

ÖZET

ALLIUM SATIVUM L. EKSTRESİNDEN HAZIRLANAN FORMÜLASYONLAR VE OSTEOARTRİT ÜZERİNE ETKİSİ

- 5 Buluş, etken madde olarak içerisinde en az %0.45 oranında allisin bulunduran *Allium sativum* L. metanol ekstresi içeren mikroemülsiyon formülasyonlarına ve söz konusu formülasyonların osteoartrit üzerine etkisine ilişkindir.

İSTEMLER

1. En az %0.45 oranında allisin bulunduran *Allium sativum* L. metanol ekstresi içeren mikroemülsiyon formülasyonları.
2. İstem 1'e göre bir mikroemülsiyon formülasyonu olup özelliği en az %0.45 oranında allisin içeren *Allium sativum* L. metanol ekstresi ve
 - en az bir yağ fazı
 - iki veya daha fazla sürfaktan
 - İki veya daha fazla kosürfaktan
 - en az bir çözücü'yü içeren bir mikroemülsiyon sisteminden oluşmasıdır.
3. İstem 1 veya 2'ye göre bir mikroemülsiyon formülasyonu olup özelliği en az %0.45 oranında allisin bulunduran *Allium sativum* L. metanol ekstresinin ağırlıkça % 3 ile %10 arasında bir miktarda olmasıdır.
4. İstem 1-3'den herhangi birine göre bir mikroemülsiyon formülasyonu olup özelliği söz konusu formülasyonun mikroemülsiyon sistemi ve *Allium sativum* L. metanol ekstresinden oluşması ve mikro emülsiyon sisteminin;
 - %40-50 oranında en az bir yağ fazı
 - %40-50 oranında iki veya daha fazla sürfaktan
 - %0,5-15 oranında iki veya daha fazla kosürfaktan
 - %1-15 oranında çözücü içermesidir.
5. İstem 1-4'ten herhangi birine göre bir mikroemülsiyon formülasyonu olup özelliği söz konusu formülasyonun mikroemülsiyon sistemi ve *Allium sativum* L. metanol ekstresinden oluşması ve mikroemülsiyon sisteminin; izopropil miristat, tween 60, span 80, PEG-400, su ve etanolden oluşması ve formülasyon içerisinde etken madde olarak %3-10 oranında en az %0.45 oranında allisin bulunduran *Allium sativum* L. metanol ekstresi içermesidir.
6. İstem 1-5'ten herhangi birine göre bir mikroemülsiyon formülasyonu olup özelliği söz konusu formülasyonun mikroemülsiyon sistemi ve *Allium sativum* L. metanol ekstresinden oluşması ve mikroemülsiyon sisteminin;
 - %40-50 oranında izopropil miristat

- %40-50 oranında tween 60 ve span 80
- %0,5-15 oranında PEG-400 ve Etanol
- %1-15 oranında su içermesi ve formülasyon içerisinde etken madde olarak %3-10 oranında en az %0.45 oranında allisin bulunduran *Allium sativum* L. metanol ekstresi içermesidir.

5

7. İstem 5 ve 6'dan herhangi birine göre bir mikroemülsiyon formülasyonu olup özelliği söz konusu formülasyonun mikroemülsiyon sistemi ve *Allium sativum* L. metanol ekstresinden oluşması ve mikroemülsiyon sisteminin;

- %40-50 oranında izopropil miristat

10

- %5-10 oranında tween 60 ve %30-40 oranında span 80
- %0,5-2 oranında PEG-400 ve %5-10 oranında etanol
- %1-15 oranında su içermesi ve
- etken madde olarak %3-%10 oranında en az %0.45 oranında allisin bulunduran *Allium sativum* L. metanol ekstresi içermesidir.

15

8. Osteoartirit tedavisinde veya semptomlarının giderilmesinde kullanım için en az %0.45 oranında allisin bulunduran *Allium sativum* L. metanol ekstresi içeren İstem 1-7'den herhangi birine göre mikroemülsiyon formülasyonları.

