



**VİTEKSİN VE VİTEKSİN YÜKLÜ TAŞIYICI
SİSTEMİN NÖROPATİK AĞRI ÜZERİNDEKİ
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Doktora Tezi

Hazal EKEN

Eskişehir 2021

**VİTEKSİN VE VİTEKSİN YÜKLÜ TAŞIYICI SİSTEMİN NÖROPATİK AĞRI
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Hazal EKEN

DOKTORA TEZİ

Farmakoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Rana ARSLAN

(İkinci Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Behiye ŞENEL)

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Haziran 2021

Bu tez çalışması BAP Komisyonunca kabul edilen 1910S157 no.lu proje kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Hazal EKEN'in "Viteksin ve viteksin yüklü taşıyıcı sistemin nöropatik ağrı üzerindeki etkilerinin araştırılması" başlıklı tezi 20/08/2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmakoloji Anabilim dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Unvanı Adı Soyadı

İmza

Üye (Tez Danışmanı):

.....

Üye:

.....

Üye:

.....

Üye:

.....

Üye:

.....

Enstitü Müdürü

ÖZET

VİTEKSİN VE VİTEKSİN YÜKLÜ TAŞIYICI SİSTEMİN NÖROPATİK AĞRI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Hazal EKEN

Farmakoloji Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Haziran, 2021

Danışman: Prof. Dr. Rana ARSLAN

(İkinci Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Behiye ŞENEL)

Viteksin, antinosisepsiyon dahil olmak üzere çeşitli farmakolojik etkiler gösterdiği bilinen ve daha önce nöropatik ağrı üzerindeki etkisi detaylı olarak çalışılmamış bir flavonoiddir. Bu tez çalışmasında, viteksin ve katı lipit nanopartiküle yüklenmiş viteksinin nöropatik ağrı üzerindeki olası etkilerinin belirlenmesi, karşılaştırılması ve bu etkinliğe serotonerjik sistemin katılımının değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Sıçanlarda kronik konstrüksiyon sinir hasarı ile indüklenen nöropatik ağrı modeli geliştirilerek, 5, 10, 20, 40 mg/kg viteksinin anti-allodinik ve antihiperaljezik etkisi değerlendirildi. Viteksinin sağladığı anti-allodinik ve antihiperaljezik aktiviteye serotonerjik sistemin katılımını incelemek amacıyla WAY-100635 (5-HT_{1A} reseptör antagonisti), ketanserin (5-HT_{2A/2C} reseptör antagonisti) ve ondansetron (5-HT₃ reseptör antagonisti) kullanıldı. Elde edilen verilere göre; uygulanan tüm dozlarda viteksin anti-allodinik etkinlik gösterirken, 5 mg/kg viteksin uygulaması haricinde antihiperaljezik etkinlik gösterdi. Buna göre seçilen 5 mg/kg viteksin ile katı lipit nanopartikül formülasyonu hazırlandı. 5 mg/kg saf viteksin ve 5 mg/kg viteksin yüklü taşıyıcı sistemin anti-allodinik ve antihiperaljezik etkileri karşılaştırıldığında ise viteksin yüklü taşıyıcı sistemin anlamlı etki gösterdiği belirlendi. Viteksinin anti-allodinik ve antihiperaljezik etkinliğine 5-HT_{1A} ve 5-HT₃ reseptör stimülasyonlarının belirgin katkı sağladığı tespit edildi.

Anahtar Sözcükler: Viteksin, Nöropatik ağrı, Serotonerjik reseptörler, Lipidik yapıdaki nanopartikül.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF VITEXIN AND VITEXIN LOADED CARRIER SYSTEM ON NEUROPATHIC PAIN

Hazal EKEN

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, June, 2021

Supervisor: Prof. Dr. Rana ARSLAN

(Co-Supervisor: Asst. Prof. Dr. Behiye ŞENEL)

Vitexin is a flavonoid known to have various pharmacological activities including antinociception and its effect on neuropathic pain has not been studied in detail before. In this thesis, it was aimed to determine the possible effects of the vitexin and vitexin loaded on solid lipid nanoparticle on neuropathic pain and to evaluate the relationship between this activity and the serotonergic system. A model of neuropathic pain induced by chronic constriction nerve injury was developed in rats. The anti-allodynic and antihyperalgesic effects of 5, 10, 20, 40 mg/kg vitexin were evaluated. WAY-100635 (5-HT_{1A} receptor antagonist), ketanserin (5-HT_{2A/2C} receptor antagonist), and ondansetron (5-HT₃ receptor antagonist) were used to examine the involvement of the serotonergic system in the anti-allodynic and antihyperalgesic activity provided by vitexin. According to the data; while vitexin showed anti-allodynic activity at all doses administered, it showed antihyperalgesic activity except for the application of 5 mg/kg vitexin. Accordingly, a solid lipid nanoparticle formulation was prepared with the selected 5 mg/kg vitexin. When the anti-allodynic and antihyperalgesic effects of 5 mg/kg vitexin and 5 mg/kg vitexin loaded carrier system were compared, it was determined that the vitexin loaded carrier system had a significant effect. It was determined that 5-HT_{1A} and 5-HT₃ receptor stimulations significantly contributed to the anti-allodynic and antihyperalgesic activity of vitexin.

Keywords: Vitexin, Neuropathic pain, Serotonergic receptors, Lipid nanoparticle.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitim sürecine ilk adım attığım andan itibaren sadece akademik değil hayata dair pek çok konuda değerli bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, yanımda olup bana yol gösteren ve üzerimde büyük emekleri olan değerli tez danışmanım Prof. Dr. Rana ARSLAN'a ve değerli hocam Doç. Dr. Nurcan BEKTAŞ TÜRKMEN'e sonsuz teşekkür ederim.

Geniş bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, tez çalışmamın olgunlaşmasında çok büyük emeği olan ve bana her zaman güler yüzü ve samimiyeti ile yaklaşan değerli ikinci tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Behiye ŞENEL'e çok teşekkür ederim.

Görüş ve önerileri ile tezimin şekillenmesine katkıda bulunan ve çalışma sürecimiz boyunca desteğini esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU'na çok teşekkür ederim.

Benim bugünlere gelmemi sağlayan, hayatımın her aşamasında bana desteğini hissettiren, beni her zaman sabırla ve anlayışla dinleyen ve yol gösteren annem Ferda EKEN'e ve kardeşim Burak EKEN'e çok teşekkür ederim.

Doktora sürecim TÜBİTAK 2211-A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programı tarafından desteklenmiştir. Burs desteği için TÜBİTAK kurumuna teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, 100/2000 YÖK Doktora Bursu desteği için T.C. Yükseköğretim Kurulu'na teşekkür ederim.

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programıyla 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.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

BAŞLIK SAYFASI.....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
KISALTMALAR DİZİNİ.....	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. KAYNAK BİLGİSİ.....	3
2.1. Nöropatik Ağrı.....	3
2.1.1. Nöropatik ağrının epidemiyolojisi	4
2.2.1. Nöropatik ağrının periferik mekanizmaları	7
2.2.1.1. Primer afferent nosiseptörlerin sensitizasyonu.....	7
2.2.1.2. Ektopik deşarjlar	8
2.2.1.4. Coupling.....	9
2.2.2. Nöropatik ağrının santral mekanizmaları	9
2.2.2.1. Spinal reorganizasyon	9
2.2.2.2. Dorsal boynuzdaki inhibitör sinapsların depresyonu (disinhibisyon).....	10
2.2.2.4. Wind-up fenomeni	10
2.2.2.5. Geniş dinamik alan (GDA) nöronlarının aktivasyonu	11
2.3. Ağrının Algılanma ve Yönetim Süreci.....	13

2.3.1. Ağrı modülasyonunda serotonerjik sistemin rolü	17
2.4. Nöropatik Ağrının Hayvan Modelleri	19
2.5. Nöropatik Ağrının Tedavisi.....	21
2.5.1. Nöropatik ağrı tedavisinde flavonoidlerin rolü	24
2.5.1.1. Viteksin	25
2.5.1.1.1. Viteksinin antiinflamatuvar etkisi.....	26
2.5.1.1.2. Viteksinin antioksidan etkisi	27
2.5.1.1.3. Viteksinin antinosiseptif etkisi	27
2.6. Gen Aktarım Sistemlerinde Kullanılan Vektörler	28
2.6.1. Kitosan	29
2.6.2. Katı lipit nanopartiküller (KLN).....	31
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	33
3.1. Kullanılan Kimyasallar.....	33
3.2. Kullanılan Cihazlar	34
3.3. Deney Hayvanları.....	35
3.4. Deney Gruplarının Oluşturulması ve İlaç uygulamaları.....	35
3.5. Deneysel Yöntemler.....	37
3.5.1. Kronik konsrüksiyon sinir hasarı (KKH)'na bağlı nöropati modelinin oluşturulması.....	37
3.6. Ağrı Eşiklerinin Değerlendirilmesi.....	37
3.6.1. Elektronik von Frey cihazı-mekanik allodini	37
3.6.2. Plantar test (Hargreaves metodu)- termal hiperaljezi.....	38
3.6.3. Aktivite kafesi	39
3.7. Formülasyon Çalışmaları	39
3.7.1. Ön formülasyon çalışmaları	<u>Sayfa</u>
3.7.1.1. Lipidik yapıdaki nanopartikül (LNP) formülasyonlarının hazırlanması	39

3.7.1.2. LNP'lere pozitif yük kazandırma.....	41
3.7.1.3. LNP'lerin kitooligosakkarid ile kaplanması	41
3.7.2. LNP'lere viteksin yüklenmesi.....	42
3.7.3. LNP'lere genetik materyal yüklenmesi	42
3.8. Karakterizasyon Çalışmaları	43
3.8.1. Partikül boyut ve dağılımı	43
3.8.2. Zeta potansiyel ölçümü	43
3.8.3. pH değeri.....	43
3.8.4. FTIR (Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi) analizleri.....	43
3.8.5. NMR analizi.....	43
3.8.6. Formülasyonlarda jel reterdasyon analizleri	44
3.8.6.1. Agaroz jel elektroforez işlemi	44
3.8.7. Serum içinde karalılık ve DNaz enzimine karşı koruyuculuk	45
3.9. Hazırlanan Sistemlerin Hücreler Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi ..	46
3.9.1. Hücre kültürü çalışmaları	46
3.9.1.1. Sitotoksisite çalışması	46
3.10. <i>İn vitro</i> Salm Çalışması	48
3.10.1. Standart eğrinin hesaplanması ve denklem oluşturulması	48
3.11. Enkapsülasyon Etkinliğinin Belirlenmesi	48
3.12. İstatiksel Analiz	49
4. BULGULAR	50
4.1. Deneysel Nöropati Gelişimi	50
4.2. Anti-allodinik Aktivitenin Değerlendirilmesi	51
4.3. Antihiperaljezik Aktivitenin Değerlendirilmesi	52
4.4. Viteksinin Anti-allodinik ve Antihiperaljezik Etkisinde Serotonerjik Sistemin Rolü	53
4.5. LNP Formülasyonlarının Karakterizasyon Çalışmaları	55

4.5.1. Partikül boyut ve dağılımı	55
4.5.2. Zeta potansiyel analizleri.....	57
4.5.3. pH Değerleri.....	58
4.5.5. FTIR analizleri	59
4.5.6. NMR analizleri	62
4.5.7. Jel Reterdasyon analizleri	64
4.5.8. Serum içinde kararlılık ve DNaz enzimine karşı koruyuculuk.....	65
4.6. Sitotoksosite Analizleri	67
4.7. <i>İn vitro</i> Salım Analizleri	70
4.8. Viteksin İçeren Formülasyonun Anti-allodinik Aktivitenin Değerlendirilmesi	74
5. TARTIŞMA	77
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	88
KAYNAKÇA	89
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1. Nöropatik ağrı mekanizmaları, semptomları ve terapötik girişimler için olası hedefler.....	6
Tablo 2.2. Nöropatik ağrı için geliştirilmiş modeller.....	20
Tablo 2.3. Nöropatik ağrı için farmakoterapi.....	23
Tablo 3.1. Lipidik ve kitooligosakkarid kaplı formülasyonların kodları ve kullanılan miktarları.....	40
Tablo 4.1. Formülasyonların partikül boyutu ve dağılımı, zeta potansiyel ve pH değerleri.....	58
Tablo 4.2. Viteksin standart eğrisi çizilirken kullanılan konsantrasyon ve absorbans değerleri.....	71

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Nöropatik ağrının patofizyolojik mekanizmaları.....	12
Şekil 2.2. Çıkıcı ağrı yolları ve inisiyasyon yolları.....	16
Şekil 2.3. Periferden beyine nörotransmisyon yolları.....	17
Şekil 2.4. Viteksinin kimyasal yapısı.....	25
Şekil 2.5. Kitin ve kitosanın kimyasal yapıları.....	30
Şekil 4.1. Elektronik von Frey testte nöropatik ağrı gelişimi.....	50
Şekil 4.2. Plantar testte nöropatik ağrı gelişimi.....	50
Şekil 4.3. Viteksinin anti-allodinik etkisinin değerlendirilmesi.....	51
Şekil 4.4. Viteksinin antihiperalezik etkisinin değerlendirilmesi.....	52
Şekil 4.5. Viteksinin anti-allodinik ve antihiperalezik etkisinde 5-HT _{2A/2C} reseptörünün rolü.....	53
Şekil 4.6. Viteksinin anti-allodinik ve antihiperalezik etkisinde 5-HT ₃ reseptörünün rolü.....	54
Şekil 4.7. Viteksinin anti-allodinik ve antihiperalezik etkisinde 5-HT _{1A} reseptörünün rolü.....	54
Şekil 4.8. Dynasan 114 (A), viteksin (b), kitooligosakkarit (c), fiziksel karışım (D), F11 (E) ve F12 (F)'ye ait FTIR spektrumları	60
Şekil 4.9. Viteksin, Dynasan 114, kitooligosakkarit, F11 ve F12'ye ait ¹ H-NMR spektrumları.....	63
Şekil 4.10. F12 formülasyonunun DNA bağlanma jel görüntüsü.....	64

Şekil 4.11. F12 formülasyonunun serum varlığında zaman içerisinde DNA üzerindeki etkisinin jel görüntüsü.....	65
Şekil 4.12. F12 formülasyonun DNAz varlığında formülasyon üzerindeki etkisinin jel görüntüsü.....	66
Şekil 4.13. Saf viteksinin NIH-3T3 hücrelerinde 24-48 saat inkübasyon sonrası hücre canlılığı üzerindeki etkisi.....	67
Şekil 4.14. F7 formülasyonunun 24-48 saat inkübasyon sonrasında NIH-3T3 hücrelerinde hücre canlılığı üzerindeki etkisi.....	68
Şekil 4.15. F8 formülasyonunun 24-48 saat inkübasyon sonrasında NIH-3T3 hücrelerinde hücre canlılığı üzerindeki etkisi.....	68
Şekil 4.16. F10 formülasyonunun 24-48 saat inkübasyon sonrasında NIH-3T3 hücrelerinde hücre canlılığı üzerindeki etkisi.....	69
Şekil 4.17. F11 formülasyonunun 24-48 saat inkübasyon sonrasında NIH-3T3 hücrelerinde hücre canlılığı üzerindeki etkisi.....	69
Şekil 4.18. F12 formülasyonunun 24-48 saat inkübasyon sonrasında NIH-3T3 hücrelerinde hücre canlılığı üzerindeki etkisi.....	70
Şekil 4.19. Viteksine ait standart eğri.....	71
Şekil 4.20. Saf viteksin ve F12 formülasyonundan viteksinin in vitro salım deneyi grafiği.....	73
Şekil 4.21. Viteksinin ve viteksin içeren formülasyonun anti-allodinik etkisinin değerlendirilmesi.....	74
Şekil 4.22. Viteksinin ve viteksin içeren formülasyonun antihiperalezik etkisinin değerlendirilmesi.....	75

Şekil 4.23. Viteksin ve viteksin içeren formülasyonun nöropatik ağrılı gruplarında lokomotor aktivite üzerine etkisi.....	76
--	----



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%MPE	: Maksimum olası etkinin yüzdesi
5-HT	: Serotonin
6-OHDA	: 6-hidroksidopamin
ANOVA	: Varyans analizi
ASP	: Antisolvent çökeltme
A β	: A-beta
A δ	: A-delta
cAMP	: Siklik adenzin monofosfat
CGRP	: Kalsitonin gen ilişkili peptit
CMC	: Karboksimetil selüloz
DDAB	: Didodesildimetilamonyum bromid
DDAB	: Dimetildioktadesilamonyum bromür
dk	: Dakika
DKM	: Diklorometan
DLS	: Dinamik ışık saçılımı
DMEM	: Dulbecco's modified Eagles medium
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DOGS	: Dioktadesil amidoglisil spermin
DOPC	: Dioleoil fosfatidilkolin
DOPE	: Dioleil fosfatidiletanolamin
DOSPA	: N, N-dimetil-1-propanaminyum- trifluoroasetat

DOTAP	: 1,2-dioleol trimetil amonyum propan klorür
DOTMA	: N, N, N-trimetil-2,3-bis(z-oktadek-9-eniloksi)-1-propanaminyum klorür
DSC	: Diferansiyel taramalı kalorimetre
E	: Elektroforetik hareketlilik
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
EE	: Enkapsülasyon etkinliği
EMCS	: Epidural motor korteks stimülasyonun
FBS	: Fetal bovin serum
FTIR	: Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi
GABA	: Gama-aminobütirik asit
GC	: Gaz kromatografisi
GDA	: Geniş dinamik alan
gf	: Gram force
GFP	: Green Fluorescence Protein
GlcNAc	: N-asetil- β -d-glukozamin
HIV	: İnsan immün yetmezlik virüsü
HPH	: Yüksek basınçlı homojenizasyon
IASP	: Uluslararası ağrı araştırmaları topluluğu
IC50	: Yarı-maksimum inhibisyon konsantrasyonu
i.p.	: İntraperitoneal
KKH	: Kronik konstrüksiyon sinir hasarına
KLN	: Katı lipid nanopartikül
KOS	: Kitoooligosakkarit
LPN	: Lipidik yapıdaki nanopartikül

MAPK	: Mitojen tarafından aktive edilmiş protein kinaz
MLV	: Mürin lösemi virüs
MPS	: Ortalama partikül boyutunu
mRNA	: Mesajcı RNA
MS	: Kütle spektrometresi
MTT	: 3-[4,5-dimetiltriazol-2-il]-2,5- difeniltetrazolium bromür
MVL	: Çok veziküllü lipozomlar
n	: Gruptaki deney hayvanı sayısı
NA	: Noradrenalin
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NMDA	: N-metil-D-aspartat
NMR	: Nükleer manyetik rezonans
NO	: Nitrik oksit
PAG	: Periaquaduktal gri madde
PBQ	: Fenil-p-benzokinon
PDI	: Partikül boyut dağılımı
PEG	: Polietilen glikol
PEI	: Polietilenimin
PGE2	: Prostaglandin E2
PLA	: Poli (D, L- laktit)
PLGA	: Poli(D,L- laktit-ko-glikolit
RNA	: Ribonükleik asit
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu

SNRI	: Serotonin-noradrenalin geri-alım inhibitörü
SSRI	: Selektif serotonin geri-alım inhibitörü
SUV	: Küçük tek katlı veziküller
TAE	: Tris asetik asit etilen diamin tetra asetat
TRPV1	: Geçici reseptör potansiyel vanilloid 1
TSA	: Trisiklik antidepresanlar
XRD	: X-Işını kırınım yöntemi
XRPD	: X-ışını toz kırınımı
ϵ	: Çözücünün dielektrik sabiti
ζ	: Zeta potansiyeli
η	: Dispersiyon ortamının viskozitesi

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Genel popülasyonda görülme sıklığı %7-8'lere ulaşan nöropatik ağrı; hiperaljezi, allodini, hiperestezi, hipoestezi, dizestezi, parestezi ve hiperpati gibi semptomları nedeni ile hastaların hayatını olumsuz yönde etkileyerek insanları hekime başvurmaya yöneltip sağlık hizmetlerinde yüklü masraflara yol açmaktadır (Yücel ve Çimen, 2005; Colloca vd., 2017; Bouhassira, 2019). Antidepresanlar ve antiepileptikler, nöropatik ağrının tedavisinde en sık tercih edilen ilaç gruplarıdır (Collaca vd, 2017; Obata, 2017). Bu ilaç gruplarının yanı sıra nöropati tedavisinde kullanılan çok sayıda ilaç bulunmasına rağmen, mevcut ilaçların yan etkileri ve/veya etkilerindeki sınırlılıktan dolayı yeni ilaç araştırma ve geliştirme çalışmaları devam etmektedir (Serpell, 2008).

Yapılan çalışmalar, flavonoidlerin nöropatik ağrının tedavisinde başarılı olabileceğine işaret eden çeşitli farmakolojik aktivitelere sahip olduğunu göstermektedir (Quintans vd; 2014). Ancak flavonoidlerin düşük çözünürlükleri, karasızlıkları, düşük emilim ve hızlı metabolizma özellikleri kullanımlarını kısıtlamaktadır (Thilakarathna vd., 2013; Cassidy vd. 2017; Roy vd., 2019). Bununla birlikte nanoteknoloji kullanılarak geliştirilen nano taşıyıcılar ile kapsülleme flavonoidlerin bu dezavantajlarını azaltarak biyoyararlanımlarını arttırabilmektedir (Khan vd., 2019; Roy vd., 2019; Dobrzynska vd., 2020). Flavonoid yüklü nanopartiküllerin hazırlanması çözünürlüğü arttırması, yan etkileri azaltması ve uzun süreli kullanılabilirlik sağlaması nedeniyle önemli bir araştırma konusudur. Ayrıca, gen terapileri kendine özgü avantaj ve dezavantajları ile birlikte kanser ve enfeksiyon hastalıklarına olduğu gibi mevcut ağrı tedavilerine de uygun bir alternatif olarak ortaya çıkmıştır (Vega-Loza vd., 2020). Genetik materyal aracılığı ile hastalıkların veya belirtilerinin iyileştirilmesi için kullanılan gen terapisi, modern tıbbı yirmi yıl öncesine kadar düşünilemeyen yeni bakış açıları kazandırmıştır (Mali, 2013). Dolayısıyla hastalıkların tedavisi için büyük umut vaat eden gen terapisi üzerine de araştırmalar devam etmektedir.

Son zamanlarda antimikrobial, antiviral, antispazmodik, antitümoral, antihipertansif, antidepresan, antiinflamatuvar, antioksidan, nöroprotektif ve kardiyoprotektif etkileri ile dikkat çeken bir flavonoid olan viteksinin olası analjezik etkisinin araştırılması üzerine yoğunlaşmıştır (Zhu vd., 2016; He vd., 2016; Venturini vd., 2018). Ağrı tedavisinde etkili olduğu sınırlı sayıda çalışma ile gösterilen viteksinin, özellikle akut ağrı modellerinde dikkat çekici bir şekilde antinosiseptif etki açığa

çıkarmıştır (Özkay ve Can, 2013). Akut ağrıda etkisi gösterilen viteksinin, daha karmaşık mekanizmaların rol aldığı nöropatik ağrı tedavisinde de başarılı olabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte, viteksinin analjezik etkisine aracılık eden çeşitli mekanizmalar gösterilmiş olsa da ağrı modülasyonunda rol aldığı bilinen çok sayıda mekanizma mevcuttur. Dolayısıyla viteksinin antinosiseptif etkisine eşlik eden farklı mekanizmaların da olabileceği ön görülmektedir.

Çok uzun zamandır ağrı modülasyonunda rol aldığı bilinen serotonin reseptörleri, antinosiseptif etki için yapılan mekanizma çalışmalarında oldukça sık tercih edilen hedeflerdir (Sommer, 2010; Viguiet vd., 2013). Serotonin reseptörleri; konumlarına, antagonist veya agonist dozuna ve uygulama yoluna, ağrı tipine ve süresine bağlı olarak pronosiseptif veya antinosiseptif etkiye aracılık edebilmektedir (Cortes-Altamirano vd., 2017). Nitekim; HT_{1A}, 5-HT_{1B} ve 5-HT₃ reseptörlerinin aktivasyonunun ağrı iletimini baskıladığını (Kayser vd., 2007; Viguiet vd., 2013; Cortes-Altamirano vd., 2017; Tao vd., 2019), 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C} ve 5-HT₇ reseptör alt tiplerinin ise hem pronosiseptif hem de antinosiseptif etkiye aracılık ettiğini gösteren farklı çalışmalar bulunmaktadır (Viguiet vd., 2013; Cervantes-Durán vd., 2016; de Oliveria vd., 2017).

Bu bilgilerden hareketle bu tez çalışmasında, viteksin ve viteksin içeren taşıyıcı sistemin nöropatik ağrı üzerindeki muhtemel etkisinin değerlendirilmesi ve bu etkinin serotonerjik sistem ile bağlantısının araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla; kronik konstrüksiyon sinir hasarı (KKH) ile nöropati geliştirilen deney hayvanlarında intraperitonel (i.p.) olarak uygulanan 5, 10, 20, 40 mg/kg viteksinin olası anti-allodinik etkisinin elektronik von Frey cihazı ile, antihiperalezik etkisinin ise plantar test (Hargreaves's Metodu) ile değerlendirilmesine ve referans ilaç olarak 30 mg/kg pregabalin ile karşılaştırılmasına karar verilmiştir. Viteksinin aracılık ettiği anti-allodinik ve antihiperalezik etkiye 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A/2C} ve 5-HT₃ reseptörlerinin katkısı sırasıyla WAY-100635, ketanserin ve ondansetron kullanılarak araştırılmıştır. Ayrıca tez çalışmaları kapsamında viteksin ve genetik materyal için taşıyıcı sistem olarak lipidik nanopartiküller hazırlanması ve geliştirilen formülasyonun hücre canlılığı üzerindeki etkilerinin de göz önünde bulundurularak nöropatik ağrı üzerine sağlayabileceği avantajların *in vivo* deneylerde değerlendirilmesi planlanmıştır.

2. KAYNAK BİLGİSİ

2.1. Nöropatik Ağrı

Ağrı, fizyolojik sistemde ters giden bir şeyler olduğunda, vücudu potansiyel bir zarardan kurtarmak için çalışan bir alarm sistemi gibi davranarak bilinçsizce doku hasarının farkına varılmasına aracılık etmektedir. (Aydın, 2002). Çok çeşitli şekillerde sınıflandırılabilen ağrı, süre dikkate alınarak kronik ve akut ağrı olarak sınıflandırılmaktadır (Fürst, 1999; Millan, 1999). Kronik ağrı, vücut için koruyucu bir alarm sistemi olmaktan çıkmış, uykuyu ve normal yaşamı oldukça rahatsız eden ve 3-6 aylık bir dönemden sonra hale devam eden ağrıdır (Berry vd, 2001). Kronik ağrı; doku hasarından kaynaklanan osteoartrit gibi ‘nosiseptif ağrılar’, somatosensoriyel sistem hasarından kaynaklı ‘nöropatik ağrı’ ve nosiseptif ve nöropatik ağrının birlikte seyrettiği ‘mikst ağrı’ olmak üzere üç başlık altında sınıflandırılmaktadır (Baron vd, 2010).

Nöropatik ağrı tanımını ilk kez Mitchell (1872), Amerika Birleşik Devletleri iç Savaşı sırasında travma sonrası ağrı şikayetinde bulunan hastaları için kullanmıştır (Zimmermann, 2001). Günümüzde hala mekanizması tam olarak aydınlatılamayan nöropatik ağrı ancak 1994 yılında, Uluslararası Ağrı Araştırmaları Topluluğu (IASP) tarafından “sinir sistemindeki primer bir lezyon ya da disfonksiyon sonucu ortaya çıkan ağrı” olarak sistematik bir şekilde tanımlanabilmiştir (Merskey ve Bogduk,1994). Ancak bu tanım yetersiz kalmış ve nöropatik ağrı tanımı, 2008 yılında IASP tarafından yapılan “somatoduyusal sistemi etkileyen bir lezyon ya da hastalığın direkt sonucu olarak ortaya çıkan ağrı” şekliyle günümüzde en çok kabul gören halini almıştır (Merskey ve Bogduk,1994; Bennett, 2010).

Karpal tünel sendromu ve vertabral disk hernisi gibi mekanik sinir hasarının olduğu rahatsızlıklar, diyabet gibi metabolik hastalıklar, herpes zoster, insan immün yetmezlik virüsü (HIV) gibi nörotropik viral hastalıklar, kemoterapi gibi nörotoksisiteye yol açan etkenler, multiple skleroz gibi immünolojik ve inflamatuvar mekanizmaları içeren rahatsızlıklar nöropatik ağrıya yol açabilmektedir (Zimmermann, 2001; Jaggi vd; 2011; Baron vd., 2010; Colloca vd., 2017). Ayrıca tarokotomi (göğüs kafesinin cerrahi girişimle açılması), herniorafi (fitiğe neden olan gevşek duvarı dikişlerle sağlamlaştırma ameliyatı), mastektomi (memenin herhangi bir rahatsızlık nedeniyle alınması) ve sternotomi (sternumun kırıldığı bir cerrahi işlem türü) gibi cerrahi girişimler sonrasında nöropatik ağrı gelişebilmektedir (Jaggi vd; 2011). Nöropatik ağrıya yol açan durumlar

periferal ve santral nedenler olarak sınıflandırılabilir. Trigeminal nevralji, postherpetik nevralji, ağırlı diyabetik nöropati, alkol kullanımı ve kemoterapiye bağı polinöropatiler, vasküler hastalıklar, beslenme bozuklukları periferal nedenler arasında yer alırken (Woolf, 1993; Yücel ve Çimen, 2005); inme, multiple skleroz, spinal kord hasarı ve tümörler ise nöropatik ağrıya yol açan santral nedenler arasında bulunmaktadır (Yücel ve Çimen, 2005).

2.1.1. Nöropatik ağrının epidemiyolojisi

Epidemiyoloji, nöropatik ağrının yönetim ve önlenme stratejilerinin geliştirilmesi ve değerlendirilmesine olanak sağlayan önemli klinik araçlar arasında yer almaktadır (Smith ve Torrance, 2012). Ancak, uzun bir dönem nöropatik ağrı için epidemiyolojik çalışmaların ihmal edilmiş olması ve anketlerde kullanılabilecek kesin tanı kriterlerinin bulunmaması nedeniyle hastalığın insidansı ve prevalansı hakkında güvenilir bilgi bulmak zordur. Mevcut bilgiler çoğunlukla belirli etiyolojilerle ilgili hasta kohortlarındaki çalışmalara dayanmaktadır ve genel popülasyonda nöropatik ağrının prevalansını araştıran az sayıda çalışma bulunmaktadır (Colloca vd., 2017). Bu çalışmalardan biri, prevalansın genel popülasyonda %7-8, kronik ağırlı hastalar arasında %20-25'e kadar çıktığını göstermektedir. Hasta kohortlarda yapılan çalışmalar ise nöropatik ağrı olgularının postherpetik nevralji durumuyla %8-10, diyabetik polinöropati ile %14-26, cerrahi işlem nedeniyle %10-50, multiple sklerozla ilişkili %20-30, omur ilik yaralanması nedeniyle %30-40, inmeye nedeniyle %5-11 ve kansere bağı olarak %17-19 prevalans ile ortaya çıktığını göstermektedir (Bouhassira, 2019). Türkiye'de üniversite hastanelerine başvuran diyabetik hastalardan %40,4'nün diyabetik periferal nöropatiye sahip olduğu ve bu popülasyonda nöropatik ağrı prevalansının %14 olduğu tespit edilmiştir (Erbaş vd., 2011). Çok merkezli olarak yürütölen bir çalışmada nöropatik ağrının kadınlarda (%8) erkeklere (%5,7) göre, 50 yaş üstü hastalarda (%8,9) 49 yaş ve altına göre daha yaygın olduğu ve ağrının baş, sırt ve alt ekstremitelerde daha sık göröldüğü belirtilmektedir (Colloca vd., 2017). Bir diğeri epidemiyolojik çalışmada kadınlarda, yaşlılarda, sosyoekonomik olanakları kısıtlı olan bireylerde, daha çok el gücünü kullanarak çalışanlarda ve genel sağık durumu iyi olmayan kişilerde nöropatik ağrıya daha sık rastlandığı gösterilmiştir. Sonuç olarak epidemiyolojik çalışmalar hastalığın risk faktörlerinin belirlenmesi, tedavisi ve hatta hastalığın önüne geçilmesi için oldukça önemli bilgiler sunmaktadır (Smith ve Torrance, 2012).

2.1.2. Nöropatik ağrının klinik belirtileri

Nöropatik ağrısı olan birçok hastada bir uyarandan bağımsız olarak gelişen kalıcı veya ani ve geçici krizler halinde gelen ağrı görülür. Hastalar bu ağrıyı genellikle iğnelenme/karıncaalanma, yanıcı, zonklayıcı, batıcı şeklinde şikayetler ile tanımlamaktadır (Woolf ve Mannion, 1999; Collaca vd., 2017). Nöropatik ağrı, hiperaljezi (ağrı yapan uyarana karşı aşırı yanıt), allodini (normalde ağrıya neden olmayacak bir uyarıya cevap olarak ağrı oluşumu), hiperestezi (duyusal uyarana karşı anormal duyarlılık), hiperpati (tekrarlanan uyarılara bağlı olarak ağrı eşiğinin düşmesiyle birlikte abartılı ağrı hissi), hipoestezi (dokunma duyusunun azalması veya kaybolması), parestezi (spontan veya bir uyarıya bağlı olarak ortaya çıkan hoş olmayan deri hissi, uyuşukluk) ve dizestesi (hoş olmayan, anormal his) ile karakterizedir (Besson, 1999; Aydın, 2002; Yücel ve Çimen, 2005; Bouhassira, 2019). Nöropatik ağrıyla karakterize bu belirtiler negatif ve pozitif semptomlar olarak sınıflandırılabilir. Dizestezi, parestezi, ağrı atakları, devamlı hal alan yüzeysel ağrı, hiperaljezi ve allodini gibi ağrı verici belirtiler nöropatik ağrının pozitif semptomları arasında yer almaktadır. Negatif semptomlar ise hipoestezi, termal hipoestezi ve duyu ve güç kaybı gibi ağrı verici olmayan ancak rahatsız edici belirtileri içermektedir (Nickel vd., 2012).

Nöropatik ağrının tedavisini sağlamak için öncelikli adım doğru tanıyı koymak yani nöropatik ağrıyı diğer ağrı türlerinden ayırt etmektir. Yukarıda belirtilen semptomlar ayırıcı tanı kriterleri olarak kullanılabilir. Bununla birlikte nosiseptif ağrının tedavisinde kullanılan geleneksel ağrı kesicilerin nöropatik ağrı tedavisinde yetersiz kaldığı bilgisi de hastanın tıbbi geçmişinden faydalanılarak tanı konulmasına yardımcı olmaktadır (Yücel ve Çimen, 2005; Baron vd., 2010). Anket şeklinde tarama testleri, duyu sistemini detaylı incelemeye fırsat veren bazı özel testler (Yücel ve Çimen, 2005), elektrofizyolojik teknikler ve sinir biyopsi örnekleri, nöronal fonksiyonda meydana gelen zayıflamanın değerlendirilmesine ve nöropatinin derecesini belgelemeye yardımcı olabilir (Baron vd., 2010).

2.2. Nöropatik ağrının patofizyolojisi

Her ne kadar mevcut çalışmalar nöropatik ağrı hakkındaki bilgilerimizi genişletmiş olsa da patofizyolojisi hala tam olarak aydınlatılamamıştır. Nosiseptif ağrı, nosiseptör adı verilen primer afferent nöronların aktivasyonu ve doku hasarı sonucu periferik sinir sisteminde açığa çıkan inflamatuvar yanıttan kaynaklanmaktadır. Birçok yönden

nosiseftif ağrıdan farklı olan nöropatik ağrının ise, periferik ve merkezi sinir sistemini etkileyen çeşitli fizyopatolojik mekanizmaların neden olduğu ağrı iletiminde artmış duyarlılıktan kaynaklandığını düşünülmektedir (Pasero, 2004). Periferik ve santral mekanizmalardan gelişen ve genelde tedavisinde nosiseptif ağrı tedavisinde kullanılan ilaçların yetersiz kaldığı nöropatik ağrı beraberinde gelişen semptomlar çoğunlukla heterojendir ve tek bir mekanizma ile açıklanamamaktadır. Buna rağmen, mekanizma bazlı tedavi rejimlerinin etkili analjezinin sağlanmasına yardımcı olabileceği düşüncesiyle nöropatik ağrının patofizyolojisinin tam olarak anlaşılabilmesi için yapılan araştırmalar günümüzde hala önemini korumaktadır (Berker, 2005). Tablo 2.1’de nöropatik ağrı mekanizmaları, semptomları ve terapötik girişimler için olası hedefler özetlenmiştir.

Tablo 2.1. Nöropatik Ağrı Mekanizmaları, Semptomları ve Terapötik Girişimler İçin Olası Hedefler (Baron, 2006, s. 98.)

SEMPTOM	MEKANİZMA	HEDEFLER
Spontan ağrı (Zonklama)	Ektopik impuls üretimi Dorsal kök gangliyonlarından çeşitli nörotransmitterlerin salınımı	Na ⁺ kanalları
	Periferal nosiseptör sensitizasyonu Sinirlerde inflamasyon Sitokin salınımı	Sitokinler
Spontan ağrı	Santral dorsal boynuz hipereksitabilitesi Spinal seviyede santral sensitizasyon Devamlı C liflerine artmış sinaptik iletim C-lif girdisi amplifikasyonu A β girdisinin A δ girdisinin kapılanması	Presinaptik: μ reseptörler Ca ⁺⁺ kanalları Post-sinaptik: NMDA reseptörleri NK-1 reseptörleri Na ⁺ kanalları İntraselüler kaskadlar
Spontan ağrı	GABAerjik Supraspinal inisi modülasyonda değişiklikler İnhibitör kontrol	GABAB reseptörleri μ reseptörleri α_2 reseptörler ve 5-HT reseptörler

????

Tablo 2.1. (Devam) *Nöropatik Ağrı Mekanizmaları, Semptomları ve Terapötik Girişimler İçin Olası Hedefler* (Baron, 2006, s. 98.)

	Santral dorsal boynuz hipereksitabilitesi	Presinaptik:
	Spinal seviyede santral sensitizasyon	μ reseptörler
	Devamlı C liflerine artmış sinaptik iletim	Ca^{++} kanalları
Dinamik mekanik	C-lif girdisi amplifikasyonu	Post-sinaptik:
allodini	A β girdisinin kapılanması	NMDA reseptörleri
ve	A δ girdisinin kapılanması	NK-1 reseptörleri
noktasal mekanik		Na^+ kanalları
hiperlajezi	İntraspinal inhibitör internöron azalması	GABAB reseptörler
	GABAerjik, Opioiderjik	μ -reseptörler
	Supraspinal inisi modülasyonda değişiklikler	α_2 reseptörler ve
	İnhibitör kontrol	5-HT reseptörler

5-HT: Serotonin, ASIC: Aside duyarlı iyon kanalı, GABA: Gama-aminobütirik asit, NA: Noradrenalin, NK-1: Nörokinin 1, NMDA: N-metil-D-aspartat, SMP: Sempatik aracılı ağrı, TRPV1: Geçici reseptör potansiyel vanilloid 1, TRPM8: Geçici reseptör potansiyel melastatin kanal ailesi

2.2.1. Nöropatik ağrının periferik mekanizmaları

Periferik nöropatik ağrı, periferik sinir sistemindeki lezyon veya disfonksiyon ile karakterizedir. Bu lezyon; travma, metabolik bozukluklar, beslenme bozukluğu, sitotoksik ajanlar, iskemi ve inflamasyon gibi nedenlerle, periferik bir sinirde, dorsal kök gangliyonunda veya dorsal kökte oluşabilmektedir. Bu faktörler, primer duyu nöronunun aksonunda, hücre gövdesinde veya merkezinde hasara yol açmaktadır (Woolf, 2004). Periferik sensitizasyona yola açan mekanizmalar şu şekildedir;

2.2.1.1. Primer afferent nosiseptörlerin sensitizasyonu

Periferik sinir sisteminde meydana gelen sinir hasarını takiben, aksiyon potansiyelinin antidromik yani fizyolojik iletim yönünün tersi yönde iletilmesi sonucu yaralanan veya hasarsız sinir uçlarından duyarlılığa yol açan bradikinin, prostaglandin, serotonin, noradrenalin (NA), lökotrienler ve sitokinler gibi inflamatuvar mediyatörlerin salıverilmesi gerçekleşmektedir (Pasero, 2004; Serpell, 2008).

Böylelikle, primer afferent nosiseptörlerin aktive olması için gerekli eşğin düşmesi, termal ve mekanik uyarılara ve spontan deşarjlara verilen yanıtların artmasıyla

sensitizasyon gelişmektedir (Berker, 2005; Serpell, 2008). Periferalsensitizasyonun primer hiperaljeziden sorumlu olabileceği düşünülmektedir (Serpell, 2008).

2.2.1.2. Ektopik deşarjlar

Primer afferent nöronlarda sensitizasyon sonucu spontan patolojik aksiyon potansiyelleri oluşmaktadır. Herhangi bir dış uyaran yokken nosiseptif yolakta meydana gelen ektopik dürtüler sonucu spontan ve paroksizmal ağrılar açığa çıkabilmektedir. Bu ektopik aktivitelere, ağrılı diyabetik nöropatili hastalarda ve fantom ağrısı olan hastalarda yapılan mikronörografi testlerinde rastlanılmıştır. Fizyolojik koşullarda nosiseptör A-delta ($A\delta$) ve C liflerinin aktivasyonu termal, mekanik ve kimyasal uyaran ile hasar görmüş dokuya işaret ederken, nöropatik ağrıda bu koşullar önemli ölçüde değişmiştir ve bu liflerde ektopik aktivasyonlar görülmektedir. Periferik lezyon sonucunda voltaj kapılı sodyum (Na^+) kanallarının üretiminden sorumlu mesajcı ribonükleik asit (mRNA) seviyelerinin yükselmesi ile ilişkili olarak Na^+ kanallarının ekspresyonu artmaktadır (Serpell, 2008; Baron vd., 2010). Özetle, Nav1.3 ve Nav1.8 gibi voltaj kapılı Na^+ kanallarının ve voltaja bağlı kalsiyum (Ca^{++}) kanallarının yukarı-regülasyonu, potasyum (K^+) kanallarının aşağı-regülasyonu aksiyon potansiyelinin uyarılma eşiğini düşürmekte ve ektopik deşarjlar oluşturmaktadır (Woolf, 2004; Serpell, 2008; Baron vd., 2010). Sinir hasarı ayrıca sağlam C liflerinde geçici reseptör potansiyel vanilloid 1 (TRPV1) seviyesinde artışa neden olur ve böylelikle hücre içi sinyal iletiminde ısıya karşı hassasiyet gelişmektedir. Bu mekanizma, hastalarda yanıcı ağrıyla birlikte gelişen ısı hiperaljezisinden de sorumlu tutulmaktadır (Baron vd., 2010). Sonuç olarak ektopik deşarjların parestezi, dizestezi ve yanıcı ağrıya yol açabileceği düşünülmektedir (Woolf, 2004).

