

***IN-SITU* RAT BAĞIRSAK PERFÜZYONU  
TEKNİĞİ KULLANILARAK KOLAJENİN  
BARSAK GEÇİŞ PERFORMANSININ  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Yüksek Lisans Tezi  
Fargana MUSAYEVA  
Eskişehir 2022**

***IN-SITU* RAT BAĞIRSAK PERFÜZYONU TEKNİĞİ KULLANILARAK  
KOLAJENİN BARSAK GEÇİŞ PERFORMANSININ DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Ecz. Fargana MUSAYEVA**

**YÜSEK LİSANS TEZİ**

**Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı**

**Danışman: Doç. Dr. Mustafa Sinan KAYNAK**

**(İkinci danışman: Araş. Gör. Dr. Saniye ÖZCAN)**

**Eskişehir**

**Anadolu Üniversitesi**

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

**Haziran 2022**

## JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Fargana MUSAYEVA'nın "*In-Situ* Rat Bağırsak Perfüzyonu Tekniği Kullanılarak Kolajenin Barsak Geçiş Performansının Değerlendirilmesi" başlıklı tezi 24/06/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Doç. Dr. Mustafa Sinan KAYNAK	.....
Üye	: Prof. Dr. Yeşim AKTAŞ	.....
Üye	: Doç. Dr. Evrim YENİLMEZ	.....

Prof. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ  
Enstitü Müdürü

## ÖZET

### *IN-SITU* RAT BAĞIRSAK PERFÜZYONU TEKNİĞİ KULLANILARAK KOLAJENİN BARSAK GEÇİŞ PERFORMANSININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Ecz. Fargana MUSAYEVA

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Kozmetoloji Bilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Haziran 2022

Danışman: Doç. Dr. Mustafa Sinan KAYNAK

(İkinci danışman: Araş. Gör. Dr. Saniye ÖZCAN)

İnsan vücudunda oluşan en bol proteinlerden biri kolajendir. Destek ağları kurarak tüm hücrel sistemlerde vücut dokularının gücünden sorumludur. Kolajen lifler genellikle opak ve beyazdır, bu nedenle dokularda kolayca tanınırlar. Kolajen, kanın pıhtılaşmasına, dokuyu yeniden şekillendirmeye yardımcı olduğu için yaygın olarak kullanılır. Bilinen hiçbir yan etkisi olmasa da birçok klinik uygulamada hayvan kaynaklı (doğal) kolajen kullanılmaktadır.

Düşük molekül ağırlığı sayesinde hidrolize kolajen vücudumuz tarafından hızla sindirilir ve kan dolaşımına girer. Yapılan araştırmalara göre en uygun kolajen türü, kolayca emilebilen ve vücudumuz tarafından kullanılabilen kolajen peptitleri için toz veya sıvı haldeki kolajendir. HPLC, LC-MS/MS gibi teknikler, karmaşık peptit karışımlarını karakterize etmek için kullanılır. Klasik fibril oluşturan kolajen, kolajen tip I, II, III, V ve XI'i içerir. Bu kolajenler, 25 ila 400 nm arasında çaplara sahip fibriler diziler oluşturarak yüksek oranda yönlendirilmiş supramoleküler kümeler halinde kümelenme yetenekleriyle karakterize edilir. Doğal bir protein olması ve teknik özellikleri nedeniyle kolajen hidrolizatın gelişiminin ve tüketiminin önümüzdeki yıllarda artması beklenmektedir. Bu derlemede kolajenin fiziksel ve kimyasal özellikleri, çeşitleri, farmakolojik özellikleri, miktar belirleme yöntemleri kısaca anlatılmaktadır.

**Anahtar sözcükler:** Bağırsak Perfüzyonu, Hidroksiprolin, Kolajen, LC-MS/MS, SPIP.

## ABSTRACT

### EVALUATION OF INTESTINAL PASSAGE PERFORMANCE OF COLLAGEN USING *IN-SITU* RAT INTESTINAL PERFUSION TECHNIQUE

BSc. Fargana MUSAYEVA

Department of Pharmaceutical Technology

Programme in Cosmetology

Anadolu University, Institute of Health Sciences, June 2022

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mustafa Sinan KAYNAK

(Co-supervisor: Res. Ass. Dr. Saniye ÖZCAN)

One of the most abundant proteins formed in the human body is collagen. It is responsible for the strength of body tissues in all cellular systems by establishing support networks. Collagen is widely used as it helps blood coagulate, remodeling tissue. Although there are no known side effects, there is some concern about its role in inflammation, group-to-group variability, and possible disease transfection, given that animal-derived (natural) collagen is used in many clinical applications. Not every protein is of equal value, so not every collagen is of equal value. Thanks to its low molecular weight, hydrolyzed collagen is quickly digested by our body and enters our blood circulation.

According to the study, the most suitable type of collagen is the one in powder or liquid form for collagen peptides that can be easily absorbed and used by our body. Not every protein is of equal value, so not every collagen is of equal value. It is necessary to rely on the most appropriate analysis technique to evaluate the quality feature. Techniques such as HPLC, LC-MS/MS are used to characterize complex peptide mixtures. Classical fibril-forming collagen includes collagen types I, II, III, V, and XI. These collagens are characterized by their ability to aggregate into highly oriented supramolecular aggregates, forming fibrillar arrays with diameters between 25 and 400 nm. Being a natural protein and its technical characteristics, it is expected that development and consumption of collagen hydrolyzate will increase in the coming years. In this review, physical and chemical properties of collagen, types, pharmacology properties, quantity determination methods are briefly described.

**Keywords:** Intestinal Perfusion, Hydroxyproline, Collagen, LC-MS/MS, SPIP.

## TEŞEKKÜR

Hazırlamış olduğum bu yüksek lisans tezimin her aşamasında sahip olduğu değerli bilgi ve birikimleriyle bana destek olan, ekibinde yer almaktan büyük gurur ve mutluluk duyduğum, bu süreçte kendimi tanıma imkanı veren, mesleki ve bilimsel birikimiyle bana yol gösteren, her yaptığım çalışmada bana hissettirdiği sonsuz güveni ve özverileriyle arkamda olan, mesleğimde ve hayatta çok şey öğrendiğim ve her zaman örnek alacağım, danışman hocam Doç. Dr. Mustafa Sinan KAYNAK'a,

Yüksek lisans eğitimim sürecimde laboratuvarında yan yana çalıştığım, çok şey öğrendiğim, zor zamanlarımda bana destek olan, hayattaki tecrübelerini dinleyip hayatıma yön vermemde yardımcı olan canım hocam Arş. Gör. Dr. Saniye ÖZCAN'a,

Her zaman sevgi ve desteklerini hissettiğim Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'ndaki saygıdeğer hocalarıma,

Ve her anımda sevgi ve güvenleriyle yanımda olan, aldığım her kararda beni maddi ve manevi destekleyen, sizin sayenizde dediğim güzel aileme,

En içten sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

## **ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ**

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

Fargana MUSAYEVA

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI.....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI .....	ii
ÖZET .....	iii
ABSTRACT .....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ .....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLolar DİZİNİ .....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. KAYNAK BİLGİSİ.....	2
2.1. Kozmetoloji .....	2
2.2. Deri.....	3
2.2.1. Epidermis.....	3
2.2.2. Dermis .....	4
2.2.3. Hipodermis .....	5
2.3. Tek Geçişli Bağırsak Perfüzyonu Tekniği (SPIP).....	5
2.3.1. Permeabilite markerleri .....	6
2.4. Kolajen.....	7
2.4.1. Kolajenin yapısı.....	9
2.4.2. Kolajenin biyosentezi.....	11
2.4.3. Kolajenin tipleri .....	11
2.4.3.1. Kolajenin tipleri i, ii, iii, v and xi – fibril oluşturan kolajen.....	11
2.4.4. Tanımlama ve kantifikasyon yöntemleri .....	13
2.4.5. Hidroksiprolin .....	13
2.4.6. Kolajenin farmakoloji özellikleri.....	14



2.4.6.1. Kolajenin hareket mekanizması.....	14
2.4.7. Emilim, dağıtım, metabolizasyon ve eliminasyon .....	16
2.4.8. Kolajenin emilimi ve dağılımı .....	17
2.4.9. Kolajenin metabolizasyonu ve eliminasyonu.....	18
2.4.10. Kolajenin yan etkileri .....	19
2.4.11. Kolajen ürünleri.....	20
2.4.11.1. Kolajen takviyeleri.....	20
2.4.11.2. Sıvı kolajen.....	21
2.4.11.3. Katı dozaj formlarında oral kolajen.....	21
2.4.11.4. Toz formu.....	21
2.4.11.5. Kolajen tabletleri .....	21
2.4.12. Gıda katkı maddesi olarak kolajen .....	21
2.4.13. İçeceklerdeki kolajen .....	22
<b>3. GEREÇLER.....</b>	<b>24</b>
3.1. Kullanılan Maddeler ve Reaktifler .....	24
3.2. Kullanılan Cihazlar .....	24
3.3. Kromatografik Ayrım için Kullanılan Sabit Fazlar .....	24
3.4. Perfüzyon Gereçleri.....	25
3.5. Deney Hayvanları .....	25
<b>4. YÖNTEMLER.....</b>	<b>26</b>
4.1. Deney Hayvanları Üzerinde Yapılacak İşlemler .....	26
4.1.1. Bağırsak perfüzyonu çalışmalarında cerrahi prosedürler.....	26
4.1.2. Bağırsak perfüzyonu.....	27
4.1.3. Veri analizi.....	28
4.1.4. Perfüzyon çözeltisi.....	28
4.1.5. Kolajen'in bağırsaklardan absorpsiyonunun incelenmesi.....	29
4.1.6. Deney grupları.....	29
4.2. Çalışmada Kullanılan Maddeler İçin Miktar Tayini .....	30

4.2.1. Enstrümental parametreler .....	30
4.2.2. Standart çözeltilerinin hazırlanışı .....	30
4.2.3. Kolajenin hidrolizi .....	31
4.2.4. Numune çözeltilerinin hazırlanışı.....	31
4.2.5. Geri kazanım çalışmaları için çözeltilerin hazırlanışı .....	32
4.2.6. Hareketli faz çözeltilerinin hazırlanışı .....	32
4.2.7. Sonuçların değerlendirilmesi .....	32
4.2.8. Yöntem geçerliliğinin tespiti .....	32
4.2.9. Sistem uygunluk testleri .....	33
4.2.10. Seçicilik, spesifiklik .....	33
4.2.11. Doğrusallık ve aralık.....	33
4.2.12. Kararlılık .....	34
4.2.12.1. Donma-çözülme kararlılığı .....	34
4.2.12.2. Tezgah üstü stabilite .....	34
4.2.12.3. İşlenmiş numune kararlılığı.....	35
4.2.13. Taşınma.....	35
4.2.14. Doğruluk .....	35
4.2.14.1. Matris etkisi .....	35
4.2.15. Kesinlik .....	36
4.2.16. Teşhis ve tayin alt sınırı.....	36
4.2.17. Sağlamlık.....	36
<b>5. BULGULAR VE TARTIŞMA .....</b>	<b>37</b>
<b>5.1. Miktar Tayini.....</b>	<b>37</b>
5.1.1. Sıvı kromatografisi çalışmaları.....	38
5.1.2. Kütle dedektöründe FK, MT ve HP iyonlaşma karakteristiği .....	39
<b>5.2. Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu .....</b>	<b>40</b>
<b>5.3. Analitik Metot .....</b>	<b>45</b>

<b>5.4. Perfüzyon Deneyleri .....</b>	<b>45</b>
<b>5.5. Net Su Akışı Değerlerine Ait Bulgular.....</b>	<b>48</b>
<b>6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....</b>	<b>51</b>
<b>KAYNAKÇA .....</b>	<b>53</b>
<b>EKLER</b>	
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	

## TABLULAR DİZİNİ

### Sayfa

<b>Tablo 1.1.</b> Kolajenin tiplerinin özellikleri .....	12
<b>Tablo 4.1.</b> Bağırsak perfüzyonu çalışmalarında kullanılan perfüzyon çözeltisinin bileşimi .....	27
<b>Tablo 4.2.</b> Optimize LC-MS/MS koşulları .....	29
<b>Tablo 4.3.</b> SUT parametrelerinin sınırları .....	32
<b>Tablo 5.1.</b> FK, MT ve HP için elde edilen SUT verileri .....	37
<b>Tablo 5.2.</b> HP'nin pozitif modda çoklu reaksiyon izlemede ESI koşulları .....	38
<b>Tablo 5.3.</b> FLB için doğrusallık ve kesinlik verileri.....	40
<b>Tablo 5.4.</b> Geri kazanım verileri (n=3).....	41
<b>Tablo 5.5.</b> Sağlamlık verileri (n=3) .....	42
<b>Tablo 5.6.</b> FK, MT ve HP'nin standart çözeltilerinin kararlılık çalışmaları.....	43
<b>Tablo 5.7.</b> Deney gruplarında kolajen ve MT Peff değerleri.....	47
<b>Tablo 5.8.</b> Deney gruplarında ss, ortalama ve vk .....	47
<b>Tablo 5.9.</b> Gruplar için NWF değerleri .....	49

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b><u>Sayfa</u></b>
Şekil 2.1. Tropokolajenin yapısı .....	9
Şekil 2.2. Kolajenin molekülünün yapısı.....	10
Şekil 4.1. Perfüzyon sistemi ve cerrahi yöntemin şematik olarak gösterilmesi .....	37
Şekil 5.1. Optimize koşullar altında MT, FK (a) ve HP (b) için elde edilen TIC+ ....	39

## SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

C	: Konsantrasyon
CAC	: Kritik agregasyon konsantrasyonu
CH	: Kolajen hidrolizat
CLP	: Kolajen benzeri peptit
CLPW	: Kolajen benzeri peptit su
CTp	: prolil-hidroksiprolin grubu
CTP	: Kolajen tripeptit
CV RSD	: Varyasyon katsayısı
DSC	: Diferensiyal Taramalı Kalorimetre
FACIT	: Fractured Triple-helix Fibril Associated Collagen
FK	: Fenol kırmızısı
Gln	: Glutamin
GPH	: Gly-Pro-Hyp amino asit dizilimi
HP	: Hidroksiprolin
HPLC	: Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
kDa	: Kilodalton
Q	: Quadrapol (Dört Kutuplu)
LC-MS/MS	: Sıvı Kromatografisi Kütle Spektrometresi
LMW	: Düşük moleküler ağırlıklı
LMW-CH	: Düşük moleküler ağırlıklı kolajen hidrolizat
LOQ	: Tayin Alt Sınırı
LOD	: Teşhis Sınırı
MRM	: Çoklu Reaksiyon İzleme Modu
MS	: Kütle Spektrometresi
MT	: Metoprolol tartarat
N	: Teorik plaka sayısı
NE	: Norepinefrin
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
NWF	: Net Su Akış Hızı (Net Water Flux)

ODS	: Oktadesil silika
PH	: Pro-Hyp amino asit dizilimi
Pro-Hyp	: Prolin-hidroksiprolin
PYD	: Piridinolin
RP-LC	: Ters Faz Sıvı Kromatografisi
R <sub>s</sub>	: Ayrım gücü
SEC	: Boyut Dışlama Kromatografisi
S <sub>1</sub>	: Ara kesinlik varyansı
SPIP	: Tek geçişli barsak perfüzyonu
S <sub>r</sub>	: Tekrarlanabilirlik varyansı
SS	: Standart sapma
SUT	: Sistem uygunluk testi
T	: Kuyruklanma faktörü
Td	: Denatürasyon sıcaklığı
TQ	: Triple Quadrapol (Üçlü Dört Kutuplu)
TOF	: Time of Flight (Uçuş Süresi)
USP	: United States Pharmacopeia (Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi)
UV	: Ultraviyole
UV-Vis	: Ultraviyole görünür alan

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kozmetoloji insan derisinin, saçın, tırnağın, dişlerin bakımı, sağlığı ve temizliğiyle ilgili işlemleri barındıran bilim dalıdır. Kozmetolojinin temelini insan derisinin, tırnağın, saçın sağlığı oluşturur. Derimizde oluşan deformasyonlardan en önemlisi kırışıklıklar ve lekelerdir. Kırışıklıklar yaşlanma, mimiklerin uzun süreli kullanımı ve uyku gibi dış etkenlere bağlı olarak derinin deformasyonu ile oluşmaktadır. Deride 2 tür kırışıklık görmekteyiz. Derin olmayan ve derin kırışıklıklar. Derin olmayan kırışıklıklar epidermisin su kaybı ile epidermisin bozulması sonucu gelişmektedir. Derin kırışıklıklar kolajen ve elastin liflerinin azalması nedeniyle elastikiyet kaybına bağlı dermisin bozulması ile oluşmaktadır. Doğru şekilde beslenme ve yaşam tarzı daha sağlıklı deriye sahip olmaktır. Sağlıklı yaşam tarzının yanında alınan ilaçlar, vitaminler de deri sağlığınıza etki etmektedir.

Kırışıklıkları azaltmak ve daha sağlıklı görünüm elde etmek için birçok kozmetik ürün kullanılmaktadır. Bunlardan en yaygın olanı kolajendir. Kolajenin farklı farmasötik çeşitleri vardır; birçok şirket bu biyomoleküllü tabletler, sıvı formlar, kapsüller, yarı katı topikal formlar vb. gibi farklı farmasötik formlardaki birçok ürüne entegre ederek yeni formülasyonlar geliştirmektedir. Günümüzde oral yolla alınan kolajen çeşitleri daha çok tercih edilir. Son zamanlarda yapılan hayvan çalışmalarında ve insan denemelerinde, kolajen veya hidrolizatlarının oral yoldan verilmesinin cilt yaşlanması üzerinde faydalı etkileri olduğu da öne sürülmüştür. Kolajen makromolekül olduğu için kullanılan ürünlerin ne kadar etki etmesi ve permeabilitesiyle ilgili çalışmalar yapılmaktadır. Fakat literatürde kolajenin absorpsiyonu üzerine incelendiği *in situ* sıçan barsak perfüzyonu çalışması sınırlı sayıda yer almaktadır

Bu çalışmada Tek Geçişli Bağırsak Perfüzyonu (SPIP) tekniği kullanılarak kolajenin farklı hammaddelerinin ve oral yolla alınan sıvı formülasyonunun barsaklardan paraselüler absorpsiyonu üzerine etkisi ileum barsak segmentinde incelenmiş ve geliştirdiğimiz yeni optimize tam valide LC-MS/MS metodu ile miktar tayinleri yapılmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre MT, FK ve kolajenin permeabiliteyi kıyaslanarak değerlendirilmiştir. Sonuc olarak oral yolla kullanılan sıvı formülasyonlarda kolajenin permeabilitesinin gruplara göre farklılık göstermesine rağmen yüksek olması sonucuna varılmıştır.



## 2. KAYNAK BİLGİSİ

### 2.1. Kozmetoloji

Kozmetik ürünün tüm dünyada kabul edilebilirliği, deri üzerinde bıraktığı hissi, kokusu, görünümü, deriye yayılabilirliği ve hızlı emilmesi, deriyi nemlendirmesi, düzgün, sağlıklı ve güzel göstermesi, alerjik ve iritan özelliklerinin olmaması ve ambalajının görsel çekiciliğe sahip olması gibi niteliklere bağlıdır. FDA kozmetik tanımını 'vücuda uygulandıklarında, temizlik, bakım, güzelleştirmek, çekiciliğini arttırmak nedenleri veya görünümü iyileştirmek için kullanılan madde ve ürünler' olarak belirlemiştir. Kozmetik ürünlerde preparatın kozmetik niteliğini belirleyen ayırım preparat ve içindeki etkin maddeler için öne sürülen ve etiketinde belirlenen kullanım amacıdır. Eğer kozmetik ürünlerdeki madde bir hastalığı önlemek, örneğin selülit azaltmak veya yok etmek veya deri hücrelerini yenilemek gibi deri ve eklerinin yapı ve işlevlerini değiştiren bir sav ile piyasaya sürülmüşse ilaç olarak kabul edilir. Herhangi bir ürün eskiden beri ilaç özellikleri ile bilinen bir hammadde içeriyorsa ve bu nedenle kullanılmamışsa, ürünün işlevi yasal kapsamda kozmetik olarak kabul edilse ve üretici tarafından endikasyonu ilaç olarak verilmemiş olsa bile dermatolojik ilaç olarak sınıflandırılır.

AB, kozmetik üreticileri için kozmetik formülasyonlarda kullanılacak yaklaşık 20,000.00 hammaddenin listesi belirlenmiştir. Bu geniş liste hammadde satan firmaların birbiri ile rekabeti sonucu, daha ucuz, saf ve daha yüksek etkinliğe sahip formülasyonların hazırlanabilmesine olanak sağlamış, en basit kozmetik formülasyon için bile ileri sürülen etkinliğin artmasına yol açmıştır. Örneğin ucuz bir nemlendirici krem formülasyonunda çeşitli polimer, yüzey etkin maddeler, yağlar, bir veya daha fazla nemlendirici, antioksidan, kelat yapıcı ve koruyucu madde gibi en az 15-20 bileşen bulunmaktadır. Genel olarak bu ve benzeri formülasyonlar deride kaldıkları sürece deriye etki eder. Oysa günümüzde AB listesindeki geniş nemlendirici yelpazesinden seçilmiş nemlendiricilerden biri veya birkaçı derinin nem oranında süreklilik ortaya çıkarabilmektedir. Bu şekilde kullanılan kozmetik hammaddelerin kalıcılığı arttığı için deride veya deriden geçip vücutta birikebilir.

Kozmesötik veya dermakozmetik ürünlerin, kozmetik ve ilaç özelliğindeki etkin maddeleri birleştirerek, cildin kırılganlık, leke, akne ve kızarıklık gibi sorunlarını gideren ve cilt sağlığını ve güzelliğini sağlayan veya arttırılmasına yol açan preparatlar olduğu dünya genelinde kabul edilmektedir.