20

25

ALLIUM SATIVUM L. EKSTRESİNDEN HAZIRLANAN FORMÜLASYONLAR VE OSTEOARTRİT ÜZERİNE ETKİSİ

Teknik Alan

- 5 Buluş, *Allium sativum* L. soğanlarından elde edilen, içerisinde en az %0.45 oranında allisin bulunduran metanol ekstresi ile tasarlanan mikroemülsiyon formülasyonlarına ve söz konusu formülasyonların osteoartrit üzerine etkisine ilişkindir.

Tekniğin Bilinen Durumu

- Osteoartrit, görülme sıklığı ilerleyen yaşlarda artan, özellikle yük taşıyan eklemlerde
10 hasar yapan kronik seyirli bir hastalıktır. Eklem kıkırdığının ilerleyici dejenerasyonu ile karakterize bir hastalık olan primer osteoartrit (OA) hakkında kıkırdak harabiyetini yavaşlatacak ve tedavide son basamak olan total eklem protezi uygulamasını geciktirecek kıkırdak koruyucu ajanların geliştirilmesi amacıyla günümüzde birçok araştırma yapılmaktadır. Kıkırdak dokudaki yapım ile yıkım
15 arasındaki dengenin bozulduğu bu hastalıkta dengenin yeniden teminini sağlayabilecek ajanların geliştirilmesi yüksek maliyet ve ileri teknoloji gerektirmektedir.

- Farklı etyopatolojik nedenlerle gelişen ve ilerleyici bir hastalık olan OA'nın tedavisinde amaç; ağrıyı azaltmak, eklem hareket açıklığını artırmak ve fonksiyonel
20 bozukluğu gidermektir. Tedavisinde farklı konservatif yöntemlerin kullanıldığı bu hastalıkta, cerrahi uygulama gereksinimini geciktirmek ve osteoartritin erken dönemlerinden itibaren başlayan fakat klinik bulgu vermeyen kıkırdak harabiyetini yavaşlatmak hedeflenir. Günümüzde pek çok alanda bitkisel kaynaklı ilaçlardan sıklıkla yararlanılıyor olması, yapılan çalışmaları biyolojik çeşitlilik kaynağı doğal
25 ürünlere doğru çekmektedir. Türkiye bitki çeşitliliği açısından dünyanın en zengin ülkelerinden biridir ve geleneksel tedavide bitkilerden sıklıkla yararlanılmaktadır.

Örneğin US2020215143 (A1) numaralı başvuruda osteoartrit semptomlarının tedavisinde vişne ekstresi ve vişne çekirdeği yağı kullanımı açıklanmaktadır.

- Bir diğer başvuru olan KR102044659 (B1) numaralı başvuruda ise osteoartrit
30 tedavisinde kullanım için fermente *Achyranthes japonica* Nakai bitkisi ekstresinin kullanımı açıklanmaktadır.

Ancak doğal bileşenlerden elde edilen ekstrelerde yapılan çalışmaların genellikle doğadan toplanan yahut standardize edilmemiş ekstreler üzerinden olması elde edilen ürünün tekrar edilebilirlik niteliğini önemli ölçüde zayıflatmaktadır.

5 Tekniğin bilinen durumu göz önüne alındığında güvenilir, farmakope kalitesinde bitkisel kaynaklardan elde edilen ve standardize edilebilir, ilaç kalitesinde farmasötik formülasyonlara ihtiyaç duyulduğu görülmektedir.

10 Bu doğrultuda çalışmalar yapan buluş sahipleri en az %0.45 oranında allisin bulunduran *Allium sativum* L. metanol ekstresi mikroemülsiyon formülasyonları geliştirmişler ve bu formülasyonların osteoartrit tedavisindeki etkilerini belirlemişlerdir.

Buluşun Kısa Açıklaması

Mevcut buluş bir açıdan; sahipleri en az %0.45 oranında allisin bulunduran *Allium sativum* L. metanol ekstresi içeren mikroemülsiyon formülasyonlarına ilişkindir.

15 Mevcut buluş bir diğer açıdan osteoartrit tedavisinde veya semptomlarının giderilmesinde kullanım için en az %0.45 oranında allisin bulunduran *Allium sativum* L. metanol ekstresi içeren mikroemülsiyon formülasyonlarına ilişkindir.

