T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Selma SÜER GÖKMEN

İSOPROTERENOL İLE MİYOKART İNFARKTÜSÜ OLUŞTURULAN RATLARDA LİPOZOMAL PİPERİNİN OKSİDATİF STRESE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

YAREN GÜNİZ ULUÇAM

(Referans no: 10481207)

EDİRNE-2024

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Selma SÜER GÖKMEN

İSOPROTERENOL İLE MİYOKART İNFARKTÜSÜ OLUŞTURULAN RATLARDA LİPOZOMAL PİPERİNİN OKSİDATİF STRESE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

YAREN GÜNİZ ULUÇAM

Destekleyen Kurum: TÜBAP-2022/213

EDİRNE-2024

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI ..... **İ**
ETİK BEYAN ..... **İİ**
İTHAF ..... **İİİ**
TEŞEKKÜR ..... **İV**
SİMGE VE KISALTMALAR ..... **V**
ÖZET ..... **Vİ**
ABSTRACT ..... **Vİİ**
1. GİRİŞ VE AMAÇ **1**
2. GENEL BİLGİLER **3**
2.1. Akut Miyokart İnfarktüsü **3**
2.2. Kardiyak Belirteçler **6**
2.3. Oksidatif Stres **7**
2.4. Deneysel Akut Miyokart İnfarktüsü **9**
2.5. Piperin **11**
2.6. Nano İlaç Taşıyıcı Sistemler **15**
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER **19**
3.1. Lipozomal Piperin Sentezi **22**
3.2. Lipozomal Piperin Karakterizasyon Çalışmaları **28**
3.3. Deney Hayvanı Protokolü **30**
3.4. Kan ve Doku Örneklerinin Alınması **31**
3.5. Kardiyak Troponin I Analizi **32**
3.6. Total Oksidan Durum (TOS) Analizi **33**
3.7. Total Antioksidan Durum (TAS) Analizi **34**
3.8. Oksidatif Stres İndeksinin Hesaplanması **35**
3.9. İstatistiksel Değerlendirme **36**
4. BULGULAR **37**
4.1. Lipozomal Piperin Karakterizasyon Çalışma Sonuçları **37**
4.2. Biyokimyasal Analiz Sonuçları **45**
4.3. Histopatolojik Bulgular **49**
5. TARTIŞMA **52**
KAYNAKLAR **59**
EKLER ..... **I**

EK 1: ..... **I**
ÖZGEÇMİŞ ..... **II**
BENZERLİK RAPORU ..... **III**

ONAY SAYFASI

ETİK BEYAN

"İsoproterenol ile Miyokart İnfarktüsü Oluşturulan Ratlarda Lipozomal Piperinin Oksidatif Strese Etkisinin İncelenmesi" adlı bana ait olan tez çalışmamın bütün aşamalarında etik dışı davranışımın olmadığını, bütün verileri ve bilgileri akademik ve etik kurallar içerisinde elde ettiğimi, verilerde ve sonuçlarda herhangi bir tahrifat yapmadığımı, tezimin yazımında yapay zeka yazılımları kullanmadığımı, diğer kaynaklardan elde ettiğim bilgi ve yorumlara tezimde uygun şekilde kaynak gösterdiğimi ve kaynaklar bölümünde yer verdiğimi, patent ve telif haklarını ihlal edici herhangi bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Yaren Güniz ULUÇAM

İmza:

İTHAF

“Yüksek lisans tez çalışmamı hayatımın her anında, desteklerini üzerimden eksik etmeyen ve bana örnek olan babam Enis ULUÇAM, annem Gühergül ULUÇAM ve kardeşim Tolga ULUÇAM’a” ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince her konudaki bilgi ve tecrübesi ile akademik gelişimimde bana yol gösteren, öğrencisi olmaktan gurur duyduğum saygıdeğer danışman hocam Biyokimya AD öğretim üyesi Prof. Dr. Selma SÜER GÖKMEN'e, eğitim sürecim boyunca bana kattıkları akademik donanım için bölüm hocalarım Biyokimya AD Başkanı Prof. Dr. Hakan ERBAŞ'a, Biyokimya AD öğretim üyeleri Prof. Dr. İlker DIBIRDIK'a, Doç. Dr. Eray ÖZGÜN'e, Doç. Dr. Gülben SAYILAN ÖZGÜN'e ve anabilim dalındaki araştırma görevlisi arkadaşlarıma, lipozomal piperin sentez ve karakterizasyon çalışmalarındaki katkılarının yanı sıra deney süreci boyunca bilgisi ve manevi desteği ile her zaman yanımda olan değerli hocam Eczacılık Fakültesi Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı Dr. Öğr. Üyesi Habibe YILMAZ'a, dokuların histopatolojik incelemesini gerçekleştirdiği için Tıbbi Patoloji AD öğretim üyesi Prof. Dr. Ufuk USTA'ya, bilgisayar ve grafik programlarının kullanımı konusundaki yönlendirmeleri için Fen Fakültesi Fizik Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Şaban AKTAŞ'a, lipozomların AFM analizlerini yaparak tezime katkı sağlayan Süleyman Demirel Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi Kimya Bölümü Araş. Gör. Yunus Emre BÜLBÜL'e, motivasyonumu korumamdaki yeri ve laboratuvar çalışmalarıma sağladığı katkılar için Eczacılık Fakültesi Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı Araş. Gör. Ayça EREK'e, sağladıkları maddi destek için Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkürlerimi sunarım.

SİMGE VE KISALTMALAR

AFM: Atomik kuvvet mikroskobu

Ca^{2+}: Kalsiyum

DLS: Dinamik ışık saçılımı

DMSO: Dimetil sülfoksit

H_2O_2: Hidrojen peroksit

ISO: İsoproterenol

LDL: Düşük dansiteli lipoprotein

MI: Akut miyokart infarktüsü

NO: Nitrik oksit

OSİ: Oksidatif stres indeksi

OxLDL: Okside LDL

PDI: Polidispersite indeksi

ROS: Reaktif oksijen türleri

TAS: Total antioksidan durum

TnI: Troponin I

TOS: Total oksidan durum

ÖZET

‘‘İsoproterenol ile Miyokart İnfarktüsü Oluşturulan Ratlarda Lipozomal Piperinin Oksidatif Strese Etkisinin İncelenmesi’’, Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Edirne, 2024.

Giriş ve Amaç: Antioksidan etkiye sahip olduğu bilinen piperinin, nanopartikül formunda verildiğinde biyoyararlanımının ve antioksidan etkisinin arttığı ileri sürülmüştür. İsoproterenol ile uyarılan miyokart infarktüsünün mekanizmasında oksidatif stresin önemli rol oynadığı bilinmektedir. Literatürde lipozomal piperinin, in vitro ortamda, diyabet modelinde ve Parkinson modelinde oksidatif strese etkisini inceleyen az sayıda çalışma bulunmakla birlikte, isoproterenol ile oluşturulan infarktüs modelinde oksidatif strese etkisini inceleyen bir çalışmaya rastlanmadı. Bu çalışmanın amacı isoproterenol ile deneysel miyokart infarktüsü oluşturulan ratlarda, lipozomal piperinin oksidatif strese etkisini incelemektir.

Gereç ve Yöntemler: Lipozomal piperin sentezlendi ve karakterizasyon çalışmaları yapıldı. Çalışmada 40 adet yetişkin erkek Wistar albino cinsi rat kontrol grubu, piperin grubu, isoproterenol (ISO) grubu, ISO+piperin grubu olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Lipozomal piperin, 20 mg/kg/gün dozunda 10 gün boyunca oral yoldan verildi. Miyokart infarktüsü oluşturabilmek için 9. ve 10. günlerde 24 saat ara ile isoproterenol (85 mg/kg/gün) intraperitoneal olarak uygulandı. Son isoproterenol dozundan 24 saat sonra ratlardan anestezi altında kan ve doku örnekleri alındı. Kan örneklerinde serum total antioksidan durum, total oksidan durum ve troponin I düzeyleri ölçüldü. Oksidatif stres indeksi, total antioksidan ve total oksidan durum değerleri kullanılarak hesaplandı. Dokular histopatolojik olarak incelendi.

Bulgular: ISO grubunun serum troponin I düzeyleri kontrol grubuna ($p=0,001$), piperin grubuna ($p=0,001$) ve ISO+piperin grubuna ($p=0,04$) göre anlamlı olarak yüksekti. ISO+piperin grubunun troponin I düzeyleri de kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksekti ($p=0,012$). ISO grubunun serum total oksidan durum düzeyleri, kontrol grubuna ($p=0,006$) ve piperin grubuna ($p=0,000$) göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Piperin grubunun total oksidan durum düzeyi ise ISO+piperin grubuna göre daha düşüktü ($p=0,004$). Serum total antioksidan durum düzeyi bakımından gruplar arasında anlamlı bir fark görülmedi ($p>0,05$). ISO grubunun oksidatif stres

indeksi düzeyi, kontrol grubuna (p=0,000) ve piperin grubuna (p=0,000) göre anlamlı olarak yüksek bulundu. ISO+piperin grubunun oksidatif stres indeksi düzeyi de piperin grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti (p=0,01). ISO grubunun histopatolojik incelemesinde kas lifleri arasında ödem ve atrofi görüldü. ISO grubunda kas lifleri arasında çok sayıda ince fibröz bant görülürken ISO+piperin grubunda kas lifleri arasında az sayıda ve kesitli ince fibröz bant görüldü.

Sonuç: Çalışmamız lipozomal piperinin isoproterenol ile miyokart infarktüsü oluşturulan ratlarda oksidatif stresi azaltttığını göstermektedir.

Anahtar kelimeler: İsoproterenol ile oluşturulan miyokart infarktüsü, lipozomal piperin, oksidatif stres indeksi, Troponin I

Destekleyen Kurum: Bu çalışma, Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 2022-213.

Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenen tez çalışmasının bir bölümü ‘Liposomal piperine as a nutrient based antioxidant regard to create sustainable medical formulations’ başlığı altında Uluslararası Yaşamda Sürdürülebilirlik Kongresi'nde (SUIC 2024) 21.05.2024 tarihinde sözlü olarak sunulmuştur.

ABSTRACT

‘‘Investigation of the Effect of Liposomal Piperine on Oxidative Stress in Rats with Isoproterenol Induced Myocardial Infarction’’, Trakya University Institute of Health Science, Medical Biochemistry Department, Master Thesis, Edirne, 2024.

Background and Aim: It has been suggested that the bioavailability and antioxidant effect of piperine, which is known to have antioxidant effects, increases when given in nanoparticle form. It has been known that oxidative stress has an important role in the mechanism of isoproterenol-induced myocardial infarction. In the literature, there are few studies investigating the effect of liposomal piperine on oxidative stress in in vitro, diabetes model and Parkinson model, however, no study was found examining the effect of isoproterenol on oxidative stress in the infarction model. The aim of the study is to investigate the effect of liposomal piperine on oxidative stress in rats with isoproterenol induced myocardial infarction.

Material and Methods: Liposomal piperine synthesized and characterization studies carried out. In the study, 40 adult male Wistar albino rats divided into 4 groups: control group, piperine group, isoproterenol (ISO) group, ISO+piperine group. Liposomal piperine administrated orally at the dose of 20 mg/kg/day for 10 days. To induce myocardial infarction, isoproterenol (85 mg/kg/day) was administered intraperitoneally every 24 hours on the 9th and 10th days. Blood and tissue samples were taken from rats under anesthesia 24 hours after the last isoproterenol dose. Serum total antioxidant status, total oxidant status and troponin I levels were measured in blood samples. Oxidative stress index was calculated with total antioxidant status and total oxidant status values. Tissues were examined histopathologically.

Results: Serum troponin I levels of the ISO group were significantly higher than the control group ($p = 0.001$), piperine group ($p = 0.001$) and ISO + piperine group ($p = 0.04$). Troponin I levels of the ISO+piperine group were also significantly higher than the control group ($p=0.012$). Serum total oxidant status levels of the ISO group was found to be significantly higher than the control group ($p = 0.006$) and piperine group ($p = 0.000$). Total oxidant status levels of the piperine group was lower than the ISO+piperine group ($p=0.004$). There was no significant difference between the groups in terms of serum total antioxidant status levels ($p>0.05$). Oxidative stress index level of the ISO group was found to be significantly higher

than the control group (p = 0.000) and piperine group (p = 0.000). Oxidative stress index level of the ISO+piperine group was also significantly higher than the piperine group (p=0.01). Histopathological examination revealed that ISO group has edema and atrophy between muscle fibers. Many thin fibrous bands were seen between muscle fibers in the ISO group, few and sectional thin fibrous bands were seen between muscle fibers in the ISO+piperine group.

Conclusion: Our study showed that liposomal piperine reduces oxidative stress in rats with isoproterenol-induced myocardial infarction.

Keywords: ISO-induced myocardial infarction, liposomal piperine, oxidative stress index, Troponin I

Financial Support: The present study was supported by the Research Fund of Trakya University. Project No: 2022-213.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Dünya genelindeki ölüm nedenleri incelendiğinde en önemli küresel ölüm nedeninin kardiyovasküler hastalıklar ile ilişkili olduğu görülmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından yayımlanan verilerde dünyadaki toplam ölümlerin içinde kardiyovasküler hastalıkların birinci sırada yer aldığı belirtilmiştir. Kardiyovasküler hastalıklar içerisinde akut miyokart infarktüsü (MI), 2000 yılından 2019 yılına kadar 2 milyondan fazla artış göstererek ölüm sayısında en çok artış görülen hastalık grubu olmuştur (1).

Miyokart infarktüsü, koroner arterlerde trombüs oluşumuyla birlikte miyokart dokuya giden kan akışının kesilmesi ve oksijen yetersizliği nedeniyle iskemiye bağlı doku nekrozu olarak tanımlanmaktadır. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) artışıyla birlikte endojen antioksidan savunma sistemi yetersiz kalmakta ve oksidatif streste artış görülmektedir. Oksidatif stresin artışı ile düşük dansiteli lipoproteinler (LDL) gibi dayanıksız moleküller okside olarak endotel disfonksiyonuna neden olur. Hasar gören endotel, seçici geçirgenliğini kaybederek intima tabakasına partikül geçişini kolaylaştırır. İntimada biriken okside LDL (OxLDL) partikülleri düz kas hücrelerinin migrasyonunu tetikleyerek miyokart doku bütünlüğünün bozulmasına neden olur. Böylece doku bütünlüğü bozulan arterlerde artmış oksidan moleküllerin birikimi, ateroskleroz için zemin oluşturur. Ateroskleroz ilerleyen dönemlerde trombüs oluşumunu tetikleyerek dokuları oksijenden fakir hale getirir. Yetersiz oksijen iskemiye neden olur. Trombüs hacmi arttıkça doku iskemisi artar ve nekrozla sonuçlanarak akut MI'ya neden olur. Bu sebeple oksidatif stresin MI patogenezindeki rolü önemlidir (2,3).

İsoproterenol (ISO) kardiyak hasar ve miyokart infarktüse neden olan mekanizmaları tetikleyen bir katekolamin analoğudur. Düz kas ve miyokartta yer alan β-adrenerjik reseptörlere etki ederek miyokartta kasılma, iyon dengesizlikleri ve ROS artışına sebebiyet verir. Deneysel miyokart infarktüsü modeli oluşturularak metabolik ve patofizyolojik mekanizmaların araştırılmasında tercih edilen bir kimyasaldır (4).

Vücutta var olan endojen antioksidan savunma sistemleri, oksidan moleküllerin etkilerine karşı organizmayı korumaktadır. Oksidatif stresin artışını engelleyerek homeostazın devamlılığına katkıda bulunurlar. Antioksidan tedaviler oksidatif stresi önleme adına önemli girişimlerdir. Birçok hastalığın önlenmesi için endojen antioksidan sistemin desteklenmesi hedeflenmektedir. Bitki ve meyve ekstraktlarından elde edilen doğal antioksidan moleküller, endojen antioksidan mekanizmaların desteklenmesine katkıda bulunurlar. Bu sayede oksidatif

stresi azaltarak hastalıkların seyrini olumlu yönde etkileyebilirler. Doğal antioksidanların tedavi edici potansiyelleri yeni terapötik stratejiler olarak gündeme gelmekte ve çalışılmaktadır (5).

Nano ilaç taşıyıcı sistemler çeşitli yollarla sentezlenebilen nanopartiküller aracılığı ile hedef moleküllerin verimliliğinin arttırılması, spesifik doku hedeflenmesi ve organizmada kalış süresinin arttırılmasını hedefleyen tıbbi uygulama araçlarıdır. Lipozomlar, ortasında sulu çekirdek yapı ve onu çevreleyen fosfolipit çift tabakaya sahip küresel şekilli nanopartiküllerdir. Organizma ile yüksek biyouyumluluğa sahip olması sebebiyle klinik ilaç uygulamalarında sıklıkla tercih edilmektedir. İçerisine yüklenen bileşenleri fiziksel ortamdan kaynaklanan bozunmadan korumaktadır. Hem hidrofobik hem hidrofilik yapıya sahip moleküller lipozomal sistemler ile taşınabilir. Doğal antioksidanlar gibi hassas bileşenlerin oral alımda verimliliğinin arttırılması ve kontrollü alımın gerçekleştirilmesi için en sık tercih edilen nano ilaç taşıyıcı sistemlerdendir (6).

Piperin, karabiberin (*Piper Nigrum*) bileşeni olan majör bir alkaloiddir. Yapılan çalışmalarda piperinin antioksidan, antiinflamatuar, antimikrobiyal etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte ROS'lara karşı detoksifiye edici etki göstererek miyokart hücrelerini oksidatif hasara karşı koruduğu belirtilmiştir. Piperinin isoproterenol ile oluşturulan miyokardial iskemi ve toksisitede antioksidan etki gösterdiği ileri sürülmüştür (7-9).

Literatürde lipozomal piperinin, isoproterenol ile oluşturulan infarktüs modelinde oksidatif strese etkisini inceleyen bir çalışmaya rastlanmadı. Bu çalışmanın amacı isoproterenol ile akut miyokart infarktüsü oluşturulan ratlarda lipozomal piperinin oksidatif strese etkisini araştırmaktır. Bu amaçla Wistar albino cinsi ratlarda isoproterenol ile deneysel infarktüsü modeli oluşturularak lipozomal piperinin serum total antioksidan durum (TAS), total oksidan durum (TOS) ve oksidatif stres indeksi (OSİ) üzerine etkisi incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Akut Miyokart İnfarktüsü

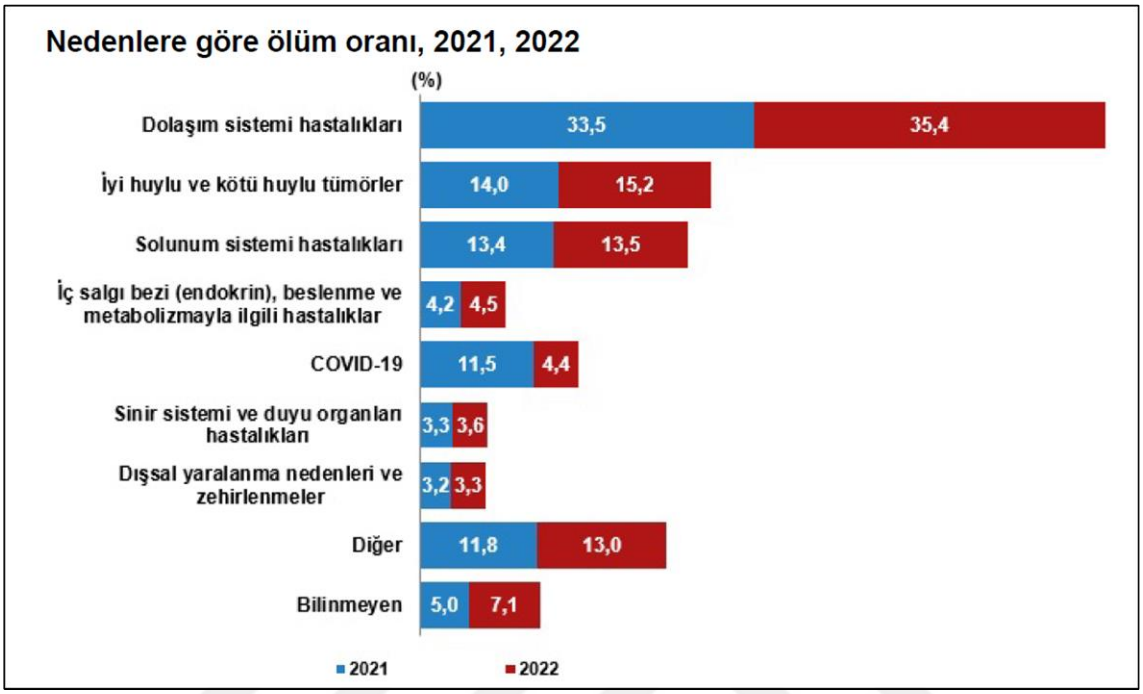
Kalbe oksijenden zengin kanı taşıyan damarlar koroner arterler olarak adlandırılmaktadır. Koroner arterlerde meydana gelen fizyolojik veya fonksiyonel bir hasar, miyokardiyal oksijen miktarında dengesizliğe neden olmakta ve kan akışını engelleyerek kalbin ihtiyaç duyduğu moleküllere ulaşmasını güçleştirmektedir. Bu durumun uzun sürmesi kalp fonksiyonlarını olumsuz etkilemekte ve iskemik kalp hastalıklarının görülmesine neden olmaktadır (10).

Küresel boyutta incelendiğinde kardiyovasküler hastalıklar grubunun dünya genelindeki tüm ölümlerin neredeyse üçte birini oluşturduğu ve içlerinde iskemik kalp hastalıklarının birinci sırada yer aldığı görülmektedir. Yüksek mortalite oranlarının görülmesi sebebiyle oluşturduğu küresel sağlık yükü ülkeler için önem arz etmektedir (11).

Türkiye özelinde incelendiğinde Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) tarafından yayımlanan güncel verilerde iskemik kalp hastalıklarının, yüksek mortalite oranlarına sahip hastalıklar içerisinde uzun yıllardır ülkemizde de ilk sıralarda yer aldığı rapor edilmiştir. Dolaşım sistemi hastalıklarından kaynaklı ölümler 2021 yılında %33,5 ve 2022 yılında ise %35,4'lük bir oranla tüm hastalıklar içerisinde birinci sırada yer aldığı görülmektedir (Şekil 2.1.) (12).

İskemik kalp hastalıklarına neden olan mekanizmaların tetiklenmesi, endotel tabakada meydana gelen fonksiyonel ve morfolojik değişimlerin arter duvarlarında kalıcı hasarlara neden olmasıyla başlamaktadır. Endotel, kan damarlarının iç yüzeyini kaplayarak arter duvarını kan dolaşımından ayıran hücre tabakasıdır. Seçici geçirgenliği sebebiyle arterler için bariyer görevi görmektedir. Nitrik oksit (NO), asetilkolin (ACH), endotelin gibi vazoaktif moleküllerin salımını kontrol ederek düz kasların kasılıp gevşeme mekanizmasını regüle eder ve tonusunun devamlılığını sağlar. Bu fonksiyonlar kalp kasının işlevini sürdürmesi için gereklidir. Endotel tabakada meydana gelen fonksiyonel bozuklukların vasküler olaylar üzerinde olumsuz etkilere yol açtığı bilinmektedir. Oksidatif stres ve ROS artışı vasküler mekanizmaları olumsuz etkilemektedir. ROS artışına karşı savunmada yetersiz kalan endojen antioksidan sistemi, beraberinde sistemdeki endotelyal nitrik oksit sentaz (eNOS) aktivitesini azaltarak NO üretimini azaltır. Bununla birlikte NO'ların peroksi nitrite ($ONOO^-$) dönüşme eğilimleri artar. Böylelikle homeostatik denge bozularak endotel disfonksiyon sürecinin başlamasına neden

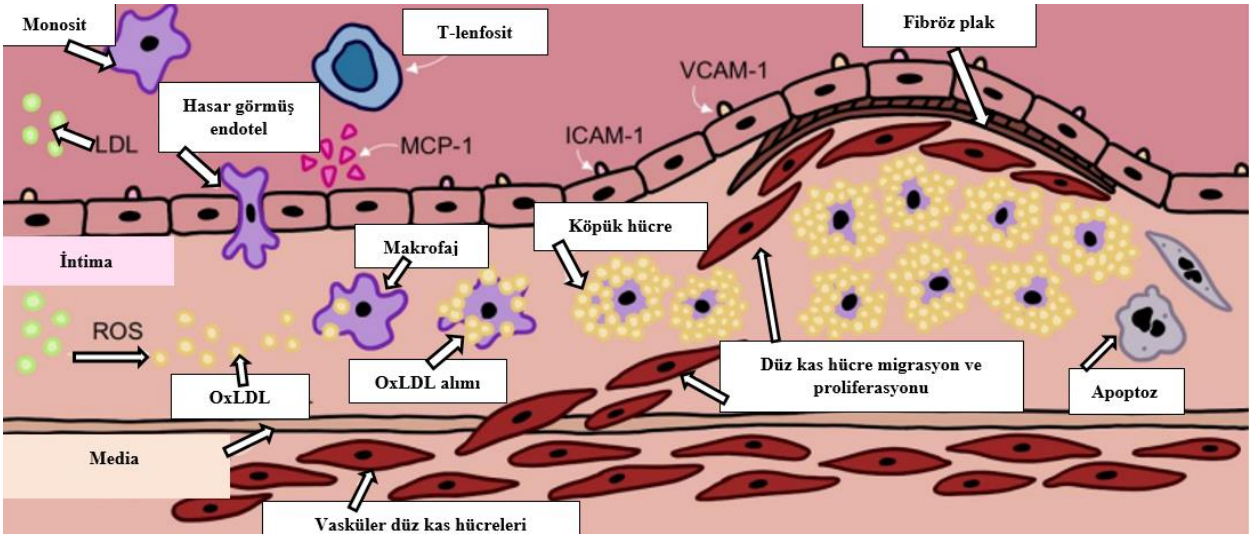
olur. Bu sebeple kardiyovasküler hastalıkların patolojisinde endotel disfonksiyonun yeri önemlidir (13,14).



