



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN
ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



Nigella sativa- ÇÖREK OTU YAĞI
ENKAPSÜLASYONUNUN BAĞIRSAK
MİKROBİYOTASI
ÜZERİNDEKİ PREBİYOTİK ETKİSİNİN
İNCELENMESİ

Aylin GÜNDÜZ REYHANİ

DOKTORA TEZİ

Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı

Mayıs-2025
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

Aylin GÜNDÜZ REYHANİ tarafından hazırlanan “*Nigella sativa*-Çörek Otu Yağı Enkapsülasyonunun Bağırsak Mikrobiyotası Üzerindeki Prebiyotik Etkisinin İncelenmesi” adlı tez çalışması 26/05/2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı’nda DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Başkan

Prof. Dr. Meryem KARA

.....

Danışman

Prof. Dr. Meltem DEMİREL KARS

.....

Üye

Prof. Dr. Gökalp Özmen GÜLER

.....

Üye

Prof. Dr. Erdal KOCABAŞ

.....

Üye

Dr. Öğretim Üyesi Tuğba Melike PARLAK

.....

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun/.../20.. gün ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Havvanur UÇBEYİAY
FBE Müdürü

Bu tez çalışması Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Komisyon Başkanlığı tarafından 221451001 nolu proje ile desteklenmiştir.

Bu tez çalışması TÜBİTAK tarafından 119C100 nolu 2244 Sanayi Doktora Programı projesi ile desteklenmiştir.

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Aylin GÜNDÜZ REYHANİ

Tarih:26/05/2025

ÖZET

DOKTORA TEZİ

Nigella sativa- ÇÖREK OTU YAĞI ENKAPSÜLASYONUNUN BAĞIRSAK MİKROBİYOTASI ÜZERİNDEKİ PREBİYOTİK ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Aylin GÜNDÜZ REYHANI

Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Meltem DEMİREL KARS

2025, 84 Sayfa

Jüri

Prof. Dr. Meryem KARA

Prof. Dr. Meltem DEMİREL KARS

Prof. Dr. Gökalg Özmen GÜLER

Prof. Dr. Erdal KOCABAŞ

Dr. Öğretim Üyesi Tuğba Melike PARLAK

Ranunculaceae familyasından *Nigella sativa* (NS) tohum yağının kuvvetli lipofilik karakterinden dolayı suda çözünürlüğü azdır. NS tohum yağının oksidasyonunu önlemek, salımını kontrol etmek ve hoş olmayan tat ve kokularını maskelemek kullanım kolaylığı ve sağlık açısından etkinliğinin artırılması için önemlidir. Bunun yanında oral yolla alınmada bağırsağa ulaşan ve emilen yağ miktarını artırmak amacıyla bu doktora tez çalışmasında ince film hidrasyon metodu ile NS tohum yağını koruyabilen ve kontrollü salımını sağlayacak noniyonik veziküller olan niyozomlar (NY) elde edilmiştir. Bağırsak mikrobiyotasındaki probiyotik bakterilerin büyümesini ve aktivitesini seçici olarak uyararak konakçıyı yararlı bir şekilde etkileyen gıda bileşeni prebiyotik olarak tanımlanmaktadır. Bu doktora tez çalışmasında NS yağı hapsedilen nano boyutta NY'ler (NS/NY) geliştirilmiş olup, NS/NY'lerden NS salım kinetiği belirlenmiştir. NS/NY ve NS'nin bağırsak mikrobiyotası üzerindeki prebiyotik etkisi incelenmiştir. Bu amaç doğrultusunda hayvan dışkısından elde edilen DNA saflaştırılarak DNA dizi analizi gerçekleştirilmiştir. DNA dizileme sonuçları analiz edilerek NS yağı ve Korsmeyer-Peppas kinetiği ile salım gösteren NS/NY'nin prebiyotik etkileri ve sıçanlar üzerinde herhangi bir yan etkinin olup olmadığı biyokimyasal analiz ile değerlendirilmiştir. Nano NY kapsülleme sisteminin NS yağı modifiye salım için kullanılabilceği ve NS yağının bağırsak mikrobiyotasında probiyotik bakterileri çoğalttığı sonucuna varılmıştır. NS/NY yedirilen sıçan grubunda kontrol grubuna göre elde edilen sonuçlar arasında anlamlı fark tespit edilmemiştir. Bu durumda NS/NY'nin bağırsak mikrobiyotasına toksik etkisinin olmadığı sonucuna ulaşılmıştır. Biyokimyasal analiz sonuçlarına göre kreatinin ve ALT değerleri, Wistar albino erkek sıçanlar için referans aralığındadır. Bu durumda NS ve NS/NY yedirilen sıçanlarda yan etkinin gözlemlenmediği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Nigella sativa*, nano niyozom, kontrollü salım, mikrobiyota, prebiyotik

ABSTRACT

Ph.D THESIS

INVESTIGATION OF PREBIOTIC EFFECT OF *Nigella sativa*- BLACK CUMIN OIL ENCAPSULATION ON GUT MICROBIOTA

Aylin GÜNDÜZ REYHANİ

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
NECMETTİN ERBAKAN UNIVERSITY
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
IN NANOSCIENCE AND NANOENGINEERING

Advisor: Prof. Dr. Meltem DEMİREL KARS

2025, 84 Pages

Jury

Prof. Dr. Meryem KARA

Prof. Dr. Meltem DEMİREL KARS

Prof. Dr. Gökcalp Özmen GÜLER

Prof. Dr. Erdal KOCABAŞ

Asst. Prof. Tuğba Melike PARLAK

Nigella sativa (NS) seed oil from the *Ranunculaceae* family has low water solubility due to its strong lipophilic character. It is essential to prevent the oxidation of NS seed oil, control its release, and mask its unpleasant tastes and odors to ensure ease of use and enhance its health benefits. In addition, in order to increase the amount of oil reaching the gut and being absorbed during oral intake, niosomes (NY) which are nonionic vesicles that can protect NS seed oil and provide controlled release were obtained by thin film hydration method in this doctoral thesis study. Food components that affect the host beneficially by selectively stimulating the growth and activity of probiotic bacteria in the gut microbiota are defined as prebiotics. In this doctoral thesis study, NS oil entrapped nano-sized NYs (NS/NY) were developed and their release kinetics were determined. The prebiotic effect of NS/NY and NS on gut microbiota was investigated. For this purpose, DNA obtained from animal gaita was purified and DNA sequence analysis was performed. DNA sequencing results were analyzed and the prebiotic effects of NS oil and NS/NY released with Korsmeyer-Peppas kinetics and whether there were any side effects on rats were evaluated with biochemical analysis. It was concluded that the Nano NY encapsulation system could be used for modified release of NS oil and that NS oil increased probiotic bacteria in the gut microbiota. No significant difference was detected between the results obtained in the NS/NY fed rat group compared to the control group. In this case, it was concluded that NS/NY had no toxic effect on the gut microbiota. According to the biochemical analysis results, creatinine and ALT values were within the reference range for Wistar albino male rats. In this case, it was concluded that no side effects were observed in rats fed NS and NS/NY.

Keywords: *Nigella sativa*, nano niosome, controlled drug delivery, microbiota, prebiotic

ÖNSÖZ

Doktora tez çalışmamda değerli bilgilerini ve kıymetli zamanını esirgemeyen, eleştirileriyle bana yol gösterici olan, her sorun yaşadığımda yanına çekinmeden gidebildiğim ve gelecekteki mesleki hayatımda da bana verdiği değerli bilgilerden faydalanacağımı düşündüğüm kıymetli danışmanım Sayın Prof. Dr. Meltem DEMİREL KARS'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Tez çalışmalarım sırasında yapmış olduğu katkılarından dolayı ikinci tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Burak DİK'e, değerli katkılarından dolayı doktora tez izleme komitesi üyeleri hocalarım Sayın Prof. Dr. Erdal KOCABAŞ'a ve Sayın Prof. Dr. Gökalp Özmen GÜLER'e teşekkürlerimi sunuyorum. Tez çalışmalarına katkı sağlayan tez jüri üyeleri Prof. Dr. Meryem KARA ve Dr. Öğr. Üyesi Tuğba Melike PARLAK'a teşekkürlerimi sunuyorum. HELVACIZADE ve Zade Vital İlaç Kimya Gıda Sanayi ve Ticaret Anonim Şirketi'ne şükranlarımı sunuyorum.

TÜBİTAK 2244 Sanayi Doktora Programı 119C100 nolu proje kapsamındaki desteklerinden dolayı TÜBİTAK'a ve 211451004 nolu proje kapsamındaki desteklerinden dolayı Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında sağladıkları maddi ve manevi destekleri ile her zaman yanımda olan aileme en içten teşekkürlerimi sunarım. Özellikle sabır ve anlayışları için müteşekkirim.

Doktora tezimi canım kızım Zehra'ya ithaf ediyorum.

Aylin GÜNDÜZ REYHANİ
KONYA-2025

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
1.1. Simgeler	ix
1.2. Kısaltmalar	ix
1.GİRİŞ	1
2.KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. Tıbbi Bitkiler	3
2.1.1. Tıbbi ve aromatik bitki NS	4
2.2. NS tohumlarından yağ çıkarma işlemi	5
2.3. İlaç salım sistemleri	6
2.3.1. Salım kinetiği	8
2.3.1.1. Sıfıncı dereceden kinetik model	8
2.3.1.2. Birinci dereceden kinetik model	9
2.3.1.3. Higuchi kinetik model	9
2.3.1.4. Hixson-Crowell kinetik model	10
2.3.1.5. Korsmeyer-Peppas kinetik modeli	10
2.4. İlaç salım sistemleri olarak nano taşıyıcılar	11
2.4.1. İlaç salım sistemi olarak niyozomlar	12
2.5. Mikrobiyota	13
2.5.1. Prebiyotik ve probiyotikler	14
2.6. Literatür çalışmaları	15
3. MATERYAL VE YÖNTEM	18
3.1. Materyal	18
3.1.1. Kullanılan kimyasallar	18
3.1.2. Kullanılan cihazlar	18
3.2. Yöntem	18
3.2.1. NS tohumu yağında yapılan analizler	18
3.2.1.1. Serbest yağ asitliği (%FFA) tayini	19
3.2.1.2. Yağ asitleri kompozisyonu tayini	19
3.2.2. NS tohumu yağı enkapsüle edilmiş nano boyutta NY'lerin hazırlanması	20
3.2.3. Nano NY'lerin karakterizasyonu	22
3.2.3.1. Taramalı geçirimli elektron mikroskopisi (STEM) analizleri	22
3.2.3.2. Partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli analizi	22
3.2.3.3. Formülasyon bileşenlerinin kimyasal uyumluluğu	22
3.2.3.4. Termal analiz	22
3.2.3.5. Enkapsülasyon verimliliği (%EE)	23

3.2.4. <i>In vitro</i> salım profili	24
3.2.5. NS ve NS/NY'lerin bağırsak mikrobiyotasına prebiyotik etkisinin belirlenmesi	24
3.2.5.1. Deney hayvanlarından dışkı örneklerinin toplanması.....	25
3.2.5.2. Dışkı örneklerinden DNA izolasyonu	26
3.2.5.3. DNA konsantrasyonu ve kalitesinin belirlenmesi	27
3.2.5.4. PCR ve jel elektroforez	28
3.2.5.5. Kütüphane hazırlığı.....	29
3.2.6. Biyoinformatik ve istatistiksel analiz	29
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA	30
4.1. NS yağı analiz sonuçları	30
4.1.1. Serbest yağ asitliği sonuçları	30
4.1.2. Yağ asit kompozisyonu sonuçları	30
4.2. Nano niyozomların karakterizasyonu	31
4.2.1. Taramalı geçirimli elektron mikroskopisi (STEM) analiz sonuçları	31
4.2.2. Ortalama parçacık boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel analiz sonuçları	33
4.2.3. Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi sonuçları.....	37
4.2.4. Termal analiz (TGA/DSC)	39
4.2.5. Enkapsülasyon verimliliği	42
4.3. <i>In vitro</i> salım çalışmaları sonuçları	43
4.3.1. <i>In vitro</i> salım kinetikleri.....	45
4.4. Nano NY'lerin bağırsak mikrobiyotasına prebiyotik etkisinin incelenmesi	46
4.4.1. DNA konsantrasyon sonuçları.....	46
4.4.2. Mikrobiyal profil	47
4.4.3. Biyokimyasal analiz sonuçları.....	63
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	66
5.1. Sonuçlar	66
5.2. Öneriler	69
6. KAYNAKLAR.....	71
ÖZGEÇMİŞ.....	82

SİMGELER VE KISALTMALAR

1.1. Simgeler

C	Santigrat
µmol	Mikromol
fmol	Femtomol
M	Molarite
U	Unit
kg	Kilogram
g	Gram
mg	Miligram
ng	Nanogram
L	Litre
dL	Desilitre
cm	Santimetre
mL	Mililitre
µm	Mikrometre
nm	Nanometre
ppm	Milyonda bir birim
kV	Kilovolt
mV	Milivolt
kX	Büyütme oranı
dk	Dakika
rpm	Dakikadaki devir sayısı
g (rcf)	Göreceli santrifüj kuvveti
R ²	Belirlilik katsayısı

1.2. Kısaltmalar

NS	<i>Nigella sativa</i>
NY	Niyozom
TGA	Termogravimetrik analiz
DSC	Diferansiyel taramalı kalorimetri
FT-IR	Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi
GC	Gaz kromatografisi
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
NaCl	Sodyum klorür
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PDI	Polidispersite indeksi
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
STEM	Taramalı-geçirimli elektron mikroskobu
OTU	Operasyonel taksonomik birimler
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
UHPLC	Ultra yüksek basınçlı sıvı kromatografisi

1. GİRİŞ

Nigella sativa (NS) tohumu Orta Doğu, Uzak Doğu ve Batı Asya'da yaygın olarak kullanılan *Ranunculaceae* familyasına ait bir bitkidir (Rashwan ve ark., 2023). Bağışıklık sistemini uyarıcı, antiinflamatuvar ve antioksidan etkileri olan popüler bir bitkidir (Pop ve ark., 2020).

NY'ler, tabakaları arasında sulu fazın bulunduğu tek veya çok tabakadan oluşan lipozom benzeri veziküllerdir. NY'lerin hazırlanması noniyonik madde ve kolesterol kullanılarak ince film hidrasyon yöntemiyle gerçekleştirilmektedir. Lipozomlara amfifilik ve lipofilik etkin maddeleri kapsülleyebilmeleriyle benzerler. NY'lerle lipozomlar arasındaki önemli farklardan biri NY'lerin hazırlanmasında polioksietilen alkil eter, polioksietilen alkil ester, sakkaroz diesterleri gibi noniyonik yüzey aktif maddelerin kullanılmasıdır. Bu yapı NY'lerin lipozomlara kıyasla daha stabil olmalarını sağlamaktadır (Süren, 2012).

NY'lerin küresel olduğu varsayılmaktadır. Bu küre çaplarının belirlenmesinde TEM görüntüleme kullanılmaktadır. NY solüsyonlarının parçacık boyut dağılımı zeta sizer ile ölçülmektedir. Kapsülleme verimliliği bir yükün NY'ler kullanılarak başarıyla kapsüllendiğinin göstergesidir (Witika ve ark., 2022).

Çörekotu yağı, oksidasyona karşı özellikle hassas olan işlevsel bileşenlere sahip olan tekli doymamış yağ asitleri açısından zengindir, bu da hoş olmayan tat ve aromaların oluşmasına ve ürünün raf ömrünün azalmasına neden olur. Ayrıca insan sağlığı üzerinde olumsuz etkileri olabilecek serbest radikallerin oluşumuna da yol açabilir. Enkapsülasyon ile çoklu doymamış yağ asidi bakımından zengin yağların oksidasyondan korunması, salımlarının kontrol edilebilmesi ve hoş olmayan tat ve kokularının maskelenebilmesi sağlanmaktadır (Palamutoğlu ve ark., 2022).

Bağırsak mikrobiyotası, insan gastrointestinal sisteminde yaşayan mikroorganizmaları ifade eder. Bu dinamik topluluk ağırlıklı olarak prokaryotik alandaki türleri ve daha az ölçüde mantarları, parazitleri ve arkeleri kapsar. Virüsler de bu ortamın bileşenleridir. Mikrobiyal türlerin genetik ve fonksiyonel profiline bağırsak mikrobiyomu denir (Bander ve ark., 2020).

İlk olarak 1995 yılında Glen Gibson ve Marcel Roberfroid tarafından "kolondaki bir veya sınırlı sayıda bakterinin büyümesini ve/veya aktivitesini seçici olarak uyararak konakçıyı faydalı bir şekilde etkileyen bir gıda bileşeni" olarak tanımlanan prebiyotikler, faydalı bakteri türlerinin fermentasyon ürünlerinden biri olan kısa zincirli yağ asitleri

dahil birçok metabolitin oluşturulmasını sağlamaktadır. Prebiyotikler, bağırsak mikrobiyotasının bileşenlerini ve aktivitelerini modüle etmektedir (Sredkova ve ark., 2020, Snelson ve ark., 2021).

Prebiyotikler mikroorganizma içermez, yalnızca onların büyümesini teşvik eden maddeler içerir. Prebiyotikler anne sütü, soya fasulyesi ve çığ yulaf gibi çeşitli kaynaklardan elde edilebilir ancak en popüler prebiyotikler bitkilerde bulunan oligosakkaritlerdir (Oniszcuk ve ark., 2021). Son zamanlarda, oligosakkaritler, dirençli nişasta, inülin, laktuloz, pirodekstrinler, şeker alkolleri, levanlar ve laktosükroz gibi prebiyotikler, biyoaktif gıda ürünlerinin yenilikçi ve önemli sağlık destekleyicileri olarak besin bileşenlerinin işlevini artırmak amacıyla sıklıkla fonksiyonel gıdalara eklenmektedir (Peng ve ark., 2020). Son araştırmalar, probiyotiklerin ve prebiyotiklerin bağışıklık sistemi, kanser metastazı, tip 2 diyabet ve obezite ile ilgili birçok bozukluğu hafiflettiğine dikkat çekmektedir (Oniszcuk ve ark., 2021).

Bu doktora tez çalışmasında NS yağının enkapsüle edileceği nano boyuttaki NY'lerin morfolojileri ve partikül boyutları incelenmiştir. Etkin madde açığa çıkış mekanizmaları ile kinetik modellerinin değerlendirilmeleri yapılmıştır. Ayrıca nano NY'lerin mide ve bağırsak simüle edilerek salım profilleri incelenmiştir. Ardından NS yağı enkapsülasyonu yapılan nano boyuttaki NY'lerin *in vivo* çalışması ile deney hayvanlarına (sıçanlara) yedirilerek bağırsak mikrobiyotası üzerine etkileri incelenmiştir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Tıbbi Bitkiler

Modern bilim, hastalıkları tedavi edebilen ve iyileştirebilen bitkiler ve bitki özleri keşfetmiş olsa da tarih öncesi çağlarda sağlık alanında ilerlemeyi sağlayan bileşenleri içeren bitkileri bulmak ve tanımlamakta insanlar zorlanmıştır. En eski mevcut tıbbi kayıtlara MÖ 5000-3000 yıllarında Sümerler tarafından kil tabletlerde rastlanılmaktadır. Bu kayıtlar, insanların hastalıkları tanımlayabildiği ve kullanılan bitkilerle bu hastalıkları iyileştirebildiği ile ilgilidir. MÖ 3400 ile 3100 yılları arasında soğuk, dağlık Alpler'de kazara öldürülen Buz Adam Ötzi olarak bilinen korunmuş vücutta keşfedilen tıbbi bitkiler, başkalarının tıbbi bitkilerden haberdar olduğunu göstermektedir. Tarihte ilaçlarla ilgili eksik bilgi mevcut olsa da tıbbi bitkilerin iyileştirme ve korumadaki rolü değerlidir (Inoue ve ark., 2019).

Çağlar boyunca insanlar, ilaç, gıda, tat, gübre, koku, giyim, barınma yeri ve ulaşım araçları gibi basit ihtiyaçları için doğaya muhtaç kalmışlardır. Tıbbi bitkiler, hemen hemen tüm kültür ve medeniyetler için geleneksel ilaçların zengin kaynakları olarak kabul edilir ve bu bitkilerden birçok modern ilaç üretilir. Binlerce yıldır tıbbi bitkiler ilaç kaynağı olarak kullanımının yanı sıra hastalıkları tedavi etmek ve salgınları önlemek, yiyeceklere lezzet katmak ve yiyecekleri korumak için kullanılmıştır. Ayrıca çeşitli endüstrilerde bitkilerin katkısı, kozmetikler, ilaçlar ve endüstriyel hammaddeler olarak kullanımı önem kazanmıştır (Pakdemirli ve ark., 2021).

Bitkisel ürünlerin insanlar tarafından tedavi amaçlı kullanım oranı Orta Doğu, Asya ve Afrika'daki bazı ülkelerde bu oran %95 iken Almanya'da bu oran %40-50 aralığında değişmektedir. ABD'de kullanım yüzdesi %42, Avustralya'da %48 ve Fransa'da ise %49'dur. Zengin bir floraya sahip Türkiye'nin yaklaşık 11000 bitki taksonu bulunmaktadır. Bu bitki taksonlarının yaklaşık 500'ü alternatif tıpta hem yaş hem de kuru halleri ile kullanılmaktadır. Ülkemizde tıbbi aromatik bitkilerin en yaygın olduğu bölgeler; Ege, Akdeniz, Güneydoğu Anadolu, Marmara ve Doğu Karadeniz'dir (Göktaş ve ark., 2019).

FAO Biyoçeşitlilik El Kitabı, tıbbi ve aromatik bitkilerin hastalıkları önlemede ve tedavi etmekte kullanılmaları yönünde önemli bir yere sahiptir. Bu bitkilerin kullanım açısından güvenilirliği Genel Olarak Güvenli Olarak Tanınmış (GRAS) statüsüne sahip olmalarını sağlamaktadır (Dikme, 2023). ABD Gıda ve İlaç Dairesi, 2007 yılında gıda

takviyelerinin tanımlanması için Tainted Dietary Supplement Database'i oluşturmuştur (White, 2022).

2.1.1. Tıbbi ve aromatik bitki NS

NS, 30-60 cm yüksekliğinde bir bitkidir. Yaprakları alternatif ve çift kanatlıdır. Çiçekler terminal, saplı ve beyazımsı mavi veya morumsu renktedir. Meyve kapsül şeklindedir. Tıp alanında daha çok ana bileşenleri olan kurutulmuş meyve ve tohumlar kullanılmaktadır. NS tohumları siyah renkli ve üçgen şeklindedir. Beyaz yağlı bir çekirdeğe sahip tohum ovalandığında hafif bir havuç kokusu ile limon kokusunun hoş bir şekilde yayıldığı görülür (Ara ve ark., 2020).

NS, biyolojik aktiviteleri ve terapötik potansiyeli açısından kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Diüretik, antihipertansif, antidiyabetik, antikanser ve immünomodülatör, analjezik, antimikrobiyal, antihelmintik, analjezik ve antiinflamatuvar, spazmolitik, bronkodilatör, gastroprotektif, hepatoprotektif, böbrek koruyucu ve antioksidan özellikleri gibi geniş bir aktivite yelpazesine sahiptir. Ayrıca bronşit, astım, ishal, romatizma ve cilt rahatsızlıkları gibi birçok hastalığın tedavisinde önemli rol oynamaktadır. Karaciğer toniği, sindirimi kolaylaştırıcı, ishal önleyici, iştah açıcı, emziren annelerde süt üretimini artırıcı mucizevi bir bitkidir. Parazitik enfeksiyonlarla savaşma ve bağışıklık sistemini destekleme açısından önemli bir potansiyele sahiptir. Bu bitkinin tedavi edici özelliklerinin çoğu, uçucu yağın ana aktif kimyasal bileşeni olan timokinon varlığından kaynaklanmaktadır. Toksisitesinin düşük olması özelliği ile ekmek ve turşularda tatlandırıcı katkı maddesi olarak kullanılmaktadır (Ahmad ve ark., 2013).

Günümüzde insanların değişen yaşam tarzı ve beslenme alışkanlıkları tıbbi bitkilere olan rağbeti artırmıştır. Kronik rahatsızlıkların artmasıyla sentetik ilaçların etkinliği azalmış ve fitoterapi araştırmalarına yönelik çalışmalar önem kazanmıştır. Kronik iltihaplı hastalıkların kontrolünde kullanılan geleneksel tıbbin vazgeçilmez bitkisi NS'dır (Wahab ve ark., 2023).

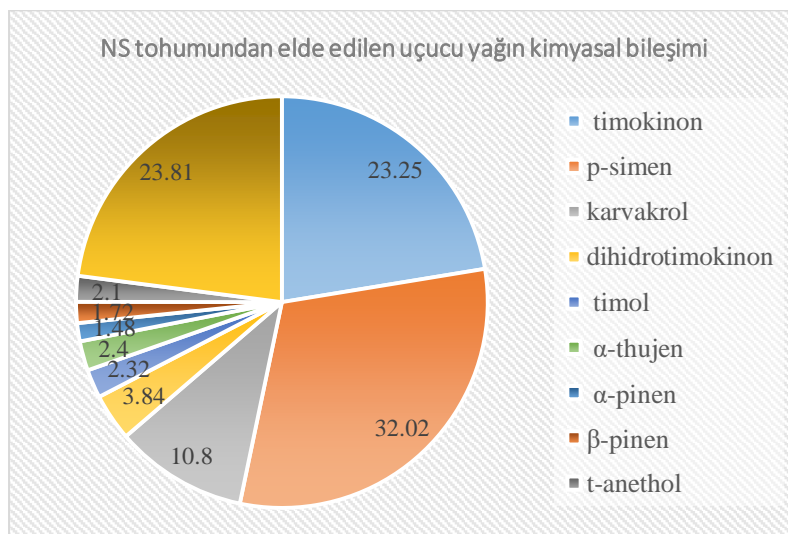
Antibiyotiklerin potansiyel doğal kaynağı aromatik bitkilerdir. Aromatik bir bitki olarak NS, ilaçların antimikrobiyal, antifungal ve antioksidan gibi özelliklerini desteklemek için kullanılmaktadır (Mokhtariniya ve ark., 2015).

NS, Asya ve Orta Doğu'ya özgü bir angiospermdir. Modern tıp ortaya çıkmadan önce dünyada geleneksel tıpta her türlü rahatsızlık ve hastalığın tedavisi için kullanılmıştır (Dabeer ve ark., 2022). Müslümanlar arasında yaygın olarak kabul gören

bir inanışa göre, Arapçada "Habba sawda" olarak adlandırılan çörek otu tohumu, ölüm hariç her türlü hastalığa karşı kullanılan şifa kaynağıdır (Dalli vd., 2021).

2.2. NS tohumlarından yağ çıkarma işlemi

NS tohum yağı; soğuk presleme, süperkritik akışkan ekstraksiyonu (SFE) ve hekzan gibi çözücü ekstraksiyonu gibi yöntemlerle çıkarılmaktadır. Soğuk pres ekstraksiyonu en yaygın yağ çıkarma prosesidir (Sundar ve ark., 2023). NS tohum yağı içeriği %34,4 ila %38,7 arasında değişmektedir. Öte yandan sabit yağ bileşimi bu fraksiyonun %98,2-99,9'udur. Ayrıca esansiyel yağ asitleri, tokoferoller ve steroller bakımından zengindir. Nötr lipitler, toplam lipit fraksiyonunun %93,5'ini oluşturmaktadır. Ayrıca % 96 triasilgliserol (TAG), %2,0 serbest yağ asitleri (FFA) ve %1,9 diasilgliserol içermektedir (Mazaheri ve ark., 2019). NS yağının yaklaşık %2'sini oluşturan timokinon, p-simen, karvakrol, timol, dihidrotimokinon gibi uçucu yağ bileşenlerinin konsantrasyonları şekil 2.1'de gösterilmektedir (Bulca, 2014).

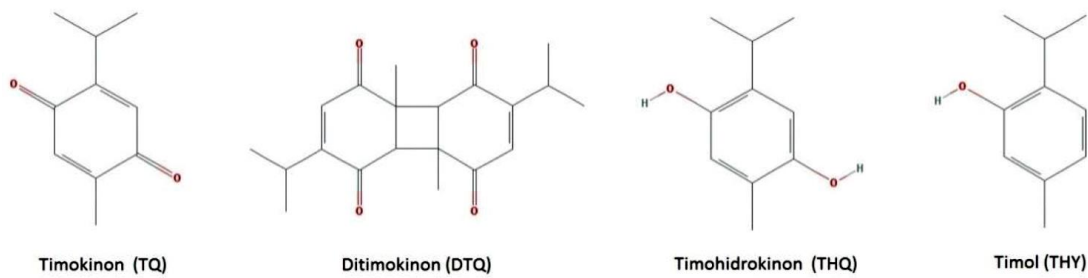


Şekil 2.1. NS tohumundan elde edilen uçucu yağın kimyasal bileşimi (Bulca, 2014)

Soğuk sıkım yöntemi düşük maliyetli olması, daha az enerji ihtiyacı, toksik olmaması, diğer ekstraksiyon yöntemlerinden daha kolay olması ve bu yöntem kullanılarak yüksek kaliteli bir ürün elde edilebilmesi gibi avantajları barındırmaktadır. Ayrıca soğuk sıkımla elde edilen yağlara herhangi bir rafinasyon işleminin uygulanması gerekmemektedir. Soğuk sıkım ile elde edilen yağ doğrudan tüketilebilme özelliğine ve yüksek kalitede bir bileşime sahiptir. Ayrıca karakteristik bir tohum aroması ve kokusu bulunmaktadır. Bütün bu avantajlara sahip olan bu proses sisteminde katı-sıvı faz

ayrımını sağlayan mekanik basınç altında bir vidalı pres çalıştırılmaktadır. Soğuk pres ekipmanı beslemeden yağ akımı ve kek olmak üzere iki ana akım üretmektedir. Yağlı tohumun ön işleme sürecinde etkilidir (Ketenöglü ve ark., 2020).

NS tohum yağının ana aktif bileşenleri şekil 2.2’ de gösterilen timokinon, ditimokinon, timohidrokinon (nigellon) ve timoldür. Timokinon 2-izopropil-5-metil-1,4-benzokinon yapısındadır ve molekül formülü de $C_{10}H_{12}O_2$ ’dir (Üstün, 2015). Timokinon, NS tohumunun ekstraksiyonu ile elde edilen güçlü bir antioksidan fitokimyasaldır (Jasemi ve ark., 2022). NS tohum yağının aktif bileşeni olan timokinonun varlığı, NS tohum yağına antimikrobiyal, antihipertansif, analjezik, gastroprotektif, antidiyabetik, antienflamatuvar, immünomodülatör, antikanser gibi biyolojik özellikler kazandırmaktadır (Tabassum ve ark., 2021). Timokinonun nöroprotektör özelliği onu nörodejeneratif süreçlerde nöron hasarının ana patojenik faktörlerinden biri olan oksidatif strese yönelik terapötik hedef haline getirmektedir (Isaev ve ark., 2023).



Şekil 2.2. Çörek otu tohumu yağının aktif bileşenleri (Üstün, 2015).

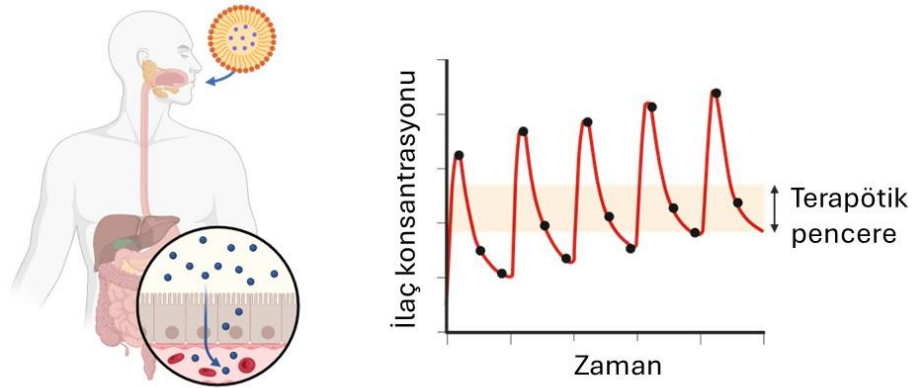
2.3. İlaç salım sistemleri

İlaç salımı, farmasötik bileşiğin tedavi amaçlı uygulandığı süreci ifade etmektedir (Tiwari ve ark., 2012). İlaç salım sistemleri ilaçların metabolizmasını, gücünü, toksisitesini, immünojenitesini ve biyolojik olarak tanınmasını düzenleyen sistemlerdir. Bu özellikleri sayesinde ilaç işlevini gerçekleştireceği mikroçevreyi iyileştirmektedir. Böylece ilacın vücut tarafından alımı kolaylaşmaktadır. Geleneksel yöntemlere göre ilaç salım sistemleri gelişmiş ilaç stabilitesi, optimize edilmiş ilaç salımı, artan hedef konsantrasyonu ve azaltılmış yan etkilere yol açma, hassas ilaç lokalizasyonu, zamanlaması ve azaltılmış terapötik dozaj, azaltılmış toksisite ve yükseltilmiş terapötik indeks gibi birçok avantaja sahiptir. Ayrıca bu sistemler ilacın hedef bölgeye taşınmasını ve böylece kontrollü salımını sağlamaktadır (Chen ve ark., 2024).