Şekillerin Açıklaması

20 **Şekil 1:** Bu grafikte, sağlıklı kontrol (101), osteoartritlik kontrol (102), pozitif kontrol uygulaması (103) ve *Allium sativum* L. Metanol ekstresi mikroemülsiyon formülasyonu uygulaması (104) durumlarında Kaspaz-3 pozitif hücrelerin sayıları yüzde (%) olarak gösterilmektedir.

25 **Şekil 2:** Bu grafikte, sağlıklı kontrol (101), osteoartritlik kontrol (102), pozitif kontrol uygulaması (103) ve *Allium sativum* L. Metanol ekstresi mikroemülsiyon formülasyonu uygulaması (104) durumlarında Metalloproteinaz-3 (MMP-3) pozitif hücrelerin sayıları yüzde (%) olarak gösterilmektedir.

Şekil 3: Bu grafikte sağlıklı kontrol (101), osteoartritlik kontrol (102), pozitif kontrol uygulaması (103) ve *Allium sativum* L. Metanol ekstresi mikroemülsiyon formülasyonu uygulaması (104) durumlarında artiküler kıkırdaktaki safranin-o boyama yoğunluğunun istatistiksel olarak değerlendirilmesi gösterilmektedir.

30 **Şekil 4:** Bu grafikte sağlıklı kontrol (101), osteoartritlik kontrol (102), pozitif kontrol uygulaması (103) ve *Allium sativum* L. Metanol ekstresi mikroemülsiyon

formülasyonu uygulaması (104) durumlarında kıkırdaktaki histopatolojik değişikliklerin Mankin skorlama sistemi kullanılarak değerlendirilmesi gösterilmektedir.

5 Şekillerde yer alan kısaltmaların açıklamaları şu şekildedir;

A: Kaspaz-3 pozitif hücre miktarı (%)

B: MMP-3 pozitif hücre miktarı (%)

C: Safranin-O Boyama Yoğunluğu

D: Mankin Skorlaması

10 101: Sağlıklı kontrol

102: Osteoartritik kontrol

103: Pozitif kontrol

104: *Allium sativum* L. Metanol ekstresi

Buluşun Detaylı Anlatımı

15 Mevcut buluşun tercih edilen bir uygulamasında buluşa uygun mikroemülsiyon formülasyonu en az %0.45 oranında allisin bulunduran *Allium sativum* L. metanol ekstresi ve

- en az bir yağ fazı
- iki veya daha fazla sürfaktan

20 - iki veya daha fazla kosürfaktan

- en az bir çözücü'yü içeren bir mikroemülsiyon sisteminden

oluşmasıyla karakterize olur.

Buluşa uygun mikroemülsiyon formülasyonu içerisinde yer alan en az %0.45 oranında allisin bulunduran *Allium sativum* L. metanol ekstresi, ağırlıkça %3 ile %10 arasında bir miktarda, tercihen %4 ile %8 arasında bir miktarda, özellikle tercihen %5 miktarında bulunur.

25

Buluşa uygun mikroemülsiyon formülasyonu içerisinde yer alan mikroemülsiyon sisteminde yağ fazı ağırlıkça %40-50 oranında, tercihen %42 ile %48 arasında bir oranda, özellikle tercihen %44 oranında bulunur.

Buluşa uygun mikroemülsiyon formülasyonu içerisinde yer alan mikroemülsiyon sisteminde sürfaktanlar, toplam %40 ile %50 arasında bir oranda, tercihen %42 ile %48 arasında bir oranda, özellikle tercihen %45 oranında bulunur.

- 5 Buluşa uygun mikroemülsiyon formülasyonu içerisinde yer alan mikroemülsiyon sisteminde kosürfaktanlar %0,5 ile %15 arasında bir oranda, tercihen %1 ile %10 arasında bir oranda bulunur.

Buluşa uygun mikroemülsiyon formülasyonu içerisinde yer alan mikroemülsiyon sisteminde çözücü toplam %1 ile %15 arasında bir oranda, tercihen %1 ile %10 oranında bulunur.

- 10 Buluşa uygun mikroemülsiyon formülasyonu içerisinde yer alan mikroemülsiyon sistemindeki yağ fazı; izopropil miristat, shea yağı, kakao yağı, lanolin, bitkisel yağlardan oluşan bir grubun içerisinde seçilebilir. Yağ fazı olarak tercihen izopropil miristat (IPM) kullanılır.