2.2.1.3. Nöropeptidlerin ekspresyonunda fenotipik değişimler

Periferik sinir hasarı, transkripsiyon seviyesinde önemli değişimlere yol açarak yaşamsal faktörleri kontrol eden genleri, rejenerasyondan sorumlu genleri ve nöronların işlevlerini düzenleyen genleri içeren çok çeşitli genin seviyelerinde artış veya azalışa yol açmaktadır. Bazı değişiklikler ise nöropeptitlerin ekspresyonunda fenotipik değişikliklere neden olmaktadır. Örneğin, periferik lezyon gelişiminden sonra beyin kaynaklı nörotropik faktör ve P maddesi C liflerinin yanı sıra $A\delta$ liflerinde de ekspresyon edilmektedir (Woolf, 2004). Ayrıca fenotipik değişim olarak bilinen A-beta ($A\beta$)

liflerinin nöropeptit ekspresyonuna başlaması durumu sonucu sinir sistemi hücrelerinin uyarılabilirliğinde artış gözlenmektedir (Serpell, 2008).

2.2.1.4. Coupling

Coupling, dorsal kök gangliyonlarında ve periferde direkt elektriksel bağlantıyla veya adrenerjik reseptörler aracılığıyla kimyasal bağlantıyla açığa çıkmaktadır. Kısmi sinir hasarını takiben hasarlı aksonda veya komşu aksonda α -adrenoseptörler seviyesinde artış gözlenmektedir. Bu değişim, bazı hastalarda gözlenen katekolaminlere bağlı ağrı hassasiyetinde artış durumunu açıklamaktadır (Serpell, 2008). Çünkü, hasarlı veya sağlam aksonlarda artan α -adrenoseptörler adrenalin ve NA'e duyarlıdır ve bunun sonucunda sempatik efferentler ve duysal afferentler arasında bağlantı kurulmaktadır (Berker, 2005; Baron vd., 2010).

2.2.2. Nöropatik ağrının santral mekanizmaları

Periferik mekanizmalar tek başına nöropatik ağrının tüm semptomlarını açıklamakta yetersiz kalır, santral mekanizmaların da nöropatik ağrının gelişmesinde kritik rol oynadığı bilinmektedir (Pasero, 2004). IASP, santral duyarlılığı "santral sinir sisteminde bulunan nosiseptif nöronların normal veya düşük eşikli afferent girdilere karşı artan sensitizasyonu" olarak tanımlamaktadır. Nöropatik ağrı gibi sürekli ve yeterli yoğunlukta devam eden nosiseptif girdiler santral sensitizasyona yol açmaktadır (Meacham vd., 2017). Santral sensitizasyona aracılık eden mekanizmalar şu şekildedir;

2.2.2.1. Spinal reorganizasyon

Tekrarlanan aşırı stimülasyon sonucu omurilikte önemli bazı değişimler gerçekleşmektedir. Normal fizyolojik koşullarda farklı tiplerdeki primer afferent nöron lifleri dorsal boynuzun spesifik katmanlarında sonlanmaktadır. Genel olarak, A δ ve C lifleri dorsal boynuzda lamina I ve II'de sonlanırken, A β lifleri lamina III ve IV'te sona ermektedir (Bridges vd., 2001). Periferik sinir hasarını takiben A β liflerinin lamina II'ye filizlenmesi sonucu ağrısız uyaranlar nosiseptif olarak algılanmaya başlamaktadır (Bridges vd., 2001; Harden, 2005; Serpell, 2008). Sıçan omurilik kesitindeki dorsal boynuz nöronları üzerinde yapılan elektrofizyolojik çalışmalar bu mekanizmanın allodiniye yol açtığını göstermiştir, bu nedenle allodinin açıklanmasında spinal reorganizasyonun muhtemelen önemli bir yere sahip olduğu düşünülmektedir (Bridges vd., 2001; Serpell, 2008).

2.2.2.2. Dorsal boynuzdaki inhibitör sinapsların depresyonu (disinhibisyon)

Nöronlar üzerindeki inhibitör ve eksitator etkilerin dengesi, santral sinir sisteminde iletişimin düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir. Eksitasyonda artış veya inhibisyonunda azalma dengeyi ağrı hissi olarak ortaya çıkabilen uyarılabilirlikte artışa kaydırmaktadır. Gama-aminobütirik asit (GABA) ve glisin aracılı inhibisyonun baskılanması allodiniye ve nöropatik ağrıya çok benzer bir ağrı duyarlılığına yol açmaktadır (Woolf, 2004). GABAerjik yolağın etkinliğinde gerçekleşen azalma santral duyarlılığa sebep olmaktadır (Bridges vd., 2001). Periferel sinir lezyonlarının oluşmasından sonra, omur ilik boynuzunda GABAerjik nöronların inhibitör etkisinin zayıflaması ve opioidderjik reseptörlerin aşağı regülasyonu ile mekanik ve termal hiperaljezi açığa çıkmaktadır (Serpell, 2008; Baron vd, 2010).

2.2.2.3. Ektopik aktivite

Primer afferent nöronların uyarılmasının ardından başlıca glutamat olmak üzere çeşitli eksitator aminoasitlerin transmisyonunda meydana gelen artış santral sensitizasyona yol açmaktadır (Bridges vd., 2001). Ağrılı nöropatilerde, iyonotropik ve metabotropik glutamat reseptörleri eksitator post sinaptik potansiyel frekansında artışa neden olmakta ve hipereksitabilite açığa çıkarmaktadır (Meacham vd., 2017). Ayrıca glutamatın, NMDA reseptörleri aracılığı ile hipokampusta sinaptik iletimi güçlendirerek, fantom uzuv ağrısında belirgin gözlenen ağrı hafızasının oluşumundan sorumlu olabileceği düşünülmektedir (Harden, 2005).

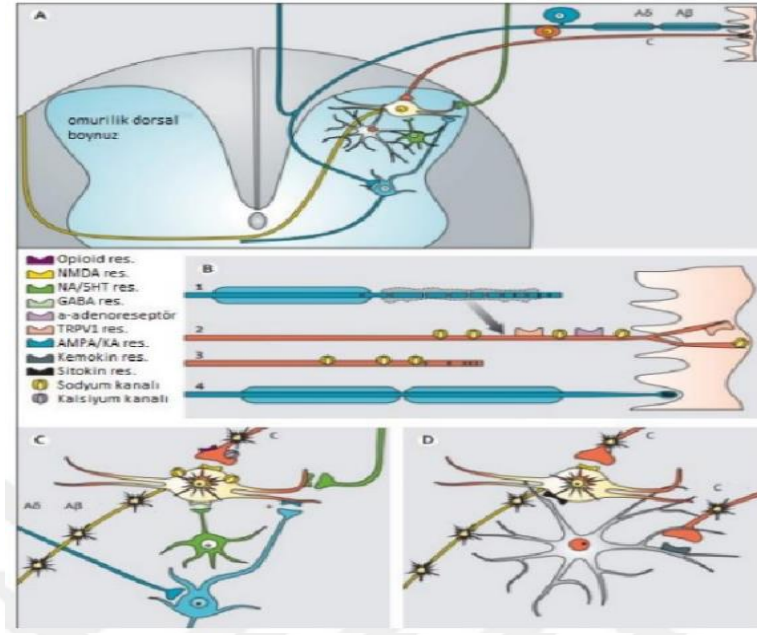
2.2.2.4. Wind-up fenomeni

C liflerinin tekrarlayan ağrılı uyarılarla aktive edilmesi, elektriksel yanıtın birikmesine ve dorsal boynuz nöronlarının cevaplarının uzamasına neden olmaktadır ve durum wind-up fenomeni olarak isimlendirilmektedir (Herrero vd., 2000; Meacham vd., 2017). Bir uyarı dizisinde ilk uyarıya verilen nöranal yanıtlar sabit kalırken, daha sonra ateşlemelerde hızlı bir artış gözlenmektedir. Nöronal hiperaktivite stimülasyonun sona ermesinden sonra birkaç saniye devam edebilmektedir. Çeşitli deneysel veriler, wind-up fenomeninin NMDA reseptörlerinin aktivasyonuna bağılı olduğunu göstermektedir (Eide, 2000).

2.2.2.5. *Geniş dinamik alan (GDA) nöronlarının aktivasyonu*

GDA nöronları, dorsal boynuzda lamina I ve V'te bulunur ve hem nosiseptörlerden hem de düşük eşikli mekanoreseptörlerden uyarı alarak mekanik, termal ve kimyasal uyarılara yanıt verir (D'Mello ve Dickenson, 2008). GDA nöronları kalıcı ve yoğun uyarı almaya başladıklarında duyarlılık geliştirmekte ve ağrısız uyarıyı bile ağrılı uyarı gibi yanıtlamaktadır (D'Mello ve Dickenson, 2008; Serpell, 2008).





Şekil 2.1. Nöropatik ağrının patofizyolojik mekanizmaları (Baron vd., 2010, s. 812)

(A) Omurilik dorsal boynuzundaki primer afferent yollar ve bağlantıları. C lifleri (kırmızı) daha üst laminalardaki (sarı nöron) spinotalamik projeksiyon nöronlarında sonlanmaktadır. Nosiseptif olmayan miyelinli A lifleri daha derin laminalara uzanır. GDA nöronları (mavi nöron sistemi), nosiseptif terminallerden doğrudan uyarı alan ve miyelinli A liflerinden multisinaptik uyarı alan ikinci sıra nöronlardır. Mikroglia (gri hücre) ile etkileşim, sinaptik iletimi kolaylaştırır. GABAerjik nöronların (yeşil nöron), normalde GDA nöronları üzerinde inhibe edici sinaptik girdi uygular. Bununla birlikte, inisi modülatör sistemler (yeşil inisi terminal) GDA nöronlarda sinaps yapar. (B) Parsiyel sinir lezyonu sonrasında primer afferent nöronlarda duyarlılığa yol açan periferik değişiklikler meydana gelir. Bazı aksonlar hasar görmüş ve dejenere olmuş (akson 1 ve 3), bazıları hala sağlam ve periferik uç organa (deri; akson 2,4) bağlı durumdadır. Lezyonun bir sonucu olarak hasarlı nöronlarda Na^+ kanallarının ekspresyonu artar. Dahası, Wallerian dejenerasyonu ile ilişkili ve ayrılmış liflerin yakınında salınan sinir büyüme faktörü gibi ürünler, zarar görmemiş lifler üzerinde kanalların ve reseptörlerin (örneğin sodyum kanalları, TRPV1 reseptörleri, adrenoreseptörler) ekspresyonunu uyarır. (C) C nosiseptörlerdeki spontan santral duyu sürecinde sekonder değişikliklere neden olarak mekanoreseptör A liflerinden (mavi nöron sistemi; hafif dokunma ve noktasal uyarılar) alınan girdinin ağrı olarak algılanmasına neden olur. Merkezi sensitizasyonda çeşitli presinaptik (opioid reseptörleri, Ca^{++} kanalları) ve postsinaptik moleküler yapılar (glutamat reseptörleri, AMPA/kainat reseptörleri, NA/5-HT reseptörleri, GABA reseptörleri, Na^+ kanalları) rol oynar. İnhibitör internöronlar ve inisi modülatör kontrol sistemleri (yeşil nöronlar), sinir lezyonlarından sonra işlevsizdir ve omurilik dorsal boynuz nöronlarının disinhibisyonuna veya fasilitasyonuna ve daha fazla merkezi sensitizasyona yol açar. (D) Periferik sinir hasarı, kemokin reseptörlerine etki eden CCL2 gibi kemokinler aracılığıyla omurilik glial hücrelerini (gri hücre) aktive eder. Aktive edilmiş mikroglia, sitokinleri ve büyüme faktörlerinin salınımına yol açarak ve glutamat konsantrasyonunu artırarak GDA nöronlarında uyarılabilirliği daha da artırır. GDA: Geniş dinamik alan, NA: Noradrenalin, TRPV1: Geçici reseptör potansiyel vanilloid 1, CCL2: kemokin (C-C motifi) ligandı

2.3. Ağrının Algılanma ve Yönetim Süreci

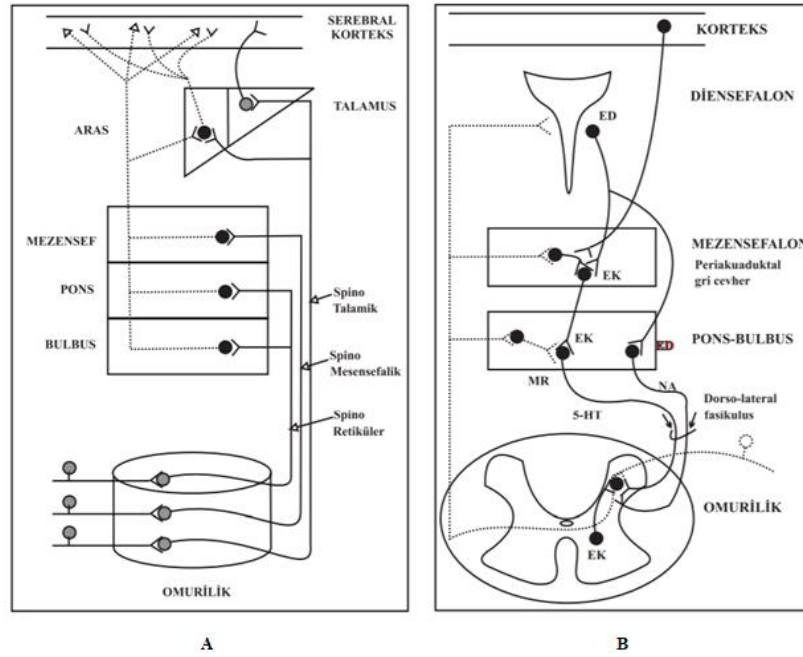
Ağrılı uyarının transdüksiyon, transmisyon, modülasyon ve persepsiyon süreçleri ile ağrı yolları üzerinden periferden beyne iletilmesi nosisepsiyon terimi ile açıklanmaktadır. Nosisepsiyon sürecinin ilk basamağında, nosiseptör olarak adlandırılan özelleşmiş duyuşal nöronlar görev alır (Lamont vd., 2000; Guindon ve Hohmann, 2009; Steeds, 2009; Patel, 2010; Ringkamp vd., 2018). Mekanik deformasyonlara yanıt veren yüksek eşikli mekanoreseptörler ve dokuya hasar veren çeşitli girdilere yanıt veren polimodal nosiseptörler olmak üzere iki tip nosiseptör bulunmaktadır (Steeds, 2009). Aslında nosiseptörler, sinir liflerinin serbest sinir uçlarıdır ve Aδ ve C lifleri olmak üzere iki tip sinir lifi bulunmaktadır. (Lamont vd., 2000; Steeds, 2009; Bourne vd., 2014). Bu iki lifin dışında, iletim hızları çok yüksek olan ancak genellikle nosiseptif olmayan sinyalleri taşıyan Aβ lifleri de bulunmaktadır (Marchand, 2008). Miyelinsiz C liflerinin çapları küçüktür ve iletim hızları (7,2 km/s) yavaştır. Miyelin bulunduran Aδ lifleri ise daha geniş çaplıdır ve C liflerine göre iletim hızları (72 km/s) daha yüksektir (Patel, 2010). Ayrıca, C lifleri mekanik, termal ve kimyasal uyarılara yanıt veren polimodal nosiseptörlerken, Aδ lifleri sadece mekanik ve mekano-termal uyarılara yanıt vermektedir (Farquhar-Smith, 2008; Patel, 2010; Bourne vd., 2014). Bu iki lif arasındaki belirtilen farklılıklar nedeniyle, C lifleri gecikmiş ve inatçı ağrılardan sorumluyken, Aδ lifleri hızlı ve keskin ağrılardan sorumludur (Marchand, 2008; Patel, 2010). Yukarıda bahsedilen, nosiseptörlerin mekanik, termal ve kimyasal uyarıları elektriksel impulslara yani aksiyon potansiyellerine dönüştürme süreci transdüksiyon olarak adlandırılır (Lamont vd., 2000; Guindon ve Hohmann, 2009; Steeds, 2009; Patel, 2010).

Transdüksiyon aşamasından sonra, elektriksel impulsların periferden santral sinir sistemine taşındığı transmisyon süreci gerçekleşmektedir. (Steeds, 2009). Bu süreç, nosiseptörlerin hücre hasarı sonucu salınan potasyum, serotonin, bradikinin, histamin, prostaglandinler ve lökotrienler gibi kimyasallar tarafından periferik aktivasyonu ile başlamaktadır (Farquhar-Smith, 2008; Marchand, 2008; Steeds, 2009; Patel, 2010). Ayrıca santral sinir sisteminde nörotransmitter olarak işlev gören P maddesi ve kalsitonin gen ilişkili peptit (CGRP) de periferde salınarak proinflatuvar madde görevi görür (Marchand, 2008). Bu mediyatörler, nosiseptör aktivitesinin derecesini ve ağrının yoğunluğunu etkilemektedir (Marchand, 2008; Patel, 2010). Periferik nosiseptörler, primer somatosensoryal nöronlardaki nosiseptif sinyali omuriliğin dorsal boynuzun

belirli laminalarına taşır ve ikinci sıra nöronlarla veya projeksiyon nöronlarla ilk sinaptik teması yapar (Marchand, 2008). İkinci sıra nöronlar, nosiseptif spesifik nöronlar, GDA nöronları ve düşük eşikli nöronlar olmak üzere üç sınıfa ayrılmaktadır (Steeds, 2009). İsminden de anlaşılacağı gibi nosiseptif spesifik nöronlar, sadece nosiseptif uyarılara yanıt vermektedir ve Aδ ve C lifleri ile uyarılmaktadır. Yüksek eşikli zararlı uyarılara spesifik yanıt veren bu nöronlar çoğunlukla lamina II ve lamina III'te bulunmaktadır. Lamina V ve lamina VI'da bulunan GDA nöronları ise, Aβ, Aδ ve C liflerinden girdi alması nedeniyle hem zararsız uyarılara ve hem nosiseptif uyarılara yanıt verme kapasitesine sahiptir (Marchand, 2008; Steeds, 2009). Düşük eşikli nöronlar ise sadece zararsız uyarılara yanıt vermektedir (Steeds, 2009). İkinci sıra nöronlar, spinotalemik (lateral) ve spinoretiküler (medial) yollar üzerinden omuriliğe ve sonra daha üst merkezlere iletiyi göndermektedir. Afferentlerin çoğu talamusun lateral ve medial çekirdeklerinde ikinci bir sinaps oluşturduktan sonra üçüncü sıra nöronlarla temas etmektedir. Üçüncü sıra nöronlar, primer ve sekonder somatosensoriyel kortekse (SI, SII) afferentler göndermektedir. SI ve SII, ağrı bölgesinin, süresinin ve şiddetinin belirlenmesinde rol almaktadır. Ayrıca, üçüncü sıra nöronlar ağrının duyuşal ve duygusal bileşenlerinden sorumlu olan ön singulat korteks ve insula gibi limbik yapılarla da temas halindedir (Marchand, 2008). Yani, en basit şekliyle transmisyon yolu üç nöron zinciri olarak düşünülebilir; primer afferentler periferden köken alıp omuriliğe uzanır, ikinci sıra nöronlar omurilikte yükselmeye devam eder ve üçüncü sıra nöronlar serebral kortekse iletim yapar (Lamont vd., 2000).

Modülasyon aşaması daha karmaşık işleyişleri içeren, sinirsel aktivitenin ağrı yolları boyunca değiştirilebildiği bir süreçtir. Nosiseptif girdinin modülasyonu büyük ölçüde omuriliğin dorsal boynuzunda gerçekleşmektedir (Lamont vd., 2000; Ringkamp vd., 2018). Zararlı bir uyarıdan sonra, ağrı modülasyon sistemlerinin aktive olması çoğunlukla transmisyon yolağında aktivitenin düşmesine neden olmaktadır. Bununla birlikte, bazı durumlarda modülasyon ağrı sinyallerinin güçlenmesine de yol açabilmektedir (Ringkamp vd., 2018). Modülasyon süreci ile ilişkili 1965 yılında, Wall ve Melzack tarafından ortaya atılan “kapı kontrol teorisi” ağrılı girdinin omuriliğin dorsal boynuzunda güçlendirilebilir veya zayıflatılabilir olduğunu ileri sürmüştür. Ayrıca, dokunma gibi ağrısız uyarıları alan geniş çaplı Aβ liflerinin aktivasyonunun, omuriliğin substantia gelatinosa bölgesindeki inhibitör internöronları stimüle ederek sinaptik transmisyonu dolayısıyla ağrı algısını azalttığı belirtilmektedir (Marchand, 2008;

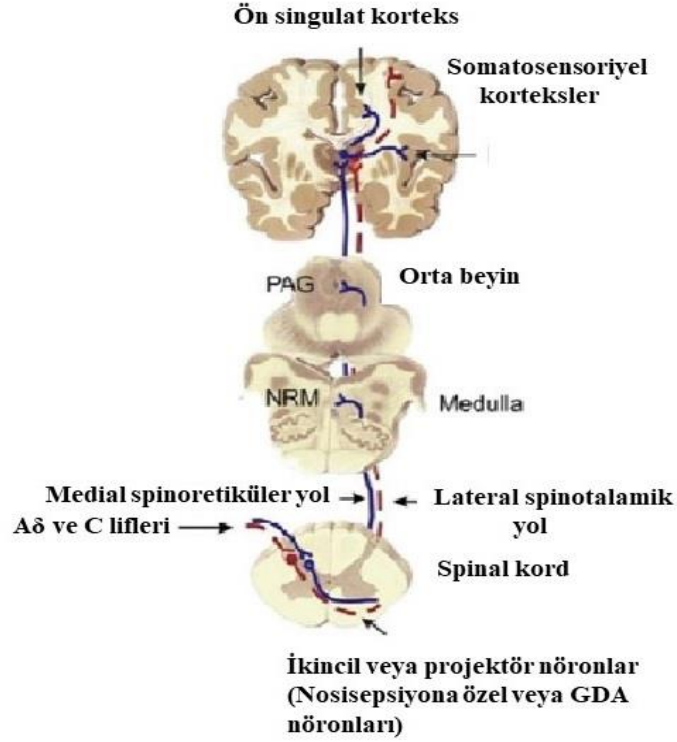
Guindon ve Hohmann, 2009; Steeds, 2009; Patel, 2010). Bu mekanizma, yaralı bölgenin ovalanmasının ağrı hissini neden azalttığı açıklamaktadır (Steeds, 2009; Patel, 2010). Ayrıca, transkutanöz elektriksel stimülasyonun ağrı kesici etkisi de Aβ liflerinin aktivasyonu sonucu omurilikte inhibisyon gerçekleşmesi temeline dayanmaktadır (Steeds, 2009). Buna karşılık, nöropatik ağrı gibi belirli koşullarda ağrısız uyarının modülasyon süreci sonunda ağrılı bir uyarın olarak algılandığı allodini fenomeni gelişebilir (Marchand, 2008). Modülasyonda, kapı kontrol teorisi dışında endojen opioidler ve serotonin, NA, GABA gibi birçok nörotransmitteri bulunduran inisiyasyon inhibitör yollar görev almaktadır (Lamont vd., 2000; Marchand, 2008; Patel, 2010). Farmakolojik modülasyonunda görev alan en önemli nörotransmitterler, serotonin ve NADir (Marchand, 2008). Özellikle dorsal boyunun lamina I ve lamina II bölgesinde etkisini gösteren serotonin, NA ve dopamin etkiledikleri reseptör alt tiplerine de bağlı olarak pronosiseptif veya antinosiseptif etki açığa çıkarmaktadır (Bourne vd., 2014). Raphe nükleusu ve periaküaduktal gri madde (PAG) ağrının inhibisyonunda görev alan en önemli alanlardır (Marchand, 2008; Guindon ve Hohmann, 2009; Steeds, 2009). PAG'nın elektriksel uyarımı antinosiseptif etki açığa çıkarmaktadır. Raphe nükleusundaki serotonerjik nöronlar ise tıpkı adrenerjik nöronlar gibi lamina II ve lamina III'teki hücrelerle sinaps yapmaktadır ve raphe nükleusunun uyarılması sonucu salınan serotoninin, inhibitör internöronları ve NA salımını aktive ederek ağrı iletimini baskıladığı düşünülmektedir. Ayrıca, beyin sapı nöronları doğrudan dorsal boynuz hücrelerini aktive ederek, eksitator nöronları inhibe ederek veya inhibitör nöronları uyararak nosiseptif transmisyonu kontrol edebilir (Steeds, 2009). Bununla birlikte, enkefalinler, dinorfinler ve prodinorfinler gibi endojen opioid peptitler de ağrının iletimi sürecinde inhibitör etki açığa çıkarmaktadır (Lamont vd., 2000). En iyi bilinen nosiseptif çıkıcı sistemler ise spinotalamik ve spinoretiküler yollardır ve bu yollar ağrının yerinin ve şiddetinin algılanmasını ve tehditlere karşı genel bir alarm halinin sürdürülmesini sağlamaktadır (Guindon ve Hohmann, 2009; Steeds, 2009). Şekil 2.2'de inisiyasyon ve çıkıcı ağrı yolları özetlenmiştir.



Şekil 2.2. A: Çıkıcı ağrı yolları, B: İnici ağrı yolları (Aydın, 2002, s. 37-48)

ARAS: Assendan retiküler aktive edici sistem, ED: Endorfin, EK: Enkefalinergic, NA: Noradrenalin, 5-HT: Serotonin

Persepsiyon, somatosensoriyel iletim yolundaki nöral aktivitenin öznel bir ağrı hissi ile sonuçlandığı nosiseptif sürecin son aşamasıdır. Ağrının algılanma süreci olarak tanımlanabilecek bu sürecin, primer ve sekonder somatosensoriyel korteklerin ve limbik sistemin etkileşiminden kaynaklandığı var sayılmaktadır (Guindon ve Hohmann, 2009; Ringkamp vd., 2018). Sonuç olarak, psikolojik, nörofizyolojik ve psikofiziksel farklılıklar taşıyan farklı bireyler benzer ağrılı uyaranları bile farklı düzeyde ağrı hissi ile algılayabilir ve bu nedenle tedavide seçilecek ajanlar ve bunların etkinliği farklılık gösterebilir (Guindon ve Hohmann, 2009). Şekil 2.3'te periferden beyine nosiseptif uyarının taşındığı yollar özetlenmiştir.



Şekil 2.3. *Periferden beyine nosisepatif sinyal yolakları (Marchand, 2008, s.285-309)*

Periferden gelen nosisepatif uyarılar iki sinaptik bağlantının ardından beyine iletilmektedir. Aδ ve C lifleri, omuriliğin dorsal boynuzundaki projeksiyon nöronları ile ilk sinapslarını yapar. İkincil nöronlar hemen spinal korddan kıvrılır ve ikinci sinaptik teması kuracakları talamik çekirdeklere iletilir. Üçüncü nöronlar ağrının duyusal-ayrıt edici bileşeni için somatosensör korteksler ve ağrının motivasyonel bileşeni için limbik yapılara (anterior singulat korteks ve insula) projeksiyon yapar. NRM: Raphe çekirdeği PAG: Periaquaduktal gri madde, GDA: Geniş dinamik alan.

2.3.1. Ağrı modülasyonunda serotonerjik sistemin rolü

Çok uzun zamandır ağrı modülasyonunda rol aldığı bilinen serotonin, etki yerine, etkilediği hücre tipine ve aktive ettiği reseptör tipine bağlı olarak pronosisepatif veya antinosiseptif etki açığa çıkarmaktadır (Sommer, 2010; Viguiet vd., 2013). Periferde ve santral sinir sisteminde yaygın olarak bulun serotoninin ağrı modülasyonu üzerindeki etkileri periferde ve santral sinir sisteminde farklılık göstermektedir. Serotonin; periferde histamin, bradikinin ve prostaglandinler gibi diğer inflamatuvar maddelerle birlikte

inflamasyona yol açıp nosiseptif etki gösterirken, doğrudan omur iliğe enjekte edildiğinde antinosiseptif etki açığa çıkarmaktadır (Bardin, 2011; Viguier vd., 2013). Her ne kadar serotoninin periferdeki pronosiseptif etkisi iyi bir şekilde açıklanmış olsa da spinal ve supraspinal düzeydeki etkisi oldukça değişkenlik göstermektedir ve hala tam olarak açıklanamamaktadır. Bu karmaşık role, periferde ve santral sinir sisteminde eksprese edilen farklı reseptör tiplerinin aracılık ettiği düşünülmektedir. 15 farklı reseptör alt tipini içeren 7 farklı serotonin reseptör ailesi bulunmaktadır (Bardin, 2011) ve periferde serotonin ile indüklenen pronosiseptif etkiden, C lifleri üzerinde yer alan 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₆ ve 5-HT₇ reseptörlerinin aktivasyonunun sorumlu olduğu belirtilmektedir (Viguier vd., 2013). 5-HT_{1A} reseptörünün aktivasyonu adenilil siklazı inhibe ederek siklik adenosin monofosfat (cAMP) seviyesini düşürür ve K⁺ ve Ca⁺⁺ kanallarını kapatarak nöronal uyarılmanın inhibisyonuna yol açar. Bununla birlikte, omur ilikte 5-HT_{1A} reseptörünün aktivasyonu glutamat salımını inhibe ederek ve GABA bağımlı inhibisyonu baskın hale getirerek ağrı iletimini baskılamaktadır (Tao vd., 2019). Ayrıca, 5-HT_{1A} reseptörünün inhibitör bir otoreseptör gibi davranarak dorsal boynuzun lamina I ve II'sinde nosiseptif iletimi inhibe ettiği düşünülmektedir (Cortes-Altamirano vd., 2017). 5-HT_{1A} reseptörleri çıkartılmış farelerin sıcak plaka testinde daha yüksek ağrılı yanıt vermesi, bu bilgileri destekler niteliktedir (Kayser vd., 2007). 5-HT_{1B/1D/1F} reseptörleri birbirleri ile homolog yapıda oldukları için özellikle migrende olmak üzere ağrı sürecinde benzer işlevler üstlenmektedir ve bazı çalışmalar, bu reseptör alt tiplerinin substantia gelatinosada presinaptik glutamat salımını inhibe ederek ağrıyı baskıladığını göstermektedir. 5-HT₂ reseptörleri raphe nükleusu, dorsal boynuz ve PAG içeren inisiyasyon yolları ve retiküler formasyon, talamus ve limbik yapılarda eksprese edilmektedir. Ağrının modülasyonu ile ilgili araştırmalardan, 5-HT_{2A} ve 5-HT_{2C} reseptör alt tiplerinin pronosiseptif veya antinosiseptif olduğunu gösteren birbirine zıt veriler elde edilmiştir (Tao vd., 2019). Yakın geçmişte yapılan bir çalışma, gigantocellular retiküler çekirdek ve raphe nükleusunda bulunan 5-HT_{2A} ve 5-HT_{2C} reseptörlerinin panik benzeri duygusal durumlarda açığa çıkan hipoaljeziye eşlik ettiğini öne sürmüştür (de Oliveria vd., 2017). Ayrıca, intratekal olarak uygulanan 5-HT_{2A} ve 5-HT_{2C} reseptör agonistlerinin spinal sinir hasarı geliştirilen hayvan modellerinde anti-allodinik etki açığa çıkardığı gösterilmiştir (Honda vd., 2006). Bununla birlikte, bir başka araştırma spinal 5-HT_{2A} ve 5-HT_{2C} reseptörlerinin pronosiseptif etki gösterdiğini ve formalin kaynaklı aşırı duyarlılığın geliştirilmesi ve sürdürülmesine aracılık ettiğini ileri sürmüştür (Cervantes-Durán vd.,

2016). Genel olarak ise, 5-HT_{2A} ve 5-HT_{2C} reseptörlerinin supraspinal düzeyde antinosisepsiyonda, spinal düzeyde pronosisepsiyon veya antinosisepsiyonda rol aldığı kabul edilmektedir (Tao vd., 2019). Ligand kapılı bir iyon kanalı olan 5-HT₃ reseptörlerinin nosisepsiyondaki rolü çeşitli 5-HT₃ reseptör agonist ve antagonistleri kullanılarak geniş çaplı olarak araştırılmıştır ve omurilikteki 5-HT₃ reseptörlerinin aktivasyonunun kronik inflamatuvar ağrı, postoperatif ağrı, visceral aşırı duyarlılık, nöropatik ağrı ve kanser ağrısında görev aldığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Viguiet vd., 2013; Tao vd., 2019). Sistemik uygulanan serotonin prekürsörlerinin yol açtığı visceral duyarlılık ve somatik ağrının intratekal uygulanan 5-HT₃ reseptör antagonisti ondansetron tarafından zayıflatıldığı gösterilmiştir (Tao vd., 2019). Ayrıca, alosetron ve ramosetron gibi 5-HT₃ reseptör antagonistleri irritabl bağırsak sendromu tedavisinde etkili bulunmuştur (Cortes-Altamirano vd., 2017). Serotonin reseptör ailesinin son tanımlanan üyesi olan 5-HT₇ reseptörlerinin ise, serotoninin periferik pronosisseptif etkisine aracılık etmektedir. Formalinle indüklenen nosisepsiyonun selektif 5-HT₇ reseptör antagonisti SB-269970 [(2R)-1-[(3-hidroksifenil) sülfonil]-2-(2-(4-metil-1-piperidinil)etil) piperidin] tarafından baskılandığı gösterilmiştir (Viguiet vd., 2013). Ayrıca, kronik konstriktif hasar ile nöropatik hale getirilen sıçanlarda SB-269970 sistemik uygulamasının hiperaljezi ve allodiniyi zayıflattığı rapor edilmiştir (Viguiet vd., 2013; Cortes-Altamirano vd., 2017). Sonuç olarak; 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃ ve 5-HT₇ reseptörleri konumlarına, antagonist veya agonist dozuna ve uygulama yoluna, ağrı tipine ve süresine bağlı olarak nosisseptif yanıtın güçlendirilmesi veya baskılanmasına aracılık etmektedir (Cortes-Altamirano vd., 2017).

2.4. Nöropatik Ağrının Hayvan Modelleri

Nöropatik ağrı ile ilgili mekanizmaları aydınlatmak ve etkili yeni tedavi yöntemleri geliştirebilmek için onaylanmış ve kolayca tekrarlanabilen hayvan modellerine ihtiyaç duyulmuştur. 1970'li yılların sonuna kadar bilimsel araştırmalarda sadece mekanik ve termal uyara bağlı gelişen akut ağrı tedavisine odaklanılmış ve sıcak plaka ve kuyruk sıkıştırma testleri kullanılmıştır. Bu nedenle kronik ağrının değerlendirilmesinde eksik kalmıştır (Jaggi vd., 2011). Wall vd., (1974) periferik bir sinire hasar vererek, mekanizmaları akut ağrıdan farklı olan kronik ağrı için bir model geliştirmiştir ve bu ilk adım nöropatik ağrının araştırılması için farklı sinir hasarı modellerinin geliştirilmesine yol açmıştır. Bu modeller, periferik veya santral sinir

sistemine yapılan çeşitli uygulamalar ile total veya parsiyel sinir hasarı geliştirilerek, ilaç uygulamaları ile sinirleri direkt hasara uğratarak ve diyabet, kanser, HIV gibi hastalıklar geliştirilerek oluşturulmaktadır (Wang ve Wang, 2003; Jaggi vd, 2011). Ayrıca, yaygın olarak kullanılsa da primer nöron kültür tekniği ve kalıcı duyuusal nöron kültür tekniği (füzyonla veya transformasyon ölümsüzleştirilmiş duyu hücrelerini kullanan modeller) ile geliştirilen nöropatik ağrı modelleri bulunmaktadır (Wang ve Wang; 2003).

Günümüzde periferik nöropatik ağrıyı değerlendirmek için genellikle ligasyon aracılı periferik sinir hasarına dayanan modeller kullanılırken, santral nöropatik ağrıyı incelemek için ise eksitotoksik omurilik hasarı ve spinal hemiseksiyon modelleri tercih edilmektedir. Bununla birlikte, antikanser ajanlar, anti-HIV ilaçlar, diyabet ve etanol ile geliştirilen diğer modeller ilgili etiyolojilere bağlı patogenezin ve tedavinin aydınlatılmasına olanak sağlamaktadır (Jaggi vd, 2011). Tablo 2.2’de nöropatik ağrı için geliştirilmiş modeller özetlenmektedir.

Tablo 2.2. Nöropatik ağrı için geliştirilmiş modeller (Jaggi vd., 2011, s. 1-28.)

Modelin Adı	Hasar İlkesi	Türler
Aksotomi	Siyatik sinirin tam transeksiyonu	Sıçan
Kronik konstriktif hasar	Siyatik sinire dört ayrı gevşek düğüm	Sıçan, fare
Kısmi siyatik sinir ligasyonu (Seltzer modeli)	Siyatik sinirin 1/3 ve 1/2 ‘sine sıkı düğüm	Sıçan, fare
Spinal sinir ligasyonu	L5 ve L6 spinal sinire sıkı düğüm L7 spinal sinire sıkı düğüm	Sıçan, primat
Yedeklenmiş periferik dal zedelenmesi	Tibial ve ana peroneal sinirlerin aksotomisi	Sıçan, fare
Tibial ve sural sinir transeksiyonu	Tibial ve sural sinir aksotomisi	Sıçan
Peroneal sinir ligasyonu	Peroneal sinirin düğümlenmesi	Fare
Siyatik kriyoöroliz	Siyatik sinirin dondurulması	Sıçan
Kaudal gövde rezeksiyonu	Kaudal gövdenin rezeksiyonu	Sıçan, fare
Fotokimyasal kaynaklı siyatik sinir hasarı	Fotosensitizer boya ve lazerle siyatik siniri besleyen küçük damarlarda tromboz	Sıçan, fare
Allen Modeli	Cerrahi olarak ortaya çıkarılmış omurilik üzerine ağırlık düşürülmesi	Sıçan, fare

Tablo 2.2. (Devam) *Nöropatik Ağrı İçin Geliştirilmiş Modeller (Jaggi vd., 2011, s. 1-28.)*

Eksitotoksik omur ilik hasarı	Eksitator aminoasitlerin intraspinal enjeksiyonu	Sıçan, fare
Spinal hemiseksiyon	T11-T12 segmentlerinin laminektomisi	Sıçan
Antikanser ilaçlar (vinkristin, sisplatin, oksaliplatin, paklitaksel), anti-HIV ilaçlar (2,3 deoksisitidin, didanozin)	İlaçların periferik sinir sistemini doğrudan hasara uğratması	Sıçan, fare, tavşan, guinea pig
Diyabetik nöropati (steptozosin ile indüklenen, genetik modeller)	Sinirlerde kalıcı hiperglisemiye bağlı gelişen değişiklikler	Sıçan, fare
Kemik kanseri ağrı modelleri	Kanser hücrelerini ilgili kemiklere aşılama	Sıçan, fare
Post-herpetik nevralji (Varisella zoster virüs, herpes simpleks virüs, non-viral model)	Viral enfekte hücrelin enjeksiyonu	Sıçan, fare
Kronik etanol tüketimi/yoksulluğu	Uzun süre etanol tüketimi (70 günden uzun)	Sıçan
Piridoksin ile indüklenen model	Uzun süre piridoksin kullanımı	Sıçan, köpek
Trigeminal nevralji	Trigeminal gangliyonun sıkıştırılması	Sıçan
Orofasiyal ağrı	Formalin, karagenanın temporomandibular eklemlere ve maksillaya enjeksiyonu	Sıçan, fare

2.5. Nöropatik Ağrının Tedavisi

Nöropatik ağrının tedavisi, girişimsel işlemleri, farmakolojik tedavileri, psikolojik ve fiziksel terapileri kapsamaktadır. Nöropatik ağrıdan şikayetçi bir hastanın tedavisine geleneksel olarak girişimsel işlemlerden önce konservatif farmakolojik ve tamamlayıcı tedavilerle başlanmaktadır. Bununla birlikte, ilaçların sınırlı etkinliği girişimsel tedavilerin sıklığının artmasına neden olmaktadır (Collaca vd, 2017). Nöropatik ağrının tedavisinde kullanılan ilaç grupları; trisiklik antidepresan (TSA)'lar, selektif serotonin geri alım inhibitörleri (SSRI), serotonin-noradrenalin geri alım inhibitörleri (SNRI), antiepileptikler, lokal anestezikler, opioidler, kannabinoidler, botulinum toksini ve topikal kapsaisindir (Collaca vd, 2017; Nishikawa ve Nomoto, 2017; Cavalli vd, 2019).

Antidepresanlar ve antiepileptik ilaçlar, nöropatik ağrının birinci basamak tedavisinde en sık tercih edilen ilaç gruplarıdır (Collaca vd, 2017; Obata, 2017).