Geleneksel hızlı salımlı formülasyonlar genellikle hızlı ilaç emilimine ve ardından plazma konsantrasyonlarında hızlı bir düşüşe neden olur, bu da sık dozlama gerektirebilir ve potansiyel olarak ilaç seviyelerinde dalgalanmalara yol açabilir. Bu, terapötik faydaları sınırlayabilir ve terapötik pencere içinde uygun ilaç konsantrasyonlarının korunmasında zorluklar yaratabilir (De Jesus ve ark., 2022).

Terapötik pencere, çoğu hasta için etkili olan dozların seçilmesi için önemlidir. Bu aralıkta bir ilacın uygulanması, gereksiz doz artışları olmadan terapötik hedeflere ulaşılmasını sağlar. Böylece terapötik pencere ile ilaç etkinliği artar ve ilacın yan etkisi azalır (Bonnet, 2024). Kontrollü salım, bir kimyasalın malzeme veya cihazdan salım süresini, salım oranını veya her ikisini de kontrol etmesi şeklinde gerçekleşmektedir (Özçelik ve ark., 2022). Şekil 2.3'te gösterildiği gibi kontrollü salım sistemlerinde ilaç seviyeleri, terapötik pencere içinde sürekli olarak tutulmaktadır. İlacın kesin dozunu önceden belirlenmiş bir süre boyunca serbest bırakarak ilaç plazma seviyelerini sürekli olarak korur. Bu, dozu ve doz sıklığını azaltmaya yardımcı olur ve hasta uyumunu iyileştirir. İlacın biyolojik ortama daha az maruz kalması, ilacın toksisitesini ve yan etkilerini azaltır. Dozaj formunun genel etkinliği artırılır (Adepu ve ark., 2021).

Kontrollü salım sistemlerinin sürekli salım, yavaş salım ve uzatılmış salım olmak üzere 3 değişik formu bulunmaktadır. Sürekli salımda tek doz ilacın uygulanmasından sonra ilacın uzun bir süre boyunca salımıyla daha uzun süreli terapötik etki elde etmeyi amaçlamaktadır. Yavaş salımlı dozaj formları, ilacı normal hızdan daha yavaş bir hızda salan ve esas olarak dozaj sıklığını iki kat azaltan farmasötik dozaj formlarıdır. Uzatılmış salım sistemleri ise ilacın uzun bir zaman dilimi boyunca yavaş ve sürekli salımını sağlamak üzere tasarlanmıştır. Dahası, bu sistemler ilacın hızlı emilimini de önler, bu da aşırı yüksek tepe plazma ilaç konsantrasyonu ile sonuçlanabilir. Gecikmeli salım sistemleri, tek bir dozaj formuna yerleştirilmiş bir veya daha fazla hızlı salımlı üniteden ilacın tekrarlayan ve kesikli dozlanmasını içerir (Kaur ve ark., 2017).



Şekil 2.3. İlaç salım sistemleri a) oral yolla alınan etken maddelerin yüksek konsantrasyonda kalın bağırsağa ulaşip emilimin artmasını, b) damar yoluyla alınan etken maddelerin konsantrasyonunun plazmada uzun süreli terapötik pencere içerisinde kalmasını hedeflerler (<https://BioRender.com>).

2.3.1. Salım kinetiği

İlaçların çözünmesi ve salımı modifiye salımlı dozaj formunun tasarımı ve optimizasyonu için önemlidir (Üresin ve ark., 2011). İlaç salım kinetiği, matriksin bileşimine, geometrisine, hazırlama yöntemine ve ilaç salımının çözünme ortamına bağlı özelliklere dayanmaktadır. Kinetik modeller, ayrıca parçacık boyutu dağılımı, ilacın polimerik parçacıklar içindeki fiziksel durumu, konsantrasyon profili ve yüklenen ilacın çözünme ile difüzyon özelliklerine bağlıdır. İlaç salımının matematiksel modellemesi, ürün geliştirmeyi kolaylaştırmak ve karmaşık farmasötik dozaj formlarının salım davranışını anlama açısından önemli bir potansiyele sahiptir (Paarakh ve ark., 2018).

2.3.1.1. Sıfırıncı dereceden kinetik model

Sıfırıncı dereceden salım kinetiği, bir ilaç salım cihazından sürekli ilaç salım sürecinin modellemesidir. Bu ilaç sistemleri arasında oral ozmotik tablet, transdermal sistem, düşük çözünürlüğe sahip ilaçlar içeren matris tablet sayılabilmektedir. Birim zaman başına aynı miktarda ilaç salımı olarak tanımlanan sıfırıncı dereceden ilaç salımı denklem 1'deki gibi ifade edilmektedir:

$$C = C_0 + k_0t \quad (1)$$

Bu denklemde C salınan ilaç miktarı, C_0 çözeltideki ilk ilaç miktarı ve k_0 sıfırıncı mertebeden sabittir (Laracuate ve ark., 2020).

2.3.1.2. Birinci dereceden kinetik model

Birinci dereceden kinetik modeli zamanla ilaç salım hızının sadece sistemde salınan ilaç miktarına bağlı olduğunu ifade etmektedir. Modeli temsil eden denklem aşağıda denklem 2 ile gösterilmektedir:

$$\log Q_t = \log Q_0 - (Kt / 2,303) \quad (2)$$

K, log% kalan kümülatif salımın zamana göre grafiğinden elde edilen düz çizginin eğiminden elde edilen birinci dereceden sabittir.

Bu modelde salım hızı, matrisin katı-sıvı arayüzü ile ortam arasındaki konsantrasyon gradyanına orantılıdır. Model, gözenekli matrislerde suda çözünen ilaçlar içerenler gibi farmasötik dozaj formlarının çözünmesine uygulanabilir (Khalbas ve ark., 2024).

2.3.1.3. Higuchi kinetik model

1961 ve 1963 yılları arasında Higuchi, hem düşük hem de yüksek çözünürlüğe sahip ilaçlar için matris sistemlerinden ilaçların salım oranlarını tanımlamak üzere matematiksel denklemler geliştirmiştir. Bu matematiksel denklemler, homojen bir matriste dağılmış bir parçacığın difüzyonu ile ilgilidir. Lipofilik ve düzlemsel matrise sahip bir sistem için, Higuchi tarafından aşağıdaki denklem 3 önerilmiştir:

$$f_t = Q = A\sqrt{D(2C - C_s)C_s t} \quad (3)$$

Burada Q, birim alan başına t zamanında salınan ilaç miktarıdır, C başlangıç konsantrasyonudur, C_s ilacın ortamdaki çözünürlüğüdür ve D ilacın difüzyon katsayısıdır.

Bu modelleme, ilaç salımı ortamda doygunluk konsantrasyonuna ulaşılan kadar olan süreç için uygulanabilmektedir. Higuchi aktif madde salımında ve çözünürlüğünde gözenekliliğinde dahil edildiği yeni bir denklem önermiştir.

$$Q = \sqrt{D\delta/\tau}(2C - \delta C_s)C_s t \quad (4)$$

Burada ε matrisin gözenekliliği, τ kılcal kıvrım faktörüdür. Bu model, bir çözelti ortamıyla temas halindeyken çözünmeyen bir matris varsayar. Salınan ilacın konsantrasyonunu zamanın kareköküne bağlayan Higuchi denkleminin basitleştirilmiş biçimi şu şekilde yazılabilir:

$$f_t = Q = K_H \times t^{1/2} \quad (5)$$

K_H : Higuchi çözünme katsayısı

Higuchi denklemi kullanılırken başlangıçtaki ilaç konsantrasyonunun ilacın çözünürlüğünden çok daha yüksek olduğu ve formülasyonun kalınlığının ilaç moleküllerinden daha büyük olduğu varsayımları yapılmalıdır (Bruschi, 2015).

2.3.1.4. Hixson-Crowell kinetik model

Hixson ve Crowell tarafından 1931 yılında geliştirilen Hixson ve Crowell küp kök yasası modeli ile parçacıkların çapında ve tabletlerin yüzey alanında bir değişikliğin olması durumunda ilacın sistemden nasıl salınacağı ifade edilmektedir. Hixson Crowell modeli, aşağıdaki denklem 6 ile ifade edilmektedir.

$$M_0/3 - M_t/3 = \kappa t \quad (6)$$

Burada ' W_0 ' başlangıç aşamasındaki ilaç miktarını temsil eder. ' W_t ' t zamanında mevcut olan ilacın kalanıdır. ' κ ' (kappa) sabittir.

Bu denklem, dağılıbilir tabletler ve geleneksel tabletler gibi anında salınan dozaj formlarının çözünme verilerinin açıklanması amacıyla kullanılmaktadır.

İlaç salım kinetiğini incelemek için çözünme verileri in vitro ilaç çözeltisinden alınır ve veriler, kalan ilacın yüzdesinin zamana göre küp kökü olarak çizilir (Mohamed Rizwan ve ark., 2020).

2.3.1.5. Korsmeyer-Peppas kinetik modeli

Korsmeyer ve arkadaşları polimerik bir sistem denkleminde ilaç salımını sağlayan bir modelleme kurmuşlardır. İlaç salımının mekanizması araştırılırken öncelikle %60 ilaç salımı verisi Korsmeyer Peppas modeline uydurulmuştur.

$$M_t / M_\infty = K t^n \quad (7)$$

Burada M_t / M_∞ , t zamanında salınan ilacın bir kesridir, k salım hızı sabitidir ve n salım üssüdür. n değeri, silindirik şekilli matrisler için farklı salımları karakterize etmek için kullanılır. n değerine bağlı olarak tanımlanan salım mekanizmaları çizelge 2.1'de gösterilmektedir.

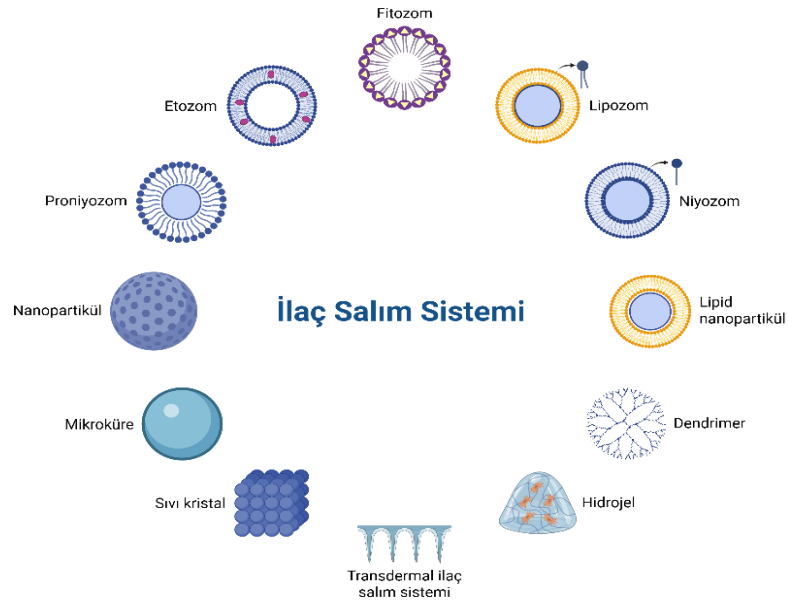
Çizelge 2.1. Polimerik filmlerden difüzyonel salım mekanizmalarının yorumlanması

Salım üssü (n)	İlaç salım mekanizması	Zamana bağlı oran
0,5	Fickian difüzyonu	$t^{-0,5}$
0,45 < n < 0,89	Non -Fickian salımı	t^{n-1}
0,89	Durum II salımı	Sıfır derece salım
0,89'dan yüksek	Süper durum II salımı	t^{n-1}

Bu modelde, n değeri, ilacın salım mekanizmasını karakterize eder. Silindirik tabletler durumunda, $0,45 \leq n$, Fickian difüzyon mekanizmasına, $0,45 < n < 0,89$, Fickian olmayan taşımaya, $n = 0,89$, Durum II (gevşeme) taşımaya ve $n > 0,89$, süper durum II taşımaya karşılık gelir. Salım eğrisinin $M_t / M_\infty < 0,6$ olan kısmı n üssünü bulmak için kullanılmaktadır (Dash ve ark., 2010).

2.4. İlaç salım sistemleri olarak nano taşıyıcılar

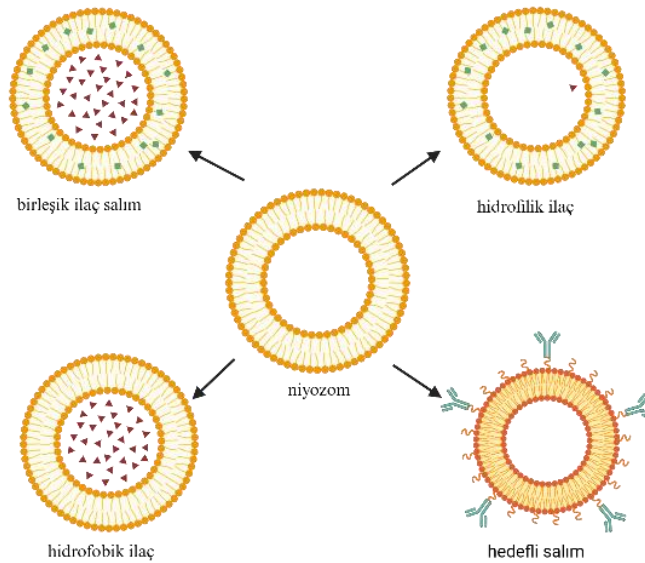
Nanoteknolojinin biyolojik sistemlere uygulanması ile nano taşıyıcılara istenen özellikler konjuge edilmektedir. Böylece hastalıklı bölgelere bu nano taşıyıcılar pH, sıcaklık ve enzimsel değişiklikler aracılığı ile pasif olarak ya da manyetik yöntemler, sıcaklık, ultrason ile aktif olarak hedeflendirilebilmektedir. Böylece çözünürlüğü düşük olan etken maddelerin çözünürlüğü artırılmaktadır. Hedefe yönelik bu tedavilerin en önemli özelliği ise biyoyararlanım artışında önemli rol oynamalarıdır. Bu nano taşıyıcılar şekil 2.4'te gösterilen nanopartiküller, nano lipozomlar, hidrojeller, nano emülsiyonlar, nano süspansiyonlar, niyozomlar, dendrimerler, karbon nanotüpler, polimerik miseller ve katı lipit nanopartiküller olabilmektedir (Tüylek, 2017).



Şekil 2.4. İlaç salım sistemleri olarak nano taşıyıcılar (<https://BioRender.com>)

2.4.1. İlaç salım sistemi olarak niyozomlar

Lipozomlar ilk veziküler ilaç taşıyıcı sistemlerdir; ancak toksisite ve farklı pH değerlerinde stabilite sorunları gibi birçok dezavantaja sahiptirler. Lipozomların dezavantajları nedeniyle araştırma ilgisi niyozomlara (NY) doğru kaymıştır. NY'ler, ilaçların sürekli, kontrollü ve hedefli dağıtımını için kullanılabilen veziküler, yeni ilaç salım sistemleridir. İyonik olmayan yüzey aktif maddelere ek olarak kolesterol veya türevlerini ve yüklü molekülleri de içermektedirler. Yapıları nedeniyle hem hidrofilik hem de hidrofobik ilaçların yüklenmesi ve taşınmasında kullanılabilirler (Bhardwaj ve ark., 2020). Şekil 2.5'te gösterildiği gibi ilaç salım sistemi olarak niyozomlar hidrofilik ve hidrofobik ilaç salımının yanı sıra hedefe yönelik ilaç salımında önem taşımaktadırlar. Ayrıca birleşik ilaç salımına imkân tanınmasıyla niyozomlar özellikle kanser hastalarının tedavisinde ilacın biyoyararlanımını artırmaya yönelik önem teşkil etmektedirler (Dave ve ark., 2023).



Şekil 2.5. İlaç taşıyıcı sistemi olarak niyozom (<https://BioRender.com>)

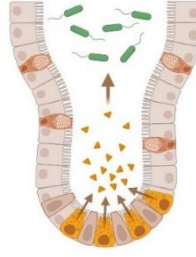
Gastrointestinal kanalda, NY vezikülleri ilacı depolamaktadır ve ilacın biyoyararlanımını artıracak olan veziküllerdeki enzimatik ve asidik bozunmadan ilacı korumaktadır (Singh ve ark., 2023). Lipozom ve nano lipozom formülasyonları gibi lipid bazlı taşıyıcıların kullanıldığı ilaç salım uygulamalarında, 0,3 ve 0,3'ten küçük polidispersite indeksi (PDI) kabul edilmektedir. Bu PDI değeri fosfolipit keseciklerinin homojen bir popülasyonunu göstermektedir (Danaei ve ark., 2018).

NY hazırlama yöntemleri arasında eter enjeksiyon, ters faz buharlaştırma, transmembran pH-gradyanı ve ince film hidrasyon yöntemi sayılabilmektedir. İnce film hidrasyon yöntemi, NY'lerin hazırlanmasında yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Bu yöntemde, yüzey aktif madde ve kolesterol (zar oluşturucu malzemeler), döner bir buharlaştırıcının yuvarlak tabanlı bir şişesinde organik bir çözücü içinde çözülür, ardından organik çözücünün buharlaştırılmasıyla yüzeyde kurutulmuş ince bir film oluşturulur. Daha sonra sulu ortam (su veya tampon), çok katmanlı kesecikler üretmek için sabit hafif çalkalama altında belirli bir süre boyunca yüzey aktif maddenin geçiş sıcaklığının üzerindeki bir sıcaklıkta filme eklenir; bu daha sonra tek katmanlı kesecikler elde etmek üzere sonikasyona tabi tutulabilir. Kapsüllenecek ilaçlar, çözünürlüklerine bağlı olarak sulu veya organik fazda çözülür. Bu tekniği genellikle homojen boyut dağılımına sahip NY'lerin oluşumuna izin vermek için sonikasyon takip eder (Thabet ve ark., 2022).

2.5. Mikrobiyota

“Mikrobiyota” ve “mikrobiyom” iki farklı terim olarak karşımıza çıkmaktadır. Mikrobiyota, ağız ve bağırsak mikrobiyotası olarak tanımlanan bir ortamdaki mikroorganizmalardan oluşmaktadır. Mikrobiyom terimi ise mikroorganizma topluluğu yanı sıra mikrobiyal yapısal unsurları, metabolitleri ve çevresel koşulları da dahil eden ekosistemdeki tüm mikroorganizmaların genomlarının toplamını temsil etmektedir. Mikrobiyom, mikrobiyotadan daha geniş bir spektruma sahiptir (Hou ve ark., 2022).

İnsan mikrobiyotası bakteri, mantar ve virüs gibi komensal mikroorganizmalardan oluşur. İnsan genomu sabit olmasına rağmen, mikrobiyal genom doğumdan ölüme kadar insan yaşamı boyunca değişmektedir. Mikrobiyota; bebek, çocuk, yetişkin, yaşlı ve hamile bireyler arasında farklılıklar göstermektedir. Mikrobiyota ve mikrobiyota genomu diyet, ilaç kullanımı, doğum şekli, temizlik gibi dış etkenler nedeniyle değişebilmektedir (Kuk ve ark., 2016).



Şekil 2.6. Bağırsak emiliminin bakteri popülasyonuna etkisinin şematik gösterimi
(<https://BioRender.com>)

Vücudun diğer bir organı olarak ifade edilen bağırsak mikrobiyotası genetik ve çevresel faktörlerden etkilenmektedir. Bağırsak mikrobiyotası ile beslenme arasındaki güçlü ilişki metabolik hastalıkların çoğunun tedavisi için yol göstericidir. Düzenli ve doğru beslenme; mikrobiyal çeşitliliği, bağırsak bariyer geçirgenliğini, bağışıklık fonksiyonlarını, enerji hasadını, makromolekül metabolizmasını ve enzim aktivitelerini etkileyerek bağırsak mikrobiyotasının kompozisyonunu ve işlevini düzenlemektedir (İlhan, 2018).

Bağırsak florası, insan vücuduyla etkileşime girmektedir (şekil 2.6). Böylece vücutta yiyeceklerden besinlerin sindirilmesine ve emilmesine, bağırsakta üretilen toksik atıkları metabolize etmesine ve amino asitler, vitaminler, kısa zincirli yağ asitleri üretilmesine yardımcı olmaktadır. Bağırsak florasının bozulması durumunda obezite, diyabet, düzensiz bağırsak rahatsızlığı ve kolon kanseri gibi hastalıklara rastlanabilmektedir. Bu nedenle bağırsak florasının dengede tutulması önemlidir. Bağırsak florasının sağlığının korunması amacıyla probiyotik ve patojenik bakteri sayısını düzenlenmelidir (You ve ark., 2022).

2.5.1. Prebiyotik ve probiyotikler

Probiyotikler kolonizasyon direnci özellikleriyle bazı patolojik hastalıklara karşı terapötik etki göstermektedirler. Bu olgu, yerli anaerobik flora, sindirim sistemindeki potansiyel patojenik floranın konsantrasyonunu sınırlamaktadır. Probiyotiklerin bir diğer fizyolojik etkisi de enzim aktivitesini etkileyebilmeleridir (Chow, 2002). İnsan bağırsağında bulunan probiyotikler bağırsak mikroplarının dengelenmesinde önemli bir potansiyele sahiptir. En yaygın probiyotik bakteriler *Lactobacillus* veya *Bifidobacterium* olarak bilinmektedir. Probiyotiklerin sağlık açısından yararları arasında bağışıklığı düzenleme, antikanser ve antidiyabetik özelliği ve obeziteyi engellemeye yönelik ajan

olarak hareket etme olarak sayılmaktadır. Probiyotikler, konak bağışıklığını bağırsak mikrobiyotanın kompozisyonunu düzenleyerek artırmaktadırlar (Chandrasekaran, 2024).

Probiyotiklerin büyümesi, çoğalması ve böylece bağırsak mikrobiyotasının düzenlenmesinde rol oynaması ancak prebiyotiklerin teşviki ile gerçekleşmektedir. Prebiyotik, 'konak mikroorganizmalar tarafından seçici olarak kullanılan ve sağlık açısından yararlı bir substrat' olarak tanımlanmaktadır. Prebiyotiklerden başka bağırsak mikro çevresi üzerinde etkileri oluşabilecek maddelerde bulunmaktadır. Bu nedenle prebiyotiklerin seçici kullanım özelliği değerlidir. Bu özellik, prebiyotikleri antibiyotikler, mineraller ve vitaminler gibi diyet bileşenlerinden ve bileşiklerinden ayırmaktadır (Cremon ve ark., 2018).

2.6. Literatür çalışmaları

Rasul ve ark., (2020) gerçekleştirdikleri bir çalışmada, noniyonik yüzey aktif madde bazlı veziküller formüle etmek ve bunların *in vitro* karakterizasyonunu, salım çalışmalarını ve *in vivo* çalışmalarını değerlendirmek üzere ince film hidrasyon yöntemiyle NY'ler oluşturmuşlardır. NY'lerin boyutlarını zeta sizer kullanarak 427,1-972,3 nm arasında bulmuşlardır. SEM görüntüleme ile NY'lerin küresel veziküller görünümüne dikkat çekmişlerdir. pH 1,2 mide ve pH 7,4 bağırsak ortamlarında salım izlenmiş ve niyozomal formülasyonlarda daha yüksek salım sonuçları elde edildiği belirtilmiştir. Salım profilinin sıfırcı dereceden salım kinetiğine uygunluğu tespit edilmiş ve aktif bileşenlerin sürekli salınabildiği gözlenmiştir. Farmakokinetik çalışmalar sağlıklı albino tavşanlar ile yürütülmüş ve *in vivo* çalışmaları sonucu NY vezikülleri ile biyoyararlanımda artış olduğu tespit edilmiştir (Rasul ve ark., 2020).

NS'nin gastrointestinal geçirgenliğini ve nöroprotektif aktivitesini iyileştirmek üzere etkisinin araştırıldığı çalışmada noniyonik yüzey aktif maddeler, kolesterol ve fosfatidilkolin bileşimleri kullanılarak ince film yöntemi ile NY'ler hazırlanmıştır. Nöroprotektif aktiviteye olan etkinin incelenmesi için NS sıçanlara yedirilmiştir. *In vivo* çalışma, niyozomal dispersiyonun standart ve kontrol formülasyonlarına kıyasla nöroprotektif aktiviteyi önemli ölçüde iyileştirdiğini ortaya koymuştur. NS'nin gastrointestinal geçirgenlik profilleri için umut verici olduğu ortaya konmuştur (Akthar ve ark., 2014).

Ravalika ve Sailaja, (2017) tarafından etoricoxibinin, hedefe yönelik salımının sağlanması için veziküler taşıyıcılar olarak NY'lerin formüle etme amaçlı çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu doğrultuda kolesterol ve noniyonik yüzey aktif maddeler

kullanmışlardır. İlaç, kolesterol ve yüzey aktif maddeleri Tween 80 (F1) ve Span 60 (F2) kullanılarak ince film hidrasyon tekniği ile iki formülasyon hazırlanmıştır. Diğer iki formülasyon, kolesterol ve yüzey aktif maddeler Tween 80 (F3) ve Span 60 (F4) kullanılarak eter enjeksiyon yöntemi ile hazırlanmıştır. Her formülasyon ilaç içeriği, tuzaklama etkinliği, ortalama vezikül çapı, zeta potansiyeli ve *in vitro* ilaç salım çalışmaları açısından değerlendirilmiştir. Dört formülasyon arasından F2 formülasyonu için %95,57'lik maksimum ilaç içeriği, %96,40'lık tuzaklama etkinliği, 463,7 nm'lik ortalama vezikül çapı, -80,5 mV'luk zeta potansiyeli, 12 saatte %95,14'lük *in vitro* ilaç salımı sonuçlarına varılmıştır. İnce film hidrasyon yöntemiyle hazırlanan NY'lerin daha etkili olduğuna karar verilmiştir (Ravalika ve Sailaja, 2017).

Nowroozi ve ark., (2018) tarafından NY'lerin nanoboyuta indirgenmesi için prob sonikasyonu, ekstrüzyon ve yüksek basınçlı homojenizasyon dahil olmak üzere farklı boyut küçültme tekniklerinin performansı araştırılmıştır. Ayrıca, kolesterol içeriğinin ve yüzey aktif madde tipinin formülasyonların boyutu ve polidispersite indeksi (PDI) üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Brij 72, Span 60 veya Tween 60 yüzey aktif maddelerinden oluşan çeşitli niyozomal formülasyonlar hazırlanmış ve boyut küçültme teknikleri denenmiştir. Tween 60 ve Span 60 NY'lerin boyutunu küçültmek için en etkili yöntemlerin ekstrüzyon ve prob sonikasyonu olduğu bulunmuştur. Brij 72 NY'lerinin boyutunu küçültmek için kullanılan tekniklerin hepsi olumlu sonuç vermiştir. NY'lerin nano boyutlandırılması için etkili bir yöntemin seçme ve istenen boyut aralığına ve homojenliğe ulaşmak büyük ölçüde NY bileşimine, özellikle kullanılan yüzey aktif madde türüne bağlı olduğu anlaşılmıştır (Nowroozi ve ark., 2018).

NS tohum yağının hücre aracılı bağışıklık etkisinin araştırıldığı çalışmada 18 erkek Wistar sıçanı, kontrol grubu ve diyetlerinde 30 ve 50 g/kg oranında çörek otu alan tedavi grupları oluşturulmuştur. NS tohum yağının fitokimyasal analizi yapılmış ve antioksidan aktivitesi incelenmiştir. CD8 ekspresyonuna etkisi immunohistokimya analizi ile incelenmiştir. Sonuçlar, NS tohumlarının antioksidan potansiyelleri, sitokin üretiminin indüksiyonu, CD8 ekspresyonunun teşviki ve dalak apoptozunun azaltılması yoluyla immünostimülatör işlev gösterdiğini göstermektedir (Mahmoud ve ark., 2021).

Galleria mellonella'nın (*G. mellonella*) mikrobiyom modeli olarak etkinliğini değerlendirmek ve vankomisin etkinliği ile NS'nin bağırsak florası üzerindeki antimikrobiyal aktivitesini karşılaştırmak amacıyla *G. mellonella* larvaları metagenomik analize tabi tutuldu. Larvalar; negatif kontrol (sadece PBS); pozitif kontrol (sadece metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (*S. Aureus*)); bağırsakta bakterilerle savaşan

vankomisin antibiyotiği ile tedavi edilen grup, NS yağı tedavi edilen grup ve kombinasyon (vankomisin ve NS yağı) tedavi edilen grup olmak üzere gruplara bölünmüştür. Çalışma, farklı antimikrobialerin *S. aureus* ve bağırsak mikrobiyotasına karşı etkisini değerlendirmek için ön test olarak *G. mellonella* modelinin kullanımını desteklemiştir. NS yağı, *S. aureus*'a karşı daha fazla seçicilik ve doğal *Enterococcus* bağırsak florası için daha fazla koruyuculuk göstermiştir (Alnezary ve ark., 2023).

Kien ve ark., (2005) tarafından sağlıklı yetişkinlerde gerçekleştirilen bir çalışmada, doymuş palmitik asit oranı yüksek bir diyet (toplam kalorinin %40'ının yağdan geldiği bir diyetle yaklaşık %17 palmitik asit), enerji harcamasında ve enerji için yağ kullanımında azalmalara yol açtı. Aynı çalışmada, tekli doymamış oleik asit oranı yüksek bir diyet uygulayan kişilerde (oleik asit %31; toplam kalorinin %40'ı yağdan) hem günlük enerji harcamasında hem de yakıt için yağ kullanımında hafif bir artış görüldü. Yüksek palmitik asit grubunda, yüksek oleik asit grubuna kıyasla vücut yağında da daha fazla artış görüldü. Bu nedenle, doymuş yağ oranı yüksek gıdalara kıyasla tekli doymamış yağ oranı yüksek gıdalar tüketmenin, orta derecede yüksek karbonhidrat alımı bağlamında bazı faydaları olabilir, toplam kalorinin %46'sı karbonhidratlardan gelir ve doymuş yağları tekli doymamış yağlarla değiştirmek, vücutta daha az yağ kazanımına yol açabilir (Kien ve ark., 2005).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasallar

Bu doktora tez çalışmasında çörek otu tohum yağı (Zade Vital A.Ş.), timokinon (Sigma Aldrich), kolesterol ($\geq 99\%$, Sigma Aldrich), fosfotidilkolin (Sigma Aldrich), Tween 80 (Sigma Aldrich), metanol (Merck, chromatography grade), kloroform (Carlo Erba), potasyum hidroksit (Merck), n-heptan (Merck), phosphate buffered saline (Sigma Aldrich), hekzan (Merck, chromatography grade), asetonitril (Merck) kullanılmıştır.

3.1.2. Kullanılan cihazlar

Ultrasonik banyo (ISOLAB Laborgeräte GmbH 180 W), döner buharlaştırıcı (Heidolph), ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi (Thermo Scientific), santrifüj (NF800R, Nüve), inkübatörlü çalkalayıcı (Unimax 1010 Incubator 1000, Heidolph Persia), alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu (GeminiSEM 500, ZEISS), diferansiyel taramalı kalorimetri ve termogravimetrik analizör (Setaram, Labsys Evo), fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (ThermoFischer), hassas terazi (Explorer EX224/AD, Ohaus), ultra saf su cihazı (Millipore UV Water Purification, Merck), zeta sizer (Nanoplus 3, Micromeritics), manyetik karıştırıcı (MSH-20A, Daihan), vorteks (MaXshake VM30, Daihan)

3.2. Yöntem

3.2.1. NS tohumu yağında yapılan analizler

Bu doktora tez çalışmasında soğuk sıkım NS tohumu yağının bağırsak mikrobiyotası üzerine prebiyotik etkisi araştırılmıştır. Bu nedenle yağın sağlık açısından kalitesinin test edilmesi önemlidir. Gerçekleştirilen kalite testleri serbest yağ asitliği ve yağ asitleri kompozisyonu tayinidir. Testlerin gerçekleştirilmesinde titrimetrik yöntem ve gaz kromatografisi kullanılmıştır. Soğuk sıkım NS tohum yağı analizleri, Zade Vital Gıda İlaç ve Kimya San. ve Tic. A.Ş. laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

3.2.1.1. Serbest yağ asitliği (%FFA) tayini

Yağlarda bulunan serbest yağ asitleri toplamı (% FFA) oleik asit yüzdesi olarak belirtilmektedir. Ayrıca bir gram yağın nötrleştirilmesi için gerekli olan potasyum hidroksit mg olarak ağırlığı da serbest yağ asitleri toplamını vermektedir. Yağın kalitesinin ve güvenilirliğinin ölçüldüğü bu analize asit sayısı da denilmektedir (Üstün, 2015).