Şekil 2.1. Türkiye İstatistik Kurumu ölüm ve ölüm nedeni istatistikleri, 2022 (12)

Endotel disfonksiyonla birlikte azalan seçici geçirgenlik inflamatuar moleküllere olan maruziyetin artması ile sonuçlanır. Membran geçirgenliğindeki bu değişimle birlikte dolaşımda bulunan LDL partiküllerinin intima tabakasına geçişi kolaylaşmaktadır. LDL partikülleri oksidasyona meyilli, dayanıksız moleküllerdir. Oksidatif stres ve ROS maruziyetiyle oksidasyona uğramış LDL intima tabakasına tutunarak birikmeye başlar. Artan OxLDL birikimi NO salımını inhibe eder, endotelin-1 düzeyini yükseltir, hücre içi kalsiyum (Ca^{2+}) konsantrasyonunun artışına neden olarak vazodilasyon-vazokonstrüksiyon arasındaki denge bozulur (15). İntimada oluşan bu birikim monositlerin de intimaya geçerek birikmesini uyarmaktadır. İntimada biriken monositler, LDL partiküllerini okside eden serbest radikallerin üretimini arttırır. Dolayısıyla ortamdaki OxLDL düzeyi artar. Monositler makrofajlara dönüşerek OxLDL partiküllerini içerisine alır. OxLDL partiküllerinin birikmesine bağlı olarak makrofajlar köpük hücrelerine dönüşür. Köpük hücreler apoptoza uğrayarak lipit ve hücre artıklarını intimaya salar (16-18).

Arter duvarlarının yapısını koruyan molekülleri salgılamakla görevli düz kas hücreleri media tabakasında yer almaktadır. İntimada, artan köpük hücre birikimiyle beraber düz kas hücreleri mediadan intima tabakasına doğru göç eder, intimada proliferasyona uğrayarak birikmeye başlar. Bu birikim intima tabakasının hasar görmesine ve fonksiyonunda bozulmaya yol açar. Hali hazırda intima tabakasında artmış köpük hücre miktarıyla birlikte biriken düz kas hücreleri fibrotik plak oluşumuna neden olur. Biriken fibrotik plaklar arterlerin tıkanmasına neden olarak, ihtiyaç duyulan oksijen ve kan girişini azaltır, böylece, dokuda iskemiye neden olur. Birikim arttıkça erken dönemde aterosklerozis ve ileri dönemde birikimin trombozu tetiklemesiyle MI için zemin oluşturmaktadır (Şekil 2.2.) (16,19).

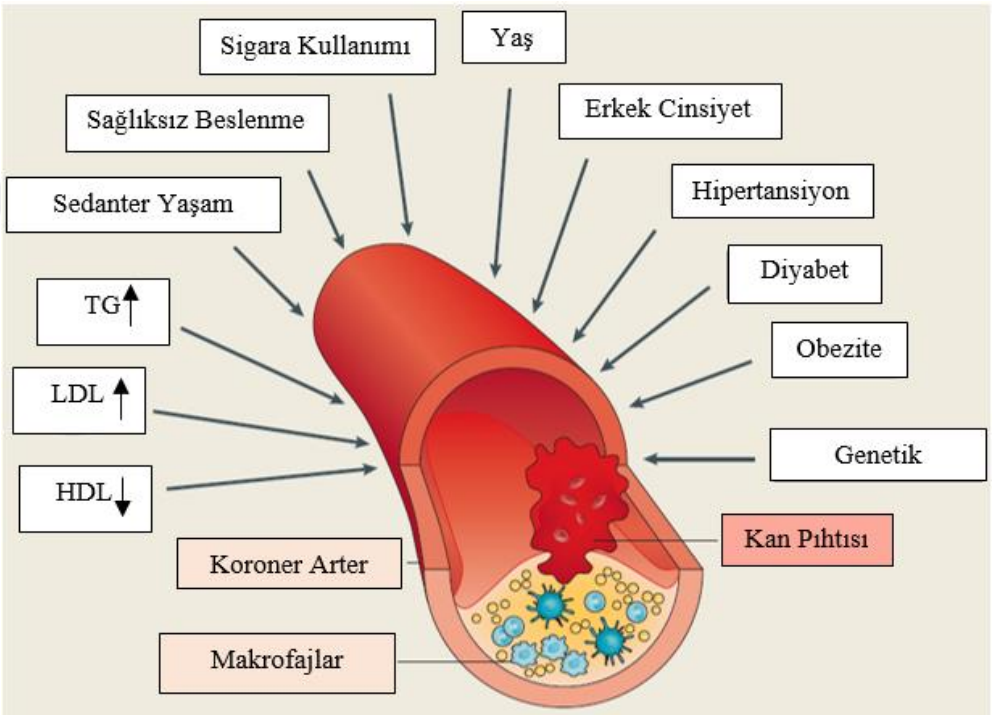


Şekil 2.2. Aterosklerotik plak ve trombüs gelişiminde rol oynayan süreçler (18)

LDL: Düşük dansiteli lipoprotein, OxLDL: Okside olmuş LDL, ROS: Reaktif oksijen türleri, MCP-1: Monosit kemoatraktan protein 1, ICAM-1: Hücreler arası adezyon molekülü-1, VCAM-1: Vasküler hücre adezyon molekülü.

Koroner arterlerde gerçekleşen inflamatuar, metabolik ve toksik moleküllerin neden olduğu hasar sebebiyle kan akışında azalma meydana gelmektedir. Trombotik aktiviteye ek olarak bu azalmaya bağlı miyokardiyal oksijen kaynağının kesilmesiyle birlikte dokuda iskemi görülmektedir. Ortak bir tanım oluşturmak amacıyla yapılan son konsensusta MI, patolojik olarak uzun süreli iskemi nedeniyle gerçekleşen miyokardiyal hücre ölümü, nekroz olarak tanımlanmıştır. Doku nekrozu nedeniyle kalp işlevlerini yerine getiremeyecek duruma gelir ve canlılığını sürdüremez. İskemik kalp hastalıkları içerisinde MI, en sık görülen ani ölümlerin nedenidir ve en yüksek mortalite oranına sahiptir (20,21).

Birçok kronik ve akut durum MI patofizyolojisini etkilemektedir. Yaş, cinsiyet, kronik hastalıkların varlığı, genetik faktörler gibi müdahale edilemeyenlerin yanı sıra stres, yaşam tarzı davranışları, obezite, sigara kullanımı gibi müdahale edilebilir faktörlerin uzun dönemde tromboz oluşumuna eğilimi artırarak MI riskini artırdığı bilinmektedir (Şekil 2.3.) (22,23). MI'ın temelinde inflamatuar ve proinflamatuar faktörlerin salımı nedeniyle oluşan şiddetli inflamasyon ve oksidatif stres önemli yer tutmaktadır (24).



Şekil 2.3. MI riskini arttıran faktörler (23)

TG: Trigliserit, LDL: Düşük dansiteli lipoprotein, HDL: Yüksek dansiteli lipoprotein.

2.2. Kardiyak Belirteçler

Avrupa Kardiyoloji Derneği ve Amerikan Kardiyoloji Derneği 2000'li yıllardan itibaren biyobelirteçlerdeki artışın tanı kriteri olarak değerlendirilmesinin önemine vurgu yapmaktadır. Tanıda kullanılabilecek ideal bir biyobelirtecin kalp kasında meydana gelen minimum hasara dahi duyarlı olması, kalp kasına spesifik olması, miyokart hasar varlığı olmadığında yanıt vermemesi, ölçümünün kolay uygulanabilir, hızlı, ucuz, kantitatif olması, infarkt şiddeti ve hastalık prognozu hakkında bilgi vermesi, uzun süreli depolama koşullarına uyum sağlayabilmesi ve bu sürede stabilitesini koruması gerekliliği belirtilmiştir. ISO ile oluşturulan infarktüsü modelinde serumda lökosit, kreatin kinaz-MB (CK-MB), laktat dehidrogenaz (LDH)

gibi stres ve hasar belirteçlerinde belirgin şekilde artış görülmüştür. Bununla birlikte bu belirteçlerin kalbe spesifik olmaması, enfeksiyon ve bazı hastalıklar sırasında da artış göstermesi sebebiyle tanı için yeterli standartları sağlamadığı vurgulanmıştır. Kalbe spesifiklik, hassaslık gibi temel standart koşulları sağlayarak MI tanısının konmasında tercih edilen en önemli belirteçlerin başında kardiyak TnI olduğu belirtilmiştir. MI sürecinde miyokart dokuda yaygın inflamasyon, miyofibril dejenerasyonu ve doku nekrozu olduğu rapor edilmiştir. Bu sebeple dokunun histopatolojik olarak incelenmesi, TnI seviyeleri ile birlikte değerlendirildiğinde bu iki verinin MI'ın oluştuğuna dair kanıt niteliğinde olduğu gösterilmiştir (25-28).

2.3. Oksidatif Stres

Organizmada yaşam devam ederken bir yandan da makro ve mikromoleküllerin metabolizması, hormonların üretimi, elektron taşıma sistemi ve enerji üretimi gibi birçok metabolik süreçler de aralıksız olarak devam etmektedir. Hücresel metabolizma süresince gerçekleşen reaksiyonlar sırasında birtakım moleküller açığa çıkmaktadır. Bu moleküllerden bazıları oldukça reaktif ve dayanıksız olup aşırı miktarlardaki ekspresyonlarının zararlı etki gösterdiği bilinmektedir. Bu moleküller ROS olarak adlandırılmaktadır. Süperoksit radikali ($O_2^{\bullet -}$), hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), $ONOO^-$, NO gibi moleküller en bilinen ROS'lara örnektir. Normal süreçte ROS'lar hücresel sinyalizasyonda da kullanılabilmektedir (29,30).

İnsan vücudu, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma mekanizmalarına sahiptir. Glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD) enzimatik, glutatyon (GSH) ise enzimatik olmayan endojen savunma mekanizmalarıdır. Antioksidan tedaviler genellikle farmakolojik etkilerini bu mekanizmalar üzerinden gösterecek şekilde tasarlanmaktadır (29).

Var olan antioksidan mekanizmalar üretilen ve kullanılmayan ROS'lara karşı savunma sağlayarak denge durumunun korunmasını sağlar. Öte yandan, ROS miktarında gerçekleşen sürekli ve hızlı artışlar karşısında endojen antioksidan mekanizmalar yetersiz kalmaktadır. Antioksidan savunma yetersiz kaldığı zaman negatif bir denge ile karşı karşıya kalınmaktadır. ROS'lar toksik etkilerini öne çıkararak lipit, protein, karbonhidrat ve nükleik asitlerde geri dönüşümsüz değişikliklere yol açan zincir reaksiyonları başlatır. Bu durum oksidatif stres olarak adlandırılmaktadır (30,31).

Oksidatif stresin birçok hastalığın patolojisinde yer aldığı bilinmektedir. Bu hastalıklar içerisinde kardiyovasküler hastalıklar üst sıralarda yer almaktadır. Oksidatif stresteki artışla birlikte zarar görmeye başlayan lipit ve protein yapıları membran geçirgenliğinde değişime neden olarak seçici geçirgen yapının zarar görmesine neden olmaktadır. Zarar gören membrandan moleküller sızabilir ya da geçişi istenmeyen moleküllerin içeri geçişi ile karşı karşıya kalınabilmektedir. Bu da yük dengesizliklerine yol açarak sinyal düzenlenmesi ve mekanizmaların işleyişini bozmaktadır. Aynı zamanda oksidatif stres artışıyla birlikte organizma inflamatuar süreçlere daha açık hale gelmektedir. Artan inflamasyonla birlikte endotel disfonksiyonu meydana gelmesi olağandır. Böylece ateroskleroz ve MI mekanizmalarının tetiklenmesi kaçınılmaz olmaktadır. Oksidatif streste meydana gelen artışın sıklıkla kardiyak reperfüzyon hasarını arttırarak miyokardiyal iskemiye neden olduğu, dolayısıyla MI oluşma riski artırdığı belirtilmiştir. Bu sebeple güncel çalışmalara konu olmaya devam etmektedir (32,33).

Oksidatif stres üzerine yapılan preklinik çalışmaların odak noktalarından biri de antioksidan tedavilerdir. Antioksidan tedavilerin uygulanması ile endojen antioksidan kapasitenin arttırılması yaklaşımının gelecekteki potansiyel tedavi yöntemleri arasında olacağı vurgulanmaktdır (34). Doğal antioksidan moleküller sebze, meyve, bitki özleri gibi kaynaklardan ekstrakte edilerek elde edilen bileşendir. Bir veya birden fazla biyoaktif bileşen içerebilirler. Eski zamanlardan beri hastalıkların tedavisinde kullanıldığı bilinen bu bileşenler günümüzde teknolojinin de gelişimiyle birlikte klinik araştırmalardaki kullanımı önemli yer edinmeye başlamıştır. Doğal antioksidan moleküllerin, ROS'ların olumsuz etkilerini azaltarak kardiyak homeostazı desteklediği, proinflamatuar sitokin salımını baskıladığı, NO üretimini destekleyerek oksidatif stresi azaltıcı etki gösterdikleri ifade edilmiştir. ROS'lar karşısında gösterdikleri savunma ile antioksidan sinyal yolaklarının düzenlenmesini sağlamakta ve endotel fonksiyonun korunmasını desteklemektedir. Ayrıca lipit peroksidasyonunu baskılayıcı etki gösterdikleri belirtilmiştir. Bu etkileri ile vasküler sağlığı destekleyerek kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi ve tedavi edilmesindeki potansiyel etkileri vurgulanmıştır (35-37).

Kuersetin, resveratrol, ginseng, kurkumin gibi doğal antioksidan özelliğe sahip birçok farklı molekülün miyokart infarktüsünde etkisi çalışılmıştır. ISO ile deneysel miyokart infarktüsü modeli oluşturulan çalışmalarda, doğal antioksidan bileşenlerin miyokardiyal hasarın ilerlemesini önlediği, hücresel apoptozu azalttığı, infarkt alanını küçülttüğü, oksidatif stres belirteçlerinde azalma meydana getirdiği, antioksidan enzim mekanizmalarının yanıtını artırdığı rapor edilmiştir (38).

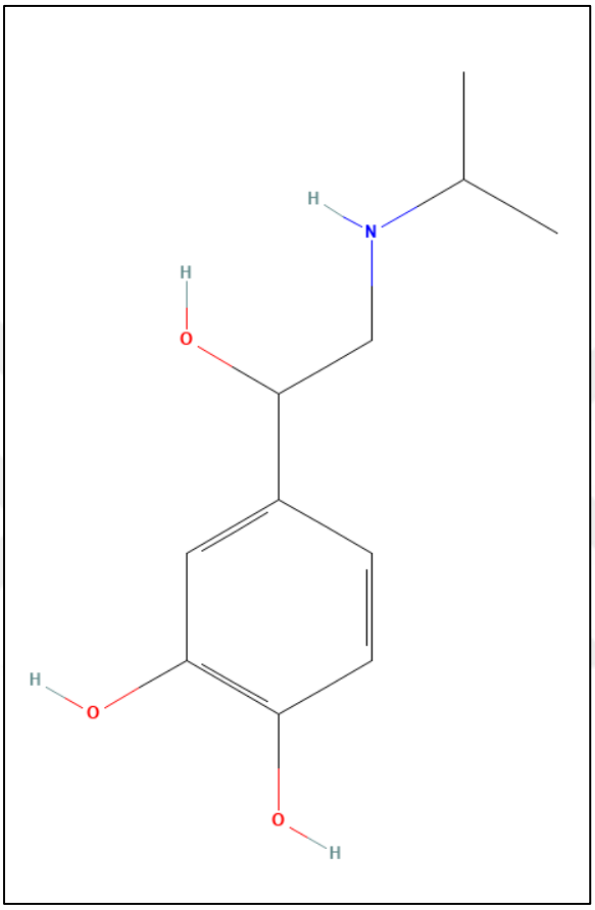
Doğal antioksidanların tercih edilmesinin bir diğer nedeni de organizma için toksisiteyi ve yabancı madde yükünü azaltan daha sürdürülebilir farmasötik alternatifler oluşturulmak istenmesidir. Doğal antioksidan bileşenlerin emilimlerinin düşük olması önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu, biyoyararlanımlarını azaltmakta ve tedavi edici potansiyellerini olumsuz etkilemektedir. Doğal antioksidanlar ile ilgili bu engelleri aşmak adına son yıllarda enkapsülasyon teknolojileri kullanılan uygulamalar dikkat çekmektedir. Bu sayede doğal bileşenlerin hızlıca katabolize olmalarını engellemek ve emilimlerini artırarak antioksidan özelliklerinden maksimum fayda sağlamak amaçlanmıştır. Doğal antioksidanlar ile ilgili uygulama dozu ve yolu hakkındaki araştırmalar da devam etmektedir (39).

Oksidan veya antioksidan özelliğe sahip moleküllerin tek tek miktar tayininin yapılması karmaşık teknikler gerektirmekte, ekonomik olmamakta ve zaman almaktadır. Bu sebeple total bir değerlendirilmeye gidilmesi önerilmektedir. Bu noktada en çok tercih edilen yöntemlerden biri TOS ve TAS ölçümüdür. TOS ve TAS ölçüm metodu kolorimetrik yönteme dayanır. TOS, serumda bulunan oksidan maddelerin miktar tayininde, TAS ise antioksidan madde miktarı tayininde kullanılmaktadır. TOS değerlerinin TAS değerlerine bölünüp yüz ile çarpılması ile elde edilen OSİ'nin oksidatif stresi değerlendirmede daha etkili bir parametre olduğu ileri sürülmüştür (40-42).

2.4. Deneysel Akut Miyokart İnfarktüsü

Hastalıkların patolojik süreçlerini gözlemlemek ve mekanizmayı anlayabilmek için birçok *in vivo* ve *in vitro* deney modeli tasarlanmıştır. Deney hayvanları ile oluşturulan modeller özellikle MI gibi akut hastalıkların patofizyolojisini anlamak için sıklıkla tercih edilmektedir. Deneysel *in vivo* modeller MI patofizyolojisi ile ilgili son bilgilerin gelişmesinde önemli rol oynamış, farmakolojik ajanların geliştirilmesi ve cerrahi yöntemlerin test edilmesine yardımcı olmuştur. Bugüne kadar pek çok model geliştirilmiş olsa da doğru çıkarımların yapılabilmesi için tekrarlanabilirliği yüksek ve uygulamada insan patolojisi ile en çok uyum gösteren modellerin seçilmesi önerilmektedir. Rat modelleri birçok açıdan insan patofizyolojisini yansıtmaktadır. Örneğin serum potasyum (K^+) düzeyinde artışın antiaritmik etki yaratması her iki metabolizmada ortak olarak görülmüştür. Dolayısıyla MI için en çok tercih edilen deney hayvanı modeli rat ile oluşturulan modeller olmaktadır (43-45).

Deney hayvanı modelleri içerisinde β-adrenerjik reseptör agonisti yoluyla indüklenen miyokart hasarı, uygulamada yararlı bulunmuştur. β-adrenerjik reseptör agonisti olarak en çok tercih edilen moleküllerden biri ISO ($C_{11}H_{17}NO_3$)'dur (Şekil 2.4.) (46,47).



Şekil 2.4. İsoproterenol kimyasal yapısı (47).

ISO, farklı mekanizmalar aracılığıyla kalpte yapısal ve fonksiyonel değişikliklere yol açarak miyokart hasara neden olmaktadır. Yüksek dozlarda uygulandığında β1 ve β2 adrenerjik reseptörlerin aşırı aktivasyonuna neden olarak siklik adenozin monofosfat (cAMP) aracılı sinyal yolaklarında değişimi indüklemesidir. Böylece miyokart hücrelerde intraselüler kalsiyum (Ca^{2+}) konsantrasyonunda artışa neden olarak membran geçirgenliğinde bozulmaya sebebiyet verir. Geçirgenlik artışı, bariyerde bozulma ve dokuda nekroz ile sonuçlanır. Ayrıca miyokardiyal Ca^{2+} artışı miyofilamentlerin sık uyarılmasına neden olarak kasılma kuvveti ve oksijen ihtiyacını artırmaktadır. Bu ihtiyaç adenozin trifosfat (ATP) gereksinimini de fazlasıyla

artırarak vücudu sürekli bir enerji dengesizliğine maruz bırakır. Böylece miyokart hücre hasarının artmasını indükler. Ayrıca sodyum-potasyum adenozin trifosfataz (Na^+/K^+- ATPaz) gibi kalsiyuma bağlı enzimlerin aktivasyonu bu süreçte inhibe olarak sodyum (Na^+) artışına neden olur. Na^+ konsantrasyonundaki artış sodyum-kalsiyum değiştiricisi (Na^+/Ca^{2+} değiştiricisi) yoluyla Ca^{2+} birikimini tetikleyerek bütünsel olarak iyon dengesizliği ve sinyal yolaklarında bozulmaya sebebiyet verir. Ca^{2+} düz kas hücreleri ve endotel dokuda kasılma ve gevşeme hareketinin idamesinde etkili olan bir mineraldir. Dolayısıyla hücre için Ca^{2+} konsantrasyonunda yaşanan dalgalanmalar hücresel fonksiyonun bozulmasına neden olarak birçok süreci tetiklemektedir (48,49).

Ratlarda ISO uygulamasının malondialdehit (MDA) düzeylerinde artışa, SOD, GPx ve CAT düzeylerinde azalmaya yol açarak oksidatif stresi artırdığı gösterilmiştir. Ayrıca ROS'lara olan maruziyeti arttırarak miyokart dejenerasyona yol açtığı belirtilmiştir (48). ISO'nun serbest radikal üretimini arttırdığı ve apoptoz sinyal regüle kinaz-1 (APK 1) yoluyla lipit peroksidasyonunu uyararak miyokardial membranların geri dönüşümsüz hasarına neden olduğu bildirilmiştir (48,50).

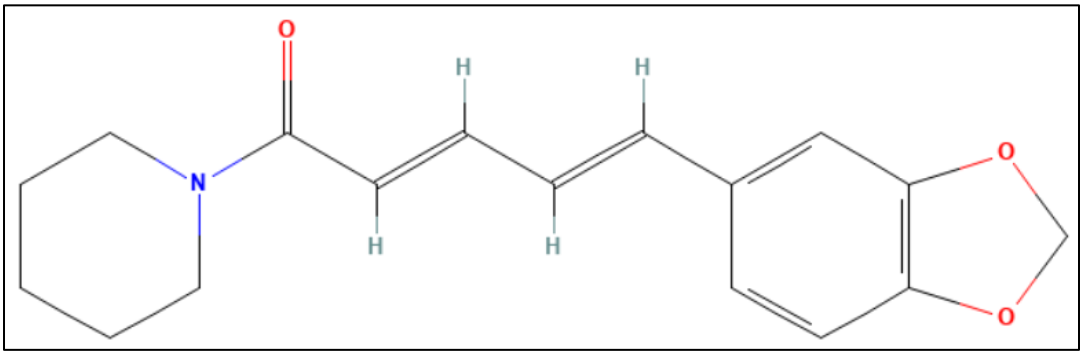
Yüksek dozdaki ISO'nun oluşturduğu miyokardiyal hasarın, insanlardaki miyokart infarktüsüne benzer değişikliklere yol açtığı görülmüştür. Aynı zamanda uygulaması kolay, hızlı ve tekrarlanabilirliği yüksek sonuçlar veren bir kimyasaldır. Bu sebeple deneysel miyokart infarktüsü modeli oluşturmak için yaygın olarak kullanılmaktadır (50,51).

2.5. Piperin

Piperin ($C_{17}H_{19}NO_3$), *Piperaceae* familyasına ait karabiber (*Piper Nigrum*) ekstraktının biyoaktif ana bileşeni olan, hidrofobik yapıya sahip bir alkaloiddir (Şekil 2.5.) (52).

Serbest radikallerin neden olduğu oksidasyon reaksiyonlarının inhibisyonu, çeşitli ilaçların biyoyararlanımını artırıcı etkisi, pankreasta yer alan sindirim enzimlerinin aktivasyonu, Tip 1 diyabet, inflamatuar bağırsak hastalığı, romatoid artirit, kanser gibi birçok inflamatuar otoimmün hastalığa karşı antiinflamatuar etkisi, piperinin bilinen ve literatüre girmiş etkilerindendir. Piperinin, nükleer faktör kappa B (Nf-kB) gibi sinyal yolaklarının modülasyonu, karaciğerde üretilen sitokrom P450 (CYP) enzim izoformlarından CYP3A türleri ve monoamin oksidazlardan (MAO) MAO-A ve MAO-B'yi inhibe ettiği, CYP1A ve CYP2B

ekspresyonunu artırdığı, gama aminobütirik asit-A (GABA-A) reseptörlerini modüle ettiği bildirilmiştir (53,54).



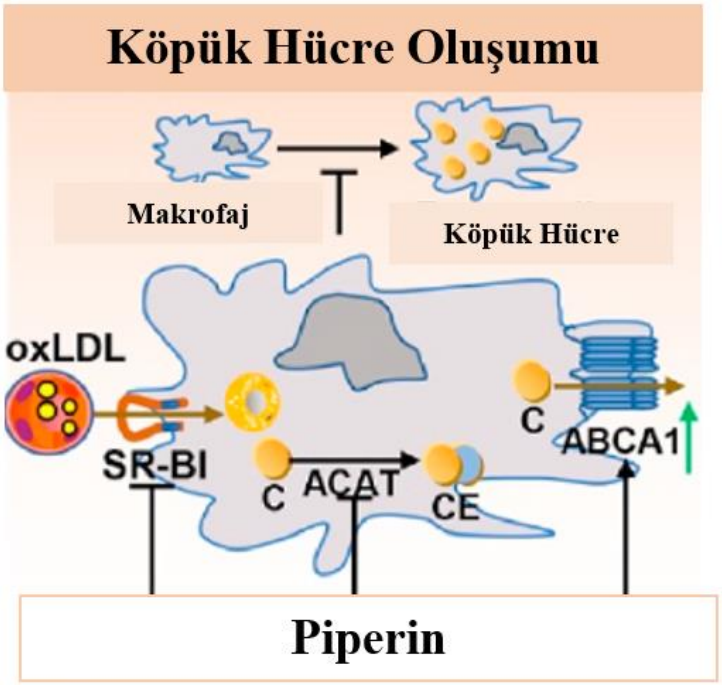
Şekil 2.5. Piperin Kimyasal Yapısı (52)

Piperinin ilgi çekici bir diğer etkisi de ilaç ve takviye edici gıda metabolizmasını modifiye edebilmesidir. Çünkü piperin, karaciğerdeki biyotransformasyon enzimlerini inhibe edebilmektedir. Bu özellik biyotransformasyon enzim grubu tarafından hedef olarak algılanan bileşiklerin biyoyararlanımının artmasını sağlamaktadır. Özellikle doğal bileşenlerin kullanımı adına bu özellik her ne kadar olumlu görünse de bazı ilaçların toksisitesi söz konusu olduğunda arzu edilmeyen bir özellik olmaktadır. Piperin, karaciğerde glukuronidlerin ilaç moleküllerine bağlanarak idrarla dışarı atılmalarını indükleyen glukuronidasyon mekanizmasını inhibe etmektedir. Glukuronidasyon ilaç ve takviye gıdalarla alınan bileşenlerin vücutta aşırı miktarlarının bulunmasını önlemektedir. Bazen de tüm alımın engellenmesine neden olarak istenen etkilerin açığa çıkmamasına neden olmaktadır. Dolayısıyla tedavi edici özellikleri de engelleyerek verimsiz hale getirmektedir. Tüm bu etkiler, bağlama göre değişebildiğinden piperin uygulamasında dikkatli olunmalıdır (53-55).

