

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**POLİMERİK NANOPARTİKÜLLERİN PARTİKÜL
BÜYÜKLÜĞÜNE BAĞLI OLARAK HÜCRE İÇİNE ALIM
KİNETİKLERİ VE MEKANİZMALARI**

Ecz. Adem ŞAHİN

**Farmasötik Teknoloji Doktora Programı
DOKTORA TEZİ**

ANKARA

2017

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**POLİMERİK NANOPARTİKÜLLERİN PARTİKÜL
BÜYÜKLÜĞÜNE BAĞLI OLARAK HÜCRE İÇİNE ALIM
KİNETİKLERİ VE MEKANİZMALARI**

Ecz. Adem ŞAHİN

**Farmasötik Teknoloji Doktora Programı
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Yılmaz Çapan**

ANKARA

2017

**POLİMERİK NANOPARTİKÜLLERİN PARTİKÜL BÜYÜKLÜĞÜNE
BAĞLI OLARAK HÜCRE İÇİNE ALIM KİNETİKLERİ VE
MEKANİZMALARI**

Ecz. Adem Şahin

Bu çalışma 07/02/2017 tarihinde jürimiz tarafından "Farmasötik Teknoloji Programı"nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: *Prof. Dr. Erem Bilensoy*
Hacettepe Üniversitesi

Tez Danışmanı: *Prof. Dr. Yılmaz Çapan*
Hacettepe Üniversitesi

Üye: *Doç. Dr. Yeşim Aktaş*
Erciyes Üniversitesi

Üye: *Doç. Dr. Zeynep Şafak Teksin*
Gazi Üniversitesi

Üye: *Doç. Dr. Güneş Esendağlı*
Hacettepe Üniversitesi

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla onaylanmıştır.



Prof. Dr. Diclehan Orhan

Enstitü Müdürü

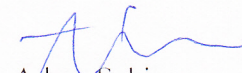
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kâğıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

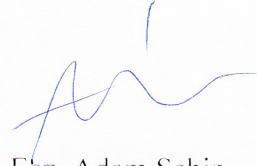
- **Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.** (Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, teziniz arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir)
- **Tezimin/Raporumun tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.** (Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir)
- **Tezimin 01.01.2022 tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.**
- **Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi**

06.02.2017


Adem Şahin

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Yılmaz Çapan danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.



Ecz. Adem Şahin

TEŞEKKÜR

Çalışmalarına yön veren ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen başta Danışman Hocam Prof. Dr. Yılmaz Çapan olmak üzere çalışmam sırasında ihtiyaç duyduğum her an yanımda olan Doç. Dr. Güneş Esendağlı, Doç. Dr. Yeşim Aktaş, Prof. Dr. Erem Bilensoy ve Dr. Fırat Yerlikaya'ya,

Beni Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Ailesi'ne kabul ederek doktora çalışmamı gerçekleştirmeme olanak tanıyan ve öğrettikleriyle kendimi geliştirmemde büyük katkıları olan başta Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Sema Çalış olmak üzere tüm Hocalarıma,

Birlikte çalıştığım ve tüm sorunların üstesinden beraber geldiğimiz başta Dr. Seçil Çaban Toktaş olmak üzere tüm çalışma arkadaşlarıma,

Hücre kültürü çalışmalarımı gerçekleştirmeme izin veren Hacettepe Üniversitesi Temel Onkoloji Anabilim Dalı'na ve bu deneyler sırasında desteğini esirgemeyen değerli arkadaşlarım Uzm. Bio. Didem Yöyen Ermiş ve Uzm. Bio. Utku Horzum'a,

İn vivo deneylerin gerçekleştirilmesine izin veren ARGEFAR'a ve bu ortamın sağlanmasında desteğini esirgemeyen Uzm. Ecz. Serhat Kozlu'ya,

Bu tezde yer alan deneylerin yapılmasına maddi destek sağlayan (Proje Numarası: 113S199) ve doktoram süresince beni doktora bursu (2211-A) ile destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'na,

Her zaman yanımda olan ve beni destekleyen Sevgili Aileme

ve yaşama sebebim, değerli Eşim Gül Güney Masalcı Şahin'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Sahin, A., Polimerik Nanopartiküllerin Partikül Büyüklüğüne Bağlı Olarak Hücre İçine Alım Kinetikleri ve Mekanizmaları, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Teknoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2017.

Bu çalışmada, PLGA ve kitosan nanopartiküllerinin partikül büyüklüğüne bağlı olarak hücre içine alımlarının araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla PLGA nanopartikülleri nanopresipitasyon, kitosan nanopartikülleri ise iyonik jelasyon metodu ile hazırlanmıştır. PLGA nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü hücre kültürü ortamında stabil bulunurken, kitosan nanopartiküllerinin agrege olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuç göz önünde bulundurularak nanopartiküllerin hücre içine alımına partikül büyüklüğünün etkisi PLGA nanopartikülleri kullanılarak, HEK293 hücreleriyle değerlendirilmiştir. Kitosan nanopartiküllerinin agregasyonunun, beyin endotel hücreleriyle kitosan nanopartiküllerinin etkileşimine etkisi ise beyne hedeflendirilmiş kitosan nanopartikülleri (Kitosan-PEG-Biyotin-CD71) kullanılarak hCMEC/D3 hücreleriyle değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, nanopresipitasyon yöntemiyle elde edilen PLGA nanopartiküllerinin partikül büyüklüğünde ufak görülebilecek bir değişikliğin nanopartiküllerin karakteristik özelliklerini, hücreye alım etkinliklerini ve in vivo ortamda davranışlarını değiştirebileceği gösterilmiştir. Ayrıca hCMEC/D3 hücrelerinin, Kitosan-PEG-Biyotin-CD71 nanopartiküllerini hücre içine alırken makropinositozu ve reseptör aracılı endositozu kullandığı belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Nanoteknoloji, PLGA, kitosan, hücre içine alım mekanizmaları, HEK293, hCMEC/D3

Bu çalışma TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir (Proje No: 113S199). Adem ŞAHİN doktora süresince TÜBİTAK tarafından doktora bursu (2211-A) ile desteklenmiştir.

ABSTRACT

Sahin, A., Cellular Uptake Kinetics and Mechanisms of Polymeric Nanoparticles Depending on Particle Size, Hacettepe University Institute of Health Sciences Department of Pharmaceutical Technology Doctor of Philosophy Thesis, Ankara, 2017. In this study, it was aimed to investigate cellular uptake of PLGA and chitosan nanoparticles depending on particle size. For this aim, PLGA and chitosan nanoparticles were prepared by nanoprecipitation and ionic gelation method, respectively. PLGA nanoparticles' average particle size was found stable in cell culture medium but chitosan nanoparticles were aggregated. Based on this results, effect of nanoparticles' size on intracellular delivery was evaluated using PLGA nanoparticles on HEK293 cells. On the other hand, effect of chitosan nanoparticles' aggregation on human brain endothelial cells (hCMEC/D3 cells) and chitosan nanoparticles' interactions was evaluated using brain-targeted chitosan nanoparticles (Chitosan-PEG-Biotin-CD71). In conclusion, our findings showed that a small variation in the average particle size of PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation can change the nanoparticles' characteristics, influence their efficacy for cellular delivery and in vivo behaviors. Also, hCMEC/D3 cells used macropinocytic and receptor-mediated endocytic pathways to uptake Chitosan-PEG-Biotin-CD71 nanoparticles.

Key Words: Nanotechnology, PLGA, chitosan, cellular uptake mechanisms, HEK293, hCMEC/D3

This research was supported by The Science and Technical Research Council of Turkey (TUBITAK) [grant numbers: 113S119]. Adem Sahin was supported by PhD Scholarship Program (2211-A) of TUBITAK.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN SAYFASI	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler	2
2.1.1. Poli(laktik ko-glikolik asit) Nanopartikülleri	3
2.1.2. Nanopresipitasyon Yöntemi	4
2.1.3. Kitosan Kullanılarak Hazırlanan Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler ve Özellikleri	12
2.2. Nanopartiküllerin İn Vitro Karakterizasyonu	17
2.2.1. Partikül Büyüklüğü Dağılımının Belirlenmesi	17
2.2.2. Nanopartiküllerden İlaç Salımının Belirlenmesi	18
2.3. Nanopartikül Sayısını Belirleme Stratejileri	20
2.3.1. Gravimetrik Metot ile Nanopartikül Sayısının Tahmin Edilmesi	22
2.4. Nanopartiküllerin Hücre Esaslı Değerlendirilmeleri	23
2.4.1. Hücrelerin Canlılıkları Üzerine Nanopartiküllerin Etkilerinin Değerlendirilmesi	23
2.4.2. Nanopartiküllerin Hücre İçine Alımının Belirlenmesi	24
2.4.3. Nanopartiküllerin Hücre İçine Alım Mekanizmaları	25
2.4.4. Hücre İçine Alım Mekanizmalarını Belirleme Yöntemleri	29
2.5. Nanopartiküllerin İşaretlenmesi ve Boya Seçimi	33

3. GEREÇ VE YÖNTEM	35
3.1. Kullanılan Cihazlar ve Yazılımlar	35
3.2. Kullanılan Madde ve Malzemeler	36
3.3. Analitik Metot Validasyonları	37
3.3.1. Dil için Miktar Tayin Yönteminin Geliştirilmesi ve Validasyonu	38
3.3.2. ICG için Miktar Tayin Yönteminin Geliştirilmesi ve Validasyonu	38
3.4. Nanopartiküllerin Hazırlanması	38
3.5. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	42
3.5.1. Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyeli Tayini	42
3.5.2. Nanopartiküllerin Morfolojisinin İncelenmesi	43
3.5.3. Enkapsülasyonun Değerlendirilmesi	43
3.5.4. İn Vitro Salım Deneyleri	43
3.5.5. Polimer Yoğunluğunun Belirlenmesi ve Nanopartikül Sayısının Tahmin Edilmesi	44
3.5.6. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrofotometre Analizi	44
3.6. İn Vitro Hücre Kültürü Çalışmaları	44
3.6.1. Nanopartiküllerin Sitotoksisitelerinin Belirlenmesi	45
3.6.2. Nanopartiküllerin Hücre İçine Alım Kinetiklerinin ve Mekanizmalarının Belirlenmesi	45
3.7. İn Vivo Görüntüleme Çalışmaları	47
3.8. İstatistiksel Analiz	47
4. BULGULAR	48
4.1. Analitik Metot Validasyonları	48
4.1.1. Dil için Miktar Tayin Yönteminin Geliştirilmesi ve Validasyonu	48
4.1.2. ICG için Miktar Tayin Yönteminin Geliştirilmesi ve Validasyonu	53
4.2. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	55
4.2.1. PLGA Nanopartiküllerinin Partikül Büyüklüğüne Etki Eden Parametrelerin Belirlenmesi	55

4.2.2. Kitosan Nanopartiküllerinin Partikül Büyüklüğüne Etki Eden Parametrelerin Belirlenmesi	58
4.3. PLGA ve Kitosan Nanopartiküllerinin Hücre Kültürü Ortamında Stabilitelerinin Değerlendirilmesi	61
4.4. Farklı Büyüklükte PLGA Nanopartiküllerinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu	62
4.5. Farklı Büyüklükte PLGA Nanopartiküllerinin Sitotoksitesinin, Hücre İçine Alım Kinetiğinin ve Mekanizmasının Belirlenmesi	66
4.6. Farklı Büyüklükte PLGA Nanopartiküllerinin İntraperitoneal Alıkonma Zamanının Belirlenmesi	71
4.7. Beyne Hedeflendirilmiş Kitosan Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu ve Beyin Endotel Hücrelerine Alım Mekanizmalarının İncelenmesi	72
5. TARTIŞMA	78
5.1. Nanopresipitasyon Metoduyla Farklı Partikül Büyüklüğüne Sahip PLGA Nanopartiküllerinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu	78
5.2. Kitosan Nanopartiküllerinin Partikül Büyüklüğüne Etki Eden Faktörlerin Belirlenmesi, Beyine Hedeflendirilmiş Kitosan Nanopartiküllerinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu	83
5.3. PLGA ₂₃₀ ve PLGA ₁₆₀ Nanopartiküllerinin Sitotoksitesilerinin, Hücre İçine Alımlarının ve İntraperitoneal Alıkonma Zamanlarının Değerlendirilmesi	86
5.4. Beyin Endotel Hücrelerine Hedeflendirilmiş Kitosan Nanopartiküllerinin Kan-Beyin Engeli Hücreleriyle Etkileşiminin İncelenmesi	88
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	90
7. KAYNAKLAR	92
8. EKLER	
EK-1: Etik Kurul Onay Belgesi	
EK-2: Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER ve KISALTMALAR

AFM	Atomik Kuvvet Mikroskobu
AML	Amilorid
ATP	Adenozin Trifosfat
AZD	Azid
BSA	Bovin Serum Albumin
CPZ	Klorpromazin
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
Dil	1,1'-dioktadesil-3,3',3'-tetrametilindokarbosiyanin perklorat
DLS	Dinamik Işık Saçılımı
DMA	Dimetilasetamit
DMEM	Dulbecco's Modifiye Eagle Ortamı
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DRAQ7	Derin Kırmızı Antrakinon 7
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
EE	Enkapsülasyon Etkinliği
EMA	Avrupa İlaç Ajansı
FBS	Fetal Bovin Serum
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FITC	Florosein İzosiyanat
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrofotometre
Hb	Hemoglobin
HbO₂	Oksihemoglobin
hCMEC/D3	İnsan Serebral Mikrovasküler Endotel Hücre Hattı
HEK293	İnsan Embriyonik Böbrek Hücre Hattı
ICG	İndosiyanin Yeşili
IND	İndometazin
LacCer	Laktozilseramid
MFI	Ortalama Floresan İntensite
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolyum Bromür
Mβ-CD	Metil-Beta-Siklodekstrin

PBS	Fosfat Tamponlu Tuz
PDI	Polidispersite İndeksi
PEG	Polietilen Glikol
PLA	Polilaktik Asit
PLGA	Poli(laktik-ko-glikolik asit)
PLGA₁₆₀	Ortalama Partikül Büyüklüğüne Yaklaşık Olarak 160 nm Olan PLGA Nanopartikül Formülasyonu
PLGA₂₃₀	Ortalama Partikül Büyüklüğüne Yaklaşık Olarak 230 nm Olan PLGA Nanopartikül Formülasyonu
PVA	Polivinil Alkol
RNA	Ribonükleik Asit
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskobu
TfRMab (-)	CD71 Antikoru Konjuge Edilmemiş Kitosan-PEG-Biyotin Nanopartikül Formülasyonu
TfRMab (+)	CD71 Antikoru Konjuge Edilmiş Kitosan-PEG-Biyotin Nanopartikül Formülasyonu
THF	Tetrahidrofuran
TPF	Tripolifosfat
UV	Morötesi

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Son on yıl içerisinde kanser alanında nanoteknoloji kullanılarak yayınlanan çalışmaların (Web of Science®) ve gerçekleştirilen klinik denemelerin (clinicaltrials.gov) toplam sayıları.	3
2.2. PLGA nanopartiküllerinin nanopresipitasyon yöntemi ile hazırlanmasının şematik gösterimi ve süreçteki değişkenler.	6
2.3. Nanopresipitasyon yöntemi ile nanopartiküllerin oluşum mekanizmasının şematik olarak gösterimi.	11
2.4. Nanopartiküllerin sayısının belirlenmesinde kullanılan metotların şematik olarak gösterimi.	20
2.5. Canlılık boyalarının hücreleri işaretleme şeklinin şematik olarak gösterimi.	24
2.6. Floresan mikroskopun (A) ve akım sitometri (B) cihazının çalışma prensiplerinin şematik gösterimi.	25
2.7. Endositoz mekanizmalarının sınıflandırılması.	26
2.8. Klatrin aracılı endositozun TEM görüntüsü (A-C) ve şematik gösterimi (D).	27
2.9. Kaveol aracılı endositozun şematik gösterimi ve TEM görüntüsü.	28
2.10. Makropinositozun şematik gösterimi.	29
2.11. Hücresel endositoz yolları ve bazı endositoz inhibitörlerinin (Amilorid, M β -CD, indometazin ve klorpromazin) şematik olarak gösterimi.	32
2.12. İn vivo görüntüleme çalışmaları için optik aralığın gösterimi.	34
3.1. PLGA nanopartiküllerinin nanopresipitasyon yöntemiyle hazırlanmasının şematik gösterimi.	39
3.2. Kitosan nanopartiküllerin oluşma mekanizmasının şematik gösterimi.	41
4.1. Dil'in DMSO içerisindeki çözeltilerinin UV absorbanları kullanılarak elde edilen kalibrasyon doğrusu.	48
4.2. Dil'in metanol : %0,5 SDS (9:1) çözeltilerinin UV absorbanları kullanılarak elde edilen kalibrasyon doğrusu.	51
4.3. ICG'in DMSO içerisindeki çözeltilerinin UV absorbanları kullanılarak elde edilen kalibrasyon doğrusu.	53

- 4.4. PLGA nanopartiküllerinin ortalama partikül büyüklüğüne anlamlı seviyede etki eden faktörlerin belirlenmesi amacıyla geliştirilmiş pareto grafiği. 56
- 4.5. PLGA nanopartiküllerinin ortalama partikül büyüklüğüne incelenen faktörlerin etkileri. 56
- 4.6. PLGA nanopartiküllerinin ortalama partikül büyüklüğüne polimer miktarı ve organik faz miktarının etkisinin kontur plot grafikleri ile gösterimi. 57
- 4.7. PLGA nanopartiküllerinin ortalama partikül büyüklüğüne polimer miktarı ve organik faz miktarının etkisinin yüzey cevap grafikleri ile gösterimi. 57
- 4.8. Kitosan nanopartiküllerinin ortalama partikül büyüklüğüne anlamlı seviyede etki eden faktörlerin belirlenmesi amacıyla geliştirilmiş pareto grafiği. 59
- 4.9. Kitosan nanopartiküllerinin ortalama partikül büyüklüğüne incelenen faktörlerin etkileri. 59
- 4.10. Kitosan nanopartiküllerinin ortalama partikül büyüklüğüne polimer miktarı ve NaCl miktarının etkisinin kontur plot grafikleri ile gösterimi. 60
- 4.11. Kitosan nanopartiküllerinin ortalama partikül büyüklüğüne polimer miktarı ve TPF miktarının etkisinin yüzey cevap grafikleri ile gösterimi. 60
- 4.12. Ultra saf su içerisinde dağıtılmış kitosan nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü dağılımları. 61
- 4.13. Tamamlanmış besiyeri içerisinde kitosan nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü dağılımı. 62
- 4.14. Değişen polimer/organik faz konsantrasyonuna karşı PLGA nanopartiküllerinin partikül büyüklüğündeki değişim. 63
- 4.15. PLGA₂₃₀ (Kırmızı) ve PLGA₁₆₀ (Yeşil) nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü dağılımları. 64
- 4.16. PLGA₂₃₀ ve PLGA₁₆₀ nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü ve salım özellikleri. A) Dil ile işaretlenmiş PLGA nanopartiküllerinin polimer konsantrasyonuna göre ortalama partikül büyüklüğünün değişimi, B) PLGA₂₃₀ ve PLGA₁₆₀ nanopartiküllerinden boya salımı, bu formülasyonlara ait AFM (C) ve TEM (D) görüntüleri. 65
- 4.17. PLGA₂₃₀ ve PLGA₁₆₀ nanopartiküllerinin aynı hücre sayısına aynı sayıda nanopartikül uygulandıktan sonra sitotoksitesi (A-B), Dil ile işaretli hücre yüzdesi (C), floresan işaretli hücrelerin ortalama intensitesindeki değişim (D), bu değişimin mikroskopi görüntüleri (E), aynı ağırlıkta uygulanan nanopartiküllerin 24 saat sonunda floresan mikroskop görüntüleri (F), 24 saat sonunda hücrelerin ortalama floresan intensitelerinin taşıdıkları boya miktarına göre

normalize edilmesiyle elde edilen nanopartiküllerin hücre içine alım etkinlikleri (G).	67
4.18. PLGA nanopartikülleri ile +4 (Kırmızı) ve +37 °C (Mavi)'de inkübe edilmiş HEK293 hücrelerinin ve nanopartikül eklenmemiş hücrelerin (Gri) akım sitometri histogramları (A) ve PLGA polimerinin, Dil'in, PLGA ₂₃₀ ve PLGA ₁₆₀ nanopartiküllerinin FTIR spektrumları (B).	68
4.19. PLGA ₂₃₀ (A-B) ve PLGA ₁₆₀ (C-D) nanopartiküllerinin hücre içine alımına inhibitörlerin etkisi ve formülasyonların boya aktarım yollarının şematik gösterimi.	69
4.20. ICG işaretli PLGA ₁₆₀ ve PLGA ₂₃₀ nanopartiküllerin salım grafikleri.	71
4.21. ICG çözeltisi, ICG yüklü PLGA ₂₃₀ ve PLGA ₁₆₀ nanopartiküllerinin intraperitoneal enjeksiyondan sonra alıkonma zamanları.	72
4.22. Endogro besiyerinin nanopartiküller eklenmeden önceki partikül büyüklüğü dağılımı.	73
4.23. TfRMAb (+) nanopartiküllerinin şematik gösterimi (A), TEM görüntüsü (B), DLS ile ultra saf su içerisinde elde edilen partikül büyüklüğü dağılımı (C) ve Endogro içerisinde 3 saat inkübe edilmiş nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü dağılımı (D).	74
4.24. Hücre kültürü çalışmalarının şematik olarak gösterimi (A), TfRMAb (-) ve TfRMAb (+) nanopartiküllerinin hCMEC/D3 hücreleri üzerine sitotoksitesi (24 saat) (A), 3 saat inkübasyondan sonra bu hücrelerin MFI değerleri (C) ve floresan mikroskop görüntüleri (D).	75
4.25. Endositoz inhibitörlerinin pozitif kontrol ajanlarının hücre içine alımına etkileri (A-C), TfRMAb (-) ve TfRMAb (+) nanopartiküllerinin hCMEC/D3 hücrelerine alımına endositoz inhibitörlerinin etkileri (D).	76
5.1. 20 ve 100 nm büyüklüğündeki polistren nanopartiküllerinin 5:1 oranda karışımının DLS ve AFM ile ölçümü sonucunda elde edilen sonuçlar.	80
5.2. Düşük iyonik şiddete sahip (A) ve yüksek iyonik şiddete sahip çözeltilerde (B) kitosan nanopartiküllerinin oluşumunun şematik olarak gösterimi.	84

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. Proses koşullarının nanopresipitasyon yöntemi ile hazırlanmış PLGA nanopartiküllerinin temel özellikleri üzerine etkisi.	7
2.2. Hidrofilik ilaçların kitosan-TPF nanopartiküllerine yüklendiği çalışmalardan bazıları.	14
2.3. Hidrofobik ilaçların kitosan-TPF nanopartiküllerine yüklendiği çalışmalardan bazıları.	15
2.4. Makromoleküllerin kitosan-TPF nanopartiküllerine yüklendiği çalışmalardan bazıları.	16
2.5. Nanopartiküllerin sayısının belirlenmesinde kullanılan bazı metotlar.	21
3.1. PLGA nanopartiküllerinin hazırlanmasında kullanılan deney tasarımı değişkenleri ve cevap değeri.	40
3.2. Kitosan nanopartiküllerinin hazırlanmasında kullanılan deney tasarımı değişkenleri ve cevap değeri.	42
4.1. Dil'in DMSO çözeltisinde miktar tayininin analitik metot validasyonuna ait doğruluk ve geri elde sonuçları.	49
4.2. Dil'in DMSO çözeltisinde miktar tayininin analitik metot validasyonuna ait tekrar edilebilirlik sonuçları.	50
4.3. Dil'in metanol : %0,5 SDS (9:1) çözeltisinde analitik metot validasyonuna ait doğruluk ve geri elde sonuçları.	51
4.4. Dil'in metanol : %0,5 SDS (9:1) çözeltisinde analitik metot validasyonuna ait tekrar edilebilirlik sonuçları.	52
4.5. ICG'in analitik metot validasyonuna ait doğruluk ve geri elde sonuçları.	54
4.6. ICG'in analitik metot validasyonuna ait tekrar edilebilirlik sonuçları.	54
4.7. PLGA nanopartiküllerinin ortalama partikül büyüklüğüne etki eden faktörlerin araştırılması amacıyla hazırlanan deney tasarımı ve cevap değerleri.	55
4.8. Kitosan nanopartiküllerinin ortalama partikül büyüklüğüne etki eden faktörlerin araştırılması amacıyla hazırlanan deney tasarımı ve cevap değerleri.	58
4.9. Dil işaretli PLGA ₂₃₀ ve PLGA ₁₆₀ nanopartiküllerinin karakteristik özellikleri.	63

4.10.	ICG işaretli PLGA ₂₃₀ ve PLGA ₁₆₀ nanopartiküllerinin karakteristik özellikleri.	71
4.11.	TfRMAB (-) ve TfRMAB (+) nanopartiküllerinin karakteristik özellikleri.	73



1. GİRİŞ

Nanoteknoloji yaşamımızın her parçasını değiştirme potansiyeli olan bir bilimdir ve günümüzde nanoteknoloji esaslı ürünler birçok alanda kullanılmaktadır. Bu alanlardan biri olan nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi üzerine yapılan çalışmalar son yıllarda hızlı bir artış göstermiştir. Bu hızlı artış, cevaplanması gereken soruları da beraberinde getirmiştir. Aranılan cevapların klinik çalışmalardan önce bulunabilmesi amacıyla preklinik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Preklinik çalışmalarda etkinliğin değerlendirilmesinde hücre kültürü çalışmaları sıklıkla kullanılmakta ve değerli bilgiler sağlamaktadır.

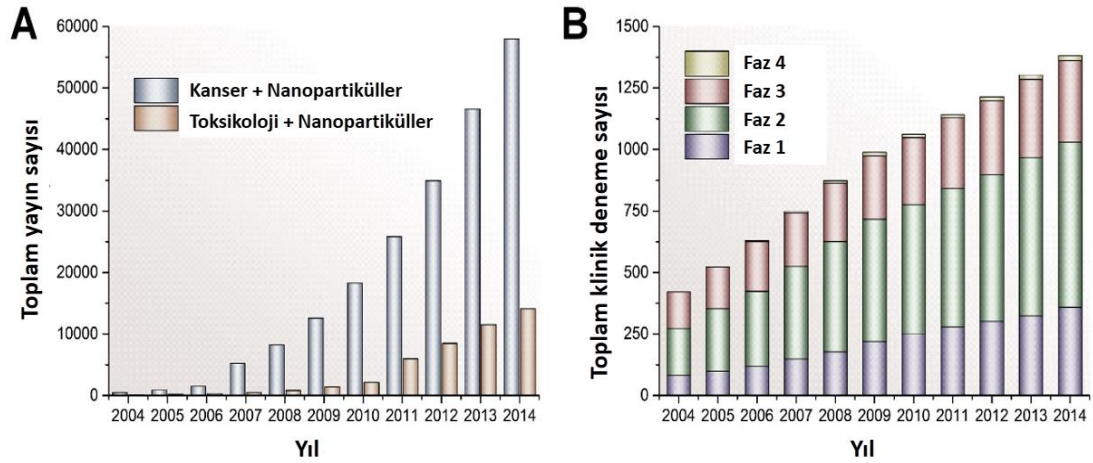
Bu çalışmalarda nanopartiküllerin hücre içine alımına nanopartikülün partikül büyüklüğünün, yüzey özelliklerinin ve şeklinin etkisi araştırılmıştır. Bununla birlikte nanopartiküllerin hücrelere alım mekanizmalarının belirlenmesi, nanopartiküllerin hücrelerle etkileşiminin incelenmesinde önemli bir yere sahiptir. Bu mekanizmalar temel olarak kaveol aracılı endositoz, klatrin aracılı endositoz ve makropinositoz olarak sınıflandırılmaktadır ve bu yolların farmakolojik inhibitörlerle inhibe edilmesi, nanopartiküllerin hücre içine alımının belirlenmesinde iyi tanımlanmış ve sıklıkla kullanılan bir yaklaşımdır.

PLGA ve kitosan polimerleri kullanılarak geliştirilen ilaç taşıyıcı sistemlerin özelliklerinin ve etkinliklerinin belirlenmesine yönelik birçok çalışma yapılmasına rağmen bu nanopartiküllerin klinik çalışmalara taşınması sınırlı kalmıştır. Avantajlarıyla dikkat çeken ve preklinik çalışmalarda etkinlikleri gösterilen bu iki polimer kullanılarak hazırlanan nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin hücrelerle etkileşimlerinin belirlenmesi devam edecek araştırmalar için yol gösterici olacaktır. Bu tez kapsamında öncelikle partikül büyüklüğü, yüzey özellikleri gibi farklı özelliklere sahip PLGA ve kitosan nanopartiküllerinin tasarımı, hazırlanması ve karakterizasyonu yapılmış elde edilen sonuçlar doğrultusunda hücre kültürü çalışmalarıyla farklı özelliklere sahip bu nanopartiküllerin hücrelerle etkileşimi incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler

Richard Feynman'ın Caltech'de 1959'da yaptığı 'Aşağıda daha çok yer var' başlıklı konuşmasıyla nanoteknoloji çalışmalarına olan ilginin artmasını sağlamıştır (1). Richard Feynman bu konuşmasında büyük boyutlara sahip makineler olarak işlem yapan daha küçük makineler için bileşenler üreten daha da küçük makinelerin bileşenlerini üretme kabiliyetine sahip makineleri öngörmüş ve bu işlemin atomik boyutlara ulaşana kadar sürebileceğini belirtmiştir. İlerleyen yıllarda nanoteknolojinin fizik, kimya, biyoloji gibi alanlardaki araştırmacılara farklı şeyler ifade etmesi bu alanın farklı yönlerde gelişmesine fırsat tanımıştır (2). Günümüzde sadece büyük nesnelerin minyatürünün üretilmesi ile sınırlı kalmayan nanoteknoloji kavramı farklı fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip nanomateryallerin hazırlanmasını da kapsamaktadır. 1970'li yılların başına kadar intravenöz yolla süspansiyonların kullanımı emboli riski nedeniyle imkânsız olarak görülmüştür. Bu düşünce nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi ile aşılabilmektedir (3). Günümüzde ise nanopartiküller kullanılarak istenilen dokuya ve hücreye ilaç taşınmasını mümkün kılan, birçok ilacın terapötik etkinliğini arttıran ve yan etkilerini azaltan süspansiyonlar geliştirilmiştir (3). Bu parçacıkların büyüklüğünün mikrometrelerden nanometrelere kayması önemli bir teknolojik ve tıbbi atılım olmuştur. Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin hala emekleme aşamasında olduğu yetmişlerin sonlarında kullanılan polimerlerin (poliakrilamid (4) veya polimetakrilat (5)) biyoparçalanabilir olmaması, geliştirilen sistemlerin kullanılmasına önemli bir sınırlama getirmiştir. Bu sınırlama, geliştirilen nanopartiküllerin sistemik uygulanmasının hayal olarak kalmasına sebep olmaktadır, devam eden yıllarda biyoyumlu ve biyoparçalanabilir polimer olan albumin (6), polisiyanoakrilat (7), polilaktik-ko-glikolik (8) daha sonralarda kitosan (9) ile hazırlanan nanopartiküller hızla geliştirilmiştir. Bu gelişmeler başta onkoloji olmak üzere birçok klinik çalışmanın yolunu açmıştır (10). Fakat çok sayıdaki araştırmaya ve yayına rağmen bu araştırmaların klinik çalışmaya dönüşme (Şekil 2.1) ve geliştirilen formülasyonların piyasaya sunulması oranı çok düşük seviyelerde kalmaktadır.



Şekil 2.1. Son on yıl içerisinde kanser alanında nanoteknoloji kullanılarak yayınlanan çalışmaların (Web of Science®) ve gerçekleştirilen klinik denemelerin (clinicaltrials.gov) toplam sayıları. (A) Kanser tedavisinde nanoteknolojinin kullanıldığı makalelerin sayısı büyük bir hızla artmaktadır. Son dört yılda nanoteknoloji kullanılarak yapılan kanser ve toksikoloji alanlarındaki yayın oranı ise sabit kalmıştır. (B) Son on yılda nanoteknoloji esaslı ilaçlarla kanser tedavisinde başlayan klinik denemelerinin sayısı sürekli bir artış göstermiştir. Fakat klinik çalışmaların toplam sayısı bu alanda yapılan yayınların %2'si seviyesinde kalmıştır (10).