Dermakozmetik ürünler günümüzde yürürlükte olan kozmetik yasa/yönetmeliklerinde tanımlanmamakla birlikte, bilinçli formülasyon, yoğun farmasötik ve dermatolojik katkı ve ayrıntılı testlerle piyasaya sunulmakta ve tüketicinin beğenisi ile popülerlik kazanmaktadır. Bu ürünlerin niteliği hakkında tüketicinin aydınlatılması için verilen ek bilgiler kullanımını arttırmıştır. Dermakozmetik ürünler genellikle kozmetik ürünlerden daha pahalı olduğu halde satış rakamları yüksektir. Dünya genelinde tüketici bilgi ve bilincinin artmasıdır; yani aynı tüketicinin doğa ve doğal madde kullanımına olan duyarlılığı, kozmesötik ürünlerin niteliğinin doğa ve hayvanları koruyucu biçimde oluşu, sağlıklı yaşam bilinci ve bilimde ve tıpta ortaya çıkan yeni gelişmelere kozmetik tüketicisinin uyum göstermesidir [1, 2].

## **2.2. Deri**

Deri dış çevre ile vücut arasında geçidi sağlar ve vücudumuzun en geniş yaşamsal organıdır. Derimizin işlevleri arasında iç organlarımızı fiziksel ve kimyasal travma ile UV ışınlardan koruma, su kaybını önleme ve mikroorganizmaların girişini engellemek önemlidir. Deri zayıf asidik yüzeye sahiptir ve bu da enfeksiyonun önlenmesine etki etmektedir. Yaş arttıkça deride kolajen ve elastin liflerinin azalması nedeniyle elastikiyet kaybına bağlı dermisenin bozulması ve dış faktörlerden dolayı derimizde zamanla deformasyonlar oluşmaktadır. Deri 3 ana katmandan oluşmaktadır; dış çevreyle ilişkide olan katman epidermis, epidermisle hipodermis arasında kalan katman dermis ve yağ hücreleri içeren katman hipodermis [3].

### **2.2.1. Epidermis**

Bizi dış faktörlerden koruyan derinin dış katmanıdır. Epidermis bakteri enfeksiyonlarına karşı temel koruyucu özellik gösteren tabakadır. Bazal katmandaki hücre bölünmesi sonrası keratinositler özel farklılaşma programı ile epidermis boyunca birçok katmanı geçerek derinin en dış katmanına ulaşır deskuamasyona uğrar. Sağlıklı epidermiste çoğalma deskuamasyon arasında bir denge mevcuttur ve yaklaşık her 28 günde bir (20-40 gün) yenilenmektedir. Bazal katmandaki hücrelerinin bir kısmı dinlenme fazında olduğu için hücrelerin ancak %15'i bu aktif süreçte yer almaktadır. Yaralanma ve deri yenilenmesi için yapılan tıbbi girişimler gibi artmış çoğalma gerekliliğinde dinlenme durumundaki bu hücreler de sürece katılmaktadır. Bu dengenin sağlanması bazı deri sayrılıklarının ortaya çıkmasından önemlidir. Bazı ihtiyoz

şekillerinde deskuamasyon hızı azalmakta ve epidermal hücreler birikmekte iken psoriaziz gibi yangısal sayrılıklarda çoğalma hızı artmaktadır. Epidermin esas hücre tipi olan keratinositler protein olan keratini sentezler. Epidermiste keratinositler dışında melanosit, langerhans ve merkel hücreleride bulunmaktadır. Bir yere çarpma sonucu hasar oluşması, kimyasal iritasyon, alerji, duyarlılık gibi durumlar bu tabakayı etkilemektedir. Melanositler bazal katman keratinositlerinin arasında yerleşik olan melanositler tüm hücre popülasyonunun %5-10'unu oluşturmaktadır. Sayıları vucüt alanına göre değişkenlik göstermekte ve keratinosit sayısı ile doğru orantılı olarak artmaktadır. Her 5-10 keratinosite oranla 1 melanosit bulunduğu görülmüştür. Langerhans hücreleri bazal katmanın hemen üzerinde yer alan langerhans hücreleri aynı melanositler gibi dendritik görünüme sahiptir. Bunlar kemik iliği kökenli immün hücreler olup epidermin immün engelini oluşturur. Dış kaynaklı antijenleri hem derideki hem de limf nodlarındaki T limfositlere sunarlar. Merkel hücreleri bazal katmanda yer alan Merkel hücreleri intrasitoplazmik granülleri içinde nöroendokrin peptitler içerir. Limfositler ve polimorfonükleer lökositler derinin spesifik immün yanıtlarını oluşturan hücrelerdir ve anormal koşullarda epidermiste de görülebilmektedir. Epidermis beş tabakadan oluşur; *Stratum Corneum* (Boynuzsu Tabaka), *Stratum Lucidum* (Önleyici Tabaka), *Stratum Granulosum* (Granuler Tabaka), *Stratum Spinosum*, *Stratum Basalae* (Bazal hücre tabakası) [4].

### 2.2.2. Dermis

Dermis dış kısımda epidermis ve iç kısımda hipodermis olmak üzere iki katmanın arasında yer almaktadır. Kalınlığı bölgeden bölgeye değişmekte olup göz kapaklarında bir millimetre'den az iken sırt bölgesinde 5 millimetre'den fazladır. Dermis'in kalınlığı yaş artışı ile giderek inceler. Dermis, papiller dermis ve retiküler dermis olmak üzere iki katmandan oluşmaktadır. Papiller dermis, epidermin hemen altındaki deri yüzeyine en yakın olan dermisin ince üst katmanıdır. Bu katman epidermis ve eklerinin beslenmesinden sorumlu zengin kapiller ağa ve duyu sinir sonlanımlarına sahiptir. Vücudu mekanik hasardan koruyan ve beslenme desteği sağlayan dermis, kolajen ve esnek lifler ile damarların yoğun bulunduğu bağ dokusu katmanıdır. Dermiste ter bezleri, yağ bezleri ve kıl folikülleri de bulunmaktadır. Aynı zamanda yüzeysel ve derin pleksuslar, kan damarları, limfatik kanallar, serbest sinir sonlanımları ve korpuskulumları içerir. Kan ve lenfatik damarların varlığı sayesinde ilaç ve toksinlerin sistematik dolaşıma

ve derin dokulara taşınması bu katmandan olmaktadır. Derimde en yoğun bulunan kolajen lifleri demetler oluşturacak şekilde bir aradadır. Dermis hacminin %30'unu ve kuru ağırlığının ise %75'ni oluşturan kolajen lifler gerilme direnci sağlamaktadır. Aynı zamanda tip 2 ve tip 6 kolajen de bulunmaktadır. Kolajen lifler fibröz yapı oluşturan prolin, hidroksiprolin ve glisin gibi özel aminoasitlerden oluşmaktadır. Yaş ile kolajenin yapısı niteliksel ve niceliksel olarak değişmektedir. Dermiste ana hücreler fibroblastlardır ve derminin hücre dışı destek matris dokusunu yapmaktadır. Merkel ve Meissner cisimcikleri (dokunma duyusu, daha çok el içi ve ayak tabanında yer almaktadır), Pacinian cisimcikleri (basınç duyusu, vücut ağırlığını taşıyan anatomik alanlar ve genital bölgede daha yoğun olarak bulunmaktadır) ve Ruffini cisimcikleri de (mekanik duyu) bu katmanda bulunmaktadır. Fibriller dışında proteoglikanlar, glikoproteinler, glikozaminoglikanlar, su ve hyaluronik asit diğer destek yapılarıdır [5].

### **2.2.3. Hipodermis**

Derinin en alt tabakasıdır. Birbirinden fibröz septa ile ayrılan yağ globüllerinin içinde yerleşmiş lipositlerden oluşur. Vücudumuzun mekanik şoktan korunmasını ve genel enerji metabolizmasının devamını sağlar. Dermisten köken alıp hipodermise uzanan lif demetleri bu iki bölüm arasındaki bağı güçlendirmektedir. Hipodermisin kalınlığı vücut alanına, beslenme durumuna göre değişiklik göstermektedir. Hipodermisteki yağın dağılımı belirgin olarak hormon bağımlı ikincil seksüel karakteristiği yansıtmaktadır [6, 7].

### **2.3. Tek Geçişli Bağırsak Perfüzyonu Tekniği (SPIP)**

Anestezi uygulanmış sıçanların bir bağırsak segmenti izole edilerek ilgili bileşiğin solüsyonu ile perfüze edilmesi SPIP (Tek geçişli bağırsak perfüzyonu) tekniğidir. Prosedür sırasında akış hızı, konsantrasyonu ve perfüze edilmiş bağırsağın uzunluğunun değişilebilmesi kimyasalların bağırsak absorpsiyonunu etkileyen faktörlerin mükemmel kontrolünü sağlar. En temel SPIP protokolünde, araştırılan bileşik sadece perfüzatta izlenir, kanda izlenmez. Ön çalışmalarla diğer olası faktörleri çıkarttıktan sonra giriş ve çıkış konsantrasyonları arasındaki farkla belirlenen bileşik kaybı, absorpsiyon olarak belirlenir. SPIP modeli, oral uygulama ile karşılaşılanlara yakın sonuçlar sunması nedeniyle önemli bir avantaja sahiptir [8, 9].

İlaçların oral uygulaması çok tercih edilen yoldur. Bu sürecin hızı ve kapsamı sadece fizikokimyasal ve fizyolojik faktörlerden değil, aynı zamanda dozaj formuyla ilgili faktörlerden de etkilenir. Oral uygulanan ilaç absorpsiyonu; ilacın çözünürlüğü ve gastrointestinal geçirgenliği olmak üzere iki temel parametre tarafından belirlenir: Pasif transselüler difüzyon, paraselüler taşıma ve endositoz dahil olmak üzere, ince bağırsak bölgelerinde oral ilaç absorpsiyonunun çeşitli mekanizmaları gösterilmiştir. İlaçların bağırsakta absorpsiyonun belirlenmesi için farklı teknikler mevcuttur. Bu tekniklerden biri de tek geçişli bağırsak perfüzyonudur. Anestezi uygulanmış sıçanların bir bağırsak segmenti izole edilerek ilgili bileşiğin solüsyonu ile perfüze edilmesi SPIP tekniğidir. SPIP, ilaçların bağırsak geçirgenliğini değerlendirmek için önemli tekniklerden biridir. Teknikte sıçanın ince barsağının farklı segmentlerinde (duodenum, jejunum, ileum) perfüze edilebilir [10]. İlacın bağırsak segmentinde ortalama kalış süresi de emilim için kritik bir faktördür. Bu bağlamda perfüzyon sıvısının akış hızının seçimi de dikkate alınması gereken diğer bir faktördür. Fenol kırmızısının (FK) sıfır geçirgenlik belirteci olarak kullanılması ve metaprolol tartaratın (MT) referans standart olarak kullanılması SPIP çalışmalarında iyi bilinen bir konudur. Prosedür sırasında akış hızı, konsantrasyonu ve perfüze edilmiş bağırsağın uzunluğunun değişilebilmesi kimyasalların bağırsak absorpsiyonunu etkileyen faktörlerin mükemmel kontrolünü sağlar.

### **2.3.1. Permeabilite markerleri**

Farmakokinetik çalışmaların spesifik uygulamalarından biri olan bağırsak geçirgenliği çalışmaları araştırılan ilaçların geçirgenliğini belirlemek için perfüzyon çözeltilisinde olan referans standartların analiz edilmesini gerektirir. Analiz sıfır geçirgenlik belirteci olan FK ve referans bileşik olan MT olmak üzere iki farklı bileşiğin konsantrasyonunun belirlenmesiyle oluşmaktadır. Sıfır geçirgenlik belirteci olan FK aktif farmasötik bileşenleriyle birlikte perfüze edilir. Tek geçişli bağırsak perfüzyon tekniğinde su emilimi ve salgısının belirlenmesi ilaç geçirgenliği hesabı için önemlidir. Fenol kırmızısının giriş ve çıkış konsantrasyonları su taşınması zamanı bağırsaktaki aktif farmasötik bileşenlerin  $C_{out}/C_{in}$  oranını düzeltmek için kullanılır. MT aktif farmasötik bileşenlerin geçirgenlik sınıfının belirlenmesi için geniş kullanılmaktadır. Bir bileşiğin  $\log P$  ve  $\log D$  geçirgenlik değeri MT değerlerinden ( $\log P= 2,15$ ;  $\log D= - 1,48$ ) düşükse, düşük geçirgenlikli bir bileşik olarak sınıflandırılır [10].

Referans maddelerin miktarları ilaçların permeabilitesi hesaplanmasında kullanılır. Etkin maddelerin bağırsak segmentinden (ileum) permeabilitesi ( $P_{eff}$ ) aşağıda verilen eşitlik kullanılarak tayin edilmektedir [11].

$$P_{eff} = [v(C_{in} - C_{out})/C_{out}]/\pi r l \quad (3.2)$$

Q : Akış hızı (mL/sn)

$C_{out}$  : Segmentten çıkan perfüzyon çözeltisindeki ilaç konsantrasyonu ( $\mu\text{g/mL}$ )

$C_{in}$  : Segmente giren perfüzyon çözeltisindeki ilaç konsantrasyonu ( $\mu\text{g/mL}$ )

r : Perfüze edilen barsak segmentinin yarıçapı (cm)

L : Perfüze edilen barsak segmentinin uzunluğu (cm)

Eşitlik 3.2'de verilen ( $C_{out}/C_{in}$ ) oranı aşağıda verilen eşitlik kullanılarak hesaplanır.

$$\left(\frac{C_{out}}{C_{in}}\right)^l = \left(\frac{C_{out}}{C_{in}}\right)_{ilaç} \times \left(\frac{C_{in}}{C_{out}}\right)_{FK}$$

$(C_{out}/C_{in})_{ilaç}$  : Segmentten çıkan ve segmente giren perfüzyon çözeltisindeki ilaç konsantrasyonlarının oranı

$(C_{in}/C_{out})_{FK}$  : Segmente giren ve segmentten çıkan perfüzyon çözeltisindeki fenol kırmızısı konsantrasyonlarının oranı

Segmente giren ve segmentten çıkan perfüzyon çözeltisindeki fenol kırmızısı konsantrasyon değerleri kullanılarak net su akışı (net water flux; NWF) değerleri hesaplanır. Net su akışı değerinin negatif çıkması mukozal bölgeden (lümen) serozal bölgeye (kan) sıvı kaybı olduğunu ifade etmektedir. Bu değer pozitif çıkması ise mukozal bölgeye sıvı girişi olduğunu ifade etmektedir. Yapılan deneyler sonucunda hesaplanan net su akışı değerleri bu doğrultuda değerlendirilmiştir [12].

## 2.4. Kolajen

Kolajen liflerinin fiziksel özelliklerinden biride onların viskoelastik olmasıdır [13]. Kolajen molekülün insan vücudundaki bulunma yerlerine, zincir halkasına ve yapısına göre 26 farklı türe ayrılmıştır. Sınıflandırmalar, fibril oluşturan, bazal membran, mikrofibriller, sabitleyici fibriller, altıgen ağ ve transmembran ilişkili kolajen içerebilir. Her bir kolajen zinciri sarmal şeklinde iç içe geçerek  $\sim 300$  kDa kadar yüksek bir

moleküler oluşturur [14]. Doğal bir polimer olarak, kolajen moleküllerinin çözelti içinde hareketi ve toplanması dikkate değer bir viskoelastik davranışa neden olur [15]. Kolajen lifleri aynı zamanda floresans özelliğe sahiptir. Ultraviyole (UV) dalga boylarında radyasyona maruz kaldığında beyaz-mavi ışık yayar. Bazı hayvan yaşının belirlenmesindeki çalışmalarda kolajenin kullanılması onun yaş arttıkça floresans özelliğinin artmasıdır [16]. Polimerlerin bazı fizikokimyasal özelliklerinin, optik özelliklerin, koloidal kararlılığın çözeltideki agregasyon davranışlarıyla ilişkili olduğu bulunmuştur [17]. Bu nedenle, kullanımları veya işlenmesi hakkında bazı bilgiler sağlamak için çözeltilerdeki polimerlerin agregasyon davranışını araştırmak önemli olmuştur. Kolajenin agregasyon aktivitesine gelince, birkaç çalışma yapılmıştır.

Shi ve diğerleri, örneğin, bir flüoresans probu ve flüoresan polarizasyonu olarak 3-metoksi-4'-N,N-dimetilamino flavon türevi molekül içi yük transfer bileşiğini kullanarak asetik asit içinde kolajen agregasyonunu incelemiştir. Kolajenin, konsantrasyonunu artırarak asitli sulu çözeltide kendi kendine ilişkili olduğu düşünülmüş ve kritik agregasyon konsantrasyonu (CAC) 0,5 mg/mL bulunmuştur [18].

Bir protein olarak kolajen, ısıya duyarlıdır ve yaklaşık 40°C'lik denatürasyon sıcaklığı (Td) olarak adlandırılan bir sıcaklıkta denatüre olmaktadır. İlginç bir şekilde, artan konsantrasyonlarla (5, 8, 12, 16 ve 20 mg/mL) kolajenin denatürasyon sıcaklığının düştüğü bulunmuştur; bu, farklı konsantrasyonlardaki kolajen çözeltilerinde kolajenin moleküler durumunun farklı olduğunu düşündürmektedir [19].

Kolajen moleküllerinin sıcaklığa tepkisi kolajenin agregasyon davranışıyla yakından bağlantılıdır. Kolajen içeren ürünler sıklıkla çözelti olarak kullanıldığından kolajenin agregasyon davranışı ile sıcaklık arasındaki ilişkiyi açıklamak önemlidir. Polimerin agregasyon davranışını araştırmak için yapılan araştırmada, (US-DSC), (AFM) ve floresan teknikleri kullanılmıştır.

Bu çalışmada, liyofilize yaparak kurutulmuş kolajen 0,1 mol/L asetik asit solüsyonlarında çözülerek 0,25, 0,50 ve 1,0 mg/mL konsantrasyonlarda kolajen çözeltileri hazırlanmıştır. Mevcut çalışmada, araştırmacılar, kolajen moleküllerinin sıcaklığa tepkisini araştırmak için esas olarak floresan tekniklerini kullanmışlardır. Kolajen moleküllerinin sıcaklığa duyarlı olduğu gösterilmiştir. Sonuç olarak, kolajen konsantrasyonu arttıkça kolajen stabilitesinin azaldığı görülmüştür.

Böylece kolajenin termal denatürasyonu, ısı transfer hızından etkilenebilir. Birçok kolajen türü keşfedilmiş olsa da: baz membran, mikrofibriller, ankraj fibrilleri,

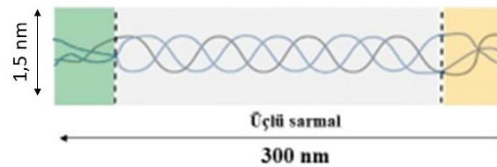
günümüzde düzeltme amacıyla en yaygın olarak kullanılan fibril oluşturan türlerdir. Kozmetik endüstrisinde kolajen, bulunabilirliği, biyouyumluluğu ve biyolojik olarak parçalanabilirliği nedeniyle kozmetik formülasyonlar için seçilebilir bir hammaddedir [20].

Kolajenin enzimatik hidrolizinden elde edilen kolajen hidrolizatları, düşük moleküler ağırlıklı (LMW) peptitlerdir [21]. Kolajen, yüksek moleküler ağırlıklı, hücre dışı bir proteindir [22]. Öte yandan, kolajen sindiriminden türetilen peptitlerin karışımı suda yüksek oranda çözünürdür ve oral uygulamadan birkaç dakika sonra kan dolaşımında ve deride aktif peptitler saptanabilir [23].

Tip I, II ve III, fibril oluşturan kolajenler, doku deformasyonunu sınırlayan ve doku boyutunu ve şeklini tanımlayan bir yapı sağlayan yapısal ağlar oluşturur. Kolajen tip I, çapı 100 nm'den büyük yapısal fibrillerle ilişkilendirilirken, tip II ve tip III kolajen, sırasıyla 10 ve 30 nm çapındaki fibrillerle ilişkilidir [24].

#### 2.4.1. Kolajenin yapısı

İnsan derisinde önemli olan kolajen molekülü tropokolajen moleküllerinden oluşmaktadır. Heliks şeklinde üç polipeptit zincirinin birleşmesiyle tropokolajen molekülü meydana gelir. Tropokolajeni oluşturan moleküller çapraz bağlar ile bağlanmaktadır. Tropokolajen 300 m uzunluğunda, 300,000 dalton ağırlığında ve 1,5 m çapındadır.

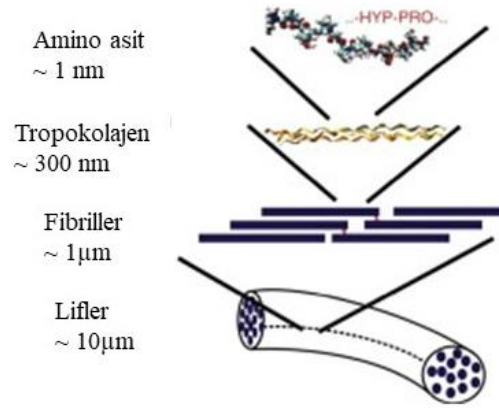


Şekil 2.1. Tropokolajenin yapısı [25]

Kolajenin amino asit kompozisyonu farklıdır. Her tip kolajende polipeptit zincirinin benzersiz amino asit dizilişi vardır ve farklı karbonhidrat molekülleri içerir. Her zincirin dizilişi ayrı bir gen tarafından kontrol edilir [26]. Sarmal yapıda polipeptit zincirinden oluşan farklı amino asit kompozisyonu olan en az 10 farklı zincir bilinmektedir ve zincirlerin farklılıkları kolajenin farklı tiplerini oluşturur. Polipeptit zincirlerinin farklı dizilişi kolajenin yapısında da farklılıklara yol açar. Vücudumuzda başlıca olarak kemik,



deri, kasta olmasıyla en çok bulunan proteindir. Yağsız kuru kas kütleinin %1-9'u kolajendir. Kolajen lif ağı şeklindedir ve yapısına göre kasta dokuya zarar verebilecek uzamalara karşı direnç gösterir. Morfolojik olarak kolajen yapısı üçe ayrılır. Endomisyum; lifleri çevreler, perimisyum; lif yığınlarını çevreler ve epimisyum; kası çevreler. Tip 1 kolajen çoğunlukla epimisyum dokuda, tip 3 kolajen ise çoğunlukla perimisyum dokuda bulunur [27].