Piperin ve oksidatif stres ilişkisi ile ilgili yürütülmüş çalışmalarda piperinin lipit peroksidasyon ürünlerinin birikimini azalttığı, serbest radikal ve ROS üretimini baskılayarak neden oldukları oksidatif hasara karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir. Oksidatif stres durumunda antioksidan enzim sistemlerinin aktivasyonunu uyardığı görülmüştür. Kronik otoimmün hastalıklarla yapılan çalışmalarda biyokimyasal ve inflamatuar parametrelerde belirgin değişimlere yol açtığı belirtilmiştir. Özellikle inflamatuar belirteçlerden olan artmış IL-1, TNF-α, prostaglandin-2 (PGE2) ve interlökin-10 (IL-10) düzeylerini azalttığı rapor

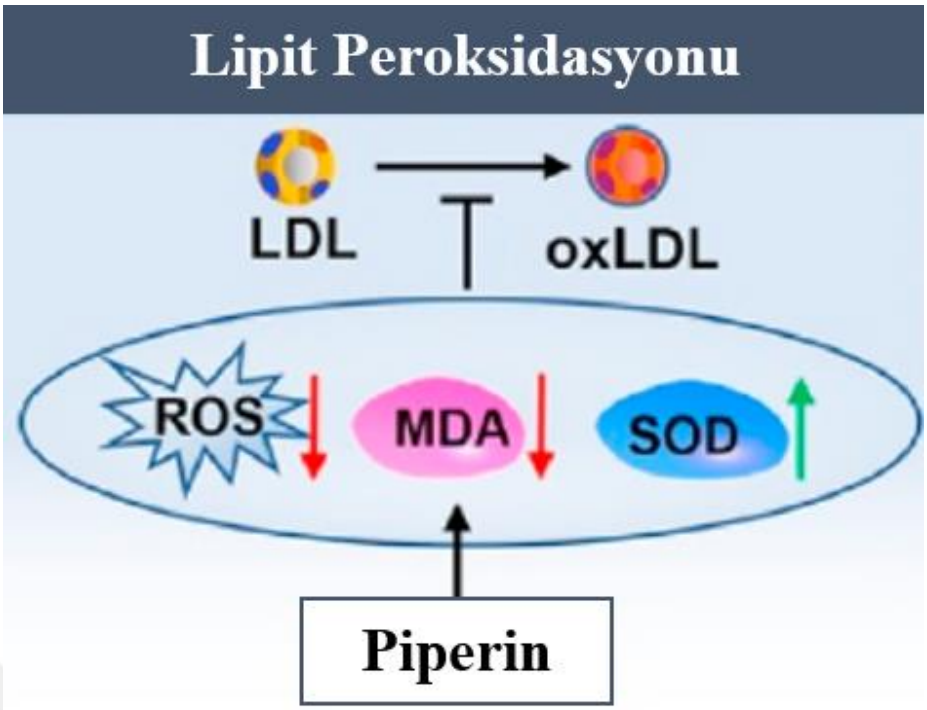
edilmiştir. Yarattığı etkiler sebebi ile piperinin güçlü bir antioksidan özelliğe sahip olduğu ve potansiyel antioksidan tedaviler için iyi bir aday olduğu vurgulanmıştır (53,56).

Piperinin antioksidan özelliği sayesinde oksidatif stres ve inflamasyonu azaltıcı etki gösterdiği bilinmektedir. Kardiyovasküler hastalıkların genelinde karşılaşılan bu tablo MI'da daha da şiddetli olmaktadır. Piperinin lipit peroksidasyonunu inhibe ederek makrofajların çoğalmasını ve köpük hücrelerin oluşum mekanizmasını tetiklemesini önlemektedir (Şekil 2.6.). Böylelikle endotel disfonksiyon görülme riski azalmakta ve damar bütünlüğü korunarak trombüs oluşumunun önüne geçilmektedir. Ayrıca LDL ve plazma trigliserit (TG) seviyelerini düşürerek antidislipidemik etki gösterdiği de belirtilmiştir (Şekil 2.7). Antioksidan enzim aktivitesini artırarak ROS ve inflamatuar sitokin düzeylerinde azalma sağladığı, oksidatif strese karşı kalp dokusunu koruduğu ileri sürülmüştür. LDH, kreatin kinaz (CK), TnI gibi miyokardiyal hasar belirteçlerinin düzeylerinde azalma tespit edilmesi ile bu görüş desteklenmiştir (Şekil 2.8) (57-59).



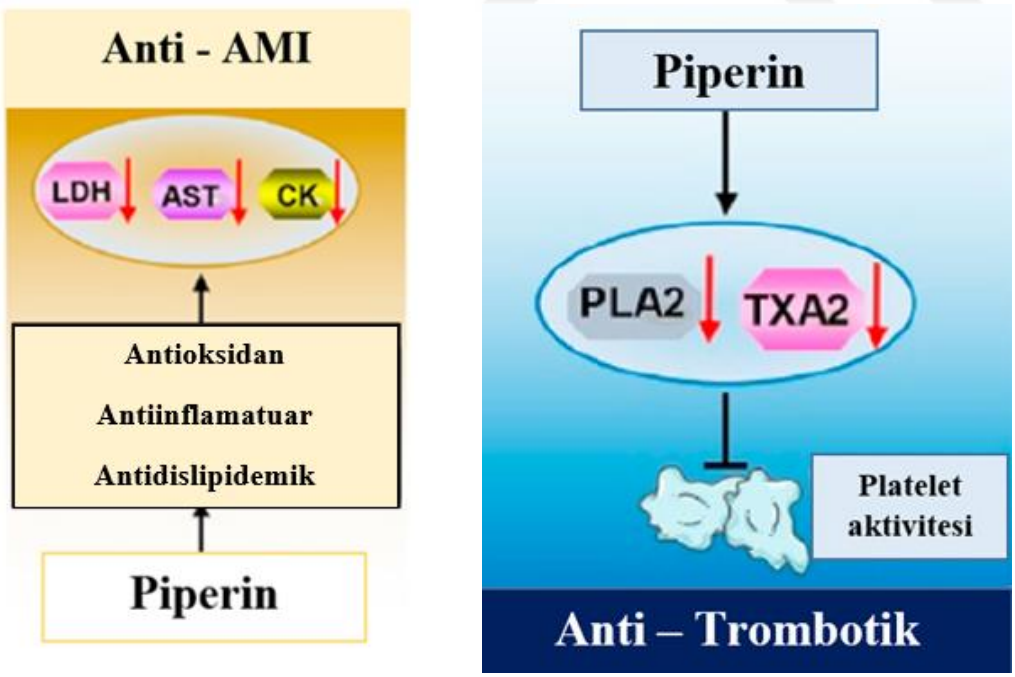
Şekil 2.6. Piperin ve köpük hücre mekanizması (59)

OxLDL: Okside olmuş LDL, C: Kolesterol, CE: Kolesterol esteri,
ACAT: Kolesterol açil transferaz, SR-B1: Çöpçü reseptör sınıf B tip 1,
ABCA1: Adenozin trifosfat bağlayıcı kaset taşıyıcı protein-1.



Şekil 2.7. Piperinin lipit peroksidasyon mekanizmasındaki rolü (59)

LDL: Düşük dansiteli lipoprotein, OxLDL: Okside olmuş LDL, ROS: Reaktif oksijen türleri, MDA: Malondialdehit, SOD: Süperoksit dismutaz.



Şekil 2.8. Piperinin AMI ve trombüs oluşum mekanizmasındaki rolü (59)

LDH: Laktat dehidrogenaz, AST: Aspartat aminotransferaz, CK: Kreatin, TXA2: Tromboksan A2, PLA2: Fosfolipaz A2.

2.6. Nano İlaç Taşıyıcı Sistemler

Nano ilaç taşıyıcı sistemler 1-1000 nanometre (nm) boyutunda, çeşitli formlarda hazırlanabilen, içerisinde çözünmüş veya kapsüle edilmiş maddeleri barındıran sistemler olarak tanımlanmaktadır. Bu sistemler, ilaç veya efektif moleküllerin istenen miktarlarının dolaşımda daha uzun süre kalmasına ve spesifik dokulara taşınabilmesine olanak sağlar. Ayrıca doğal antioksidan bileşenlerin oral alıma kıyasla biyoyararlanımını artırabilirler. Bir diğer husus, uygulanacak bileşenin nano boyutlara indirgenmesinin, dozaj konusundaki kontrolü sağlamayı ve oral alımla ulaşılamayacak dozlara çıkabilmeyi mümkün kılmasıdır. Bu sistemlerin diğer avantajları; doğal bileşenlerin biyolojik sistem içerisinde karşılaşabileceği asidik ortam ve enzimler gibi madde bütünlüğünü bozabilecek sorunlara karşı korunması, istenen etkiyi gösterecek dozun kontrol edilebilmesi ve toksisite riskinin minimuma indirilmesidir. Bu sebeple nano ilaç taşıyıcı sistemler, farmasötik tedavilere alternatif olarak kullanılabilecek doğal bileşenler için toksisite riski daha düşük, potansiyel bir etken madde dağıtım yöntemi olarak karşımıza çıkmaktadır. Farmakolojik faydalarının ön plana çıkmasıyla birlikte nano ilaç taşıyıcı sistemler son yıllarda tıp ve ilaç teknolojisinde önem kazanmaya başlamıştır (60,61).

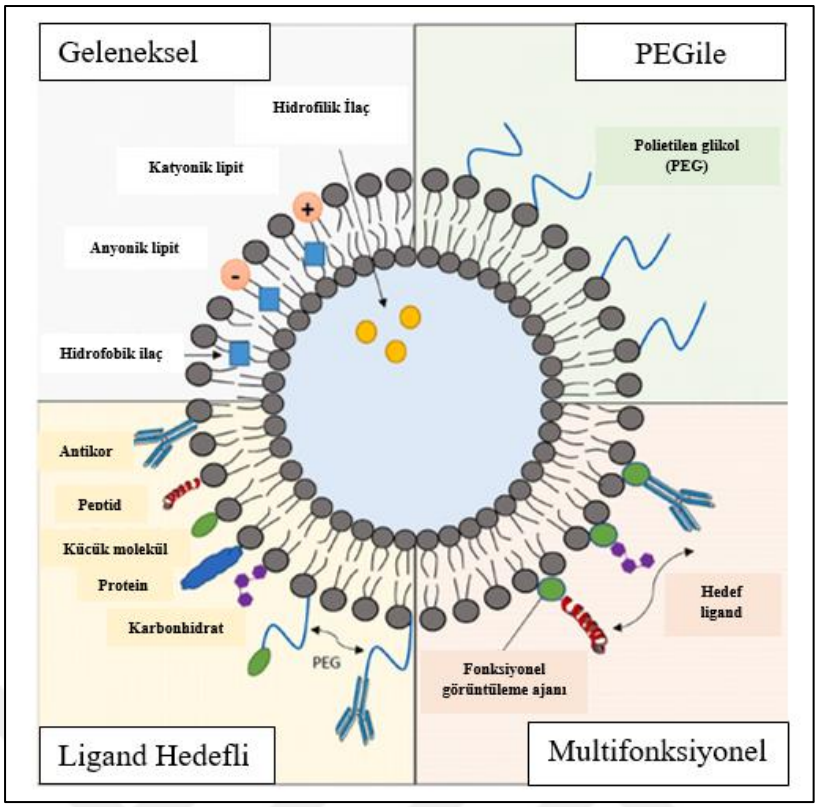
Nano formülasyonları oluştururken kullanılacak materyaller karbon, inorganik, organik veya kompozit bazlı olabilmektedir. Baz malzemeler doğal olarak oluşabilecekleri gibi sentetik olarak da üretilebilmektedir. Bununla birlikte nanopartiküllerin çeşitli şekilde ve boyutta sentezleri de mümkündür. Örneğin bir nanopartikül küresel, silindirik, spiral, şekilsiz ve yayılmış şekilde oluşturulabilmektedir. Yine uzunluk, genişlik ve yüksekliğin sabit olduğu sıfır boyutlu olabileceği gibi noktasal, iki veya üç boyutlu olabilmektedir. Bu seçenekler doğrultusunda polimerik nanopartiküller, manyetik nanopartiküller, karbon nanofiberler, metal oksit nanopartiküller, hibrit nanolifler, lipozomlar gibi birçok farklı nanopartikül sentezlenebilmektedir. Sentezlenecek nanopartikülün türüne hedef maddenin kimyasal ve fizyolojik özellikleri, uygulamanın yapılacağı alan, kullanım uygunluğu gibi kıstaslara göre karar verilmektedir (62,63).

Nano ilaç taşıyıcı sistemlerin uygulaması oral, intravenöz, dermal, inhaler gibi pek çok farklı şekilde yapılabilmektedir. Terapötik ajanın uygulama yolunu değiştirerek etkinliğinin artması, azalması ya da dokuya spesifikleştirilmesi gibi yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine olanak sağlaması nano ilaç taşıyıcı sistemleri klinik uygulamalarda öne çıkarmaktadır. Güncel çalışmalarda inorganik ve organik bazlı nanopartiküllerin tercih edildiği görülmektedir. İnorganik bazlı nanopartiküller görüntüleme ve tanı tekniklerinde tercih edilirken getireceği ağır metal yükü ve toksisitesi düşündürücü olmaktadır. Organik bazlı

nanopartiküller yapılarında yer alan moleküllerin insan vücudunda bulunan moleküllerle örtüşmesi sebebiyle klinik uygulamalarda öncelikli olarak tercih edilen türlerden biri olmaktadır. Yapılan çalışmalarda klinikte en çok çalışılmış nanopartikül çeşidinin lipozomlar olduğu görülmektedir (64-66).

Lipozomlar 50-450 nm boyutlarında fosfolipit ve steroid bazlı sentezlenen, doğal olarak küresel formda şekillenen kolloidal nanopartikül grubudur. Oluşan küresel yapının merkezini, sulu çekirdek kısmı oluşturur. Sulu çekirdek, çift katmanlı bir çeper ile çevrelenir. Çeperin çekirdeğe temas eden ve küresel yüzeyin dışı katmanını oluşturan kısmı hidrofilik, iki hidrofilik katman arasında kalan kısım ise hidrofobik karakterlidir. Lipozomlar, hem hidrofilik hem hidrofobik özelliğe sahip olmaları nedeniyle hücre membranına benzerlik gösterirler böylece hücreye girmeleri kolaylaşır. Bir diğer faydası ise hidrofilik ve hidrofobik ilaçların veya moleküllerin ayrı ayrı veya aynı anda lipozom içerisine yüklenebilmesidir. Böylece çoklu ilaç kullanımı ve doz ayarlama konusunda esneklik sağlanabilmektedir. Bu aynı zamanda yan etki ile karşılaşılmasını potansiyel olarak azaltmaktadır. Lipozomlar lipit içeriği sebebi ile organizma ile biyolojik olarak uyumludur ve sentetik ilaçlara göre biyolojik bozunmaya uğramaları kolaydır. Bu sebeple içerisine yüklenen molekülden bağımsız olarak toksisite riski düşüktür. Ayrıca belirli bir etki alanını hedefleyecek şekilde tasarlanabilirler. Böylece dokuya spesifik bir etki sağlanmış olur. Lipozom, yüklenen moleküllerin stabilitesini artırarak, onları girdiği ortamdaki enzimler ve mikroorganizmalar gibi dış etkenlerden korur. Yüklenen molekülden maksimum verim elde edilebilmesine olanak sağlamaktadır. Bütün bu olumlu etkiler, kullanım ve uygulama kolaylıkları sebebiyle lipozomlar çeşitli moleküllerin ilaç taşıyıcı sistemlere entegre edilmesi için en çok çalışılmış nano ilaç taşıyıcı sistemlerdir (64,67).

Temel olarak geleneksel, PEGile edilmiş (PEG bağlanmış), ligand hedefli ve multifonksiyonel lipozom olmak üzere dört farklı türü olmakla birlikte bu türlerden geliştirilen pH ve ısıya hassas, katyonik, uzun dolaşımlı, polimerize gibi birçok alt tür lipozom mevcuttur (Şekil 2.9.) (68,69).



Şekil 2.9. Lipozom yapısı ve türleri (69)

Birçok açıdan avantajlı ilaç taşıma sistemleri olsalar da lipozomlar hakkında kısıtlayıcı durumlar söz konusu olabilmektedir. Nano yapının stabilitesinin sağlanması konusu ilaç dağıtım sistemleri için oldukça önemlidir. Stabilitenin sağlanamaması halinde lipozomun hazırlanması, depolanması, vücuttaki barınma ömrü ve etken maddenin salımı adımları da etkilenmektedir. Bu efektif bir ilaç salımı için istenmeyen bir durumdur. Lipozom yapısındaki lipitlerin okside olma ihtimali, suda çözünebilen ilaçların sızıntı yapması, kan bileşenlerinin varlığı, zayıf depolama kararlılığı, sterilizasyon sorunu gibi sebeplerle molekül çeşidine göre kullanımı sınırlı olabilmektedir (69,70).

Doğal kaynaklı bileşenlerin organizmada karşılaştıkları değişken ortam pH'sı, enzimler, kan bileşenleri, hızlıca metabolize olmaları gibi etkenler emilimlerini ve biyoyararlanımlarını azaltmaktadır. Dolayısıyla hastalıkları önleme veya iyileştirmede beklenen verimleri düşük kalabilmektedir. Bunu önlemek için verilmesi gereken doz miktarı artırıldığında, bu dozlar da oral alım için yüksek kalmaktadır. Ayrıca bu tip bileşenlerin genellikle bir çözücü yardımıyla verilmesi gerekir ve bu çözücü çoğunlukla dimetil sülfoksit (DMSO) gibi organik maddeleri kolaylıkla çözen ancak fazla miktarlarında toksisite riski yüksek olan çözücüler olmaktadır. Bu sebeple oral alımla beraberinde yüksek miktarda çözücü uygulaması gerekeceğinden toksisite

riski daha da artabilmektedir. Doğal bileşenlerin, lipozomal formda verildiğinde organizmada karşılaştığı ortamlara karşı direncinin arttığı, dolaşımda kalış sürelerinin uzadığı, emilim oranlarında artış olduğu görülmüştür. Dolayısıyla biyoyaralanımının arttığı, antioksidan, antiinflamatuar, antimikrobiyal gibi faydalı özelliklerini daha çok yansıttığı ve tedavi edici potansiyelini daha belirgin bir şekilde ortaya koyabileceği gösterilmiştir. Lipozomun kendisi moleküller için bir taşıyıcı ve çözücü görevi göreceği için toksik çözücülere karşı maruziyeti de azaltmaktadır (71,72).

Son dönemde yapılan çalışmalarda doğal bir bileşen olan piperin için de farklı türlerde nano ilaç taşıyıcı sistem formülasyonlarının denendiği görülmektedir. Lipozomal olarak uygulama yapılan çalışmalarda piperinin daha geç bozunmaya uğradığı, sıcaklık artışı ve ortam pH'sına karşı stabilitesini daha iyi koruyabildiği ve buna bağlı olarak veriminde artış görüldüğü söylenmiştir. Bununla birlikte henüz güncel bir konu olduğu için yeterince veri bulunmadığı belirtilerek farklı formülasyonların denenmesi ve çalışmaların yapılması gerekliliği vurgulanmıştır (73,74).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Araştırmada Trakya Üniversitesi Deney Hayvanları Birimi'nden sağlanan toplam 40 adet sağlıklı yetişkin erkek Wistar albino rat kullanıldı. Standart diyet ve su ile *ad libitum* beslenen ratlar, %60 nem oranına sahip, 22±2ºC oda ısısında ve 12 saat aydınlık 12 saat karanlık döngüsünde barındırıldı. Çalışmaya başlamadan önce ve çalışma sonunda ratların ağırlıkları ölçüldü.

Çalışma Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 27.07.2022 tarihinde TÜHADYEK – 2022/26 no'lu 2022/07 sayılı oturumda onaylandı.

Kullanılan Kimyasal Maddeler

1,2-dioleil-sn-glisero-3-fosfatidil kolin (DOPC) (Sigma Aldrich)

%0.9 NaCI çözeltisi

Dimetil Sülfoksit (DMSO) (Sigma Aldrich)

Etanol (Sigma)

Formol

Isoproterenol hidroklorür (Sigma Aldrich)

Kloroform

Kolesterol (Sigma)

Mannitol (Merck)

Piperin (Sigma Aldrich)

Sodyum Asetat (Merck)

Sodyum Fosfat (Merck)

Sodyum Klorür (Merck)

Yumurta lesitini (Sigma)

Kullanılan Sarf Malzemeler

Balon joje

Beher

Biyokimya Kan Tüpü

Deney tüpleri

Diyaliz Membranı (SERVA)

Erlen

Mikropipet Uçları

Mikrosantrifüj Tüpü

Otomatik pipetler (Eppendorf, ISOLAB)

Puar

Kullanılan Laboratuvar Gereçleri

Distile su cihazı (Nüve NS245)

Etüv (Daihan Scientific)

Hassas terazi (Sartorius)

Homojenizatör (IKA T18 Digital ULTRA TURRAX)

Manyetik Karıştırıcı (Wisd MSH-20A)

Mikroplate spektrofotometre (Biotek µquant MQX200)

Santrifüj (Rotofix-32,Hettich)

Soğutmalı Santrifüj (Hermle/Z36K)

Ultrasonik su banyosu (WEIGHTLAB, WF-UD2)

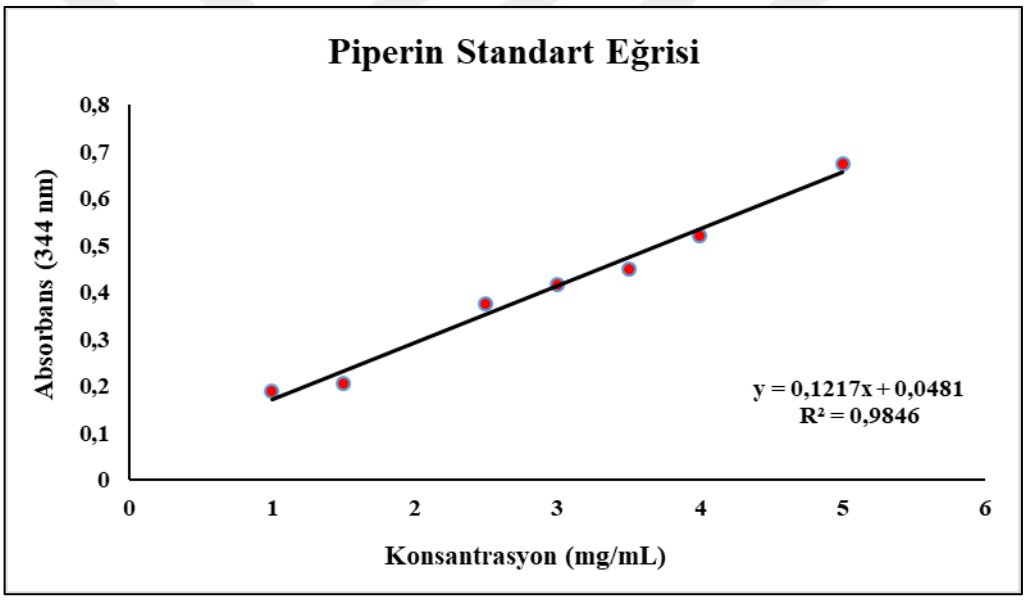
UV-Vıs spektrofotometre (Optizen POP)

Vorteks (VELP)

3.1. Lipozomal Piperin Sentezi

Çalışmada uygulanan lipozomal piperinin sentezi, piperin salım ve stabilite çalışmaları Trakya Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda yapıldı. Lipozomal piperin sentezi, Şanlıer ve ark. tarafından modifiye edilen metodlar referans alınarak gerçekleştirildi (75).

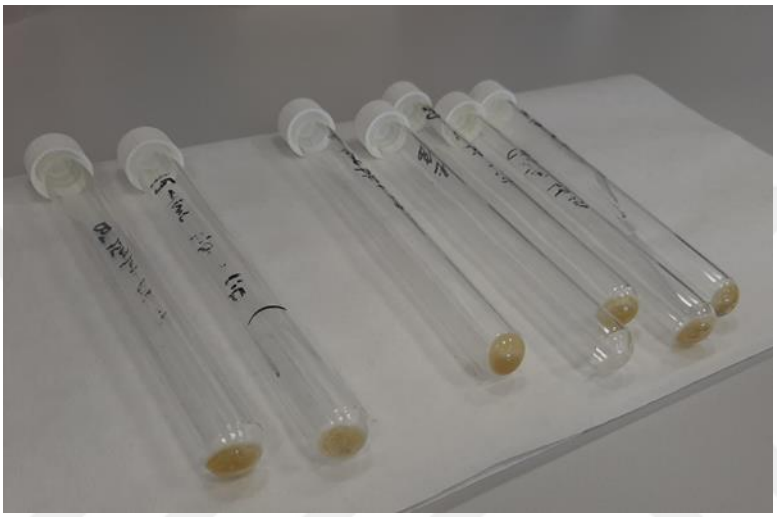
Piperin tayini, spektrum taraması yapılarak gerçekleştirildi. Kloroform içerisinde piperinin absorbsiyon maksimum değerinin 344 nm dalga boyunda olduğu tespit edildi. Numune 2 mg/ml konsantrasyondan 500 kat seyreltilerek ölçüldü ve okunan absorbans değeri 1,180 olarak kaydedildi. 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4 mg/mL konsantrasyonlarında kalibrasyon eğrisi oluşturuldu (Şekil 3.1.).