Bu başarısızlığın arkasında birçok sebep yer almakla beraber, bu sebeplerden bazılarını; nanopartiküllere düşük oranda ilaç yüklenebilmesi (3), ani ilaç salımı (11) ve in vitro-in vivo preklinik çalışmaların yetersizliği (12) oluşturmaktadır. Bu sınırlamalar, uygulanan ilacın miktarının etkili olacağı doza ulaşması için kullanılması gereken taşıyıcının toksik seviyelere ulaşmasına, ilacın büyük bir bölümünün ilaç hedefe ulaşmadan salınmasına ve nanopartiküllerin klinik çalışmalardaki davranışlarının önceden öngörülememesine sebep olmaktadır.

2.1.1. Poli(laktik ko-glikolik asit) Nanopartikülleri

PLGA yıllardır başarıyla kullanılan biyoparçalanabilir polimerlerden biridir. Polimerin hidroliz sonucu laktik asit ve glikolik asit monomerlerine dönüşmesi ve bu iki monomerin de krebs siklusu ile kolaylıkla metabolize olabilmesi, bu polimerin ilaç taşınmasında toksisite görülmeden kullanılmasını mümkün kılmaktadır (13, 14). Bu özellikleri ile FDA ve EMA tarafından kullanımı onaylanmıştır (15). Ticari olarak farklı molekül ağırlıklarında ve farklı kopolimer bileşimine sahip formlarını bulmak mümkündür, bu özellikler degregasyonunun süresini belirlemektedir (16, 17). Son

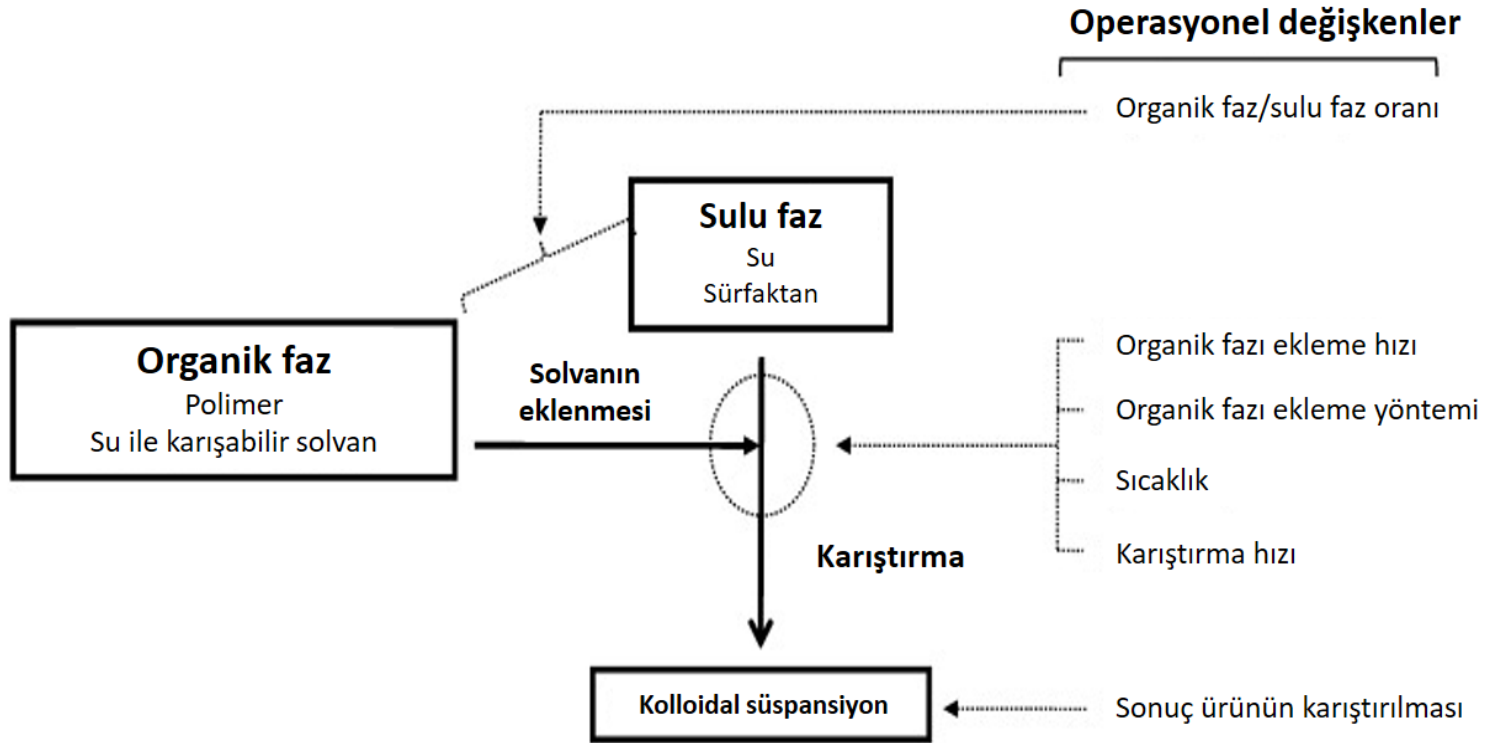
yıllarda PLGA nanopartiküllerinin hazırlanması ve kullanılması için birçok araştırma yapılmıştır. Bu çalışmalar, nanopartiküllerin hazırlanması, karakterizasyonu ve etkinliklerinin in vitro-in vivo testlerle değerlendirilmesini kapsamaktadır. PLGA nanopartiküllerin hazırlanması için farklı metotlar tanımlanmıştır fakat bu metotlardan hangisinin seçileceğine karar verilirken ilaç özellikleri, nanopartikül özellikleri, ölçek büyütmeye uygunluğu, çevreye etkisi, verimi gibi parametreler göz önünde bulundurulmak zorundadır (18). PLGA nanopartikülleri ile yapılan tüm araştırmalara rağmen piyasada bulunan PLGA esaslı ilaçlar sadece implantlar ve mikrokürelerle sınırlı kalmıştır. Nanopartiküllerin piyasaya çıkmasındaki en büyük sınırlamalardan ilki olan üretim metotları incelendiğinde bu metotların başlıca; tekli veya çift emülsiyon çözücü evaporasyon/ekstraksiyon, nanopresipitasyon, membran emülsifikasyonu ve mikro akışkan teknolojisi olduğu görülmektedir. Her yöntemin avantajları ve dezavantajları bulunmakla birlikte tüm bu metotların ortak özelliğini PLGA'in organik bir solvanda dağıtılması ve antisolvanla karıştırılması prensibine dayanmaktadır. Solvan ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen nanopartiküller toplanmaktadır (18-20).

2.1.2. Nanopresipitasyon Yöntemi

Günümüzde sık kullanılan PLGA nanopartikülü hazırlama yöntemlerinden biri olan nanopresipitasyon yöntemi, tez kapsamında kullanılan yöntem olduğundan, bu bölümde daha detaylı olarak açıklanmıştır. Bir yağ suyla karışabilen bir organik solvan içinde çözülüp daha büyük miktarda su ile karıştığında kendiliğinden emülsifiye olan stabil nanoemülsiyonlar oluşmaktadır. Bu “*Uzo Etkisi*” olarak adlandırılmakta ve hidrofobik özelliğe sahip, organik fazda çözünmüş maddenin suda nanoboyutta damlalar veya partiküller olarak dağılması olarak tanımlanmaktadır (21). Uzo emülsifikasyon prosesi, polimerik nanopartiküllere uygulandığı zaman ise bu nanoenkapsülasyon metodu “*nanopresipitasyon*” adını almaktadır. Pratikte hidrofobik olan polimer öncelikle suyla karışabilen bir çözücüde çözülür. Bu polimeri içeren faz, sulu fazla düşük enerji kullanan bir karıştırma düzeneği ile karıştırıldığında, hidrofobik polimer nanoboyutta agregatlar haline gelir. Fessi ve ark. bu metodu PLGA nanopartikülleri için kullandığında bu metodu çözücü değiştirme metodu olarak adlandırmışlardır (22). Bazı araştırmacılar solvanı diyalizle uzaklaştırmışlar ve

metodu solvan diyaliz metodu olarak adlandırmışlardır (23). Nanopresipitasyon yönteminde kullanılan solvan suyla karışabilir, evaporasyonla ve/veya ekstraksiyonla kolaylıkla uzaklaştırılabilir olmalıdır (19). Bu metotta genellikle kullanılan solvanlar aseton, asetonitril, dimetilasetamit, dimetilformamid, dimetil sülfoksit, poli etilen glikol ve tetrahidrofurandır (18, 24). Bunlar arasında aseton en çok tercih edilen solvan olmakla birlikte aseton-etanol gibi ikili solvan karışımları da bu metotta kullanılabilmektedir (25-27).

Şekil 2.2’de PLGA nanopartiküllerinin nanopresipitasyon yöntemi ile hazırlanmasının şematik prosedürü ve süreçteki değişkenler özetlemektedir (28). Nanopresipitasyon yöntemiyle elde edilen PLGA nanopartiküllerine ait koşulların nanopartiküllerin karakteristiğine etkisi yapılan çalışmalardan örnekler de Tablo 2.1’de verilmiştir.



Şekil 2.2. PLGA nanopartiküllerinin nanopresipitasyon yöntemi ile hazırlanmasının şematik gösterimi ve süreçteki değişkenler (28).

Tablo 2.1. Proses koşullarının nanopresipitasyon yöntemi ile hazırlanmış PLGA nanopartiküllerinin temel özellikleri üzerine etkisi. (Sah ve ark.'nın yayınında (18) yer alan liste esas alınarak, güncellemeler ve eklemelerle tablo oluşturulmuştur.)

Polimer Özelliği	Kullanılan Solvan	Organik Fazda Bulunan Polimer Konsantrasyonu (%)	Yüklenen Etkin Madde	Etkin Madde Miktarının Polimer Miktarına Oranı	Partikül Büyüklüğü (nm)	Enkapsülasyon Etkinliği (%)	Kaynak
PLGA 50 : 50 (0.2 dL/g)	Aseton	2.5	Anastrazol	5	118~180	37~62	(29)
RGP d	Aseton	4	Atorvastatin	12	76~172	3~51	(30)
PLGA50 : 50 (45–75 kDa)	Aseton-Etanol	2	Azelaik asit	50	252	72	(25)
RGP d 50155	PEG 400	0.3~1.3	BSA	12.5~50	95~394	35'e kadar	(31)
PLGA	Aseton	1.7	Kelidonin	20	123	83	(32)
PLA (42 kDa)	Aseton-Etanol	0.6	Alüminyum klorür	3.33	115	57	(33)
PLGA75 : 25 (10 kDa)	Aseton	1	Koenzim-Q	10	100	88	(34)
PLGA50 : 50 (7–17 kDa)	Tetrahidrofuran	0.2	Kurkumin	100	79	92	(35)

PLGA	Aseton	1.25	Dosetaksel	10	139	75	(36)
RG502H	Aseton	0.375	Dosetaksel	0,1-1	157~172	17~23	(37)
PLA-TPGS (25.3 kDa)	Aseton-Etanol	1.01	Dosetaksel	-	122	80	(38)
RG502 (12 kDa)	Aseton	1.5	Kannabinoid	6~20	291~315	71~90	(39)
PLGA75 : 25 (75–120 kDa)	Propilen karbonat	2	Estradiol benzoat	1,5	70~250	67	(40)
PLGA-PEG (34 kDa)	Aseton	0.36	Flurbiprofen	1,67	123	81	(41)
PLGA50 : 50 (40–75 kDa)	Aseton-Etanol	0.88	Loperamid	50	174	41	(42)
RG 502H	Aseton	0.375	Melatonin	1, 3, 5	100	6~44	(43)
PLGA	Aseton	1.67	Kumarin	20	117	88	(44)
PLGA50 : 50 (40.1 kDa)	Dimetilasetamit	2	Norfloksasin	100	323	15	(45)
PLGA	Aseton	1	Paklitaksel	2	87	2	(46)

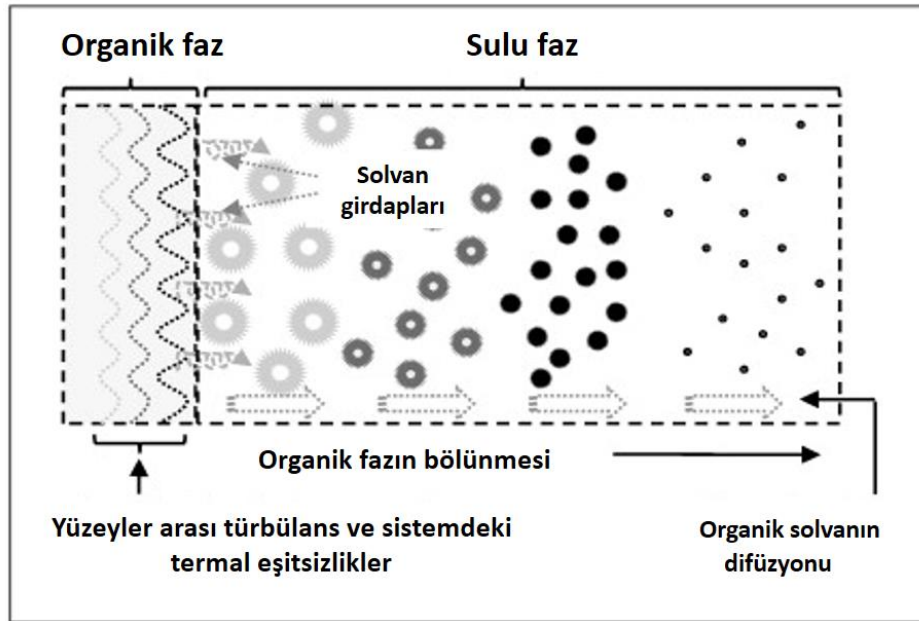
PLGA (60 kDa)	Aseton	0.24	Ropivakain	0,25, 0,5	163	4	(47)
PLGA50 : 50 (41 kDa)	Aseton	1.25	Testosteron	40	202	27	(48)
RG502H (12 kDa)	Aseton	2	Tramadol	10	141	74	(49)
PLGA50 : 50 (50–75 kDa)	Aseton	0.5	Ksanton	1,5	96	43	(50)
PLGA 50:50	Aseton	1	Lopinavir	60	142.1	93.03	(51)
PLGA	Aseton	1	Paklitaksel	8	164-183	74.7-80.1	(52)
PLGA 85:15 50–75 kDa	Kloroform	2,5-5	Stavudin	10-20	84.34- 238.2	35.96- 8.43	(53)

Yapılan çalışmalarda PLGA nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinliğinin birçok parametreden etkilendiği gözlemlenmiştir. Bu parametreler arasında solvan ve PLGA'ye ait özellikler, etkin madde/PLGA oranı, sürfaktan, polimerik fazın su fazına oranı gibi parametreler dikkat çekmektedir. Vurgulanması gereken bir diğer nokta polimerik fazın antisolvan içerisinde disperse olurken gerçekleştirilen karıştırmanın da PLGA nanopartiküllerinin kalitesi için önem taşımasıdır. Solvanın yer değiştirmesi sırasında koşulların sabit olmaması, tekdüze nanopartikül elde etmeyi zorlaştırmaktadır. Bu nedenle çeşitli karıştırma mekanizmaları geliştirilmiştir. Bu mekanizmalar; tüm organik fazın sulu faza bir kerede dökülmesi, organik fazın sulu faza kontrollü bir şekilde damla damla ilave edilmesi, su fazın organik faza tek bir seferde ilave edilmesi, su fazının kontrollü bir şekilde damla damla organik fazla ilave edilmesi ve polimerik fazın diyalizle su fazında disperse edilmesi olarak sayılabilir (18, 28).

Nanopresipitasyon yönteminin en önemli avantajlarından birisi de üretim sürecinde yüksek enerjili, yüksek basınçlı karıştırma sistemlerine ihtiyaç duyulmamasıdır. Bu metotta PLGA nanopartikülleri organik fazın sulu faz içerisinde spontan bir şekilde difüze olması ile oluşmaktadır (Şekil 2.3). Bu prosedür diğer PLGA nanopartikülü üretim yöntemlerinden daha küçük nanopartiküller elde edilmesini sağlamaktadır. Bir diğer avantajı ise nanopresipitasyon yönteminin daha az toksik, çevreye zarar vermeyen organik solvanlarla nanopartiküllerin üretimine olanak tanımasıdır. Fakat nanopartikül hazırlarken bu metodun en büyük zorluğunu ise hazırlanan nanopartiküllerin sadece belirli bir dar aralıkta oluşuyor olması oluşturmaktadır. Bu aralık "**Uzo Bölgesi**" olarak adlandırılmaktadır.

Nanopresipitasyon süresince solvan geçişi ile antisolvan içerisinde PLGA nanopartikülleri oluşmakta ve bu sebeple solvanın geçiş yapabileceği büyük miktarda su fazının bulunmasını gerektirmektedir. Yüksek polimer miktarının kullanılması ise parçacıkların birleşme eğilimini doğurmakta ve agregasyona neden olmaktadır. Organik solvanın tam olarak uzaklaştırılamaması ise santrifüj sırasında nanopartiküllerin agregasyonuna neden olmaktadır (54-56). Bu yöntemle nanopartiküllerin oluşum mekanizması incelendiğinde mekanik mekanizma organik

faz damlacığının sulu faz içinde dağılması ve parçalanması ile partiküllerin oluştuğunu göstermektedir (Şekil 2.3). Böylece Quintanar ve ark. ve Galindo ve ark. nanopartiküllerin, solvan ve antisolvan arasındaki yüzey gerilimini hesaba katarak, oluşan yüzeyler arası türbülans veya Gibbs–Marangoni etkisi ile oluştuğunu ileri sürmüştür. Yüksek yüzey gerilime sahip sulu faz, çevrelediği düşük yüzey gerilimine sahip organik fazı çeker. Bu yüzey gerilim farkı yüzeyler arası türbülansa sebep olarak iki yüzey arasındaki ara yüzeyde devamlı girdapların oluşmasına sebep olur. Sonuç olarak bu şiddetli dağılma solvanın tekrar tekrar nanopartiküler boyuta ulaşana kadar daha küçük parçacıklara bölünmesini sağlar. Daha sonra solvan düşük yüzey gerilimi olan bölgelere akar ve polimer mikron altı partiküller olarak çöker (28).



Şekil 2.3. Nanopresipitasyon yöntemi ile nanopartiküllerin oluşum mekanizmasının şematik olarak gösterimi (28).

Nanopresipitasyon Yönteminde Partikül Büyüklüğüne Etki Eden Faktörlerin Belirlenmesi

Nanopartiküllerin oluşma mekanizması göz önüne alındığında organik fazın sulu faza oranı, organik fazın eklenme metodu, karıştırma sistemi, sıcaklık ve çözücüyü uzaklaştırmak için kullanılan nihai karıştırma yöntemi gibi birçok operasyon değişkeni nanopresipitasyon metodu için tanımlanmıştır (28). Bununla birlikte

organik fazın eklenme hızı ve organik faz/sulu faz oranına ait çelişen sonuçlar deney şartlarına ve kullanılan malzemelere göre bildirilmiştir (Tablo 2.1). Bu problemin üstesinden gelebilmek için süreçte yer alan değişkenlerin partikül büyüklüğü, ilaç yüklenme miktarı gibi hedef özelliklere etkisi tarafımızdan araştırılmış ve bildiri olarak yayınlanmıştır (57). Bu çalışmada Plackett–Burman deney tasarımı kullanılarak cevap değerler üzerine etkileri değerlendirilen kritik proses parametreleri incelenmiştir. Bu parametrelerin, tez çalışmasına temel oluşturabilecek olan partikül büyüklüğüne etkileri incelendiğinde ortalama partikül büyüklüğünün 140 ve 228,1 nm’ler arasında değiştiği gözlemlenmiştir. Partikül büyüklüğünr etki eden parametreler sürfaktan tipi, homojenizasyon hızı, PLGA miktarı ve PLGA terminal grubu olarak belirlenmiştir. Bu çalışma sonucunda artan homojenizasyon hızının daha küçük damlacıkların oluşturması sonucu partikül büyüklüğünü azalttığı, artan PLGA konsantrasyonunun organik faz viskozitesini artmasına bağlı olarak daha büyük parçacıkların oluşmasına sebep olmuş olabileceği, kullanılan polimerin terminal grubunun, kullanılan yüzey etkin madde tipinin partikül büyüklüğünü etkileyebileceği gibi ön fikir oluşturabilecek sonuçlara varılmıştır (57).

2.1.3. Kitosan Kullanılarak Hazırlanan Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler ve Özellikleri

Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesinde sıklıkla kullanılan polikasyonik bir polimer olan kitosan, deniz kabuklularının dış iskeletlerinden elde edilen kitinin alkali ortamdaki deasetilasyonu ile elde edilmektedir (58-60). Kitosan nanopartikülleri emülsiyon damla birleşmesi (61), emülsiyon solvan difüzyonu (62), ters miselleşme (63) ve elektrostatik kompleksleşme (64) gibi birçok metotla hazırlanabilmesine rağmen elektrostatik kompleksleşme metodu tekdüze ve tekrarlanabilir özelliğe sahip nanopartiküller elde edilmesine olanak tanınmasıyla ön plana çıkan yöntem olmuştur. Bu metodun organik solvan içermemesi ve toksik olmayan çapraz bağlayıcıların kullanılabilmesi metoda ait diğer avantajlar olarak dikkat çekmektedir (60).

Kitosan, amin gruplarının protonlanması ile asidik ortamda çözünür özelliğe kavuşmaktadır. Bu pozitif yük, nanopartiküllerin anyonlar kullanılarak iyonotropik

jelasyonla kitosan nanopartikülleri oluşturulmasına imkân tanımaktadır. Bununla birlikte kitosanın sitrat, sülfat veya TPF gibi anyonik maddelerle kompleksleştirilmesi süreci spesifik olarak “*iyonik jelasyon*” adını almaktadır (65). İyonik jelasyon metodu kitosan nanopartiküllerinin elde edilmesinde bugüne kadar kullanılan en kolay yollardan biridir. Bu başarıyı tek adımda nanopartikülün elde edilmesi ve kullanılan ortamın uygun olması sağlamaktadır. Bu metodla biyomedikal kullanımlar için ideal nanometrik boyutta, dar bir partikül büyüklüğü dağılımına sahip ve küresel şekilde nanopartiküller elde edilmesini sağlamaktadır. Kitosan-TPF nanopartikülleri hem küçük hem de büyük molekül ağırlığına sahip ilaçların nanopartiküllerin içine yüklenmesinde kullanılmıştır (Tablo 2.2-4). Hidrofobik ilaçların kitosan nanopartiküllerin yüklenmesi ise bazı zorluklara sahip olup yükleme etkinlikleri suda çözünen ilaçlara göre düşük seviyelerde kalmaktadır. Kitosanın çözünmüş olduğu sulu ortamda yüklenecek maddenin çözünememesi ve homojen bir dağılım sergilememesi başlıca engeli oluşturmaktadır. Bu sınırlamanın üstesinden gelebilmek için farklı stratejiler geliştirilmiştir. Bu metotlar temel olarak emülsiyon oluşturmaya veya maddenin siklodekstrinler gibi ajanlarla kompleksleştirilmesine dayanmaktadır. Geliştirilen basit metotlardan biri de etkin maddenin etanol veya metanol gibi suyla karışabilir bir organik solvanla karıştırılarak dağıtılması ve TPF ile kompleksleştirilmesine dayanmaktadır. Bu metotla yüksek yükleme etkinliği başarıyla elde edilebilmiştir (60).

Kitosan-TPF nanopartiküllerinin karakteristik özelliklerine etki eden parametreler incelendiğinde, kitosan konsantrasyonunun, kitosan-TPF oranının, kitosanın molekül ağırlığının, çözünme ortamının pH'sının ve iyonik şiddetinin etkili parametreler olabileceği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (66). Yapılan son çalışmalarda nanopartiküller hazırlanırken kullanılan solvanın iyonik şiddetinin nanopartiküllerin partikül büyüklüğünü ve sıklığını etkilediği belirlenmiştir. Bu çalışmalarda tuzlu su ile normal suya kıyasla daha küçük nanopartiküller elde edilebildiği belirlenmiştir. Bununla birlikte tuzlu ortamın kitosan-TPF oranının değişimine bağlı olan partikül büyüklüğünde değişimi azalttığı gösterilmiştir. Dahası kitosan-TPF nanopartiküllerinin sıklığı artmıştır (66).

Tablo 2.2. Hidrofilik ilaçların kitosan-TPF nanopartiküllerine yüklendiği çalışmalardan bazıları (60).

Molekül	Uygulama	Etkin maddenin yüklenme yöntemi	Kaynak
5-Flurourasil	Kanser tedavisi	Kitosan çözeltisine eklenmiştir.	(67)
5-Flurourasil	Kanser tedavisi	TPF çözeltisine eklenmiştir.	(68)
Alendronat	Kemik erimesi	Kitosan çözeltisine eklenmiştir.	(69)
Askorbik asit	Antioksidan	Kitosan çözeltisine eklenmiştir.	(70)
Bromokriptin	Parkinson hastalığı	Kitosan çözeltisine eklenmiştir.	(71)
Karteolol	Glokom	Kitosan çözeltisine eklenmiştir.	(72)
Kateşin	Antibakteriyel	Kitosan çözeltisine eklenmiştir.	(73)
Kateşin	Antioksidan	TPF çözeltisine eklenmiştir.	(74)
Sefazolin	Antioksidan	TPF çözeltisine eklenmiştir.	(75)
Klorheksidin	Antibakteriyel	Kitosan çözeltisine eklenmiştir.	(76)
Klorokin	Sıtma	Nanopartikül süspansiyonuna eklenmiştir.	(77)
Donepezil	Alzheimer hastalığı	Kitosan çözeltisine eklenmiştir.	(78)
Dopamin	Parkinson hastalığı	Nanopartikül süspansiyonuna eklenmiştir.	(79)
Doksorubisin	Kanser tedavisi	Kitosan çözeltisine eklenmiştir.	(80)
Doksorubisin	Kanser tedavisi	Dektranla önceden kompleksleştirilmiştir.	(81)
Gemsitabin	Kanser tedavisi	Kitosan çözeltisine eklenmiştir.	(82)
Metotreksat	Kanser tedavisi	TPF çözeltisine eklenmiştir.	(83)
Vankomisin	Antibakteriyel	Kitosan çözeltisine eklenmiştir.	(84)

Tablo 2.3. Hidrofobik ilaçların kitosan-TPF nanopartiküllerine yüklendiği çalışmalardan bazıları (60).

Molekül	Uygulama	Etkin maddenin yüklenme yöntemi	Kaynak
6-Merkaptopürin	Kanser tedavisi	DMF/Tween 80® ile çözündürülmüş, kitosan çözeltisine eklenmiştir.	(85)
Amlodipin	Hipertansiyon tedavisi	TPF çözeltisinde çözündürülmüştür.	(86)
Askorbil palmitat	Antioksidan	Tween 60®/soya yağı ile emülsiyon oluşturulmuştur.	(87)
Kaptopril	Hipertansiyon tedavisi	TPF çözeltisinde çözündürülmüştür.	(86)
Karum koptikum yağı	Antioksidan	Tween 80®/CH ₂ Cl ₂ ile emülsiyon oluşturulmuştur.	(88)
Kurkumin	Sıtma	Etanolde çözülmüş ve nanopartikülle karıştırılmıştır.	(89)
Kurkumin	Kanser tedavisi	Etanolde çözülmüş ve kitosan çözeltisine eklenmiştir.	(90)
Kurkumin	Kanser tedavisi	Etanolde çözülmüş ve kitosan çözeltisine eklenmiştir.	(91)
Dosetaksel	Kanser tedavisi	Metanolde çözülmüş ve TPF çözeltisine eklenmiştir.	(91)
Ojenol	Antioksidan	Tween 60® ile emülsiyon oluşturulmuştur	(92, 93)
Ferulik asit	Antibakteriyel	DMSO'da çözülmüş ve kitosan çözeltisine eklenmiştir.	(94)
İndometazin	Model ilaç	DMSO'da çözülmüş ve kitosan çözeltisine eklenmiştir.	(95)
İtrakonazol	Akciğer enfeksiyonu	Siklodektrin kompleksleri oluşturulmuştur.	(96)
Lutein	Antioksidan	Metanolde çözülmüş ve nanopartiküllerle karıştırılmıştır.	(97)
Probukol	Stenoz	Tween 80®/CH ₂ Cl ₂ ile emülsiyon oluşturulmuştur.	(98)
Saponin	Kanser tedavisi	Etanolde çözülmüş ve kitosan çözeltisine eklenmiştir.	(99)
Saponin	Antifungal	Etanolde çözülmüş ve kitosan çözeltisine eklenmiştir.	(100)
Sunitinib	Kanser tedavisi	DMSO'da çözülmüş ve kitosan çözeltisine eklenmiştir.	(101)

Tablo 2.4. Makromoleküllerin kitosan-TPF nanopartiküllerine yüklendiği çalışmalardan bazıları (60)

Makromolekül	Uygulama	Etkin maddenin yüklenme yöntemi	Kaynak
Agomir plazmit	Kemik erimesi	TPF çözeltisine eklenmiştir.	(102)
ALT-2 antijen	Lenfatik filaryaz	Nanopartikül süspansiyonuna eklenmiştir.	(103)
BSA	Model sistem	Kitosan çözeltisine eklenmiştir.	(104)
BSA	Model sistem	Kitosan çözeltisine eklenmiştir.	(105)
BSA	Model sistem	Kitosan çözeltisine eklenmiştir.	(106)
Kriptdin-2	Antibakteriyel	Kitosan çözeltisine eklenmiştir.	(107)
Siklosporin A	Göz hastalıkları	Kitosan çözeltisine eklenmiştir.	(108)
Estradiol-2	Alzheimer hastalığı	Kitosan çözeltisine eklenmiştir.	(109)
İnsülin	Model sistem	TPF çözeltisine eklenmiştir.	(110)
İnsülin	Diyabet	TPF çözeltisine eklenmiştir.	(111)
İnsülin	Diyabet	TPF çözeltisine eklenmiştir.	(112)
Interlökin-12	Kanser tedavisi	Kitosan çözeltisine eklenmiştir.	(113)
pEGFP-N1	Model sistem	Nanopartikül süspansiyonuna eklenmiştir.	(114)
pVP28	Aşı	Nanopartikül süspansiyonuna eklenmiştir.	(114)
RGVP	Aşı	TPF çözeltisine eklenmiştir.	(115)
siRNA	Kanser tedavisi	TPF çözeltisine eklenmiştir.	(116)
TGFB1	Kanser tedavisi	TPF çözeltisine eklenmiştir.	(117)
Z-DEVD-FMK	Apopotik hücre ölümünün önlenmesi	Kitosan çözeltisine eklenmiştir.	(118)

2.2. Nanopartiküllerin İn Vitro Karakterizasyonu

Bu bölümde tez kapsamında araştırılan temel parametre olan partikül büyüklüğü ve in vitro- iv vitro değerlendirmelerde kritik öneme sahip olan ilaç salımı hakkındaki genel bilgilere yer verilmiştir.

2.2.1. Partikül Büyüklüğü Dağılımının Belirlenmesi

Nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklüğü bu partiküllerin hücrelerle etkileşiminin, biyodağılımının ve hedef dokuya ulaşmasının değerlendirilmesinde etkili olan en kritik parametrelerden biri olarak dikkat çekmektedir (119). Partikül büyüklüğünün belirlenmesinde genel olarak kullanılan metot dinamik ışık saçılımı (DLS) metodudur. DLS metodu nanopartiküllerin süspansiyon içerisindeki Brownian hareketini ve bunun hızla ilişkisini ölçmektedir (12). Bu metotla elde edilen partikül büyüklüğü ortalama partikül büyüklüğü olarak rapor edilir ve partikül büyüklüğü dağılımı polidispersite indeksi (PDI) olarak rapor edilir. Birçok literatürde PDI'nın 0,1 ve 0,25 arasında olması, formülasyonun dar bir partikül büyüklüğü dağılımı sergilediğini göstermektedir. PDI değerinin 0,5'in üstünde olması ise geniş bir partikül dağılımı olduğunu belirtilmektedir (12). DLS metodu basit ve hızlı bir partikül büyüklüğü sonucu vermesine karşın bu metodun bazı sınırlamaları bulunmaktadır. Bunlardan biri çoklu partikül büyüklüğün sahip parçacıkların örneğin 20 ve 100 nm çapındaki nanopartiküllerin ölçümünün yapılırken küçük nanopartiküllerin sinyalinin kaybolmasıdır (120-122).

