T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

JUGLON YÜKLÜ NANOPARTİKÜLLERİN ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU

GÖZDE YELKENCİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI

DANIŞMAN
YRD. DOÇ. DR. BANU MANSUROĞLU
EŞ DANIŞMAN
DR. SERAP DERMAN

İSTANBUL, 2015

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

JUGLON YÜKLÜ NANOPARTİKÜLLERİN ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU

Gözde Yelkenci tarafından hazırlanan tez çalışması 13.07.2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. Banu MANSUROĞLU

Yıldız Teknik Üniversitesi

Eş Danışman

Dr. Serap DERMAN

Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Yrd. Doç. Dr. Banu MANSUROĞLU

Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Dr. Serap DERMAN

Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. İsmail KOCAÇALIŞKAN

Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Yrd. Doç. Dr. Melike ERSÖZ

İstanbul Bilim Üniversitesi _____

Yrd. Doç. Dr. Emel SERDAROĞLU KAŞIKÇI

Üsküdar Üniversitesi _____

Bu çalışma, TÜBİTAK 3001 – Başlangıç Ar-Ge Projeleri Destekleme Programı'nın 114Z093 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimim boyunca engin bilgi ve deneyimleri ile bu çalışmanın ortaya çıkmasında büyük emeği olan ve her konuda yardımlarını esirgemeyip bana yol gösteren danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Banu MANSUROĞLU ve eş danışmanım Sayın Dr. Serap DERMAN'a;

Çalışmam boyunca bilgi, fikir ve yardımları ile desteğini esirgemeyen Sayın Arş. Gör. Burcu TUNCER'e, Mustafa KAYA'ya ve Gözde ZEYTUN'a;

Yüksek lisans eğitimimde kendisinden aldığım dersler sayesinde bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım ve aynı zamanda proje yürütücümüz olan Sayın Prof. Dr. İsmail KOCAÇALIŞKAN'a ve Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Öğretim üyeleri değerli hocalarıma;

SEM analizlerini yapan Yıldız Teknik Üniversite'si Merkez Laboratuvarı analistlerine ve Uzman Ali Can ZAMAN'a;

Sitotoksisite deneylerinin gerçekleştirilmesi sürecindeki desteklerinden dolayı; Yıldız Teknik Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü Hücre Kültür Laboratuvarı çalışanlarına ve özellikle Sayın Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEV ve Serap YEŞİLKIR BAYDAR'a,

Tez calışmalarım sırasında arkadaşlık ve destekleri ile bana yardımcı olan Aycan SAÇU'ya, ev arkadaşlarım Ceren ELBASAN ve Ece TOPAL'a;

Istanbul'daki ailem diye nitelendirdiğim canım arkadaşlarım Alp SARIGÜN, Dr. Berkay ARMAN, Hasan ÖZTUTAR, Gamze TURAN, Çiğdem SARIGÜN'e;

Hayatımın her anında yanımda olan en yakın arkadaşım ve kuzenim Dila TABAN'a;

Tüm hayatım boyunca yanımda olan, maddi manevi beni destekleyen, bana her zaman inanan ve güvenen canım annem Aynur YELKENCİ'ye, canım babam İmdat YELKENCİ'ye, abilerim Levent YELKENCİ ve Özgür YELKENCİ'ye ve babaannem Hatice YELKENCİ'ye içtenlikle teşekkür ederim.

Bana ve bu teze emeği geçmiş herkese teşekkürü bir borç bilirim.

Temmuz, 2015

Gözde YELKENCİ

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGE LİSTESİ viii
KISALTMA LİSTESİ ix
ŞEKİL LİSTESİ x
ÇİZELGE LİSTESİ xiii
ÖZET xiv
ABSTRACT xvi
BÖLÜM 1
GİRİŞ 1
1.1 Literatür Özeti 1
1.2 Tezin Amacı 4
1.3 Hipotez 4
BÖLÜM 2
GENEL BİLGİLER 5
2.1 Nanoteknoloji ve Nanoteknolojinin Tarihçesi 5
2.2 Nanoteknolojinin Uygulama Alanları 7
2.3 Nanoteknolojinin Yararları 9
2.4 Küresel Özellikteki Taşıyıcılar 10
2.4.1 Mikropartiküller 10
2.4.2 Nanopartiküller 10
2.4.2.1 Nanopartiküllerin Sağladığı Avantajlar 13
2.4.2.2 Nanopartikül Hazırlanmasında Kullanılan Polimerler 14
2.4.2.2.1 Poli(D,l-laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) 16
2.4.2.3 Nanopartikül Üretim Yöntemleri 18
2.4.2.3.1 Emülsifikasyon – Çözücü Buharlaştırma Yöntemi 19
2.4.2.3.2 Emülsifikasyon – Çözücü Difüzyon Yöntemi 21
2.4.2.3.3 Nano Çöktürme (Nanopresipitasyon) Yöntemi 22
2.4.2.3.4 Tuzla Çöktürme (Salting-Out) Yöntemi 24
2.4.2.3.5 Süper Kritik Sıvı Teknolojisi 25
2.4.2.3.6 Diyaliz 25
2.5 Ceviz Ağacı, Juglon ve Allelopatik Etkisi 26
2.6 Juglonun Mikroorganizmalar Üzerine Etkileri 28

BÖLÜM 3

DENEYSEL ÇALIŞMALARDA KULLANILAN ÖLÇÜM YÖNTEMLERİ..... 30

3.1 Kullanılan Cihazlar 30
3.2 Kullanılan Kimyasallar 30
3.3 Kullanılan Çözeltiler 31
3.3.1 Çeşitli Konsantrasyonlardaki Juglon Çözeltileri 31
3.3.2 Polivinilalkol PVA 31
3.3.3 0.01 mol/L'lik Fosfat Tamponu (PBS) (pH=7.4) 32
3.4 Nanopartiküllerin Karakterizasyonunda Kullanılan Cihazlar 32
3.4.1 UV-Vis Spektroskopisi 32
3.4.2 Zeta Sizer 34
3.4.3 SEM - Scanning Electron Microscope (Taramalı Elektron Mikroskopisi) 34
3.4.4 FT-IR Fourier Transform Infrared 35

BÖLÜM 4

DENEYSEL BÖLÜM 36

4.1 Juglonun UV Standart Eğrisi 36
4.2 Farklı Parametrelere Sahip Juglon Yüklü PLGA Nanopartiküllerin Üretimi 37
4.3 Reaksiyon Veriminin Hesaplanması 39
4.4 Enkapsülasyon Etkinliğinin Hesaplanması 39
4.5 Etken Yüklenme Kapasitesinin Hesaplanması 39
4.6 Juglon Yüklü PLGA Nanopartiküllerin Karakterizasyonu 40
4.6.1 Zeta Sizer Analizi 40
4.6.2 SEM Analizi 40
4.6.3 FT-IR Analizi 40
4.7 Juglon Yüklü PLGA Nanopartiküllerin *In Vitro* Salımı 40
4.8 Juglon Yüklü PLGA Nanopartiküllerinin Vero Hücrelerindeki Sitotoksik Analizi 41

BÖLÜM 5

DENEY SONUÇLARI 42

5.1 Reaksiyon Verimi 43
5.2 Enkapsülasyon Etkinliği 44
5.3 Etken Yüklenme Verimi 46
5.4 Juglon Yüklü PLGA Nanopartiküllerin Karakterizasyonu 48
5.4.1 Boyut, Çoklu Dağılım Indeksi (PDI) ve Zeta Potansiyel Analizi 48
5.4.1.1 Nanopartiküllerin Boyutları Z-Ave (nm) 48
5.4.1.2 Nanopartiküllerin Boyut Dağılım Analizi ve Çoklu Dağılım Indeksleri (PDI) 50
5.4.2 SEM Analizi 52
5.4.3 FT-IR Analizi 58
5.5 Nanopartiküllerin *In Vitro* Salımının İncelenmesi 62

5.6 Juglon Yüklü PLGA Nanopartiküllerinin Vero Hücrelerindeki Sitotoksik Analizi 63
BÖLÜM 6
SONUÇ VE ÖNERİLER 69
KAYNAKLAR 72
ÖZGEÇMİŞ 82

SİMGE LİSTESİ

L	Litre
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
mg	Miligram
g	Gram
µm	Mikrometre
nm	Nanometre
λ	Dalgaboyu
M	Molar
n	Mol
°C	Derece Santigrat
rpm	Dakikada Dönme Hızı
mV	Milivolt
W	Watt

KISALTMA LİSTESİ

AFM	Atomic Force Microscopy
DCM	Diklorometan
DL	Drug Loading
EE	Encapsulation Efficiency
FDA	Food and Drug Administration
FT-IR	Fourier Transform Infrared
HCl	Hidroklorik Asit
MTT	3-(4,5-dimetil triazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliumbromid
NaCl	Sodyum Klorür
NP	Nanopartikül
PAA	Poliakrilik Asit
PACA	Polisiyano-akrilat
PBCA	Polibütil-siyano-akrilat
PBS	Fosfat Tamponu
PECL	Polikaprolakton
PLA	Polilaktik Asit
PLGA	Polilaktik-ko-glikolik Asit
PVA	Polivinil Alkol
RY	Reaction Yield
SEM	Scanning Electron Microscopy
UV	Ultra Violet

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1 Juglon (5-hidroksi-1,4-naftakinon)'un moleküler yapısı……...1
Şekil 1.2 PLGA polimerinin hidrolizi……...2
Şekil 1.3 PLGA nanopartikülünün hidrolizi ve etkin madde salımının aşamaları……3
Şekil 2.1 Değişik Uzunluk Ölçüleri……....7
Şekil 2.2 Nanoküre ve nanokapsül yapısının şematik gösterimi…….11
Şekil 2.3 Nanoküre yapısının şematik gösterimi……....11
Şekil 2.4 Nanokapsül yapısının şematik gösterimi……..12
Şekil 2.5 Nanopartikül boyutları ve diğer biyolojik moleküller ile karşılaştırılması..12
Şekil 2.6 Biyoparçalanabilir nanopartiküllerin çeşitleri……..13
Şekil 2.7 Poli(Laktik asit) (PLA), Poli(Glikolik asit) (PGA) ve Poli(d,l-laktik-ko-glikolik asit)(PLGA) polimerlerinin kimyasal yapıları……....16
Şekil 2.8 PLGA polimerinin hidrolizi……17
Şekil 2.9 Biyobozunur polimerik partiküllere tutunan biyoaltif ajanların partiküllerden salımı. Aktif ajan ile birleştirilen polimerik sistem, çevre ile etkileştiriliyor ve ortam sıvısı matrise giriyor (A), ardından sistemin şişmesine neden oluyor (B), sıvı difüzyon kanalları oluşturuluyor (C) ve malzemenin bozunmasıyla birlikte oluşan polimerik sistem de yok oluyor (D)……18
Şekil 2.10 Yüzeylerarası depozisyon tekniği ile nanokapsül oluşumu……18
Şekil 2.11 Emülsiyon-çözücü buharlaştırma tekniği ile nanoküre oluşumu……20
Şekil 2.12 Peptid yüklü nanopartiküllerin ikili emülsiyon S/Y/S çözücü buharlaştırma yöntemi ile Üretimi……...21
Şekil 2.13 Emülsiyon-çözücü difüzyon yöntemi ile nanoküre oluşumu……...22
Şekil 2.14 Nanopresipitasyon metoduna göre nanopartikül hazırlanmasının şematik gösterimi (A: Laboratuvar koşullarında, B: Büyük ölçekte hazırlama)…...24
Şekil 2.15 Salting-Out Yöntemiyle Polimerik Nanopartikül Üretimi……...25
Şekil 2.16 Diyaliz yöntemi ile nanopartikül oluşumunun şematik gösterimi……...26
Şekil 2.17 Juglon'un kimyasal yapısı……....27
Şekil 3.1 UV-görünür bölge……....32
Şekil 3.2 Tek Işık Yollu Spektrometre……....33
Şekil 3.3 FT-IR spektrometrenin şematik gösterimi……...35
Şekil 4.1 Juglonun UV-VIS Spektrumu……..36
Şekil 4.2 Juglonun kalibrasyon eğrisi……..37
Şekil 5.1 Reaksiyon Verimi (A) Juglon miktarının (mg) etkisi (B) PVA Konsantrasyonu w/v (%)(C)PVA Miktarı(ml)(D)PLGA Miktarı(mg)(E) Aseton/DCM (ml/ml)……44

Şekil 5.2 Enkapsülasyon Verimi (A) Juglon miktarının (mg) etkisi (B) PVA Konsantrasyonu w/v (%)(C)PVA Miktarı(ml)(D)PLGA Miktarı(mg)(E) Aseton/DCM (ml/ml)……46
Şekil 5.3 İlaç Yüklenme Verimi (A) Juglon miktarının (mg) etkisi (B) PVA Konsantrasyonu w/v (%)(C)PVA Miktarı(ml)(D)PLGA Miktarı(mg)(E) Aseton/DCM (ml/ml)……48
Şekil 5.4 Boyut Z-Ave (nm) (A) Juglon miktarının (mg) etkisi (B) PVA Konsantrasyonu w/v (%)(C)PVA Miktarı(ml)(D)PLGA Miktarı(mg)(E) Aseton/DCM (ml/ml)……50
Şekil 5.5 Tekli emülsiyon (s/y) çözücü uçurma yöntemi ile hazırlanan NP 1-Juglon1, NP 2-Juglon 2, NP 3-Juglon 3, NP 4-Juglon 4 ve NP 5-Juglon5 partiküllerine ait boyut dağılım indeksi (PDI)……..50
Şekil 5.6 Tekli emülsiyon (s/y)çözücü uçurma yöntemi ile hazırlanan NP2-Juglon2, NP 6-Juglon 6, NP 7-Juglon 7, NP 8-Juglon 8 ve NP 9-Juglon 9 partiküllerine ait boyut dağılım indeksi (PDI)……..51
Şekil 5.7 Tekli emülsiyon (s/y)çözücü uçurma yöntemi ile hazırlanan NP2-Juglon2, NP 10-Juglon 10, NP 11-Juglon 11, NP 12-Juglon 12 ve NP 13-Juglon 13 partiküllerine ait boyut dağılım indeksi (PDI)……..51
Şekil 5.8 Tekli emülsiyon (s/y)çözücü uçurma yöntemi ile hazırlanan NP2-Juglon2, NP 14-Juglon 14, NP 15-Juglon 15 ve NP 16-Juglon 16 partiküllerine ait boyut dağılım indeksi (PDI)…….52
Şekil 5.9 Tekli emülsiyon (s/y)çözücü uçurma yöntemi ile hazırlanan NP2-Juglon2, NP 17-Juglon 17, NP 18-Juglon 18 ve NP 19-Juglon 19 partiküllerine ait boyut dağılım indeksi (PDI)…….52
Şekil 5.10 NP2'nin 20.000 kat büyütülmüş SEM görüntüsü……53
Şekil 5.11 NP2'nin 30.000 kat büyütülmüş SEM görüntüsü……54
Şekil 5.12 50.000 kat büyütülmüş SEM görüntüsü……...54
Şekil 5.13 NP5'in 20.000 kat büyütülmüş SEM görüntüsü……..55
Şekil 5.14 NP5'in 30.000 kat büyütülmüş SEM görüntüsü……..55
Şekil 5.15 NP5'in 50.000 kat büyütülmüş SEM görüntüsü……..56
Şekil 5.16 NP 20'nin 20.000 kat büyütülmüş SEM görüntüsü……....56
Şekil 5.17 NP 20'nin 30.000 kat büyütülmüş SEM görüntüsü……...…..57
Şekil 5.18 NP 20'nin 30.000 kat büyütülmüş SEM görüntüsü……....57
Şekil 5.19 Serbest juglondan alınan FT-IR spektrumu……..58
Şekil 5.20 PLGA'dan alınan FT-IR spektrumu…….59
Şekil 5.21 NP 20'den alınan FT-IR spektrumu……...…..59
Şekil 5.22 NP 2'den alınan FT-IR spektrumu……...……60
Şekil 5.23 NP 5'den alınan FT-IR spektrumu……...……60
Şekil 5.24 PLGA ve NP 20'den alınan FT-IR spektrumları…….……61
Şekil 5.25 PLGA, NP 2 ve NP 5'in FT-IR spektrumları……..……61
Şekil 5.26 NP2, NP5, NP6, NP12, NP14, NP19'un günlere göre salınım grafiği……62
Şekil 5.27 NP2, NP5, NP6, NP12, NP14, NP19'un saatlere göre salınım grafiği……63
Şekil 5.28 Serbest juglonun konsantrasyona(mg/ml) bağlı hücre canlılığı (%) grafiği
Şekil 5.29 Serbest juglonun 48 saatlik inkübasyonu sonucu Vero hücrelerinde……..64 oluşturduğu morfolojik değişimlerin mikroskobik görüntüsü (20x); (a) 0,0125 mg/ml (b) 0,1 mg/ml (c) 0,5 mg/ml (d) 1 mg/ml…….64
Şekil 5.30 NP 2'nin konsantrasyona (mg/ml) bağlı hücre canlılığı (%) grafiği……65

Şekil 5.31 NP 2'nin 48 saatlik inkübasyonu sonucu vero hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimlerin mikroskobik görüntüsü(20x);(a)0,1mg/ml(b)0,5 mg/ml (c) 1 mg/ml……65
Şekil 5.32 NP 5'in konsantrasyona (mg/ml) bağlı hücre canlılığı (%) grafiği……...66
Şekil 5.33 NP 5'nin 48 saatlik inkübasyonu sonucu vero hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimlerin mikroskobik görüntüsü(20x);(a)0,1mg/ml(b)0,5 mg/ml (c) 1 mg/ml……..……...66
Şekil 5.34 NP 20'inn konsantrasyona (mg/ml) bağlı hücre canlılığı (%) grafiği…..…..67
Şekil 5.35 NP 20'nin 48 saatlik inkübasyonu sonucu vero hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimlerin mikroskobik görüntüsü(20x);(a)0,1mg/ml(b)0,5 mg/ml (c) 1 mg/ml……..……..67
Şekil 5.36 NP 20, serbest juglon, NP 2 ve NP 5'in konsantrasyona (mg/ml) bağlı % hücre canlılığı grafiği……68

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 Nanopartiküllerin genel medikal uygulamaları……..8
Çizelge 2.2 Nanopartikül hazırlanmasında kullanılan polimerler…..……..15
Çizelge 4. 1 Juglonun farklı konsantrasyonlardaki 261nm ve 424nm'deki absorbans değerleri……...……...37
Çizelge 4.2 Farklı kombinasyonlara sahip nanopartikül üretimi……..38
Çizelge 5.1 Farklı parametrelerin reaksiyon verimi (RY), enkapsülasyon verimi (EE), ilaç yüklenme verimi (DL), boyut (Z-Ave), çoklu dağılım indeksi (PDI), ve zeta potansiyeli (mV) üzerine etkileri…….……42

ÖZET

JUGLON YÜKLÜ NANOPARTİKÜLLERİN ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU

Gözde YELKENCİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Banu MANSUROĞLU

Eş Danışman: Dr. Serap DERMAN

Son yıllarda mikron altı boyutlardaki partiküler sistemlerle ilgili olarak; nanoteknoloji, tıp ve biyoteknoloji alanlarında yapılan çalışmaların sayısında önemli artış olmuştur. Özellikle nanopartiküler sistemlerle ilgili yapılan çalışmalarda; ilaç, gen, antimikrobiyal ajanlar ile antijenlerin taşınması, *in vitro/in vivo* diagnostiklerin uygulanması, geliştirilmiş biyouyumlu materyallerin üretimi gibi konular göze çarpmaktadır. Bu çalışmalarda nanopartiküler sistemler içerisinden polimerik yapıda olanların; biyouyumluluk, biyobozunurluluk, sürekli salım ve güvenilirlik gibi birçok teknolojik avantaja sahip olduğu gösterilmiştir. Özellikle antimikrobiyal özelliğe sahip maddelerin poli-(D,L-laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) nanopartiküllerinin içerisine yüklenmesi ile oluşturulan sistemlerin, aynı etken maddelerin serbest formuna göre farmakokinetik özelliklerinin, terapötik indekslerinin ve biyouyumluluklarının dikkat çekici bir şekilde arttırıldığı belirlenmiştir.

Bu tez çalışmasında etken madde olarak kullanılan juglon molekülü (5-hydroxy-1,4-naphthoquinone), ceviz ağacının (*Juglans sp.*) ağaç ve meyve kabuğundan, meyve ve yapraklarından doğal olarak izole edilen naftokinon yapılı bir allelokimyasaldır. Literatürde bu bileşiğin önemli antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu ve bundan dolayı cevizin birçok ülkede tıbbi bitki olarak kullanıldığı belirtilmektedir.

Bu tezde, cevizden elde edilen ve antimikrobiyal aktivitesi bilinen juglon molekülünün yüklü olduğu nanopartikül sistemlerin hazırlanması ve fizikokimyasal karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Üretilen nanopartiküllerin serbest juglon molekülü ile karşılaştırmalı olarak, *in vitro* biyouyumluluk analizleri maymun böbrek vero hücreleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlarda Juglon molekülünün PLGA nanopartiküllere yüklenmesi sonucunda biyouyumluluğunun arttırıldığı görülmüştür.

Yapılan literatür taramalarında antimikrobiyal özellikli juglon molekülünün nanopartikül sistemine enkapsüle edilmemiş olması ile özgünlüğü ortaya konulan tezde, juglon molekülünün nanopartikül sistemlere yüklenmesi sonucunda farmakoloji alanındaki kullanılabilirliğinin arttırılması sağlanacaktır.

Bu tezde juglon maddesinin nanopartikül sistemlere yüklenmesi sureti ile antimikrobiyal aktivitesinin ve biyouyumluluğunun arttırılması ve daha düşük dozlarda daha etkili olan nanopartikül formülasyonlarının geliştirilmesi sağlanmıştır. Geliştirilen nanopartiküler formülasyonun diğer antimikrobiyal etken maddeler için de faydalı bir model oluşturacağı ve ülkemiz ilaç sanayisine önemli katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Juglon, nanopartikül, poli(D,L-laktik-ko-glikolik asit), biyouyumluluk, sitotoksisite

ABSTRACT

JUGLON LOADED NANOPARTICLES: PREPARATION AND CHARACTERIZATION

Gözde YELKENCİ

Department of Molecular Biology and Genetics

MSc. Thesis

Adviser: Assist. Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU

Co-Adviser: Ph.D.Serap DERMAN

In recent years, a significant increase in the studies of submicron sized particulate system; in the fields of nanotechnology, medicine and biotechnology has been detected. Especially some issues are conspicuousness such as; drugs, genes, antimicrobial agents and antigen carriage, implementation of *in vitro*/*in vivo* diagnostics, the production of improved biocompatible materials in studies related to nanoparticulate systems. It has been shown in these studies that the polymeric nanoparticulate systems have many technological advantages as well as biocompatibility, biodegradability, sustained release and reliability. Especially pharmacokinetic properties, therapeutic index and biocompatibility of poly-(D, L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles system which formed by loading the antimicrobial agents, remarkably increased when compared to free form of antimicrobial agent.

Juglone molecule (5-hydroxy-1 ,4-naphthoquinone) which used as an active integrient in this thesis is known as a naphthoquinone structured allelochemical it exist naturally leaves fruits, roats and stem bark of walnut tree (*Juglan sp*.) .

In this thesis, preparation, physicochemical characterization and cytotoxic activity analysis of juglone loaded nanoparticle system will be performed for the first time. *In vitro* biocompatibility analysis of the produced nanoparticles were investigated on green

monkey vero cell line with comparatively free juglone. As a result of the juglone loaded PLGA nanoparticles has been shown to increase the bioavailability of juglone.

The originality of the thesis is introduce by the lack of such a study in the literature about encapsulation of antimicrobial juglone molecules to nanoparticle system. Thus, in this thesis we will provide efficient usability of juglone molecules in field of pharmacology by loading to nanoparticle system.

In this thesis we performed to improve of antimicrobial activity and biocompatibility and develop of more effective nanoparticle formulations at lower doses by loading of juglone to nanoparticle systems. It is expected that developed nanoparticles provide a significant contribution to the pharmaceutical industry in our country and will be a useful model for other antimicrobial agents.

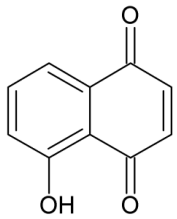
Keywords: Juglone, nanoparticle, poly(D,L-lactic-co-glikolic acit) PLGA, biocompatibility, cytotoxicity

BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Juglon (5-hidroksi-1,4-naftakinon veya 5-hidroksinaftokinon), ceviz ağacının (*Juglans sp*.) kök, gövde ve meyve kabuğunda, yapraklarında ve meyvesinde doğal olarak bulunur. (Şekil 1.1). Bu bileşiğin en önemli özelliği, diğer bitkilerin metabolik fonksiyonu için gerekli olan belirli enzimleri inhibe ederek allelopatik etki göstermesidir ve aynı zamanda birçok bitki için de toksiktir [1]. Araştırmalar incelendiğinde juglon bileşiğinin; herbisit [2], antimikrobiyal; [3-9], antiviral [10] , antifungal [11, 12], antitumor [7, 13], antikanser [6, 8], sitotoksik ve genotoksik [14, 15], anti-proliferatif [16] antihipertansif [17], larvicidal ve molluscicidal [7], acaricidal [18], antioksidant [7, 8, 19, 20] gibi etkilere sahip olduğu ve bu amaçla da birçok ülkede tıbbi bitki olarak kullanıldığı gözlenmiştir. Bununla birlikte gıda ve kozmetik sanayide renklendirici ajan, mürekkep, tekstil boyası gibi farklı amaçlarla da kullanımı mevcuttur.



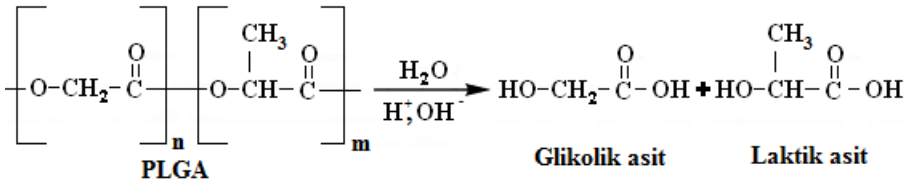
Şekil 1.1 Juglon (5-hidroksi-1,4-naftakinon)'un moleküler yapısı [1]

Juglon molekülü insan hücre kültürleri üzerine sitotoksik özellik göstermektedir [15]. Juglon molekülünün sahip olduğu farmakolojik (antimikrobiyal, antiviral, antifungal, antitumor, antikanser vb.) özelliklerden yararlanılabilmesi için biyouyumluluğunun arttırılması ve toksik özelliğinin azaltılması gerekmektedir. İlaçların

biyouyumluluğunun artırılması ile toksik özelliklerini azaltması ve kontrollü salımla daha az etken madde kullanımının sağlamasına yönelik olarak son yıllarda nanoteknoloji, tıp ve biyoteknoloji alanında nanopartiküler sistemlerin kullanılmaya başlandığı gözlenmektedir [21].

Nanopartiküler sistemlerin hazırlanmasında; çitosan, jelatin, poli(laktik-ko-glikolik asit), polimetilmetakrilat, polikaprolakton ve polilaktik asit gibi birçok biyobozunur polimer kullanılmaktadır. Doğal ya da sentetik polimerlerin kullanılması ile elde edilen; ilaçların yanı sıra, proteinler, peptitler ve genlerin de ilgili dokuya hedeflendirilmeleri için kullanılan nanopartiküllerin sağladığı avantajlar iki temel özelliklerinden ileri gelmektedir. Bu özelliklerinden birincisi, nanopartiküllerin küçük partikül boyutlarına sahip olmasıdır. Böylece küçük kapillerlerden daha kolay geçerler, hücre içi ve hücre dışı alanlara daha kolay giriş yaparlar [22] ve hedef bölgede etkili etkin madde salımını sağlarlar [21, 23-27]. İkincisi ise, nanopartiküllerin hazırlanmasında biyobozunur materyallerin kullanılmasıdır. Biyobozunur malzemeler günler hatta haftalar süren periyotlarda hedef dokuda kontrollü etkin madde salımını sağlamaktadırlar. Tüm bunlara ek olarak nanopartiküller; ilaç, protein yada peptid gibi etkin maddelerin biyolojik sistemdeki enzimatik parçalanmalarına karşı koruyucu etki göstererek stabilitelerinin artmasını sağlarlar ve yan etkilerini azaltırlar [21, 22, 28].

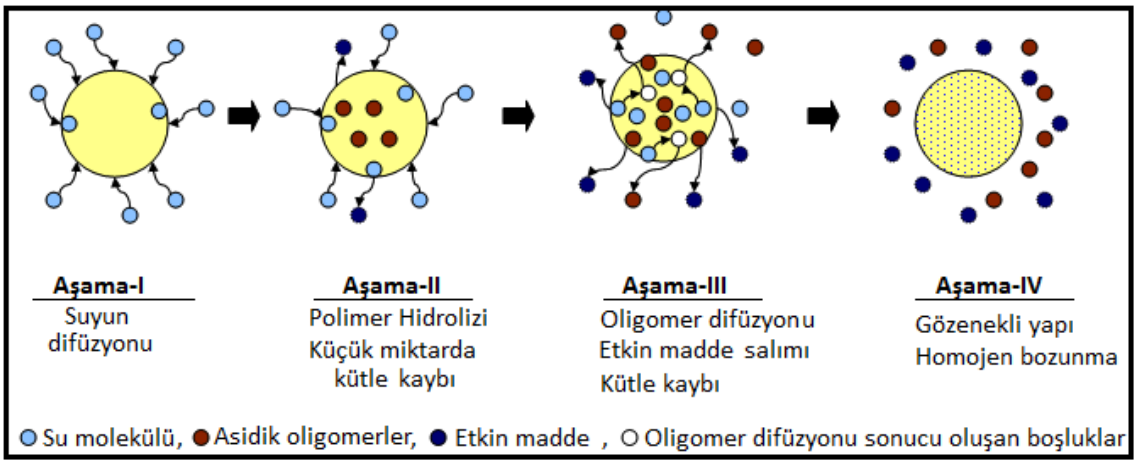
PLGA; nanopartikül hazırlanmasında kullanılan polimerler arasında en iyi biyouyumluluğa sahip, fizyolojik ortamda inert özellik gösteren ve biyolojik olarak toksik olmayan son ürünlere parçalanabilen (parçalanması sonucu oluşan laktik asit ve glikolik asit monomerleri sitrik asit döngüsüne (TCA) girerek metabolize olurlar) bir kopolimerdir (Şekil 1.2) [29]. PLGA sahip olduğu bu eşsiz özelliklerinden dolayı FDA tarafından onaylanmış ve etken madde yüklenmesinde en yaygın olarak kullanılan polimerik taşıyıcıdır [22].



Şekil 1.2 PLGA polimerinin hidrolizi [30]

PLGA nanopartiküllerinden etken madde salımı, polimerin hidrolizi sonucu bozunmasına bağlı olarak dört aşamadan meydana gelmektedir (Şekil 1.3). Birinci

aşamada suyun difüzyonu gerçekleşmekte bunu takip eden ikinci aşamada ise asidik uç gruplara sahip oligomerlerin hidroliz reaksiyonunu otokatalizlemesi sonucu hidroliz hızlanmaktadır. Üçüncü aşamanın başında kritik molekül ağırlığına ulaşılmakta ve oligomerler partikülden dışarıya difüze olmaktadır. Su molekülleri oluşan boşluklardan difüze olmakta bu da oligomerlerin daha fazla difüzyonunu teşvik etmektedir. Polimerin belirgin kütle kaybı ve etken madde salımındaki keskin artış üçüncü aşamada meydana gelmektedir. Dördüncü aşamada ise polimerik matriks yüksek oranda gözenekli bir yapıya dönüşmekte, bozunma daha yavaş ve homojen bir şekilde ilerlemektedir [31].



Şekil 1.3 PLGA nanopartikülünün hidrolizi ve etkin madde salımının aşamaları [30]

Yapılan çalışmalarda 100 nm boyutundaki nanopartiküllerin, 1µm boyuta sahip mikropartiküllere göre hücre içerisine alınan etken madde miktarını 2,5 kat arttırdığı, 10 µm boyuttaki bir mikropartiküle göre ise 6 kat arttırdığı gösterilmiştir [25, 32]. Benzer sonuçlar insitu intestinal loop model sıçanlarda yapılan çalışmalarda da elde edilmiş ve 100 nm boyutlardaki nanopartiküllerin 1-10 µm boyutlarındaki mikropartiküllere göre hücre içi alımlarda 15-250 kat daha etkili olduğu gösterilmiştir [24, 32].

Yapılan literatür taramalarında nanopartikül sistemler ile ilgili çok sayıda çalışmaya rastlanmıştır, ancak araştırmamızda kullandığımız juglon maddesiyle ilgili gerek nanopartiküler sistemlere yüklenmesi ve gerekse bu sistemlerin sitotoksisite etkinliklerinin incelenmesi ile ilgili herhangi bir çalışma saptanmamıştır. Bundan dolayı sunulan bu tezde antimikrobiyal özelliği bilinen juglon maddesi PLGA kopolimeri kullanılarak oluşturulacak nanopartiküler sisteme yüklenmiştir. Oluşturulan nanopartikül formülasyonun karakterizasyonu ve *in vitro* biyouyumluluk analizleri için vero hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi incelenmiştir.

1.2 Tezin Amacı

Antimikrobiyal aktivitesi daha önceki çalışmalarda gösterilmiş olan juglon maddesinin nanopartikül sistemlere yüklenerek nanopartiküllerin karakterizasyonun ve vero hücreleri üzerindeki sitotoksik etkinliğinin belirlenmesi, *in vitro* biyouyumluluk analiziyle sitotoksik özelliğinin incelenmesi ve biyouyumluluğunun arttırılması, daha düşük dozlarda daha etkili olan nanopartikül formülasyonlarının geliştirilmesi amaçlanmaktadır.

1.3 Hipotez

Bu çalışmada juglon maddesinin nanopartikül sistemlere yüklenmesi sureti ile biyouyumluluğunun arttırılması ve daha düşük dozlarda daha etkili olan nanopartikül formülasyonlarının geliştirilmesi hedeflenmektedir. Etkin maddeyi içeren nanopartikül taşıyıcı sistemi kan dolaşımında uzun süre kalıp, etkin maddenin korunmasını ve kontrollü salınımını sağlayabilir. Geliştirilen nanopartiküler formülasyonun diğer antimikrobiyal etken maddeler için de faydalı bir model oluşturacağı ve ülkemiz ilaç sanayisine önemli katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1 Nanoteknoloji ve Nanoteknolojinin Tarihçesi

'Nano' sözcük olarak, bir fiziksel büyüklüğün bir milyarda biri anlamına gelmektedir. Bir nanometre ise metrenin bir milyarda birine eşit bir uzunluk birimidir. Bir nanometre içine yan yana ancak 2-3 atom dizilebilmektedir; yaklaşık 100-1000 atom bir araya gelerek nano ölçeklerde bir nesneyi oluşturur [33]. Atomik skalada yapılan bu araştırmalar sonucu oluşan gelişmeler insan sağlığında nanoteknolojiden kaynaklanan tekniklerin uygulanmasıyla nanotıp (Nanomedicine) olarak adlandırılan yeni bir disiplin ortaya çıkarmıştır ve tıpta devrim yaratma potansiyeline sahip yeni bir alan olarak ifade edilmektedir. Bu alanın kalbi, nanometre boyutunda yapıların oluşturulup bunların boyutuna bağlı olarak gösterdikleri çeşitli eşsiz fiziksel ve kimyasal özelliklerinin kullanılmasına dayanmaktadır [34].

Nanobilim kavramı ilk kez 1959 yılında Nobel Fizik Ödülü sahibi Richard Feyman tarafından bilim felsefesiyle ilgili bir sohbeti sırasında gündeme getirilmiştir [35]. Feynman konuşmasında; atom ve moleküler boyutta üretim yapılabilirse birçok yeni keşiflerin yapılabileceğini, bu kapsamda öncelikle nanoölçekte özel ölçme ve üretim yöntemlerinin geliştirilmesi gerektiğini belirtmiştir. Feynman, gelişmiş mikroskoplar ve yeni üretim metotları gibi günümüz nanoteknolojisinin önemli etmenlerinin geliştirilmesi yönünde öngörülerde bulunmuş, doğal yaşamdan örnekler vererek çok küçük bir hacme ne kadar çok fonksiyon ve bilginin sığdırılabileceğini göstermiştir [36].

