

To cite this article: Akkuş Arslan Ş, Bal NB, Özdemir ED, Uludağ O, Tırnaksız FF. Aseklofenak içeren kendiliğinden nanoemülsiyon oluşturan sistemlerin geliştirilmesi ve antiinflamatuvar etkinliğin sıçanlarda değerlendirilmesi. Turk J Clin Lab 2022; 3: 333-339.

## ■ Orijinal Makale

# Aseklofenak içeren kendiliğinden nanoemülsiyon oluşturan sistemlerin geliştirilmesi ve antiinflamatuvar etkinliğin sıçanlarda değerlendirilmesi

## *Development of self-nanoemulsifying systems containing aceclofenac and evaluation of anti-inflammatory activity in rats*

Şeyda Akkuş Arslan\*<sup>1</sup>, Nur Banu Bal<sup>2</sup>, Elif Derya Özdemir<sup>2</sup>, Orhan Uludağ<sup>2</sup>, Fahriye Figen Tırnaksız<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Selçuk Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Konya-TÜRKİYE

<sup>2</sup>Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Ankara-TÜRKİYE

<sup>3</sup>Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Ankara-TÜRKİYE

### ÖZ

**Amaç:** Aseklofenak yüklü kendiliğinden nanoemülsifiye olan sistemlerin karragenle tetiklenen sıçan pençe ödemi yöntemi ile antiinflamatuvar aktivitesinin belirlenmesi ve midede peteşi kontrolü ile sistemlerin gastrik ülserojenik aktivitesi olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntemler:** Çalışma randomize kontrollü ve prospektif olarak planlandı. Çalışmada 200-300 g arasındaki ağırlıklarda, Wistar, albino erkek sıçanlar kullanılmıştır. Oral gavajla verilen aseklofenak dozu 10 mg/kg'dır. Çalışma grupları 17 gruba ayrılmıştır (n=6) ve her birine oral gavaj uygulanmıştır (100 g sıçan için 0,5 mL örnek). Uygulama sonrası pençe hacimleri pletismometre ile 0., 90., 180., 270. ve 360. dakikalarda ölçülmüştür. Akut toksik etki incelenmiş ve 48 saat sonra mortalite varlığı kaydedilmiştir. Aseklofenanın gastrik ülserojenik etkisini incelemek için, sıçanların mideleri çıkarılmış ve peteşi varlığı incelenmiştir.

**Bulgular:** Bütün aseklofenak grupları 180. dakikada maksimum ödem inhibisyonu göstermiştir. Geliştirilen sistemin inhibisyonu (ND1+AC kodlu) tüm ölçülen zaman noktalarında diğer gruplarla kıyaslandığında daha yüksektir (p<0,001) ve ülserojenik etki görülmemiştir. Sistemlerin hiçbiri peteşiye neden olmamıştır. Hiçbir grup akut toksik etki göstermemiştir.

**Sonuçlar:** Yapılan bu çalışma ile geliştirilen aseklofenak içeren sistemin etkili olduğu ve medikal tedavide alternatif bir ilaç verilmiş sistemi olduğu gösterilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Nanoteknoloji; emülsiyonlar; ödem; peteşi.

Sorumlu Yazar\*: Şeyda Akkuş Arslan, Selçuk Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Konya-TÜRKİYE

E-mail: seydaakkus@gmail.com

ORCID: 0000-0002-0109-7372

Doi: 10.18663/tjcl.1008123

Geliş Tarihi: 11.10.2021 Kabul Tarihi: 23.06.2022

Bu araştırma makalesi, Antalya'da, 12-15 Kasım 2015 tarihinde yapılan 'International Gazi Pharma Symposium Series' sempozyumunda poster bildiri şeklinde sunulmuştur.

## ABSTRACT

**Aim:** It's aimed to determine the anti-inflammatory activity of aceclofenac-loaded self-nanoemulsifying systems using carrageenan induced rat paw edema method and to investigate if there was any gastric ulcerogenic activity of the systems with the controlling of petechia in the pylorus.

**Materials and Methods:** The study was planned as randomized controlled and prospective. The studies were carried out in male, Wistar, albino rats weighing between 200-300 g. Aceclofenac dose given by oral gavage was 10 mg/kg. The study groups were divided into 17 groups (n=6) and each one was administered by oral gavage (0.5 mL sample to 100 g rat). The paw volumes were measured with a plethysmometer at 0th, 90th, 180th, 270th and 360th minutes of administration. Acute toxic effects were investigated and mortality presence was recorded after 48 h. For investigating gastric ulcerogenic effect of aceclofenac, the stomach of the rats were removed and examined for any petechia.