Nanopartiküllerin partikül büyüklüğünün belirlenmesinde daha doğru sonuçların alınması için mikroskopik yöntemler de tercih edilmektedir (122). Mikroskoplar ile elde edilen görüntüler nanopartiküllerin şeklinin belirlenmesine de olanak sağlamaktadır. Fakat mikroskopik yöntemlerin değişen özel örnek hazırlama süreçleri, örneğin özelliklerini değiştirmekte ve özellikle kuruma prosesinde görülen agregasyonlar gibi birçok probleme neden olmaktadır. Ayrıca sınırlı hacmi ve görüntü alanı nedeniyle partikül büyüklüğü dağılımının belirlenmesi zorlaşmaktadır (122, 123). Bu metotların dışında nanopartikül izleme analizi ve disk santrifüjü gibi partikül büyüklüğü belirleme yöntemleri bulunmaktadır (12). Tez kapsamında gerçekleştirilen ölçümler en sık kullanılan metotlar olan DLS ve mikroskop yöntemleriyle

gerçekleştirildiği için bu iki metot detaylı olarak açıklanmıştır. Tüm bu teknikler farklı fiziksel prensiplere ve numune hazırlama metotlarına dayandığı için sonuçlar kullanılan metoda göre değişiklik göstermektedir. Örneğin elektron mikroskobu ve DLS yöntemiyle yapılan, homojen olduğu bilinen sistemlere ait ölçümler farklı sonuçlar gösterebilmektedir. Yapılan son çalışmalardan birinde DLS ölçümleriyle karşılaştıran TEM ve SEM analizleri 70 nm büyüklüğündeki gümüş ve 15 nm büyüklüğündeki altın nanopartiküllerin partikül büyüklüğü dağılım aralığını 40–124 nm ve 11–52 nm olarak ölçmüştür (122). Bunlarla birlikte ölçümler numunelerin içinde bulundukları ortamlar da göz önüne alınarak değerlendirilebilir. Örneğin sıvı içerisinde ölçümü yapılan nanopartiküllerin büyüklüğü hidrasyon tabakası nedeniyle genelde daha büyük olabileceği veya ölçüm yapılan sıvı içerisinde nanopartiküllerin agregasyonuna bağlı olarak daha büyük partikül büyüklüğü ölçülebileceği göz önünde bulundurulmalıdır (124). Bu amaçla DLS ile partikül büyüklüğü ölçümünden önce nanopartiküller sonikasyonla disperse edilse de yüksek enerji uygulanan bu metot tekrar agregasyon oluşumunu önlememektedir. Murdock ve ark. yaptıkları çalışmada ise çeşitli inorganik ve organik nanopartiküllerin partikül büyüklüğü ölçümleri su ve hücre kültürü ortamında gerçekleştirilmiştir. Birçok durumda özellikle serum içeren hücre kültürü ortamında partikül büyüklüğü yüzeye adsorbe olan proteinler sebebiyle büyüdüğünü göstermektedir (124). Bununla birlikte DLS metodu nanopartiküllerin küresel olduğunu öngörmektedir bu nedenle partiküllerin şekli mikroskop analizleri ile doğrulanmalıdır (125). Tüm bu faktörler DLS ölçümlerinin görüntülü analizlerle desteklenmesi gereksinimine sebep olmaktadır.

2.2.2. Nanopartiküllerden İlaç Salımının Belirlenmesi

Nanopartiküllerin ilaç taşınmasında kullanılmasından beri nanopartiküllerin ilacı salım hızı değerlendirilmektedir. Bu salım hızı nanopartiküllerin istenilen dokuya ulaşmaya kadar nanopartiküllerinin ilacı salıp salmadıklarının, nanopartiküler taşıyıcı sistemlerin bir diğer kullanıma amacı olan kontrollü salım sistemlerinin amacına ulaşıp ulaşmadığının belirlenmesinde kritik öneme sahiptir (19). Polimerik nanopartiküllerden ilacın salınması için 3 mekanizma tanımlanmıştır. Bunlar:

- yüzeye tutunmuş ilacın salımı,
- polimer matrisinden difüzyon,

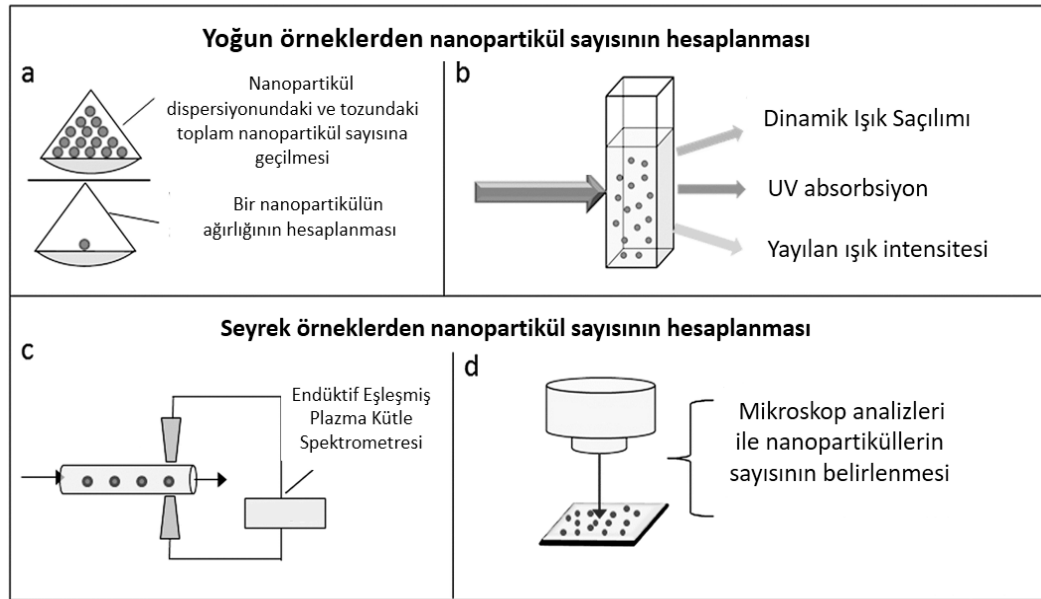
- polimerik erozyonla ilaç salımı olarak sınıflandırılabilir (12, 126).

Matris tipi nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerde başlangıçta ani bir salım varsa bu genellikle yüzeye adsorbe olmuş veya zayıfça bağlanmış ilacın varlığını göstermektedir (127). Yine ilacın difüzyonu matriksin parçalanmasında çok daha hızlı gerçekleşiyorsa devam eden temel salım mekanizması olarak matris difüzyonu görülmektedir. Daha yavaş ilaç salımı ise difüzyon ve polimer erozyonunun birlikte görüldüğü durumlarda izlenmektedir (126, 127). Salım hızının belirlenmesi için de üç yöntem literatürde sıkça kullanılmaktadır. Bunlar (12): Örnek alma ve ayırma, diyaliz membrandan difüzyon ve in situ analitik teknik olarak sınıflandırılabilir.

Örnek alma ve ayırma metodunda nanopartikülden ayrılan serbest ilaç santrifüjle nanopartikülden uzaklaştırıldıktan sonra miktarının belirlenmesi esasına dayanmaktadır. Örnek alındıktan sonra ortama taze salım ortamı eklenmekte nanopartiküller resüspande edilmekte ve bir sonraki salım noktasına kadar inkübe edilmektedirler. Bu yöntem çabuk salıma sahip nanopartiküller için ek olarak ayrıca bir ayırma basamağı gerektirdiğinden uygun değildir. Ayrıca uygulanan santrifüj gücü nanopartiküller üzerinde değişikliğe sebep olmakta bu da salım özelliğini değiştirebilmektedir. Diyaliz membran difüzyon metodunda ise membran içerisinde yerleştirilen nanopartikül süspansiyonundan salım ortamına devamlı difüzyonuna bağlı bir metottur. Örnek alma ve ayırma metoduna göre ayırma işlemi gerektirmemesi, hızlı ve kolay örnek alımı gibi avantajlara sahiptir. Diğer yandan diyaliz membran difüzyon bariyeri veya adsorbsiyon yüzeyiyle ilaç salımını azaltmaktadır. Bu nedenle bu metot membranın serbest ilaca etkisini görebilmek amacıyla ilaç çözeltisi ile yapılacak bir kontrol deneyiyle karşılaştırılmalıdır. Ayrıca bu metodun büyük hacimlerin uygulanmasına olanak tanınması sink koşulun sağlanmasını kolaylaştırmaktadır. Büyük hacim sink koşulu sağlanmasını kolaylaştırırken, ilaç miktar tayin limitinin altına düşülmesine sebep olabilmektedir. İn situ analitik teknik ise matris tipi nanopartiküllerde genelde kullanılmamakta özellikle nanokristallerle çalışmak için uygun görülmektedir (128). Bu teknik çözünen ilacın dolaylı olarak belirlenmesine dayanmaktadır.

2.3. Nanopartikül Sayısını Belirleme Stratejileri

Geçtiğimiz yıllarda nanoteknoloji alanında görülen büyük gelişmelere rağmen nanopartiküllerin sayısının tahmin edilmesindeki zorluklar hala devam etmektedir. Nanopartiküllerin ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılmasında ağırlık, total iyon gibi farklı konsantrasyon ifadeleri ile çalışılmakta fakat farklı büyüklükteki nanopartiküllerin molar konsantrasyona etkisi göz ardı edilmektedir (129). Son yıllarda nanopartiküllerin sayısını esas alan çalışmalar yapılmaya başlanmıştır ve her geçen gün artmaktadır (130, 131). Nanopartiküllerin sayısını veya molar konsantrasyonunu tayin etmeye yönelik çalışmalarda bununla beraber hız kazanmıştır(129). Günümüzde kullanılmakta ve geliştirilmekte olan metotlar başlıca (129); gravimetrik ölçüm, ışık absorpsiyonu, türbidimetre ve dinamik ışık saçılımı ile ölçümdür. Mikroskopi yöntemleri de kullanılmakla birlikte başlıca metotlar Tablo 2.5’de özetlenmiş, bazılarına ait şematik görüntüler ise Şekil 2.4’de verilmiştir.



Şekil 2.4. Nanopartiküllerin sayısının belirlenmesinde kullanılan metotların şematik olarak gösterimi (129).

Tablo 2.5. Nanopartiküllerin sayısının belirlenmesinde kullanılan bazı metotlar. (Shang ve ark.'nın derlemesinden (129) modifiye edilerek hazırlanmıştır.)

Yöntem	Uygulanabildiği Nanopartikül Tipi	Partikül Büyüklüğü Sınırlaması (çap)	Önkoşulları
Gravimetrik Ölçüm	Yoğunluğu ve şekli bilinebilen nanopartiküller	Sınırlama bulunmamaktadır.	Tek bir nanopartikülün ortalama ağırlığı ve çapı belirlenebilmelidir.
UV spektroskopisi	Güçlü UV ekstinksiyonu olmalı (gümüş, altın)	Sınırlama bulunmamaktadır.	Nanopartiküllerin ekstinksiyon katsayısı doğru bir şekilde belirlenebilmelidir.
Türbidimetri	Belirlenecek dalga boyunda absorpsiyonu olmamalı	70 nm'nin üzerindeki partiküller	Nanopartiküllerin saçılma katsayısı doğru bir şekilde belirlenebilmelidir.
Dinamik Işık Saçılımı	Floresan dalga boylarında absorpsiyonu olmamalı	Genel olarak mikronun altındaki partiküller	Standart nanopartikül çözeltisi ile kalibrasyon gerektirmektedir.
Endüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektrometresi	Metal nanopartiküller	Partiküle bağlı olarak değişmekle birlikte altın nanopartikülleri için 15 nm üzeri, Gümüş nanopartikülleri için 20 nm üzeri	Standart nanopartikül çözeltisi ile kalibrasyon gerektirmektedir.
TEM	TEM ile görüntülene bilen nanopartiküller	Alınabilen görüntü kalitesine ve partiküle göre sınırlamalara sahiptir.	TEM gridlerinde sayımının yapılabilmesi için homojen bir dağılım olması gerekmektedir.

Bu metotlar içerisinde tez çalışmasında kullanılacak yöntem olan gravimetrik metot daha detaylı olarak açıklanacaktır.

2.3.1. Gravimetrik Metot ile Nanopartikül Sayısının Tahmin Edilmesi

Bu metot nanopartiküllerin yoğunluğunun ve partikül büyüklüğünün bilinmesiyle bir partikülün ortalama ağırlığının hesaplanarak toplam partikül sayısının tahmin edilmesi esasına dayanmaktadır. Bu amaçla öncelikle bir partikül ağırlığının hesaplanması gerekmektedir. Küresel olan polimerik nanopartiküller için kürenin ağırlığının hesaplanması mantığı göz önünde bulundurularak formül 2.1. kullanılabilmektedir (129):

$$m_{\text{partikül}} = \frac{\pi d^3}{6} \rho \quad (2.1.)$$

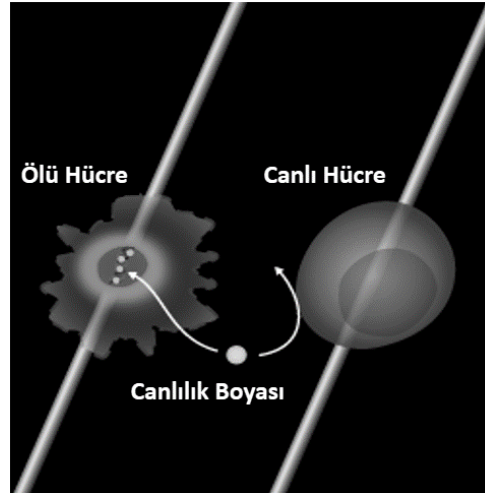
Belirtilen bu formülde ρ değeri polimerin yoğunluğunu (g/nm^3) d değeri polimerik nanopartikülün çapını (nm) belirtmektedir. Bu formülden yola çıkarak hesaplanan tek nanopartikülün ortalama ağırlığı bilindiği takdirde bilinen miktarda kaç nanopartikül olduğu kolaylıkla tahmin edilebilmektedir. Bu metodun sınırlamaları arasında nanopartiküllerin yoğunluğunun, çapının ve şekillerin bilinmesi gereksinimi yer almaktadır. Nanopartiküllerin şeklinin belirlenmesinde birçok mikroskopi yöntemi başarıyla kullanılmasına rağmen nanopartiküllerin ortalama çapının belirlenmesinde mikroskopi yöntemleri birçok sınırlamaya sebep olmaktadır. Bu nedenle nanopartiküllerin polidispersiteleri de göz önüne alındığında konsantrasyonunun hesaplanmasında ortalama partikül çapının hesaplanması daha uygun görülmektedir. Bununla birlikte tek nanopartikülün ağırlığının hesaplanmasında nanopartikülün yüzeyinde bulunan maddelerin tamamen yok edilmesi söz konusu olamayacağından bu nanopartikülün net ağırlığının hesaplanmasında hataya sebep olabilmektedir. Bu zorluklar da göz önüne alındığında bu metot kolay arındırılabilen, şekli bilinen ve dar partikül dağılımına sahip olan nanopartiküllerin sayısının hesaplanmasında uygun görülmektedir. Belirtilen bu hataların yok edilebilmesi geliştirilmekte olan analitik tayin yöntemlerinin ve daha geniş örneklem kümelerine uygulanabilecek mikroskopi yöntemlerinin geliştirilmesi ile mümkün olabilecektir (129).

2.4. Nanopartiküllerin Hücre Esaslı Değerlendirilmeleri

Nanopartiküllerin fiziksel ve kimyasal özellikleri karakterize edildikten sonra biyolojik etkileri in vivo uygulamalardan önce hücre kültürü modelleri ile test edilmektedir. Bu bölümde bu amaçla kullanılan yöntemlerin tez ile ilgili olan kısımları hakkında genel bilgi verilecektir.

2.4.1. Hücrelerin Canlılıkları Üzerine Nanopartiküllerin Etkilerinin Değerlendirilmesi

Özellikle antikanser özelliğe sahip ilaçların yüklendiği nanopartiküler ilaç formülasyonları geliştirildikten sonra geliştirilen formülasyonun hedef kanser hücrelerine sitotoksitesinin değerlendirilmesi önem taşımaktadır. Bununla birlikte nanopartiküllerin hücre içine alımının araştırılmasından önce nanopartiküllerin hücreler üzerine sitotoksik etkisi araştırılmalıdır. Bu amaçla kullanılan hücrelerin canlılığının değerlendirilmesi yöntemleri iki başlık altında derlenebilir. Bu metotlardan ilki metabolik aktivitenin belirlenmesidir: MTT gibi testler, mitokondriyal aktivitenin tetrazolyum tuzlarını renkli formazan kristallerine dönüştürmesini temel almaktadır (132). Biyoluminensans yönteminde ise canlı hücrelerin lusiferazı kullanarak ATP üretmesi esas alınmaktadır. Lusiferazın lusiferine enerji bağımlı olarak dönüşmesi, ATP harcanması ve dolayısıyla hücrelerin canlılığıyla orantılıdır (132). Diğer canlılık belirleme yöntemi ise hücre membran bütünlüğünün değerlendirilmesi olarak belirtilmektedir. Bu deneyler canlı hücrelerin membranını geçemeyen boyalarla ölü hücrelerin işaretlenmesi esasına dayanmaktadır (Şekil 2.5.). Bu amaçla genelde propidyum iyodür, tripan mavisi gibi boyalar kullanılmaktadır (133).

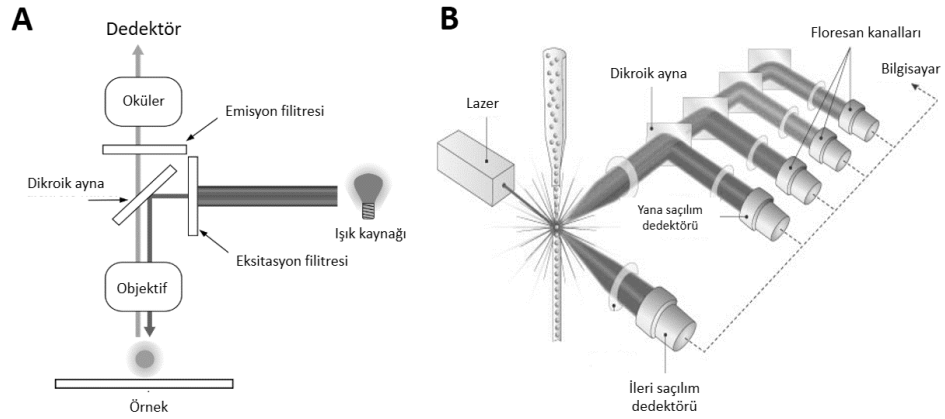


Şekil 2.5. Canlılık boyalarının hücreleri işaretleme şeklinin şematik olarak gösterimi (134).

2.4.2. Nanopartiküllerin Hücre İçine Alımının Belirlenmesi

Konfokal, floresan mikroskop analizleri ve bunlarla birlikte akım sitometri nanopartiküllerin hücre içine alımının belirlenmesinde sıklıkla kullanılan yöntemlerdir (135-137). Bu metotlar nanopartiküllerin uygun bir floresan belirteç ile işaretlenmesini gerektirmektedir. Bu işaretleme floresan özelliğe sahip maddelerin fiziksel olarak yüklenmesi veya kovalent olarak bağlanması ile gerçekleştirilebilmektedir. Birçok avantajına rağmen özellikle lipofilik boyaların bu amaçla kullanılması, nanopartikülün lipofilik maddelerle teması sonucu boyanın bu maddelere sızmasına sebep olabilmektedir (138). Konjugasyonla işaretlenmenin sağlanması durumunda ise konjugasyonun stabilitesinin hücre kültürü ortamında test edilmesi gerekmektedir. Eğer hem ilacın hem taşıyıcı sistemin takip edilmesi amaçlanıyorsa hem ilacın hem taşıyıcı sistemin ayrı ayrı işaretlenmesi en doğru değerlendirmeyi sağlayabilmektedir (12, 139). Konfokal analiz nanopartiküllerin hücre içi lokasyonunu belirlemede faydalı bir yöntem olsa da mikroskopi yöntemleriyle sadece belirli bir sayıda hücre değerlendirebileceği için nanopartiküllerin hücrelerdeki yoğunluğunun kantitatif analizi akım sitometri ile yapılmalıdır. Akım sitometri hücre süspansiyonunun lazer ışığına maruz kaldığı noktadan geçişi sonrasında floresan özellik gösteren hücre sayısı ve floresan intensitesinin ölçülmesine dayanmaktadır (140). Akım sitometri sonuçlarında hücreye adsorbe olan nanopartiküllerin de değerlendirilmesinin sebep olduğu intensitenin de sağlıklı bir şekilde yorumlanabilmesi için ya hücrelerin

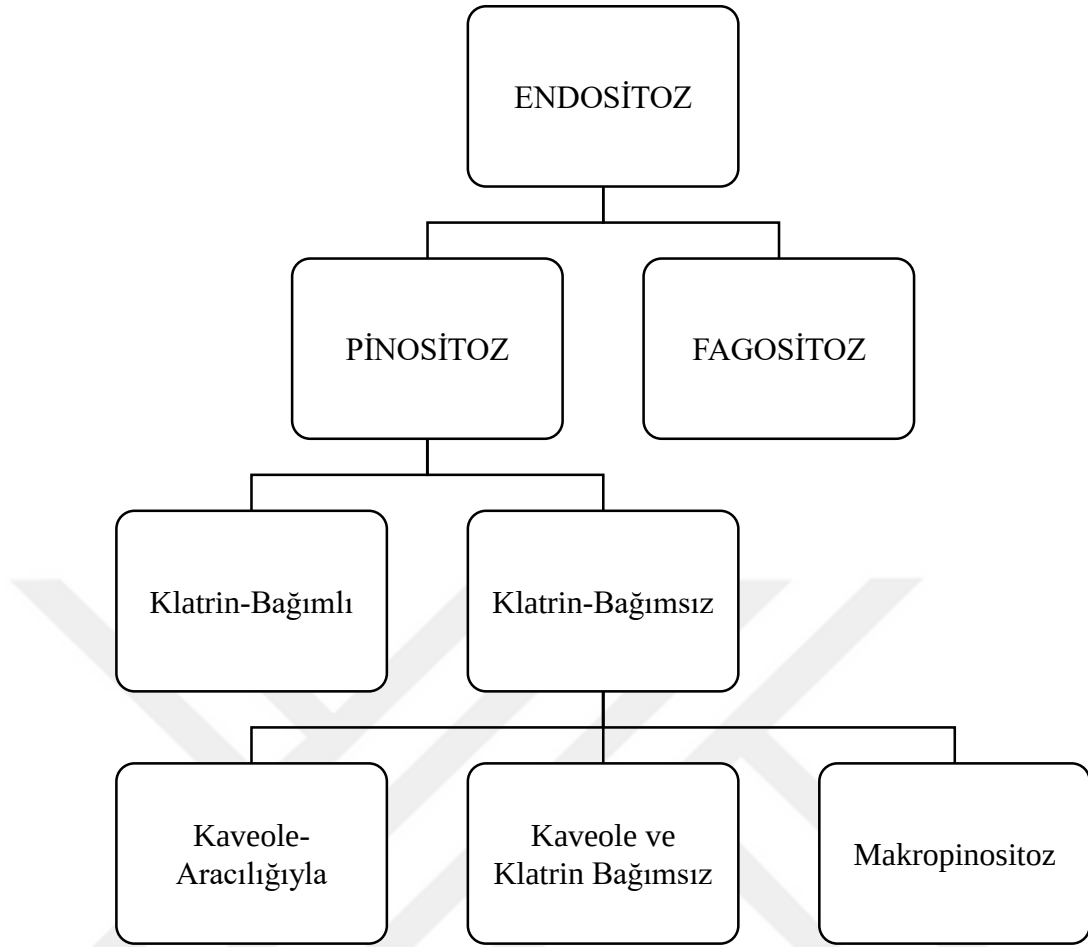
soldurulması ya da hücre içine alım çalışmalarının mikroskopi görüntüleri ile desteklenmesi gerekmektedir (141, 142).



Şekil 2.6. Floresan mikroskopun (A) ve akım sitometri (B) cihazının çalışma prensiplerinin şematik gösterimi (143, 144).

2.4.3. Nanopartiküllerin Hücre İçine Alım Mekanizmaları

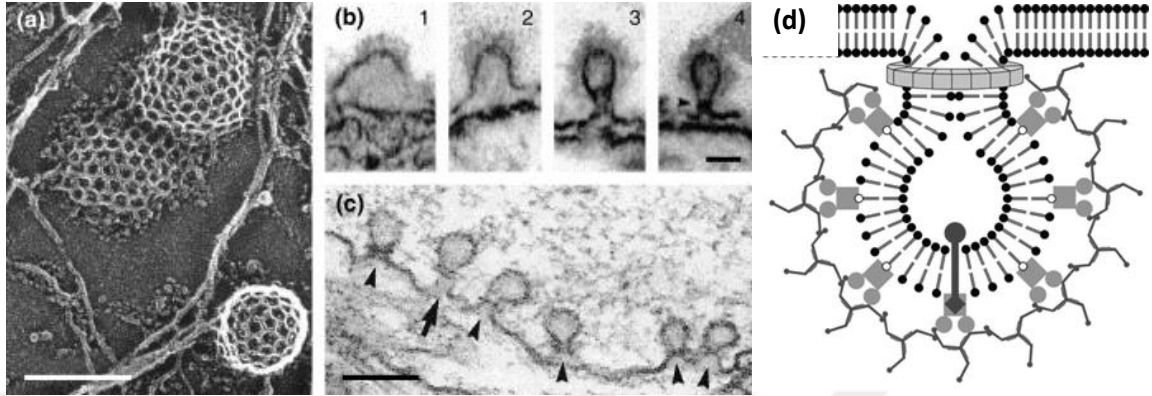
Nanopartiküller hücre dışı ortamda oldukları zaman hücre zarı ile etkileşirler bu etkileşim nanopartiküllerin hücre içine girişine yol açar ve bu süreç “**endositoz**” olarak adlandırılır. Endositoz mekanizmalarının sınıflandırılması Şekil 2.7’de verilmiştir (145).



Şekil 2.7. Endositoz mekanizmalarının sınıflandırılması (145).

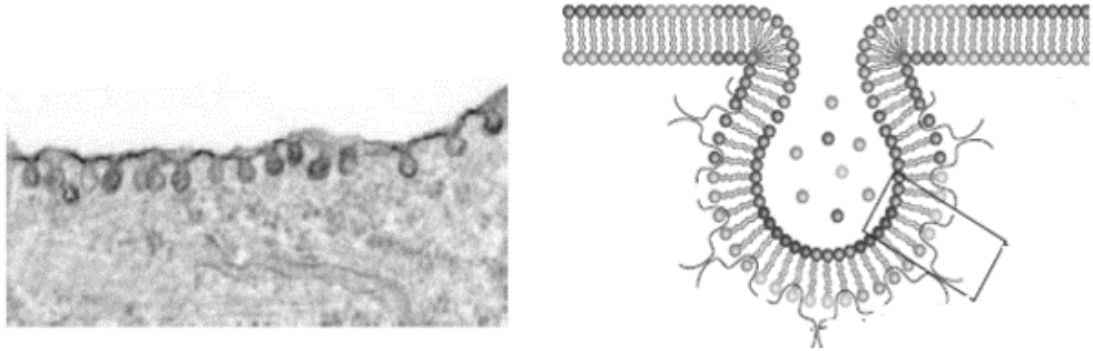
Klatrin (reseptör) aracılı endositoz (Şekil 2.8), bütün memeli hücrelerinde bulunur ve hücre içine alımda en iyi bilinen alım yollarından biridir. Klatrin bağımlı endositoz düşük yoğunluklu lipoprotein ve transferrin gibi reseptörlerle kolesterol, transferrin gibi besinlerin hücre içine alımından sorumludur. Klatrin bağımlı endositoz ligandıyla birleşmiş olan reseptörün kaplanmış bir çukura alınarak hücre içine taşınmasıyla oluşur. Kaplanmış çukur AP180 ve AP-2 gibi proteinlerin toplanmasını gerektiren klatrin-1 adı verilen sitozolik proteinin polimerizasyona bağlı olarak oluşur. Toplanmış vezikül küçük bir GTPaz olan, dinamin ile plazma membrandan ayrılır. Sitoplazmaya girdikten sonra klatrin kılıf yok olmakta ve hızlıca taşıyıcı erken endozomla birleşmektedir. Erken endozomlar endositozun ana istasyonlarında bulunmaktadır. Asidik iç ortamda (pH 5.9–6.0) reseptör ve ligand serbest bırakılır. Reseptör yüzeye geri dönerek plazma membranı ile birleşebilir. Eğer madde erken

endozomdan kaçamazsa multiveziküler cisimler aracılığıyla geç endozomlara taşınır ve lizozomlar tarafından sindirilir (146).



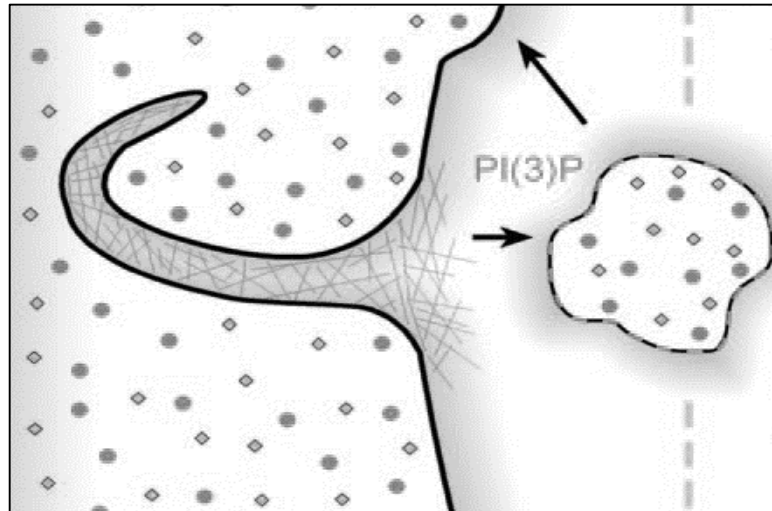
Şekil 2.8. Klatrin aracılı endositozun TEM görüntüsü (A-C) ve şematik gösterimi (D) (147, 148).

Kaveola-aracılı endositoz (Şekil 2.9); kaveol kas, endotel, fibroblast ve adipositlerde yüksek miktarda bulunur fakat lökosit ve nöronlarda bulunmamaktadır. Kolesterolce zengin plazma membran bölgeleri, endositozu toplama ve sinyal dönüştürme özellikleri olan lipidlerin alt dalıdır. Kaveolanın biyogenezi için önemli olan kaveolin-1'in, saç iğnesi şeklindeki membran proteininin varlığı kaveolanın tanımlayıcı karakteristiğidir. Bu protein sayesinde, kaveola hallmark şişesi şeklindeki yapıya (60-80nm) bürünür ve kaveola yüzeyine bağlanmış olan kargoyu yutabilir. Çoğu hücrede bulunan kaveolin-1'e ek olarak kaveolin-2 ve kaveolin-3 gibi başka izoformlar da vardır. Kaveola endositik mekanizmasının diğer bileşenleri, membran kavisliliğini arttıran kavin, vezikül-bağlı membran proteini gibi vezikülün ayrılmasını sağlayan dinamin, ve sonraki vezikül kaynaşmasına aracılık eden snaptozom-ilişkili proteindir. Bu yolak, in vitroda klatrin aracılı endositoz ile karşılaştırıldığında daha yavaştır; ancak önemli olan özelliği lizozoma alınmıyor olmasıdır. Dolayısıyla virüs ve bakteri gibi birçok patojen lizozomal degregasyonu önlemek için bu yoldan faydalanmaktadır. Aynı sebepten dolayı bu yolağın protein ve DNA'nın hücreye taşınmasında faydalı olabileceği düşünülmektedir (145).



Şekil 2.9. Kaveol aracılı endositozun şematik gösterimi ve TEM görüntüsü (149).