- 15 Buluşa uygun mikroemülsiyon formülasyonu içerisinde yer alan mikroemülsiyon sistemindeki en az iki sürfaktan; sodyum stearat, poloksamerler, sorbitan monostearat (Span 60), sorbitan tristearat (Span 65), sorbitan monolaurat (Span 20), sorbitan monooleat (Span 80), polisorbata 20 (Tween 20), polisorbata 40 (Tween 40), polisorbata 60 (Tween60), polisorbata 80 (Tween 80) içerisinde seçilir. Buluşun tercih edilen bir uygulamasında sürfaktan olarak Tween 60 ve Span 80 kullanılır.

- 20 Buluşa uygun mikroemülsiyon formülasyonu içerisinde yer alan en az iki kosürfaktan; poliakrilik asit (karbomer), etanol, propanol, izopropanol, bütanol, propilen glikol polietilen glikol, sodyum aljinat, agar jel, jelatin, karragenan içerisinde seçilir. Buluşun tercih edilen bir uygulamasında kosürfaktan olarak polietilen glikol (PEG), özellikle tercihen PEG-400 ve etanol kullanılır.

- 25 Buluşa uygun mikroemülsiyon formülasyonu içerisinde yer alan mikroemülsiyon sistemindeki çözücüler su, etanol, propanol, izopropanol, bütanol, propilen glikol, asetonitril, etil eter, etil asetat içerisinde seçilir. Buluşun tercih edilen bir uygulamasında çözücü olarak su kullanılır.

- 30 Buna göre buluşun tercih edilen bir uygulaması *Allium sativum* L. metanol ekstresi içeren bir mikroemülsiyon formülasyonuna yönelik olup, söz konusu formülasyon mikroemülsiyon sistemi ve *Allium sativum* L. metanol ekstresini içerir ve mikro emülsiyon sisteminin;

- %40-50 oranında en az bir yağ
- %40-50 oranında iki veya daha fazla sürfaktan
- %0,5-15 oranında iki veya daha fazla kosürfaktan
- %1-15 oranında çözücü içermesi ve

5 *Allium sativum* L. metanol ekstresinin en az %0.45 oranında allisin bulundurması ile karakterize olur.

Buluşun tercih edilen bir diğer uygulaması *Allium sativum* L. metanol ekstresi içeren bir mikroemülsiyon formülasyonuna yönelik olup, söz konusu formülasyon mikroemülsiyon sistemi ve *Allium sativum* L. metanol ekstresini içerir ve mikro

10 emülsiyon sisteminin;

- izopropil miristat, tween 60, span 80, PEG-400, su ve etanolden oluşması ve formülasyon içerisinde etken madde olarak %3-10 oranında en az %0.45 oranında allisin içeren *allium sativum* L. metanol ekstresi içermesi ile karakterize olur.

Buluşun tercih edilen bir diğer uygulaması *Allium sativum* L. metanol ekstresi içeren bir mikroemülsiyon formülasyonuna yönelik olup, söz konusu formülasyon mikroemülsiyon sistemi ve *Allium sativum* L. metanol ekstresini içerir ve mikro emülsiyon sisteminin;

15 bir mikroemülsiyon formülasyonuna yönelik olup, söz konusu formülasyon mikroemülsiyon sistemi ve *Allium sativum* L. metanol ekstresini içerir ve mikro emülsiyon sisteminin;

- %40-50 oranında izopropil miristat
- %40-50 oranında tween 60 ve span 80
- 20 - %0,5-15 oranında PEG-400 ve Etanol
- %1-15 oranında su içermesi ve formülasyon içerisinde etken madde olarak %3-%10 oranında en az %0.45 oranında allisin bulunduran *Allium sativum* L. metanol ekstresi içermesi ile karakterize olur.