**Results:** All of the aceclofenac groups, showed maximum edema inhibition at 180th minutes. The value of developed system (ND1+AC), was higher at all the time points compared to other groups (p<0.001) and had no ulcerogenic effect. None of the systems caused petechia dots. There was no acute toxic effect of any groups.

**Conclusion:** This study indicated that the developed system including aceclofenac was effective and an alternative drug delivery system in medical treatment.

**Keywords:** Nanotechnology; emulsions; edema; petechiae.

## Giriş

Son yıllarda lipofilik etkin maddelerin oral biyoyararlanımını geliştirmek için lipit temelli formülasyonlar önem kazanmıştır. Lipit temelli formülasyonlardan biri olan kendiliğinden emülsiyon oluşturan formülasyonların içine etkin maddeyi dahil etmenin en önemli nedenlerinden biri, bu sistemlerin su varlığında mide-bağırsak kanalı koşullarında kendi kendine yağ/su tipi nanoemülsiyon oluşturabilme özelliğine sahip olmaları ve ilgili etkin maddenin oral emilimini ve etkinliğini artırmalarıdır [1-3]. Hazırlanan sistem belirli özelliklere sahip olan yağ fazı, yüzey etkin madde (YEM) ve yardımcı yüzey etkin madde (YYEM) içeren, sıvı veya yarı katı özellikte olan ve su içermeyen bir karışımdır.

Kendiliğinden nanoemülsiyon oluşturan sistemler (SNEDDS-Self Nanoemulsifying Drug Delivery Systems) etkin maddeyi yüksek oranda çözme kapasitesine sahip sistemlerdir. Yüksek plazma derişimi sağlarlar. Uzun dönem saklama sürecinde su içermemeleri nedeniyle iyi bir fiziksel dayanıklılığa sahiptirler [3,4]. Etkin maddenin oral emilim oranını ve hızını artırdıkları belirtilmiştir [5]. Bu sistemlerle, etkin maddenin in vivo koşullarda her zaman çözünmüş şekilde kalması sağlanır [2].

Bu çalışmada, suda çözünmeyen ancak mide-bağırsak kanalından emilimi iyi olan bir etkin madde olan aceclofenacın mide-bağırsak kanalı koşullarında kendiliğinden nanoemülsiyon oluşturan formülasyonlarının, antienflamatuvar

etkinliğinin artırılması amaçlanmıştır. Böyle bir sistemin oral olarak uygulanmasından hemen sonra, etkin madde midede kendiliğinden oluşan nanometre boyutundaki yağ damlacıkları içinde çözünmüş durumda bulunacaktır. Dolayısıyla bu ilaç şekli ile etkin maddenin, alınan gıda içindeki yağda çözünerek emiliminin artması durumu da ortadan kalkmakta ve gıda alımından bağımsız bir emilim sağlanabilmektedir.

Antienflamatuvar ilaçlar sağlık alanında yaygın bir kullanıma sahiptirler. Antienflamatuvar etkinliği, en güçlü olarak antienflamatuvar glukokortikoidler (steroid yapılı ilaçlar) gösterir. Bunun dışında non-steroidal antienflamatuvar ilaçlar da çeşitli derecelerde antienflamatuvar etki potensine sahiptirler ve glukokortikoidlere göre daha az yan etkileri vardır. Antienflamatuvar aktivitenin varlığını ve gücünü ölçmek için günümüze kadar birçok test geliştirilmiştir. Antienflamatuvar aktivite testleri, temelde deney hayvanının arka pençesine, kulak kepçesine, sırt altı derisine, plevra, periton veya mesane içerisine enflamasyon oluşturucu bir ajan vererek o bölgede enflamasyon oluşmasını sağlamak ve oluşan bu enflamasyonun antienflamatuvar etkinliği olduğu varsayılan madde tarafından geriletilip geriletilmediği esasına dayanır [6]. Antienflamatuvar aktivite ölçümlerinde deney hayvanının pençesi kullanılacak ise bu amaçla genellikle sıçanlardan faydalanılır. Sıçan cinsi olarak çoğunlukla Sprague-dawley [7,8], Wistar [9,10] gibi sıçan

cinsleri tercih edilmektedir. Deney hayvanlarında enflamasyon oluşturmak amacıyla birçok enflamatuvar ajan kullanılmış olup, bunlardan bazıları (lambda-carrageenan gibi) hemen her çalışmanın baş enflamatuvar ajanı haline gelmiştir.