NS tohumu yağının serbest yağ asit değeri Zade Vital İlaç Kimya Gıda San. ve Tic. A. Ş. firmasında standart metot American Oil Chemists Society (AOCS) Ca 5a-40 kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 10 g NS tohum yağı tartılarak 50 ml etilalkol-dietileter karışımında çözdürülmüştür. 1 ml fenolftaleyn damlatılmasının ardından çözelti, 0.1 M etanollü KOH ile renk pembe oluncaya kadar titre edilmiştir. Bu aşamada harcanan 0.1 M KOH miktarı kaydedilmiştir:

$$\text{Serbest Yağ Asitleri} = (V \times 2.8) / M \text{ (\% oleik asit)} \quad (9)$$

V: Harcanan 0,1 M etanollü KOH hacmi (mL)

M: Numune ağırlığı

3.2.1.2. Yağ asitleri kompozisyonu tayini

Zade Vital İlaç Kimya Gıda San. ve Tic. A.Ş. firmasından ısıl işleme maruz bırakılmadan soğuk sıkım yöntemi ile elde edilen NS tohum yağına ait yağ asit kompozisyonu gaz kromatografi cihazı (Shimadzu GC 2010 Plus, Japonya) ve gaz kromatografi-alev iyonlaştırma dedektörü (GC-FID) kullanılarak International Olive Council (IOC) tarafından yayınlanan COI/T.20/Doc.No.33 yöntemi ile analiz edilmiştir. Oda sıcaklığında 65 mg NS yağı tartılarak 2 mL metanollü potasyum hidroksit çözeltisinde çözdürülmüştür. Karışım vorteks cihazı ile 2 dk boyunca karıştırılmıştır. Vorteksle 2 dk karıştırılan yağ numunesinin üzeri n-heptan ile 10 mL'ye tamamlanmıştır. Vorteks işlemi 1 dk'lık süreyle tekrarlanmıştır. Metil esterleri türevlerine dönüşen yağ numunesi 500 rpm 5 dakika koşullarında santrifüjlenmiştir. Santrifüjlenen yağ numunesinin üst fazı (organik faz) alınarak, 0,45 µm filtreden geçirilerek GC viali içine aktarılmıştır. NS yağına ait yağ asitlerini belirlemek için kullanılan gaz kromatografi cihazın çalışma koşulları Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2'de belirtilmiştir. Bu doktora tez çalışmasında Fatty Acid Methyl Esters mixture (FAMEMIX) karışım standartı % alan değerleri, 1 mL 37 bileşenli FAMEMIX karışımından alınarak 10 mL'ye n-heptan ile tamamlanarak GC sistemine enjekte edilip belirlenmiştir.

Çizelge 3.1. Gaz kromatografi sisteminin çalışma koşulları

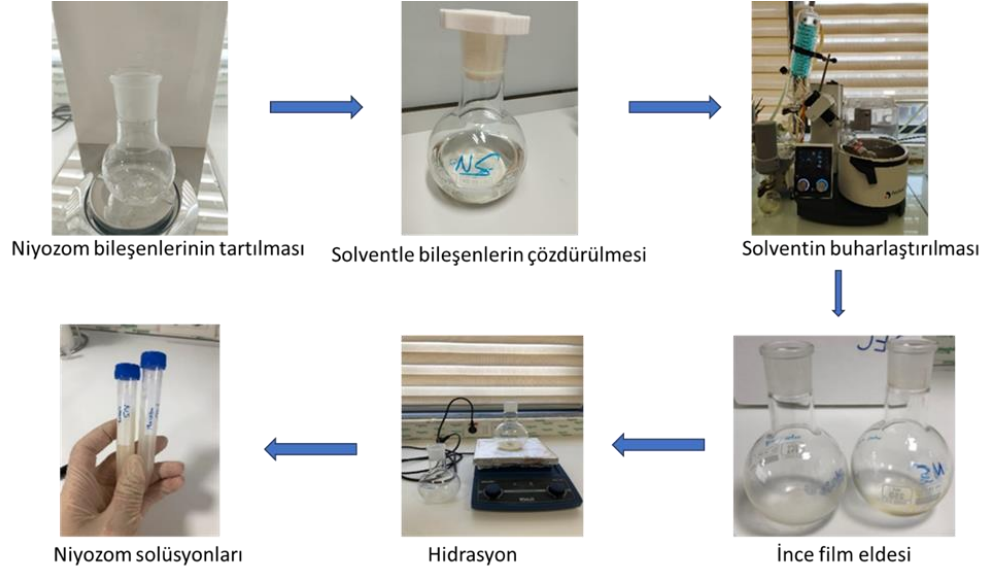
Sistem	Çalışma koşulları
Analiz için kullanılan cihaz	Shimadzu GC 2010 plus
Kolon	Silika, $\ell = 100$ m, $\varnothing = 0,25$ mm \times 0,20 μ m, poli(bis siyanopropilsiloksan) (film kalınlığı 0,20 μ m)
Dedektör	Alevli iyonlaştırma (FID)
Enjeksiyon hacmi	1,0 μ L
Enjeksiyon sıcaklığı	250°C (4°C/dk.)
Taşıyıcı gaz	Helyum
Akış hızı	1,5 mL/dk
Ayrırma oranı	1:99,7

Çizelge 3.2. Shimadzu GC-2010 plus enstrümental sistemin sıcaklık koşulları

	Sistem sıcaklığı (°C)
Kolon	140→240(4°C/dk.)
Enjeksiyon yuvası	250
Dedektör	260

3.2.2. NS tohumu yağı enkapsüle edilmiş nano boyutta NY'lerin hazırlanması

NS tohumu yağı enkapsüle edilmiş ve plasebo (yağ içermeyen) NY'lerin oluşturulmasında ince film hidrasyon metodu kullanılmıştır (Akhtar ve ark., 2014). İnce film hidrasyon yöntemi ile niyozomların üretim aşamaları şekil 3.1'de özetlenmiştir. Bu doğrultuda Tween 80, kolesterol ve fosfotidilkolin kütlece 9:1:1 oranında tartılarak 1:2 (h/h) oranında kloroform-metanol karışımı içerisinde çözdürülmüştür. Bu şekilde hazırlanan iki numuneden biri plasebo olarak hazırlanırken diğerinin içine yine ml başına 4 mg olacak şekilde NS tohumu yağı 1:2 (h/h) kloroform-metanol karışımı içerisinde çözdürülerek eklenmiştir. Yağın homojen bir şekilde çözünmesi sağlandıktan sonra plasebo ve yağ enkapsüle edilmiş proniyozomlar döner buharlaştırıcıya yerleştirilmiştir. Solvent, şişenin duvarında ince bir lipit filmi birikinceye kadar bir döner buharlaştırıcı ile 60°C'lik bir sıcaklıkta indirgenmiş basınç altında buharlaştırılmıştır. Numuneler içerisinde kalan nemin tamamen uzaklaştırılması için plasebo proniyozomlar ve NS enkapsüle edilmiş proniyozomlar vakumlu etüv içerisinde bekletilmiştir. Proniyozomlar, 10 ml distile su ile hidratlanarak ve manyetik karıştırıcıda 2 dakika boyunca çalkalanarak NY'lere dönüştürülmüştür. Plasebo nano NY'ler de aynı yöntemle hazırlanmıştır.



Şekil 3.1. İnce film hidrasyon yöntemiyle NY'lerin elde edilmesi

Prob sonikasyonu, yüzey aktif maddelerin kararlılığını etkileyebilen ve prob kaynaklı kirliliğe neden olabilen lokal ısı üretebilmektedir. Prob sonikasyonu işleminin bu dezavantajı yanı sıra banyo sonikasyonunun sonikasyon işlemi sırasında parametrelerin kontrol edilebilirliği sayesinde banyo sonikasyonu daha çok tercih edilmektedir (Witika ve ark., 2022). Bu nedenle tez çalışmasında banyo sonikasyonu ile nano boyutta NY geliştirilmesi optimize edilmiştir.

NY'ler oluşturulduktan sonra ultrasonikasyon uygulanarak nanoboyutta NY'ler elde edilmiştir (şekil 3.2). Hazırlanan NY'lerin boyutunu küçültmek ve homojen bir dağılım elde etmek amacıyla hidrasyondan sonra, ultrasonik homojenleştirici kullanılarak partikül agregasyonunu en aza indirmek için süspansiyon, 1 saat boyunca ultrasonik banyoda sonikasyona tabii tutulmuştur. Nano boyutta NY'ler elde edildikten sonra karakterizasyon çalışmalarına devam edilmiştir.



Şekil 3.2. NY'lerin nano boyuta indirgenmesi ve karakterizasyonu

3.2.3. Nano NY'lerin karakterizasyonu

Elde edilen plasebo ve NS yağı enkapsüle edilmiş olan NY'ler fiziksel görünüm, parçacık boyutu, FTIR spektrumu, termal özellikleri bakımından karakterize edilmiştir. Ayrıca NS/NY'lerin enkapsülasyon verimliliği ve salım kinetiği de belirlenmiştir.

3.2.3.1. Taramalı geçirimli elektron mikroskopisi (STEM) analizleri

Boş (NY) ve NS enkapsüle nano-NY'lerin (NS/NY) fiziksel görünümü taramalı geçirimli elektron mikroskopisi (STEM, ZEISS Gemini SEM 500) görüntüleme analizi ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmada NS/NY ve NY 1:10 (h/h) oranında seyreltilmiştir. Ardından NS/NY ve NY örnekleri 1 saat boyunca ultrasonik banyoda sonikasyona tabii tutulduktan sonra sonikasyon işlemi sonrası oluşan nano boyuttaki NY'ler 0,22 µm'lik filtre ile süzülmüştür. Örneklerin sıvı ortamda 30 kV voltaj, 2.9 mm çalışma mesafesi ve 10 kX parametreleri kullanılarak STEM görüntüleri alınmıştır.

3.2.3.2. Partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli analizi

NY ve NS/NY'lerin partikül boyutu, polidispersite indeksi (PDI) ve zeta potansiyeli zeta sizer (Micromeritics – Nanoplus 3) cihazı kullanılarak belirlenmiştir. NY ve NS/NY örnekleri 1 saat boyunca ultrasonik banyoda sonikasyona maruz bırakıldıktan sonra 0,22 µm'lik filtre ile süzdürülmüştür. Örnekler çoklu saçılmayı önlemek için kuvars küvette 10:1 deiyonize su içerisine seyreltilerek hazırlanmıştır (Ragheb ve ark., 2020). Kuvars küvet analiz için cihaza yerleştirilerek her numune için ortalama parçacık boyutu, PDI ve zeta potansiyel değeri 50 okuma ile üç ardışık ölçümün ortalaması hesaplanmıştır.

3.2.3.3. Formülasyon bileşenlerinin kimyasal uyumluluğu

NY bileşenlerinin ve kapsüle ettiği NS'nin varlığı ile bu bileşenler arasındaki olası etkileşimlerin yanında birbirlerine olan uyumluluğu Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektroskopisi ile incelenmiştir. NY bileşenlerinin, NS/NY'nin, NS'nin ve aktif bileşeni olan timokinonun, boş NY'nin FTIR spektrumları 4 cm⁻¹ spektral çözünürlükte 4000-400 cm⁻¹ frekans aralığında 16'şar okuma şeklinde kaydedilmiştir (Rathee ve ark., 2020).

3.2.3.4. Termal analiz

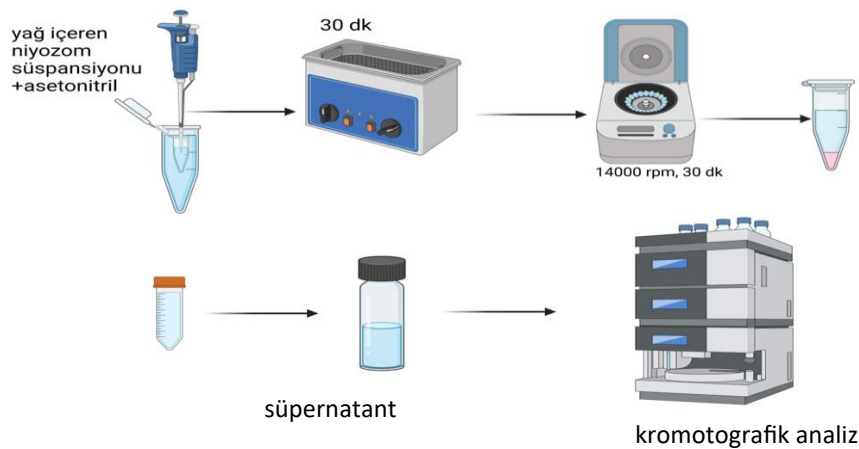
NY ve NS/NY'nin uyumluluk testi diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) ve termogravimetrik analiz (TGA) testleri ile gerçekleştirilmiştir. Bu testlerin gerçekleştirilmesi için hazırlanan 5 mg kuru numunenin, yüksek sıcaklıklara dayanıklı

alüminyum tavada tartımı yapılmıştır. Termogramlar, numuneleri 25 ile 250 °C'ye ısıtarak 10 °C/dakika tarama hızında kaydedilmiştir. Bu taramalar, 20 ml/dakika tasfiye hızında azot atmosferinde kaydedilmiştir (Khan ve ark., 2016).

3.2.3.5. Enkapsülasyon verimliliği (%EE)

NS/NY içerisinde NS enkapsülasyon verimliliği dispersiyon ortamındaki serbest timokinon konsantrasyonunun ölçülmesiyle belirlenmiştir. Bu amaçla UHPLC 'de timokinon standardı ile (0,50 – 1 – 7,5 – 15 – 30 –75 – 90 – 120 ppm) kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Timokinon miktarı UHPLC'de belirlenirken kullanılan mobil faz metanol-su (60:40 h/h), standartların enjeksiyon hacmi 2 µL ve akış hızı 1 mL/dk olarak belirlenmiştir. Ayrıştırma için C18 (150 mm x 2.1 mm x 1.9 µL) kolonunda kullanılarak, 254 nm dalga boyunda ölçümler gerçekleştirilmiştir. Aynı reaksiyon koşullarında NY içine NS enkapsülasyon verimi hesaplanmıştır. NS/NY ve asetonitril belirli miktarda karıştırılarak 30 dakika boyunca bir ultrasonik banyo içerisinde sonikasyona tabii tutularak NY'lerin parçalanması sağlanmıştır. Sonikasyon sonrası numune 14 000 rpm'de 30 dakika süreyle santrifüj edilmiş ve süpernatantın UHPLC'de analizi gerçekleştirilmiştir (şekil 3.3). Enkapsüle edilmemiş timokinon konsantrasyonu kalibrasyon eğrisi baz alınarak belirlenmiştir. Enkapsülasyon verimi denklem 10'a göre hesaplanmıştır (Suksuwan ve ark., 2021).

$$\text{Verim (\%)} = \frac{\text{Toplam Timokinon konsantrasyonu} - \text{Serbest haldeki Timokinon konsantrasyonu} \times 100}{\text{Toplam Timokinon konsantrasyonu}} \quad (10)$$



Şekil 3.3. NS/NY örneğinde enkapsülasyon verimi belirlenmesi iş akışı şeması(<https://BioRender.com>)

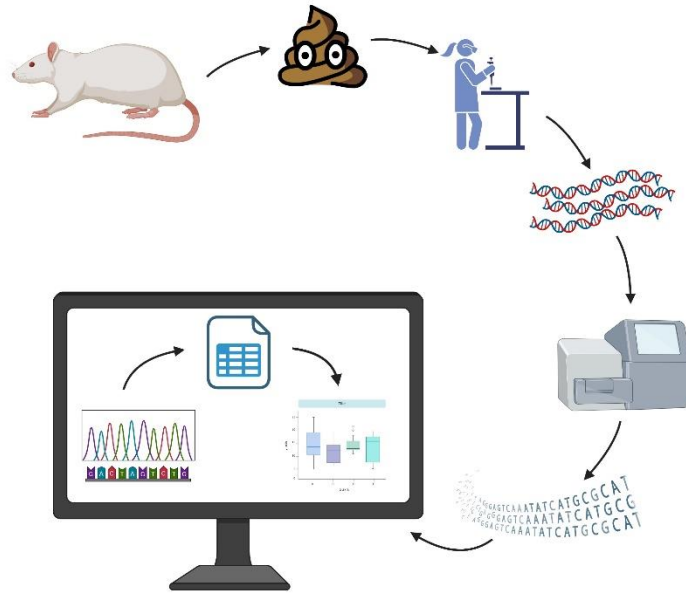
3.2.4. *In vitro* salım profili

NS/NY örnekleri UDT-804 dissolüsyon cihazında 100 rpm, 37°C±0.5°C’de mide için pH 1.2, ince bağırsak için pH 6.8 ve kalın bağırsak için pH 7.4 PBS içerisinde inkübe edilmiştir. NS/NY’ler 900 ml PBS içerisinde süspansiyon edilmiştir. Tampon çözeltisi pH’ı; sırasıyla pH 1.2, pH 6.8 ve pH 7.4’e ayarlanarak 100 rpm, 37°C±0.5°C koşullarında salım ortamından 10 saatlik bir periyotta saat başı örnek alınmıştır. Salım tamponuna her bir saat sonunda alınan numune hacminde tampon çözeltisinden eklenmiştir. İlk dört saatlik çalışma pH 1.2’de gerçekleştirilmiştir. Sonra pH 6.8 fosfat tamponunda da iki saatlik salım yapılması sağlanmış ve aynı prosedür pH 7.4 tamponu ile tüm 4 saatlik çalışma için tekrarlanmıştır (Nazeer ve ark., 2017). Örneklerdeki NY kalıntısı 14000 rpm 30 dakika çöktürülüp, süpernatant örneklerindeki timokinon miktarı UHPLC’de ölçülmüştür. PBS içinde dağılan timokinon miktarı UHPLC’de belirlenirken kullanılan mobil faz metanol-su (60:40 h/h), enjeksiyon hacmi 2 µL ve akış hızı 1 mL/dak protokolüne göre ayrıştırma gerçekleştirilmiştir. C18 (150 mm x 2.1 mm x 1.9 µL) kolonunda ayrıştırılan örneklerdeki timokinon miktarı 254 nm dalga boyunda ölçülmüştür (Suksuwan ve ark., 2021).

Her zaman noktasında toplanan örnek, açıklanan UHPLC yöntemine göre analiz edilmiştir. Elde edilen ilaç salımı ve zaman verileri matematiksel kinetik denklemlerde (sıfırıncı derece, birinci derece, Higuchi, Hixson- Crowell ve Korsmeyer Peppas modelleri) değerlendirilerek regresyon analizi yapılmıştır.

3.2.5. NS ve NS/NY’lerin bağırsak mikrobiyotasına prebiyotik etkisinin belirlenmesi

NS ve NS/NY’lerin bağırsak mikrobiyotasına prebiyotik etkisi şekil 3.4’te özetlenmiştir. Deney hayvanları olarak kullanılan sıçanların dışkılarından DNA izole edilmiştir. Ardından DNA’lar saflaştırılarak konsantrasyon ölçümü yapılmıştır. Saf DNA metagenomik analizi yaptırılmıştır. Biyoinformatik analiz sonrası elde edilen metagenomik data istatistiksel analiz ile yorumlanmıştır.



Şekil 3.4. NS ve NS/NY'lerin bağırsak mikrobiyotasına prebiyotik etkisinin belirlenmesi
(<https://BioRender.com>)

3.2.5.1. Deney hayvanlarından dışkı örneklerinin toplanması

NS/NY'lerin bağırsak mikrobiyotasına prebiyotik etkisinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen deney hayvanları çalışması Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp ve Araştırma Merkezi laboratuvarında 22/04/2022 tarih ve 2022-9 nolu etik kurul kararı ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmada 350-400 gram ağırlığında 30 tane sağlıklı erkek Wistar albino ırkı sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar konvansiyonel kafeslerde 23°C'de 12 saatlik bir aydınlık/karanlık döngüsü koşullarında tutulmuştur. Her deney grubunda 10 sıçan olmak üzere deney hayvanları rasgele üç gruba bölünmüştür. 1 haftalık adaptasyon süreci sonrası birinci deney grubuna %0,9'luk serum fizyolojik, ikinci deney grubuna oral gavaj ile sıçan vücut ağırlığına göre günlük 20 mg/kg NS yağı, üçüncü deney grubuna ise oral gavaj ile günlük 20 mg/kg nano NY ile enkapsüle edilmiş olan NS yağı verilmiştir. Tüm uygulamalar 6 hafta boyunca devam ettirilmiş ve bu süre boyunca tüm hayvanların su ve yem ihtiyaçları ad libitum olarak gerçekleştirilmiştir. 6. Hafta sonunda 3 deney hayvan grubu ayrı ayrı metabolik kafeslere alınarak bireysel dışkı örnekleri steril kaba alındıktan hemen sonra sıvı azotta dondurulup analizler gerçekleştirilinceye kadar saklanmıştır. Beslenme süresi tamamlandıktan sonra ikinci gruptan bir deney hayvanı ölmüş ve dışkısı toplanamamıştır.

3.2.5.2. Dışkı örneklerinden DNA izolasyonu

Deney hayvanları dışkı numunesinden DNA izolasyonu ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep Kit kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

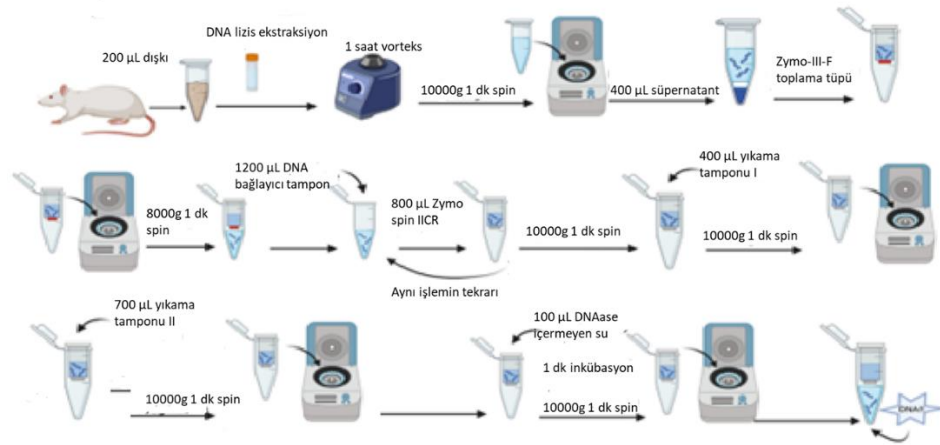
1. 200 mg dışkı numunesi ZR BashingBead™ lizis tüplerine (0,1 ve 0,5 mm) tartılmıştır. Tüpe 750 µl lizis solüsyonu eklenerek kapak sıkıca kapatılmıştır.
2. Tüp 1 saat boyunca maksimum hızda vortekslenmiştir.
3. İçerisinde dışkı numunesinin bulunduğu ZR BashingBead™ Lizis Tüpleri bir mikro santrifüjde 10000 g'de santrifüjlenmiştir.
4. Bir toplama tüpüne Zymo-Spin™ III-F filtresi yerleştirilerek, filtre üzerine 400 µl'ye kadar süpernatant aktarılmıştır. 1 dakika boyunca 8.000 x g koşullarında santrifügasyon işlemi sonrası Zymo-Spin™ III-F filtresi atılmıştır.
5. Toplama tüpündeki filtrat üzerine 1200 µl ZymoBIOMICS™ DNA bağlayıcı tampon eklenmiştir. Filtrat ile tampon homojen karışımı elde edilmesi için pipetaj işlemi yapılmıştır.
6. Yeni bir toplama tüpüne Zymo-Spin™ IICR kolonu yerleştirilmiştir. Önceki adımda elde edilen karışımın 800 µl'si bu toplama tüpündeki Zymo-Spin™ IICR kolonuna aktarılarak karışım 1 dakika boyunca 10.000 g'de santrifüjlenmiştir.
7. Toplama tüpünden süpernatant boşaltılmış ve önceki adım tekrar edilmiştir.
8. Yeni bir toplama tüpüne yerleştirilen Zymo-Spin™ IICR kolonuna 400 µl ZymoBIOMICS™ DNA yıkama tamponu 1 eklenmiştir. Santrifügasyon işlemi, 1 dakika boyunca 10.000x g'de gerçekleştirilmiş ve süpernatant tüpten boşaltılmıştır.
9. Toplama tüpündeki Zymo-Spin™ IICR kolonuna bu aşamada 700 µl ZymoBIOMICS™ DNA yıkama tamponu 2 eklenerek solüsyon 1 dakika boyunca 10.000 x g'de santrifüjlenmiştir. İşlem sonrası tüpteki süpernatant atılmıştır.
10. Toplama tüpündeki Zymo-Spin™ IICR kolonuna 200 µl ZymoBIOMICS™ DNA yıkama tamponu 2 eklenmiştir. Solüsyon, 10.000 g'de 1 dakika santrifüjlendikten sonra süpernatant tüpten boşaltılmıştır.
11. Zymo-Spin™ IICR kolonu steril bir 1,5 ml mikro santrifüj tüpüne aktarılmıştır. 100 µL ZymoBIOMICS™ DNase/RNase içermeyen su doğrudan kolon matrisine denk gelecek şekilde aktarılmıştır. Steril 1,5 ml

mikro santrifüj tüpü içindeki Zymo-Spin™ IICR kolonu 1 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası DNA'yı elüe etmek için 1 dakika boyunca 10.000 g'de santrifüj gerçekleştirilmiştir.

12. Yeni bir toplama tüpüne bir Zymo-Spin™ III-HRC Filtresi yerleştirilmiş ve 600 µl ZymoBIOMICS™ HRC hazırlık solüsyonu bu tüpe eklenmiştir. Solüsyon, 3 dakika boyunca 8.000 x g'de santrifüj edilmiştir.

13. Santrifüj işlemi sonrası steril 1,5 ml mikro santrifüj tüpüne toplama tüpündeki Zymo-Spin™ III-RC filtresi yerleştirilmiştir. 16.000 g'de 3 dakika koşullarında santrifügasyon gerçekleştirilmiştir.

Dışkı örneklerinden DNA izolasyon basamakları şekil 3.5'te görselleştirilmiştir.



Şekil 3.5. DNA izolasyonu aşamalarının şematik görüntüsü (<https://BioRender.com>)

3.2.5.3. DNA konsantrasyonu ve kalitesinin belirlenmesi

29 örneğin DNA konsantrasyonları iQuant dsDNA HS Assay Kiti (#N011) kullanılarak Invitrogen Qubit 4 cihazıyla ölçülmüştür. DNA için saflık incelemesi numunenin 260, 280 ve 230 nm absorban değerlerinin oranlanmasıyla sağlanmıştır. A260/A280 oranının 1,8-2,1 arasında olması gerekirken, A260/A230 oranının 1,8'den düşük olması ciddi bir kontaminasyon varlığını göstermektedir. DNA konsantrasyonu okuması ng/µL ile ifade edilmiştir.

İzole edilen DNA örnekleri kantitasyon ve saflık bakımından incelendikten sonra metagenomik analizine devam edebilmek için DNA sekans hizmeti alınmıştır (Kurul lab, Türkiye).

3.2.5.4. PCR ve jel elektroforez

İzole edilmiş DNA, numuneden organizmaların daha başarılı PCR amplifikasyonuna izin veren yüksek bir saflık seviyesine sahip olmalıdır. Dışkı DNA'sından bağırsak mikrobiyotasına ait DNA parçaları yer almaktadır.

Mikrobiyotadaki probiyotik bakterileri ve üç grupta göreceli miktarlarının farklarını (örneğin; *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*) tespit etmek için PCR analizi yapılmıştır. İzole edilmiş olarak gönderilen 29 sıçan gaitası örneği ile 20µL hacimde 16S PCR kurulmuştur, örneklerden PCR reaksiyonunda 1 ng/µL olacak şekilde eklenmiştir. PCR detayları çizelge 3.3, 3.4, ve 3.5'te verilmiştir.

Çizelge 3.3. PCR'da kullanılan enzim ve primer

Enzim	2X Hi-fi MobiomX (#HF101)
Primer	27F- 1492R Tailsiz Primer Mix

Çizelge 3.4. PCR'da kullanılan enzim ve primer miktarları

	1X
2X Hi-fi MobiomX	10 µl
27F-1492R Tailsiz Primer Mix	10 µm, 2 µl

Çizelge 3.5. PCR'da kullanılan 5'->3' primer dizileri

Primer adı	Primer dizisi (5'->3')
16S-27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG
16S-1492R	CGGTTACCTTGTTACGACTT

Hazırlanan karışımlar hazırlanan tüplere 12µL olacak şekilde dağıtılmıştır. Örneklerle uygulanan PCR programında, öncelikle 95 °C'de 3 dakika süren bir başlangıç denatürasyonu uygulanmıştır. Daha sonra, 30 döngü boyunca 95 °C'de 15 saniye, 58 °C'de 15 saniye ve 72 °C'de 45 saniyelik aşamalar gerçekleştirilmiştir. Döngülerin tamamlanmasının ardından, 72 °C'de 5 dakika süren bir final uzatma adımı uygulanmış ve program 4 °C'de süresiz bekletme ile sonlandırılmıştır.

PCR sonrası amplifikasyon, %1 agaroz jel elektroforezi ile teyit edilmiştir. MobiomX DL5000 (#DL5-01) DNA Marker kullanılarak, Bento Lab Pro (#BLM1B2P) cihazında 80 voltta 25 dakika yürütülmüştür.

3.2.5.5. Kütüphane hazırlığı

Jel elektroforez sonrası SQK-LSK109 ve EXP-NBD196 kitleriyle 29 sıçan gaitası örneği için kütüphane hazırlığı yapılmıştır. 16S rRNA hedefli metagenomik analizde amplikon kütüphanelerinin oluşturulması için kullanılacak primer çifti 16S rRNA geninin V1-V9 bölgesini kapsayan yaklaşık 1500 bp'lik bir bölgeyi hedeflemektedir. Kütüphane hazırlığında öncelikle NEB Ultra II End-Prep dA Tailing Module (#E7647L) kullanılarak end-prep reaksiyonu 20°C 5 dakika, 65°C 5 dakika inkübe edilerek gerçekleştirilmiştir. Ardından, örneklerin barkod ligasyonu, Blunt/TA ligase master mix (#M0367L) kullanılarak protokol uyarınca 20°C 20 dakika, 65°C 10 dakika inkübe edilerek gerçekleştirilmiştir. Barkod ligasyonu reaksiyonu sonrasında örnekler tek bir temiz tüplerde toplanmıştır. Ardından AMPure manyetik boncuk ile pürifikasyon gerçekleştirilmiş ve pürifikasyonun ardından ddH₂O ile elüsyon yapılarak barkodlu örneklerin konsantrasyonu iQuant dsDNA HS Assay Kiti (#N011) kullanılarak Invitrogen Qubit 4 cihazıyla ölçülmüş ve DNA konsantrasyonu kontrol edilmiştir.

Ardından, adaptör ligasyonu MobioMx T4 DNA ligase (#M0202) kullanılarak 30°C'de 10 dakika inkübe edilerek gerçekleştirilmiştir. Sonrasında, adaptör bağlı kütüphane AMPure Manyetik boncuklar ile saflaştırılmıştır. Bu aşamada yıkamalar Short Fragment Buffer ile yapılmıştır. Pürifikasyon aşamasının ardından EB ile elüsyon yapılmıştır. Elüsyon aşaması sonrası sekans için yüklemeye hazır kütüphanenin konsantrasyonu Qubit ile ölçülerek DNA konsantrasyonu kontrol edilmiştir. Hazırlanan bu kütüphaneden FLO-MIN106D akış hücresine 250 fmol yüklenmiş ve sekans MK1B cihazında gerçekleştirilmiştir. Sekans, barkod başına en az 10.000 okuma alındığında durdurulmuştur.

3.2.6. Biyoinformatik ve istatistiksel analiz

Dizileme uygulamasından sonra fastq programı kullanılarak her numune için kalite kontrol analizi gerçekleştirilmiştir. Kalite kontrol sonuçlarına göre her numunedeki OTU grupları mikrobiyal topluluk yapısı, bileşimi, alfa çeşitliliği ve beta çeşitliliği analizleri gibi biyoinformatik analizler gerçekleştirilmiştir. Üç çalışma grubu arasındaki taksonların nispi bolluklarındaki farklılıklar değerlendirilmiştir. Bu amaçla kullanılan istatistiksel yazılım SPSS V.25'tir. ANOVA testi ile gruplar arası farkların anlamlılık derecesi tanımlanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, *p* değeri 0,05'ten küçükse ilişki anlamlı kabul edilmiştir. İstatistiksel analizler, SPSS V.25 istatistiksel yazılımı (IBM) kullanılarak yapılmıştır.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. NS yağı analiz sonuçları

Soğuk sıkım NS yağının kalite kontrol testleri olarak serbest yağ asitliği ve yağ asitleri kompozisyonu analizleri yağın sağlık açısından uygunluğunun tespiti için uygulanmıştır.