Buluşun tercih edilen bir diğer uygulaması *Allium sativum* L. metanol ekstresi içeren bir mikroemülsiyon formülasyonuna yönelik olup, söz konusu formülasyon mikroemülsiyon sistemi ve *Allium sativum* L. metanol ekstresini içerir ve mikro emülsiyon sisteminin;

25 bir mikroemülsiyon formülasyonuna yönelik olup, söz konusu formülasyon mikroemülsiyon sistemi ve *Allium sativum* L. metanol ekstresini içerir ve mikro emülsiyon sisteminin;

- %40-50 oranında izopropil miristat
- %5-10 oranında tween 60 oranında ve %30-40 oranında span 80

30 - %0,5-2 oranında PEG-400 ve %5-10 oranında Etanol

- %1-15 oranında su içermesi ve etken madde olarak %3-10 oranında en az % 0.45 oranında allisin bulunduran *Allium sativum* L. metanol ekstresi içermesi ile karakterize olur.

5 Buluşun bir diğer unsuru, osteoartrit tedavisinde veya semptomlarının giderilmesinde kullanım için en az %0.45 oranında allisin bulunduran *Allium sativum* L. metanol ekstresi içeren buluşan uygun formülasyonlardır.

10 Bu çalışmada mikroemülsiyon formülasyonu haline getirilen sarımsak ekstresi osteoartrite karşı etki yönünden *in vitro* ve hayvanlarda *in vivo* yöntemlerle araştırılmıştır. Bu noktada hem doğal bir ajan hem de bir taşıyıcı sistem içerisine yerleştirilen ekstre osteoartrite karşı gerek makroskobik gerek histolojik açıdan iyi sonuçlar vermiştir.

ÖRNEKLER:

Örnek 1: *Allium sativum* L. Metanol Ekstresinin Hazırlanması

15 50 gram toz formunda *A. sativum* soğanı, 250 mL metanol içerisinde 1 saat boyunca bekletilir. Sonrasında solvent ayrılır ve düşük basınçlı kurutucuda uzaklaştırılır. İşlem sonunda yaklaşık 3 g *A. sativum* metanol ekstresi elde edilir.

Örnek 2: Mikroemülsiyon Sisteminin Hazırlanması

20 Mikroemülsiyon sistemi içerisinde izopropil miristat (IPM) yağ olarak, Tween 60 ve Span 80 sürfaktan olarak ve PEG400 ile etanol (EtOH) kosürfaktan olarak kullanılmıştır. PEG400:EtOH oranı 1:8'dir. Formülasyon içerisinde kullanılan sürfaktan: kosürfaktan oranı ağırlıkça (w/w) 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1 değerlerinde olabilir.

Örnek 3: *Allium sativum* L. Metanol Ekstresi İçeren Mikroemülsiyon Formülasyonunun Hazırlanması

25 Mikroemülsiyon formülasyonu ağırlıkça (w/w) %5 oranında *Allium sativum* L. metanol ekstresi ve mikroemülsiyon sistemi içerecek şekilde hazırlanmıştır.

Örnek 4: In Vivo Deneyler

30 Metot: Hayvanlara ketamin (80 mg/kg, i.p.) - ksilazin (10 mg/kg, i.p.) enjekte edilerek hayvanlar anestezi altına alınmıştır. Hayvanların sağ dizlerine lateral