Drexler 1986 yılında moleküler yapıdaki nanoteknolojinin dikkat çekici olanaklarını tartışmaya açmıştır. Zamanla nanoteknolojideki hızlı gelişmelerin diğer teknolojik

alanlarda olduğu gibi insan ve ekosistem için büyük yararları olduğu kadar önemli zararları olabileceği konusunu da gündeme getirmiştir [37]. Drexler, atomlarla, canlı hücrelerden çok daha küçük, mevcut makinalardan çok daha güçlü, hafif ve kendi kendini kopyalayan nanoölçek seviyesinde makinalar üretilebileceğini iddia etmiştir (Drexler,1986).

1981 yılında Heinrich Rohrer ve Gerd Karl Binning tarafından, elektron mikroskobuyla görülemeyen atom parçacıklarını 2000 kez büyütme özelliği bulunan ve atomik ölçekte çözünürlük sağlayan Tarama Tünel Mikroskobu keşfedilmiştir. Müteakiben 1986 yılında; G.Binnig, C.F.Quate ve Ch.Gerber, Atomik Kuvvet Mikroskopu'nu keşfetmişlerdir. Heinrich Rohrer ve Gerd Karl Binning, Tarama Tünel Mikroskobunun keşfi sebebiyle fizik alanında Nobel ödülü kazanmışlardır.

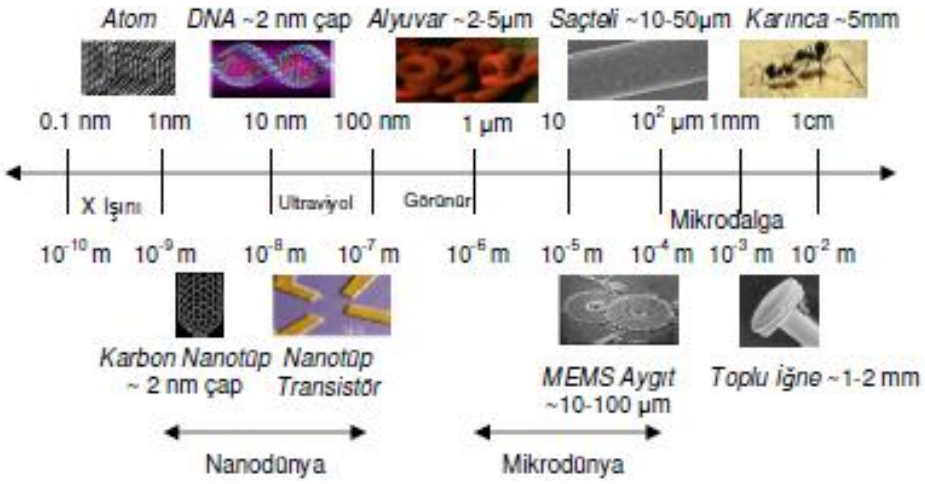
1991 yılı içerisinde Japon araştırmacı Sumio Lijima, 1985 yılında keşfedilen karbon nanotüpleri üretmiştir. Ayrıca 1986 yılında keşfedilen Atomik Kuvvet Mikroskopu (AFM) ilk kez canlı hücreler üzerinde kullanılmış, antikorların etkileri ve canlı alyuvarların tuzluluk değişimleri gözlemlenmiştir.

2006 yılında ise, kansere karşı ilaç dağıtımı için nanoparçacıklar kullanılarak vücudun belirli bölgelerine müdahele etme yeteneği geliştirilmiştir. Bu konuda Harvard Tıp Fakültesi, MIT, Harvard Kanser Nanoteknoloji Mükemmeliyet Merkezi ve Gwangju Bilim ve Teknoloji Enstitüsünden (Kore) bilim adamları, nanoparçacıkların kanser tedavisinde başarıyla kullanıldığını açıklamışlardır [36].

Son yıllarda nanoteknoloji alanındaki hızlı gelişmeler bu teknoloji ürünlerinin günlük yaşantımıza daha fazla oranda girmesine yol açmaktadır. Bugün itibariyle 1000'den fazla çeşit nanoteknoloji ürününün günlük kullanılan ürünler arasında yerlerini aldığı görülmektedir. Kir tutmaz bebek elbiseleri, leke tutmaz masa örtüleri, su tutmaz-ıslanmaz-kirlenmez boyalar, tıraş losyonları, güneş kremleri, hatta tanı ve tedavi amacıyla yapılan bir takım ilaç-tıbbi uygulamalar bunlardan bazılarıdır. Nanoteknolojiye dayalı ekonominin 2015 yılında 1 trilyon doları aşacağı tahminleri yapılmaktayken, bu beklentinin 3 trilyon doları aşacağı ifade edilmeye başlanmıştır [38]. Nanoteknolojideki bu akıl almaz hızlı gelişmeler bu teknolojinin özünü oluşturan nanopartiküllere dikkatleri çevirmiş ve ilk deneysel gözlemler bu kuşkuyu haklı çıkaracak boyutlara ulaştığını göstermiştir.

Nanoteknoloji, maddelerin 100 nm veya daha küçük boyutlara küçültülmesi, bunların karakterizasyonu ve analiz etme konularını içine alır. Bu derece küçük yapıların benzersiz ve yeni fonksiyonel özellikler taşıdıklarının belirlenmesi ile nanoteknolojiye gösterilen ilgi ve bu araştırma alanında yapılan çalışmalar son yıllarda giderek artmış olup, artmaya da devam etmektedir. Nano boyutlara inildiğinde artan "yüzey alan/hacim" oranı maddeyi çok daha aktif yaparak çevredeki moleküllerle daha farklı etkileşmesine sebep olur.

Nanoteknoloji kısaca, atom ve moleküllerin bir araya getirilmesi ile nanometre ölçeklerde işlevli yapıların oluşturulması şeklinde özetlenmektedir. Nanometrenin büyüklüğünün daha iyi anlaşılması amacıyla Şekil 2.1'de değişik uzunluk ölçüleri gösterilmiştir [36].



Şekil 2.1 Değişik Uzunluk Ölçüleri [35]

Nanobilim ve nanoteknolojinin hedefi, nanoölçek seviyesinde sistem ve malzemeler tasarlamak, üretmek, çeşitli özelliklere sahip nanoebatlarda cihazlar yapmak ve tüm bu üretilenleri günlük yaşamın her evresinde kullanılır hale getirmektir.

2.2 Nanoteknolojinin Uygulama Alanları

Nanoteknoloji, biyosistemlerin değişimi için yeni çözümler sunar ve birçok alanda teknolojik geniş bir platform sağlar: Endüstride bioproses teknolojisinde, moleküler tıp [39] alanında hastalık tanı ve teşhis, antikanser, antienflamatuvar [40] ve antiparaziter ilaçlarda, protein ve peptitler için taşıyıcı sistemlerde, ayrıca aşı ve tanı maddelerinde de kullanılır [41]. Çevredeki nanoyapıların hastalıklara etkisinin gözlemlenmesinde

(ekotoksikoloji [42, 43]); gıda ve tarım sistemlerinin geliştirilmesinde [44] (tarım veriminin arttırılması, yeni gıda ürünleri, gıda koruması); veteriner hekimlikte de yaygın uygulama alanı bulunmaktadır [45, 46]. Veterinerlikte özellikle hayvanları parazitlere karşı korumak için içme suyu içinde verilen ve bağırsakta parçalanarak ilacı serbestleştiren nanopartiküller kullanılmaktadır [47, 48]. Antijenik özellikteki molekülleri taşıyan nanopartiküllerin ise immünolojide ümit verici sonuçlar verdiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [49].

Çizelge 2. 1 Nanopartiküllerin genel medikal uygulamaları [50]

Nanopartiküller	Örnek	Medikal Uygulamalar
Metal Nanopartikül	Altın Nanopartikül	Hastalık tanı ve teşhisi
	Altın Nanoçubuk	Biyosensör
	Altın Nanokabuk	Moleküler görüntüleme
	Kuantum Kristalleri	İlaç salımı
Manyetik Nanopartikül	Süperparamanyetik demir oksitler	MRI
Polimerik Nanopartikül	PLGA	İlaç salımı
	PLA-PGA	Protein salımı
		Gen ekspresyon vektörü

Nanobilimin tıp alanındaki araştırmalarının temel amacı, bireysel molekül seviyesinde biyofizik ve biyokimyanın temellerini gösteren detaylı bir anlayış elde etmektir. Uygulama alanı olarak kısa vadede proteinler, DNA ve diğer bio-polimerlerin nanoelektronik ve biosensör uygulamalarında kullanılabileceği öngörülmektedir. İlaç alanındaki uygulamalar ise gelecek vadetmektedir. Hastalık teşhisi, ilaç dağıtımı ve moleküler görüntüleme gibi alanlarda yoğun araştırmalar yapılmaktadır.

Nanoteknolojinin tıp alanındaki kullanımı birçok alt başlık altında incelenmektedir. Bunlar; hastalıkların tanısı ve tanısı yapılan hastalıklara doğru tedavinin uygulanması ve doğru ilacın sevki alt başlıkları olarak sayılabilmektedir. Hastalığın tedavisinin yapılabilmesi için öncelikli olarak tanının dogru yapılması önem arzetmektedir. Bu kapsamda, nanoölçek seviyesinde yapılmış sensörler tanının doğru ve zamanında yapılabilmesine imkan sağlayacaktır.

Tıp alanında kullanılan nanocihazlar, moleküllerin, proteinlerin ve DNA'nın faaliyetlerini de tespit etmek amacıyla kullanılmaktadır. Hastalıkların tanısının konulması sonrasında uygulanacak tedavi süreci, hastalığın ve hastanın durumu açısından oldukça önem arzetmektedir. Bu kapsamda hedefe yönelik ilaç dağıtımı nanoteknolojinin sağlık alanında getireceği en önemli avantajlardan birisi olacaktır. Sadece hastalıklı dokulara etkili olan nanoilaçlar, hem yan etkileri ortadan kaldıracak hem de hastanın çektiği sıkıntıyı azaltacaktır. Aynı zamanda bu ilaçların doğrudan hastalıklı bölgeye ulaşmasını sağlayacak nanosistemlerin geliştirilmesi yönünde araştırmalar da sürdürülmektedir.

Günümüzde nanoteknolojinin önemli etkilerinin görülmesi beklenen kanser tedavisinde demir nanoparçacıklar veya altın bombacıkların kullanılmasına yönelik çalışmalar etkili örnekler olarak gösterilmektedir. Tanı ve tedavi sürecinde kullanılan malzemelerin nanoölçek seviyede yeniden düzenlenmesi ile kanser tanı ve görüntüleme yöntemleri geliştirilecek ve kanser ilk baslangıç seviyesinde iken tespit edilebilecektir. İlk tespit ile birlikte tedavi sürecinde ise hedefe yönelik olarak üretilen ilaçlar, nanorobotlar vasıtasıyla kanserli hücreye gönderilerek sadece o hücrenin yokedilmesi sağlanacaktır [51].

2.3 Nanoteknolojinin Yararları

- Nanoteknoloji daha az maliyetli daha çok üretim avantajı sağlar.
- Nanoteknoloji sayesinde enerji kaynaklarında yapılan tasarruf ile enerji maliyetleri azalabilir.
- Nanoteknoloji üretim süreçlerini kısaltarak maliyetten ve zamandan kazanır ve rekabet gücü arttırılır.
- Nanoteknoloji kullanılarak elde edilen ürünlerin kalitesi daha yüksek olur.
- Nanoteknolojik ürünler ile insanların yaşam standart ve kalitesi yükseltilerek daha sağlıklı ve daha güvenli bir yaşam olanağı sunar.
- Nanoteknoloji ulusal gelir düzeyinin yükselmesine neden olur [52].

2.4 Küresel Özellikteki Taşıyıcılar

Etken madde parçalanmasını ve kaybını en aza indirmek, zararlı yan etkilerini önlemek, biyoyararlanım ve etki yerlerinde bulunan oranlarını artırmak için, çeşitli etken madde salım sistemleri ve hedefleme sistemleri geliştirilmiştir. Bu sistemlerden bazıları lipozomlar, nanopartiküller, etkin madde-polimer konjugatları ve polimerik misellerdir. Son yıllarda özellikle polimerik miseller üzerinde artan bir ilgi söz konusudur [53].

İlaç taşıyıcı sistemler; çözünürlüğü düşük etkin maddeleri çözünür hale getirmekte ve böylece biyoyararlanımlarını artırmaktadırlar. Gerekli bölgede etkin maddenin toplanabilmesini sağlamak için vücutta yeterli derecede uzun bir süre kalabilmektedirler. İçlerindeki etken maddeyi biyolojik ortamda inaktivasyondan koruyabilmektedirler ve istenmeyen yan etkiler gözlenmemektedir. Nanometre boyutlarında büyüklüğe sahip olmaları, onların zayıf damarlanmanın olduğu bölgelerde birikmelerine olanak sağlamaktadır [54].

Mikropartiküller büyüklükleri 1-1000 μm arasında değişen [55], nanopartiküller ise boyutları ise 10 nm – 1000 nm arasında değişen [56] ve makromoleküler maddeleri içeren kolloidal, katı partiküllerdir.

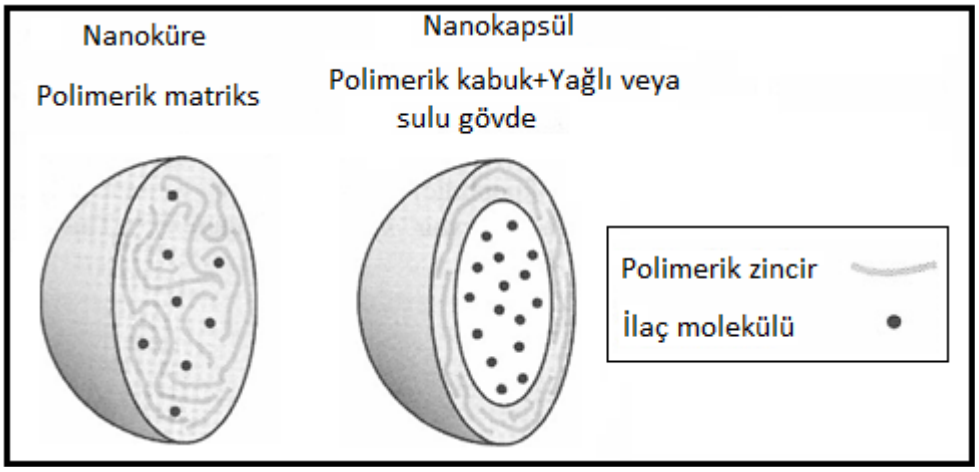
2.4.1 Mikropartiküller

Mikropartiküller, içlerinde etken maddenin moleküler düzeyde ya da makroskopik partiküller halinde disperse edildiği, birkaç μm'den mm boyutlarına kadar değişen çap dağılımına sahip, katı, küresel, partiküller şeklindeki kontrollü salım sağlayan ilaç taşıyıcı sistemlerdir. Burada "Kontrollü salım" deyimi; etken maddenin hızının ve etken maddenin vücuttaki biyolojik dağılımının kontrol edilmesini ifade etmektedir. Dolayısıyla mikropartiküller, hem oral hem parental yolla sürekli etki elde edilmesi, bölgesel kontrollü etken madde salımı, kan dolaşımına enjeksiyonla etken maddenin etki yerine hedeflendirilmesi için kullanılabilmektedir. Böylece etken maddenin dozunun düşürülmesi ve yan etkilerinin azaltılması amaçlanmaktadır [57-61].

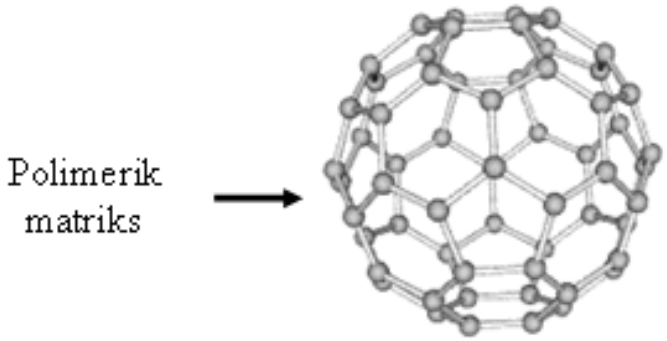
2.4.2 Nanopartiküller

Nanopartiküller, prizma, çubuk, küp, küre, iğne şeklinde farklı morfolojilere sahip, yaklaşık olarak 10-1000 nm boyutlarındaki kolloidal yapılardır. İlk olarak, 1970'lerde bölgeye özgü ilaç taşınması amacıyla kullanılmıştır. Düşük molekül ağırlıklı ilaçları ve

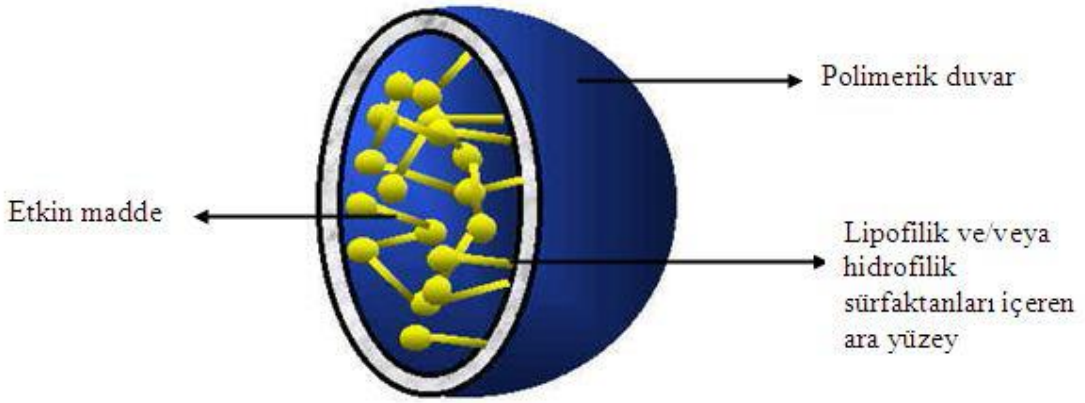
peptit-protein gibi makromolekülleri lokalize veya sistemik olarak taşıyabilirler [48]. Sentetik veya doğal kaynaklı bir makromolekülden meydana gelirler [62, 63]. Aktif madde taşıyıcı sistem olarak hazırlanan ve kullanılan polimerik nanopartiküller pek çok avantajı ile diğer kolloidal yapılı taşıyıcı sistemlerden ayrılmaktadır [64]. Etken maddenin partikül içinde çözündürüldüğü, hapsedildiği veya yüzeye absorbe edildiği ya da bağlandığı sistemlerdir. Hazırlama yöntemine bağlı olarak, enkapsüle edilmiş terapötik ajanın farklı özellikler ve farklı salım karakteristikleri sergilediği nanoküreler veya nanokapsüller elde edilir. Nanokapsüller veziküler sistemlerdir, ilaç bir kaviteye hapsedilir ve bir polimer membran ile çevrelenir. Nanoküreler ise matriks sistemlerdir, burada ilaç fiziksel olarak ve uniform olarak disperse edilmiştir [65] (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 Nanoküre ve nanokapsül yapısının şematik gösterimi [30]

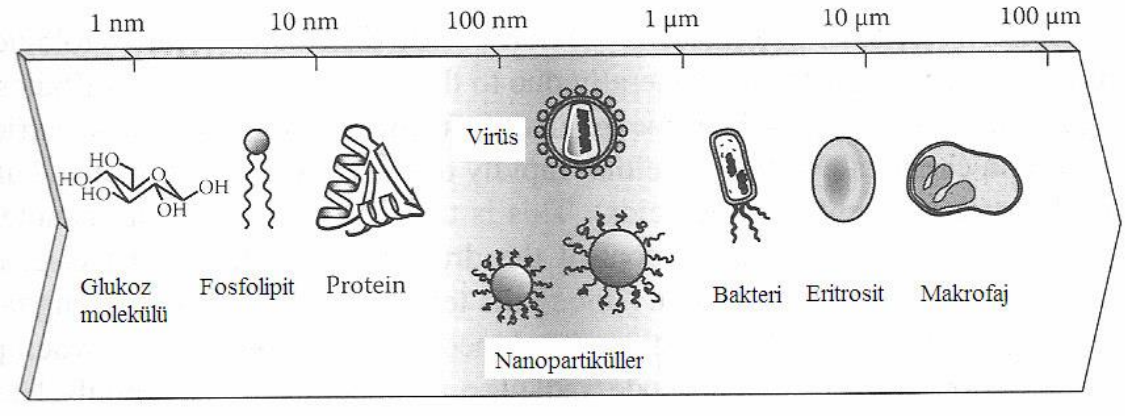


Şekil 2.3 Nanoküre yapısının şematik gösterimi

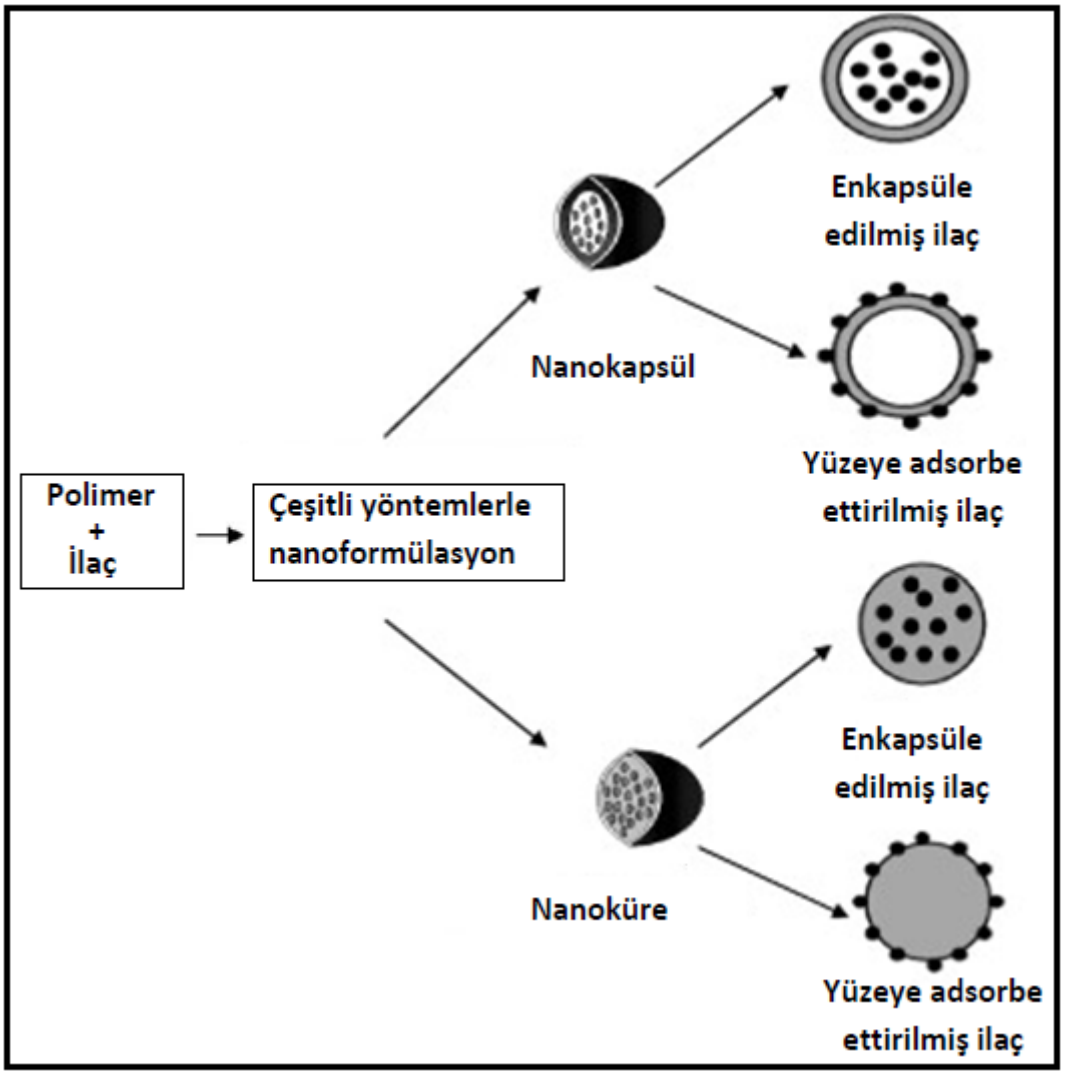


Şekil 2.4 Nanokapsül yapısının şematik gösterimi [30]

Mikropartikül sistemlerle karşılaştırıldığında nanopartiküller nano boyutlarından dolayı hücre içerisine daha kolay ulaşabilmektedirler. Örneğin Santral Sinir Sistemi hastalıklarının tedavisindeki en önemli problem, aktif maddelerin beyne sınırlı geçişleridir. Bu sınırlı geçişin nedeni ise beyin kapiller endoteli tarafından oluşturulan kan beyin engelidir. Son yıllarda, kan beyin engelinin aşılmasına yönelik çeşitli farmasötik stratejiler geliştirilmiştir. Bunlardan en önemlisi, nanopartiküller gibi kolloidal aktif madde taşıyıcı sistemler kullanılarak beyne ilaç hedeflendirilmesidir [64].



Şekil 2.5 Nanopartikül boyutları ve diğer biyolojik moleküller ile karşılaştırılması[65]



Şekil 2.6 Biyoparçalanabilir nanopartiküllerin çeşitleri [30]

2.4.2.1 Nanopartiküllerin Sağladığı Avantajlar

• Yüksek aktif madde yükleme kapasitesine sahiptirler. Bu şekilde, aktif maddenin intrasellüler dağılımı artar.

• Polimerik partiküler yapı katı matriks içine hapsedilmiş aktif maddeyi degredasyondan korur. Böylece aktif maddenin hedeflenmiş hücreye ulaşma olasılığı artar.

• Nanopartiküllerin polimerik yapıları aktif maddenin hedeflendirilmesini, salımının kontrolünü ve sürdürülmesini sağlar. Hedeflenen bölgede injeksiyonlarını takiben günler hatta haftalar süren bir aktif madde salımına olanak verirler.

• Diğer kolloidal taşıyıcı sistemlerle kıyaslandıklarında polimerik nanopartiküller biyolojik sıvılarda çok daha yüksek stabiliteye sahiptirler.

• Nanopartiküller kolaylıkla sterilize edilebilen kolloidal partiküllerdir.

• Fizyolojik ortamda parçalanabilirler ve parçalanma ürünleri toksik değildir.

• Küçük partikül boyutları nanopartiküllerin küçük kapillerlere penetrasyonuna imkan verir ve hücreler tarafından tutulmalarını sağlar. Böylece, vücutta hedeflenen bölgede istenen aktif madde salımı sağlanır.

• Aktif maddenin hedef bölgede salımını sağladıkları için, aktif maddenin, diğer organ ve dokular üzerindeki sistemik toksisitesini azaltırlar.

• Aktif maddenin vücutaki dağılımını ve terapötik aktifliğini düzenlerler.

• Üretim teknikleri genel olarak basit ve kolaydır [47, 66-74].

Bu üstünlüklerinin yanı sıra, nanopartiküllerin bazı sakıncaları da bulunmaktadır. Bu sistemlerin, sahip oldukları oldukça küçük partikül büyüklüğü ve geniş yüzey alanı partiküller arası agregasyona neden olabilmekte, bu da nanopartiküllerin katı veya sıvı formları halinde saklanmasını zorlaştırmaktadır. Ayrıca, küçük partikül büyüklüğü ile geniş yüzey alanı, sınırlı ilaç yüklemesine ve salımda ani patlama etkisine yol açabilir ki, bu etki "burst effect" yani "patlama etkisi" olarak bilinmektedir. Nanopartiküller, klinik olarak kullanıma geçmeden yani ruhsatlandırılmadan önce bu sorunların çözüme kavuşturulması gerekmektedir [75, 76].

2.4.2.2 Nanopartikül Hazırlanmasında Kullanılan Polimerler

Polimerik nanopartiküller birçok açıdan avantajlıdır. İlaç yükleme kapasiteleri yüksektir ve ilacın hücreiçi taşınımı artırılabilir. Katı matriksli taşıyıcı partiküller, ilaçları degradasyona karşı korurlar, böylece ilacın beyine ulaşma olasılığı yükselir. Ayrıca taşıyıcılar ilaçları hedefleyebilirler ve bu hedefleme kontrol edilebilir [77, 78].

Genel olarak nanopartiküllerin hazırlanmasında, aktif madde ya sentetik veya doğal bir polimer içine hapsedilmekte (nanokapsül) ya da hazırlanan nanopartikül yüzeyine adsorbe ettirilmekte veya polimer yapı içinde çözünerek bir matriks yapısı oluşturmaktadır (nanoküre). Nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan polimerler;

1- Doğal polimerler

- Proteinler (albumin, jelatin)
- Polisakkaritler (aljinat, kitozan, dekstran)

2- Sentetik polimerler

- Önceden sentezlenenler (polianhidrit, polikaprolakton (PECL), polilaktik asit (PLA), polilaktik-ko-glikolik asit (PLGA))
- Nanopartiküllerin hazırlanması sırasında sentezlenenler (polisiyano-akrilat (PACA), polibütil-siyano-akrilat (PBCA)) şeklinde sınıflandırılabilir.

İlk nanopartiküller, albumin gibi doğal ve poli (akrilamit), poli (metil metakrilat) gibi biyolojik olarak parçalanmayan sentetik polimerlerden hazırlanmıştır. Protein bazlı polimerlerin sakıncası bunlara karşı gelişen antijenik yanıtlar iken biyolojik olarak parçalanmayan sentetik polimerlerin en önemli sakıncaları ise toksisite riskleridir.

Hazırlama sırasında sentezlenen polimerler, toksik özellikte olan monomerlerin kalabilme olasılığı nedeniyle bir risk taşımaktadırlar. Son zamanlarda peptit, protein ve nükleik asitlerin nanopartiküller ile taşınmasında ise polisakkaritlerden yararlanılmaktadır [64].

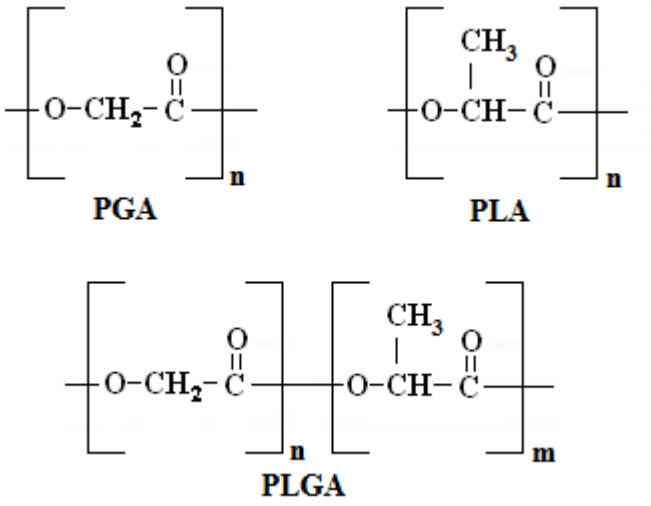
Çizelge 2.2 Nanopartikül hazırlanmasında kullanılan polimerler [79]

Polimer Tipleri	**Polimer İsimleri**
Sentetik polimerler	Poli(laktid) Poli(laktid-ko-glikolid) Poli(ε-kaprolakton) Poli(izobütilsiyanoakrilat) Poli(izoheksilsiyanoakrilat) Poli(n-bütilsiyanoakrilat) Poli(akrilat) Poli(metakrilat)
Doğal polimerler	Kitosan Aljinat Jelatin Albümin
Blok kopolimerler	Poli(laktid)-poli(etilen glikol) (PLA-PEG) Poli(epsilon-kaprolakton)- poli(etilen glikol) (PCL-PEG) Poli(heksadesilsiyanoakrilat)-ko-poli(etilen glikol) (PHDCA-PEG)
Kolloidal stabilizanlar	Dekstran Poli(vinil alkol) Tween® 20 veya Tween® 80

Sunulan tez çalışmasında nanopartiküllerin hazırlanması amacıyla poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) kopolimeri kullanılmıştır. Bu nedenle aşağıda PLGA kopolimerlerine ait ayrıntılı bilgi sunulmuştur.

2.4.2.2.1 Poli(D,l-laktik-ko-glikolik asit) (PLGA)

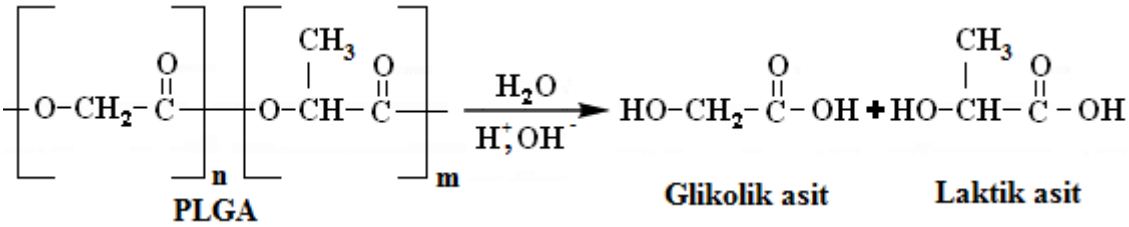
PLGA ile hazırlanmış ilaç sistemlerinin konvansiyonel sistemlere göre çok sayıda avantajı bulunmaktadır. Bu avantajlardan biri, ilaçların uzatılmış salım özelliklerinin günler, haftalar veya aylarca devam edebilmesidir [80]. PLGA polimerleri biyouyumlu ve biyobozunur özelliklerinden dolayı ilaç, hormon, peptid ve proteinlerin kontrollü salımı için uygun taşıyıcılardır. PLGA, yapısındaki ester bağlarının hidrolizi sonucu laktik ve glikolik asit son ürünlerine bozunmaktadır. Polimerin bozunma davranışı salım kinetiğini belirleyen önemli bir parametredir. PLGA'yı oluşturan kopolimerlerden PGA hidrofilik yapıda olup 2-4 haftada bozunur. PLA ise yapısındaki metil grupları dolayısıyla hidrofobik yapıdadır. Zengin laktik asit içeriği PLGA kopolimerlerinin hidrofilitesini azaltır ve buna bağlı olarak polimer daha yavaş bozunur [81, 82].



Şekil 2.7 Poli(Laktik asit) (PLA), Poli(Glikolik asit) (PGA) ve Poli(d,l-laktik-ko-glikolik asit)(PLGA) polimerlerinin kimyasal yapıları [83]

PLGA'nın yaygın kullanımının sebepleri biyolojik olarak parçalanabilir olması, biyolojik olarak geçimli olması ve FDA (Gıda ve İlaç İdaresi) tarafından onaylanmış olmasıdır. Kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar, analjezikler, antibiyotikler gibi çeşitli ilaçların yanısıra protein, peptid, gen, aşı, antijen, insan büyüme faktörleri, vasküler endotelial büyüme faktörleri gibi makromoleküler yapıdaki çeşitli aktif farmasötik ajanların PLGA veya PLGA ile hazırlanmış ilaç sistemleri içerisine başarılı bir şekilde

yüklenebilmektedir. Sonuç olarak bu sistemler genel olarak ilaçların hedeflendirilmesinde (hücresel veya doku bazında), ayrıca lokal etkilerinin de fayda sağlayacağı sistemlerde kullanılmaktadır. Biyoyararlanımı artırırlar, ilaç salımını uzatırlar veya sistemik etki amacıyla ilaçların çözünmesini sağlarlar. Gelecekte yapılacak araştırma ve geliştirme çalışmalarında PLGA veya PLGA ile hazırlanmış ilaç sistemleri çeşitli avantajlarından dolayı ilgi çekici bir alandır [80].

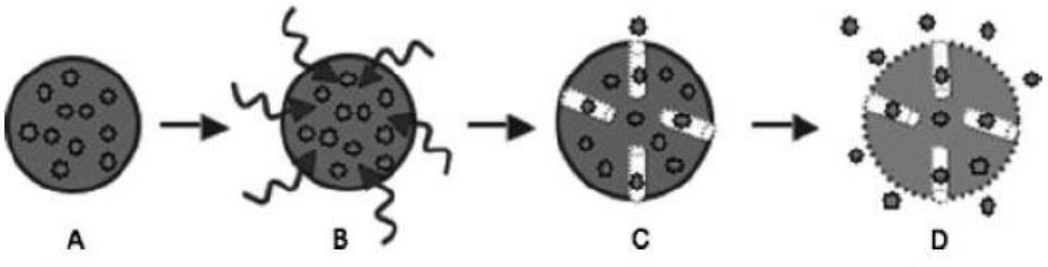


Şekil 2.8 PLGA polimerinin hidrolizi [83]

Farklı terapötik etkinlikteki pek çok düşük veya yüksek molekül ağırlıklı, hidrofilik ve hidrofobik etkin maddeler PLGA nanopartiküllerine enkapsüle edilebilirler. PLGA nanopartikülleri oral, intravenöz, intra-arteriyal, nazal ve inhalasyon yoluyla ilaç taşınmasında uygulanabilmektedir [84].