Antidepresan ilaçların, HIV ve kemoterapiye bağlı gelişen periferik nöropatiler gibi çeşitli nöropatik ağrı türlerinin tedavisinde etkili olduğu gösterilmiştir. TSA'lar, düşük maliyetli olmaları, günde tek doz kullanıma uygun olmaları ve çoğu durumda nöropatik ağrıya eşlik eden depresyon gibi psikolojik problemler üzerine iyileştirici etkiye sahip olmaları nedeniyle nöropatik ağrı tedavisinde büyük avantajlar sağlamaktadır (Connor ve Dworkin, 2009). Ayrıca, TSA'lar nöropatik ağrıda depresif olmayan hastalarda da depresif hastalara eşdeğer analjezik etkilere sahip görülmektedir (Connor ve Dworkin, 2009; Obata, 2017). Bununla birlikte, TSA'lar idrar retansiyonu, ağız kuruluğu ve konstipasyon gibi antikolinerjik yan etkiler, ortostatik hipotansiyon ve kardiyak toksisite gibi çeşitli dezavantajlara sahiptir (Sindrup vd, 2005; Connor ve Dworkin, 2009). Nortriptilin ve desipramin gibi trisiklikler, amitriptilin ve diğer tersiyeramin trisikliklere göre daha az yan etkiye sahip olmaları ve güçlü ağrı kesici etkileri nedeniyle daha sık önerilmektedir (Connor ve Dworkin, 2009). Ayrıca, duloksetin ve venlafaksin gibi SNRI'lar ve paroksetin, fluoksetin ve sitalopram gibi SSRI'lar nöropatik ağrı tedavisinde etkili bulunmuştur (Sindrup vd, 2005; Lee ve Chen, 2010). SSRI ve SNRI, TSA'lara göre daha iyi tolere edilebilir, ancak bu ilaçlar da mide bulantısı, kusma ve dispepsi gibi yan etkilere sahiptir (Sindrup vd, 2005). Bu ilaçlar antinositif etkinliğini büyük ölçüde inisi inhibitör yolları kullanarak açığa çıkardığı düşünülmektedir (Collaca vd, 2017). Günümüzde nöropatik ağrı tedavisinin temeli farmakoterapiye dayanmaktadır ve antiepileptik ilaçlar bu terapinin temel bileşinidir. Gabapentin ve pregabalın postherpetik nevralji ve diyabetik nöropatinin, karbamazepin ve okskarbazepin ise trigeminal nevraljinin birinci basamak tedavisinde tercih edilmektedir (Eisenberg vd, 2007). Bu ilaçlar etkilerini esas olarak voltaj kapılı-kalsiyum ve sodyum kanallarını bloke ederek göstermektedirler (Eisenberg vd, 2007; Obata, 2017).

İkinci basamak tedavide tercih edilen lidokain ise sodyum kanallarını bloke ederek ektopik deşarjların önüne geçmektedir (Obata, 2017; Cavalli vd, 2019). Topikal olarak uygulanan lidokain yamaları (%5), özellikle ağrı bölgesi nispeten küçük ve sınırlı olan postherpetik nevralji ve diğer periferik nöropatilerde etkili bulunmuştur (Galluzzi, 2007). Kapsaisin ise TRPV1 aktive edip sinir liflerinde duyarsızlaşmaya yol açar ve %8'lik kapsaisin yamasının tek başına uygulaması postherpetik nevraljide, diyabetik ve diyabetik olmayan nöropatik ağrıda etkili olmaktadır (Obata, 2017). Ancak, kapsaisin krem güçlü tahriş edici etkisi nedeniyle dikkatli kullanılmalıdır (Galluzzi, 2007). Ayrıca,

yarı sentetik opioid agonisti ve serotonin-NA geri alım inhibitörü olan tramadol, özellikle periferik nöropatik ağrıda etkilidir (Galluzzi, 2007; Obata, 2017).

Üçüncü basamak tedavide ise Botulinum toksini periferik nöropatide etkili bulunmuştur (Obata, 2017; Cavalli vd, 2019). Opioid agonistleri oksikodon ve morfin nöropatik ağrı için zayıf etkili bulunmakla birlikte yan etkileri nedeniyle de çok fazla tercih edilmemektedir (Obata, 2017).

Ayrıca, NMDA antagonisti ketamin ve memantin, glutamat salımını baskılayarak kronik ağrı tedavisinde etkili olabileceğini gösteren prelinik ve klinik çalışmalar bulunmaktadır (Galluzzi, 2007; Cavalli vd, 2019). Sodyum kanallarını (Nav1.7) bloke eden ilaçlar ve anjiyotensin tip 2 reseptör antagonisti EMA401 gibi ilaçlar periferik nöropatik ağrının tedavisi için klinik gelişme aşamasında bulunmaktadır (Obata, 2017). İlaç tedavilerinin yanı sıra, 1990'lı yılların başlarında korteksin elektriksel uyarımını kullanan epidural motor korteks stimülasyonunun (EMCS) ilaçlara dirençli santral nöropatik ağrının tedavisinde etkili olabileceği öne sürülmüş ve bugüne kadar yapılan birçok çalışmada EMCS, periferik ve santral nöropatik ağrı tedavisinde yararlı bulunmuştur (Moisset ve Lefaucheur, 2018). Tablo 2.3'te günümüzde nöropatik ağrı tedavisinde kullanılan ilaçlar ve yan etkileri özetlenmiştir.

Tablo 2.3. Nöropatik ağrı için farmakoterapi (Cavalli vd, 2019, s. 1-10.)

		İlaçlar	Doz aralığı	Yan etki
Birinci basamak tedavi	Antiepileptikler	Gabapentin	150-600 mg/gün	Uyuşukluk, baş dönmesi, periferik ödem, bulanık görme
		Pregabalin	300-3600 mg/gün	
	TSA	Amitriptilin	10-150 mg/gün	Antikolinerjik etkiler, intihar riski, idrar retansiyonu, aritmi
	SNRI	Duluoksetin	20-120 mg/gün	Bulantı, uyuşukluk, ataksi, ağız kuruluğu
		Venlafaksin	150-225 mg/gün	Bulantı, vertigo, letarji, hipertansiyon

Tablo 2.3. (Devam) *Nöropatik ağrı için farmakoterapi (Cavalli vd, 2019, s. 1-10.)*

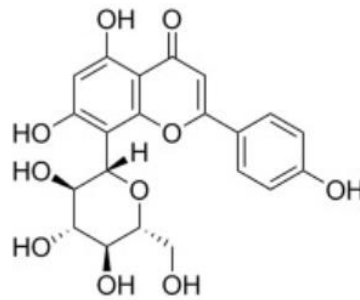
İkinci basamak tedavi	Opiooidler	Tramadol	25-400 mg/gün	Bulantı/kusma, kabızlık, uyuşukluk, nöbetler, ataksi
		Tapentadol	50-600 mg/gün	
	Topikal tedavi	Lidokain	%5'lik yama veya jel	Lokal kaşıntı ve kızarıklık
		Kapsaisin	%8'lik yama	Ağrı, kızarıklık, kaşıntı; nadir yüksek tansiyon vakaları
Üçüncü basamak tedavi	Güçlü opiooidler	Morfin	10-120 mg/gün	Bulantı, kusma, konstipasyon, baş dönmesi ve uyuşukluk
		Oksikodon	10-120 mg/gün	Bulantı / kusma, konstipasyon, uyuşukluk, solunum depresyonu
	Nörotoksin	Botulinum toksini	25-300U (%0.9 salin)	Enjeksiyon yerinde ağrı

TSA: Trisiklik antidepresanlar, SNRI: Serotonin-noradrenalin geri-alım inhibitörü

2.5.1. Nöropatik ağrı tedavisinde flavonoidlerin rolü

Flavonoidler, meyve ve sebzelerde doğal olarak bulunurlar ve sarı renkli olmaları nedeniyle Latince’de sarı anlamına gelen '*flavus*' sözcüğünden türetilerek flavonoid adını almışlardır (Kahraman vd, 2002, He vd, 2016). Bitkilerde aromatik amino asit yapıda bulunan fenilalanin ve malonattan sentez edilmektedirler. Temel flavonoid yapısını; A, B ve C olarak adlandırılan üç halkada (C-6 –C-3– C-6) düzenlenmiş 15 karbon atomunu içeren “flavan çekirdeği” oluşturmaktadır. Flavonoidler oksidasyon seviyelerine ve C halkasının yerleşimine göre; flavonlar, flavanonlar, izoflavonlar, flavonoller, flavanonoller, flavan-3-ol’ler, antosiyanidinler, kalkonlar ve auronlar olarak sınıflandırılmaktadır ve bitkilerde daha çok glikozit form olmak üzere aglikon veya metillenmiş formlarda bulunmaktadır (Verri Jr vd; 2012; Kumar ve Pandey, 2013; Karabin vd, 2015). Bu bileşikler antikanser, antiinflamatuvar, antioksidan, anksiyolitik, antifungal, antiviral, antimikrobiyal, kardiyoprotektif, nöroprotektif ve antinosiseptif etki gibi çok çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptir. Sahip oldukları bu tıbbi aktiviteleri nedeniyle flavonoidler ilaç ve kozmetik endüstrisinin önemli kaynakları arasında yer almaktadır. (Akbar, 2019).

2.5.1.1. Viteksin



Çince'de “Mujingsu” olarak adlandırılan ve bir flavon glikoziti olan “viteksin” (apigenin-8-C-glikozit); inci darısı, alıç, güvercin bezelye, maş fasulyesi, yapraklı kara yosunları, çarkıfelek, bambu, mimosa, hayıt gibi çeşitli tıbbi bitkilerde bulunmaktadır (Borghi vd, 2013; He vd, 2016; Ganesan ve Xu, 2017). Viteksin, antiinflamatuvar, antimikrobal, antiviral antioksidan, antispazmodik, antinosiseptif, antitümoral,

antihipertansif, antidepresan, nöroprotektif ve kardiyoprotektif etki gibi çok çeşitli farmakolojik aktiviteleri nedeniyle bilim dünyasında büyük ilgi görmektedir. Ayrıca; viteksinin anksiyolitik ve hipnotik etki gösterdiği (Zhu vd, 2016; He vd, 2016; Venturini vd, 2018) ve skopolamin kaynaklı hafıza bozukluğunu iyileştirdiği belirtilmektedir (Zhu vd; 2016, He vd, 2016). Bu etkilerin yanı sıra, viteksinin tiroid peroksidaz enzimini inhibe ederek antitiroid etki (Gaitan vd, 1989) ve lipid birikimini engelleyerek obeziteye karşı koruyucu etki gösterdiği düşünülmektedir (Kim vd, 2010). Viteksinin insan sağlığına faydalı olabilecek başka biyolojik aktivitelere de sahip olduğu düşünülmektedir. 60 mg/kg viteksinin sıçanlarda nikotine bağlı gelişen lokomotor aktivite duyarlılığını antagonize ettiği belirlenmiştir ve nikotin bağımlılığı tedavisinde potansiyel faydalarının araştırılması gerektiği düşünülmektedir (Bedell vd, 2019). Başka bir çalışmada ise viteksinin dermal papilla hücrelerinin proliferasyonunu ve saç shaftının büyümesini teşvik ederek saç uzamasına katkı sağlayabileceği ve alopesi tedavisinde kullanılabileceğine işaret edilmektedir (Luo vd, 2018).

2.5.1.1.1. Viteksinin antiinflamatuvar etkisi

Son zamanlarda yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar viteksinin antiinflamatuvar aktivitesine ilginin artmasına neden olmuştur (Peng vd, 2020). Viteksinin özellikle nötrofiller olmak üzere lökosit göçünü inhibe ederek ve sitokin, prostaglandin E2 (PGE2) ve nitrik oksit (NO) salımını baskılayarak antiinflamatuvar etki açığa çıkardığı düşünülmektedir (Rosa vd, 2016). Deney hayvanlarında yapılan bir araştırmada, viteksinin asetik asit, formalin, kapsaisin ve fenil-p-benzokinon (PBQ) gibi kimyasal uyarıcılar tarafından indüklenen inflamatuvar ağrı modellerinde TRPV1 kanallarını hedef alarak kapsaisini (TRPV1 agonist) inhibe ettiği, antiinflamatuvar etkisiyle eş zamanlı olarak antioksidan etki gösterdiği ve TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve IL-33 gibi sitokinlerin sentezini azalttığı öne sürülmüştür (Borghi vd, 2013). Viteksinin, IL-8 ve proinflamatuvar mediyatörlerden olan miyeloperoksidaz seviyesini düşürerek de antiinflamatuvar etkiye aracılık ettiği düşünülmektedir (Nikfarjam vd, 2017). Ayrıca, viteksinin inflamatuvar sitokin ve MAPK (Mitojen Tarafından Aktive Edilmiş Protein Kinaz) yolağını inhibe ederek miyokardiyal iskemi reperfüzyon hasarında etkili olduğunu gösterilmiştir (Dong vd, 2013). Ovalbumin kaynaklı alerjik astım geliştirilen farelerde ise viteksinin, muhtemelen IgE ve lökosit seviyesini düşürerek mukus salgısında ve ödemde azalma sağlamıştır (Venturini vd, 2018). Bu bilgiler dışında, viteksinin peritoniti, akciğer

ödemini, böbrek iltihabını ve inflamasyon kaynaklı osteolizini iyileştirdiği belirtilmektedir (Peng vd, 2020). Bu verilerden hareketle viteksinin çeşitli inflamatuvar hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde başarılı olabileceği düşünülmektedir (Nikfarjam vd, 2017).

2.5.1.1.2. Viteksinin antioksidan etkisi

Hücrelerde yüksek toksisiteye ve fiziksel hasara yol açan reaktif oksijen türlerinin (ROS) artışıyla oksidatif stres indüklenmektedir. Uzun süreli oksidatif stres, yaşlanmaya bağlı fonksiyonel kayıpların hızlanmasına ve birçok kronik hastalığın gelişmesine katkı sağlayabilir (Peng vd, 2020). Çeşitli çalışmalarda, viteksinin oksijen radikallerini temizleyerek güçlü antioksidan aktivite açığa çıkardığı gösterilmiştir. Nörodejenerasyon, miyokardiyal hasar, karaciğer hasarı ve insülin direnci gibi oksidatif stresli ilişkili hastalıklarda viteksinin etkisini araştırmak için *in vivo* ve *in vitro* pek çok deney yapılmıştır. Genel olarak, viteksinin oksidatif stresi ROS ve malondialdehit seviyesini düşürerek baskıladığı ve doku hasarını azaltıp hücre canlılığını artırdığı bulunmuştur (Zhang vd, 2017; Babaei vd, 2020; Peng vd, 2020). Viteksinin yaşlı farelerin serum, beyin, karaciğer ve böbreklerinde süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz seviyesini yükselterek antioksidan etkiyi artırdığı gösterilmiştir (An vd, 2012). Ayrıca, viteksinin muhtemelen antioksidatif etkisiyle ilişkili olarak antiinflamatuvar, antinosiseptif, nöroprotektif ve kardiyoprotektif etki açığa çıkardığı bildirilmektedir (Babaei vd, 2020). Bu bilgilerden hareketle, viteksinin oksidatif stresin neden olduğu birçok hastalığın tedavisinde yardımcı olabilecek güçlü bir antioksidan olarak düşünülebilir (Babaei vd, 2020; Peng vd, 2020).

2.5.1.1.3. Viteksinin antinosiseptif etkisi

Viteksinin sıcak plaka, kuyruk sıkıştırma, asetik asit ile indüklenen kıvrınma testi gibi çeşitli akut nosisepsiyon modellerinde spinal, supraspinal ve periferik mekanizmalar ile antinosiseptif etki açığa çıkardığı ve bu etkisine opioid klorid, delta ve mu reseptörlerinin aracılık ettiği gösterilmiştir (Özkay ve Can, 2013). Ayrıca, akut ve uzun süreli viteksinin tedavisinin postoperatif ağrıya karşı da etkili olduğu ve postoperatif ağrıdaki antinosiseptif etkisine öncelikli olarak opioid reseptörleri ve GABA_A reseptörlerinin aracılık ettiği belirtilmektedir (Zhu vd, 2016). Çeşitli inflamatuvar ağrı modellerinde yapılan çalışmalar sonucunda ise, viteksinin muhtemelen glutatyon seviyesindeki azalmayı önleyerek, ferrik iyon azaltma yeteneğini artırarak, serbest

radikalleri temizleyerek, TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve IL-33 gibi hiperaljezik sitokinleri inhibe ederek ve IL-10 gibi antihiperaljezik sitokinlerin seviyesini artırarak analjezik etki açığa çıkardığı sonucuna varılmıştır (Borghi vd, 2013). Yakın geçmişte yapılan bir çalışmada, viteksinin farelerde KKH ile geliştirilen nöropatide antiinflamatuvar etkisi nedeniyle yararlı olabileceği üzerinde durulmuştur (Xu vd, 2020).

2.6. Gen Aktarım Sistemlerinde Kullanılan Vektörler

Gen tedavisi, genetik materyal aracılığı ile hastanın hücrelerini genetik olarak değiştirerek hastayı tedavi etmek veya hastalığın belirtilerini azaltmak için kullanılan bir tedavi yöntemidir. Gen tedavisinin en kritik aşaması, genetik materyali hücre içine kolay ve güvenli yoldan taşıyacak en uygun vektörü seçmektir. Günümüzde gen aktarım sistemlerinde kullanılan vektörler genel olarak viral ve viral olmayan vektörler olarak sınıflandırılmaktadır (Nayerossadat vd., 2012; Ramamoort ve Narvekar, 2015).

Viral vektörler: Virüsler, genlerin etkili bir şekilde konakçı hücrelere aktarabilen doğal araçlardır. Bu yetenekleri nedeniyle terapötik genlerin taşınması için virüs vektör sistemleri geliştirilmiştir (Walther ve Stein, 2000). Retrovirüs, adenovirüs (tip 2 ve 5), lentivirüs, adeno-ilişkili virüs, herpes virüsü, çiçek virüsü gibi viral vektörler, günümüzde gen terapisinde en çok kullanılan başarılı sistemler arasında yer almaktadır (Walther ve Stein, 2000; Nayerossadat vd., 2012). Tüm viral vektörlerin genomları belirli bölgeleri silinerek değiştirilmiştir ve replikasyon yetenekleri hasara uğrattırılıp daha güvenli hale getirilmiştir. Buna rağmen, konakçıda immün sistem uyarımına, toksin üretimine ve genotoksisiteye yol açabilmektedirler (Nayerossadat vd., 2012).

Viral olmayan vektörler: Viral vektörlerin, konakçı hücrelere transfeksiyon verimi viral olmayan vektörler ile karşılaştırıldığında daha yüksektir. Ancak, immünojenite ve sitotoksisite riski viral vektörlerin kullanımını sınırlandırmaktadır. Nitekim, gen tedavisiyle ilgili olarak ilk ölümcül klinik deney viral vektöre (Adenovirüs) karşı gelişen inflamatuvar yanıt ile ilişkilidir. Viral olmayan vektörler, iletim verimliliğindeki yetersizlikleri ve dolayısıyla transgenlerin düşük ve geçici ekspresyonu nedeniyle geçmişte göz ardı edilmiştir. Fakat, daha sonra düşük immünojenite riskleri nedeni ile dikkat çekmişlerdir. Viral olmayan vektörlerin en büyük avantajı biyo-güvenli olmalarıdır. Bununla birlikte, viral olmayan vektörler düşük patojenite riski, düşük maliyet ve üretim kolaylığı ile viral vektör kullanımında önemli ölçüde düşüşe yol açmıştır (Hunter, 2006; Ramamoort ve Narvekar, 2015).

Viral olmayan vektörler genellikle katyonik özellik gösteren polikasyonik makromoleküller, lipidik ve peptit-protein yapıdaki taşıyıcı sistemlerdir. Viral olmayan taşıyıcı sistemlerin katyonik yapıda olması negatif yüklü olan genetik materyal ile doğal olarak elektrostatik etkileşime girmesine neden olmaktadır. Bu etkileşim sonucu ortaya çıkan pozitif net yük, negatif yüklü olan hücre zarından geçişi kolaylaştırmakta ve genetik materyalin verimli bir şekilde aktarılmasına yardımcı olmaktadır (Uddin, 2007).

İnorganik viral vektörler (metaller ve metal oksitler), kolay sentez edilebilme, uzun raf ömrü ve hedef dokularda birikebilme yeteneği gibi üstünlüklere sahiptir (Pamukcu vd., 2018).

Lipozomlar ise, kolesterolden ve toksik olmayan doğal fosfolipidlerden oluşturulabilen küresel şekilli küçük yapay veziküllerdir. Katman sayılarına ve boyutlarına göre küçük tek katlı veziküller (small unilamer vesicles, SUV), büyük tek katlı veziküller (large unilamer vesicles, LUV), çok katlı veziküller (multilamellar vesicles, MLV) ve çok veziküllü lipozomlar (multivesicular liposomes, MVL) olarak sınıflandırılmaktadırlar (Akbarzadeh vd., 2013).

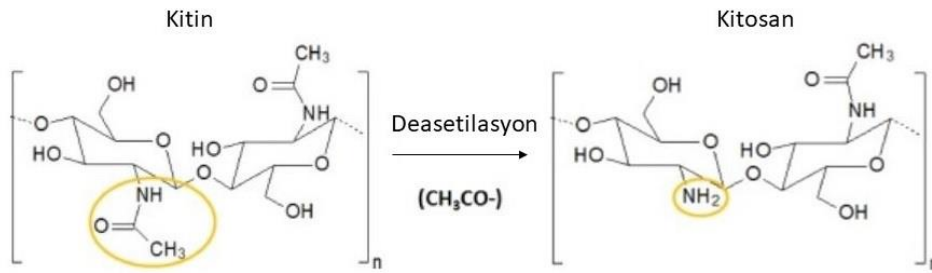
Polimerler, gen tedavisinde büyük ilgi gören viral olmayan vektörler arasında yer almaktadır. Genellikle protonlanabilir amin pompası taşıyan bu polimerler, pozitif yüklü oldukları için negatif yüklü genetik materyal ile etkileşip partikül oluşturmakta ve bu pozitif net yüklü partikülün negatif yüklü hücre zarından özellikle de endositoz ile etkili bir şekilde taşınmasını sağlamaktadır (Dinçer vd., 2005). Polimerler, proteinler, peptitler ve polisakkaritler gibi doğal ve polietilenimin (PEI), dendrimenler ve polifosfoesterler gibi sentetik polimerler olarak kategorize edilmektedir (Ramamoort ve Narvekar, 2015).

Kitosan, düşük immünojenitesi, toksik olmayan ve biyolojik olarak parçalanabilen yapısıyla sıklıkla tercih edilen polikasyonik bir polimerdir. Bu nedenlerden dolayı gen aktarım sistemlerinde özellikle tercih edilmektedir.

2.6.1. Kitosan

Kitosan (a (1→4) 2-amino-2-deoksi-β-d-glukan), kitinin alkalın deasetilasyonu ile elde edilen ve kabukluların (yengeçler, ıstakozlar), böceklerin dış iskeletinde ve miselyal mantarların hücre duvarlarında bulunan bir polisakkarittir. Kitosan, düşük immünojenisiteye sahip, toksik olmayan ve biyolojik olarak parçalanabilen polikasyonik bir polimerdir (Mansouri vd., 2004; Lara-Veleazquez vd., 2020). Aynı zamanda demir,

bakır, magnezyum gibi elementlerin şelatörü olan kitosan antioksidan ve hemostatik bir ajan olarak işlev görmektedir. Ayrıca, inflamatuvar yanıtı modüle ederek, nötrofillerin, makrofajların ve fibroblastların etkisini artırarak doku onarım sürecini ve yara iyileşmesini hızlandırmaktadır. Katyonik yükü sayesinde kitosan, bakterilerin negatif yüklü hücre zarında geçirgenliği artırıp besin alımını bozmakta ve antimikrobiyal etki açığa çıkarmaktadır (Lara-Veleazquez vd., 2020).



Şekil 2.5. Kitin ve kitosanın kimyasal yapıları (Muxia vd., 2017, s. 1358-1368)

Bahsedilen özelliklerinin yanı sıra, pozitif yüklü kitosan negatif yüklü DNA ve RNA ile kompleks oluşturabildiğinden gen aktarımı için oldukça iyi bir seçenek olarak görülmektedir. Kitosan, 1995 yılında ilk kez plazmit transfeksiyonu için kullanılmış, 2006 yılından itibaren de siRNA taşınması için kullanılmaya başlanmıştır (Santos-Carballal vd., 2018). Son yıllarda, kitosan biyo-uyumluluğu, biyolojik olarak parçalanabilmesi, mükemmel film oluşturabilme yeteneği, yüksek geçirgenliği ve mukoyapışkan olarak tanımlanan büyük moleküllerin mukozal yüzey boyunca penetrasyonunu artırma yeteneği ile gen aktarımı için oldukça yaygın bir şekilde tercih edilmektedir (Xu ve Du, 2002; Mansouri vd., 2004). Ancak, kitosan asidik ortamlarda iyi çözünürken, nötr ve bazik ortamlarda çok zayıf çözünmektedir. Kitosanın bu özelliği sudaki çözünürlüğünün, transfeksiyon verimliliğinin ve hedefleme yeteneğinin düşmesine yol açmaktadır. Bu sorunları çözmek için çeşitli modifikasyonların yapılmasına ihtiyaç duyulmuştur (Choi vd., 2016). Bu modifikasyonlar arasında en çok dikkat çeken, kitosanın enzimatik ve asidik hidroliz ile depolimerize edilerek kitooligosakkaritleri (KOS) dönüştürülmesidir (Xia vd., 2011). Antibakteriyel, antiinflamatuvar, antioksidan, anti-tümör, kolesterol düşürme, anti-obezite gibi çeşitli biyoaktiviteler gösteren

kitooligosakkaritler suda çözünürlüklerinin yanı sıra, moleküler kütlelerinin ve viskozitelerinin düşük olması nedeni ile bazı endüstriyel uygulamalar için kolaylık sağlamaktadır (Hamed vd., 2016; Jafari vd., 2020).

Gen aktarımında kullanılan bir diğer önemli vektörde taşıdıkları etken maddenin dolaşım süresini uzatabilen nanopartiküllerdir. Suda çözünürlüğü zayıf olan etkin maddelerin hücre membranından geçişini artırmaları, biyouyumlu olmaları ve biyoyararlanımı artırıyor olmaları gibi nedenlerle katı lipit nanopartiküller (KLN) bu alanda öne çıkmaktadır (Marangoz ve Yavuz, 2020).

2.6.2. Katı lipit nanopartiküller (KLN)

Emülsiyon, lipozom ve polimerik sistem gibi geleneksel taşıyıcı sistemlerin düşük taşıma kapasiteleri, kararsızlık sorunları ve toksisite riskleri nedeni ile endüstriyel üretimde kullanımları kısıtlıdır. Bu nedenle, 1980’lerde katı lipit mikropartiküller geliştirilmiş ve daha sonra da 1990’ların başlarında mikron altı aralıkta biyo-uyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilen KLN geliştirilmiştir (Gordillo-Galeano ve Mora-Huertas, 2018). KLN, vücut ve oda sıcaklığında katı olan lipitlerden hazırlanan ve yüzey etkin maddeler ile stabilize edilebilen nanometre boyutlu partiküllerdir (Marangoz ve Yavuz, 2020). KLN üretimi için kullanılan yöntemler arasında yüksek basınçlı homojenizasyon (sıcak ve soğuk homojenizasyon), mikroemülsiyon yöntemi, çözücü emülsifikasyon-evaporasyon veya çözücü difüzyon yöntemi, yüksek hızda karıştırma ve/veya ultrasonikasyon yöntemi yer almaktadır (Marangoz ve Yavuz, 2020).

KLN’ler, fizyolojik lipitlerden oluşma, kontrollü ilaç salımı ve hedeflendirme yapabilme, hem hidrofilik hem lipofilik ilaçları taşıyabilme, büyük ölçüde üretim ve sterilizasyona elverişli olma, toksisite riskinin düşük olması, ilaç kararlılığını ve hapsedilmiş etkin maddenin biyoyararlılığını artırma gibi avantajlar sunmaktadır. Bunlarla birlikte, öngörülemeyen jelleşme eğilimi, polimorfik geçiş sonrasında ilaç sızıntısı ve ilaç yükleme kapasitesinde düşüklük gibi bazı dezavantajlara sahiptir (Yadav vd., 2013; Lingayat vd., 2017; Marangoz ve Yavuz, 2020). KLN’ler suda çözünmeyen ilaçların çözünürlüğünü ve biyoyararlanımını artırmanın yanı sıra nanometre ölçekli partikül boyutlarından dolayı ilaç emilimini, taşınmasını ve dağıtımını teşvik etmektedir (Üner, 2007; Mehnert ve Mäder, 2011; Tan vd., 2017). KLN’ler kan dolaşımından ziyade daha çok lenfatik sistemde dolaşması nedeniyle hapsettiği ilaç etkin maddesini ilk geçiş etkisinden korumaktadır. Bu sayede daha düşük dozlarda tedaviyi mümkün kılmakta bu

da daha az yan etkinin oluşmasına sebep olmaktadır. Bu sebeple de KLN ile hazırlanan ilaç etkin madde içeren formülasyonlarda serbest ilaçlara göre daha az toksisite görülmektedir (Öztürk, 2017).

Bu bilgilerden hareketle bu tez çalışmasında viteksinin nöropatik ağrı üzerindeki olası etkisinin belirlenmesi ve bu etkinliğin serotonerjik sistem ile ilişkisinin aydınlatılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, KKH ile nöropatik ağrı geliştirilen sıçanlara intraperitoneal (i.p) olarak uygulanan 5, 10, 20, 40 mg/kg viteksinin muhtemel anti-allodinik etkisinin elektronik von Frey cihazı ile ve antihiperaljezik etkisinin plantar test (Hargreave's Methodu) ile değerlendirilmesi ve sonuçların referans ilaç olarak kullanılan 30 mg/kg pregabalin ile karşılaştırılması planlanmıştır. Serotonerjik sistemin, viteksinin anti-allodinik ve antihiperaljezik etkisindeki rolü, 5-HT₂ antagonisti ketanserin (1 mg/kg; i.p), 5-HT₃ antagonisti ondansetron (1 mg/kg, i.p) ve 5-HT_{1A} antagonisti WAY-100635 (1 mg/kg) kullanılarak araştırılmıştır.

Günümüzde kersetin, genistein, apigenin, naringenin, silibinin ve kamferol ve viteksin gibi flavonoidler sıklıkla çalışılmakta fakat bunların düşük çözünürlükleri, sulu ortamda karasızlık, zayıf emilim, foto degradasyon ve hızlı metabolizma özellikleri nedeniyle kullanımlarında sıkıntılar yaşanmaktadır (Thilakarathna vd., 2013; Cassidy vd., 2017; Roy vd., 2019). Bu sebeple modern nanoteknoloji kullanılarak geliştirilen nano taşıyıcılar ile kapsülleme flavonoidlerin bu dezavantajlarını azaltarak biyoyararlanımını artırabilmektedir (Khan vd., 2019; Roy vd., 2019; Dobrzynska vd., 2020). Bu bağlamda flavonoid yüklü nanopartiküller gelişmiş çözünürlükleri, azaltılmış yan etkileri ve uzun süreli biyolojik kullanılabilirlikleri nedeniyle önemli bir araştırma konusudur. Bugüne kadar farklı flavonoidler içinde çeşitli taşıyıcı sistemler geliştirilmiştir. Bunlar içerisinde polimerik nanopartiküller (Puhl vd., e ark, 2012; Tuncer vd., 2016; Fatma vd., 2016), katı lipid nanopartiküller (Scalia vd., 2013; Tan vd., 2017; Borrrges vd., 2020) ya da metalik nanopartiküller (Jain vd., 2012, Sierra vd., 2016; Sharma vd., 2019) bulunmaktadır. Bu bilgilerden yola çıkılarak bu tez kapsamında viteksinin kitooligosakkarit kaplı katı lipid nanopartiküllere yüklenmesi ve etkisinin araştırılması işlemleri yapılmış daha sonra *in vivo* olarak da bu etki değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla katı lipid olarak Dynasan 114 ve formülasyonlara katyonik özellik kazandırmak için katyonik ajan olarak didodesildimetilamonyum bromid (DDAB) kullanılmıştır. Yapılan çalışmalarda DDAB kullanılan formülasyonların hücreler üzerindeki yüksek sitotoksisite göstermesi sebebi ile

katı lipid nanopartiküllerin suda çözünen kitooligosakkarid ile kaplanması yapılmıştır. Formülasyonlarda önce karakterizasyon analizleri (Partikül boyut ve dağılımı, zeta potansiyel, pH ve DSC) sonra da viteksinin yüklenme miktarı ve zaman içerisinde salım özellikleri değerlendirilmiştir. Hazırlanan formülasyonlarda genetik materyal olarak GFP plazmidi kullanılmış ve genetik materyalin nanopartiküllere adsorbsiyon çalışmaları yapılmıştır. Bu formülasyonların hücre canlılığı üzerindeki etkisinin araştırılması için MTT test kullanılmış ve hücrelerde transfeksiyon özellikleri araştırılmıştır. Daha sonra uygun formülasyonlar bir sonraki aşamada *in vivo* deneyler için kullanılmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasallar

Sarf madde	Firma adı
Viteksin	Cayman Chemical
Ketamin	Richter Pharma AG, Avusturya
Ksilazin	Bioveta, Ankara, Türkiye
Pregabalin	Cayman Chemical
Ketanserine	Sigma, St. Louis, A.B.D
Ondansetron	Sigma, St. Louis, A.B.D
WAY-100635	Sigma, St. Louis, A.B.D
Dynasan 114	IOI Oleo GmbH, Almanya
Kitooligosakkarit (KOS)	Sigma Aldrich, Almanya
Diklorometan	Sigma Aldrich, Almanya
Agaroz	Sigma Aldrich, Almanya
DMSO	VWR Prolabo, ABD
DMEM	Sigma Aldrich, Almanya
EDTA	Sigma Aldrich, Almanya
Etidyum bromür~95%	Amresco, Amerika
Etil Alkol (Absolüt)	Merck, Almanya
Fötal sığır serumu	Sigma-Aldrich, Almanya
Penisilin/Streptomisin	GIBCO, İngiltere
MTT boyası	Applchem, Almanya
GFP plasmid	Aldevron, ABD
1XPBS tampon	Capricorn Sci., Almanya

Tween 80®	Sigma Aldrich, Almanya
Span 80®	Sigma Aldrich, Almanya
Trizma Baz	Sigma Aldrich, Almanya
Borik asit	Sigma Aldrich, Almanya
Tripsin/EDTA	Sigma Aldrich, Almanya
DDAB®	Fluka, Almanya
Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent	İnvitrogen, ABD

3.2. Kullanılan Cihazlar

Makine-Teçhizat

Elektronik von Frey Cihazı
Plantar test-Hargreaves Aparatı
Ultrasonik su banyosu
Hassas terazi
Aktivite kafesi
Manyetik Karıştırıcı
Mekanik Karıştırıcı
Sonikatör
Su banyoları
Hassas teraziler
Saf su cihazı
Rotavapor
Küçük kapasiteli masa üstü santrifüj
Partikül boyut dağılımı, zeta potansiyel ölçer
Otoklav
Vorteks
pH metre
Küçük kapasiteli yatay elektroforez*
Jel dokümantasyon sistemi
CO₂'li Etüv
İnvert Mikroskop
Büyük kapasiteli santrifüj

Firma-Model

Ugo Basile 38450=004, İtalya
Ugo Basil 37370, İtalya
Heto, Allerod, Danimarka
Ohaus E12140, İsviçre
Ugo Basile 47420, İtalya
Stuart, İngiltere
Heidolph Hei Torque, Almanya
Sonics, Vibra Cell, ABD
Lab Companion BW 10H,
Mettler AM 100, ABD
MilliQ Millipore, Fransa
Buchi (R-205), İsviçre
Sigma-Aldrich, Almanya
Malvern Zetasizer Nano ZS, İngiltere
Hirayama HVE 50, Japonya
Velp Scienticia, Çin
WTW Profi Lab, Almanya
GE Healthcare, ABD
UviTec Cambridge, İngiltere
Binder, Almanya
Leica DMI 400, Almanya
Rotina 420R, Almanya

Laminar Akış Kabini	Kojair Xtraline Biowizard
Cytatin 5 Çoklu Plaka okuyucu	BioTek, ABD
Otomatik Mikropipetler	Ovation M, Vista Lab, ABD
Elektronik pipet	Brand Accujet pro, ABD
Derin dondurucu (-20)	Liebherr Medline, Almanya
Derin dondurucu (-80)	New Brunswick Sci, ABD

3.3. Deney Hayvanları

Deneylerimizde Anadolu Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Birimi'nden alınan 200-250 g ağırlığında Sprague Dawley dişi sıçanlar kullanılmıştır. 12 saat aydınlık/12 saat karanlık döngüsü olan, iyi havalandırılmış, 22 ± 1 °C ortam sıcaklığına sahip odalarda barındırılan hayvanlar deneyler başlamadan birkaç gün önce deneylerin yapılacağı odaya alınarak deney ortamına alıştırmıştır. Standart yem peletleri ve çeşme suyu verilerek hayvanlarının beslenmeleri sağlanmıştır. Deney hayvanları ile yapılacak çalışmalar için Anadolu Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Komitesi (Karar No: 2019-41, 13.11.2019) tarafından Etik Kurul Onayı alınmıştır.

3.4. Deney Gruplarının Oluşturulması ve İlaç uygulamaları

KKH modeline bağlı nöropati gelişimini gösterebilmek için cerrahi işlem yapılmadan önce tüm sıçanların termal (Plantar Test) ve mekanik (Elektronik von Frey filament) ağrı eşikleri ölçülmüştür. Daha sonra cerrahi işlem yapılarak sıçanlarda KKH'ye bağlı nöropati modeli geliştirilmiştir. Cerrahi müdahalenin etkisini göstermek amacıyla sham grubu olarak seçilen bir grup sıçana ise sinir hasarı verilmeden sadece sham operasyonu yapılmıştır. Sinir hasarı oluşturulduktan ve sham operasyonu yapıldıktan 7 gün sonra, aynı test prosedürleri ile sıçanların termal ve mekanik eşikleri tekrar ölçülmüş ve nöropati gelişiminin tespit edildiği sıçanlar deneylere alınmıştır. Daha sonra 8. Günde ilaç enjeksiyonları yapıp tekrarlanan test prosedürleri ile ilaç etkinliği ve etki mekanizmasının değerlendirilmesi yapılmıştır. Viteksin, %0,5 karboksimetil selüloz (CMC) çözeltisi ve serum fizyolojinin 3:7 oranında karışımı içerisinde çözünmüştür (Sumbul vd, 2016) ve kontrol grubuna da bu çözücü uygulanmıştır. %8 DMSO (dimetilsülfoksit) ve %50 PEG (polietilen glikol) çözeltilerinin 1:1 oranında karışımı pregabalin çözücüsü olarak kullanılmıştır. Ketanserin, ondansetron ve WAY-100635 serum fizyolojikte çözünmüştür. Tüm enjeksiyonlar i.p. yolla yapılmıştır.

Viteksinin antihiperalezik ve anti-allodinik etkinliğini ve etki mekanizması değerlendirmek için sıçanlar 14 gruba ayrılmıştır. (n=8). Bu gruplara sırasıyla;

1. Çözücü uygulaması (Sham kontrol grubu),
2. Çözücü uygulaması (Nöropatili kontrol grubu),
3. 5 mg/kg viteksin uygulaması,
4. 10 mg/kg viteksin uygulaması,
5. 20 mg/kg viteksin uygulaması,
6. 40 mg/kg viteksin uygulaması,
7. 30 mg/kg pregabalin uygulaması,
8. Çözücü uygulamasından 30 dk önce 5-HT₂ antagonisti 1mg/kg ketanserin ön-uygulaması,
9. Viteksin uygulamasından 30 dk önce önce 5-HT₂ antagonisti 1mg/kg ketanserin ön-uygulaması,
10. Çözücü uygulamasından 30 dk önce 5-HT₃ antagonisti 1mg/kg ondansetron ön-uygulaması,
11. Viteksin uygulamasından 30 dk önce önce 5-HT₃ antagonisti 1mg/kg ondansetron ön-uygulaması,
12. Çözücü uygulamasından 30 dk önce 5-HT_{1A} antagonisti 1mg/kg WAY-100635 ön-uygulaması,
13. Viteksin uygulamasından 30 dk önce önce önce 5-HT_{1A} antagonisti 1 mg/kg WAY-100635 ön-uygulaması,
14. 5 mg/kg viteksin yüklü formülasyon uygulaması, yapılmıştır.

Nöropati modeli geliştirilmiş 4 ayrı grup (15., 16. 17. ve 18. grup) ise aktivite kafesi ile lokomotor aktivitenin değerlendirilmesi için belirlenmiş ve bir gruba çözücü uygulaması yapılırken, bir gruba etkili bulunan ve etki mekanizması çalışmalarında da uygulanan 20 mg/kg viteksin uygulaması, bir diğer gruba 5 mg/kg viteksin içeren

formülasyon ve son olarak da viteksin yüklü olmayan boş formülasyon uygulaması yapılmıştır.

3.5. Deneysel Yöntemler

3.5.1. Kronik konsrüksiyon sinir hasarı (KKH)’na bağlı nöropati modelinin oluşturulması

Bennett vd., tarafından 1988 yılında geliştirilen ve ilk bulunan parsiyel siyatik sinir zedelenmesi modeli olan KKH, sıklıkla tercih edilen bir nöropatik ağrı hayvan modelidir. Sıçanlar i.p olarak uygulanan 90 mg/kg ketamin + 10 mg/kg ksilazin ile anestezi altına alındıktan sonra sağ arka bacaklarının üst kısmı traşlanıp cerrahi işleme hazır hale getirilmiştir (Pathak vd., 2013). Anestezi uygulamasını takiben spontan hareketlerini kaybeden sıçanlar göğüs kafeslerinin üzerine yerleştirilmiş ve arka bacakları femurları ile 90 derecelik açı oluşturulacak şekilde sabitlendikten sonra kalçanın distalinde, femurun 3-4 mm altına uzunlamasına eksenini boyunca 1cm’lik kesik atılmıştır. Makas yardımıyla kas tabakası ayrıldıktan sonra açığa çıkarılan siyatik sinir çevre dokulardan temizlenmiştir. Daha sonra bu sinire, 4/0 ipek katkı (Doğsan, Trabzon, Türkiye) kullanılarak unilateral olarak yaklaşık 1mm aralıklarla dört ayrı gevşek düğüm atılmıştır (Austin vd., 2012). Her bir düğüm üzerine ikinci bir düğüm daha atılarak düğümlerin uygun pozisyonda kalması sağlanmıştır. Düğümlerde serbest kalan uçlar 1 mm olacak şekilde kesildikten sonra (Shi vd., 2011), kesi atılan alan 4/0 ipek katkı (Doğsan, Trabzon, Türkiye) ile kapatılmış ve dikiş tamamlandıktan sonra iyot çözeltisiyle sterilize edilmiştir. Cerrahi işlem sonrasında sıçanlar ayrı kafeslerde muhafaza edilmiş ve anesteziden çıkana kadar takip edilmiştir. Test prosedürlerine başlamadan önce, sıçanlar nöropati gelişimi için 1 hafta boyunca bekletilmiştir.