4.1.1. Serbest yağ asitliği sonuçları

Serbest yağ asitliği, yağda raf ömrü takip parametresi olarak kullanılması ile yağın kalite kontrolü açısından önemli bir kalite indeksidir. Çünkü analizi gerçekleştirilen yağın serbest yağ asitliği değerinin o yağda yüksek bulunması, oksidasyona olan stabilitenin azalması demektir. Bu durum yağın acılaşmaya başladığını göstermektedir. Türk Farmakope Dergisi Milli Monografi'na göre soğuk sıkım NS tohum yağına ait serbest yağ asidi değeri en fazla 25 mg KOH/g olabilmektedir. Çalışmada kullanılan soğuk sıkım NS tohumu yağına ait serbest yağ asitliği değeri 2,1 mg KOH/g olarak hesaplanmıştır. Bu sonuç çalışmada kullanılan yağın kalite açısından uygunluğunu doğrulamaktadır (Demirbolat, 2019).

4.1.2. Yağ asit kompozisyonu sonuçları

Bütirik asit, kaproik asit, kaprilik asit, kaprik asit, undekanoik asit, laurik asit, tridekanoik asit, miristik asit, miristoleik asit, pentadekanoik asit, cis-10-pentadekanoik asit, palmitik asit, palmitoleik asit, heptadekanoik asit, cis-10-heptadekanoik asit, stearik asit, n-9 trans-oleik asit, n-9 cis oleik asit, n-6 trans-linoleik asit, n-6 cis linoleik asit, arasidik asit, n-6 gama linolenik asit, n-9 gondoik asit, n-3 alfa linolenik asit, heneikosanoik asit, cis-11,14-eikosadienoik asit, behenik asit, n-6 cis-8,11,14-eikosatrienoik asit, n-9 erusik asit, n-3 cis-11,14,17-eikosatrienoik asit, n-6 arasidonik asit, trikosanoik asit, cis-13,16-dokosadienoik asit, lignoserik asit, n-3 cis-5,8,11,14,17-eikosapentaenoik asit, n-9 nervonik asit, n-3 cis-4,7,10,13,16,19-docosaheksaenoic asit yağ asitleri olmak üzere 37 bileşenli FAMEMIX standart karışımı kullanılarak soğuk sıkım NS tohum yağının yağ asit kompozisyon analizi yapılmıştır. NS tohum yağına ait yağ asitleri % alan değerleri çizelge 4.1'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.1. Soğuk sıkım NS tohumu yağına ait yağ asitleri, % alan

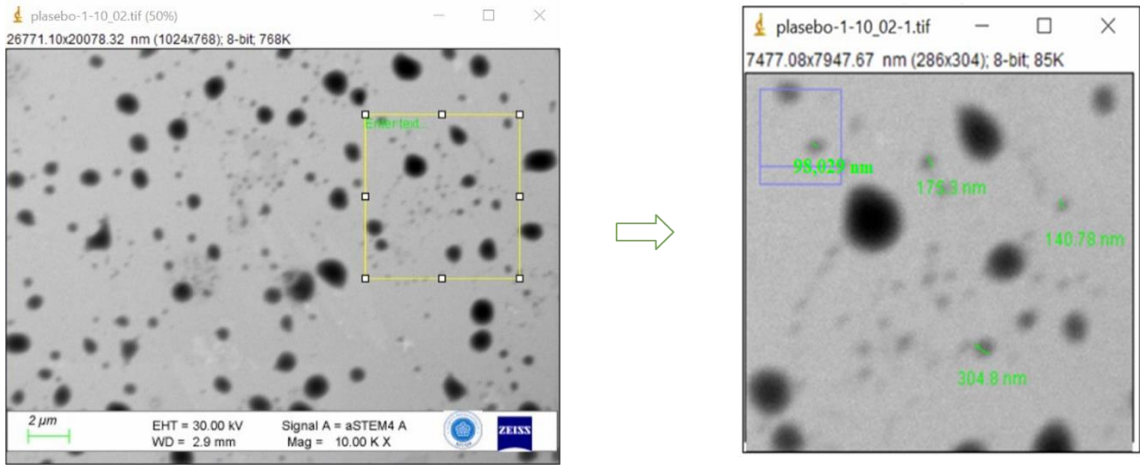
Sıra	Yağ asidi adı	Alan %
1	C 16:0 Palmitik asit	12,1828
2	C 16:1 Palmitoleik asit	0,1776
3	C 17:0 Heptadekonik asit	0,0618
4	C 17:1 cis-10-Heptadekonik asit	0,0390
5	C 18:0 Stearik asit	3,3438
6	C 18:1 n9 cis Oleik asit	25,2295
7	C 18:2 n6 Linoleik asit	58,0218
8	C 20:0 Arasidik asit	0,2260
9	C 20:1 n9 Gondoik asit	0,4035
10	C 18:3 n3 alfa Linoleik asit	0,2749
11	C 22:0 Behenik asit	0,0393
Toplam		100

Linoleik asit çoğunda ana bileşen olmak üzere bütün bitkisel yağlarda bulunan doymamış yağ asididir (Çakmakçı ve ark., 2012). Soğuk sıkım NS tohum yağ asitleri arasında en yüksek alan yüzdesi n6 linoleik asite aittir. Türk Farmakope Dergisi Milli Monografi'na göre soğuk sıkım NS tohum yağına ait yağ asidi fraksiyonunun bileşimi palmitik asit %10-20 aralığında, palmitoleik asit en fazla %1, stearik asit en fazla %6, oleik asit %20-30 aralığında ve linoleik %40-60 arasında olarak belirtilmiştir (Demirbolat, 2019). Bu doktora tez çalışmasında palmitik asit %12, palmitoleik asit %0,17, stearik asit %3,3, n9 cis oleik asit %25, ve n6 linoleik asit %58 olarak tespit edilmiştir. Bu kabul aralıkları göz önünde bulundurulduğunda bu doktora tez çalışmasında kullanılan NS tohum yağının yağ asit değerleri uygundur.

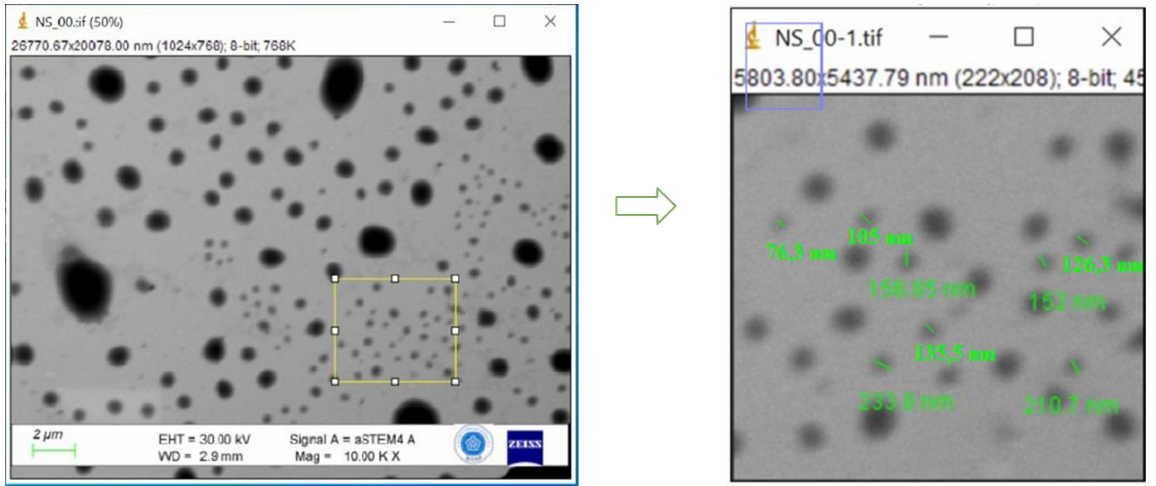
4.2. Nano niyozomların karakterizasyonu

4.2.1. Taramalı geçirimli elektron mikroskopisi (STEM) analiz sonuçları

NS yağı kapsüle edilmiş nano NY'lerle plasebo nano NY'lerin morfolojik özellikleri, taramalı geçirimli elektron mikroskobu ile incelenmiştir. STEM görüntüleri Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de gösterilmektedir. STEM analiziyle elde edilen görüntüler literatür çalışmalarında alınan görüntülerle benzerlik göstermiştir (Akhtar ve ark., 2014). Bu doktora tez çalışmasında elde edilen nano niyozom çeşitleri küresel görünüm sergilemişlerdir. NS/NY ortalama parçacık boyutu 149,5 nm olarak hesaplanmıştır. NY veziküllerinin ortalama parçacık boyutu ise 179,7 olarak hesaplanmıştır.

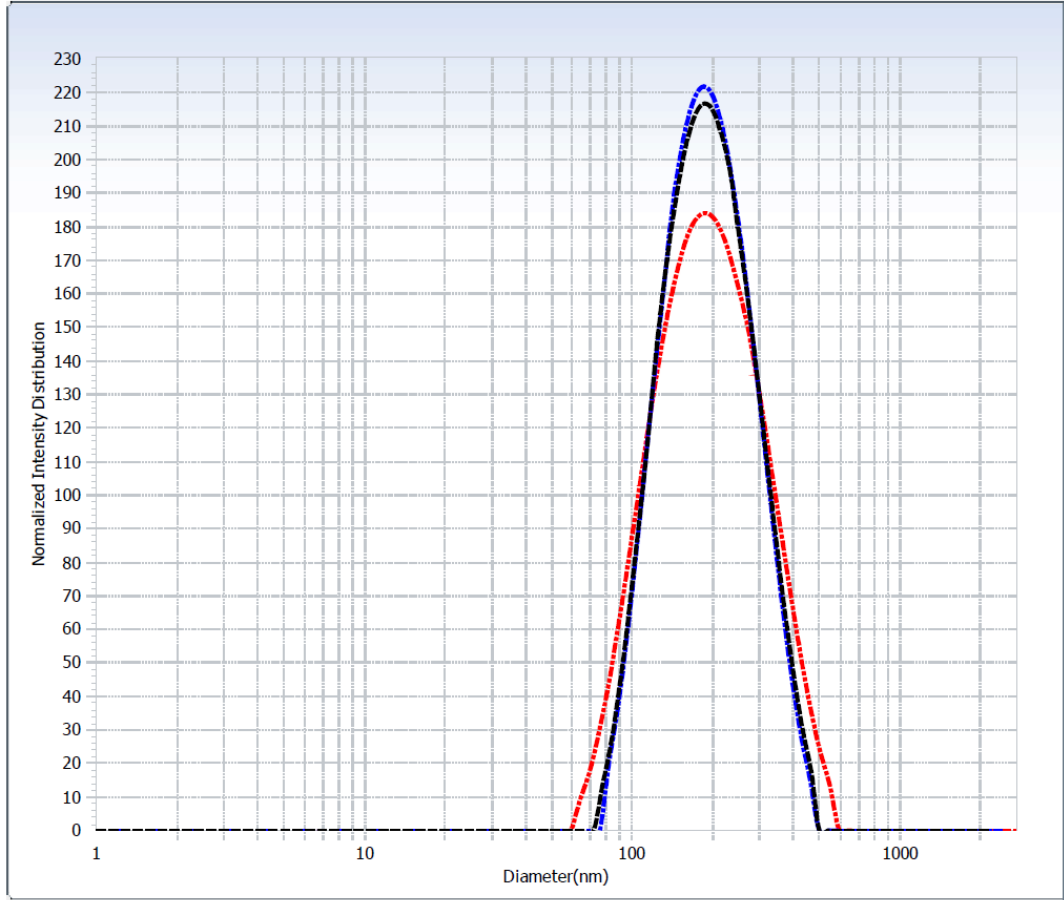


Şekil 4.1. Plasebo nano NY'lerin STEM görüntüsü

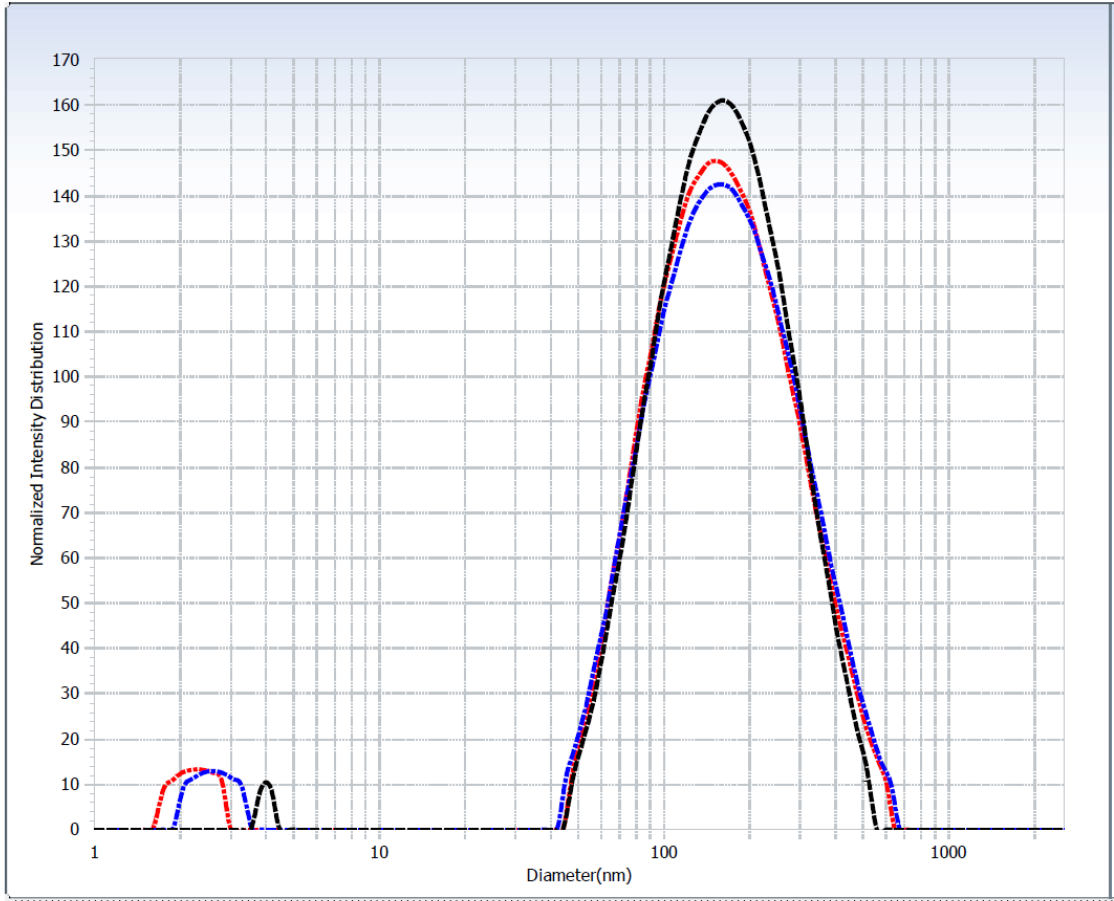


Şekil 4.2. NS yağı içeren nano NY'lerin STEM görüntüsü

4.2.2. Ortalama parçacık boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel analiz sonuçları



Şekil 4.3. Plasebo nano NY'lerin parçacık boyut dağılımı

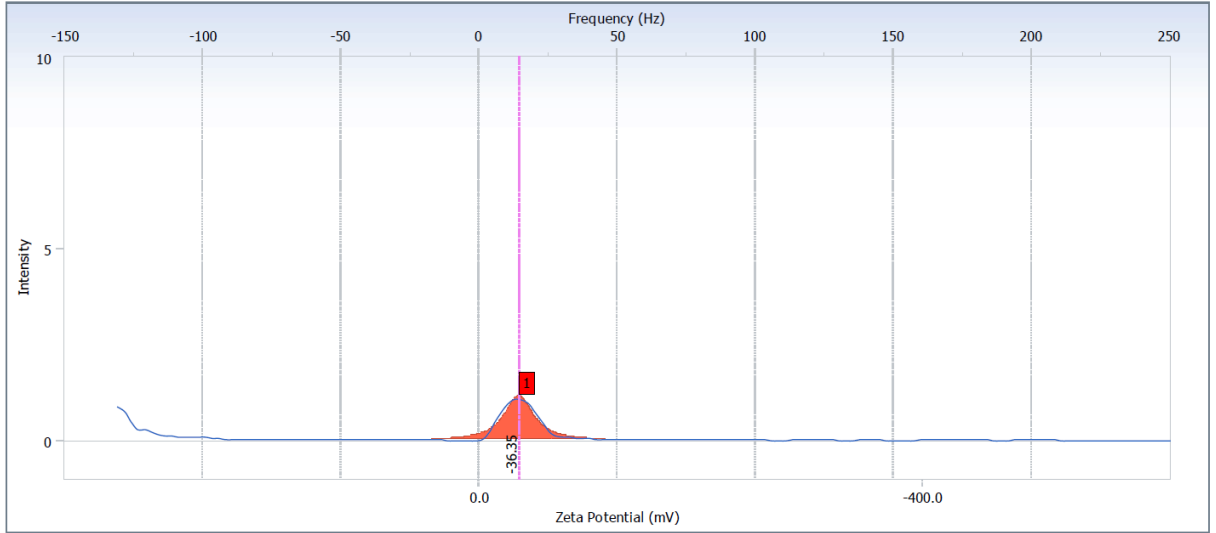


Şekil 4.4. NS yağı içeren nano NY'lerin parçacık boyut dağılımı

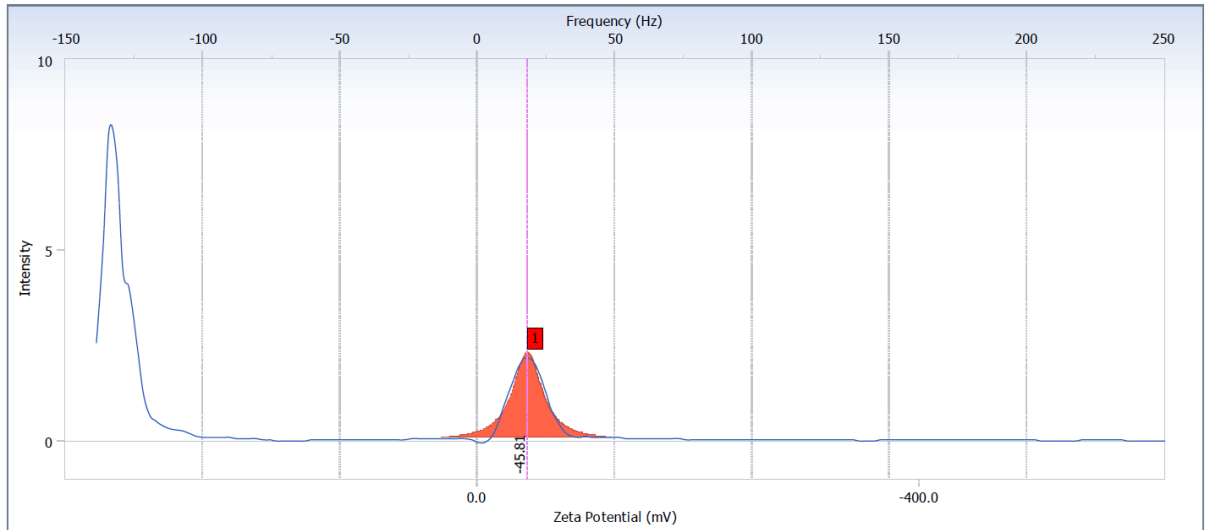
NY dispersiyonu 1 saat ultrasonik banyoda sonike edildikten sonra 0,22 μm 'lik filtreden geçirilerek analize alınmıştır. Analiz sonuçlarına göre NS yağı içeren nano NY'lerin ortalama parçacık boyutu 131 nm iken, PDI değeri 0,274 olarak elde edilmiştir. Plasebo nano NY'lerin ortalama parçacık boyutu 173 nm iken PDI 0,149 değerinde bulunmuştur (Şekil 4.3 ve 4.4). NS/NY ve NY veziküllerinin ortalama parçacık boyutu STEM görüntüleme aracılığı ile ölçülen ortalama parçacık boyutları ile uyumludur.

Terapötik bileşiklerin etkisi hedef dokuya yetersiz ilaç iletimi veya sağlıklı dokularda ve organlarda şiddetli toksisiteler gibi istenmeyen yan etkiler nedeniyle sınırlı kalabilmektedir. Bu durum lipidik nano taşıyıcılar içine ilacın kapsüllenmesiyle maksimum biyoyararlanım ve biyouyumluluk özelliği sayesinde minimum yan etki şeklinde aşılabilir. Ancak lipidik nano taşıyıcıların hedef dokuda birikme eğilimi durumu bu veziküllerin parçacık boyutu dağılımı ile ilişkilendirilmektedir. Lipit bazlı taşıyıcılar için FDA'nın belirlediği PDI değeri 0,3 ve altı değerlerdir (Danaei ve ark., 2018).

Sonuçlar dikkate alındığında hem NS yağı içeren hem de plasebo nano NY'lerin PDI değerleri, NY'ler lipit bazlı taşıyıcılar için kabul edilen 0,3 PDI değeri altında belirlenmiştir. Bu durumda istenilen homojen dağılımın elde edildiği söylenebilmektedir.



Şekil 4.5. Plasebo nano NY'lerin zeta potansiyeli



Şekil 4.6. NS yağı içeren nano NY'lerin zeta potansiyeli

Kararlı ve kararsız dağılımlar arasındaki genel ayırım çizgisi genellikle +30 veya -30 mV'de alınmaktadır. Zeta potansiyeli +30 mV'den daha pozitif veya -30 mV'den daha negatif olan parçacıklar normalde kararlı kabul edilmektedir (Okore ve ark., 2011). Nanopartiküllerin hücresel alımında hücre zarına bağlanması, parçacıkların yüzey

yükünden etkilendiğini göstermektedir. Parçacık yüzey yükünün değişimi, dokuya bağlanmayı kontrol edebilmektedir ve NP'leri hem *in vitro* hem de *in vivo* hücrel bölmelere yönlendirebilmektedir. Daha yüksek yüzey yüküne sahip nanopartiküller hücre zarına güçlü bir şekilde bağlanmaktadır. Anyonik zar ile katyonik nanopartiküller arasındaki elektrostatik etkileşimlerin alımı kolaylaştırdığı daha yüksek bir hücrel alım gözlenmektedir. Nanopartiküllerin hücre zarına adsorpsiyonundan sonra, alım pinositoz, spesifik olmayan veya reseptör aracılı endositoz veya fagositoz gibi birkaç olası mekanizma yoluyla gerçekleşmektedir (Honary ve ark., 2013).

Düşük veya yüksek zeta potansiyeli yalnızca nano-süspansiyonların kararsızlığını yansıtmaz, aynı zamanda gastrointestinal sistemde yoğun uyarıya da yol açabilir. Ayrıca stabilizatör seçimi, ilaç konsantrasyonları ve diğerleri gibi zeta potansiyeli değişimini etkileyen bazı faktörler yeniden değerlendirilmelidir. Aksi takdirde bu durum doğrudan ilacın vücutta emilmesinin zorlaşmasına yol açacak ve bazı yan etkileri, hatta toksisiteyi de beraberinde getirecektir (Wang ve ark., 2017).

Mevcut çalışmada NS yağı içeren nano NY'lerin ve plasebo nano NY'lerin zeta potansiyeli değerleri sırasıyla -46.69 mV ve -35.05 olarak bulunmuştur. Sonuç olarak, NS yağı içeren nano NY'ler ve plasebo nano NY'lerin kararlılıklarını biyolojik sisteme uygulamak için uygun olduğu sonucuna varılmıştır (Şekil 4.5 ve 4.6).

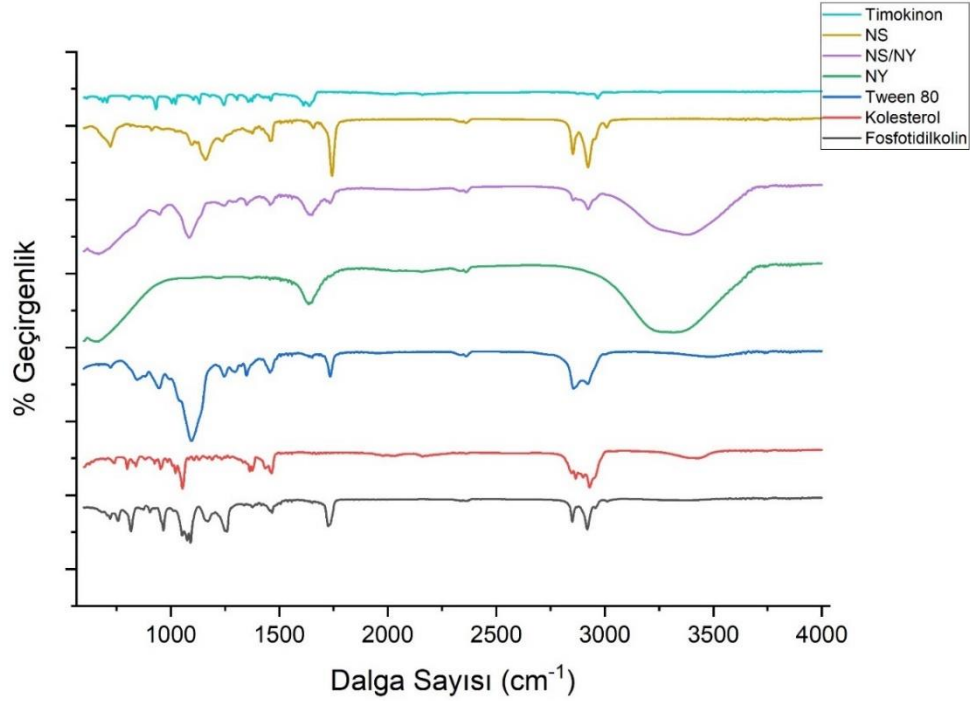
NY ve NS/NY'lerin ortalama parçacık boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel analiz sonuçları çizelge 4.2'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.2. Plasebo NY'lerle *N.sativa* yağı içeren NY'lerin ortalama parçacık boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel analiz sonuçları (n=3)

	Ortalama Parçacık Boyutu (nm)	Polidispersite İndeksi	Zeta Potansiyeli (mV)
NS/NY	131,7 ± 0,9	0,274 ± 0,01	-45,81 ± 0,67
NY	173 ± 3,37	0,149 ± 0,029	-35,05 ± 0,9

4.2.3. Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi sonuçları

NS ile aktif bileşeni timokinonun, NY ve NS/NY ile bileşenlerinin kimyasal uyumluluğu FTIR ile belirlenmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. NS/NY, NY, NS, Tween 80, kolesterol, fosfotidilkolin ve timokinonun FTIR spektrumları

Fosfotidilkolin spektrum diyagramında CH gerilme titreşimleri, öncelikle hidrokarbon zincirlerinden gelen 3400 ve 2800 cm^{-1} arasındaki emilime neden olmaktadır. $2919,11$ ve $2850,28$ cm^{-1} pikleri sırasıyla CH_2 grubunun asimetric ve simetric gerilme modundan kaynaklanmaktadır. Spektrumların düşük dalga sayısına sahip olduğu bölge, lipidlerin polar baş grupları tarafından domine edilmekte ve bu durum farklı lipidleri ayırt etmek için parmak izi bölgesi olarak düşünülebilmektedir. Bu bölgede, $1725,33$ cm^{-1} civarında bulunan pik C=O grubunun gerilme moduyla ilişkilidir. $1466,58$ cm^{-1} civarında başka bir önemli özellik mevcuttur ve CH_3 grubunun bükülme moduna atfedilmektedir. 1200 ile 900 cm^{-1} arasındaki spektral bölgede fosfat grubunun katkıları fark edilebilmektedir. $1259,03$ ve $1091,31$ cm^{-1} bantlarındaki pikler sırasıyla asimetric ve simetric $\text{PO}-2\text{PO}_2-$ gruplarını temsil etmektedir (Portaccio ve ark., 2023).

Kolesterol, OH grubunu sulu faza ve alifatik zincirini yüzey aktif maddenin hidrokarbon zincirine doğru yönlendirerek, NY'lerin sert membranına katkıda bulunduğu

bilinen bir hidrojen bağı oluşturmaktadır (Ugorji ve ark., 2022). Kolesterol spektrumunda –OH gerilmesi $3426,72 \text{ cm}^{-1}$ bandında gözlenmektedir. $2899,88$ ve $2865,83 \text{ cm}^{-1}$ bantlarında ise alkil zincirlerindeki C–H bağı gerilmesine rastlanmaktadır. $1376,14 \text{ cm}^{-1}$ bandında C–H bağı bükülmesi gözlemlenirken, $1054,22 \text{ cm}^{-1}$ bandında ise C–O gerilmesine katkı bulunmaktadır (Farmoudeh ve ark., 2020).

Tween 80'nin $3502,53 \text{ cm}^{-1}$ bandındaki güçlü gerilme O-H fonksiyonel grubundan kaynaklanmaktadır. Ester bileşiğinin karakteristiği olan karbonil grubu gerilmesi $1734,24 \text{ cm}^{-1}$ bandında gözlenmektedir (Batool ve ark., 2017). C-H gerilmesi ise $2921,03$ ve $2855,89 \text{ cm}^{-1}$ pozisyonlarında gösterilen piklerde oluşmaktadır. Sırasıyla $1456,80$ ve $1348,79 \text{ cm}^{-1}$ ile $1296,03 \text{ cm}^{-1}$ bantlarında C-H bükülmeleri mevcuttur. C-O gerilmesi spektrumun $1095,78 \text{ cm}^{-1}$ bandında gözlenmektedir. $946,51$ ve $846,03 \text{ cm}^{-1}$ bantlarında C-H deformasyonuna rastlanılmaktadır (Fu ve ark., 2015).

NY'de görülen $3298,78 \text{ cm}^{-1}$ bandındaki pik O-H gerilmesine işaret etmektedir. Bu akut pik formülasyon bileşenleri olan kolesterol ve Tween 80 arasında sağlam bir hidrojen bağının varlığını teyit etmektedir. $2359,68 \text{ cm}^{-1}$ bandındaki gerilme C-H gruplarının varlığını göstermektedir. $1635,48 \text{ cm}^{-1}$ 'deki pik C=O'nun varlığını gösterirken $667,5$ bandı C=C gruplarını temsil etmektedir (Krithika ve ark., 2023). Çoklu eğilme ve gerilme titreşimleri, çeşitli bileşenlerden C–O, C–N ve C–C bağlarının varlığını ortaya koymaktadır (Mawazi ve ark., 2024).

FTIR spektrumlarının sonuçları, C-H, $-\text{CH}_2$, $-\text{CH}_3$, C=O, C-O ve C=C'ye karşılık gelen çeşitli keskin, güçlü ve zayıf tepe noktalarının yanı sıra önemli fonksiyonel gruplara sahip fenolik bileşikler timokinon, ditimokinon, timohidrokinon ve timolün varlığını belirlemektedir. Rotasyonları ve moleküler hareketleriyle bu fonksiyonel gruplar, NS'ye çeşitli özellikler kazandırmaktadır. Bildiğimiz kadarıyla, FTIR spektrumunda gösterilen 3008 cm^{-1} de ki zayıf bir emilim tepe noktası, vinil grubunun C-H gerilmesine karşılık gelmektedir. Ayrıca, 2922 cm^{-1} ve 2852 cm^{-1} 'de gözlenen iki yoğun bant, metil ve izopropil konumlarını gösteren bir alifatik grubun C-H gerilmesine atanmaktadır. Bu arada, sırasıyla keton gruplarının C=O gerilmesine atfedilebilen 1743 cm^{-1} bir başka önemli güçlü bant gözlenmiştir. Ek olarak, karbonil grubunun rezonans frekansı etkisindeki azalma nedeniyle timokinonun C=O gerilmesine ait 1639 cm^{-1} 'de daha dikkate değer bir emilim bandı gözlenmiştir. 1457 ve 1376 cm^{-1} 'deki iki tepe sırasıyla C-H emilim makaslaması ve metil sallanma titreşimi ile ilişkilendirilebilmektedir. Sonunda, C-O grubu nedeniyle 1160 cm^{-1} 'de zayıf bir tepe ve =C-H bükülme grubu nedeniyle 1097

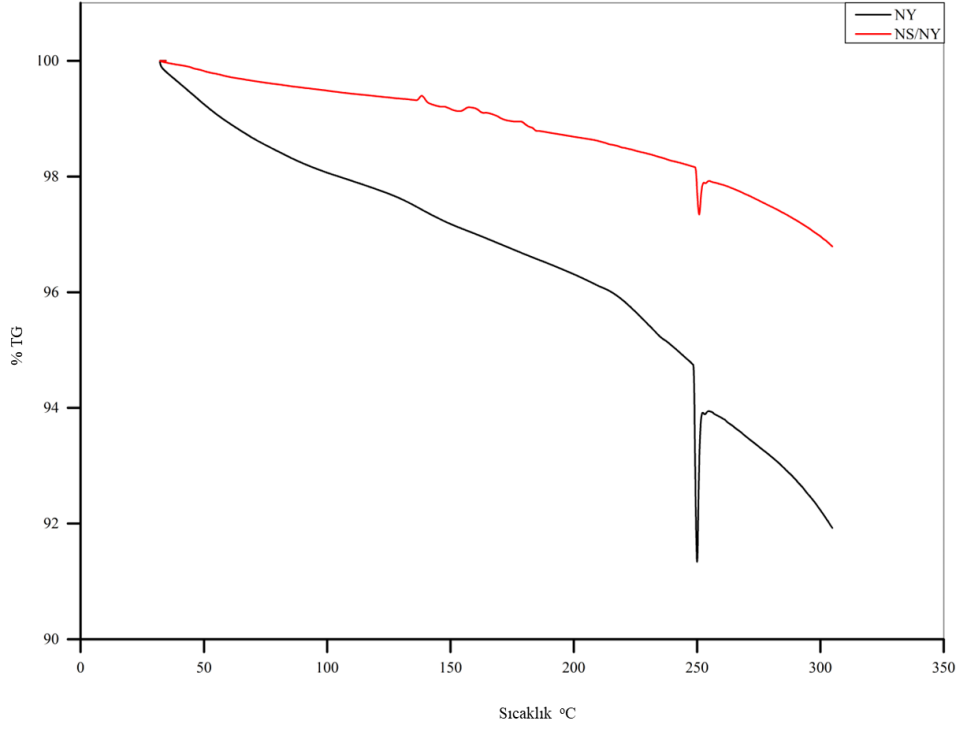
cm^{-1} 'de bir bant da gözlemlenmiştir. Tüm bu bulgular literatürde bulunanlara çok benzerdir (Mohammed ve ark., 2019).