Antienflamatuvar aktivite testleri, akut ve kronik enflamasyon testleri olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Çalışmamızda, en çok kullanılan ve tercih edilen akut enflamasyon testi olan 'sıçanlarda karragenle oluşturulmuş pençe ödemi testi' kullanılmıştır [3-6,8,9].

## Gereç ve Yöntemler

Çalışma randomize kontrollü ve prospektif olarak planlanmıştır. Geliştirilen formülasyon ile kontrol gruplarında kullanılacak formülasyonlar hazırlanıp, deney gruplarında kullanılmış ve hayvanlar üzerindeki etkinin karşılaştırması yapılmıştır.

### Geliştirilen Formülasyon Hakkında Genel Bilgi

Çalışmada etkin madde olarak aseklofenak (Biotrend, Almanya), formülasyondaki yardımcı maddeler olarak ise Gliserol monolinoleat (Maisine 35-1) (Gattefosse, Fransa), orta zincirli trigliserit (Labrafac<sup>TM</sup> Lipophile WL 1349) (Gattefosse, Fransa), Polietoksile kaprilik/kaprik gliserit (Labrasol) (Gattefosse, Fransa), PEG-40 hidrojene hint yağı (Cremophor RH 40) (BASF, Almanya), Kaprilik asit mono/digliseritleri (Capmul MCM C8) (ABITEC, ABD), Polioksietilen oleil eter (Brij O10) (Sigma, ABD) kullanılmıştır. Sistemlerin nanoemülsiyon oluşumu ile damlacık büyüklüğü ölçümü yapılmış ve nanosistem oluşumu doğrulanmıştır (ZetaSizer Nano ZS, Malvern Inst., İngiltere).

Formülasyon geliştirme çalışmaları sırasında hedef, sindirilen ve sindirilmeyen yardımcı maddeleri kullanarak sindirilen ve sindirilmeyen özellikte olan iki farklı formülasyon hazırlamaktır. İlk aşamada sindirilebilir olduğu bilinen bileşenlerin kullanılmasıyla, mide-bağırsak kanalında sindirilme olasılığı yüksek olan bir formülasyon (D4 kodlu) hazırlanmıştır. İkinci aşamada ise sindirilmediği bilinen bileşenlerin kullanılmasıyla, mide-bağırsak kanalında büyük olasılıkla sindirilemeyecek olan bir formülasyon (ND1 kodlu) hazırlanmıştır. Formülasyonların içerikleri Tablo 1'de verilmiştir. Formülasyonların (SNEDDS) in vitro karakterizasyonlarının incelenmesi amacıyla, ND1 ve D4 kodlu formülasyonlarda dansite, bulanıklık, viskozite, FT-IR analizi, dondurma-çözme çalışması, lipoliz çalışması, salım çalışması, aseklofenak miktar tayini ve 4 aylık dayanıklılık çalışması yapılmıştır [11].

ND1-NE ve D4-NE formülasyonları ise, Tablo 1'de verilen kendiliğinden nanoemülsifiye olan sistemlere, 250 mL su eklenmesi sonucu oluşan nanoemülsiyonlardır.

**Tablo 1.** Sindirilen ve sindirilmeyen bileşenlerle hazırlanan formülasyonların içerikleri.

| Formülasyon*  | ND1  | D4   |
|---|------|------|
| %Yağ (Labrafac Lipophile WL 1349 veya Maisine 35-1)       |      | 7,4  |
| %Yüzey Etkin Madde (Labrasol veya Cremophor RH40)         | 82,2 |      |
| %Yardımcı Yüzey Etkin Madde (Capmul MCM C8 veya Brij O10) |      | 10,4 |

\*ND1 kodlu formülasyon, hazırlama aşamasında sindirilmediği bilinen bileşenlerin kullanılmasıyla mide-bağırsak kanalında büyük olasılıkla sindirilemeyecek olan bir formülasyondur. D4 kodlu formülasyon ise, hazırlama aşamasında sindirilebilir olduğu bilinen bileşenlerin kullanılmasıyla mide-bağırsak kanalında sindirilme olasılığı yüksek olan bir formülasyondur.

Nanoemülsiyonlarda (NE) in vitro karakterizasyonların incelenmesi amacıyla, ND1-NE ve D4-NE kodlu nanoemülsiyonlarda damlacık büyüklüğü ve polidispersite indeksi, zeta potansiyel, sıvı kristal faz varlığı tespiti, dansite, bulanıklık, dondurma-çözme çalışması, FT-IR analizi, santrifüj çalışması ve salım çalışması yapılmıştır [11].