3.6. Ağrı Eşiklerinin Değerlendirilmesi

3.6.1. Elektronik von Frey cihazı-mekanik allodini

Sıçanların mekanik uyarana karşı ağrı eşikleri, elektronik von Frey cihazı (Ugo Basile, No: 38450, Verase, İtalya) kullanılarak ölçülmüştür. Elektronik von Frey cihazı kapasitesinin [1=1000 gram force (gf)] izin verdiği kadar kullanıcı kontrollü olarak sürekli kuvvet uygulanması sağlanmakta ve hayvan tepkisini otomatik olarak kaydetmektedir. Mekanik allodini, elektronik von Frey cihazı kullanılarak geliştirilen mekanik uyarana yanıt olarak sıçanın pençesini geri çekme eşiğinin tespit edilmesiyle değerlendirilmiştir. Sıçanlar mekanik allodini değerlendirmesinden önce delikli metal

platformun üzerine konulan özel plastik kafeslerine yerleştirilip 15-30 dk boyunca ortama alıştırmıştır (Bordet vd., 2008). Hayvanın sinir hasarı geliştirilen taraftaki arka ayak pençesinin orta plantar yüzeyine dik olarak uygulanan paslanmaz çelik bir filament aracılığıyla, operatör kontrolündeki hızla artan kuvvet ile mekanik uyarı oluşturulmuştur (Huang vd., 2004; Thangamani vd, 2013). Hayvanın pençesini çekmesine yol açan güç (gram=gf) cihaz tarafından kaydedilmiştir. Her bir sıçan için 3'er dakikalık aralıklarla alınan 3-4 ardışık ölçümün ortalaması hayvanın geri çekme eşiği olarak değerlendirilmiştir. Pençede doku hasarı gelişmesinin önüne geçmek için kuvvet kesme noktası (cut-off) 50 gf olarak belirlenmiştir (Huang vd., 2004; Bordet vd., 2008).

3.6.2. Plantar test (Hargreaves metodu)- termal hiperaljezi

Sıçanların termal uyarana karşı ağrı eşikleri plantar test-Hargreaves aparatı (Model no:37370; Ugo-Basile, 7280, İtalya) ile ölçülmüştür. Termal hiperaljezi, termal uyarana yanıt olarak sıçanın arka pençesini çekme süresi üzerinden değerlendirilmiştir. Sıçanlar test başlamadan önce özel cam platformun üzerine konulan şeffaf plastik kafeslerine yerleştirilip 15-30 dk boyunca ortama alıştırmıştır. Yüksek yoğunluklu hareket edebilir radyant ısı kaynağı, sıçanın arka ayak pençesinin orta plantar yüzeyine denk gelecek şekilde cam platformun altına yerleştirilmiştir ve ölçüm esnasında hayvanın hareketsiz olup olmadığı takip edilmiştir. Radyant ısının başlangıcından sıçanın pençesini çekmesine kadar geçen süre cihaz tarafından otomatik olarak kaydedilmektedir (Hori vd., 2010). Her bir sıçan için 3'er dakikalık aralıklarla alınan 3-4 ardışık ölçümün ortalaması hayvanın geri çekme eşiği olarak değerlendirilmiştir. Plantar test cihazının infrared ısı yoğunluğu nedeniyle hayvanın pençe dokusunda oluşabilecek hasarın önüne geçilebilmesi için deneyin bitirilme zamanı (cut-off) 30 sn olarak belirlenmiştir (Duan vd., 2014).

Maksimum olası etkinin yüzdesi (%MPE), elektronik von Frey ve plantar testlerden elde edilen eşiklerden hareketle aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır (Kondo vd., 2009):

$$\%MPE = [(\text{ilaç sonrası ölçülen eşik} - \text{ilaç öncesi ölçülen eşik}) / (\text{cut off değeri} - \text{ilaç öncesi ölçülen eşik})] \times 100 \quad (3.1)$$

%MPE değerindeki yükselme anti-allodinik ve antihiperaljezik aktivite olarak değerlendirilmiştir.

3.6.3. Aktivite kafesi

Hayvanların spontan lokomotor aktivitesini değerlendirmek için pleksiglas yapıda ve kafes biçimindeki aktivite kafesi kullanılmıştır. Hayvanların kafes içinde yaptıkları yatay ve dikey yöndeki hareketler, infrared ışınları kesintiye uğratmakta ve elektronik ünitenin dahili hafızası tarafından sayılan ve kaydedilen ışın kesintileri, kullanıcının hayvan aktivitesini değerlendirmesini ve analiz etmesini sağlamaktadır (Marazoti vd., 2009). Çözücü, 20 mg/kg viteksin, 5 mg/kg viteksin içeren formülasyon ve viteksin içermeyen boş formülasyon uygulanan nöropatik ağrı modeli oluşturulmuş hayvanlar madde uygulanmasından 45 dk sonra aktivite kafesine alınmış ve 15 dk boyunca ölçüm yapılmıştır.

3.7. Formülasyon Çalışmaları

3.7.1. Ön formülasyon çalışmaları

3.7.1.1. *Lipidik yapıdaki nanopartikül (LNP) formülasyonlarının hazırlanması*

LNP'ler bazı modifikasyonlarla sonikasyon-evaporasyon yöntemleri ile hazırlanmıştır (Olbrich vd., 2001; Şenel vd., 2012; Şenel vd., 2015). Bu teknikte, Tablo 3.1'de gösterilen miktarda tartılan katı lipit (Dynasan 114) 500 µl diklorometan (DKM) ile bir balon içinde çözündürülmüştür. Balon hemen rotavapora alınmış ve çözücü uçurma işlemi 500 mbar basınçtan başlayarak en son 100 mbar'a indirilmiş ve 30 dk organik çözücünün uçması lipidin balon iç yüzeyinde film tabakası oluşturması beklenmiştir. Aynı bir falkon tüpü içinde ise distile su ve yüzey aktif maddeler (Tween®80 ve Span 80) tartılmış ve homojen bir şekilde karışması için hafifçe vortekslenmiştir ve 40 °C'ye kadar ısıtıldı. İki sıvı faz birbiri içinde hemen dağıtılarak %40 güçte 3 ya da 5 dk sonikasyona maruz bırakılmıştır. Bu arada hazırlanan formülasyonun eser miktarda kalabilecek DKM ve sonikasyon sebebiyle çok ısınmaması ve etkilenmemesi için ara ara soğuk su dolu beher içine daldırma işlemi uygulanmış ve sistemin aşırı ısınması engellenmiştir. 5 dk sonikasyon sonunda balon içeriği bir behere alınmış ve gece boyunca manyetik karıştırıcı üzerinde karışmaya bırakılmıştır. Burada eser miktarda kalabilecek DKM'nin de uçması sağlanmıştır. Süre sonunda gözle herhangi bir faz ayrışması ya da kremalaşma olup olmadığı kontrol edilerek oda ısısında bir hafta beklemeye bırakılmıştır. Bir hafta sonunda da yine gözle görülen faz ayrışması ya da kremalaşma olup olmadığı kontrol edilmiş ve uygun formüllere katyonik ajan eklemesi işlemlerine geçilmiştir. Hazırlanan formülasyonların oranları ve kodları Tablo 3.1'de gösterilmektedir.

Tablo 3.1. Lipidik ve kitooligosakkarid kaplı formülasyonların kodları ve kullanılan miktarları

	Katı lipit	Yüzey etkin maddeler		Katyonik Ajan	Polimer	Viteksin mg/mL	Organik çözücü mL	Uygulanan yöntemler
Formülasyon	Dynasan 114 (g/2mL)	Tween® 80 (g/2mL)	Span® 85 (g/2mL)	DDAB® (g/2mL)	Kitooligosakkarid (mg/4mL)		DKM	Sonikasyon Süresi (dk)
F1	0,08	0,156	0,084	-	-	-	500	3
F2	0,08	0,156	0,084	-	-	-	500	5
F3	0,04	0,156	0,084	-	-	-	500	3
F4	0,04	0,156	0,084	-	-	-	500	5
F5	0,2	0,156	0,084	-	-	-	500	5
F6	0,2	0,156	0,084	-	-	-	500	5
F7	0,2	0,156	0,084	0,06	-	-	500	5
F8	0,2	0,156	0,084	0,006	-	-	500	5
F9	0,2	0,156	0,084	0,0006	-	-	500	5
F10	0,2	0,156	0,084	-	10	-	500	5
F11	0,2	0,156	0,084	-	20	-	500	5
F12	0,2	0,156	0,084	-	20	5	500	5
F13	0,2	0,156	0,084	-	-	5	500	5

3.7.1.2. LNP'lere pozitif yük kazandırma

Katyonik lipitler genellikle anyonik özellikteki maddelerdir ve genetik materyale elektrostatik olarak tutunabilmek için katyonik özellik taşımaları gerekmektedir (Uddin, 2007; Chen vd., 2010). Formülasyon hazırlama sırasında hazırlanan nanopartiküllere genetik materyalin bağlanabilmesi için katyonik özellik kazandırılmak istenmiştir. Bu amaçla literatürde de sıkça kullanılan DDAB katyonik ajan olarak seçilmiştir. DDAB formülasyon hazırlama aşamasında katı lipit ile birlikte tartılmış ve DKM içerisinde çözündürülmüştür. Bundan sonra formülasyonların hazırlanması için yukarıda “Lipidik Yapıdaki Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması” bölümünde anlatılanlar ile aynı işlemler kullanılmıştır. Hazırlanan formülasyonlarda da bir hafta herhangi bir fiziksel ayrışma ya da kremalaşma olup olmadığı gözlenmiştir. Bir hafta sonunda fiziksel olarak herhangi bir değişim gözlenmeyen formülasyonlar sitotoksisite deneyine alınmıştır.

3.7.1.3. LNP'lerin kitooligosakkarid ile kaplanması

LNP'lere DDAB ile katyonik özellik kazandırılması aşamasından sonra önce karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Karakterizasyon çalışmalarında partikül boyutu ve zeta potansiyel değerleri göz önüne alınarak uygun formülasyonlar için sitotoksisite deneyleri yapılmış ve “Bulgular” bölümünde görüldüğü üzere hücreler üzerinde çalışılan konsantrasyonlarda yüksek oranda sitotoksisite gözlenmiştir. Daha düşük DDAB konsantrasyonlarında da istenen zeta potansiyel değeri elde edilemediği için formülasyona katyonik özellik kitooligosakkarid ile kazandırılması planlanmıştır.

Kitin doğada en bol bulunan doğal bir polisakkaritlerden biridir ve kitosan da en önemli kitin türevidir. Çeşitli biyoaktivitelere sahip olmalarına bakılmaksızın, kitin ve kitosanın suda çözünmemeleri birçok endüstride uygulamalarını sınırlamaktadır. Bu sebeple kitin ve kitosanın fiziksel, kimyasal veya enzimatik depolimerizasyonu ile KOS elde edilmiştir. KOS'lar kitosana göre suda çözünür ve düşük moleküler ağırlıklı türevleridir ve birçok yönden ana polimerlerden üstündür. KOS'lar çok çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptir ve tıp, kozmetik, gıda ve tarım gibi birçok alanda çok sayıda umut verici uygulamaya sahiptir.

Kitooligosakkaridin doğal katyonik özelliği (Huang vd, 2006) sayesinde genetik materyalin rahatlıkla nanopartikül üzerine adsorbe edilebileceği ve hücreler üzerinde daha az sitotoksik etki yaratacağı düşünülmüştür. Bu amaçla yukarıda “Lipidik Yapıdaki

Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması” bölümünde anlatılan lipit formülasyonu DDAB içermeden hazırlandıktan sonra manyetik karıştırıcı üzerinde 4 ml suda çözündürülerek hazırlanan KOS çözeltisi içerisine damlatılarak nanopartiküllerin kitooligosakkarid ile kaplanması sağlanmıştır. Formülasyon hazırlandıktan sonra karakterizasyon ve sitotoksite analizlerine geçilmiştir.

3.7.2. LNP'lere viteksin yüklenmesi

Formülasyona viteksin yükleme aşaması en iyi formülasyon koşullarının elde edilmesinden sonra gerçekleştirilmiştir. Viteksin konsantrasyonu 5 mg/ml olacak şekilde tartılmış ve 30 µL DMSO içerisinde çözündürülmüştür. Daha sonra katı lipit ile birlikte balona koyulmuş ve rotavopara aktararak LNP formülasyonu hazırlama işlemlerinin aynısı uygulanmıştır. Oluşan dispersiyon kitooligosakkarid ile kaplandıktan sonra yine karakterizasyon analizleri, genetik materyal bağlama analizi, yükleme kapasitesinin belirlenmesi ve in vitro salım deneylerine geçilmiştir

3.7.3. LNP'lere genetik materyal yüklenmesi

Bu aşamada hedeflenen genetik materyal olarak seçilen GFP (Green Fluorescence Protein) plazmidinin hazırlanan KOS kaplı katyonik lipit nanopartiküllere elektrostatik etkileşim yoluyla interaksiyon yapması sağlanmıştır. Çalışma için kullanılan GFP, kristal denizanası *Aequorea victoria*'dan türetilen 238 amino asitten oluşan ~ 27 kDa'lık bir proteindir. Görünür spektrumun yeşil bölümünde, proteinin merkezinde üç spesifik amino asidin olgunlaşma reaksiyonundan (Ser65, Tyr66 ve Gly67) oluşan bir kromofordan kaynaklanan bir floresan emisyon dalga boyuna sahiptir. GFP'nin geleneksel floresan boyalara göre en büyük avantajı, toksik olmaması ve canlı hücrelerde ifade edilebilmesi ve dinamik, fizyolojik süreçlerin incelenmesine olanak sağlamasıdır. Bu sebeple de çok çeşitli biyolojik disiplinlerdeki araştırmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Bunlar arasında plazmid yapıları hangi hücrelerin başarıyla aldığının belirlenmesinde genellikle bir işaretçi olarak plazmid yapılarında bulunmaktadır (<http-1>). Bu amaçla çalışmamızda belirli oranlarda alınan formülasyonlara yapılan çalışmaya göre hesaplanan GFP plazmid miktarları bir tüp içerisinde dikkatlice karıştırılmış ve daha sonra 37°C'de 20 dk inkübasyona bırakılarak elektrostatik etkileşim olması sağlanmıştır. Daha sonra bu kompleksler karakterizasyon, sitotoksite, jel dökümantasyon ve transfeksiyon çalışmaları için kullanılmıştır.

3.8. Karakterizasyon Çalışmaları

Bu bölümde hazırlanan lipit formülasyonlarında, partikül boyut ve dağılımı, zeta potansiyeli ve pH değeri gibi fizikokimyasal özellikler değerlendirilmiştir.

3.8.1. Partikül boyut ve dağılımı

Hazırlanan formülasyonlarda partikül boyutu ve dağılımı foton korelasyon spektroskopisi kullanılarak ölçülmüştür. Ölçümler renksiz zeta ölçüm kuvvetleri içinde gerçekleştirilmiştir. Ölçümlerden önce, tüm formülasyonlar, uygun bir saçılma yoğunluğu elde etmek için pH 7.4 ve 50 μ S iletkenliğe sahip 0.22 μ m filtreden geçirilmiş distile su içinde dağıtılmıştır. Ölçümlerde Malvern Zeta Sizer Nano ZS cihazı (25 ± 2 °C) kullanılmış olup cihaz 100 ölçümün ortalaması alınacak şekilde ayarlanmıştır ve 3 kez tekrar edilmiştir.

3.8.2. Zeta potansiyel ölçümü

Zeta potansiyel ölçümünde partikül boyut dağılımı için hazırlanan örneklerde aynı cihaz kullanılarak zeta ölçüm kuvvetleri cihaz içinden çıkarılmadan yapılmıştır. Elektrostatik hareketliliğin zeta potansiyeline dönüştürülmesinde aşağıda gösterilen Helmholtz-Smulochowski eşitliği (E.1) kullanılmıştır.

$$E.1 \zeta = E (4\pi\eta/\varepsilon) \quad (3.2)$$

ζ = zeta potansiyeli (mV)

E = elektroforetik hareketlilik

η = dispersiyon ortamının viskozitesi (su 0,8904 cp)

ε = çözücünün dielektrik sabiti (su, 78,54)

Ölçümlerde cihaz 10 ölçümün ortalaması alınacak şekilde ayarlanmıştır ve 3 kez tekrar edilmiştir.

3.8.3. pH değeri

Viteksin yüklü ve yüklü olmayan formülasyonlar hazırlandıktan sonra pH metre ile pH değerleri belirlenmiştir.

3.8.4. FTIR (Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi) analizleri

Hazırlanan formülasyonlarda FTIR analizleri için örnekler öncelikle liyofilize edilmiştir. Daha sonra viteksin, viteksin yüklü KOS-LNP'ler, boş KOS-LNP'ler ve

viteksin ve boş KOS-LNP'lerin fiziksel karışımı için önce KBr diskleri hazırlanmış daha sonra FTIR spektrumu FTIR (Schimadzu IR Prestige-21, Japonya) cihazı kullanılarak 4000-500 cm^{-1} dalga boyu aralığında saptanmıştır.

3.8.5. NMR (Nükleer manyetik rezonans) analizi

Hazırlanan formülasyonlarda NMR (^1H -NMR) analizleri için örnekler öncelikle liyofilize edilmiştir. Daha sonra viteksin, viteksin yüklü KOS-LNP'ler, boş KOS-LNP'ler ve viteksin ve boş KOS-LNP'lerin fiziksel karışımları dötero DMSO (DMSO- d_6) içinde çözündürülmüştür. Örneklerin analizleri NMR (Bruker 500 MHz UltraShield NMR, Almanya) cihazı kullanılarak yapılmıştır.

3.8.6. Formülasyonlarda jel reterdasyon analizleri

Bu analizlerde hazırlanan formülasyonların genetik mateyali bağlayabilme, serum varlığında ya da DNaz enzimi varlığında formülasyonların genetik mateyali koruyabilme kabiliyetleri değerlendirilmiştir. Bunun için aşağıda anlatılan agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanılmıştır.

3.8.6.1. Agaroz jel elektroforez işlemi

Bu analiz için agardan ya da agar içeren deniz yosunlarından ekstrakte edilmiş bir polimer olan agaroz kullanılmıştır. Agaroz DNA/RNA görüntülemeye kullanılan nükleik asitleri elektroforetik olarak ayırmak için rutinde kullanılan jelleştirici bir ajandır.

Bu işlem için aşağıda tarif edildiği gibi %2,5 agaroz içeren jeller hazırlanmıştır. Hem agaroz jel hazırlanması hem de jelin yürütüleceği yürütme tamponunu hazırlama için önce 50 x TAE (Tris asetik asit etilen diamin tetra asetat) hazırlanmış daha sonra bu stok çözeltiden 1 x TAE kullanılmıştır. TAE tamponu hazırlandıktan sonra otoklavlanmıştır.

50xTAE (500 ml pH8.0)

Tris 242 g (121,14g/mol)

0.5 M Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) 100 ml (372,24 g/mol pH:8,0)

Glasiyel asetik asit 57,1 ml (60,05)

Tampon hazırlandıktan sonra %2,5'lik 100 ml agaroz jel hazırlamak için sırasıyla;

- 1- Bir erlene 2.5 gr agaroz tartılmış ve üzerine 100 ml 1 x TAE tamponu eklenerek manyetik karıştırıcı üzerinde ısıtılarak çözünmesi beklenmiştir.
- 2- Agarozun iyi bir şekilde çözüldüğünde ve çözelti şeffaflaştığında erlen manyetik karıştırıcıdan indirildi ve jel çözeltisi yaklaşık 45 °C'ye kadar soğuması beklendi. Bu dereceye geldiğinde üzerine %5 oranında (10 mg/ml) etidyum bromür eklenerek çok kısa bir süre yine manyetik karıştırıcıda homojen bir şekilde karışması beklenmiştir.
- 3- Çok fazla soğumasına izin verilmeden jel daha önceden hazırlanmış jel tepsisine dökülerek üzerine yine uygun aralıklarla jel tarakları yerleştirilmiştir.
- 4- Jelin polimerleşmesi yani katılaşması için yaklaşık 45 dk beklendikten sonra üzerine 1 x TAE tamponu koyularak taraklar dikkatlice çıkarılmıştır.
- 5- Örnekler dikkatlice küçük mikrotüpler içerisine belli konsantrasyonlarda alınmış ve üzerlerine yükleme tamponu eklenmiş ve homojen karışması sağlanmıştır
- 6- Yükleme tamponu ile karıştırılan örnekler mikropipet yardımı ile dikkatlice jel kuyucuklarına yüklenmiştir
- 7- Yükleme işlemi bittikten sonra elektroforez cihazı çalıştırılmış ve 50mv'da yaklaşık 2 saat örneklerin jel içerisinde yürütülmesi sağlanmıştır.
- 8- Süre sonunda jel dikkatlice görüntüleme cihazına (UVP Alliance Cambridge, İngiltere) alınmış ve bantların görüntüsü UV lamba altında alınmıştır.

3.8.7. Serum içinde karalılık ve DNaz enzimine karşı koruyuculuk

Hazırlanan formülasyonların iyi bir etkinlik gösterebilmesi taşıdıkları genetik materyali hedef bölgeye bozunmadan ya da parçalanmadan götürebilmelerine bağlıdır. Dolaşımda da çıplak haldeki nükleik asitleri parçalayacak birçok nükleazın var olması sebebiyle hedef bölgeye ulaşabilme iyi bir taşıyıcı sistemin taşıdıkları genetik materyali koruyabilme kapasitesine bağlıdır. Bu amaçla hazırladığımız formülasyonların birçok nükleaz içeren serum bileşenlerine ve DNaz enzimine karşı genetik materyali koruma kapasiteleri araştırılmıştır. Bu amaçla KOS-LNP/GFP kompleksleri %10 fetal bovin serum (FBS) içeren yüksek glukozlu Dulbecco's modified Eagles medium (DMEM) ile 37 °C'de 30 dk, 1 saat, 2 saat, 3 saat 4 saat, 6 saat, 12 saat, 24 saat, 36 saat, 48 saat, 60 saat ve 72 saat inkübasyona bırakılarak serum bileşenlerine karşı koruyuculuk analiz edilmiştir. Süre sonunda örnekler jel dokümantasyon sistemi ile herhengi bir parçalanma ya da formülden ayrılma olup olmadığı görüntülenmiştir. DNaz enzimine karşı koruma analizleri içinde sadece 1 µg çıplak GFP, 15 µl KOS-LNP/GFP kompleksi DNaz I (1,0

U/ml) ile 37 °C’de 30 dk inkübe edilmiştir. Süre sonunda reaksiyon 100 µl reaksiyon sonlandırma tamponu (400 mmol/L NaCl, 100 mmol/L EDTA, pH 8.0) eklenerek reaksiyon durdurulmuştur. Plazmit DNA bütünlüğü %0,8’lik agaroz jel elektroforeze yüklenerek parçalanma olup olmadığı analiz edilmiştir.

3.9. Hazırlanan Sistemlerin Hücreler Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi

3.9.1. Hücre kültürü çalışmaları

Hazırlanan formülasyonların hücreler üzerindeki etkisinin incelenmesi MTT testi ile değerlendirilmiştir. Bu sebeple öncelikle hücrelerin kültür işlemleri gerçekleştirilmiştir. Çalışma için normal hücre hattı olarak NIH-3T3 (fare embriyonik fibroblast hücre hattı) seçilmiştir.

Seçilen hücrelerinin üretiminde ve formülasyonların uygulanmasında hücre kültür tekniğinden yararlanılmıştır. Bunun için öncelikle

1. Hücreler önce 25 cm²’lik flasklarda, %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin ve %1 L-glutamin içeren yüksek glukoz içeren DMEM besiyerinde kültüre edilmiştir.
2. Kültür işlemi 37 °C’de %5 CO₂ ve %95 hava içeren atmosfer ortamında etüv de yapılmıştır.
3. Hücreler flask tabanını doldurduğunda 1 ml %0.25 konsantrasyonundaki Tripsin/EDTA çözeltisi ile muamele edilip 75 cm²’lik flasklara alt kültürlere ayrılmıştır.
4. Çalışma için kullanılacak hücre süspansiyonu 75 cm’lik flasklardan kaldırıldıktan sonra MTT testi için plakalara ekilmek üzere ayrılmıştır. Kullanılmayan diğer hücre süspansiyonları uzun süreli hücre stoğu olarak -80 °C’de saklanmak üzere dondurulmuştur.

3.9.1.1. Sitotoksite çalışması

Mosmann tarafından geliştirilen MTT (3-[4,5-dimetiltriazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium bromür) testi, günümüzde sitotoksite, hücre canlılığı ve proliferasyonun değerlendirilmesinde en sık kullanılan yöntemdir (Stockert vd., 2012). Pozitif yüklü bir bileşik olan MTT, ökaryot hücrelerin membranından kolaylıkla geçebilir ancak hücre içine girdiğinde indirgenebilir ve indirgenme sonucu suda çözünmeyen formazan kristallerini oluşturmaktadır. Yöntemde kullanılan sarı renkli MTT boyasının nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADH) tarafından indirgenmesiyle oluşan bu iğne şeklindeki mor formazan kristallerinin, absorbansın ölçülebilmesi için DMSO gibi uygun

bir çözücüde çözdürülmesi gerekmektedir. Canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renkte boyanırken, ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler boyanmamaktadır. Hücrelerin MTT indirgeme özelliği hücre canlılığının ölçütü olarak kabul edilmekte ve MTT analizi sonucunda elde edilen boya yoğunluğu canlı hücre sayısı ile doğru orantı göstermektedir (Uchida vd., 2009; Van Meerloo vd., 2011; Riss vd., 2016).

Bu çalışmada hazırlanan formülasyonun hücre üzerindeki sitotoksitesini araştırmak için NIH-3T3 (fare embriyonik fibroblast hücre hattı) ve kanser hücresi hattı (A549, akciğer karsinomu hücre hattı) hücrelerine uygulanan MTT testinin aşamaları aşağıdaki gibidir.

I. Hücreler 37 °C sıcaklıkta ve %5 CO₂ ve %95 hava içeren atmosfer ortamında, 75 cm² 'lik hücre kültürü kaplarında kültüre edildikten sonra tripsin ile kaldırılmış ve %10 FBS içeren DMEM besiyerinde süspansiyon haline getirilmiştir.

II. *Thoma* lamı ile hücre sayımı yapıldıktan sonra, hücreler 96 kuyucuklu hücre kültür plakalarının her kuyucuğuna her bir kuyuda 2x10⁴ /ml hücre süspansiyonu olacak şekilde eşit olarak aktarılmıştır.

III. 24 saatlik inkübasyonun ardından sitotoksik etkiyi belirlemek amacı ile hücre süspansiyonunun üzerine farklı derişimde viteksin içeren ve içermeyen formülasyonlar eklenmiş ve 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır.

IV. Kontrol grubu olarak, plakada belirlenen kuyucuklara formülasyon konulmadan sadece besiyeri eklenmiştir.

V. 24-48 saatlik inkübasyon süresi sonrasında kuyucuklardaki formülasyon içeren besiyeri uzaklaştırılmış, her bir kuyucuğa 20 µl (5 mg/ml) MTT boyası eklenmiş ve MTT boyasının, canlılığını koruyan hücrelerce formazan tuzuna dönüştürülebilmesi için 4 saat daha inkübasyon yapılmıştır.

VI. İnkübasyon süresinin ardından, MTT kuyucuklardan uzaklaştırılmış ve her bir kuyucuğa 200 µl DMSO eklenmiştir. 15 dakika sonra, hücre canlılığının belirlenmesi için bir çoklu plaka okuyucuda (Cytation 5, BioTek Instruments, ABD) 570 nm dalga boyunda renk değişimi tespit edilmiştir (Uchida vd., 2009).

VII. Formülasyon eklenen kuyular için belirlenen absorbans değerleri kontrol hücresi değerleri ile karşılaştırılmış ve yüzde değer hesaplanarak grafiğe aktarılmıştır.

VIII. Deney, formülasyonun her bir derişimi için 8 kuyuda 3'er kez tekrar edilerek yapılmıştır.

3.10. *In vitro* Salım Çalışması

Viteksinin KOS-LNP formülasyonunda salım davranışının belirlenmesi için diyaliz torba yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde salım ortamı olarak pH 7.4 1 x fosfat tamponu (PBS) ve 37 ± 0.5 °C'de sink koşulları sağlanarak analiz yapılmıştır. Analizde 2.5 mg saf viteksin, 2.5 mg viteksin içeren formülasyon (F12) ve viteksin içermeyen formülasyonu (F11) belli molekül ağırlığındaki maddeyi geçirebilme özelliğine sahip diyaliz membran (12.000-14.000 MW, Sigma) içine koyularak iki ucu sıkıca kapatılmıştır. Membran kullanılmadan önce PBS tampon içinde 1 gece bekletilmiştir. Bu diyaliz torbası 100 ml pH 7.4 PBS içine daldırılarak manyetik karıştırıcı üzerine koyulmuş ve 150 dev/dk'da 96 saat karıştırılması yapılmıştır. 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90.dk'dan sonra 2.,4.,6., 12., 24., 48 ve 96. saatlerde 500 µl örnek alınarak yerine taze tampon eklenmiştir. Alınan 500 µl örnekten 85 µl alınarak üzerine 15 µl viteksinin çözündüğü DMSO koyularak mikrospektrofotometre cihazında 335 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri alınmıştır.

3.10.1. Standart eğrinin hesaplanması ve denklem oluşturulması

Örnek ölçümlerinden önce standart eğri oluşturmak amacı ile 20-100 µg/ml konsantrasyon aralığında n=3 olacak şekilde 14 konsantrasyon viteksin çözeltisi hazırlanmış ve bu çözeltilerin 335 nm dalga boyundaki absorbans değerleri spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Viteksin çözeltisi hazırlanırken bu çözeltilere de DMSO eklemesi yapılmıştır. Ölçümde absorbans değerlerine karşılık gelen konsantrasyonlar kullanılarak bir grafik çizilmiştir. Elde edilen grafikte yer alan değerlerin regresyon analizi yapılarak eğrinin kullanılabilirliği ve doğrusallığı saptanmıştır. Bu eğri ve oluşturulan denklem ile viteksinin miktar tayini ve örneklerin zaman içinde salınan konsantrasyonlarının hesaplanması yapılmıştır.

3.11. Enkapsülasyon Etkinliğinin Belirlenmesi

Yüklü nanopartiküllerin etkin madde yükleme kapasitesi genellikle yüzde enkapsülasyon etkinliği (%EE) şeklinde ifade edilir. %EE yüklenen etkin maddenin toplam etkin maddeye bölünmesiyle hesaplanır. Yüklenmiş etkin maddeye bağlı olarak

nanopartikül kütlelerinin yüzdesini belirten, nanopartikülün birim ağırlığı başına yüklenen etkin madde miktarıdır (Khoshneviszadeh vd., 2016). Tez çalışmasında hazırlanan formülasyonların enkapsülasyon etkinlikleri UV-spektrofotometre ile bazı değişikliklerle hesaplanmıştır (Öztürk, 2017; Çalışkan, 2019). Kalibrasyon eğrisi çizildikten sonra belirlenen denklemden yola çıkılarak viteksinin formülasyon ile enkapsülasyon etkinliği belirlenmiştir. Bunun için bir tüpe 500 µl F12 alınmış ve üzerine 1 ml distile su eklenip önce 30 saniye %20 güçte sonikasyon uygulanmış ve 16500 rpm’de 10 dk santrifüj uygulanmıştır. Süpernatant alınmış ve filtreden geçirilmiş ve üzerine 250 µl PBS tampon + 50 µl DMSO koyularak spektrofotometrede ölçüm yapılmıştır. Tüpün dibinde kalan pellet üzerine önce 100 µl distile su koyularak lipidin erime derecesinin yaklaşık 10 °C üstündeki su banyosunda (yaklaşık 75 °C) 1 dk tutulmuş ve lipit yapısının bozulması sağlanmıştır. Daha sonra üzerine 250 µl PBS ve 50 µl DMSO koyularak hafifçe vorteks yapıldıktan sonra 16500 rpm’de 10 dk santrifüj uygulanmıştır. Tüpten alınan süpernatant filtreden geçirilmiş ve üzerine 250 µl PBS tampon ve 50 µl DMSO koyularak spektrofotometrede ölçüm yapılmıştır. Tüp dibindeki pellet üzerine 250 µl PBS tampon ve 50 µl DMSO koyularak spektrofotometrede ölçüm yapılmıştır.

Enkapsülasyon etkinliği çalışması ve hesabı Khoshneviszadeh vd., (2016) yaptığı çalışmada kullandığı yöntem ve eşitlik ile gerçekleştirilmiştir. Enkapsülasyon etkinliğini hesaplamak amacıyla aşağıda verilen denklem (E2) kullanılmıştır.

E2:

$$\%EE = \frac{[(\text{Formülasyondaki etkin madde miktarı} - \text{Süpernatanttaki etkin madde miktarı}) / (\text{Formülasyondaki etkin madde miktarı})] \times 100}{(3.3)}$$

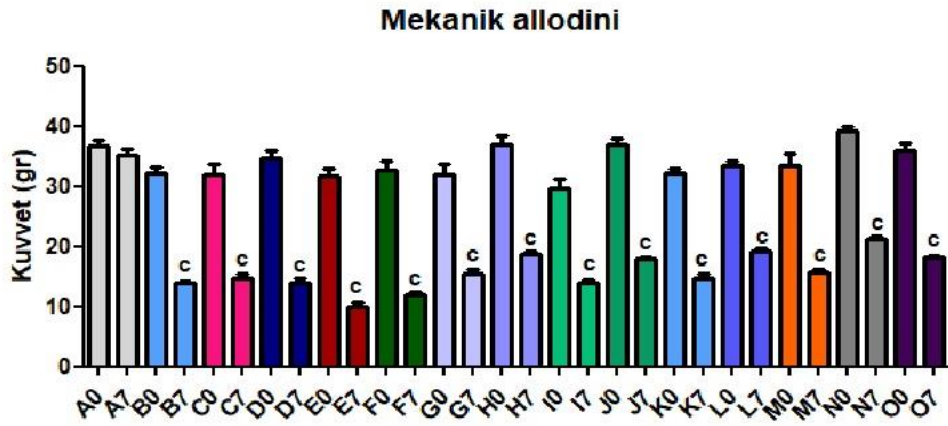
3.12. İstatiksel Analiz

Hayvanlarda nöropatik ağrı gelişiminin istatistiksel değerlendirilmesi için tek-yönlü varyans analizi (ANOVA) ve ardından Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır. Etki değerlendirmesi için çift-yönlü ANOVA ve ardından Bonferroni metodu uygulanmıştır. Tüm istatistiksel analiz sonuçları Graphpad Prism ver. 5.0 paket program kullanılarak hesaplanmıştır. Tüm analiz sonuçları ±standart hata (S.H.) olarak ifade edilmiş ve istatistiksel anlamlılık düzeyi başlangıcı olarak $P < 0.05$ kabul edilmiştir.

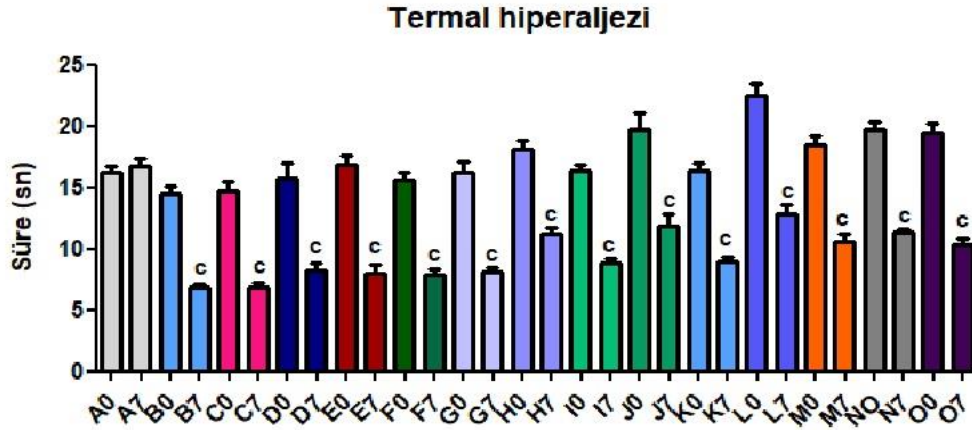
4. BULGULAR

4.1. Deneysel Nöropati Gelişimi

KKH uygulanan grupların tamamında nöropati gelişimi gözlenmiştir ve Şekil. 4.1 ve şekil 4.2’de görüldüğü üzere mekanik ve termal uyarana karşı ağrı eşiklerinde anlamlı ($P<0.001$) bir düşüş gerçekleşmiştir. SHAM grubunda ise beklendiği üzere nöropati gelişmemiş ve mekanik ve termal ağrı eşiklerinde değişiklik gözlenmemiştir.



Şekil 4.1. Elektronik von Frey testte nöropatik ağrı gelişimi

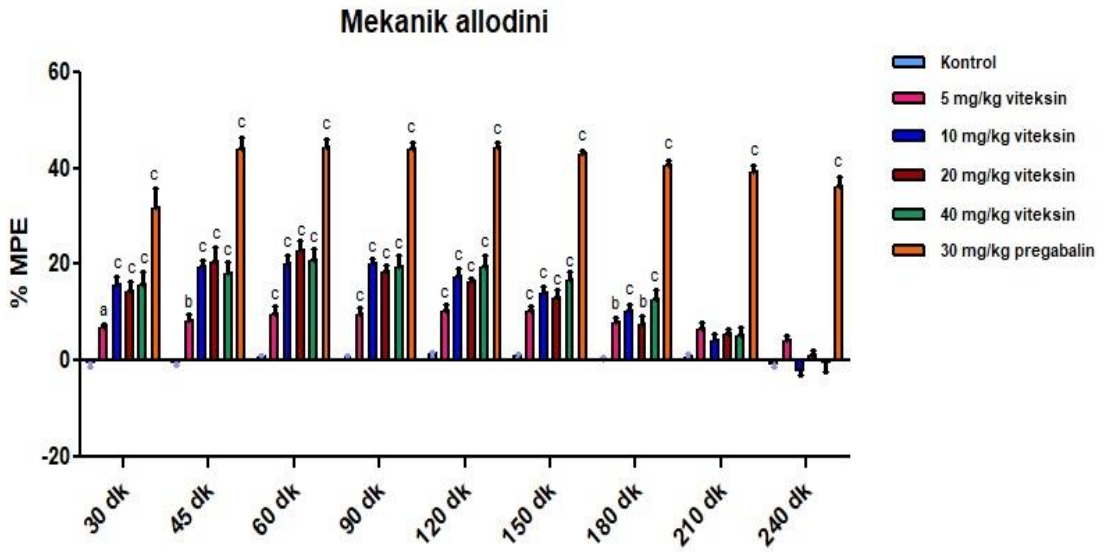


Şekil 4.2. Plantar testte nöropatik ağrı gelişimi

0: 0. gün, 7: 7. gün, A: Sham, B: Kontrol, C: 5mg/kg viteksin, D: 10 mg/kg viteksin, E: 20 mg/kg viteksin, F: 40 mg/kg viteksin, G: Ketanserin + çözücü H: Ketanserin + viteksin I: Ondansetron + çözücü, J: Ondansetron + viteksin, K: Way-100635 + çözücü L: Way-100635 + viteksin. M: Pregabalin. $^cP<0.001$; 0. güne göre anlamlılık. Tek-yönlü ANOVA ve ardından Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi uygulandı. (n=8)

4.2. Anti-allodinik Aktivitenin Değerlendirilmesi

Şekil 4.3'te 5, 10, 20 40 mg/kg viteksin ile 30 mg/kg pregabalin uygulanan grupların zamana bağlı ölçülen mekanik allodini eşiklerinden hareketle hesaplanan % MPE değerleri görülmektedir. 5 mg/kg uygulanan gruba ait % MPE değerlerinin değerlendirilen zaman aralığı içerisinde kontrol grubuna göre anlamlı bir fark oluşturmadığı görüldü. Ayrı ayrı 10, 20 ve 40 mg/kg viteksin dozlarının uygulandığı grupların %MPE değerlerinin ise kontrol grubuna göre 30-180 dk zaman aralığı içerisinde anlamlı farklılık oluşturduğu görüldü (10 mg/kg: 30-180 dk. $P<0.001$, 20 mg/kg: 30-150 dk $P<0.001$; 180 dk. $P<0.05$, 40 mg/kg: 30-180 dk. $P<0.001$). 30 mg/kg pregabalin uygulan gruba ait % MPE değeri ise kontrol grubuna göre 30-240 dk aralığında anlamlı ($P<0.001$) olarak arttı.