Şekil 2.2. Kolajen molekülünün yapısı [28]

Kolajenin yapısı karmaşık bir molekül olduğu için farklı araştırmacılar tarafından yıllar içinde tekrardan incelenmiştir. Daha esnek üçlü sarmallı Tip IV kolajen, temel membranlarla sınırlı ağlarda birleştirilir [29]. Mikro fibriller tip VI kolajen, yüksek oranda disülfid çapraz bağlıdır ve diğer kolajen fibrilleri ile iç içe geçmiş filamentler ağına katkıda bulunur. Bunlar, kolajen tip II, III, VII, VIII, X ve diğerlerinde olduğu gibi üç aynı zincirden (homotrimerler) veya kolajen tip I, IV, V, VI, IX gibi iki veya daha fazla farklı zincirden (heterotrimerler) oluşturulabilir. XI [30, 31].

## 2.4.2. Kolajenin biyosentezi

Çekirdekdeki genlerin gen transkripsiyonu ile başlayan kolajenin biyosentezi, kolajen heterotrimerleri büyük fibriller halinde toplanıncaya kadar karmaşık, çok aşamalı bir süreçtir. Bu mekanizmalar hakkındaki bilgilerimizin çoğu fibril oluşturan kolajene dayandığından, bu tartışma çoğunlukla tip I kolajene odaklanacaktır. Üçlü sarmal oluşumu ve biyosentezinin temel mekanizmasının diğer kolajen türleri için de geçerli olması mümkündür. Fibril kolajen ile ilgili olarak, kolajen biyosentezi üzerine en detaylı araştırma yapılmıştır. İşlem karmaşıktır ve tümü son fibrillerin yapısına ve biyomekanik özelliklerine katkıda bulunan birçok hücre içi ve hücre dışı adımı içermektedir. Prokolajen zincirlerinin ribozomlar üzerinde sentezinden sonraki ilk olay, bunların kaba endoplazmik retikuluma girmesidir. Orada bir dizi post-translasyonel modifikasyondan geçerek prokolajen moleküllerinin bir araya gelmesine yol açmaktadırlar [32].

Bu adımlar, prolin kalıntılarının hidroksiprolin modifikasyonunu, lizinin hidroksilizine modifikasyonunu, N ve O bağlantılı glikosilasyon, trimerizasyon, disülfür bağı, prolil *sis-trans* izomerizasyonu ve üçlü spiral katlamayı içerir. Moleküller daha sonra Golgi ağından geçer ve burada hücre dışı matrise gecmeden önce salgı keseciklerine toplanırlar. Prokolajenin oluşması, salgılama sırasında veya kısa bir süre sonra gerçekleşir ve ardından fibriller birleştirilir. Son olarak, fibriller kovalent çapraz bağların oluşumuyla stabilize edilir [33].

## 2.4.3. Kolajenin tipleri

### 2.4.3.1. Kolajenin tipleri i, ii, iii, v and xi – fibril oluşturan kolajen

Klasik fibril oluşturan kolajen, kolajen tip I, II, III, V ve XI'i içerir. Bu kolajenler, 25 ila 400 nm arasında çaplara sahip fibriller sıra oluşturarak yüksek moleküllü supramoleküler kümeler halinde toplanma yetenekleriyle karakterize edilir. En yaygın olarak bulunan ve üzerinde çalışılan kolajen tipi tip I kolajendir. Organik kemik kütlelerinin %90'ından fazlasını oluşturur ve hiyalin kıkırdak, beyin ve vitreus gibi çok az doku dışında tendonların, cildin, bağların, korneanın ve birçok interstisyel bağ dokusunun ana kolajenidir. Üçlü sarmal lifler, genellikle tip III kolajen (deride ve retiküler liflerde) veya tip V kolajen (kemik, tendon, korneada) içerir. Çoğu organda ve özellikle tendon ve bağ dokusunda tip I kolajen, gerilme sertliği sağlar ve kemikte, özellikle kalsifikasyondan sonra, yük taşıma, gerilme mukavemeti ve burulma sertliği ile ilgili önemli biyomekanik özellikleri tanımlar [34].

Fibril oluşturan tip II kolajen, hiyalin kıkırdağın karakteristik ve baskın bileşenidir. Ancak vitreus gövdesinde, kornea epitelinde, notokordda, intervertebral disklerin nükleus pulposusunda ve embriyonik epitelde de bulunur. Tip II kolajenin üçlü sarmalı, tip I kolajene boyut ve biyomekanik özellikler bakımından benzer bir homotrimerik molekülden oluşur. Tip I kolajen ile karşılaştırıldığında, tip II kolajen zincirleri, yüksek oranda hidratlı hiyalin kıkırdağın matrisinin bir başka tipik bileşeni olan proteoglikanlar ile etkileşime aracılık eden glukozil ve galaktosil kalıntılarının yanı sıra daha yüksek bir hidroksilisit içerdiği gösterir. Tip III kolajen homotrimerdir ve kemik dışında tip I kolajen içeren dokularda yaygın olarak bulunur. Akciğerler, karaciğer, dermis, dalak ve damarların interstisyel dokusundaki retiküler liflerin önemli bir bileşenidir. Bu homotrimerik molekül ayrıca sıklıkla tip I kolajen ile karışık liflere katkıda bulunur ve ayrıca elastik dokularda bol miktarda bulunur [35].

Bu çalışmadaki "bağırsak kesesi" deneylerinde, jelatin hidrolizat uygulamasından sonra bağırsağın serozal tarafında 1 kD ila 10 kD arasında peptitler tespit edilmiştir, bu da jelatinin bir dereceye kadar yüksek oranda emildiğini düşündürdü. Özetle, bu çalışma jelatin hidrolizatın bağırsaktan emildiğini ve ideal olarak kıkırdağda biriktiğini göstermektedir. Bu bulgular, jelatinin spesifik amino asit ve peptit profilinin, oral jelatinin kas-iskelet sistemi dejeneratif koşullarındaki terapötik etkinliğine ilişkin önceki raporlardan sorumlu olabileceğini göstermektedir [36].

**Tablo 1.1.** Kolajen tiplerinin özellikleri

Kolajen Tipi	Özellikleri
I	Dokularda en çok bulunan türdür.
II	Heterofibrildir.
III	En çok elastik dokularda bulunur.
IV	Laminin, integrin, nidogen ile etkileşime girer.
V	Kolajen I'in çekirdeğini oluşturur; DNA, heparin sülfat, heparin, trombospondin ve insüline bağlanır.

#### 2.4.4. Tanımlama ve kantifikasyon yöntemleri

Kalite özelliğini değerlendirmek için en uygun analiz tekniğine güvenmek gerekir. SEC, MS ve NMR gibi teknikler, karmaşık peptit karışımlarını karakterize etmek için kullanılır. Boyut dışlama kromatografisi (SEC), bir kalite özelliği olarak kolajen hidrolizatlarının polidispersitesini belirlemek için yaygın olarak kullanılan iyi bilinen bir tekniktir [37]. Ayrıntılı SEC profili, üretim sürecinin tutarlılığını kanıtlamak için küçük farkları ve partiküller arasındaki kabul edilebilir fark aralığını tanımlayabilir. Bununla birlikte, kütle spektrometrisi (MS) ve nükleer manyetik rezonans (NMR) gibi en gelişmiş teknikler, karmaşık karışımlarda bulunan bileşenlerin tanımlanmasını ve özelliklerini belirlemek için daha hassas ve oldukça yetenekli yöntemlerdir. DSC, polimerlerdeki geçişleri ölçmek için kullanılan iyi geliştirilmiş bir analitik yöntemdir ve tipik olarak kolajen termal stabilitesini incelemek için kullanılır [38].

Bu çalışmada Sonja Gamsjaeger ve diğerleri başlıca mineralleştirici tip I içeren çapraz bağlardan birini, yani piridinolin'i (PYD) tanımlayan Raman spektroskopik parametrelerini doğrulamaktır. Bu amaçla, bilinen PYD içeriği (HPLC analizi ile belirlendiği üzere), insan kemiği, domuz derisi, preentin ve dentin hayvan modeli dokusuna sahip bir dizi kolajen çapraz bağlı peptit Raman mikrospektroskopisi ile analiz edilmiştir. Sonuç olarak, bu çalışmanın bulguları, Raman spektrumlarında  $\sim 1660 \text{ cm}^{-1}$  tepe noktasının (ikinci türev spektrumuna dayalı olarak) altında yatan amid I'in tespitinin, mineralize doku örneklerinde PYD kolajen çapraz bağlarının varlığını göstermektedir [39].

#### 2.4.5. Hidroksiprolin

Kolajen makromolekülünü oluşturan polipeptit aminoasitleridir ki, onun da % 23'ü prolin ve hidroksiprolin içermektedir [40]. HP tayininde kimyasal metot olan kolorimetrik ve kromatografik metotlar kullanılmaktadır [41].

Kolorimetrik yöntemde nümune asit kullanarak ısıtılır ve protein hidrolizatına parçalanır. Elde edilen hidrolizat kloramin T ile reaksiyona girerek pirolun oluşur. Tekrardan dimetilaminobenzaldehyt ile reaksiyona giren pirolunun renkli bileşikler meydana gelir. Bu bileşiğin absorbansı ölçülerek HYP miktarı hesaplanır [42].

Kromatografik yöntem olan iyon değiş-tokuş kromatografisi ve LC-MS/MS analiz süresi uzun ve duyarlılığı düşük olmasına rağmen güvenilir bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalara istinaden HPLC (High Performance

Liquid Chromatography) ve LC-MS/MS cihazların sonuçlarındaki hızlı gelişmeler nedeniyle amino asit analizlerinde bu tekniklere yönelme olmuştur. Bu yöntemlerde türevlendirilmiş protein hidrolizatı cihaza enjekte edilir. Oluşan pik alanı veya pik yüksekliğine nazaran hidroksiprolin miktarı bulunur. Glisin polipeptit zincirinin her üçüncü pozisyonunda görülmektedir. Makromolekül olan kolajen aminoasitlerinin %35'ni glisin, %1'ni alanin ve %23'nü prolin içerir. Prolinin yaklaşık yarısına hidroksil grubu (hidroksiprolin) bağlanmıştır. Kolajenin hidroksiprolin içeriği (%12,5) önemli bir bileşiktir ve kolajen tayininde mükemmel bir özellik kazandırmaktadır [43].

## **2.4.6. Kolajenin farmakoloji özellikleri**

### **2.4.6.1. Kolajenin hareket mekanizması**

Kolajenin hemostat ve pıhtı oluşturmak gibi özellikleri vardır ve kanamayı durdurmak içinde kullanılabilir. Hayvandan elde edilen (doğal) kolajen birçok klinik uygulamada kullanılır, ancak enflamasyon, tiplerarası değişkenlik ve olası hastalık transfeksiyonundaki rolü hakkında bazı endişeler vardır. Bağışıklık problemlerini önlemek için özelliklerini taklit edebilen bazı sentetik nanomalzemeler geliştirilmiştir. Buna göre KOD™ ticari adıyla kolajen geliştirilmiştir. KOD kolajen, antikoagülan fraksiyonlar, trombosit aktivasyonunu ve yapışmasını artırabilir. Aynı zamanda pıhtı şeklindeki trombositleri bağlar, onları aktive eder ve iltihaplanmayı teşvik etmeden iyileşmeyi destekler [44]. Jelatin, kolajen hidrolizi ile oluşturulan heterojen bir polipeptit karışımıdır. Jelatin hidrolizatın bağırsaktan emilmesinin yanı sıra jelatin emiliminin kıvamının incelenmesi de büyük önem taşımaktadır. Genel olarak, peptitlerin absorpsiyondan önce gastrointestinal sistemde hidrolize edildiğine ve böylece serbest amino asitlerin esas olarak dolaşıma girdiğine düşünülmektedir. Bununla birlikte, peptitlerin ve hatta makromoleküllerin de bozulmadan emilebileceğine dair çok sayıda kanıt vardır. Daha önceki araştırmalar, tüm peptitlerin ve makromoleküler proteinlerin bağırsaktan emilebileceğini ve bazı biyolojik işlevleri sürdürebileceğini göstermiştir.

Büyük bir kolajen molekülünün hidrolizi ile oluşturulan peptitler, sağlık açısından büyük faydalara sahip olabilir ve cildin özelliklerini iyileştirebilir. "Bağırsak kesesi" çalışmalarını kullanarak, Oeser ve diğerleri bağırsak yolunda tüketilen hidrolize kolajenin moleküler ağırlığını incelediler. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi ve sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi gibi teknikler, 1-10 kDa moleküler ağırlık aralığındaki peptitlerin absorbe edilebileceğini göstermiştir. Özetle, bu çalışma jelatin

hidrolizatın bağırsaktan emildiğini ve ideal olarak kıkırdakta biriktiğini göstermektedir. Bu bulgular, jelatinin spesifik amino asit ve peptit profilinin, oral jelatinin kas-iskelet sistemi dejeneratif koşullarındaki terapötik etkinliğine ilişkin önceki raporlardan sorumlu olabileceğini göstermektedir [36].

Bilimsel araştırmalar, kolajen hidrolizatın emilmesinden sonra vurgulanan birinci etkinin bir antioksidan, ikinci etkinin ise biyolojik aktivite olduğunu göstermiştir. Kolajen hidrolizat, epidermisen nem içeriğini iyileştirme, cildin yaşlanmasını önleme ve eklemleri ve bağ dokularını yenileme etkisine sahip biyoaktif bir bileşendir. Kolajen, kolajenaz enzimi tarafından parçalanır. Oral alımdan sonra, kolajen hidrolizatın %90'undan fazlası parçalanır ve hızla emilir. Kolajen hidrolizatın sindiriminin bir gıda ürünü olarak sağlıklı olduğu bulunmuştur [45-47].

Iwai ve diğerleri 12 saatlik açlıktan sonra kıkırdak hidrolize kolajen, tavuk budu ve domuz derisi yiyen sağlıklı insan gönüllülerin kanında hidroksiprolinden türetilen büyük miktarda hidrolize kolajen bulunduğunu gösterdiler. Kolajen tüketiminden sonra, kandaki hidroksiprolin içeren peptitlerin miktarı 2 saat sonra zirveye çıktı, ardından alımdan 4 saat sonra maksimum seviyenin yarısına düştü. Hidrolize kolajenin yutulmasını takiben kanda küçük bir peptit, prolin-hidroksiprolin (Pro-Hyp) tespit edilmiştir. Iwai ve diğerleri tarafından yapılan çalışmalar, Pro-Hyp'in sindirilemez bir peptit olarak kabul edilebileceğini göstermektedir, çünkü Pro-Hyp'in %75'inden fazlasının *in vitro* insan serum reaksiyonundan sonra 24 saat boyunca kanda kaldığı gösterilmiştir [46].

Chen. ve diğerleri balıklardan ekstrakte edilen çeşitli hidrolize kolajen konsantrasyonlarının fibroblastlar ve keratinositler üzerindeki etkisini incelediler. Özellikle kolajenin çoğalmasına ve gelişmesine baktılar. 48-97 µg/mL'lik kolajen konsantrasyonlarının optimal proliferasyonla sonuçlandığı bulunmuştur (%191) [48].

Ohara ve diğerleri üç kolajen tip I kaynağından insan kanındaki gıda kaynaklı jelatin hidrolizatların yapısını ve miktarını karşılaştıran tek kör bir çapraz analiz gerçekleştirdiler. Beş stabil erkek gönüllü, 12 saatlik açlıktan sonra balık pullarından, balık derisinden veya domuz derisinden kolajen tip I jelatin hidrolizatı almıştır. Çalışmada HP içeren peptitlerin yaklaşık yüzde 30'u 24 saatlik bir süre boyunca kanda bulunmuştur [49].

Bununla birlikte, peptitlerin tüketilene kadar gastrointestinal sistemde hidrolize edilebileceğine ve böylece esas olarak serbest amino asitlerin dolaşıma girebileceğine

dair önemli kanıtlar vardır. Hidroksiprolin iki şekilde ya amino asit ya da peptit kombinasyonu şeklinde emilmiştir [50].

Bağırsak zarından absorpsiyon mekanizması kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Epitel hücreleri, çeşitli besinlerin emilimi için kritik bölgelerdir. Oligopeptitlerin bağırsakta taşınmasının gerçekleşebileceği üç yol vardır: PEPT1'in aracılık ettiği dipeptitlerin ve tripeptitlerin PEPT1 aracılı taşınması [51]; proteinler gibi makromoleküllerin transsitotik yoldan taşınması [52]; ve pasif hücre içi yoldan peptit absorpsiyonunun taşınması. Bu yolların bağırsak oligopeptit absorpsiyonundaki tam rolü henüz tam olarak anlaşılamamıştır [53].

Kolajen peptitleri yuttuktan sonra sindirilir ve vücuda yayılır. Watanabe-Kamiyama ve arkadaşları, Wistar sıçanlarına <sup>14</sup>C etiketli prolin veya kolajen peptitlerinin uygulandığı bir *in vivo* deney yoluyla kolajen peptitlerinin cilde ve diğer dokulara verilmesini incelediler. Radyoaktivite, kolajen peptitlerinin alınmasından 0-6 saat sonra ve 14 gün sonra çeşitli dokularda değerlendirmiştir. Bulgular ciltte geçirilen süre açısından çok olumlu olup cilt dokusunda radyoaktivitenin 14 güne kadar yüksek kaldığını göstermiştir. Bu, kolajen peptitlerinin, temel avantajlarının gözlemlendiği dermisin cildine nüfuz etme kapasitesini gösterir [54].

#### **2.4.7. Emilim, dağıtım, metabolizasyon ve eliminasyon**

Kolajen hidrolizinin absorpsiyonundan sonra gösterilen ilk etkinin bir antioksidan olduğu ve ikincisinin biyolojik aktivite olduğu deneysel çalışmalarla gösterilmiştir [55]. Çalışmalar, oral uygulamadan sonra portal damarda ve kanda CH'nin saptandığını ve peptitlerin *in vivo* olarak daha büyük peptitler olarak bağırsaktan emildiğini göstermektedir.

Bazı çalışmalarda kolajen tripeptitin ortalama moleküler ağırlığı geleneksel kolajen peptitinkinden çok daha küçük olduğu için kolajen tripeptitin hızla kana emildiğini ve dokulara kolayca aktarıldığını göstermiştir. Araştırma sonuçlarına göre, kolajenin tripeptit olarak uygulanmasının fonksiyonel peptitlerin emilimini sağladığı öne sürülmüştür [56].

#### 2.4.8. Kolajenin emilimi ve dağılımı

Kolajen tıbbi uygulamalarda uzun süredir kullanılmaktadır, ancak absorpsiyon mekanizması iyi bilinmemektedir. Peptitler tipik olarak gastrointestinal sistemde absorpsiyona kadar proteolitik olarak sindirilir. Bununla birlikte, Oesser ve diğerleri oral yoldan uygulanan kolajen hidrolizatın fareler tarafından bağırsaklardan emilebileceğini ve tercihen kıkırdak dokusunda birikebileceğini öne sürmüştür [36]. Kolajen hidrolizatlarının oral yoldan alınmasından sonra kolajenden türetilen birçok peptitin insan serumu ve plazmasında tespit edilebileceği daha önce belirtilmiştir [46].

Ana makromolekül hücre dışı matrisi olan kolajen, tıbbi amaçlar için yaygın olarak kullanılır. Kamiyama ve diğerleri tarafından incelenmiş bu çalışmada, araştırmacılar düşük ağırlıklı moleküler kolajen hidrolizatın (LMW-CH) radyoaktif izleyiciler kullanarak absorpsiyonunu yorumladılar. Araştırmacılar vücuttaki radyoaktif dağılımı ölçtüler ve plazmanın radyoaktif peptitlerini analiz etmişlerdir. Burada araştırmacılar, kolajen hidrolizinin osteoporoz üzerindeki emilim mekanizması ve faydalı etkileri hakkında yeni bulgular tanımlamışlardır. Wistar sıçanlarında [14C] prolin (Pro grubu) veya glisil-[14C]prolil-hidroksiprolin (CT grubu), LMW-CH ile hızla artan plazma radyoaktivitesi gözlemlenildi. Her iki grupta da radyoaktivite uygulamadan 14 gün sonrasına kadar deride yüksek seviyede saptanmıştır [54].

Sneha ve diğerleri Gly-Pro-Hyp (GPH) ve Pro-Hyp (PH) gibi Hyp içeren peptitlerin, sıçanlarda yüksek moleküler ağırlıklı kolajene göre CTP'nin (kolajen tripeptit) oral uygulamasından sonra daha etkili bir şekilde emildiğini ve daha yüksek bir plazma seviyesine ulaştığını incelemişlerdir. Peptitler (H-CP). GPH ve PH'nin gastrointestinal sıvıda ve sıçan plazmasında 2 saat boyunca stabil olduğu bulunmuştur. GPH ve PH'nin biyolojik membranlara nüfuz etme kapasitesi de insan bağırsak mukozasının (Caco-2 hücre tek tabakası) *in vitro* bir modeli kullanılarak araştırılmışlardır [57].