PLGA nanopartikülleri i.v. uygulamadan sonra karaciğerde bulunan mononükleer fagositik sistem tarafından sistemik dolaşımdan uzaklaştırılır. PLGA nanopartikülleri hücreye endositoz ile alınmakta ve sitoplazmada toplanmaktadır. PLGA vücutta laktik asit ve glikolik asit monomerlerine parçalanmakta, bunlar da sitrik asit döngüsüne girmek suretiyle metabolize olarak CO_2 ve H_2O olarak elimine edilmekte, glikolik asit ise böbrekler tarafından uzaklaştırılmaktadır [85].

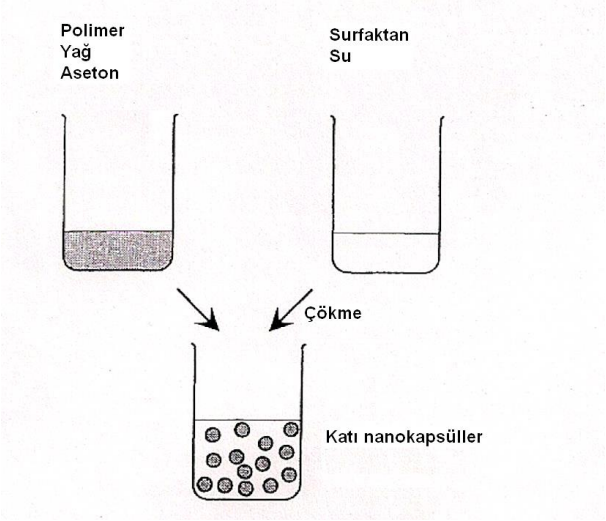
PLGA matrislere yerleştirilen ilaçlar, ortama şekil 2.9'da da şematize edildiği gibi, polimer matristen difüzyon yoluyla ve polimerin bozunmasına bağlı olarak salınır. Polimerin bozunması, değişen blok kopolimer bileşimine ve moleküler ağırlığına bağlı olarak günler veya aylar sürebilir [41].



Şekil 2.9 Biyobozunur polimerik partiküllere tutunan biyoaktif ajanların partiküllerden salımı. Aktif ajan ile birleştirilen polimerik sistem, çevre ile etkileştiriliyor ve çevresindeki ortam sıvısı matrise giriyor (A), ardından sistemin şişmesine neden oluyor (B), sıvı difüzyon kanalları oluşturuyor (C) ve malzemenin bozunmasıyla birlikte oluşan polimerik sistem de yok oluyor (D) [41].

2.4.2.3 Nanopartikül Üretim Yöntemleri

Nanopartikül formülasyonlarının hazırlanmasına yönelik olarak çok sayıda üretim tekniği bulunmaktadır. Nanoküreler için en yoğun kullanılan teknikler polimer çözeltisinin emülsifikasyonuna dayanan emülsiyon çözücü difüzyon, emülsiyon çözücü buharlaştırma, salting-out teknikleri iken nanokapsül üretimi için genel olarak kullanılan tek bir yöntem bulunmaktadır. Bu yöntem ilk defa 1989 yılında Fessi ve ark. tarafından geliştirilmiştir ve sulu faza eklenen organik faz içinde bulunan polimerin organik faz ile birlikte yağ/su ara yüzeyine difüze olduğu yüzeylerarası polimerizasyon ya da yüzeylerarası depozisyon tekniğidir. Zamanla çeşitli araştırmacılar tarafından bu teknik üzerinde farklı modifikasyonlar gerçekleştirilerek yöntem çeşitlendirilmiştir. Nanokapsül oluşumu için gerekli olan temel şart ise organik fazın fosfolipit yapılı bir yağ içermesidir (Şekil 2.10) [86].



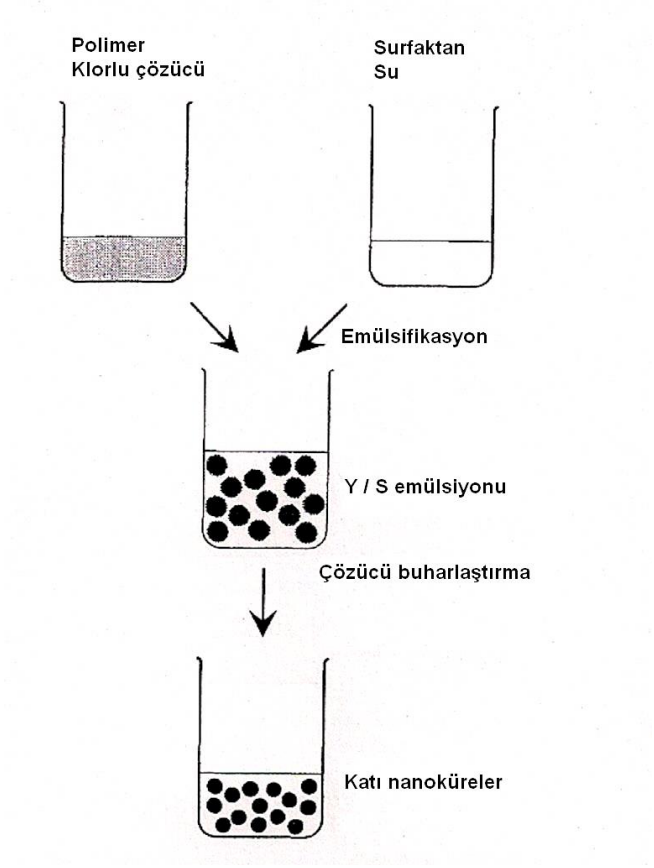
Şekil 2.10 Yüzeylerarası depozisyon tekniği ile nanokapsül oluşumu [86]

Hazırlama yönteminin seçimi, kullanılan polimerin yapısına ve etkin maddenin çözünürlük özelliğine göre belirlenmektedir. Nanopartikül hazırlama yöntemleri olarak önceleri monomerlerin çeşitli ortamlarda in situ polimerizasyonuna dayanan yöntemler kullanılmıştır. Günümüzde ise, tam olarak karakterize edilmiş, önceden sentezlenmiş polimer veya dogal makromoleküllerin dispersiyonuna dayalı yöntemler geliştirilmiştir [87].

2.4.2.3.1 Emülsifikasyon – Çözücü Buharlaştırma Yöntemi

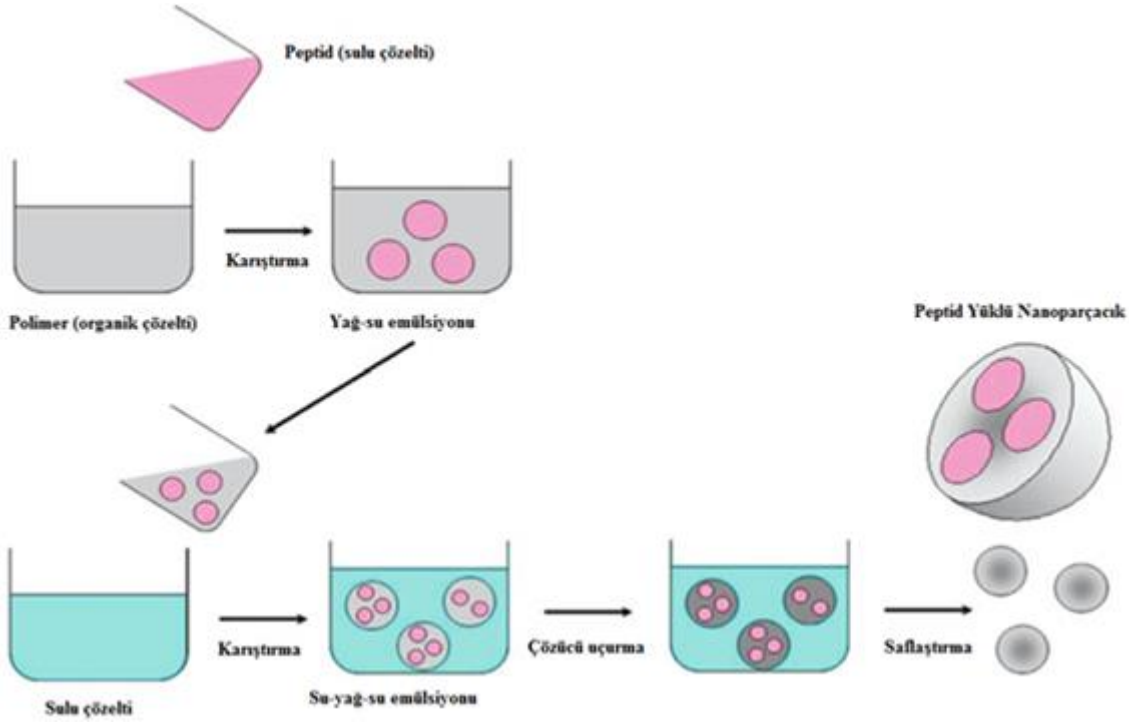
İlk defa 1971 yılında Vanderhoff ve ark. geliştirdikleri bir patente dayanılarak Gurny ve ark. tarafından uygulanan bu yöntemin esası, su ile karışmayan diklorometan, kloroform gibi klorlu bir organik çözücüde polimerik materyalin çözünmesi ve ardından surfaktan içeren sulu faz içinde emülsifiye edilmesine dayanır (Şekil 2.11). Bu üretim metodunda en çok kullanılan surfaktanlar polisorbatlar, poloksamerler ve sodyum dodesilsülfattır. Emülsifikasyon prosesi, mekanik karıştırmayla, sonikasyonla ya da yüksek basınçlı homojenizasyonla gerçekleştirilir. Ultrasonik, insan kulağının duyamayacağı kadar yüksek frekansdaki ses dalgalarıdır (>18 kHz). Ultrasonik emülsifikasyon, birbiri ile karışmayan iki sıvı surfaktan varlığında ultrasonik bir enerji alanına getirildiklerinde oluşmaktadır [88]. Ultrasonik metotlarda titreyen katı bir yüzey, premiks emülsiyonunu genellikle 20 kHz veya daha fazla ultrasonik frekansta ve yüksek güçte karıştırmaktadır, böylece taneciklerin parçalanmasını sağlayacak ekstrem kayma ve kavitasyon sağlanmaktadır [89]. Ultrasonik emülsifikasyon damlacık boyutlarının küçültülmesinde etkilidir fakat sadece küçük hacimler için uygundur [90].

Organik çözücü ya oda sıcaklığında ya da düşük basınç altında buharlaştırılarak ortamdan uzaklaştırılır. Bu tekniğin en önemli dezavantajı, emülsiyonun hazırlanabilmesi için organik çözücü kullanımının gerekliliğidir [86].



Şekil 2.11 Emülsiyon-çözücü buharlaştırma tekniği ile nanoküre oluşumu [86]

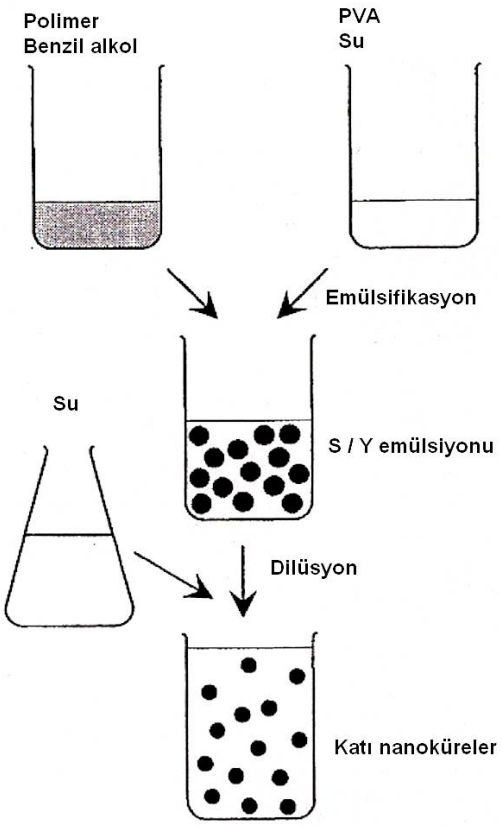
Etkin maddenin hidrofilik ya da hidrofobik oluşuna göre, hazırlanan emülsiyonun tipi farklılık gösterir. Peptit, protein yapısındaki ilaçların bu yöntemle enkapsülasyonlarının sağlanabilmesi için, S/Y/S tipinde çoklu emülsiyonu oluşturulur. Hidrofilik ilaçlar hazırlama sırasında dış faza kaçmaktadır [91]. Hidrofilik ilaçların hapsedilme etkinliğini artırmak için S/Y/S emülsifikasyon/solvan buharlaştırma yöntemi geliştirilmiştir [92]. Organik faz bu sistemde iki sulu faz arasında ilacın dış sulu faza difüzyonunu önleyici bir bariyer görevi görmektedir [93]. Bu yöntemde etkin maddenin sulu çözeltisi, polimer içeren organik faz içinde dağıtılır. Elde edilen S/Y emülsiyonu dış sulu faz içinde emülsifiye edilerek S/Y/S çoklu emülsiyonu hazırlanır. Elde edilen küreler santrifüjlenir, yıkanır ve kurutulur (dondurarak kurutma vb.).



Şekil 2.12 Peptid yüklü nanopartiküllerin ikili emülsiyon S/Y/S çözücü buharlaştırma yöntemi ile üretimi [94]

2.4.2.3.2 Emülsifikasyon – Çözücü Difüzyon Yöntemi

Emülsiyon-çözücü difüzyon yöntemi, 1995 yılında Leroux ve ark. tarafından salting-out tekniğinde su fazında yüksek miktarlarda elektrolit kullanımına bağlı olarak biyoaktif bileşiklerle elektrolitler arasında ortaya çıkan geçimsizlik probleminin aşılması amacıyla bu teknikten hareketle geliştirilmiştir. Bu hazırlama yönteminin esası, PVA veya jelatin gibi surfaktan bir madde içeren su fazının, su ile kısmen karışabilen benzil alkol ve etil asetat gibi organik bir çözücü içinde çözünmüş halde bulunan polimer çözeltisine eklenmesi ve ilk etapta yağ içinde su tipi bir emülsiyonun oluşturulmasına dayanır. Organik çözücü kısmen suyla karışabildiğinden hesaplı bir miktar daha su ortama ilave edilerek organik çözücünün tamamen su faza difüze olması sağlanarak polimerin nanoküreler halinde çökmesi temin edilir (Şekil 2.13) [86].



Şekil 2.13 Emülsiyon-çözücü difüzyon yöntemi ile nanoküre oluşumu [86]

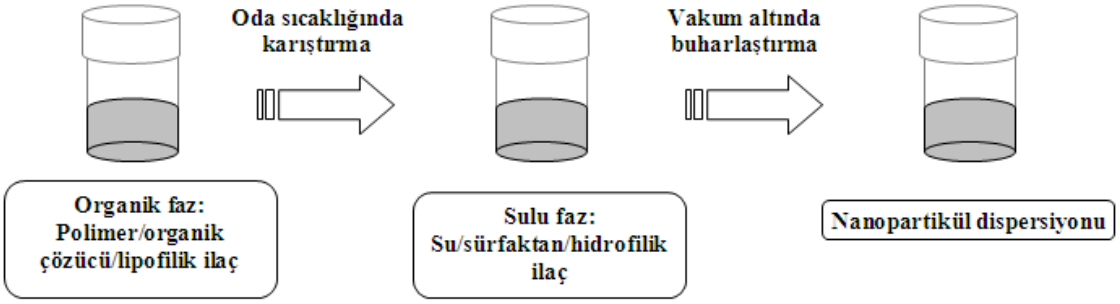
2.4.2.3.3 Nano Çöktürme (Nanopresipitasyon) Yöntemi

Fessi ve ark. tarafından 1989 yılında nanokapsül formülasyonlarının hazırlanması için geliştirilen yüzeylerarası depozisyon tekniğinin nanoküre hazırlama amacıyla modifiye edilmesiyle geliştirilen bir tekniktir. Bu yöntemin esası, aseton gibi suyla karışabilen bir organik faz içinde çözünen polimerik materyalin, PVA gibi surfaktan bir madde içeren su fazına manyetik karıştırma altında ilave edilmesi ile nanokürelerin kendiliğinden çökmesine dayanır (Şekil 2.14) [86].

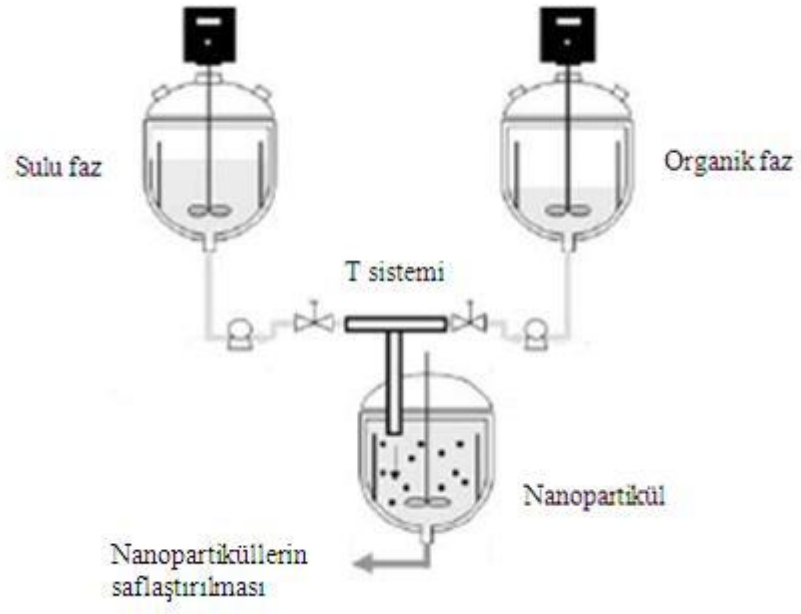
Bu yöntemde, organik faz, iç su fazında tamamen çözünmektedir. Bu nedenle, buharlaştırma veya çözücü ekstraksiyonu gibi yöntemlere gerek kalmadan nanoküreler ortamda çökmektedir. Yöntemin esasına göre, polar olmayan çözücü içerisindeki polimer, yarı-polar özellikte çözücüdeki etkin maddenin organik fazda çözünmesini sağlamakta ve polimer-etkin madde yapısının hemen çökmesine neden olmaktadır. Şekil 2.14'de nanopresipitasyon metoduna göre laboratuvar koşullarında düşük

miktarlarda ve endüstriyel boyutta büyük miktarlarda nanopartiküllerin hazırlanması şematik olarak gösterilmektedir [49].

Nanopresipitasyon yöntemi ile hidrofobik özellikteki polimer içerisine hem hidrofobik hem de hidrofilik etkin maddeleri enkapsüle etmek mümkün olmaktadır. Etkin maddeleri çözecek çözücü, hem polar hem de polar olmayan özellikte olabilmektedir. Bu yöntem ile nanopartikül hazırlamada toksik yardımcı maddelerin kullanılma gereğinin bulunmaması nanopresipitasyon metodunun önemli bir üstünlüğü olarak belirtilebilir [49].



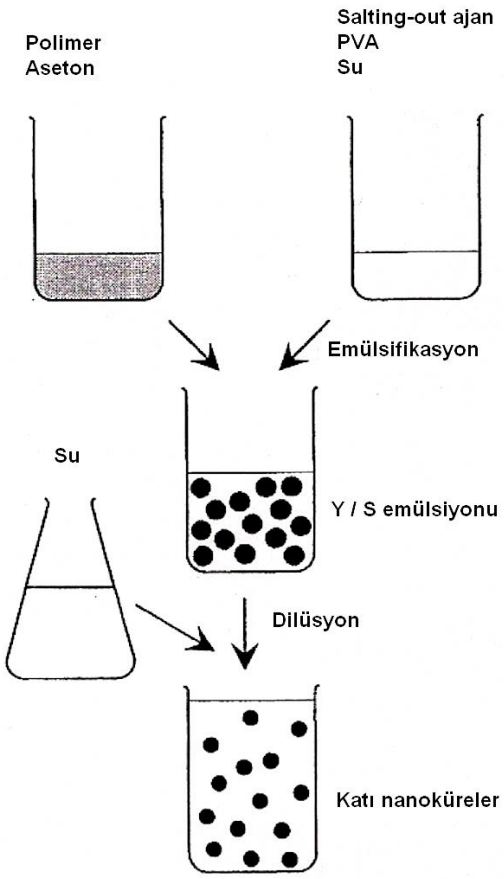
(A)



(B)

Şekil 2.14 Nanopresipitasyon metoduna göre nanopartikül hazırlanmasının şematik gösterimi (A: Laboratuvar koşullarında, B: Büyük ölçekte hazırlama) [49]

2.4.2.3.4 Tuzla Çöktürme (Salting-Out) Yöntemi



Şekil 2.15 Salting-Out Yöntemiyle Polimerik Nanopartikül Üretimi [86]

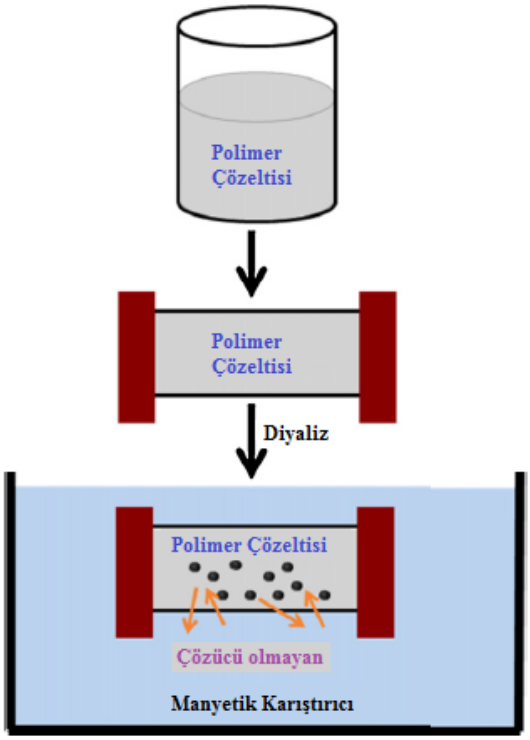
Salting-out tekniğinin ilk uygulaması 1988 yılında Bindschaedler ve ark. tarafından geliştirilen bir patentle olmuştur. Bu tekniği emülsiyon-çözücü buharlaştırma yönteminden ayıran temel farklılık toksik çözücü kullanılmamasıdır. Bu durum bu prosesin başlıca avantajını da oluşturmaktadır [86]. Organik faz, polimer ve etkin maddenin aseton gibi bir çözücüde çözünmesiyle elde edilir. Sonrasında salting-out ajanı (magnezyum klorür, kalsiyum klorür gibi elektrolitler) içeren polivinilpiroldon gibi koloidal stabilizatörlerin sulu jel çözeltisi içerisinde emülsifiye edilirler. Surfaktan olarak çoğunlukla polivinil alkol kullanılmasının temel nedeni ise bu maddenin salting-out ajan olarak kullanılan pek çok elektrolit ile geçimli olmasıdır. Kullanılan elektrolit madde ile doygun halde bulunan sulu çözelti salting-out prosesi ile asetonun su fazına difüzyonunu engeller [86]. Bu yağ/su emülsiyonu çözücünün diffuzyonu için yeterli hacime kadar seyreltilir ve difüzyon sonucu nanopartiküller elde edilir [95-98].

2.4.2.3.5 Süper Kritik Sıvı Teknolojisi

Konvansiyonel metotlar (çözücü ekstraksiyon buharlaştırma, çözücü difüzyon ve organik faz ayrışması) fizyolojik sistemlere ve doğaya zararlı olan organik çözücülerin kullanımını gerektirir. Bu nedenle kullanımı zararlı olmayan süperkritik sıvılarla biyoparçalanabilir mikro ve nanopartikül hazırlanma yolları araştırılmıştır. Süperkritik sıvılar genel olarak süperkritik sıcaklığı üzerinde, basıncın değişmesine rağmen faz değiştirmeyen sıvılar olarak tanımlanırlar. Süperkritik CO_2 en çok kullanılan süperkritik sıvıdır, çünkü kritik olduğu durumlar uyumludur (Tc=31,1 ˚C, Pc=73.8 bar), toksik değildir, alev almaz ve ucuzdur. Genel olarak süperkritik sıvılarla en çok gerçekleştirilen proses teknikleri süperkritik anti-solvent (SAS) ve kritik çözeltinin ani genleşmesidir (RESS). SAS metodunda süperkritik sıvı ile tamamen karışabilen bir sıvınının (örneğin metanol) içinde süpekritik sıvıda çözünmeyen solut tamamen mikronize edilir. Çözücünün süpekritik sıvı içinde ekstrakte edilmesi solutun aniden çökmesine sonuç olarak da nanopartikülün oluşmasına sebep olur. RESS yönteminin SAS yönteminden ayrıldığı basamak solutun süperkritik sıvı içinde çözünmesini takiben çözeltinin düşük basınca nozzle yardımıyla genleştirildiği basamaktır. Böylece süperkritik sıvıların çözücü gücü birden azalır ve solut çöker. Bu tekniğin avantajı çöktürülmüş ürünün çözücü içermemesidir. Bu teknik polimerik nanopartiküller hazırlamak amacıyla kullanılır [99]. Süperkritik sıvı teknolojisi tekniği, doğaya zararsız ve yüksek miktarda üretimler için elverişli olmasına rağmen özel tasarım edilmiş pahalı ekipmanlar gerektirmektedir [65].

2.4.2.3.6 Diyaliz

Diyaliz küçük ve dar dağılımlı nanopartiküllerin oluşturulmasında kullanılan basit ve etkili bir yöntemdir [100-104]. Bu yöntemde polimer organik bir çözücüde çözünür ve uygun molekül ağırlığına göre diyaliz yapan diyaliz tüpü içerisine yerleştirilir. Çözücünün diyaliz sonucu yer değiştirmesine bağlı olarak polimer çözünürlüğü kaybetmekte ve polimerin kademeli agregasyonu meydana gelmekte ve böylece homojen nanopartikül süspansiyonu elde edilmektedir (Şekil 2.16) [96].



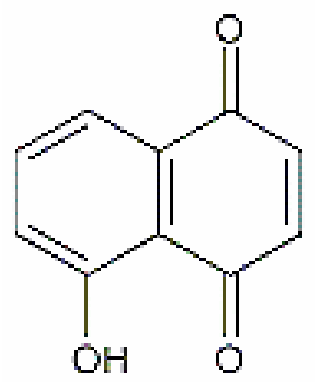
Şekil 2.16 Diyaliz yöntemi ile nanopartikül oluşumunun şematik gösterimi [96]

2.5 Ceviz Ağacı, Juglon ve Allelopatik Etkisi

Ceviz bitkisi serbest olarak büyümeye bırakıldığı zaman 20-25 m. boylanmakta, 350-400 m^2 alanı tek başına kaplayabilmektedir. Dalları çevreye ve yukarı doğru aynı hızla gelişme gösterdiği için ağaç genellikle düzgün bir küre görünümü almaktadır. Bitkiler aleminde mensubu bulunduğu sınıfın karakterlerine uygun olarak kuvvetli bir kazık köke sahiptirler. Bu kuvvetli kök gelişimi daha tohum çimlenirken başlar. İlk yıl toprak üstünde gelişen gövdenin en az 2-3 katı kadar kalınlığa erişir. Kazık kök, kalınlığına rağmen gövdeden daha az sert ve yumuşak dokuludur. Birinci yıl çok az yan kök teşekkül eder. İkinci ve müteakip yıllarda yan kökler de kazık köke uygun olarak hızlı gelişme gösterir, saçak kökler yan köklerin ucunda teşekkül eder [105].

Amerika'da doğal olarak yayılım gösteren kara ceviz ağaçlarının (*Juglans nigra L.*) dibinde ekilen yonca otlarının yağmurlardan sonra kısa zamanda öldükleri, ceviz yapraklarından damlayan yağmur sularının saksılardaki domateslere verilmesiyle domateslerin öldükleri, ceviz ağaçlarına yakın olan elma ağaçlarının cevizden tarafta olan dal ve köklerinin kurudukları, buna mukabil ceviz dibinde üçgül ve çayır otlarının çok iyi gelişebildikleri tespit edilmiştir [105]. Daha sonra bu etkiye sahip olan madde, cevizin kök ve yaprak özütlerinden izole edilerek bunun 5-hidroksi-naftokinon olduğu

tespit edilmiş ve cevizin Latince ismine izafeten "juglon" adı verilmiştir . Şekil 2.17'da juglonun kimyasal yapısı görülmektedir. Daha sonraki çalışmalarda juglonun sadece kara ceviz ağaçlarından değil diğer ceviz türlerinden de salıverildiği belirlenmiştir [106]. Bunlardan biri de ülkemizde yaygın ceviz türü olan *Juglans regia L*. dır. Bu ceviz türünde juglon miktarının mevsimlik değişimi incelendiğinde kışın en düşük düzeyde iken ilkbahar başlangıcından Nisan sonuna kadar düzenli bir artış, daha sonra Haziran sonuna kadar bir azalma ve Temmuz başından Ağustos ortasına kadar tekrar bir artış gösterdiği belirlenmiştir [107]. Juglonun köklerde sentezlenip ksilem vasıtasıyla bitkinin yapraklarına taşındığı ve juglonun bitkide hidrojuglon şeklinde bulunduğu ancak daha sonra bunun oksitlenmesiyle toksik karakterli juglona (5-hidroksi-1,4-naftakinon) dönüştüğü belirtilmiştir [108]. Cevizde juglon köklerden toprağa geçebileceği gibi yapraklardan da yağmurla yıkanarak toprağa geçebilir. Ayrıca yaprakların absisyonuyla da toprağa karışır [109, 110].



Şekil 2.17 Juglonun kimyasal yapısı [1]

Juglon ekolojik öneme sahip bir allelokimyasal maddedir. Çünkü juglon ceviz ağaçlarının yaprak ve köklerinden çevreye salıverilen toksik karakterli bir madde olduğundan ceviz ağaçlarının dibinde ve yakınında birçok bitki türü gelişememekte hatta kurumaktadır. Bunun yanında bazı bitki türleri nadir de olsa juglondan olumlu etkilenmektedir [111]. Ceviz ağaçlarının dünyada çok yaygın olarak bulunmasından ve juglonun allelopatik özelliğe sahip olmasından dolayı onun ekolojik önemini artırmaktadır. Juglon bütün ceviz türlerinde bulunmakla birlikte en çok *Juglans nigra* ve ülkemizde en yaygın ceviz türü olan *Juglans regia*' da bulunduğu belirtilmektedir [112, 113]. Hidrojuglon olarak adlandırılan renksiz, toksik olmayan, indirgenmiş form, özellikle yapraklarda, meyve kabuklarında ve ceviz köklerinde boldur. Hidrojuglon cevizden dışarı salgılandığında hava ile temas ederek oksitlenmeye maruz kaldığında

toksik formu olan juglona dönüşür [114, 115]. Yaprakların yağmur sularıyla yıkanmasıyla toprağa taşınır. Böylece, ceviz ağacından salıverilen juglonun komşu bitkilerin kökleri tarafından absorbe edilmesiyle komşu bitkiler olumlu veya olumsuz etkilenmektedir [106]. Ceviz ağacından salgılanan juglonun hem odunsu hem de otsu bitkiler üzerine toksik olduğu rapor edilmiştir [106, 116].

Juglonun bitkiler üzerine allelopatik etkileri genelde toksiktir, fakat nadiren yararlıdır. Domates, salatalık, tere ve yoncanın fide büyümesinin juglon ve ceviz yaprak özütleri tarafından güçlü bir şekilde engellendiği, fakat kavun fide büyümesinin bu uygulamayla arttığı tespit edilmiştir [117].

Juglonun fizyolojik etkisi tam olarak anlaşılamamıştır. Juglonun tohum çimlenmesi ve fide büyümesi üzerine olan etkisi hakkında bir kaç çalışma yapılmıştır. Juglonun solunum ve fotosentezi azaltarak bitki büyümesini engellediği [118, 119] ve oksidatif stresi artırmasıyla, oksitleyici enzimlerin aktivitelerini artırdığı belirlenmiştir [115].

2.6 Juglonun Mikroorganizmalar Üzerine Etkileri

Krajci ve Lynch (1978) yaptıkları çalışmada, juglon ve ceviz özütlerinin (etanol, hekzan, su, DMSO çözücüleri ile hazırlanan) çeşitli mikroorganizmalar üzerindeki inhibisyon etkilerini araştırmıştır. Araştırmacılar juglonu çeşitli konsantrasyonlarda (1.0-0.5-0.25-0.125-0.0625-0.0313-0.0156 mg/ml) ve ceviz özütlerini de çeşitli çözücüler (etanol, hekzan, su, DMSO) kullanarak mikroorganizmalara uygulamışlardır. Ceviz özütleri kullanılan mikroorganizmaların çoğunda etkili olmuş, fakat juglon kullanılan bütün test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal etki göstermiştir [120]. Clark ve arkadaşları (1990) juglonun antimikrobiyal aktivitesini araştırmıştır. İki dermatofit olan *Microsporum gypseum* ve *Trichophyton mentagrophytes* türlerini kullanarak juglonun minumum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) değerlerini, diğer ticari fungal ajanlar (clotrimazole, triacetin, tolnaftate, griseoflavin, zinc undecylanate, selenium sulfide) ve fungal antibiyotikler (liriodenine ve liriodenine methiodide) ile karşılaştırmalı olarak tespit etmiştir. Juglonun MİK değerleri, diğer ticari fungisitler (zinc undecylanate, selenium sulfide) kadar etkili olduğunu göstermiştir.

Lopez ve arkadaşları (2001) yaptıkları çalışmada, Kolombiya'da yetişen tıbbi bitkilerinin antiviral ve antimikrobiyal aktivitelerini araştırmıştır. Kolombiya'da yetişen ceviz (*Juglans neotropica*) ve diğer bitki türlerinden metanolle hazırlanan ekstratlarının

virüs olarak HSV ve RNA polivirüs, gram pozitif bakteriler olan *Bacillus subtilis, Streptococcus faecelis, Staphylococcus aureus methisiline* dirençli, gram negatif bakteriler olan *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeroginosa* (wild), *Salmonella typhimurium*, *Mycobacterium phlei* ve maya türü olarak *Candida albicans* üzerideki etkileri incelemiş, ceviz mayalar ve bakteriler üzerinde geniş bir antimikrobiyal ve antiviral etki göstermiştir [121].

BÖLÜM 3

DENEYSEL ÇALIŞMALARDA KULLANILAN ÖLÇÜM YÖNTEMLERİ

3.1 Kullanılan Cihazlar

- Hassas Terazi - Shimadzu
- Sonikatör – Bandelin Sonoplus
- Manyetik Karıştırıcı – Variomag Mono
- Çoklu Manyetik Karıştırıcı – IKA
- Santrifüj Cihazı – Hettich Zentrifugen (universal 32 R)
- UV-Vis Spektrofotometre – Shimadzu UV-1800
- Zeta Potansiyel ve Parçacık Ölçüm Cihazı – Malvern ZEN 3600 Nano ZS
- SEM – Zeiss – EVO LS 10
- FT-IR – Shimadzu IR-Prestige
- İnkübatör – Biosan, ES 20
- Ultrasonik Su Banyosu – Bandelin Sonorex
- Milipore-Q Gradient Su Cihazı
- Vortex – Stuart, Heidolph

3.2 Kullanılan Kimyasallar

- Juglon (5-Hidroksi-1, 4-naf) – Sigma Aldrich H47003-5G
- *Poli*(*laktik*-ko-glikolik asit) PLGA – Sigma Aldrich 719900
- Diklorametan DCM - Sigma Aldrich 24233-2
- Aseton - Sigma Aldrich-24201-2
- NaCl
- Na_2HPO_4

- NaH_2PO_4
- NaOH
- HCl

3.3 Kullanılan Çözeltiler

3.3.1 Çeşitli Konsantrasyonlardaki Juglon Çözeltileri

1 mg Juglon 10 ml DCM içerisinde çözülerek 0,1 mg/ml oranında çözelti elde edildi. 0,1 mg/ml – 0,001 mg/ml konsantrasyonları arasında 20 adet çözelti UV-Vis Spektroskopisinde spektrumu alınmak için hazırlandı. Elde edilen spektrumda λ_{max} değeri belirlendi. Bu λ_{max} değerindeki UV şiddetlerinden kalibrasyon eğrisi çıkartıldı.