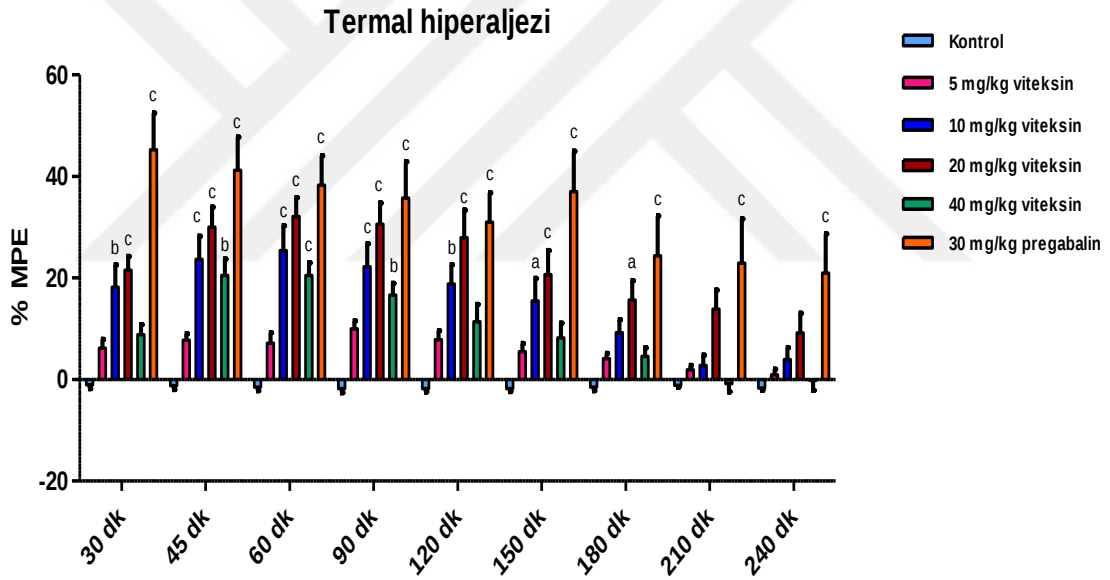


Şekil 4.3. Viteksinin anti-allodinik etkisinin değerlendirilmesi

^c $P<0,001$, ^b $P<0,01$, ^a $P<0,05$; kontrole göre anlamlılık. Çift-yönlü ANOVA ve ardından Bonferroni metodu uygulanmıştır.

4.3. Antihiperaljezik Aktivitenin Değerlendirilmesi

Şekil 4.4'te 5, 10, 20 40 mg/kg viteksin ile 30 mg/kg pregabalin uygulanan grupların zamana bağlı ölçülen termal hiperaljezi eşiklerinden hareketle hesaplanan % MPE değerleri görülmektedir. 10, 20, 40 mg/kg viteksin dozlarının uygulandığı grupların % MPE değerleri farklı zaman aralıklarında anlamlı olarak arttı (10 mg/kg: 30 dk. $P<0.01$; 45-90 dk $P<0.001$; 120 dk. $P<0.01$; 150 dk. $P<0.05$, 20 mg/kg: 30 dk. $P<0.01$; 45-120 dk $P<0.001$; 150 dk. $P<0.01$; 180 dk. $P<0.05$, 40 mg/kg: 45 ve 60 dk $P<0.01$; 90 dk $P<0.05$). 30 mg/kg pregabalin uygulanan gruba ait % MPE değeri ise kontrol grubuna göre 30-240 dk aralığında anlamlı (30-150 dk $P<0.001$; 180 ve 210 dk. $P<0.01$; 210 dk. $P<0.05$) olarak arttı.

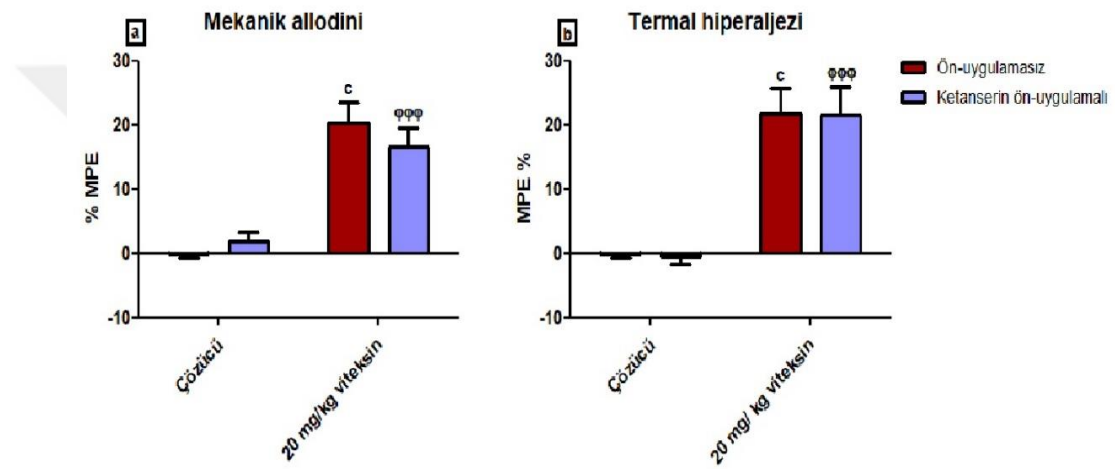


Şekil 4.4. Viteksinin antihiperaljezik etkisinin değerlendirilmesi

^c $P<0,001$, ^b $P<0,01$, ^a $P<0,05$; kontrole göre anlamlılık. Çift-yönlü ANOVA ve ardından Bonferroni metodu uygulanmıştır.

4.4. Viteksinin Anti-allodinik ve Antihiperaljezik Etkisinde Serotonerjik Sistemin Rolü

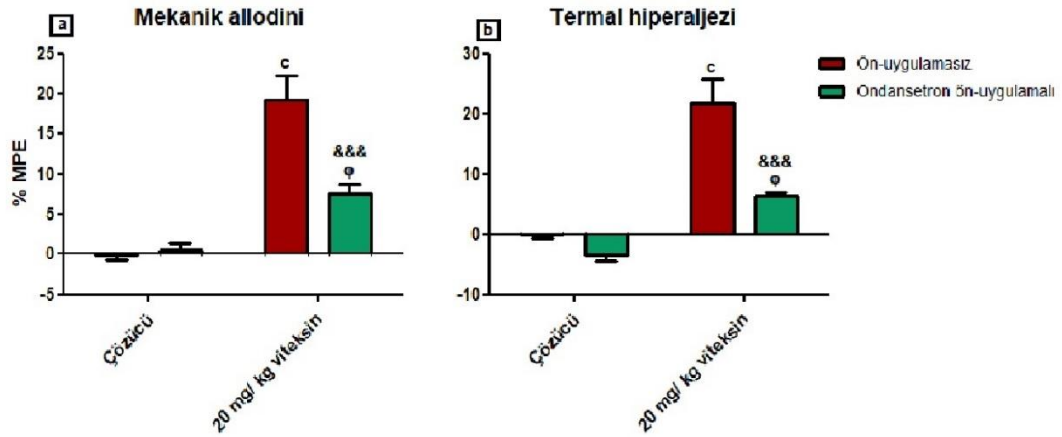
Şekil 4.5'te 20 mg/kg viteksin öncesi 5-HT_{2A/2C} reseptör antagonisti olan ketanserin (1 mg/kg, i.p.) ön-uygulamasının, mekanik allodini ve termal hiperaljezi eşiklerinden hareketle hesaplanan % MPE değerleri üzerindeki etkisi görülmektedir. Ketanserin ön uygulamasının 20 mg/kg viteksinin yükseltmiş olduğu mekanik ve termal eşikte anlamlı bir değişiklik yaratmadığı gözlemlendi.



Şekil 4.5. Viteksinin anti-allodinik (a) ve antihiperaljezik (b) etkisinde 5-HT_{2A/2C} reseptörünün rolü

*** $P < 0.001$; ön-uygulamasız çözücüye göre anlamlılık, *** $P < 0.001$; ketanserin ön-uygulamalı çözücüye göre anlamlılık. Ortalama $\pm$ standart hata değerleri kullanılarak çift yönlü ANOVA ve ardından Bonferroni testi uygulandı. (n=8).

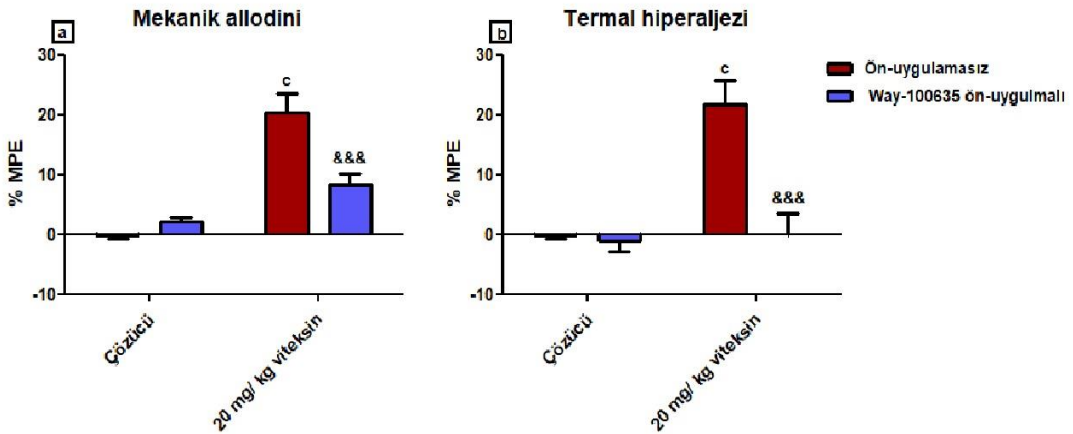
Şekil 4.6'da 20 mg/kg viteksin öncesi 5-HT₃ reseptör antagonisti olan ondansetron (1 mg/kg, i.p.) ön-uygulamasının mekanik allodini ve termal hiperaljezi eşiklerinden hareketle hesaplanan % MPE değerleri üzerindeki etkisi görülmektedir. Ondansetron ön-uygulaması 20 mg/kg viteksinin yükseltmiş olduğu mekanik ve termal eşiği anlamlı ($P < 0.001$) olarak geri çevirmekle birlikte viteksinin anti-allodinik ve antihiperaljezik etkisinin kontrol grubuna göre anlamlı ($P < 0.05$) olarak devam ettiği gözlemlendi.



Şekil 4.6. Viteksinin anti-allodinik (a) ve antihiperalezik (b) etkisinde 5-HT₃ reseptörünün rolü

*** $P < 0.001$; ön-uygulamasız çözücüye göre anlamlılık, ^c $P < 0.001$; ketanserin ön-uygulamalı çözücüye göre anlamlılık, ^{***} $P < 0.001$; ön-uygulamasız 20 mg/kg viteksine göre anlamlılık. Ortalama $\pm$ standart hata değerleri kullanılarak çift yönlü ANOVA ve ardından Bonferroni testi uygulandı. (n=8).

Şekil 4.7’de 20 mg/kg viteksin öncesi 5-HT_{1A} reseptör antagonisti olan WAY-100635 (1 mg/kg, i.p.) ön-uygulamasının mekanik allodini ve termal hiperalezi eşiklerinden hareketle hesaplanan % MPE değerleri üzerindeki etkisi görülmektedir. WAY-100635 ön-uygulamasının 20 mg/kg viteksinin yükseltmiş olduğu mekanik ve termal eşiği anlamlı ($P < 0.001$) olarak geri çevirdiği gözlemlendi.



Şekil 4.7. Viteksinin anti-allodinik(a) ve antihiperalezik (b) etkisinde 5-HT_{1A} reseptörünün rolü

*** $P < 0.001$; ön-uygulamasız çözücüye göre anlamlılık, ^{***} $P < 0.001$; ön-uygulamasız 20 mg/kg viteksine göre anlamlılık. Ortalama $\pm$ standart hata değerleri kullanılarak çift yönlü ANOVA ve ardından Bonferroni testi uygulandı. (n=8).

Daha sonra viteksin yüklü nano boyutlu formülasyon geliştirme çalışmalarında katı lipit nanopartiküler sistemler geliştirilmiştir. Çalışmada katı lipit olarak Dynasan 114, katyonik ajan olarak dimetildioktadesilamonyum bromür (DDAB), yüzey etkin madde olarak Tween 80 ve Span 80 kullanılmıştır. Formülasyon hazırlama işleminde kullanılan materyaller ve yöntem daha önce Farmasötik Biyoteknoloji Laboratuvarında hazırlanan katı lipit formülasyonlarından yola çıkılarak bazı modifikasyonlarla yeni formülasyon geliştirme işlemleri uygulanarak hazırlanmıştır. Formülasyon sırasıyla organik çözücüde çözündürme, sonikasyon ve evaporasyon yöntemleri uygulanmıştır. Hazırlanan tüm formülasyonların karakterizasyon işlemlerinde öncelikle partikül boyut ve dağılımı ile zeta potansiyel değerlendirilmiş ve bunlardan elde edilen sonuçlara göre sonraki analiz aşamasına geçilmiştir. Partikül boyutu ve zeta potansiyel açısından en uygun formülasyon seçildikten sonra genetik materyal bağlama, sitotoksite ve *in vitro* salım analizleri değerlendirilmiştir. Daha sonra viteksin yüklü uygun formülasyon ile *in vivo* çalışmalara geçilerek deney hayvanlarına uygulanmış ve formül halindeki viteksinin nöropatik ağrı üzerindeki etkisi serbest olarak verilen viteksin sonuçları ile karşılaştırılmıştır.

4.5. LNP Formülasyonlarının Karakterizasyon Çalışmaları

4.5.1. Partikül boyut ve dağılımı

Ön formülasyon hazırlama aşamalarında öncelikle üç farklı lipit oranı ve iki farklı sonikasyon süresi uygulanmış ve bunların partikül boyut ve dağılımı ile zeta potansiyel değerlerine bakılmıştır. Kullanılan yüzey etkin madde miktarı değiştirilmemiş bütün formülasyonlar için aynı miktarlar kullanılmıştır. Hazırlanan ilk formülasyonlarda (F1 ve F2) lipit oranı %4 olarak seçilmiştir. Bu formülasyonlarda partikül boyutları ve partikül boyut dağılımları yüksek bulunmuştur. Örneğin 3 dk sonikasyon uygulanan F1 formülasyonunda partikül boyutu $855,6 \pm 5,765$ nm iken 5 dk sonikasyon uygulanan F2 formülasyonunda $672,4 \pm 4,760$ nm olarak saptanmıştır. Bununla birlikte partikül boyut dağılımlarında 0,5'in üstünde hatta 1,0'a yakın bulunmuştur. Bu sebeple bu formülasyonların homojen bir partikül boyut dağılımı göstermediği ve partikül boyutlarının bir genetik materyal taşıma için çok yüksek olduğu düşünülerek lipit oranında değişiklikler yapılmasına karar verilmiştir. Bu sonuçlara göre %2 ve %1 lipit içeren formülasyonlar aynı yöntemler kullanılarak hazırlanmıştır. Bu formülasyonlara F3, F4, F5 ve F6 kodu verilmiştir. Formülasyonlar hazırlandıktan sonra partikül boyutları

ile partikül boyut dağılımları ve zeta potansiyelleri ölçülmüştür. Sonuçlara bakıldığında hazırlanan F3-F6 formülasyonlarında düşük nanopartikül boyutu (89,5 nm-273,4 nm) ve 0,5'in altında partikül boyut dağılımı gözlenmiştir. En düşük partikül boyutuna sahip olan formülasyonun %1 lipit içeren ve 5 dk sonikasyon işlemi uygulanan F6 kodlu formülasyon olduğu saptanmıştır. Burada lipit oranının düşmesi ile partikül boyutunun düştüğü saptanmıştır. Ayrıca uygulanan sonikasyon süresinin de yine partikül boyutunun düşmesine yardımcı olduğu saptanmıştır. Örneğin %2 lipit içeren ve 5 dk sonikasyon uygulanan F3 formülasyonunda partikül boyutu 273,4 nm iken aynı oranda lipit içeren fakat 5 dk sonikasyon uygulanan F4 formülasyonunda partikül boyutunun 154,1 nm'ye düştüğü saptanmıştır. Bunun üzerine lipit oranında yine azalmaya gidilmesine karar verilmiş ve sonikasyon sürelerinin de etkisine bakılmıştır. Bu analizlere göre %1 lipit içeren ve 3 dk sonikasyon uygulanan F5 formülasyonunda partikül boyutu 121,1 nm iken aynı oranda lipit içeren fakat 5 dk sonikasyon uygulanan F6 formülasyonunda partikül boyutu 89.5 nm olarak saptanmıştır. Bu sonuçlar dikkate alınarak katyonik ajan eklenecek formülasyon bileşiminin F6 kodlu formülasyon olmasına karar verilmiştir ve bundan sonraki formülasyonların hazırlanmasında lipit için %1 oranına karar verilmiştir ve sonikasyon süresinin de 5 dk olarak belirlenmiştir.

Tez kapsamında formülasyonlara hem negatif yüzey yüküne sahip genetik materyal ile elektrostatik etkileşim kurabilmesi hem de yine negatif yüzey yüküne sahip hücre membranına yaklaşabilmesi ve buradan geçebilmesi için pozitif yük kazandırılmaya çalışılmıştır. Bu amaçla literatürdeki çalışmalarda da sıklıkla kullanılan kuaterner amonyum tuzlarından biri olan pozitif yüzey yüküne sahip DDAB kullanılmıştır. Çalışmada DDAB konsantrasyonu olarak 6 ml formülasyon için 0,06, 0,006 ve 0,0006 g olarak seçilmiş ve hazırlanma aşamasında lipit faza eklenmiştir. Bu formülasyonlara da F7, F8 ve F9 olarak kod verilmiştir. DDAB eklenerek hazırlanan bu formülasyonlardan F7 formülasyonunda partikül boyutunun $93,5 \pm 0,981\text{nm}$ ve partikül boyut dağılımının $0,165 \pm 0,030$ olduğu saptanmıştır. F8 formülasyonunda partikül boyutunun $96,1 \pm 1,621\text{ nm}$ ve partikül boyut dağılımının $0,231 \pm 0,041$ olduğu saptanırken, F9 formülasyonunda ise partikül boyutunun $98,0 \pm 0,933\text{ nm}$ ve partikül boyut dağılımının 0.188 ± 0.010 olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlara göre DDAB eklenmesi partikül boyutunda ve partikül boyut dağılımında çok fazla yükselmeye sebep olmadığı nanopartiküllerin küçük boyutlarını kısmen koruduğu saptanmıştır.

Çalışmada en uygun formülasyonun partikül boyutu, boyut dağılımı ve zeta potansiyel değerine bakıldığında F7 ve F8 olduğu düşünülmüş ve bu formülasyonların hücre canlılığı üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Sitotoksite analizlerinin sonuçları kısmında da görüleceği üzere bu formülasyonların çok yüksek sitotoksik etkinlikleri sebebiyle farklı bir formülasyon hazırlama yöntemine geçiş yapılmıştır. Bu yöntemde DDAB gibi bir katyonik ajan kullanmak yerine yine Farmasötik Biyoteknoloji laboratuvarlarında daha önce hazırlanmış formülasyon örneklerine bakılarak hazırlanan bu LNP'lerin suda çözünen kitooligosakkarit ile kaplanmasına karar verilmiştir. Bu amaçla herhangi bir katyonik ajan içermeyen hazırlanan LNP'ler önce 10 mg/4 ml (F10) sonra da 20 mg/4 ml (F11) konsantrasyonunda olacak şekilde hazırlanan kitooligosakkarit çözeltisine damlatılarak LNP'lerin kaplanması sağlanmıştır. Böylelikle doğal bir pozitif yüzey yüküne sahip kitooligosakkarit kullanımı ile LNP'lere pozitif yük kazandırılmıştır. Bu şekilde hazırlanan formülasyonlardan F10'da partikül boyutu $298,5 \pm 3,233$ nm iken partikül boyut dağılımı $0,267 \pm 0,123$ olarak saptanmıştır. F11 formülasyonunda ise partikül boyutu $302,9 \pm 1,980$ nm iken partikül boyut dağılımı $0,241 \pm 0,034$ olarak saptanmıştır.

Bu sonuçlara göre hazırlanan F10 ve F11 nolu formülasyonun uygun partikül boyutuna sahip oldukları saptanmış ve bir sonraki aşama olan viteksin ile yükleme kısmına geçilmiştir. Formülasyon hazırlama aşamasında lipit faza DMSO ile çözündürüldükten sonra eklenen viteksin partikül boyutunda çok fazla yükselmeye sebep olmamıştır. Zeta potansiyel sonuçlarına da bakılarak F11 nolu formülasyona viteksin yüklenmesine karar verilmiştir. Bu bağlamda DMSO ile çözündürüldükten sonra lipit fazına eklenen viteksin ile F13 kodlu formülasyon elde edilmiş ve bu kompleksin partikül boyutu $105,5 \pm 2,260$ ve partikül boyut dağılımı $0,211 \pm 0,012$ olarak saptanmıştır. Daha sonra bu kompleksin F11 deki gibi KOS ile kaplanması sonucu F12 kodlu formülasyon elde edilmiş ve bu kompleksin partikül boyutu $338,9 \pm 2,692$ nm ve partikül boyut dağılımı $0,254 \pm 0,048$ olarak saptanmıştır.

4.5.2. Zeta potansiyel analizleri

Çalışmada ikinci karakterizasyon çalışması Zeta potansiyel değerlerinin belirlenmesi üzerine yapılmıştır. Burada katyonik ajan eklenmeden hazırlanan formülasyonlarda zeta potansiyel üzerinde lipit oranının düşmesi ya da sonikasyon süresinin etkisi gözlenmemiştir. Elde edilen sonuçlara baktığımızda F1-F6 arasındaki ve

F13 kodlu formülasyonlarda zeta potansiyel -15,5 ile -18,9 mV arasında değişim göstermiştir.

Formülasyonlara pozitif yük kazandırmak için üç farklı konsantrasyon DDAB eklenmesi yapılmıştır. Buna göre DDAB'ın 0,06 g (%1) tartılarak hazırlanan F7 formülasyonunda zeta potansiyel değeri $+34,2 \pm 1,67$ mV, DDAB'ın 0,006 g (%0,1) tartılarak hazırlanan F8 formülasyonunda zeta potansiyel değeri $+26,3 \pm 2,21$ mV ve DDAB'ın 0.0006 g (%0,01) tartılarak hazırlanan F9 formülasyonunda ise zeta potansiyel değeri $+9,2 \pm 2,22$ mV olarak saptanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre DDAB kullanılarak hazırlanan tüm formülasyonlarda pozitif yüzey yükü sağlanmıştır. Fakat F9'daki pozitif yük diğerlerine göre düşük bulunmuş ve DNA'yı tutma kapasitesi düşük olacağı düşünüldüğü için deneyden çıkarılmasına karar verilmiştir.

4.5.3. pH Değerleri

Hazırlanan formülasyonların hepsinde pH metre ile ölçümler yapılmıştır. Yapılan ölçümlerde pH değerleri 5,5-6,3 aralığında saptanmıştır. Tez çalışması boyunca hazırlanan tüm formülasyonların partikül boyut ve dağılımı, zeta potansiyel değerleri ve pH değerleri Tablo 4.1'de görülmektedir.

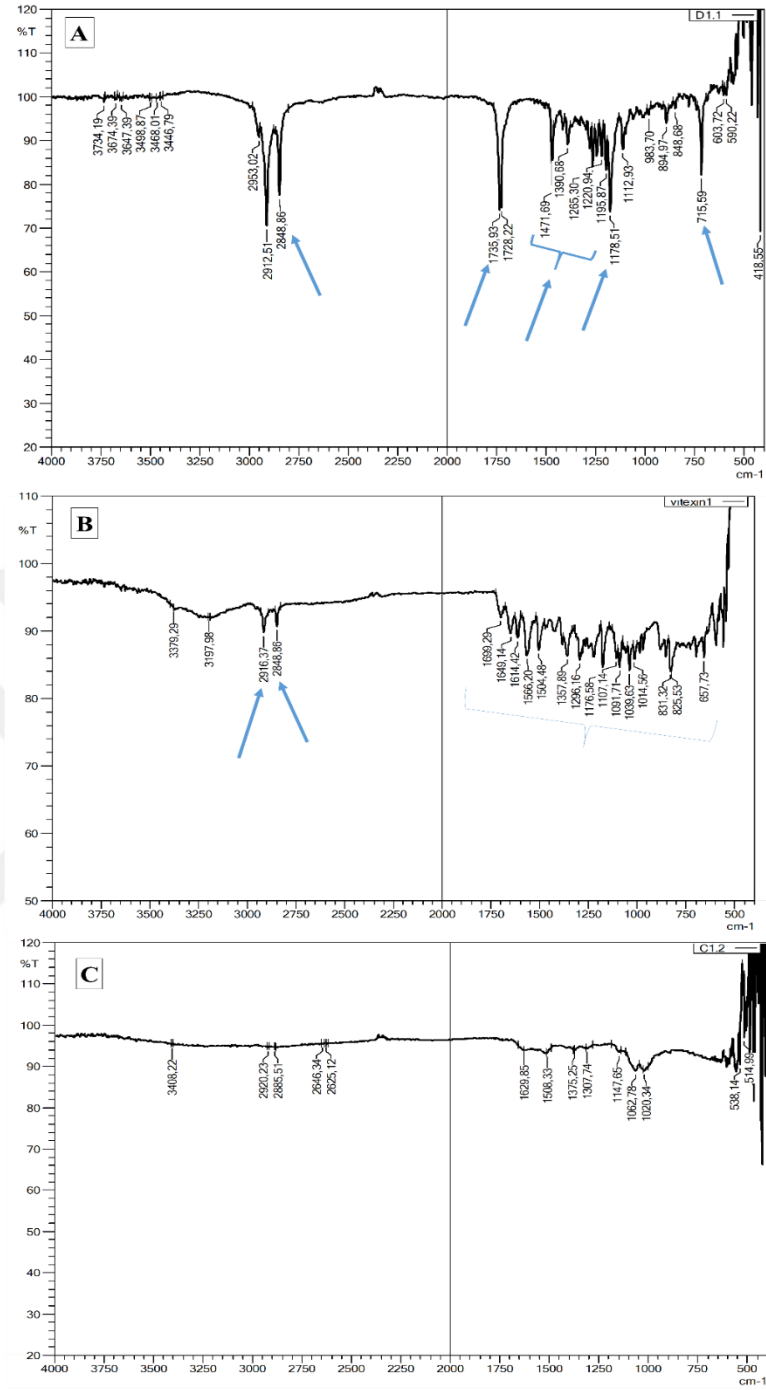
Tablo 4.1. Formülasyonların partikül boyutu ve dağılımı, zeta potansiyel ve pH değerleri

	Partikül Boyutu (nm) $\pm$ SH	Partikül Boyut Dağılımı (PDI) $\pm$ SH	Zeta Potansiyel (mV) $\pm$ SH	pH $\pm$ SH
F1	855,6 $\pm$ 5,765	0,888 $\pm$ 3,444	-18,9 $\pm$ 1,21	6,3 $\pm$ 2,1
F2	672,4 $\pm$ 4,760	0,741 $\pm$ 3,284	-18,5 $\pm$ 2,20	6,0 $\pm$ 2,0
F3	273,4 $\pm$ 0,045	0,261 $\pm$ 0,032	-17 $\pm$ 1,51	6,2 $\pm$ 1,2
F4	154,1 $\pm$ 0,178	0,192 $\pm$ 0,05	-15,5 $\pm$ 0,13	6,2 $\pm$ 2,2
F5	121,1 $\pm$ 2,341	0,428 $\pm$ 0,50	-15,8 $\pm$ 0,45	6,0 $\pm$ 2,3
F6	89,5 $\pm$ 1,632	0,122 $\pm$ 0,012	-16,6 $\pm$ 0,32	6,1 $\pm$ 1,1
F7	93,5 $\pm$ 0,981	0,165 $\pm$ 0,030	+34,2 $\pm$ 1,67	5,8 $\pm$ 1,0
F8	96,1 $\pm$ 1,621	0,231 $\pm$ 0,041	+26,3 $\pm$ 2,21	6,0 $\pm$ 2,4
F9	98,0 $\pm$ 0,933	0,188 $\pm$ 0,010	+9,2 $\pm$ 2,22	6,2 $\pm$ 0,8
F10	298,5 $\pm$ 3,233	0,267 $\pm$ 0,123	+31,3 $\pm$ 2,89	5,5 $\pm$ 0,9
F11	302,9 $\pm$ 1,980	0,241 $\pm$ 0,034	+44,6 $\pm$ 3,76	5,7 $\pm$ 1,0
F12	338,9 $\pm$ 2,692	0,254 $\pm$ 0,048	+38 $\pm$ 2,89	5,7 $\pm$ 1,2
F13	105,5 $\pm$ 2,260	0,211 $\pm$ 0,012	-15,9 $\pm$ 3,564	6,2 $\pm$ 1,6
F12/ DNA	345,4 $\pm$ 2,222	0,301 $\pm$ 0,161	+35,6 $\pm$ 2,50	5,8 $\pm$ 0,9

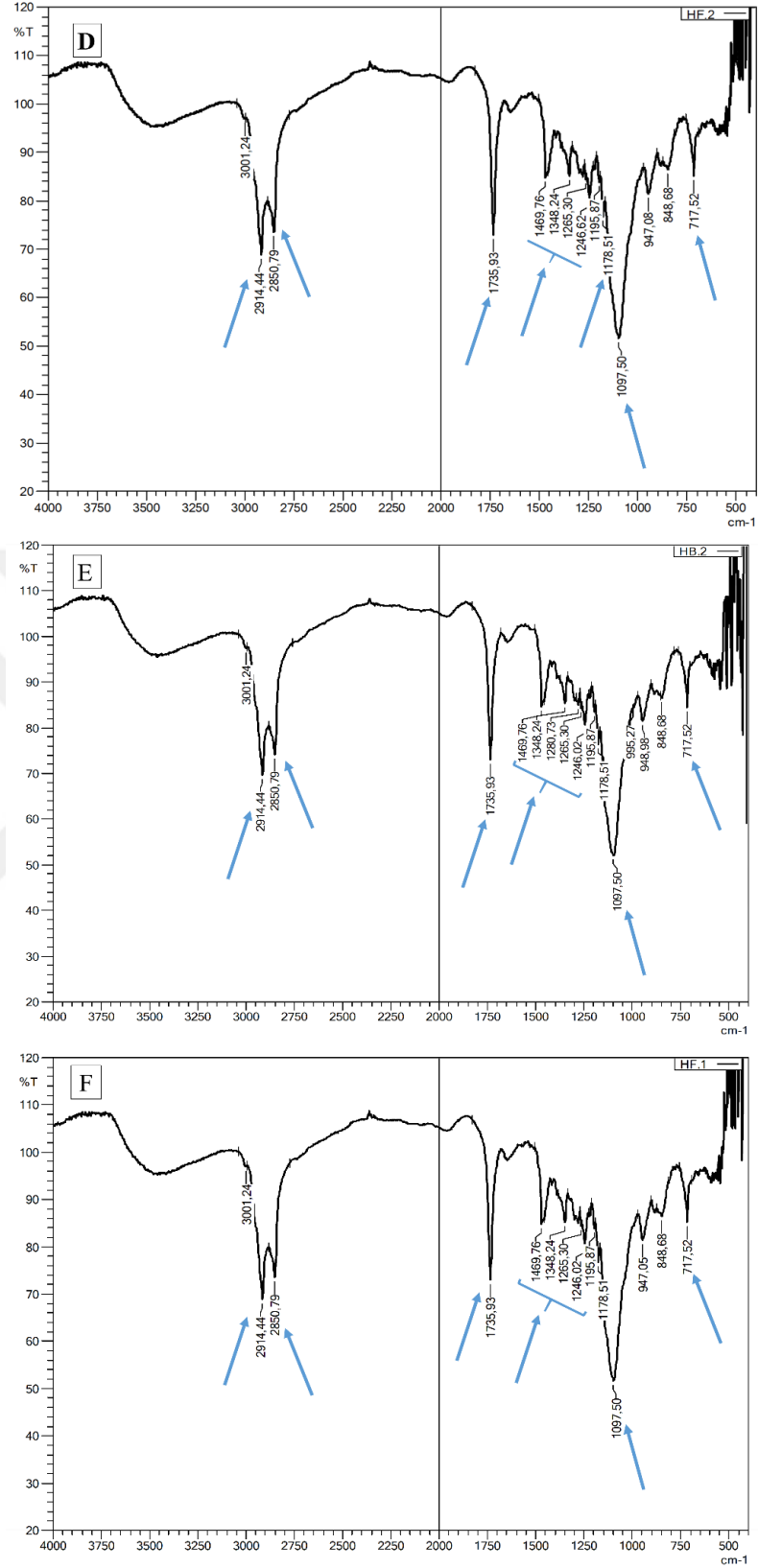
SH: Standart hata, PDI: Partikül boyut dağılımı, DNA: Deoksiribo nükleik asit.

4.5.5. FTIR analizleri

Tezde etkin madde olarak kullanılan viteksin ve formülasyon hazırlarken kullanılan lipit (Dynasan 114), polimer (kitooligosakkarit) ile viteksin içeren (F12) ve içermeyen formüle (F11) ait FTIR spektrumları Şekil 4.8’de verilmiştir. Analizler yapılmadan önce formülasyonlar liyofilize edilmiş ve su içeriği uzaklaştırılmıştır. Daha sonra viteksin, dynasan, kitooligosakkarit, fiziksel karışım ve liyofilize haldeki boş ve viteksin içeren formülasyonların analizi yapılmıştır. Bu analizlerde viteksine ait $657,73\text{ cm}^{-1}$ - $1699,29\text{ cm}^{-1}$ aralığında çok fazla pikin yer alması buradaki karakteristik piklerin ayrılmasını zorlaştırmıştır. Fakat özellikle $2848,86\text{ cm}^{-1}$ ve $2916,37\text{ cm}^{-1}$ ’deki karakteristik iki pik saptanmıştır. Dynasan ile yapılan FT-IR analizinde özellikle $715,59\text{ cm}^{-1}$, $848,68$ - $983,70\text{ cm}^{-1}$ aralığında, $1112,93\text{ cm}^{-1}$, $1178,51\text{ cm}^{-1}$, $1195,87$ - $1471,69\text{ cm}^{-1}$ aralığında, $1728,22\text{ cm}^{-1}$, $1735,93\text{ cm}^{-1}$, $2848,86\text{ cm}^{-1}$, $2912,51\text{ cm}^{-1}$, $2953,02\text{ cm}^{-1}$ ve $3446,79$ - $3734,19\text{ cm}^{-1}$ aralığında pikler gözlenmiştir. Kitotoligosakkaritin FTIR analizlerinde çok karakteristik pikler olmamakla beraber $538,14\text{ cm}^{-1}$, $1020,34$ - $1629,85\text{ cm}^{-1}$ aralığında, $2625,12\text{ cm}^{-1}$, $2646,23\text{ cm}^{-1}$, $2885,51\text{ cm}^{-1}$, $2920,23\text{ cm}^{-1}$ ve $3408,22\text{ cm}^{-1}$ ‘de pikler elde edilmiştir. Fiziksel karışım, boş formülasyon (F11) ve viteksin yüklü formülasyon (F12) için yapılan diğer FTIR analizlerinde çok benzer pikler elde edilmiştir. Örneğin 717 cm^{-1} , 1097 cm^{-1} , 1178 cm^{-1} , 1195 - 1469 cm^{-1} aralığı, 1735 cm^{-1} , 2850 cm^{-1} ve 2914 cm^{-1} ’deki pikler gözlenmiştir. Fiziksel karışım, boş formülasyon (F11) ve viteksin yüklü formülasyon (F12) için yapılan diğer FTIR analizlerinde çok benzer pikler elde edilmiştir. Örneğin 717 cm^{-1} , 1097 cm^{-1} , 1178 cm^{-1} , 1195 - 1469 cm^{-1} aralığı, 1735 cm^{-1} , 2850 cm^{-1} ve 2914 cm^{-1} ’deki pikler gözlenmiştir.



Şekil 4.8. Dynasan 114 (A), Viteksin (B), kitoooligosakkarit (C), Fiziksel karışım (D), F11 (E) ve F12 (F)'ye ait FTIR spektrumları

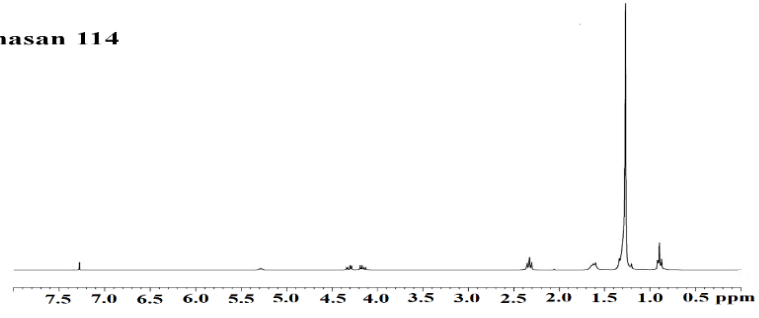


Şekil 4.8. (Devam) Dynasan 114 (A), Vitexin (B), kitoooligosakkarit (C), Fiziksel karışım (D), F11 (E) ve F12 (F) 'ye ait FTIR spektrumları

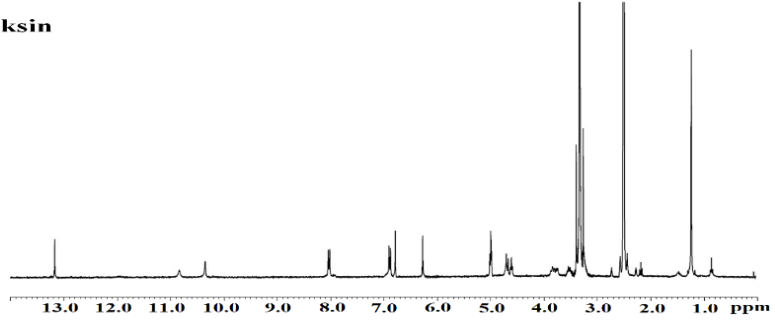
4.5.6. NMR analizleri

Tezde etkin madde olarak kullanılan viteksin ve formülasyon hazırlarken kullanılan lipit (Dynasan 114), polimer (kitoooligosakkarit) ile viteksin içeren (F12) ve içermeyen formüle (F11) ait ^1H -NMR spektrumları Şekil 4.9’da verilmiştir. Tez çalışmasında kullanılan viteksinin tek başına yapılan ^1H -NMR analizinde elde edilen pikler literatürde yapılan analizlerde elde edilen piklerle karşılaştırılmıştır. Yapılan analizde özellikle 1,23 ppm, 2,15-2,27 ppm aralığı, 3,31-3,39 ppm aralığı, 4,60-5,01 ppm aralığı, 6,26, 6,78-6,90 ppm aralığı, 8,04 ppm, 10,34 ppm, 10,83 ppm ve 13,16 ppm görülen pikler (Şekil 4.9) literatürle de uyumlu bulunmuştur (Costa vd., 2020). Dynasan 114 ile yapılan ^1H -NMR analizinde ise 0,86-0,91 ppm aralığı, 1,26-1,64 ppm aralığı, 2,04 ppm, 2,29-2,38 ppm aralığı, 4,12-4,33 ppm aralığı, 5,26-5,29 ppm aralığı, 7,27 ppm ve 7,34 ppm’de karakteristik pikler gözlenmiştir. Analiz sonucunda elde edilen bu spektrum pikleri literatürle uyumlu bulunmuştur (Öztürk, 2017). Formülasyon hazırlarken kullanılan kitoooligosakkarit’in ^1H -NMR analizinde 1,23 ppm, 2,43-2,57 ppm aralığı, 3,24-3,38 ppm aralığı, 7,81-7,98 ppm aralığı, 8,12 ppm, 8,34-8,65 ppm aralığında karakteristik pikler gözlenmiştir. Bu pikler hafif kaymalarla birlikte literatürde kitoooligosakkaritlerle yapılan ^1H -NMR analizlerinde benzer yerlerdeki piklerle uyumlu bulunmuştur (Yang vd., 2019). Viteksin içermeyen boş formülasyon (F11) ve viteksin içeren (F12) formülasyonunun ^1H -NMR analizlerine bakıldığında F11’de 3,33 ppm, 3,40 ppm ve 3,51 ppm’de karakteristik 3 pik gözlenmiştir. Aynı şekilde F12 formülasyonunda ise yine 3,24 ppm, 3,29 ppm ve 3,35 ppm’de yine 3 karakteristik pik gözlenmiştir ve bu piklerin kitoooligosakkaritte yine aynı bölgede gözlemlenen 3 karakteristik pike çok benzediği saptanmıştır.

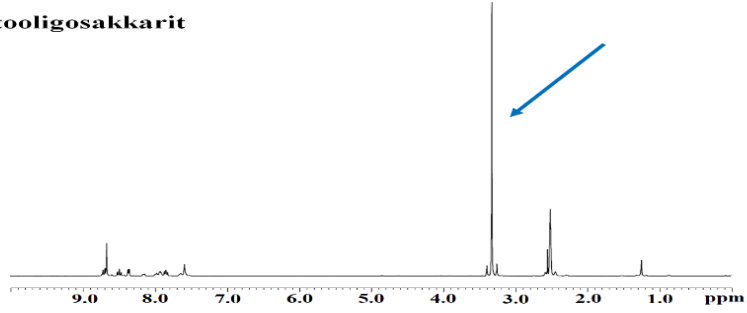
Dynasan 114



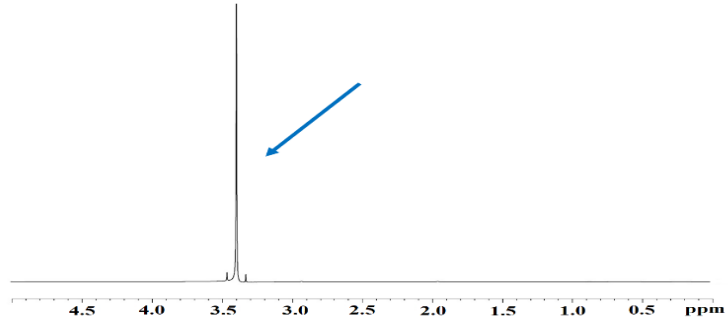
Viteksin



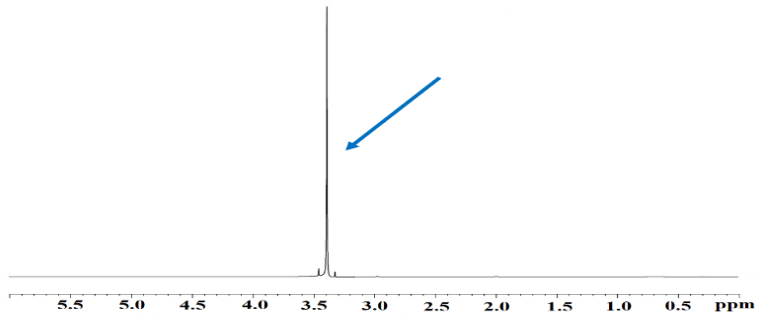
Kitoooligosakkarit



F11



F12



Şekil 4.9. *Viteksin*, *Dynasan 114*, *kitoooligosakkarit*, *F11* ve *F12*'ye ait ¹H-NMR spektrumları

4.5.7. Jel Reterdasyon analizleri

Tez kapsamında hazırlanan KOS kaplı LNP formülasyonunun (F12) DNA bağlanma özellikleri, serum bileşenlerine ve DNaz enzimine karşı koruma özelliklerinin incelenmesi hazırlanması yöntemler kısmında 3.9.7’de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Bütün jel reterdasyon çalışmalarında kontrol DNA olarak 1 µg GFP DNA kullanılmıştır.