İn vivo çalışmalar için geliştirilen formülasyonlar 50 mg aseklofenak içerecek şekilde hazırlanmıştır. Aseklofenak içeren formülasyonların hazırlanması amacıyla, önce 50 mg aseklofenak yağda çözülmüş, sonra bu çözelti YEM+YYEM karışımına eklenmiştir.

### Deney Hayvanları Hakkında Bilgi

Deneyisel çalışmalarda, Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneyisel Araştırma Merkezi'nden (GÜDAM) temin edilen 200-300 g arasındaki ağırlıklarda, Wistar, albino erkek sıçanlar kullanılmıştır.

Deneylerde kullanılan hayvanlar, deney süresince Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (Onay No: GÜET-13.037) gözlemi altında, laboratuvar hayvanlarını korumaya yönelik uluslararası etik kurallar kılavuzuna uygun olarak barındırılmış ve deney protokolleri uygulanmıştır.

### Deney Grupları

Deneylerde kullanılan hayvanlar 17 gruba ayrılmıştır. Her bir deney grubunda kullanılan hayvan sayısı 6'dır. Sıçanla yapılan in vivo çalışmalar için kullanılan aseklofenak dozu 10 mg/kg'dır [12]. Kullanılan gruplar Tablo 2'de verilmiştir.

**Tablo 2.** Kullanılan hayvan grupları ve her bir grup için 180. dakikada sağ pençede oluşan ödem hacimleri

| Grup                 | Her bir grup için 180.dakikada sağ pençede oluşan ödem hacimleri             |               | Hayvan Sayısı | Doz |          |
|----------------------|--|---------------|---------------|-----|----------|
|                      | Ortalama (n=6)   | Standart Hata |               |     |          |
| Kontrol Grupları     | Kontrol grubu (sıçanlara oral gavaj ile sadece serum fizyolojik verilmiştir) | 1,13          | 0,11          | 6   | 10 mg/kg |
|                      | pH 6.8 tampon grubu  | 1,06          | 0,04          |     |          |
|                      | Distile su grubu   | 0,92          | 0,14          |     |          |
|                      | Maisine (sindirilmeyen yağ) grubu  | 0,65          | 0,17          |     |          |
|                      | Labrafac (sindirilen yağ) grubu  | 0,72          | 0,14          |     |          |
|                      | ND1 grubu  | 0,97          | 0,08          |     |          |
|                      | D4 grubu   | 0,88          | 0,18          |     |          |
|                      | ND1-NE grubu   | 0,83          | 0,08          |     |          |
|                      | D4-NE grubu  | 0,89          | 0,12          |     |          |
| Aseklöfenak Grupları | pH 6.8 tampon+Aseklöfenak grubu (Çözelti)                                    | 0,57          | 0,11          | 6   | 10 mg/kg |
|                      | Distile su+Aseklöfenak grubu (Süspansiyon)                                   | 0,60          | 0,11          |     |          |
|                      | Maisine+Aseklöfenak grubu (Çözelti)  | 0,34          | 0,10          |     |          |
|                      | Labrafac+Aseklöfenak grubu (Çözelti)   | 0,55          | 0,10          |     |          |
|                      | ND1+Aseklöfenak grubu (SNEDDS)   | 0,40          | 0,08          |     |          |
|                      | D4+Aseklöfenak grubu (SNEDDS)  | 0,51          | 0,09          |     |          |
|                      | (ND1-NE)+Aseklöfenak grubu (Nanoemülsiyon)                                   | 0,49          | 0,08          |     |          |
|                      | (D4-NE)+Aseklöfenak grubu (Nanoemülsiyon)                                    | 0,48          | 0,13          |     |          |

### In Vivo Pençe Ödemi Yöntemi

Antienflamatuvar aktivitenin belirlenebilmesi için fizyolojik tuzlu suda (serum fizyolojik) çözülmüş karragen (10 mg/mL) ile oluşturulmuş pençe ödemi modeli kullanılmıştır [6]. Antienflamatuvar etkinliği ölçülmek istenen madde grupları, sıçanlara (100 g ağırlığındaki sıçana 0,5 mL olacak şekilde) oral gavaj ile verilmiştir. Veriliştikten bir saat sonra her sıçanın sağ pençesine intraplantar olarak 10 mg/mL derişimindeki serum fizyolojik içerisinde taze hazırlanan karragen (Lambda, Type 4, C-3889) (Sigma, ABD) çözeltisinden 0,1 mL enjekte edilmiştir [13]. Her sıçanın kendi kontrolü için, sol arka pençesine intraplantar olarak aynı hacimde (0,1 mL) serum fizyolojik enjekte edilmiştir.