Makropinositoz (Şekil 2.10), büyüme faktörleri tarafından tirozinkinaz reseptörünün geçiş aktivasyonu ile başlatılan klatrin- kaveola- ve dinamin-bağımsız endositozun özel bir durumudur. Reseptör aktivasyonu, aktin sitoskeletonunda değişikliğe yol açan ve membran pürüzlerinin oluşumunu tetikleyen bir sinyal kaskadı oluşturur. Bu membran dalgaları (ruffle), hücre dışı ortamdaki besin ve etraftaki akışkanı yutmak için çıkıntı yapar. Hücre membranı ile kaynaşabilir ya da aynı zamanda makropinozom olarak adlandırılan hücre içi vakuol oluşturabilirler. Makropinozomlar (0.5-10µm) daha büyüktür ve pinositoz boyunca oluşan diğer veziküllerden ayrıdır. Bakteri, apoptotik cisimcikler, nekrotik hücreler ve virüsler gibi pek çok parçacık büyüme faktörlerinden bağımsız olarak dalgalanma (ruffling) davranışını azaltabilir ve makropinozomları içine alabilir. Prensipde fagositoz yapamayan hücreler de sub-mikron ve daha büyük parçacıkları hücre içine alabilir. Çoğu durumda bu yolak, belirli olmayan bir giriş noktası vazifesi görebilir ve nanopartiküllerin hücre içine alımında rol aldığı gösterilmiştir (145).



Şekil 2.10. Makropinositozun şematik gösterimi (150).

Klatrin ve kaveol bağımsız endositoz: Yaklaşık 90 nm veziküllerle klatrin ve kaveola bağımsız endositoz yapan hücrelerde, hücre dışı sıvı, büyüme hormonları gibi farklı maddelerin hücre içine taşındığı gösterilmiştir. Bu kaveol ve klatrin bağımsız yollar; Arf6-bağımlı, filotillin-bağımlı, Cdc-42-bağımlı ve RhoA-bağımlı olarak sınıflandırılmışlardır (145, 146).

2.4.4. Hücre İçine Alım Mekanizmalarını Belirleme Yöntemleri

Hücre içine alım miktarları belirlenen nanopartiküllerin, hücreye hangi endositoz yolağını kullanarak alındığının belirlenmesi amacıyla genellikle iki yöntem kullanılmaktadır. Bunlardan biri endositoz inhibitörlerinin kullanılması (farmakolojik inhibitörler), diğeri ise yapılan genetik mutasyonla endositoz yolları inhibe edilmiş veya bu alım yollarının aşırı aktive olduğu hücrelerin kullanılmasıdır (145). Bu tez kapsamında farmakolojik inhibitörler kullanılacağı için bu metot ve kullanılan inhibitörler hakkında genel bilgiler verilecektir.

Farmakolojik İnhibitörler

Belirli endositoz mekanizmalarının önlenmesi, endositozu açıklamada güçlü ve net bir yöntemdir. Bu yöntemlerden biri endositoz yolağına spesifik kimyasal ajanlar kullanılarak istenen endositoz yolağına inhibe edilmesidir. Bu inhibitörler farmakolojik inhibitörler başlığı altında değerlendirilmektedir. Nanopartiküllerin alım

yolakları çalışılırken, floresan olarak işaretlenmiş nanopartiküllerin inkübasyonundan önce, hücrelere spesifik alım yollarına ait endositoz inhibitörleri uygulanır. Klatrin aracılı endositoz için klorpromazin, kaveol aracılı endositoz için ise filipin ve M β -CD gibi inhibitörlere örnekler çoğaltılabilir (Şekil 2.11). İnhibitörler belirli bir süre hücrelerle inkübe edildikten sonra, nanopartiküller hücrelerle aynı ortama eklenir ve nanopartiküllerin hücre içine alımındaki azalma belirlenerek inhibisyon değerlendirilir (151).

Klatrin Aracılı Endositoz İnhibitörleri

Klatrinin fonksiyonun inhibe edilmesi için birçok yaklaşım geliştirilmiştir. Tez kapsamında kullandığımız klorpromazin gibi diğer katyonik amfifilik ilaçlarının kullanımının klatrin aracılı endositozu engellediği birçok çalışmada gösterilmiştir. Klorpromazini diğer inhibitörlerden ayıran özelliği, kaveol aracılı endositozu inhibe etmeden klatrin aracılı endositozu inhibe etmesidir. Klorpromazinin spesifik özelliği, kaveol aracılı endositozla hücre içine alınan kolera toksininin hücre içini alımını inhibe etmemesiyle gösterilmiştir. Klorpromazin kaplanmış çukurcuklardaki klatrinle etkileşerek membranın yüzey bütünlüğünü kaybetmesine sebep olmaktadır (152-154).

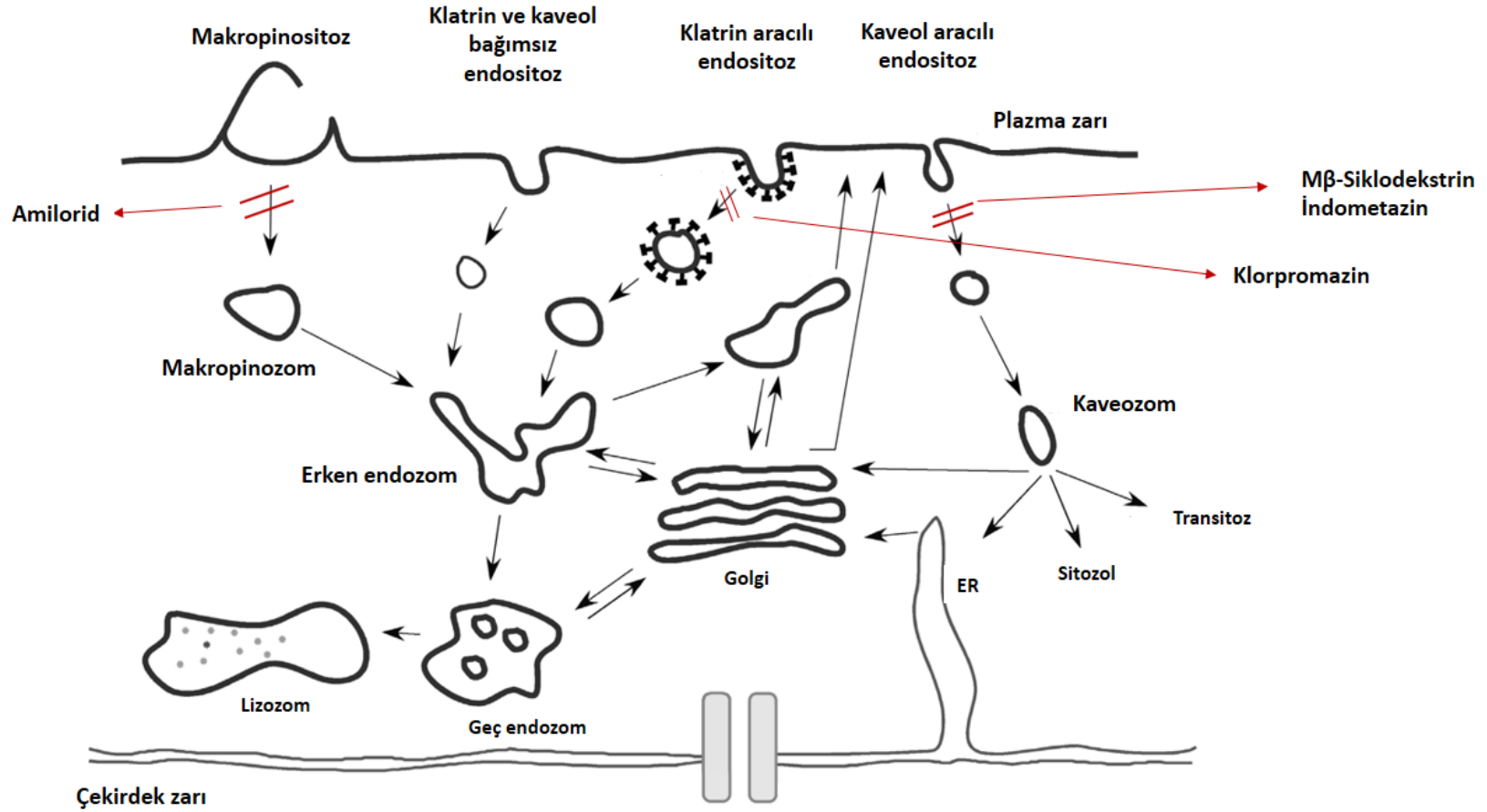
Kaveol Aracılı Endositoz İnhibitörleri

Kaveol aracılı endositozun inhibisyonu amacıyla kullanılan birçok inhibitör bulunmakla birlikte bu inhibitörlerden biri olan indometazinin inhibitör özelliği Smart ve ark. tarafından bulunmuş ve araşidonat birikimi ile bu inhibisyonu sağlandığını öne sürülmüştür. Bu inhibisyonun, kaveollerin alımını indometazinle 30 dakikalık inkübasyondan sonra durdurulduğu rhesus maymunu böbrek hücreleri üzerinde gösterilmiştir ve devam eden çalışmalarda bu inhibitör kullanılmıştır (155, 156). Başka bir kaveol aracılı endositoz inhibitörü olan M β -CD kolesterolle çözünür inklüzyon kompleksi oluşturmakta ve plazma membranında kolesterolün azalmasına sebep olmaktadır. Azalan kolesterolün kaveol aracılı endositozu inhibe ettiği gösterilmiştir (157).

Makropinositoz İnhibitörleri

Makropinositozun amilorid ve amilorid türevleriyle inhibe edildiği gösterilmiş bunun mekanizması tam olarak belirlenmemiştir. Na^+/H^+ değiştiricilerin inhibisyonu ile bu etkiyi gösterdiği tahmin edilmektedir. Etkisi tam olarak aydınlatılamamış olmasına rağmen günümüzde en sık kullanılan makropinositoz inhibitörlerinden biridir (158, 159).

Ayrıca klatrin ve kaveole bağlı olmayan hücre içi alımın da özellikle klatrin aracılı endositozun inhibe olmasından sonra arttığı ve bu yollara spesifik inhibitörlerin geliştirilmemiş olduğu da çalışmalarında göz önünde bulundurulmalıdır. 4 °C derece tüm endositozun inhibe olduğu fakat hücre yüzeyiyle nanopartiküllerin etkileşiminin devam ettiği ve pasif difüzyonun hala aktif olduğu bilinmektedir. Bu alternatif yolların durdurulması ise bu yolla sağlanabilmektedir. Buna ek olarak endositozun metabolik aktiviteye bağlı olarak gerçekleşip gerçekleşmediğinin araştırılmasında mitokondriyal oksidatif fosforilasyon inhibitörleri kullanılabilmektedir (157).



Şekil 2.11. Hücresel endositoz yolları ve bazı endositoz inhibitörlerinin (Amilorid, Mβ-CD, indometazin ve klorpromazin) şematik olarak gösterimi. (Şekil Velhoen ve ark.'nın makalesinden (160) modifikasyonla hazırlanmıştır.)

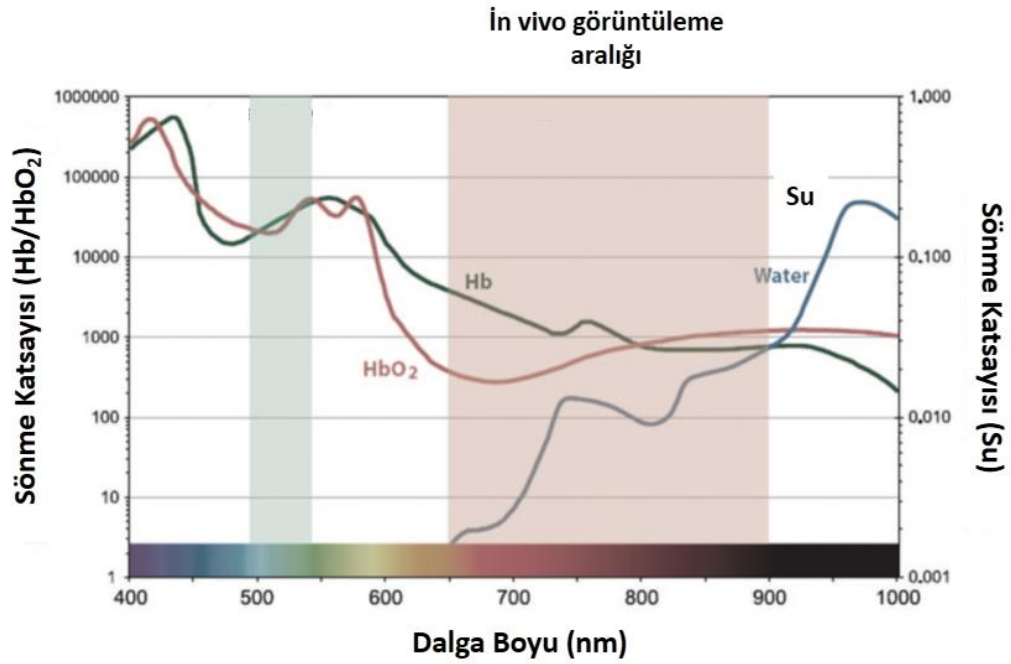
2.5. Nanopartiküllerin İşaretlenmesi ve Boya Seçimi

Floresan esaslı görüntüleme yöntemlerinin gelişmesiyle kompleks biyolojik sistemlerin ve süreçlerin anlaşılmasında büyük bir ilerleme kaydetmiştir (139). Fakat tüm bu görüntüleme teknikleri nanopartiküllerin biyolojik sistemlerle etkileşimini belirlerken yüksek parlaklıkta ve analiz edilecek sistemin özelliklerine uygun olarak işaretlenmiş nanopartikülleri gerekmektedir. Günümüzde çeşitli organik boyalar kullanılarak nanopartiküller istenilen özellikte işaretlenebilmektedir. Bu işaretlemede kullanılan temel iki yöntemi organik boyaların doğrudan nanopartikül içerisine yüklenmesi veya doğrudan polimere konjuge edilmesi oluşturmaktadır. Konjuge edilmiş polimerik nanopartiküller geçtiğimiz yıllarda birçok çalışmaya konu olmuştur. Fakat bu polimer boya konjugatları biyoparçalanabilir özellikten yoksunlardır ve her boyanın polimerle kojugasyonu mümkün olmamaktadır. Buna alternatif olarak geliştirilen küçük organik boyaların nanopartiküllere enkapsüle edilmesi konjugasyon yaklaşımının yerini almaktadır (139, 141, 161-163).

Bu yaklaşımın hızla popüler olmasının başlıca nedenleri (139);

- polimerin biyoparçalanabilir özelliklerini bozmaması,
- hazırlama tekniklerinin çeşitliği ile farklı özellikteki boylarla işaretlenmenin sağlanabilmesi
- ilaçla benzer özelliklere sahip bir boya seçildiğinde daha doğru bir taklidin sağlanabilmesidir.

Nanopartiküllerin işaretlenmesinde genellikle hem hidrofobik hem de hidrofilik boyalar başarıyla kullanılmıştır. Bu boyalar seçilirken hücre kültürü çalışmalarında ve in vivo görüntüleme çalışmalarında kullanılacak boyanın seçiminde kullanılacak cihazların özellikleri, sahip olduğu filitreler, çalışabildiği eksitasyon emisyon aralıkları ve özellikle in vivo görüntüleme yaparken otofloresan hesaba katılarak boya seçilmelidir (164, 165). Kızılötesi görüntüleme sistemleriyle yapılan analizleri bu nedenle sınırlı bir aralıkta gerçekleştirilebilmektedir. Bu aralık Şekil 2.12’de gösterilmiştir.



Şekil 2.12. İn vivo görüntüleme çalışmaları için optik aralığın gösterimi (165).

Bunlarla birlikte floresan özelliğe sahip nanopartiküllerin partikül büyüklüğünün DLS metoduyla ölçülmesi de bazı kısıtlamaları beraberinde getirmektedir. Bu ölçüm sırasında ışığın absorblanması saçılan ışığın intensitesinde farklılığa sebep olur ve bu süreç daha küçük partikül büyüklüğünün ölçülmesiyle sonuçlanır. Bu nedenle DLS cihazının lazerinin sahip olduğu dalga boyunda absorbsiyon gösteren boyalardan kaçınılmalıdır ve sonuçlar mikroskopi sonuçlarıyla doğrulanmalıdır (166).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Cihazlar ve Yazılımlar

Cihaz/Yazılım	Marka/Program Adı
Santrifüj aleti	Hermle Z383 K, Almanya
Termostatlı yatay çalkalayıcı	Memmert, Almanya
İnkübatör	Sanyo, Japonya
UV spektrofotometre	Shimadzu, Japonya
Hassas terazi	Mettler Toledo, İsviçre
Laminar hava akımlı kültür kabini	Faster, İtalya
Liyofilizatör	Jouan, Danimarka
Isıticılı manyetik karıştırıcı	IKA, Almanya
Çok noktalı manyetik karıştırıcı	Variomag Telesystem, Almanya
Partikül büyüklüğü ve zeta potansiyeli ölçüm cihazı	Malvern Instruments, İngiltere
Ultra saf su sistemi	Milipore, A.B.D.
Vorteks	IKA, Almanya
Geçirimli elektron mikroskobu	FEI Company, Hollanda
Atomik kuvvet mikroskobu	Veeco, A.B.D.
Floresan mikroskop	Leica, Germany
Akım sitometri cihazı	Becton-Dickinson, A.B.D.
FTIR cihazı	Bruker, A.B.D.
Rotavapor	IKA, Almanya
Mikropipetler	Eppendorf, Almanya

Helyum piknometre	Quantachrome, A.B.D.
İn vivo görüntüleme sistemi	IVIS Spectrum, A.B.D.
İstatistik yazılımı	Minitab 16
Çizim yazılımları	ChemDraw 15, SketchUP2016
Resim düzenleme yazılımları	ImageJ, Image Plus, Adobe Photoshop CS3

3.2. Kullanılan Madde ve Malzemeler

Madde	Marka
Dil	Sigma Aldrich, A.B.D.
ICG	Sigma Aldrich A.B.D.
PLGA 503	Sigma Aldrich A.B.D.
Protasan UPCL 113	Novamatrix, Norveç
Kitosan-PEG-Biyotin kompleksi	Dr. Eduardo Fernandes Megia tarafından bağışlanmıştır
Saflaştırılmış anti-insan CD71 antikoru	Biolegend, A.B.D.
PVA	Sigma Aldrich, A.B.D.
TPF	Sigma Aldrich, A.B.D.
NaCl	Emir Kimya, Türkiye
Aseton	Sigma Aldrich A.B.D.
Metanol	Sigma Aldrich A.B.D.
Etanol	Sigma Aldrich, A.B.D.
DMSO	Sigma Aldrich A.B.D.
Formaldehit	Sigma Aldrich A.B.D.

SDS	Sigma Aldrich A.B.D.
Sodyum azid	Sigma Aldrich A.B.D.
Amilorid hidroklorür hidrat	Sigma Aldrich, A.B.D.
İndometazin	Sigma Aldrich A.B.D.
Klorpromazin hidroklorür	Sigma Aldrich A.B.D.
M β -CD	Prof.Dr.Erem Bilensoy tarafından bağışlanmıştır.
DAPI	Sigma Aldrich A.B.D.
Tween 20	Merck, Almanya
DRAQ7	Biolegend, A.B.D.
Yüksek glukozlu DMEM	Lonza, İsviçre
FBS	Lonza, İsviçre
L-glutamin	Lonza İsviçre
Penisilin-Streptomisin	Lonza İsviçre
Tripsin EDTA	Lonza İsviçre
Endogro temel besiyeri ortamı	Milipore, Almanya
Endogro destek kiti	Milipore, Almanya
BODIPY-LacCer	Life Technologies, A.B.D.
FITC-İnsan Transferrin	Life Technologies, A.B.D.
FITC-Dekstran	Life Technologies, A.B.D.

3.3. Analitik Metot Validasyonları

Tez çalışmasında kullanılan iki boya olan Dil ve ICG, maksimum absorbans verdikleri dalga boyları esas alınarak seçilmiştir. Bu seçimlerin yapılmasında akım sitometri, floresan mikroskop ve kızılötesi in vivo görüntüleme sisteminin özellikleri göz önünde bulundurulmuştur.

3.3.1. Dil için Miktar Tayin Yönteminin Geliştirilmesi ve Validasyonu

Dil miktar tayini UV spektrofometre ile yapılmıştır. Bu amaçla maddenin 200-800 nm arasında DMSO ve metanol : %0,5 SDS (9:1) içerisinde absorban spektrumu taranarak, maksimum absorban verdiği dalga boyları ($\lambda_{\text{maks-Dil}}$) belirlenmiştir. Tespit edilen $\lambda_{\text{maks-Dil}}$ değerlerinde Dil'in DMSO ve metanol : %0,5 SDS (9:1) içerisinde 1,5-4,5 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyon aralığındaki çözeltilerine ait absorban değerleri ölçülmüştür. Analitik metot validasyonları aşağıda verilen parametreler göz önünde bulundurularak, Söğüt Ertaş ve ark. (167) ve Toprak (168)'ın belirttiği gibi gerçekleştirilmiştir.

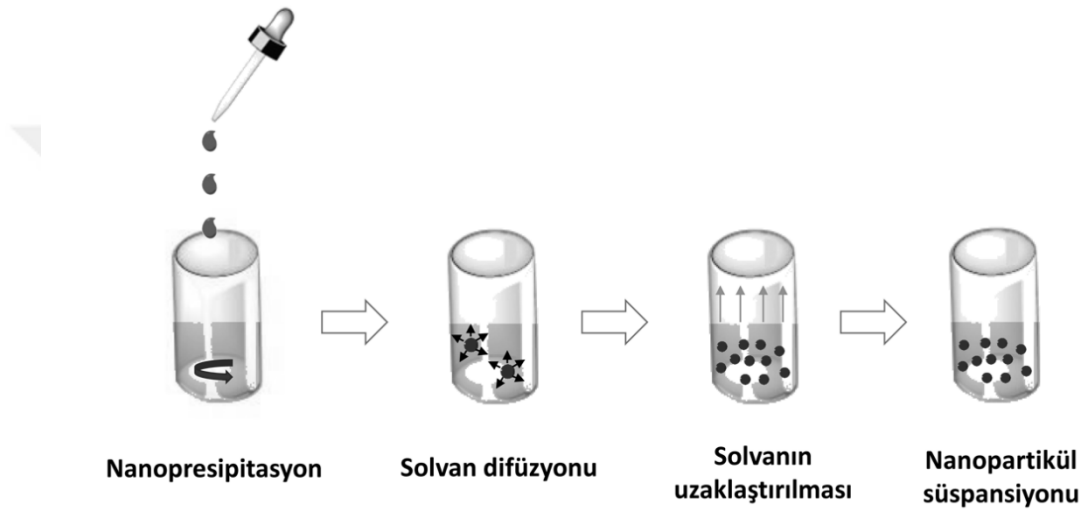
- Doğrusallık
- Doğruluk ve Geri Elde
- Tekrar Edilebilirlik
- Özgünlük
- Stabilité

3.3.2. ICG için Miktar Tayin Yönteminin Geliştirilmesi ve Validasyonu

ICG miktar tayini Dil'e benzer şekilde UV spektrofotometre ile yapılmıştır. Bu amaçla öncelikle 200-800 nm arasında absorbsiyon spektrumu taranarak maddenin çözeltisinin maksimum absorban verdiği dalga boyu ($\lambda_{\text{maks-ICG}}$) belirlenmiştir. Tespit edilen $\lambda_{\text{maks-ICG}}$ değerinde, ICG'nin DMSO içerisinde 0,4-2,8 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyon aralığındaki çözeltilerine ait absorban değerleri ölçülmüştür. Analitik metot validasyonu yukarıda belirtilen parametreler göz önünde bulundurularak gerçekleştirilmiştir. ICG'nin suda stabil olmadığı daha önceki çalışmalarda net bir şekilde tanımlandığından (169-171) salım ortamında stabilite analizleri gerçekleştirilmemiş, nanopartiküllerden boya salımının belirlenmesi belirli zaman sonunda nanopartikülün içerisinde bulunan boya miktarının belirlenmesi ile gerçekleştirilmiştir. Nanopartiküllerden boya salımının belirlenmesinde kullanılan metotlar ilgili bölümde detaylı olarak açıklanmıştır.

3.4. Nanopartiküllerin Hazırlanması

PLGA nanopartikülleri nanopresipitasyon metodu ile hazırlanmıştır (172). Nanopartiküllerin hazırlanması için kısaca polimerin aseton içinde çözünmesinin ardından üzerine etanolde çözündürülmüş Dil eklenmiştir. Organik faz damla damla, 1.100 rpm hızla karıştırılan 10 ml PVA çözeltisine eklenmiştir (Şekil 3.1). Organik fazın uçması için gece boyu manyetik karıştırıcıda karıştırılan süspansiyon, 13.500 rpm'de 45 dakika PVA'yı uzaklaştırmak için santrifüjlenmiş, yıkanmış süpernatantlar atılarak nanopartiküller toplanmıştır.



Şekil 3.1. PLGA nanopartiküllerinin nanopresipitasyon yöntemiyle hazırlanmasının şematik gösterimi(173).

Farklı büyüklükte PLGA nanopartikülleri elde edebilmek için, nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklüğüne etki eden temel faktörler araştırılmıştır. Bu amaç doğrultusunda organik faz hacmi, polimer miktarı ve kullanılan yüzey etkin madde konsantrasyonu literatür bilgileri ve önceki çalışmalar göz önüne alınarak, ortalama partikül büyüklüğüne etki etmesi muhtemel faktörler olarak belirlenmiştir. Bu değişkenlerin partikül büyüklüğüne etkisinin incelenmesi amacıyla 2^3 faktöriyel deney tasarımı Minitab®16 yazılımı ile geliştirilmiştir. Tasarımda üst ve alt limitler (Tablo 3.1) önceki deney tecrübeleri ve literatür bilgileri göz önüne alınarak seçilmiştir. Bu değişkenlerin ortalama partikül büyüklüğüne etkisi aynı program yardımıyla analiz edilerek etkili faktörler pareto prensibine göre belirlenmiştir.

Belirtilen faktörlerin etkisi deney tasarımıyla incelendikten sonra, belirlenen etkinin daha detaylı incelenmesi amacıyla sürfaktan miktarı ve organik faz hacmi en düşük seviyede sabitlenerek sadece polimer konsantrasyonun 10, 15, 20, 25, 30 mg/ml olacak şekilde değiştirilerek nanopartiküller üretilmiş ve polimer konsantrasyonunun partikül büyüklüğüne etkisi daha detaylı olarak incelenmiştir. Polimer miktarı 10 mg'dan düşük olduğunda enkapsülasyon oranının çok az olması ve 30 mg'dan yüksek olması durumunda partikül agregasyonunun gözlenmesinden dolayı bu aralıklar alt ve üst limitler olarak belirlenmiştir.

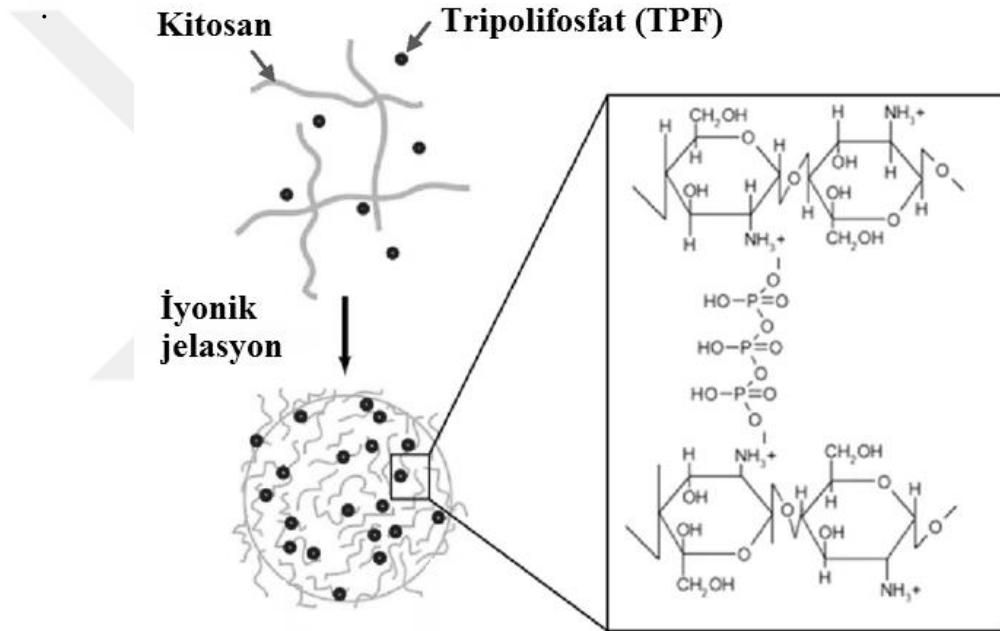
Tablo 3.1. PLGA nanopartiküllerinin hazırlanmasında kullanılan deney tasarımı değişkenleri ve cevap değeri.

Bağımsız Değişkenler	Kullanılan Seviyeler	
	Düşük	Yüksek
Polimer Miktarı (X_1) (mg)	10	30
Yüzey Etkin Madde (PVA) Konsantrasyonu (%) (X_2)	0.5	1
Organik Faz Hacmi (X_3) (ml)	1	3
	Cevap	
Ortalama Partikül Büyüklüğü (nm)	Y	

Karşılaştırılması planlanan farklı partikül büyüklüğündeki formülasyonlarının polimer konsantrasyonu değiştirilerek elde edilmesine karar verilmiş ve bu formülasyonlar 10 ve 30 mg/ml konsantrasyonunda polimer kullanarak elde edilmiştir. PVA ve organik faz miktarları, hücre içine alımın artırılması ve sitotoksitenin azaltılması amacıyla en düşük seviyede sabitlenmiştir. Elde edilen PLGA₁₆₀ (~160 nm) ve PLGA₂₃₀ (~230 nm) nanopartikülleri, her nanopartikülün aynı yoğunlukta boya içermesinin sağlanması amacıyla, farklı oranlarda Dil eklenerek tekrar hazırlanmıştır. PLGA₁₆₀ ve PLGA₂₃₀'un hazırlanmasında sırasıyla 15 ve 20 µg Dil 100 µl etanole eklendikten sonra 900 µl aseton çözeltisine eklenmiş ve aynı boya yoğunluğu sağlanmıştır. Çalışma devamında gerçekleştirilecek in vivo deneylerde kullanmak için aynı formülasyonlar ICG yüklenerek tekrar hazırlanmıştır. Dil yüklenmesinden farklı olarak PLGA₁₆₀ ve PLGA₂₃₀'ın hazırlanmasında sırasıyla 70 ve 100 µg ICG, 100 µl

metanolde çözündürülerek PLGA içeren 900 µl aseton çözeltisine eklenmiş ve nanopartiküller yukarıda tarif edildiği gibi hazırlanmıştır.

Nanopartiküllerin hücre içine alımına partikül büyüklüğünün ve yüzey yükünün etkisini incelemek amacıyla PLGA nanopartikülleri ile aynı büyüklüğe sahip kitosan nanopartikülleri TPF ile kitosanın (Protasan UP CL113) iyonik jelasyonu (Şekil 3.2) ile hazırlanmıştır (66). Nanopartiküllerin hazırlanmasında öncelikle 20 µg Dil'in 20 µl etanoldeki çözeltisi 1 ml TPF'ne çözeltisine eklenmiş ardından manyetik karıştırıcı üzerinde oda sıcaklığında sürekli olarak karışmakta olan NaCl içeren kitosan çözeltisine (10 ml) damla damla eklenerek elde edilmiştir.



Şekil 3.2. Kitosan nanopartiküllerin oluşma mekanizmasının şematik gösterimi (174).

Farklı büyüklükte kitosan nanopartikülleri elde edebilmek için, nanopartiküllerin partikülün büyüklüğüne etki edebilecek temel faktörler araştırılmış ve bu faktörlerin TPF miktarı, polimer miktarı ve NaCl miktarı olduğu literatür bilgileri ile belirlenmiştir. Bu bilgilerden yola çıkarak Dil ile floresan işaretlenmiş nanopartiküllerin partikül büyüklüğüne bu faktörlerin etkisinin incelenmesi amacıyla 2^3 faktöriyel deney tasarımı Minitab®16 yazılımı ile geliştirilmiştir. Tasarımda üst ve alt limitler önceki deney tecrübeleri ve literatür bilgileri göz önüne alınarak seçilmiştir (Tablo 3.2). Bu değişkenlerin ortalama partikül büyüklüğüne etkisi aynı program

yardımıyla analiz edilerek farklı partikül büyüklüğüne sahip kitosan nanopartikülleri elde edilmiştir.