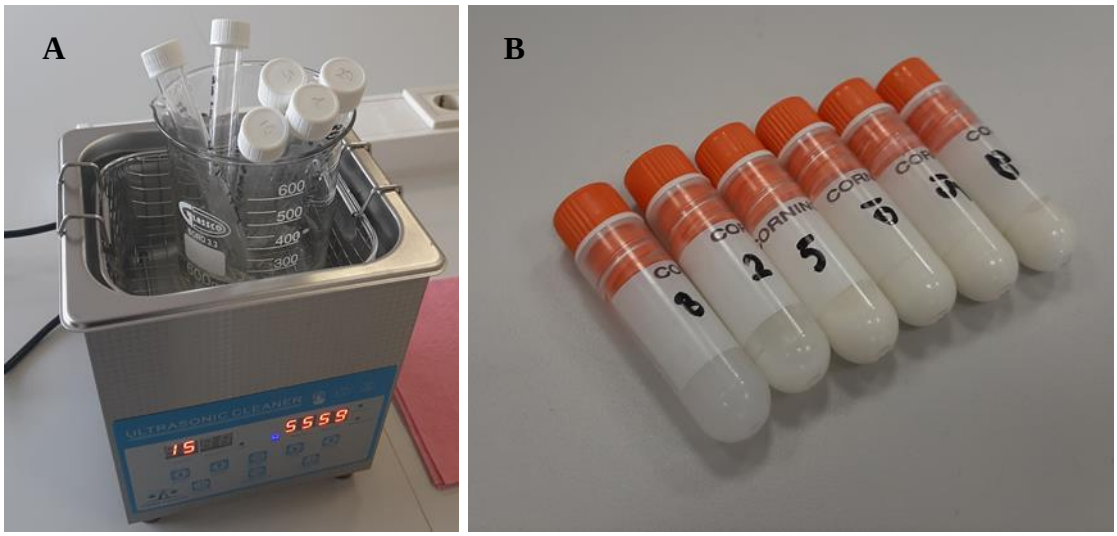
Şekil 3.1. Piperin Standart Eğrisi

Lipozomal piperinin hazırlanmasında lipit olarak yumurta lesitini, 1,2-dioleil-sn-glisero-3-fosfatidil kolin (DOPC) ve kolesterol kullanıldı. Lipitlerin tartımı 7 farklı tüpün içerisinde, her bir tüpte 7 mg yumurta lesitini, 7 mg DOPC ve 6 mg kolesterol olacak şekilde yapıldı. 2, 5, 10, 15, 20 mg/ml şekildeki farklı konsantrasyonlarda, 4 ml kloroform ile hazırlanan piperin çözeltileri lipitlerin bulunduğu tüplere, tüp çeperlerini yıkayacak şekilde eklendi.

Piperin çözeltileri ile yıkanan tüpler gece boyu ağızları açık bir şekilde 50ºC lik sabit sıcaklıklı etüvde buharlaştırıldı. Buharlaşma işlemine tüp çevresinde bir film tabaka oluşana kadar devam edildi (Şekil 3.2.). Daha sonra film tabaka 2 ml'lik 0,32 M mannitol çözeltisi ile hidrate edildi (Şekil 3.3.A). Sonrasında tüplerin kapakları kapatılarak sonik banyo ile 60 dakika boyunca inkübasyonu sağlandı ve lipozomal piperin elde edildi (Şekil 3.3.B). Boş lipozomlar, aynı metod takip edilerek sentezlendi ancak piperin içermemekte idi.



Şekil 3.2. Lipit film tabaka



Şekil 3.3. Lipit film tabaka hidrasyonu (A: Sonikatör içerisinde lipozom hidrasyonu, B: Hidrete edilmiş lipozomlar)

Lipozoma yüklenen piperin miktarı, üst fazda kalan piperin miktarının sentez başlangıcında koyulan piperin miktarından çıkarılması ile tespit edildi. Piperinin miktar analizi

için öncelikle UV-Vıs spektrofotometrik spektrum taraması yapıldı ve absorbsiyon maksimumunda spektrofotometrik ölçüm yoluyla miktar analizi gerçekleştirildi. Lipozom içerisine enkapsüle edilecek olan piperin miktarı optimizasyon çalışmaları sonucunda tespit edilerek, 7 farklı konsantrasyonda hazırlanan nanopartiküllerin piperin içerikleri aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplandı ve bağlanma verimi tanımlandı.

$$Enkapsülasyon\ Verimi\ (\%) = \frac{Bağlanmayan\ İlaç\ Miktarı}{Başlangıç\ İlaç\ Miktarı}\ x\ 100$$

Yapılan hesap sonucunda optimum konsantrasyon değeri tespit edildi ve lipozom sentezine bu konsantrasyon üzerinden devam edildi. Aynı metod kullanılarak, seçilen optimum konsantrasyonda lipozomlar hazırlandı.

Oluşan sıvı form eppendorflara alınarak 60 dakika boyunca soğutmalı santrifüjde 14000 rpm ve 4 ºC de santrifüj edildi. İlk santrifüjden sonra eppendorfta oluşan üst faz başka bir tüpe aktarıldı. Kalan çökelti, distile su ile yıkaması yapılarak tekrar soğutmalı santrifüjde 14000 rpm ve 4 ºC de santrifüj edildi. Bu işlem toplam 3 kez yıkama olacak şekilde tekrarlandı. Son kalan çökeltide lipozomal piperin nanopartiküllerinin son hali elde edilmiş oldu (Şekil 3.4. A).

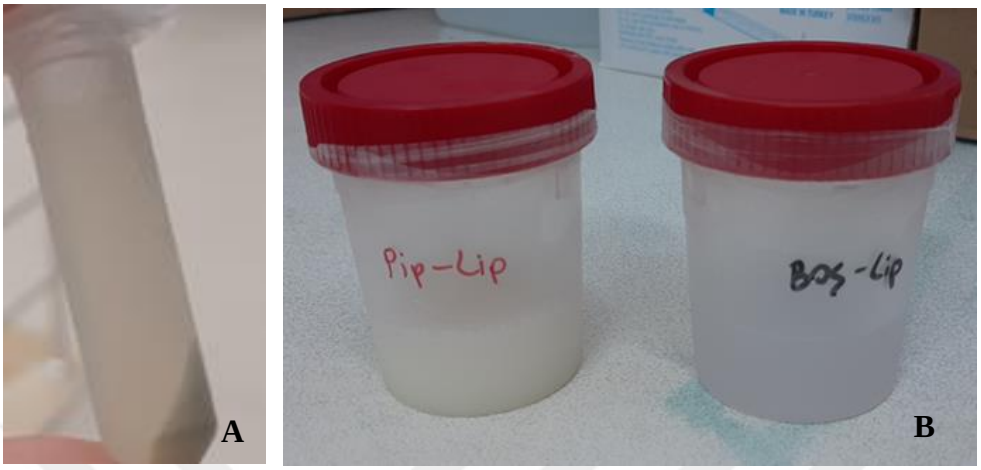
Sonrasında elde edilen nanopartiküller % 0.9 NaCI çözeltisi içerisinde disperse edilerek ratların oral alımı için uygun bir sıvı haline getirildi. Her bir rat için 20 mg piperin/kg/gün dozda olacak şekilde, 1 mL hacminde optimum miktarda piperin içeren lipozom oral olarak verilmeye hazır hale getirildi (Şekil 3.4.B).

Stabilite çalışması +4°C'de, sentezlenen lipozomların oral kullanımı için hazırlanan ortam (% 0,9 NaCI çözeltisi) içerisinden üç ay boyunca örnek alınarak gerçekleştirildi (Şekil 3.5.). Stabilite kararının verilmesinde, piperinin etkinliğinin inceleniyor olması nedeniyle, kullanılan ortama salınan piperin miktarının tayini yoluyla karar verildi.

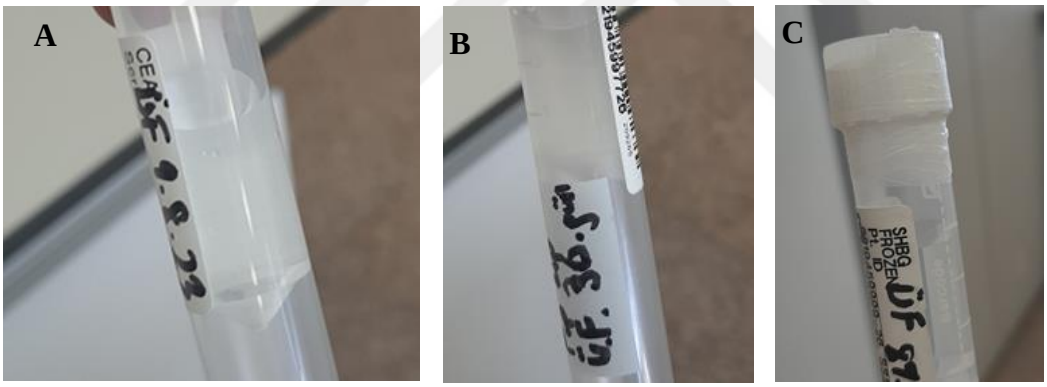
Lipozomal piperinin salım profilinin belirlenmesinde Diyaliz Torbası Metodu (76). kullanıldı. Salım çalışması pH 1,2 ve pH 4,5 ortamlarında gerçekleştirildi. Uygun pH aralıklarını sağlamak için asetat ve HCl kullanıldı.

Lipozomal piperin için deney üç tekrar olacak şekilde gerçekleştirilerek değerlerin ortalamaları alındı. Salım çalışmasına 176. saate kadar devam edildi. Serbest piperin için deney

iki tekrar olacak şekilde gerçekleştirilerek değerlerin ortalamaları alındı. Salım çalışmasına 149. saate kadar devam edildi.



Şekil 3.4. Uygulamaya hazır hale gelen lipozomal piperin (A: Lipozomal piperin, B: % 0.9 NaCI çözeltisi içerisinde disperse edilmiş lipozomal piperin ve boş lipozom)



Şekil 3.5. Lipozomal piperin stabilite çalışması (A: 15. gün alınan örnek, B: 30. gün alınan örnek, C: 89. gün alınan örnek)

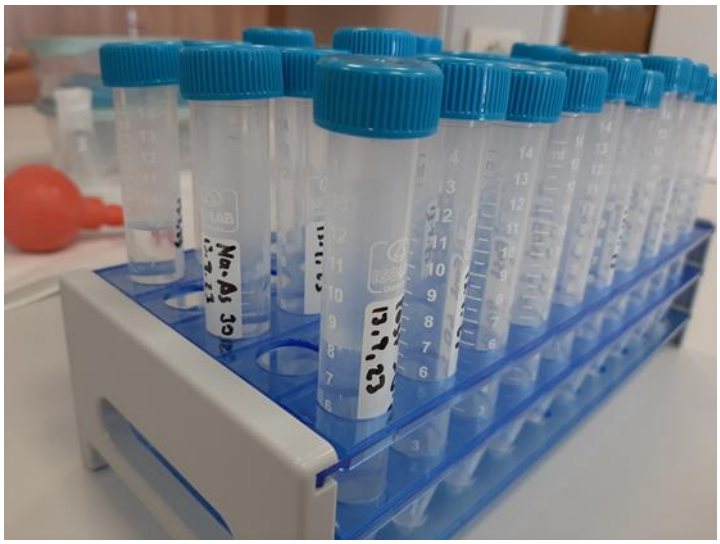
Lipozomlar sentezlendikten sonra pH 1,2 ve pH 4,5 olan iki farklı tamponla birlikte ayrı diyaliz membranlar içerisine yerleştirildi (Şekil 3.6.). Amber şişe içerisine diyaliz membranların içerisindeki tampon ile aynı tamponlardan konuldu ve sink koşulu sağlamak için 37ºC de manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirildi (Şekil 3.7.). Belirli saat aralıklarında şişedeki tampondan örnekler toplandı (Şekil 3.8.). Toplanan örnekler UV-Vıs spektrofotometresinde 344 nm dalga boyunda ölçülerek absorbans değerleri kaydedildi.



Şekil 3.6. Diyaliz membran içerisinde lipozomal piperin



Şekil 3.7. pH 1,2 ve pH 4,5 ortamlarında lipozomal piperin



Şekil 3.8. Diyaliz torbası metodunda örnek alımı

Serbest piperinin salım çalışması, piperin çözücüsü DMSO (% 4) içeren pH 1,2 ve 4,5 ortamlarında aynı metodla gerçekleştirildi (Şekil 3.9.). Toplanan örnekler UV-Vıs spektrofotometresinde 344 nm dalga boyunda ölçülerek absorbanslar kaydedildi. Elde edilen absorbans değerleri ile lipozomal ve serbest piperinin salım profilleri grafikler üzerinden karşılaştırıldı.



Şekil 3.9. pH 1,2 ve pH 4,5 ortamlarında serbest piperin

3.2. Lipozomal Piperin Karakterizasyon Çalışmaları

Karakterizasyon aşamasında kullanılan yöntemler olan zeta potansiyel, dinamik ışık saçılımı, atomik kuvvet mikroskopu ve ilaç salım kinetik analizi nanopartiküllerin biyolojik ortamlardaki davranışlarının, fizikokimyasal ve morfolojik özelliklerinin tanımlanmasını sağlar.

Lipozomal piperinin dinamik ışık saçılımı (DLS) ve zeta potansiyel analizleri Ege Üniversitesi ARGEFAR'dan hizmet alımı yapılarak gerçekleştirildi. Lipozomal piperinin görüntülenmesinde atomik kuvvet mikroskobu (AFM) kullanıldı. AFM ölçümleri Gazi Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü Malzeme Karakterizasyon Laboratuvarında gerçekleştirildi. İlaç salım kinetik analizi matematiksel formülasyon denklemleri kullanılarak hesaplandı.

Nanopartikülleri çevreleyen çift tabakalar iç ve dış yüzeylerinde yüklü iyonlardan oluşan elektriksel çift katman yapısına sahiptir. Sulu çözelti içerisindeki nanopartiküller elektrik alana maruz kaldığında sahip oldukları yüzey yükü doğrultusunda elektroforetik mobilite gösterirler. Bu hareket esnasında elektrik çift katmanı ile içerisinde bulunduğu çözelti arasında bir itme-çekme kuvveti açığa çıkmaktadır. Kayma düzlemi ile parçacık sınırında oluşan potansiyel enerji farkı ölçülerek nanopartikülün zeta potansiyel enerjisi tanımlanır. Zeta potansiyel yükü ± 20-30 mV olan nanopartiküllerin çözelti içerisinde stabiliteleri yüksektir (77).

Sulu çözelti içerisinde bulunan nanopartiküller, çözelti içerisine bir ışık kaynağı ile geçirilen ışığı, yarıçapları ile orantılı bir kuvvet ile yansıtır. Saçılan ışığın şiddeti ve bu şiddetin değişiminin ölçülmesi ile partikül boyutu hakkında veri elde edilir. Bu veri DLS analizi ile elde edilir, bu sayede partikülün ilgili nano boyut aralığında olup olmadığı anlaşılır (78).

Lipozomların morfoloji ve şekil özelliklerinin tanımlanması için tercih edilen mikroskobik tekniklerden birisi atomik kuvvet mikroskobudur (AFM). Biyolojik membranların yapısal olarak incelenmesi için lipit katmanlarının görüntülenebilmesi gerekmektedir. AFM ile uygulanan görüntüleme tekniği hareketli, katı bir bariyer alan yardımı ile kolloidal veya sıvı faz içerisinde hareket halinde bulunan nano lipit tabakanın hava-su arayüzüne yayılarak tutunmasını sağlamaktadır. Katı bariyere tutunumu sağlanan partiküllerin lazer ışınları ile analizi yapılarak görüntüsü alınır ve şekil, yüzey özellikleri, iç yapısı gibi veriler elde edilir. AFM lipit yapıların nano düzeyde gerçek zamanlı ölçümünün yapılması ve numuneye boyama, etiketleme gibi herhangi bir müdahale yapılmaması gibi avantajları sebebiyle lipozom görüntülenmesi için öncelikli olarak tercih edilmektedir (79-81).

Çalışmada AFM ölçümleri için, lipozomal formülasyonlar ultrasaf suyla seyreltilerek doğrudan mika alt tabaka yüzeyine damlatıldı ve oda sıcaklığında yaklaşık dört saat kurumaya bırakıldı. AFM çalışmaları, XE-7 AFM (Park Systems Corp., Suwon, Kore) ile SmartScan ™ programı kullanılarak gerçekleştirildi. Örneklerin yüzey topografya görüntüleri bir piezo tarayıcı ile 12,5 × 12,5 μm2 alanlar için kaydedildi. Tarama işlemi, 0,8 Hz tarama hızında tapping modda gerçekleştirildi. Tarama işlemleri için yaklaşık 10 nm yarıçaplı, parabolik şekilli, 40 N/m normal yay sabitine sahip elmas kantilever (NSC15, MikroMasch, Estonya) kullanıldı. Topografya, yüzey pürüzlülüğü (Ra) ve lipozom çapı dahil olmak üzere tüm analizler XEI-7 Görüntü İşleme Programı (Park Systems Corp. Suwon, Kore) kullanılarak gerçekleştirildi.

Bir ilaç organizmaya girdiği andan itibaren etken madde salımını etkileyen fiziksel faktörlerle karşılaşmaktadır. Bu koşullar altında kontrollü bir salım profili hedeflenerek kanda veya dokudaki ilaç konsantrasyonunun istenen düzeylerde kalması sağlanır. İlaç salım kinetiği olarak bilinen bu davranışın değerlendirilmesi için matematiksel formüller geliştirilmiştir. Bu sayede organizmaya giren ilacın ortamdaki kinetik davranış potansiyelini teorik olarak yorumlayabilmek mümkün olmaktadır. Matematiksel formülasyonlar istatistiksel, modele bağımlı ve bağımsız olmak üzere kategorize edilmektedir. Modele bağlı geliştirilen metodlar ilacın çözünme profilinin değerlendirilmesi için kullanılmaktadır (82).

Çalışmada piperin salımı kinetik davranışını değerlendirmek amacıyla modele bağlı metodlardan Zero Order, Higuchi, Korsmayer-Peppas ve Hixon-Crowell matematiksel modelleri kullanıldı. Modellerin uygunluğunun teyidi için korelasyon katsayısı (R^2) değerlendirildi ve en uygun model R^2 değeri en yüksek değer olan model olacak şekilde değerlendirme yapıldı (83).

3.3. Deney Hayvanı Protokolü

Çalışmada 40 adet yetişkin erkek Wistar albino cinsi rat kullanıldı. Ratlar; kontrol grubu, piperin grubu, ISO grubu, ISO+piperin grubu olmak üzere eşit sayıda rat içeren 4 gruba ayrıldı (Şekil 3.10). Uygulanacak piperin dozu önceki çalışmalar esas alınarak belirlendi (7-9).



Şekil 3.10. Ratların gruplandırılması

Kontrol grubu: On gün boyunca 1 mL boş lipozom oral olarak, 9. ve 10. günler % 0.9 NaCI çözeltisi intraperitoneal olarak verildi.

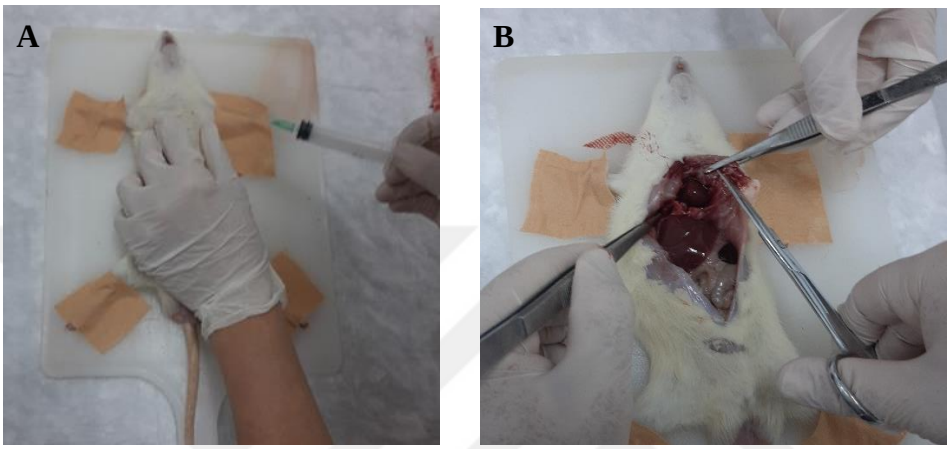
Piperin grubu: On gün boyunca 1 mL lipozomal piperin (20 mg/kg/gün) oral olarak, 9. ve 10. günler % 0.9 NaCI çözeltisi intraperitoneal olarak verildi.

ISO grubu: On gün boyunca 1 mL boş lipozom oral olarak, 9. ve 10. günler % 0.9 NaCI çözeltisi içerisinde çözülmüş isoproterenol (85 mg/kg/gün) 24 saat arayla toplam 2 kez intraperitoneal olarak verildi.

ISO+piperin grubu: On gün boyunca 1 mL lipozomal piperin (20 mg/kg/gün) oral olarak, 9. ve 10. günler % 0.9 NaCI çözeltisi içerisinde çözülmüş isoproterenol (85 mg/kg/gün) 24 saat arayla toplam 2 kez intraperitoneal olarak verildi.

3.4. Kan ve Doku Örneklerinin Alınması

Son ISO dozundan 24 saat sonra, her gruptan birer rat ayrıldı. Kalan tüm ratların anestezi altında kardiyak kan örnekleri alınarak sakrifikasyonları gerçekleştirildi (Şekil 3.11.A.) ve kalp dokuları çıkarıldı (Şekil 3.11.B.). Anestezik ilaç olarak 45 mg/kg dozda ksilazin ve 90 mg/kg Ketamin-HCl kombinasyonu kullanıldı.



Şekil 3.11. Ratların anestezi altında sakrifikasyon süreçleri

Biyokimya tüplerine alınan kan örnekleri 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen serumlar eppendorflara aktarıldı ve analiz gününe kadar Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda -80º C'de saklandı. Piperin grubundan 1 adet ratın serumu, hemolizli olması nedeniyle çalışma dışı bırakıldı. Bu sebeple piperin grubundaki istatistikler 8 adet rat üzerinden gerçekleştirildi.

Alınan kalp dokuları histopatolojik değerlendirilmenin yapılması için formol çözeltisi içerisinde Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'na teslim edildi. Her gruptan ayrılmış olan birer adet rat, on beş gün daha hiçbir uygulama yapılmadan, standart diyet ve su ile *ad libitum* beslenerek, %60 nem oranına sahip, 22±2ºC oda ısısında ve 12 saat aydınlık 12 saat karanlık döngüsünde barındırıldı. Ardından on beşinci günde aynı işlemler takip edilerek alınan dokular, inceleme için Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'na teslim edildi.

Ratlardan alınan kalp dokularının histopatolojik incelemesi Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi. Kalp dokuları tüm kalp duvarları görülebilecek şekilde horizontal sirküler örnekler halinde hazırlandı. Gece boyu alkol takibine alınan örnekler parafine gömüldü ve sonrasında 5 mikron kalınlığında kesitler alındı. Son ISO

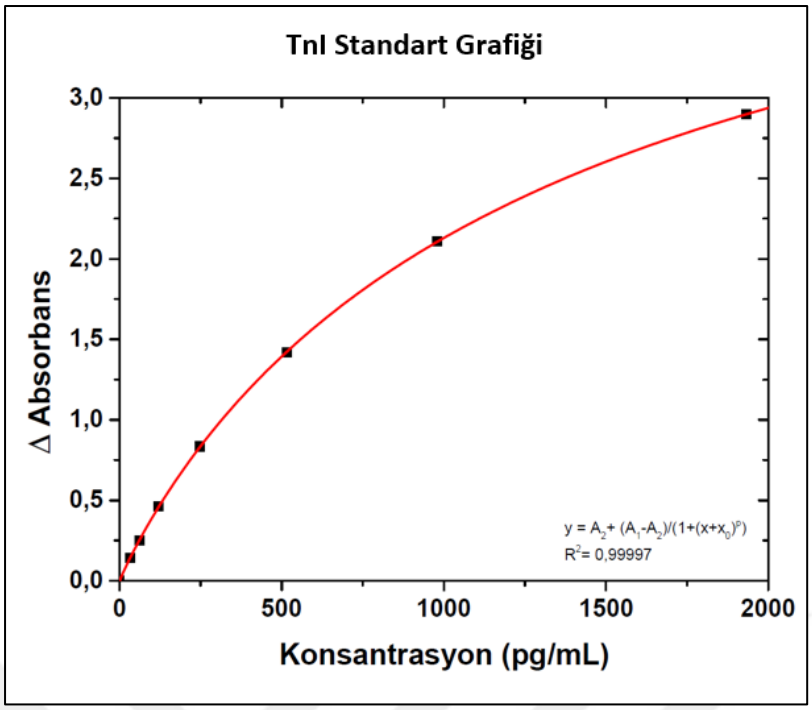
uygulamasından 24 saat sonraki örneklerden alınan kesitler Hematoksilen-eozin (HE) boyası, 15 gün daha yaşatılan ratların örneklerinden alınan kesitler Van-gieson boyası ile boyanarak ışık mikroskobunda değerlendirildi.

3.5. Kardiyak Troponin I Analizi

Serum TnI analizi, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda rat spesifik TNNI3/cTn-I (Troponin I Tip 3, Kardiyak) ELISA Kiti (ELABSCIENCE E-EL-R1253) kullanılarak 450 nm dalga boyunda yapıldı. Ölçümler iki kez tekrarlanarak ortalaması alındı.

Kit içerisinde bulunan mikroplaka kuyucukları TNNI3/cTn-I'ya spesifik bir antikor ile kaplı haldedir. Standart ve serum, kuyucuklara pipetlendiğinde spesifik antikor ile birleşmesi sağlanmış olur. Sonra sırası ile biyotinli saptama antikoru ve avidin-yaban turbu peroksidaz konjugatı (HRP) eklenerek oluşan antijen-antikor kompleksine bağlanması sağlanır. Substrat solüsyonu eklenir. Substratın eklenmesi ile birlikte enzim-substrat reaksiyonu başlar, renk değişimi gözlenir ve renk şeffaftan maviye döner. Son olarak enzim-substrat reaksiyonunu sonlandırmak için durdurma solüsyonu eklenir ve renk sarıya döner. Mikroplaka okuyucuda 450 nm dalga boyunda okunarak absorbans değerleri elde edilir. Sonuçlar kitte verilen standartların farklı konsantrasyonları ile elde edilen standart absorbsiyon grafiği üzerinden değerlendirilerek rat TNNI3/cTn-I için konsantrasyon değerleri hesaplanır.

Kit içeriğinde verilen standart solüsyon ve rat serumları kullanılarak belirtilen uygulama prosedürleri takip edildi ve TnI düzeyleri için absorbans ölçümleri yapıldı. Ölçümler iki tekrar olacak şekilde yapılarak değerlerin ortalaması alındı. Standart solüsyon kullanılarak sekiz farklı konsantrasyonda örnek hazırlandı. Sekiz farklı konsantrasyondan elde edilen absorbans değerlerine göre TnI standart grafiği Origin Pro (Free Learning Edition) Grafik programı kullanılarak çizildi (Şekil 3.12.). Rat serumları kullanılarak ölçülen absorbans değerleri Fortran 77 (Intel Fortran Free) programı kullanılarak grafik denkleminde yerine yazıldı ve her bir örnek için TnI konsantrasyonu hesaplandı.