Timokinonun FTIR spektrumu, karbonil gerilmesine ve alifatik ve vinilik C-H gerilmelerine atanabilen tipik emilim bantları göstermektedir (Pagola ve ark., 2004). Timokinon spektrumu, izopropil ve CH_3 gruplarının gerilme titreşimlerine atfedilebilen $3000\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ bölgesinde tepelere sahiptir. Kızılötesi spektrumda 2966 cm^{-1} 'deki bant, izopropil grubundaki üçüncül karbonun C-H gerilmesine aittir. C=O gerilmesi için 1637 cm^{-1} 'de yoğun bant; CH_3 antisimetrik bükülmesi için 1466 cm^{-1} bandı; izopropil grubundaki üçüncül karbonun simetrik bükülmesi için 1387 ve 1357 cm^{-1} bantları ve CH_3 salımı için $1100\text{--}900\text{ cm}^{-1}$ bantları gözlemlenmiştir (Rani ve ark., 2018). C-H gerilmesi için 2966 cm^{-1} ve C için 1637 cm^{-1} bantları NS içinde timokinon varlığını kanıtlamaktadır.

NS/NY'ye ait FTIR spektrumunda gözlemlenen $3378,4\text{ cm}^{-1}$ bandı NY FTIR spektrumunda gözlemlenen 3298 cm^{-1} bandındaki kolesterol ve Tween 80 arasındaki hidrojen bağı ile eşleşmektedir. 2922 cm^{-1} bandında ise timokinonun varlığını pekiştiren 2966 cm^{-1} bandıyla eşleşmektedir. Bu durum NS'nin NY tarafından enkapsülasyonuna işaret etmektedir.

4.2.4. Termal analiz (TGA/DSC)

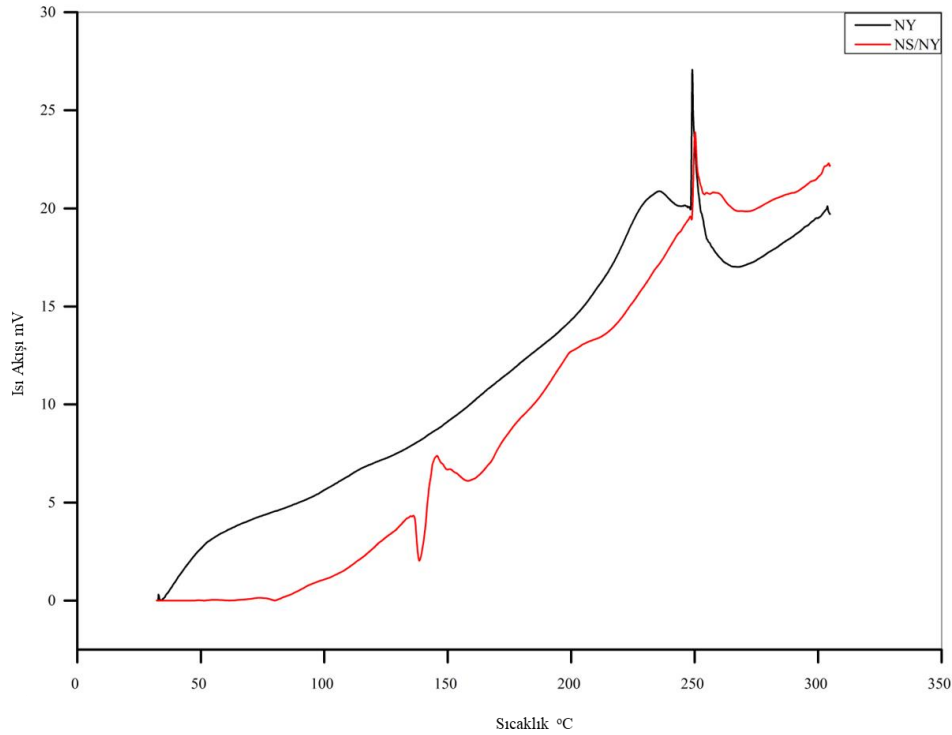
Sonuçların doğruluğu ve tekrarlanabilirliğini sağlamak amacıyla TGA ve DSC analiz ve okumaların tümü üç defa gerçekleştirilmiştir ($n=3$). Böylece NY ve NS/NY veziküllerinin termal davranışı ve uyumluluğu hakkında kapsamlı sonuç elde edilmiştir.



Şekil 4.8. NY ve NS/NY'lerin TGA termogramları

NY veziküllerinin TGA analiz sonucu incelendiğinde (şekil 4.8), 50°C'ye kadar ağırlık kaybı gözlemlenmemesi sistemde serbest su miktarının çok az olduğunu göstermektedir. 100-150°C civarında hafif bir ağırlık kaybı mevcuttur. Bu durum, hidrasyon suyunun veya sistemdeki uçucu küçük moleküllerin buharlaşması ile ilgilidir. 250°C'den sonra belirgin bir ağırlık kaybı başlamaktadır. Bu, plasebo NY'leri oluşturan organik moleküllerin bozunmaya uğradığını göstermektedir. Genel olarak, ağırlık kaybı oranları plasebo NY'lerin termal stabilitesinin NS/NY veziküllerine göre daha az olduğunu gözlemlenmiştir.

NS/NY veziküllerinin TGA analiz sonucu incelendiğinde (şekil 4.8) 100°C sıcaklığa kadar belirgin bir ağırlık kaybı görülmemektedir. Bu durum sistemde serbest su miktarının çok az olduğunu göstermektedir. 150°C civarında hafif bir ağırlık kaybı başlamaktadır. Bu, NY'lerde hapsolmuş nemin veya uçucu bileşenlerin kaybına işaret etmektedir. 250°C'nin üzerinde daha belirgin bir ağırlık kaybı meydana gelmektedir. Bu durum organik bileşenlerin termal bozunmasına işaret etmektedir. NS enkapsüle edilmiş NYlerde TGA eğrisinde daha az bir gravimetrik düşüş gözlemlenmiştir. Bu durum yağın termal kararlılık üzerinde stabilize edici bir etkisi olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.9. NY ve NS/NY'lerin DSC termogramları

NY veziküllerinin DSC analiz sonucunda (şekil 4.9) 50-150°C arasında çok küçük bir endotermik pik gözlemlenmektedir. Bu pik, NY'lerin içerdiği suyun buharlaşması ile ilişkilidir. 150-250°C arasında ise bir endotermik olay veya faz geçişi mevcuttur. Bu durum, fosfolipidlerin sıvı kristal fazına geçişini göstermektedir. 250°C civarında keskin bir endotermik pik olması NY'lerin ana bileşenlerinin (fosfolipidlerin) erime veya bozunma sıcaklığına işaret etmektedir.

NS/NY veziküllerinin DSC analiz sonucu incelendiğinde (şekil 4.9) 60-100°C arasında küçük bir endotermik pik görülmektedir. Bu, hidrasyon suyunun buharlaşmasıyla ilişkilidir. 150°C civarındaki pik, lipit fazın geçiş sıcaklığını veya bileşenlerin yeniden düzenlenmesini belirtmektedir. 250°C'nin üzerinde keskin bir endotermik pik, fosfolipidlerin erime veya bozunma sıcaklığına işaret etmektedir. NS yağı içeren NY'lerde piklerin yer değiştirmesi veya azalması gözlenmiştir. Bu, yağın fosfolipid yapılarının termal özelliklerini değiştirdiğini göstermektedir (Ghumman ve ark., 2023).

Plasebo NY'lerin termal davranışı NS yağı içeren NY'lerle karşılaştırıldığında ağırlık kaybı daha keskin gerçekleşmiştir, bu da yağın stabilizasyon etkisi olmadan plasebo NY'lerin daha düşük termal stabiliteye sahip olabileceğini göstermektedir.

DSC'deki piklerin yoğunluğu ve sıcaklıklarındaki farklılıklar, yağın sistem üzerinde ısı özellikleri değiştiren bir etkisinin olduğunu göstermektedir.

4.2.5. Enkapsülasyon verimliliği

NS yağı içeren NY'lerin enkapsülasyon verimliliğinin hesaplanması amacıyla timokinon standartları UHPLC ile 3 tekrarlı olacak şekilde okutulmuştur. Kalibrasyon eğrisi satın alınan timokinon standartı kullanılarak timokinonun 0,50 – 1 – 7,5 – 15 – 30 – 75 – 90 – 120 µg/mL (ppm) ($r^2= 0,9951$) konsantrasyonları hazırlanarak oluşturulmuştur. Elde edilen kalibrasyon eğrisi şekil 4.10'da gösterilmektedir.

Çörekotu yağının stabilitesinin sağlanması amacıyla yağ katı lipid nanopartiküllerle kapsülleneceği çalışmada katı lipid nanopartikülleri emülsifikasyon-ultrasonikasyon metoduyla hazırlanmıştır. Farklı emülgatörlerin parçacık boyutu açısından etkileri incelenmiştir. Karakterizasyon çalışmaları sonucunda katı lipid nanopartiküllerinin çapı 250-900 nm aralığında bulunmuştur. Ayrıca küre benzeri partiküller olarak gözlemlenmiştir. Çörekotu yağı, balmumu, lesitin ve Tween 80'den oluşan nano partikül formülasyonunun enkapsülasyon verimi %66 olarak bulunmuştur (Suksuwan ve ark., 2021). Singh ve ark., (2021) tarafından gerçekleştirilen çalışmada yüzey aktif madde span 60 ve kolesterolün 9 farklı formülasyonu ile kurkuminin enkapsüle edileceği niyozomlar ince film hidrasyon metodu kullanılarak oluşturulmuştur. Karakterizasyon çalışmaları sonucu morfolojilerinin küresel olduğu tespit edilmiştir. Parçacık boyutunun 4.22 µm ile 4.83 µm arasında değiştiği belirlenmiştir. Enkapsülasyon verimliliği ise oluşturulan farklı miktarda span 60 ve kolesterolün kullanıldığı formülasyonlardan 7. niyozom formülasyonunda %91 olarak elde edilmiştir. Salım kinetiği verimin en yüksek olduğu N7 formülasyonunun Korsmeyer-Peppas kinetik modeline uygun olduğu belirlenmiştir (Singh ve ark., 2021).

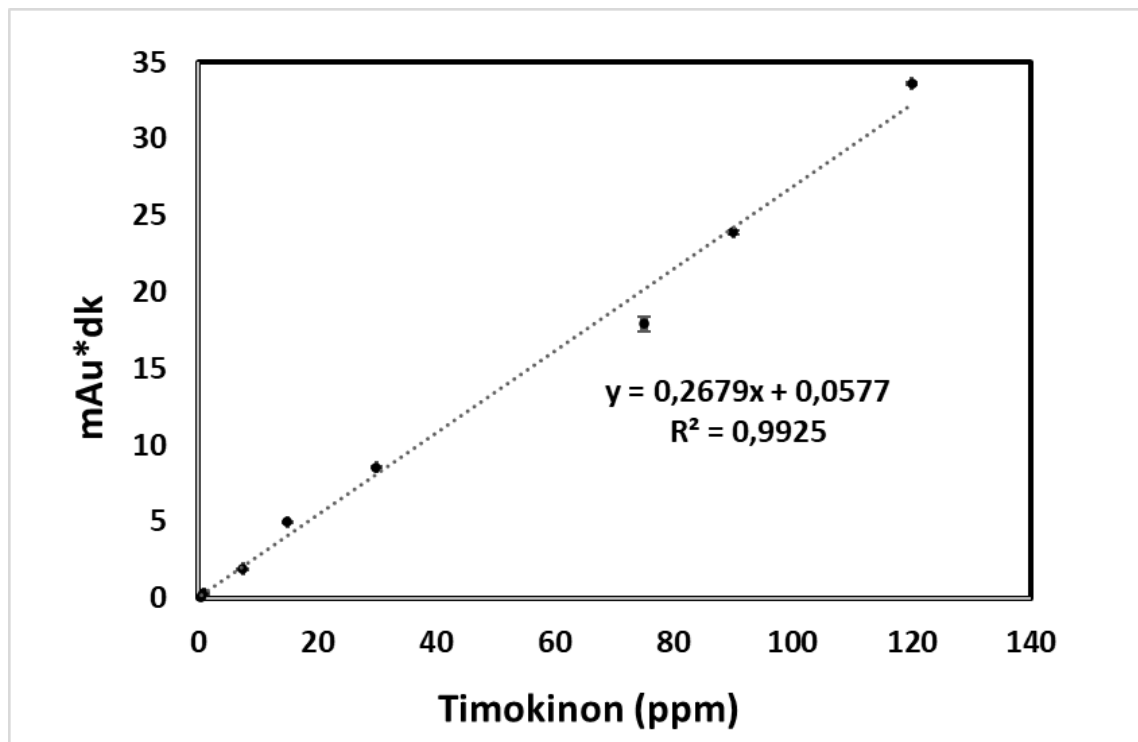
Kalibrasyon eğrisine göre analiz sonuçları denklem 8'e göre hesaplanmıştır. Enkapsülasyon verimi %79 olarak hesaplanmıştır. Literatürdeki çalışmalara benzer sonuç elde edilmiştir.

Enkapsülasyon verimliliği yüzey aktif madde konsantrasyonu ve kolesterol miktarına büyük ölçüde bağlı olan vezikülün stabilitesine dayanmaktadır. Tweenler hidrofiliktir ve yüksek hidrofilik-lipofilik denge (HLB) değerine sahiptir (Akhtar ve ark., 2014).

HLB, yüzey aktif maddelerin hidrofilik ve hidrofobik grupları arasındaki ilişkinin bir ölçüsüdür. HLB değeri hem niyozomların boyutu hem de ilaçların veya doğal

moleküllerin kapsülleme etkinliği üzerinde doğrudan bir etkiye sahiptir (Liga ve ark., 2024).

Noniyonik yüzey aktif maddeler için HLB aralığı 0 ila 20 arasındadır. Daha düşük HLB daha lipofilik yüzey aktif maddeyi, daha yüksek HLB ise daha hidrofilik yüzey aktif maddeyi ifade etmektedir (Uchegbu ve ark., 1995). 14 ila 17 arasında bir HLB değerine sahip hidrofilik yüzey aktif maddeler, yüksek sulu çözünürlükleri nedeniyle çift katmanlı bir zar oluşturmak için optimum seviyede kolesterol eklenmektedir (Shahiwala ve ark., 2002). Niyozomlar Tween 80'den (HLB değeri =15) ve Tween 20'den (HLB değeri = 16,7) oluşmaktadır. Kolesterol konsantrasyonunun varlığında stabil niyozom oluşturmaktadır. Oluşan niyozomun sudaki çözünürlüğü yüksektir (Seleci ve ark., 2016).



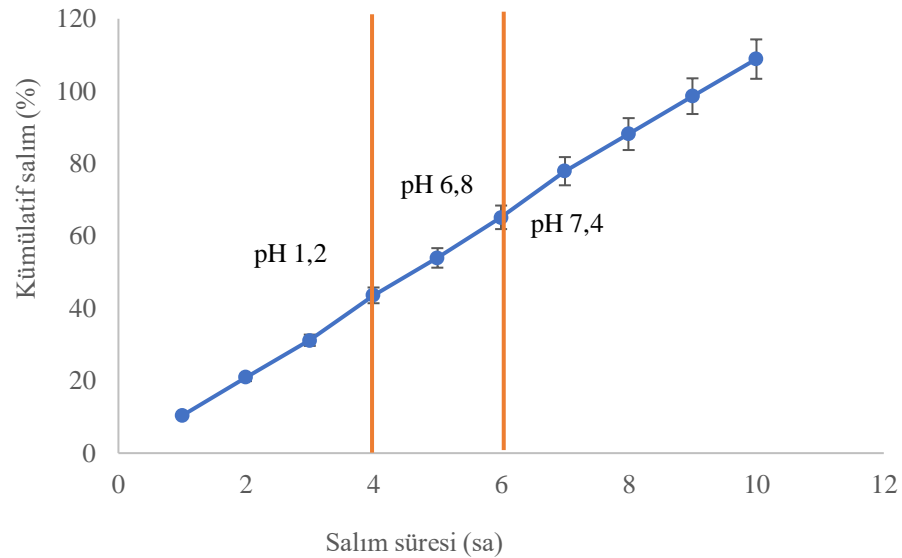
Şekil 4.10. Timokinon kalibrasyon eğrisi

4.3. *In vitro* salım çalışmaları sonuçları

In vitro ilaç salım çalışmaları, mide ve bağırsak ortamından pH 1,2 ve pH 6,8 ve pH 7,4'te 37°C'de gerçekleştirilmiştir. Ölçümler pH 1,2 mide ortamı için 4 saat, pH 6,8 ince bağırsak ortamı için 2 saat ve pH 7,4 kalın bağırsak ortamı için 4 saat olmak üzere toplamda 10 saat boyunca her saat başı 3 tekrarlı şekilde UHPLC kullanılarak 254 nm dalga boyunda yapılmıştır (Nazeer ve ark., 2017). Kalibrasyon eğrisi ticari timokinon standartı kullanılarak timokinonun 0,50 – 1 – 7,5 – 15 – 30 – 75 – 90 – 120 µg/mL (ppm)

($r^2 = 0,9951$) konsantrasyonları hazırlanarak oluşturulmuş ve Şekil 4.10'da gösterilmektedir.

Mide ortamı için pH 1,2, ince bağırsak ortamı için pH 6,8 ve kalın bağırsak ortamı için pH 7,4 için zamana karşı kümülatif etken madde salım yüzdesi grafiği Şekil 4.11'de gösterilmektedir.



Şekil 4.11. NS/NY'den NS'nin pH'a bağlı in vitro % salım sonuçları

Çizelge 4.3. pH 1,2 mide, pH 6,8 kalın bağırsak ve pH 7,4 ince bağırsak ortamında NS/NY'den NS'nin in vitro % salım sonuçları (n=3)

Zaman (saat)	pH	Kümülatif salınan ilaç (%)
1	1,2	10,25
2	1,2	20,63
3	1,2	30,87
4	1,2	43,31
5	6,8	53,53
6	6,8	64,11
7	7,4	75,56
8	7,4	85,66
9	7,4	95,92
10	7,4	100

pH 1,2 mide ortamında salımın % 43'ü gerçekleşirken, pH 6,8 ince bağırsak ortamında etken maddenin % 21'inin salımı sağlanmıştır. pH 7,4 kalın bağırsak

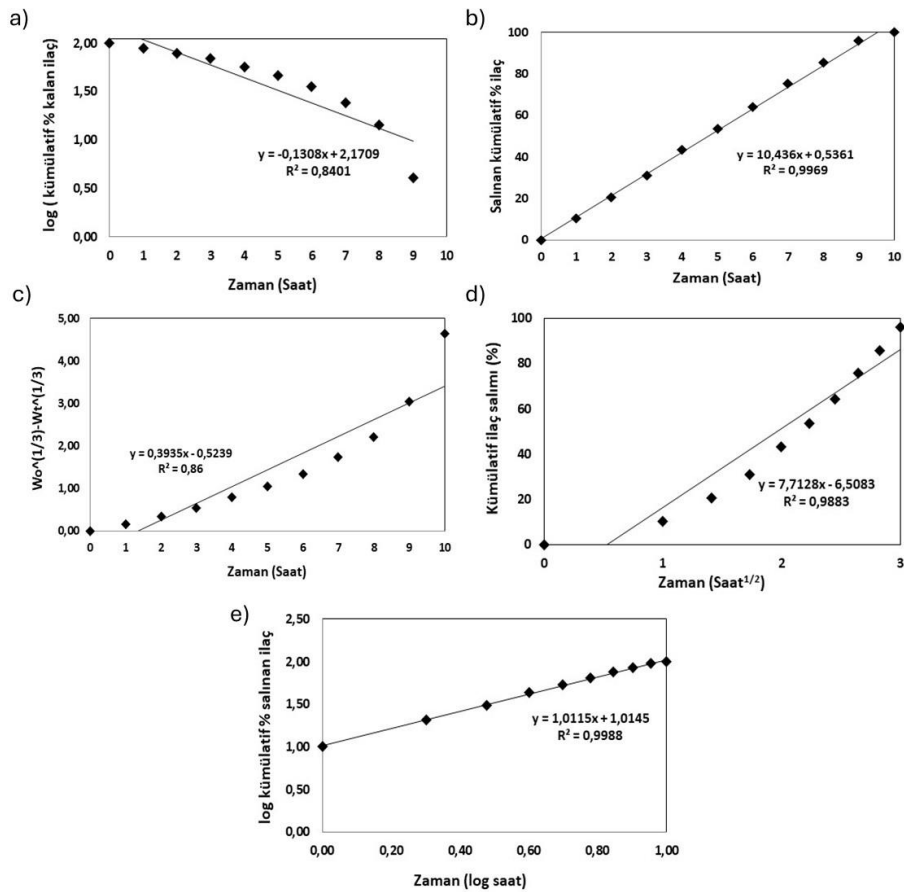
ortamında geri kalan % 36'lık etken maddenin tamamı salınmıştır. Saat başı salınan etken madde kümülatif salım yüzdesi çizelge 4.3'te gösterilmektedir.

4.3.1. *In vitro* salım kinetikleri

NS/NY'ye ait salım verileri, salım kinetiğini belirlemek ve salım sürecini anlamak için sıfıncı derece, birinci derece, Higuchi, Korsmeyer-Peppas ve Hixson-Crowell kinetik modellerine uyarlanmıştır. Kinetik modelleri için çizilen grafikler şekil 4.12'de gösterilirken, hesaplanan korelasyon katsayılarına her üç pH değeri için Çizelge 4.4'te yer verilmiştir.

Çizelge 4.4. Salım kinetiği modellerine ait korelasyon katsayıları

	Sıfıncı derece	Birinci derece	Korsmeyer-Peppas	Higuchi	Hixson-Crowell
NS/NY	0,8401	0,9969	0,9988	0,9883	0,8600



Şekil 4.12. Salım kinetik modellerine ait salım grafikleri a) Birinci derece b) Sıfıncı derece c) Hixson-Crowell d) Higuchi e) Korsmeyer Peppas kinetik modeli

Kinetik değerlendirme sonucu formülasyonun Korsmeyer-Peppas modeline uygun olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen n değerinin 1'den büyük olması non-Fickian ilaç salımını işaret etmektedir. ' n ' değerlerinden formüle edilen NY'lerin erozyon kontrollü ilaç taşıma sistemi olan süper vaka II transportunu takip ettiği bulunmuştur. Nazeer ve ark., (2017) çalışmalarında salım kinetiğini değerlendirilmişlerdir. Timokinonun mikrokapsüllerinden salımının Korsmeyer-Peppas modelini ve süper vaka II taşımayı (erozyon kontrollü ilaç dağıtım sistemi) izlediğini belirtmişlerdir. Başlangıçta, gastrik ortamda (pH 1.2), mikrokapsüllerden çekirdek materyalinin (timokinon) çok az salındığı tespit edilmiş olup pH 6.8 ve pH 7.4'te, formülasyon başlangıçta ani salım göstermiş ve daha sonra sabit bir oranda salım eğiliminde olduğu vurgulanmıştır. Mikrokapsüller, gastrik ortamda istenen süre boyunca salım göstermemiştir ve ilacı kolon ve ilgili alanlarının pH'ı olan pH 6.8 ve 7.4'te salıvermiştir. Bu durumda hazırlanan mikrokapsüllerin, bölgeye özgü ilaç dağıtımı için iyi bir aday olduğu sonucuna varılmıştır. Nazeer ve ark., (2017) bu çalışmasında gözlemlendiği gibi salım sırasında difüzyon hızı değişimleri meydana gelmiş olabilmektedir. (Nazeer ve ark., 2017).

Süper vaka-II salımı, su veya biyolojik sıvılarda şişen hidrofilik camsı polimerlerdeki stresler ve durum geçişleriyle ilişkili ilaç taşıma mekanizmasıdır. Bu terim ayrıca polimer çözülmesini ve erozyonunu da içermektedir (Solanki ve ark., 2020). Mevcut çalışmada non-Fickian ilaç salımının meydana gelmesi NS yağının niyozomlar içinde hedef bölgeye daha etkin şekilde taşındığı ve salımın hızlı olduğu anlamına gelmektedir. Bu durumda hızlı salım olması etkinin de hızlı bir şekilde gerçekleşmesini sağlayabilmektedir. Ayrıca süper vaka II salımının gerçekleşmesi yağın yeterince emilmemesi ve beklenen etkinin yeterince gözlemlenmemesine neden olmuş olabilir.

4.4. Nano NY'lerin bağırsak mikrobiyotasına prebiyotik etkisinin incelenmesi

4.4.1. DNA konsantrasyon sonuçları

ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep kiti kullanılarak sıçan dışkılarından elde edilen DNA'lara ait konsantrasyon değerleri çizelge 4.5'te verilmiştir. G1 kontrol sıçan grubunu belirtmektedir. G2 grubu NS yedirilen sıçan grubunu temsil ederken G3 ise NS/NY yedirilen sıçan grubudur.

Çizelge 4.5. Dışkı numunelerinden izole edilen DNA'lara ait konsantrasyon değerleri

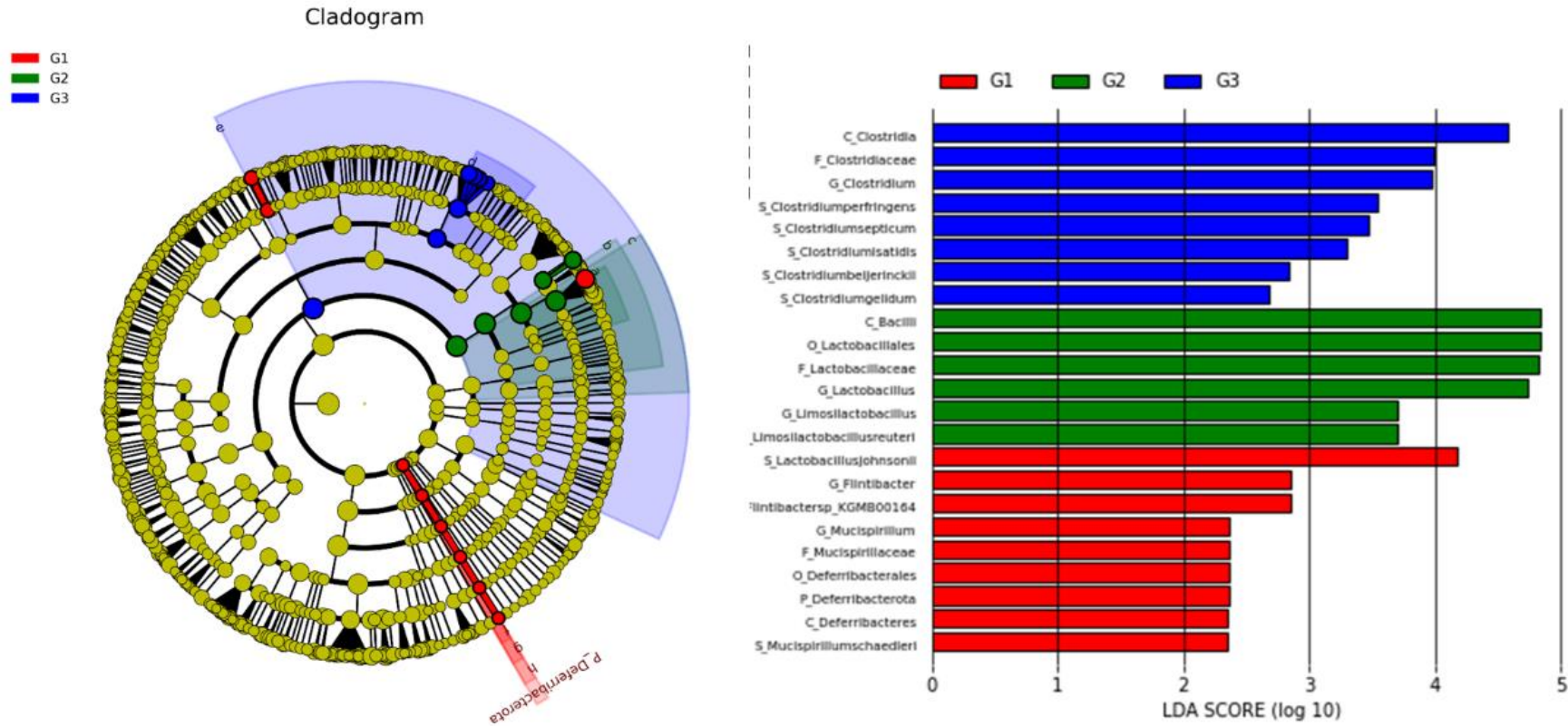
	Grup adı	DNA konsantrasyonu (ng/ μ L)
1	G1-1	52
2	G1-2	63,6
3	G1-3	72,2
4	G1-4	49,8
5	G1-5	95,2
6	G1-6	59,6
7	G1-7	88
8	G1-8	69,2
9	G1-9	24,2
10	G1-10	34,6
11	G2-1	34,8
12	G2-2	64,4
13	G2-3	72,8
14	G2-4	51,6
15	G2-5	89,2
16	G2-6	71,4
17	G2-7	56
18	G2-8	51,8
19	G2-9	59,4
20	G3-1	57,2
21	G3-2	45,4
22	G3-3	66,6
23	G3-4	46,8
24	G3-5	64,6
25	G3-6	53,4
26	G3-7	40,8
27	G3-8	25,2
28	G3-9	57,4
29	G3-10	44,4

Dışkı örneklerinden izole edilen DNA örnekleri kullanılarak metagenomik analiz gerçekleştirilmiştir.

4.4.2. Mikrobiyal profil

DNA sekanslama teknolojisi yüksek verimliliği ve metagenomik data analiz yöntemlerindeki gelişmeler insan bağırsak mikrobiyotası üzerinde dinamik etkileri üzerine çalışmaları yoğunlaştırmıştır (Yüksekal, 2019).

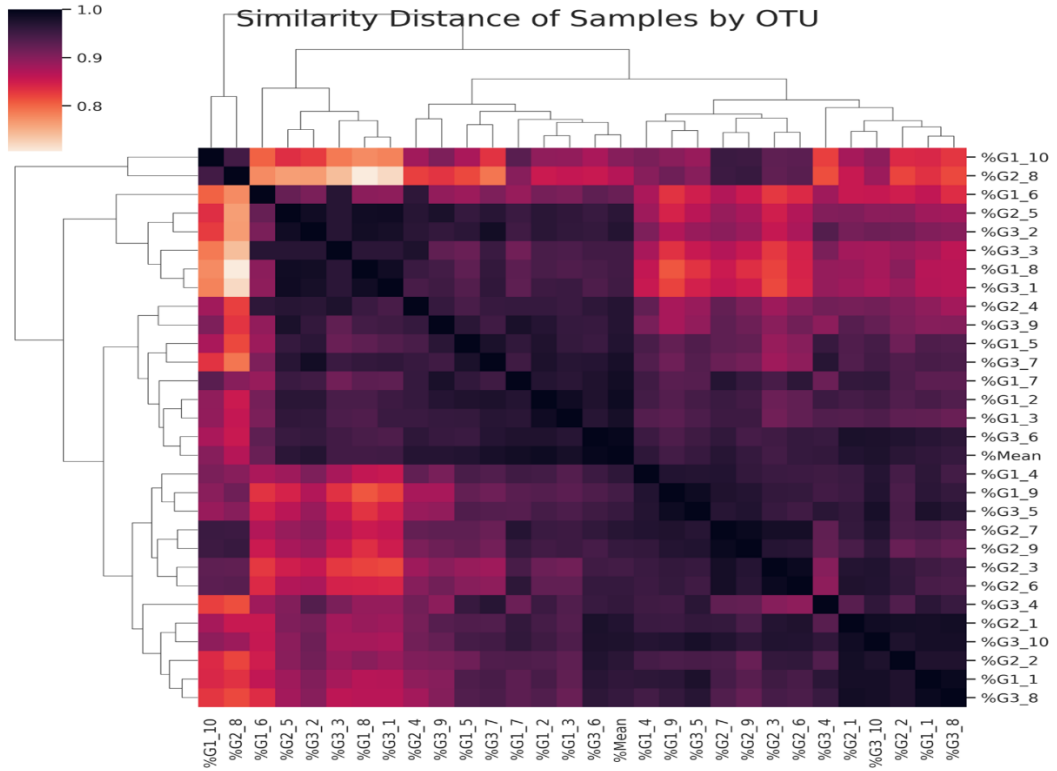
Bu doktora tez çalışmasında gerçekleştirilen metagenomik data analizi ile 192 cins, 73 aile, 39 takım, 22 sınıf, 14 filum ve 443 türe ait 784 bakteri suşu tanımlanmıştır.