Anne J. ve diğerleri dört kolajen hidrolizatını farklı matrislerde LC-MS/MS kullanarak analiz ederek hidrolizatların emilim öncesi ve sonrası durumunu *in vitro* veya *in vivo* olarak karşılaştırmışlardır. Elde edilen veriler analitik iş akışı, protein hidrolizatlarının davranışını araştırmak için özellikle yararlıdır. Yapıları genellikle yutmadan önce oldukça karmaşıktır ve sindirim ve absorpsiyon sırasında hidrolizat bileşenleri birçok enzime (geniş özgüllük ile) ve kimyasal hidrolize maruz kalacaktır. Birçok hidrolizat bileşeni, öncülerden üretilecek ve aynı zamanda bozunarak, ara



konsantrasyonların kaydedilmesinin yararlılığını azaltacaktır. Araştırmacılar, hedeflenmemiş ve hedeflenmiş veri analizinin karıştırılmasının veri toplamaya genel bir bakış sağlayabileceğini göstermişlerdir [58].

#### **2.4.9. Kolajenin metabolizasyonu ve eliminasyonu**

Bağ dokularında kolajen sentezi, salgılanması, birikmesi hakkında çok az şey bilinmektedir. Hücre ortamındaki değişikliklerin kolajen formlarında değişikliklere yol açtığı bilinmektedir ve  $K^+$  iyonlarındaki artış gibi basit değişikliklerin hücre proliferasyonunda ve hücre dışı matris sentezinde bir artışa yol açacağı kabul edilmektedir [59].

Bu süreçlerin tümü, kolajen sentezi formlarındaki düzenleyici değişiklikleri içerir ve bu değişiklikler, mezenkimal hücrelerin veya olgunlaşmamış fibroblastların ortamındaki değişikliklerden kaynaklanır veya tetiklenir. Kıkırdaklı kırık kallus oluşumunda, ektopik kemik oluşumunda ve çeşitli onarım süreçlerinde benzer varyasyonlar ortaya çıkar. Sentezlenen kolajen miktarının da çeşitli faktörlerden etkilendiği gösterilmiştir [60]. Örneğin askorbatın, prolil hidroksilaz aktivitesinde bir artış olsun veya olmasın kolajen sentezini arttırdığı gösterilmiştir [61]. Prostaglandinler E1 ve F1, kolajen sentezini indükler ve aktive eder, makrofajlar, granülasyon dokularında kolajen ve diğer proteinlerin sentezini uyaran çözünür bir faktör salgılar. Bu prostaglandinler inflamatuvar lezyonlarda arttığından, bu bulgular inflamasyonun neden kolajen sentezini uyardığını açıklamaya yardımcı olabilir. Prostaglandin E2, sayısız rapora göre, osteoblastlar tarafından kolajen sentezinin nispeten spesifik bir inhibitörüdür ve diğer bağ dokuları, hyaluronat üretimini taklit eden ancak kolajen üretimini inhibe eden bir veya daha fazla küçük temel protein üretir. Bununla birlikte, bu bulguların tümü ön bulgulardır ve kolajen transkripsiyonunun, translasyonunun ve translasyon sonrası modifikasyonların kontrolünün yanı sıra tüm bağ dokularında kolajen birikimi, stabilizasyonu ve bozunması için gerekli hücre dışı enzimlerin kontrolüne ilişkin daha birçok iyi temel çalışmaya acilen ihtiyaç vardır [62]. Kolajen metabolizması ve eliminasyonu hakkında az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu konuyla ilgili yapılan çalışmalar aşağıda listelenmiştir;

1. Bu derlemede kolajenin amino asit bileşimi ve ayrıca onun spesifik amino asitleri olan hidroksprolin ve hidrokasilisin sentezi hakkındaki mevcut bilgi durumu

tanımlanmıştır. Makale, tüm hayvanda kolajen veya metabolizmasını incelerken, kolajenin diğer bileşiklerle etkileşimlerini anlamının önemini vurgulamıştır [63].

2. Bu analiz, ciltte, tendonda, kemikte, kan damarlarında, kıkırdakta ve hücre zarlarında bulunan belirli kolajen türlerinin yanı sıra kolajen anabolizması ve katabolizmasındaki çeşitli temel adımları tartışmış ve aşırı kolajen birikimine bağlı hastalıkları ele almıştır [64].

3. Bu analiz, kolajen biyosentezi ve hücreSEL metabolizmada prolinin (Pro) işlevine ilişkin son bulgulara odaklanmıştır. Son araştırmalar, hücre dışı Pro'nun (kültür ortamına eklenen), glutamin (Gln) varlığında kültürlenmiş fibroblastlarda (birincil kolajen sentezlenmiş hücreler) kolajen biyosentezi üzerinde önemli ancak minimal bir etkiye sahip olduğunu bulmuşlardır. Bu çalışma, bu yöntemin önerilen mekanizmasını ve ayrıca bağ dokusu hastalıklarının farmakoterapisindeki potansiyel etkilerini tartışmıştır [65].

4. Kolajenin parçalanmasıyla oluşan prolin ve hidroksprolin, hücre yapısı ve işlevi için önemli amino asitlerdir. Yaşam döngüsü boyunca, omurgalı hayvanlar arasında prolin metabolizması ve gereksinimlerinde önemli farklılıklar vardır. Prolin ise yeni araştırmalara göre hücre metabolizması ve fizyolojisinin önemli bir düzenleyicisi gibi görünmektedir. Bu çalışmada prolin ve hidroksprolinin kimyasal yapıları ve işlevleri, prolin ve hidroksprolinin vücut proteinlerinde ve fizyolojik sıvılardaki gelişimsel değişiklikleri ve prolin metabolizması incelenmiştir [66].

#### **2.4.10. Kolajenin yan etkileri**

Kolajen, kanın pıhtılaşmasına, dokuyu yeniden şekillendirmeye yardımcı olduğu için yaygın olarak kullanılır. Bilinen hiçbir yan etkisi olmamasına rağmen, birçok klinik uygulamada hayvan kaynaklı (doğal) kolajen kullanıldığı göz önüne alındığında, iltihaplanma, gruptan gruba değişkenlik ve olası hastalık transfeksiyondaki rolü hakkında bazı endişeler vardır. Kolajen hidrolizatları içeren ürünler, ciddi yan etkiler bildirmeden uzun yıllardır kullanılmaktadır. Bununla birlikte, farklı kolajen hidrolizat formülasyonlarının pazarlandığını ve güvenlik üzerinde benzersiz bir etki gösterebileceğini anlamak da önemlidir. Ayrıca, ilaç toksisitesini kontrol etmek için farmasötik endüstrisinde rutin olarak kullanılan CaCo-2 ve HepG2 hücre hatları kullanılarak güvenlik *in vitro* olarak değerlendirilmiştir [67].

## **2.4.11. Kolajen ürünleri**

### **2.4.11.1. Kolajen takviyeleri**

Her protein eşit değerde olmadığı gibi kolajen tipleride farklı değerlerdedirler. Büyük molekülü kolajenle kıyasla düşük moleküler ağırlığına sahip hidrolize kolajen vücudumuz tarafından hızla sindirilir ve kan dolaşımımıza girer. Yapılan araştırmalara göre kolayca emilebilen ve vücudumuz tarafından kullanılabilen en uygun kolajen türü toz veya sıvı haldeki kolajendir. Bu tip kolajen besinler yoluyla alındığında vücudun kullanacağı kan dolaşımına çok kısa sürede ulaşır. Yüksek bir biyoyararlanıma sahiptir ve bu nedenle bu tipte en çok tercih edilen kolajendir. Biyoyararlanım açısından tablet veya kapsül şeklinde sağlanan kolajen hap şeklinde kullanımı diğerlerine göre daha düşüktür. Kapsül içindeki kolajenin midemizde sindirilmesi ve kan dolaşımına tam olarak girmesi daha zordur. Kolajen kapsüllerin başka dezavantajları da vardır. Kullanımı kolay gibi görünse de aslında yanıtıcı olabilir. İhtiyacınız olan günlük kolajen miktarını elde etmek için bu kapsüllerden günde 10-20 tane yutmanız gerekebilir. Kolajene ek olarak bu kapsüllerin üretiminde kullanılan kıvam arttırıcı ve emülgatör gibi bileşenler de vücuda alınmaktadır [68].

Vücudumuzun ihtiyacı olan kolajenin normal şartlarda sadece beslenme ile alınması çeşitli sindirim problemlerine veya kilo problemlerine neden olabilir. Kolajen saşe dozaj formu, ihtiyaç duyulan kolajen miktarı ile ekstra içerik içermeyen bir formül ile hazırlanır. Hiçbir katkı maddesi içermez, yiyecek ve içeceklerinize kolaylıkla ekleyebileceğiniz formda sunulur. Kolajenin paket şeklindeki ürünlerinin bir diğer avantajı da işte, evde veya okulda nerede olursanız olun kolayca tüketebilmenizdir. Tek kullanımlık paketlerde olması kullanım kolaylığı sağlar [69].

Kolajen ve hidrolizatları, insan diyetlerinin oluşturulmasında değerli besin lifleri ve protein kaynağı olarak önemli bir işlev göstermiştir [70]. İnsanlar yaşlandıkça kolajen sentezi azalacak ve dokular daha ince, daha zayıf ve daha az esnek hale gelecektir. Kolajen takviyeleri, kullanıcıların cilt, saç, tırnak ve vücut dokularını korumak için tasarlanmıştır. Yeni kolajen sentezini oluşturan fibroblastları çekerek, kolajen metabolitleri kemik, deri ve bağları birleştirir. Dermisteki kolajen fibrillerinin dermal kolajen liflerinin çapını ve kohezyonunu geliştirir. Bu nedenle, dokuların kalınlığı, esnekliği ve esnekliği ile hidrasyon geliştirilecektir. Kolajen en dıştaki cilt tabakasının suyu emme kapasitesini artırarak cilt dermisi ve epidermisinin işlevini geliştirilebilir. Cilt dokusunun nemlenmesi, pürüzsüzlük ile doğrudan ilişkilidir ve kırışmayı azaltır. Kolajen

takviyesi yağsız kas kazanımını artırabilir, iyileşmeyi hızlandırabilir, hasarlı eklem yapısını yeniden oluşturabilir ve kardiyovasküler performansı artırabilir. Bu, antrenmanlardan sonra yeni kas büyümesinde temel bir amino asit olan doğal kreatinin kolajen tarafından teşvik edilmesiyle elde edilir [71].

#### ***2.4.11.2. Sıvı kolajen***

Sıvı kolajen formları, toz kolajen formlarına benzer özelliklere sahiptir. Hidrolize kolajen takviyesi olduğu için emilimi daha hızlı ve kolaydır. Ancak sıvı haldeki kolajen aroma içerir. Kolajen takviyelerinin çoğu toz veya sıvı formda bulunur ve aromalı veya aromasız olabilir. Pek çok kişi, lezzetini değiştirmeden yemeklere ve içeceklerle karıştırılabildiği için tatlandırılmamış türü tercih eder. Aynı zamanda porsiyonu ve karışımı hazır olduğu için günlük hayatta da rahatlıkla tüketilebilir.

#### ***2.4.11.3. Katı dozaj formlarında oral kolajen***

#### ***2.4.11.4. Toz formu***

Toz halindeki kolajen takviyeleri vücuda girdiği andan itibaren mide, bağırsak gibi sindirim sisteminden sindirilerek organlara ulaşır. Bu şekilde daha yüksek verim elde edilir. Toz halindeki kolajen takviyelerinin kullanımı daha kolaydır, kahveye, suya veya tüketeceğiniz sıvıya katılarak rahatlıkla içilebilir. Bir araştırma, oral kolajen takviyeleri kullanmanın cilt elastikiyetini, hidrasyonunu ve kolajen yoğunluğunu iyileştirdiğini keşfetmiştir [72].

#### ***2.4.11.5. Kolajen tabletleri***

Kolajen tabletler, sıvı ve toz formlardan daha az hidrolize kolajen içerir. Daha fazla parçalanma özelliği olduğu ve emilmesi uzun sürdüğü için tercih edilmez.

#### **2.4.12. Gıda katkı maddesi olarak kolajen**

Kolajenler, yeterli miktarda hayvansal besin lifi sağlayan gıda katkı maddeleri olarak kullanılır. Kolajen veya onun hidrolizatları ile eklenen ham madde içeren etin teknolojik ve reolojik özellikleri geliştirilebilir. İçeriklere kolajen eklenmesi, ürünlerin kıvamını artırır. Santana ve diğerleri. ısı ile işlenen kolajen lifinin, gıda uygulamasında,

özellikle asidik ürünlerde emülgatör olarak kullanım için iyi bir potansiyele sahip olduğunu belirtmiştir [71].

#### **2.4.13. İçeceklerdeki kolajen**

Kolajen katkılı içecekler, günümüzde bir başka küresel pazar gelişimidir. Soya kolajeni, kakao kolajeni, kapuçino kolajeni, kolajen suyu içeceği gibi birçok ürün, üreticiler tarafından yayınlanmaktadır. Vücudun doğal yağ dokusu üretme kapasitesini arttırmaya yardımcı olmak için kolajenli bir enerji içeceği önerdi [73]. Kolajen içeceği genellikle vücudun kolajen üretim sürecini aktive ettiğini iddia eder, bu da vücudun dokularını destekleyecek ve cildin kırışıklıklarını ve sarkmasını azaltacaktır. Sonuç olarak, "Vitagen Collagen" içeceği, yararlı bağırsak bakterilerinin üretimini teşvik etmek ve cildin iyileşmesi için geliştirildi. Ayrıca Avon, somon balığı derisinden, C vitamininden ve saf ve yüksek kaliteli balık peptit kolajeninden yapılan fruktooligosakkaritlerden yapılan çığır açan bir içecek olan Avon Life Marine Fish Peptit Collagen Drink'i de geliştirmiştir [71].

Kolajen takviyelerinin artan popülaritesi ile kahveye kolajen peptitlerinin eklenmesi gibi bir dizi yeni trend geldi. Birçok insan bunun diyetlerine ekstra kolajen almak için mükemmel bir yöntem olduğuna inanıyor. Nötr aroması nedeniyle, aromalandırılmamış form, lezzetlerini önemli ölçüde değiştirmeden yemeklere ve içeceklere kolayca eklenebilir. Kahveye kolajen eklenmesi söz konusu olduğunda, en büyük sorun, yüksek sıcaklıkların takviyenin kalitesi üzerindeki etkisi olabilir. Proteinler genellikle yüksek sıcaklıklara veya asidik ve alkali çözeltilere maruz kaldıklarında denatüre olurlar ve bu da yapılarında küçük bir değişikliğe neden olur. Bu önemlidir, çünkü kolajen peptitleri genellikle kolajeni serbest bırakmak için hayvan derilerinin asidik veya alkalın bir çözeltiliye maruz bırakılmasıyla üretilir. Deriler daha sonra daha fazla kolajen peptiti çıkarmak için 190°F (88°C) kadar yüksek sıcaklıklarda suda kaynatılır [74].

Öyle olsa bile, eğer kolajen proteinleri daha da yüksek sıcaklıklara maruz kalırsa, proteini daha da bozan, bozunma olarak bilinen bir süreç meydana gelebilir. Şu anda, protein artık düzgün çalışmayabilir ve takviyeyi etkisiz hale getirebilir. Bir araştırma, kolajen proteinlerinin 302-788°F (150-420°C) arasında değişen sıcaklıklara maruz kaldığında, ilk parçalanmalarının 302°F (150°C) olduğunu buldu [75].

Öte yandan kahve normalde çok daha düşük bir sıcaklık aralığı 195–205°F’de (90–96°C) demlenir. Sonuç olarak, kolajen takviyesi eklediğinizde kahveniz 302°F’nin (150°C) altında olduğu sürece tozun kalitesi etkilenmemelidir [75].

### **3. GEREÇLER**

#### **3.1. Kullanılan Maddeler ve Reaktifler**

Analitik dereceli kimyasallar; hidroklorik asit, potasyum klorür, sodyum klorür, sodyum bikarbonat, sodyum sülfat ve mannitol ve LC-MS sınıfı çözücü; asetonitril, formik asit Sigma-Aldrich'ten (Amerika Birleşik Devletleri) satın alınmıştır. Hidroksiprolin, metaprolol tartarat ve fenol kırmızısı referans standartları da yine Sigma-Aldrich'ten (Amerika Birleşik Devletleri) satın alınmıştır. Kolajen hammaddeleri CelloCEL, Halavet ve Vernisol Türkiye'den alınmıştır. Hazırlanmış formülasyon Reneva'dan (Türkiye) satın alınmıştır.

#### **3.2. Kullanılan Cihazlar**

Kütle detektörü çalışmaları için LC-MS/MS 8040: Nexera XR serisi Shimadzu (Japonya) marka cihaz kullanılmıştır. Cihaz DGU-20A3R gaz giderici, LC-20AD gradyan pompa, SIL-20AC otomatik örnekleyici, CTO-10ASVP kolon fırını, SPD-M20A PDA dedektörüne sahip olup parçalar arası bağlantı CBM-20A iletişim modülü ile sağlanmaktadır. Cihaz Windows 7 ve LabSolutions 5.86 SP1 yazılımına sahiptir.

Kullanılan diğer yardımcı cihazlar ise Mettler Toledo (İsviçre) firmasına ait XSE 105 Dual Range model analitik terazi, SevenMulti model pH metre, Bandelin (Almanya) firmasına ait RK 100 H model ultrasonik banyo, Heidolph (Almanya) firmasına ait reax top model karıştırıcı ve çözeltilerin hazırlanmasında 20-100 µL ve 100-1000 µL aralığında çalışabilen Eppendorf (Almanya) firmasına ait Research model pipetörlerdir. Permaabilite çalışması için pompa Gilson (ABD) kullanılmıştır.

#### **3.3. Kromatografik Ayrım için Kullanılan Sabit Fazlar**

Çalışmalarda kromatografik ayırım için iki adet sabit faz denenmiştir. Bunlardan birisi Sigma Aldrich (Amerika Birleşik Devletleri) firmasına ait Supelco Ascentis® Express model C<sub>8</sub> fonksiyonel grubuna sahip (100×4,6 mm, ID, 2,7µm) ölçülerinde kolon ve diğeri de ChromaNik Technologies Inc. firmasına ait Sunshell C<sub>18</sub> (100×4,6 mm, ID, 2,6µm) kolonlardır.

### **3.4. Perfüzyon Gereçleri**

Çalışmalar esnasında kullanılan perfüzyon gereçleri olan peristaltik Pompa ve tubingler Gilson Inc. (Fransa) Firmasına aittir. Golytely çözeltisinin etkin maddeleri sodyum sülfat (Sigma Aldrich, Japonya), potasyum klorid (Sigma Aldrich, Japonya), sodyum klorid (Sigma Aldrich, İngiltere), sodyum hidrojen karbonat (Merck, Almanya), mannitol (Sigma Aldrich, İngiltere) kullanılmıştır. Metaprolol tartrat (İpca Hindistan), Fenol kırmızısı (Merck, Almanya) kullanılmıştır.

### **3.5. Deney Hayvanları**

Perfüzyon çalışmalarında kullanılan deney hayvanları ise Anadolu Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Birimi'ne (Eskişehir) ait Sprague-Dawley Dişi Sıçanlardır.



## 4. YÖNTEMLER

### 4.1. Deney Hayvanları Üzerinde Yapılacak İşlemler

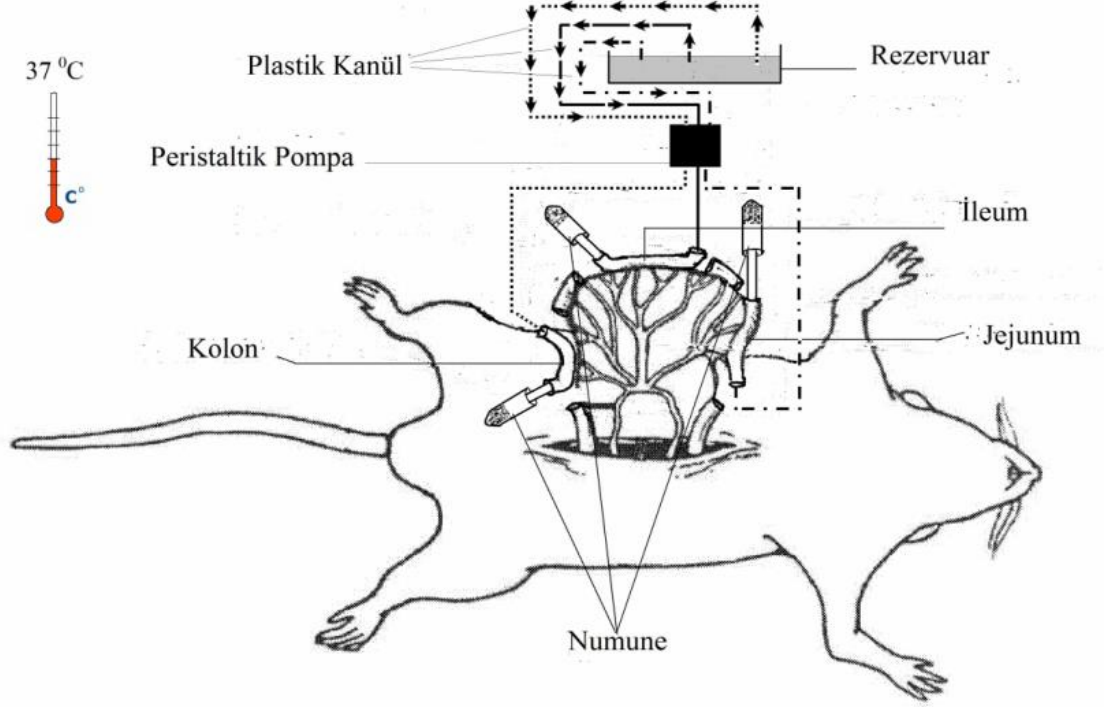
#### 4.1.1. Bağırsak perfüzyonu çalışmalarında cerrahi prosedürler

Bağırsak perfüzyonu çalışmaları için Anadolu Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan 09.03.2022 tarih ve 2022/08 protokol numaralı etik kurul izni alınmış ve çalışmalar etik kurula beyan edilen prosedürler kapsamında yapılmıştır. Perfüzyon çalışmaları için tek geçişli intestinal perfüzyon tekniği (*Single Pass Intestinal Perfusion*, SPIP) kullanılmıştır [11]. Perfüzyon deneyleri 200-250 g ağırlığındaki sıçanlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Deney öncesi hayvanlar aç bırakılmış ve çeşme suyu içmelerine izin verilmiştir. Cerrahi prosedürler süresince anestezi altındaki hayvanların deney süresince vücut sıcaklığı, ısıtıcı yatak yardımı ile 37°C' de sabit tutulmuştur. Anestezi ketamin:kxilazin (90:10 mg/kg) karışımının intraperitoneal (ip) enjeksiyonu yoluyla sağlanmıştır. Anestezi derinliği deney hayvanlarının ayak parmaklarının 38 sıkıştırılmasına verilen reaksiyona göre değerlendirilmiştir. Deney süresince anestezi derinliği takip edilerek gerektiğinde ek doz anestezi yapılmıştır.