TfRMAb (-) ve TfRMAb (+) nanopartiküllerinin hazırlanması için kullanılacak madde miktarları deney tasarımından elde edilen sonuçlar göz önünde bulundurularak belirlenmiştir. Bu amaçla daha fazla boya enkapsülasyonunun sağlanması ve nanopartiküllerin sıklığının artırılabilmesi için polimer ve TPF miktarları üst sınırlarda sabitlenmiştir. Değişen NaCl miktarının nanopartiküllerin özelliklerine etkisinin sınırlı kalması nedeniyle ve ortamda uzaklaştırılmamış NaCl kalması olasılığının azaltılması için, NaCl miktarı düşük seviyede sabitlenmiştir.

Tablo 3.2. Kitosan nanopartiküllerinin hazırlanmasında kullanılan deney tasarımı değişkenleri ve cevap değeri.

Bağımsız Değişkenler	Kullanılan Seviyeler	
	Düşük	Yüksek
Polimer Miktarı (X ₁) (mg)	5	10
TPF Miktarı (X ₂) (mg)	0.5	1
NaCl Miktarı (X ₃) (mg)	15	45
	Cevap	
Ortalama Partikül Büyüklüğü (nm)	Y	

Beyne hedeflendirilmiş kitosan nanopartikülleri 10 mg Kitosan-PEG-Biyotin ve 15 mg NaCl çözündürülmüş 10 ml saf su üzerine, 20 µg Dil içeren 1 ml TPF (1 mg/ml) çözeltisinin eklemesiyle, yukarıda tarif edildiği gibi hazırlanmıştır (20 µg Dil 20 µl etanolde çözündürüldükten sonra TPF çözeltisine eklenmiştir.). Daha sonra nanopartiküller Aktaş ve ark. (175)'nin tarif ettiği gibi toplanarak, Kitosan-PEG-Biyotin nanopartiküllerine CD71 antikoru bağlanmıştır.

3.5. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

3.5.1. Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyeli Tayini

Nanopartiküllerin partikül büyüklüğü ve zeta potansiyeli ölçümleri ultra saf su içerisinde Zetasizer Nanoseries-ZS ile yapılmıştır. Ölçümler oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

3.5.2. Nanopartiküllerin Morfolojisinin İncelenmesi

Partiküllerin büyüklüğünün ve morfolojisinin incelenmesi amacıyla nanopartiküller AFM ve/veya TEM yöntemiyle analiz edilmişlerdir. TEM için süspansiyon halindeki örnekler grid üzerine damlatılarak oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kurutulan örnekler Tecnai G² Spirit Biotwin cihazı ile 20-120 kV aralığında incelenmiştir. Benzer şekilde AFM analizi için bir damla nanopartikül süspansiyonu mikroskop camı üzerine damlatılmış, kurutulmuş ve Veeco MultiMode V cihazının AS-12 probu ile incelenmiştir.

3.5.3. Enkapsülasyonun Değerlendirilmesi

PLGA nanopartiküllerinin enkapsülasyon etkinlikleri direkt yöntemle belirlenmiştir. Özetle elde edilen nanopartiküller DMSO içerisinde çözündürülmüş miktar tayini yukarıda belirtildiği gibi yapılarak enkapsülasyon etkinliği Formül 3.1’le hesaplanmıştır.

$$\text{Enkapsülasyon etkinliği (\%)} = \frac{\text{Elde edilen nanopartiküllerde bulunan toplam boya}}{\text{Formülasyona eklenen toplam boya}} \times 100 \quad (3.1)$$

Nanopartiküllerin birim miktarında (mg) bulunan boya miktarı sonuç olarak elde edilen nanopartiküllerdeki boya miktarının, elde edilen toplam nanopartikül ağırlığına bölünmesi ile hesaplanmıştır. Beyin endotel hücreleriyle etkileşimi incelenecek olan kitosan nanopartiküllerinin aynı floresan intensiteye sahip oldukları ise aynı ağırlıkta kitosan nanopartikülü içeren süspansiyonların 555 nm’de absorbanlarının ölçülmesiyle belirlenmiştir.

3.5.4. İn Vitro Salım Deneyleri

Nanopartiküllerin in vitro ortamdaki salım profilinin incelenebilmesi için, salım deneyleri gerçekleştirilmiştir. Salım deneyleri, 37 °C’de ve yatay çalkalayıcı su banyosunda gerçekleştirilmiştir. Salım ortamı olarak Dil yüklü nanopartiküller için % 0,5 SDS içeren pH 7,4 fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) kullanılmış, PLGA nanopartikülleri için 1,5., 3., 6., 12. ve 24. saatler sonunda nanopartiküller santrifüjlenerek süpernatantlar alınmış, metanolle seyreltilerek spektrofotometreyle miktar tayini yapılmıştır. Kitosan nanopartikülleri içinse analiz süresinin 3 saat

sonunda tamamlanması nedeniyle 3. saat sonundaki salınan boya miktarları hesaplanmıştır. ICG yüklü nanopartiküller ise suda çözünen ICG'nin su içerisinde stabilite problemi göstermesinden dolayı farklı bir metotla analiz edilmiştir. Kısaca salım ortamı olarak pH 7,4 PBS kullanılmış ve 0,5 sa, 1,5. sa, 3. sa, 6. sa, 12. saat sonunda tüpler santrifüjlenerek süpernatantlar atılmış toplanan nanopartiküller DMSO içerisinde çözündürülerek ICG miktar tayini gerçekleştirilmiştir. Hesaplanan madde miktarı başlangıçtaki ICG miktarından çıkarılarak salınan boya miktarları belirlenmiştir.

3.5.5. Polimer Yoğunluğunun Belirlenmesi ve Nanopartikül Sayısının Tahmin Edilmesi

PLGA nanopartiküllerinin ortalama partikül ağırlığı Formül 3.2 kullanılarak tahmin edilmiş ve nanopartikül sayısı da bu ortalama ağırlıktan yola çıkarak hesaplanmıştır (129, 176):

$$M_{\text{çekirdek}} = \rho \times \frac{4}{3}\pi r^3 \quad (3.2)$$

$M_{\text{çekirdek}}$: Bir nanopartikülün ortalama ağırlığını

r : DLS metoduyla elde edilen ortalama partikül yarıçapını

ρ : 1.33 g/ml polimer yoğunluğu. (Helyum piknometresi ile ölçülmüştür.)

(Quantachrome Instruments, A.B.D.).

3.5.6. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrofotometre Analizi

Dil'in PLGA nanopartikülleri içerisindeki moleküler durumunu değerlendirmek için Dil, PLGA ve Dil yüklü PLGA nanopartiküllerinin FTIR spektrumları ALPHA FTIR spektrometre ile (Bruker; Massachusetts, USA) ile 4000–400 cm^{-1} aralığında dalga sayısı taranmıştır.

3.6. İn Vitro Hücre Kültürü Çalışmaları

HEK293 hücreleriyle yapılan çalışmalarda besiyeri olarak yüksek glikoz içeren DMEM besiyeri, %10 FBS, %1 U/ml streptomisin, %1 U/ml penisilin ile tamamlanarak kullanılmış, hücreler 37°C'de, 5% CO_2 içeren ortamda inkübe

edilmişlerdir. Beyin endotel hücreleri (hCMEC/D3) ise Endogro bazal ortamı içerisine Endogro destek ürünleri ilave edilerek (177) 37°C’de, 5% CO₂ içeren ortamda inkübe edilmişlerdir.

3.6.1. Nanopartiküllerin Sitotoksitesinin Belirlenmesi

Nanopartiküllerin sitotoksitesini belirlenmek amacıyla Akagi, J ve ark. (178) belirttiği yöntemle canlılık boyası kullanılmıştır. Kısaca HEK293 hücreleri için 1.000.000 hücre 6’lı plaklara ekilmiştir. 24 saat sonra üzerine nanopartiküller uygulanmıştır. Beyin endotel hücreleri ile gerçekleştirilen çalışmada sitotoksitenin belirlenmesi amacıyla ise 95.000 beyin endotel hücresi 24’lü plaklara tamamlanmış besiyeri ortamı içerisinde ekilmiştir. Hücrelerin kan beyin engeli özelliklerini kazanması için üç günde bir besiyeri yenilenerek bir hafta beklenmiş ve daha sonra nanopartiküller ortama eklenmiştir.

Belirlenen süreler sonunda hücreler tripsin EDTA ile kaldırılarak 1.800 rpm de 5 dakika santrifüjlenerek hücreler toplanmış, süpernatant dökülmüştür. Hücreler 100 µl PBS içerisinde süspande edildikten sonra DRAQ7 (canlılık boyası) eklenerek akım sitometriyle analiz edilmiştir. Her analizde 10.000 hücre analiz edilerek veriler toplanmış ve tüm kontrol hücrelerine de aynı işlemler uygulanmıştır. DRAQ7 pozitif hücreler ölü negatif hücreler ise canlı olarak değerlendirilmiştir.

3.6.2. Nanopartiküllerin Hücre İçine Alım Kinetiklerinin ve Mekanizmalarının Belirlenmesi

Hücre içine alım kinetiğinin belirlenmesi amacıyla Dil ile işaretli nanopartiküller yukarıda belirtildiği gibi hazırlanan hücreler üzerine eklenmiştir. Çalışma kapsamında kitosan nanopartikülleri agrege olmasına rağmen PLGA nanopartikülleriyle farklılıklarının gösterilmesi amacıyla alım kinetikleri HEK293 hücreleri kullanılarak incelenmiştir. Belirlenen sürelerde nanopartiküller ve hücreler inkübe edildikten sonra, hücreler toplanmış, akım sitometri ile floresan olarak işaretli hücre yüzdesi ve bu hücrelerin ortalama floresan yoğunluğu (MFI) ölçülmüştür. Floresan işaretli nanopartiküllerin hücrelerdeki durumunun görüntülenmesi amacıyla belirlenen sürelerde floresan mikroskobu ile hücreler görüntülenmiştir. Görüntüleme

işlemine hücrelerin hazırlanması kısaca, hücrelerin PBS'le yıkandıktan sonra %4 formaldehit ile 20 dakika bekletilerek fikse edilmesi ve hücrelerin tekrar PBS'le iki kez yıkanmasının ardından, %0,1 tween 20 içeren DAPI çözeltisi ile inkübe edilmesi ve tekrar PBS ile yıkanmasının ardından görüntülenmesi ile gerçekleştirilmiştir. Eklenen nanopartikül konsantrasyonları ve analiz zamanları ile ilgili bilgiler bulgular kısmında detaylı olarak belirtilmiştir.

Hücre içine alım mekanizmalarının belirlenmesi amacıyla ise endositoz inhibitörleri nanopartiküller uygulanmadan önce uygulanarak hücrelerin endositoz yolları inhibe edilmiştir. İnhibitörler literatür bilgileri göz önünde bulundurularak HEK293 hücrelerine nanopartiküller uygulanmadan bir saat önce ilave edilmiştir. hCMEC/D3 hücrelerine ise bir buçuk saat öncesinde ilave edilmiştir. Yine inhibitörler de literatür ve çalışma bilgilerinden yola çıkarak belirlenmiştir. HEK293 hücreleri ile yapılan çalışmada: 1.25 mM amilorid (makropinositoz inhibitörü), 45 µM klorpromazin (klatrin aracılı endositoz inhibitörü) , 15 µg/ml indometazin (kaveol aracılı endositoz inhibitörü), 3 µg/ml sodyum azid (ATPaz inhibitörü) kullanılmıştır. hCMEC/D3 hücreleriyle yapılan çalışmadan ise 1.25 mM amilorid (makropinositoz inhibitörü), 45 µM klorpromazin (klatrin aracılı endositoz inhibitörü), 5 mg/ml Mβ-CD (kaveol aracılı endositoz inhibitörü) inhibitör olarak kullanılmıştır. hCMEC/D3 ile devam eden çalışmada bu hücreler üzerinde Mβ-siklodekstrin'in etkinliği daha önce gösterildiği için kaveol aracılı endositozu inhibe etmede indometazine tercih edilmiştir. Deneyler +4 °C'de tekrarlanarak endositoz yolları dışında nanopartiküllerden boya sızıntısının veya temasla boya aktarımının olup olmadığı araştırılmıştır (179). Nanopartiküllerin hücre içine alım kinetikleri farklılık gösterdiğinden hücre içine alım mekanizmaları PLGA₂₃₀ için eklendikten 3 saat sonra PLGA₁₆₀ içinse eklendikten 24 saat sonra tekrarlanmıştır. Kitosan nanopartikülleri için ise bu süre 3 saat olarak belirlenmiştir. Kullanılan inhibitörlerden biri olan Mβ-CD'in kullanımının hem klatrin aracılı endositozu hem de kaveol aracılı endositozu inhibe ettiğine ve hücrenin tekrar kolesterol senteziyle hücre içine alım yollarını aktive edebileceğine dair yayınlar literatürde yer almaktadır. Bu yayınlar çalışmamızda kullandığımız Mβ-CD'in kaveole spesifik inhibisyonunun ve belirlenen sürede bu inhibisyonun etkin olduğunun gösterilmesi ihtiyacını doğurmuştur. Bu sebeple Mβ-

CD ile hCMEC/D3 hücreleri 90 dakika bekletildikten sonra hücre içine kaveol aracılı endositozla alındığı bilinen pozitif kontrol ajanı (BODIPY-LacCer) eklenmiş, hücre içine alım inhibisyonu kontrol grubuyla karşılaştırılarak belirlenmiştir. Aynı şekilde klatrin aracılı endositoza etkisi FITC-İnsan Transferrini kullanılarak test edilmiştir. Bununla birlikte klorpromazinin klatrin aracılı endositozu inhibe ettiği FITC-İnsan Transferrini kullanılarak, amiloridin makropinositozu inhibe ettiği FITC-Dextran kullanılarak belirlenmiştir.

3.7. İn Vivo Görüntüleme Çalışmaları

In vivo deneyler Ege Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan izin aldıktan sonra gerçekleştirilmiştir (EK-1). 4 veya 6 haftalık BALB/c fareler, her grupta en az iki hayvan olacak şekilde deney kapsamında kullanılmıştır. Farelere intraperitoneal olarak 200 µL ICG çözeltisi (20 µg/ml) veya buna eşdeğer miktarda boya içeren PLGA₂₃₀ ve PLGA₁₆₀ nanopartikülleri uygulanmıştır. Enjeksiyondan 1,5 ve 6 saat sonra fareler izofluran ile anestezi altına alınmış ve in vivo görüntüleme sistemine yerleştirilmiştir. Görüntüleme IVIS® Spektrum (Perkin Elmer, MA, USA) cihazı ile eksitasyon dalga boyu 745 nm emisyon dalga boyu ise 820 nm olarak analiz gerçekleştirilmiştir (180). Elde edilen görüntüler niteliksel olarak değerlendirilmiştir.

3.8. İstatistiksel Analiz

Aksi belirtilmedikçe tüm deneyler üçer kez tekrarlanmış ve istatistiksel olarak aşağıda tarif edildiği gibi değerlendirilmiştir. $\pm$ ifadesi standart sapmayı yansıtmaktadır. İki grubun karşılaştırılmasında t testi, ikiden fazla grubun karşılaştırılmasında ANOVA'yı takiben Tukey's post hoc testi Minitab®16 programı ile gerçekleştirilmiştir. P değerinin 0.05 den düşük olduğu sonuçlar anlamlı olarak kabul edilmiş * işareti ile gösterilmiştir.

4. BULGULAR

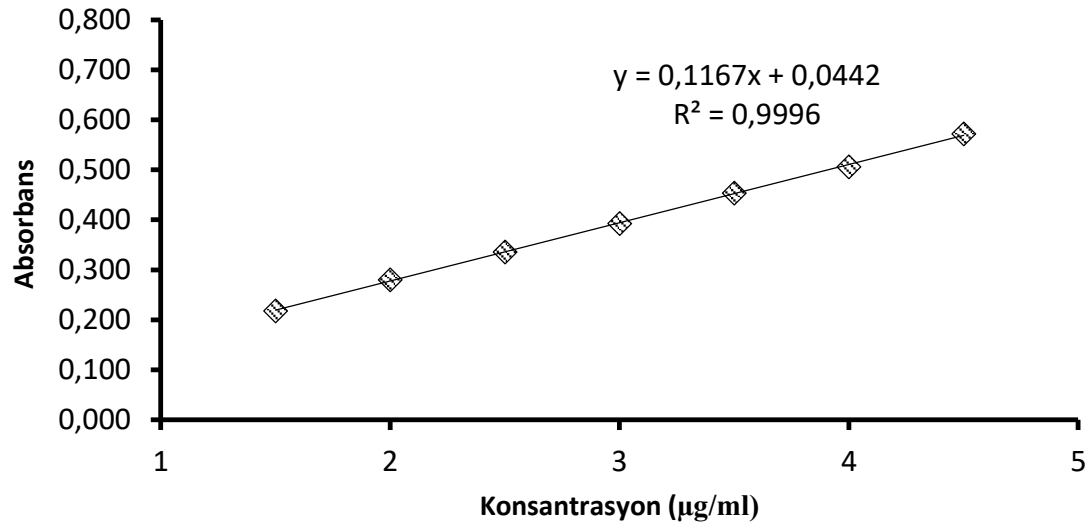
4.1. Analitik Metot Validasyonları

4.1.1. Dil için Miktar Tayin Yönteminin Geliştirilmesi ve Validasyonu

Dil'in maksimum absorbans verdiği dalga boyunun belirlenmesi için spektrumu taranmıştır. Dil içeren DMSO ve metanol : %0,5 SDS (9:1) çözeltisinin maksimum absorbans verdiği dalga boyları sırasıyla 555 ve 554 nm olarak belirlenmiştir. Dil'in DMSO'daki çözeltisi kullanılarak geliştirilen miktar tayini yönteminin detayları aşağıda başlıklar halinde sıralanmıştır.

Doğrusallık

Dil'e ait kalibrasyon doğrusu, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 µg/ml konsantrasyonda Dil'in DMSO içerisindeki çözeltileri hazırlanarak, 555 nm dalga boyundaki absorbanslarının belirlenmesi ile elde edilmiştir. Çalışmalar 6 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen absorbans değerleri çözeltilerin konsantrasyonlarına karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon doğrusuna ait denklem lineer regresyon ile



Şekil 4.1. Dil'in DMSO içerisindeki çözeltilerinin UV absorbansları kullanılarak elde edilen kalibrasyon doğrusu.

bulunmuştur. Kalibrasyon doğrusu ve denklemi Şekil 4.1'de yer almaktadır. Tanımlayıcılık katsayısı $R^2 = 0,9996$ olarak bulunarak denklemin doğrusallığı

gösterilmiştir. Bununla birlikte 1,5 ve 4,5 µg/ml konsantrasyondaki çözeltilerin varyasyon katsayıları %2'nin altında bulunmuştur.

Doğruluk ve Geri Elde

Analitik yöntemin doğruluğu gün içi ve günler arası olarak incelenmiş ve varyasyon katsayısı değerleri %2'nin altında, geri kazanım değerleri ise %98-102 aralığında bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar ile yöntemin uygun doğrulukta olduğu gösterilmiştir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Dil'in DMSO çözeltisinde miktar tayininin analitik metot validasyonuna ait doğruluk ve geri elde sonuçları.

Deneysel sonuçlar

Teorik konsantrasyon (µg/ml)	Gün içi			Günler arası		
	Ortalama (µg/ml)	Geri elde (%)	Varyasyon katsayısı (%)	Ortalama (µg/ml)	Geri elde (%)	Varyasyon katsayısı (%)
2,5	2,5	99,9	0,4	2,48	99,4	0,6
3	2,99	99,6	0,7	2,99	99,7	1,1
3,5	3,51	100,1	0,4	3,5	100,1	0,5

Tekrar Edilebilirlik

Dil'in 2,5 µg/ml, 3 µg/ml ve 3,5 µg/ml konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltilerinin 6 ayrı kez ölçülmesi ile elde edilen absorbans değerlerinin kalibrasyon doğrusunda kullanılması ile hesaplanan konsantrasyonların ortalama ve varyasyon katsayısı değerleri hesaplanarak değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.2'de özetlenmiş ve varyasyon katsayısı değerleri %2'nin altında bulunmuştur.

Tablo 4.2. Dil'in DMSO çözeltisinde miktar tayininin analitik metot validasyonuna ait tekrar edilebilirlik sonuçları.

Konsantrasyon (µg/ml)	Hesaplanan konsantrasyonların ortalaması (µg/ml)	Varyasyon katsayısı (%)
2,5	2,50	0,2
3	2,99	0,3
3,5	3,50	0,2

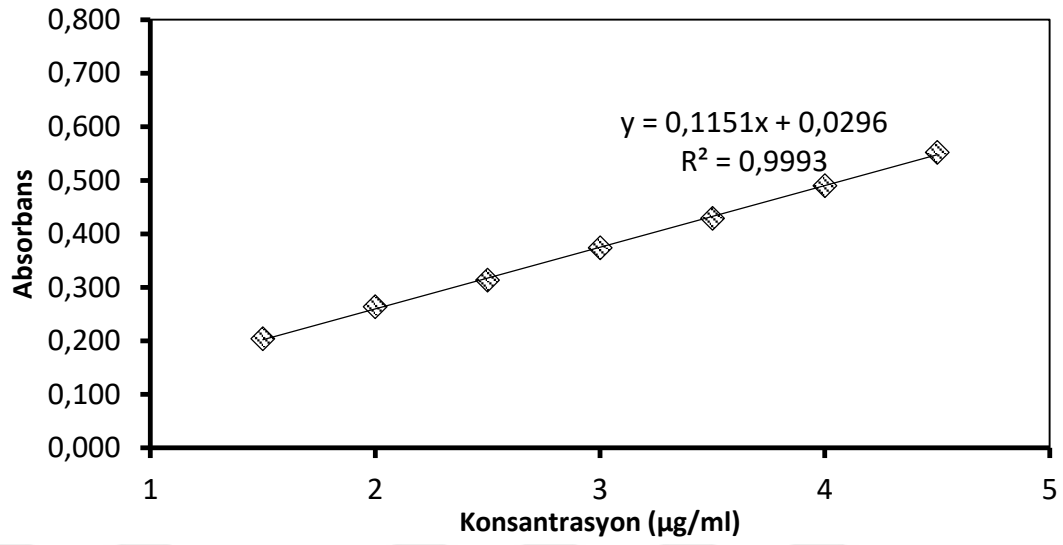
Özgünlük

Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarında kullanılan PVA, PLGA gibi maddelerin olası en yüksek kalıntısının 555 nm dalga boyunda, 3 µg/ml konsantrasyondaki Dil çözeltisinin %2'sinden az absorbans verdiği belirlenmiştir.

Dil'in metanol : %0,5 SDS (9:1) 'deki çözeltisi kullanılarak elde edilen miktar tayini yönteminin detayları aşağıda başlıklar halinde sıralanmıştır.

Doğrusallık

Dil'e ait kalibrasyon doğrusu, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 µg/ml konsantrasyonda Dil'in metanol : %0,5 SDS (9:1) içerisindeki çözeltileri hazırlanarak, 554 nm dalga boyundaki absorbanslarının belirlenmesi ile elde edilmiştir. Çalışmalar 6 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen absorbans değerleri çözeltilerin konsantrasyonlarına karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon doğrusuna ait denklem lineer regresyon ile bulunmuştur. Kalibrasyon doğrusu ve denklemi ise Şekil 4.2'de yer almaktadır. Tanımlayıcılık katsayısı $R^2 = 0,9993$ olarak bulunarak denklemin doğrusallığı gösterilmiştir. Bununla birlikte 1,5 ve 4,5 µg/ml konsantrasyondaki çözeltilerin varyasyon katsayıları %2'nin altında bulunmuştur.



Şekil 4.2. Dil'in metanol : %0,5 SDS (9:1) çözeltilerinin UV absorbansları kullanılarak elde edilen kalibrasyon doğrusu.

Doğruluk ve Geri Elde

Analitik yöntemin doğruluğu gün içi ve günler arası olarak incelenmiş ve varyasyon katsayısı değerleri %2'nin altında, geri kazanım değerleri ise %98-102 aralığında bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar ile yöntemin uygun doğrulukta olduğu gösterilmiştir (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Dil'in metanol : %0,5 SDS (9:1) çözeltisinde analitik metot validasyonuna ait doğruluk ve geri elde sonuçları.

Deneysel sonuçlar

Teorik konsantrasyon (µg/ml)	Gün içi			Günler arası		
	Ortalama (µg/ml)	Geri elde (%)	Varyasyon Katsayısı (%)	Ortalama (µg/ml)	Geri elde (%)	Varyasyon Katsayısı (%)
2,5	2,46	98,5	0,6	2,47	98,6	0,6
3	2,99	99,6	0,9	2,98	99,5	0,7
3,5	3,47	99,1	1,5	3,46	98,8	1

Tekrar Edilebilirlik

Dil'in 2,5 µg/ml, 3 µg/ml ve 3,5 µg/ml konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltilerinin 6 ayrı kez ölçülmesi ile elde edilen absorbans değerlerinin kalibrasyon doğrusunda kullanılması ile hesaplanan konsantrasyonların ortalama ve varyasyon katsayısı değerleri hesaplanarak değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.4'de özetlenmiş ve varyasyon katsayısı değerleri %2'nin altında bulunmuştur.

Tablo 4.4. Dil'in metanol : %0,5 SDS (9:1) çözeltisinde analitik metot validasyonuna ait tekrar edilebilirlik sonuçları.

Konsantrasyon (µg/ml)	Hesaplanan konsantrasyonların ortalaması (µg/ml)	Varyasyon katsayısı (%)
2,5	2,47	0,6
3	2,98	0,2
3,5	3,49	0,3

Özgünlük

Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarında kullanılan PVA, PLGA, kitosan gibi maddelerin olası en yüksek kalıntısının 554 nm dalga boyunda, 3 µg/ml konsantrasyondaki Dil çözeltisinin %2'sinden az absorbans verdiği belirlenmiştir.

Stabilite

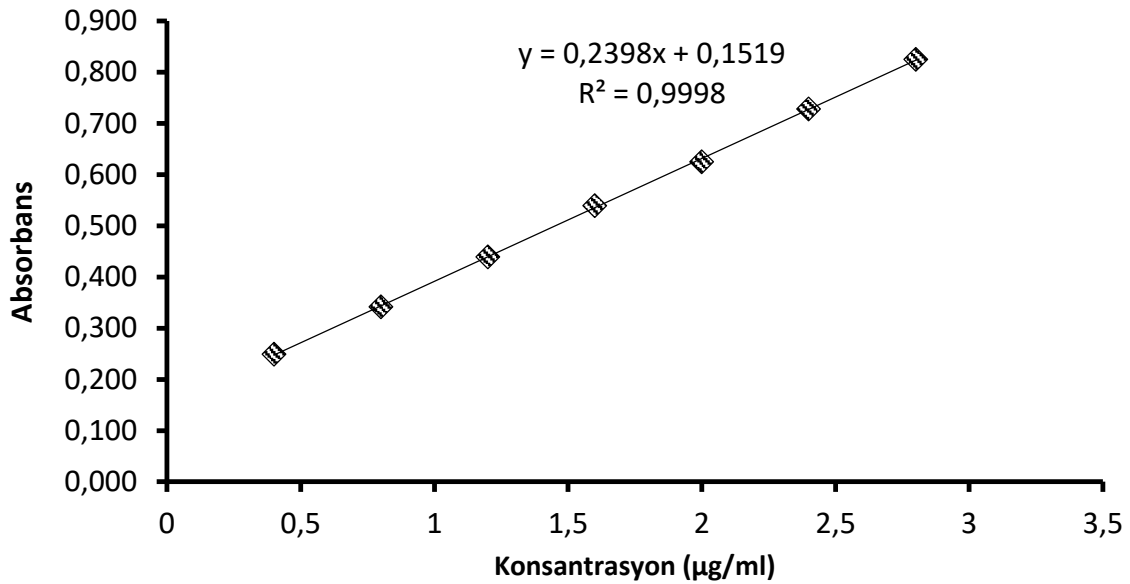
Salım ortamında Dil'in stabilitesinin belirlenmesi amacıyla %0,5 SDS içeren salım ortamı kullanılarak hazırlanan 1,5 µg/ml, 3 µg/ml ve 4,5 µg/ml konsantrasyonlarda Dil çözeltileri 37°C'de karanlık ortamda inkübe edilerek, 24 saat sonunda absorbansları ölçülmüştür. Başlangıç ve inkübasyon sonrası yapılan ölçümlerde elde edilen absorbans değerleri t testi ile karşılaştırılmış ve anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemiştir.

4.1.2. ICG için Miktar Tayin Yönteminin Geliştirilmesi ve Validasyonu

ICG'nin maksimum absorbans verdiği dalga boyunun belirlenmesi için spektrumu taranmıştır. ICG içeren DMSO çözeltisinin maksimum absorbans verdiği dalga boyunun ($\lambda_{\text{maks-ICG}}$) 795 nm olduğu belirlenmiştir.

Doğrusallık

ICG'e ait kalibrasyon doğrusu, 0,4, 0,8, 1,2, 1,6, 2, 2,4, 2,8 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda ICG'nin DMSO içerisindeki çözeltileri hazırlanarak 795 nm dalga boyundaki absorbanslarının belirlenmesi ile elde edilmiştir. Çalışmalar 6 seri üzerinden gerçekleştirilmiştir. Çözeltilerin UV absorbansları çözeltilerin konsantrasyonlarına karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon doğrusuna ait denklem lineer regresyon ile bulunmuştur. Kalibrasyon doğrusu ve denklemi ise Şekil 4.3'de yer almaktadır. Tanımlayıcılık katsayısı $R^2 = 0,9998$ olarak bulunarak denklemin doğrusallığı gösterilmiştir. Bununla birlikte 0,4 ve 2,8 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyondaki çözeltilerin varyasyon katsayıları %2'nin altında bulunmuştur.



Şekil 4.3. ICG'nin DMSO içerisindeki çözeltilerinin UV absorbansları kullanılarak elde edilen kalibrasyon doğrusu.

Doğruluk ve Geri Elde

Analitik yöntemin doğruluğu gün içi ve günler arası olarak incelenmiş ve varyasyon katsayısı değerleri %2'nin altında, geri kazanım değerleri ise %98-102 aralığında bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar ile yöntemin uygun doğrulukta olduğu gösterilmiştir (Tablo 4.5).

Tekrar Edilebilirlik

ICG'in 1,2 µg/ml, 1,6 µg/ml ve 2 µg/ml konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltilerinin 6 ayrı kez ölçülmesi ile elde edilen absorbans değerlerinin kalibrasyon doğrusunda kullanılması ile hesaplanan konsantrasyonların ortalama ve varyasyon katsayısı değerleri hesaplanarak değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.6'da özetlenmiş ve varyasyon katsayısı değerleri %2'nin altında bulunmuştur.

Tablo 4.5. ICG'in analitik metot validasyonuna ait doğruluk ve geri elde sonuçları.

Deneysel sonuçlar

Teorik konsantrasyon (µg/ml)	Gün içi			Günler arası		
	Ortalama (µg/ml)	Geri elde (%)	Varyasyon Katsayısı (%)	Ortalama (µg/ml)	Geri elde (%)	Varyasyon Katsayısı (%)
1,2	1,21	100,5	1,6	1,21	100,5	1,2
1,6	1,62	101	1,1	1,62	101,5	0,9
2	1,97	98,7	1,14	1,98	99,2	1

Tablo 4.6. ICG'in analitik metot validasyonuna ait tekrar edilebilirlik sonuçları.

Konsantrasyon (µg/ml)	Hesaplanan konsantrasyonların ortalaması (µg/ml)	Varyasyon katsayısı (%)
1,2	1,22	0,3
1,6	1,62	0,5
2	1,99	0,2

Özgünlük

Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarında kullanılan PVA, PLGA gibi maddelerin olası en yüksek kalıntısının 555 nm dalga boyunda, 1,6 µg/ml konsantrasyondaki ICG çözeltisinin %2'sinden az absorbans verdiği belirlenmiştir.