Şekil 4.14. Cins bazında kontrol, NS grubu ve NS/NY grubunda yüksek oranda saptanan bakteriler: cladogram, Lefse analizi ve LDA score.

Krona grafiği; halka grafiği ve radyal ağaç haritası gibi birden fazla isimle bilinmektedir ve hiyerarşik bir veri kümesini görselleştirmek için kullanılmaktadır. Her halkanın hiyerarşideki belirli bir seviyeye karşılık geldiği bir dizi eř merkezli halka kullanarak hiyerarşiyi göstermektedir. Her halkanın içindeki segmentler, o seviyedeki ayrıntıları temsil etmek için orantılı olarak bölünür. Bir halkanın içindeki bir segmente odaklanarak, o segmentin tüm hiyerarşi ve onun ana halka segmentiyle ilişkisi anlaşılabilir Tanımlanmış mikrobiyal aileleri ve biyolojik süreçleri özetleyerek mikrobiyal topluluk yapısı ve metabolik işlevsellik hakkında kapsamlı bir genel bakış sunmaktadır. Bu grafik, tanımlanmış bakteri, arke ve virüslerin, süper krallıktan aileye kadar çeşitli taksonomik seviyelerdeki dağılımını tasvir etmektedir (Aplakidou ve ark., 2024). Şekil 4.13'te gösterildiği gibi krona grafiği ile cins seviyesinde bakteri suşlarının göreceli bollukları spektrum sayısına göre temsil edilmektedir.

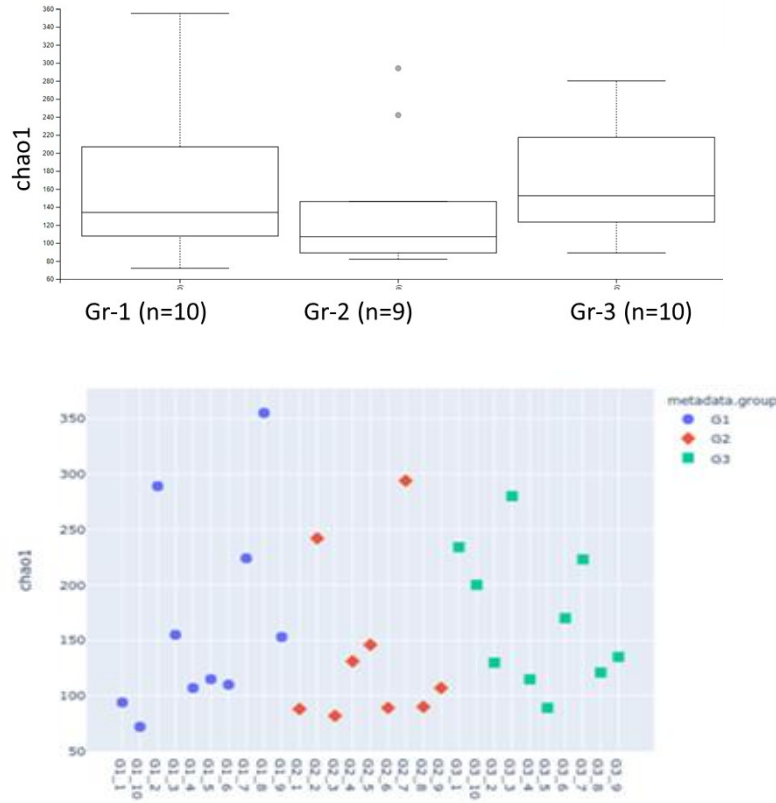
Metagenomik analizlere odaklanarak yüksek boyutlu sınıf karşılaştırmalarını desteklemek için doğrusal ayırıcı analiz (LDA) etki büyüklüğü (LEfSe) yöntemi kullanılmaktadır. LEfSe, istatistiksel önem için standart testleri biyolojik tutarlılık ve etki alaka düzeyini kodlayan ek testlerle birleştirerek sınıflar arasındaki farklılıkları açıklama olasılığı en yüksek olan özellikleri (organizmalar, kladlar, operasyonel taksonomik birimler, genler veya işlevler) belirlemektedir. LDA puanı 2 veya 2'den büyük çıkan topluluklar için anlamlı farklılıklar mevcuttur denebilir (Segata ve ark., 2011). Şekil 4.14'te gösterildiği gibi bu doktora tez çalışmasında 2 ve 2'den büyük LDA değerlerinde nispi bolluklarda farklılıklara rastlanılmıştır.



Şekil 4.15. OTU ile örneklerin benzerlik mesafeleri

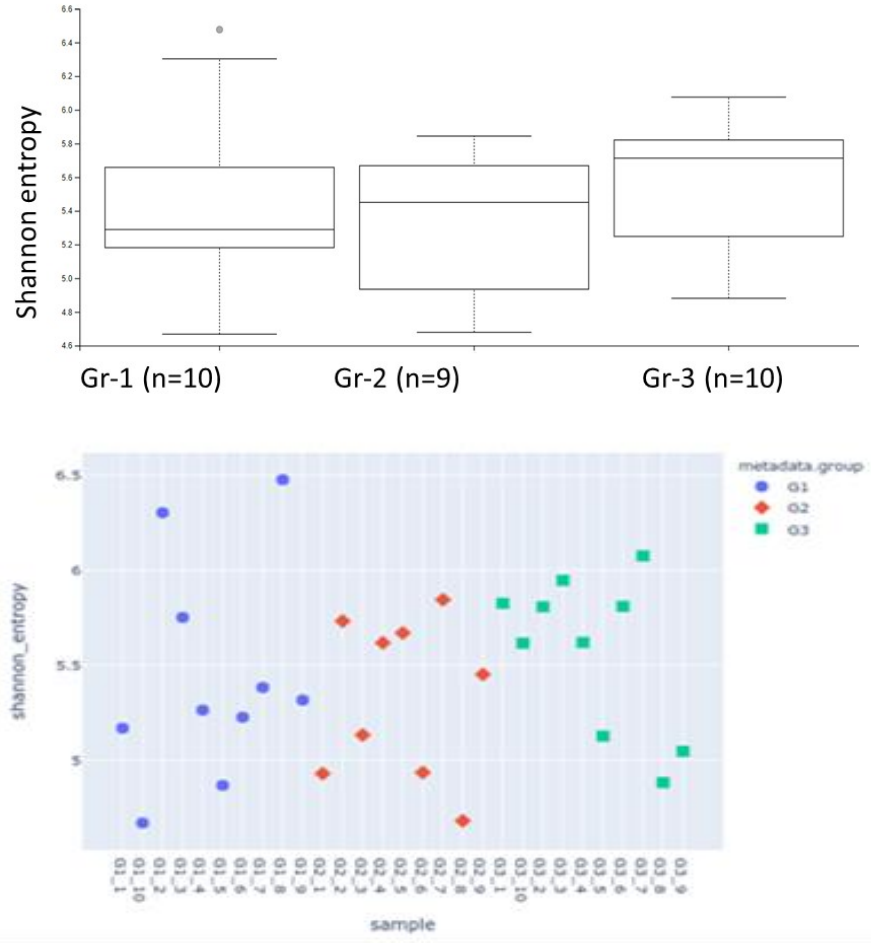
Operasyonel taksonomik birimler (OTU'lar) matematiksel olarak tanımlanmış taksonları oluşturmaktadır. 16S rRNA geninin amplicon dizilimini kullanarak bakteri topluluklarını tanımlamak için uygulanır (Lladó Fernández ve ark., 2019). Metagenomik data analiz çalışmasında yüksek kaliteli okumaların analizi 784 OTU tanımlamıştır (şekil 4.15).

Alfa çeşitliliği, belirli bir örnek veya ekosistem içerisinde bulunan türlerin çeşitliliğini ifade eder. Alfa çeşitliliğin hesaplanmasında farklı indeksler kullanılmaktadır (şekil 4.16, 4.17 ve 4.18). Bir numunedeki çeşitli türlerin sayısına tür zenginliği, mikroorganizmaların bir numunedeki dağılımına tür çeşitliliği denir.



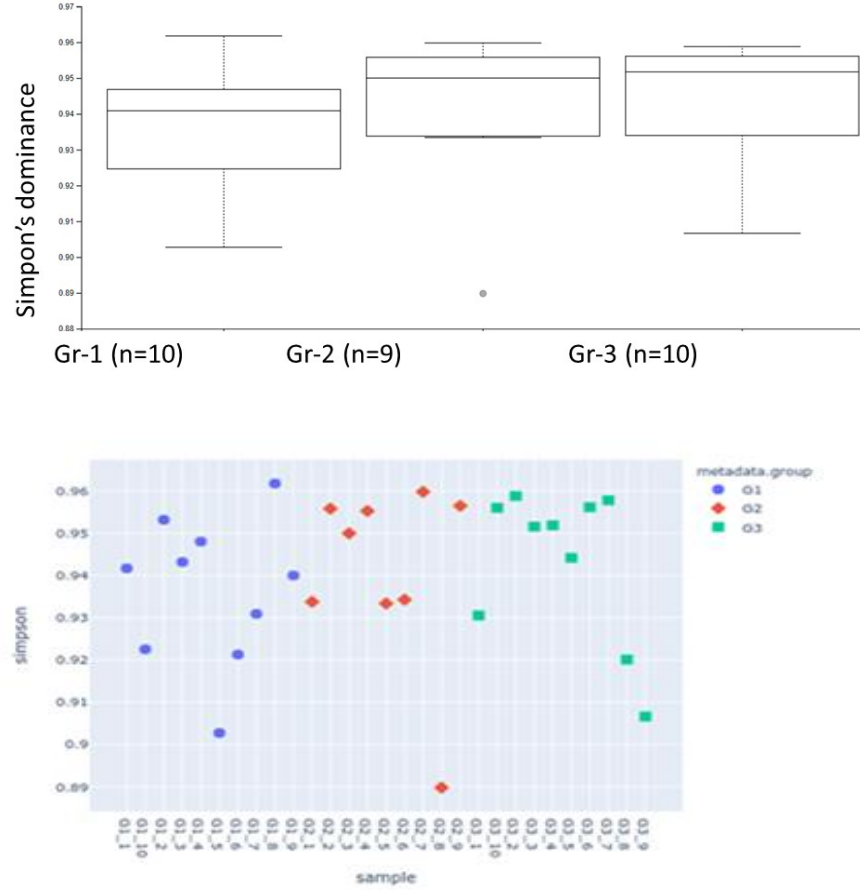
Şekil 4.16. Chao1 indeksi

Chao1 indeks, bulunan verideki çeşitliliği ve yetersiz veri sebebiyle gözden kaçabilecek türleri tahmin etmektedir. Gruplar arasında chao1 indeks karşılaştırması yapılmıştır (şekil 4.16). En yüksek chao1 değerine sahip grup 3'tür. Tahmini tür sayısı 152 olarak hesaplanmıştır. Sıçanlara NS/NY yedirilen bu grup en yüksek tahmini tür zenginliğine sahiptir. Chao1 değerinin en düşük dolayısıyla tahmini tür çeşitliliğinin en az olduğu grup NS tohum yağı yedirilen sıçanların bulunduğu grup 2'de tahmini 107 tür bulunmaktadır. Kontrol grubu olan grup 1'deki tahmini tür çeşitliliği 134 olup 3. Gruptan daha az, 2. Gruptan daha fazla olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.17. Shannon indeksi

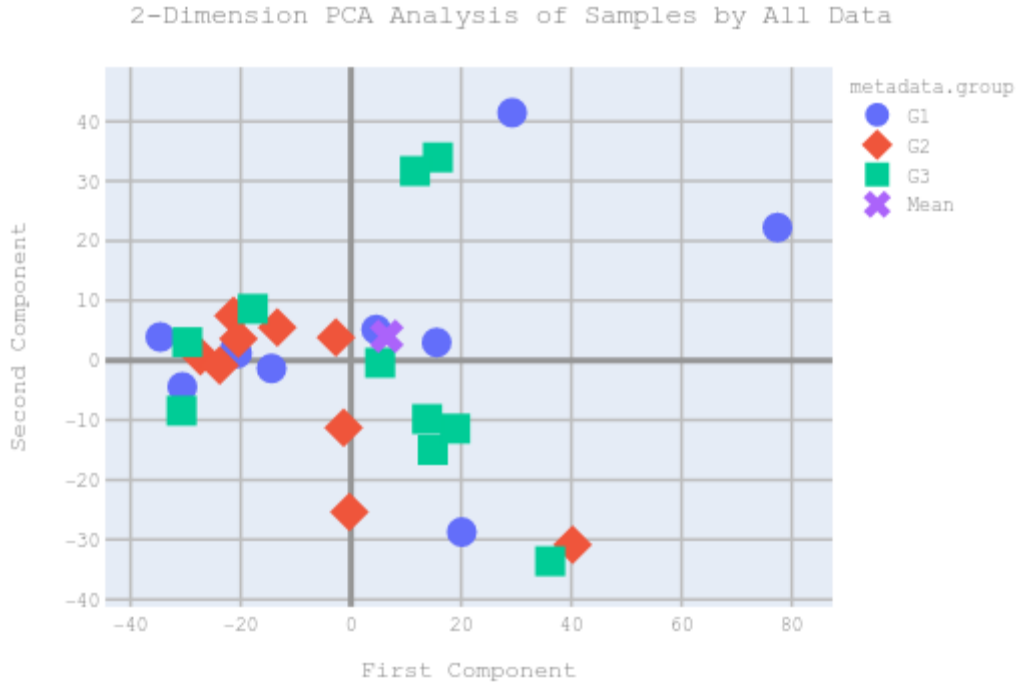
Shannon indeksi, alfa çeşitliliği tür zenginliği ve çeşitliliği bakımından ölçülmektedir. Gruplar arasında Shannon indeks karşılaştırması yapılmıştır (şekil 4.17). En yüksek Shannon değerine sahip grup 3'tür. Shannon indeks değeri grup 3 için 5,7 olarak hesaplanmıştır. Sıçanlara NS/NY yedirilen bu grup, tür bakımından çeşitlilik göstermektedir. Shannon değerinin en düşük dolayısıyla tür çeşitliliğinin grup 3'e göre az ve grup 1'e göre fazla olduğu NS tohum yağı yedirilen sıçanların bulunduğu grup 2'dir. Bu grupta Shannon değeri 5,45 olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubu olan grup 1'de en düşük Shannon değeri hesaplanmış olup 5,28'dir. Tür çeşitliliği ve sayısı en az bulunduran grup 1'dir.



Şekil 4.18. Simpson indeksi

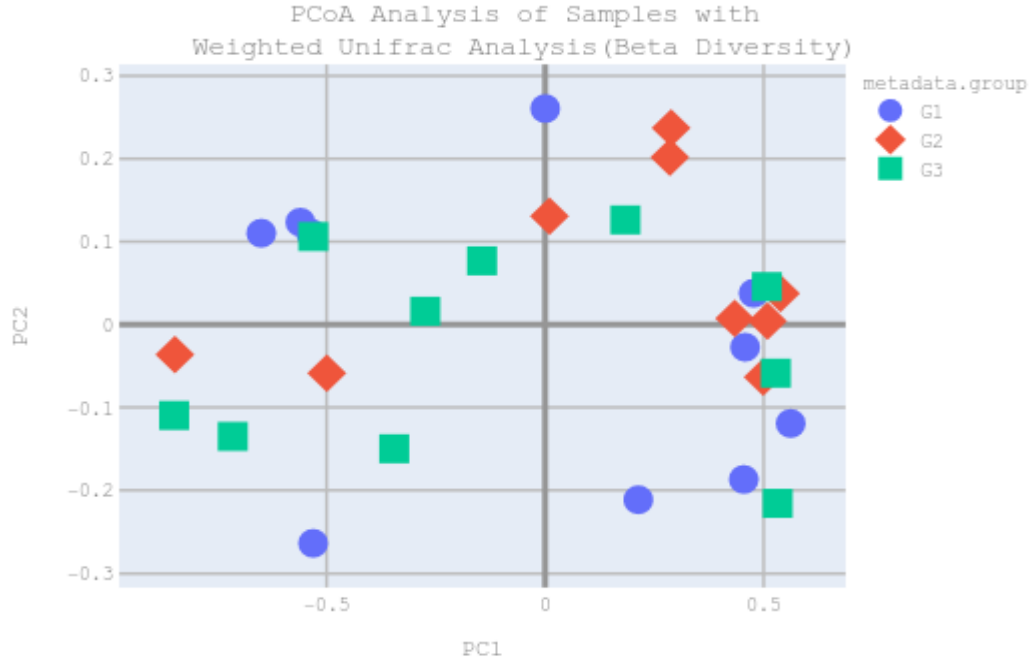
Simpson indeksi örneği oluşturan farklı türlerin göreceli bolluğu ile örneğin zenginliğini hesaplar. Gruplar arasında Simpson indeks karşılaştırması yapılmıştır (Şekil 4.18). En yüksek Simpson değerine sahip grup 3'tür. Simpson indeks değeri grup 3 için 0,95 olarak hesaplanmıştır. Sıçanlara NS/NY yedirilen bu grup, tür bakımından çeşitlilik göstermektedir. Simpson değerinin en düşük dolayısıyla tür çeşitliliğinin grup 3'e göre az ve grup 1'e göre fazla olduğu NS tohum yağı yedirilen sıçanların bulunduğu grup 2'dir. Bu grupta Simpson değeri 0,949 olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubu olan grup 1'de en düşük Simpson değeri hesaplanmış olup 0,940'tır. Tür çeşitliliği ve sayısı en az bulunduran grup 1'dir.

Beta çeşitlilik analizinin temel amacı örnekleri hem kendi içinde hem buldukları grupları birbirleriyle karşılaştırılarak, gruplar veya örnekler arası yapısal durumu gözlemlenmektir. Bunun için, örneklerin sahip oldukları bakteriler ile de karşılaştırılması amaçlandığından, PCoA analizleri yani temel koordinat analizi yapılmıştır. PCoA analizleri temel bileşen analizlerinden (PCA) farklı olarak örneklerin sahip olduğu bakterilerin birbiri arasındaki uzaklıklar da hesaba katılmaktadır.



Şekil 4.19. Kontrol, NS grubu ve NS/NY grubu PCA analizi

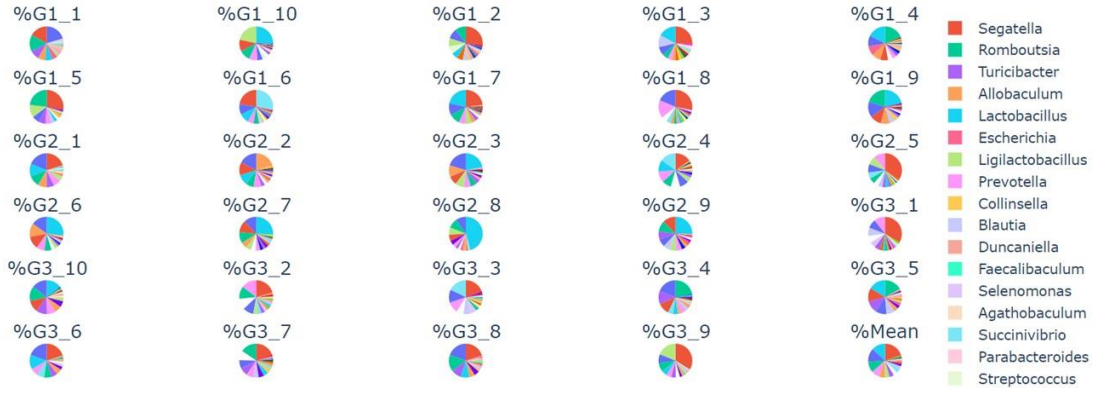
PCA analizi, çok boyutlu verilerde değişkenler arasındaki ilişkiyi tespit etmek için maksimum varyansı bularak boyut indirgeme yöntemine dayanır. Bu analizde amaç verileri 2 veya 3 boyutlu düzlemlere indirgemek ve bu sayede veriler arasında bulunan patternleri gözlemlemektir. PCA analizinin temel özelliği minimum değişken ile mümkün olduğunca fazla varyansın ortaya çıkarılmasıdır. Bu analizde oluşacak patterni gözlemlemek amacıyla veriler ve verilerin ait oldukları gruplar 2 boyutlu olarak analiz edilmiştir (şekil 4.19).



Şekil 4.20. Tür topluluk dağılımının PCoA analizi

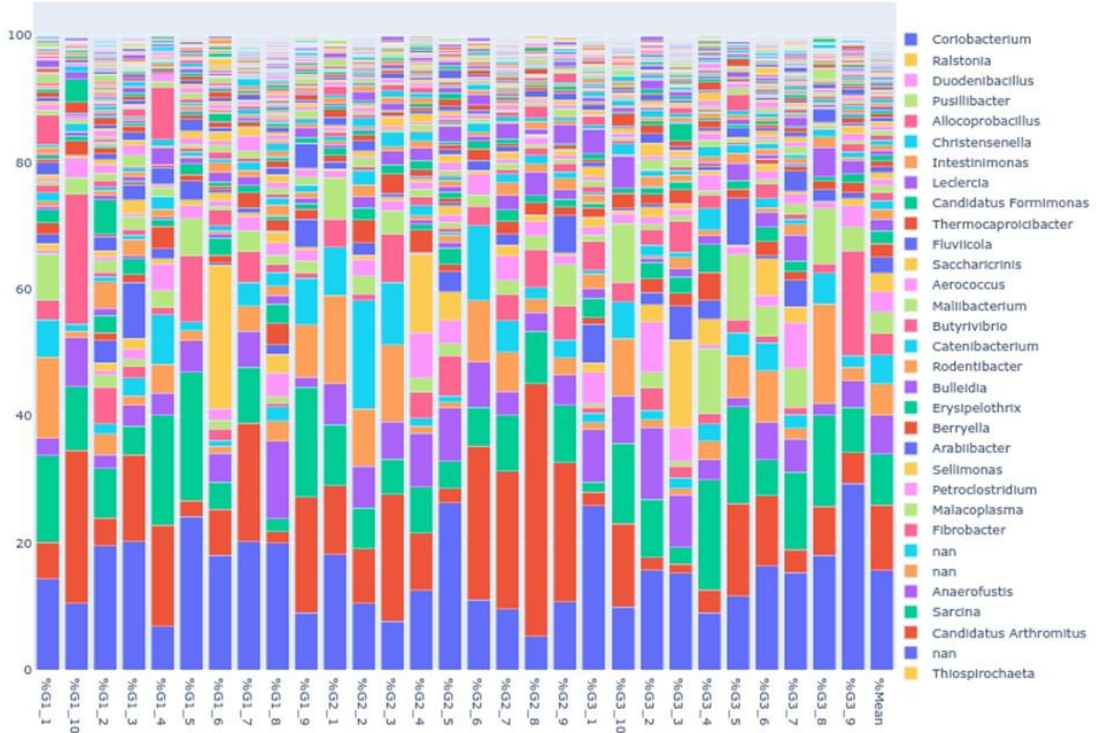
Farklı örnekler arasındaki çeşitlilik farklılıklarını yansıtmak için, örneklerde gruplar arası beta çeşitlilik analizi gerçekleştirildi. Verilerin benzerliğini veya farklılığını incelemek için bir görselleştirme yöntemi olan PCoA, beta çeşitliliği teorisine göre gerçekleştirilebilir. PCoA grafiğindeki örnek noktaları arasındaki mesafe, örneklerdeki mikrobiyal toplulukların benzerliğini temsil eder. Mesafe ne kadar yakınsa, benzerlik o kadar yüksek olur ve bu da birçok örneği çevreleyen her kümenin benzer mikrobiyal topluluklardan oluştuğunu gösterir (Yüksekal, 2019). Weighted-Unifrac, örneklerin içerisindeki bakterilere ait genomların sekansları ile bir filogenetik ağaç oluşturarak uzaklık hesabı yapar ve bakterilerin bulunma oranları ile birlikte analiz eder. PCoA grafiği Weighted-Unifrac analizini (beta çeşitliliği) göstermektedir (şekil 4.20).

Kontrol sıçan grubu, NS yedirilen sıçan grubu ve NS/NY yedirilen sıçan grupları dağılımı incelendiğinde üç gruptaki bazı bakteriler üst üstedir. Bu bakteriyel yapının benzer olduğu ile ilgili olabilmektedir. Grupların kendi içerisinde ise bazı türler birbirine yakın konumlanmıştır. Bu gruplar içerisinde tür bakımından benzerlikler olduğunu göstermektedir. Dağınık halde bulunan gruplar içerisinde tür ve bolluk dağılımında farklılıklar mevcuttur.



Şekil 4.21. Grupların cins düzeyinde taksonomik karşılaştırılması
(G1: kontrol, G2: NS, G3: NS/NY)

Cins düzeyinde gerçekleştirilen metagenomik analiz sonucuna göre nispi bolluk NS verilen *Lactobacillus* bakteri suşunda NS/NY verilenlere göre %11,2 artış gözlemlenirken, *Limosilactobacillus* suşlarında %0,997 artış gözlemlenmiştir. Bu durumda NS 'nin bağırsak mikrobiyotası sağlığına katkısının olduğu sonucuna varılmaktadır. Deney hayvanlarına NS tohumu yağı verildiğinde bunların göreceli bolluğu arttı. *Clostridium* türleri sayısında NS/NY yedirilen sıçanlarda kontrol grubuna göre %1,7 oranında artış gözlemlenmiştir. *Flintibacter* tür sayısında nispi bolluk oranı kontrol grubunda NS yedirilen gruba göre %0,1 artış tespit edilmiştir. *Ruthenibacterium* sayısında NS/NY yedirilen grupta NS yedirilen gruba göre %0,05 artış gözlemlenmiştir (şekil 4.21) ($p < 0,05$).



Şekil 4.22. Tüm örneklerde tespit edilen bakteri suşlarının nispi bollukları (G1: kontrol, G2: NS, G3: NS/NY)

Sınıf düzeyinde gerçekleştirilen metagenomik data analiz sonucuna göre NS grubunda bacilli sınıfı nispi bolluğu NS/NY yedirilen sıçanlara göre %13 tespit edilmiştir. Bu, NS tohum yağının bağırsak mikrobiyotasına katkıda bulunduğunu göstermektedir. NS/NY yedirilen sıçan grubunda NS verilenlere göre *Clostridia* sınıfının göreceli bolluğu %8 olarak bulunmuştur. Takım düzeyinde nispi bollukları karşılaştırıldığında *Lactobacillales* için nispi bolluk NS yedirilen sıçan grubunda NS/NY verilenlere göre %13 olarak bulunması NS'nin bağırsak mikrobiyotasına olan katkısını göstermektedir. Aile bazında ise *Lactobacillaceae* için nispi bolluk NS yedirilen sıçanlarda NS/NY yedirilen sıçanlara göre %13,8 olarak tespit edilirken *Clostridiaceae* için ise bu oran NS/NY yedirilen sıçan grubunda NS verilenlere göre %1,79'dur (şekil 4.22) ($p < 0,05$). NS tohum yağı, *Lactobacillaceae* suşunda artış sağlarken bağırsak mikrobiyotası için yararlılığını göstermektedir.

Tür düzeyinde metagenomik data analiz sonucuna (şekil 4.22) göre *Lactobacillus intestinalis* türünde NS yedirilen sıçanlarda kontrole göre nispi bolluk %3,46 olarak belirlenmiş olup NS/NY grubundaki sıçanlarda anlamlı fark bulunmamıştır. Bağırsak mikropları kolorektal kanserin tümör mikro çevresini düzenlemede kritik öneme sahiptir. Bununla birlikte, mikrobiyota-tümör mikro çevresi etkileşim mekanizmasının

araştırıldığı çalışmada, *Lactobacillus intestinalisin* kolorektal kanseri modelinde tümör büyümesini etkili bir şekilde bastırıldığı bulunmuştur. *Lactobacillus intestinalisin* bağışıklık hücrelerinin, özellikle dendritik hücrelerin (DC) infiltrasyonunu artırdığı ortaya konmuştur (Sun ve ark., 2025). Afla toksin B1 (AFB1) mikotoksini vücuda girdiğinde, bağırsak bariyer fonksiyonuna zarar verebilir ve metabolitleri karaciğere taşınır. Bu nedenle, karaciğere verilen hasar bağırsak bariyer bozukluğu ile yakından ilişkilidir. Çalışmada *Lactobacillus intestinalis* ve *Lactobacillus rhamnosus*'un AFB1 kaynaklı karaciğer hasarına karşı koruyucu etkileri ve bağırsak bariyer mekanizmalarının araştırılması için erkek SD sıçanlarına oral yoldan AFB1 ve *Lactobacillus intestinalis* / *rhamnosus* uygulanmıştır. Araştırma bulguları ile AFB1'e maruz kalmanın karaciğer histopatolojisinde ve biyokimyasal fonksiyonlarda değişikliklere, inflamatuvar yanıt ve oksidatif strese değişikliğe, bağırsak mukozal bariyerini tehlikeye atmaya ve karaciğerde inflamatuvar faktörlerin ve inflamasyonun birikmesine neden olduğunu gösterilmektedir. *Lactobacillus intestinalis* veya *Lactobacillus rhamnosus* takviyesinin AFB1 kaynaklı karaciğer hasarını önemli ölçüde önlediği, bağırsak mukozal bariyer bütünlüğünün korunmasıyla histopatolojik değişiklikleri ve karaciğer hasarını hafiflettiği belirtilmiştir (Chen ve ark., 2023).

Limosilactobacillus reuteri türü için ise göreceli bolluk NS yedirilen sıçan grubunda %0,98'lik bir oranda ölçülmüştür. Bu prebiyotik etkinliğe sahip bağırsak probiyotiği iyi bağırsak kolonizasyonu ve bakteriyosin salgılama yeteneklerine sahiptir. Bu özelliği sayesinde musin genlerinin ifadesini artırabilmekte ve böylece bağırsak organoidlerinin gelişimini ve olgunlaşmasını teşvik etmektedir. Konakçının bağırsak mikrobiyal topluluğunu manipüle ederek patojenlerin büyümesini engelleyen immünoglobulin A (IGA) üretimini de başlatmaktadır (Jiang ve ark., 2023).

NS/NY yedirilen sıçan grubundaki nispi bolluk oranı kontrol grubuna göre *Clostridium perfringens* için %0,65, *Clostridium septicum* için %0,52, *Clostridium isatidis* için %0,36, *Clostridium beijerinckii* için %0,1 ve *Clostridium gelidum* için %0,03 olarak tespit edilmiştir. *Clostridium* türleri nispi bolluğu sağlıklı mikrobiyotada %0,8-%5 aralığında kabul edilebilir olup daha yüksek nispi bolluk değerlerinde çeşitli hastalıklara neden olabilmektedir (Kuo ve ark., 2024).

Clostridium perfringens, insanlarda ve hayvanlarda bağırsak komensal mikrobiyotasının bir parçası olan arketipal bir patosimbionttur, ancak aynı zamanda toksin cephaneliği yoluyla yıkıcı hastalıklara da neden olabilir. Bu bakteri, prematüre bebeklerde yaşamı tehdit eden nekrotizan enterokolit (NEC) ile ilişkilendirilmiştir (Shaw

ve ark., 2020). *Clostridium perfringens* 4 tip toksin üretmektedir; α , β , ϵ , ι . Bu toksinler nörotoksisite, hemolitik ve enterotoksijenik aktivite gibi çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptir. Ayrıca enfeksiyonu yüksek ölüm oranıyla birlikte nekrotizan enterit, gazlı gangren enterotoksemi, gazlı gangren vb. indükleyebilmektedir (Guo ve ark., 2020). *Clostridium septicum*, travmatik ve travmatik olmayan gazlı gangrenin etken maddesidir. Ayrıca artrit ve aortit vakaları da tanımlanmıştır. Enfeksiyon öncelikle şiddetli hematolojik maligniteleri ve kolorektal kanseri olan yetişkinlerde ve şiddetli nötropeni olan çocuklarda görülmektedir. Bu bakteri tarafından üretilen majör virülans faktörü ise bir alfa toksindir (Benamar ve ark., 2016). NS/NY grubu yedirilen sıçanlarda *Clostridium* türleri nispi bollukları sağlıklı mikrobiyotada bulunabilecek aralıkta olduğundan bağırsak mikrobiyotasına olumsuz etkisi olmadığı sonucuna varılmıştır.