Anestezi altında karın duvarı orta kısmından kesilerek bağırsaklar açığa çıkarılmıştır. Çalışmanın gerçekleştirileceği intestinal segment olan jejunum açığa çıkartılmış ve yaklaşık olarak 10 cm'lik kısmı tespit edilmiştir. İzole edilen barsak segmentinin proksimal ve distal uçlarına silikon tüpler yerleştirilerek cerrahi iplikle sabitlenmiştir. Bağırsak segmenti peristaltik pompanın bulunduğu perfüzyon sistemimize bağlanmıştır. Perfüzyon sistemine bağlı olan izole segment serum fizyolojik (37°C) ile 0,5 mL/dk perfüzyon hızında 15 dakika boyunca yıkanarak temizlenmiş ve temizlenme göstergesi olarak çözeltilerin berrak gelmesi esas alınmıştır. Temizleme işleminden sonra perfüzyon sistemindeki rezervuarda bulunan temizleme çözelti deney gruplarında bildirilen test çözeltileri ile değiştirilmiştir. Peristaltik pompa aracılığıyla akış hızı 0,2 mL/dk olacak şekilde ayarlanmış ve deney süresinde perfüzyon çözeltisi barsaktan tek geçişli olacak şekilde sirküle edilmiştir. Her deney sonunda perfüze edilen bağırsak segmenti çıkarılarak uzunluğu ölçülmüştür.

Deney süresince sıçanların vücut sıcaklığı 37°C'de sabit tutulmuştur. Perfüze edilen segmentlerin kurummasını önlemek için serum fizyolojikle ara ara ıslatılmış ve üzerleri parafilm ile kapatılmıştır. Deney sonunda hayvanlar servikal dislokasyon yöntemiyle öldürülmüştür ve her deney sonunda perfüze edilen barsak segmentleri

çıkarılarak uzunluklar tekrar ölçülmüştür. Perfüzyon sistemi ve cerrahi işlem Şekil 3.1’de şematik olarak gösterilmiştir [76].



Şekil 4.1. Perfüzyon sistemi ve cerrahi yöntemin şematik olarak gösterilmesi

Perfüzyon çalışmalarında kolajen test maddesi olarak kullanılmıştır. Ayrıca MT permeabilite katsayısının belirlenmesinde referans ilaç olarak kullanılmıştır. FK’de, sıfır absorpsiyona sahip referans maddesi, perfüzyon çalışmalarında NWF’ın (Net Water Flux) belirlenmesinde ve düzeltilmiş konsantrasyonların hesaplanması için perfüzyon çözeltisine eklenmiştir [11, 77, 78].

#### 4.1.2. Bağırsak perfüzyonu

*In situ* tek geçişli intestinal perfüzyon prosedürü uygulanması hedeflenmektedir. Perfüzyon çalışmaları belirlenmiş olan 4 grup üzerinde gerçekleştirilecektir. Gerçekleştirilen deneyler neticesinde elde edilen numunelerden kolajen (model ilaç), metoprolol tartarat (referans ilaç) ve fenol kırmızısı (sıfır permeabilite ajanı)’nın konsantrasyonları LC-MS/MS ile tespit edilmiştir.

#### 4.1.3. Veri analizi

Tüm sonuçlar ortalama  $\pm$  standart sapma kullanılarak verilmiştir. Çoklu karşılaştırma için Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. Deney grupları arasındaki farklılıkları belirlemek için, iki gruplu karşılaştırmalarda iki uçlu parametrik olmayan Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.  $p < 0,05$  anlamlı kabul edilmiş olup elde edilen sonuçlar Microsoft Excel 2007 versiyonu kullanılarak istatistiksel analize tabi tutulmuştur [77].

#### 4.1.4. Perfüzyon çözeltisi

Tüm perfüzyon çalışmalarında perfüzyon ortamı olarak “Golytely” (Tablo 4.1.) olarak adlandırılan izo-ozmotik çözelti kullanılmıştır. Perfüzyon çözeltisi taze olarak hazırlanmış olup pH’sı 7,4’e ayarlanmıştır [78]. İzole segment serum fizyolojikle 0,2 mL/dak akış hızıyla dengeye ulaşana kadar (yaklaşık 10 dk) perfüze edilmiştir. Ardından kaynaktan sağlanan kolajen hammadde (Vernisol) 22 mg/mL konsantrasyonda, metoprolol tartarat 400  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyonda, fenol kırmızısı 100  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyonda perfüzyon çözeltisine eklenerek 15 dakika dengeye ulaşana kadar ileum, perfüze edilmiştir. Sonra 60 dk boyunca her 10 dakikadan bir 2 mL nümune toplanmıştır. Toplanan numuneler içerisindeki metoprolol, fenol kırmızısı ve kolajen miktarı geliştirilmiş LC-MS/MS yöntemi ile tayin edilmiştir.

**Tablo 4.1.** Bağırsak perfüzyonu çalışmalarında kullanılan Golytely bileşimi

Madde	Konsantrasyon (mmol/L)
NaCl	25
KCl	10
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	40
NaHCO <sub>3</sub>	20
Mannitol	80

#### 4.1.5. Kolajen'in bağırsaklardan absorpsiyonunun incelenmesi

İzole segment serum fizyolojikle yıkandıktan sonra perfüzyon çözeltisiyle dengeye ulaşana kadar (yaklaşık 10 dk) perfüze edilmiştir. Perfüze edilen bağırsak segmentleri dengeye ulaştıktan sonra yapılan çalışmalar aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

#### 4.1.6. Deney grupları

**Grup 1:** İzole segment serum fizyolojikle 0,2 mL/dak akış hızıyla dengeye ulaşana kadar (yaklaşık 10 dk) perfüze edilmiştir. Ardından kaynaktan sağlanan kolajen hammadde (Halavet) 22 mg/mL konsantrasyonda, metoprolol tartarat 400 µg/mL konsantrasyonda, fenol kırmızısı 100 µg/mL konsantrasyonda perfüzyon çözeltisine eklenerek 15 dakika dengeye ulaşana kadar ileum, perfüze edilmiştir. Sonra 60 dk boyunca her 10 dakikadan bir 2 mL nümune toplanmıştır. Toplanan numuneler içerisindeki metoprolol, fenol kırmızısı ve kolajen miktarı geliştirilmiş LC-MS/MS yöntemi ile tayin edilmiştir.

**Grup 2:** İzole segment serum fizyolojikle 0,2 mL/dk akış hızıyla dengeye ulaşana kadar (yaklaşık 10 dk) perfüze edilmiştir. Ardından kaynaktan sağlanan kolajen hammadde (CelloCel) 22 mg/mL konsantrasyonda, metoprolol tartarat 400 µg/mL konsantrasyonda, fenol kırmızısı 100 µg/mL konsantrasyonda perfüzyon çözeltisine eklenerek 15 dakika dengeye ulaşana kadar ileum, perfüze edilmiştir. Sonra 60 dk boyunca her 10 dakikadan bir 2 mL numune toplanmıştır. Toplanan numuneler içerisindeki metoprolol, fenol kırmızısı ve kolajen miktarı geliştirilmiş LC-MS/MS yöntemi ile tayin edilmiştir.

**Grup 3:** İzole segment serum fizyolojikle 0,2 mL/dak akış hızıyla dengeye ulaşana kadar (yaklaşık 10 dk) perfüze edilmiştir. Ardından kaynaktan sağlanan kolajen hammadde (Vernisol) 22 mg/mL konsantrasyonda, metoprolol tartarat 400 µg/mL konsantrasyonda, fenol kırmızısı 100 µg/mL konsantrasyonda perfüzyon çözeltisine eklenerek 15 dakika dengeye ulaşana kadar ileum, perfüze edilmiştir. Sonra 60 dk boyunca her 10 dakikadan bir 2 mL numune toplanmıştır. Toplanan numuneler içerisindeki metoprolol, fenol kırmızısı ve kolajen miktarı geliştirilmiş LC-MS/MS yöntemi ile tayin edilmiştir.

**Grup 4:** İzole segment serum fizyolojikle 0,2 mL/dak akış hızıyla dengeye ulaşana kadar (yaklaşık 10 dk) perfüze edilmiştir. Ardından kaynaktan sağlanan oral yolla

uygulanan sıvı kolajen 28,16 mg/mL konsantrasyonda, fenol kırmızısı 200 µg/mL konsantrasyonda perfüzyon çözeltisine eklenerek 15 dakika dengeye ulaşana kadar ileum, perfüze edilmiştir. Sonra 60 dk boyunca her 10 dakikadan bir 2 mL nümune toplanmıştır. Toplanan numuneler içerisindeki metoprolol, fenol kırmızısı ve kolajen miktarı geliştirilmiş LC-MS/MS yöntemi ile tayin edilmiştir. Bu grupta MT kullanılmamıştır. Bu grupta kullanılan etkin madde üçüncü grupta kullanılan hammaddedir. Bu grup değerleri diğer grup değerleriyle kıyaslanacaktır.

Farklı firmalardan elde edilmiş kolajen hammaddelerinin her birinin moleküler ağırlığı 2000 Da ağırlığındadır. Üçüncü grupta kullanılan kolajen hammaddesinin dördüncü grupta sıvı formülasyonun etkin maddesidir. Sıvı formülasyonun içinde hialuronik asit, vitamin c, tatlandırıcılar gibi farklı bileşiklerde yer almaktadır.

## 4.2. Çalışmada Kullanılan Maddeler İçin Miktar Tayini

### 4.2.1. Enstrümental parametreler

LC-MS/MS analizlerinde sisteme gönderilen hareketli fazın akış hızı 0,5 mL/dk olup kolon fırın sıcaklığı 35,0±0,1°C olarak seçilmiştir. Otomatik örnekleyici termostat sıcaklığı numune ve standart çözeltilerin stabilitesinin korunması amacıyla 15±0,1°C'ye sabitlenmiş olup enjeksiyon hacmi ise 1 µL olarak belirlenmiştir. Analizlerde kullanılan optimize LC-MS/MS koşulları Tablo 4.2'de verilmiştir.

**Tablo 4.2.** Optimize LC-MS/MS koşulları

Kurutucu gaz akış hızı (azot)	15 L/dk
Nebülize edici gaz akış hızı (azot)	3,0 L/dk
Arayüz akımı	0,1 µA
DL sıcaklığı	250 °C
Isı bloğu sıcaklığı	450 °C
İyon tarama şekli	Çoklu Reaksiyon İzleme Modu (MRM)
İyon kaynağı	Elektrosprey İyonizasyon (ESI)

### 4.2.2. Standart çözeltilerinin hazırlanışı

Referans standartların hepsinin tüm stok çözeltileri ve çalışma çözeltileri, kütle dedektöründe yaşanan matris etkisi nedeniyle matris çözeltilerinin çözücü olarak kullanılmasıyla hazırlanmıştır. Bu amaçla FK ve MT'nin çözeltileri için hayvan

bağırsağından geçirilmiş Golytely çözeltisi çözücü olarak kullanılmıştır. HP'nin stok çözeltileri ise hayvan bağırsağından geçirilmiş golytely çözeltisinin yakılmasıyla elde edilen çözeltinin çözücü olarak kullanılmasıyla hazırlanmıştır.

FK ve MT'nin stok çözeltileri 150,0 µg/mL elde etmek üzere ilk olarak bu çözelti içinde 1,5 mg çözündürülerek hazırlanmıştır. Kalibrasyon, LOD, LOQ ve QC çözeltileri için diğer dilüsyonlar ise bu çözeltilerden gerekli seyreltmeler su ile yapılarak hazırlanmıştır.

HP'nin stok çözeltisi 100 µg/mL derişimde elde etmek için 1,0 mg analitin hayvan bağırsağından geçirilmiş golytely'nin numune analizi için yakıldığı gibi asidik hidroliz ortamına maruz bırakılarak hazırlanmasıyla elde edilen çözeltide hazırlanmıştır. Kalibrasyon, LOD, LOQ ve QC çözeltileri için diğer dilüsyonlar ise bu çözeltilerden gerekli seyreltmeler su ile yapılarak hazırlanmıştır.

#### **4.2.3. Kolajenin hidrolizi**

Bağırsaktan geçirilmiş 5 dakika vorteks karıştırıcıda iyice karıştırılmış perfüzyon çözeltisinden 45 µL alınmış 955 µL su ile seyreltilmiştir. Ardından deney tüpüne bu çözeltiden 508 µL alınmış içine 492 µL %37 (a/a) HCl çözeltisinden eklenerek 1 dakika vorteks karıştırıcıda karıştırılarak etüvde 110°C'de 24 saat bekletilmiştir. Deney tüpü 24 saatin sonunda çözücüsü uçmuş ve kararmış olarak etüvden alınmıştır. Ardından çözücüsü uçmuş bu hidrolizat su ile aşağıda bahsedilen seyreltme işlemleri yapılarak analiz edilmiştir.

#### **4.2.4. Numune çözeltilerinin hazırlanışı**

Numunelerin hazırlanmasında kolajenin asit hidrolizi yapılarak HP'nin açığa çıkarılması işlemi uygulanmıştır. Ancak böyle bir ortamda FK ve MT'de bozunmaya uğrayacağı için iki grup halinde analizleri gerçekleştirilmiştir. Bağırsaktan geçirilmiş 5 dakika vorteks karıştırıcıda iyice karıştırılmış perfüzyon çözeltisinden 45 µL alınmış 955 µL su ile seyreltilmiştir. Hazırlanan çözelti 5 dakika vorteks karıştırıcıda karıştırılmıştır. Ardından bu çözelti 10 kat su ile seyreltilip 2 dakika vorteks karıştırıcıda karıştırılarak LC-MS/MS cihazına enjekte edilmiştir.

Hidrolize edilen çözücüsü buharlaşmış kolajen çözeltisi 10 mL su ile seyreltilmiş ve çözelti 5 dakika vorteks karıştırıcıda karıştırılmıştır. Ardından bu çözelti 10 kat su ile

seyreltilip 2 dakika vorteks karıştırıcıda karıştırılarak LC-MS/MS cihazına enjekte edilmiştir.

#### **4.2.5. Geri kazanım çalışmaları için çözeltilerin hazırlanışı**

Geri kazanım çözeltileri FK ve MT'nin eş zamanlı analizi; HP'nin ise kolajenin asit hidrolizinden analiz edilmesinden dolayı iki ayrı grupta hazırlanmıştır. Bu amaçla her üç analit içinde kalibrasyon grafiğinin düşük (%80), orta (%100), ve yüksek (%120), seviyelerine karşılık gelecek şekilde çözeltileri hazırlanarak analiz edilmiştir. FK ve MT'nin çözeltileri hayvan bağırsağından geçirilmiş golytely çözeltilerinde hazırlanırken HP'nin geri kazanım çözeltileri hayvan bağırsağından geçirilmiş golytely çözeltilerinin asitte hidrolize edilmiş çözeltilerinde hazırlanmıştır.

Bu iki grup homojen çözeltilerden geri kazanım çözeltileri gerekli oranlarda su ile %80, %100 ve %120 oranlarına gelecek şekilde seyreltilerek hazırlanmıştır.

#### **4.2.6. Hareketli faz çözeltilerinin hazırlanışı**

Çalışmalar için optimum hareketli faz, su içinde %0,1 formik asit (*h/h*) ve asetonitril içinde %0,1 formik asit (*h/h*) izokratik olarak (60:40, *h/h*) karıştırılmasıyla elde edilmiştir. Her bir hareketli faz çözeltilerine gerekli miktarda formik asit eklenmiş ve hazırlanan çözelti çözünmesi için 15 dakika ultrasonik banyoda bekletilmiştir. Ardından Sartorius firmasına steril olmayan selüloz asetat membran filtrelerden (47 mm ID, 0,2 µm gözenek boyutu, Almanya) süzülmüştür.

#### **4.2.7. Sonuçların değerlendirilmesi**

MS dedektör sistemi için analitik yanıt, elde edilen kromatogramda her bir analit sinyalinin alanı olarak alınmıştır. Elde edilen sonuçların gruplar arası uyumu, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile incelenmiştir. İstatistiksel hesaplamalar için kullanılan program ise Microsoft Excel 2007 versiyonudur.

#### **4.2.8. Yöntem geçerliliğinin tespiti**

Geliştirilen yöntem ICH kılavuzunun tavsiye ettiği şekilde metot geçerliliği sağlanmış ve analitik kriterleri sağladığı gösterilmiştir [79]. Yöntem geçerliliği için

spesifiklik, doğrusallık, doğruluk, kesinlik, tayin alt sınırı, saptama sınırı ve sistem uygunluk testleri tam olarak yapılmıştır.

#### 4.2.9. Sistem uygunluk testleri

Çalışmada bir kromatografik sistemin sağlaması gerekli sistem uygunluk testleri ayrıntılı olarak hesaplanmış ve değerlerinin sınırlar arasında olduğu gösterilmiştir. Bu sistem uygunluk test parametreleri; teorik tabaka sayısı (N), kuyruklanma (T) ve asimetri faktörü ( $A_s$ ), kapasite ( $k'$ ) ve seçicilik faktörü ( $\alpha$ ) gibidir. Metot geliştirme sürecinde bu parametreler Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi (USP) metoduna göre hesaplanmıştır. Parametrelerin kabul edilebilirlik sınırları Tablo 4.4.'te verilmiştir.

**Tablo 4.3. SUT parametrelerinin sınırları**

SUT parametresi	Kabul edilebilirlik sınırı (USP)
Bağıl alıkonulma	-
Teorik plaka sayısı	$N > 2000$
Kapasite faktörü	$1 \leq k \leq 10$
Seçicilik	$\alpha > 1$
Kuyruklanma faktörü	$2 \leq T$
Pik asimetrisi	$0,95 \leq A_s \leq 2$
Pik alanının tekrar edilebilirliği	%BSS < 1,5 Genel ayrımlar %BSS < 5 Biyolojik numuneler %BSS 5-15 Eser element analizleri

#### 4.2.10. Seçicilik, spesifiklik

Önerilen yöntemin seçiciliğini incelemek için farklı bağırsaktan geçmiş boş golytely çözelti grupları kullanılmıştır. Her boş perfüzyon çözeltisi numunesi, numune hazırlama prosedürleri izlenerek ve yukarıda açıklanan kromatografik koşullar altında test edilmiştir. Birlikte salınan interferansların derecesinin ölçümü, analitsiz plazmanın MRM kromatogramları ile LLOQ'da analit eklenmiş plazmanın karşılaştırılmasıyla yapılmıştır. Deneyin kabul kriterleri, altı lottan en az dördünün, kalibratörlerin ve QC numunelerinin LLOQ seviyesi yanıtının < %20'sine sahip olması gerektiğini belirtmektedir.

#### 4.2.11. Doğrusallık ve aralık

Doğrusallık üç analit içinde altı seviye halinde (% 50, % 80, % 100, % 120, % 150 ve % 180) analiz edilmiştir. Bu seviyede kalibrasyon grafiği derişimleri FK için 1,58; 2,53;



3,16; 3,79; 4,74 ve 5,69  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ ; MT için 1,25; 2,00; 2,50; 3,00; 3,75 ve 4,50  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ ; HP için ise 34,25; 54,80; 68,50; 82,20; 102,75 ve 123,30  $\text{ng. mL}^{-1}$  konsantrasyon seviyelerinde analiz edilmiştir. Kalibrasyon eğrileri, kalibrasyon standartlarının konsantrasyonuna karşı pik alanları çizilerek yapılmıştır. Kalibrasyon eğrileri, ağırlıklı en küçük kareler doğrusal regresyon yöntemi ( $1/x^2$ ) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kabul kriterleri, sapmanın,  $\pm\%20$  olarak ayarlanan LLOQ hariç, geri hesaplanan standart konsantrasyonların nominal değerinin  $\pm\%15$ 'i olması gerektiğini belirtmektedir.

#### **4.2.12. Kararlılık**

Numune hazırlama, saklama ve numune analizi sırasında atılan her adımın analitin konsantrasyonunu etkilemediğinden emin olmak için FK, MT ve HP'nin stabilitesinin değerlendirilmesi araştırılmıştır. Kararlılık testlerinin sonuçları, başlangıç (sıfır döngü) stabilite numune konsantrasyonu ile karşılaştırılmıştır. Stabilite numunelerinin taze numunelerden sapması  $\pm\%15$  aralığında olmalıdır [80].