4.2. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

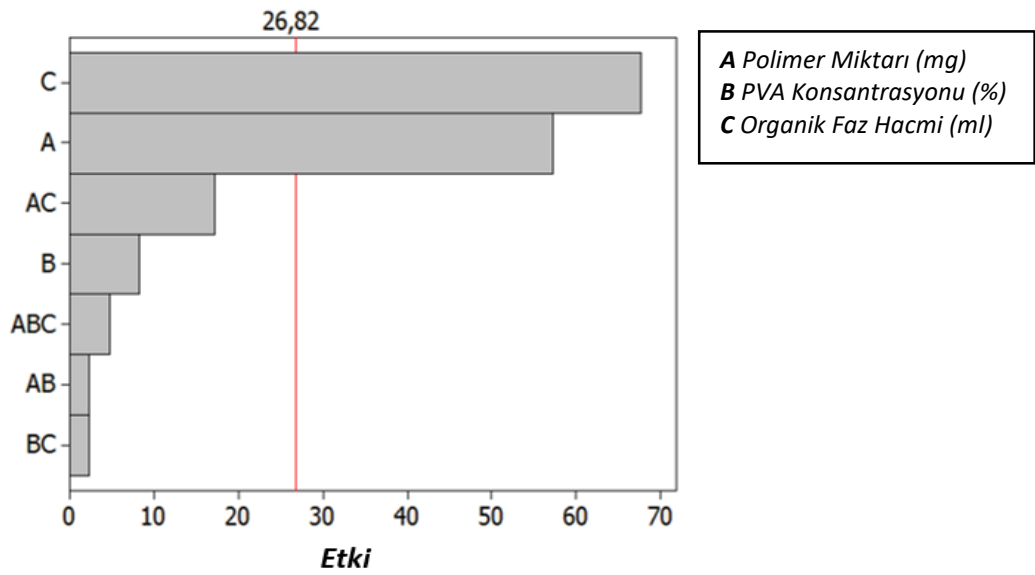
4.2.1. PLGA Nanopartiküllerinin Partikül Büyüklüğüne Etki Eden Parametrelerin Belirlenmesi

Farklı formülasyon değişkenlerinin nanopartiküllerin büyüklüğüne etkisinin belirlenmesi amacıyla 2³ faktöriyel deney tasarımı Minitab® programı ile tasarlanmış ve değerlendirilmiştir. 107-245 nm arasında değişen partikül büyüklükleri elde edilmiştir (Tablo 4.7).

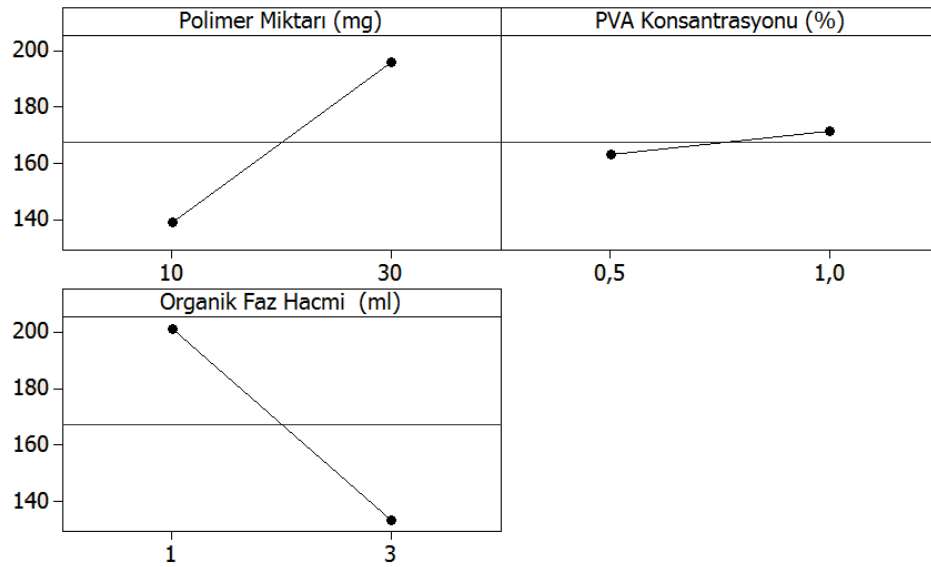
Tablo 4.7. PLGA nanopartiküllerinin ortalama partikül büyüklüğüne etki eden faktörlerin araştırılması amacıyla hazırlanan deney tasarımı ve cevap değerleri.

	X ₁ Polimer Miktarı (mg)	X ₂ PVA Konsantrasyonu (%)	X ₃ Organik Faz Hacmi (ml)	Y Ortalama Partikül Büyüklüğü (nm)
PLGA F ₁	30	0,5	1	232
PLGA F ₂	10	1	1	168
PLGA F ₃	10	0,5	1	160
PLGA F ₄	30	0,5	3	154
PLGA F ₅	30	1	1	245
PLGA F ₆	10	1	3	120
PLGA F ₇	30	1	3	153
PLGA F ₈	10	0,5	3	107

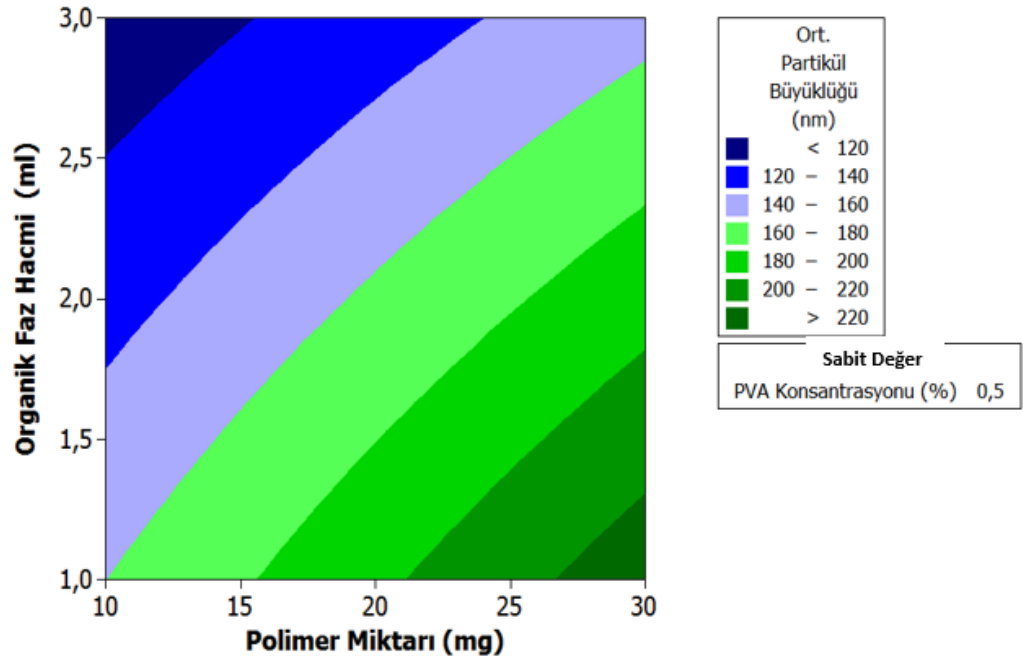
Tasarıma etki eden parametreler %95 güven aralığında incelendiğinde ortalama partikül büyüklüğüne etki eden, istatistiksel olarak anlamlı temel iki değişkenin polimer miktarı ve organik faz hacmi olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.4). Bu etkiler ana etki grafikleri, kontor ve yüzey grafikleri ile incelendiğinde artan polimer miktarının partikül büyüklüğünü arttırdığı, artan organik faz hacminin ortalama partikül büyüklüğünü azalttığı belirlenmiştir (Şekil 4.5-7).



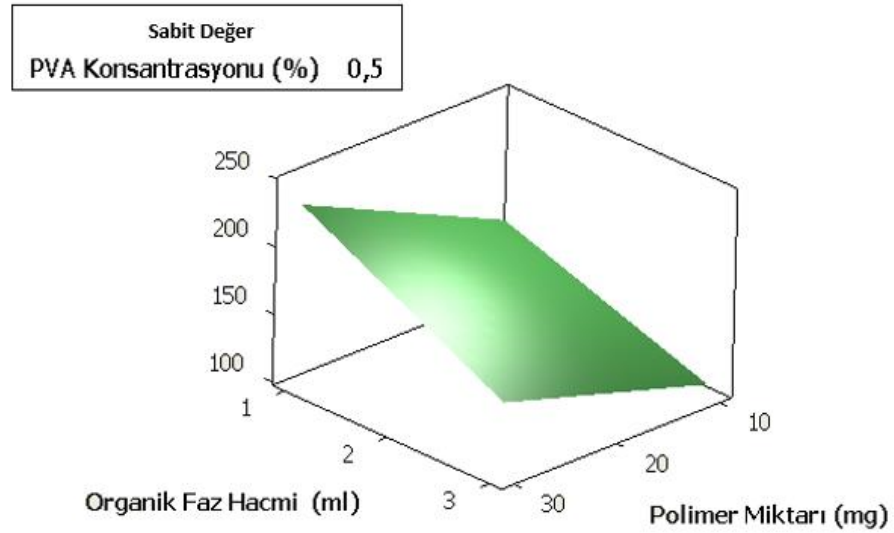
Şekil 4.4. PLGA nanopartiküllerinin ortalama partikül büyüklüğüne anlamlı seviyede etki eden faktörlerin belirlenmesi amacıyla geliştirilmiş pareto grafiği.



Şekil 4.5. PLGA nanopartiküllerinin ortalama partikül büyüklüğüne incelenen faktörlerin etkileri.



Şekil 4.6. PLGA nanopartiküllerinin ortalama partikül büyüklüğüne polimer miktarı ve organik faz miktarının etkisinin kontur plot grafikleri ile gösterimi.



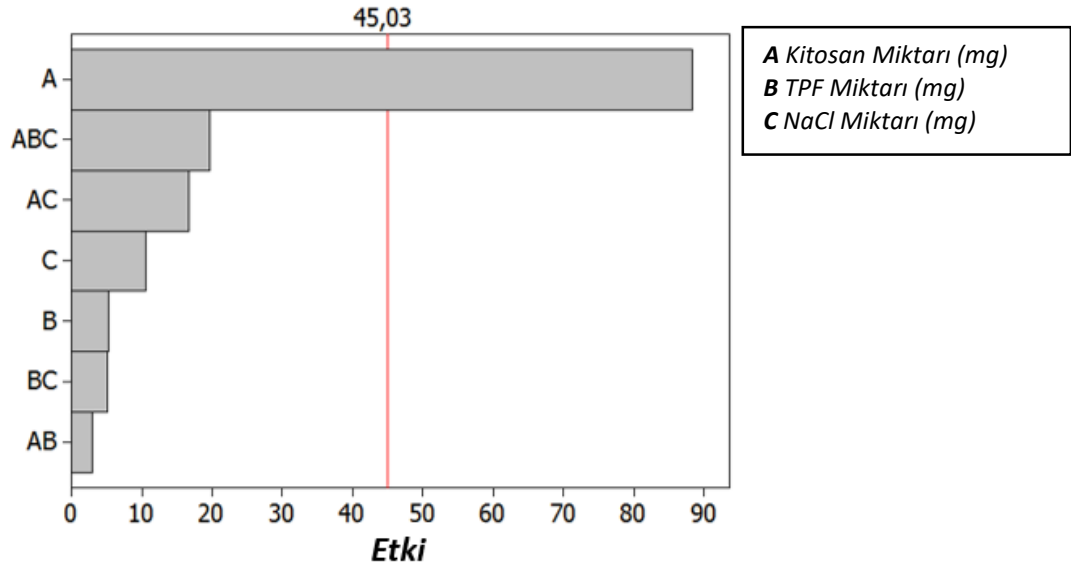
Şekil 4.7. PLGA nanopartiküllerinin ortalama partikül büyüklüğüne polimer miktarı ve organik faz miktarının etkisinin yüzey cevap grafikleri ile gösterimi.

4.2.2. Kitosan Nanopartiküllerinin Partikül Büyüklüğüne Etki Eden Parametrelerin Belirlenmesi

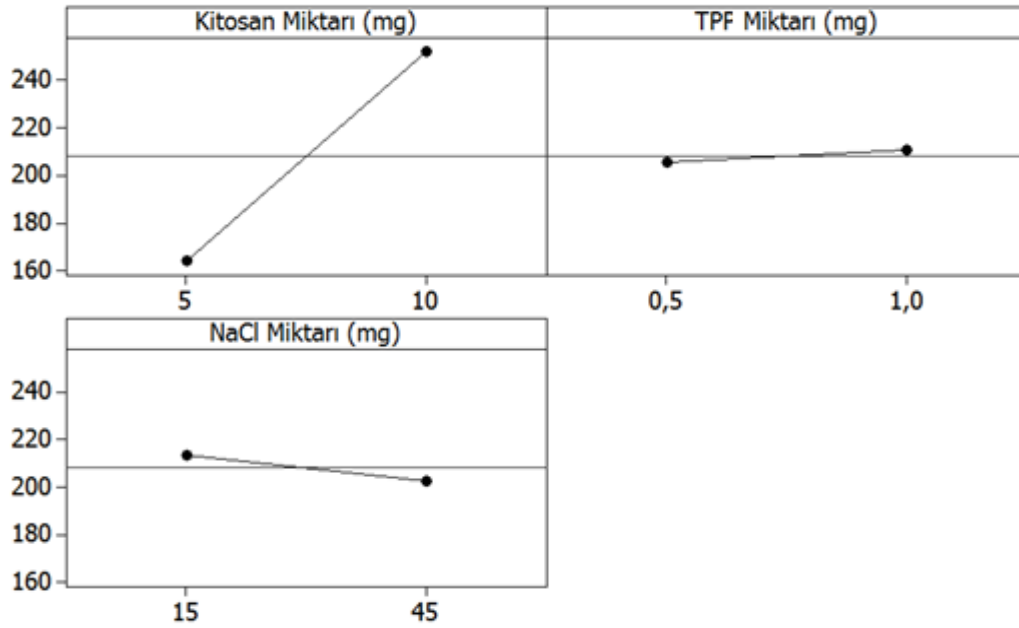
PLGA nanopartikülleriyle karşılaştırabilmek için PLGA nanopartiküllerine yakın büyüklükte kitosan nanopartiküllerinin belirlenmesi amacıyla 2^3 faktöriyel tasarımıyla partikül büyüklüğüne etkili parametreler ve etki seviyeleri Minitab® programı ile belirlenmiştir. 161-274,3 nm arasında değişen partikül büyüklükleri elde edilmiştir. Formülasyonlara ait partikül büyüklükleri Tablo 4.8’de verilmiştir. Deneye etki eden faktörlerin pareto grafiğine bakıldığında (Şekil 4.8) kitosan miktarının partikül büyüklüğünü belirleyen temel faktör olduğu belirlenmiştir. Artan kitosan miktarıyla partikül büyüklüğünde artış gözlemlenirken TPF ve NaCl miktarındaki değişiklik anlamlı bir partikül büyüklüğünde değişimine sebep olmamıştır. (Şekil 4.9-11).

Tablo 4.8. Kitosan nanopartiküllerinin ortalama partikül büyüklüğünr etki eden faktörlerin araştırılması amacıyla hazırlanan deney tasarımı ve cevap değerleri.

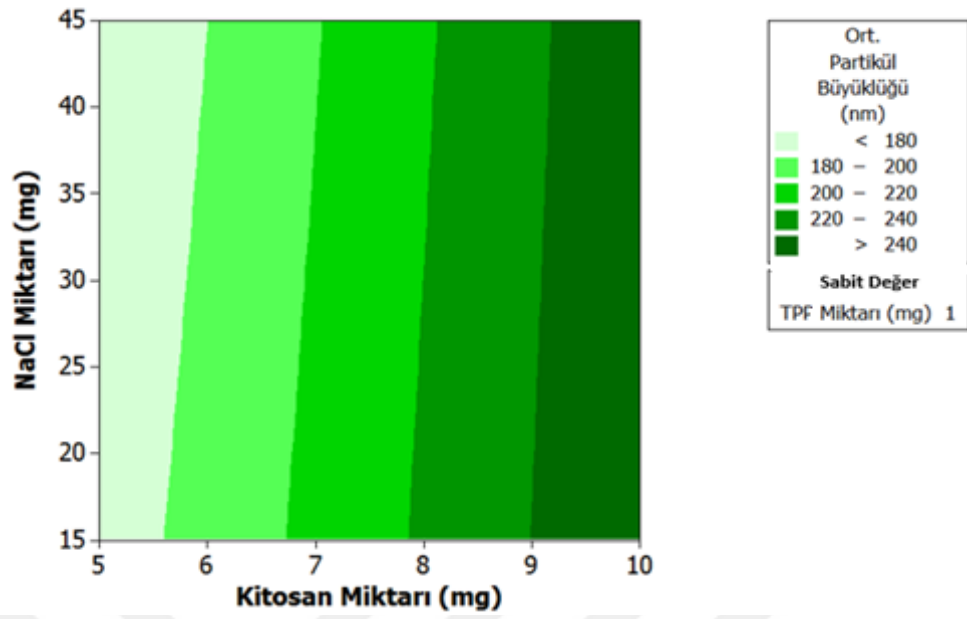
	X ₁ Kitosan Miktarı (mg)	X ₂ TPF Miktarı (mg)	X ₃ NaCl Miktarı (mg)	Y Ortalama Partikül Büyüklüğü (nm)
Kitosan F ₁	10	1,0	15	257
Kitosan F ₂	5	1,0	45	161
Kitosan F ₃	5	1,0	15	169
Kitosan F ₄	5	0,5	15	152
Kitosan F ₅	10	1,0	45	255
Kitosan F ₆	5	0,5	45	173
Kitosan F ₇	10	0,5	45	222
Kitosan F ₈	10	0,5	15	274



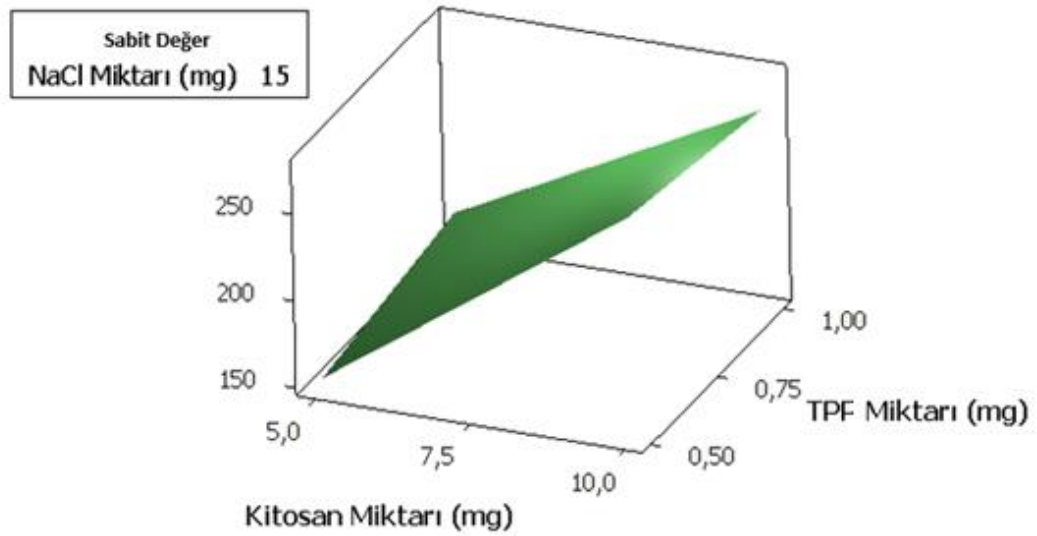
Şekil 4.8. Kitosan nanopartiküllerinin ortalama partikül büyüklüğüne anlamlı seviyede etki eden faktörlerin belirlenmesi amacıyla geliştirilmiş pareto grafiği.



Şekil 4.9. Kitosan nanopartiküllerinin ortalama partikül büyüklüğüne incelenen faktörlerin etkileri.



Şekil 4.10. Kitosan nanopartiküllerinin ortalama partikül büyüklüğüne polimer miktarı ve NaCl miktarının etkisinin kontur plot grafikleri ile gösterimi.

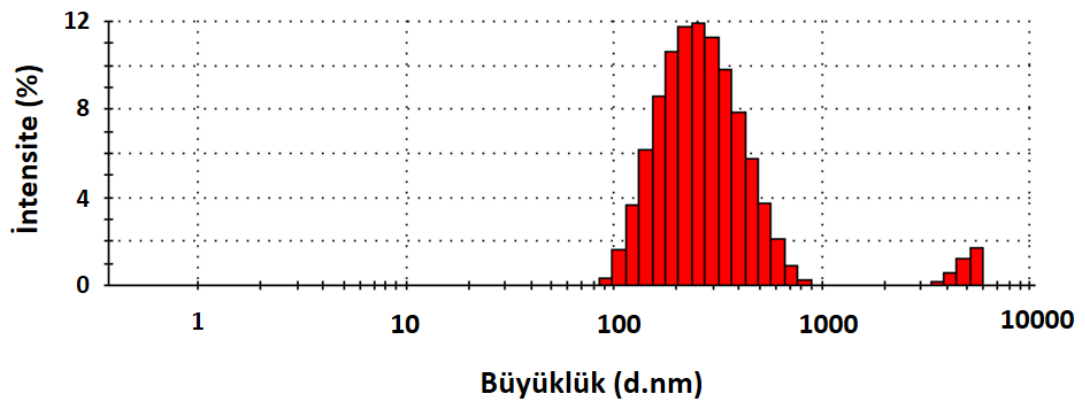


Şekil 4.11. Kitosan nanopartiküllerinin ortalama partikül büyüklüğüne polimer miktarı ve TPF miktarının etkisinin yüzey cevap grafikleri ile gösterimi.

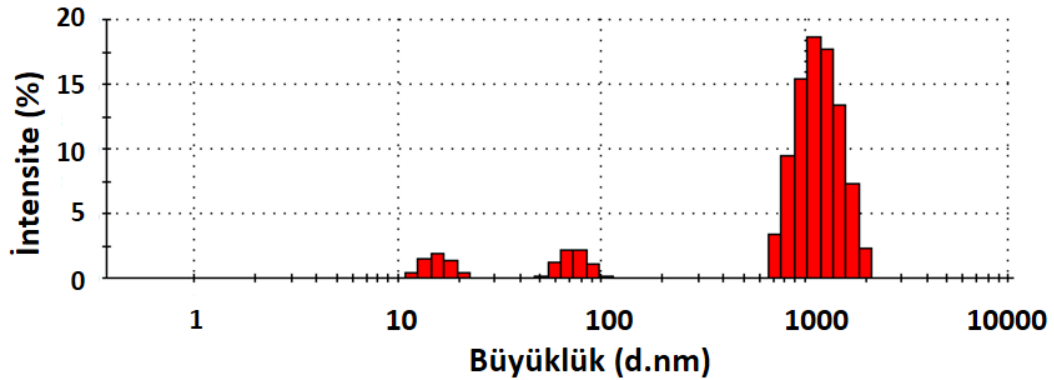
4.3. PLGA ve Kitosan Nanopartiküllerinin Hücre Kültürü Ortamında Stabilitelerinin Değerlendirilmesi

Deney tasarımı sonuçlarından yola çıkarak benzer büyüklükte PLGA ve kitosan nanopartikülleri elde edilmiştir. Ancak nanopartiküllerin hücre kültürü ortamında stabilitesi belirlenirken PLGA nanopartiküllerinin besiyeri ortamında partikül büyüklüğünü koruduğu, kitosan nanopartiküllerinin ise agregre olduğu belirlenmiştir. Bu agregasyon (Şekil 4.12-13) nedeniyle kitosan nanopartiküllerinin farklı büyüklükte hücre içine alıma etkisinin belirlenmesi olanaksız bulunmuştur. Bu bilgilerden yola çıkarak farklı büyüklükte nanopartiküllerin hücre içine alımının karşılaştırılmasına PLGA nanopartikülleri kullanılarak devam edilmiştir. Kitosan nanopartiküllerinin agregasyonu partikül büyüklüğünün karşılaştırılmasını anlamsız kılmıştır fakat daha önceki çalışmalarda kullanılan beyne hedeflendirilmiş kitosan nanopartiküllerinin beyin endotel hücrelerine hangi yolla alındığının araştırılması gereksimi doğmuştur.

Bu nedenle çalışmalara ayrı iki başlık altında devam edilmiştir.



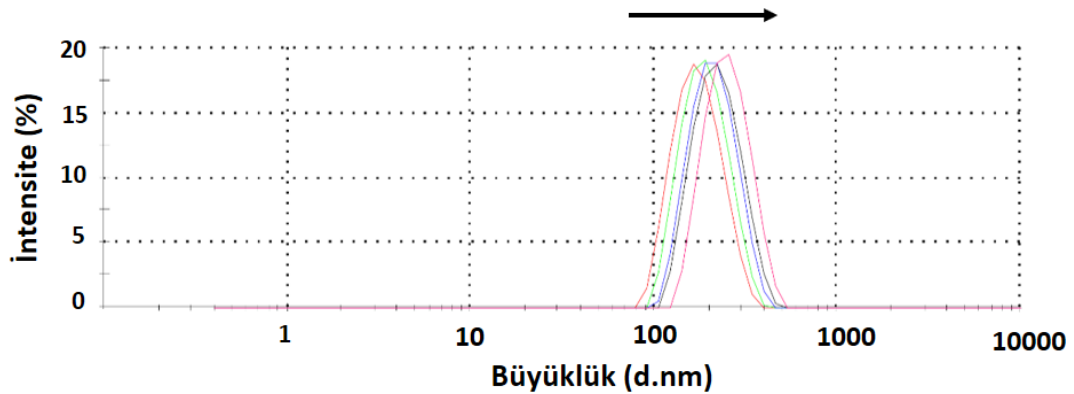
Şekil 4.12. Ultra saf su içerisinde dağıtılmış kitosan nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü dağılımları. (Ortamala partikül büyüklüğü: 253,7 nm, PDI: 0,266)



Şekil 4.13. Tamamlanmış besiyeri içerisinde kitosan nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü dağılımı. (Ortamala partikül büyüklüğü: 697,2 nm, PDI: 0,723)

4.4. Farklı Büyüklükte PLGA Nanopartiküllerinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Tez kapsamında, PLGA nanopartiküllerinin hazırlanmasında kullanılan nanopresipitasyon yönteminin sağladığı partikül büyüklüğü limitleri içerisinde iki farklı partikül büyüklüğü elde edilmesi hedeflenmiştir. Elde edilen pareto grafiği polimer miktarının organik faza oranının partikül boytuna etki eden temel faktör olduğunu göstermiştir. Sitotoksitenin en düşük seviyede tutulması ve hücre içine alımın daha yüksek seviyede olması için PLGA nanopartikülleri organik faz hacmi ve PVA konsantrasyonu en düşük seviyede sabitlenerek elde edilmiştir. Değişen polimer miktarının partikül büyüklüğünr etkisi belirlenen limitler içerisinde daha detaylı olarak incelenmiştir. Bu sonuçlar artan polimer konsantrasyonunun lineer olarak partikül büyüklüğünde artışa sebep olduğunu göstermiştir (Şekil 4.14, Şekil 4.16.A). Karşılaştırılacak farklı büyüklükteki partiküller üst ve alt polimer konsantrasyonları ile elde edilmiştir.

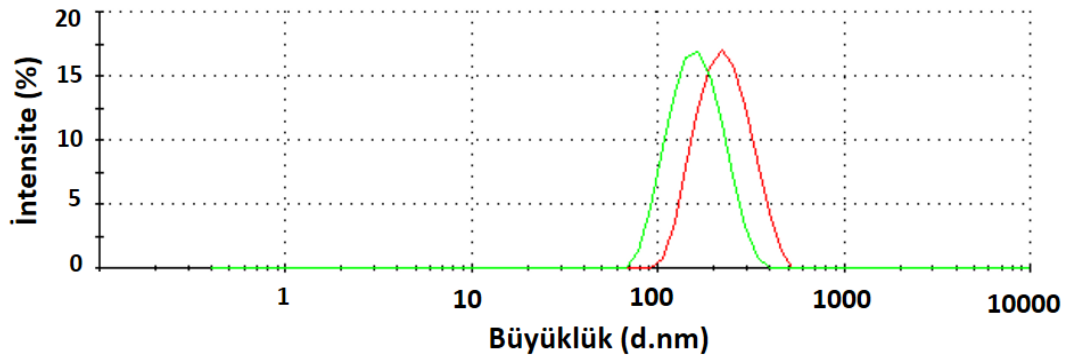


Şekil 4.14. Değişen polimer/organik faz konsantrasyonuna karşı PLGA nanopartiküllerinin partikül büyüklüğündeki değişim. Dağılımlar sırasıyla 5, 10, 15, 20, 25, 30 mg/ml konsantrasyonları kullanılarak elde edilen nanopartikül formülasyonlarına aittir.

Farklı büyüklükteki PLGA nanopartikülleri PLGA₂₃₀ ($230,8 \pm 4,32$ nm) ve PLGA₁₆₀ ($157,9 \pm 6,16$ nm) olarak belirlenmiştir. Bu formülasyonların PDI değerleri her ikisi içinde 0,15'den küçük bulunmuştur. Zeta potansiyel değerleri sırasıyla $-6,32 \pm 0,9$ mV ve $-11,2 \pm 4,7$ mV olarak belirlenmiştir. Zeta potansiyel değerlerindeki bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı bulunmamıştır ($P > 0.05$). Bu formülasyonların enkapsülasyon etkinlikleri sırasıyla $\% 57,1 \pm 2,9$ ve $\% 25,7 \pm 1,7$ olarak bulunmuştur. Hazırlama kısmında hedeflenen aynı boya konsantrasyonuna sahip nanopartiküllerin elde edilmesi hücre kültürü çalışmalarının daha net yorumlanabilmesi için başarıyla sağlanmıştır. Tüm bu değerler Tablo 4.9'da özetlenmiştir.

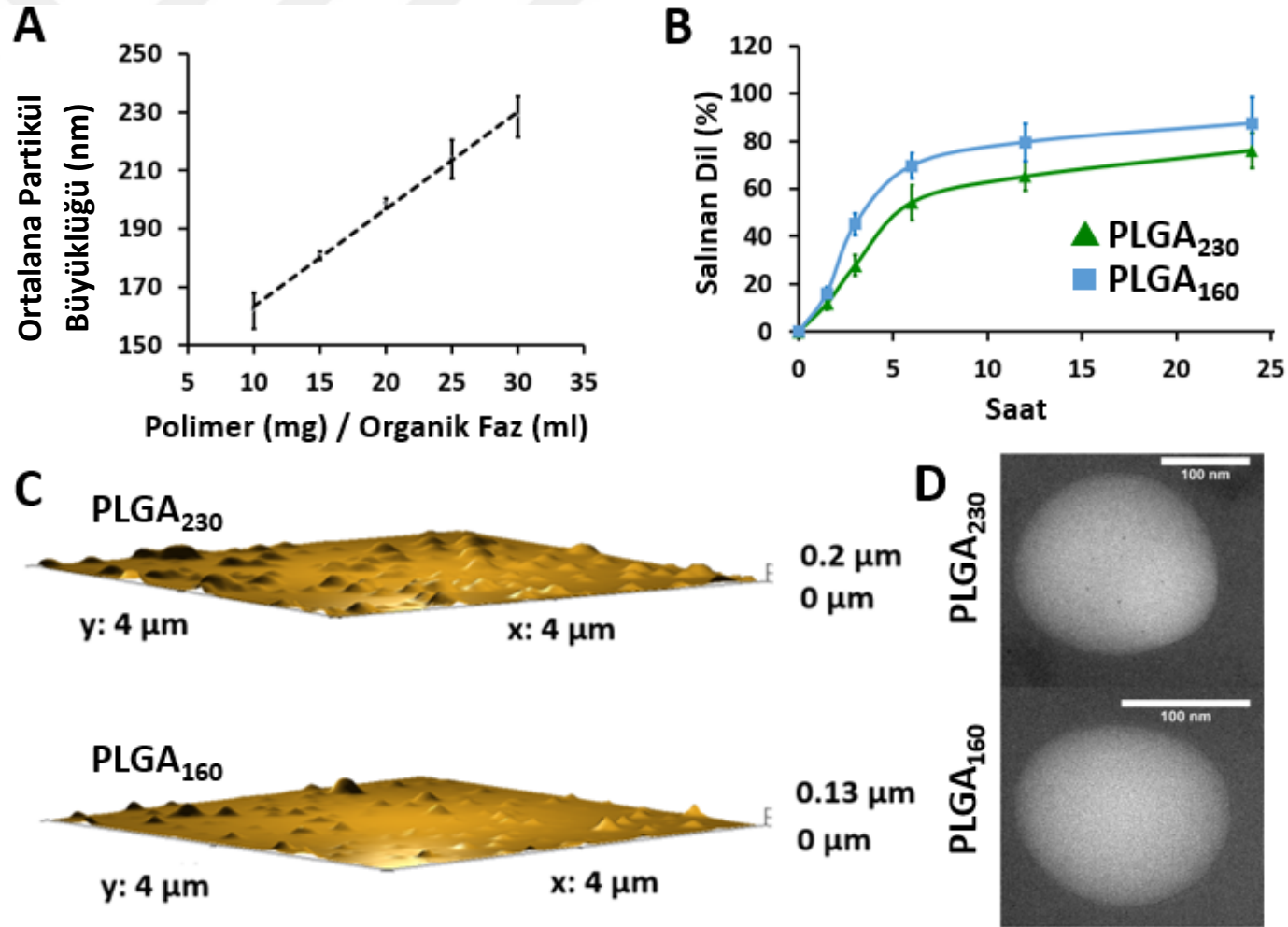
Tablo 4.9. Dil işaretli PLGA₂₃₀ ve PLGA₁₆₀ nanopartiküllerinin karakteristik özellikleri.