Şekil 3.12. TnI standart grafiği

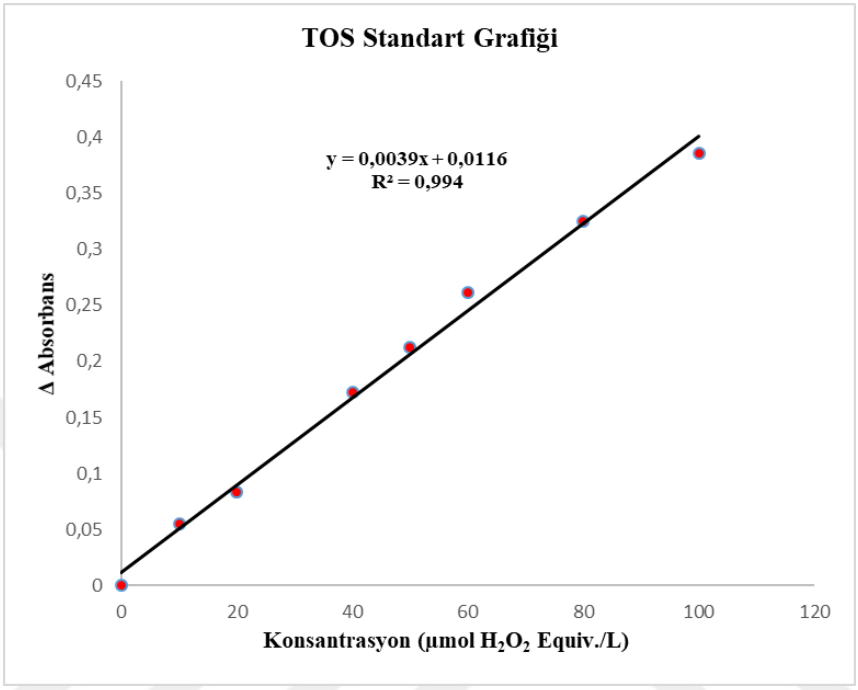
3.6. Total Oksidan Durum (TOS) Analizi

Serum TOS analizi, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda kolorimetrik kit (ELABSCIENCE E-BC-K802-M) kullanılarak 530 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü. Ölçümler iki kez tekrarlanarak ortalaması alındı.

Asidik koşullarda ortamdaki oksitleyici madde Fe^{+2} iyonlarını Fe^{+3} haline okside eder. Bu oksidasyonda ksilenol turuncusu yüksek oranda bağlanarak mavi-mor bir renk alır. Oluşan renk, pH 2-3 aralığında ve belirli zaman diliminde ortamdaki oksidan madde varlığı ile doğru orantılı olarak koyulaşır. Bu aşamada 530 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapıldığında serum TOS değeri indirekt olarak hesaplanır. Sonuçlar kitte referans standart olarak verilen H_2O_2'nin farklı konsantrasyonları ile elde edilen standart absorbsiyon grafiği üzerinden değerlendirilir.

Kit içeriğinde verilen standart solüsyon ve rat serumları kullanılarak belirtilen uygulama prosedürleri takip edildi ve TOS düzeyleri için absorbans ölçümleri yapıldı. Ölçümler iki tekrar olacak şekilde yapılarak değerlerin ortalaması alındı. Standart solüsyon kullanılarak sekiz farklı konsantrasyonda örnek hazırlandı. Sekiz farklı konsantrasyondan elde edilen absorbans

değerlerine göre TOS standart grafiği Microsoft Excel programı kullanılarak (Şekil 3.13.) çizildi. Rat serumları kullanılarak ölçülen absorbans değerleri Excel programı üzerinde grafik denkleminde yerine yazıldı ve her bir örnek için TOS konsantrasyonu hesaplandı.



Şekil 3.13. TOS standart grafiği

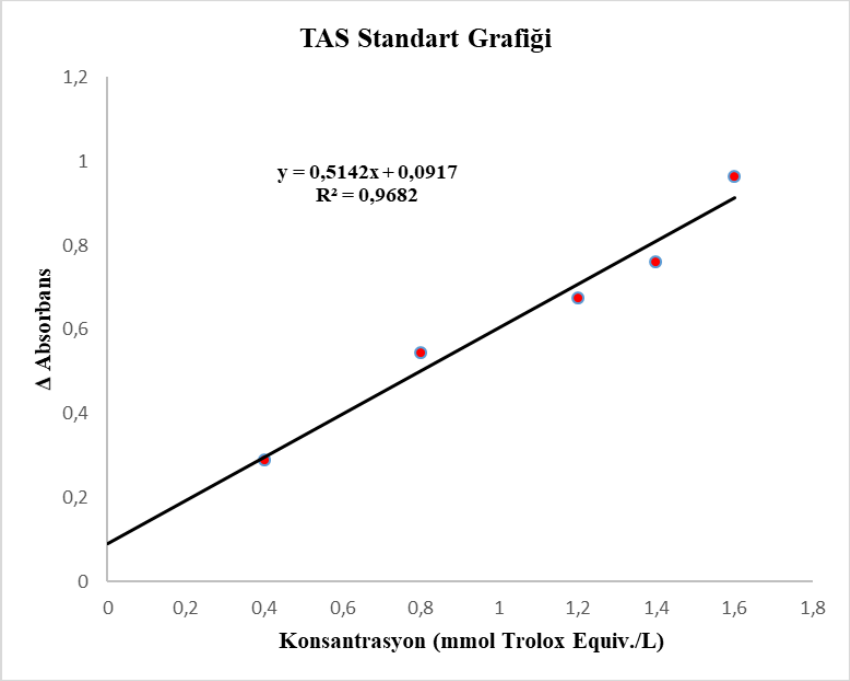
3.7. Total Antioksidan Durum (TAS) Analizi

Serum TAS analizi, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda kolorimetrik kit (ELABSCIENCE E-BC-K801-M) kullanılarak 660 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü. Ölçümler iki kez tekrarlanarak ortalaması alındı.

Yeterli oksidan varlığında 2,2´-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonat) (ABTS) okside olarak yeşil renk verir. Bu reaksiyon antioksidan varlığında azalır ve renkte açılma meydana gelir. Serum TAS değeri okside ABTS miktarının 660 nm dalga boyundaki absorbans değerinin belirlenmesiyle tespit edilir. Elde edilen absorbans değerleri antioksidan durum için referans standart olarak gösterilen Trolox'un farklı konsantrasyonları ile elde edilen standart absorbsiyon grafiği üzerinden değerlendirilir.

Kit içeriğinde verilen standart solüsyon ve rat serumları kullanılarak belirtilen uygulama prosedürleri takip edildi ve TAS düzeyleri için absorbans ölçümleri yapıldı. Ölçümler iki tekrar olacak şekilde yapılarak değerlerin ortalaması alındı. Standart solüsyon kullanılarak sekiz farklı konsantrasyonda örnek hazırlandı. Sekiz farklı konsantrasyondan elde edilen absorbans değerlerine göre TAS standart grafiği Microsoft Excel programı kullanılarak (Şekil 3.14.) çizildi.

Rat serumları kullanılarak ölçülen absorbans değerleri Excel programı üzerinde grafik denkleminde yerine yazıldı ve her bir örnek için TAS konsantrasyonu hesaplandı.



Şekil 3.14. TAS standart grafiği

3.8. Oksidatif Stres İndeksinin Hesaplanması

TAS birimi, µmol Trolox Equiv./L'ye çevrildi ve aşağıdaki formül kullanılarak oksidatif stres indeksi (OSİ) hesaplandı.

$$OS\dot{I} = \frac{TOS\ (\mu mol\ H2O2\ Equiv./L)\ x\ 100}{TAS\ (\mu mol\ Trolox\ Equiv./L)}$$

3.9. İstatistiksel Değerlendirme

Verilerin istatistiksel değerlendirmeleri SPSS 20.0 programı (Lisans no: 10240642) paket programı kullanılarak yapıldı. Her grupta verilerin parametrik varsayımları yerine getirip getirmediğini inceleyebilmek için normal dağılıma uygunluk ve varyans homojenliği testleri uygulandı. Parametrik test olarak gruplar arasındaki farklılıklar One-way ANOVA varyans analizi ve anlamlı fark varlığında çoklu karşılaştırma testi olarak Tukey ya da Tamhane post-hoc testleri ile değerlendirildi. Nonparametrik test olarak, Kruskal Wallis ve gruplar arası karşılaştırmalar için Mann-Whitney U testi kullanıldı. Grup içi ilk ve son ağırlık karşılaştırmalarında Paired-Samples T testi kullanıldı. Elde edilen değerler ortalama±standart sapma (Ort±SS) olarak ifade edildi ve $p<0.05$'in altındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Lipozomal Piperin Karakterizasyon Çalışma Sonuçları

Hesaplanan bağlanma verimi tüm konsantrasyonlar için %99 seviyesinde görüldü ve maksimum bağlanma veriminin %99,80 ile 20 mg/mL konsantrasyondaki piperin yüklü lipozomda olduğu bulundu (Tablo 4.1.) Çalışmada kullanılmak üzere maksimum bağlanma verimine sahip konsantrasyon seçildi.

Tablo 4.1. Lipozomların bağlanma verimleri

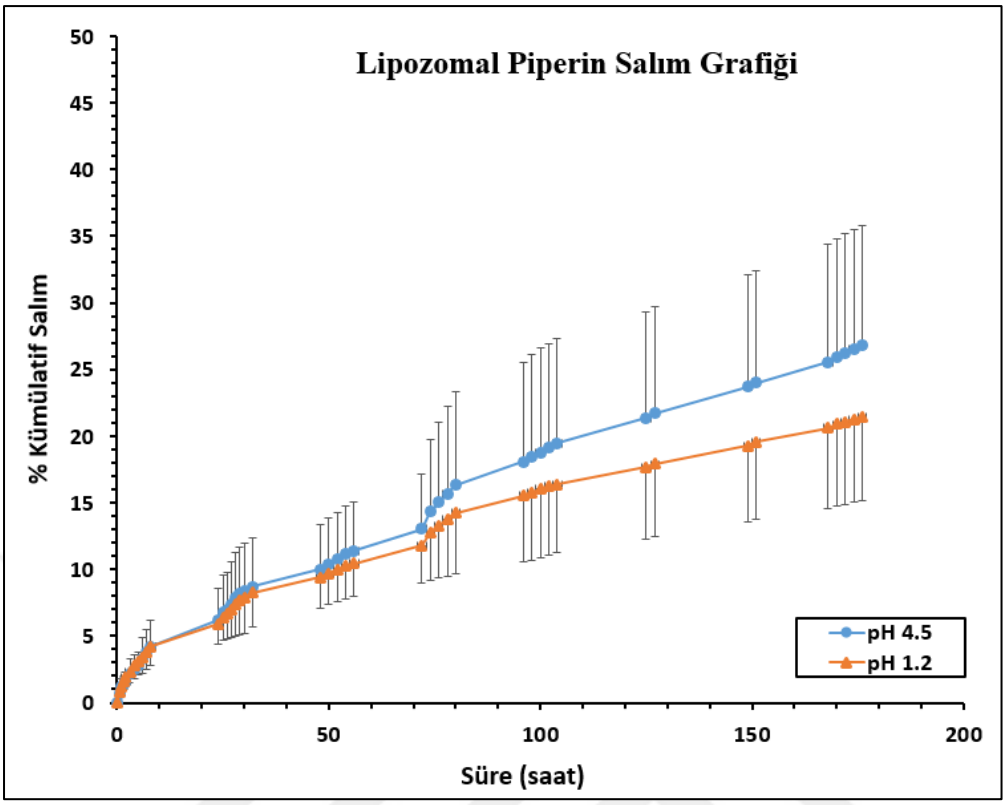
Piperin Konsantrasyonu (mg/mL)	Bağlanma Verimi (% ± SD)
2	99,20 ± 0,16
5	99,55 ± 0,08
10	99,64 ± 0,18
15	99,78 ± 0,04
20	99,80 ± 0,09

Tablo 4.2.'de hesaplanan salım miktarlarının başlangıç piperin konsantrasyonundan çıkarılmasıyla elde edilen, ortamda kalan piperin miktarları verilmiştir.

Tablo 4.2. Lipozom içerisinde korunan piperin yüzdesi

1. Tekrar		2. Tekrar		Ort ± SD
Süre (Gün)	Salınmadan Korunan Miktar (%)	Süre (Gün)	Salınmadan Korunan Miktar (%)	
0	100	0	100	0,00
14	99,70	15	99,85	0,11
39	99,50	29	99,60	0,07
69	99,00	59	99,00	0,00
84	98,60	89	98,15	0,32

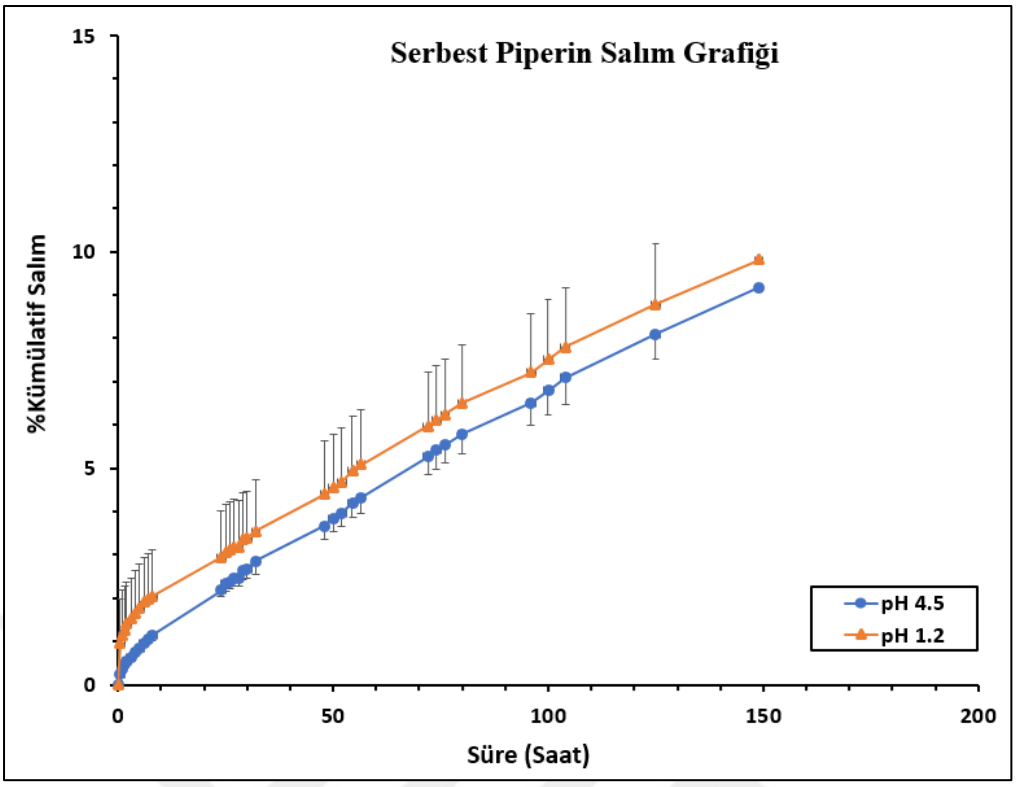
Lipozomal piperin ve serbest piperine ait ilaç salım profillerini gösteren grafikler sırasıyla Şekil 4.1 ve 4.2'te verilmiştir.



Şekil 4.1. Lipozomal piperinin pH 1,2 ve 4,5 ortamlarındaki salım grafiği

Lipozomal piperinin ilk 30 dakikadaki salım yüzdeleri pH 1,2 ve 4,5'te sırasıyla %0,78 ve %0,69 olarak kaydedildi. Bu oranlar ikinci ve altıncı saatlerde pH 1,2 için %1,90 ve %3,40 iken pH 4,5 için %1,59 ve %3,33 olarak kaydedildi.

Yirmi dört ve kırk sekizinci saatlerde ulaşılan salım yüzdeleri sırasıyla pH 1,2'de %5,90 ve %9,41 iken pH 4,5'te %6,21 ve %10,02 oldu. Yetmiş ikinci saate gelindiğinde pH 1,2 için salım yüzdesi %11,81'e ulaşırken pH 4,5 için bu oran %13,02 oldu. Yetmiş ikinci saatten sonra iki farklı pH ortamındaki salım yüzdeleri arasındaki farkın belirgin şekilde artmaya başladığı görüldü. 125. saate gelindiğinde pH 1,2 için kaydedilen değer %17,65 iken pH 4,5 için kaydedilen değer %21,37 oldu. Salım çalışmasının sonlandırıldığı 176. saatte pH 1,2'deki salım yüzdesi %21,44 iken pH 4,5'te ise %26,77'ye ulaştı.



Şekil 4.2. Serbest piperinin pH 1,2 ve 4,5 ortamlarındaki salım grafiği

Serbest piperinin ilk 30 dakikadaki salım yüzdeleri pH 1,2 ve 4,5'te sırasıyla %0,95 ve %0,25 olarak kaydedildi. Bu oranlar ikinci ve altıncı saatlerde pH 1,2 için %1,4 ve %1,92 iken pH 4,5 için %0,55 ve %0,97 olarak kaydedildi. Yirmi dört ve kırk sekizinci saatlerde ulaşılan salım yüzdeleri sırasıyla pH 1,2'de %2,94 ve %4,4 iken pH 4,5'te %2,19 ve %3,67 oldu. Yetmiş ikinci saate gelindiğinde pH 1,2 için salım yüzdesi %5,96'e ulaşırken pH 4,5 için bu oran %5,27 oldu. Yetmiş ikinci saatten sonra iki farklı pH ortamındaki salım yüzdeleri arasındaki farkta büyük bir artış gözlenmedi. İlerleyen süreçte 125. saate gelindiğinde pH 1,2 için kaydedilen değer %8,78 iken pH 4,5 için kaydedilen değer %8,1 oldu. Salım çalışmasının sonlandırıldığı 149. saatte pH 1,2'deki salım yüzdesi %9,81 iken pH 4,5'te ise %9,17'ye ulaştı.

Tablo 4.3.'te pH 1.2 ve pH 4.5 ortamlarında lipozomal piperin ve serbest piperinin saatlere göre salım yüzdelerinin karşılaştırması gösterilmiştir.

Tablo 4.3. Lipozomal ve serbest piperinin pH 1,2 ve pH 4,5 ortamlarında saatlere göre salım yüzdeleri

Süre	pH 1,2		pH 4,5	
(Saat)	Lip-Pip (% Salım)	Pip (% Salım)	Lip-Pip (% Salım)	Pip (% Salım)
0,5	0,78	0,95	0,69	0,25
2	1,90	1,40	1,59	0,55
6	3,40	1,92	3,33	0,97
24	5,90	2,94	6,21	2,19
48	9,41	4,40	10,02	3,67
72	11,81	5,96	13,02	5,27
96	15,52	7,21	18,08	6,50
125	17,65	8,78	21,37	8,10

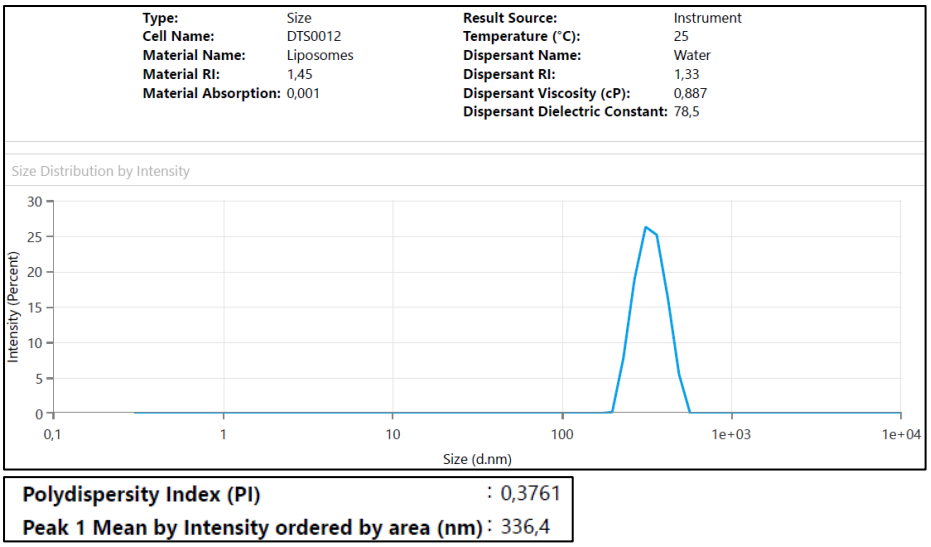
Lip-Pip: Lipozomal piperin, **Pip:** Serbest piperin.

Sentezlenen lipozomların DLS, zeta potansiyel ve AFM analiz sonuçları sırasıyla Şekil 4.3, 4.4 ve 4.5'te verilmiştir.

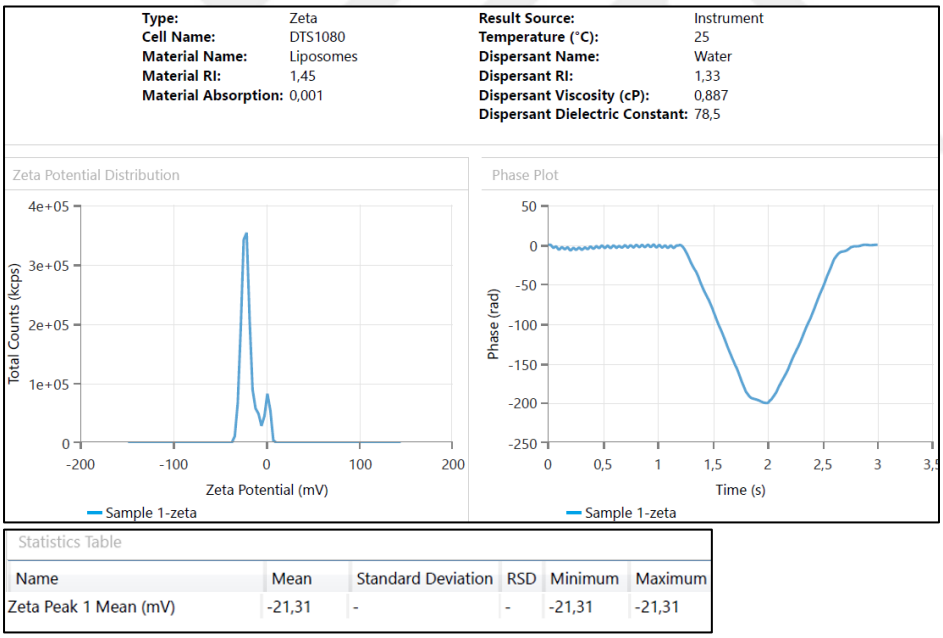
Zeta-sizer ile DLS analizi yapılarak 20 mg/mL konsantrasyonda piperin yüklü lipozomun 336,4 nm partikül çapı olduğu, polidispersite indeksinin (PDI) 0,38 olduğu belirlendi.

Zeta-sizer ile yapılan zeta potansiyel analizi, lipozomların -21,31 mV'luk zeta potansiyele sahip olduğunu gösterdi.

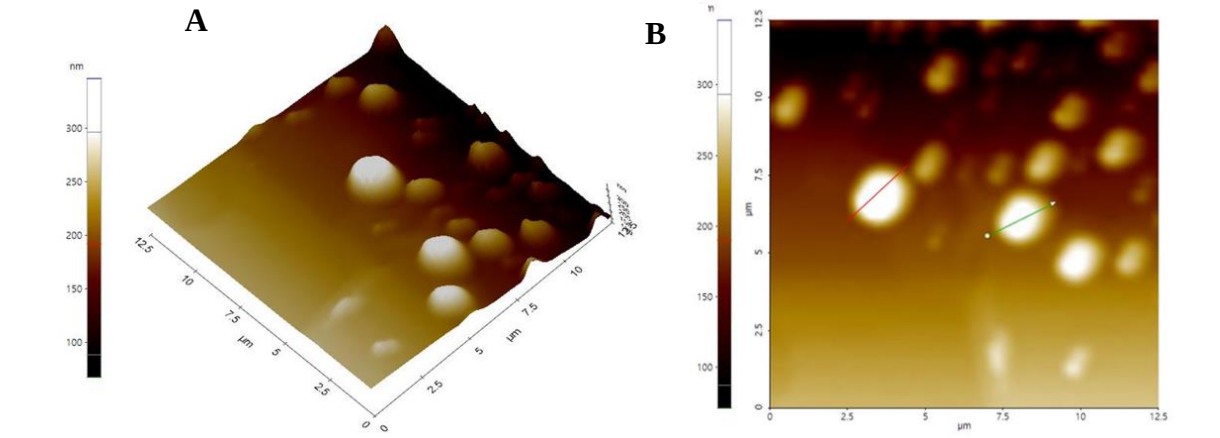
AFM analizi ile lipozomal piperin çap ölçümlerinin ortalama değer aralığının 321,187-339,934 nm ve yüzey pürüzlülük değeri (Ra) aralığının 39,335-44,108 nm olduğu saptandı. Boş lipozom çap ölçümlerinin ortalama değer aralığı 260,767-262,955 nm ve Ra aralığı 39,176-56,409 nm olarak ölçüldü.