Enjeksiyonların yapılmasından hemen sonra sıçanların pençe hacimleri pletismometre (Ugo Basile 7140, İtalya) ile ölçülmüş (0. dakika), daha sonraki ölçümler ise 90.; 180.; 270. ve 360. dakikalarda yapılmıştır. Sağ ve sol pençe arasındaki hacim farkı 'pençe ödem hacmi'ni vermektedir.

### Mortalite ve Ülserojenik Aktivite Ölçümü

Mortalite çalışmasında, deneylerden sonra 48 saat süre ile tüm

sıçanların mortalite kayıtları tutulmuş ve sıçanlarda mortalite yönünden akut toksik etki olup olmadığına bakılmıştır. Ülserojenik aktivite ölçümü için antienflamatuvar aktivite deneylerinden bir hafta sonra hayvanlara tekrar oral gavaj ile gruplardaki maddeler verilmiştir (100 g sıçana 0,5 mL olacak şekilde). Maddelerin verilışinden dört saat sonra onaylı etik kurul raporuna göre sakrifiye edilen tüm sıçanların mideleri önce 5–6 mL kadar %10'luk formaldehit ile doldurulmuş, sonra özafagus ve duodenumları bağlanarak çıkartılıp formaldehite konulmuştur [14]. Yaklaşık 15–20 dakika beklendikten sonra mideler büyütle incelenerek peteşi (kanama noktası) olup olmadığına bakılmıştır.

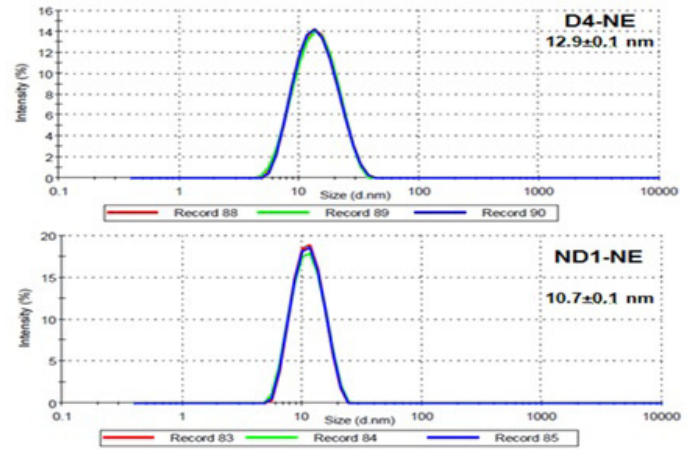
### İstatistiksel Analiz

Tek yönlü varyans analizi (One way ANOVA), Post-Hoc, Dunnett testi ve 'student t testi' kullanılmıştır (GraphPad Prism version 5.00 for Window; GraphPad Software, San Diego, California, Amerika).

### Bulgular

#### Geliştirilen Formülasyonların Damlacık Büyüklükleri

Aseklöfenak içeren sindirilen ve sindirilmeyen formülasyonlara ve bu formülasyonlara 250 mL su eklenmesiyle oluşturulan nanoemülsiyonlara ait damlacık boyutu dağılımları Şekil 1'de verilmiştir. D4-NE ve ND1-NE kodlu nanoemülsiyonların damlacık büyüklükleri sırasıyla  $12,9 \pm 0,1$  nm ve  $10,7 \pm 0,1$  nm olarak bulunmuştur.



**Şekil 1:** Kendiliğinden nanoemülsifiye olan sistemlere 250 mL su eklenmesiyle elde edilen nanoemülsiyonların (D4-NE ve ND1-NE) damlacık büyüklüğü dağılımları (n=3)

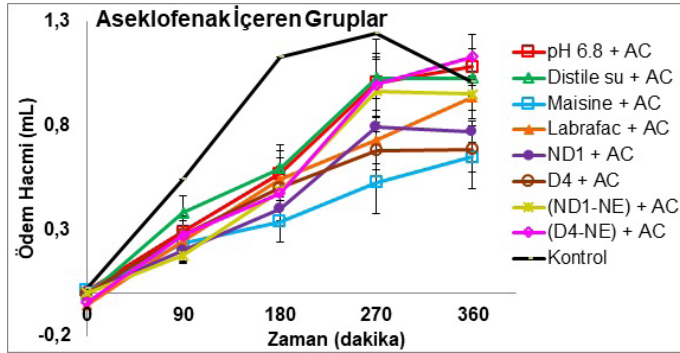
### In Vivo Pençe Ödemi

Tüm deney grupları için her bir zaman aralığında ölçülen sağ ve sol pençe hacimleri arasındaki farktan hareketle, sağ pençede oluşan ödem hacimleri hesaplanmıştır.