	Ortalama Partikül Büyüklüğü (nm)	Hücre kültürü ortamında 24 saat sonra Ortalama Partikül Büyüklüğü (nm)	PDI	Zeta Potansiyel (mV)	EE (%)	Nanopartikülde bulunan boya miktarı ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
PLGA ₁₆₀	$157,9 \pm 6,16$	$152,3 \pm 4,54$	$0,10 \pm 0,04$	$-11,2 \pm 4,7$	$25,7 \pm 1,7$	$0,61 \pm 0,03$
PLGA ₂₃₀	$230,8 \pm 4,32$	$210,2 \pm 8,3$	$0,11 \pm 0,03$	$-6,32 \pm 0,9$	$57,1 \pm 2,9$	$0,62 \pm 0,04$



Şekil 4.15. PLGA₂₃₀ (Kırmızı) ve PLGA₁₆₀ (Yeşil) nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü dağılımları.

Elde edilen bu formülasyonların partikül büyüklükleri ve şekilleri AFM ve TEM analizleri ile incelenmiştir. Bu analizler neredeyse küresel partikül şekline sahip nanopartiküllerin varlığını göstermiş, partikül büyüklükleri arasındaki fark dinamik ışık saçılımı metodu sonucuna benzer bir şekilde gösterilmiştir (Şekil 4.16.C-D). Partiküllerin hücre kültürü ortamındaki partikül büyüklükleri stabil bulunmuş, ölçüme dahil olan hücre kültürü bileşenleri nedeniyle sudaki ölçümüne göre biraz daha düşük değerler elde edilmiştir (Tablo 4.9). Nanopartiküllerden boya salımı incelendiğinde ise ilk 6 saatte ani bir ilaç salımını takiben kontrollü salımın takip etmesi her iki formülasyonda da görülmüştür (Şekil 4.16.B). Bununla birlikte PLGA₂₃₀ nanopartiküllerinin PLGA₁₆₀ nanopartiküllerine kıyasla daha yavaş boya salımına sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bu salım profilleri fark faktörü (f_1) ve benzerlik faktörü (f_2) kullanılarak incelendiğinde salım profillerinin farklı olduğu belirlenmiştir ($f_1=27$, $f_2=44$).



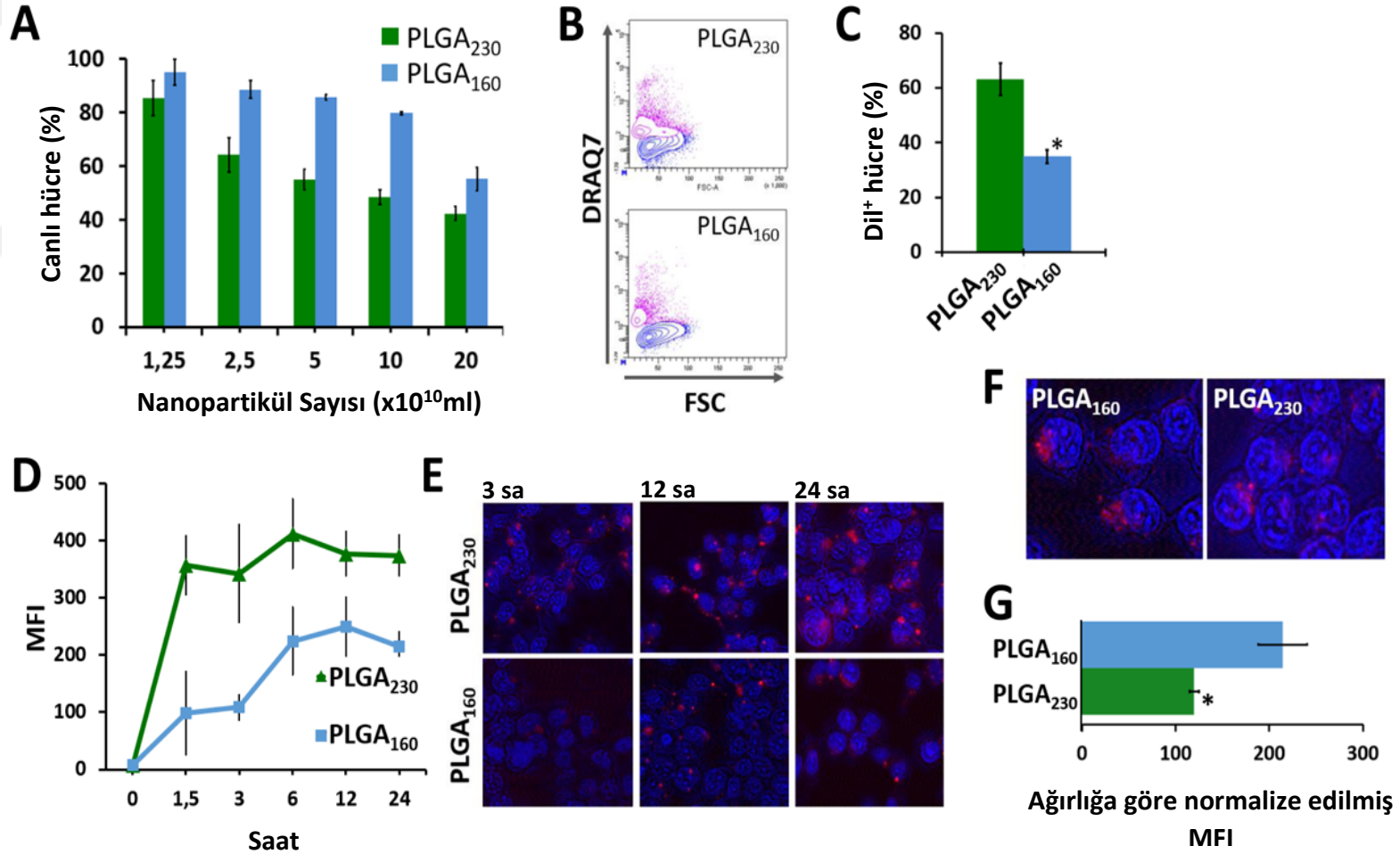
Şekil 4.16. PLGA₂₃₀ ve PLGA₁₆₀ nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü ve salım özellikleri. A) Dil ile işaretlenmiş PLGA nanopartiküllerinin polimer konsantrasyonuna göre ortalama partikül büyüklüğünün değişimi, B) PLGA₂₃₀ ve PLGA₁₆₀ nanopartiküllerinden boya salımı, bu formülasyonlara ait AFM (C) ve TEM (D) görüntüleri.

4.5. Farklı Büyüklükte PLGA Nanopartiküllerinin Sitotoksitesinin, Hücre İçine Alım Kinetiğinin ve Mekanizmasının Belirlenmesi

PLGA₂₃₀ ve PLGA₁₆₀ nanopartiküllerinin sitotoksitesileri incelendiğinde 1.25×10^{10} sayıda nanopartikül aynı sayıda hücreye uygulandıktan 24 saat sonra hücrelerin %80'inin canlı olduğu belirlenmiştir. Aynı sayıda nanopartikül uygulanmasının ardından PLGA₂₃₀ nanopartikülleri her konsantrasyonda PLGA₁₆₀ nanopartiküllerine göre toksik bulunmuştur. Hücre canlılığı ise her iki formülasyon için de artan konsantrasyona karşı azalmıştır (Şekil 4.17.A-B). Hücrelerin canlılığının 24 saat sonunda mümkün olduğu kadar yüksek olması için çalışmalar 1.25×10^{10} sayıda nanopartikül hücrelere uygulanacak şekilde sürdürülmüştür.

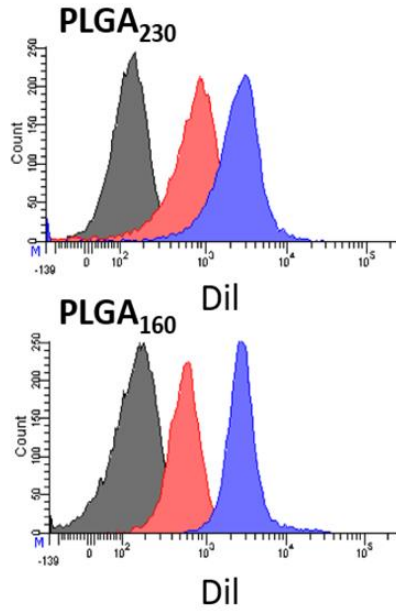
Floresan işaretli PLGA₂₃₀ ve PLGA₁₆₀ nanopartiküller hücrelere uygulandıktan 24 saat sonra sırasıyla hücrelerin % $63,1 \pm 4,9$ ve % $34,9 \pm 8,6$ 'u floresan özellik kazanmıştır (Şekil 4.17.C). Nanopartiküllerin hücre içine alım kinetikleri incelendiğinde ise PLGA₂₃₀ nanopartikülleri uygulanan hücrelerin ortalama floresan intensiteleri 1,5 saat sonunda maksimuma erişip daha sonra artış göstermezken, PLGA₁₆₀ nanopartikülleri uygulanan hücrelerin ortalama floresan intensiteleri 6 saat sonunda maksimum seviyeye ulaşmıştır (Şekil 4.17.D). Floresan mikroskop analizleri bu sonuçları doğrulamaktadır (Şekil 4.18.E).

Aynı sayıda nanopartikülün hücre içine alımının karşılaştırılmasında PLGA₂₃₀ ve PLGA₁₆₀ nanopartikülleri aynı yoğunlukta boya içerecek şekilde üretilmiş olmalarına rağmen farklı boya taşıma kapasitelerine sahip bu ilaç taşıyıcı nanopartiküllerin boya taşıma etkinliklerinin belirlenmesine olanak tanımıştır. Elde edilen MFI değerleri boya miktarına göre normalize edildiğinde ve aynı ağırlıkta nanopartikül eklenerek hücre içine alım değerlendirildiğinde PLGA₁₆₀ nanopartiküllerinin PLGA₂₃₀ nanopartiküllerine göre daha etkili taşıyıcı olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.17.F-G). Nanopartiküllerin hücre içine alımları +4 ve +37 °C'de tekrarlanarak incelendiğinde +4 °C'de de floresan boyanın hücrelere aktarımının her iki formülasyonda da söz konusu olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.18.A).

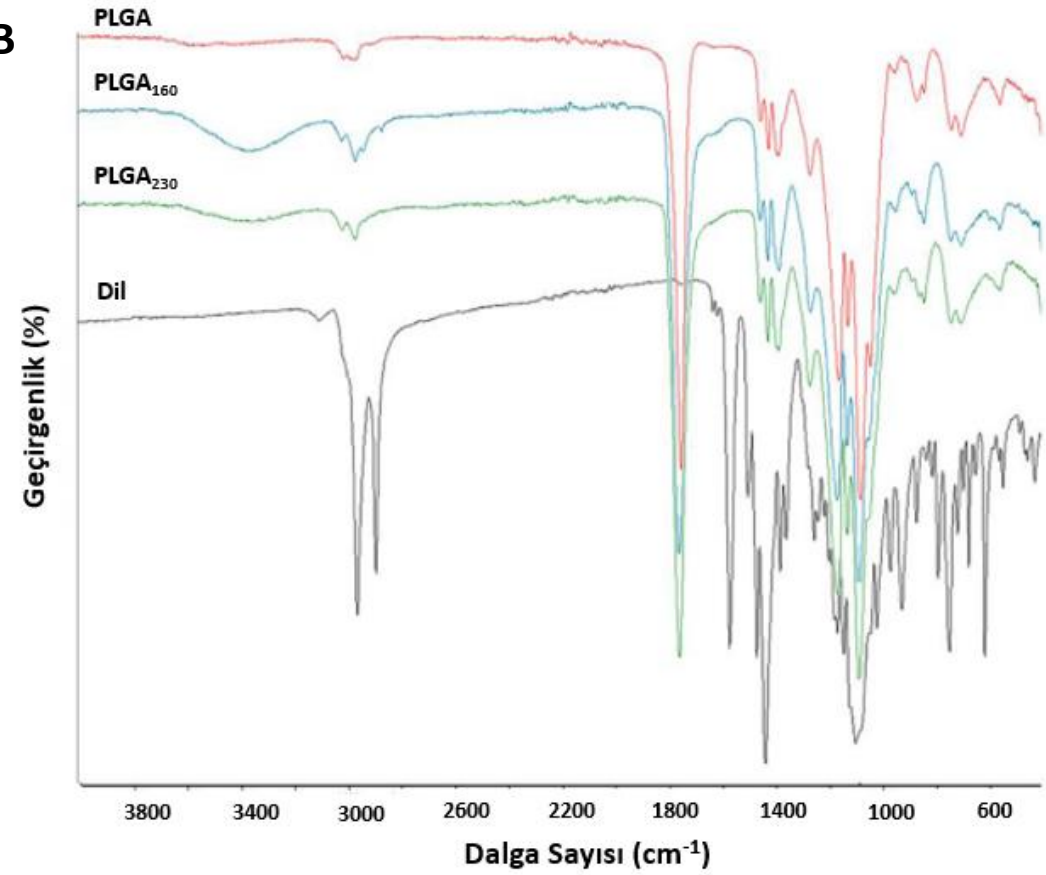


Şekil 4.17. PLGA₂₃₀ ve PLGA₁₆₀ nanopartiküllerinin aynı hücre sayısına aynı sayıda nanopartikül uygulandıktan sonra sitotoksitesi (A-B), Dil ile işaretli hücre yüzdesi (C), floresan işaretli hücrelerin ortalama intensitesindeki (MFI) değişim (D), bu değişimin mikroskop görüntüleri (E), aynı ağırlıkta uygulanan nanopartiküllerin 24 saat sonunda floresan mikroskop görüntüleri (F), 24 saat sonunda hücrelerin ortalama floresan intensitelerinin taşıdıkları boya miktarına göre normalize edilmesiyle elde edilen nanopartiküllerin hücre içine alım etkinlikleri (G) (* $P < 0.05$).

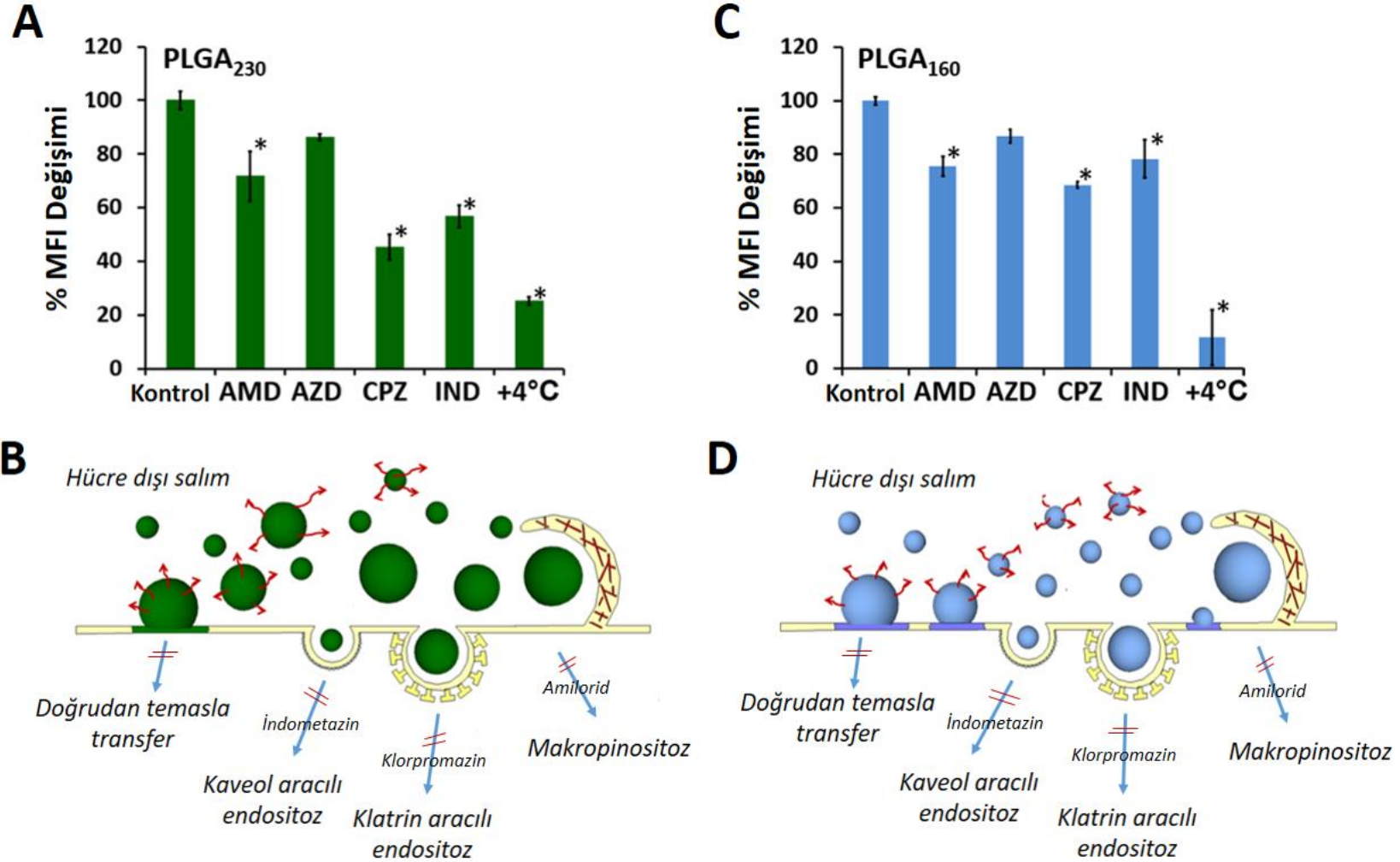
A



B



Şekil 4.18. PLGA nanopartikülleri ile +4 (Kırmızı) ve +37°C (Mavi)'de inkübe edilmiş HEK293 hücrelerinin ve nanopartikül eklenmemiş hücrelerin (Gri) akım sitometri histogramları (A) ve PLGA polimerinin, Dil'in, PLGA₂₃₀ ve PLGA₁₆₀ nanopartiküllerinin FTIR spektrumları (B).



Şekil 4.19. PLGA₂₃₀ (A-B) ve PLGA₁₆₀ (C-D) nanopartiküllerinin hücre içine alımına inhibitörlerin etkisi ve formülasyonların boya aktarım yollarının şematik gösterimi.

FTIR sonuçları incelendiğinde ise Dil'e ait karakteristik bantlar 2920, ve 2853 cm^{-1} de gözlemlenmiş ve PLGA₁₆₀ nanopartiküllerinde PLGA₂₃₀ nanopartiküllerine göre bu karakteristik pikler daha net bir şekilde belirlenmiştir (Şekil 4.18.B).

Hücre içine alım mekanizmalarının belirlenmesinde; öncesinde inhibitörler uygulanmış ardından hücreler üzerine aynı sayıda Dil ile işaretlenmiş PLGA₂₃₀ ve PLGA₁₆₀ nanopartikülleri eklenmiş ve MFI değerlerindeki değişim, inhibitör uygulanmamış kontrol grubuyla karşılaştırılarak ifade edilmiştir. Ayrıca PLGA nanopartiküllerinin hücre içine alım mekanizmalarına dair bulgular şematik olarak gösterilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde klorpromazinin, amiloridin ve indometazinin hücre içine alımı istatistiksel olarak anlamlı seviyede inhibe ettiği gösterilmiştir ($P<0,05$). Sodyum azid uygulanmasıyla inhibisyonda anlamlı seviyeye ulaşılmamasına karşın hücre içine alımda az bir seviyede azalma gözlenmiştir (Şekil 4.19).

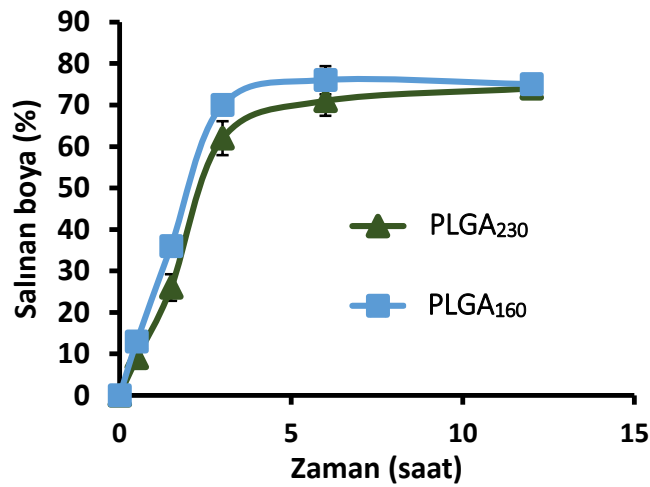
Kitosan nanopartiküllerinin (*ortalama partikül büyüklüğü: 164,1 ± 6,5 nm, PDI: 0,29 ± 0,03, zeta potansiyel: 26,4 ± 0,3 mV*) HEK293 hücreleri kullanılarak sitotoksiteleri ve hücre içine alım kinetikleri de beyin endotel hücreleriyle yapılacak çalışmalara ön fikir oluşturması amacıyla incelenmiştir. Bu ön çalışmada PLGA ile benzer büyüklükte kitosan nanopartikülleri 250 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyona kadar uygulanmasına rağmen canlılığın %90'ın üzerinde olduğu belirlenmiştir. PLGA konsantrasyonu 100 $\mu\text{g/ml}$ dozun üzerine çıkıldığında, bu sitotoksitite oranının %90'ın altına düştüğü belirlenmiştir. Aynı zamanda PLGA'le benzer konsantrasyonlarda uygulandıklarında 24 saat sonunda tüm hücrelerin floresan olarak işaretlendiği ve hücre içine alımının 24 saat süresince doğrusal bir kinetikle arttığı belirlenmiştir ($R^2= 0,87$). Kitosan nanopartikülleri kullanarak hCMEC/D3 hücreleri ile yapılacak çalışmalara, bu ön çalışma sonuçları ve literatür bilgileri göz önüne alınarak başlanmıştır. Bu çalışmalarda hücrelerle nanopartiküllerin inkübasyon süresi 3 saat ve kullanılacak nanopartikül konsantrasyonu 250 $\mu\text{g/ml}$ olarak belirlenmiştir.

4.6. Farklı Büyüklükte PLGA Nanopartiküllerinin Intraperitoneal Alıkonma Zamanının Belirlenmesi

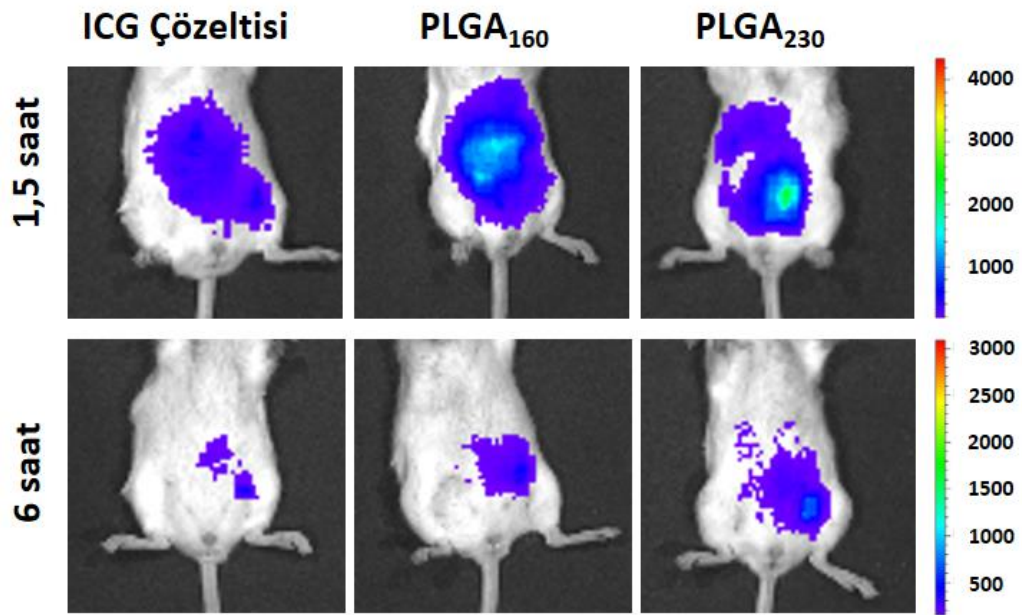
ICG yüklü PLGA₁₆₀ ve PLGA₂₃₀ nanopartikülleri Dil ile benzer partikül büyüklüğüne sahip şekilde başarıyla hazırlamıştır. PDI değerleri, zeta potansiyel değerleri, enkapsülasyon etkinlikleri gibi nanopartikül karakteristikleri Tablo 4.10'da listelenmiştir. ICG işaretli PLGA₁₆₀ ve PLGA₂₃₀ nanopartiküllerin salım grafikleri incelendiğinde ise PLGA₁₆₀ nanopartikülleri biraz daha hızlı ilaç salımı göstermesine rağmen in vitro ortamda yapılan bu salım çalışmasında fark anlamlı seviyeye ulaşmamıştır (Şekil 4.20) ($f_1=12$, $f_2=59$).

Tablo 4.10. ICG işaretli PLGA₂₃₀ ve PLGA₁₆₀ nanopartiküllerinin karakteristik özellikleri.

	Ortalama Partikül Büyüklüğü (nm)	PDI	Zeta Potansiyel (mV)	EE (%)	Nanopartikülde bulunan boya miktarı (µg/mg)
PLGA₁₆₀ nanopartikülleri	153,5 ±4,2	0,14±0,03	-11±3,1	4,75±0,8	0,51±0,05
PLGA₂₃₀ nanopartikülleri	227,9.7±10,2	0,14±0,06	-4,3±2,1	9,38± 1,9	0,52 ±0,07



Şekil 4.20. ICG işaretli PLGA₁₆₀ ve PLGA₂₃₀ nanopartiküllerin salım grafikleri.



Şekil 4.21. ICG çözeltisi, ICG yüklü PLGA₂₃₀ ve PLGA₁₆₀ nanopartiküllerinin intraperitoneal enjeksiyondan sonra alıkonma zamanları.

ICG çözeltisi, ICG işaretli PLGA₂₃₀ ve PLGA₁₆₀ tutunma zamanları karşılaştırıldığında ise 6 saat sonunda çözelti grubunun intensitesinin neredeyse yok olduğu, PLGA₂₃₀ nanopartiküllerinin PLGA₁₆₀ nanopartiküllerine göre daha odaklanmış ve daha yoğun intensiteye sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.21).

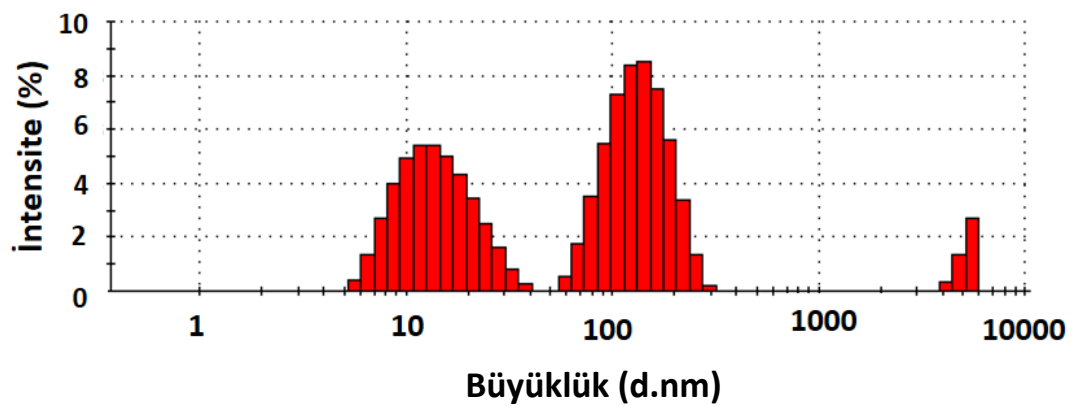
4.7. Beyne Hedeflendirilmiş Kitosan Naopartiküllerinin Karakterizasyonu ve Beyin Endotel Hücrelerine Alım Mekanizmalarının İncelenmesi

Antikor konjuge edilmemiş, Dil ile işaretlenmiş kitosan nanopartikülleri (TfRMAb (-)) başarıyla geliştirilmiş ve antikorla konjuge edildikten sonra (TfRMAb (+)) nanopartiküllerin karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. TfRMAb (-) nanopartiküllerinin ortalama partikül büyüklüğü, PDI ve 555 nm'deki absorbans değerlerinde antikor konjugasyonu sonrasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik belirlenmemiştir (Tablo 4.11). Formülasyonların ortalama partikül büyüklüğünün hücre kültürü ortamında stabil olup olmadığı araştırılmış, formülasyonlar hücre kültürü ortamında bir saat inkübe edildikten sonra her iki formülasyonunda 500 nm ile 1000 nm arasında değişen büyüklüklerde agreste olduğu, üç saat sonrasında ise 1000 nm'den büyük agregatlar oluştuğu belirlenmiştir (Tablo 4.11) (Şekil 4.23. D) Bu

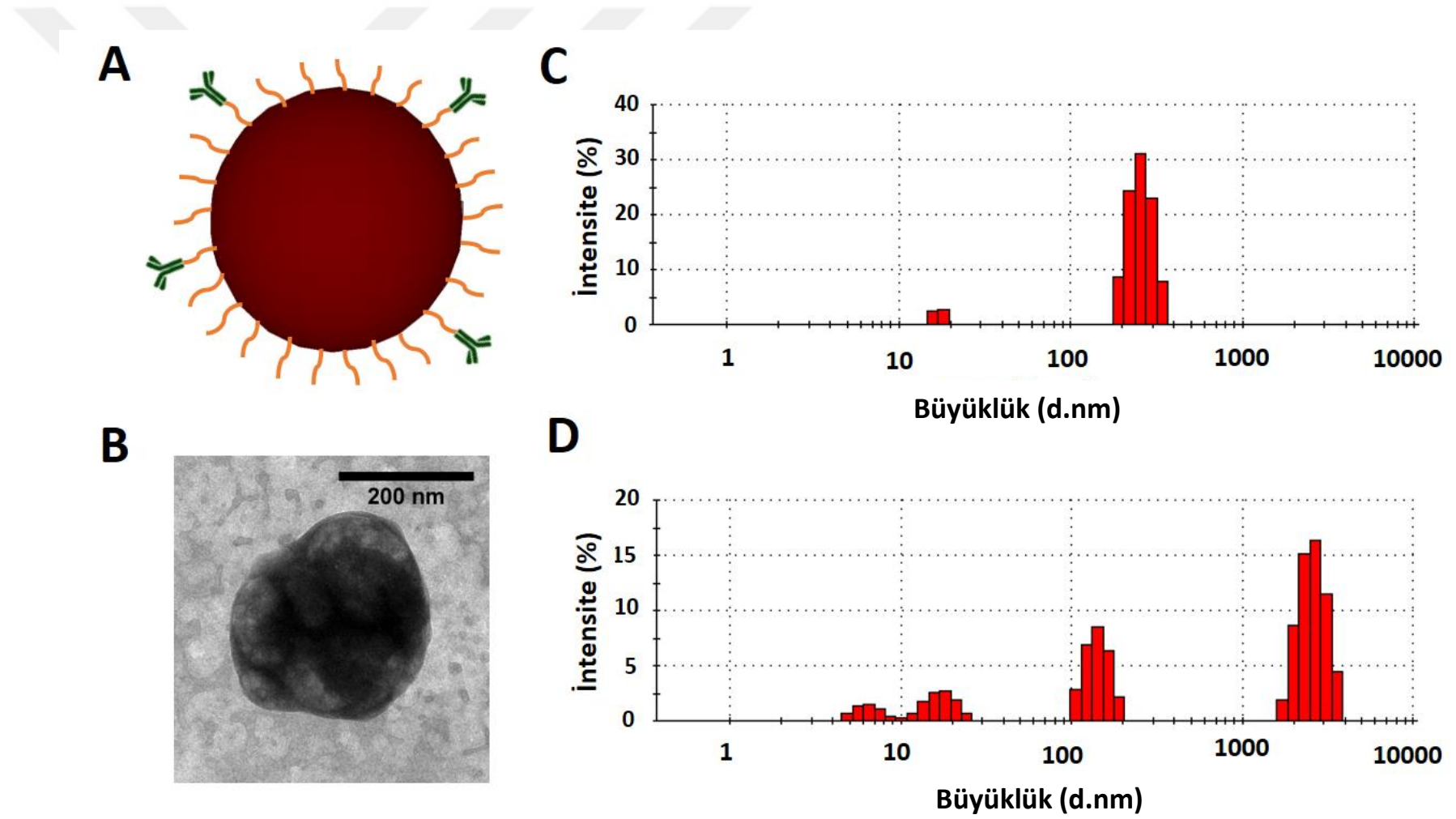
sonuçlar nanopartiküllerin hücre kültürü ortamında zamana bağlı olarak agregasyonu göstermiştir. Salım miktarları değerlendirildiğinde, TfRMAb (+) ve TfRMAb (-) formülasyonundan analiz süresi olan 3. saatin sonunda toplam boya salımının sırasıyla $0,15 \pm 0,03 \mu\text{g}/\text{mg}$ ve $0,16 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{mg}$ olduğu belirlenmiş bu değerler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Elde edilen TEM görüntüsü TfRMAb (+)'ın küresel yapıya sahip olduğunu göstermektedir (Şekil 4.23. B).