3.3.2 Polivinilalkol PVA

%3'lük polivinil alkol çözeltisi elde etmek için; 15 g polivinil alkol tartıldı ve üzerine 500 ml ultra saf su eklenip manyetik karıştırıcıda 60-70 °C'de homojen çözelti elde edilene kadar karıştırıldı.

%2'lik polivinil alkol çözeltisi elde etmek için; 10 g polivinil alkol tartıldı ve üzerine 500 ml ultra saf su eklenip manyetik karıştırıcıda 60-70 °C'de homojen çözelti elde edilene kadar karıştırıldı.

%1'lik polivinil alkol çözeltisi elde etmek için; 5 g polivinil alkol tartıldı ve üzerine 500 ml ultra saf su eklenip manyetik karıştırıcıda 60-70 °C 'de homojen çözelti elde edilene kadar karıştırıldı.

%0,5'lik polivinil alkol çözeltisi elde etmek için; 2,5 g polivinil alkol tartıldı ve üzerine 500 ml ultra saf su eklenip manyetik karıştırıcıda 60-70 °C'de homojen çözelti elde edilene kadar karıştırıldı.

%0,1'lik polivinil alkol çözeltisi elde etmek için; 0,7 g polivinil alkol tartıldı ve üzerine 700 ml ultra saf su eklenip manyetik karıştırıcıda 60-70 °C'de homojen çözelti elde edilene kadar karıştırıldı.

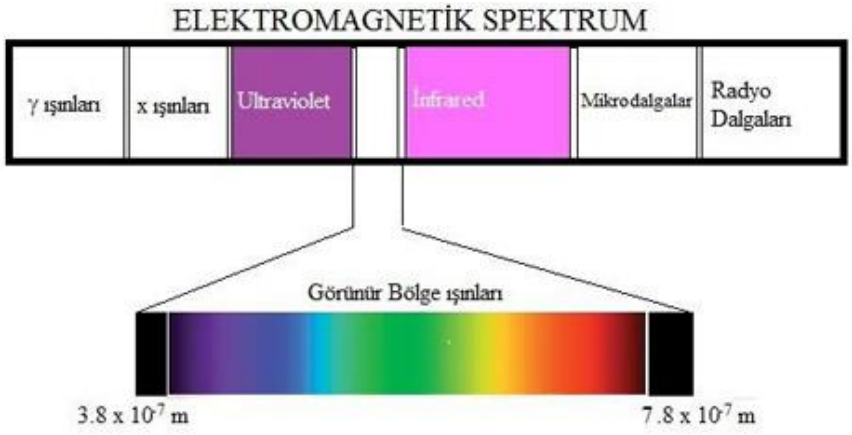
3.3.3 0.01 mol/L'lik Fosfat Tamponu (PBS) (pH=7.4)

1.1998g NaH_2PO_4 tartılarak 500ml saf suda çözülür. Aynı zamanda 1.7799g Na_2HPO_4 tartılarak yine 500ml saf suda çözüldü. Bu iki çözeltiden NaH_2PO_4 çözeltisi, Na_2HPO_4 çözeltisinin üzerine eklendi ve karışıma 8.766g NaCl ilave edilerek, tekrar karıştırıldı. Çözeltinin pH'ı 7.4'ye ayarlandı.

3.4 Nanopartiküllerin Karakterizasyonunda Kullanılan Cihazlar

3.4.1 UV-Vis Spektroskopisi

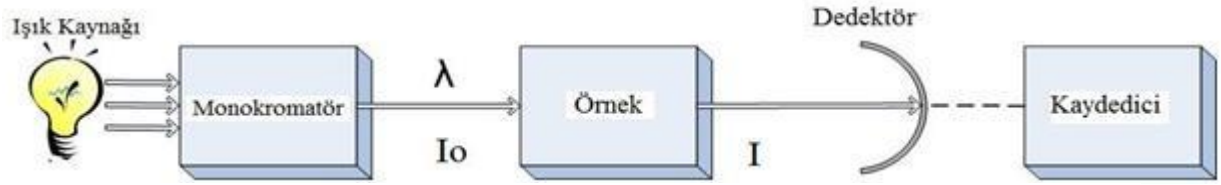
Görünür bölge ve mor ötesi (UV-VIS) spektroskopisi moleküllerdeki elektronik geçişlerin verdiği spektrumları konu alır ve ikisi birden elektronik spektroskopi olarak adlandırılır. Elektronik spektrum 100-700 nm aralığını kapsar; 100-200 nm aralığı Vakum UV, 200-400 nm aralığı UV (veya yakın UV) ve 400-700 nm aralığı görünür bölgedir. Bir bileşik görünür bölgede absorbsiyon yaparsa renklidir ve absorbladığı rengin tamamlayıcı renginde görünür. Örneğin, viyolede absorpsiyon yapan bir bileşik yeşildir.



Şekil 3.1 UV-görünür bölge

Mor ötesi ve görünür bölge spektrofotometrelerinde cam veya kuvars prizma bulunur ve kullanırken ışığın herhangi bir frekanslı UV veya görünür bölgesi seçilir. Işık örnekten (veya örnek çözeltisinden) geçtikten sonraki absorbsiyonu (soğurganlığı) veya geçirgenliği okunur. UV bölgesinde en uygun ışık kaynağı hidrojen deşarj tüpü ve görünür bölgede tungsten lambasıdır. Otomatik spektrofotometreler, frekansı düzgün olarak değiştirir.

Tek ışık yollu spektrofotometrelerde, bileşenlerin tümü aynı ışık yoluna yerleştirilmiştir. Bu aletin başlıca üç ayar düğmesi vardır: Bunlardan biri, alette kullanılan optik ağ veya prizmayı mekanik olarak döndürmeyi sağlayan düğmedir. İkinci düğme, ışık yolunu tamamen kapatarak galvanometre "sıfır" geçirgenlik ayarını yapmak içindir. Üçüncü düğme, ışığın geçtiği aralığın enini değiştirir. Ölçümün yapılacağı dalga boyu birinci düğme ile ayarlandıktan sonra ışık yolu kapatılarak ikinci düğme ile "sıfır" ayarı yapılır. Daha sonra üçüncü düğme ile ışığın geçtiği aralığın eni değiştirilerek ve örnek kabında sadece çözücü kullanılarak galvanometre 100 değerine getirilir. Sıfır ve 100 ayarları her dalga boyunda yeniden yapılmalıdır.



Şekil 3.2 Tek Işık Yollu Spektrometre [122]

Çift ışık yollu spektrofotometrelerde, monokromatörden çıkan ışık, eşit şiddette iki demete bölünerek biri örneğe diğeri sadece çözücünün bulunduğu kaba gönderilir. İkiye ayrılan ışık, iki ayrı dedektörle algılanır ve dedektörlerde oluşan sinyallerin oranı ölçülür. Böylece örnekteki geçirgenlik değeri sürekli olarak çözücününki ile karşılaştırılmış olur. Burada iki dedektörün tam uyumlu olması, yani eşit şiddetteki ışık ile aynı sinyali oluşturması gerekir.

Çift ışık yollu spektrofotometrelerde, tek dedektör kullanılarak da ölçüm yapmak mümkündür. Örnekten ve çözücüden geçen ışık demetleri dedektör üzerine art arda gelir ve alternatif türden sinyal oluşturur. Işık şiddetleri eşit ise dedektörde herhangi bir sinyal oluşmaz; örnek bölmesinden gelen ışığın şiddeti absorpsiyon nedeniyle azaldığı zaman dedektöre gelen sinyal alternatif sinyal olarak algılanır.

Çift ışık yollu spektrofotometrelerin bir başka türü çift dalga boylu spektrofotometrelerdir. Çift dalga boylu spektrofotometrelerde iki farklı monokromatör vardır; iki farklı dalga boyundaki ışık, dönen bir ışık bölücü yardımıyla örnekle art arda etkileştirilir. Bulanık çözeltilerde dalga boylarından biri çözeltideki maddenin

absorplayacağı, diğeri ise absorplamayacağı değerlere ayarlanır. Bulanıklıktan dolayı her iki dalga boyunda aynı miktarda ışık kaybı olacağından iki dalga boyunda yapılan ölçümlerin farkı, sadece örneğin absorbansı ile ilişkilidir [122].

Spektrofotometrik cihazların birçoğunda (özellikler UV, FTIR) absorpsiyon ölçümü yapılırken ışık sadece hedef moleküllerle değil çözelti ile de etkileşime girer. Dolayısıyla cihaz bize hedef molekülün absorpsiyon spektrumunu vermez, çözeltinin spektrumunu verir. Bunu önlemek için, sadece hedef molekül türünün absorpsiyonunu öğrenmek için kör (blank) alınır. Bu işlemin bir diğer adı dara almaktır. Çift ışık yollu spektroskopilerde bir hücreye numune konulurken diğerine çözücü konulur. Tek ışık yollu spektroskopilerde ilk önce çözücü kuvartz küvete konularak dara alınır. Daha sonra ölçüm alınır.

Biyolojik moleküllerin UV absorplama özellikleri; çözeltilerindeki konsantrasyonun ve saflığın tayininde kullanılmaktadır [123].

3.4.2 Zeta Sizer

Zeta potansiyel partiküllerin yüzey yüklerinin oluşturduğu potansiyelin dolaylı olarak ölçümüdür. Başka bir ifade ile partiküller arasındaki itme veya çekme değeri ölçümüdür [124]. En az bir boyutu 1 nm–1 μm arasında olan peptid, protein gibi katı bir maddenin sıvı bir çözücü içinde çözünmesiyle oluşan kolloidal sisteme kolloidal süspansiyon denir. Kolloidal sistemlerin doğalarını gösteren en önemli özelliklerden ikisi, partikül boyutu ve yüzey özellikleridir [125].

Zeta Sizer NS cihazı, kolloidal çözeltilerde partiküllerin boyutunu, zeta potansiyelini ve molekül ağırlığını bulmak için kullanılır. Kolloidlerin (homojen görünümlü heterojen karışım) kararlılığı, partiküller arasındaki itme çekme kuvvetini belirleyen zeta potansiyeli ile yakından ilişkilidir. Zeta Sizer cihazı, belirli bir potansiyel altında hareketi sağlayan tanelerin hızını belirleyerek zeta potansiyelini hesaplamaktadır.

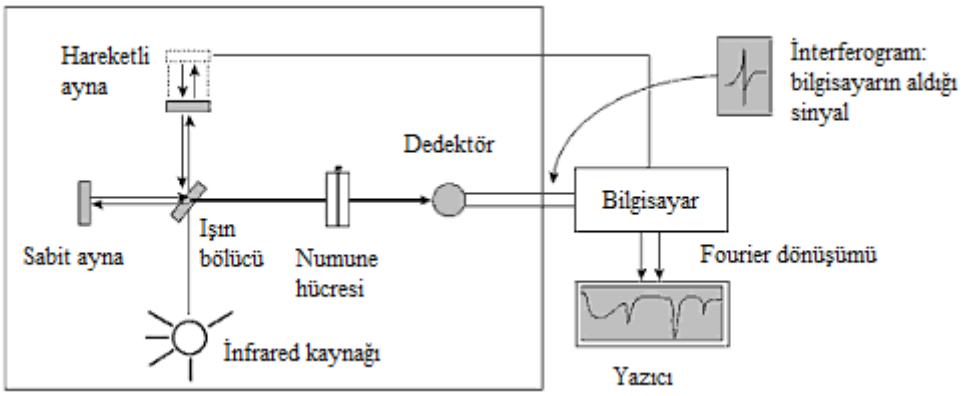
3.4.3 SEM - Scanning Electron Microscope (Taramalı Elektron Mikroskopisi)

Taramalı elektron mikroskobunda (SEM) görüntü elde etmek için yüksek enerjili elektronların numune yüzeyine odaklanması sağlanır ve bu elektron demeti numune yüzeyinde taratılır. Bu tarama sırasında elektron ve numune atomları arasında oluşan çeşitli etkileşimler uygun algılayıcılarda toplanır ve sinyal güçlendiricilerinden

geçirildikten sonra bir katot ışınları tüpünün ekranına aktarılarak görüntü elde edilir. Modern sistemlerde bu algılayıcılardan gelen sinyaller dijital sinyallere çevrilerek bilgisayar monitörüne verilmektedir [126].

3.4.4 FT-IR Fourier Transform Infrared

FT-IR spektrometre Şekil 3.4'de görüldüğü üzere infrared ışık kaynağı, ışın bölücü ve dedektörden oluşmaktadır [127-132]. İnfrared kaynağından çıkan ışın, ışın bölücü ve sabit ve hareketli aynalardan oluşan interferometreden geçerek ikiye ayrılır. Sabit ve hareketli aynalar yardımıyla tekrar ışın bölücüye gelen ışın, numuneden geçer ve numune bu ışının bir kısmını absorplar. Numuneden çıkan ışın dedektöre ulaşır ve numune tarafından absorplanan kısmının belirlenmesi amacıyla referans olarak kullanılan bir lazer ışınıyla karşılaştırılır. Sonuç olarak elde edilen interferograma bilgisayar aracılığıyla Fourier dönüşümü uygulanır ve numuneye ait FT-IR spektrumu elde edilir [131-133].



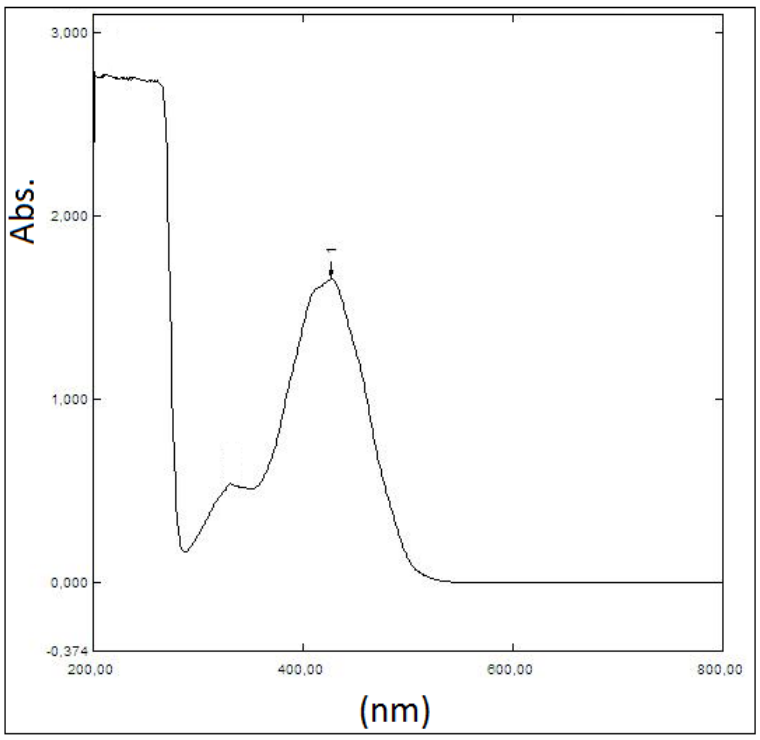
Şekil 3.3 FT-IR spektrometrenin şematik gösterimi [131].

BÖLÜM 4

DENEYSEL BÖLÜM

4.1 Juglonun UV Standart Eğrisi

1 mg Juglon 10 ml DCM içerisinde çözülerek 0,1 mg/ml oranında çözelti elde edildi. 0,1 mg/ml – 0,001 mg/ml konsantrasyonları arasında 20 adet çözelti UV-Vis Spektroskopisinde spektrumu alınmak için hazırlandı. Elde edilen spektrumda λ_{max} değeri belirlendi. Bu λ_{max} değerindeki UV şiddetlerinden kalibrasyon eğrisi çıkartıldı.

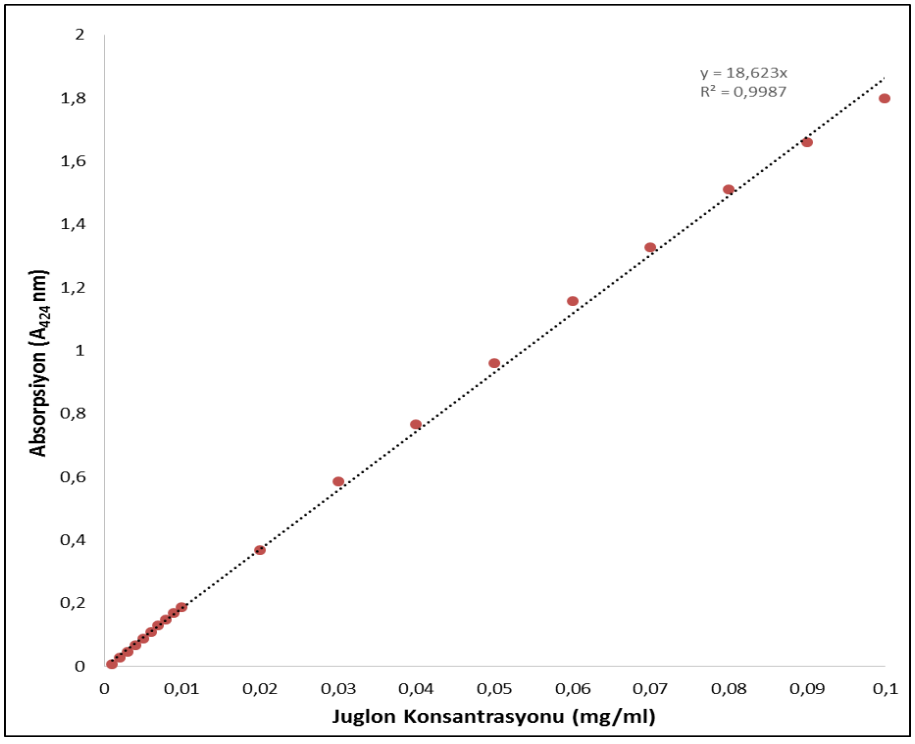


Şekil 4.1 Juglonun UV-VIS Spektrumu

Çizelge 4. 1 Juglonun farklı konsantrasyonlardaki 261 nm ve 424 nm'deki absorbans değerleri

Konsantrasyon (mg/ml)	DALGA BOYU (nm)	
	261	424
0,001	0,008	0,006
0,002	0,016	0,027
0,003	0,038	0,045
0,004	0,096	0,066
0,005	0,151	0,086
0,006	0,204	0,107
0,007	0,271	0,128
0,008	0,315	0,146
0,009	0,375	0,167
0,01	0,426	0,185

Konsantrasyon (mg/ml)	DALGA BOYU (nm)	
	261	424
0,01	0,426	0,185
0,02	0,916	0,367
0,03	1,491	0,583
0,04	1,937	0,766
0,05	2,293	0,96
0,06	2,482	1,155
0,07	2,548	1,326
0,08	2,589	1,508
0,09	2,595	1,659
0,1	2,599	1,798



Şekil 4.2 Juglonun kalibrasyon eğrisi

4.2 Farklı Parametrelere Sahip Juglon Yüklü PLGA Nanopartiküllerin Üretimi

PLGA polimeri ile nanopartiküler sistemlerin hazırlanmasında çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Kullanılacak yöntemin seçiminde en etkin parametre ise etken maddenin hidrofilik ya da hidrofobik karakteridir. Alkol, aseton, kloroform, diklorometan gibi organik çözücülerde çözünen juglon molekülünün hidrofobik

özelliğinden dolayı, bu tezde nanopartiküler sistemlerin hazırlanması tekli emülsiyon (s/y) çözücü uçurma yöntemi [134] ile gerçekleştirilmiştir. 19 farklı kombinasyonda juglon yüklü PLGA nanopartikül ve 1 tane de boş nanopartikül olmak üzere toplam 20 farklı üretim gerçekleştirildi. Belirli miktarlardaki juglon ve PLGA polimeri öncelikle farklı parametrelerdeki çözücüler (DCM ve Aseton) içerisinde çözdürüldü. Oluşan organik faza Tablo 1'de belirtilen farklı konsantrasyonlarda ya da farklı hacimlerde PVA çözeltisi eklendi. Karışım, buz banyosunda 2 dakika 70 W (%80 power) enerji altında sonikasyona tabi tutuldu. Daha sonra oluşan y/s emülsiyonu manyetik karıştırıcı üzerindeki 35 ml %0,1'lik PVA üzerine eklendi. Elde edilen tekli emülsiyon çözücünün uzaklaştırılması için gece boyu manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Daha sonra örnekler 9000 rpm'de 20 dk santrifüj edildi, üst faz uzaklaştırıldıktan sonra pellet ultra saf su ile yıkandı ve santrifüj işlemi tekrar yapıldı. 3 yıkama sonrasında üst fazın uzaklaştırılması ile elde edilen katı nanopartiküller liyafilizatörde kurutularak analiz edilmek üzere +4 °C saklandı.

Çizelge 4.2 Farklı kombinasyonlara sahip nanopartikül üretimi

Sıra	Bileşenler		PVA		Çözücü		Sonikasyon
	Juglon (mg)	PLGA (mg)	İç faz %-ml	Dış faz %-ml	Aseton (ml)	DCM(ml) (Juglon-DCM)	
1	10	100	3,5ml PVA(%3)	35ml PVA(%0,1)	-	1ml-2,5ml	2 dk 70 W
2	20	100	3,5ml PVA(%3)	35ml PVA(%0,1)	-	1ml-2,5ml	2 dk 70 W
3	30	100	3,5ml PVA(%3)	35ml PVA(%0,1)	-	1ml-2,5ml	2 dk 70 W
4	40	100	3,5ml PVA(%3)	35ml PVA(%0,1)	-	1ml-2,5ml	2 dk 70 W
5	50	100	3,5ml PVA(%3)	35ml PVA(%0,1)	-	1ml-2,5ml	2 dk 70 W
6	20	100	3,5ml PVA(%0,1)	35ml PVA(%0,1)	-	1ml-2,5ml	2 dk 70 W
7	20	100	3,5ml PVA(%0,5)	35ml PVA(%0,1)	-	1ml-2,5ml	2 dk 70 W
8	20	100	3,5ml PVA(%1)	35ml PVA(%0,1)	-	1ml-2,5ml	2 dk 70 W
9	20	100	3,5ml PVA(%2)	35ml PVA(%0,1)	-	1ml-2,5ml	2 dk 70 W
10	20	100	6ml PVA(%3)	35ml PVA(%0,1)	-	1ml-2,5ml	2 dk 70 W
11	20	100	8ml PVA(%3)	35ml PVA(%0,1)	-	1ml-2,5ml	2 dk 70 W
12	20	100	10ml PVA(%3)	35ml PVA(%0,1)	-	1ml-2,5ml	2 dk 70 W
13	20	100	20ml PVA(%3)	35ml PVA(%0,1)	-	1ml-2,5ml	2 dk 70 W
14	20	100	3,5ml PVA(%3)	35ml PVA(%0,1)	3,5ml	- -	2 dk 70 W
15	20	100	3,5ml PVA(%3)	35ml PVA(%0,1)	1,2ml	1ml-1,4ml	2 dk 70 W
16	20	100	3,5ml PVA(%3)	35ml PVA(%0,1)	1,75ml	1ml-0,75ml	2 dk 70 W
17	20	200	3,5ml PVA(%3)	35ml PVA(%0,1)	-	1ml-2,5ml	2 dk 70 W
18	20	300	3,5ml PVA(%3)	35ml PVA(%0,1)	-	1ml-2,5ml	2 dk 70 W
19	20	400	3,5ml PVA(%3)	35ml PVA(%0,1)	-	1ml-2,5ml	2 dk 70 W
20	--	100	3,5ml PVA(%3)	35ml PVA(%0,1)	-	1ml-2,5ml	2 dk 70 W

4.3 Reaksiyon Veriminin Hesaplanması

Katı olarak elde edilen nanopartikül miktarının nanopartikül hazırlanmasında kullanılan juglon ve PLGA miktarlarının toplamına oranlanmasıyla reaksiyon verimi elde edilir (4.1).

$$\textbf{Reaksiyon Verimi}\ \% = \frac{Elde\ edilen\ nanopartikül\ miktarı\ (mg)}{Juglon + PLGA}\ x\ 100 \qquad (4.1)$$

4.4 Enkapsülasyon Etkinliğinin Hesaplanması

Nanopartikül içerisine yüklenen juglon miktarını saptamak için nanopartikülün santrifüjü sonrası elde edilen üst faz kullanıldı. Santrifüj sonrası ve yıkama sonrası elde edilen üst fazlar toplanılarak ve partikül içerisine yüklenen juglon miktarı indirekt yöntem ile saptandı. Konsantrasyonu bilinen bir seri standart juglon çözeltisinin UV spektrumları alınarak, 424 nm'deki absorpsiyon değerlerinden standart Juglon UV kalibrasyon eğrisi çizildi. Daha sonra elde edilen üst fazın UV spektrumu alındı ve 424 nm dalga boyundaki UV değerinden yüklenmemiş juglon miktarı hesaplandı. Nanopartikül içerisindeki juglon miktarı ilk kullanılan juglon miktarından yüklenmeyen juglon miktarının çıkarılması ile bulundu. Nanopartikül içerisindeki juglon miktarı ve kullanılan juglon miktarı kullanılarak (4.2)'den enkapsülasyon verimi/etkinliği hesaplandı.

$$\textbf{Enkapsülasyon Verimi}\ \% = \frac{Nanopartikül\ içerisindeki\ ilaç\ (mg)}{Kullanılan\ İlaç\ Miktarı\ (mg)}\ x\ 100 \qquad (4.2)$$

4.5 Etken Yüklenme Kapasitesinin Hesaplanması

Nanopartikül içerisine yüklenen juglon miktarını saptamak için nanopartikülün santrifüjü sonrası elde edilen üst faz kullanıldı. Santrifüj sonrası ve yıkama sonrası elde edilen üst fazlar toplanılarak ve pellet içerisine yüklenen juglon miktarı indirekt yöntem ile saptandı. Konsantrasyonu bilinen bir seri standart juglon çözeltisinin UV spektrumları alınarak, 424 nm'deki absorpsiyon değerlerinden standart Juglon UV kalibrasyon eğrisi çizildi. Daha sonra elde edilen üst fazın UV spektrumu alındı ve 424 nm dalga boyundaki UV değerinden yüklenmemiş juglon miktarı hesaplandı. Nanopartikül içerisindeki juglon miktarı ilk kullanılan juglon miktarından yüklenmeyen juglon miktarının çıkarılması ile bulundu. Nanopartikül içerisindeki juglon miktarı ve

katı olarak elde edilen nanopartikül miktarı kullanılarak (4.3)'den İlaç yükleme verimi hesaplandı.

$$\textbf{İlaç Yüklenme Verimi } \% = \frac{Nanopartikül\ İçindeki\ İlaç\ (mg)}{Elde\ edilen\ Nanopartikül\ (mg)}\ x\ 100 \qquad (4.3)$$

4.6 Juglon Yüklü PLGA Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Hazırlanan nanopartiküler sistemlerin karakterizasyonu için aşağıda belirtilen yöntemler uygulandı.

4.6.1 Zeta Sizer Analizi

Üretilen nanopartiküllerin boyut analizleri Dinamik Işık Saçılması Yöntemiyle 4,0 mV He-Ne lazer lamba (633 nm) ile donatılmış Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK) cihazında 25 °C'de ±0,1 °C hassasiyeti ile gerçekleştirildi. Tüm analizler otomatik modda ve 3 tekrar ile yapıldı. Zeta potansiyel ölçümleri ise kapiler küvetlerde M3-PALS (Faz analiz Işık Saçılması) tekniği kullanılarak yine aynı cihazda 25 °C'de ±0,1 °C hassasiyeti ile ve 3 tekrarda gerçekleştirildi.

4.6.2 SEM Analizi

Y/S tekli emülsiyon çözücü uçurma yöntemi ile oluşturulan katı nanopartiküllerin morfolojik incelemeleri SEM cihazında altın ile kaplandıktan sonra incelenmiştir.

4.6.3 FT-IR Analizi

Numune doğrudan ATR (Attenuated Total Reflectance) ataçmanı kullanılarak analiz edilmektedir.

4.7 Juglon Yüklü PLGA Nanopartiküllerin *In Vitro* Salımı

Çeşitli nanopartikül kombinasyonlarından (NP 2, NP 5, NP 6, NP 12, NP 14, NP 19) 5'er mg tartıldı ve 2 ml PBS tamponunda süspanse edilerek (pH=7,4), 37 °C'de yatay çalkalayıcıda 220 rpm'de çalkalanmaya bırakıldı. Belirli sürelerde örnekler 9000 rpm'de 20 dk santrifüj edildi, üst faz UV spektrofotometrede 424 nm dalga boyundaki UV değeri okunarak salınan juglonun miktarı hesaplandı. Bu işlem 43 gün süre ile tekrar edildi.

4.8 Juglon Yüklü PLGA Nanopartiküllerinin Vero Hücrelerindeki Sitotoksik Analizi

İlk defa Mossman tarafından tanımlanan ve daha sonra Alley ve arkadaşları tarafıdan geliştirilen 3-(4,5-dimetil triazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliumbromid (MTT) yöntemi hücre canlılığının belirlenmesi için yaygın olarak kullanılan pratik bir yöntemdir [135, 136]. MTT hücrelere aktif olarak absorbe olan ve mitokondriye bağlı bir reaksiyon ile renkli, suda çözünmeyen formazana indirgenen bir maddedir [136]. Hücrelerin MTT indirgeme özelliği hücre canlılığının ölçütü olarak alınır ve MTT analizi sonucunda elde edilen boya yoğunluğu canlı hücre sayısı ile doğru orantı gösterir [137]. MTT analizi için maymun böbrekvero hücreleri kullanıldu. Vero hücreler hazır kitler halinde satılan canlılığını yitirme riski düşük, saflaştırılmış hücre kültürleridir. Defalarca pasaj yapmaya uygun, birçok hücre kültürüne göre daha proliferik bir gelişim gösteren yapıya sahiptirler. Bu yüzden ekim yapılan hücre sayısı miktarı da diğer ko-kültür sistemlerine göre daha düşüktür [138].

Serbest juglon, NP 20, NP 2 ve NP 5'in sitotoksisik özellikleri MTT (metil-tiyazoltetrazolyum) yöntemi ile incelendi. MTT analizi için 96 kuyucuklu pleytlere her bir kuyucuğa $2x10^4$ hücre düşecek şekilde ekim yapıldı ve bir gecelik inkübasyonun ardından her bir kuyucuğa farklı konsantrasyonlardaki bileşenler (serbest juglon, NP 20, NP 2 ve NP 5) eklendi. Serbest juglon, NP 20, NP 2 ve NP 5 için 1; 0,75; 0,5; 0,4; 0,2; 0,1 mg/ml konsantrasyonları uygulandı. 48 saat etken ile inkübasyonun ardından her bir kuyucuğun optik yoğunluk değeri 570 nm'de UV absorpsiyonu okunarak elde edildi. Her bir örnek için % hücre canlılığı aşağıda verilen formül ile hesaplandı (Kontrol ve her bir örneğin farklı konsantrasyonları için 3 tekrar çalışıldı ve ortalama alınarak % canlılık hesaplandı) (4.4). IC_{50} değerleri (%50 ölüm oranı) hesaplandı.

$$\%\ Canlılık\ Formülü = \frac{\text{Etken Yüklü Örneklere Ait } Abs_{570}}{\text{Kontrol Grubuna Ait } Abs_{570}} x100 \qquad (4.4)$$

BÖLÜM 5

DENEY SONUÇLARI

Bu tezde nanopartiküler sistemlerin hazırlanması tekli emülsiyon (s/y) çözücü uçurma yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon verimi (RY), enkapsülasyon etkinliği (EE), ilaç yüklenme verimi (DL-%), boyut (Z-Ave), çoklu dağılım indeksi (PDI) ve zeta potansiyel (mV) 5 farklı parametreye göre hesaplanmıştır (Çizelge 5.1).

Çizelge 5.1 Farklı parametrelerin reaksiyon verimi (RY), enkapsülasyon verimi (EE), ilaç yüklenme verimi (DL), boyut (Z-Ave), çoklu dağılım indeksi (PDI), ve zeta potansiyeli (mV) üzerine etkileri

Sıra	Reaksiyon Verimi (RY)		Enkapsülasyon Etkinliği % (EE)			Etken Yüklenme Verimi % (DL)			Boyut Z-Ave (nm)	Çoklu Dağılım Indeksi (PDI)	Zeta Potansiyel (mV)
	Miktarı (mg)	Verimi (%)	İndirekt Yöntem	Direkt Yöntem	Ortalama	İndirekt Yöntem	Direkt Yöntem	Ortalama			
1	80,2	72,9	35,01	31,54	33,27	4,3	3,93	4,115	265,7	0,205	-23,65
2	91,3	76,08	58,77	51,7	55,23	12,87	11,32	12,09	329,2	0,180	-21
3	99,6	76,61	70,74	62,64	66,69	21,3	18,86	20,08	286,9	0,168	-15,85
4	108,9	77,78	79,46	71,12	75,29	29,18	26,12	27,65	281,8	0,217	-19,55
5	106,1	70,73	83,08	66,77	74,92	39,15	31,46	35,30	291,0	0,238	-21,2
6	91	75,83	65,51	51,86	58,69	14,39	11,39	12,89	382,5	0,184	-23,05
7	79,8	66,5	51,14	33,73	42,43	12,81	8,45	10,63	417,0	0,265	-17,9
8	77,5	64,58	47,35	30,84	39,09	12,21	7,95	10,08	338,2	0,137	-19,85
9	76,6	63,83	46,9	36,01	41,45	12,24	9,4	10,82	300,1	0,161	-20,5
10	49,5	41,25	39,13	26,17	32,65	15,81	10,57	13,19	218,7	0,133	-16,45
11	34,1	28,41	34,86	19,39	27,12	20,44	11,37	15,90	213,0	0,127	-11,34
12	35	29,16	36,55	23,65	30,1	20,88	13,51	17,19	208,3	0,085	-15,95
13	44,1	36,75	13,28	8,62	10,95	6,02	3,9	4,96	222,1	0,077	-13,4
14	21,1	17,58	31,03	18,36	24,69	29,41	17,4	23,40	226,6	0,115	-19,95
15	45	37,5	33,79	21,37	27,58	15,01	9,49	12,25	204,6	0,033	-25
16	38,2	31,83	29,38	20,47	24,92	15,38	10,71	13,04	221,5	0,068	-21,15
17	168,2	76,45	49,88	40,66	45,27	5,93	4,83	5,38	292,6	0,216	-19,1
18	164,1	82,53	38,26	31,94	35,1	2,89	2,41	2,65	371,6	0,094	-20,3
19	366,7	87,3	44,78	38,89	41,83	2,44	2,12	2,28	395,4	0,123	-20,65

5.1 Reaksiyon Verimi

Yüksek reaksiyon verimli bir üretim için madde kaybından kaçınılmalı, üretim arttırılmalı ve üretim maliyeti düşürülmelidir [139]. Bu çalışmada farklı parametrelerle kurulan 19 dizi partikül üretiminin reaksiyon verimi %17,58 ile %87,3 arasında değişkenlik göstermektedir (Çizelge 5.1). Özellikle juglon ve PLGA miktarlarındaki değişim, reaksiyon verimini büyük ölçüde olumlu olarak değiştirmektedir.