Şekil 4.3. Lipozomal piperin DLS analizi
PDI: Polidispersite indeksi

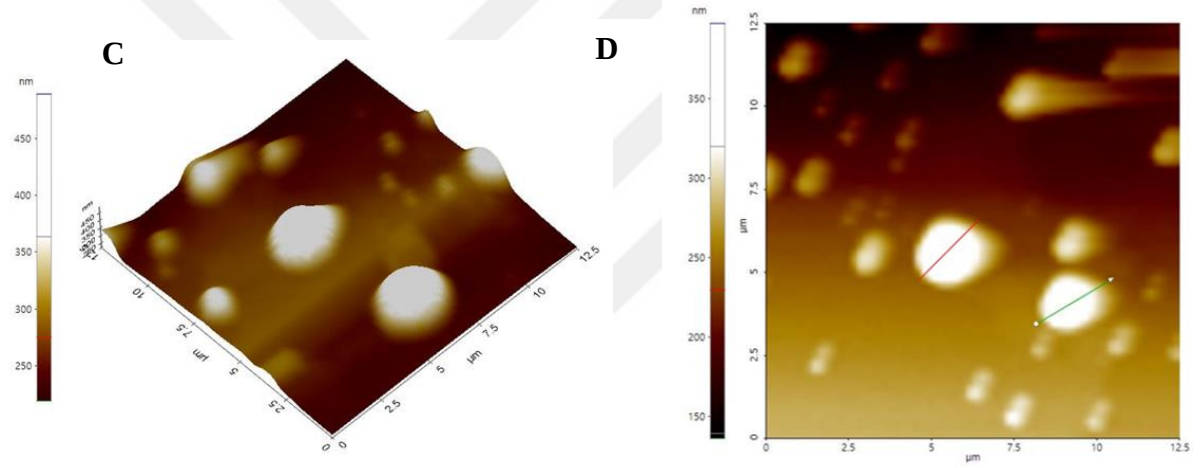


Şekil 4.4. Lipozomal piperin zeta potansiyel analizi



Statistics

Line	Min(nm)	Max(nm)	Mid(nm)	Mean(nm)	Rpv(nm)	Rq(nm)	Ra(nm)	Rz(nm)	Rsk	Rku
Red	163.549	335.260	249.404	260.767	171.712	61.921	56.409	N/A	0.210	1.447
Green	199.653	316.919	258.286	262.955	117.267	43.613	39.176	N/A	0.229	1.505

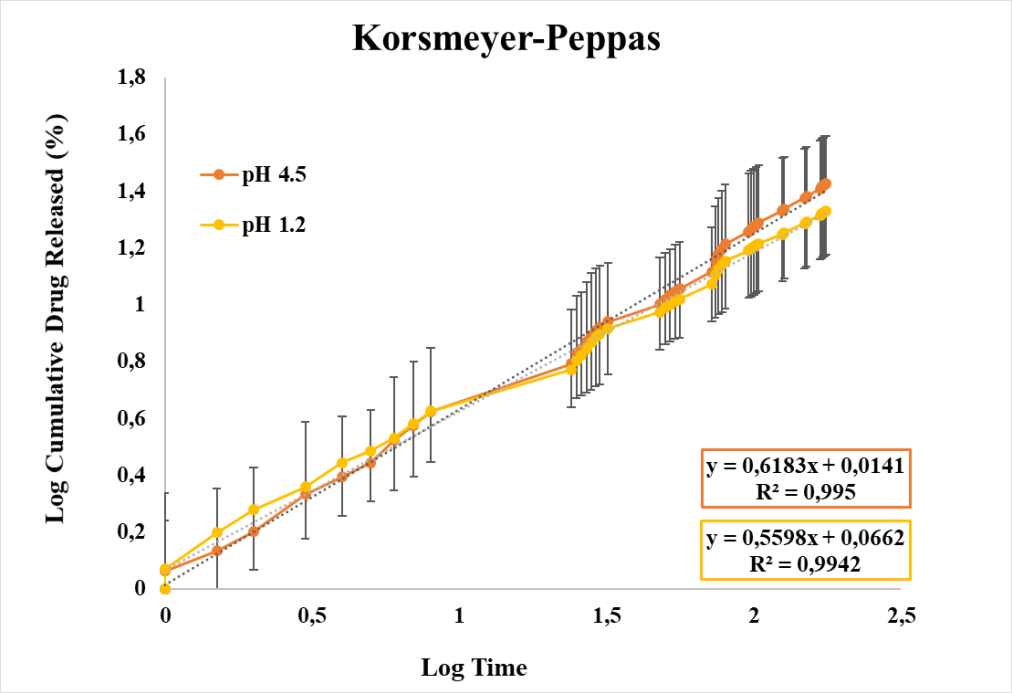


Statistics

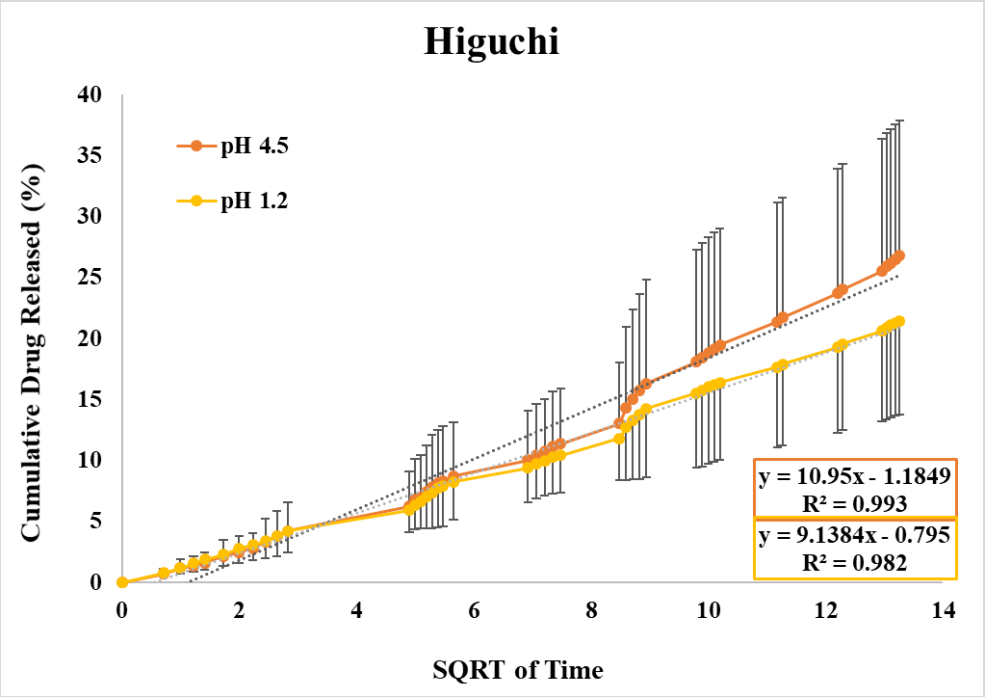
Line	Min(nm)	Max(nm)	Mid(nm)	Mean(nm)	Rpv(nm)	Rq(nm)	Ra(nm)	Rz(nm)	Rsk	Rku
Red	245.538	393.949	319.744	339.934	148.411	50.567	44.108	N/A	0.593	1.940
Green	248.049	375.824	311.936	321.187	127.776	44.073	39.335	N/A	0.266	1.598

Şekil 4.5. Lipozomların AFM analizi (A-B: Boş lipozom, C-D: Lipozomal piperin)

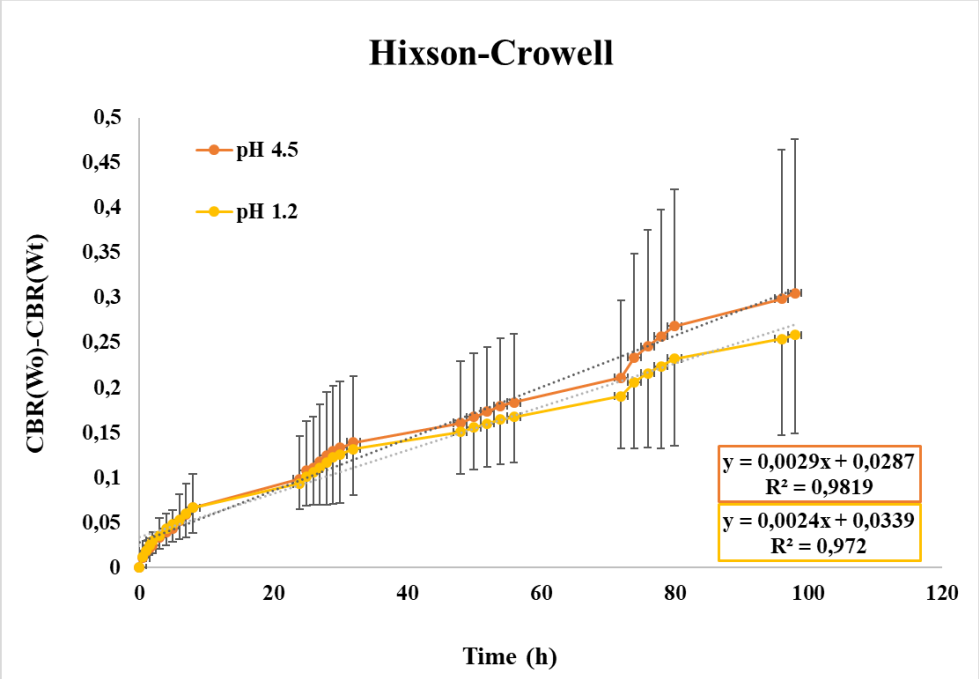
Her iki pH ortamı için en yüksek R^2 değerine sahip modelin Korsmayer-Peppas (Şekil 4.6.) modeli olduğu görüldü. İkinci sırada Higuchi (Şekil 4.7.) modeli yer almaktaydı. Üçüncü sırada Hixon (Şekil 4.8.) modeli ve dördüncü sırada en düşük R^2 değerine sahip Zero-order (Şekil 4.9.) modeli yer aldı.



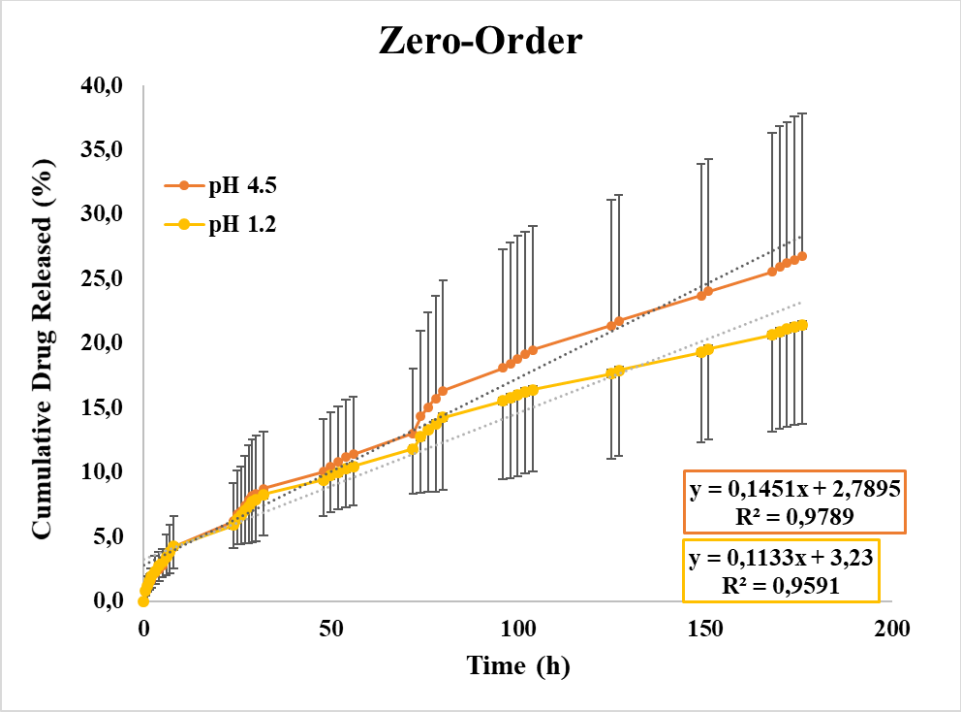
Şekil 4.6. Korsmayer-Peppas modeli kullanılarak gerçekleştirilen lipozomal piperin kinetik analiz grafiği



Şekil 4.7. Higuchi modeli kullanılarak gerçekleştirilen lipozomal piperin kinetik analiz grafiği



Şekil 4.8. Hixon-Crowell modeli kullanılarak gerçekleştirilen lipozomal piperin kinetik analiz grafiği



Şekil 4.9. Zero-order modeli kullanılarak gerçekleştirilen lipozomal piperin kinetik analiz grafiği

4.2. Biyokimyasal Analiz Sonuçları

Rat gruplarının ağırlıkları ve biyokimyasal parametreleri sırasıyla Tablo 4.4 ve Tablo 4.5'te görülmektedir.

Tablo 4.4. Rat Gruplarının İlk ve Son Ağırlıkları

Grup	İlk ağırlık (g)	Son ağırlık (g)
Kontrol		
1	215	242
2	216	234
3	232	251
4	216	236
5	211	214
6	219	269
7	230	244
8	229	239
9	225	250
ISO		
1	225	248
2	202	265
3	195	257
4	228	250
5	208	253
6	222	242
7	226	257
8	223	248
9	207	243
Piperin		
1	207	240
2	222	240
3	221	240
4	221	234
5	216	237
6	211	241
7	223	258
8	222	233
ISO+piperin		
1	231	258
2	227	241
3	233	253
4	224	226
5	217	223
6	230	257
7	212	246
8	223	233
9	224	235

ISO: İsoproterenol.

Tablo 4.5. Rat gruplarına ait biyokimyasal parametreler

Grup	TnI (pg/mL)	TOS (μmol H_2O_2 Equiv. L)	TAS (mmol Trolox Equiv. /L)	OSİ
Kontrol				
1	8,70	5,23	1,13	0,46
2	9,58	7,92	1,09	0,73
3	47,44	9,72	1,11	0,88
4	16,59	7,53	1,34	0,56
5	15,02	6,47	1,30	0,50
6	2,12	7,15	1,03	0,69
7	15,02	7,53	1,07	0,71
8	5,70	8,82	1,22	0,72
9	14,98	7,41	1,25	0,59
ISO				
1	21,68	8,86	1,16	0,76
2	111,35	8,69	1,06	0,82
3	63,65	11,39	0,93	1,22
4	25,90	11,90	1,14	1,04
5	47,46	11,00	1,11	0,99
6	66,10	16,64	1,17	1,43
7	109,43	8,44	0,87	0,97
8	63,65	11,39	1,06	1,08
9	64,01	14,21	1,00	1,41
Piperin				
1	14,67	5,62	1,07	0,52
2	20,92	4,08	1,12	0,37
3	17,29	9,46	1,30	0,73
4	18,88	3,82	1,21	0,32
5	19,55	7,41	1,16	0,64
6	7,74	6,27	0,71	0,88
7	16,49	6,27	1,07	0,59
8	16,51	7,24	1,32	0,55
ISO+piperin				
1	57,50	6,64	1,03	0,65
2	15,30	8,05	1,11	0,72
3	52,65	7,41	1,31	0,57
4	11,80	10,47	1,17	0,89
5	78,54	12,97	1,12	1,15
6	16,32	14,33	1,18	1,22
7	21,03	14,59	1,32	1,11
8	36,11	9,28	1,13	0,82
9	36,16	10,49	1,06	0,99

ISO: İsoproterenol; **TOS:** Total Oksidan Durum; **TAS:** Total Antioksidan Durum; **OSİ:** Oksidatif Stres İndeksi; **TnI:** Troponin I.

Rat gruplarının ilk ve son ağırlıklarının ortalamaları Tablo 4.6.'da verilmiştir.

Grupların ilk ağırlıklarının ortalamaları kontrol grubunda 221,44±7,67 g, ISO grubunda 215,11±12,17 g, piperin grubunda 217,875±5,96 g, ISO+piperin grubunda 224,55±6,76 olarak ölçüldü. Son ağırlıklarının ortalamaları kontrol grubunda 242,11±14,88 g, ISO grubunda 251,44±7,37 g, piperin grubunda 240,37±7,73, ISO+piperin grubunda 241,33±13,05 olarak ölçüldü.

Gruplar arasında ilk ve son ağırlıklar bakımından istatiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p>0,05$).

Tablo 4.6. Rat gruplarının ilk ve son ağırlık ortalamaları

Grup	n	İlk Ağırlık (ort±SD)	Son Ağırlık (ort±SD)
Kontrol	9	221,44±7,67	242,11±14,88
ISO	9	215,11±12,17	251,44±7,37
Piperin	8	217,87±5,96	240,37±7,73
ISO+piperin	9	224,55±6,76	241,33±13,05

ISO: İsoprotereol.
İstatistiksel değerlendirme One-Way ANOVA testi ile yapıldı.

Grupların serum TnI, TOS, TAS ve OSİ ortalamaları Tablo 4.7.'de verilmiştir.

Serum TnI ortalamaları, kontrol grubunda 15,02±13,11 pg/mL, ISO grubunda 63,69±31,27 pg/mL, piperin grubunda 16,50±4,06 pg/mL, ISO+piperin grubunda 36,16±22,84 pg/mL olarak bulundu. Kontrol grubu ve piperin grubunun TnI düzeyleri arasında anlamlı bir fark görülmedi ($p>0,05$). ISO grubunun serum TnI düzeyleri, kontrol grubuna ($p=0,001$), piperin grubuna ($p=0,001$) ve ISO+piperin grubuna ($p=0,04$) göre anlamlı olarak yüksek bulundu. ISO+piperin grubunun TnI düzeyleri de kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksekti ($p=0,012$). Piperin grubu ile ISO+piperin grubunun TnI değerleri arasında anlamlı fark görülmedi ($p>0,05$).

Serum TOS ortalamaları, kontrol grubunda 7,53±1,28 μmol H_2O_2 Equiv. /L, ISO grubunda 11,39±2,69 μmol H_2O_2 Equiv./ L, piperin grubunda 6,27±1,84 μmol H_2O_2 Equiv. /L, ISO+piperin grubunda 10,47±2,95 μmol H_2O_2 Equiv. /L olarak bulundu. ISO grubunun serum

TOS düzeyi, kontrol grubuna (p=0,006) ve piperin grubuna (p=0,000) göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Piperin grubunun TOS düzeyi ise ISO+piperin grubuna göre daha düşüktü (p=0,004).

Serum TAS ortalamaları, kontrol grubunda 1,17±0,11 mmol Trolox Equiv. /L, ISO grubunda 1,06±0,10 mmol Trolox Equiv. /L, piperin grubunda 1,12±0,19 mmol Trolox Equiv. /L, ISO+piperin grubunda 1,16±0,10 mmol Trolox Equiv. /L olarak bulundu. Serum TAS düzeyi bakımından gruplar arasında anlamlı bir fark görülmedi (p>0,05).

OSİ ortalamaları, kontrol grubunda 0,65±0,13, ISO grubunda 1,08±0,23, piperin grubunda 0,57±0,18, ISO+piperin grubunda 0,90±0,23 olarak bulundu. ISO grubunun OSİ düzeyi, kontrol grubuna ve piperin grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu (her ikisi için p=0,000). ISO+piperin grubunun OSİ düzeyi de piperin grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti (p=0,01).

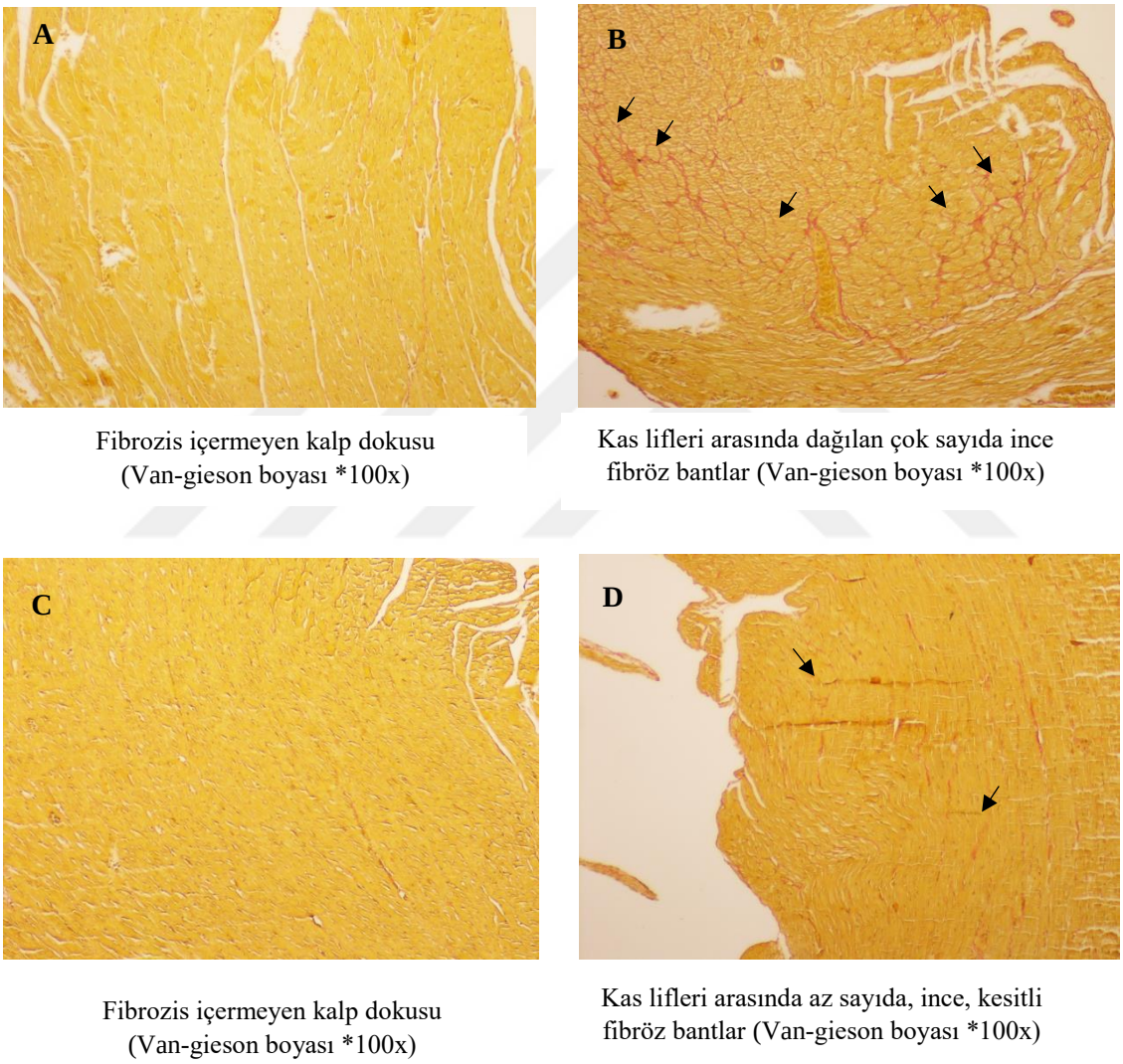
Tablo 4.7. Rat gruplarının serum TnI, TOS, TAS ve OSİ ortalamaları

GRUP	n	TnI (pg/mL) (ort±SD)	TOS (µmol H_2O_2 Equiv. L) (ort±SD)	TAS (mmol Trolox Equiv. /L) (ort±SD)	OSİ (ort±SD)
Kontrol	9	15,02±13,11¶	7,53±1,28	1,17±0,11	0,65±0,13†
ISO	9	63,69±31,27	11,39±2,69*	1,06±0,10	1,08±0,23
Piperin	8	16,50±4,06¶	6,27±1,84†	1,12±0,19	0,57±0,18†
ISO+piperin	9	36,16±22,84#, ‖	10,47±2,95‡	1,16±0,10	0,90±0,23§

ISO: İsoproterenol; **TOS:** Total Oksidan Durum; **TAS:** Total Antioksidan Durum; **OSİ:** Oksidatif Stres İndeksi; **TnI:** Troponin I.
İstatistiksel değerlendirme, TOS, TAS ve OSİ için One-Way ANOVA testi, TnI için Mann-Whithey U testi ile yapıldı.
¶: ISO grubu ile karşılaştırıldı, p= 0,001.
#: ISO grubu ile karşılaştırırıldı, p= 0,04.
‖: Kontrol grubu ile karşılaştırıldı, p= 0,012.
*: Kontrol grubu ile karşılaştırıldı, p=0,006.
†: ISO grubu ile karşılaştırıldı, p= 0,000.
‡: Piperin grubu ile karşılaştırıldı, p= 0,004
§:Piperin grubu ile karşılaştırıldı, p= 0,01.

4.3. Histopatolojik Bulgular

Her gruptan birer ratın son ISO dozudan sonra on beş gün daha yaşatılmasının ardından alınan kalp dokularının histopatolojik incelemesi sonucunda kontrol grubu ve piperin grubunda fibrozis izlenmedi. ISO grubunda kas lifleri arasında dağılan çok sayıda ince fibröz bant görülürken, ISO+piperin grubunda kas lifleri arasında az sayıda, ince ve kesintili fibröz bantlar görüldü (Şekil 4.10.).



Fibrozis içermeyen kalp dokusu (Van-gieson boyası *100x)

Kas lifleri arasında dağılan çok sayıda ince fibröz bantlar (Van-gieson boyası *100x)

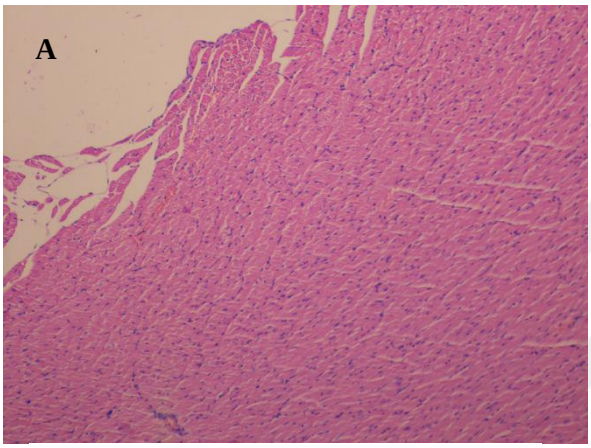
Fibrozis içermeyen kalp dokusu (Van-gieson boyası *100x)

Kas lifleri arasında az sayıda, ince, kesitli fibröz bantlar (Van-gieson boyası *100x)

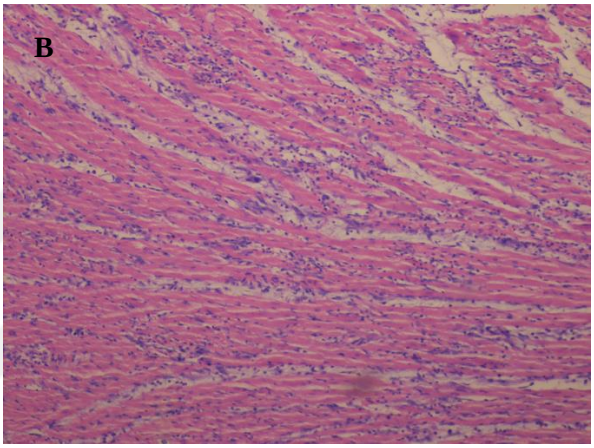
Şekil 4.10. Son ISO dozundan sonra 15 gün daha yaşatılan ratların kalp kasına ait patoloji bulguları (A: Kontrol, B: ISO, C: Piperin, D: ISO+piperin grubu)

Son ISO dozundan 24 saat sonra sakrifiye edilen ratların kalp dokularının patolojik görüntüleri incelendiğinde kontrol ve piperin gruplarında normal morfolojik bulgular görüldü.

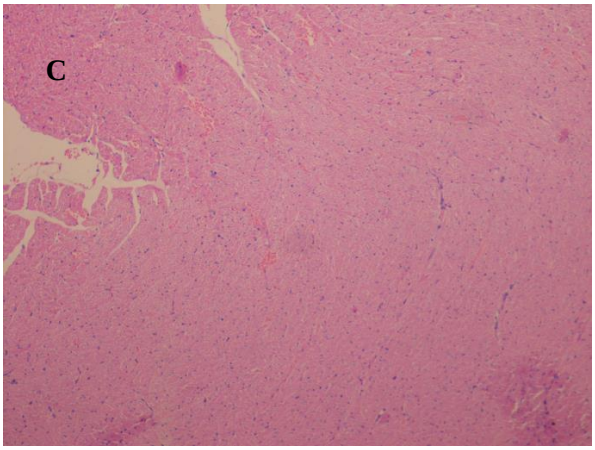
ISO grubunda kas lifleri arasında yoğun inflamasyon ve aralarda kas liflerini ayıran ödem bulgularına rastlanırken, ISO+piperin grubunda kas lifleri arasında perivasküler dağılan inflamatuar hücreler görüldü ancak ödem bulgusuna rastlanmadı. Ayrıca ISO grubunda üç adet ratta yaygın subendokardiyal atrofi bulgularına rastlanırken, ISO+piperin grubunda atrofi bulgusuna rastlanmadı (Şekil 4.11.).