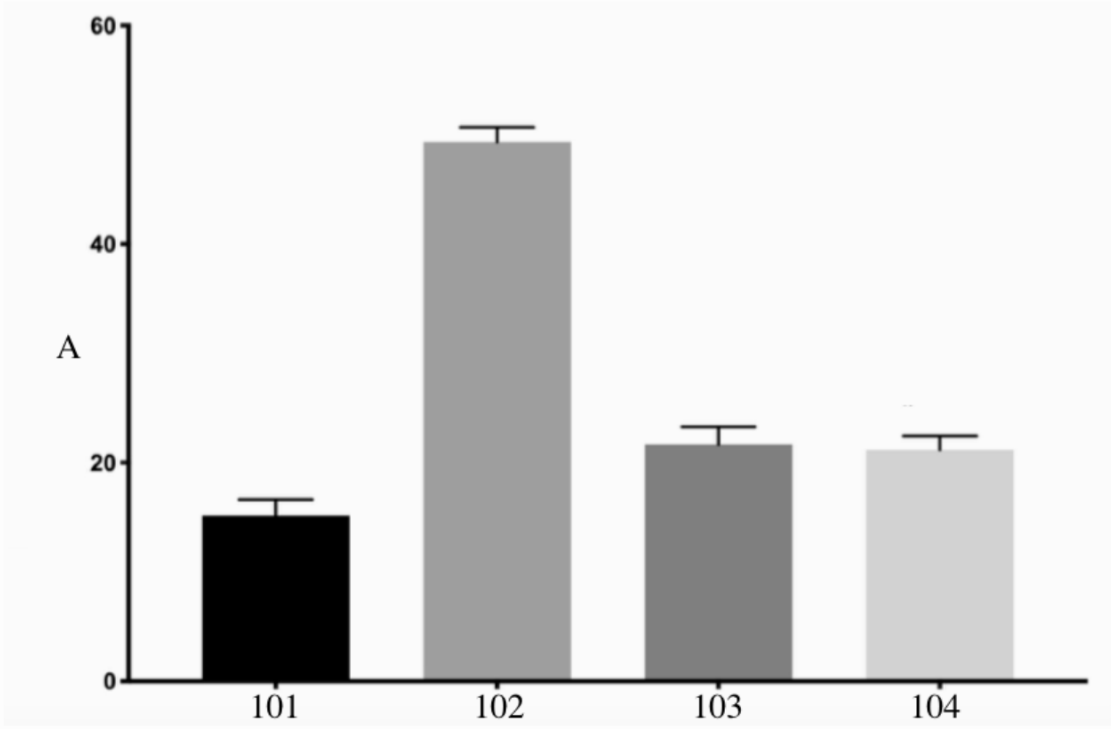
parapatellar cilt kesisi yaklaşımı ile ön çapraz bağ hasarı ve medial menisektomi hasarı ile osteoartrit oluşturulmuştur. Cerrahi teknikte; sağ diz cilt kesisinin ardından vastus lateralis kası geçilerek eklem kapsülüne ulaşılmış, patella laterale lükse edilmiş, femoral kondil ve tibial plato ortaya çıkarılmıştır.

- 5 Öncelikle ön çapraz bağı kesilmiş ardından medial menisektomi uygulanmıştır. Patella yerine oturtulup eklem yıkanıp dokular suture edilmiştir.