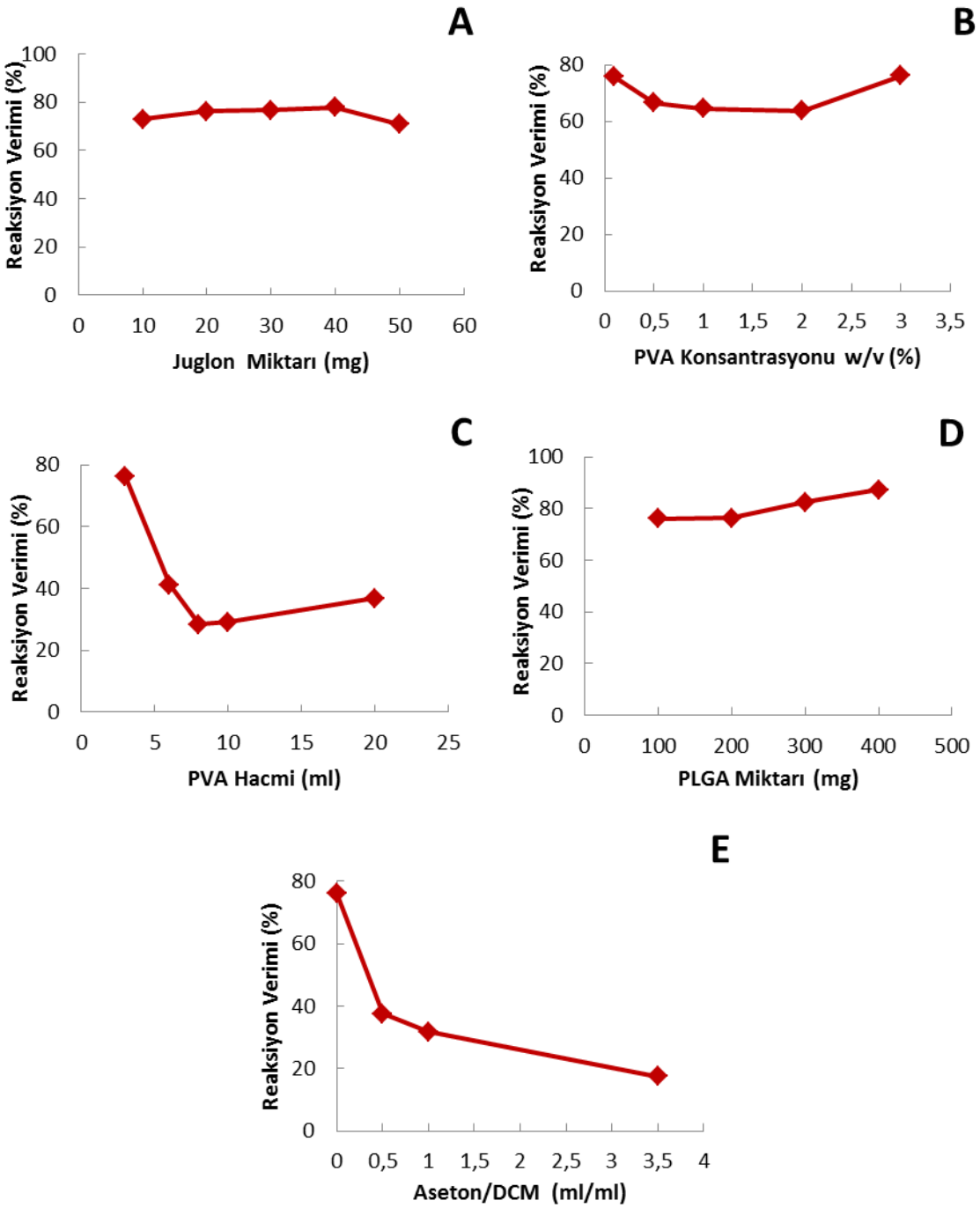
Şekil 5.1A'da görüldüğü gibi juglon miktarının 40 mg'a kadar olan artışı için reaksiyon verimi de % 77,78'a kadar artmış, kullanılan juglon miktarı 50 mg olduğunda ise reaksiyon verimi % 70,73 olarak gözlenmiştir.

Şekil 5.1B, PVA konsantrasyonunun reaksiyon verimi üzerindeki etkisini göstermektedir. PVA konsantrasyonun artmasıyla reaksiyon verimi önce azalmış sonra artmıştır. PVA konsantrasyonları % 0,1 ile % 3 arasında değişen 5 farklı nanopartikülün reaksiyon verimleri % 63,83 ile % 76,08 arasında değişmektedir (Çizelge 5.1).

Şekil 5.1C, PVA hacminin reaksiyon verimine etkisini göstermektedir. PVA hacmindeki artış reaksiyon veriminin önce azalmasına sonra da artmasına sebep olmaktadır. PVA hacimleri 3 ml ile 20 ml arasında değişen 5 farklı nanopartikülün reaksiyon verimleri % 28,41 ile % 76,08 arasında değişmektedir (Çizelge 5.1).

Elde edilen sonuçlar PLGA'nın reaksiyon veriminin artışında büyük önemi olduğunu göstermektedir. PLGA miktarı (mg) arttıkça reaksiyon verimi de önemli ölçüde artmaktadır. PLGA miktarının 100 mg'dan 400 mg'a çıkarılmasıyla reaksiyon veriminin de % 76,08'den % 87,3'e çıktığı gözlenmiştir (Çizelge 5.1, Şekil 5.1D). Çalışmamızın sonuçları Hussein ve arkadaşları tarafından yapılan sonuçlarla benzerlik göstermektedir [139]. PLGA'nın artışı viskoziteyi arttırmaktadır. Bu da daha büyük ve yoğun partiküllerin üretilmesine sebep olmaktadır, bunun sonucunda da reaksiyon verimi artmaktadır [139].

Çözücü türlerinin reaksiyon verimi üzerine etkileri Şekil 5.1E'de gösterilmektedir. Aseton/DCM (v/v) oranının artması reaksiyon veriminin kademeli olarak düşmesine neden olur. Aseton/DCM oranının 0'dan 3,5'a çıkması ile birlikte reaksiyon verimi % 76,08'den % 17,58'e düşmektedir.



Şekil 5.1 Reaksiyon verimi üzerine (A) juglon miktarının (mg), (B) PVA konsantrasyonunun w/v (%), (C) PVA miktarının (ml), (D) PLGA miktarının (mg), (E) Aseton/DCM (v/v) oranının etkisi

5.2 Enkapsülasyon Etkinliği

Çizelge 5.1'de enkapsülasyon etkinliği incelenmiştir. Şekil 5.2A'da görüldüğü gibi juglon miktarındaki artışla birlikte enkapsülayon etkinliği de artmaktadır. Kullanılan juglon miktarı 10 mg ve 50 mg arasında değişen nanopartiküllerin enkapsülasyon

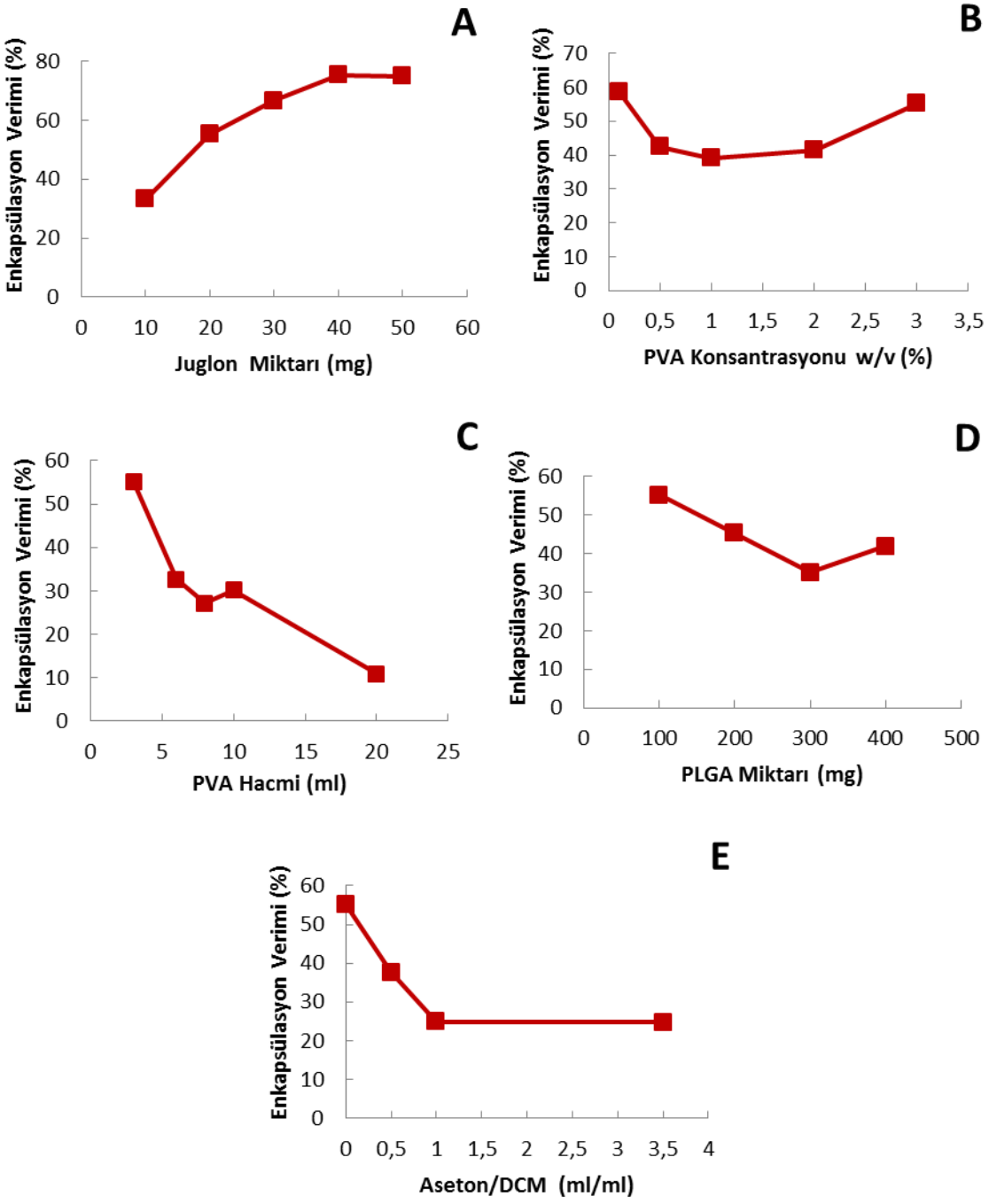
etkinliği % 33,27 ile % 75,29 arasında değişmektedir (Şekil 5.2A). Çalışmalarımız Halayka ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmayla benzer sonuçlar göstermektedir [140].

Şekil 5.2B, PVA konsantrasyonu ile enkapsülasyon etkinliği arasındaki ilişkiyi göstermektedir. Çizelge 5.1'de de görüldüğü gibi % 0,1 ile % 3 arasında farklı konsatrasyonlarda PVA kullanılmıştır. Enkapsülasyon etkinliği % 0,1'lik PVA kullanımında % 58,69'a ulaşmıştır. En düşük enkapsülasyon etkinliği ise %1'lik çözeltinin kullanılmasıyla % 39,09'luk olarak elde edilmiştir. PVA konsantrastonu arttıkça enkapsülasyon etkinliği önce düşmüştür daha sonra da artmıştır (Şekil 5.2B). PVA konsantrasyonunun artması manyetik karıştırıcıdaki karışım sırasında damlacıkların koalesensini önlemektedir. Bu da enkapsülasyon etkinliğindeki düşüşe neden olmaktadır. Sonuçlarımız Esmaeili ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmanın sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir [141].

Elde edilen sonuçlar PVA hacminin artışının enkapsülasyon etkinliğini azalttığını göstermektedir (Çizelge 5.1, Şekil 5.2C). PVA hacmi arttıkça enkapsülasyon etkinliğinde önemli düşüş yaşanmaktadır (Şekil 5.2C) [142].

Şekil 5.2D, PLGA miktarının enkapsülasyon etkinliği üzerindeki etkisini göstermektedir. 100 mg ile 400 mg PLGA arasında değişen değerler enkapsülasyon etkinliği incelenmiştir (Çizelge 5.1). Enkapsülasyon etkinliği, PLGA miktarının artışıyla önce azalmıştır daha sonra artmıştır (Şekil 5.2D).

Şekil 5.2E'de de görüldüğü gibi Aseton/DCM (v/v) oranı arttıkça enkapsülasyon verimi azalmaktadır. Enkapsülasyon verimi % 55,23'ten % 24,69'a düşmektedir (Çizelge 5.1). Benzer sonuçlar farklı çalışmalarda da gözlenmiştir [141, 142].



Şekil 5.2 Enkapsülasyon etkinliği üzerine (A) juglon miktarının (mg), (B) PVA konsantrasyonunun w/v (%), (C) PVA miktarının (ml), (D) PLGA miktarının (mg), (E) Aseton/DCM (v/v) oranının etkisi

5.3 Etken Yüklenme Verimi

Etken yüklenme verimi, nanopartikül içindeki etken miktarının elde edilen nanopartikül miktarına oranlanmasıyla bulunmaktadır. Bu çalışmada farklı parametrelerle kurulan 19 dizi üretiminin etken yüklenme verimi Çizelge 5.1'de gösterilmiştir.

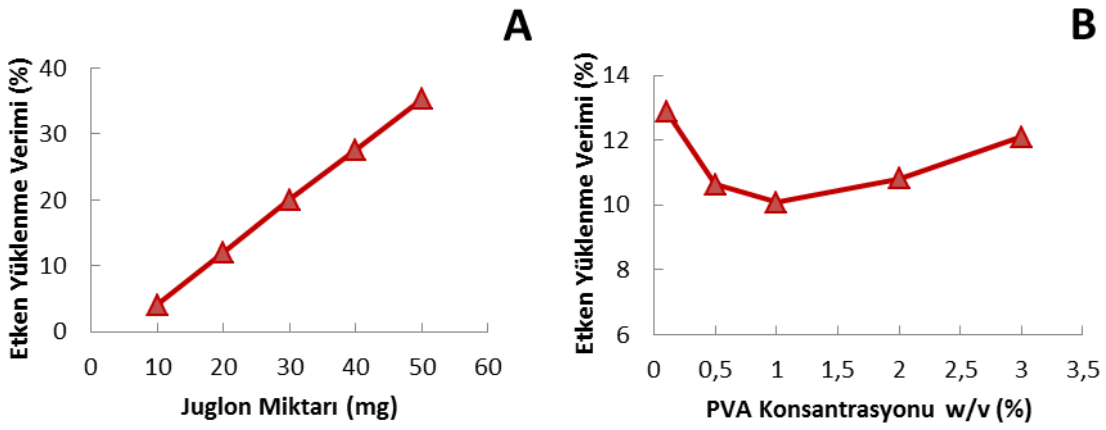
Şekil 5.3A, juglon miktarı ile etken yüklenme verimi arasındaki ilişkiyi göstermektedir. Juglon miktarı 10 mg'dan 50 mg'a arttıkça etken yüklenme verimi de % 4,11'den % 35,30'a artmaktadır.

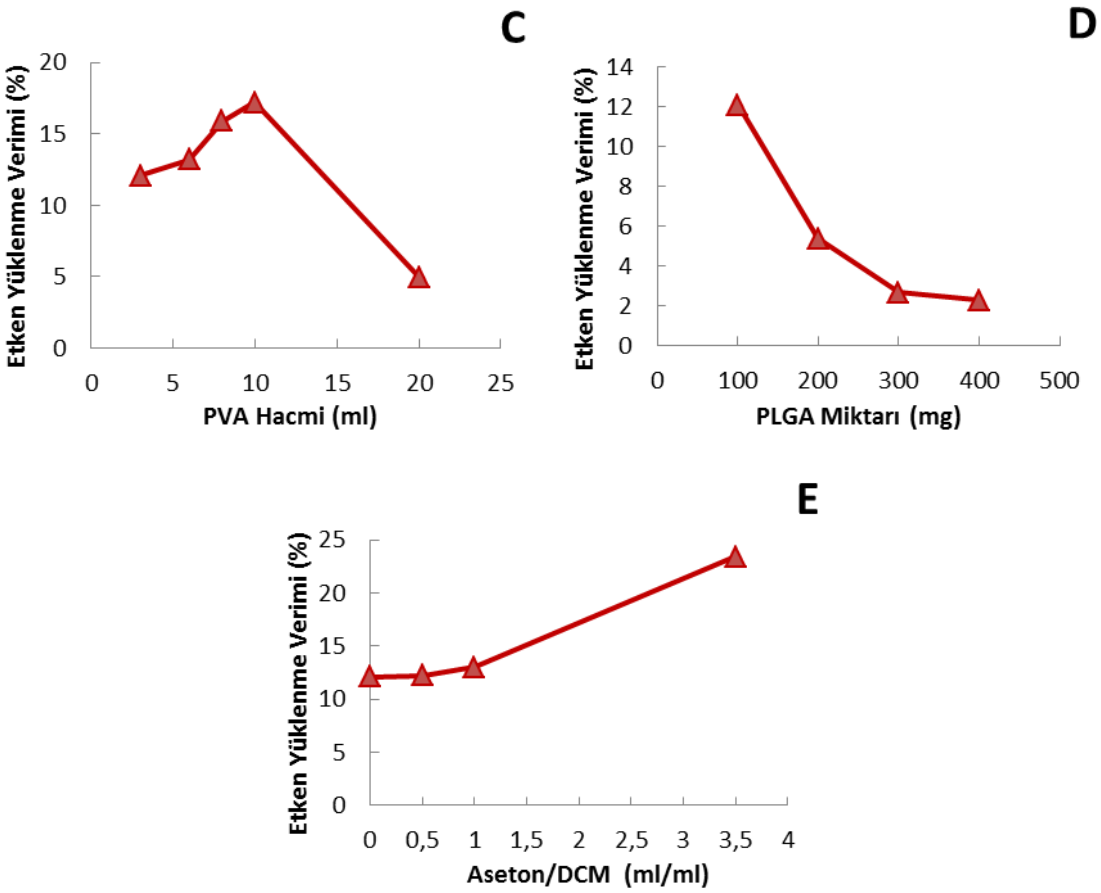
Şekil 5.3B ve Çizelge 5.1, PVA konsantrasyonu ile etken yüklenme verimi arasındaki ilişkiyi göstermektedir. Çizelge 5.1'de de görüldüğü gibi %0,1 ile % 3 arasında farklı konsatrasyonlarda PVA kullanılmıştır. Etken yüklenme verimi % 0,1'lik PVA kullanımında % 12,89'a ulaşmıştır. En düşük etken yüklenme verimi ise % 1'lik çözeltinin kullanılmasıyla % 10 olarak elde edilmiştir. PVA konsantrasyonu arttıkça etken yüklenme verimi önce düşmüştür daha sonra da artmıştır (Şekil 5.3B).

Şekil 5.3C, PVA hacminin etken yüklenme verimine etkisini göstermektedir. PVA hacmindeki artış etken yüklenme veriminin önce artmasına sonra da azalmasına sebep olmuştur. PVA hacimleri 3 ml ile 20 ml arasında değişen 5 farklı nanopartikülün etken yüklenme verimi % 4,96 ile % 17,19 arasında değişmektedir (Çizelge 5.1).

Elde edilen sonuçlar PLGA'nın etken yüklenme veriminin azalışında önemli etkisi olduğunu göstermektedir. PLGA miktarı (mg) arttıkça etken yüklenme verimi düşmektedir (Şekil 5.3D). PLGA miktarının 100 mg'dan 400 mg'a çıkarılmasıyla etken yüklenme verimi de % 12,09'dan % 2,28'e düşmektedir (Çizelge 5.1).

Şekil 5.3E'de de görüldüğü gibi Aseton/DCM (v/v) oranı arttıkça etken yüklenme verimi de artmaktadır. Yapılan analizler sonucunda etken yüklenme verimi % 12,09'dan % 23,40'a çıkmaktadır (Çizelge 5.1).





Şekil 5.3 Etken yüklenme verimi üzerine (A) juglon miktarının (mg), (B) PVA konsantrasyonunun w/v (%), (C) PVA miktarının (ml), (D) PLGA miktarının (mg), (E) Aseton/DCM (v/v) oranının etkisi

5.4 Juglon Yüklü PLGA Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

5.4.1 Boyut, Çoklu Dağılım Indeksi (PDI) ve Zeta Potansiyel Analizi

5.4.1.1 Nanopartiküllerin Boyutları Z-Ave (nm)

Çizelge 5.1'de üretilen nanopartiküllerin boyutları (nm) incelenmiştir. Şekil 5.4A'da görüldüğü gibi juglon miktarındaki artışla birlikte boyutlarda öncelikle artış sonra da azalış gözlemlenmektedir. Sonuçlar juglon miktarının artışının hidrofobik molküllerinin boyutları üzerinde önemli bir etkisi olmadığını gösteriyor. Sonuçlarımız başka çalışmalarla da benzerlikler göstermektedir [142-144].

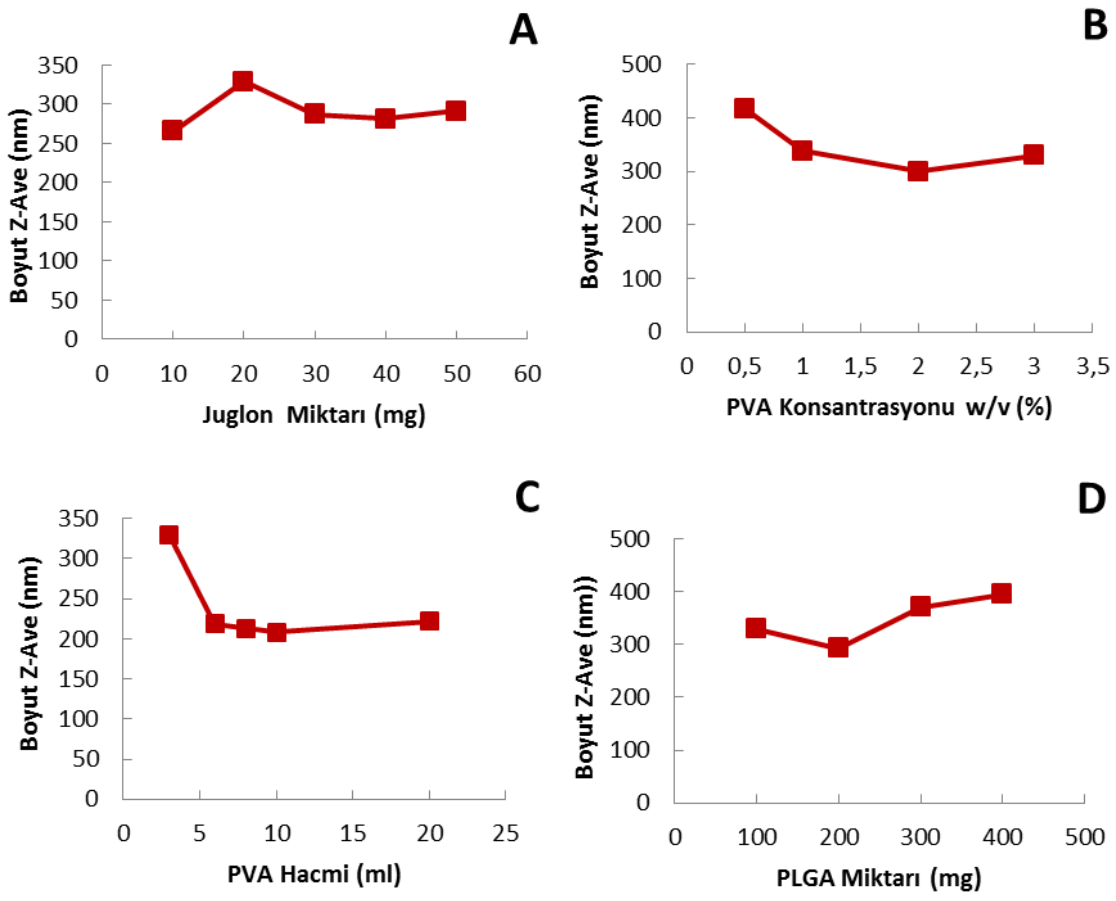
PVA, nanopartiküllerin dağılımındaki yüzey gerilimini azaltarak [145, 146] nanopartiküllerin aglomerasyonunu engeller. Böylece PVA konsantrasyonunun artışıyla daha küçük boyutlarda nanopartikül elde edilir (Şekil 5.4B). Fakat PVA

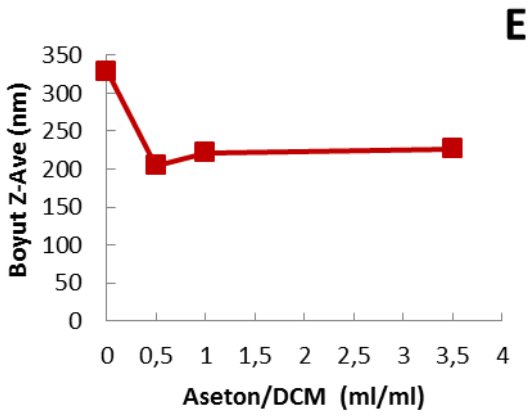
konsantrasyonunun artışı aynı zamanda dış sıvı fazdaki viskoziteyi arttırırken kayma geriliminde düşüşe neden olmakta, bu sebeple nanopartikül boyutlarında daha sonradan artış gerçekleşmektedir (Şekil 5.4B).

Şekil 5.4C, PVA hacminin (ml) artışıyla değişen partikül boyutunu göstermektedir. PVA hacminin artışı yüzey gerilimini azalttığı için partikül boyutlarında düşüş gerçekleşmektedir. Fakat bir süre sonra PVA hacminin artışı viskoziteyi arttırmakta ve bu da daha büyük nanopartiküllerin oluşmasına neden olmaktadır [142, 147].

Şekil 5.4D'de de görüldüğü gibi PLGA miktarının artışı partikül boyutlarının artışına neden omaktadır. PLGA miktarının artması iç fazdaki viskoziteyi arttırmakta, bunun sonucu olarak da kayma gerilimi düşmekte ve daha büyük nanopartiküller elde edilmektedir [140, 148-150].

Aseton tamamen su ile karışabilen organik bir çözeltidir. Aseton/DCM (v/v) oranı arttırıldığında asetonun dış faza hızlı difüzyonu ara yüzey geriliminin önemli derecede düşmesine neden olur. Bu da partikül boyutlarının azalmasına sağlar (Şekil 5.4E).

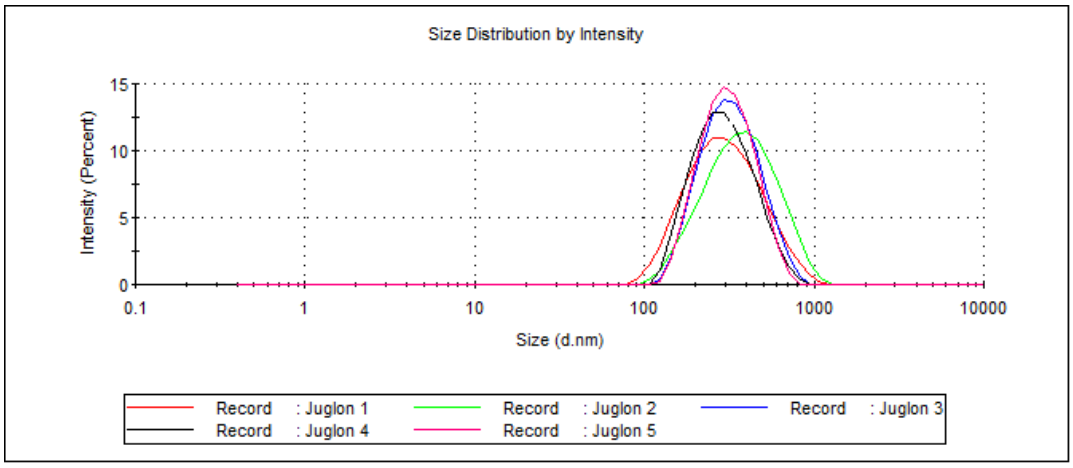




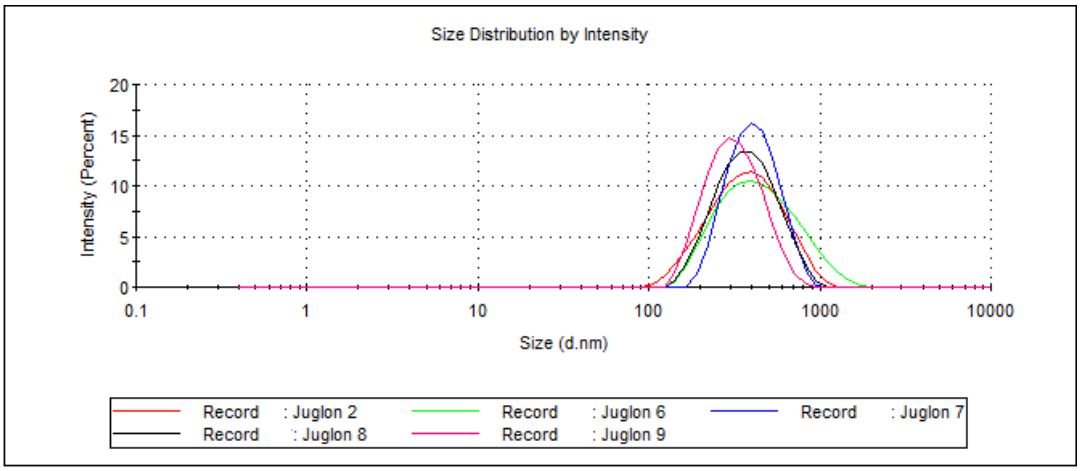
Şekil 5.4 Boyut Z-Ave (nm) üzerine (A) juglon miktarının (mg), (B) PVA konsantrasyonunun w/v (%), (C) PVA miktarının (ml), (D) PLGA miktarının (mg), (E) Aseton/DCM (ml/ml) oranının etkisi

5.4.1.2 Nanopartiküllerin Boyut Dağılım Analizi ve Çoklu Dağılım Indeksleri (PDI)

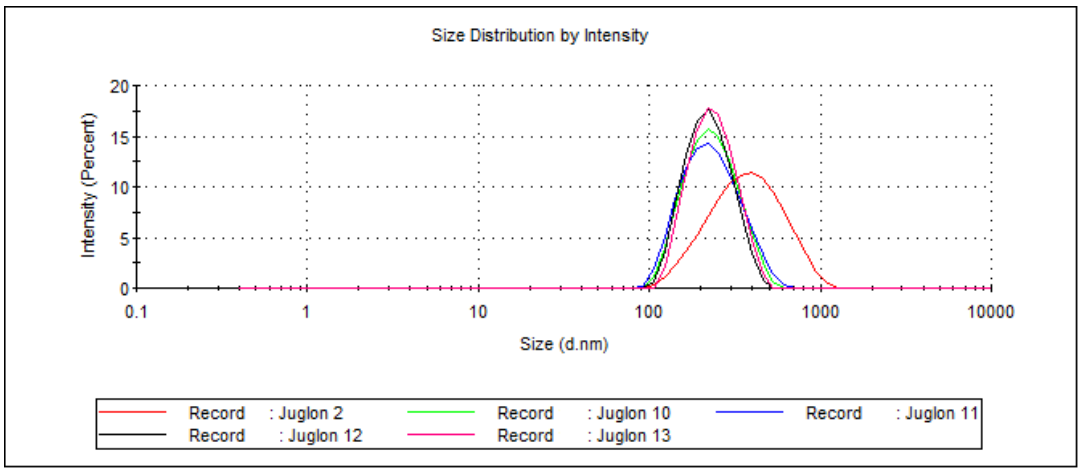
Tekli emülsiyon (y/s) çözücü uçurma yöntemi ile hazırlanan 19 seri farklı nanopartikül zetasizer cihazı ile analizleri gerçekleştirildi ve elde edilen sonuçlar Çizelge 5.1'de verildi. Şekil 5.4, Şekil 5.5, Şekil 5.6, Şekil 5.7 ve Şekil 5.8'de nanopartiküllere ait boyut dağılım analizi sonuçları ve Z-Ave değerleri verilmiştir.



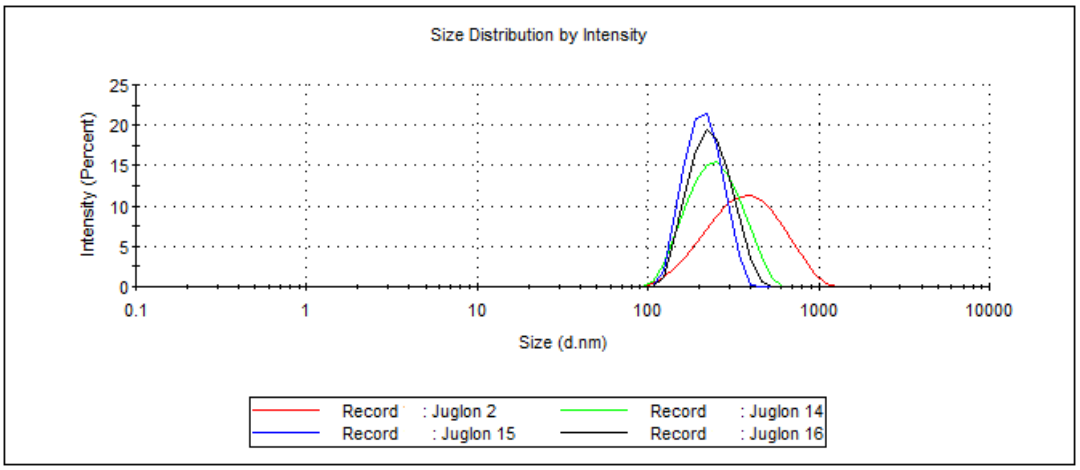
Şekil 5.5 Tekli emülsiyon (s/y) çözücü uçurma yöntemi ile hazırlanan NP 1-Juglon1, NP 2-Juglon 2, NP 3-Juglon 3, NP 4-Juglon 4 ve NP 5-Juglon5 partiküllerine ait boyut dağılım analizi



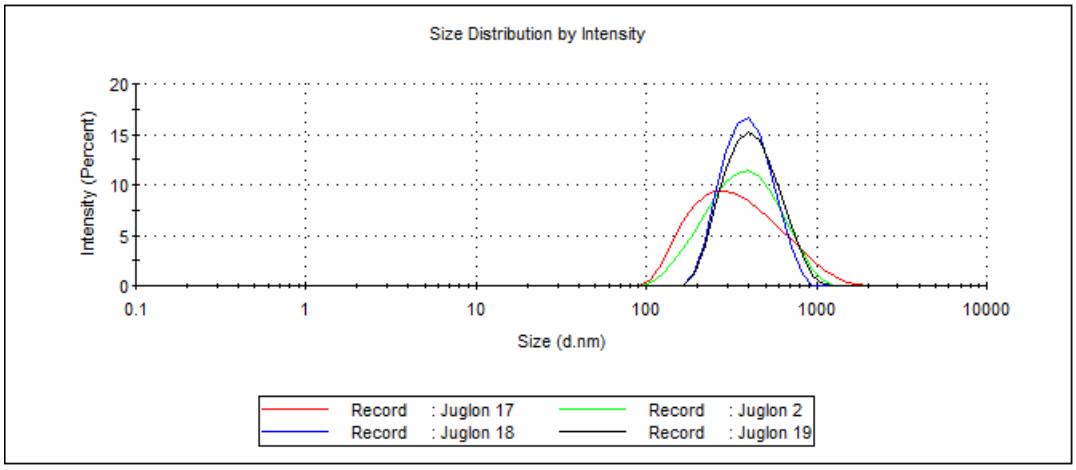
Şekil 5.6 Tekli emülsiyon (s/y) çözücü uçurma yöntemi ile hazırlanan NP 2-Juglon2, NP 6-Juglon 6, NP 7-Juglon 7, NP 8-Juglon 8 ve NP 9-Juglon 9 partiküllerine ait boyut dağılım analizi



Şekil 5.7 Tekli emülsiyon (s/y) çözücü uçurma yöntemi ile hazırlanan NP 2-Juglon2, NP 10-Juglon 10, NP 11-Juglon 11, NP 12-Juglon 12 ve NP 13-Juglon 13 partiküllerine ait boyut dağılım analizi



Şekil 5.8 Tekli emülsiyon (s/y) çözücü uçurma yöntemi ile hazırlanan NP 2-Juglon2, NP 14-Juglon 14, NP 15-Juglon 15 ve NP 16-Juglon 16 partiküllerine ait boyut dağılım analizi



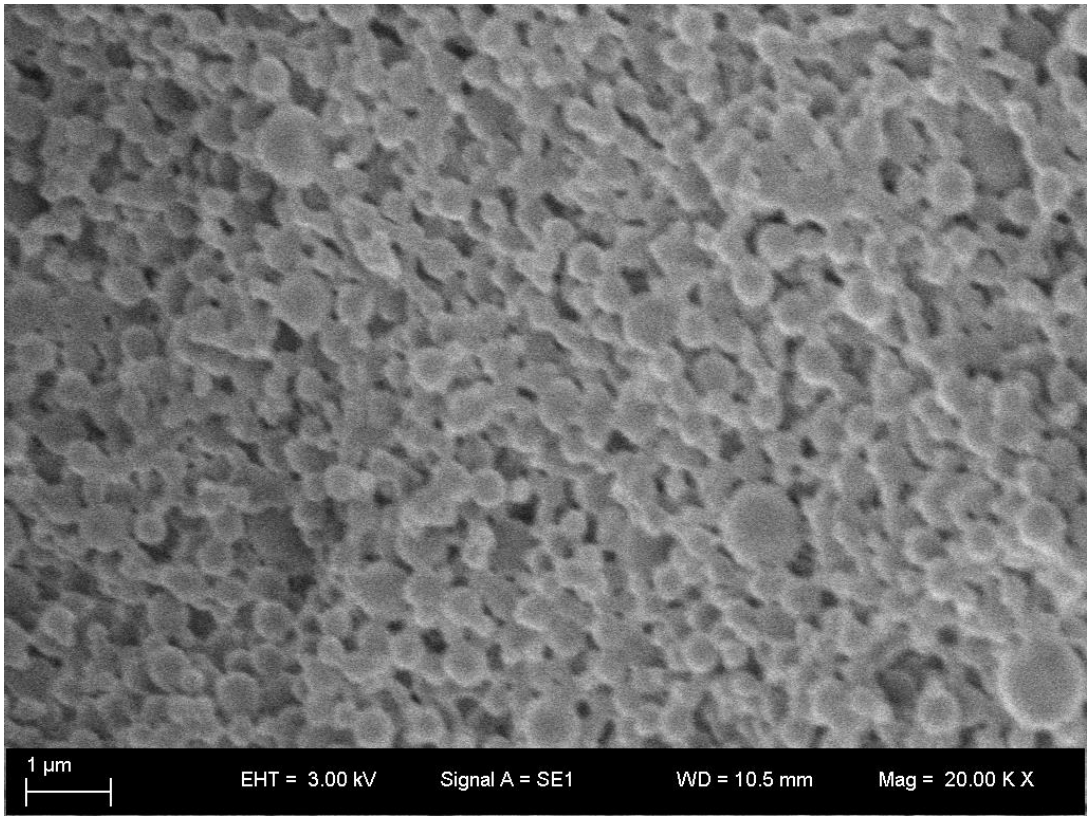
Şekil 5.9 Tekli emülsiyon (s/y) çözücü uçurma yöntemi ile hazırlanan NP 2-Juglon 2, NP 17-Juglon 17, NP 18-Juglon 18 ve NP 19-Juglon 19 partiküllerine ait boyut dağılım analizi

Üretilen nanopartiküllerin PDI değerlerinin 0,033 ile 0,265 arasında değiştiği görülmektedir. PDI değeri ne kadar küçük olursa boyut dağılımının da o kadar dar olur ve istenilen boyut dağılımının aseton eklenmesi ile oluşturulan NP 14, NP 15, NP 16 numaralı nanopartikülleri içeren seride olduğu söylenebilmektedir.