Flintibacter sp. KGM B00164 ve *Ruminococcus torques* türleri için nispi bolluğunda kontrol grubunda NS yedirilen sıçan grubuna göre %0,1'lik artış gözlenmiştir. *Ruminococcus torques* türü çeşitli musin ve musin glikan yapılarını doğrudan parçalayabilme ve diğer türler için salınan glikanları serbest bırakma yeteneğine sahiptir. Bu durum, onun inflamatuvar bağırsak hastalıklarına neden olabilecek temel bir musin parçalayıcısı olduğunu düşündürmektedir (Schaus ve ark., 2024). *Ruthenibacterium lactatiformans* türünde NS grubuna göre NS/NY grubunda %0,05'lik artış mevcuttur. Bu bakterinin hayvan deneylerinde yüksek yağlı diyetle indüklenen obeziteyi, glikoz intoleransını, dislipidemi ve bağırsak bariyeri işlev bozukluğunu hafiflettiği bulunmuştur. Bu etkiler, dislipideminin iyileştirilmesi ve orucun yağ metabolizması üzerindeki yararlarının aracılık edilmesi için bir probiyotik aday olarak potansiyelini düşündürmektedir (Wu ve ark., 2024). *Lactobacillus* türlerinde NS yedirilen sıçanlarda göreceli bolluk arttığı gözlemlenmiştir ($p < 0,05$). Metagenomik veri analiz sonuçlarına göre gruplar arasında bollukları istatistiksel olarak anlamlı fark gösteren bakteri türleri çizelge 4.6'da özetlenmiştir.

Çizelge 4.6. Metagenomik analiz verileri

Bakteri adı	Taksonomik sınıflandırma	Grup (I)	Grup (J)	Ortalama fark (I-J)	p değeri
Lactobacillus intestinalis	Tür	NS	Kontrol	3,46576*	0,024
			NS/NY	3,80136*	0,012
Clostridium perfringens		NS/NY	Kontrol	0,65470*	0,015
Clostridium septicum	Tür	NS/NY	Kontrol	0,52360*	0,003
Clostridium isatidis	Tür	NS/NY	Kontrol	0,36770*	0,006
Clostridium beijerinckii	Tür	NS/NY	Kontrol	0,10760*	0,017
Clostridium gelidum	Tür	NS/NY	Kontrol	0,03330*	0,026
Flintibacter sp KGM B00164	Tür	Kontrol	NS	0,14479*	0,026
Ruminococcus torques	Tür	Kontrol	NS	0,10152*	0,048
Ruthenibacterium lactatiformans	Tür	NS/NY	NS	0,05694*	0,043
Lactobacillus	Cins	NS	NS/NY	11,21976*	0,018
Clostridium	Cins	NS/NY	Kontrol	1,74560*	0,004
Limosilactobacillus	Cins	NS	NS/NY	0,99732*	0,012
Flintibacter	Cins	Kontrol	NS	0,14479*	0,026
Ruthenibacterium	Cins	NS/NY	NS	0,05694*	0,043
Lactobacillaceae	Aile	NS	NS/NY	13,59563*	0,023
Clostridiaceae	Aile	NS/NY	Kontrol	1,79730*	0,001
Lactobacillales	Takım	NS	NS/NY	13,80842*	0,021
Bacilli	Sınıf	NS	NS/NY	13,81619*	0,021
Clostridia	Sınıf	NS/NY	NS	8,24011*	0,012

*. Ortalama fark 0,05 düzeyinde anlamlıdır.

Dong ve ark., (2020) tarafından gerçekleştirilen çalışmada yüksek yağlı diyetle beslenen tip 2 diyabetli fare modelinde NS tohum polisakkaritlerinin (NSSP) tip 2 diyabetli fareler ve bağırsak mikrobiyotası üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Çalışmada yüksek yağlı diyetle streptozotosin (STZ) kombinasyonu ile oluşturulan tip 2 diyabetli farelerde NSSP'nin antidiyabetik tedavi ve bağırsak mikrobiyotası üzerindeki etkisini değerlendirmek ve PI3K/AKT sinyal yolunun moleküler mekanizması üzerindeki etkisini araştırmak amaçlanmıştır. Toplam 60 erkek, spesifik patojen içermeyen 20±2 g ağırlığında 4 haftalık Kunming faresi kullanılmıştır. RT-PCR ve western blot çalışmaları ile sitokinlerin ekspresyonu ve PI3K/AKT sinyal yolağı protein ifadeleri incelenmiş ve NSSP'nin antienflamatuvar etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Bağırsak mikrobiyotasının sonuçları, NSSP'nin *Firmicutes* bolluğunu azalttığını ve *Bacteroidetes* bolluğunu artırdığını göstermiştir. Sonuçlar, NSSP'nin tip 2 diyabete karşı potansiyel bir koruyucu etkiye sahip olduğunu düşündürmektedir (Dong ve ark., 2020). Mevcut araştırmada NS tohum yağı yedirilen deney hayvanlarında bağırsak mikrobiyotasına faydalı bakteri grubu olan *Lactobacillus* türlerinin göreceli bolluk miktarlarının arttığı tespit edilmiştir. Bu sonuç NS tohum yağının insan bağırsak mikrobiyotası üzerine belirgin bir prebiyotik etkisi olduğunu göstermektedir.

Bu doktora tez çalışmasında oluşturulan NS/NY vezikülleri deney hayvanlarına yedirilmiş ve bu NS/NY veziküllerinin insan bağırsak mikrobiyotasında probiyotik bakterilere olan katkısı metagenomik data analiziyle araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre NS/NY yedirilen sıçan grubunda probiyotik bakterileri olan *Lactobacillus* türleri bolluğu NS yedirilen sıçan grubuna göre daha az (%11) bulunmuştur. Bunun nedeni *Lactobacillus* suşlarının büyümesi sıcaklık, pH, oksijen konsantrasyonu veya su aktivitesi gibi çeşitli koşullardan etkilenebilmesi olabilir. *Laktobasillusların* üremesi için optimum sıcaklık ve pH koşulları sırasıyla 30–40 °C ve 5,5–6,2'dir. İnsan kalın bağırsağı pH değeri 7,4'tür. Ayrıca *Lactobacillus* bakterilerinin yetiştirildiği kültür koşulları ve fermantasyon ortamı bileşimi; özgül büyüme hızı ve bakterilerin yeni ortama adapte olup çoğalmadığı zaman gerçekleşen gecikme fazı süresi gibi büyüme kinetiği parametrelerini etkileyebilmektedir (Śliżewska ve ark., 2020).

Niyozom formülasyonundaki yüzey aktif madde ile onu çevreleyen sulu salım ortamı arasında arayüz geriliminin düşmesi sonucu yağın penetrasyonu kolaylaşabilmektedir. Bu durumda enkapsüle edilen yağ ortama daha hızlı ve birim zamanda daha yüksek dozda yayılabilmektedir (Shehata ve ark., 2021). Bu nedenle deney hayvanlarına verilen NS tohum yağı ile NS/NY veziküllerinin insan bağırsak mikrobiyotasındaki etkisini farklı kılabilir. NS tohum yağının mideden bağırsağa geçen miktarının enkapsüle edilen NS tohum yağının veziküllerden salımıyla kalın bağırsağa ulaşan miktarından daha az olması beklenmektedir. Bu durum NS/NY'nin bağırsak florasının dengesini bozmuş olabileceği ve bundan dolayı probiyotik bakteriler olan *Lactobacillus* türlerinin bolluğunun daha az bulunmuş olduğu düşünülmektedir.

NS/NY verilen sıçan grubunda bağırsak florasında probiyotik bakterilerin nispi bolluklarının azalması gut mikrobiyota dengesizliğinin (disbiyozis) bir sonucu olabilir. NS tohum yağının kapsüllendiği niyozomlardan bağırsak florasını doğrudan etkileyecek şekilde salımı bu durumun nedenlerinden biri olabilir. NS tohum yağının timokinon, p-simen, karvakrol, timol, gibi uçucu yağ bileşenlerinin bakterilerle doğrudan etkileşimi de yararlı bakteri büyümesini sınırlandırabilmektedir. Aynı şekilde NS tohum yağında sıçanlara yedirilen NS/NY konsantrasyonunun yüksek tutulması bağırsak bariyerinde daha çok yağ bileşiğinin emilimi demektir. Bu da bağırsak bariyeri geçişlerinde dengesizliğe yol açabilir. Bu nedenle konsantrasyonun uygun dozajda ayarlanması önemlidir.

4.4.3. Biyokimyasal analiz sonuçları

NS tohum yağının ve niyozomla enkapsüle edilmiş formunun fareler üzerinde herhangi bir yan etkisi olup olmadığının araştırılması amacıyla biyokimya testi yapıldı. İstatiksel analiz SPSS kullanılarak tek yönlü ANOVA ve postdoc Tukey test ile gerçekleştirilen istatistik test sonucuna göre kreatin ve ALT parametrelerinde gruplar arasında anlamlı farklı bulundu (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7. Kontrol, NS ve NS/NY gruplarının kan örneklerinden biyokimya test değerleri

	İndeksler	Gruplar			p değeri
		Kontrol	NS	NS/NY	
Biyokimya	Albümin (g/dL)	3,43	3,47	3,39	0,747
	Kreatinin (mg/dL)	0,493 ^a	0,503 ^{ab}	0,582 ^c	0
	Üre (mg/dL)	19,2	17,2	20,1	0,067
	AST (U/L)	125,9	135	125,2	0,594
	ALT (U/L)	48,8 ^{bc}	56,6 ^c	34,2 ^a	0
	Bilirubin(mg/dL)	0,1	0,1	0,1	1

a,b,c grupların anlamlı ortalama değerleri; Albümin, Kreatinin, AST (Aspartat aminotransferaz), ALT (Alanin aminotrasferaz), Billtotal (Toplam Bilirubin) (p<0,05)

Kreatinin, kas kasılması ya da hasarı sonrasında artan atık ürünüdür. Aynı zamanda kreatinin glomerüler fonksiyonun bir indeksi olarak da ölçülmektedir. Sıçanlar için serum kreatininin normal aralığı 0,2–0,8 mg/dl'dir. Sadece böbrekler yoluyla atılır. Bu nedenle, böbrekte meydana gelen hasar böbreğin hem üreyi hem de kreatinin atılımını verimsiz hale getirmekle beraber bunların kanda birikmesine neden olmaktadır. Bu nedenle, kan üre ve kreatininin yüksek seviyesi böbrek hasarını göstermektedir (Dollah ve ark., 2013).

Mevcut araştırmada NS tohum yağının sıçanlara yedirilmesiyle kreatin miktarında artış (p<0,05) gözlenmiştir. NS'nin bazı araştırmalarda böbrek sağlığı üzerinde koruyucu etkileri olduğu gösterilmiş olsada, aşırı dozda kullanımı veya belirli sağlık koşullarıyla etkileşimi, böbrek fonksiyonlarını etkileyebilir. Bu da kreatinin seviyelerinin artmasına yol açabilir. Nano niyozom enkapsülasyonda ise aktif bileşenlerin vücutta daha hızlı ve etkili bir şekilde emilim gerçekleşmiş ve NS bileşenlerinin böbrekler tarafından daha hızlı işlenmesine ve birikmesine neden olmuş olabilir. Bu durum, böbrek fonksiyonlarını zorlayarak kreatinin seviyelerinin artmasına neden olmuş olabilir. Ancak kreatinin

değerlerinin 0,2–0,8 mg/dL referans aralığında olması NS yağının ve NS/NY veziküllerinin böbreklerde toksik etki yaratmadığı sonucuna varılabilir.

Mevcut araştırmada NS/NY yedirilen sıçanların ALT değerinde azalma gözlenmiştir. NS tohum yağı verilen sıçanlarda ALT değerinde ise artış gözlenmektedir. Bu durum sıçanlara verilen NS tohum yağının dozajı ve verilme süresi ile ilgili olabilmektedir. Bununla birlikte NY enkapsüle edilen NS, yapısından dolayı hızlı salım ve antioksidan etkilerinden kaynaklı nedenlerden dolayı ALT seviyesindeki artış engellenmiş olabilir. Bütün gruplardaki ALT değerleri Wistar Albino erkek sıçanlar için 24.13-67.45 U/L referans aralığındadır (Vigneshwar ve ark., 2021). Bu durum NS yağının ve NS/NY veziküllerinin karaciğerde toksik etki yaratmadığını göstermektedir.

Bağırsak mikrobiyotasının biyokimyasal süreçlere doğrudan etkisi mevcuttur. Karaciğer için bağırsak mikrobiyotası ile bağlantısı düşünüldüğünde karaciğer ve mikrobiyota arasında çift yönlü bir iletişim vardır. Bağırsaktan gelen venöz kan, portal ven yoluyla doğrudan karaciğere ulaşmaktadır. Besin maddeleri, mikrobiyal ürünler ve metabolitler ve bağırsak toksinleri, insan vücudundaki ilk organ olan karaciğere ulaşmaktadır. Besin maddeleri ve mikrobiyal ürünler ayrıca lenf damarlarına boşaltılmakta ve torasik kanal ve sistemik dolaşım yoluyla karaciğere ulaşmaktadır (Jiang ve ark., 2020). Bağırsak mikrobiyotasındaki dengesizlik sonucu bağırsaktaki patojenik bakteri sayısında artış oluşabilmekte ve bu durumda probiyotik bakteriler baskılanabilmektedir.

Bağırsak mikrobiyotasının bileşiminde ve işlevinde meydana gelen değişiklikler, iltihaplanmaya ve metabolik anormalliklere yol açabilir ve nihayetinde çeşitli hastalıkların gelişimine katkıda bulunabilir. Sayı, tür ve bileşimdeki bu değişiklikler disbiyoz olarak ifade edilir. Bu değişiklik, konak genlerinin, diyetin, antibiyotik kullanımının, yaşam tarzının, ilaçların ve diğer birçok faktörün etkilerinden kaynaklanan bağırsak mikrobiyotasının bileşimi ve çeşitliliğinden kaynaklanabilir. Son çalışmalar, bağırsak mikrobiyotası disbiyozunun, inflamatuvar bağırsak hastalığı, kanserler ve kardiyovasküler hastalıklar gibi çeşitli hastalıklar için potansiyel bir patojen olabileceğini göstermiştir (Wang ve ark., 2022).

Clostridioides difficile bakterisi tarafından üretilen A ve B toksinleri, pro-inflamatuar sitokinleri işleyen ve programlanmış hücre ölümünü başlatan kaspaz-1 enzimini uyarabilir. Böylece, epitel bariyerine ve bağırsak hücrelerine zarar veren olgun IL-1b ve IL-18 (pro-inflamatuar sitokinler) salgılayabilirler. Bu reaksiyonun meydana

geldiği inflamatuvar bağırsak hastalığı hastalarında *C. difficile* enfeksiyonunun yüksek olduğu bulunmuştur (Santana, Patricia ve ark., 2025).

Kısa zincirli yağ asitleri, hücre döngüsünü, otofajiyi, kanserle ilişkili sinyal yollarını ve kanser hücresi metabolizmasını düzenleyerek tümör büyümesini ve kanser hücresi metastazını baskılamaktadır (Son ve ark., 2023).

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Bu doktora tez çalışmasında *Nigella sativa* tohum yağı enkapsülasyonu yapılarak yağın kalın bağırsağa daha yüksek konsantrasyonda ulaşmasını sağlamak için yavaşlatılmış salım sistemi geliştirilmiştir. NS yağının ana aktif bileşeni timokinon antibakteriyel, antioksidan, antiinflamatuvar, immünomodülatör gibi özelliklere sahiptir. Ancak sudaki çözünürlüğünün yok denecek kadar az olması, kokusunun ve tadının acı olmasive oksidasyona kolay uğrayabilen yağ olması, oral yolla alımında bağırsaktaki emilimin artırılabilmesi amaçları doğrultusunda *Nigella sativa* tohum yağının lipid bazlı ilaç taşıyıcı sistem olan niyozomlarla kapsüllenmesine karar verilmiştir. Niyozomların hazırlanması için ince film hidrasyon yöntemi kullanılmıştır. NS tohum yağının solvent karışımında çözdürülmesi ve evaporatörle çözücülerin uzaklaştırılması aşamalarından sonra ince film formu elde edilmiştir. Ancak elde edilen film proniyozom formundadır. Proniyozomun distile su ile hidrasyonu ile niyozomlar elde edilmiştir.

Nano boyutta niyozom eldesi için prob sonikasyonu ve ultrasonikasyon yöntemleri denenmiştir. Uygun niyozom çapı ve homojen parçacık dağılımı eldesi uygulanan 1 saatlik ultrasonikasyon sonucu elde edilmiştir. Üç tekrarlı olacak şekilde zeta sizer kullanılarak ortalama parçacık boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Ortalama parçacık boyutu NY için 173 nm iken NS/NY için ise 131,7 nm 'dir. PDI değerinin lipid bazlı veziküller için 0,3 ve altında bir değerde olması gerektiğini göz önünde bulundurduğumuzda bulunan NY için 0,149 iken NS/NY için 0,274 değerleri kabul edilebilir değerlerdir. Zeta potansiyeli ise NY için -45,81, NS/NY için ise -36,35 mV olarak bulunmuştur. Zeta potansiyelinin -30 mV'den daha negatif değerde elde edilmesi niyozom kararlılığının göstergesidir. STEM görüntülemeyle niyozom veziküllerinin morfolojik görüntüleri alınmış ve görüntülerin literatürle benzeştiği ve NY lerin küresel yapıda oldukları tespit edilmiştir. NYlerin DSC analizi ile termal analizi gerçekleştirilmiş ve bileşenleri arasındaki kimyasal uyumun varlığı FTIR analiziyle tespit edilmiştir. FTIR analiziyle kapsülasyonun gerçekleştiği desteklenmiştir. Ayrıca bu doktora tez çalışmasında kullanılan NS'nin kalite kontrol testleri yapılmış ve test sonucunda NS'nin sağlık açısından kullanımı uygun bulunmuştur. Yağ karakterizasyon değerleri Türk farmakopisine göre uygun aralıktadır.

NS/NY enkapsülasyon verimi %79 olarak elde edilmiştir. NS/NY 'den NS salımının gerçekleştiği salım profili pH 1,2 mide, pH 6,8 ince bağırsak ve pH 7,4 kalın

bağırsak ortamlarında oluşan salım sonuçlarına göre oluşturulmuştur. NS/NY'den 10 saat içinde NS'nin %100'ü salınmıştır. Kümülatif salım sonuçlarına göre sıfıncı, birinci, Higuchi, Hixson Crowell ve Korsmeyer-Peppas kinetik modelleri için korelasyon katsayıları hesaplanmıştır. En yüksek korelasyon katsayısına göre salım profilinin Korsmeyer-peppas salım kinetiğine göre gerçekleştiği tespit edilmiştir. n değerinin 1'den büyük elde edilmesi salımın non-fickian difüzyonuna uygunluğunu kanıtlamıştır.

Deney hayvanları çalışması ile sıçanlardan toplanan dışkının DNA izolasyonu yapılmıştır. DNA kalitesinin ölçülmesi ardından DNA'ların metagenomik analizi gerçekleştirilmiştir. Metagenomik data SPSS tek yönlü ANOVA testi ile analiz edilmiştir. Sonuçlar NS'nin bağırsak mikrobiyotasına faydalı etkisinin olduğunu göstermiştir. NS yağı bağırsak mikrobiyotasında bulunan probiyotik bakteri *Lactobacillus intestinalis* türünün nispi bolluğunda artış sağlamıştır. NS'nin, NY ile enkapsülasyonu başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Ayrıca NS'nin NY veziküllerinden tamamının salımı gerçekleştirilebilmiştir. Ancak NS/NY'nin bağırsak mikrobiyotasına beklenen düzeyde prebiyotik etkisi gözlemlenmemiş olup öte yandan patojenik mikrobiyota tespit edilmemiştir. Mevcut çalışmada biyokimya analiz sonuçlarına göre ALT ve kreatinin değerleri gruplar arasında farklı olsa da deney hayvanları çalışmasında kullanılan Wistar albino erkek sıçanlar için referans aralığında olması nedeniyle NS/NY'nin herhangi bir toksik etki oluşturmadığı tespit edilmiştir.

Mevcut çalışma, geliştirilen ilaç salım sistemi ve mikrobiyota çalışmalarıyla literatüre katkı sağlamıştır. Akhtar ve ark., (2014) NS'nin ilaç salımını, gastrointestinal (GI) geçirgenliğini ve nöroprotektif aktivitesini artırmak için niyozomları ince film hidrasyon yöntemi kullanılarak geliştirmiştir. Akhtar ve ark., (2014) yaptıkları araştırmada enkapsülasyon verimini hesaplamış ve sonucu % 86 olarak tespit etmişlerdir. Bu doktora tez çalışmasında olduğu gibi verimin değerinin yüksek olması, yüksek HLB değerli Tween 80'nin kullanımı ve onun yüksek alkil zincirine sahip olmasına bağlanmıştır. Akhtar ve ark., (2014) niyozomlardan NS salımını sadece pH 6,8 ince bağırsak ortamında incelemiştir. Ayrıca salım hemen başlamış ve 12 saat sonunda yağın yaklaşık %95'i niyozomlardan salınmıştır. Mevcut çalışmada niyozomlardan NS salımı üç farklı pH ortamında araştırılmıştır: pH 1,2 mide ortamı, pH 6,8 ince bağırsak ortamı ve pH 7,4 kalın bağırsak ortamı. 10. saat sonunda niyozomlardan NS'nin %100'ü salınmıştır.

Kumar ve ark., (2017) tarafından çörekotu tohumunun (BCS) doğal bir büyüme promotörü olarak takviyesinin tavuklarda besin kullanımı, bağırsak mikrobiyotası ve

morfolojisi, bağımsıklık, antioksidan durumu, kaslarda protein birikimi ve azot atılımı üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Etlik piliçlere 0, 5, 10 ve 20 g kg⁻¹ diyetle BCS verilmiştir. Bulgular; duodenum, jejunum ve iliumdaki bağırsak morfolojisinin genellikle BCS'den etkilenmediğini göstermiştir. Toplam bakteri, *Escherichia coli*, *Lactobacillus* ve *Clostridium* tür sayılarının, kontrole kıyasla BCS'den etkilenmediği vurgulanmıştır. Ancak, *Salmonella*'nın artan BCS dozlarıyla doğrusal olarak azaldığı belirtilmiştir (P = 0,05) (Kumar ve ark., 2017).

Fathi ve ark., (2023) NS tohumunun etlik piliçlerde büyüme performansı, kan ve biyokimyasal indeksler, et kalitesi ve kör bağırsak mikrobiyal yükü üzerine etkilerini incelemek üzere çalışmada toplam 400 adet bir günlük erkek etlik piliç (Ross 308), her biri 10 civcivden oluşan on tekrarlı dört gruba ayırmışlardır. Kontrol grubuna çörekotu tohumunu (ÇTU) içermeyen bazal bir diyet verilirken, ÇTU-20, ÇTU-40 ve ÇTU-60 gruplarına sırasıyla 42 gün boyunca ÇTU içeren diyetler (sırasıyla 20, 40 ve 60 g/kg diyet) verilmiştir. Sonuçta verilen NS tohum yağı miktarı arttıkça ALT değerinde azalma miktarında artış gözlenmiştir (p<0,01). 40 ve 60 g/kg BCSM takviyesiyle kör bağırsak koliform ve *E. coli* popülasyonunda bir azalma olduğunu göstermektedir (p<0,05). Dahası, her üç seviyedeki (20, 40 ve 60 g/kg diyet) BCSM takviyesi kör bağırsak toplam maya ve küf popülasyonunu azaltmıştır (p<0,05). BCSM'nin kör bağırsak *Lactobacillus* popülasyonu üzerinde bir etkisi olmamıştır (Fathi ve ark., 2023).

Akinrinde ve ark., (2022) tarafından NS tohum yağının kadmiyum (Cd) ile indüklenen bağırsak morfolojisi ve mikrobiyota kompozisyonunu etkileyen değişiklikleri incelenmiştir. Deneylemlerden sonra dışkı örnekleri çeşitli seçici besiyerlerinde mikrobiyal kültür için işlenirken, bağırsak segmentleri histopatolojik inceleme ve immünohistokimya için hazırlanmıştır. *In vivo* çalışma 28 erkek Wistar albino sıçan kullanılarak 7 gün boyunca gerçekleştirilmiştir. Data ANOVA testi ile analiz edilmiştir. NS tohum yağının potansiyel olarak patojenik türlerin seviyelerini azaltırken, *Lactobacilli* sayılarını önemli ölçüde artırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca Cd kaynaklı bağırsak toksisitesine karşı önemli koruyucu olduğu vurgulanmıştır (Akinrinde ve ark., 2022). Bu doktora tez çalışmasında soğuk sıkım NS tohum yağı yedirilen deney hayvanlarında literatüre benzer şekilde bağırsak mikrobiyotasına patojenik etkisi olabilen bakteri grubu olan *Clostridium* türlerinin göreceli bolluk miktarlarının azaldığı ve probiyotik bakteri olan *Lactobacillus* tür sayısının arttığı tespit edilmiştir. NS tohum yağı insan bağırsak mikrobiyotasında faydalı bakterilerin sayısını artırması ve patojenik bakterilerin sayısını azaltması ile bağırsak mikrobiyotası üzerine prebiyotik etkisini

kanıtlamaktadır. Bu da mikrobiyota bütünlüğünün korunması açısından önemlidir. Çalışmamızla Akinrinde ve ark., (2022) gerçekleştirdiği çalışma desteklenmiştir. Ancak NS/NY 'nin bağırsak mikrobiyotasında oluşturduğu değişimler ile ilgili çalışmalara literatürde rastlanılmamıştır. Doktora tez çalışması bu konuda gerçekleştirilen ilk çalışmadır.

Bu doktora tez çalışması yenilikçi bir çalışmadır. *Nigella sativa* tohumu soğuk sıkım yağ ilk defa bir nano taşıyıcı bir sistem olan nano-niyozom içerisine enkapsüle edilmiştir. Yenilikçi NS/NY'ler küresel yapıda olup zeta potansiyeli ve polidispersite indeksi bakımından değerlendirildiğinde biyolojik sistemlere uygulanabilir düzeydedir. Tez çalışmasında geliştirilen NS/NY sisteminden NS'nin salımı 10 saat içerisinde 100%'e ulaşabilmiştir. Bu açıdan değerlendirildiğinde, NS salımı için modifiye edilmiş ve oksidasyonu engelleme potansiyeli mevcut bir salım sistemi geliştirilmiştir. NS ve NS/NY'lerin bağırsak mikrobiyotası üzerinde etkisi ilk defa değerlendirilmiştir.

5.2. Öneriler

Bu doktora tez çalışmasında ince film hidrasyon metodu ile nano niyozomlar oluşturulmuş ve oluşturulan bu niyozomlar içine NS tohum yağı enkapsüle edilmiştir. Niyozomların geliştirilmesinde farklı parametreler denenerek enkapsülasyon veriminin daha yüksek olacağı yöntem seçilebilir.

Bu doktora tez çalışmasında in vivo çalışma öncesi deney hayvanlarına verilen NS ve NS/NY dozlarının antibakteriyel etkisi in vitro çalışma ortamında ölçülebilir. In vitro ortamında hücre hattı kullanılarak biyoyumlu konsantrasyon belirlenebilir. Böylece deney hayvanlarına verilecek dozun etkisi önceden tahmin edilebilir.

Kullanılan niyozom kolesterol, Tween 80, ve fosfotidilkolinden oluşturulmuştur. Niyozom oluşturulmadan önce kullanılacak non-iyonik yüzey aktif madde seçimi için farklı span ve Tween'ler kullanılarak çeşitli denemeler yapılabilir. Kullanılan NS tohum yağının kullanım konsantrasyonu belirlenmeden önce farklı dozlarla in-vitro ön denemeler yapılabilir.

pH'a bağlı ilaç salım sistemi olarak niyozomlar incelenebilir. Böylece salımın tamamının sadece bağırsak ortamında gerçekleştirilmesi sağlanabilir. Bu durum mide içerisinde salınmasını istemediğimiz tüm ilaç türleri için ideal bir iletim sistemi kurulmuş olur.

NS tohum yağı içeriğindeki timokinon varlığı sayesinde tıbbi özelliği bakımından önemli bir fonksiyonel gıdadır. Yine fonksiyonel gıdalar olan probiyotiklerle kombine

edilerek ilaç salım sistemleri oluşturulabilir. Böylece bağırsak mikrobiyotasında NS tohum yağının sinerjik etkisi artırılabilir. Ayrıca omega-3 yağı ile birleştirilerek oluşturulacak ilaç salım sistemi çörekotu yağının antienflamatuvar etkisini artırabilir.

NS tohum yağı içeren NY salım sistemlerinin NS'nin biyoyararlanımını artırıp artırmadığı farmakolojik çalışma yapılarak incelenebilir. Bu amaçla deney hayvanlarına NS/NY yedirilerek belirli aralıklarla kan örnekleri alınır. Kan örnekleri HPLC'ye verilir ve timokinon okunur. Böylece niyozomlarla enkapsülasyonun biyoyararlanıma etkisi araştırılmış olur.

Bu tez kapsamında geliştirilen salım sistemi, literatürde yer alan çalışmalara kıyasla benzer düzeyde yüksek enkapsülasyon verimi göstermesi ve yavaş salım profili sergilemesi nedeniyle, farklı hidrofobik etken maddelerin enkapsülasyonu amacıyla potansiyel bir nano-taşıyıcı sistem olarak değerlendirilebilir.