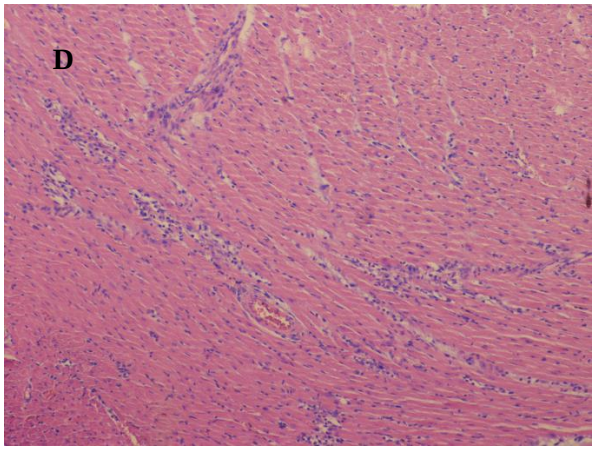
Normal morfolojik bulgular (Hematoksilen-eozin (HE) boyası *100x)



Kas lifleri arasında yoğun inflamasyon ve arada lifleri ayıran ödem bulguları (Hematoksilen-eozin (HE) boyası *100x)



Normal morfolojik bulgular (Hematoksilen-eozin (HE) boyası *100x)



Kas lifleri arasında perivasküler dağılan inflamatuar hücreler (Hematoksilen-eozin (HE) boyası *100x)

Şekil 4.11. Son ISO dozundan 24 saat sonra sakrifiye edilen ratların kalp kasına ait patoloji bulguları (A: Kontrol, B: ISO, C: Piperin, D: ISO+piperin grubu)

Son ISO dozundan 24 saat sonra sakrifiye edilen ISO grubundaki ve ISO+piperin grubundaki ratların kalp dokularının inflamasyon yüzdeleri sırasıyla Tablo 4.8.'de ve Tablo 4.9.'da verilmiştir.

Tablo 4.8. ISO grubunda kalp dokularının inflamasyon yüzdeleri

Rat	Subendotelyal inflamasyon %	İntramuskuler inflamasyon %
1	20	20
2	60	90
3	50	90
4	30	25
5	80	60
6	20	20
7	60	90
8	90	60
9	30	80

Tablo 4.9. ISO+piperin grubunda kalp dokularının inflamasyon yüzdeleri

Rat	Subendotelyal inflamasyon %	İntramuskuler inflamasyon %
1	60	60
2	100	40
3	60	60
4	35	40
5	60	50
6	30	70
7	20	40
8	10	25
9	80	30

5. TARTIŞMA

Karabiberin (*Piper Nigrum)* fitokimyasal bileşenlerinden biri olan piperin, güçlü antioksidan etkiye sahiptir. Bu etkisi, reaktif oksijen türlerini temizleme yeteneğinden kaynaklanır. Bunun yanı sıra anti-inflamatuar, anti-anjiyojenik özelliklere sahip kardiyovasküler sağlığı koruyucu bir ajan olduğu da bildirilmiştir (84).

Literatürde lipozomal piperinin, in vitro ortamda, diyabet modelinde ve Parkinson modelinde oksidatif strese etkisini inceleyen az sayıda çalışma bulunmaktadır (85-87). Bununla birlikte lipozomal piperinin, isoproterenol ile oluşturulan infarktüs modelinde oksidatif strese etkisini inceleyen bir çalışmaya rastlanmadı.

Çalışmamızda lipozomal piperinin oksidatif strese etkisini araştırmak amacıyla Wistar albino cinsi ratlarda isoproterenol ile deneysel infarktüsü modeli oluşturularak lipozomal piperinin serum total antioksidan durum (TAS), total oksidan durum (TOS) ve oksidatif stres indeksi (OSİ) üzerine etkisi incelenmiştir.

Piperinle ilgili en büyük engellerden biri suda çözünürlüğünün ve biyoyararlanımının düşük olmasıdır. Suresh ve ark. (88) ratlarda, oral olarak verilen piperinin emiliminin düşük olduğunu bildirmiştir. Piperinin farklı taşıyıcı sistemler aracılığıyla organizmaya alınarak potansiyel terapötik etkilerinden maksimum yararlanılabileceği vurgulanmaktadır. Nano ilaç dağıtım sistemleri, kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde umut verici olarak görünmektedir (89). Literatürde lipozomların, ilaç ve doğal bileşenlerin kapsüllenmesinde kardiyovasküler uygulamalarda tercih edilen nano taşıyıcılar olduğu görülmektedir (90).

Dutta ve ark. (91) soya bazlı fosfatidil kolin kullanarak sentezledikleri lipozomal piperinin bağlanma veriminin %76,6 olduğunu ve serbest piperine göre antioksidan potansiyelinin 1,1 kat arttığını bildirmiştir. Aynı çalışmada lipozomal piperinin PDI'sinin 0,153 ve zeta potansiyel enerjisinin -25,2 mV olduğu raporlanmıştır. Amalia ve ark. (92) soya lesitini ve kolesterol ile formülize edilmiş lipozomal piperinin bağlanma veriminin %95,5 olduğunu, PDI'sinin 0,594 ve zeta potansiyel enerjisinin -13,3 mV olduğunu belirtmiştir. Başka bir çalışmada hidrojel içerisinde hazırlanan lipozomal piperinin bağlanma veriminin %68,10 olduğu, zeta potansiyel enerjisinin -0,7 mV ve PDI'sinin de 0,15 olduğu belirtilmiştir (93).

Çalışmamızda sentezlenen lipozomal piperinin %99,8'lik bir bağlama verimine sahip olduğu tespit edildi. Çalışmamızda bulunan yüksek bağlanma verimi yüzdeleri, piperin için lipozomal taşıyıcı sistemlerin uygun olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda sentezlenen lipozomal piperinin PDI'si 0,38 ve zeta potansiyel enerjisi -21,31 mV olarak ölçülmüştür. Bulgularımız, mevcut literatürleri destekler niteliktedir (91-93).

Literatürde farklı formülasyonlarda sentezlenen lipozomal piperinin morfolojik özelliklerinin değerlendirilmesi amacıyla geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizlerinin kullanıldığı görülmektedir (85,91,93). AFM analizinin lipozomların morfolojik özelliklerinin belirlenmesinde tercih edildiği bilinmektedir (79-81). Kundu ve ark. (86) lipit bazlı piperin nanopartikülünün uygun morfolojik özelliklere sahip olduğunu AFM analiz sonuçları ile teyit etmiştir. Çalışmamızda AFM analiz sonuçları, boş lipozomun ve lipozomal piperinin küresel şekli, partikül çapı, yüzey pürüzlülüğü gibi morfolojik özelliklerinin lipozom yapısı için uygun olduğunu göstermiştir.

Piperin spektrum taramasında absorbsiyon maksimumu 344 nm olarak bulundu. Bulunan değerin, literatürde verilen maksimum dalga boyu referansına benzer olduğu görüldü (85,87,93). Literatürde stabilite çalışmalarının lipozomun ve içindeki maddenin bozunmaya uğrayıp uğramadığı, ürünün verimliliğinin, güvenliğinin, kalitesinin değerlendirilmesi hakkında yorum yapılması için önemli olduğu belirtilmiştir (94). Yapılan bir çalışmada stabilite 37ºC'de izlenmiş, ortama salınan piperin miktarları incelendiğinde lipozom içerisinde kalan piperinin yoğunluğu yüksek bulunmuştur (87). Çalışmamızda 3 ay boyunca belirli periyotlarda alınan örneklerin ölçümü yapıldığında lipozom içerisinde korunan piperin miktarının %98'lerde olduğu görüldü.

Tüm bu bulgular, sentezlenen lipozomal piperinin gerekli standart morfolojik özellikleri sağladığını, yüksek bir stabiliteye sahip olduğunu ve lipozomun, içerisinde piperini koruduğunu kanıtlamaktadır.

Lipozomal piperin ve serbest piperinin salım çalışması verileri incelendiğinde pH 1,2'de lipozomal piperinin serbest piperine göre yaklaşık 2 kat daha fazla salım yüzdesine sahip olduğu görülmüştür. Aynı şekilde pH 4,5'te de lipozomal piperinin serbest piperine göre salım yüzdesinin yaklaşık 2,5 kat daha fazla olduğu görülmektedir.

Bir diğer dikkat çeken nokta ise lipozomal piperin ve serbest piperinin salım yüzdelerinin ortam pH'ına göre farklılık göstermesidir. Lipozomal piperinin pH 4,5 ortamında pH 1,2 ortamına göre daha yüksek bir salım yüzdesine sahip olurken serbest piperindeki salım yüzdesinin pH 1,2 ortamında pH 4,5 ortamına göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Ayrıca her iki pH ortamı için lipozomal piperinin salımının serbest piperine kıyasla daha yüksek yüzdelere ulaştığı ve iki pH ortamı arasındaki farkın serbest piperine kıyasla daha fazla olduğu kaydedilmiştir. Serbest piperinin her iki pH ortamındaki salımı arasındaki farkta belirgin bir değişim gözlenmemiştir. Bu bulgular, çalışmamızda kontrollü salım gerçekleştiren bir ilaç taşıma sisteminin hazırlandığını ve sistemin pH'a duyarlı olduğunu göstermektedir.

Literatürde kitosan kaplı lipit nanopartikülü formundaki piperinin pH 7,4 ortamında 24. saatte serbest piperine göre daha yüksek salım yüzdelerine ulaştığı bildirilmiştir (85). Karimi ve ark (93) tarafından pH 7,4 ortamında piperin içeren lipozomun ve piperin-fosfolipit içeren lipozomun 24. saatte salım yüzdelerinin sırasıyla %36 ve %45 olduğu, 72. saate gelindiğinde ise salım yüzdelerinin sırasıyla %64 ve %68'e ulaştığı ifade edilmiştir.

Piperinin ince barsaktan emildiği bilinmektedir (95). İnce bağırsak pH değerinin nötrale yakın olduğu düşünüldüğünde, lipozomal piperinin yüksek pH değerlerindeki salım profilinin daha iyi olması, piperinin barsaktan emilimini kolaylaştırması açısından önemlidir.

Lipozomal piperin salım kinetiğinin değerlendirilmesinde kullanılan her bir model, farklı bir kinetik özellik hakkında yorum yapılmasına olanak sağlamaktadır. Korsmayer-Peppas çoğunlukla hidrojel gibi ilaç matrisleri için kullanılır. Etken maddenin lipozomdan difüzyon yoluyla çıkışına uygunluğu hakkında yorum yapılmasını sağlar. Higuchi modeli kompleks matris sisteminden ilaç salımını tanımlamak için tercih edilmektedir. Bu model ilacın çözünürlüğünün başlangıç matrisinden düşük olduğunu ve buna bağlı olarak ilacın difüzyon aşamasında matrisin etkisinin ihmal edilebilir olduğunu söyler. Ayrıca ilaç partiküllerinin matristen daha yoğun olduğunu ve sink koşulu altında ilacın sabit bir salım profiline sahip olduğunu belirtir. Hixon-Crowell modeli ilaç matrisinin yüzey alanı ve çapının zamanla değiştiği sistemleri tanımlar. Zero-order modeli ilaç salımının sadece zamana bağlı olduğunu ve salımın çok yavaş gerçekleştiğini belirtir (96,97).

Darwish ve ark. (85) kitosan kaplı lipit nanopartikülü fromundaki piperinin salım kinetiğini incelemiş ve en yüksek R^2 değerinin Korsmayer-Peppas modelinde olduğunu belirtmişlerdir. Dutta ve ark. (91) sentezledikleri lipozomal piperinin salım kinetiğini değerlendirmiş ve en yüksek R^2 değerinin Higuchi modelinde olduğunu bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada da benzer şekilde en yüksek R^2 değerinin Higuchi modelinde olduğu ve piperin salımının difüzyona uygun olduğu vurgulanmıştır (92).

Çalışmamızda Zero-order modeli en düşük R^2 değerine sahip olduğu için salımı etkileyen tek faktörün zaman olduğu yorumunu yapmak doğru değildir. Diğer üç modelin R^2 değerlerinin 98'in üzerinde olması sebebiyle ilaç salımının difüzyona uygun, difüzyonda matrisin etkisinin ihmal edilebilir, ilaç matrisinin yüzey alanı ve çapının zamanla değişebilir olduğu yorumu yapılabilir.

Literatürde, ISO ile oluşturulan deneysel modelde serum TnI düzeylerinin yükseldiği bildirilmiştir. ISO ile oluşturulan deneysel modelin kanıtlanmasında, histopatolojik inceleme ve artmış serum TnI düzeylerinin birlikte değerlendirilmesinin daha iyi bir gösterge olduğu

belirtilmiştir (98,99). Çalışmamızda ISO uygulanan gruplarda deneysel miyokart infarktüsü modelinin oluştuğu, serum TnI düzeylerindeki artış ve histopatolojik bulgularla kanıtlanmıştır.

Çalışmamızda kontrol grubu, piperin grubu ve ISO+piperin grubu ile karşılaştırıldığında ISO grubunun serum TnI düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulundu (Sırasıyla p=0,001, p=0,001 ve p=0,004). ISO+piperin grubunun serum TnI düzeyleri de kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu (p=0,012). Bu bulgular, ISO uygulamasının serum TnI düzeylerinde artışa neden olduğunu göstermektedir. ISO+piperin grubuna göre, ISO grubunun serum TnI düzeylerinin daha yüksek olması ise lipozomal piperin uygulamasının bu artışı önlediğini kanıtlamaktadır. ISO+piperin grubunun serum TnI düzeyleri, piperin grubunun serum TnI düzeylerinden daha yüksek olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bu durum, piperin grubundaki rat sayısının diğer gruplardan daha az olmasından kaynaklanmış olabilir. Literatürde piperinin, serum TnI düzeylerine etkisini inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamız bu yönüyle de özgündür.

İsoproterenol ile oluşturulan miyokart infarktüsünde ıspanak, zencefil ve java eriği ekstraktları, fraksetin, karnosik asit gibi doğal antioksidan bileşenlerin serum TnI düzeylerindeki artışı önlediği rapor edilmiştir (100-105). Ratlarda streptozotosin ile oluşturulan diyabetik kardiyomiyopati modelinde insülin ile birlikte verilen piperinin, TnI ekspresyonunu azaltığı bildirilmiştir (106).

Literatürde %0,5'lik DMSO'da çözünmüş piperinin, isoproterenol ile oluşturulan miyokardial iskemi ve toksisite üzerine etkisini inceleyen az sayıda çalışma bulunmaktadır (7-9). Dhivya ve ark. (9), ISO+piperin grubu ile kıyaslandığında ISO grubunun serum CK ve LDH düzeylerinin daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

ISO uygulamasının serum TnI düzeylerinde artışa neden olduğunu, lipozomal piperin uygulamasının ise bu artışı önlediğini gösteren bulgularımız yukarıdaki çalışmaları desteklemektedir.

Histopatolojik incelemede, kontrol ve piperin grubunun son ISO dozundan 24 saat sonra alınan kalp dokularının normal morfolojik bulgulara sahip olduğu görüldü. ISO grubunda kas lifleri arasında yoğun inflamasyon ve ödem bulguları görülürken, ISO+piperin grubunda kas lifleri arasında perivasküler dağılan inflamatuar hücreler görüldü ancak ödem bulgusuna rastlanmadı. ISO grubunda üç adet ratta yaygın subendokardiyal atrofi bulguları gözlenirken, ISO+piperin grubunda atrofi bulgusuna rastlanmadı.

Her gruptan birer ratın on beş gün daha yaşatıldıktan sonra alınan kalp dokuları mikroskopik olarak incelendiğinde, kontrol grubunun ve piperin grubunun normal morfolojik bulgulara sahip olduğu gözlendi. Diğer yandan ISO grubunda kas lifleri arasında dağılan çok

sayıda ince fibröz bant görülürken, ISO+piperin grubunda kas lifleri arasında az sayıda, ince ve kesintili fibröz bantlar görüldü.

Ma ve ark. (107) tarafından yapılan bir çalışmada piperinin farelerde isopraline bağlı kardiyak hipertrofiyi azalttığı ve fibrozisi inhibe ettiği gösterilmiştir. Literatürde oral olarak uygulanan piperinin, isoproterenol ile oluşturulan miyokardiyal iskemi modeli üzerinde yapılan bir çalışmada ise ISO+piperin grubuna göre ISO grubunda daha yoğun inflamasyon ve doku nekrozu görüldüğü bildirilmiştir (9). İsoproterenol ile indüklenen inflamasyona bağlı miyokart toksisitesi üzerine yapılan bir diğer çalışmada ise ISO grubunda ISO+piperin grubuna kıyasla daha yoğun kolajen birikimi ve fibrozis görüldüğü belirtilmiştir (7). Her iki çalışmada da kontrol ve sadece piperin uygulaması yapılan gruplarda sağlıklı miyokart doku bulguları görülmüştür. Çalışmamız histopatolojik bulgular açısından literatür ile uyum göstermektedir.

İsoproterenol ile uyarılan miyokart infarktüsünün mekanizmasında cAMP düzeylerindeki artış, intrasellüler kalsiyum artışı, yüksek enerjili fosfatların tüketilmesi, serbest radikallerin aşırı üretimine bağlı oksidatif stres gibi çeşitli faktörlerin rol oynayabileceği ileri sürülmüştür (4,49).

Çalışmamızda oksidatif stres düzeylerini belirlemek için serum TAS, TOS düzeyleri ölçülmüş ve OSİ hesaplanmıştır.

Literatürde tampon çözücü içinde verilen piperinin serum TAS ve TOS düzeylerine etkisini inceleyen çalışmalar bulunmakla birlikte (108,109), isoproterenol ile deneysel miyokart infarktüsü oluşturulan ratlarda lipozomal piperinin serum TAS ve TOS düzeylerinin yanısıra OSI düzeylerine etkisini de inceleyen herhangi bir çalışmaya rastlanmadı.

ISO grubunun serum TOS düzeyleri, kontrol grubuna ($p=0,006$) ve piperin grubuna ($p=0,000$) göre, ISO+piperin grubunun serum TOS düzeyleri ise piperin grubuna ($p=0,004$) göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Bulgularımız, ISO uygulamasının serum TOS düzeylerini artırdığını, lipozomal piperin uygulamasının ise bu artışı önlediğini göstermektedir. Diğer yandan gruplar arasında TAS düzeyleri bakımından anlamlı bir fark görülmedi.

Bu bulgular, isoproterenol ile uyarılan miyokart infarktüsünde serum TOS düzeylerinin anlamlı olarak arttığını, TAS düzeylerinin ise değişmediğini bildiren çalışma ile tutarlıdır (110). Vurmaz ve ark. (108) civciv embriyolarında steroid ile indüklenen katarakt modelinde, piperin verilen grubun steroid verilen gruba göre daha düşük serum TOS düzeylerine sahip olduğunu, serum TAS düzeylerinin ise piperin gruplarında daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Aynı modelde yapılan bir diğer çalışmada ise, piperin grubunun karaciğer dokusundaki TOS düzeylerinin steroid grubuna göre daha düşük, TAS düzeylerinin ise daha yüksek olduğu belirtilmiştir (109).

ISO grubunun OSİ düzeyleri, kontrol grubuna (p=0,000) ve piperin grubuna (p=0,000) göre anlamlı olarak yüksek bulundu. ISO+piperin grubunun OSİ düzeyleri de piperin grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu (p=0,01). Bulgularımız, ISO uygulamasının OSİ düzeylerini artırdığını, lipozomal piperin uygulamasının ise bu artışı önlediğini göstermektedir.

Yüksek yağlı diyetle beslenen ratlarda piperinin, TG ve kolesterol seviyelerini düşürerek lipit birikimini ve peroksidasyon riskini azalttığı gösterilmiştir (111,112). Kadmiyum ile indüklenen *in vitro* oksidatif stres modelinde piperinin reaktif oksijen türlerini temizleyerek oksidatif stresi azalttığı ileri sürülmüştür (113). İskemik inme geçiren hastalarda kurkumin ile birlikte piperin takviyesinin total kolesterol ve trigliserit düzeylerini azalttığı, total antioksidan kapasiteyi arttırdığı rapor edilmiştir (114). Heidari ve ark. (115), kurkumin ve piperinin birlikte verilmesinin oksidatif stresi azaltıcı etkiye neden olduğunu göstermişlerdir.

Literatürde oral olarak uygulanan piperinin, isoproterenol ile oluşturulan miyokardiyal iskemi modelinde dokuda TBARS ve ROS düzeylerinin ISO grubunda diğer gruplara kıyasla daha yüksek olduğu, bununla birlikte ISO grubunun CAT, SOD ve GPx düzeylerinin ISO+piperin grubuna göre daha düşük olduğu bildirilmiştir. ISO grubunun serum LDL düzeylerinin de ISO+piperin grubuna göre daha düşük olduğu gösterilmiştir (9). Viswanadha ve ark. (8) isoproterenol ile oluşturulan miyokardiyal iskemi modelinde, ISO grubunun mitokondriyal TBARS ve ROS düzeylerinin ISO+piperin grubuna göre daha yüksek olduğunu, mitokondriyal SOD, CAT ve GPx düzeylerinin ise düşük olduğunu bildirmişlerdir.

Lipozomal piperinin isoproterenol ile oluşturulan infarktüs modelinde oksidatif strese etkisinin ilk defa incelendiği bu çalışmada başlıca kısıtlılığımız; farklı çözücülerde çözünmüş piperinin etkisinin incelenmemiş ve lipozomal piperinin etkisi ile karşılaştırılmamış olmasıdır.

Lipozomal piperinin, isoproterenol ile miyokart infarktüsü oluşturulan ratlarda oksidatif strese etkisini inceleyen çalışmamız;

1) Lipozomal piperinin bazik ortamda daha iyi bir salım profiline sahip olduğunu ve lipozomun, piperin için uygun bir taşıyıcı sistem olduğunu,
2) ISO uygulamasının serum TnI düzeylerinde anlamlı bir artışa neden olduğunu, lipozomal piperin uygulamasının ise bu artışı önlediğini,
3) ISO uygulamasının serum TOS ve OSİ düzeylerinde anlamlı bir artışa neden olduğu, lipozomal piperin uygulamasının bunu önlediğini,
4) ISO uygulamasının serum TAS düzeylerini etkilemediğini gösterdi.

Sonuç olarak, çalışmamız lipozomal piperin uygulamasının isoproterenol ile miyokart infarktüsü oluşturulan ratlarda oksidatif stresi azaltttığını göstermektedir. Lipozomal piperin uygulaması, oksidatif stresi azaltarak miyokart infarktüsünü önlemede rol oynayabilir.

KAYNAKLAR

1-The Top 10 Causes of Death, 2019. World Health Organization Fact Sheets. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death. Erişim tarihi 5.4.2024.

2-Hashmi S, Al-Salam S. Acute myocardial infarction and myocardial ischemia-reperfusion injury: A comparison. Int J Clin Exp Pathol. 2015;8:8786-96.

3-Sugamura K, Keaney Jr JF. Reactive oxygen species in cardiovascular disease. Free Radic Biol Med. 2011;51:978–92. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.004.

4-Singal PK, Beamish RE, Dhalla NS. Potential oxidative pathways of catecholamines in the formation of lipid peroxides and genesis of heart disease. Adv Exp Med Biol. 1983;161:391-401.

5-Dubois-Deruy E, Peugnet V, Turkieh A, Pinet F. Oxidative stress in cardiovascular diseases. Antioxidants. 2020;9:864. doi:10.3390/antiox9090864.

6-Panahi Y, Farshbaf M, Mohammadhosseini M, Mirahadi M, Khalilov R, Saghfi S et al. Recent advances on liposomal nanoparticles: Synthesis, characterization and biomedical applications. Artif Cells Nanomed Biotechnol. 2017;45:788-99. doi: 10.1080/21691401.2017.1282496.

7-Viswanadha VP, Dhivya V, Beeraka NM, Huang CY, Gavryushova LV, Minyaeva NN et al. The protective effect of piperine against isoproterenol-induced inflammation in experimental models of myocardial toxicity. Eur J Pharmacol. 2020;885:173524. doi:https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173524.

8-Viswanadha VP, Dhivya V, Somasundaram B, Beeraka NM, Huang CY, Mikhaleva LM et al. The role of mitochondria in piperine mediated cardioprotection in isoproterenol induced myocardial ischemia. Curr Pharm Des. 2021;27:1-15. doi:10.2174/1381612826666200909125750.

9-Dhivya V, Priya LB, Chirayil HT, Sathiskumar S, Huang CY, Padma VV. Piperine modulates isoproterenol induced myocardial ischemia through antioxidant and anti-dyslipidemic effect in male Wistar rats. Biomed Pharmacother. 2017;87:705–13. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.01.002.

10-Smit M, Coetzee AR, Lochner A. The pathophysiology of myocardial ischemia and perioperative myocardial infarction. J Cardiothorac Vasc Anesth. 2019; 00:1-12. doi:10.1053/j.jvca.2019.10.005.

11-World Heart Report 2023: Confronting The World's Number One Killer. World Heart Federation. 2023. Available from:https://world-heart-federation.org/resource/world-heart-report-2023/.

12-Ölüm ve Ölüm Nedeni İstatistikleri,2022. (2023, Haziran). Türkiye İstatistik Kurumu Haber Bülteni, 49679. Erişim adresi: https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Olum-ve-Olum-Nedeni-Istatistikleri-2022-49679#. Erişim tarihi: 26.03.2024.

13-Matsuzawa Y, Lerman A. Endothelial dysfunction and coronary artery disease: Assessment, prognosis and treatment. Coron Artery Dis. 2014;25:713-24. doi: 10.1097/MCA.0000000000000178.

14-Summers MR, Lerman A, Lennon RJ, Rihal CS, Prasad A. Myocardial ischaemia in patients with coronary endothelial dysfunction: Insights from body surface ECG mapping and implications for invasive evaluation of chronic chest pain. Eur Heart J. 2011;32:2758–65. doi:10.1093/eurheartj/ehr221.

15-Lipid Biosynthesis; Cholesterol, steroids and isoprenoids: Biosynthesis, regulation and transport. Nelson DL, Cox MM, Hoskins AA. Lehninger: Principles of Biochemistry, 8 ed. New York: Macmillan Learning; 2021.p.2759-2761.