Aseklöfenak içeren tüm grupların, tüm zaman aralıklarında

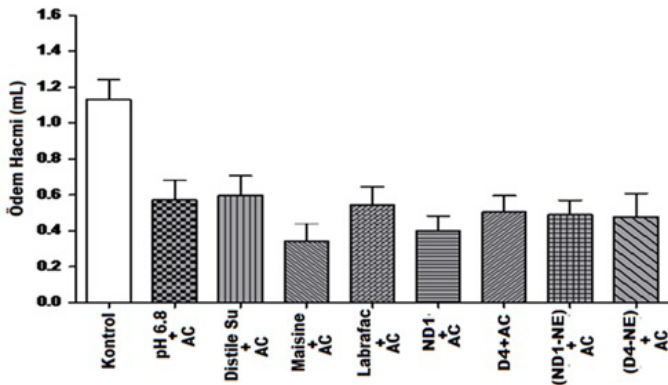


sağ pençe ödemin üzerinde oluşturdukları inhibisyon incelendiğinde, kontrol grubuna kıyasla en fazla inhibisyonun 180. dakikada olduğu Şekil 2 üzerinde görülmektedir. Buradan yola çıkılarak aseklofenanın en yüksek etkinliği gösterdiği dakikanın 180. dakikada olduğu bulunmuştur. Sağ pençede oluşan ödem hacimleri 180. dakika için, verilerin ortalaması şeklinde Tablo 2’de toplu halde verilmiştir.



**Şekil 2:** Aseklofenak içeren grupların karragen ile indüklenen pençe ödemi üzerine etkilerinin zamansal değişimi (n=6, Xort ±SH) (AC: Aseklofenak)

Aseklofenak içeren formülasyonların etkilerinin daha ayrıntılı olarak görülebilmesi ve değerlendirilebilmesi için, 180. dakikada gözlenen inhibisyonların sütun grafikleri çizilmiştir Şekil 3’te gösterilmiştir.



**Şekil 3:** Aseklofenak içeren grupların, kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak karragen enjeksiyonundan 180 dakika sonra oluşan sıçan pençe ödemi üzerine olan etkileri (n=6, Xort ±SH) (AC: Aseklofenak)

### Mortalite ve Ülserojenik Aktivite Ölçümü

Ülserojenik aktivite ölçüm sonuçları Tablo 3’te verilmiştir. Tabloda her bir grup için kullanılan 6 adet sıçan midesinin kaçında peteşi gözlemlendiği görülmektedir. ‘pH 6,8 tampon+Aseklofenak’ grubu için midede peteşi gözlenmiştir. Mortalite çalışmasının sonucunda ise, sıçanların hiçbirinde mortalite yönünden akut toksik etki olmadığı görülmüştür.

**Tablo 3.** Grupların midedeki ülserasyon oranları

| Kullanılan Gruplar         | Aseklofenak içermeyen gruplarda peteşi gözlenen sıçan sayısı | Aseklofenak içeren gruplarda peteşi gözlenen sıçan sayısı |
|----------------------------|--|---|
| Kontrol                    | 0/6  |   |
| pH 6.8 tampon              | 0/6  | 4/6   |
| Maisine 35-1               | 0/5*   | 0/6   |
| Labrafac Lipophile WL 1349 | 1/6  | 0/6   |
| ND1                        | 0/6  | 0/6   |
| D4                         | 0/6  | 0/6   |
| ND1-NE                     | Bu grupta çalışma yapılmamıştır                              |   |
| D4-NE                      | Bu grupta çalışma yapılmamıştır                              |   |

\*Deney sırasında grupta bulunan 6 adet sıçandan 1 tanesi deney dışı kalmıştır. Bu nedenle sadece bu grup için 5 adet sıçan ile peteşi taraması yapılmıştır.

### Tartışma

#### İn Vivo Pençe Ödemi Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Çalışma sonuçlarında aseklofenanın, karragenle oluşturulmuş olan ödemi en fazla inhibe ettiği zaman 180. dakika olarak bulunmuştur. Bu da aseklofenanın etkisinin 180. dakikada en yüksek seviyeye çıktığını göstermektedir. Bu nedenle, çalışma yorumları bu dakika üzerinde yapılmıştır. Yapılan bazı çalışmalar da aseklofenanın in vivo pençe ödemi üzerindeki etkisinin 180. dakikada en yüksek seviyeye ulaştığını doğrulamaktadır [14].