Stok çözelti stabilitesi, 2-8°C'de kısa süreli depolama sırasında 6 saat ve 4 gün boyunca ölçülmüş ve depolanan stok çözeltinin yanıtı, taze hazırlanmış bir çözeltinin tepkisi ile karşılaştırılmıştır.

##### **4.2.12.1. Donma-çözülme kararlılığı**

Her üç analit içinde  $\%100$  konsantrasyon seviyesinde (FK için 3,16  $\mu\text{g/mL}$ , MT için 2,50  $\mu\text{g/mL}$  ve HP için 68,50  $\text{ng/mL}$ ) hazırlanan numuneler derin dondurucuda en az 12 saat saklanmış ardından oda sıcaklığında çözülmeye bırakılmıştır. İşlem üç döngü için tekrarlanmış ve sonuçlar sıfır döngü örnekleriyle karşılaştırılmıştır.

##### **4.2.12.2. Tezgah üstü stabilite**

Her üç analit içinde  $\%100$  konsantrasyon seviyesinde (FK için 3,16  $\mu\text{g/mL}$ , MT için 2,50  $\mu\text{g/mL}$  ve HP için 68,50  $\text{ng/mL}$ ) hazırlanan numuneler toplam hazırlama süresini (yaklaşık 12 saat) kapsayan bir süre boyunca oda sıcaklığında bırakılmış, daha sonra analiz edilmiş ve sonuçlar taze hazırlanmış numunelerle karşılaştırılmıştır.

#### **4.2.12.3. İşlenmiş numune kararlılığı**

Her üç analit içinde %100 konsantrasyon seviyesinde (FK için 3,16 µg/mL, MT için 2,50 µg/mL ve HP için 68,50 ng/mL) hazırlanan numuneler 15°C’de bir otomatik numune alıcıda saklanmış ve numunelerin enjeksiyon veya ekstre edilen numunelerin yeniden enjeksiyonundaki ara sıra gecikmelerden etkilenmemesini sağlamak için 24 saat sonra değerlendirilmiştir.

#### **4.2.13. Taşınma**

Taşınma, yüksek konsantrasyonlu bir numuneden (ULOQ) sonra enjekte edildiğinde boş numune piklerinde bir analitik sinyalin görünümüdür. Bulaşma, yüksek konsantrasyonlu bir numuneden sonra üç boş numune enjekte edilerek ölçülmüştür (ULOQ, üç analit içinde 300,0 µg mL<sup>-1</sup>). Aktarma, LLOQ’de analitin pik alanının <20’i olmalıdır.

#### **4.2.14. Doğruluk**

Doğruluk çalışmaları her üç analit içinde düşük seviyede (FK için 2,53 µg/mL; MT için 2,00 µg/mL; HP için 54,80 ng/mL), orta seviyede (FK için 3,16 µg/mL; MT için 2,50 µg/mL; HP için 68,50 ng/mL) ve yüksek seviyede (FK için 3,79 µg/mL; MT için 3,00 µg/mL; HP için 82,20 ng/mL) olmak üzere 3 farklı seviyede (%80, %100 ve %120) hazırlanarak analizleri yapılmıştır. Her seviye için 3 paralel set hazırlanmış, elde edilen sonuçların standart sapma (S), bağıl standart sapma (%BSS) ve %95 güven seviyesinde güven sınırları ile ortalama geri kazanım hesaplanmıştır.

##### **4.2.14.1. Matris etkisi**

Matris etkisini ölçmek için altı farklı boş golytely çözeltisi kullanılmıştır. Analitler, FK ve MT üç konsantrasyon seviyesi oluşturmak için hayvan bağırsağından geçirilmiş boş golytely numunesine eklenmiştir. HP ise hayvan bağırsağından geçirilmiş boş golytely çözeltisinin asit hidrolizi ile yakılması ile elde edilmiş çözeltide hazırlanmıştır. Matris faktörü (MF), her bir boş plazma numunesi partisi için hesaplanmış; analit pik alanları suda hazırlanmış standart çözeltilerin ortalama pik alanları değeri ile karşılaştırılmıştır. Söz konusu MF < %15 olmalıdır [80, 81].

#### 4.2.15. Kesinlik

RSD olarak ifade edilen gün içi ve günler arası kesinliğin ölçümü için her üç analit içinde düşük seviyede (FK için 2,53 µg/mL; MT için 2,00 µg/mL; HP için 54,80 ng/mL), orta seviyede (FK için 3,16 µg/mL; MT için 2,50 µg/mL; HP için 68,50 ng/mL) ve yüksek seviyede (FK için 3,79 µg/mL; MT için 3,00 µg/mL; HP için 82,20 ng/mL) olmak üzere 3 farklı seviyede (%80, %100 ve %120) hazırlanarak analizleri yapılmıştır. Gün içi kesinlik, aynı gün içinde altı tekrarın analizi ile gerçekleştirilirken, günler arası kesinlik, 3 gün boyunca tekrarlanan analizlerle değerlendirildi. Doğruluk, ortalama değerlerin nominal değerden sapması olarak ölçülmüştür. Alt kantitasyon limiti (LLOQ) dışında doğruluğun %85-115 arasında (doğruluğun LLOQ seviyesinde %80-120 arasında olması gerekmektedir) ve kesinliğin ilgili standardın %15'i içinde (LLOQ seviyesinde ise <%15) olması gerekmektedir [80, 81].

#### 4.2.16. Teşhis ve tayin alt sınırı

Teşhis alt sınırı (LOD), analitin bilinen konsantrasyonlarına sahip numunelerin analiziyle ve analitin güvenilir bir şekilde tespit edilebileceği minimum seviyenin belirlenmesiyle belirlenir. Tayin alt sınırı (LOQ) ise analitik koşullar altında kabul edilebilir doğruluk ve hassasiyetle belirlenebilen en düşük konsantrasyondur. Genel olarak LOQ, LOD'nin üç katı olarak tahmin edilebilir [82]. Çalışmada S/N oranının 3,3 katına karşılık gelen derişim LOD, 10 katına karşılık gelen derişim ise LOQ olarak hesaplanmıştır.

#### 4.2.17. Sağlamlık

Söz konusu metodun analiz koşullarında maruz kaldığı küçük değişikliklerden etkilenme miktarı saptanmıştır. Bu amaçla her bir analit için kalibrasyon eğrisinin %100 seviyesindeki derişimde çözeltileri hazırlanmış ve akış hızı ( $\pm$ %10), kolon sıcaklığı ( $\pm$ %10) ile hareketli fazın apolar bileşen yüzdesinde ki ( $\pm$ %10) değişimlerden etkilenme miktarları hesaplanmıştır.

## 5. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 5.1. Miktar Tayini

Çalışmada bağırsaktan geçirilen perfüzet karışımlarının LC-MS/MS ile analizi tercih edilmiştir. Bunun en büyük nedenlerinden birisi perfüzet karışımında analizi yapılmak istenen kolajendir. Kolajen analizi için yukarıda da bahsedildiği gibi çeşitli yöntemler mevcuttur. Ancak bu çalışmada çeşitli avantajlarına istinaden kolajenin asit hidrolizi ile ortaya çıkan HP nin kantitatif analizi tercih edilmiştir. HP, ultraviyole aralığında zayıf bir şekilde emilir. Tespiti ve kantitasyonu için geleneksel yöntem olan kimyasal türevlendirme kullanılmıştır. Analiz sırasında içinde bulunduğu tuzların, amino asitlerin, şekerlerin ve yağ asitlerinin etkileşimlere neden olabileceği ve hidroksprolinin doğru nicelleştirilmesini engelleyebileceği biyolojik matrisinde karmaşık şekilde ortaya çıkar. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kapsamlı gradyanlarla hidroksprolini bu tür etkileşimlerden ayırma özelliğine sahiptir. Kimyasal türevlendirme veya kapsamlı LC gradyanlarının kullanımıyla elde edilen seçicilik ve duyarlılık sonuçlarına rağmen, hidroksprolinin miktar tayini için bazı kütle spektrometrisi tabanlı yaklaşımlar da vardır. Son zaman lösün, izolösün ve hidroksprolin izomerlerinin dahil olduğu izobarik amino asitlerin ayrı olarak saptanması ve nicelleştirilmesi hidrofilik etkileşim kromatografisinin kullanımıyla mümkün olmuştur. Amino asitlerin parçalanması sonucu oluşan 46 kütle biriminin kaybı düşük enerjili çarpışma kaynaklı ayrışma (CID) kütle spektrometrisinin sonucudur ve bu karakteristik özellik, bu tekniklerin seçiciliğini arttırmak için nötr kayıp taramalarında kullanılmıştır. Bu makalede LC-MS/MS analitik yöntemiyle HP miktarının belirlenmesini anlatılmıştır. Yöntem önce kimyasal türevlendirme gerektirmez, basit, hızlı, sağlam ve doğrudur [83].

Yapılan ön denemelerde perfüzyon çözeltisinde yer alan diğer iki perfüzet olan FK ve MT'nin kolajenin asit hidrolizi sonucu ortaya çıkan çözeltiden eş zamanlı analizlerinin mümkün olmadığı görülmüştür. Bu nedenle iki ayrı numune analizi çalışmada sunulmuştur. FK ve MT perfüzyon çözeltisinden eş zamanlı analizleri yapılırken HP'nin analizi ayrı yapılmıştır. Ancak geliştirilen sıvı kromatografisi metodu her iki analit grubu içinde aynıdır.

### 5.1.1. Sıvı kromatografisi çalışmaları

Sıvı kromatografisi çalışmalarında verimli kromatografik ayırım için Supelco Ascentis® Express model C<sub>8</sub> fonksiyonel grubuna sahip (100×4,6 mm, ID, 2,7µm) ve ChromaNik Technologies Inc. firmasına ait Sunshell C<sub>18</sub> (100×4,6 mm, ID, 2,6µm) olmak üzere iki sabit faz denenmiştir. Kromatografik ayırımın etkinliği verimliliği FK ve MT karışımının analizi için daha çok üzerinde durulmuştur. Sunshell C<sub>18</sub> kolonda kromatografik ayırım da MT iyi bir alıkonulma zamanı verirken (3,0 dk) FK oldukça geç (9 dk) kolondan çıkmıştır. Optimizasyon çalışmalarında kullanılan apolar faz ise asetonitrildir. Bu nedenle sabit faz değiştirilmiş Supelco C<sub>8</sub> kolonu seçilmiş ve daha iyi bir alıkonma zamanı elde edilmiştir.

Çalışmada metanol gibi farklı apolar fazlar denenererek en uygun apolar faz olarak asetonitril, MRM<sup>+</sup> iyonlaşma modundan dolayı da iyonlaştırıcı ajan olarak formik asit tercih edilmiştir. Apolar fazın ve formik asidin yüzdesi ayrıntılı olarak optimize edilmiş buna bağlı olarak kolon sıcaklığı ve enjeksiyon hacmi de incelenmiştir. Sonuç olarak en uygun kromatografik ayırım için optimum hareketli faz, su içinde %0,1 formik asit (*h/h*) ve asetonitril içinde %0,1 formik asit (*h/h*) izokratik olarak (60:40, *h/h*) karıştırılmasıyla elde edilmiştir. Hareketli fazın pH 2,6 olarak ölçülmüştür ve akış hızı 0,5 mL/dk olarak pompalanmıştır. Optimize kromatografik koşullar da her bir analit için elde edilen SUT verileri Tablo 5.2’de verilmiştir. Elde edilen değer sınırlar içerisinde olup analiz için uygundur.

**Tablo 5.1.** FK, MT ve HP için elde edilen SUT verileri

Parametre	FK	MT	HP
Alıkonulma zamanı (dk)±GA*	3,87±0,03	2,73±0,02	2,76±0,001
Alıkonulma zamanı için %BSS	0,87	0,95	0,28
Pik alanı kesinliği için %BSS (n=6)	0,13	0,64	0,13
Alıkonulma zamanı için enjeksiyon kesinliği %BSS (n=6)	0,28	0,39	0,19
Kuyruklanma faktörü (T)	1,26	1,13	1,44
Teorik tabaka sayısı (N)	2643	15255	10039
USP Genişlik	0,33	0,21	0,11
HETP (USP)	32,32	9,85	14,982

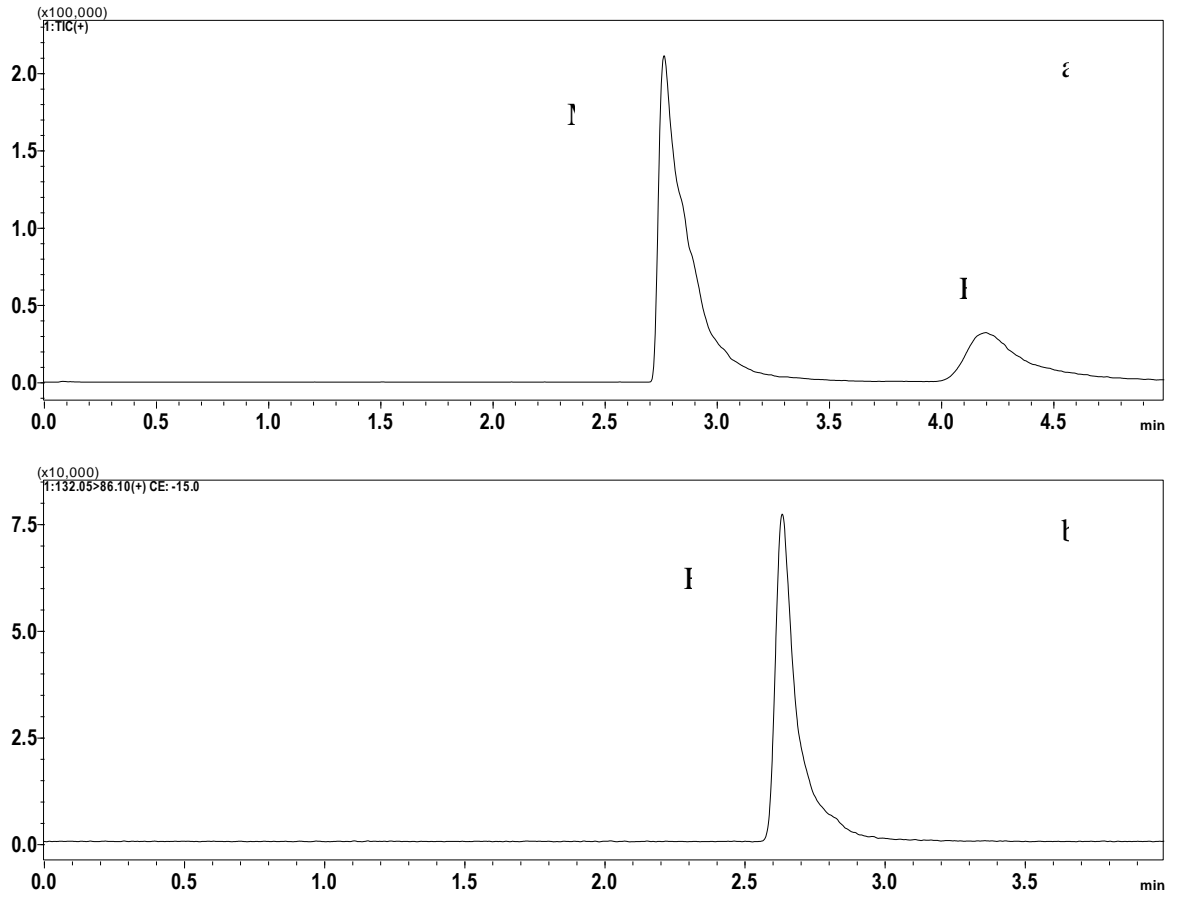
### 5.1.2. Kütle dedektöründe FK, MT ve HP iyonlaşma karakteristiği

Çalışmada her bir analitin kütle dedektöründe iyonlaşma özellikleri incelenmiş ve her üçünün de Elektrosprey iyonizasyon (ESI) ile çoklu reaksiyon görüntüleme pozitif modda (MRM<sup>+</sup>) yüksek iyonlaşma verdikleri görülmüştür. İyonlaşma karakteristiklerine bakıldığında HP'nin ana iyonu olan  $m/z$  132,05'ten  $m/z$  68,10 ve  $m/z$  86,10 yavru iyonları; FK'nın ana iyonu olan  $m/z$  355,10'dan  $m/z$  273,10 ve  $m/z$  261,00 iki yavru iyon ve MT'nin ana iyonu olan  $m/z$  267,95'den  $m/z$  227,10;  $m/z$  251,20 ve 116,15 olmak üzere üç yavru iyon sinyali elde edilmiştir. Şiddetleri en yüksek olan yavru iyonlar seçilmiş ve MRM + taramasına tabi tutularak optimize edilmişlerdir. Her bir analit için en yüksek sinyal şiddeti veren yavru iyonları ve optimize çarpışma enerjileri Tablo 5.3'de verilmiştir. Her bir iyon için tutma süresi 100 ms olarak seçilmiştir.

**Tablo 5.2.** HP'nin pozitif modda çoklu reaksiyon izlemede ESI koşulları

Bileşik	Ana İyon	Yavru İyon	Q1 Pre Bias (V)	CE(V)	Q3 Pre Bias (V)
MT	266,25	116,15	-18,0	-19,0	-21,0
FK	355,10	261,00	-17,0	-22,0	-26,0
HP	132,05	86,10	-14,0	-15,0	-16,0

Miktar tayini çalışmaları LC-MS/MS ile iki ayrı metot olarak yapılmıştır. Kolajen analizinin asit hidrolizi sonu ortaya çıkan HP miktarından yapılmasından ve bu koşullar altında FK ve MT 'den güvenilir sonuçlar alınamamasından dolayı bu yönteme başvurulmuştur. Asit hidrolizi ortamında özellikle MT miktarında azalma fazla olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle numune analizlerinde iki ayrı pozitif toplam iyon kromatogramı (TIC+) elde edilmiştir. Örnek olarak her bir analit için TIC+ Şekilde 5.1.'de verilmiştir.



Şekil 5.1. Optimize koşullar altında MT, FK (a) ve HP (b) için elde edilen TIC+

## 5.2. Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu

Perfüzat karışımının analizi için geliştirilen optimize metodun tam validasyonu her üç analit içinde yapılmıştır. Bağırsaktan geçirilmiş altı ayrı hidrolizat numunesine HP eklenerek altı standart seti hazırlanmıştır. FK ve MT içinse altı bağırsaktan geçirilmiş golytely çözeltisi ile hazırlanmıştır. Yöntemin dinamik aralığını, saptama sınırını, kesinliğini ve doğruluğunu belirlemek için her numune üç kez (farklı günlerde) analiz edilmiştir. Tablo 5.4’de verildiği gibi her üç analit içinde belirtilen aralıkta lineerdir ( $R^2 > 0,99$ ). Matris içinde hazırlanan MT ve HP kalibrasyon standartları,  $< 8\%$  nispi standart sapmalar gösterirken, FK kalibrasyon standartları da  $< 10\%$  BSS göstermiştir. Kompleks hidrolizatta iyon bastırma etkileri gözlemlenmiş ve saf standartlardan ziyade matris eşli kalibrasyon standartlarının kullanılması gerekmiştir.

**Tablo 5.3** *FLB için doğrusallık ve kesinlik verileri*

Parametre	FK (µg/mL)	MT (µg/mL)	HP (ng/mL)
<b>Doğrusal aralık</b>	1,58-5,69	1,25-4,50	34,25-123,30
<b>Eğim±SH<sup>a</sup> (gün içi, n=6)</b>	159605±7546	651771±26594,7	4700±117
<b>Kesim±SH<sup>a</sup> (gün içi, n=6)</b>	-103088±28911	395466±80611	865±9676
<b>Tanımlayıcılık katsayısı (gün içi, n=6)</b>	0,9991	0,9934	0,9975
<b>Teşhis sınırı (ng/mL)</b>	252,00	62,90	1,34
<b>Tayin sınırı (ng/mL)</b>	757,00	189,00	3,93
<b>Eğim±SH<sup>a</sup> (günler arası, k=3, n=18)</b>	160481±7810	656008±29495	4558±173
<b>Kesim±SH<sup>a</sup> (günler arası, k=3, n=18)</b>	-105345±29924	389638±89402	9269±14334
<b>Tanımlayıcılık katsayısı (günler arası, k=3, n=18)</b>	0,99061	0,99198	0,99429
<b>ANOVA</b>	F(2,17)=0,0002 P=0,99977 (P>0,05)	F(2,17)=0,0003 P=0,99978 (P>0,05)	F(2,17)=0,0035 P=0,99654 (P>0,05)

<sup>a</sup> Standart hata

Optimize edilen söz konusu LC-MS/MS yöntemi ile FK, MT ve HP'nin analiz edilecekleri matris içinde geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. FK ve MT için eş zamanlı analizlerinin yapıldığı bağırsaktan geçirilmiş golytely çözeltili, HP için ise bağırsaktan geçirilmiş ve asit hidrolizine tabi tutulmuş çözeltilinin çözücüsü uçmuş kalıntının suyla seyreltilmesiyle elde edilen çözeltili kullanılmıştır. Kısaca geri kazanım çalışmalarının yapıldığı matris; her bir analit için numune hazırlama prosedürünün birebir aynısı ile hazırlanmıştır. Elde edilen geri kazanım verilerinden hesaplanan kesinlik ve doğruluk parametrelerine ait bilgiler Tablo 5.5'de verilmiştir.