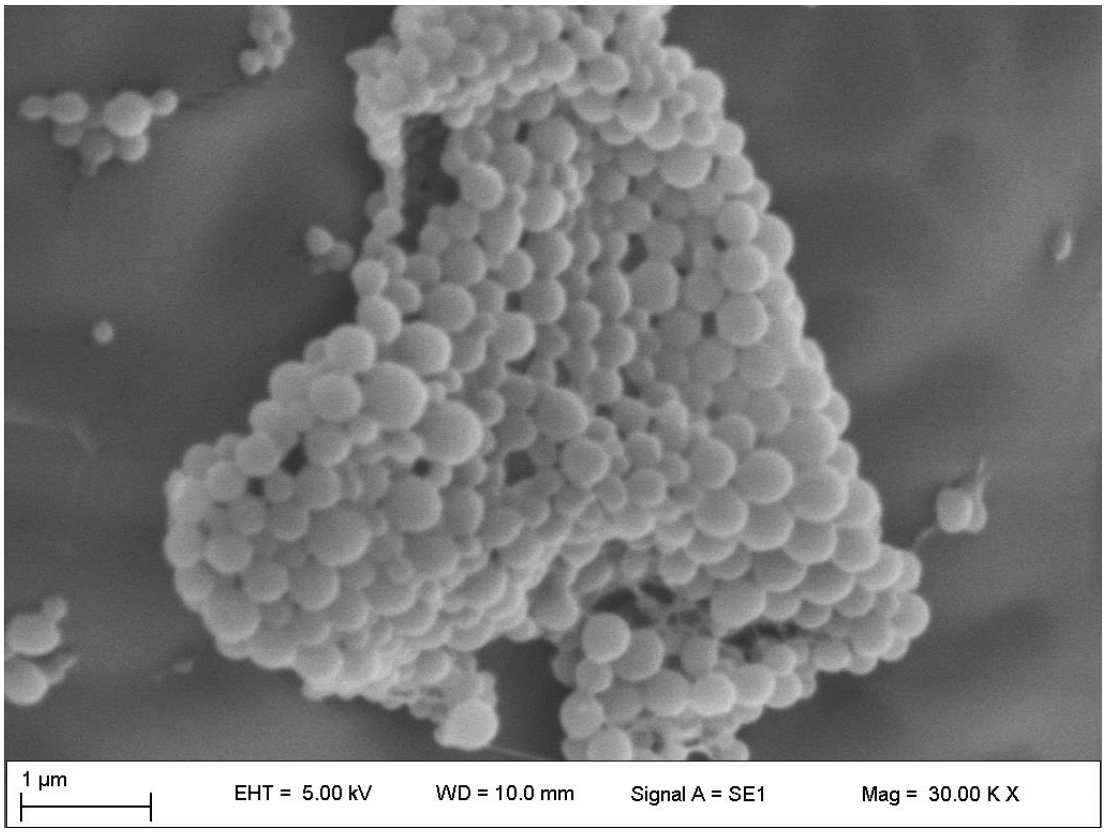
5.4.2 SEM Analizi

Üretilen nanopartiküllerin morfolojik analizleri için Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) kullanılmıştır. SEM analizlerinde numuneler iletkenliği sağlamak için altınla kaplanmıştır. Kaplama malzemesi olarak altın kullanılmasının amacı yüksek iletkenlik ve oksitlenmeme özelliği olmasıdır. 20.000x, 30.000x ve 50.000x olarak farklı büyütme

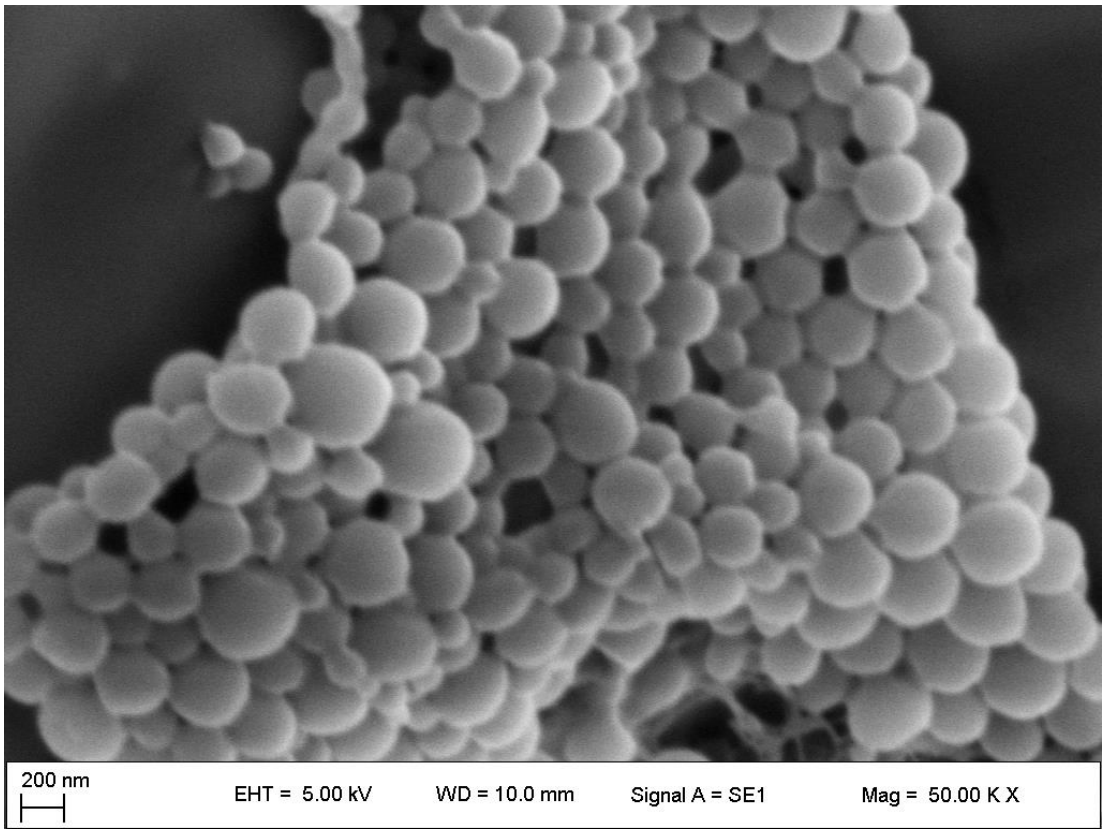
oranlarıyla nanopartiküllerin SEM görüntüleri alınmıştır. Elde edilen SEM görüntüleri Şekil 5.10-Şekil 5.18'de görülmektedir. SEM görüntülerine göre yüzey morfolojisi, tanecik şekli ve tanecik boyutu hakkında bilgiler edinilmiştir.



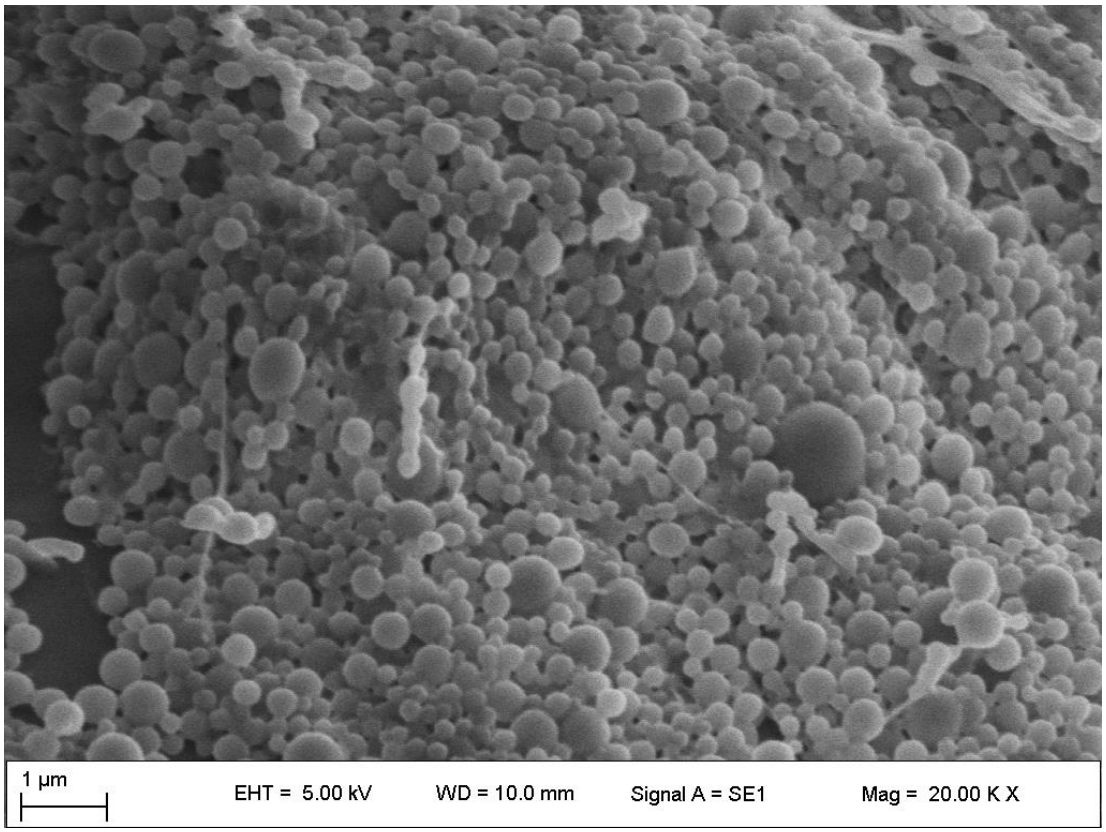
Şekil 5.10 NP 2'nin 20.000 kat büyütülmüş SEM görüntüsü



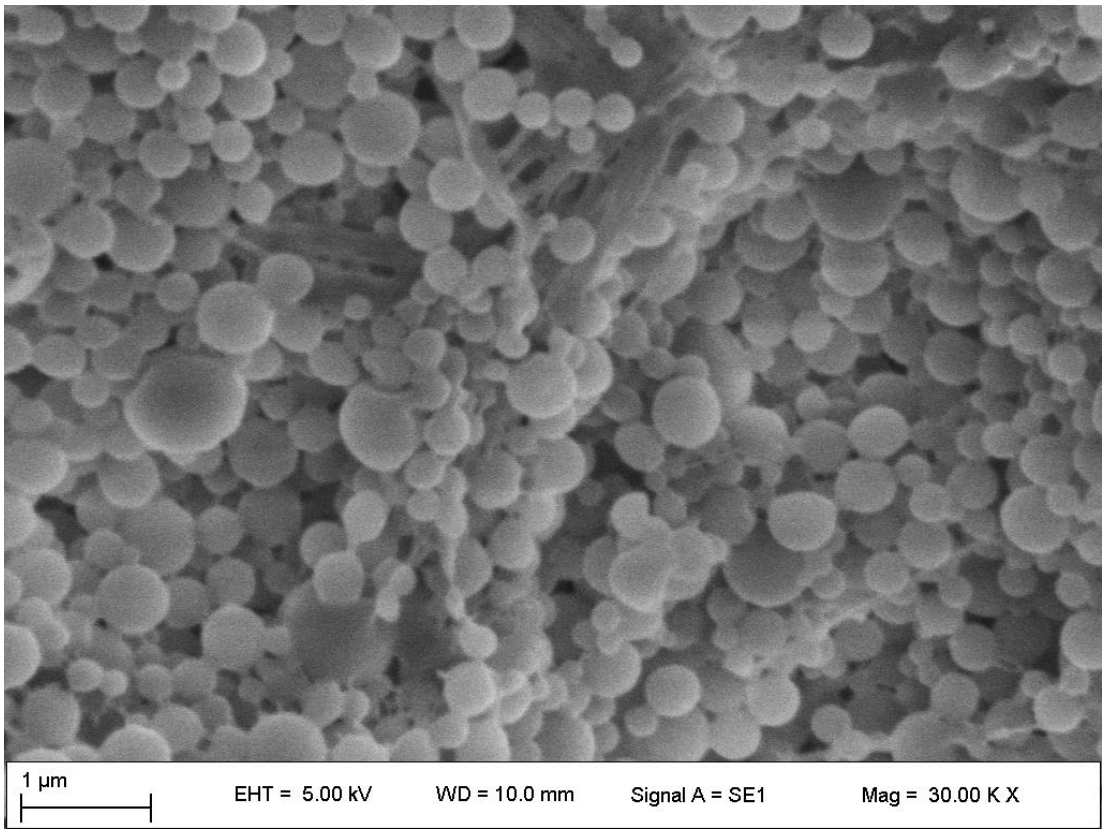
Şekil 5.11 NP 2'nin 30.000 kat büyütülmüş SEM görüntüsü



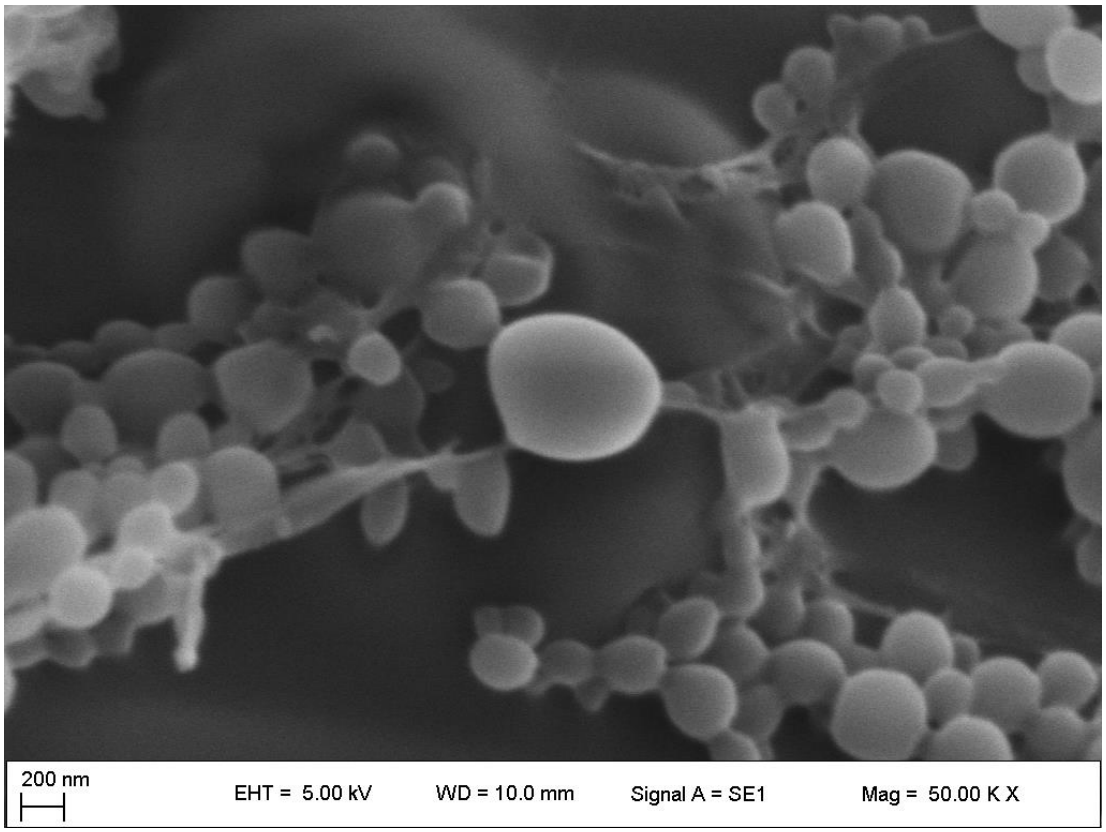
Şekil 5.12 NP 2'nin 50.000 kat büyütülmüş SEM görüntüsü



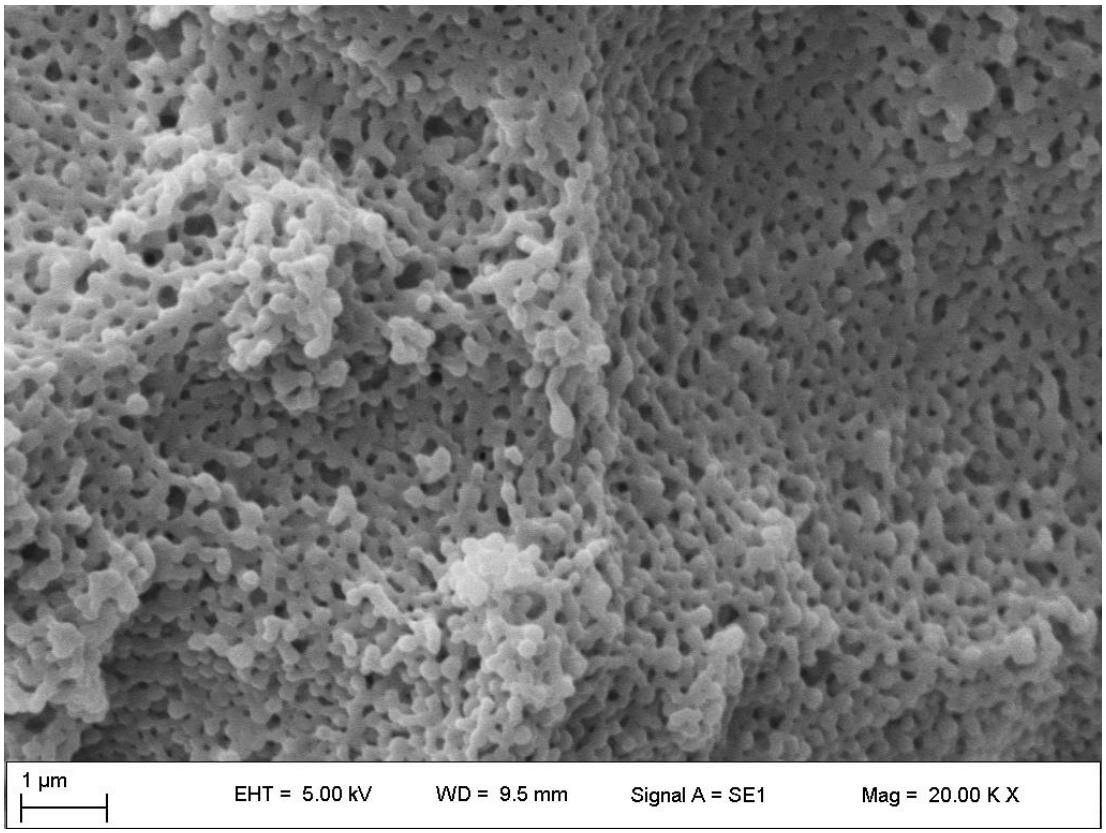
Şekil 5.13 NP 5'in 20.000 kat büyütülmüş SEM görüntüsü



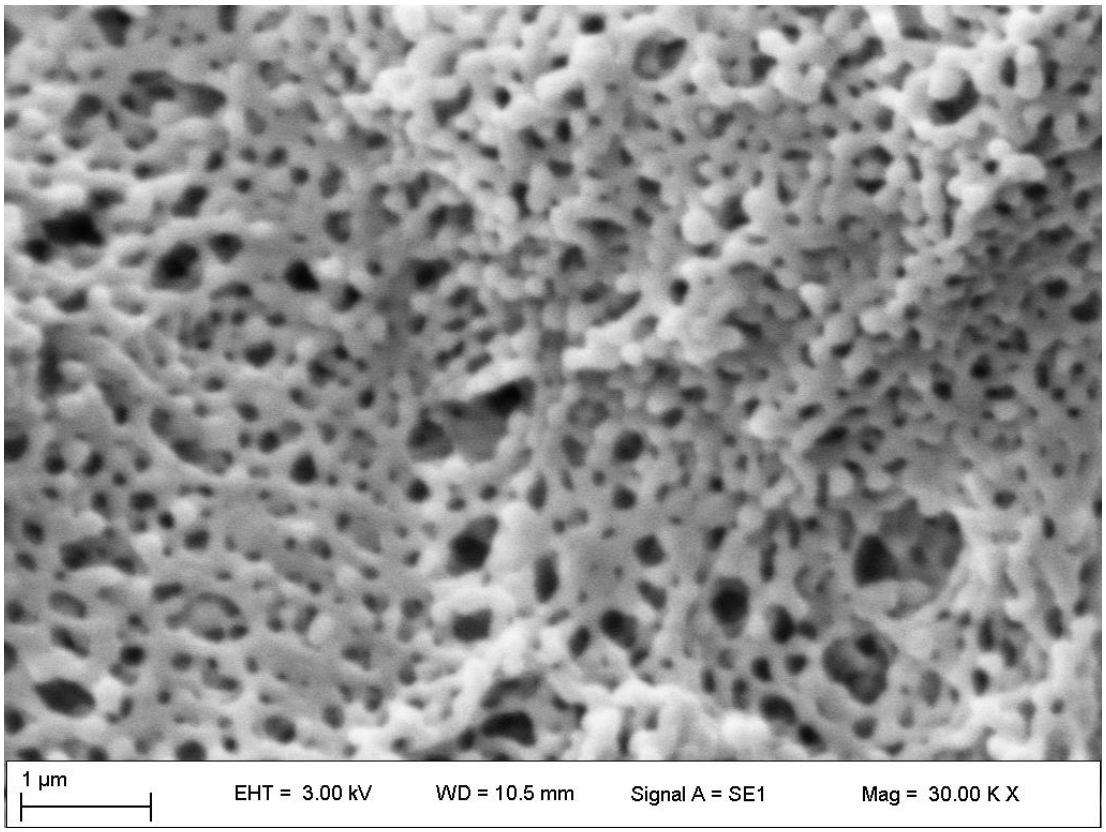
Şekil 5.14 NP 5'in 30.000 kat büyütülmüş SEM görüntüsü



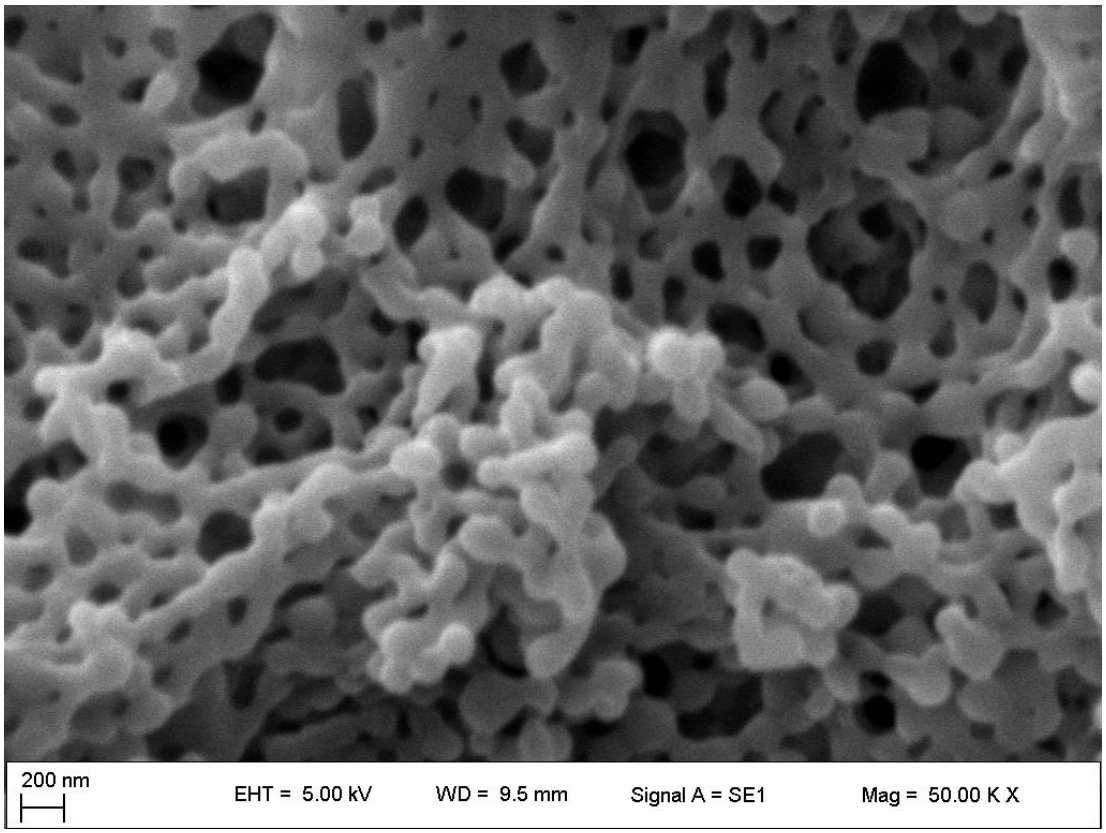
Şekil 5.15 NP 5'in 50.000 kat büyütülmüş SEM görüntüsü



Şekil 5.16 NP 20'nin 20.000 kat büyütülmüş SEM görüntüsü



Şekil 5.17 NP 20'nin 30.000 kat büyütülmüş SEM görüntüsü

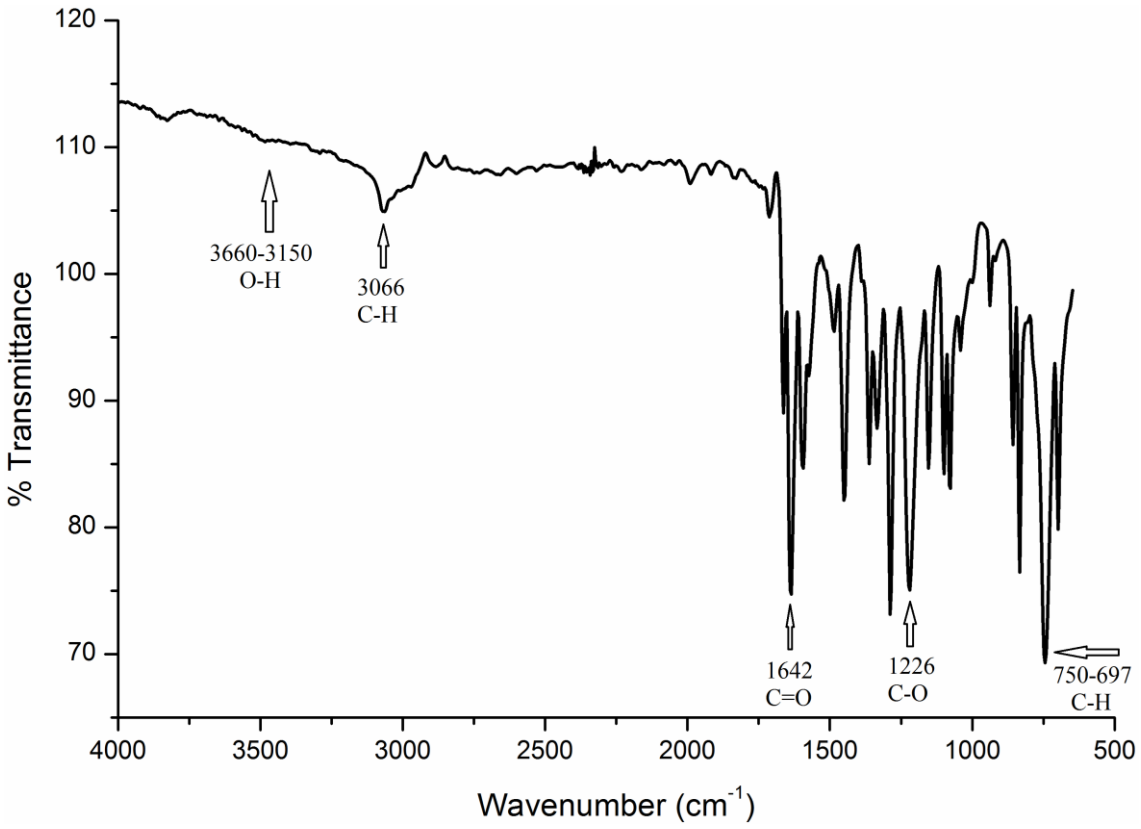


Şekil 5.18 NP 20'nin 30.000 kat büyütülmüş SEM görüntüsü

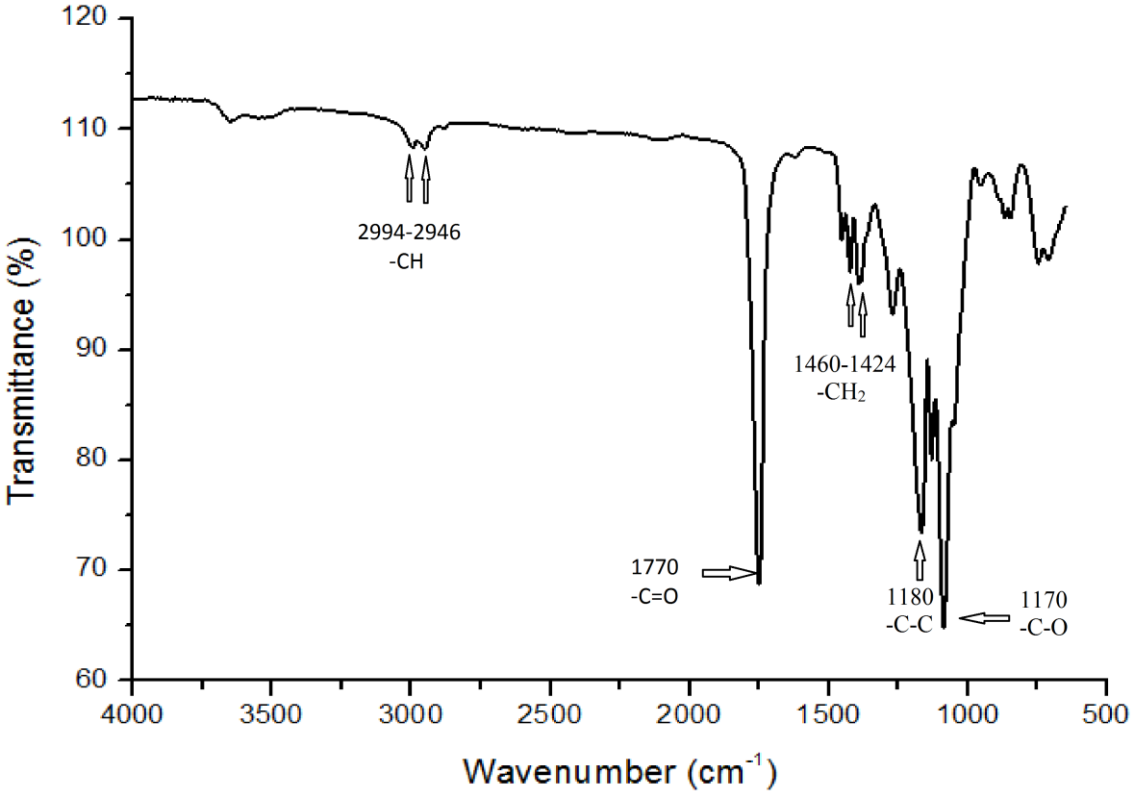
Juglon yüklü nanopartiküllerin (NP 2 ve NP 5) ve boş nanopartikülün (NP 20) SEM analizleri incelendiğinde partiküllerin 200 nm – 1000 nm civarında olduğu görülmektedir. NP 2 ve NP 5 nanopartikülleri homojen bir dağılım gösterirken NP 20'de kümelenmeler ve aglomerasyon olduğu görülmektedir.

5.4.3 FT-IR Analizi

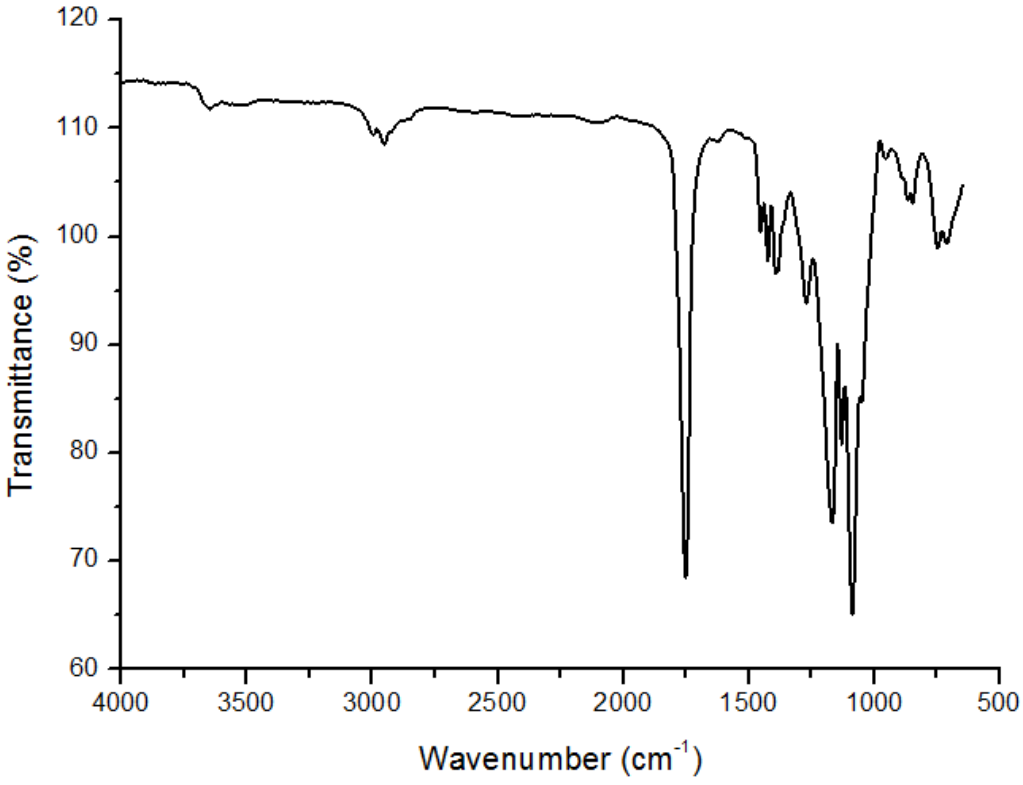
PLGA'nın, NP 20'nin, NP 2 ve NP 5'in kurutma sonrası FTIR spektrumları çekilmiştir. Şekil 5.19-5.23'de tipik FTIR spektrumları verilmiştir. Elde edilen FT-IR sonuçlarından NP 20'nin PLGA karakteristiğinde olduğunu görülmektedir (Şekil 5.24). Buna ek olarak Şekil 5.25 incelendiğinde ise nanopartiküllere juglon yüklenmesi ile beraber juglona ait olan 1600 cm^{-1} – 1700 cm^{-1} aralığında görülen üçlü bandın, 1226 cm^{-1}'de görülen tekli bandın ve 750-697 cm^{-1} aralığında görülen bandın NP 2 ve NP 5'e ait FT-IR spektrumlarında da oluştuğu görülmektedir. Juglon yüklü NP 2 ve NP 5'den elde edilen spektrumlar juglon yüklenmesi sırasında az miktarda etkenin nanopartikülün yüzeyine adsorbe olduğunu göstermektedir.