Kontrol grubu ile aseklofenak içeren etkin maddeli gruplar arasında, özellikle 180. dakikada büyük farklılık olduğu görülmektedir (Şekil 2, Tablo 2). Gözlenen bu farkın istatistiksel olarak anlamlı kılınması açısından sütun grafikleri oluşturulmuş (Şekil 3) ve sonuçlar incelenmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmeye göre sıçanlarda pençe ödemi en yüksek derecede inhibe eden grupların ND1+AC formülasyonu ( $p < 0,001$ ), bu formülasyonun yağı olarak kullanılan Maisine+AC grubu ( $p = 0,001$ ) ve (ND1-NE)+AC (ND1 formülasyonunun nanoemülsiyonu) ( $p < 0,001$ ) olduğu saptanmıştır.

Şekil 3’teki sütun grafiğine bakıldığında, ödem hacmini azaltma açısından etkinliği ikinci derecede yüksek olan grupların D4+AC (sindirilen formülasyon) ( $p = 0,001$ ), Labrafac+AC (sindirilen formülasyonun yağı) ( $p = 0,003$ ) ve D4-NE-AC (D4 formülasyonunun nanoemülsiyonu) ( $p = 0,004$ ) olduğu saptanmıştır.

Karşılaştırılan gruplar arasında pençe ödem hacmini kontrol

grubuna kıyasla en az inhibe eden gruplar ise pH 6.8 tampon+AC (p=0,004) ve distile su+AC (p=0,006) (aseklofenak çözeltileri) grupları olarak bulunmuştur.

### **Mortalite ve Ülserojenik Aktivitenin Değerlendirilmesi**

Mortalite çalışmasının sonucuna göre, aseklofenağın uygulanan dozunun sıçanların hiçbirinde akut toksik etki göstermediği sonucuna ulaşılmıştır. Çalışılan her bir sistem için hiçbir hayvanda mortalite gözlenmemiştir.

Ülserojenik aktivite çalışması sonucunda, çalışılan her bir sistem için, midesinde peteşi gözlenen sıçan sayısı Tablo 3'te verilmiştir. Tablodaki bulgular incelendiğinde, aseklofenağın midede kanamaya yol açıp açmadığı yorumlanabilmektedir. Bulgulara göre aseklofenak, çözelti halinde sıçanlara verildiğinde (pH 6,8 tampon+AC grubu), 6 sıçandan 4 tanesinin midesinde kanamaya yol açmıştır. Bu çalışmada hazırlanan formülasyonlarla, bu kanama durumunun azaltıldığı görülmektedir. Aseklofenak içeren formülasyonlar (D4+AC ve ND1+AC) sıçanların hiçbirinde mide kanamasına yol açmamıştır.

Ülserojenik aktivite değerlendirilirken, kontrol gruplarından biri olan Labrafac grubunun verildiği altı adet sıçandan bir tanesinin midesinde birkaç adet kırmızımsı nokta gözlenmiş ve peteşi olarak değerlendirilmiştir. Ancak bu grubun aseklofenak içeren sisteminde bile (Labrafac+AC) hiçbir sıçanda kanama noktacığın rastlanmamıştır. Bu nedenle Labrafac kontrol grubundaki bir adet sıçanda gözlenen petesinin, deneysel hatadan kaynaklandığı sonucuna ulaşılmıştır.

Bu konunun çok daha ayrıntılı bir çalışma ile desteklenebileceği bilinmekle beraber, mide-bağırsak kanalında nanoemülsiyon oluşturacak D4 ve ND1 formülasyonlarının, aseklofenağın mide üzerindeki ülserojenik etkiyi engelleyebileceği söylenebilir.

Geliştirilen formülasyonların (D4 ve ND1), kontrol grubuna göre antienflamatuvar etkinin daha erken başlamasını sağladığı, 180. dakikada en yüksek etkiyi oluşturduğu ve oluşan bu etkiyi 270. dakikaya kadar devam ettirebileceği gösterilmiştir.