Çalışmada öncelikle hazırlanan formülasyonların DNA bağlama özellikleri incelenmiştir. Bu amaçla 1 µg GFP DNA ile 1, 2.5, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 µL F12 formülasyonu alınarak 37 °C’de 30 dk bekletilmiş ve elektrostatik etkileşim sağlanmıştır. Elektrostatik etkileşimin ardından örnekler yükleme tamponu ile karıştırılarak jel kuyularına yüklenmiş ve jel 50 mV’da 2 saat yürütülmüştür. İki saat sonunda jel dikkatlice görüntüleme cihazı içerisine alınıp UV altında bantlar incelenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.10.’da gösterilmiştir.



Şekil 4.10. F12 formülasyonunun DNA bağlanma jel görüntüsü

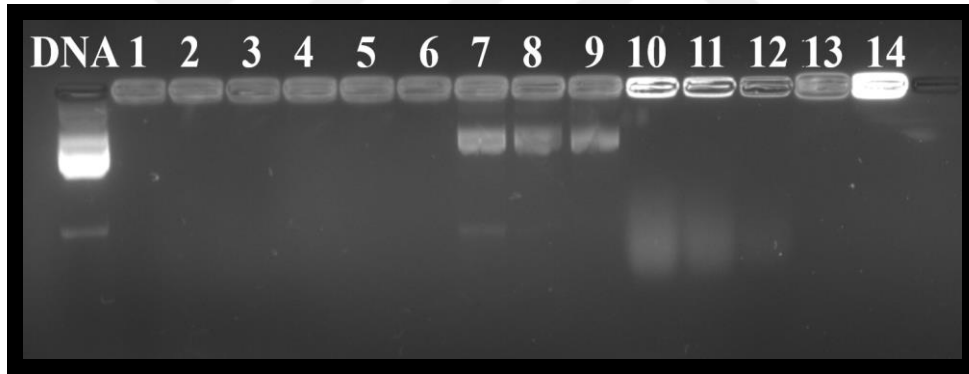
1. kuyu: 1 µg GFP DNA + 1 µl F12, 2. kuyu: 1 µg GFP DNA + 2.5 µl F12, 3.kuyu: 1 µg GFP DNA + 5 µl F12, 4. kuyu: 1 µg GFP DNA+ 10 µl F12, 5. kuyu: 1 µg GFP DNA+ 15 µl F12, 6. kuyu: 1 µg GFP DNA+ 20 µl F12, 7. kuyu: 1 µg GFP DNA+ 25 µl F12, 8.kuyu: 1 µg GFP DNA+ 30 µl F12, 9. kuyu: 1 µg GFP DNA+ 35 µl F12, 10. kuyu: 35 µl F12, 11. kuyu: 35 µl viteksin yüklü LNP.

Şekil 4.10’dan da anlaşılacağı üzere ilk üç kuyuda GFP DNA’nın yürüdüğü görülmektedir. Bu arada 1. kuyuda DNA çok düşük oranda F12 formülasyonu tarafından tutulduğu gözlenirken formülasyon miktarının artması ile kademeli olarak DNA bağlama oranında artış gözlenmiştir. 4. kuyuda neredeyse jelde hiç yürüyen DNA gözlenmemiştir. Bu sonuçlardan GFP DNA’yı yaklaşık 10 µl F12 formülasyonunun tamamıyla tutmaya başladığı daha yüksek konsantrasyonlarda da bu DNA bağlama özelliğini sürdürdüğü gözlenmiştir. 10. kuyudaki örnek DNA içermeyen sadece F12 formülasyonunun

yüklendiği kuyudur. 11. kuyudaki örnek ise KOS ile kaplanmadan önce viteksin yüklü LNP formülasyonudur. Burada F12 formülasyonunun ışıma verdiği, KOS kaplanmamış LNP formülasyonunda ise herhangi bir ışıma vermediği gözlenmiştir. Daha önce Farmasötik Biyoteknoloji laboratuvarında yapılan çalışmalarda da özellikle KOS'un bu şekilde ışıma verdiği gözlenmiştir (Şenel, 2012). Bu sebeple buradan da LNP'lerin KOS ile kaplandığı düşünülmektedir.

4.5.8. Serum içinde kararlılık ve DNaz enzimine karşı koruyuculuk

Bağlama özelliklerinin analizinden sonra serum bileşenleri varlığında formülasyonların genetik materyali koruma özellikleri incelenmiştir. Bunun için bağlama özelliklerindeki sonuçlar dikkate alınarak 1 µg GFP DNA + 15 µl F12 kompleksi bu analiz için seçilmiş yöntemler kısmında 3.9.8'de anlatıldığı gibi uygulanmıştır. Sonuçlar Şekil 4.11'da verilmiştir.



Şekil 4.11. F12 formülasyonunun serum varlığında zaman içerisinde DNA üzerindeki etkisinin jel görüntüsü

1. kuyu: 30. dakika, 2. kuyu: 1. saat, 3. kuyu: 2. saat, 4. kuyu: 3. saat, 5. kuyu: 4. saat, 6. kuyu: 6. saat, 7. kuyu: 12. saat, 8. kuyu: 24. saat, 9. kuyu: 36. saat, 10. kuyu: 48. saat, 11. kuyu: 60. saat, 12. kuyu: 72. saat, 13. kuyu: 1 µg GFP DNA+ 15 µl F12, 14. kuyu: 35 µl F12.

Analiz sonuçlarına göre serum bileşenleri varlığında F12 formülasyonunun genetik materyali koruma kapasitesi yaklaşık 6 saat boyunca devam etmektedir. Fakat 6. saatten sonra 12. saatteki jel görüntüsünde F12 formülasyonunun DNA'yı bırakmaya başladığı gözlenmiştir. Bu bırakmanın 36. saate kadar devam ettiği gözlenmiştir. Fakat burada F12'ye tutunmuş DNA'nın bandı ile kontrol DNA'nın bandının aynı seviyede olduğu gözlenmiştir. Bu sonuç F12'nin taşıdığı DNA'nın neredeyse 36. saate kadar kısmen de

olsa korunduğunu düşündürmektedir. Fakat özellikle 48. saatte gözlemlenen smear şeklinde kontrol DNA'nın da önünde gözlemlenen bant DNA'nın bu satten sonra kırılmaya ve parçalanmaya başladığını göstermektedir. 72. saatte ise smear görüntüsünün de azalmaya başladığı gözlenmiştir.

Özellikle 13. kuyudaki işlem görmemiş GFP yüklü F12 ve 14. kuyudaki GFP içermeyen F12 formülasyonunun kuyudaki ışımlar ile 48. ve 60. saatlerdeki kuyulardaki ışımlar karşılaştırıldığında 48. ve 60. saatlerde DNA'nın formülasyondan ayrılması ile KOS'un daha çok açığa çıkarak ışımda parlaklık artışına sebep olduğu düşünülmektedir. 72. saatte bu parçalanma ya da smear görüntüsündeki azalma ve 12. kuyudaki ışımda da azalma DNA'nın bu zamanda çok daha fazla parçalandığını göstermektedir.

Diğer bir analiz olan formülasyonun DNaz enzimine karşı koruma analizi de gerçekleştirilmiş ve sonuçlar Şekil 4.12'de verilmiştir.



Şekil. 4.12. *F12 formülasyonun DNaz varlığında formülasyon üzerindeki etkisinin jel görüntüsü*

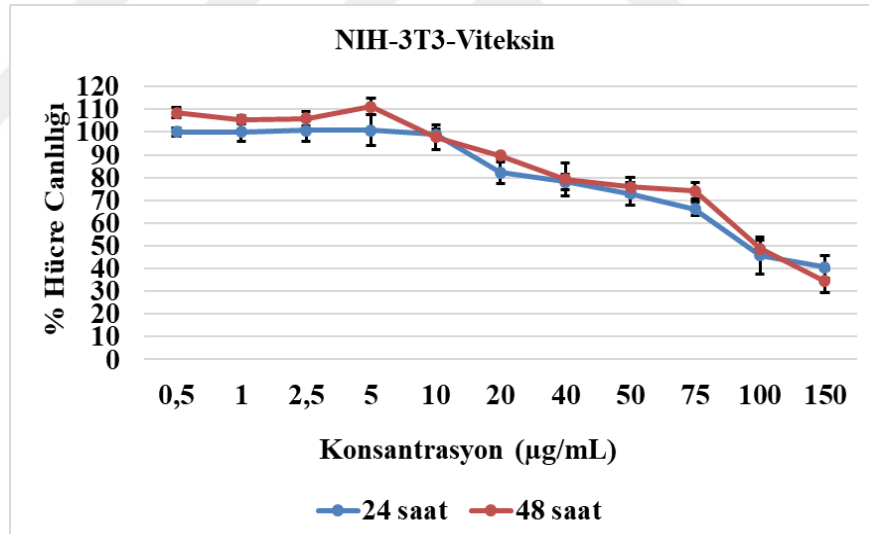
1. kuyu: 1 µg GFP DNA + 15 µl F12 + 1 µl DNaz I (1.0 U/ml), 2. kuyu: 15 µl F12 + 1 µg GFP DNA, 3. kuyu: 1 µg GFP DNA+ 1 µl DNaz I (1.0 U/ml).

Analiz sonuçlarına göre sadece DNaz ve GFP bulunan kuyunun (4. kuyu) olduğu bölgede hiçbir ışıma gözlenmemiş olması DNaz'ın GFP plazmid DNA'sını tamamıyla parçaladığını göstermektedir. F12 ve GFP plazmid DNA ve DNaz bulunan kuyunun (1. Kuyu) olduğu bölgede herhangi bir ışıma gözlenmemiş olması ve bu kuyudaki (1.kuyu) ışıma ile F12 ve GFP plazmid DNA içeren kuyudaki (2. kuyu) ışıma ile aynı olması, bununla birlikte GFP plazmid içermeyen sadece F12 formülasyonu bulunan kuyudaki (3. kuyu) daha parlak ışıma formülasyonun DNaz enzimine karşı genetik materyali koruyabildiğini düşündürmüştür. Çalışma sırasında GFP plazmid DNA yüklenmiş

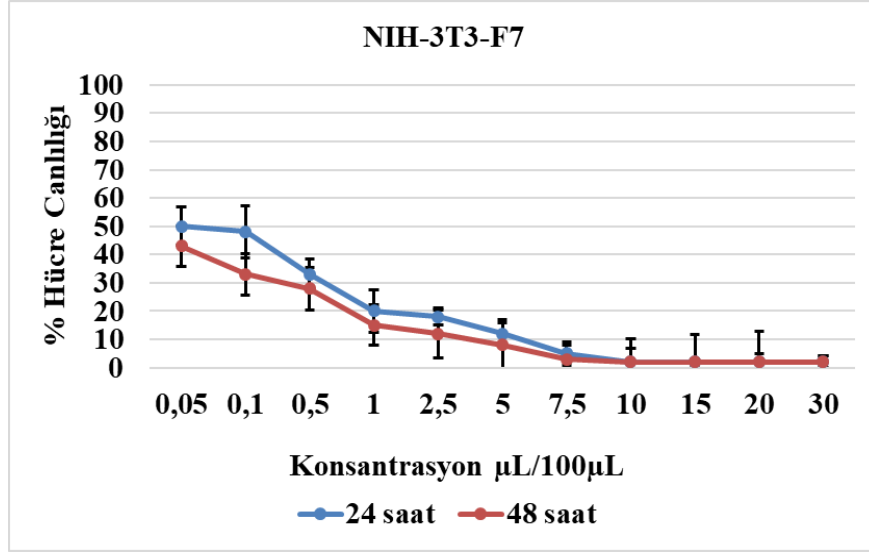
formülasyondan genetik materyalin ekstrakte edilme işlemi denenmiş fakat başarısız olunmuştur. Eğer ki ekstrakte edilebilseydi o zaman bu koruma potansiyelinin daha iyi görülebileceği düşünülmüş fakat ekstraksiyondaki başarısızlık nedeniyle deney daha ileriye götürülememiştir.

4.6. Sitotoksite Analizleri

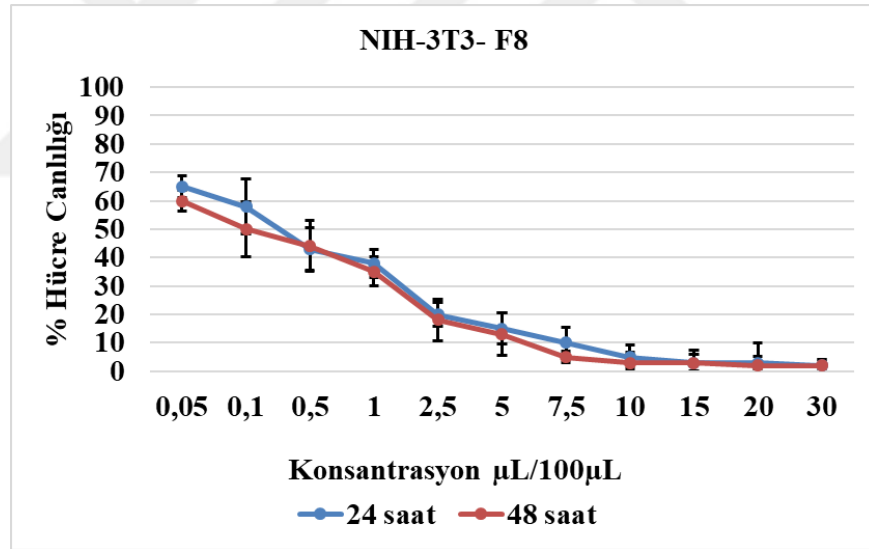
Tez kapsamında hazırlanan formülasyonların ve tek başına etkin maddenin NIH-3T3 hücre hatlarında 24 ve 48 saat inkübasyon süresi ile analizleri gerçekleştirilmiştir. Saf viteksin için 1-150 µg/ml konsantrasyon aralığında formülasyonlar için ise 0,05-30 µl/100 µl konsantrasyon aralığında sitotoksite analizleri yapılmıştır. Viteksinin tek başına, F7 ve F8 formülasyonlarının ilgili hücrelerin canlılığı üzerindeki etkisi zamana ve konsantrasyona bağlı olarak analiz edilmiş ve sonuçlar standart sapma değerleri ile birlikte Şekil 4.13, 4.14 ve 4.15'te gösterilmiştir.



Şekil 4.13. Saf viteksinin NIH-3T3 hücrelerinde 24-48 saat inkübasyon sonrası hücre canlılığı üzerindeki etkisi



Şekil 4.14. F7 formülasyonunun 24-48 saat inkübasyon sonrasında NIH-3T3 hücrelerinde hücre canlılığı üzerindeki etkisi

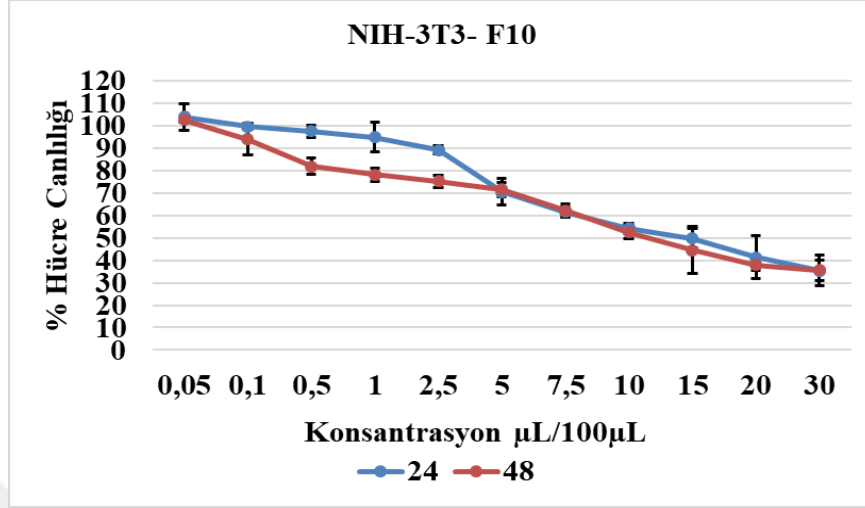


Şekil 4.15. F8 formülasyonunun 24-48 saat inkübasyon sonrasında NIH-3T3 hücrelerinde hücre canlılığı üzerindeki etkisi

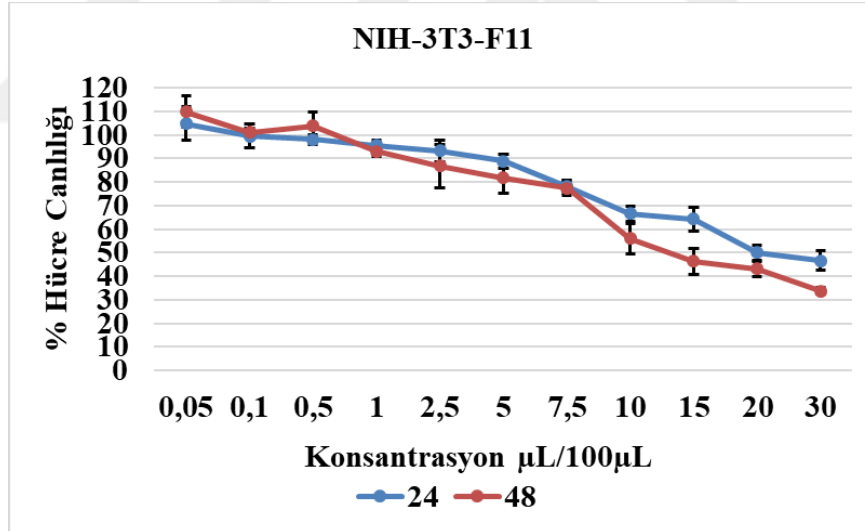
F9 formülasyonunun düşük zeta potansiyeline sahip olması sebebi ile sitotoksosite deneylerine alınmamıştır.

DDAB ile hazırlanan formülasyonlarda gözlenen yüksek hücre ölümü sebebi ile formülasyon değişikliğine gidilmiş ve formülasyonlar doğal katyonik özelliğe sahip KOS ile kaplanmıştır. Bu formülasyonların (F10 ve F11) hücre canlılığı üzerindeki etkisi

zamana ve konsantrasyona bağılı olarak analiz edilmiş ve sonuçlar standart sapma değerleri ile birlikte Şekil 4.16, 4.17’da gösterilmiştir.



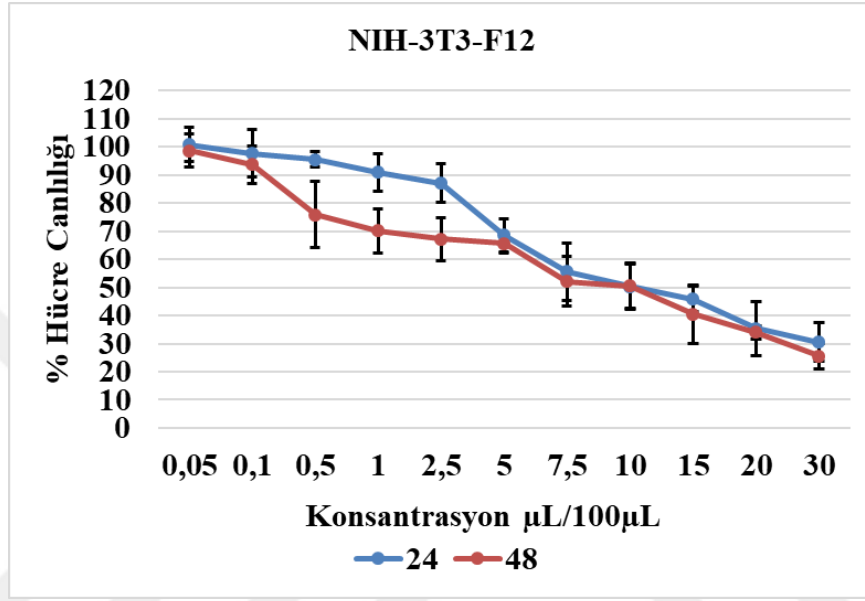
Şekil 4.16. F10 formülasyonunun 24-48 saat inkübasyon sonrasında NIH-3T3 hücrelerinde hücre canlılığı üzerindeki etkisi



Şekil 4.17. F11 formülasyonunun 24-48 saat inkübasyon sonrasında NIH-3T3 hücrelerinde hücre canlılığı üzerindeki etkisi

Yapılan analizler sonucunda F10 ve F11 arasında sitotoksosite açısından belirgin bir fark olmadığı gözlenmiştir. F10 ve F11 kodlu formülasyonlar partikül boyutu ve zeta potansiyel değerleri açısından değerlendirildiğinde partikül boyutu açısından bir fark olmadığı fakat F11’in zeta potansiyel değerinin daha yüksek olması sebebi ile ileriki çalışmalar için F11’in kullanılmasına karar verilmiştir. Bu sebeple viteksin yüklemesi

F11 kodlu formülasyona yapılmış ve F12 kodu verilmiştir. Bu formülasyonda da (F12) partikül boyutu, boyut dağılımı ve zeta potansiyel değeri ölçülmüştür. Sonuçlar Tablo 4.1’de verilmiştir. Buna göre viteksin yüklü formülasyonun (F12) hücre canlılığı üzerindeki etkisi zamana ve konsantrasyona bağlı olarak analiz edilmiş ve sonuçlar standart sapma değerleri ile birlikte Şekil 4.18’de gösterilmiştir.



Şekil 4.18. F12 formülasyonunun 24-48 saat inkübasyon sonrasında NIH-3T3 hücrelerinde hücre canlılığı üzerindeki etkisi

Yapılan analizlerde saf viteksin uygulanmış kuyularda yarı-maksimum inhibisyon konsantrasyonu (IC50) değerinin NIH-3T3 hücreleri için 24. saatte 85,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ve 48. saatte 87 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ olduğu saptanmıştır. Viteksin içermeyen F11 kodlu plasebo formülün IC50 değeri NIH-3T3 hücreleri için 24. saatte 20 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ ve 48. saatte 13,8 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ olduğu saptanmıştır. Viteksin içeren F12 kodlu plasebo formülün IC50 NIH-3T3 hücreleri için 24. ve 48. saatte 10 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ olduğu saptanmıştır.

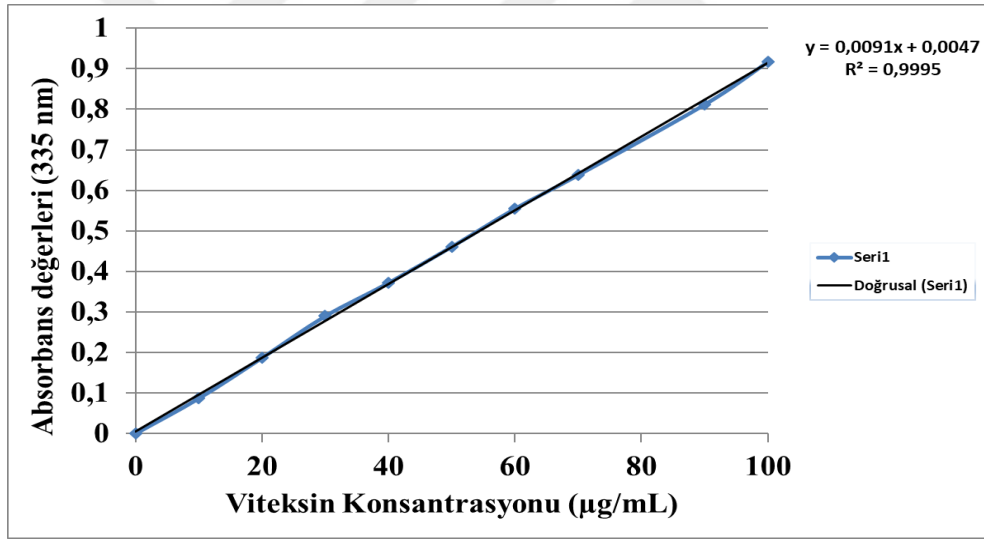
4.7. *In vitro* Salım Analizleri

Saf viteksinin standart eğrisi, 10-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ konsantrasyon aralığında yöntemler kısmında 3.11’de anlatıldığı gibi spektrofotometrik yöntem ile hazırlanmıştır. Sonuçlar 335 nm dalga boyunda $n=3$ olacak şekilde tekrar edilip ortalama alınarak elde edilmiştir.

Viteksine ait standart eğrinin hazırlanması çalışmasında elde edilen ve viteksin konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbans değerleri Tablo 4.2 ve konsantrasyon değerlerine bağlı absorbans değişim grafiği ise Şekil 4.20’de verilmiştir.

Tablo 4.2. Viteksin standart eğrisi çizilirken kullanılan konsantrasyon ve absorbans değerleri

Konsantrasyon (µg/ml)	Absorbans
10	0,087
20	0,187
30	0,29
40	0,372
50	0,461
60	0,555
70	0,638
90	0,812
100	0,917



Şekil 4.19. Viteksine ait standart eğri

Yapılan bu hesaplama ve grafik çiziminde standart eğrinin doğru denkleminin $y = 0,0091x + 0,0047$ ve $R^2 = 0,9995$ olduğu saptanmıştır. R^2 değeri de göz önüne alınarak hazırlanan standart eğrinin tez çalışması kapsamında in vitro salım için kullanılabileceğine karar verilmiş ve in vitro salım sonucunda gözlenen absorbanslar bu denklemde yerine koyularak zaman içinde salınan viteksin konsantrasyonu hesaplanmıştır.

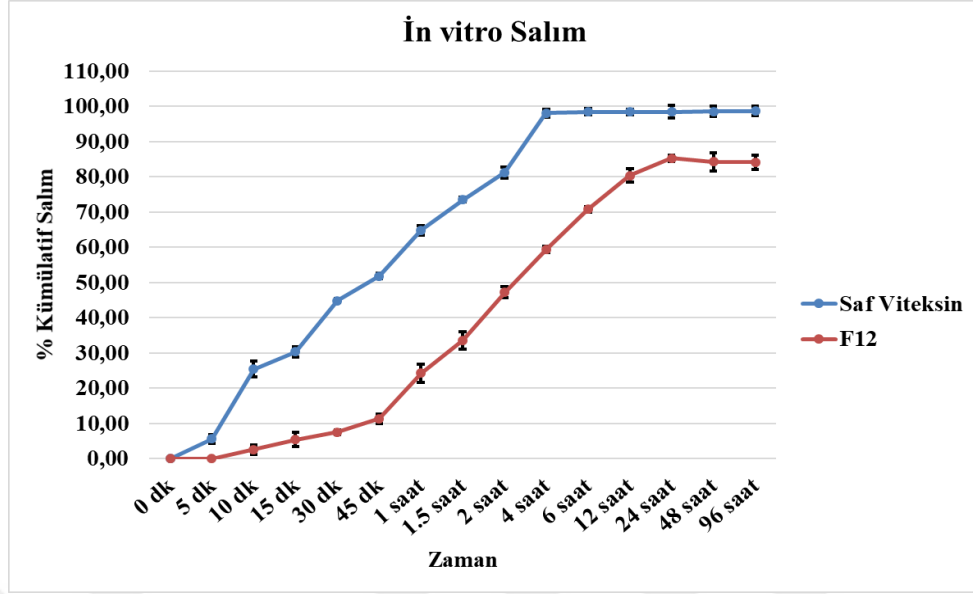
Viteksin içeren LNP formülasyonundan (F12) viteksinin in vitro salım çalışması 96 saat süre boyunca yapılmış ve çalışmada saf viteksin, plasebo formül (F11) ve viteksin

yüklü formülasyon (F12) eş zamanlı n=3 olacak şekilde yöntemler kısmında 3.10’da anlatıldığı gibi yapılmıştır.

F12’den farklı zamanlarda salınan viteksinin %kümülatif değerleri zamana karşı grafiğe geçirilmiş ve salım profili Şekil 4.19’daki gibi çizilmiştir. *In vitro* salım süresince hesaplanan viteksinin zamana bağlı salınan kümülatif madde miktarları da Tablo 4.3’te verilmiştir.

Tablo 4.3. pH 7.4 PBS tampon çözeltisinde saf viteksin ve viteksin yüklü F12 formülasyonundan kümülatif salınan viteksin miktarları

Örnek alma zamanı	% Kümülatif salım değerleri		Kümülatif çözünen etkin madde miktarı (mg)	
	Saf Viteksin	F12+Viteksin	Saf Viteksin	F12+Viteksin
0 dk	0,00±0	0,00±0	0,00±0	0,00±0
5 dk	5,57±1,21	0,00±0	0,124±2,34	0,00±0
10 dk	25,36±2,22	2,56±1,31	0,563±2,59	0,057±2,34
15 dk	30,35±1,46	5,36±1,98	0,674±3,21	0,119±2,88
30 dk	44,87±0,51	7,54±0,68	0,996±2,56	0,167±2,91
45 dk	51,80±0,79	11,32±1,34	1,15±1,44	0,251±1,76
1 saat	64,80±1,36	24,22±2,54	1,439±2,89	0,538±1,27
1.5 saat	73,50±0,67	33,56±2,43	1,632±1,99	0,745±0,33
2 saat	81,20±1,56	47,21±1,59	1,803±0,98	1,048±0,90
4 saat	98,10±1,12	59,31±0,87	2,178±0,45	1,317±1,11
6 saat	98,50±0,97	70,78±0,77	2,187±0,34	1,571±2,91
12 saat	98,40±0,88	80,32±1,90	2,184±0,76	1,783±1,45
24 saat	98,50±1,77	85,26±0,99	2,187±1,11	1,893±1,25
48 saat	98,61±1,53	84,29±2,56	2,189±1,54	1,871±0,31
96 saat	98,63±1,34	84,12±2,02	2,19±2,05	1,867±2,99

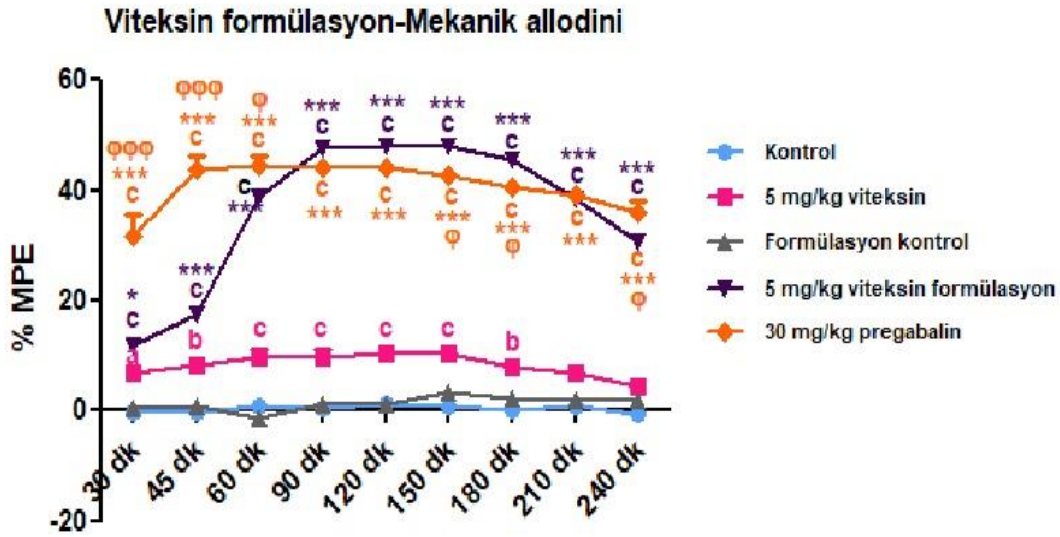


Şekil 4.20. Saf viteksin ve F12 formülasyonundan viteksinin in vitro salım deneyi grafiği

Aynı denklem kullanılarak yöntemler kısmında 3.11’de anlatıldığı gibi E2 eşitliği ile enkapsülasyon etkinliği hesaplanmıştır. Buna göre F12 formülasyonun viteksin için %88,8 oranında enkapsülasyon etkinliği gösterdiği saptanmıştır.

4.8. Viteksin İçeren Formülasyonun Anti-allodinik Aktivitenin Değerlendirilmesi

Şekil 4.21’de, çözücü, 5 mg/kg viteksin, 5 mg/kg viteksin içeren formülasyonun ve 30 mg/kg pregabalin uygulanan grupların zamana bağlı ölçülen mekanik allodini eşiklerinden hareketle hesaplanan % MPE değerleri görülmektedir. 5 mg/kg viteksin ve 30 mg/kg pregabalin uygulanan grupların % MPE değerlerinin 30-240 dk zaman aralığı içerisinde anlamlı olarak yükseldiği belirlendi (5 mg/kg viteksin: 30. dk ^a $P<0.05$; 45.dk 30 mg/kg pregabalin: ^c $P<0.001$). Ayrıca, 5 mg/kg viteksin içeren formülasyon ve 30 mg/kg pregabalin uygulanan gruplara ait % MPE değerlerinin formülasyonsuz viteksin uygulanan grubun değerlerine göre yine 30-240 dk aralığında anlamlı olarak yüksek bulundu (5 mg/kg viteksin formülasyon: 30. dk ^{*} $P<0.05$; 45 -240 dk ^{***} $P<0.001$ ve 30 mg/kg pregabalin: 30-240 dk ^{***} $P<0.001$). 30 mg/kg pregabalin uygulaması ile hesaplanan % MPE değerlerinin 5 mg/kg viteksin formülasyon uygulanan gruba göre belli zaman noktalarında anlamlı olarak yüksek kaldığı belirlendi (30 ve 45 dk ^{***} $P<0.001$; 60, 150-180 ve 240 dk [°] $P<0.05$).

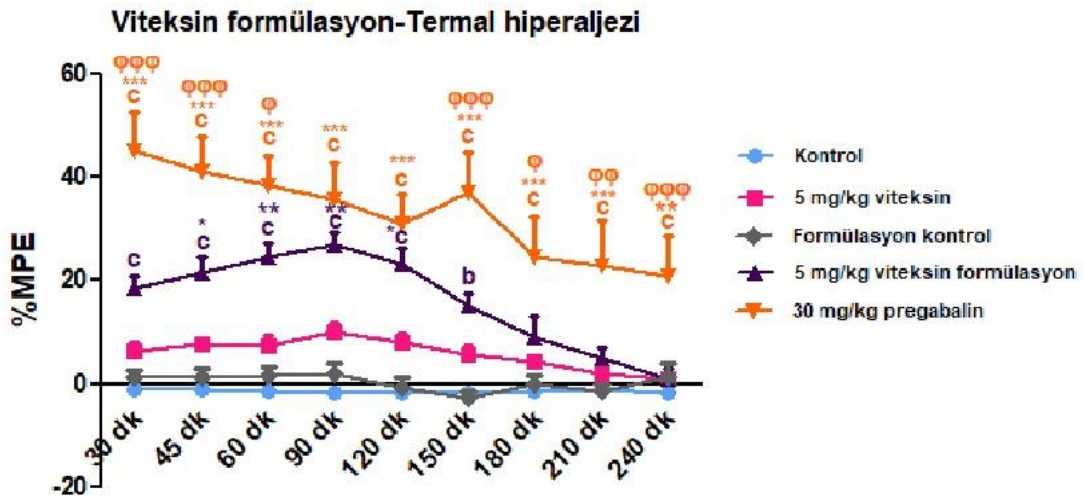


Şekil 4.21. Viteksinin ve viteksin içeren formülasyonun anti-allodinik etkisinin değerlendirilmesi

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$, ^c $P<0.001$; kontrole göre anlamlılık, ^{*} $P<0.05$, ^{***} $P<0.001$; 5 mg/kg viteksine göre anlamlılık, [°] $P<0.05$, ^{***} $P<0.001$; 30 mg/kg pregabalinine göre anlamlılık. Çift-yönlü ANOVA ve ardından Bonferroni metodu uygulanmıştır.

4.9. Viteksin İçeren Formülasyonun Antihiperaljezik Aktivitenin Değerlendirilmesi

Şekil 4.22, kontrol, 5 mg/kg viteksin, 5 mg/kg viteksin içeren formülasyonun ve 30 mg/kg pregabalın uygulanan grupların zamana bağlı ölçülen termal hiperaljezi eşiklerinden hareketle hesaplanan % MPE değerleri görülmektedir. 5 mg/kg viteksin uygulanan gruba ait % MPE değerlerinin anlamlı olarak değişiklik göstermediği belirlendi. 5 mg/kg viteksin içeren formülasyon uygulanan gruba ait % MPE değerlerinin 30-150 dk zaman aralığında anlamlı olarak yüksek bulundu (30-120 dk $^cP<0.001$; 150.dk $^bP<0.01$). 30 mg/kg pregabalın uygulanan grupların % MPE değerleri 30-240 dk aralığında anlamlı olarak yüksek olduğu belirlendi (30-240 dk $^cP<0.001$). Ayrıca, 5 mg/kg viteksin içeren formülasyon ve 30 mg/kg pregabalın uygulanan gruplara ait % MPE değerlerinin formülasyonsuz viteksin uygulanan grubun değerlerine göre yine 30-240 dk aralığında anlamlı olarak yüksek bulundu (5 mg/kg viteksin formülasyon: 45. dk $^*P<0.05$; 60 ve 90 dk $^{**}P<0.01$; 120. dk $^*P<0.05$ ve 30 mg/kg pregabalın: 30-210 dk $^{***}P<0.001$; 240. dk $^{**}P<0.01$). 30 mg/kg pregabalın uygulaması ile hesaplanan % MPE değerlerinin 5 mg/kg viteksin formülasyon uygulanan gruba göre belli zaman noktalarında anlamlı olarak yüksek kaldığı belirlendi (30 ve 45 dk $^{***}P<0.001$; 60. dk $^cP<0.05$; 150. dk $^{***}P<0.001$; 180. dk $^cP<0.05$; 210. dk $^{**}P<0.01$; 240.dk $^{***}P<0.001$).

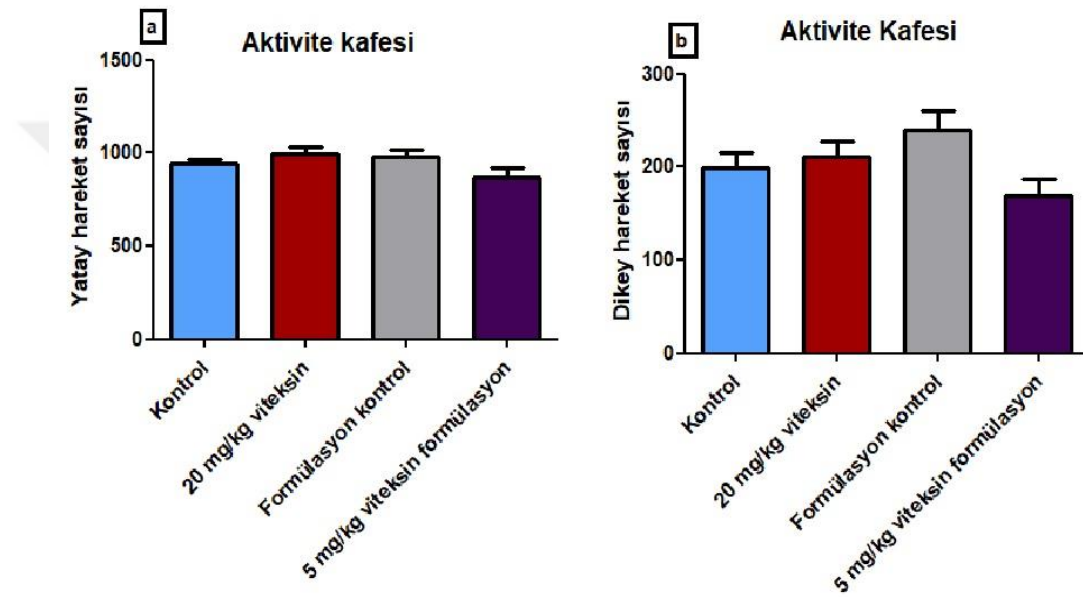


Şekil 4.22. Viteksinin ve viteksin içeren formülasyonun antihiperaljezik etkisinin değerlendirilmesi

$^aP<0.05$, $^bP<0.01$, $^cP<0.001$; kontrole göre anlamlılık, $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$; 5 mg/kg viteksine göre anlamlılık, $^cP<0.05$, $^bP<0.01$, $^{***}P<0.001$; 30 mg/kg pregabalinine göre anlamlılık. Çift-yönlü ANOVA ve ardından Bonferroni metodu uygulanmıştır.

4.10. Aktivite Kafesi ile Lokomotor Aktivite Tayini

Şekil 4.23'te nöropatik ağrılı gruplara çözücü, 5 mg/kg viteksin, viteksin içermeyen formülasyon ve 5 mg/kg viteksin formülasyonu uygulamasının aktivite kafesi deneylerinde lokomotor aktivite üzerine etkisi görülmektedir. Gruplara yapılan tüm uygulamaların lokomotor aktiviteye işaret eden yatay (a) ve dikey (b) hareketlerde istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı belirlendi.



Şekil 4.23. Viteksin ve viteksin içeren formülasyonun nöropatik ağrılı gruplarında lokomotor aktivite üzerine etkisi

Ortalama $\pm$ standart hata değerleri kullanılarak Student's *t*-testi uygulandı. (n=8).