**Tablo 5.4 Geri kazanım verileri (n=3)**

	Eklenen	Bulunan $\pm$ GA*	SS	Kesinlik		Doğruluk	
				BSS (%)	Geri kazanım (%)	Hata (%)	
FK ( $\mu$ g/mL)	2,53	2,36 $\pm$ 0,03	0,04	1,71	93,4	-6,61	
	3,16	3,11 $\pm$ 0,04	0,05	1,62	98,5	-1,09	
	3,79	3,75 $\pm$ 0,14	0,18	4,78	99,0	-0,36	
MT( $\mu$ g/mL)	2,00	1,94 $\pm$ 0,01	0,01	0,64	96,8	-3,16	
	2,50	2,49 $\pm$ 0,02	0,03	1,16	99,4	-0,52	
	3,00	2,99 $\pm$ 0,02	0,03	0,87	99,7	-0,27	
HP (ng/mL)	54,80	53,00 $\pm$ 0,24	0,29	0,56	96,7	-3,28	
	68,50	64,82 $\pm$ 0,37	0,46	0,71	94,6	-5,37	
	82,20	76,56 $\pm$ 0,19	0,24	0,32	93,1	-6,86	

\*%95 Güven seviyesinde

Geliştirilen yöntemin kullanılabilirliğinin en önemli özelliklerinden biriside sağlamlığının ifade edilmesidir. Sağlamlık yöntemin bulunduğu koşullardaki ufak değişikliklerde gösterdiği performansın ifadesidir. Elde edilen sonuçlar Tablo 5.7’de sunulmuştur.

Çalışmanın diğer bir önemli adımı da analitlerin kararlılıklarının tespit edilmesidir. Bu özellikle uzun süren perfüzyon çalışmaları için de çok önemli bir yere sahiptir. Bu nedenle her bir analitin kısa dönem ve uzun dönem kararlılıkları ayrıntılı olarak incelenmiştir. Kısa dönem kararlılık için oda sıcaklığı koşulları ve otomatik örnekleyici koşulları ayrı olarak incelenmiştir. Uzun dönem kararlılık içinde analitlerin saklama koşulları seçilmiş olup çözeltiler analiz koşullarında hazırlandığı gibi hazırlanmıştır. Kolajen çözeltilerinin kararlılık çalışmaları ise perfüzyon çözeltilerinde hazırlanmış çözeltilerin farklı koşul ve sürelerde bekletilip yakılmasıyla elde edilmiştir. Kararlılık analizlerinde kullanılan kolajen hammaddesi ise CelloCEL’dir. Analizlerden elde edilen hesaplamalar Tablo 5.3’de sunulmuştur. Sonuçlara göre etken maddeler çalışma koşullarında kararlı olup elde edilen sonuçlar sınırlar içerisindedir.

**Tablo 5.5** Sağlamlık verileri (n=3)

	<b>Deęiřtirilen Parametre</b>	<b>Pik Alanı</b>	<b>%Fark ± SS</b>	
<b>FK</b>	Akış hızı (mL/dk)	0,55	2107060	3,12±1,1
		0,45	1904348	-9,65±2,0
	Hareketli faz organik çözücü oranı (%)	45,0	1779498	-15,6±1,0
		35,0	2322957	10,2±1,3
	Kolon sıcaklığı (°C)	38,0	2031195	-3,64±2,6
		32,0	1991402	-5,52±0,8
<b>MT</b>	Akış hızı (mL/min)	0,55	314999	-18,9±0,1
		0,45	346767	-10,8±0,04
	Hareketli faz organik çözücü oranı (%)	45,0	266342	-31,5±0,5
		35,0	388424	-0,09±0,2
	Kolon sıcaklığı (°C)	38,0	427634	-9,98±2,2
		32,0	435268	-11,9±0,8
<b>HP</b>	Akış hızı (mL/min)	0,55	375864	11,9±0,62
		0,45	322881	-3,90±0,53
	Hareketli faz organik çözücü oranı (%)	45,0	335009	-0,29±0,61
		35,0	388941	15,8±0,93
	Kolon sıcaklığı (°C)	38,0	366144	-8,97±0,31
		32,0	354443	-5,49±0,76

**Tablo 5.6.** FK, MT ve HP'nin standart çözeltilerinin kararlılık çalışmaları (n=3)

	Eklenen derişim	Kısa dönem kararlılık (24 s, oda sıcaklığı)		Kısa dönem kararlılık (48 s, +15 °C)		Uzun dönem kararlılık (3 hafta, -20°C)		Dondurma çözme kararlılığı (3 tekrar)	
		Bulunan (Ortalama±GA*)	GK (%)	Bulunan (Ortalama±GA*)	GK (%)	Bulunan (Ortalama±GA*)	GK (%)	Bulunan (Ortalama±GA*)	GK (%)
FK (µg/mL)	3,16	3,05±0,01	96,54	3,04±0,01	96,14	2,93±0,01	92,80	2,95±0,01	93,39
MT (µg/mL)	2,50	2,41±0,06	96,74	2,38±0,04	95,23	2,36±0,03	95,23	2,38±0,06	93,67
HP (ng/mL)	68,50	68,49±0,10	99,98	66,47±0,64	97,0	66,40±0,48	96,93	66,38±0,36	96,90
Kolajen (mg/mL)	1,00	0,90±0,07	90,14	0,91±0,08	90,59	0,89±0,01	90,77	0,89±0,02	89,05

\*%95 seviyesinde güven aralığı

### 5.3. Analitik Metot

Çalışmamızda metodu geliştirmeden önce birkaç metod denenmiştir. Bunlardan ilki 10 mL kolajen standardını tripsin ile hidrolize uğratarak hazırlanmış çözeltinin üzerine 10 mL amonyum bikarbonat (50 mM pH 8,0) tamponu ilave edilmiştir. Kolajen çözeltisi 100°C'de 10 dakika boyunca ısıtılarak denatüre edildi ve oda sıcaklığında soğutuldu. Kolajen çözeltisine 200 µL tripsin tamponu (1mg/mL 50 mM) ilave edilerek 16 saat 37°C'de parçalanmaya bırakılmıştır. Numune HPLC cihazıyla analiz edilmiş, fakat analiz sonunda pik alanı bulunamamıştır [84]. Başka bir metotta da 1mg/mL 1N HCl ekleyerek 48 saat 37°C derecede yakılmış, seyreltme yapılmıştır. Analiz edildi ve olumlu sonuç alınamamıştır [85]. Diğer çalışmada kolajeni 0,1 g tartarak 500 mL su ve triklorasetik asit ilave edildi. Analiz yapılmış ve pik alanı bulunamamıştır. [86]. Geliştirdiğimiz metotta 5 mg kolajen alıp üzerine 5 mL su ilave edilerek çözündürülmüştür. Tüplere çözeltilerden 508 µL, üzerine de 492 µL HCl ekleyerek 24 saat 110°C de yakmaya bırakıldı. Sonuçlar analiz edilerek ve pik alanları tespit edilmiştir. İşlem sonrasında yapılan tüm analizler geliştirdiğimiz bu metodu baz alarak uygulanmıştır [87].

### 5.4. Perfüzyon Deneyleri

İlaçların permeabilitesini için perfüzyon çözeltinin tek geçişli veya sirkülasyonlu çeşitleri vardır. Çalışmamız sıçan barsağının ileum segmentinde 10 cm'lik uzunluktaki alanda yapılmıştır. Perfüzyon çözeltisi 60 dakika boyunca sabitlediğimiz alandan akarak nümuneleri toplanmıştır. Çalışmamızda model ilaç olarak kozmetik ürün olan kolajenin permeabilitesini incelemek için tek geçişli perfüzyon tekniği kullanılmıştır. Bu tekniği seçmemizin nedeni cerrahi yöntemin kolay olması ve *in vivo* koşullara yakın bir teknik olmasıdır. Bu teknikde dişi sıçanlar kullanılmıştır. Perfüzyon çözeltisi olarak nötr pH değerinde izoozmotik çözelti olan Golytely çözeltisi kullanılmıştır. Perfüzyon çözeltisine eklenen MT, FK literatüre göre eklenmiştir. Kolajen miktarı oral uygulamada kullanılan sıvı çözeltilerin içinde bulunan en çok değere göre eklenmiştir. Perfüzyon çözeltisinde metoprolol tartarat 400 µg/mL, fenol kırmızısı 200 µg/mL olarak kullanılmıştır [88]. Deney sırasında kullanılan referans maddesi olan metoprolol tartaratla kolajenin ortalaması, standart sapması ve varyasyon katsayısı verilmiştir. Kullanılan model ilacın permeabilitesini karşılaştırmak için BCS sınıf I'de yer alan MT kullanılmıştır. *In vivo* biyoyararlanım çalışmalarında BCS kriterleri esas alınmaktadır. Sisteme göre ilaçlar 4 gruba ayrılır. BCS'ye göre oral yolla kullanılan ilacın etkin maddenin yüksek çözünürlük

ve yüksek permeabiliteye ilacınsa yüksek çözünme hızına sahip olmalıdır. Eğer ilaç ürünü belirtilen ortamlarda ilk 30 dk içerisinde %85'den fazla çözünüyor ise, hızlı çözünüyor olarak tanımlanmaktadır. Deney sırasında kolajenin tüm hammaddeleri yüksek çözünürlüğe sahiptir. Kolajen makromolekül bir protein olduğu için permeabilitesinin zayıf olması düşünülmektedir. Fakat birçok üründe kolajenin hidrolize uğratarak daha düşük molekül oluşturuyorlar. Bu durumda kolajen hidrolizatlarının permeabilitesi yükseliyor. Bizde çalışmamızda kullanılan hammadde ve oral yolla kullanılan sıvı formülasyonun permeabilitesine baktık. Permeabilitesini kullandığımız referans maddesi olan MT'nin  $P_{eff}$  değerleriyle kıyas olarak değerlendirdik. Metoprololun  $P_{eff}$  değeri  $0,38 \pm 0,06 \times 10^{-4}$  bu aralıkta normal permeabilite olarak kabul edilmektedir [89]. Yapmış olduğumuz ilk grubun sonuçlarına bakıldığında ilk grubun permeabilite değerleri diğer gruplara göre az absorbe olmuş, diğer gruplardan aldığımız sonuçlara göre kolajen yüksek permeabilite göstermiştir. Yaptık olduğumuz hayvan deneyleri başarılı şekilde bitmiştir. Geliştirmiş olduğumuz metotla kolajenin miktar tayini yapılmıştır.

Metoprolol tartaratın fenol kırmızı ve metmorfinle birlikte HPLC cihazında analizi yapılabilmesi için metot geliştirilmiş ve bağırsak perfüzyonu çalışması yapılmıştır. Yöntem seçicilik, duyarlılık, doğrusallık, kesinlik, doğruluk, kararlılık için doğrulanmıştır. Sonuçta tüm kalibrasyon eğrileri doğrusaldır ( $r > 0,9986$ ). Yöntemin kesinlik ve doğruluk değerleri gerekli limitleri karşılamıştır. Jejunum, ileum ve kolon boyunca metoprolol ortalama geçirgenlik değerlerine karşılık gelen değerler  $5.77 \pm 3.37$ ,  $4.33 \pm 0.48$  ve  $10.5 \pm 3.15 \times 10^{-5}$  cm/s idi. Bu sonuçlar, metoprololun jejunum ve kolon boyunca geçirgenliğinin düşük olarak sınıflandırılabilirliğini, buna karşın ileum boyunca geçirgenliğinin yüksek olduğunu göstermektedir [90].

Bağırsak perfüzyon çalışmaları için biyolojik bir matriste (boş perfüzyon ortamı) HPLC cihazında asiklovir, metoprolol ve fenol kırmızısı eşzamanlı tespiti için metod geliştirilmiş ve doğrulanmıştır. Yöntem, doğrusallık, doğruluk, kesinlik, seçicilik açısından iyi bir performans göstermiştir. Bu yeni geliştirilmiş ve onaylanmış yöntem, yerinde bağırsak geçirgenliği deneylerinin standardizasyonu için rutin bir temelde kolayca kullanılabilir [91].

Çalışmada sıçan *in situ* bağırsak perfüzyon çalışmalarından alınan numunelerde metoprolol, propranolol ve fenol kırmızısının eş zamanlı tayini yapılmıştır. Tek geçişli bağırsak perfüzyon tekniği (SPIP), su akışını düzeltmek için fenol kırmızısı gibi emilmeyen bir işaretleyicinin kullanıldığı bileşiklerin bağırsak absorpsiyonunun

çalışmasında kullanılan en çok kullanılan klasik tekniktir. Yerinde geçirgenlik çalışmaları için propranolol ve metoprololün yanı sıra fenol kırmızısının eş zamanlı nicelleştirmesi için 227 nm'de UV saptamalı basit ve hızlı ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntem geliştirilmiştir. Kalibrasyon eğrileri, 4,24, 2,18 ve 8,57 ng/mL tespit limiti ve 14, 7,2 ve 28,3 ng miktar limiti ile 7,5-125 µg/mL konsantrasyon aralığında her üç bileşik ( $r > 0.999$ ) için doğrusaldır. Sırasıyla metoprolol, propranolol ve fenol kırmızısı için test içi ve testler arası kesinlik için varyasyon katsayısı %8'den az ve doğruluk %93,6-107 arasında saptanmıştır. Örnek analizi için SPIP tekniği ve önerilen HPLC yöntemi kullanılarak propranolol ve metoprolol bağırsak geçirgenlik katsayıları için sırasıyla  $0.49 \text{ e}^{-4} (\pm 0.19) \text{ cm/sn}$  ve  $0.32 \text{ e}^{-4} (\pm 0.09) \text{ cm/sn}$  ortalama değerleri elde edilmiştir [88].

**Tablo 5.7.** Deney gruplarında kolajen ve  $MT P_{eff}$  değerleri ( $10^{-4}$  cm/sn)

Barsak segmenti (İleum)	Kolajen	Metoprolol tartarat
Grup 1	0,451± 0,141	0,362±0,112
Grup 2	0,914±0,893	0,222±0,944
Grup 3	0,966±0,581	0,321±0,913
Grup 4	0,888±0,369	

**Tablo 5.8.** Deney gruplarında SS, Ortalama,  $V_k$  ( $10^{-4}$  cm/sn)

Deney grupları		Kolajen	Metoprolol tartarat
	Ortalama	0,451	0,362
Grup 1	Standart sapma	0,135	0,112
	Varyasyon katsayısı	0,299	0,310
	Ortalama	0,914	0,222
Grup 2	Standart sapma	0,893	0,944
	Varyasyon katsayısı	0,149	0,157
	Ortalama	0,966	0,321
Grup 3	Standart sapma	0,581	0,193
	Varyasyon katsayısı	1,16	3,22
	Ortalama	0,880	
Grup 4	Standart sapma	0,370	
	Varyasyon katsayısı	0,617	

### 5.5. Net Su Akışı Değerlerine Ait Bulgular

Perfüzyon sırasında absorpsiyonunu etkileyen faktörler su emilimi ve salgılanması zamanı, hesaplanan  $P_{eff}$  değerlerinde hatalara neden olabileceğinden su akışını düzeltmek için emilemeyen bir işaretçiye ihtiyaç vardır. Bu amaçla fenol kırmızısı ilaç bileşikleri ile birlikte perfüze edilir. İlk olarak 1923'te Gorham tarafından barsaklardan absorplanmayan bir referans olarak tanıtıldı [88]. Negatif bir net su akışı, mukozal taraftan (lümen) serozal tarafa (kan) sıvı kaybını gösterir. Pozitif bir net su akışı, sıvının segmente salgılandığını gösterir. Stabil su akışının olması intestinal bariyer fonksiyonunun korunduğunun göstergesi olarak da alınmıştır [92]. Bizim çalışmamızda fenol kırmızısı kolajen ve metoprolol tartarat ile birlikte perfüzyon çözeltisine eklenmiş ve perfüzyon deneyleri sonrası her bir barsak segmenti için fenol kırmızısı konsantrasyon

oranları hesaplanmıştır. Bu oran belirtildiği şekilde hem kolajenin permeabilite değerinin hesaplanmasında kullanılan konsantrasyon oranını hem de net su akış değerlerini hesaplamak amacıyla kullanılmıştır. Tek geçişli bağırsak perfüzyonunda test edilen bileşikler için belirlenen NWF değerleri ve tablo 5,9 listelenmiştir. Oranın 1'e eşit olması barsak segmentlerinde su dengesine ulaşma göstergesi olarak alınmıştır. Ayrıca, insan bağırsağında ortalama  $P_{eff}$  değeri yaklaşık  $<0,3e^{-4}$  cm/s olan bileşikler, düşük geçirgen bileşikler olarak kabul edilir. Laboratuvarımızda devam eden farklı fizikokimyasal özelliklere sahip çok sayıda bileşiğin sıçan bağırsağında SPIP yöntemi ile  $P_{eff}$  değerlerinin belirlenmesi, insanda absorbe edilen oral dozun tahminini sağlayabilir. İnsan *in vivo* çalışmaları zor ve zaman alıcı olduğundan, bu tahmin, ilaç geliştirmenin erken bir aşamasında oldukça ilgi çekicidir. Gruplarımızın bazı hayvan gruplarında negatif oran sıvı kaybının göstergesidir. Pozitif oran ise sıvının segmenti olduğunu gösterir.



**Tablo 5.9.** *Gruplar için NWF değerleri*

İleum	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4
Hayvan 1	-0,719	-0,275	0,203	-0,998
Hayvan 2	0,332	-0,149	0,102	-0,265
Hayvan 3	-0,275	-0,2991	0,1921	-0,563
Hayvan 4	0,4804	-0,1327	0,12045	0,288
Hayvan 5	0,12965	-0,4085	0,70895	-0,159
Hayvan 6	-0,1136	-0,6772	0,51843	-0,7401

## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yiyecek ve içecek sektörlerinde kolajenin önemli bir bileşen olduğu kanıtlanmıştır. Kolajen, ürünlerin kıvamını arttırmak için protein diyet takviyeleri, et işleme taşıyıcıları, yenilebilir film ve ürün kaplamaları ve gıda katkı maddeleri olarak kullanılmıştır. Ayrıca kolajen, ürünün sağlığını ve besin değerini iyileştirebilir. Çalışmamız, kolajen hidrolizatın sağlık ve cilt üzerindeki yararlı etkilerini ve ayrıca kolajen hidrolizatın oral alımının bir sonucu olarak yüksek düzeyde biyoyararlanımını desteklemiştir. Hayvanlar üzerinde deney sürecimiz başarılı şekilde sonuçlanmıştır.

Bu araştırmada kolajenin miktar tayini için kolajeni asit hidroliziyle parçalayarak hidrokisprolin elde edilmiş ve analiz yapmak için LC-MS/MS cihazında metot geliştirilmiştir. Geliştirilen metodun optimizasyonu ve metodun ICH Q2R1 kılavuzuna göre tam validasyonu yapılmıştır. Kolajenin bağırsak segmenti olan ileumda gastrointestinal permeabilitesi için Sprague Dawley dişi sıçanlar üzerinde *in vivo* deneyler yapılmıştır. Deneylerde farklı kolajen hammaddeleri ve oral yolla uygulanan sıvı formülasyonu kullanılmıştır.

Çalışmamızda perfüzyon çözeltileri hazırlarken referans madde MT ve FK ekleyerek kolajenin permeabilite ve NWF değerlerinin, hesaplanmasında ve kıyaslanmasında kullanılmıştır. Çıkan analiz sonuçlarına göre kolajenin hammaddelerinin ve sıvı formülasyonunun permeabilitesi yüksek olduğu incelenmiştir.

Bu araştırma kolajenin sıvı formülasyonu üzerinde analiz yapılarak sonuçlanmıştır, geliştirilen metotla kolajenin katı dozaj şekillerinin de miktar tayinini yapmak ve permeabilitesine bakmak için istikamet verecektir. Ayrıca kullandığımız konsantrasyonlarda diğer çalışmalarda kullanılabilir. Araştırmada kullandığımız kolajen tip 1 ve tip 3 içermektedir ve moleküler ağırlığı düşüktür. Kullanılan hammaddelerinin moleküler ağırlığı 2000 Da ağırlığındadır. Deneylerin permeabilite değerlerine baktıkta kolajen hammaddeleri yüksek permeabilite göstermektedir. Gruplar arasında da hammaddelerin permeabilite değerleri farklılık göstermektedir. İlk grupta değeri MT referans maddemizle kıyaslandığında permeabilitesi yüksektir, fakat diğer grupların kolajen hammaddeleriyle kıyaslandığında daha düşük permeabiliteye sahiptir. Grup 2'te ve grup 3'teki değerleri referans maddemizle kıyasladıkta permeabilitesi yüksektir ve değerleri birbirine yakındır. Deney grubu 3'te kullanılan hammadde deney grubu 4'teki sıvı formülasyonun etkin maddesidir. Sıvı formülasyonun permeabilitesi MT göre yüksek

permeabilite göstermektedir, fakat diğer grup hammaddelerinin permeabilite değerlerinden daha dūşüktür. Bu da sıvı formülasyon içindeki diğer bileşiklerin permeabiliteye etki etmekte olduğunu düşündürmektedir. Permeabilite değerleri moleküler ağırlıktan etkilenmektedir. Bunun içinde bu çalışmamızı baz alarak moleküler ağırlığı büyük olan kolajen ürünlerine ve kolajenin ayrı-ayrı tiplerinde analizleri yapılabilir. Günümüzde sıklıkla kullanılan kozmetik ürünü kolajenin permeabilitesiyle ilgili çalışmalar çok az bulunmaktadır. Araştırma literatüre de katkı sağlamaktadır. Geliştirilmiş metod ve yapılmış deneyler gelecekteki çalışmalara yön verecek niteliktedir.