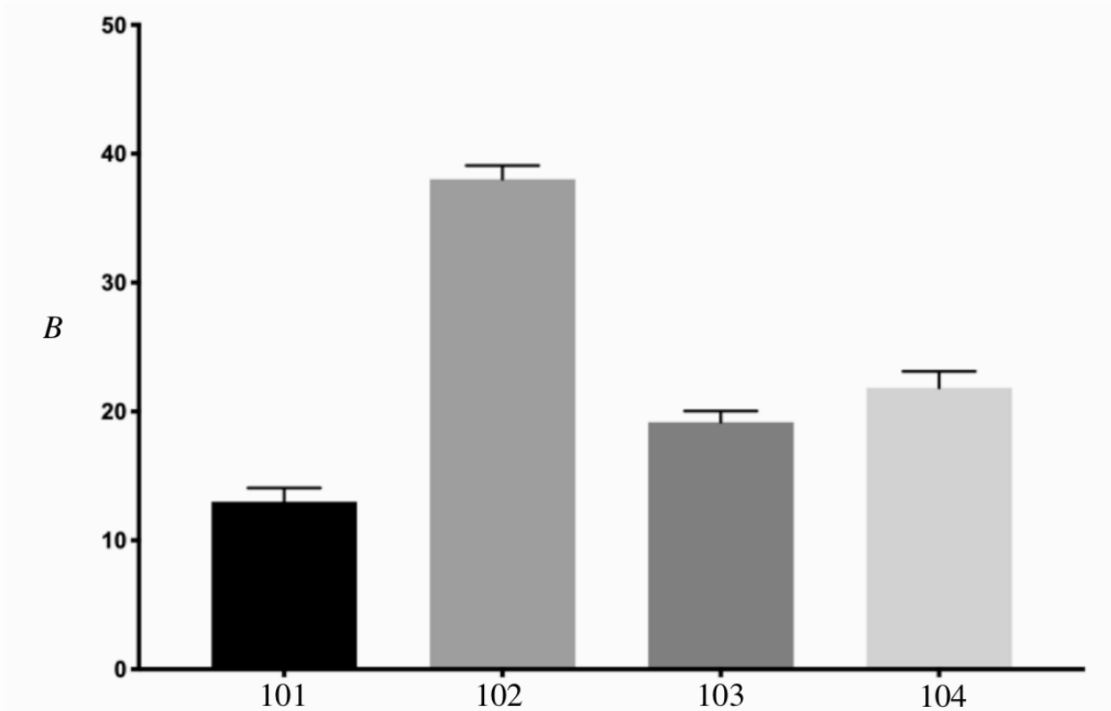
- Sonuç ve Değerlendirme:.. Yapılan deneylerde buluşa uygun *Allium sativum L.* içeren mikroemülsiyon formülasyonun Kaspaz-3 ve MMP-3 pozitif hücrelerin sayısında osteoartrit kontrol numunesine kıyasla daha düşük olduğunu göstermektedir (Şekil 1 ve Şekil 2). Bu da mikroemülsiyon formülasyonunun osteoartrit tedavisinde veya semptomlarının giderilmesinde olumlu sonuç verdiğini göstermektedir. Ayrıca, yapılan in-vivo testlerde piyasada osteoartrit tedavisinde kullanılan ve içerisinde hyaluronik asit bulunan pozitif kontrol maddesi ile karşılaştırıldığında *Allium sativum L.* metanol ekstresi içeren mikroemülsiyon formülasyonunun pozitif kontrol numunesiyle aynı etki gösterdiği görülmektedir (Şekil 1 ve Şekil 2). *Allium sativum L.* metanol ekstresi içeren formülasyonlar Kaspaz-3 ve MMP-3 pozitif hücre sayısını seviyesini neredeyse sağlıklı dokudaki Kaspaz-3 ve MMP-3 pozitif hücre sayısına düşürmektedir (Şekil 1 ve Şekil 2).

- Ayrıca, yapılan histokimyasal çalışmalarda safranin-o ile yapılan çalışmalarda buluşa konu ekstreyi içeren mikroemülsiyonların, pozitif kontrol olarak kullanılan piyasa ürününe göre daha iyi sonuç verdiği görülmektedir (Şekil 3). Buluşa konu ekstreyi içeren mikroemülsiyon uygulaması sonrasında numunelerin artiküler kıkırdak yüzeyindeki dejenerasyonun azaldığı ve kondrosit sayısının arttığı görülmektedir. Benzer şekilde, numuneler arasında histopatolojik değişiklikler Mankin skorlama sistemi kullanılarak değerlendirildiğinde buluşa uygun mikroemülsiyon formülasyonunun pozitif kontrol olarak kullanılan piyasa ürününe kıyasla anlamlı şekilde farklı olduğu ve daha iyi etki gösterdiği görülmektedir (Şekil 4).