5. TARTIŞMA

Nöropatik ağrı ile ilişkili yapılan bu tez çalışmasında, insanlardaki periferik nöropatiyi taklit ettiği bilinen KKH yöntemi tercih edilmiştir. Bu yöntem, güvenilir ve kolay tekrarlanabilir bir yöntem olmasıyla birlikte klinikte etkili olabilecek ilaçlarla ilgili güvenilir sonuçlar vermektedir (Jaggi vd, 2011; Challa, 2014). Nöropatik ağrının karakteristik özelliği olan allodoni ve hiperaljezi, sinire verilen hasar sonucu A β ve C liflerinde açığa çıkan duyarlılık artışına bağlı olarak oluşmakta ve ağrı davranışı olarak karşımıza çıkmaktadır (Challa, 2014). Tez çalışmasında, deney hayvanlarının mekanik allodoni ve termal hiperaljezi verileri invaziv işlem uygulanmadan önce sırası ile mekanik uyaran ve termal uyarana karşı tepkinin ölçülmesine olanak tanıyan elektronik von Frey ve plantar test cihazları ile ölçülmüştür. Daha sonra, literatürlerde allodini ve hiperaljezi geliştiği belirtilen süre olan birinci haftanın sonunda (Jaggi vd, 2011) ağrı eşikleri tekrar ölçülerek değerlendirildiğinde sham grubu hariç diğer gruplarda mekanik ve termal uyaranlara karşı ağrı eşiklerinin düştüğü tespit edilmiştir. Dolayısıyla nöropatik ağrı modeli başarı ile geliştirilmiştir. Başka bir deyişle, sinir hasarına bağlı olarak A β liflerinde duyarlılık artışı ile allodini, C liflerindeki duyarlılık artışı ile hiperaljezi geliştirilebilmiştir (Baron, 2010; Challa, 2014; Jensen ve Finnerup, 2014). Daha sonra, deney gruplarına araştırma maddesi olan viteksin 5, 10, 20 ve 40 mg/kg dozlarda sistemik (ip) olarak uygulanmıştır. Yapılan uygulamanın allodoni ve hiperaljezi eşiklerini ne şekilde değiştirdiği 30-240 dk zaman aralığı içerisinde değerlendirilmiştir. Çalışmamızdaki en düşük doz olan 5 mg/kg viteksin uygulaması haricinde diğer dozların 30-180 dk zaman aralığı içerisinde ağrı eşiklerini yükselterek anti-allodinik ve antihiperaljezik etki sağladığı gözlenmiştir. Viteksinin antiallodinik etkisi 30 mg/kg pregabalin ile benzer zamanlarda başlamış fakat pregabalin etkisine göre daha erken sonlanmış. Dolayısıyla, antiallodinik etkinin pregabalin etkisine göre düşük ve kısa süreli fakat ağrının giderilmesine yeterli seviyede katkı sağladığı görülmektedir. Viteksinin anti-allodinik etkisi pregabalin ile benzer zamanlarda başlamış fakat pregabalin etkisine göre daha erken sonlanmış. Etkili bulunan 10, 20, 40 mg/kg viteksin uygulaması sonrasında anti-allodinik etkinin net bir şekilde doza bağımlı olarak açığa çıkmadığı gözlenmiştir. Her ne kadar dozdaki 2 kat artışa rağmen etkide de 2 kat artış beklemesek de ön görüldüğü şekilde dozlar arasında herhangi bir etkinlik farkı oluşmadığı görülmektedir. Nitekim, bir çalışmada bronkokonstriksiyonda yeterli rahatlamayı sağlayan 10 mg/ml teofilin dozu iki katına çıkarıldığında etkide sadece %17

artış gerçekleştiği gösterilmiştir (Holford ve Sheiner, 1981). Bu noktada, deneysel koşullarımızda etkin viteksin dozunun etki yöresinde doygunluğa ulaştığı veya doz yükseldikçe anti-mekanizmaların yanı sıra bu mekanizmaları baskılayacak farklı fizyolojik olayları da etkilemiş olabileceği düşünülmüştür.

Antihiperaljezik etkinliğin değerlendirildiği çalışma sonuçlarına bakıldığında ise 5 mg/kg viteksin dozunun antihiperaljezik etki için yetersiz kaldığı diğer 3 dozun ise anlamlı etkiler gösterdiği hatta 20 mg/kg viteksin uygulanan grubun antihiperaljezik etkisinin 30 mg/kg pregabalin etkinliğine göre nispeten erken sonlanmasına rağmen yakın seviyelerde açığa çıktığı gözlenmiştir. Anti-allodinik etkinlikten farklı olarak antihiperaljezik etkinliğin doza bağımlı şekilde gerçekleşiyormuş gibi gözlenmesine rağmen en yüksek doz olan 40 mg/kg viteksin uygulamasıyla birlikte antihiperaljezik etkinliğin düşmüş olması dikkat çekicidir. Böyle bir durumla karşılaşılmasının nedeni etkili dozundan daha yüksek dozlar uygulandığında etkin maddenin ağrı oluşumuna neden olabilecek yolları harekete geçirebildiğini akla getirmektedir. Nitekim, çan şeklinde doz-cevap eğrisinin birbirinden farklı kompleks mekanizmalar ile etki eden ilaçlarda gözlenebildiği bilinmektedir. Örneğin; sitalopram, esitalopram, fluoksetin, paroksetin ve sertralin gibi bazı antidepresanlarda çan şeklinde doz-cevap eğrisi görülmektedir. Bu ilaçlarda doz arttırılmasının etkinliği yalnızca bir noktaya kadar arttırabildiği ve bunun üzerindeki artışların ise etkinin azalmasına yol açtığı görülmektedir. Belirli bir konsantrasyondan sonraki artışın 5-HT_{1A} otoresseptörlerini uyararak SSRI'ların etkilerini azalttığı düşünülmektedir (Terao vd., 2020). Benzer şekilde, psikotropik etkiden bağımsız olarak anksiyolitik ve antiinflamatuvar etki açığa çıkarttığı bilinen saf kannabidiol i.p. veya oral olarak uygulandığında çan şeklinde doz-cevap eğrisi gösterdiği bildirilmiştir (Gallily vd., 2015). Kanser tedavisi için yapılan bir araştırmada, resveratrolün düşük dozlarda yüksek dozlara göre daha etkili olduğu ve bu nedenle çan şeklinde doz-cevap eğrisi gösterebileceği üzerinde durulmuştur (Cai vd., 2015).

Aktivite kafesi deneylerinde ölçülen yatay ve dikey hareketlerin sayılarındaki artış veya azalış ilacın psikostimülan veya sedatif etkinlik gösterip göstermediği ile ilişkili fikir vermektedir. İlacın klinikte kullanımı esnasında bir yan etki olarak lokomotor aktivitede değişiklik yapması tercih edilmemekle birlikte kimi zaman gözlenen analjezik etkinliğin psikostimülan veya sedatif etkiyle ilişkili olup olmadığını yorumlamak için bu

verilerin alınması gerekmektedir (Stevenson vd., 2009). Nitekim, 20 mg/kg viteksin uygulamasının anlamlı değişiklik yapmadığı belirlenmiştir. Antiallodinik ve antihiperaljezik etkinliğin, lokomotor aktiviteden bağımsız bir şekilde gerçekleşiyor olması viteksinin farmakolojik etkisine avantaj sağlamaktadır.

Özetle, anti-allodinik ve antihiperaljezik etkinlik ve etki süresi kullanılan her bir viteksin dozu için farklılık gösterse de söylenebilir ki viteksin nöropati ile birlikte bozulmuş olan A β ve C liflerinin duyarlılığını başarılı bir şekilde düzeltmektedir. Mekanik ve termal uyarana yanıt olarak gelişen ağrılı uyaranların kullandıkları yollar, bu yolların kullandığı mekanizmalar, nosiseptörler ve iletimde görevli sinir lifleri farklılık göstermektedir. Miyelinsiz ve küçük çaplı C lifleri esas olarak termal uyarının iletilmesinden sorumluyken miyelinli ve geniş çaplı A β lifleri esas olarak mekanik uyarının iletilmesinden sorumludur. Dolayısıyla, her ilaç benzer seviyede ve sürede antihiperaljezik ve anti-allodinik etki açığa çıkarmayabilir (Huang vd., 2004; Meyer, 2008; Patel, 2010). Ağrı yitimi A β ve C liflerinin duyarlılığı üzerinde kontrol sağlayan birçok nörokimyasalın karşılıklı etkileşimi ile gerçekleşen karmaşık bir olaydır (Baron vd., 2010). Nörokimyasalların çeşitliliği ile birlikte onlar için özelleşmiş reseptörlerdeki çeşitlilik de anlaşılmayı zorlaştırmaktadır. Fakat hem farmakolojik etkinliğin ispatı hem de farmakolojik etki gösteren ilacın etki profillerinin aydınlatılması amacıyla etki mekanizması çalışmalarının detaylı olarak gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Bu tez çalışmasında, etki mekanizmasının aydınlatılmasına yönelik olarak ağrı kontrolünde primer rol oynayan sistemlerden biri olan serotonerjik sistemle ilişkisinin araştırılmasına odaklanılmıştır. Diğer mekanizmalar ile ilişkisi hakkında yetersiz sayıda da olsa çalışmalar mevcuttur. Ayrıca, serotonerjik sistemin ağrı modülasyonundaki rolünün karmaşık olması nedeniyle bu sistem üzerinde durulmuştur. Serotoninin 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C}, 5-HT₃ ve 5-HT₇ reseptör alt tipleri aracılığıyla ağrı kontrol sürecinde yer aldığı yapılan çalışmalarca gösterilmektedir (Cortes-Altamirano vd., 2017; Parades vd., 2019). 5-HT_{1A} ve 5-HT₃ reseptörlerinin aktivasyonunun ağrı iletimini baskıladığını gösteren pek çok çalışma bulunmaktadır (Kayser vd., 2007; Viguiet vd., 2013; Cortes-Altamirano vd., 2017; Tao vd., 2019). Ayrıca, 5-HT_{1A} reseptörü ile homolog yapıda olan 5-HT_{1B} reseptörünün de benzer şekilde ağrının baskılanmasına aracılık ettiği gösterilmiştir (Nascimento vd., 2015; Tao vd., 2019). Bununla birlikte, 5-HT_{2A} ve 5-HT_{2C} reseptör alt tiplerinin hem pronosiseptif hem de antinosiseptif etkiye aracılık ettiğini gösteren farklı çalışmalar bulunmaktadır (Cervantes-Durán vd., 2016; de Oliveria vd.,

2017). 5-HT₇ reseptörleri ise, serotoninin periferik pronosiseptik etkisine aracılık etmektedir. Ancak 5-HT₇ reseptörünün sadece sağlıklı hayvanlarda pronosiseptik etki açığa çıkardığı (Viguiet vd., 2013) nöropatik hayvanlarda ise hiperalejiyi hafiflettiği gösterilmiştir (Brenchat vd., 2010; Viguiet vd., 2013). Tez çalışmasında 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A/2C} ve 5-HT₃ reseptör stimölasyonlarının gözlenen farmakolojik etkiye katkı sağlayıp sağlamadığının araştırılması için sırasıyla WAY-100635, ketanserin, ondansetron kullanılmıştır. Söz konusu antagonistler deneysel etki mekanizması çalışmalarımda sıklıkla tercih edilen antagonistlerdir. Çalışma sonuçları değerlendirildiğinde hem antihiperalejik hem anti-allodinik etkide 5-HT_{2A/2C} reseptör antagonisti ketanserin ile geri dönüş sağlanamazken, 5-HT₃ reseptör antagonisti ondansetron ve 5-HT_{1A} reseptör antagonisti WAY-100635 ile tama yakın geri dönüş sağlandığı gözlenmiştir. Bu verilerden hareketle açıkça görölmektedir ki viteksin ile indüklenen analjezik etkiye serotonerjik sistemin katılımı söz konusudur. Fakat dikkat çeken nokta ketanserin uygulaması ile birlikte etkinin antagonize olamadığıdır. Kaynakçada da belirtildiği üzere serotonin hem antinosiseptik hem de pronosiseptik etkinlik göstermekte ve bu zıt etkiler serotonin reseptörlerinin konumları, uyarılma eşikleri, antagonist veya agonist dozu, uygulama yolu, ağrı tipi ve süresi ile ilişkilidir (Cortes-Altamirano vd., 2017; Parades vd., 2019). 5-HT_{2A} reseptörleri omurilikte geniş bir şekilde dağıldığı ve presinaptik ve postsinaptik bölgelerde bulunduğı gösterilmiştir. Ayrıca, bu reseptör alt tipinin lamina II'nin iç kısmında çok yoğun olarak bulunuyor olması spinal nosisepsitif sürecin modölasyonunda rol aldığıının kanıtı olarak görölmektedir. Dahası, birçok 5-HT_{2A} reseptörünün küçük ve orta büyüklükteki dorsal kök gangliyon hücrelerinde TRPV1 eksprese ettiğinin gösterilmesi bu reseptörün nosisepsitif doğasını doğrular niteliktedir (Stenwinckel vd., 2009; Rahman vd., 2011).

Günümüzde çeşitli farmakolojik etkileri olduğı bilinen flavonoidler sıklıkla çalışılmakta fakat bunların düşük çözünürlükleri, sulu ortamda karasızlık, zayıf emilim, foto degradesyon ve hızlı metabolizma özellikleri nedeniyle kullanımlarında sıkıntılar yaşanmaktadır (Thilakarathna vd., 2013; Cassidy vd., 2017; Roy vd., 2019). Çok sayıda tıbbi faydası olmasına rağmen, düşük suda çözünürlüğü ve zayıf biyoyararlanımı viteksinin klinik uygulamasını sınırlamaktadır. Nanopartikül mühendisliği, suda az çözünür bileşiklerin yukarıda bahsedilen dezavantajlarını çözmek için kullanılan yaygın stratejilerden biridir (Gu vd., 2017). Viteksin için taşıyıcı sistemlerinin geliştirilmesi üzerine çok az sayıda çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalardan birinde viteksin-fosfolipid

nanokomplekslerinin, serbest viteksinden daha yüksek bir biyoyararlanıma sahip olduğu gösterilmiştir (Luo vd., 2017). Bu sonuç, viteksinin işlevselliğini geliştirmek için taşıyıcı sistemlerin kullanılma potansiyelini vurgulamaktadır. Böylelikle, viteksinin kimyasal stabilitesinin geliştirilebileceği veya sindirimden sonra gastrointestinal sistemdeki metabolizmasının ve absorpsiyonunun modüle edilebileceği düşünülmüştür (Peng vd., 2020).

Yapılan bir başka çalışmada ise suda çözünürlüğünü arttırmak ve çözünme oranını iyileştirmek için antisolvent çökeltme (ASP) ve yüksek basınçlı homojenizasyon (HPH) yaklaşımlarını ve ardından liyofilizasyonu birleştirerek viteksin/Poloxamer 188 nanopartikülleri hazırlanmıştır. Viteksinin ortalama partikül boyutunu etkileyen ana faktörlerin etkileri araştırılmış ve optimize edilmiştir. Çalışmada viteksin nanopartikül formülasyonu en düşük $368.4 \pm 31,23$ nm partikül boyutu -18,5 mV zeta potansiyel saptanmıştır. Daha sonra homojenizasyon basınç değerleri ve sayıları ayarlanarak partikül boyutunda küçülmeler (80,5 nm) saptanmıştır. Elde edilen viteksin nanopartikülleri ayrıca SEM, FTIR, kütle spektrometresi (MS), X-ışını toz kırınımı (XRPD), gaz kromatografisi (GC) ve çözünme testi ile karakterize edilmiştir. Viteksin nanopartiküllerinin hızlandırılmış çözünme hızı partikül boyutunun küçültülmesi ile açıklanmıştır (Gu vd., 2017). Rahman ve Kumar (2019) hazırladıkları viteksin yüklü KLN'leri, 6-hidroksidopamin (6-OHDA) ile indüklenen parkinson modelinde etkili bulmuştur. Sivathanu (2021), tarafından hazırlanan viteksin yüklü lipozom formülasyonunda ise POPC fosfolipiti kullanılmıştır. Sonuçlar, formüle edilmiş lipozomların daha iyi ilaç taşıyıcı sistemler olduğunu ve kanser hücreleri gibi hedef bölgeye ulaşmak için iyi bir seçim olduğunu göstermiştir.

Kitosan nanopartiküllerine yüklü viteksin ile yapılan bir diğer çalışmada *in vitro* sitotoksikite ve *in vivo* yara iyileştirme çalışmasında; viteksin formülasyonunun kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir etki gösterdiği ve cilt yenilenmesini desteklediği gösterilmiştir. NIH 3T3 ve HaCaT hücreleri ile yapılan yara iyileştirme testinde de viteksin/kitosan dispersiyonu ile önemli hücre proliferasyonu gözlenmiştir. Sonuç olarak, viteksin yüklü kitosan jel bazlı formülasyonun hem *in vivo* hem de *in vitro* deneylerde yara iyileşmesini hızlandırdığı rapor edilmiştir (Bektaşvd., 2020).

KLN'ler suda çözünmeyen ilaçların çözünürlüğünü arttırmanın yanı sıra nanometre ölçekli partikül boyutlarından dolayı ilaç emilimini, taşınmasını ve dağılımını teşvik

ederek de ilaçların biyoyaralanımının artırılmasına olanak sağlamaktadır (Üner, 2007; Mehnert ve Mäder, 2011; Tan vd., 2017). KLN'ler kan dolaşımından ziyade daha çok lenfatik sistemde dolaşmaları nedeniyle hapsedtiği ilaç etkin maddesini ilk geçiş etkisinden korumakta ve bu sayede daha düşük dozlarda ve daha az yan etki ile tedaviyi mümkün kılmaktadır (Üner, 2007; Mehnert ve Mäder, 2011; Tan vd., 2017). Bahsedilen bu avantajların viteksinin farkokinetik özelliklerini düzelterek nöropatik ağrı üzerindeki etkinliğini iyileştirebileceği düşünülerek KLN formülasyonları hazırlanmıştır.

Nanopartiküllerin yapısal analizlerinde belirlenmesi gereken kritere göre birçok teknik kullanılabilmektedir. Tez çalışmasında yapılan ilk analizler partikül boyut, boyut dağılımı ve zeta potansiyel analizleri olmuştur. Partikül boyut analizlerinde lipit oranındaki değişimlerin ve sonikasyon sürelerinin partikül boyutuna etkisinin olduğu gözlenmiştir. Örneğin %4 (0,24 g) lipit içeren formülasyonlarda 3 dk (F1) sonikasyon sonunda partikül boyutu $855,6 \pm 5,765$ nm ve 5 dk (F2) sonikasyon süresi uygulandıktan sonra partikül boyutu $672,4 \pm 4,760$ nm bulunmuştur. Lipitin konsantrasyonu %2'ye (0,12 g) indirildiğinde ise 3 dk (F3) sonikasyon sonunda partikül boyutu $273,4 \pm 0,045$ nm ve 5 dk (F4) sonikasyon süresi uygulandıktan sonra partikül boyutu $154,1 \pm 0,178$ nm bulunmuştur. Lipitin konsantrasyonu %1'e (0,06 g) indirildiğinde ise 3 dk (F5) sonikasyon sonunda partikül boyutu $121,1 \pm 2,341$ nm ve 5 dk (F6) sonikasyon süresi uygulandıktan sonra partikül boyutu $89,5 \pm 1,632$ nm bulunmuştur. Çalışmada daha düşük lipit konsantrasyonuna inildiğinde ise faz ayrışması gözlemlendiğinden bu konsantrasyonlar çalışmaya dahil edilmemiştir.

Çalışmamızda hazırlanan PDI da analiz edilmiştir. PDI bir dispersiyondaki partiküllerin ortalama homojenliğini tahmin etmek için kullanılır ve büyük PDI değerleri, partikül numunesinde daha büyük boyut dağılımına karşılık gelir. PDI formülasyondaki partikül yüzey modifikasyonlarının tutarlılığı ve verimliliği ile birlikte nanopartikül agregasyonunun da bir göstergesidir (Clayton, 2016). PDI'nın sayısal değeri 0,0 (mükemmel monodispers sistemler) ile 1,0 (polidispers sistemler) arasında değişmektedir. 0,2 ve altındaki değerler, pratikte en çok polimer bazlı nanopartikül malzemeler için kabul edilebilir PDI değeri olarak görülürken, lipit bazlı taşıyıcıların kullanıldığı ilaç taşıma sistemlerinde 0,3 ve altındaki PDI değerleri kabul edilebilir homojen sistemler olarak görülmektedir (Danaei, 2018). Tez çalışmasında hazırlanan formülasyonlarda yüksek lipit içeriğine ve düşük sonikasyon süresi ile hazırlanan

formülasyonlarda PDI değerinin yüksek olduğu fakat lipit oranı azaldığında ve sonikasyon süresi de arttığında PDI değerinde de azalmalar gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlarla (Tablo 4.1) hazırlanan F6 formülasyonunun monodispers yapıda olduğu söylenebilir.

Bir süspansiyonda partikül boyutu yanında zeta potansiyel değerinin de ölçülmesi nanopartiküllerin karakterizasyonunda önemli bilgiler elde edilmesine yardımcı olmaktadır. Bir numunenin zeta potansiyeli, koloidal dispersiyonların stabilitesinin önemli bir göstergesidir. Oldukça pozitif veya negatif yüklü partiküller, birbirlerini itme eğilimindedirler, böylece nispeten topaklaşma göstermeyen stabil koloidal çözeltiler oluştururlar. Öte yandan, bir koloidal nanopartikül dispersiyonunun düşük zeta potansiyel değerine sahip olması, kolloidlerin topaklanmasına neden olur. Genel olarak, yaklaşık -20–30 mV aralığındaki veya daha yüksek aralıktaki zeta potansiyeli değerlerine sahip kolloidler stabil kabul edilmektedir. Zeta potansiyel değeri nanopartiküllerin yüzeylerinin modifikasyonları ya katyonik bir ajan eklenmesi ile ayarlanabilir, böylece koloidal süspansiyonun stabilizasyonu, elektrostatik itme yoluyla elde edilir. Zeta potansiyeli, süspansiyonun konsantrasyonu, kullanılan çözücü ve diğer katkı maddelerinin bileşiminden de etkilenmektedir (Baldassarre vd., 2015). Çalışmada hazırlanan formülasyonların zeta potansiyelleri 15,5 ile 18,9 arasındaki değerlerde negatif olarak bulunmuştur. Lipid nanopartiküllerinin, lipidlerdeki terminal karboksilik grupların varlığından dolayı yüzeylerinde negatif bir yüke sahip olması nedeniyle tüm formülasyonlar negatif bir zeta potansiyeli göstermiştir (Badawi vd., 2021).

Çalışmalarda karakterizasyon aşamasında yapılan ¹H-NMR ve FTIR analizleri özellikle taşıyıcı sistemlerin bileşimini ve yapısını karakterize etmek için kullanılan etkili yöntemler arasındadır. Katı lipit nanopartiküllere birlikte polimerik nanopartiküllerde de etkin madde ve kullanılan yardımcı maddeler arasında etkin maddenin durumu, moleküler hareketliliği ve moleküler etkileşimleri bu analizlerle belirlenebilmektedir.

¹H-NMR analizleri, saf etkin madde ve kullanılan diğer formülasyon bileşiklerinin yanı sıra viteksin içermeyen ve içeren formülasyonlarda yapılmıştır. Bu analizlerin sonuçları değerlendirildiğinde etkin madde içermeyen formülasyon ile içeren formülasyon arasında herhangi bir fark olmadığı gözlenmiştir. Özellikle viteksin içeren formülasyonda viteksine ait bir karakteristik pik gözlenmemesi hem kullanılan etkin maddenin az olmasından (%0,5) kaynaklandığı, hem de kullanılan kitooligosakkarit

polimerinin bu etkin maddenin piklerini baskıladığını düşündürmüştür. Aynı zamanda Şekil 4.9'da etkin maddeli formülasyonda 3,24 ppm, 3,29 ppm ve 3,35 ppm'de görülen karakteristik piklerin çok benzerlerinin hafif kayma ile birlikte viteksin içermeyen boş formülasyonda da 3,33 ppm, 3,40 ppm ve 3,51 ppm'de gözlenmesi, bunun polimerin bir etkisi olabileceği ihtimalini güçlendirmektedir.

Yapılan FTIR analizlerinde fiziksel karışım, boş formülasyon (F11) ve viteksin yüklü formülasyon (F12) için yapılan diğer FTIR analizlerinde çok benzer pikler elde edilmiştir. Örneğin 717 cm^{-1} , 1097 cm^{-1} , 1178 cm^{-1} , $1195\text{-}1469\text{ cm}^{-1}$ aralığı, 1735 cm^{-1} , 2850 cm^{-1} ve 2914 cm^{-1} 'deki pikler tamamen örtüşmektedir. Viteksinde $2848,86\text{ cm}^{-1}$ ve $2916,37\text{ cm}^{-1}$ 'de görülen iki karakteristik Daynasan'da da 2848.86 cm^{-1} ve $2912,51\text{ cm}^{-1}$ olarak benzer yerlerde pik görülmesi sebebiyle, formülasyondaki analizde sadece pik şiddetinin artışı ile viteksinin formülasyona yüklenebildiği yorumu yapılabilmiştir. Bunun dışında farklı bölgelerde pik gözlenmemesi formülasyon hazırlanma sırasında kullanılan maddeler ve etkin maddenin kimyasal yapılarını koruduğu ve aralarında herhangi bir kimyasal etkileşimin olmadığını göstermektedir. Aynı zamanda FTIR sonuçları $^1\text{H-NMR}$ 'da gözlenen karakteristik pikin polimere ait olduğu ve bu polimerin diğer pikleri baskıladığı düşüncesini güçlendirmektedir.

Literatürdeki $^1\text{H-NMR}$ ve FTIR analizlerinde etkin madde piklerinin kullanılan polimer tarafından baskılandığı ya da düşük etkin madde konsantrasyonu sebebiyle etkin maddeye ait karakteristik piklerin görülemediği çalışmalar mevcuttur. Örneğin bir çalışmada Siklosporin A yüklenen katı lipid nanopartiküllerin $^1\text{H-NMR}$ analizlerinde siklosporin A'nın karakteristik piklerinin gözlenmemesinin kullanılan etkin maddenin konsantrasyonunun düşük olmasından (%0,1) kaynaklandığı belirtilmiştir (Başaran vd., 2010). Aynı şekilde Pereira vd., (2016) yaptıkları bir diğer çalışmada da %1 oranında oxaliplatin yüklü PLGA nanopartiküllerini hazırladıkları diğer bir çalışmada da FTIR analizlerinde etkin maddenin pikleri düşük konsantrasyon sebebiyle görülememiştir. Costa vd. (2020) yaptıkları bir çalışmada ise viteksin yüklü beta siklodekstrin nanopartikülleri hazırlanmış ve betasiklodekstrinin viteksin piklerini baskıladığı, bu nedenle de yine $^1\text{H-NMR}$ 'da formülasyonun analizinde viteksine ait karakteristik piklerin gözlenmediği saptanmıştır. Yapılan bir başka çalışmada da formülasyonlar içinde etkin maddeye ait pik/tepe noktası gözlenmemesi ilacın polimerik yapı içinde kapsüllendiğini doğruladığı şeklinde yorulanmıştır (Öztürk ve Kıyan, 2020). Öztürk vd., (2019)

tarafından yapılan bir çalışmada formülasyonlara yüklenen etkin maddenin spesifik piklerinin, formülasyonlarda gözlenmemesi ise etkin maddenin polimer matris içinde moleküler olarak dağıldığı şeklinde yorumlanmıştır. Bu sonuçlar göz önüne alındığında yaptığımız çalışmada viteksin KOS-LNP partiküllerine yüklenebildiği ve literatürle benzer sonuçların elde edildiği düşünülmektedir.

Bu karakterizasyon analizlerinden sonra formülasyonların hücreler üzerindeki etkinliğini görebilmek için sitotoksite analizleri gerçekleştirilmiştir. Analizler ISO 10993-5: 2009: tıbbi cihazların biyolojik değerlendirmesi - Bölüm 5: in vitro sitotoksite testleri temel alınarak değerlendirilmiştir. Bu uluslararası standarda göre ilgili test numunesi hücre canlılığında %30'dan fazla düşmeye sebep oluyorsa sitotoksiktir olarak tanımlanmaktadır (http-2). Hazırlanan formülasyonların ve saf viteksinin hücreler üzerindeki etkinliğini belirleme amacıyla çalışmada NIH-3T3 hücre dizileri kullanılmıştır. Formülasyonlardan DDAB yüklü LNP formülasyonları ilk önce analize alınmış ve yüksek zeta potansiyel değerine sahip F7 ve F8'in 0,05-30 µl/100 µl konsantrasyon aralığında hücre canlılığına etkisi değerlendirilmiştir. Analiz sonuçlarına göre çalışılan en düşük konsantrasyonda bile %70 hücre canlılığı elde edilemediğinden DDAB'ın çok sitotoksik olduğu gözlenmiş ve çalışmaya KOS ile kapla şeklinde devam edilmesine karar verilmiştir. Viteksin yüklü formülasyon ise doza bağlı olarak sitotoksik etki göstermiştir.

Literatürdeki DNA bağlama çalışmalarda, flavonoid içeriği bulunan bitki ekstraktlarının nanopartiküllere yüklenmesi ve bu nanopartiküllerin de DNA ile bağlanması çalışmalarına pek çok örnek vardır. Bağlama çalışması yapılan bu DNA'lar için genellikle buzağı timüs DNA'sı (Calf Thymus DNA) kullanılmıştır ve amaç nanopartikülün *in vivo* uygulandıktan sonra hücre içindeki DNA'ya bağlanabilme ve sonrasında hücre döngüsünü ve mitozu engelleme/bozma yetisinin araştırılmasıdır (Ribeiro vd., 2018; Chandraker vd., 2021). Literatürde viteksin ile hazırlanan bir nanopartikül formülasyonuna daha önce hiçbir genetik materyal bağlama çalışması yapılmamıştır. Bu çalışma ilk defa bu tez kapsamında yapılmıştır.

Formülasyonun genetik materyal bağlayabilme özellikleri araştırılmıştır. Analizde viteksin yüklü pozitif yüzey yüküne sahip nanopartiküller hazırlandıktan sonra GFP plazmid DNA ile etkileşimi araştırılmıştır. Jel reterdasyon sonuçlarına göre 10 µl ve yukarıdaki konsantrasyonlardaki F12 formülasyonu GFP plazmid DNA'yı

bağlayabildiği, daha düşük konsantrasyonlarda ise bu bağlanmanın yeterli bir şekilde gerçekleşmediği saptanmıştır. Bu sonuçlar alındıktan sonra formülasyonun DNA'yı serum bileşenleri ve DNaz enzimi varlığında koruma özellikleri araştırılmıştır. DNA yüklü nanopartiküllerin serum bileşenlerine ve enzimatik parçalanmaya karşı stabiliteleri genetik materyalin *in vivo* ya da *in vitro* etkisi açısından çok önemlidir. Çünkü nanopartikül ile etkileşimde olmayan çıplak haldeki DNA fizyolojik ortamda bulunan nükleazlara karşı açık haldedir ve parçalanmaya meyillidir (Chandrasekaran, 2021). Bu sebeple plazmid DNA'nın hem hedef bölgeye ulaşabilmesi hem de hücrelere etkili bir şekilde transfeksiyonu için uygun nanopartiküller geliştirilmektedir (Najafi vd., 2015). Serum bileşenlerine DNaz enzimine karşı koruma analizlerinde hazırlanan F12 formülasyonu GFP-Plazmid DNA'sını 6 saate kadar serum bileşenlerine karşı koruduğu fakat bu saatten sonra formülasyonun genetik materyali salmaya başladığı jel üzerindeki bant görüntülerinden belirlenmiştir (Şekil 4.11). Bu görüntülerde 36. saate kadar görülen bantlar, kontrol DNA'sı ile aynı yerde iken özellikle 48. saatte bantların daha önde ve smear şeklinde görülmeye başlandığı saptanmıştır. Bu da DNA'nın bu saatten sonra parçalandığını göstermektedir. DNaz enzimine karşı korunmasında ise DNaz ile muamele edilmeyen GFP yüklü F12 formülasyonunun, DNaz ile muamele edilen F12 formülasyonu ile aynı görüntüde olması formülasyonun bu enzime karşı koruma görevi gördüğünü göstermektedir.

Çalışmada *in vitro* olarak en son *in vitro* salım çalışması yapılmıştır. Bu çalışma öncesinde F12 formülasyonunun %88,8 gibi yüksek bir enkapsülasyon etkinliği gösterdiği saptanmıştır. *In vitro* salım analizine göre saf viteksin için ilk 4 saatte % 98 oranında salım gözlenirken, viteksin yüklü F12 formülasyonda zamana bağlı salım gözlenmiştir. İlk 45 dakikada viteksinin %10'u salınırken, F12 formülasyonunun 96 saat sonunda %84,12'sinin salındığı gözlenmiştir. Formülasyondan ilk dakikalarda herhangi bir ani salımın olmaması viteksinin kompleksin iç bölgelerinde hapsediğini ve kompleks parçalandıkça ortama salındığını göstermektedir.

Etki analizi çalışmalarından hareketle tez amacımıza uygun şekilde hem anti-allodinik hem de anti-hiperaljezik etkinlik açısından yetersiz kalan ve en düşük doz olan 5 mg/kg dozunda viteksinin formülasyona yüklenmesine karar verilmiştir. Amaç fizyolojik sisteme mümkün olduğunca düşük dozda etkin madde uygulamasıyla güvenli bir profil oluşturmak ve en iyi farmakolojik etkinliği yakalamaktır. Çalışma sonuçları

değerlendirildiğinde 5 mg/kg viteksinin formülasyon içinde uygulamasının anti-allodinik ve anti-hiperaljezik etkinliği anlamlı derecede ortaya çıkmasına ve etki süresinin de uzamasına yol açtığı belirlenmiştir. Gösterdiği anti-allodinik etkinin 30 mg/kg pregabalin kadar etkin ve hatta etki analizinde en etkili doz olarak belirlenen 20 mg/kg viteksinin göstermiş olduğu etkiden de daha yüksek olduğu dikkat çekmektedir. Yapılan salım analizi çalışma sonuçları ile birlikte değerlendirildiğinde görülmüştür ki; formülasyon içinden viteksin salınımının pik yaptığı zaman ile formülasyonlu viteksin uygulamasının etkinliğinin pik yaptığı zaman aralığı örtüşmektedir. Yine etkinlik saf viteksin ile yapılan etki analizi çalışmalarında 180 dk.'da sonlanarak pregabalin kadar uzun etki süreli olmadığı belirlenmiştir. Fakat viteksin yüklü formülasyon uygulaması etki süresinin de pregabalin benzer şekilde uzamasına neden olmuştur. Benzer sonuçlar, anti-hiperaljezik etkinliğin araştırıldığı çalışmada da gözlenmiştir. Farklı olarak viteksin yüklü formülasyon uygulamasında anti-hiperaljezik etkinlik pregabalin ile aynı seviyelerde gözlenememiş fakat yine de 20 mg/kg viteksinin göstermiş olduğu etkiden daha yüksek ve uzun süreli olarak gerçekleşmiştir. Ayrıca etkideki ve etki süresindeki bu artışın taşıyıcı formülasyonun kendisinden kaynaklanıp kaynaklanmadığının belirlenebilmesi için viteksin içermeyen formülasyonun uygulaması sonucu elde edilen veriler değerlendirildiğinde görülmektedir ki; formülasyonun kendi başına herhangi bir farmakolojik aktivitesi yoktur. Ayrıca lokomotor aktivite sonuçlarına göre; viteksin yüklü formülasyon uygulamasının lokomotor aktiviteyi göreceli olarak düşürüyor olmasına rağmen, bu düşüşün istatistiksel anlamlılık göstermemesi viteksin yüklü formülasyonun etkinliğine önemli bir avantaj sağladığı düşünülmüştür.

Bu sonuçlardan hareketle geliştirilen viteksin yüklü formülasyonun, viteksinin olumsuz farmakokinetik özelliklerinin düzeltilmesini sağlayarak daha düşük konantrasyonda daha uzun etki süreli yüksek efikasite göstermesine imkân sağlamıştır. Nitekim daha önce belirtildiği gibi KLN'ler taşıdıkları etkin maddenin membranlardan geçişini, biyoyararlanımını, etki yöresine ulaşan konstrasyonunu artırmaktadırlar. KLN'lerin sağladığı tüm bu yararlar sayesinde etkin maddenin etkinliği artılabilmekte ve etki süresi uzatılabilmektedir. Böylece daha düşük konsantrasyonlarda daha yüksek ve uzun süreli bir etki sağlanabilmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması, daha önce nöropatik ağrı üzerindeki etkisi detaylı olarak çalışılmamış olan viteksinin nöropatik ağrı kontrolünü sağladığını göstermesi ve bu etkiye aracılık eden serotonerjik sistem ile ilişkisinin değerlendirilmesi açısından bir ilktir. Bir başka özgün değeri ise viteksin yüklü KLN'nin de nöropatik ağrı üzerindeki etkinliğinin değerlendirilmiş olması ve genetik materyal (GFP) ile etkin madde yüklü partiküllerin hücrelere geçişinin kontrol edilmiş olmasıdır.

Bu çalışmada, KKH modeli ile nöropati geliştirilmiş sıçanlara i.p. olarak 10, 20, 40 mg/kg viteksin uygulaması, nöropati gelişimi neticesinde düşen mekanik ve termal eşikleri yükselterek anti-allodinik ve antihiperalezik etkinlik göstermiştir. Ayrıca, anti-allodinik ve antihiperalezik etkinliğin lokomotor aktiviteden bağımsız bir şekilde gerçekleşiyor olması viteksinin farmakolojik etkinliğine avantaj olarak görülmektedir. 5-HT_{1A} ve 5-HT₃ reseptör stimülasyonları, viteksinin anti-allodinik ve antihiperalezik etkinliğine belirgin katkı sağladığı ortaya konmuştur. Ayrıca yapılan çalışmalarda, viteksinin KLN'ler içerisine başarılı bir şekilde yüklendiği yapılan karakterizasyon çalışmaları ile gösterilmiştir. Viteksin yüklü formülasyonun daha düşük konsantrasyonda daha yüksek ve uzun süreli bir etki sağladığı belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlar nöropatik ağrı tedavisinde viteksinin kullanılabileceğine dair, etki ve etki mekanizmaları açısından literatüre ve yeni ilaç geliştirilmesine katkı sağlayan veriler sunmaktadır. Bununla birlikte bu çalışma ile viteksinin bir formülasyon halinde kullanılabilmesi ve aynı zamanda biyoteknolojik olarak yeni bir gen taşıyıcı sistem olarak değerlendirilebilmesine olanak sağlayacak sonuçlar da elde edilmiştir. Böylelikle hem nöropatik ağrının giderilmesinde hem de ağrının eşlik ettiği birçok hastalıkta da yeni bir tedavi yaklaşımı sunmaktadır.

KAYNAKÇA

- Abbasi, E., Aval, S.F., Akbarzadeh, A., Milani, M., Nasrabadi, H.T., Joo, S.W., Pashaei-Asl, R. (2014). Dendrimers: synthesis, applications, and properties. *Nanoscale Res. Lett.*, 9(1), 1-10.
- Akbar, S. (2019). Flavonoids in neuropathic pain management: A new player on an old target. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.*, 13(9), 100-112.
- Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S.W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., Samie, M., Kouhi, M., Nejati-Koshki, K. (2013). Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res. Lett.*, 8(1), 1-9.
- An, F., Yang, G., Tian, J., Wang, S. (2012). Antioxidant effects of the orientin and vitexin in *Trollius chinensis* Bunge in D-galactose-aged mice. *Neural Regen. Res.*, 7(33), 2565.
- Aydın, O. N. (2002). Ağrı ve Ağrı Mekanizmalarına Güncel Bakış. *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 2(3), 37-48.
- Azevedo, M.I., Pereira, A.F., Nogueira, R.B., Rolim, F.E., Brito, G.A., Wong, D.V.T., Riberio, R.A., Vale, M.L. (2013). The antioxidant effects of the flavonoids rutin and quercetin inhibit oxaliplatin-induced chronic painful peripheral neuropathy. *Mol. Pain*, 9, 3-14.
- Babaei, F., Moafizad, A., Darvishvand, Z., Mirzababaei, M., Hosseinzadeh, H., Nassiri-Asl, M. (2020). Review of the effects of vitexin in oxidative stress-related diseases. *Food Sci. Nutr.*, 8(6), 2569-2580.
- Badawi, N.M., Elkafrawy, M.A., Yehia, R.M., Attia, D.A. (2021). Clinical comparative study of optimized metronidazole loaded lipid nanocarrier vaginal emulgel for management of bacterial vaginosis and its recurrence. *Drug Deliv.*, 28(1), 814-825.
- Baldassarre F, Cacciola M, Ciccarella G (2015). A predictive model of iron oxide nanoparticles flocculation tuning Z-potential in aqueous environment for biological application. *J. Nanopart. Res.*, 17, 1-9.
- Bardin, L. (2011). The complex role of serotonin and 5-HT receptors in chronic pain. *Behav. Pharmacol.*, 22(5-6), 390-404.