## KAYNAKÇA

- [1] Levin, J., Momin, S.B. (2010). How much do we really know about our favorite cosmeceutical ingredients? *The Journal of clinical and aesthetic dermatology*, 3 (2), 22.
- [2] Ivens, U., Steinkjer, B., Serup, J., Tetens, V. (2001). Ointment is evenly spread on the skin, in contrast to creams and solutions. *British Journal of Dermatology*, 145 (2), 264-267.
- [3] Kerscher, M. (2009). Aesthetic and cosmetic dermatology. *European Journal of Dermatology*, 19 (5), 530-534.
- [4] Baroni, A., Buommino, E., De Gregorio, V., Ruocco, E., Ruocco, V., Wolf, R. (2012). Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clinics in dermatology*, 30 (3), 257-262.
- [5] Lin, J.Y., Fisher, D.E. (2007). Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature*, 445 (7130), 843-850.
- [6] Draelos, Z.D. (2022). *Cosmetic dermatology: products and procedures*. John Wiley & Sons.
- [7] Anissimov, Y.G., Jepps, O.G., Dancik, Y., Roberts, M.S. (2013). Mathematical and pharmacokinetic modelling of epidermal and dermal transport processes. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65 (2), 169-190.
- [8] Svensson, U.S., Sandström, R., Carlborg, Ö., Lennernäs, H., Ashton, M. (1999). High *in situ* rat intestinal permeability of artemisinin unaffected by multiple dosing and with no evidence of P-glycoprotein involvement. *Drug metabolism and disposition*, 27 (2), 227-232.
- [9] Sinko, P.J., Hu, P., Waclawski, A.P., Patel, N.R. (1995). Oral absorption of anti-aids nucleoside analogues. 1. Intestinal transport of didanosine in rat and rabbit preparations. *Journal of pharmaceutical sciences*, 84 (8), 959-965.
- [10] Kasim, N.A., Whitehouse, M., Ramachandran, C., Bermejo, M., Lennernäs, H., Hussain, A.S., Junginger, H.E., Stavchansky, S.A., Midha, K.K., Shah, V.P. (2004). Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification. *Molecular pharmaceuticals*, 1 (1), 85-96.
- [11] Wagner, D., Spahn-Langguth, H., Hanafy, A., Koggel, A., Langguth, P. (2001). Intestinal drug efflux: formulation and food effects. *Advanced drug delivery reviews*, 50, S13-S31.

- [12] Zakeri-Milani, P., Valizadeh, H., Tajerzadeh, H., Azarmi, Y., Islambolchilar, Z., Barzegar, S., Barzegar-Jalali, M. (2007). Predicting human intestinal permeability using single-pass intestinal perfusion to rat. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 10 (3), 368-379.
- [13] Gelse, K., Pöschl, E., Aigner, T. (2003). Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Advanced drug delivery reviews*, 55 (12), 1531-1546.
- [14] Prasad, O., Sinha, L., Gupta, G.P., Misra, N., Mehrotra, C., Agnihotri, R.C., Lal, J. (2006). Theoretical study of temperature induced transition and hyper stability of collagen mimics. *Polymer*, 47 (5), 1674-1677.
- [15] Ding, C., Zhang, M., Li, G. (2014). Rheological properties of collagen/hydroxypropyl methylcellulose (COL/HPMC) blended solutions. *Journal of Applied Polymer Science*, 131 (7)
- [16] Swatland, H., Ananthanarayanan, S., Goldenberg, A. (1994). A review of probes and robots: implementing new technologies in meat evaluation. *Journal of animal science*, 72 (6), 1475-1486.
- [17] Chen, J.-H., Chiu, C.-W., Chen, L.-C., Lai, S.-Y., Lee, C.-C. (2012). Conformational structure and aggregation behavior of poly [2-methoxy-5-(2-ethylhexyloxy)-1, 4-phenylenevinylene] in toluene/nonane solutions. *Polymer*, 53 (21), 4843-4854.
- [18] Shi, X., Ma, W., Sun, C., Wu, S. (2001). The aggregation behavior of collagen in aqueous solution and its property of stabilizing liposomes *in vitro*. *Biomaterials*, 22 (12), 1627-1634.
- [19] Liu, W., Li, G. (2010). Non-isothermal kinetic analysis of the thermal denaturation of type I collagen in solution using isoconversional and multivariate non-linear regression methods. *Polymer degradation and stability*, 95 (12), 2233-2240.
- [20] Pinali, C. (2008). *Cross-correlation of amino acid sequence data to explain fibril formation in a number of collagen subtypes*. Cardiff University (United Kingdom).
- [21] Hong, H., Fan, H., Chalamaiah, M., Wu, J. (2019). Preparation of low-molecular-weight, collagen hydrolysates (peptides): Current progress, challenges, and future perspectives. *Food chemistry*, 301, 125222.

- [22] Shoulders, M.D., Raines, R.T. (2009). Collagen structure and stability. *Annual review of biochemistry*, 78, 929-958.
- [23] López-Morales, C.A., Vázquez-Leyva, S., Vallejo-Castillo, L., Carballo-Uicab, G., Muñoz-García, L., Herbert-Pucheta, J.E., Zepeda-Vallejo, L.G., Velasco-Velázquez, M., Pavón, L., Pérez-Tapia, S.M. (2019). Determination of peptide profile consistency and safety of collagen hydrolysates as quality attributes. *Journal of food science*, 84 (3), 430-439.
- [24] Silver, F.H., Birk, D.E. (1984). Molecular structure of collagen in solution: comparison of types I, II, III and V. *International Journal of biological macromolecules*, 6 (3), 125-132.
- [25] Oosterlaken, B.M., Vena, M.P., de With, G. (2021). *In vitro* mineralization of collagen. *Advanced Materials*, 33 (16), 2004418.
- [26] Sams, A. (1999). Meat quality during processing. *Poultry Science*, 78 (5), 798-803.
- [27] Rowe, R. (1974). Collagen fibre arrangement in intramuscular connective tissue. Changes associated with muscle shortening and their possible relevance to raw meat toughness measurements. *International Journal of Food Science & Technology*, 9 (4), 501-508.
- [28] Jawad, H., Brown, R. (2011). Mesoscale Engineering of Collagen as a Functional Biomaterial.
- [29] D'souza, Z., Chettiankandy, T., Ahire, M., Thakur, A., Sonawane, S., Sinha, A. (2020). Collagen–structure, function and distribution in orodental tissues. *Journal of Global Oral Health*, 2, 134-139.
- [30] Shigemura, Y., Akaba, S., Kawashima, E., Park, E.Y., Nakamura, Y., Sato, K. (2011). Identification of a novel food-derived collagen peptide, hydroxypropyl-glycine, in human peripheral blood by pre-column derivatisation with phenyl isothiocyanate. *Food Chemistry*, 129 (3), 1019-1024.
- [31] Mustafa, Ü. Bound Water and Hydroxyproline are the essential contributors to collagen molecular stability: A Computational Analysis. *Akademik Platform Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi*, 7 (3), 373-380.
- [32] Balabanli, B., Cevher, Ş., Küçük, F. (2015). Growth Factor-Collagen Relationship in Wound Healing. *Gazi University Journal of Science*, 28 (2), 175-179.

- [33] Odabaş, S. Functional Polysaccharides Blended Collagen Cryogels. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 46 (1), 113-120.
- [34] Soydaş, T., Saraç, E.Y., Çınar, S., Yenmiş, G., Doğan, S., Solakoğlu, S., Tunçdemir, M., Sultuybek, G.K. Effects of Short-term High Glucose on nIH/3T3 Fibroblast Proliferation, Apoptosis, and Collagen Type I Production. *Tip Fakültesi Klinikleri Dergisi*, 2 (3), 91-95.
- [35] Ata, Ö., Tavman, Ş. (2019). Kolajen ekstraksiyon yöntemlerinin karşılaştırılması. *GIDA/The Journal of FOOD*, 44 (3)
- [36] Oesser, S., Adam, M., Babel, W., Seifert, J.r. (1999). Oral administration of <sup>14</sup>C labeled gelatin hydrolysate leads to an accumulation of radioactivity in cartilage of mice (C57/BL). *The Journal of nutrition*, 129 (10), 1891-1895.
- [37] Khiari, Z., Ndagijimana, M., Betti, M. (2014). Low molecular weight bioactive peptides derived from the enzymatic hydrolysis of collagen after isoelectric solubilization/precipitation process of turkey by-products. *Poultry science*, 93 (9), 2347-2362.
- [38] Wang, S., Hou, H., Hou, J., Tao, Y., Lu, Y., Yang, X., Li, B. (2013). Characterization of acid-soluble collagen from bone of pacific cod (*Gadus macrocephalus*). *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 22 (4), 407-420.
- [39] Gamsjaeger, S., Robins, S.P., Tatakis, D.N., Klaushofer, K., Paschalis, E.P. (2017). Identification of pyridinoline trivalent collagen cross-links by Raman microspectroscopy. *Calcified tissue international*, 100 (6), 565-574.
- [40] Eskin, N.M., Shahidi, F. (2012). Biochemistry of foods.
- [41] Kolar, K. (1990). Colorimetric determination of hydroxyproline as measure of collagen content in meat and meat products: NMKL collaborative study. *Journal of the Association of official Analytical Chemists*, 73 (1), 54-57.
- [42] Jones, A., Homan, A., Favell, D., Hitchcock, C. (1986). High-performance liquid chromatographic column switching method for the determination of hydroxyproline in meat and meat products. *Journal of chromatography*, 353, 153-161.
- [43] Neuman, R.E., Logan, M.A. (1950). The determination of hydroxyproline. *J Biol Chem*, 184 (1), 299-306.

- [44] Kumar, V.A., Taylor, N.L., Jalan, A.A., Hwang, L.K., Wang, B.K., Hartgerink, J.D. (2014). A nanostructured synthetic collagen mimic for hemostasis. *Biomacromolecules*, 15 (4), 1484-1490.
- [45] Bilek, S.E., Bayram, S.K. (2015). Kolajen hidrolizatının fonksiyonel bir bileşen olarak gıda endüstrisinde kullanılması. *Akademik Gıda*, 13 (4), 327-334.
- [46] Iwai, K., Hasegawa, T., Taguchi, Y., Morimatsu, F., Sato, K., Nakamura, Y., Higashi, A., Kido, Y., Nakabo, Y., Ohtsuki, K. (2005). Identification of food-derived collagen peptites in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53 (16), 6531-6536.
- [47] Wu, J., Fujioka, M., Sugimoto, K., Mu, G., Ishimi, Y. (2004). Assessment of effectiveness of oral administration of collagen peptite on bone metabolism in growing and mature rats. *Journal of bone and mineral metabolism*, 22 (6), 547-553.
- [48] Borumand, M., Sibilla, S. (2014). Daily consumption of the collagen supplement Pure Gold Collagen® reduces visible signs of aging. *Clinical Interventions in Aging*, 9, 1747.
- [49] Ohara, H., Matsumoto, H., Ito, K., Iwai, K., Sato, K. (2007). Comparison of quantity and structures of hydroxyproline-containing peptites in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates from different sources. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55 (4), 1532-1535.
- [50] Matthews, D., Laster, L. (1965). Absorption of protein digestion products: a review. *Gut*, 6 (5), 411.
- [51] Daniel, H. (2004). Molecular and integrative physiology of intestinal peptite transport. *Annu. Rev. Physiol.*, 66, 361-384.
- [52] Sai, Y., Kajita, M., Tamai, I., Wakama, J., Wakamiya, T., Tsuji, A. (1998). Adsorptive-mediated endocytosis of a basic peptite in enterocyte-like Caco-2 cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 275 (3), G514-G520.
- [53] Adson, A., Raub, T.J., Burton, P.S., Barsuhn, C.L., Hilgers, A.R., Audus, K.L., Ho, N.F. (1994). Quantitative approaches to delineate paracellular diffusion in cultured epithelial cell monolayers. *Journal of pharmaceutical sciences*, 83 (11), 1529-1536.



- [54] Watanabe-Kamiyama, M., Shimizu, M., Kamiyama, S., Taguchi, Y., Sone, H., Morimatsu, F., Shirakawa, H., Furukawa, Y., Komai, M. (2010). Absorption and effectiveness of orally administered low molecular weight collagen hydrolysate in rats. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58 (2), 835-841.
- [55] Tanaka, M., Koyama, Y.-i., Nomura, Y. (2009). Effects of collagen peptide ingestion on UV-B-induced skin damage. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 73 (4), 930-932.
- [56] Yamamoto, S., Hayasaka, F., Deguchi, K., Okudera, T., Furusawa, T., Sakai, Y. (2015). Absorption and plasma kinetics of collagen tripeptide after peroral or intraperitoneal administration in rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 79 (12), 2026-2033.
- [57] Sontakke, S.B., Jung, J.-h., Piao, Z., Chung, H.J. (2016). Orally available collagen tripeptide: enzymatic stability, intestinal permeability, and absorption of Gly-Pro-Hyp and Pro-Hyp. *Journal of agricultural and food chemistry*, 64 (38), 7127-7133.
- [58] Kleinnijenhuis, A.J., van Holthoon, F.L., Maathuis, A.J., Vanhoecke, B., Prawitt, J., Wauquier, F., Wittrant, Y. (2020). Non-targeted and targeted analysis of collagen hydrolysates during the course of digestion and absorption. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 412 (4), 973-982.
- [59] Lash, J.W., Rosene, K., Minor, R.R., Daniel, J.C., Kosher, R.A. (1973). Environmental enhancement of *in vitro* chondrogenesis: III. The influence of external potassium ions and chondrogenic differentiation. *Developmental biology*, 35 (2), 370-375.
- [60] Baum, B., Moss, J., Breul, S., Crystal, R. (1978). Association in normal human fibroblasts of elevated levels of adenosine 3' : 5' -monophosphate with a selective decrease in collagen production. *Journal of Biological Chemistry*, 253 (10), 3391-3394.
- [61] Kao, W.W.-Y., Berg, R.A., Prockop, D.J. (1975). Ascorbate increases the synthesis of procollagen hydroxyproline by cultured fibroblasts from chick embryo tendons without activation or prolyl hydroxylase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 411 (2), 202-215.
- [62] Minor, R. (1980). Collagen metabolism: a comparison of diseases of collagen and diseases affecting collagen. *The American journal of pathology*, 98 (1), 225.

- [63] Robertson, W.v.B. (1964). Metabolism of collagen in mammalian tissues. *Biophysical journal*, 4 (1), 93-106.
- [64] Nimni, M.E. (1983): Collagen: structure, function, and metabolism in normal and fibrotic tissues. Seminars in arthritis and rheumatism. Elsevier, pp. 1-86.
- [65] Karna, E., Szoka, L., Huynh, T.Y.L., Palka, J.A. (2020). Proline-dependent regulation of collagen metabolism. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77 (10), 1911-1918.
- [66] Wu, G., Bazer, F.W., Burghardt, R.C., Johnson, G.A., Kim, S.W., Knabe, D.A., Li, P., Li, X., McKnight, J.R., Satterfield, M.C. (2011). Proline and hydroxyproline metabolism: implications for animal and human nutrition. *Amino acids*, 40 (4), 1053-1063.
- [67] Myllyharju, J., Kivirikko, K.I. (2001). Collagens and collagen-related diseases. *Annals of medicine*, 33 (1), 7-21.
- [68] Moskowitz, R.W. (2000): Role of collagen hydrolysate in bone and joint disease. Seminars in arthritis and rheumatism. Elsevier, pp. 87-99.
- [69] Nicklas, M., Schatton, W., Heinemann, S., Hanke, T., Kreuter, J. (2009). Enteric coating derived from marine sponge collagen. *Drug development and industrial pharmacy*, 35 (11), 1384-1388.
- [70] Neklyudov, A., Berdutina, A., Ivankin, A., Mitaleva, S., Evstaf'eva, E. (2003). Collagen fractions obtained by water-salt extraction from raw materials of animal origin. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 39 (4), 426-430.
- [71] Yuswan, M.H., Jalil, N.H.A., Mohamad, H., Keso, S., Mohamad, N.A., Yusoff, T.S.T.M., Ismail, N.F., Manaf, Y.N.A., Hashim, A.M., Desa, M.N.M. (2020). Hydroxyproline determination for initial detection of halal-critical food ingredients (gelatin and collagen). *Food chemistry*, 337, 127762.
- [72] Choi, F.D., Sung, C.T., Juhasz, M., Mesinkovsk, N.A. (2019). Oral collagen supplementation: a systematic review of dermatological applications. *Journal of drugs in dermatology: JDD*, 18 (1), 9-16.
- [73] Hashim, P., Ridzwan, M.M., Bakar, J., Hashim, M.D. (2015). Collagen in food and beverage industries. *International Food Research Journal*, 22 (1), 1.
- [74] Meyer, M. (2019). Processing of collagen based biomaterials and the resulting materials properties. *Biomedical engineering online*, 18 (1), 1-74.

- [75] Bozec, L., Odlyha, M. (2011). Thermal denaturation studies of collagen by microthermal analysis and atomic force microscopy. *Biophysical journal*, 101 (1), 228-236.
- [76] Ateş, M. (2013). Barsaklardan Paraselüler İlaç Absorpsiyonu Üzerine Permeabilite Artırıcı Ajanların Etkisinin Araştırılması.
- [77] Gökçe, E.H., Kaynak, M.S., Yurdasiper, A., Üstündağ-Okur, N., Şahin, S. (2018). Comparison of intestinal permeability of nebivolol hydrochloride loaded solid lipid nanoparticles with commercial nebivolol tablet.
- [78] Sinan Kaynak, M., Celebier, M., Akgeyik, E., Sahin, S., Altınoz, S. (2017). Application of HPLC to investigate the physicochemical properties and intestinal permeability of ketoprofen. *Current Pharmaceutical Analysis*, 13 (1), 72-79.
- [79] Group, I.E.W. (2005): Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). Proceedings of the International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva, Switzerland. pp. 25-27.
- [80] Zimmer, D. (2014). New US FDA draft guidance on bioanalytical method validation versus current FDA and EMA guidelines: chromatographic methods and ISR. *Bioanalysis*, 6 (1), 13-19.
- [81] Food, States, D.A.o.t.U., Health, U.D.o., Services, H., Evaluation, C.f.D., Research, Medicine, C.f.V. (2018). Bioanalytical Method Validation. *Guidance for Industry*,
- [82] Yuwono, M., Indrayanto, G. (2005). Validation of chromatographic methods of analysis. *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*, 32, 243-259.
- [83] Colgrave, M.L., Allingham, P.G., Jones, A. (2008). Hydroxyproline quantification for the estimation of collagen in tissue using multiple reaction monitoring mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1212 (1-2), 150-153.
- [84] Taddese, S., Jung, M.C., Ihling, C., Heinz, A., Neubert, R.H., Schmelzer, C.E. (2010). MMP-12 catalytic domain recognizes and cleaves at multiple sites in human skin collagen type I and type III. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Proteins and Proteomics*, 1804 (4), 731-739.

- [85] De Melo Oliveira, V., De Assis, C.R.D., Da Costa, B.d.A.M., De Araújo Neri, R.C., Do Monte, F.T.D., Da Costa Vasconcelos, H.M.S., França, R.C.P., dos Santos, J.F., de Souza Bezerra, R., Porto, A.L.F. (2020). Physical, biochemical, densitometric and spectroscopic techniques for characterization collagen from alternative sources: A review based on the sustainable valorization of aquatic by-products. *Journal of Molecular Structure*, 129023.
- [86] Kolpakov, V., Gordon, D., Kulik, T.J. (1995). Nitric oxide-generating compounds inhibit total protein and collagen synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *Circulation research*, 76 (2), 305-309.
- [87] Ignat'eva, N.Y., Danilov, N., Averkiev, S., Obrezkova, M., Lunin, V. (2007). Determination of hydroxyproline in tissues and the evaluation of the collagen content of the tissues. *Journal of Analytical Chemistry*, 62 (1), 51-57.
- [88] Zakeri-Milani, P., Valizadeh, H., Azarmi, Y., Jalali, M.B., Tajerzadeh, H. (2006). Simultaneous determination of metoprolol, propranolol and phenol red in samples from rat *in situ* intestinal perfusion studies. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14 (2), 102-108.
- [89] Incecayir, T., Tsume, Y., Amidon, G.L. (2013). Comparison of the permeability of metoprolol and labetalol in rat, mouse, and Caco-2 cells: use as a reference standard for BCS classification. *Molecular pharmaceuticals*, 10 (3), 958-966.
- [90] Gulsun, T., Sahin, S. (2016). Development and validation of a RP-HPLC method for simultaneous determination of metformin hydrochloride, phenol red and metoprolol tartrate for intestinal perfusion studies. *Lat. Am. J. Pharm*, 35 (1), 50-57.
- [91] Müge, A., Kaynak, M.S., Şahin, S. (2015). Simultaneous determination of acyclovir, metoprolol and phenol red by a RP-HPLC method for intestinal perfusion studies. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, (2), 146-161.
- [92] Tugay, D., Aycan, M.B. Biyoçeşdeğerlik Çalışmaları.

### **Araştırma Projeleri**

- Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi Bakış Açısıyla Glibenklamidin Fizikokimyasal Karakteristiğinin ve İntestinal Permeabilitesinin Değerlendirilmesi [ 26/01/2021 – Mevcut durum ] - Bursyer
- Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi Bakış Açısıyla İbuprofenin Fizikokimyasal Karakteristiğinin ve İntestinal Permeabilitesinin Değerlendirilmesi [ 10/07/2019 – 10/01/2021 ] - Araştırmacı
- “Pluronic® F127, Kolliphor® 188 ve Ploxamer® 407 ile telmisartan katı dispersiyonlarının hazırlanması, karakterizasyonu, çözünürlük ve dissolüsyon özelliklerinin belirlenmesi ve *in situ* permeabilitesinin saptanması” [ 15/03/2021 – Mevcut durum ] – araştırmacı yardımcısı

### **Yayımlar**

- An overview of the cellulose derivatives and research conducted with cellulose as Drug carriers from turkey [2022 – Mevcut durum] - Yazar
- A Review on Collagen as a Food Supplement [2022 – mevcut durum] - Yazar