1/2

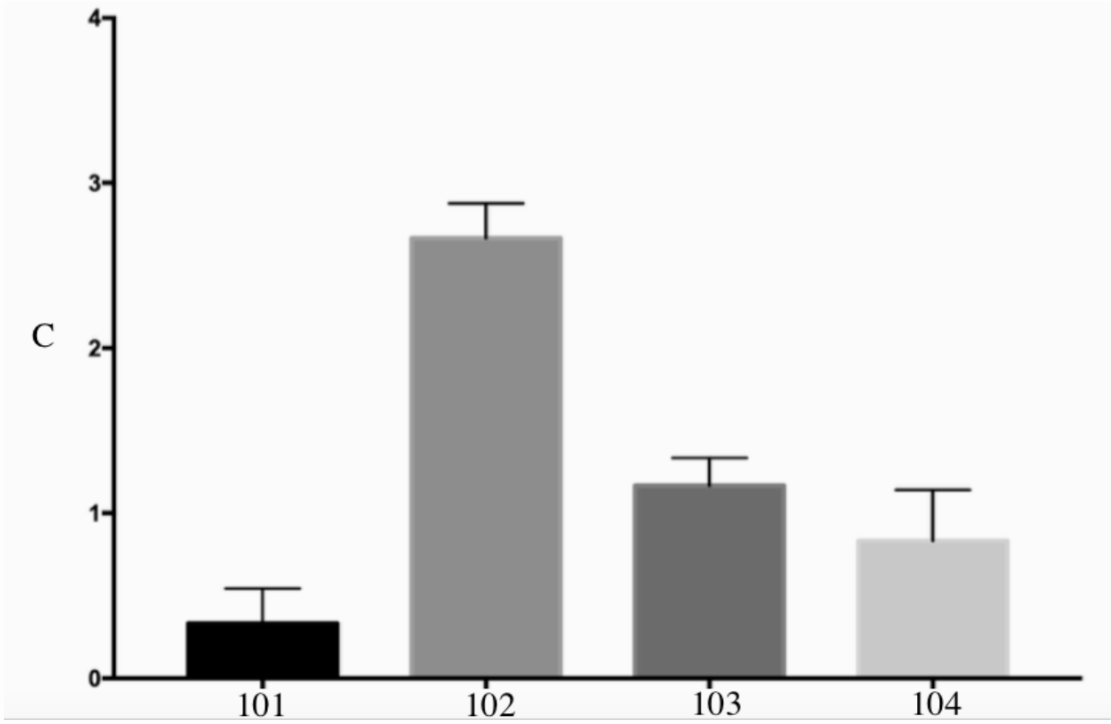


Şekil 1

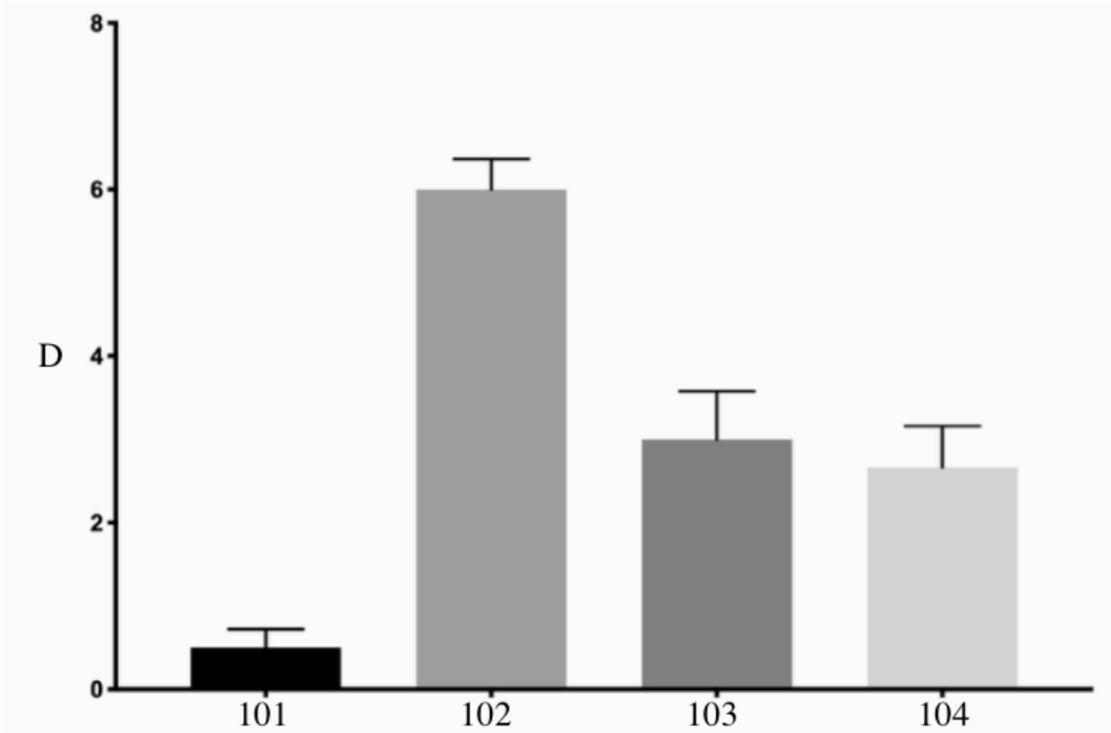


Şekil 2

2/2



Şekil 3



Şekil 4