16-Doodnauth SA, Grinstein S, Maxson ME. Constitutive and stimulated macropinocytosis in macrophages: roles in immunity and in the pathogenesis of atherosclerosis. Phil Trans R Soc B. 2019;374:20180147. doi: http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2018.0147.

17-Khatana C, Saini NK, Chakrabarti S, Saini V, Sharma A, Saini RV et al. Mechanistic insights into the oxidized low-density lipoprotein induced atherosclerosis. Oxid Med Cell Longev. 2020;14. doi:https://doi.org/10.1155/2020/5245308.

18-Batty M, Bennett MR, Yu E. The role of oxidative stress in atherosclerosis. Cells. 2022;11:3843. doi:https://doi.org/10.3390/ cells11233843.

19-Nabel EG, Braunwald E. A tale of coronary artery disease and myocardial infarction. N Engl J Med. 2012;366:54-63. doi: 10.1056/NEJMra1112570.

20-Anderson HV, Masri SC, Abdallah MS, Chang AM, Cohen MG, Elgendy IY, et al. 2022 ACC/AHA Key Data Elements and Definitions for Chest Pain and Acute Myocardial Infarction: A Report of the American Heart Association/American College of Cardiology Joint Committee on Clinical Data Standards. Circ Cardiovasc Qual Outcomes. 2022;15:e000112. doi:10.1161/HCQ.0000000000000112.

21-Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Chaitman BR, Bax JJ, Morrow DA, et al. Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction 2018. Circulation. 2018;138:e618–e51. doi: 10.1161/CIR.0000000000000617.

22-Culic V. Acute risk factors for myocardial infarction. Int J Cardiol. 2007;117:260–69. doi:10.1016/j.ijcard.2006.05.011.

23-Khera AV, Kathiresan S. Genetics of coronary artery disease: Discovery, biology and clinical translation. Nat Rev Genet. 2017;18:331-44. doi:10.1038/nrg.2016.160.

24-Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T. Role of Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases. J Hypertens. 2000;18:655-73.

25-Filho HG, Ferreira NL, Bezerra de Sousa R, Carvalho ER, Lobo P, Filho JG. Experimental model of myocardial infarction induced by isoproterenol in rats. Rev Bras Cir Cardiovasc. 2011;26:469-76. doi: 10.5935/1678-9741.20110024.

26-Bertinchant JP, Robert E, Polge A, Marty-Double C, Fabbro-Peray P, Poirey S, et al. Comparison of the diagnostic value of cardiac troponin I and T determinations for detecting early myocardial damage and the relationship with histological findings after isoprenaline-induced cardiac injury in rats. Clinica Chimica Acta. 2000;298:13-28.

27-Babuin L. Jaffe AS. Troponin: the biomarker of choice for the detection of cardiac injury. CMAJ. 2005;173:1191-1202. doi:https://doi.org/10.1503/cmaj/051291.

28-Aydin S, Ugur K, Aydin S, Sahin İ, Yardim M. Biomarkers in acute myocardial infarction: current perspectives. Vasc Health Risk Manag. 2019;15:1–10. doi:https://doi.org/10.2147/VHRM.S166157.

29-Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol. 2007;39:44–84. doi:10.1016/j.biocel.2006.07.001.

30-Cochrane CG. Cellular injury by oxidants. Am J Med. 1991;91:23-30.

31-Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry, and role in human disease. Am J Med. 1991;91:14-22.

32-Daiber A, Andreadou I, Oelze M, Davidson SM, Hausenloy DJ. Discovery of new therapeutic redox targets for cardioprotection against ischemia reperfusion injury and heart failure. Free Radic Biol Med. 2021;163:325–43. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.12.026.

33-Tomandlova M, Parenica J, Lokaj P, Ondrus T, Kala P, Miklikova M, et al. Prognostic value of oxidative stress in patients with acute myocardial infarction complicated by cardiogenic shock: A prospective cohort study. Free Radic Biol Med. 2021;174:66–72. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.07.040.

34-Van der Pol A, Van Gilst WH, Voors AA, Var der Meer P. Treating oxidative stress in heart failure: past, present and future. Eur J Heart Fail. 2019;21:425–35. doi:10.1002/ejhf.1320.

35-Shafi S, Ansari HR, Bahitham W, Aouabdi S. The impact of natural antioxidants on the regenerative potential of vascular cells. Front Cardiovasc Med. 2019;6:28. doi: 10.3389/fcvm.2019.00028.

36-Bartekova M, Adameova A, Görbe A, Ferenczyova K, Pechanova O, Lazou A et al. Natural and synthetic antioxidants targeting cardiac oxidative stress and redox signaling in cardiometabolic diseases. Free Radic Biol Med. 2021;169:446–77. doi:https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.03.045.

37-He L, He T, Farrar S, Liu T, Ma X. Antioxidants maintain cellular redox homeostasis by elimination of reactive oxygen species. Cell Physiol Biochem. 2017;44:532-53. doi: 10.1159/000485089.

38-Wong ZW, Thanikachalam PV, Ramamurthy S. Molecular understanding of the protective role of natural products on isoproterenol-induced myocardial infarction: A review. Biomed Pharmacother.2017;94:1145-66. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.08.009.

39-Losada-Barreiro S, Sezgin-Bayındır Z, Paiva-Martins F, Bravo-Diaz C. Biochemistry of antioxidants: Mechanisms and pharmaceutical applications. Biomedicines. 2022;10:3051. doi:https://doi.org/10.3390/biomedicines10123051.

40-Neri M, Fineschi V, Paolo MD, Riezzo I, Turillazzi E, Cerretani D. Cardiac oxidative stress and inflammatory cytokines response after myocardial infarction. Curr Vasc Pharmacol. 2015;13:26-36.

41-Ozcan E. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. Clin Biochem. 2004;37:277–85. doi:10.1016/j.clinbiochem.2003.11.015.

42-Ozcan E. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. Clin Biochem. 2005;38:1103–11. doi:10.1016/j.clinbiochem.2005.08.008.

43-Lukacs E, Magyari B, Toth L, Petrasi Z, Repa I, Koller A, et al. Overview of large animal myocardial infarction models (Review). Acta Physiol Hung. 2012;99:365–81. doi:10.1556/APhysiol.99.2012.4.1.

44-Hundahl LA, Tfelt-Hansen J, Jespersen T. Rat models of ventricular fibrillation following acute myocardial infarction. J Cardiovasc Pharmacol Ther. 2017;22:514-28. doi:https://doi.org/10.1177/1074248417702894.

45-Bhindi R, Witting PK, McMahon AC, Khachigian LM, Lowe HC. Rat models of myocardial infarction. Pathogenetic insights and clinical relevance. Thromb Haemost. 2006;96:602-10.

46-Nichtova Z, Novotova M, Kralova E, Stankovicova T. Morphological and functional characteristics of models of experimental myocardial injury induced by isoproterenol. Gen Physiol Biophys. 2012;31:141–51. doi:10.4149/gpb_2012_015.

47-National Center for Biotechnology Information (2024). PubChem Compound Summary for CID 3779, Isoproterenol. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Isoproterenol. 11.04.2024.

48-Garg M, Khanna D. Exploration of pharmacological interventions to prevent isoproterenol-induced myocardial infarction in experimental models. Ther Adv Cardiovasc Dis. 2014;8:155-69. doi:https://doi.org/10.1177/1753944714531638.

49-Bhagat B, Sullivan JM, Fischer VW, Nadel EM, Dhalla NS. cAMP activity and isoproterenol-induced myocardial injury in rats. Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab. 1976;12:465-70.

50-Rona G, Chappel CI, Balazs T, Gaudry R. An infarct-like myocardial lesion and other toxic manifestations produced by isoproterenol in the rat. AMA Arch Pathol. 1959;67:443-55.

51-Benjamin IJ, Jalil JE, Tan LB, Cho K, Weber KT, Clark WA. Isoproterenol-induced myocardial fibrosis in relation to myocyte necrosis. Circ Res. 1989;65:657-70. https://doi.org/10.1161/01.RES.65.3.657.

52-National Center for Biotechnology Information (2024). PubChem Compound Summary for CID 638024, Piperine. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Piperine. Erişim tarihi: 10.05.2024.

53-Derosa G, Maffioli P, Sahebkar A. Piperine and Its Role in Chronic Diseases. Editors: Gupta SC, Prasad S, Aggarwal BB. Anti-inflammatory Nutraceuticals and Chronic Diseases. [E-Book]. Springer International Publishing; 2016 [Cited date: 11.04.2024]. p.173-184. Available from: doi:10.1007/978-3-319-41334-1.

54-Srinivasan K. Black pepper and its pungent principle-piperine: A review of diverse physiological effects. Crit Rev Food Sci Nutr. 2007;47:735–48. doi:10.1080/10408390601062054.

55-Chavarria D, Silva T, Magalhaes e Silva D, Remiao F, Borges F. Lessons from black pepper: piperine and derivatives thereof. Expert Opin Ther Pat. 2016;26:245-64. doi: 10.1517/13543776.2016.1118057.

56-Singh P, Pandey KB, Rizvi SI. Piperine protects oxidative modifications in human erythrocytes. J Basic Clin Physiol Pharmacol. 2021;33:163–67. doi:https://doi.org/10.1515/jbcpp-2020-0100.

57-Butt MS, Pasha I, Sultan MT, Randhawa MA, Saeed F, Ahmed W. Black pepper and health claims: A comprehensive treatise. Crit Rev Food Sci Nutr. 2014;53:875-86. doi:10.1080/10408398.2011.571799.

58-Takooree H. Aumeeruddy MZ, Rengasamy KR, Venugopala KN, Jeewon R, Zengin G, Mahoomodally MF. A systematic review on black pepper (Piper nigrum L.): From folk uses to pharmacological applications. Crit Rev Food Sci Nutr. 2019;59:210-43. doi:10.1080/10408398.2019.1565489.

59-Wang D, Zhang L, Huang J, Himabindu K, Tewari D, Horbanczuk JO, et al. Cardiovascular protective effect of black pepper (Piper nigrum L.) and its major bioactive constituent piperine. Trends Food Sci Technol. 2021;117:34-45. doi:https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.11.024.

60-Kreuter J. Nanoparticles; a historical perspective. Int J Pharm. 2007;331:1–10.

61-Bayda S, Adeel M, Tuccinardi T, Cordani M, Rizzolio F. The history of nanoscience and nanotechnology: From chemical–physical applications to nanomedicine. Molecules. 2020;25:112. doi:10.3390/molecules25010112.

62-Jeevanandam J, Barhoum A, Chan YS, Dufrense A, Danquah MK. Review on nanoparticles and nanostructured materials: History, sources, toxicity and regulations. Beilstein J Nanotechnol. 2018;9:1050–74. doi:10.3762/bjnano.9.98.

63-Ealias AM, Saravanakumar MP. A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. IOP Conf. Series: Mater Sci Eng. 2017; 263:032019. doi:10.1088/1757-899X/263/3/032019.

64-Mohanraj VJ, Chen Y. Nanoparticles: A Review. Trop J Pharm Res. 2006;5:561-73.

65-Anselmo AC, Mitragotti S. Nanoparticles in the clinic: An update. Bioeng Transl Med. 2019;4:1-16. doi:https://doi.org/10.1002/btm2.10143.

66-Lin W.Nanoparticles in medicine. Chem Rev. 2015;115:10407−409. doi: 10.1021/acs.chemrev.5b00534.

67-Patra JK, Das G, Fraceto LF, Ramos Campos EV, Rodriguez-Torrez MP, Acosta-Torres LS et al. Nano based drug delivery systems: Recent developments and future prospects. J Nanobiotechnol. 2018;16:71. doi:https://doi.org/10.1186/s12951-018-0392-8.

68-Kim J. Liposomal drug delivery system. J Pharm Investig. 2016;46:387–92. doi:10.1007/s40005-016-0260-1.

69-Guimaraes D, Cavaco-Paulo A, Nogueira E. Design of liposomes as drug delivery system for therapeutic applications. In J Pharm. 2021;601:120571. doi:https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120571.

70-Filipczak N, Pan J, Kishan Yalamarty SS, Torchilin VP. Recent advancements in liposome technology. Adv Drug Deliv Rev. 2020;156:4–22. doi:https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.06.022.

71-Gunasekaran T, Haile T, Nigusse T, Dhanaraju MD. Nanotechnology: an effective tool for enhancing bioavailability and bioactivity of phytomedicine. Asian Pac J Trop Biomed. 2014;4:1-7. doi:10.12980/APJTB.4.2014C980.

72-Wang S, Sua R, Niea S, Suna M, Zhanga J, Wub D. Moustaid-Moussaa N. Application of nanotechnology in improving bioavailability and bioactivity of diet-derived phytochemicals. J Nutr Biochem. 2014;25:363–76.

73-Salsabila H, Fitriani L, Zaini E. Recent strategies for improving solubility and oral bioavailability of piperine. Int J Applied Pharm. 2021;13:31-9.

74-Qin L. Advance on delivery nanocarriers of piperine: nanoparticles. China Biofilms E3S Web of Conferences. 2019;131:01002.

75-Şanlıer ŞH, Ak G, Yılmaz H, Ünal A, Bozkaya ÜF, Tanıyan G, Yıldırım Y, Türkyılmaz GY. Development of ultrasound-triggered and magnetic-targeted nanobubble system for dual-drug delivery. J Pharm Sci. 2019;108:1272-83.

76-Nothnagel L, Wacker GM. How to measure release from nanosized carriers. Eur J Pharm Sci. 2018;30:199-211. doi:10.1016/j.ejps.2018.05.004.

77-Sikora A, Shard AG, Minelli C. Size and ζ-potential measurement of silica nanoparticles in serum using tunable resistive pulse sensing. Langmuir. 2016;32:2216–24. doi:https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b04160.

78-Bhattacharjee S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not. J Control Release. 2016;235:337–51. http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017.

79-Ruozi B, Belletti D, Tombesi A, Tosi G, Bondioli L, Forni F et al. AFM, ESEM, TEM, and CLSM in liposomal characterization: a comparative study. Int J Nanomedicine. 2011;557-63. doi:10.2147/IJN.S14615.

80-Dufrene YF, Lee GU. Advances in the characterization of supported lipid films with the atomic force microscope. Biochim Biophys Acta. 2000;1509:14-41. doi:https://doi.org/10.1016/S0005-2736(00)00346-1.

81-Hashemi M, Omidi M, Muralidharan B, Tayebi L, Herpin MJ, Mohagheghi MA, et al. Layer-by-layer assembly of graphene oxide on thermosensitive liposomes for photo-chemotherapy. Acta Biomater. 2018;65:376-92. doi:https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.10.040.

82-Dash S, Murthy PN, Nath L, Chowdhury P. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. Acta Pol Pharm. 2010;67:217-23.

83-Yılmaz H. A pH-Sensitive Chitosan/Oxidized-Kappa-Carrageenan based nano-antibiotic for sustained and controlled release of amoxicillin. Journal of Macromolecular Science Part B. 2022;61:926–41. doi: 10.1080/00222348.2022.2119328.

84-Salehi B, Zakaria ZA, Gyawali R, Ibrahim SA, Rajkovic J, Shinwari ZK et al. Piper species: A comprehensive review on their phytochemistry, biological activities and applications. Molecules. 2019;24:1364. doi:10.3390/molecules24071364.

85-Darwish AB, Mohsen AM, ElShebiney S, Elgohary N, Younis MM. Development of chitosan lipid nanoparticles to alleviate the pharmacological activity of piperine in the management of cognitive deficit in diabetic rats. Sci Rep. 2024;14:8247. doi: https://doi.org/10.1038/s41598-024-58601-x.

86-Kundu P, Das M, Tripathy K, Sahoo SK. Delivery of Dual Drug Loaded Lipid Based Nanoparticles Across Blood Brain Barrier Impart Enhanced Neuroprotection in a Rotenone Induced Mouse Model of Parkinson's Disease. ACS Chem. Neurosci. 2016;7:1658–70. doi: https://doi.org/10.1021/acschemneuro.6b00207.

87-Pentak D. In vitro spectroscopic study of piperine-encapsulated nanosize liposomes. Eur Biophys J. 2016;45:175–86. doi:10.1007/s00249-015-1086-x.

88-D. Suresh and K. Srinivasan, Tissue distribution & elimination of capsaicin, piperine & curcumin following oral intake in rats. Indian J Med Res. 2010;131:682–91.

89-Quijia CR, Chorilli M. Characteristics, biological properties and analytical methods of piperine: A review. Crit Rev Anal Chem. 2020;50:62–77. doi:https://doi.org/10.1080/10408347.2019.1573656.

90-Deng Y, Zhang X, Shen H, He Q, Wu Z, Liao W, et al. Application of the nano-drug delivery system in treatment of cardiovascular diseases. Front Bioeng Biotechnol. 2020;7:489. doi:10.3389/fbioe.2019.00489.

91- Dutta S, Bhattacharjee P. Nanoliposomal encapsulates of piperine-rich black pepper extract obtained by enzyme-assisted supercritical carbon dioxide extraction. J Food Eng. 2017;201:49–56. doi:https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.01.006.

92-Amalia E, Sopyan I, Putriana NA, Sriwidodo S. Preparation and molecular interaction of organic solvent-free piperine pro-liposome from soy lecithin. Heliyon. 2023;9:e16674. doi:https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e16674.

93-Karimi H, Rabbani S, Babadi D, Dadashzadeh S, Haeri A. Piperine liposome-embedded in hyaluronan hydrogel as an effective platform for prevention of postoperative peritoneal adhesion. J Microencapsul. 2023;40:279-301. doi:10.1080/02652048.2023.2194415.

94-Liposome Drug Products Chemistry, Manufacturing, and Controls; Human Pharmacokinetics and Bioavailability; and Labeling Documentation Guidance for Industry. Guideline. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER). 2018. Available from: http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm.

95-Haq IU, Imran M, Nadeem M, Tufail T, Gondal TA, Mubarak MS. Piperine: A review of its biological effects. Phytother Res. 2021;35:680-700. doi:https://doi.org/10.1002/ptr.6855.

96-Yılmaz H. Preparation and Characterization of Chitosan/κ-Carrageenan Based Polymeric Nanoparticles for Gemcitabine Delivery. Erzincan University Journal of Science and Technology. 2022;15:636-48. doi:10.18185/erzifbed.1134093.

97-Chapter 5: Mathematical models of drug release. Editor: Bruschi ML. Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems. Woodhead Publishing Series in Biomedicine; 2015. p.63-86. doi:https://doi.org/10.1016/C2014-0-02342-8.

98-Chang Z, Zhang J, Liu Y, Gao H, Xu G. New mechanical markers for tracking the progression of myocardial infarction. Nano Lett. 2023;23:7350-57. doi:https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.3c01712.

99-Shinde R, Juwarwala I, Modi V, Chandarana CV. Utility of cardiac biomarkers and biosensors for diagnosis of acute myocardial infarction. Global Transl Med. 2023;2:0403. doi:https://doi.org/10.36922/gtm.0403.

100-Panda V, Bhandare N, Mistry K, Dande P. Cardioprotective potential of spinacia oleracea (Spinach) against isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. Arch Physiol Biochem. 2022;128:101-10. doi:10.1080/13813455.2019.1665074.

101-Yin Y, Wang L, Chen G, You H. Effect of fraxetin on oxidative damage caused by isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. Appl Biochem Biotechnol. 2022;194:5666-79. doi: 10.1007/s12010-022-04019-y.

102-Shukla SK, Sharma SB, Singh UR, Ahmad S, Maheshwari A, Misro M et al. Eugenia jambolana pretreatment prevents isoproterenol-induced myocardial damage in rats: evidence from biochemical, molecular, and histopathological studies, J Med Food. 2014;17:244–53. doi:http://dx.doi.org/10.1089/jmf.2013.2795.

103-Amran AZ, Jantan I, Dianita R, Buang F. Protective effects of the standardized extract of Zingiber officinale on myocardium against isoproterenol-induced biochemical and histopathological alterations in rats. Pharm Biol. 2015;53:1795-802. doi: 10.3109/13880209.2015.1008147.

104-Hemalatha KL, Mainzen Prince PS. Anti-inflammatory and anti-thrombotic effects of zingerone in a rat model of myocardial infarction. Eur J Pharmacol. 2016;791:595-602. doi:https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.08.023.

105-Kocak C, Kocak FE, Akcilar R, Isiklar OO, Kocak H, Bayat Z et al. Molecular and biochemical evidence on the protective effects of embelin and carnosic acid in isoproterenol-induced acute myocardial injury in rats. Life Sci. 2016;147:15-23. doi:https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.01.038.

106-Wang Y, Sun H, Zhang J, Xia Z, Chen W. Streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy in rats: Ameliorative effect of piperine via Bcl2, Bax/Bcl2, and caspase-3 pathways. Biosci Biotechnol Biochem. 2020;84:2533-44. doi:https://doi.org/10.1080/09168451.2020.1815170.

107- Ma ZG, Yuan YP, Zhang X, Xu SC, Wang SS, Tang QZ. Piperine attenuates pathological cardiac fibrosis via PPAR-γ/AKT pathways. EBioMedicine. 2017;18:179-87. doi:10.1016/j.ebiom.2017.03.021. Epub 2017.

108-Vurmaz A, Duman R, Sabaner MC, Ertekin T, Bilir A. Antioxidant effects of piperine in in-vivo chick embryo cataract model induced by steroids. Cutan Ocul Toxicol. 2019;38:182–89. doi:https://doi.org/10.1080/15569527.2019.1570521.

109-Vurmaz A, Atay E. Antioxidant effects of piperine on steroid-induced hepatotoxicity. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2021;25:5500-06. doi: 10.26355/eurrev_202109_26659.

110-Güven T. İsoproterenol ile miyokart infarktüsü oluşturulmuş ratlarda vinpocetinin koruyucu ve tedavi edici etkilerinin incelenmesi. [Doktora Tezi]. Malatya: İnönü Üniversitesi;2016.

111-Song X, Xu S, Hu J, Chu S, Liu H, Han N, et al. Piperine prevents cholesterol gallstones formation in mice. Eur J Pharmacol. 2015;751:112-17. doi:https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.01.038.

112-Shah SS, Shah GB, Singh SD, Gohil PV, Chauhan K, Shah KA, Chorawala M. Effect of piperine in the regulation of obesity-induced dyslipidemia in high-fat diet rats. Indian J Pharmacol. 2011;43:296-9. doi: 10.4103/0253-7613.81516.

113-Verma N, Bal S, Gupta R, Aggarwal N, Yadav A. Antioxidative effects of piperine against cadmium-induced oxidative stress in cultured human peripheral blood lymphocytes. J Diet Suppl. 2020;17:41–52. doi:https://doi.org/10.1080/19390211.2018.1481485.

114-Boshagh K, Khorvash F, Sahebkar, A, Majeed M, Bahreini N, Askari G, et al. The effects of curcumin-piperine supplementation on inflammatory, oxidative stress and metabolic indices in patients with ischemic stroke in the rehabilitation phase: a randomized controlled trial. Nutr J. 2023;22:69. doi:https://doi.org/10.1186/s12937-023-00905-1.

115-Heidari H, Bagherniya M, Majeed M, Sathyapalan T, Jamialahmadi T, Sahebkar A. Curcumin-piperine co-supplementation and human health: A comprehensive review of preclinical and clinical studies. Phytother Res. 2023;37:1462-87. doi:https://doi.org/10.1002/ptr.7737.

EKLER

EK 1

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
(Trakya University, Local Ethics Committee of Animal Experiments)

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI

Oturum Sayısı: 2022/07
Karar No: 2022.07.03
Karar Tarihi: 27.07.2022
Hayvan Sayısı ve Cinsi: Sıçan 40 adet

Yürütücülüğünü Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Ana bilim dalı öğretim üyesi, Prof. Dr.Selma SÜER GÖKMEN' in yaptığı, Yaren Güniz ULUÇAM'ın yüksek lisans tezi olarak planlanan,TÜHADYEK-2022/26 protokol no'lu, "**İsoproterenol ile Miyokart İnfarktüsü Oluşturulan Ratlarda Lipozomal Piperinin Oksidatif Strese Etkisinin İncelenmesi**" başlıklı çalışma isteği görüşüldü.Araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmesi sonucunda; Hayvan deneyleri etik kurullarının çalışma usul ve esaslarına dair yönetmelik ve Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu yönergesinde belirtilen ilke ve kurallara uygun bulunarak, çalışmanın yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

KABUL

Prof. Dr. Hakan ERBAŞ
Başkan
Araştırma ile İlişki: □ var ☑ yok
Toplantı Katılım: ☑ evet □ hayır

Prof. Dr. Enis ULUÇAM
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: □ var ☑ yok
Toplantı Katılım: ☑ evet □ hayır

Prof. Dr. Suat ERDOĞAN
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: □ var □ yok
Toplantı Katılım: □ evet □ hayır

Prof. Dr. Y. Atakan SEZER
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: □ var □ yok
Toplantı Katılım: □ evet □ hayır

Prof. Dr. Tevfik AKYOZ
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: □ var ☑ yok
Toplantı Katılım: ☑ evet □ hayır

Prof. Dr. Necdet SUT
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: □ var □ yok
Toplantı Katılım: □ evet □ hayır

-İZİNLİ-

Doç. Dr. Elvan BAKAR
Eczacılık Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: □ var □ yok
Toplantı Katılım: □ evet □ hayır

-İZİNLİ-

Doç. Dr. Filiz SANAL
Fen Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: □ var □ yok
Toplantı Katılım: □ evet □ hayır

Dr. Öğr. Üyesi F. Gülfeşan ÇANAKÇI
Diş Hekimliği Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: □ var □ yok
Toplantı Katılım: □ evet □ hayır

Vet. Hek. Kenan SELVİ
Vet. Hek. Üye
Araştırma ile İlişki: □ var ☑ yok
Toplantı Katılım: ☑ evet □ hayır

Ecz. A. Uğur GÜLER
Sivil Toplum Kuruluşu Sivil Üye
Araştırma ile İlişki: □ var □ yok
Toplantı Katılım: ☑ evet □ hayır

Tarık AYKIZ
Sivil Üye
Araştırma ile İlişki: □ var ☑ yok
Toplantı Katılım: ☑ evet □ hayır

ÖZGEÇMİŞ

BENZERLİK RAPORU

Yaren Güniz ULUÇAM

ORİJİNALLİK RAPORU

%10	%9	%6	%3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	dspace.trakya.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%3
2	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%1
3	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	%1
4	turkpsikiyatri.com İnternet Kaynağı	<%1
5	Bicer, Feryal. "Sican noropatik agri Modelinde Gabapentin, Tramadol Ve Amitriptilinin agri davranisi uzerine Etkileri", Marmara Universitesi (Turkey), 2021 Yayın	<%1
6	www.turkjbiochem.com İnternet Kaynağı	<%1
7	pdffox.com İnternet Kaynağı	<%1
8	tjtes.org İnternet Kaynağı	<%1