- Baron, R. (2006). Mechanisms of disease: neuropathic pain—a clinical perspective. *Nat. Clin. Pract. Neurol.*, 2(2), 95-106.
- Baron, R., Binder, A., Wasner, G. (2010). Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. *The Lancet Neurol.*, 9(8), 807-819.
- Başaran, E., Demirel, M., Sırmagül, B., Yazan, Y. (2010). Cyclosporine-A incorporated cationic solid lipid nanoparticles for ocular delivery. *J. Microencapsul.*, 27(1), 37-47.
- Bedell, S., Wells, J., Liu, Q.F., Breivogel, C. 2019. Vitexin as an active ingredient in passion flower with potential as an agent for nicotine cessation: Vitexin antagonism of the expression of nicotine locomotor sensitization in rats. *Pharmac. Biol.*, 57 (1), 8–12.
- Bektas, N., Şenel, B., Yenilmez, E., Özatik, O., Arslan, R. (2020). Evaluation of wound healing effect of chitosan-based gel formulation containing vitexin. *Saudi Pharm. J.*, 28(1), 87-94.
- Bennett, M.I. (2010). Theories, history and current taxonomy. M.I. Bennett (Ed.), *Neuropathic pain içinde* (s.1-9) New York: Oxford University Press Inc.
- Berker, E. (2005). Nöropatik Ağrı ve Fizyopatolojik Mekanizmalar. *Türk. Fiz. Tıp Rehab. D.*, 51, A1-A5.
- Berry, P.H., Chapman, C.R., Covington, E.C., Dahl, J.L., Katz, J.A., Miaskowski, C., Besson, J.M. (1999). The neurobiology of pain. *The Lancet*, 353(9164), 1610-1615.
- Blanco-Andujar, C. (2014). Ph.D Thesis, Sodium Carbonate Mediated Synthesis of Iron Oxide NPs to Improve Magnetic Hyperthermia Efficiency and Induce Apoptosis. London: University College London.
- Borges, A., Freitas, V.D., Mateus, N., Fernandes, I., Oliveira, J. (2020). Solid Lipid Nanoparticles as Carriers of Natural Phenolic Compounds. *Antioxidants*, 9(10), 998.
- Borghi, S.M., Carvalho, T.T., Staurengo-Ferrari, L., Hohmann, M.S., Pinge-Filho, P., Casagrande, R., Verri Jr, W.A. (2013). Vitexin inhibits inflammatory pain in mice

- by targeting TRPV1, oxidative stress, and cytokines. *J. Nat. Prod.*, 76(6), 1141-1149.
- Bouhassira, D. (2019). Neuropathic pain: definition, assessment and epidemiology. *Rev. Neurol.*, 175(1-2), 16-25.
- Bourne, S., Machado, A.G., Nagel, S. J. (2014). Basic anatomy and physiology of pain pathways. *Neurosurg. Clin.*, 25(4), 629-638.
- Brenchat, A., Nadal, X., Romero, L., Ovalle, S., Muro, A., Sánchez-Arroyos, R., Partillo-Solido, E., Pujol, M., Montero, A., Hamon, M., Maldonoda, R., Vela, J. M. (2010). Pharmacological activation of 5-HT₇ receptors reduces nerve injury-induced mechanical and thermal hypersensitivity. *Pain*, 149(3), 483-494.
- Bridges, D., Thompson, S.W.N., Rice, A.S.C. (2001). Mechanisms of neuropathic pain. *Br. J. Anaesth.*, 87(1), 12-26.
- Cai, H., Scott, E., Kholghi, A., Andreadi, C., Rufini, A., Karmokar, A., Britton, R.G., Greaves, P., James, M., Walsh, J., West, K., Miller, A., Hemingway, D., Steward, W.P., Brown, K. (2015). Cancer chemoprevention: Evidence of a nonlinear dose response for the protective effects of resveratrol in humans and mice. *Sci. Transl. Med.*, 7(298), 298ra117-298ra117.
- Caraci, F., Merlo, S., Drago, F., Caruso, G., Parenti, C., Sortino, M.A. (2019). Rescue of noradrenergic system as a novel pharmacological strategy in the treatment of chronic pain: focus on microglia activation. *Front. Pharmacol.*, 10, 1024.
- Carballo-Villalobos, A. I., González-Trujano, M.E., Pellicer, F., Alvarado-Vásquez, N., López-Muñoz, F.J. (2018). Central and peripheral anti-hyperalgesic effects of diosmin in a neuropathic pain model in rats. *Biomed. Pharmacother.*, 97, 310-320.
- Cassidy, A., Minihane, A.M. (2017). The role of metabolism (and the microbiome) in defining the clinical efficacy of dietary flavonoids. *Am. J. Clin. Nutr.*, 105, 10–22.
- Cavalli, E., Mammana, S., Nicoletti, F., Bramanti, P., Mazzon, E. (2019). The neuropathic pain: an overview of the current treatment and future therapeutic approaches. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, 33, 1–10.

- Cervantes-Durán, C., Vidal-Cantú, G.C., Godínez-Chaparro, B., Granados-Soto, V. (2016). Role of spinal 5-HT 2 receptors subtypes in formalin-induced long-lasting hypersensitivity. *Pharmacol. Rep.*, 68(2), 434-442.
- Challa, S.R. (2015). Surgical animal models of neuropathic pain: Pros and Cons. *Int. J. Neurosci.*, 125(3), 170-174.
- Chandraker, S.K., Lal, M., Dhruve, P., Singh, R.P., Shukla, R. (2020). Cytotoxic, Antimitotic, DNA binding, Photocatalytic, H₂O₂ sensing, and Antioxidant properties of biofabricated silver nanoparticles using leaf extract of *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken. *Front. Mol. Biosci.*, 7, 593040.
- Chandrasekaran, A.R. (2021). Nuclease resistance of DNA nanostructures. *Nat. Rev. Chem.*, 5, 225–239.
- Chen, Z.Y., Liang, K., Qiu, R.X. (2010). Targeted gene delivery in tumor xenografts by the combination of ultrasound-targeted microbubble destruction and polyethylenimine to inhibit survivin gene expression and induce apoptosis. *J. Experim.Clin. Cancer Res.*, 29(152), 1-9.
- Cherng, C.H., Lee, K.C., Chien, C.C., Chou, K.Y., Cheng, Y.C., Hsin, S.T., Lee, S.O., Chen, C.H., Tsai, R.Y., Wong, C.S. (2014). Baicalin ameliorates neuropathic pain by suppressing HDAC1 expression in the spinal cord of spinal nerve ligation rats. *J. Formos. Med. Assoc.*, 113(8), 513-520.
- Choi, C., Nam, J.P., and Nah, J.W. (2016). Application of chitosan and chitosan derivatives as biomaterials. *J. Ind. Eng. Chem.*, 33, 1-10.choi
- Clayton, K.N., Salameh, J.W., Wereley, S.T., Kinzer-Ursem, T.L. (2016). Physical characterization of nanoparticle size and surface modification using particle scattering diffusometry. *BMF.*, 10(5), 054107.
- Colloca, L., Ludman, T., Bouhassira, D., Baron, R., Dickenson, A.H., Yarnitsky, D., Freeman, R., Truini, A., Attal, N., Finnerup, N.B., Eccleston, C., Kalso, E., Bennett, D.L., Dworkin, R.H., Raja, S.N. (2017). Neuropathic pain. *Nat. Rev. Dis. Primers*, 3(1), 1-19.

- Cortes-Altamirano, J.L., Olmos-Hernandez, A., Jaime, H.B., Carrillo-Mora, P., Bandala, C., Reyes-Long, S., Alfaro-Rodríguez, A. (2018). 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃ and 5-HT₇ receptors and their role in the modulation of pain response in the central nervous system. *Curr. Neuropharmacol.*, 16(2), 210-221.
- Costa, E.C., Menezes, P.M.N., de Almeida, R.L., Silva, F.S., de Araújo Ribeiro, L.A., da Silva, J.A., Nunes, X.P. (2020). Inclusion of vitexin in β -cyclodextrin: preparation, characterization and expectorant/antitussive activities. *Heliyon*, 6(12), e05461.
- Çalışkan, B. (2019). *Venetoklaks ve siRNA Yüklü Albümin Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi ve Değerlendirilmesi*. Yüksek lisans Tezi. Eskişehir: Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., Mozafari, M.R. (2018). Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics*, 10(2), 57.
- de Oliveira, R., de Oliveira, R.C., Falconi-Sobrinho, L.L., da Silva Soares Jr, R., Coimbra, N.C. (2017). 5-Hydroxytryptamine_{2A/2C} receptors of nucleus raphe magnus and gigantocellularis/paragigantocellularis pars α reticular nuclei modulate the unconditioned fear-induced antinociception evoked by electrical stimulation of deep layers of the superior colliculus and dorsal periaqueductal grey matter. *Behav. Brain Res.*, 316, 294-304.
- Deshmukh, A.S. (2014). Solid Lipid Nanoparticles. *Res. J. Pharm. Dos. Forms Technol.*, 6(4), 282.
- Dincer, S., Türk, M. ve Pişkin, E. (2005). Intelligent polymers as nonviral vectors. *Gene Ther.*, 12(1), S139-S145.
- D'Mello, R. and Dickenson, A.H. (2008). Spinal cord mechanisms of pain. *Br. J. Anaesth.*, 101(1), 8-16.
- Dobrzynska, M. Napierala, M. and Florek, E. (2020). Flavonoid Nanoparticles: A Promising Approach for Cancer Therapy. *Biomolecules*, 10, 1 268.
- Dong, L.Y., Li, S., Zhen, Y.L., Wang, Y.N., Shao, X., Luo, Z.G. (2013). Cardioprotection of vitexin on myocardial ischemia/reperfusion injury in rat via regulating

- inflammatory cytokines and MAPK pathway. *Am. J. Chinese Med.*, 41(06), 1251-1266.
- Duan, B., Cheng, L., Bourane, S., Britz, O., Padilla, C., Garcia-Campmany, L., Krashes, M., Knowlton, W., Wang, Y., Goulding, M., Ma, Q. (2014). Identification of spinal circuits transmitting and gating mechanical pain. *Cell*, 159(6), 1417-1432.
- Eide, P.K. (2000). Wind-up and the NMDA receptor complex from a clinical perspective. *Eur. J. Pain*, 4(1), 5-15.
- Eisenberg, E., River, Y., Shifrin, A., Krivoy, N. (2007). Antiepileptic drugs in the treatment of neuropathic pain. *Drugs*, 67(9), 1265-1289.
- Elsoud, M.M.A. and El Kady, E.M. (2019). Current trends in fungal biosynthesis of chitin and chitosan. *Bull. Natl. Res. Cent.*, 43(1), 59.
- Erbas, T., Ertas, M., Yucel, A., Keskinaslan, A., Senocak, M., TURNEP Study Group. (2011). Prevalence of peripheral neuropathy and painful peripheral neuropathy in Turkish diabetic patients. *J. Clin. Neurophysiol.*, 28(1), 51-55.
- Farquhar-Smith, W.P. (2008). Anatomy, physiology and pharmacology of pain. *Anaesth. Intensive Care Med.*, 9(1), 3-7.
- Fatma, S., Talegaonkar, S., Iqbal, Z., Panda, A.K., Negi, L M., Goswami, D G., Tariq, M. (2016). Novel flavonoid-based biodegradable nanoparticles for effective oral delivery of etoposide by P-glycoprotein modulation: an in vitro, ex vivo and in vivo investigations. *Drug Deliv.*, 23(2), 500-511.
- Feng, X., Zhang, F., Dong, R., Li, W., Liu, J., Zhao, X., Xue, Q., Yu, B., Xu, J. (2009). Intrathecal administration of clonidine attenuates spinal neuroimmune activation in a rat model of neuropathic pain with existing hyperalgesia. *Eur. J. Pharmacol.*, 614(1-3), 38-43.
- Fürst, S. (1999). Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. *Brain Res. Bull.*, 48, 129-141.
- Gaitan, E., Lindsay, R.H., Reichert, R.D., Ingbar, S.H., Cooksey, R.C., Legan, J., Meydrech, E.F., Kubota, K. (1989). Antithyroid and goitrogenic effects of millet: role of C-glycosylflavones. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 68(4), 707-714.

- Gallily, R., Yekhtin, Z. and Hanuš, L.O. (2015). Overcoming the bell-shaped dose-response of cannabidiol by using cannabis extract enriched in cannabidiol. *Pharmacol. & Pharm.*, 6(02), 75.
- Galluzzi, K. E. (2007). Managing neuropathic pain. *J. Am. Osteopath. Assoc.*, 107(6), ES39-ES48.
- Ganesan, K. and Xu, B. (2017). Molecular targets of vitexin and isovitexin in cancer therapy: a critical review. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1401(1), 102-113.
- Gontijo, V.S., dos Santos, M.H. and Viegas, C. (2017). Biological and Chemical Aspects of Natural Biflavonoids from Plants: A Brief Review. *Mini Rev. Med. Chem.*, 17, 834-862.
- Gordillo-Galeano, A. and Mora-Huertas, C.E. (2018). Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: A review emphasizing on particle structure and drug release. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 133, 285-308.
- Gu, C., Liu, Z., Yuan, X., Li, W., Zu, Y., Fu, Y. (2017). Preparation of Vitexin Nanoparticles by Combining the Antisolvent Precipitation and High Pressure Homogenization Approaches Followed by Lyophilization for Dissolution Rate Enhancement. *Molecules*, 22(11), 2038.
- Guindon, J. ve Hohmann, A.G. (2009). Pain: Mechanisms and Measurement. G.G. Beentson, J.T. Cacioppa (Eds.), *Handbook of Neuroscience for the Behavioral Sciences (vol.1)* içinde (s.635-658). United States of America: John Wiley & Sons, Inc.
- Hamed, I., Özogul, F. and Regenstein, J. M. (2016). Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitooligosaccharides): A review. *Trends Food Sci. Technol.*, 48, 40-50.
- Harden, R.N. (2005). Chronic neuropathic pain: mechanisms, diagnosis, and treatment. *The Neurologist*, 11(2), 111-122.
- He, M., Min, J.W., Kong, W.L., He, X.H., Li, J.X., Peng, B.W. (2016). A review on the pharmacological effects of vitexin and isovitexin. *Fitoterapia*, 115, 74-85.
- Herrero, J.F., Laird, J.M., Lopez-Garcia, J.A. (2000). Wind-up of spinal cord neurones and pain sensation: much ado about something?. *Prog. Neurobiol.*, 61(2), 169-203.

- Holford, N.H. and Sheiner, L.B. (1981). Understanding the dose-effect relationship. *Clin. Pharmacokinet.*, 6(6), 429-453.
- Honda, M., Uchida, K., Tanabe, M., Ono, H. (2006). Fluvoxamine, a selective serotonin reuptake inhibitor, exerts its antiallodynic effects on neuropathic pain in mice via 5-HT_{2A/2C} receptors. *Neuropharmacology*, 51(4), 866-872.
- Huang, R., Mendis, E., Rajapakse, N., Kim, S.K. (2006). Strong electronic charge as an important factor for anticancer activity of chitooligosaccharides (COS). *Life Sci.*, 78(20), 2399-2408.
- Huang, R., Mendis, E., Rajapakse, N., Kim, S.K. (2006). Strong electronic charge as an important factor for anticancer activity of chitooligosaccharides (COS). *Life Sci.*, 78(20), 2399-2408.
- Hunter, A.C. (2006). Molecular hurdles in polyfectin design and mechanistic background to polycation induced cytotoxicity, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, 58(14), 1523–1531.
- Jafari, H., Bernaerts, K.V., Dodi, G., Shavandi, A. (2020). Chitooligosaccharides for wound healing biomaterials engineering. *Mater. Sci. Eng., C*, 111266.
- Jaggi, A.S., Jain, V. and Singh, N. (2011). Animal models of neuropathic pain. *Fund. Clin. Pharmacol.*, 25(1), 1-28.
- Jain, S., Hirst, D.G., O'sullivan, J.M. (2012). Gold nanoparticles as novel agents for cancer therapy. *Br. J. Radiol.*, 85(1010), 101-113.
- Jiao, X., Wang, R.Y.H., Feng, Z., Alter, H.J., Shih, J.W.K. (2003). Modulation of cellular immune response against hepatitis C virus nonstructural protein 3 by cationic liposome encapsulated DNA immunization. *Hepatology*, 37(2), 452-460.
- Kahraman, A., Serteser, M., Köken, T. (2002). Flavonoidler. *Kocatepe Tıp Derg.*, 3(1), 1-8.
- Kalepu S, Manthina M and Padavala V. (2013). Oral lipid-based drug delivery systems an overview. *Acta Pharm. Sin.*, 3, 361–372.
- Kandhare, A.D., Raygude, K.S., Ghosh, P., Ghule, A.E., Bodhankar, S.L. (2012). Neuroprotective effect of naringin by modulation of endogenous biomarkers in streptozotocin induced painful diabetic neuropathy. *Fitoterapia*, 83(4), 650-659.

- Karabin, M., Hudcova, T., Jelinek, L., Dostalek, P. (2015). Biotransformations and biological activities of hop flavonoids. *Biotechnol. Adv.*, 33(6), 1063-1090.
- Kato, H. (2012). Chapter 8: Size Determination of NPs by Dynamic Light Scattering, in *Nanomaterials: Processing and Characterization with Lasers*. S.C. Singh, H. Zeng, C. Guo and W. Cai, Wiley-VCH (Ed), John Wiley & Sons.
- Kayser, V., Elfassi, I.E., Aubel, B., Melfort, M., Julius, D., Gingrich, J.A., Hamon, M., Bourgoign, S. (2007). Mechanical, thermal and formalin-induced nociception is differentially altered in 5-HT1A^{-/-}, 5-HT1B^{-/-}, 5-HT2A^{-/-}, 5-HT3A^{-/-} and 5-HTT^{-/-} knock-out male mice. *Pain*, 130(3), 235-248.
- Khan, H., Ullah, H., Martorell, M., Valdes, S.E., Belwal, T., Tejada, S., Sureda, A., Kamal, M.A. (2019). Flavonoids nanoparticles in cancer: Treatment, prevention and clinical prospects. *Semin. Cancer Biol.*, 57, 72–78
- Khoshneviszadeh, R., Bazzaz, B.S.F, Housaindokht, M.R., Ebrahim-Habibi, A., Rajabi, O. (2016). A comparison of explanation methods of encapsulation efficacy of hydroquinone in a liposomal system. *J. Paramed. Sci.*, 7(2), 23-28.
- Kidibule, P.E., Costa, J., Atrei, A., Plou, F.J., Fernandez-Lobato, M., Pogni, R. (2021). Production and characterization of chitooligosaccharides by the fungal chitinase Chit42 immobilized on magnetic nanoparticles and chitosan beads: selectivity, specificity and improved operational utility. *RSC Adv.*, 11(10), 5529-5536.
- Kim, J., Lee, I., Seo, J., Jung, M., Kim, Y., Yim, N., Bae, K. (2010). Vitexin, orientin and other flavonoids from *Spirodela polyrhiza* inhibit adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Phytother. Res.*, 24(10), 1543-1548.
- Kim, W.J., and Kim, S.W. (2009). Efficient siRNA delivery with non-viral polymeric vehicles. *Pharm. Res.*, 26(3), 657-666.
- Kumar, S. ve Pandey, A.K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *TSWJ*, 2013, 1-17.
- Kundu, P.P. and Sharma, V. (2008). Synthetic polymeric vectors in gene therapy. *Curr. Opin. Solid State Mat. Sci.*, 12(5-6), 89-102.

- Kusumoto, K. I. and Ishikawa, T. (2010). Didodecyldimethylammonium bromide (DDAB) induces caspase-mediated apoptosis in human leukemia HL-60 cells. *J. Control. Release*, 147(2), 246-252.
- Lam, J.K., Liang, W., Chan, H.K., Pulmonary delivery of therapeutic siRNA. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 64(1), 1-15 (2012).
- Lamont, L.A., Tranquilli, W.J., Grimm, K.A. (2000). Physiology of pain. *Vet. Clin. Small Anim. Pract.*, 30(4), 703-728.,
- Lara-Velazquez, M. A., Al-kharboosh, R. M., Norton, E. S., Ramirez-Loera, C., Freeman, W. D., Guerrero-Cazares, H., Sarabia Estrada, R. (2020). Chitosan-based non-viral gene and drug delivery systems for brain cancer. *Front. Neurol.*, 11, 740.
- Lee, P.Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y., Kim, Y.H. (2012). Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *JoVE*, 62, e3923.
- Lingayat, V.J., Zarekar, N. S., and Shendge, R.S. (2017). Solid lipid nanoparticles: a review. *Nanosci. Nanotechnol. Res.*, 2, 67-72.
- Llorca-Torrallba, M., Borges, G., Neto, F., Mico, J.A., Berrocoso, E. (2016). Noradrenergic locus coeruleus pathways in pain modulation. *Neuroscience*, 338, 93-113.
- López-Cebral, R., Martín-Pastor, M., Seijo, B., Sanchez, A. (2014). Progress in the characterization of bio-functionalized nanoparticles using NMR methods and their applications as MRI contrast agents. *Prog. Nuc. Mag. Res. Sp.*, 79, 1-13.
- Luo, J., Chen, M., Liu, Y., Xie, H., Yuan, J., Zhou, Y., Ding, J., Deng, Z., Li, J. (2018). Nature-derived lignan compound VB-1 exerts hair growth-promoting effects by augmenting Wnt/ β -catenin signaling in human dermal papilla cells. *PeerJ*, 6, e4737.
- Mali, S. (2013). Delivery systems for gene therapy. *Indian j. Hum. Genet.*, 19(1), 3.
- Mansouri, S., Lavigne, P., Corsi, K., Benderdour, M., Beaumont, E., Fernandes, J.C. (2004). Chitosan-DNA nanoparticles as non-viral vectors in gene therapy: strategies to improve transfection efficacy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 57(1), 1-8.

- Marangoz, Ö. ve Yavuz, O. (2020). Nano-ilaç taşıma sistemleri ve toksikolojik değerlendirmeleri. *Turk Hij. Den. Biyol. Derg.*, 77(4), 509-526.
- Marchand, S. (2008). The physiology of pain mechanisms: from the periphery to the brain. *Rheum. Dis. Clin. N. Am.*, 34(2), 285-309.
- McLean, M.J. (2001). Pain: current understanding of assessment, management, and treatments. *National Pharmaceutical Council and the Joint Commission for the Accreditation of Healthcare Organizations*, VA, USA, b44.
- Meacham, K., Shepherd, A., Mohapatra, D.P., Haroutounian, S. (2017). Neuropathic pain: central vs. peripheral mechanisms. *Curr. Pain Headache Rep.*, 21(6), 28.
- Mehnert W and Mäder K. (2011). Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 47, 165–196.
- Meotti, F.C., Missau, F.C., Ferreira, J., Pizzolatti, M.G., Mizuzaki, C., Nogueira, C.W., Santos, A.R. (2006). Anti-allodynic property of flavonoid myricitrin in models of persistent inflammatory and neuropathic pain in mice. *Biochem. Pharmacol.*, 72(12), 1707-1713.
- Merskey, H., Bogduk, N. (1994). Pain terms, a current list with definitions and notes on usage, H. Merskey, N. Bogduk (Eds.), *Classification of chronic pain, IASP task force on taxonomy* içinde (s. 209-214). Seattle: WA: IASP Press.
- Meyer, H.P. (2008). Neuropathic pain-Current concepts. *S. Afr. Fam. Pract.*, 50(3), 40-49.
- Millan, M.J. (1999). The induction of pain: an integrative review. *Prog. Neurobiol.*, 57(1), 1-164.
- Mizuarai, S., Ono, K. I., You, J., Kamihira, M., Iijima, S. (2001). Protamine-modified DDAB lipid vesicles promote gene transfer in the presence of serum. *J. Biochem.*, 129(1), 125-132.
- Moisset, X. and Lefaucheur, J.P. (2019). Non pharmacological treatment for neuropathic pain: Invasive and non-invasive cortical stimulation. *Rev. Neurol.*, 175(1-2), 51-58.

- Mourdikoudis, S., Pallares, R. M., Thanh, N. T. (2018). Characterization techniques for nanoparticles: comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties. *Nanoscale*, 10(27), 12871-12934.
- Muto, Y., Sakai, A., Sakamoto, A., Suzuki, H. (2012). Activation of NK1 receptors in the locus coeruleus induces analgesia through noradrenergic-mediated descending inhibition in a rat model of neuropathic pain. *Br. J. Pharmacol.*, 166(3), 1047-1057.
- Muxika, A., Etxabide, A., Uranga, J., Guerrero, P., De La Caba, K. (2017). Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications. *Int. J. Biol. Macromol.*, 105, 1358-1368.
- Najafi, H., Abolmaali, S. S., Owraangi, B., Ghasemi, Y., & Tamaddon, A. M. (2015). Serum resistant and enhanced transfection of plasmid DNA by PEG-stabilized polyplex nanoparticles of L-histidine substituted polyethyleneimine. *Macromol. Res.*, 23, 618–627.
- Nascimento Jr, E.B., Seniuk, J.G.T., Godin, A.M., Ferreira, W.C., Dutra, M.B., Oliveira, A.C.P., Bastos, L.F.S., Fiebich, B.L., Coelho, M.M. (2011). Peripheral 5-HT1B and 5-HT2A receptors mediate the nociceptive response induced by 5-hydroxytryptamine in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 99(4), 598-603.
- Nayerossadat, N., Maedeh, T., Ali, P.A. (2012). Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. *Adv. Biomed. Res.*, 1(2), 1-11.
- Nickel, F.T., Seifert, F., Lanz, S., Maihöfner, C. (2012). Mechanisms of neuropathic pain. *Eur. Neuropsychopharm.*, 22(2), 81-91.
- Nikfarjam, B.A., Hajiali, F., Adineh, M., Nassiri-Asl, M. (2017). Anti-inflammatory effects of quercetin and vitexin on activated human peripheral blood neutrophils- The effects of quercetin and vitexin on human neutrophils. *J. Pharmacopunct.*, 20(2), 127-131.
- Nishikawa, N. and Nomoto, M. (2017). Management of neuropathic pain. *J. Gen. Fam. Med.*, 18(2), 56-60.
- Obata, H. (2017). Analgesic mechanisms of antidepressants for neuropathic pain. *Int. J. Mol. Sci.*, 18(11), 2483.

- O'Connor, A.B. ve Dworkin, R.H. (2009). Treatment of neuropathic pain: an overview of recent guidelines. *Am. J. Med.*, 122(10), S22-S32.
- Olbrich, C., Bakowsky, U., Lehr, C.M., Müller, R.H., Kneue, C. (2001). Cationic solid-lipid nanoparticles can efficiently bind and transfect plasmid DNA. *J. Control. Release*, 77(3), 345–355.
- Ossipov, M.H., Morimura, K., Porreca, F. (2014). Descending pain modulation and chronification of pain. *Curr. Opi. Support. Palliat. Care*, 8(2), 143.
- Özkay, Ü.D. ve Can, Ö.D. (2013). Anti-nociceptive effect of vitexin mediated by the opioid system in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 109, 23-30.
- Öztürk, A.A. (2017). *Deksetoprofen Trometamol Yüklü Kontrollü Salım Gösteren Nanoboyutta İlaç Taşıyıcı Sistem Geliştirilmesi ve İn Vitro/İN Vivo Değerlendirilmesi*. Doktora tezi. Eskişehir: Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Öztürk, A.A. and Kıyan, H.T. (2020). Treatment of oxidative stress-induced pain and inflammation with dexketoprofen trometamol loaded different molecular weight chitosan nanoparticles: Formulation, characterization and anti-inflammatory activity by using in vivo HET-CAM assay. *Microvasc. Res.*, 128, 103961.
- Öztürk, A.A., Yenilmez, E., Özarda, M.G. (2019). Clarithromycin-loaded poly (lactic-co-glycolic acid)(PLGA) nanoparticles for oral administration: effect of polymer molecular weight and surface modification with chitosan on formulation, nanoparticle characterization and antibacterial effects. *Polymers*, 11(10), 1632.
- Pamukcu, A., Portakal, H.S. ve Eroğlu, E. Terapötik Moleküllerin Aktarımında Kullanılan Yeni Nesil Biyomalzemeler. *Erzincan Üniv. Fen Bilim. Enst. Derg.*, 11(3), 524-542.
- Paredes, S., Cantillo, S., Candido, K.D., Knezevic, N.N. (2019). An Association of serotonin with pain disorders and its modulation by estrogens. *Int. J. Mol. Sci.*, 20(22), 5729.
- Paredes, S., Cantillo, S., Candido, K.D., Knezevic, N.N. (2019). An Association of serotonin with pain disorders and its modulation by estrogens. *Inter. Jour. Mol. Sci.*, 20(22), 5729.

- Pasero, C. (2004). Pathophysiology of neuropathic pain. *Pain Management Nursing*, 5, 3-8.
- Patel, N.B. (2010). Physiology of pain. A. Kopf ve N.B. Patel. (Ed.), *Guide to pain management in low-resource settings* içinde (s.13-17). SEATTLE.
- Peng, Y., Gan, R., Li, H., Yang, M., McClements, D. J., Gao, R., Sun, Q. (2020). Absorption, metabolism, and bioactivity of vitexin: recent advances in understanding the efficacy of an important nutraceutical. *Criti. Rev. Food Sci. Nutr.*, 1-16.
- Pereira, E.D., Cerruti, R., Fernandes, E., Peña, L., Saez, V., Pinto, J.C., Souza, F.G.D. (2016). Influence of PLGA and PLGA-PEG on the dissolution profile of oxaliplatin. *Polímeros*, 26, 137-143.
- Perinelli, D.R., Cespi, M., Bonacucina, G., Palmieri, G.F. (2019). PEGylated polylactide (PLA) and poly (lactic-co-glycolic acid)(PLGA) copolymers for the design of drug delivery systems. *J. Pharm. Investig.*, 49(4), 443-458.
- Pertovaara, A. (2006). Noradrenergic pain modulation. *Prog. Neurobiol.*, 80(2), 53-83.
- Pertovaara, A. (2013). The noradrenergic pain regulation system: a potential target for pain therapy. *Eur. J. Pharmacol.*, 716(1-3), 2-7.
- Procházková, D., Boušová, I. And Wilhelmová, N. (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, 82(4), 513-523.
- Puhl, A.C., Fagundes, M., Dos Santos, K.C., Polikarpov, I., Graças, M.F.D., Dasilva, F., Forim, M. R. (2011). Preparation and characterization of polymeric nanoparticles loaded with the flavonoid luteolin, by using factorial design. *Int. J. Drug Deliv.*, 3(4), 683.
- Pusan, S. and Abdi, S. (2018). Treatment of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: systematic review and recommendations. *Pain Physician*, 21, 571-592.
- Quintans, J.S., Antonioli, Â.R., Almeida, J.R., Santana-Filho, V.J., Quintans-Júnior, L. J. (2014). Natural products evaluated in neuropathic pain models-a systematic review. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 114(6), 442-450.
- Raghu, M.G. ve Agrawal, P. (2016). Evaluation of In-Vitro and In-Vivo Anti-Inflammatory Activities of Apigenin and Vitexin. *J. Pharm. Sci. Res.*, 8(12), 1349.

- Rahman, M. and Kumar, V. (2019). Fabrication of solid lipid nanoparticles containing vitexin protects dopaminergic neurons against 6-hydroxydopamine induced Parkinson's disease model via altered the genetic backgrounds. *J. Neurol. Sci.*, 405, 248.
- Rahman, W., Bannister, K., Bee, L.A., Dickenson, A.H. (2011). A pronociceptive role for the 5-HT₂ receptor on spinal nociceptive transmission: an in vivo electrophysiological study in the rat. *Brain Res.*, 1382, 29-36.
- Ramamoorthi, M. and Narvekar, A. (2015). Non viral vectors in gene therapy-an overview. *J. Clin. Diagn. Res*, 9(1), GE01.
- Ribeiro, A.P.C., Anbu, S., Alegria, E.C.B.A., Fernandes, A.R., Baptista, P.V., Mendes, R., Pombeiro, A.J.L. (2018). Evaluation of cell toxicity and DNA and protein binding of green synthesized silver nanoparticles. *Biomed. Pharmacother.*, 101, 137-144.
- Ringkamp, M., Dougherty, P.M., Raja, S.N. (2018). Anatomy and physiology of the pain signaling process. H.T. Benzon, S.N. Raja, S.S. Liu, S.M. Fishman, S.P. Cohen (Eds), *Essentials of pain medicine* içinde (s. 3-10). Elsevier.
- Riss T.L., Moravec R.A., Niles A.L., Duellman S., Benink H.A., Worzella T.J., and Minor, L. (2016). In vitro cell based assays: cell viability assays, In: Assay Guidance Manual. Sittampalam, G.S., Coussens, N.P. Brimacombe K. et al (Eds.) *Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences*. Amerika: Bethesda.
- Roy, P., Parveen, S., Ghosh, P., Ghatak, K., Dasgupta, S. (2019). Flavonoid loaded nanoparticles as an effective measure to combat oxidative stress in Ribonuclease A. *Biochimie*, 162, 185-197.
- Santos-Carballal, B., Fernández Fernández, E. ve Goycoolea, F. M. (2018). Chitosan in non-viral gene delivery: Role of structure, characterization methods, and insights in cancer and rare diseases therapies. *Polymers*, 10(4), 444.
- Santos-Moriano, P., Kidibule, P., Míguez, N., Fernandez-Arrojo, L., Ballesteros, A.O., Fernández-Lobato, M., Plou, F.J. (2019). Tailored enzymatic synthesis of

- chitoooligosaccharides with different deacetylation degrees and their anti-inflammatory activity. *Catalysts*, 9(5), 405.
- Scalia, S., Haghi, M., Losi, V., Trotta, V., Young, P. M., Traini, D. (2013). Quercetin solid lipid microparticles: a flavonoid for inhalation lung delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 49(2), 278–285.
- Serafini, M., Peluso, I. and Raguzzini, A. (2010). Flavonoids as anti-inflammatory agents. *Proc. Nutr. Soc.*, 69, 273–278.
- Serpell, M. (2008). *Handbook of pain management*. London: Current Medicine Group.
- Sharma, M., Yadav, S., Ganesh, N., Srivastava, M. M., Srivastava, S. (2019). Biofabrication and characterization of flavonoid-loaded Ag, Au, Au-Ag bimetallic nanoparticles using seed extract of the plant *Madhuca longifolia* for the enhancement in wound healing bio-efficacy. *Prog. Biomat.*, 8(1), 51–63.
- Sierra, J.A., Vanoni, C.R., Tumelero, M A., Cid, C.C.P., Faccio, R., Franceschini, D.F., Pasa, A.A. (2016). Biogenic approaches using citrus extracts for the synthesis of metal nanoparticles: the role of flavonoids in gold reduction and stabilization. *New J. Chem.*, 40(2), 1420-1429.
- Sindrup, S.H., Otto, M., Finnerup, N.B., Jensen, T.S. (2005). Antidepressants in the treatment of neuropathic pain. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 96(6), 399-409.
- Sivathanu, S.B. ve Shivapriya, G. (2021). Formulation, Characterization and In vitro Drug Delivery of Vitexin Loaded Liposomes. *Int. J. Pharm. Sci. Nanotechnol.*, 14(2), 5364-5371.
- Smith, B.H. and Torrance, N. (2012). Epidemiology of neuropathic pain and its impact on quality of life. *Curr. Pain Headache Rep.*, 16(3), 191-198.
- Sommer, C. (2010). Serotonin in pain and pain control. C.P. Müller ve B.L. Jacobs (Ed), *Handbook of behavioral neuroscience* içinde (s. 457-471). Elsevier.
- Steeds, C.E. (2009). The anatomy and physiology of pain. *Surgery (Oxford)*, 27(12), 507-511.
- Stevenson, G. W., Cormier, J., Mercer, H., Adams, C., Dunbar, C., Negus, S. S., Bilsky, E. J. (2009). Targeting pain-depressed behaviors in preclinical assays of pain and

- analgesia: drug effects on acetic acid-depressed locomotor activity in ICR mice. *Life sciences*, 85(7-8), 309-315.
- Stockert, J.C., Blázquez-Castro, A., Canete, M., Horobin, R.W., Villanueva, A., MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochem.*, 114(8), 785-796.
- Sumbul, E., Arslan, R. Bektas N. (2016). The Attenuation Effects Of Apigenin, Vitexin, Hyperoside And Quercetin On Carrageenan-Induced Mice Tail Thrombosis Model. *World J. Pharm. Sci.*, 4(6): 308-313.
- Şenel B. (2012). siRNA Taşıyıcı Sistem Geliştirme ve Değerlendirme Çalışmaları, Doktora Tezi, Eskişehir: Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Şenel, B., Büyükköroğlu, G. And Yazan, Y. (2015). Solid lipid and chitosan particulate systems for delivery of siRNA. *Pharmazie*, 70(11), 698-705.
- Tan, M.E., He, C.H., Jiang, W., Zeng, C., Yu, N., Huang, W., Xing, J. G. (2017). Development of solid lipid nanoparticles containing total flavonoid extract from *Dracocephalum moldavica* L. and their therapeutic effect against myocardial ischemia–reperfusion injury in rats. *Int. J. Nanomedicine*, 12, 3253-3265.
- Tao, Z.Y., Wang, P.X., Wei, S.Q., Traub, R.J., Li, J.F., Cao, D.Y. (2019). The Role of Descending Pain Modulation in Chronic Primary Pain: Potential Application of Drugs Targeting Serotonergic System. *Neural Plast.*, 2019.
- Terao, T., Ishii, N., Hirakawa, H., Aoshima, E. (2020). Is the bell-shaped dose-response curve of the selective serotonin reuptake inhibitor due to 5-HT_{1A} auto-receptors? *Med. Hypotheses*, 140, 109681.
- Thilakarathna, S., Rupasinghe, H. (2013). Flavonoid Bioavailability and Attempts for Bioavailability Enhancement. *Nutrients*, 5, 3367–3387.
- Tuncer, B., Mansuroğlu, B. ve Derman, S. (2016). Antioxidant Effect Of Catechin Loaded Polymeric Nanoparticle. *Sigma: Journal of Engineering & Natural Sciences/Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi*, 34(3).
- Uchida, M., Li, X.W., Mertens, P. and Alpar, H.O. (2009). Transfection by particle bombardment: delivery of plasmid DNA into mammalian cells using gene gun. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-General Subjects*, 1790 (8), 754-764.

- Uddin, S.N. (2007). Cationic lipids used in non-viral gene delivery systems. *BMB Rev.*, 2 (3), 58-67.
- Üner, M. (2006). Preparation, characterization and physico-chemical properties of solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC): their benefits as colloidal drug carrier systems. *Pharmazie.*, 61(5), 375-386.
- Van Meerloo, J., Kaspers, G.J. and Cloos, J. (2011). Cell sensitivity assays: the MTT assay. Cree I.A. (Ed.), *Cancer Cell Culture*. (s. 237-245). New York: Humana Press
- Van Steenwinckel, J., Noghero, A., Thibault, K., Brisorgueil, M.J., Fischer, J., Conrath, M. (2009). The 5-HT_{2A} receptor is mainly expressed in nociceptive sensory neurons in rat lumbar dorsal root ganglia. *Neuroscience*, 161(3), 838-846.
- Vega-Loza, A., Van, C., M Moreno, A., Aleman, F. (2020). Gene therapies to reduce chronic pain: are we there yet?. *Pain Manag.*, 10(4), 209–212.
- Venturini, C.L., Macho, A., Arunachalam, K., de Almeida, D.A.T., Rosa, S.I.G., Pavan, E., Balogun, S.A, Damazo S.A., de Oliveira Martins, D.T. (2018). Vitexin inhibits inflammation in murine ovalbumin-induced allergic asthma. *Biomed. Pharmacother.*, 97, 143-151.
- Verri Jr, W.A., Vicentini, F.T., Baracat, M.M., Georgetti, S.R., Cardoso, R.D., Cunha, T. M., Fonseca, M.J.V., Casagrande, R. (2012). A. Rahman (Ed), Flavonoids as anti-inflammatory and analgesic drugs: mechanisms of action and perspectives in the development of pharmaceutical forms. *Studies in Natural Products Chemistry içinde* (s. 297-330). Elsevier.
- Viguié, F., Michot, B., Hamon, M., Bourgoin, S. (2013). Multiple roles of serotonin in pain control mechanisms—implications of 5-HT₇ and other 5-HT receptor types. *Eur. J. Pharmacol.*, 716(1-3), 8-16.
- Walther, W. and Stein, U. (2000). Viral vectors for gene transfer. *Drugs*, 60(2), 249-271.
- Wang, L.X. ve Wang, Z.J. (2003). Animal and cellular models of chronic pain. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 55(8), 949-965.
- Woolf, C.J. (1993). The pathophysiology of peripheral neuropathic pain abnormal peripheral input and abnormal central processing. *Acta. Neurochir.*, 58, 125-130.

- Xia, W., Liu, P., Zhang, J., Chen, J. (2011). Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides. *Food Hydrocol.*, 25(2), 170-179.
- Xu, W., Zhu, X., Zhan, G., Sheng, L., Chen, Y. (2020). Vitexin alleviates neuropathic pain in a mouse chronic constriction injury model by inactivation of NF- κ B. *Trop. J. Pharm. Res.*, 19(5), 989-994.
- Yadav, N., Khatak, S., and Sara, U.S. (2013). Solid lipid nanoparticles-a review. *Int. J. Appl. Pharm.*, 5(2), 8-18.
- Yang, M., Yang, T., Jia, J., Lu, T., Wang, H., Yan, X., Wang, L., Yu, L., Zhao, Y. (2018). Fabrication and characterization of DDAB/PLA-alginate composite microcapsules as single-shot vaccine. *RSC Advances*, 8(24), 13612-13624.
- You, J., Kamihira, M. ve Iijima, S. (1999). Enhancement of transfection efficiency by protamine in DDAB lipid vesicle-mediated gene transfer. *J. Biochem.*, 125(6), 1160-1167.
- Yücel, A. ve Çimen, A. (2005). Nöropatik ağrı: Mekanizmalar, tanı ve tedavi. *Ağrı Dergisi*, 17(1), 5-13.
- Zhang, S., Guo, C., Chen, Z., Zhang, P., Li, J., Li, Y. (2017). Vitexin alleviates ox-LDL-mediated endothelial injury by inducing autophagy via AMPK signaling activation. *Mol. Immunol.*, 85, 214-221.
- Zhou, J., Hu, H., Long, J., Wan, F., Li, L., Zhang, S., Chen, Y. (2013). Vitexin 6, a novel lignan, induces autophagy and apoptosis by activating the Jun N-terminal kinase pathway. *Anticancer Drugs*, 24(9), 928-936.
- Zhou, J., Liu, X., Yuan, F., Deng, B., Yu, X. (2020). Biocatalysis of heterogenously-expressed chitosanase for the preparation of desirable chitosan oligosaccharides applied against phytopathogenic fungi. *ACS Sustain. Chem. Eng.*, 8(12), 4781-4791.
- Zhu, Q., Mao, L.N., Liu, C.P., Sun, Y.H., Jiang, B., Zhang, W., Li, J.X. (2016). Antinociceptive effects of vitexin in a mouse model of postoperative pain. *Sci. Rep.*, 6, 19266.

Zimmermann, M. (2001). Pathobiology of neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.*, 429(1-3), 23-37.

http-1: <https://blog.addgene.org/plasmids-101-green-fluorescent-protein-gfp> (Eriřim tarihi: 13.06.2021)

http-2 <http://nhiso.com/wp-content/uploads/2018/05/ISO-10993-5-2009.pdf> (Eriřim tarihi: 11.05.2021)