6. KAYNAKLAR

- Adepu, S., & Ramakrishna, S., 2021, Controlled Drug Delivery Systems: Current Status and Future Directions. *Molecules*, 26(19), 5905. <https://doi.org/10.3390/molecules26195905>
- Ahmad, A., Husain, A., Mujeeb, M., Khan, S. A., Najmi, A. K., Siddique, N. A., Damanhour, Z. A., & Anwar, F., 2013, A review on therapeutic potential of *Nigella sativa*: A miracle herb. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 3(5), 337–352. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60075-1](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60075-1)
- Akhtar, M., Imam, S. S., Afroz Ahmad, M., Najmi, A. K., Mujeeb, M., & Aqil, M., 2014, Neuroprotective study of *Nigella sativa*-loaded oral provesicular lipid formulation: in vitro and ex vivo study. *Drug delivery*, 21(6), 487–494. <https://doi.org/10.3109/10717544.2014.886640>
- Akinrinde, A. S., Adekanmbi, A. O., & Olojo, F. O., 2022, *Nigella sativa* oil protects against cadmium-induced intestinal toxicity via promotion of anti-inflammatory mechanisms, mucin expression and microbiota integrity. *Avicenna journal of phytomedicine*, 12(3), 241–256. <https://doi.org/10.22038/AJP.2021.18774>
- Alnezary, F. S., Almutairi, M. S., Alhifany, A. A., & Almangour, T. A., 2023, Assessing *Galleria mellonella* as a preliminary model for systemic *Staphylococcus aureus* infection: Evaluating the efficacy and impact of vancomycin and *Nigella sativa* oil on gut microbiota. *Saudi pharmaceutical journal: SPJ: the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society*, 31(12), 101824. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2023.101824>
- Aplakidou, E., Vergoulidis, N., Chasapi, M., Venetsianou, N. K., Kokoli, M., Panagiotopoulou, E., Iliopoulos, I., Karatzas, E., Pafilis, E., Georgakopoulos-Soares, I., Kyrpides, N. C., Pavlopoulos, G. A., & Baltoumas, F. A., 2024, Visualizing metagenomic and metatranscriptomic data: A comprehensive review. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 23, 2011–2033. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2024.04.060>
- Ara I, Maqbool M, Fekadu G, Hajam TA, Dar MA., 2020, Pharmaceutical Significance of *Nigella Sativa* L., a Wonder Herb. *Journal of Applied Pharmaceutical Sciences and Research*, 3(4):4-13
- Bander, Z., Nitert, M., D., Mousa, A., Naderpoor, N., 2020, The Gut Microbiota and Inflammation: An Overview, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 17, 7618; doi:10.3390/ijerph17207618
- Batool, R., Ayub, S., Akbar, 2017, I., Isolation of biosurfactant producing bacteria from petroleum contaminated sites and their characterization, *Soil and Environment* 36(01):35-44, DOI:10.25252/SE/17/20992
- Bhardwaj, P., Tripathi, P., Gupta, R., Pandey, S., 2020, Niosomes: A review on niosomal research in the last decade, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, Volume 56, Part A, 101581, <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101581>

- Benamar, S., Cassir, N., Caputo, A., Cadoret, F., & La Scola, B., 2016, Complete Genome Sequence of *Clostridium septicum* Strain CSUR P1044, Isolated from the Human Gut Microbiota. *Genome announcements*, 4(5), e00922-16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00922-16>
- Bonnet, U., 2024, Therapeutic Window: Balancing Efficacy and Safety in Drug Dosing. *Farmacologia Toxicologia*, Vol.14 No.6: 059
- Bulca, S., 2014, Çörek Otunun Bileşenleri Ve Bu Yağın Ve Diğer Bazı Uçucu Yağların Antioksidan Olarak Gıda Teknolojisinde Kullanımı. *Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 11(2), 29-36.
- Bruschi, M.L., 2015, Mathematical models of Drug release, in: Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems. *Woodhead Publishing*, pp. 63–86. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100092-2.00005-9>.
- Chandrasekaran, P., Weiskirchen, S., & Weiskirchen, R., 2024, Effects of Probiotics on Gut Microbiota: An Overview. *International journal of molecular sciences*, 25(11), 6022. <https://doi.org/10.3390/ijms25116022>
- Chen, Q., Yang, Z., Liu, H., Man, J., Oladejo, A. O., Ibrahim, S., Wang, S., & Hao, B., 2024, Novel Drug Delivery Systems: An Important Direction for Drug Innovation Research and Development. *Pharmaceutics*, 16(5), 674. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16050674>
- Chen, Y., Liu, H., An, T., Wu, Q., Zhang, H., Loo, J., J., Cheng, J., Wang, J., Sun, J., 2023, *Lactobacillus intestinalis/Lactobacillus rhamnosus* protects against AFB1-induced liver damage: involvement of intestinal mucosal barrier, *One Health Advances* 1:24 <https://doi.org/10.1186/s44280-023-00023-x>
- Chow J., 2002, Probiotics and prebiotics: A brief overview. *Journal of renal nutrition : the official journal of the Council on Renal Nutrition of the National Kidney Foundation*, 12(2), 76–86. <https://doi.org/10.1053/jren.2002.31759>
- Cremon, C., Barbaro, M. R., Ventura, M., & Barbara, G., 2018, Pre- and probiotic overview. *Current opinion in pharmacology*, 43, 87–92. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2018.08.010>
- Çakmakçı, S., & Tahmas-kahyaoğlu, D., 2012, Yağ Asitlerinin Sağlık ve Beslenme Üzerine Etkilerine Genel Bir Bakış. *Akademik Gıda*, 10(1), 103-113.
- Dabeer, S., Rather, M. A., Rasool, S., Rehman, M. U., Alshahrani, S., Jahan, S., Rashid, H., Halawi, M., & Khan, A., 2022, History and traditional uses of black seeds (*Nigella sativa*). İçinde A. Khan & M. Rehman (Ed.), *Black Seeds (Nigella Sativa)* (ss. 1-28). *Elsevier*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824462-3.00016-0>
- Dalli, M., Bekkouch, O., Azizi, S., Azghar, A., Gseyra, N., & Kim, B., 2021, *Nigella sativa* L. Phytochemistry and Pharmacological Activities: A Review (2019–2021). *Biomolecules*, 12(1), 20. <https://doi.org/10.3390/biom12010020>

- Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., Khorasani, S., & Mozafari, M. R., 2018, Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics*, 10(2), 57. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>
- Dash, S., Murthy, P. N., Nath, L., & Chowdhury, P., 2010, Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta poloniae pharmaceutica*, 67(3), 217–223.
- Dave, D., Mulla, T., 2023, Niosomes: A Comprehensive Review Of Structure, Preparation And Application. *European Journal of Biomedical AND Pharmaceutical Sciences*, 12(11), 1499-1537. <https://doi.org/10.5281/zenodo.10435677>
- Demirbolat, I., 2019, Turkish Pharmacopoeia Black Cumin Seed Oil Monograph, *Turkish Pharmacopoeia National Monographs Chapter: 2019*, 4(1)
- De Jesus, R. A., Oliveira, Í. M., Nascimento, V. R. S., Ferreira, L. F. R., & Figueiredo, R. T., 2022, Porous nanostructured metal oxides as potential scaffolds for drug delivery. *Novel Platforms for Drug Delivery Applications*, 437-457. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91376-8.00018-5>
- Dikme, T., G., 2023, Use of medicinal and aromatic plants in food. *Eu Clin Anal Med*; 11(1):6-10
- Dollah, M. A., Parhizkar, S., & Izwan, M., 2013, Effect of *Nigella sativa* on the kidney function in rats. *Avicenna journal of phytomedicine*, 3(2), 152–158.
- Dong, J., Liang, Q., Niu, Y., Jiang, S., Zhou, L., Wang, J., Ma, C., & Kang, W., 2020, Effects of *Nigella sativa* seed polysaccharides on type 2 diabetic mice and gut microbiota. *International Journal of Biological Macromolecules*, 159, 725-738. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.05.042>
- Farmoudeh, A., Akbari, J., Saeedi, M., Ghasemi, M., Asemi, N., & Nokhodchi, A., 2020, Methylene blue-loaded niosome: preparation, physicochemical characterization, and in vivo wound healing assessment. *Drug delivery and translational research*, 10(5), 1428–1441. <https://doi.org/10.1007/s13346-020-00715-6>
- Fathi, M., Hosayni, M., Alizadeh, S., Zandi, R., Rahmati, S., & Rezaee, V., 2023, Effects of black cumin (*Nigella sativa*) seed meal on growth performance, blood and biochemical indices, meat quality and cecal microbial load in broiler chickens. *Livestock Science*, 274, 105272. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2023.105272>
- Fu, X., Jiang, L., Weibo, K., Lei, J., 2015, Novel solid-solid phase change materials with biodegradable trihydroxy surfactant for thermal energy storage, *RSC Adv.*, 5, 68881, DOI: 10.1039/c5ra11842e

- Ghumman, S., A., Ijaz, A., Noreen, S., Aslam, A., Kausar, R., Irfan, A., Latif, S., Shazly, G. A., Shah, P., A., Rana, M., Aslam, A., Altaf, M., Kotwica-Mojzzych, K., & Bin Jordan, Y., A., 2023, Formulation and Characterization of Curcumin Niosomes: Antioxidant and Cytotoxicity Studies. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 16(10), 1406. <https://doi.org/10.3390/ph16101406>
- Göktaş, Ö., & Gıdık, B., 2019, Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Kullanım Alanları. *Bayburt Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 2(1), 145-151.
- Guo, P., Zhang, K., Ma, X. et al., 2020, Clostridium species as probiotics: potentials and challenges. *J Animal Sci Biotechnol* 11, 24. <https://doi.org/10.1186/s40104-019-0402-1>
- Honary, S., Zahir, F., 2013, Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems- A Review (Part 1) *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* April 2013; 12 (2): 255-264, <http://dx.doi.org/10.4314/tjpr.v12i2.19>
- Hou, K., Wu, Z., X., Chen, X., Y., Wang, J., Q., Zhang, D., Xiao, C., Zhu, D., Koya, J., B., Wei, L., Li, J., & Chen, Z., S., 2022, Microbiota in health and diseases. *Signal transduction and targeted therapy*, 7(1), 135. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00974-4>
- Inoue, M., Hayashi, S., E. Craker, L., 2019, Role of Medicinal and Aromatic Plants: Past, Present, and Future. *IntechOpen*. doi: 10.5772/intechopen.82497
- Isaev, N., K., Genrikhs, E., E., Stelmashook, E., V., 2023, Antioxidant Thymoquinone and Its Potential in the Treatment of Neurological Diseases. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 12(2), 433. <https://doi.org/10.3>
- İlhan, N., 2018, Gut microbiota and metabolism. *Int J Med Biochem*, 1(3), 115-128. <https://doi.org/10.14744/ijmb.2018.92400>.
- Jasemi, S. V., Khazaei, H., Momtaz, S., Farzaei, M. H., & Echeverría, J., 2022, Natural products in the treatment of pulmonary emphysema: Therapeutic effects and mechanisms of action. *Phytomedicine*, 99, 153988. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2022.153988>
- Jiang, J., Li, K., Xiao, Y., Zhong, A., Tang, J., Duan, Y., & Li, Z., 2023, *Limosilactobacillus reuteri* Regulating Intestinal Function: A Review. *Fermentation*, 9(1), 19. <https://doi.org/10.3390/fermentation9010019>
- Jiang L., Schnabl B., 2020, Gut Microbiota in Liver Disease: What Do We Know and What Do We Not Know? *Physiology (Bethesda)*, 1;35(4):261-274. doi: 10.1152/physiol.00005.2020. PMID: 32490750; PMCID: PMC7474259.
- Kaur, G., Grewal, J., Jyoti, K., Jain, U. K., Chandra, R., & Madan, J., 2017, Oral controlled and sustained drug delivery systems: Concepts, advances, preclinical, and clinical status. *Drug Targeting and Stimuli Sensitive Drug Delivery Systems*, 567-626. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813689-8.00015-X>

- Ketenoglu, O., Kiralan, S., S., Kiralan, M., Ozkan, G., Ramadan, M., F., 2020, Cold pressed black cumin (*Nigella sativa L.*) seed oil.
- Khalbas, A., H., 2024, Albayati, T., M., Ali, N., S., Salih, I., K., Drug Loading Methods and Kinetic Release Models Using of Mesoporous Silica Nanoparticles as a Drug Delivery System: A Review, *South African Journal of Chemical Engineering*, doi: <https://doi.org/10.1016/j.sajce.2024.08.013>
- Khan, M., I., Madni, A., Hirvonen, J., Peltonen, L., 2016, Ultrasonic Processing Technique as a Green Preparation Approach for Diacerein-Loaded Niosomes, *AAPS PharmSciTech*, 18(5):1554-1563. doi: 10.1208/s12249-016-0622-z. Epub 2016 Sep 7.
- Kien, C. L., Bunn, J. Y., & Ugrasbul, F., 2005, Increasing dietary palmitic acid decreases fat oxidation and daily energy expenditure. *The American journal of clinical nutrition*, 82(2), 320–326. <https://doi.org/10.1093/ajcn.82.2.320>
- Krithika, R., Ravilla, L., Perumal, S., Padmini, R., 2023, Formulation and characterization of Naringin- niosomes for sustained drug delivery and wound healing properties, *Journal of Advanced Zoology*, Volume 44 Issue-3, Page 1579:1598
- Kuk, S., Uyar, Y., Karaca, S., & Yazar, S., 2016, Microbiota: In Health and in Sickness, From Birth to Death. *Turkiye parazitoloji dergisi*, 40(2), 97–106. <https://doi.org/10.5152/tpd.2016.4789>
- Kumar, P., Patra, A. K., Mandal, G. P., Samanta, I., & Pradhan, S., 2017, Effect of black cumin seeds on growth performance, nutrient utilization, immunity, gut health and nitrogen excretion in broiler chickens. *Journal of the science of food and agriculture*, 97(11), 3742–3751. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8237>
- Kuo, J., Uzunovic, J., Jacobson, A., Dourado, M., Gierke, S., Rajendram, M., Keilberg, D., 2024, "Toxigenic Clostridium Perfringens Isolated from At-Risk Paediatric Inflammatory Bowel Disease Patients." *Journal of Crohn's and Colitis* 18, no. 7: 985-1001. Accessed May 21, 2025. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjae016>.
- Laracuate, M., L., Yu, M., H., McHugh, K., J., 2020, Zero-order drug delivery: state of the art and future prospects. *J. Controlled Release* 327, 834–856. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.09.020>.
- Liga, S., Paul, C., Moacă, E. A., & Péter, F., 2024, Niosomes: Composition, Formulation Techniques, and Recent Progress as Delivery Systems in Cancer Therapy. *Pharmaceutics*, 16(2), 223. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16020223>
- Lladó Fernández, S., Větrovský, T., Baldrian, P., 2019, The concept of operational taxonomic units revisited: genomes of bacteria that are regarded as closely related are often highly dissimilar. *Folia microbiologica*, 64(1), 19–23. <https://doi.org/10.1007/s12223-018-0627-y>

- Mazaheri, Y., Torbati, M., Azadmard-Damirchi, S., Savage, G., P., 2019, A comprehensive review of the physicochemical, quality and nutritional properties of *Nigella sativa* oil. *Food Reviews International*, 35(4), 342-362. <https://doi.org/10.1080/87559129.2018.1563793>
- Mahmoud, H., S., Almallah, A., A., 2021, Gad EL-Hak, H.N. et al. The effect of dietary supplementation with *Nigella sativa* (black seeds) mediates immunological function in male Wistar rats. *Sci Rep* 11, 7542. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86721-1>
- Mawazi, S., M., Widodo, R., T., 2024, Unravelling the Absence of Testosterone Peak in Niosomes Using DSC; Insights from FTIR and HRTEM Investigations. *BioNanoSci.* 14, 5094–5105. <https://doi.org/10.1007/s12668-024-01591-x>
- Mohamed Rizwan I., Damodharan N., 2020, Mathematical Modelling of Dissolution Kinetics in Dosage forms. *Research J. Pharm. and Tech*, 13(3):1339-1345. doi: 10.5958/0974-360X.2020.00247.4
- Mokhtariniya, S., & Kazemi, M., 2015, Essential Oil Constituents of *Nigella sativa* from Iran.
- Mohammed, S., J., H., Amin, H., H., Aziz, S., B., Sha, A., M., Hassan, S., Abdul Aziz, J., M., Rahman, H., S., 2019, Structural Characterization, Antimicrobial Activity, and In Vitro Cytotoxicity Effect of Black Seed Oil. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2019(1), 6515671. <https://doi.org/10.1155/2019/6515671>
- Nazeer, A., George, N., 2017, Formulation and Evaluation of Colon Targeted pH Dependent Microcapsules of Thymoquinone for Colorectal Cancer, *Saudi J. Med. Pharm. Sci.*; Vol-3, Iss-11A:1168-1179
- Nowroozi, F., Almasi, A., Javidi, J., Haeri, A., Dadashzadeh, S., 2018, Effect of Surfactant Type, Cholesterol Content and Various Downsizing Methods on the Particle Size of Niosomes. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, 17(Suppl2), 1–11.
- Oniszczyk A., Oniszczyk T., 2021, Gancarz M, Szymbańska J. Role of Gut Microbiota, Probiotics and Prebiotics in the Cardiovascular Diseases. *Molecules*. 22;26(4):1172. doi: 10.3390/molecules26041172
- Okore, V., C., Attama, A., A., Ofokansi, K., C., 2011, Esimone, C., O., Onuigbo, E., B., Formulation and Evaluation of Niosomes, *Indian J Pharm Sci*, 73 (3): 323-328, DOI: 10.4103/0250-474X.93515
- Özçelik E., Erdal M., S., Ozsoy Y., 2022, Kontrollü ilaç salımında son teknolojiler. *Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi*, Advance online publication. <https://doi.org/10.26650/JARHS2022-1122852>

- Paarakh, M., P., Jose, P., A., Setty, C., M., & Christoper, G., V., 2019, Release Kinetics – Concepts And Applications. *International Journal of Pharmacy Research & Technology*.
- Palamutoğlu, R., Kasnak, C., & Özen, B., 2022, Encapsulation of black cumin seed (*Nigella sativa*) oil by using inverse gelation method. *Food Hydrocolloids for Health*, 2, 100089. <https://doi.org/10.1016/j.fhfh.2022.100089>
- Pagola, S., Benavente, A., Raschi, A., 2004, Crystal structure determination of thymoquinone by high-resolution X-ray powder diffraction. *AAPS PharmSciTech* 5, 28. <https://doi.org/10.1208/pt050228>
- Pakdemirli, B., Birişik, N., Akay, M., 2021, General Overview of Medicinal and Aromatic Plants in Turkey. *Anadolu Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 31(1), 126-135. <https://doi.org/10.18615/anadolu.950165>
- Peng M, Tabashsum Z, Anderson M, 2020, Effectiveness of probiotics, prebiotics, and prebiotic-like components in common functional foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2020;1–26. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12565>
- Pop, R., M., Sabin, O., Suci, Ş., Vesa, S., C., Socaci, S., A., Chedea, V., S., Bocsan, I., C., Buzoianu, A., D., 2020, *Nigella Sativa*'s Anti-Inflammatory and Antioxidative Effects in Experimental Inflammation. *Antioxidants*, 9(10), 921. <https://doi.org/10.3390/antiox9100921>
- Portaccio, M., Faramarzi, B., & Lepore, M., 2023, Probing Biochemical Differences in Lipid Components of Human Cells by Means of ATR-FTIR Spectroscopy. *Biophysica*, 3(3), 524-538. <https://doi.org/10.3390/biophysica3030035>
- Ragheb, R., Nobbmann, U., 2020, Multiple scattering effects on intercept, size, polydispersity index, and intensity for parallel (VV) and perpendicular (VH) polarization detection in photon correlation spectroscopy. *Scientific Reports*, 10(1), 21768. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78872-4>
- Rani, R., Dahiya, S., Dhingra, D., Dilbaghi, N., Kim, K., & Kumar, S., 2018, Improvement of antihyperglycemic activity of nano-thymoquinone in rat model of type-2 diabetes. *Chemico-Biological Interactions*, 295, 119-132. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.02.006>
- Rashwan, H., K, Mahgoub, S, Abuelezz, N., Z., Amin, H., K., 2023, Black Cumin Seed (*Nigella sativa*) in Inflammatory Disorders: Therapeutic Potential and Promising Molecular Mechanisms. *Drugs and Drug Candidates*. 2(2):516-537. <https://doi.org/10.3390/ddc2020027>

- Rasul, A., Imran Khan, M., Ur Rehman, M., Abbas, G., Aslam, N., Ahmad, S., Abbas, K., Akhtar Shah, P., Iqbal, M., Ahmed Al Subari, A. M., Shaheer, T., & Shah, S., 2020, In vitro Characterization and Release Studies of Combined Nonionic Surfactant-Based Vesicles for the Prolonged Delivery of an Immunosuppressant Model Drug. *International journal of nanomedicine*, 15, 7937–7949. <https://doi.org/10.2147/IJN.S268846>
- Rathee, J., Kanwar, R., Kaushik, D., Salunke, D., B., Mehta, S., K., 2020, Niosomes as efficient drug delivery modules for encapsulation of Toll-like receptor 7 agonists and IDO-inhibitor. *Applied Surface Science*, 505, 144078. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2019.144078>
- Ravalika, V., Sailaja, A., K., 2017, Formulation and Evaluation of Etoricoxib Niosomes by Thin Film Hydration Technique and Ether Injection Method. *Nano Biomedicine and Engineering*, 9.
- Santana, Patricia T., Siane L. Bittencourt Rosas, Beatriz E. Ribeiro, and Ygor Marinho. "Dysbiosis in Inflammatory Bowel Disease: Pathogenic Role and Potential Therapeutic Targets." *International Journal of Molecular Sciences* 23, no. 7 (2022): 3464. Accessed May 13, 2025. <https://doi.org/10.3390/ijms23073464>.
- Seleci, D. A., Seleci, M., Walter, G., Stahl, F., & Scheper, T., 2015, Niosomes as Nanoparticulate Drug Carriers: Fundamentals and Recent Applications. *Journal of Nanomaterials*, 7372306. <https://doi.org/10.1155/2016/7372306>
- Schaus, S., R., Vasconcelos Periera, G., Luis, A., S., Madlambayan, E., Terrapon, N., Ostrowski, M., P., Jin, C., Hansson, G., C., Martens, E., C., 2024, Ruminococcus torques is a keystone degrader of intestinal mucin glycoprotein, releasing oligosaccharides used by Bacteroides thetaiotaomicron. *bioRxiv: the preprint server for biology*, 2024.01.15.575725. <https://doi.org/10.1101/2024.01.15.575725>
- Shehata, T., M., Almostafa, M., M., Elsewedy, H., S., 2021, Development and Optimization of *Nigella sativa* Nanoemulsion Loaded with Pioglitazone for Hypoglycemic effect. *Polymers*, 14(15), 3021, <https://doi.org/10.3390/polym14153021>
- Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W., S., Huttenhower, C., 2011, Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome biology*, 12(6), R60. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-6-r60>
- Shaw, A., G., Cornwell, E., Sim, K., 2020, Dynamics of toxigenic *Clostridium perfringens* colonisation in a cohort of prematurely born neonatal infants. *BMC Pediatr* 20, 75, <https://doi.org/10.1186/s12887-020-1976-7>
- Shahiwala A., Misra A., 2002, Studies in topical application of niosomally entrapped nimesulide, *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 5, no. 3, 220–225, 2-s2.0-0036769479.

- Singh, S., Kumar Upadhyay, P., Shukla, R., 2023, Niosomes: An Advancement In Novel Drug Delivery System, *World Journal Of Pharmaceutical Research*, Volume 12, Issue 6, 323-338. Review Article Issn 2277– 7105 Doi: 10.20959/Wjpr20236-27799
- Singh, D., Upadhyay, P., 2021, Niosomal Encapsulation of Curcumin: Formulation and Characterization, *Journal of Pharmaceutical Research International*, 33(43B): 300-314, 2021;Article no.JPRI.73071
- Śliżewska, K., Chlebicz-Wójcik, A., 2020, Growth Kinetics of Probiotic Lactobacillus Strains in the Alternative, Cost-Efficient Semi-Solid Fermentation Medium. *Biology*, 9(12), 423. <https://doi.org/10.3390/biology9120423>
- Snelson, M., de Pasquale, C., Ekinci, E., I., Coughlan, M., T., 2021, Gut microbiome, prebiotics, intestinal permeability and diabetes complications, *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 35 (2021) 101507, <https://doi.org/10.1016/j.beem.2021.101507>
- Solanki, D., Motiwale, M., 2020, Studies on Drug Release Kinetics and Mechanism from Sustained Release Matrix Tablets of Isoniazid using Natural Polymer Obtained from Dioscorea Alata, *International Journal of ChemTech Research*, 2020,13(3): 166-173. DOI= <http://dx.doi.org/10.20902/IJCTR.2019.130313>
- Son, Young, and Soo Cho. "Anticancer Effects of Gut Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids in Cancers." *Journal of Microbiology and Biotechnology* 33, no. 7 (2023): 849. Accessed May 15, 2025. <https://doi.org/10.4014/jmb.2301.01031>
- Sredkova, P., Batsalova, T., Moten, D., Dzhambazov, B., 2020, Prebiotics can change immunomodulatory properties of probiotics, *Cent Eur J Immunol* 2020; 45 (3): 248-255, DOI: <https://doi.org/10.5114/ceji.2020.101237>
- Suksuwan, A., Arour, Z., Santiworakun, N., Dahlan, W., 2021, Preparation and characterization of Black Seed Oil Loaded Solid Lipid Nanoparticles for Topical Formulations: A preliminary Study, *Aip Conference proceedings* 2353, 020003 (2021), <https://doi.org/10.1063/5.0052706>
- Sun, Y., Wang, Q., Jiang, Y., He, J., Jia, D., Luo, M., Shen, W., Wang, Q., Qi, Y., Lin, Y., Zhang, Y., Wang, L., Wang, L., Chen, S., & Fan, L., 2025, Lactobacillus intestinalis facilitates tumor-derived CCL5 to recruit dendritic cell and suppress colorectal tumorigenesis. *Gut microbes*, 17(1), 2449111. <https://doi.org/10.1080/19490976.2024.2449111>
- Sundar, S., K., Parikh, J., K., 2023, Advances and trends in encapsulation of essential oils, *International Journal of Pharmaceutics*, 635, 122668. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.122668>
- Süren, L., 2012, Essin İçeren Niyozom Kullanılarak Cilt Bakım Ürünlerinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi Mersin Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mersin

- Tabassum, S., Rosli, N., Ichwan, S.J., Mishra, P., 2021, Thymoquinone and its pharmacological perspective: a review. *Pharmacological Research- Modern Chinese Medicine*.
- Thabet, Y., Elsabahy, M., Eissa, N., G., 2022, Methods for preparation of niosomes: A focus on thin-film hydration method, *Methods Volume 199*, Pages 9-15, <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2021.05.004>
- Tiwari, G., Tiwari, R., Sriwastawa, B., Bhati, L., Pandey, S., Pandey, P., Bannerjee, S., K., 2012, Drug delivery systems: An updated review. *International journal of pharmaceutical investigation*, 2(1), 2–11. <https://doi.org/10.4103/2230-973X.96920>
- Tüylek, Z., 2017, İlaç Taşıyıcı Sistemler ve Nanoteknolojik Etkileşim. *Bozok Tıp Dergisi*, 7(3), 89-98.
- Uchegbu I. F. and Florence A. T., Non-ionic surfactant vesicles (niosomes): physical and pharmaceutical chemistry, *Advances in Colloid and Interface Science*. (1995) 58, no. 1, 1–55, [https://doi.org/10.1016/0001-8686\(95\)00242-i](https://doi.org/10.1016/0001-8686(95)00242-i), 2-s2.0-58149325630.
- Ugorji, O., L., Umeh, O., N., C., Agubata, C., O., Adah, D., Obitte, N., C., Chukwu, A., 2022, The effect of niosome preparation methods in encapsulating 5-fluorouracil and real time cell assay against HCT-116 colon cancer cell line. *Heliyon*, 8(12), e12369. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e12369>
- Üresin, Y., Baran, E., 2011, Tedavide Hızlı Salımlı ve Uzatılmış Salımlı Formülasyonların Farkları. *Klinik Psikofarmakoloji Bülteni-Bulletin of Clinical Psychopharmacology*, 21(sup1), S26–S32. <https://doi.org/10.1080/10177833.2011.11790746>
- Üstün, Z., 2015, Soğuk Pres Çörek Otu Tohumu Yağının Fizikokimyasal Özelliklerinin Korunması ve Katma Değerli Ürün Tasarımı, Doktora tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Vigneshwar, R., Arivalagan, A., Mekala, P., Imayarasi, K., 2021, Sex-specific reference intervals for Wistar albino rats: hematology and clinical biochemistry, *Indian Journal of Animal Health* 60(1):58-65, DOI: 10.36062/ijah.60.1.2021.58-65
- Wahab, S., Alsayari, A., 2023, Potential Pharmacological Applications of *Nigella* Seeds with a Focus on *Nigella sativa* and Its Constituents against Chronic Inflammatory Diseases: Progress and Future Opportunities. *Plants (Basel, Switzerland)*, 12(22), 3829. <https://doi.org/10.3390/plants12223829>
- Wang, L., Wang, S., Zhang, Q. et al., 2022, The role of the gut microbiota in health and cardiovascular diseases. *Mol Biomed* 3, 30, <https://doi.org/10.1186/s43556-022-00091-2>
- Wang, L., Du, J., Zhou, Y., ve Wang, Y., 2017, Safety of nanosuspensions in drug delivery. *Nanomedicine*, 13(2), 455-469.

- White C., M., 2022, Continued Risk of Dietary Supplements Adulterated With Approved and Unapproved Drugs: Assessment of the US Food and Drug Administration's Tainted Supplements Database 2007 Through 2021. *Journal of clinical pharmacology*, 62(8), 928–934. <https://doi.org/10.1002/jcph.2046>
- Witika, B., A., Bassey, K., E., Demana, P., H., Siwe-Noundou, X., Poka, M., S., 2022, Current Advances in Specialised Niosomal Drug Delivery: Manufacture, Characterization and Drug Delivery Applications. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022; 23(17):9668. <https://doi.org/10.3390/ijms23179668>
- Wu, F., Guo, Y., Wang, Y., Sui, X., Wang, H., Zhang, H., Xin, B., Yang, C., Zhang, C., Jiang, S., Qu, L., Feng, Q., Dai, Z., Shi, C., & Li, Y., 2024, Effects of Long-Term Fasting on Gut Microbiota, Serum Metabolome, and Their Association in Male Adults. *Nutrients*, 17(1), 35. <https://doi.org/10.3390/nu17010035>
- You, S., Ma, Y., Yan, B., Pei, W., Wu, Q., Ding, C., Huang, C., 2022, The promotion mechanism of prebiotics for probiotics: A review, *Frontiers in Nutrition*, 9, 1000517. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1000517>
- Yüksekal, G., 2019, Bağırsak Mikrobiyomunun Metagenomik DNA Profili, Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi, Eğitim Ve Araştırma Hastanesi, Deri Ve Zührevi Hastalıkları Anabilim Dalı, Sakarya

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Aylin GÜNDÜZ REYHANI
Uyruğu : Türkiye Cumhuriyeti
Doğum Yeri ve Tarihi : Antakya-02.02.1988
Telefon : 05394638496
e-mail : aylingunduz14@gmail.com

EĞİTİM

Üniversite: Ege Üniversitesi, Biyomühendislik, 2008-2014

Üniversite: Minho Üniversitesi, Biyomedikal Mühendisliği, 2012-2013

Yüksek Lisans: Adana Adnan Menderes Bilim ve Teknoloji Üniversitesi,
Nanoteknoloji ve Mühendislik Bilimleri Anabilim Dalı, 2016-2019

Doktora: Necmettin Erbakan Üniversitesi, Nanobilim ve Nanomühendislik
Anabilim dalı, 2020-2025

İŞ DENEYİMLERİ

Ege Üniversitesi, Hayvan Doku Kültürleri Laboratuvarı, Stajyer, 2011

Tüpraş, Kocaeli İzmit Rafinesi, Ar&Ge Bölümü, Stajyer, 2012

Bioneks- Bioneks Bioteknoloji ve Kimyasal Analiz Ürünleri San.Tic.Ltd.Şti.-
Mikrobiyoloji Departmanı-Satış ve Pazarlama Sorumlusu-2015

Novakim İlaç ve Kimya Sanayii Aş- Novakım Bıotech, Ar&Ge Uzmanı, 2019

Zade Vital İlaç, Kimya & Gıda San.Tic. Aş., Ar&Ge Uzmanı, Eylül 2020-Devam

SERTİFİKALAR

Karadeniz Teknik Üniversitesi • Eylül 2023 • Akademik Düzeyde Bilimsel Araştırma Projesi Hazırlama Eğitimi

Ant Teknik • Ekim 2022 • Shimadzu ICPE 9000 Eğitimi

Sistem Global • Eylül 2021 • Ar-Ge Projesi Hazırlama ve Yürütme Eğitimi

Ant Teknik • Haziran 2021 • Shimadzu GC-2010 Plus Eğitimi

Ant Teknik • Haziran 2021 • Shimadzu IR Prestige Eğitimi

Ant Teknik • Haziran 2021 • Shimadzu TOC-V Wp Eğitimi

Ant Teknik • Mayıs 2021 • Shimadzu GCMS-Qp2010 Ultra Eğitimi

Ant Teknik • Mayıs 2021 • Shimadzu LCMS-8040 Eğitimi

Söz Patent • Mayıs 2021 • Sinai Mülkiyet Eğitimi

Konya Sanayi Odası • Mayıs 2021 • Konya Selçuk Tto, Konya Teknokent

Akademi • Uluslararası Proje Hazırlama ve Yürütme Eğitimi

Ant Teknik • Nisan 2021 • Shimadzu DSC-60a & Tga-50 Eğitimi

Ant Teknik • Nisan 2021 • Shimadzu HPLC-20a Prominence Eğitimi

Ant Teknik • Nisan 2021 • Shimadzu UV-1800, J257 Refractometer, Ddm 2910 Automatic Density Meter & Auto Iıı Polarimeter Eğitimi

İema Eğitim Danışmanlık • Ağustos 2014 • İyi Hijyen, Laboratuvar Ve Üretim Uygulamaları GHP, GLP, GMP

İstanbul Üniversitesi • Mart 2011 • Öğrenci Kış Okulu • Uluslararası VIII. Iugen Moleküler Biyoloji ve Genetik

AKTİF KULLANILAN CİHAZLAR

HPLC, GC, FTIR, ICPE, TOC, GC-MS, Refractometer, UV-Visible Spectrometer, Automatic Density Meter, Kül ve Nem Tayin Cihazı, PCR, RT-PCR

YABANCI DİLLER

İngilizce: İleri Seviye

Arapça: Konuşma ve Anlama

BİLDİRİLER

Gündüz, A., Bayır, E., Şendemir, Ürkmez, A., Endotel Progenitör Hücrelerin (Epc) *In Vitro* Damarlanma Çalışmalarında Kullanım Potansiyeli, II. Biyomühendislik Öğrenci Kongresi 15-16 Mart 2014 İzmir/Bornova

Gündüz, A., Özdaş, S., Çil, T., Erkin, Ö., C., İleri Safha KHDAK (Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri) Hasta Kanlarında EGFR Mutasyonlarının qPCR Yöntemi ile Belirlenmesi, 6. Ulusal Moleküler Biyoloji Ve Biyoteknoloji Kongresi, 05-07 Ekim 2017

Gündüz, A., Erkin, Ö., C., Morphological and molecular characterization of Erlotinib resistance established in A549 Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) cell line, International Eurasian Conference on Science, Engineering and Technology, 22-23 November 2018, Ankara, Turkey

Sağır, Ç., Algan, D., T., Gündüz, A., Dilek, Ş., Investigation Of The Characteristics Of The Bitter Melon Macerate, 1st International Conference on Engineering and Applied Natural Sciences, May 10-13, 2022, Konya, Turkey

TEZDEN KAYNAKLANAN YAYIN

Gündüz, Reyhani, A., Kars, Demirel, M., *Nigella sativa* Oil Encapsulation for Enhanced Bioavailability, 4th International Conference on Innovative Academic Studies (ICIAS) – 12-13 March 2024 – Konya, Turkey