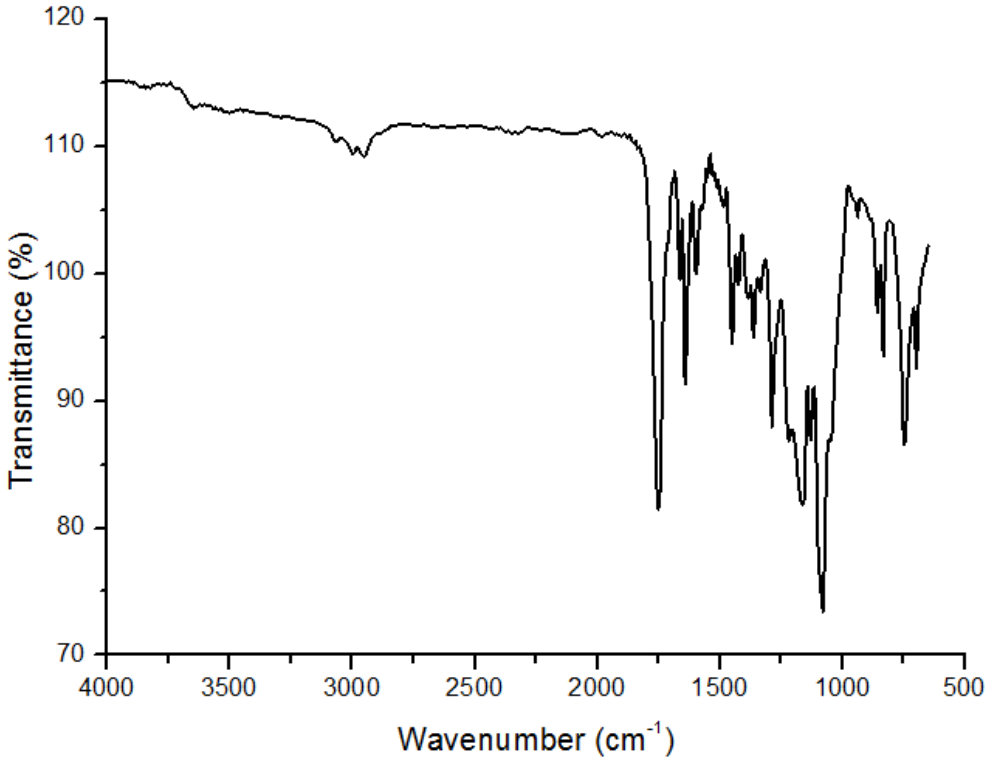
Şekil 5.19 Serbest juglondan alınan FT-IR spektrumu



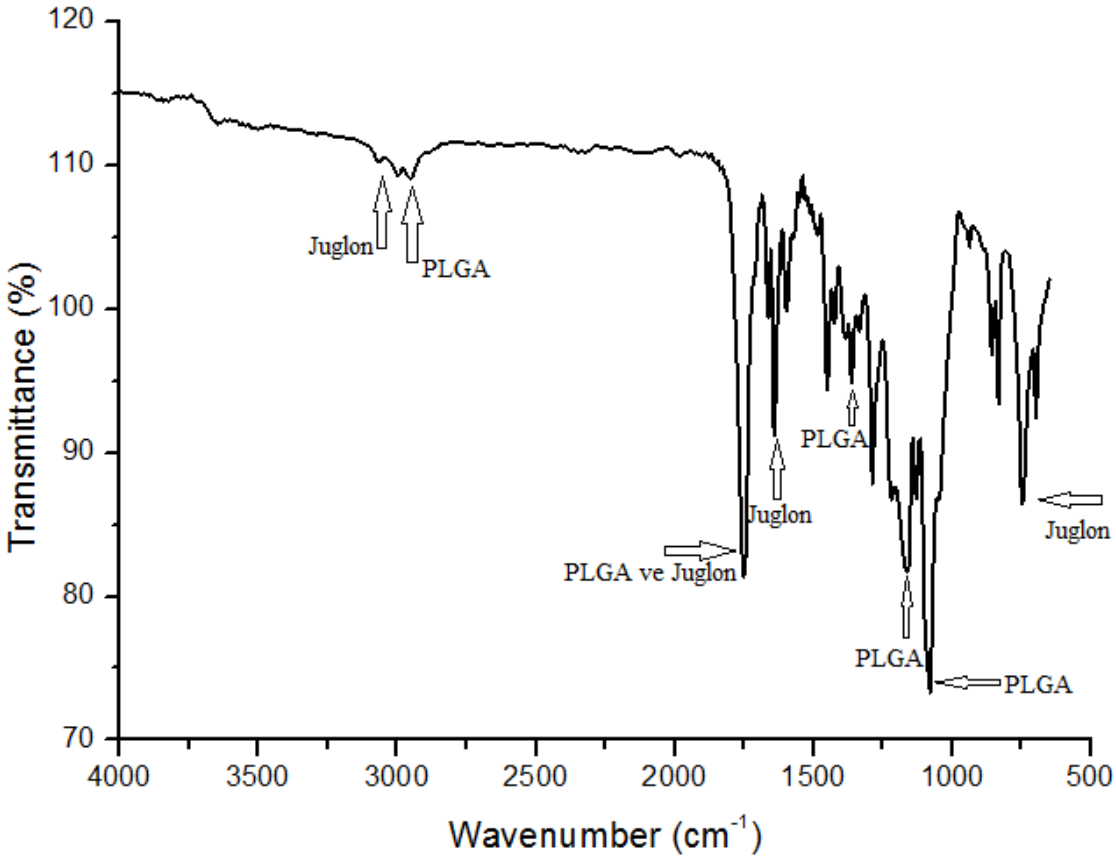
Şekil 5.20 PLGA'dan alınan FT-IR spektrumu



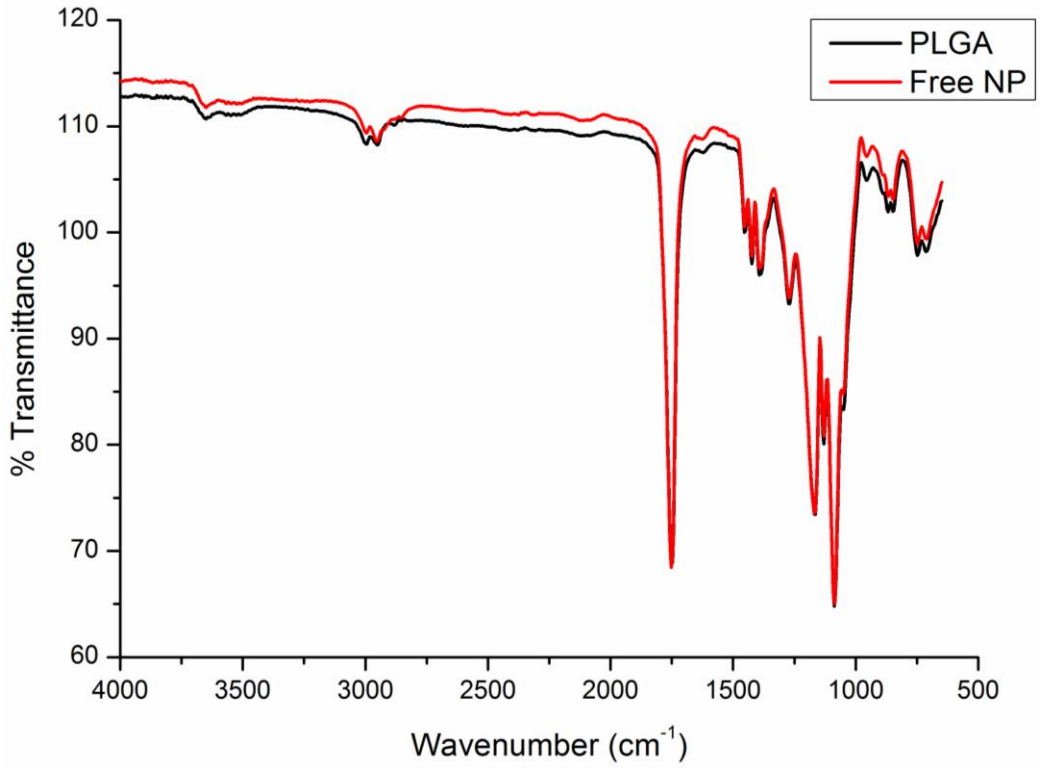
Şekil 5.21 NP 20'den alınan FT-IR spektrumu



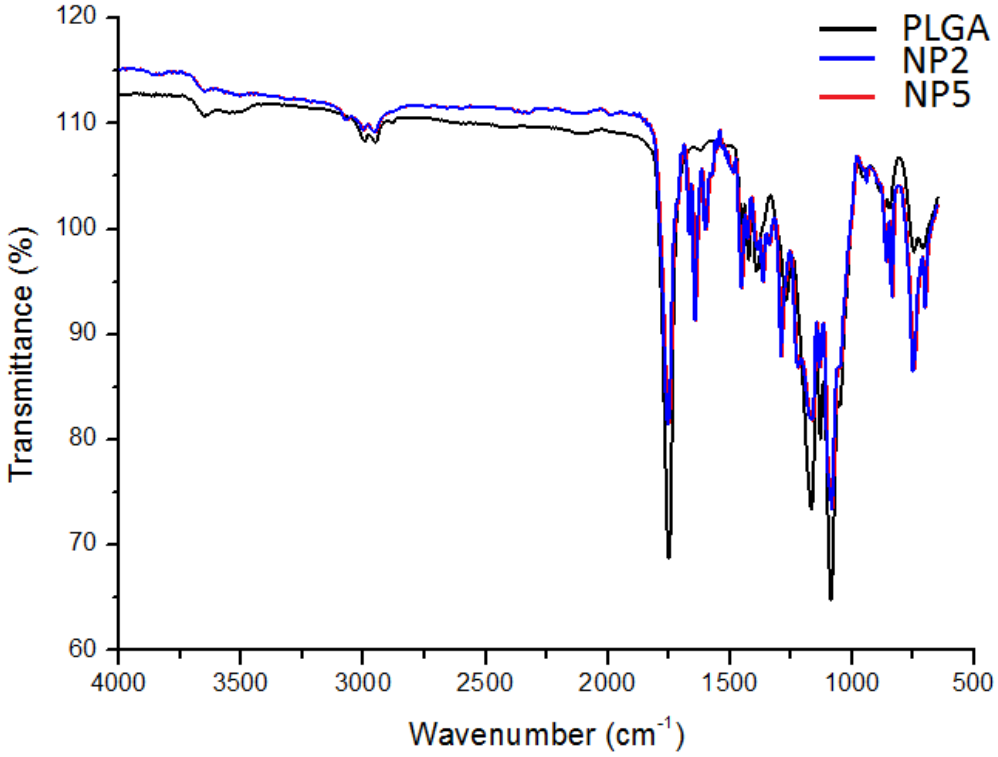
Şekil 5.22 NP 2'den alınan FT-IR spektrumu



Şekil 5.23 NP 5'den alınan FT-IR spektrumu



Şekil 5.24 PLGA ve NP 20'den alınan FT-IR spektrumları



Şekil 5.25 PLGA, NP 2 ve NP 5'in FT-IR spektrumları

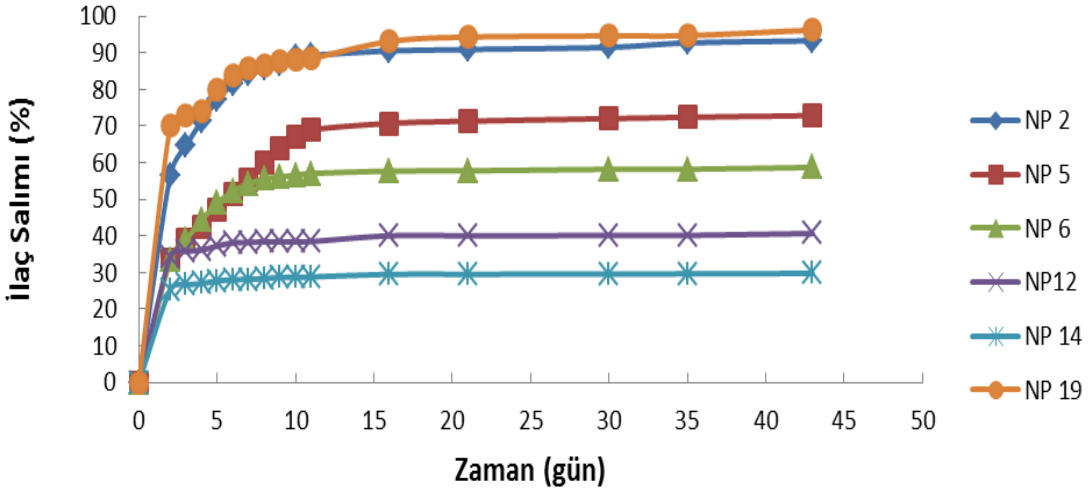
5.5 Nanopartiküllerin *In Vitro* Salımının İncelenmesi

In vitro salım çalışmaları Bölüm 4.7'de "JuglonYüklü PLGA Nanopartiküllerin *In Vitro* Salımı" başlığı altında anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Zamanın fonksiyonu olarak % etken salım miktarının gösterildiği grafik Şekil 5.26 ve Şekil 5.27'de verilmiştir.

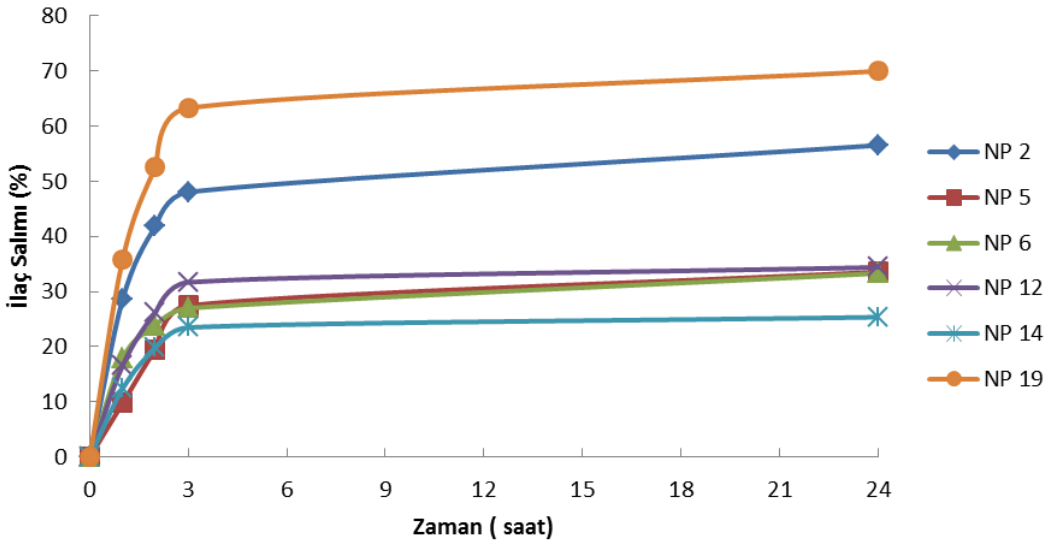
Süspanse edilmiş nanopartiküller inkübatöre konulduktan sonraki ortalama ilk 3 saatte salımın büyük bir kısmını gerçekleştirmiştir (Şekil 5.27). 1. Günden sonra salım daha yavaş gerçekleşmiştir. Bu hızlı salım, PLGA'nın yüzeyine yakın ilacın difüzyonundan kaynaklanmaktadır. Sonraki salım, çoğunlukla nanopartikülün polimerik matriksi içerisindeki ilaç moleküllerinin difüzyonuyla olmaktadır. Çalışmamızın sonuçları Song ve arkadaşları tarafından yapılan sonuçlarla benzerlik göstermektedir [142].

En fazla salım yapan 400 mg PLGA ile hazırlanan NP 19'un salımı 43. günde % 96,21'e ulaşmaktadır. En düşük salımı ise çözücüsü 3,5 ml aseton ile hazırlanan NP 14'de gerçekleşmektedir. NP 14'ün salımı 43. günde % 28,80'e ulaşmıştır. (Şekil 5.25).

Küçük partikül büyüklüğü ile geniş yüzey alanı, sınırlı ilaç yüklemesine ve salımda ani patlama etkisine yol açabilir ki, bu etki "burst effect" yani "patlama etkisi" olarak bilinmektedir. Nanopartiküller, klinik olarak kullanıma geçmeden yani ruhsatlandırılmadan önce bu sorunların çözüme kavuşturulması gerekmektedir [75, 76].



Şekil 5.26 NP 2, NP 5, NP 6, NP 12, NP 14, NP 19'un günlere göre salım grafiği

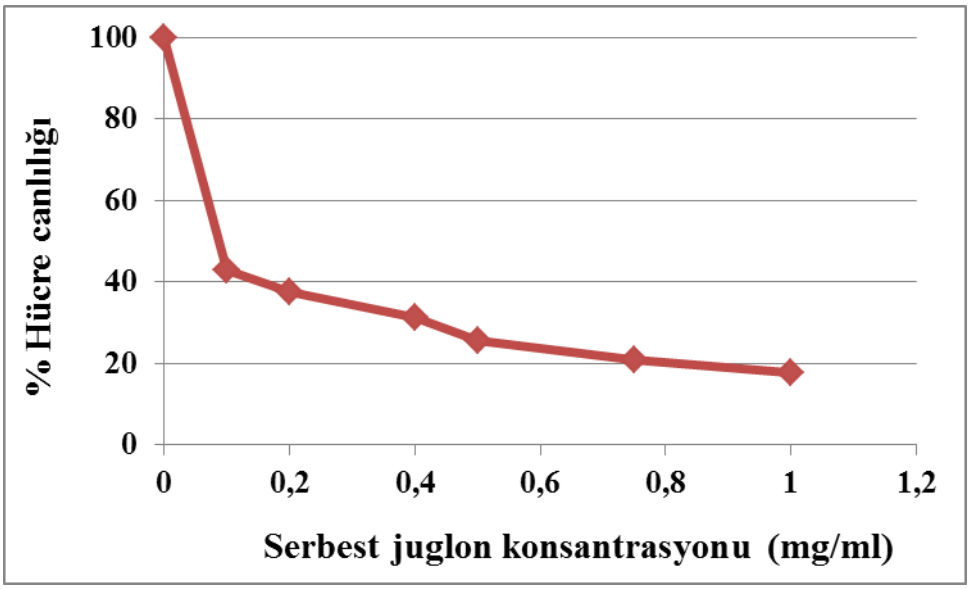


Şekil 5.27 NP 2, NP 5, NP 6, NP 12, NP 14, NP 19'un saatlere göre salım grafiği

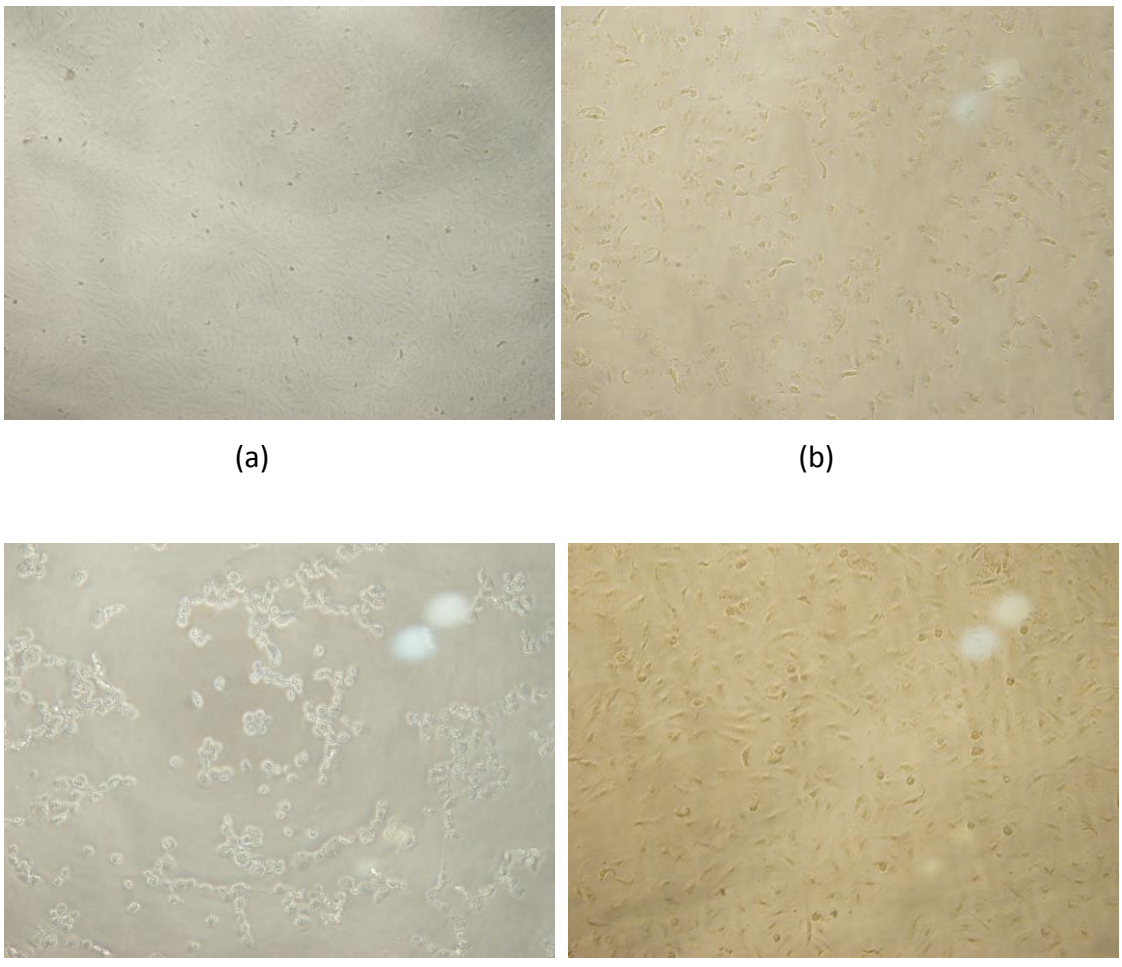
5.6 Juglon Yüklü PLGA Nanopartiküllerinin Vero Hücrelerindeki Sitotoksik Analizi

MTT solüsyonu Şekil 5.29, Şekil 5.31, Şekil 5.33, Şekil 5.35'te morfolojileri incelenen kuyucuklara eklendikten bir gece sonra hücrelerin MTT ile etkileşmesi sonucu meydana gelen değişiklikler ve formazan kristal oluşumu ters mikroskopla incelenerek değerlendirildi.

Mikroplaktaki kuyucuklarında formazan kristallerinin oluşturduğu renk değişimi 570 nm dalga boyunda ölçüldü. Etken madde uygulanmamış bir kontrol grubu oluşturuldu. Kontrol, serbest juglon, NP 2, NP 5 ve NP 20'nin farklı konsantrasyonları icin ayrı ayrı uygulanan kuyucukların 570 nm'deki absorbans değerlerinin ortalamaları (herbir konsantrasyon icin 5 kuyu) alınarak % canlılık hesaplandı. Hesaplamalara göre Şekil 5.36'daki grafik elde edilmiştir. Serbest juglon, NP 2 ve NP 5 uygulanan hücrelerden 48 saatlik inkübasyon süreci sonucunda elde edilen IC_{50} (%50 ölüm oranı) değerleri sırasıyla 0,09 mg/ml (Şekil 5.28), 0,43 mg/ml (Şekil 5.30) ve 0,34 mg/ml'dir (Şekil 5.32) ve canlılık değerlerinin değerlendirmesinde; NP 20 uygulanan grubun hücre yoğunluğunun en yüksek olduğu ve bu değerin konsantrasyon artışına bağlı olarak düştüğü belirlenmiştir.



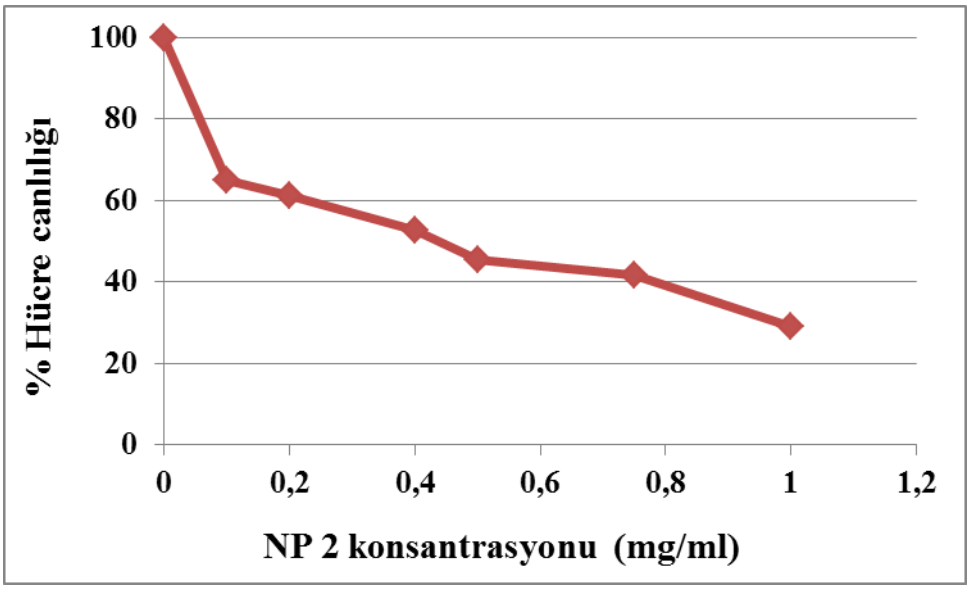
Şekil 5.28 Serbest juglonun konsantrasyona (mg/ml) bağlı hücre canlılığı (%) grafiği



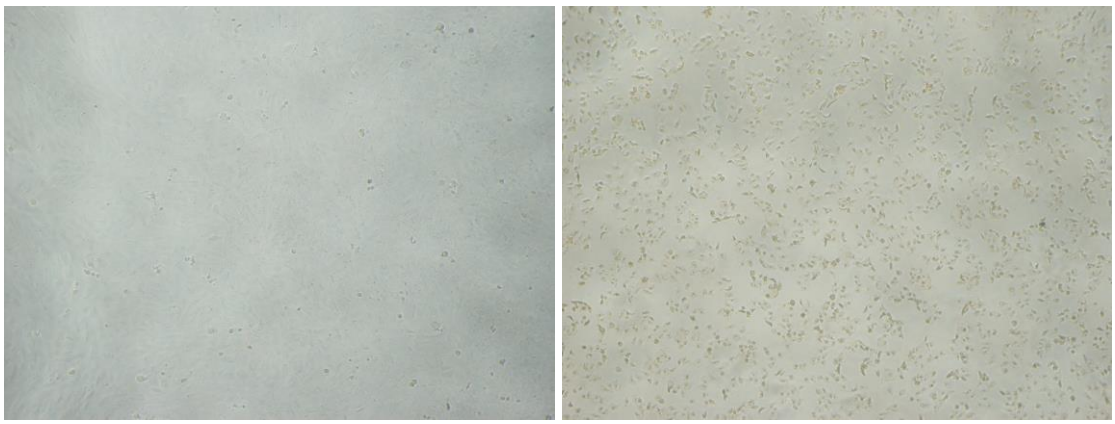
(a) (b)

(c) (d)

Şekil 5.29 Serbest juglonun 48 saatlik inkübasyonu sonucu Vero hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimlerin mikroskobik görüntüsü (20x); (a) 0,0125 mg/ml (b) 0,1 mg/ml (c) 0,5 mg/ml (d) 1 mg/ml



Şekil 5.30 NP 2'nin konsantrasyona (mg/ml) bağlı hücre canlılığı (%) grafiği

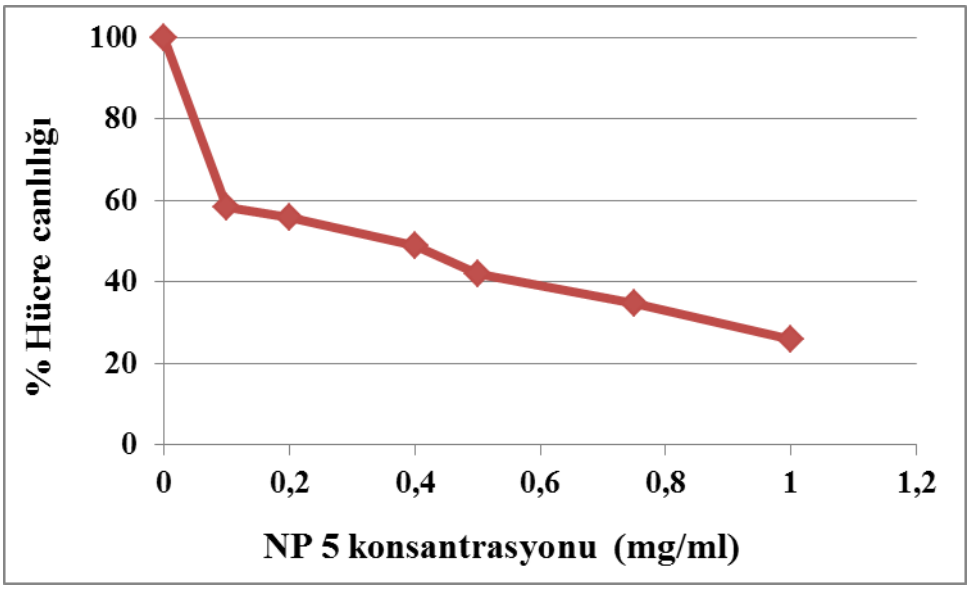


(a) (b)

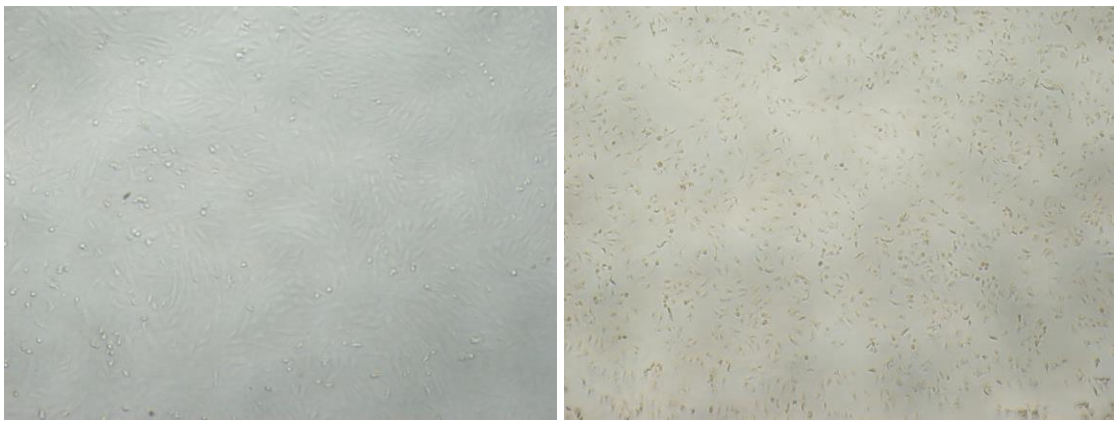


(c)

Şekil 5.31 NP 2'nin 48 saatlik inkübasyonu sonucu vero hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimlerin mikroskobik görüntüsü (20x); (a) 0,1 mg/ml (b) 0,5 mg/ml (c) 1 mg/ml



Şekil 5.32 NP 5'in konsantrasyona (mg/ml) bağlı hücre canlılığı (%) grafiği

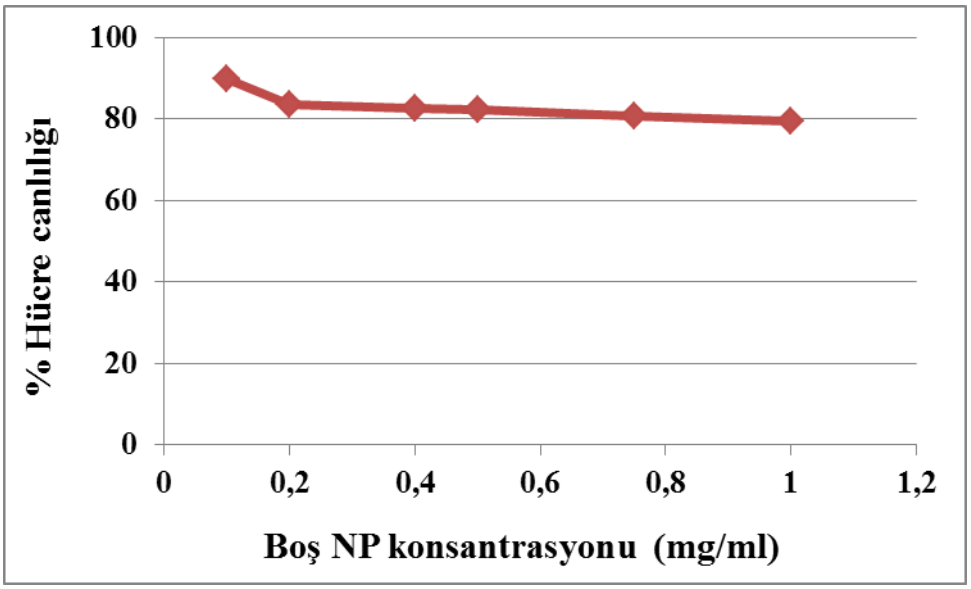


(a) (b)

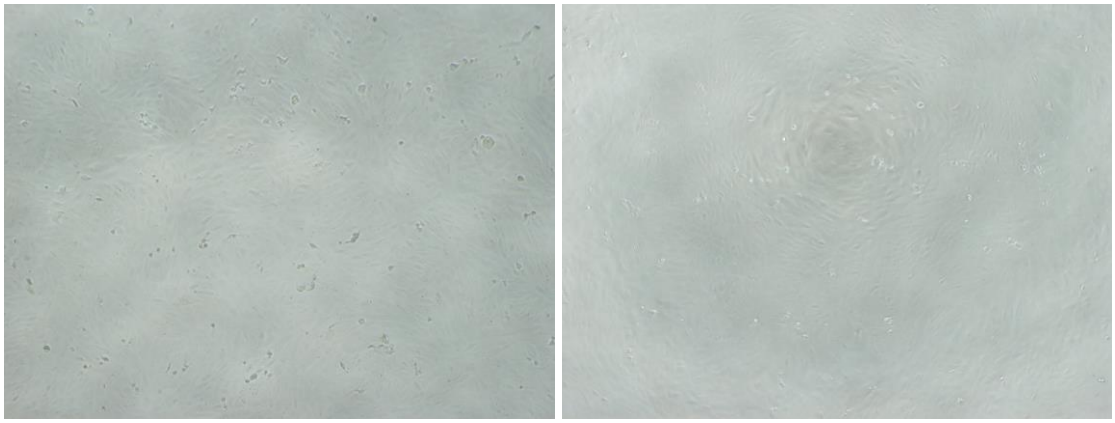


(c)

Şekil 5.33 NP 5'nin 48 saatlik inkübasyonu sonucu vero hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimlerin mikroskobik görüntüsü (20x); (a) 0,1 mg/ml (b) 0,5 mg/ml (c) 1 mg/ml



Şekil 5.34 NP 20'nin konsantrasyona (mg/ml) bağlı hücre canlılığı (%) grafiği



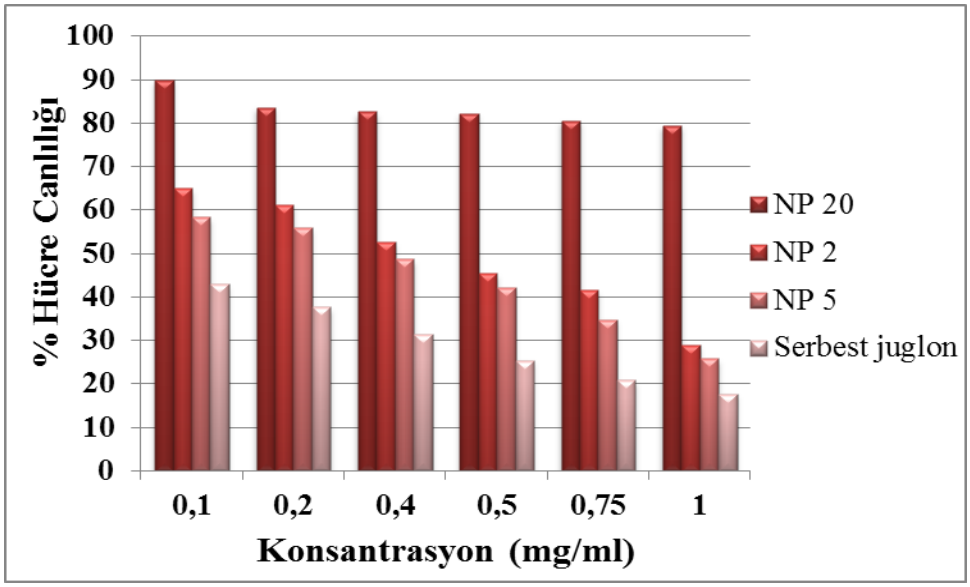
(a) (b)



(c)

Şekil 5.35 NP 20'nin 48 saatlik inkübasyonu sonucu vero hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimlerin mikroskobik görüntüsü (20x); (a) 0,1 mg/ml (b) 0,5 mg/ml (c) 1 mg/ml

Serbest Juglon, NP2 ve NP5 uygulanan vero hücrelerinde kendi aralarında karşılaştırıldığında juglonun enkapsüle edilmesi sonucu oluşturulan nanopartiküllerin biyouyumluluklarının serbest juglona göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Şekil 5.36).