### **Sonuç**

Pençe ödemi testi kullanılarak yapılan in vivo çalışmalar sonunda aseklofenağın maksimum etkisini 180. dakikada gösterdiği saptanmıştır. Bu nedenle karşılaştırmalar 180. dakikada hesaplanan ödem hacimleri arasında yapılmıştır. Sindirilmeyen formülasyon (ND1) ve bu formülasyondan elde edilen nanoemülsiyonun (ND1-NE), sindirilen formülasyon (D4) ve onun nanoemülsiyonuna (D4-NE) göre daha erken ve kontrol grubuna kıyasla daha yüksek farmakolojik etki

gösterdiği saptanmıştır. Formülasyonların etkisi 360. dakikaya kadar devam ederken, nanoemülsiyonlar için etkinlik 180. dakikadan sonra anlamlılığını kaybetmiştir.

Sonuç olarak bu çalışmada geliştirilen ND1 formülasyonunun aseklofenak gibi suda çözünürlüğü düşük maddeler için ideal bir taşıyıcı sistem olduğu bulunmuştur.

### **Etik Kurul Onayı**

Çalışmaya başlamadan önce Gazi Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı'ndan (Karar tarih:03.05.2013; sayı:66332047-604.01.02/90-9930) GÜET 13.037 kod numaralı etik onay alınmıştır.

### **Çıkar Çatışması**

Çıkar çatışması yoktur. Yazarlar eşit katkı vermişlerdir.

### **Finansal Destek**

Bu araştırma makalesi, Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'nda yapılmış olan doktora tez çalışmasının (Yüksek Öğretim Kurumu Ulusal Tez Merkezi, Tez No: 339586) bir kısmı olup Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 02/2010-47 proje numarası ile desteklenmiştir.

### **Kaynaklar**

1. Elnaggar YSR, El-Massik MA, Abdallah OY. Self-nanoemulsifying drug delivery systems of tamoxifen citrate: Design and optimization. *Int J Pharm.* 2009; 380: 133-41.
2. Ren F, Jing Q, Cui J, Chen J, Shen Y. Self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) of anethole trithione by combined use of surfactants. *J Dispersion Sci Technol.* 2009; 30: 664-70.
3. Xi J, Chang Q, Chan CK, et al. Formulation development and bioavailability evaluation of a self-nanoemulsified drug delivery system of oleanolic acid. *AAPS Pharm Sci Tech.* 2009; 10(1): 172-82.
4. Shaji J, Lodha S. Response surface methodology for the optimization of celecoxib self-microemulsifying drug delivery system. *Indian J Pharm Sci.* 2008; 70: 585-90.
5. Tang J, Sun J, Cui F, Zhang T, Liu X, He Z. Self-emulsifying drug delivery systems for improving oral absorption of Ginkgo Biloba extracts. *Drug Delivery.* 2008; 15: 477-84.
6. Özbek H, Öztürk A. Antienflamatuvar Etkinliğin Ölçülmesinde Kullanılan Yöntemler. *Van Tıp Dergisi.* 2003; 10 (1):23-8.
7. Ogonowski AA, May SW, Moore AB, et al. Antiinflammatory and analgesic activity of an inhibitor of neuropeptide amidation. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997; 280: 846-53.

8. Süleyman H, Demirezer LÖ, Kuruüzüm A, et al. Antiinflammatory effect of the aqueous extract from *Rumex patientia* L. roots. *J. Ethnopharmacol.* 1999; 65: 141-8.
9. Rimbau V, Cerdan C, Vila R, et al. Antiinflammatory activity of some extracts from plants used in the traditional medicine of North-African countries (II). *Phytother Res.* 1999; 13: 128-32.
10. Vijayakumar CS, Viswanathan S, Reddy MK, et al: Anti-inflammatory activity of usnic acid. *Fitoterapia.* 2000; 71: 564-6.
11. Akkuş Arslan Ş. Kendiliğinden nanoemülsifiye olan ilaç taşıyıcı sistemler. Gazi Üniversitesi / Sağlık Bilimleri Enstitüsü / Farmasötik Teknoloji Ana Bilim Dalı, Doktora tezi, YÖK Tez No:339586, Ankara, Türkiye, 2013.
12. Nagda C, Chotai NP, Patel U, et al. Preparation and characterization of spray-dried mucoadhesive microspheres of aceclofenac. *Drug Dev Ind Pharm.* 2009; 35(10): 1155-66.
13. Shaikh IM, Jadhav SI, Jadhav KR, Kadam VJ, Pisal SS. Aceclofenac organogels: In vitro and in vivo characterization. *Curr Drug Delivery.* 2009; 6: 1-7.
14. Yesilada E, Gurbuz I. Evaluation of the antiulcerogenic activity profile of a flavonol diglucoside from *Equisetum palustre* L. *J Ethnopharmacol.* 2010; 131: 17-21.