Şekil 5.36 NP 20, serbest juglon, NP 2 ve NP 5'in konsantrasyona (mg/ml) bağlı % hücre canlılığı grafiği

BÖLÜM 6

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında antimikrobiyal aktivitesi daha önceki çalışmalarda gösterilmiş olan juglon maddesinin nanopartikül sistemlere yüklenerek nanopartiküllerin karakterizasyonun ve vero hücreleri üzerindeki sitotoksik etkinliğinin belirlenmesi, *in vitro* biyouyumluluk analiziyle sitotoksik özelliğinin incelenmesi ve biyouyumluluğunun arttırılması, daha düşük dozlarda daha etkili olan nanopartikül formülasyonlarının geliştirilmesi amaçlanmaktadır.

Bu tezde nanopartiküler sistemlerin hazırlanması tekli emülsiyon (s/y) çözücü uçurma yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon verimi (RY), enkapsülasyon etkinliği (EE), etken yüklenme verimi (DL), boyut (Z-Ave), çoklu dağılım indeksi (PDI) ve zeta potansiyel (mV) analizleri 5 farklı parametreye göre incelenmiştir.

İlk parametre juglon miktarının arttırılmasıdır. Juglon miktarının artışı reaksiyon veriminde, enkapsülasyon etkinliğinde ve etken yüklenme veriminde artışa sebep olmuştur. Sonuçlar, juglon miktarının artışının boyutlar üzerinde önemli bir etkisi olmadığını göstermiştir. Sonuçlarımız başka çalışmalarla da uyum göstermektedir [142-144].

Bu tezde başka bir parametre olarak farklı konsantrasyonlarda PVA kullanılmıştır. PVA ara yüzey geriliminin azalmasında önemli rol oynamaktadır. Yüksek konsantrasyonda PVA, ara yüzey gerilimini azaltmak için organik solvent/sıvı arayüzüne yönelir [151]. PVA, nanopartiküllerin dağılımındaki yüzey gerilimini azaltarak [145, 146] nanopartiküllerin aglomerasyonunu engeller. Böylece PVA konsantrasyonunun artışıyla daha küçük boyutlarda nanopartikül elde edilir [146].

PVA konsatrasyonunun artışıyla enkapsülasyon veriminde önemli düşüş gerçekleşir. Bu, partikül boyutlarındaki düşüşten kaynaklanmaktadır. PVA konsantrasyonunun artışıyla juglon molekülleri emülsifikasyon sırasında hızla sıvı faza geçer ve az miktarda juglon molekülü PLGA ile iletişimde olmak için emülsiyon damlacıklarında kalır; böylece enkapsülasyon verimi düşer.

PVA hacminin (ml) artışıyla değişen partikül boyutuda bu tez çalışmasında incelenmiştir. PVA hacminin artışı yüzey gerilimini azalttığı için partikül boyutlarında düşüş gerçekleşmektedir. Fakat bir süre sonra PVA hacminin artışı viskoziteyi arttırmakta ve bu da daha büyük nanopartiküllerin oluşmasına neden olmaktadır [142, 147].

PLGA miktarının artması iç fazdaki viskoziteyi arttırmak, bunun sonucu olarak da kayma gerilimi düşmekte ve daha büyük nanopartiküller elde edilmektedir [140, 142, 148, 149].

Viskozitenin artışı sıvı PVA fazındaki polimer solüsyonunun hızlı dağılımını önler ve bu da daha büyük nanopartikül oluşumuna neden olur. Bunun sonucunda da reaksiyon verimi artmaktadır.

Aseton tamamen su ile karışabilen organik bir çözeltidir. A/DCM (v/v) oranı arttırıldığında asetonun dış faza hızlı difüzyonu ara yüzey geriliminin önemli derecede düşmesine neden olur. Bu da partikül boyutlarının azalmasına sağlar.

A/DCM oranı arttıkça sıvı faza daha fazla juglon molekülü taşınır ya da organik faz/sıvı yüzeyinde kalır. Az miktarda juglon molekülü PLGA ile iletişimde juglon olacak şekilde iç fazda kalır ve enkapsülasyon verimi böylece düşmüş olur [142, 152, 153].

Yapılan SEM analizlerine göre yüzey morfolojisinin düzgün, taneciklerin küresel ve homojen olarak dağıldığı ve nanopartiküllerin boyutlarının ölçülen Z-Ave değerleri ile örtüştüğü görülmektedir.

Karakterizasyon çalışmalarının ardından üretilen nanopartiküllerin *in vitro* salımına bakılmıştır. Süspanse edilmiş nanopartiküller inkübatöre konulduktan sonraki ortalama ilk 3 saatte salımın büyük bir kısmını gerçekleştirmiştir (Şekil 5.24). 1. günden sonra salım daha yavaş gerçekleşmiştir. Bu hızlı salım, PLGA'nın yüzeyine yakın ilacın difüzyonundan kaynaklanmaktadır. Sonraki salım, çoğunlukla nanopartikülün polimerik matriksi içerisindeki ilaç moleküllerinin difüzyonuyla olmaktadır. Çalışmamızın

sonuçları Song ve arkadaşları tarafından yapılan sonuçlarla benzerlik göstermektedir [142].

Toksisite değerlendirmesinde; NP 20 uygulanan grubun hücre yoğunluğunun en yüksek olduğu ve bu değerin konsantrasyon artışına bağlı olarak düştüğü belirlenmiştir. Serbest Juglon, NP2 ve NP5 uygulanan hücreler kendi aralarında karşılaştırıldığında juglonun enkapsüle edilmesi sonucu oluşturulan nanopartiküllerin biyouyumluluklarının serbest juglona göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışmada juglon maddesinin nanopartikül sistemlere yüklenmesi sureti ile biyouyumluluğunun arttırılması ve daha düşük dozlarda daha etkili olan nanopartikül formülasyonlarının geliştirilmesi sağlanmıştır. Etkin maddeyi içeren nanopartikül taşıyıcı sistemi kan dolaşımında uzun süre kalıp, etkin maddenin korunmasını ve kontrollü salınımını sağlayabilir. Geliştirilen nanopartiküler formülasyonun diğer antimikrobiyal etken maddeler için de faydalı bir model oluşturacağı ve ülkemiz ilaç sanayisine önemli katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Kocaçalışkan, (2006). I., Allelopati, Bizim Büro Basın Yayın, Ankara.: 132.
2. Topal, S., Kocacaliskan, I., Arslan, O., & Tel, A. Z., (2007). "Herbicidal effects of juglone as an allelochemical", PHYTON-Annales rei Botanicae, 46(2):259-269.
3. Dama, L., B. Poul, and B. Jadhav, (1998). "Antimicrobial activity of naphthoquinonic compounds. Journal of Ecotoxicology & Environmental Monitoring", 8(3): 213-215.
4. Albayrak, A., (2006). "Ceviz Yaprak Özütleri ve Juglonun Bazı Mikroorganizmalar Üzerine Etkileri" Biyoloji Ana Bilim Dalı., Dumlupınar Üniversitesi: Kütahya, 46.
5. Oliveira, I., et al., (2008). "Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (Juglans regia L.) green husks." Food and Chemical Toxicology, 46(7): 2326-2331.
6. Xu, H., et al., (2013). Juglone, isolated from Juglans mandshurica Maxi, induces apoptosis via down-regulation of AR expression in human prostate cancer LNCaP cells. Bioorganic & medicinal chemistry letters.
7. Tan, D.T.C., et al., (2012). "Synthesis and Antibacterial Activity of Juglone Derivatives. Journal of Chemistry and Chemical Engineering" 6(1):84-89.
8. Zakavi, F., "Antibacterial effect of Juglansregia bark against oral pathologic bacteria." 6(1): 22-24
9. Clark, A.M., T.M. Jurgens, and C.D. Hufford, (1990).Antimicrobial activity of juglone. Phytotherapy Research. 4(1):11-14.
10. Montenegro, R.C., et al., (2010). "Cytotoxic activity of naphthoquinones with special emphasis on juglone and its 5-methyl derivative." Chemico-biological interactions. 184(3): 439-448.
11. Bonjar, G.S., S. Aghighi, and A.K. Nik, (2004). "Antibacterial and antifungal survey in plants used in indigenous herbal-medicine of south east regions of Iran. Journal of Biological Sciences" 4(3): 405-412.
12. Bonjar, G.S., (2004). "Anti yeast activity of some plants used in traditional herbal medicine of Iran. J Biol Sci". 4: 212-5.

13. Sugie, S., et al., (1998). "Inhibitory effects of plumbagin and juglone on azoxymethane-induced intestinal carcinogenesis in rats. Cancer letters" 127(1): 177-183.

14. Kiran Aithal, B., et al., (2009). "Juglone, a naphthoquinone from walnut, exerts cytotoxic and genotoxic effects against cultured melanoma tumor cells. Cell biology international" 33(10): 1039-1049.

15. Paulsen, M.T. and M. Ljungman, (2005). "The natural toxin juglone causes degradation of p53 and induces rapid H2AX phosphorylation and cell death in human fibroblasts. Toxicology and applied pharmacology" 209(1): 1-9.

16. Xu, H.-L., et al., (2010). "Anti-proliferative effect of Juglone from Juglans mandshurica Maxim on human leukemia cell HL-60 by inducing apoptosis through the mitochondria-dependent pathway. European journal of pharmacology" 645(1): 14-22.

17. Bhosale, S., et al., (1999)."Pharmacological studies of isomeric juglones on the isolated frog heart. Indian journal of pharmacology" 31(3):222.

18. Lee, C.-H., B.-K. Sung, and H.-S. Lee, (2006)."Acaricidal activity of fennel seed oils and their main components against *Tyrophagus putrescentiae*, a stored-food mite. Journal of Stored Products Research" 42(1): 8-14.

19. Chobot, V. and F. Hadacek, (2009). "Milieu-dependent pro-and antioxidant activity of juglone may explain linear and nonlinear effects on seedling development" Journal of chemical ecology" 35(3): 383-390.

20. YİĞİT, D., et al., (1993). "Ceviz (Juglans regia L.)'in antimikrobiyal aktivitesi. Türk Mikrobiyol Cem Derg"

21. Derman S., K.K., Mustafaeva Akdeste Z., (2013). "Polimerik Nanopartiküller. Sigma Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi" 13(1): 14.

22. Kashi, T.S.J., et al., (2012). "Improved drug loading and antibacterial activity of minocycline-loaded PLGA nanoparticles prepared by solid/oil/water ion pairing method. International Journal of Nanomedicine", 7: 221-234.

23. Thomas, M. and A.M. Klibanov, (2003). "Conjugation to gold nanoparticles enhances polyethylenimine's transfer of plasmid DNA into mammalian cells. Proceedings of the National Academy of Sciences" 100(16): 9138.

24. Desai, M.P., et al., (1996). "Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: effect of particle size", Pharmaceutical research, 13(12): 1838-1845.

25. Desai, M.P., et al., (1997). The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent. Pharmaceutical Research. 14(11): 1568-1573.

26. Panyam, J., et al., (2003)."Fluorescence and electron microscopy probes for cellular and tissue uptake of poly (d, l-lactide- co-glycolide) nanoparticles. International journal of pharmaceutics", 262(1): 1-11.

27. Öztürk, K., (2010). "Serbest Radikal Temizleyici Madde İçeren Nanopartiküler Taşıyıcı Sistemlerin Tasarımı Ve Değerlendirilmesi, in Farmasötik Teknoloji Program", Hacettepe Üniversitesi: Ankara, 191.

28. Soppimath, K.S., et al., (2001). "Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. Journal of controlled release", 70(1): 1-20.

29. Çırpanlı, Y., (2009). "Kamptotesin İçeren Polimerik Ve Oligosakkarit Bazlı Nanopartiküler Formülasyonların Geliştirilmesi Ve İn Vitro-İn Vivo Değerlendirilmesi, in Farmasötik Teknoloji Programı" Hacettepe Üniversitesi: Ankara, 193.

30. Derman, S., (2012). Canine Parvovirüs'e Ait Antijenik Özellikli Sentetik Peptidlerin Sentezi ve Biyokonjugatlarının Geliştirilmesi için Biyomühendislik. Yıldız Teknik Üniversitesi: İstanbul, 247.

31. Engineer, C., J. Parikh, and A. Raval, (2011). "Review on Hydrolytic Degradation Behavior of Biodegradable Polymers from Controlled Drug Delivery System." Trends in Biomaterials and Artificial Organs, 25(2): 79-85.

32. Panyam, J. and V. Labhasetwar, (2012). "Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. Advanced drug delivery reviews."

33. Çıracı, S., Özbay, E., Gülsere, O., Demir, HV., Bayındır, M., Oral, A., Senger, T., Aydınlı, A., Dana, A., (2005). "Türkiye'de Nanoteknoloji", TÜBİTAK Bilim ve Teknik Dergisi.

34. Sayar, F., (2010). Production of Nanoparticles and Their Applications in Nanomedicine.

35. BERK, S. and İ. AKKURT, (2012). "Nanopartikül: Geleceğin korkulu rüyası." 60(2):180-184.

36. DALI, T.Y.A.B., (2005)."Nanobilim ve Nanoteknoloki ÜLke Güvenliği/Etkinliği AçısındanDoğru Modelin Belirlenmesi"

37. Seaton, A. and K. Donaldson, (2005). "Nanoscience, nanotoxicology, and the need to think small. The Lancet. 365(9463): 923-924.

38. Roco, M.C., (2005). "International perspective on government nanotechnology funding in 2005. Journal of Nanoparticle Research" 7(6): 707-712.

39. Bogunia-Kubik, K. and M. Sugisaka, (2002). "From molecular biology to nanotechnology and nanomedicine" Biosystems, 65(2): 123-138.

40. Roco, M.C., (2003). "Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine. Current opinion in biotechnology", 14(3): 337-346.

41. Panyam, J. and V. Labhasetwar, (2003). "Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue" Advanced drug delivery reviews, 55(3): 329-347.

42. Moore, M.N., (2002). "Biocomplexity: the post-genome challenge in ecotoxicology. Aquatic Toxicology", 59(1): 1-15.

43. Borm, P.J., (2002). "Particle toxicology: from coal mining to nanotechnology. Inhalation Toxicology", 14(3): 311-324.

44. Scott, N. and H. Chen, (2013). "Nanoscale science and engineering for agriculture and food systems", Industrial Biotechnology, 9(1):17-18.

45. Bozkir, A. and O.M. Saka, (2005). "Formulation and investigation of 5-FU nanoparticles with factorial design-based studies", Il Farmaco, 60(10): 840-846.

46. Calvo, P., et al., (1997). "Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines", Pharmaceutical Research, 14(10):1431-1436.

47. Kaş, H., (2002). İlaç taşıyıcı partiküler sistemler. Kontrollü Salım Sistemleri. Ed's, Gürsoy A: 82-88.

48. Çırpanlı, Y., (2009). "Kamptotesin İçeren Polimerik ve Oligosakkarit Bazlı Nanopartiküller Formülasyonların Geliştirilmesin ve In Vitro-In Vivo Değerlendirilmesi", Farmasötik Teknoloji Programı, Hacettepe University: Ankara.

49. Alonso, M.J., (1996). "Nanoparticulate drug carrier technology", Drugs and the pharmaceutical sciences, 77: 203-242.

50. Chen, H., et al., (2008). "Shape-and size-dependent refractive index sensitivity of gold nanoparticles", Langmuir, 24(10): 5233-5237.

51. Özer, Y., (2008). "Nanobilim ve Nanoteknoloji: Ülke Güvenliği/Etkinliği Açısından Doğru Modelin Belirlenmesi", 48-50.

52. Usta, M., (2012). "Biokütle Destekli Nanopartiküllerin Sentezi ve Karakterizasyonu", Kimya Anabilim Dalı, Yıldız Teknik Üniversitesi: 8.

53. Jones, M.-C. and J.-C. Leroux, (1999). "Polymeric micelles–a new generation of colloidal drug carriers", European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics, 48(2): 101-111.

54. Torchilin, V.P., (2001). "Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems", Journal of controlled release, 73(2): 137-172.

55. Couvreur, P. and F. Puisieux, (1993). "Nano-and microparticles for the delivery of polypeptides and proteins", Advanced Drug Delivery Reviews, 10(2): 141-162.

56. Singh, M., A. Chakrapani, and D. O'Hagan, (2007). "Nanoparticles and microparticles as vaccine-delivery systems."

57. Gürsoy, A., et al., (1989). "Kontrollü İlaç Serbestleştiren Sistemler.", Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, (469/5).

58. Robinson, J. and V.H. Lee, (1987). "Controlled drug delivery: fundamentals and applications", 29: Informa health care.

59. Duncan, R. and L.W. Seymour, (1989). "Controlled release technologies: a survey of research and commercial applications", Elsevier Science & Technology.

60. Oppenheim, R.C., (1986). "Nanoparticulate drug delivery systems based on gelatin and albumin", Polymeric nanoparticles and microspheres, CRC Press Boca Raton: 2-25.

61. Tomlinson, E., (1983). "Microsphere delivery systems for drug targeting and controlled release", Int. J. Pharm. Tech. Prod. Mfr, 4(3): 49-57.

62. Cushing, B.L., V.L. Kolesnichenko, and C.J. O'Connor, (2004). Recent advances in the liquid-phase syntheses of inorganic nanoparticles. Chemical reviews, 104(9): 3893-3946.

63. Kavaz, D., (2011). "Nanoteknoloji", Nanobülten,13: 12-9.

64. ŞENGEL-TÜRK, C.T., C. HASÇİÇEK, and N. GÖNÜL, (2007). "Beyne İlaç Hedeflendirilmesinde Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler", Journal of Neurological Sciences (Turkish), 24(3): 254-263.

65. Özcan, İ., (2008). Kemiğe Hedeflemek İçin Sentezlenen Biyolojik Parçalanabilen Polimerler Kullanılarak Hazırlanan Nanopartiküler İlaç Tasıyıcı Sistemlerin Tasarımı Ve In Vitro – In Vivo Değerlendirilmesi, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi.

66. Cui, Z., Lockman, PR., Atwood, CS., Hsu, CH., Gupte, A., Allen, DD., Mumper, RJ., (2008). "Novel D-penicillamine carrying nanoparticles for metal chelation therapy in Alzheimer's and other CNS diseases", Eur J Pharm Biopharm, 59: 263-272.

67. Garcia-Garcia, E., Andrieux, K., Gil, S., Couvreur, P., (2005). "Colloidal carriers and blood-brain barrier (BBB) translocation: A way to deliver drugs to the brain", Int J Pharm, 298: 274-292.

68. Green-Sadan, T., et al., (2005). "Glial cell line-derived neurotrophic factor-conjugated nanoparticles suppress acquisition of cocaine self-administration in rats", Experimental neurology, 194(1): 97-105.

69. Härtig, W., et al., (2003). "Electron microscopic analysis of nanoparticles delivering thioflavin-T after intrahippocampal injection in mouse: implications for targeting β-amyloid in Alzheimer's disease", Neuroscience letters, 338(2): 174-176.

70. Liu, G., et al., (2005). "Nanoparticle and other metal chelation therapeutics in Alzheimer disease", Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 1741(3): 246-252.

71. Pinto-Alphandary, H., A. Andremont, and P. Couvreur, (2000). "Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications", International journal of antimicrobial agents, 13(3): 155-168.

72. Simeonova, M., et al., (1988). "Tissue distribution of polybutylcyanoacrylate nanoparticles carrying spin-labelled nitrosourea", International journal of pharmaceutics, 43(3): 267-271.

73. Wang, J.-X., X. Sun, and Z.-R. Zhang, (2002). "Enhanced brain targeting by synthesis of 3′, 5′-dioctanoyl-5-fluoro-2′-deoxyuridine and incorporation into solid lipid nanoparticles", European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 54(3): 285-290.

74. Yang, S.C., et al., (1999). "Body distribution in mice of intravenously injected camptothecin solid lipid nanoparticles and targeting effect on brain", Journal of controlled release, 59(3): 299-307.

75. Mu, L. and S. Feng, (2003). "A novel controlled release formulation for the anticancer drug paclitaxel (Taxol®): PLGA nanoparticles containing vitamin E TPGS", Journal of controlled release, 86(1): 33-48.

76. Kreuter, J., (1994) "Colloidal drug delivery systems.", 66.: CRC Press.

77. Kabanov, A. and E. Batrakova, (2004). "New technologies for drug delivery across the blood brain barrier", Current pharmaceutical design, 10(12): 1355.

78. Baysal, I., et al., (2013). "Interaction of selegiline-loaded PLGA-b-PEG nanoparticles with beta-amyloid fibrils.", Journal of Neural Transmission, 120(6): 903-910.

79. Mohanraj, V. and Y. Chen, (2007). "Nanoparticles-a review." Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 5(1): 561-573.

80. Kerimoğlu, O. and E. Alarçin, (2012). "Poly (lactic-co-glycolic acid) based drug delivery devices for tissue engineering and regenerative medicine.", Ankem Derg, 26(2): 86-98.

81. Irmaka, G., et al., β-Estradiol Yüklü PLGA Nanoküreler: Sentez, Karakterizasyon ve in-vitro Salım Kinetiği

82. Hirenkumar, K., Siegel, S., (2011). "Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier", Polymer, 3: 1377-1397.

83. Derman, S., (2012). Canine Parvovirus'e Ait Antijenik Özellikli Sentetik Peptidlerin Sentezi Ve Biyokonjugatlarının Geliştirilmesi, Doktora Tezi, Bioengineerin., Yıldz Teknik Üniversitesi: Istanbul.

84. Okada, H. and H. Toguchi, (1995). "Biodegradable microspheres in drug delivery", Critical reviews in therapeutic drug carrier systems, (12): 1-99.

85. Yenice, İ., (2001). Ortopedide kullanılan biyoparçalanır polimerler ile hazırlanan teikoplanin içeren mikropartiküler sistemli implantların formülasyonu ve in vitro - in vivo değerlendirilmesi üzerine çalışmalar, Bilim Uzmanlığı Tezi, H.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

86. Şengel Türk, C.T., (2009). Kolona hedeflendirilmek üzere nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi ve değerlendirilmesi, Doktora Tezi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Ankara University: Ankara.

87. Özcan, İ., (2008). Kemiğe hedeflemek için sentezlenen biyolojik parçalanabilen polimerler kullanılarak hazırlanan nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin tasarımı ve in vitro-iin vivo değerlendirilmesi, Doktora Tezi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Ege University: Izmir.

88. Sanguansri, P. and M.A. Augustin, (2006). "Nanoscale materials development–a food industry perspective", Trends in Food Science & Technology, 17(10): 547-556.

89. Mason HG, W.J., Meleson K, Chang CB, Graves SM., (2006). "Nanoemülsions: formation, structure and physical properties", J of Phys: Condens Matter, 18: 635-666.

90. Solans C, I.P., Nolla J, Azemar N, Garcia-Celma MJ, (2005). "Nano-emülsions", Curr Opin Colloid Interface Science, 10: 102-110.

91. Benoit, J.-P., et al., (2000). "Development of microspheres for neurological disorders: from basics to clinical applications", Journal of controlled release, 65(1): 285-296.

92. Cohen, S., et al., (1991). "Controlled delivery systems for proteins based on poly (lactic/glycolic acid) microspheres", Pharmaceutical research, 8(6): 713-720.

93. Bodmeier, R., et al., (1991). "Pseudoephedrine HCl microspheres formulated into an oral suspension dosage form", Journal of Controlled release, 15(1): 65-77.

94. Akagi, T., M. Baba, and M. Akashi, (2012). "Biodegradable nanoparticles as vaccine adjuvants and delivery systems: regulation of immune responses by nanoparticle-based vaccine", Polymers in nanomedicine, Springer, 31-64.

95. Allémann, E., R. Gurny, and E. Doelker, (1992). "Preparation of aqueous polymeric nanodispersions by a reversible salting-out process: influence of process parameters on particle size", International Journal of Pharmaceutics, 87(1): 247-253.

96. DERMAN, S., K. KIZILBEY, and Z.M. AKDESTE, (2013). Polymeric nanoparticles", Sigma, 31: 109-122.

97. Muthu, M., (2009). "Nanoparticles based on PLGA and its co-polymer: An overview.", Asian Journal of Pharmaceutics, 3(4): 266.

98. Allémann, E., et al., (1993). In vitro extended-release properties of drug-loaded poly (DL-lactic acid) nanoparticles produced by a salting-out procedure. Pharmaceutical research, 10(12): 1732-1737.

99. Couvreur, P., et al., (1979). "Polycyanoacrylate nanocapsules as potential lysosomotropic carriers: Preparation, morphological and sorptive properties", Journal of Pharmacy and Pharmacology, 31(1): 331-332.

100. Rao, J.P. and K.E. Geckeler, (2011). "Polymer nanoparticles: preparation techniques and size-control parameters", Progress in Polymer Science, 36(7): 887-913.

101. Fessi, H., et al., (1989). "Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement", International journal of pharmaceutics, 55(1): R1-R4.

102. Jeong, Y.I., et al., (2001). "Preparation of poly (DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles without surfactant", Journal of applied polymer science, 80(12): 2228-2236.

103. Kostag, M., et al. (2010). "Pure cellulose nanoparticles from trimethylsilyl cellulose", Macromolecular symposia, Wiley Online Library.

104. Jeon, H.-J., et al., (2000). "Effect of solvent on the preparation of surfactant-free poly (DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles and norfloxacin release characteristics", International journal of pharmaceutics, 207(1): 99-108.

105. Hale, M.G. and D.M. Orcutt, (1987). "The physiology of plants under stress", John Wiley & Sons.

106. Rietveld, W., (1983). "Allelopathic effects of juglone on germination and growth of several herbaceous and woody species", Journal of Chemical Ecology, 9(2): 295-308.

107. Tekintaş, E., Tanrısever, A., Mendilcioğlu, K., İnal, A., (1988). "Juglon'un tohum çimlenmesine etkileri üzerine bir araştırma", E.Ü. Ziraat Fak. Der., 25(2): 200-213.

108. Daglish, C., (1950). "The identification of theapparent vitamin C'of the walnut (Juglans regia) with hydrojuglone glucoside", Biochemical Journal, 47(4): 462.

109. Mecklenburg, R. and H. Tukey Jr, (1964). "Influence of foliar leaching on root uptake and translocation of calcium-45 to the stems and foliage of *Phaseolus vulgaris*", Plant physiology, 39(4): 533.

110. Whittaker, R.H.a.F., P.P., (1971). Allelochemicals: Chemicals interactions between species. Science, 171: 757-771.

111. Rice, E., (1984). Alleopathy. Oriando (Fla., USA): Academic Press Inc, 422.

112. Daglish, C., (1950). "The isolation and identification of a hydrojuglone glycoside occurring in the walnut", Biochemical Journal, 47(4): 452.

113. Prataviera, A., A. Kuniyuki, and K. Ryugo, (1983). "Growth inhibitors in xylem exudates of Persian walnuts (*Juglans regia L*.) and their possible role in graft failure.", Journal-American Society for Horticultural Science (USA).

114. Lee K. C., C.R.W., (1969). "Nature and occurrence of juglone in Juglans nigra", L.Horticultural Science, 4: 297-298.

115. Segura-Aguilar, J., I. Hakman, and J. Rydström, (1992). "The effect of 5OH-1, 4-naphthoquinone on Norway spruce seeds during germination", Plant Physiology, 100(4): 1955-1961.

116. Funk, D.T., et al., (1979). "Notes: Effects of Juglone on the growth of coniferous seedlings", Forest Science, 25(3): 452-454.

117. Kocacaliskan, I. and I. Terzi, (2001). "Allelopathic effects of walnut leaf extracts and juglone on seed germination and seedling growth", Journal of Horticultural Science & Biotechnology, 76(4): 436-440.

118. Hejl, A.A., F.A. Einhellig, and J.A. Rasmussen, (1993). "Effects of juglone on growth, photosynthesis, and respiration", Journal of Chemical Ecology, 19(3): 559-568.

119. Jose, S. and A.R. Gillespie, (1998). "Allelopathy in black walnut (Juglans nigraL.) alley cropping. II. Effects of juglone on hydroponically grown corn (Zea maysL.) and soybean (Glycine maxL. Merr.) growth and physiology", Plant and soil, 203(2): 199-206.

120. Krajci, W. and D. Lynch, (1977). "Inhibition of various microorganisms by crude walnut hull extracts and juglone", Microbios letters.

121. Lopez, A., J. Hudson, and G. Towers, (2001). "Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants", Journal of Ethnopharmacology, 77(2): 189-196.

122. http://biyokure.org/uv-gorunur-bolge-spektroskopisi/5276/, 21 Şubat 2015.

123. Çimen, N.S., (2006). Proteinlerin Poliakrilik Asit ile Suda Çözünmeyen Kompleksleri, Yüksek Lisans Tezi,YTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Yıldız Teknik Üniversitesi, Istanbul.

124. Dizer, K.Ö., (2010). Kraft Kağıt Üretiminde Zeta Potansiyelin Kağıt Kalitesine Etkisi, Çevre Teknolojileri Anabilim Dalında, Zonguldak Karaelmas Üniversitesi: 5.

125. Mansuroğlu, B., (2007). Biyohibrid Yapılı ve Biyotaklitçi Polimer-Peptid Konjugatlarının Geliştirilmesi, Doktora Tezi, FBE Kimya Anabilim Dalı, Yıldız Teknik Üniversitesi: Istanbul: 66.

126. Karahan, H.A., (2007). Atmosferik Plazma Kullanılarak Doğal Liflerin Yüzeysel Özelliklerinin Değiştirilmesi Üzerine Bir Araştırma, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi: Izmir.

127. Gauglitz, G. and T. Vo-Dinh, (2006). Handbook of spectroscopy, John Wiley & Sons.

128. Wilson, R.H., (1994). Spectroscopic techniques for food analysis, VCH Publishers, Inc.

129. Sun, D.-W., (2009). Infrared spectroscopy for food quality analysis and control.", Academic Press.

130. Stuart, B., (2008). "Biological Application of Infrared Spectroscopy", John Wiley & Sons.

131. Pavia, D.L., et al., (2009). "Introduction to Spectroscopy", Brooks/Cole, Cengage Learning: Belmont, CA, USA: 2001.

132. Fagan, C.C. and C.P. O'Donnell, (2008). "Application of mid-infrared spectroscopy to food processing systems. Nondestructive testing of food quality", 1: 119-142.

133. Socrates, G., (2004). "Infrared and Raman characteristic group frequencies: tables and charts", John Wiley & Sons.

134. Maitra, A., et al., (1999). "Process for the preparation of highly monodispersed polymeric hydrophilic nanoparticles", Google Patents.

135. Mosmann, T., (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays", Journal of immunological methods, 65(1): 55-63.

136. Alley, M.C., et al., (1988). "Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay", Cancer research, 48(3): 589-601.

137. Abe, K. and N. Matsuki, (2000). "Measurement of cellular 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT", Neuroscience research, 38(4): 325-329.

138. Kumtepe, Y., et al., (2007). "Yardımcı üreme tekniklerinde ko-kültür kullanımı", Arşiv Kaynak Tarama Dergisi, 16(3).

139. Hussein, A.S., N. Abdullah, and A. Fakru'l-razi, (2013). "Optimizing the Process Parameters for Encapsulation of Linamarin into PLGA Nanoparticles Using Double Emulsion Solvent Evaporation Technique", Advances in Polymer Technology, 32(S1): E486-E504.

140. Halayqa, M. and U. Domańska, (2014). "PLGA Biodegradable Nanoparticles Containing Perphenazine or Chlorpromazine Hydrochloride: Effect of Formulation and Release", International journal of molecular sciences, 15(12): 23909-23923.

141. Esmaeili, F., F. Atyabi, and R. Dinarvand, (2008). "Preparation and characterization of estradiol-loaded PLGA nanoparticles using homogenization-solvent diffusion method", DARU Journal of Pharmaceutical Sciences, 16(4): 196-202.

142. Song, X., et al., (2008). "Dual agents loaded PLGA nanoparticles: systematic study of particle size and drug entrapment efficiency", European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics, 69(2): 445-453.

143. Budhian, A., S.J. Siegel, and K.I. Winey, (2007). "Haloperidol-loaded PLGA nanoparticles: systematic study of particle size and drug content", International journal of pharmaceutics, 336(2): 367-375.

144. Gómez-Gaete, C., et al., (2007). "Encapsulation of dexamethasone into biodegradable polymeric nanoparticles", International journal of pharmaceutics, 331(2): 153-159.

145. Nandi, A., D. Khakhar, and A. Mehra, (2001). Coalescence in surfactant-stabilized emulsions subjected to shear flow, Langmuir, 17(9): 2647-2655.

146. Tesch, S. and H. Schubert, (2002). "Influence of increasing viscosity of the aqueous phase on the short-term stability of protein stabilized emulsions", Journal of food engineering, 52(3): 305-312.

147. Mainardes, R.M. and R.C. Evangelista, (2005). "PLGA nanoparticles containing praziquantel: effect of formulation variables on size distribution", International journal of pharmaceutics, 290(1): 137-144.

148. Murakami, H., et al., (1999). "Preparation of poly (DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles by modified spontaneous emulsification solvent diffusion method", International journal of pharmaceutics, 187(2): 143-152.

149. Quintanar-Guerrero, D., et al., (1996). "Influence of stabilizing agents and preparative variables on the formation of poly (D, L-lactic acid) nanoparticles by an emulsification-diffusion technique", International Journal of Pharmaceutics, 143(2): 133-141.

150. Song, X., et al., (2008). "PLGA nanoparticles simultaneously loaded with vincristine sulfate and verapamil hydrochloride: systematic study of particle size and drug entrapment efficiency", International journal of pharmaceutics, 350(1): 320-329.

151. Galindo-Rodriguez, S., et al., (2004). "Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods", Pharmaceutical research, 21(8): 1428-1439.

152. Niwa, T., et al., (1994). "In vitro drug release behavior of D, L-lactide/glycolide copolymer (PLGA) nanospheres with nafarelin acetate prepared by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method", Journal of pharmaceutical sciences, 83(5): 727-732.

153. Niwa, T., et al., (1993). "Preparations of biodegradable nanospheres of water-soluble and insoluble drugs with D, L-lactide/glycolide copolymer by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method, and the drug release behavior", Journal of controlled release, 25(1): 89-98.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Gözde YELKENCİ

Doğum Tarihi ve Yeri : 17.07.1989 / ANKARA

Yabancı Dili : İngilizce, Almanca

E-posta : yelkencigozde@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Biyoloji Öğretmenliği	Hacettepe Üniversitesi	2013
Lisans	Biyoloji Öğretmenliği	Hacettepe Üniversitesi	2013
Lise	Fen Bilimleri	Ayrancı Y.D.A. Lisesi	2007

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2015	Quintiles & Roche	Clinical Trials Associate-CTA
2014-2015	Dekon Group	Araştırmacı