Tablo 4.11. TfRMAb (-) ve TfRMAb (+) nanopartiküllerinin karakteristik özellikleri.

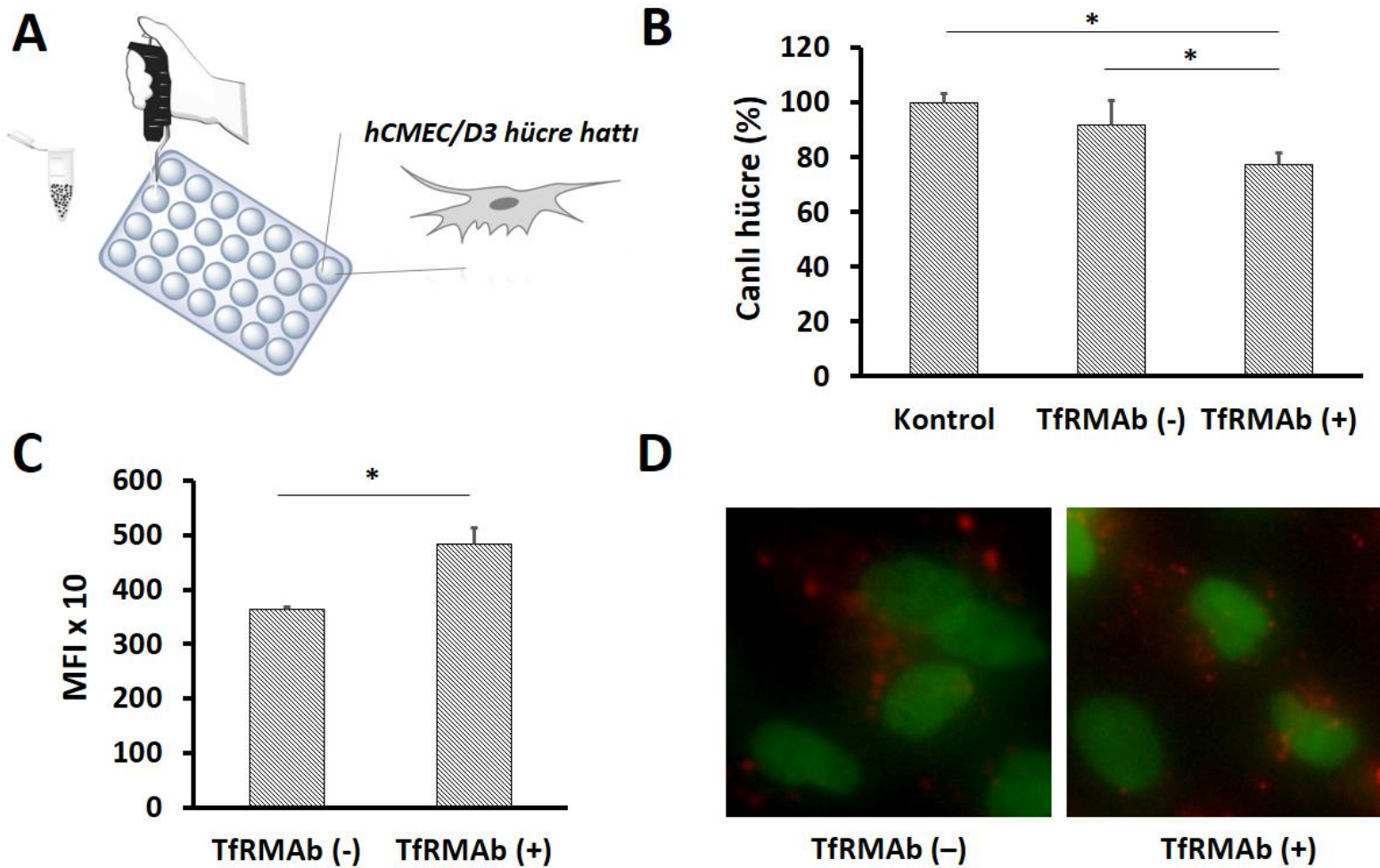
	Ortalama Partikül Büyükliği (nm)	PDI	Zeta Potansiyel (mV)	Hücre Kültürü Ortamında 1 sa. Sonra Ortalama Partikül Büyükliği	Hücre Kültürü Ortamında 3 sa. Sonra Ortalama Partikül Büyükliği
TfRMAb (-)	$274,1 \pm 32$	$0,45 \pm 0,13$	$29,7 \pm 1,7$	>500 nm (agregasyon gözlemlenmiştir)	>1000 nm (agregasyon gözlemlenmiştir)
TfRMAb (+)	$284,1 \pm 58,6$	$0,48 \pm 0,13$	$34,4 \pm 2,1$	>500 nm (agregasyon gözlemlenmiştir)	>1000 nm (agregasyon gözlemlenmiştir)



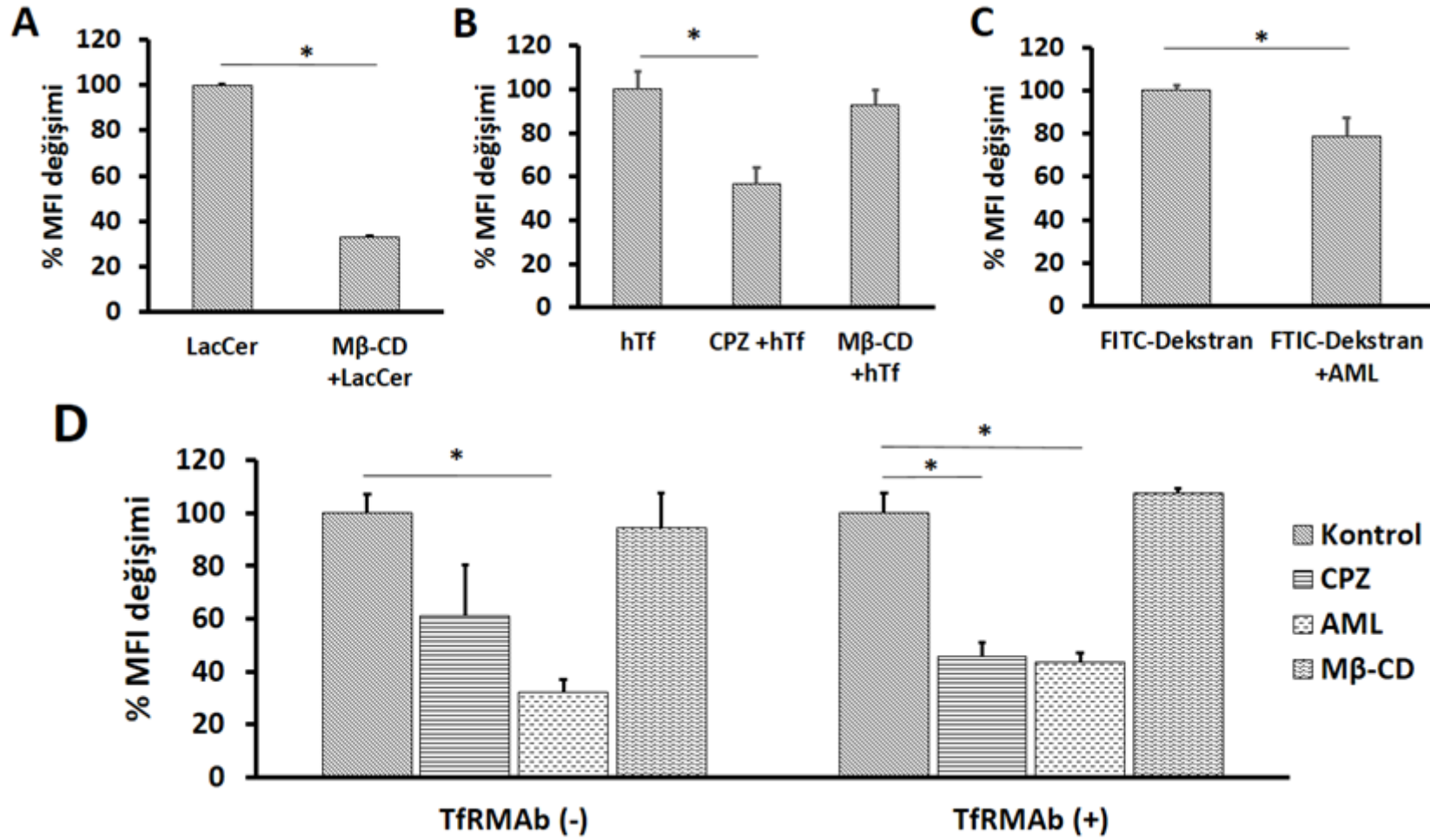
Şekil 4.22. Endogro besiyerinin nanopartiküller eklenmeden önceki partikül büyüklüğü dağılımı.



Şekil 4.23. TfRMAb (+) nanopartiküllerinin şematik gösterimi (A), TEM görüntüsü (B), DLS ile ultra saf su içerisinde elde edilen partikül büyüklüğü dağılımı (C) ve Endogro içerisinde 3 saat inkübe edilmiş nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü dağılımı (D).



Şekil 4.24. Hücre kültürü çalışmalarının şematik olarak gösterimi (A), TfRMAb (-) ve TfRMAb (+) nanopartiküllerinin hCMEC/D3 hücreleri üzerine sitotoksitesi (24 saat) (A), 3 saat inkübasyondan sonra bu hücrelerin MFI değerleri (C) ve floresan mikroskop görüntüleri (D).



Şekil 4.25. Endositoz inhibitörlerinin pozitif kontrol ajanlarının hücre içine alımına etkileri (A-C), TfrMAB (-) ve TfrMAB (+) nanopartiküllerinin hCMEC/D3 hücrelerine alımına endositoz inhibitörlerinin etkileri (D).

Hedeflendirilmiş ve hedeflendirilmemiş kitosan nanopartiküllerinin sitotoksiteleri karşılaştırıldığında 24 saat sonunda antikör konjuge edilmiş nanopartiküllerin daha fazla sitotoksite gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.24.B). Hücre içine alımları incelendiğinde ise TfRMAb (+) nanopartiküllerinin ortalama floresan intensite değerlerinin 3 saatin sonunda daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.24.C). Elde edilen floresan mikroskop görüntüleri hedeflendirilmiş nanopartiküllerin hücreye daha etkin bir şekilde alındığını, hedeflendirilmemiş nanopartiküllerin daha çok agregatlar şeklinde çekirdekten daha uzak bölgelerde bulunduğunu göstermiştir (Şekil 4.24.D). Klorpromazinin klatrin aracılı endositozu, amiloridin makropinositozu ve M β -CD'in sadece kaveol aracılı endositozu inhibe ettiği pozitif kontrol ajanlarıyla gösterilmiştir (Şekil 4.25.A-C). İnhibitör olarak amilorid kullanıldığında her iki formülasyon için de hücre içine alımda azalma görülürken, antikörle hedeflendirilmiş nanopartiküllerin hücre içine alımında amiloride ek olarak klorpromazin inhibisyonuyla hücre içine alım anlamlı bir seviyede azalmıştır (Şekil 4.25.D). Kitosan nanopartiküllerinin hücre içine alımına M β -CD anlamlı seviyede etki etmemiştir (Şekil 4.25.D).

5. TARTIŞMA

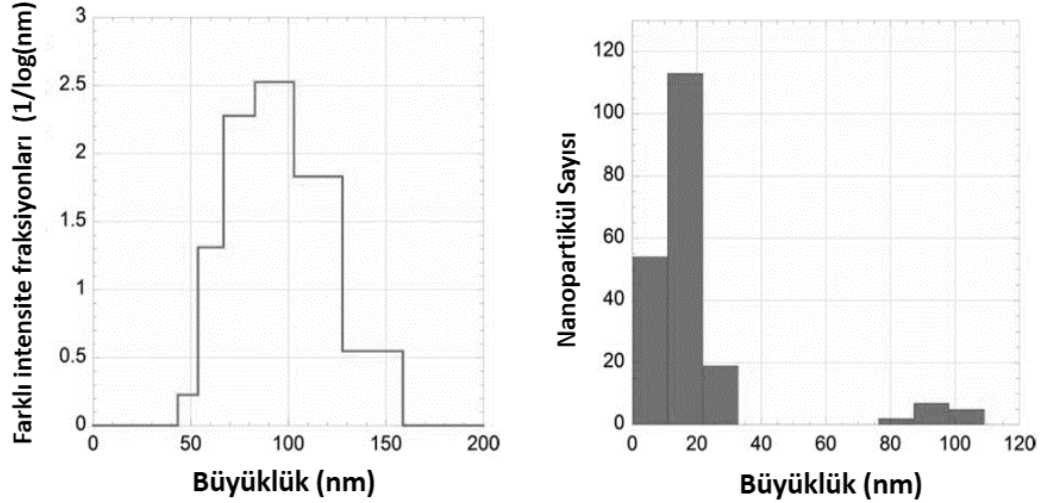
5.1. Nanopresipitasyon Metoduyla Farklı Partikül Büyüklüğüne Sahip PLGA Nanopartiküllerinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

PLGA nanopartiküllerinin hazırlanmasında birçok metot kullanılıyor olmasına rağmen daha hızlı ve enerji gerektirmeyen bir metot olması sebebiyle nanopresipitasyon sıklıkla tercih edilen bir metot haline gelmiştir. Tüm avantajlarına rağmen bu metodun en büyük dezavantajını partikül büyüklüğünün uzo bölgesi içinde sınırlı kalması oluşturmaktadır (54, 56, 181). Bu çalışmada uzo bölgesi içerisinde farklı partikül büyüklüğüne sahip PLGA nanopartikülleri elde edebilmek amacıyla temel formülasyon parametrelerinin partikül büyüklüğüne etkisi deney tasarımı ile incelenmiştir. Deney tasarımı incelenecek değişkenler polimer miktarı, organik faz hacmi ve PVA konsantrasyonu olarak belirlenmiştir. Cevap değerleri incelendiğinde elde edilen nanopartiküllerin partikül büyüklüğünün 107,7 ve 245,7 nm, PDI değerinin ise 0,1 ve 0,3 arasında değiştiği gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar nanopartiküllerin partikül büyüklüğünün beklendiği gibi uzo bölgesinde oluştuğunu göstermektedir. Bu tasarımdan yola çıkarak ortalama partikül büyüklüğüne etki eden temel faktörlerin polimer miktarı ve organik faz hacmi olduğu belirlenmiştir. Daha önceki çalışmalarda tamamen uzaklaştırılamamış organik solvanın özellikle nanopartiküllerin santrifüjlenmesi sırasında ciddi agregasyonlara sebep olduğu, uzaklaştırılamayan organik solvana bağlı olarak sitotoksikite gözlemlendiği belirlenmiştir (18). Bununla birlikte PVA kalıntısı nanopartiküllerin hücre içine alımını etkileyen bir diğer önemli faktördür ve artan PVA miktarının hücre içine alımı azalttığı önceki çalışmalarda gösterilmiştir (182). Bu bilgiler göz önünde bulundurularak en az sitotoksikite ile en fazla hücre alımının sağlanabilmesi amacıyla PVA konsantrasyonu ve organik faz hacmi en düşük seviyede sabitlenerek farklı büyüklükte PLGA nanopartikülleri polimer miktarındaki değişimle elde edilmiştir. Deney tasarımı sonuçları partikül büyüklüğünün organik fazda bulunan polimer konsantrasyonu ile doğru olarak değiştiğini göstermiştir. Bu partikül büyüklüğü büyümesi, organik fazın dış faza difüzyonu sırasında organik fazın artan viskozitesinin daha yavaş difüzyona sebep olması ve polimerin daha büyük partiküller şeklinde agregasyonu ile açıklanmaktadır (55). Nanopartiküllerin hazırlanmasında bir diğer kritik faktör polimer içeren fazı ve

dispersiyon ortamını ayıran yüzey etkin maddedir. Yüzey etkin maddelerin kullanımı nanopartiküllerin partikül büyüklüğü dağılımını ve enkapsülasyon etkinliğini etkilemektedir. PLGA nanopartiküllerinin hazırlanmasında PVA en çok kullanılan yüzey etkin maddedir. PVA kullanımıyla tekdüze ve kolay dağılabilir nanopartiküllerin üretilmesi mümkün olmaktadır (183). Bu çalışmada % 0,5'den düşük PVA kullanımıyla elde edilen nanopartiküllerin santrifüjünden sonra redisperse olması istenilen seviyede olmamış, % 1'in üzerinde PVA kullanımınınsa, suda çözünmeyen maddenin çözünmesine sebep olarak enkapsülasyonu azalttığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Bu nedenle çalışmada % 0,5-1 (a/h) aralığı test edilmiş ve bu aralıktaki PVA konsantrasyonundaki değişim, partikül büyüklüğünü önemli seviyede etkilememiştir. Organik faz miktarı ve PVA konsantrasyonu sabitlendikten sonra PLGA konsantrasyonunun partikül büyüklüğüne etkisi incelenmiş ve doğrusal bir şekilde arttığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda, polimer miktarındaki değişimle elde edilen PLGA nanopartiküllerinin üst ve alt limitleri olan PLGA₂₃₀ ($230,8 \pm 4,32$ nm) ve PLGA₁₆₀ ($157,9 \pm 6,16$ nm) nanopartikülleri, detaylı olarak karşılaştırılacak farklı büyüklükteki nanopartiküller olarak belirlenmiştir.

Bu iki formülasyonun PDI değerleri 0,15'den düşük bulunmuştur. Bu değer birçok kaynağa göre çok düşük bir partikül büyüklüğü dağılımına işaret etmektedir (12, 184). Partiküllerin şeklinin ve büyüklüğünün daha detaylı incelenmesi amacıyla DLS'e ek olarak TEM ve AFM analizleri de gerçekleştirilmiştir. TEM görüntüleri literatürle uyumlu olarak neredeyse küresel şekilde olup DLS ölçümlerine benzer şekilde nanopartiküllerin varlığını göstermiştir. Bu iki formülasyon arasındaki partikül büyüklüğü farkı AFM analizleri ile de belirlenmiştir. Fakat AFM analizleri DLS ölçümlerinden biraz daha küçük ortalama partikül büyüklüğünün ve 20-50 nm çapında partiküllerin de varlığını göstermektedir. Bu farklılık literatürde DLS ile ölçüm yapılırken oluşan hidrodinamik tabakanın partikül büyüklüğünün biraz daha fazla ölçülebilmesiyle açıklanmaktadır (124). Ayrıca yapılan çalışmalar büyük partiküllerin yoğun olarak var olduğu ortamlarda küçük nanopartiküllerin DLS metodu ile ölçülmediği göstermektedir. Yine AFM'le yapılan ölçümlerde partikül büyüklüğünün olağandan daha düşük gözükteği çalışmalar da literatürde yer almaktadır (120). Ayrıca bu sonuçlar, her ne kadar düşük PDI elde edilmiş olsa da hücre içine alımı

etkileyebilecek seviyede, farklı büyüklükte nanopartiküllerin varlığına işaret etmektedir (185).



Şekil 5.1. 20 ve 100 nm büyüklüğündeki polistren nanopartiküllerinin 5:1 oranda karışımının DLS ve AFM ile ölçümü sonucunda elde edilen sonuçlar. **A)** DLS ile yapılan ölçümlerde küçük nanopartiküllerin sinyalinin baskılandığı görülmektedir. **B)** AFM ile yapılan ölçümde ise büyük ve küçük nanopartiküllerin varlıkları net bir şekilde gösterilirken partiküllerin büyüklüklerinin olduğundan biraz daha küçük ölçüldüğü gösterilmektedir (120).

DLS ile partikül büyüklüğü ölçümüne etki eden bir diğer parametre ise ölçülen maddenin kullanılan ışığın dalga boyunda (633 nm) absorbands verip vermediğidir (166). Dil'in bu dalga boyunda absorbands vermemesi, ölçülen sonuçların mikroskopi analizleriyle neredeyse benzer sonuçlar vermesine olanak tanımıştır. Hazırlanan bu partiküllerin hücre kültürü ortamında partikül büyüklüğü ölçüldüğünde, ultra saf su içerisinde yapılan ölçümlere göre biraz daha küçük ortalama partikül büyüklüğü değerlerinin elde edildiği görülmektedir. Bu farklılık tamamlanmış besiyerinde yer alan daha küçük büyüklükte maddelerin varlığının ortalama partikül büyüklüğünün daha küçük bir şekilde ölçülmesine sebep olmasıyla açıklanabilmekte ve bu sonuçlar agregasyonun olmadığına işaret etmektedir (141). Yapılan çalışmada bu partikül büyüklükleri, tamamlanmış besiyeri ortamında yirmi dört saat süresince stabil bulunmuştur. Partikül büyüklükleri karakterize edilen bu formülasyonların zeta potansiyel değerleri arasındaki fark anlamlı seviyeye ulaşmamıştır. Formülasyonların hücre kültürü ortamındaki zeta potansiyel değerleri bazı çalışmalarda verilmiş olsa da

(186) hücre kültürü ortamları içerisinde yapılan ölçümler hücre kültürü ortamının bileşenlerinin girişiyle istenen kalitede belirlenmemiştir. Bu nanopartiküllerin zeta potansiyellerinin değişimini takip etmeyi olanaksız kılmıştır. Nanopartiküllerin sayısının tahmin edilmesinde ise gravimetrik yöntem kullanılmıştır. Bu yöntem bir nanopartikülün ağırlığının hesaplanarak belirlenen ağırlıkta ne kadar nanopartikülün olduğunun tahmin edilmesine dayanmaktadır (129). Nanopartiküllerin sayısının belirlenmesi amacıyla DLS metodu da araştırılmasına karşın DLS esasıyla çalışan partikül büyüklüğü ölçüm cihazını üretici firmasının bildirmiş olduğu ve literatürde yer alan çekinceler nedeniyle araştırmalar gravimetrik metotla gerçekleştirilmiştir. Gravimetrik metotta polimerin yoğunluğunun tam olarak belirlenebilmesi, nanopartiküllerin küresel olması ve ortalama partikül çapının bilinmesi gerekmektedir (129). Analizler sonucunda nanopartiküllerin neredeyse küresel olması, polimerin yoğunluğunun ölçülebilmesi ve partikül büyüklüğünün ortalamasının bilinmesi bu gerekliliklerin karşılanmasını sağlamaktadır. Nanopartikülün yapısında PVA gibi kalıntıların, boyanın da yer almasının yoğunluğu değiştirebileceği ve ortalama partikül büyüklüğünün ölçümünün hangi metotla gerçekleştirilmesi gerekliliğinin tartışılıyor olması bu tahmin yönteminin zayıf yönlerini oluşturmaktadır. Fakat bu konulardaki temel görüş polimer yoğunluğuna etki eden faktörlerin çok düşük seviyede bir hataya sebep olacağı bu yüzden de doğrudan polimer yoğunluğunun kullanılabileceği yönündedir. Ortalama partikül çapının ise çok fazla sayıda partikülü değerlendirebilmesinden dolayı DLS ölçümü referans alınarak hesaplanması öngörülmektedir (129). Ön çalışmalar sırasında formülasyon parametrelerindeki en ufak bir değişimle nanopartiküllere yüklenen madde miktarının değişebileceği belirlenmiştir. Nanopartiküllerin değişen floresan madde yoğunluklarının çalışma sonuçlarını etkileyebileceği açıktır. Bu çalışmada farklı partikül büyüklüğüne sahip nanopartiküller elde etmek için değiştirilen formülasyon parametresi polimer miktarıdır. Çalışmalarımız sırasında farklı boya miktarları ile PLGA₁₆₀ ve PLGA₂₃₀ nanopartiküllerinin boya yoğunluklarının aynı olması sağlanmıştır. Bu formülasyonların enkapsülasyon etkinlikleri incelendiğinde ise PLGA₂₃₀ nanopartiküllerini yaklaşık olarak iki kat yüksek enkapsülasyon etkinliği gösterdiği belirlenmiştir. Bunun sebebi organik fazın artan viskozitesinin Dil'in su fazına kaçışını azaltması olarak görülmektedir (187). Bugüne kadar yapılan çalışmalarda yine Dil

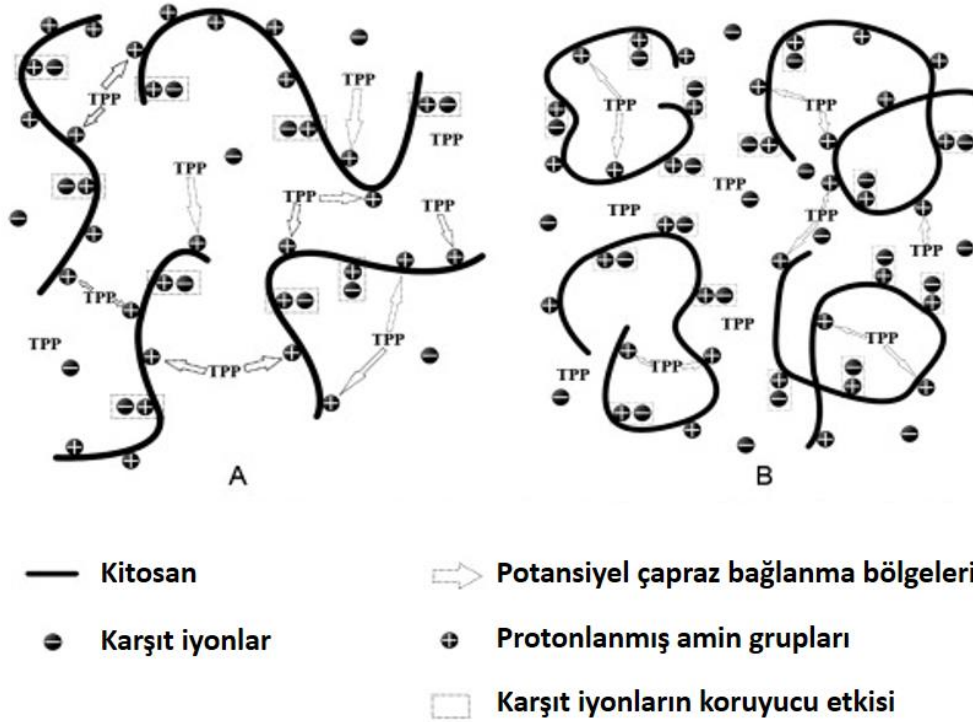
nanopartiküllerin işaretlenmesinde kullanılmış fakat nanopartiküllerin salımı sink koşul sağlanmadan incelenmiştir (156, 188, 189). Bu çalışmada sink koşul salım ortamına %0,5 (a/h) SDS eklenmesi ile sağlanabilmiştir. Diğer çalışmalar sadece su veya PBS içerisinde hemen hemen salımın olmadığına işaret etmektedir (188). Bu çalışmada nanopartiküllerden salım sink koşul sağlandığında başarı ile gösterilmiştir. Hücre kültürü ortamında sink koşulun olmadığı açık olmasına karşın, hücre kültürü ortamında bulunabilecek yüzey etkin maddelerin boya sızıntısına sebep olabileceği gösterilmiştir. Bu sızıntıların önüne geçmek için literatür polimerle floresan boyanın konjugasyonunu öngörmektedir fakat bu polimerin yapısının değişmesine sebep olmakta, konjugasyona rağmen sızıntı oluşmakta ve yüklenen ilacın taklit edilmesi için uygun bir model oluşturmamaktadır (190, 191). Bu nedenle nanopartiküllerin ilaç taşınmasındaki davranışlarını öngörebilmek için boyanın nanopartiküllere yüklenmesi tercih edilmektedir. Bunlara ek olarak PLGA₁₆₀ nanopartiküllerinden Dil salımı PLGA₂₃₀ nanopartiküllerine göre daha hızlı gerçekleşmiştir. Bu fark PLGA₁₆₀ nanopartiküllerinin sahip olduğu daha geniş yüzey alanı ve çekirdeğin yüzeye daha yakın olmasıyla açıklanabilmektedir (192). Bu formülasyonların FTIR analizlerinde ise küçük nanopartiküllerde Dil piklerinin (193) varlığı net bir şekilde gözükmemektedir. PLGA₂₃₀ nanopartiküllerinin FTIR analizlerinde de Dil'in karakteristik piklerinin olduğu bölgede değişiklik olmasına rağmen PLGA₁₆₀ nanopartikülleri kadar net değildir. Nanopartiküllere maddelerin yüklenmesi sırasında yüzeye tutunan boyanın/etkin maddenin varlığı kaçınılmazdır. Yüzeyde bulunan bu boyaların varlığı boyanın bimodal salım göstermesiyle de net bir şekilde gözükmemektedir (194-196).

In vivo görüntüleme çalışmalarında ise özellikle hemoglobinin verdiği otofloresan (165), kızılötesi görüntüleme sistemiyle Dil işaretli nanopartiküllerin görüntülenmesini olanaksız kılmıştır. Bu nedenle Dil, floresan mikroskopi ve akım sitometri çalışmalarında kullanılmış, in vivo çalışmalarda ise fare vücudunun verdiği otofloresanı aşabilecek bir boya kullanılmıştır. Boya olarak literatürde bu amaçla sıkça kullanılan, FDA onaylı bir boya olan ICG tercih edilmiştir. ICG'nin nanopartiküllere yüklenmesiyle in vivo görüntüleme önündeki engel aşılmıştır. Elde edilen ICG işaretli PLGA₁₆₀ ve PLGA₂₃₀ nanopartiküllerine ait ortalama partikül büyüklüğünün Dil işaretli nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklüğü ile benzer olduğu gösterilmiştir.

Benzer zeta potansiyeller ve PDI'lar ölçülmüş olmasına karşın enkapsülasyon etkinlikleri Dil'e göre düşük oranda kalmıştır. Bunun sebebi olaraksa ICG'nin suda çözünür yapısının boyanın su fazına kaçmasına olanak tanınması olarak gösterilmektedir (197). Yine nanopartiküllerden ICG salımının Dil'e kıyasla çok kısa sürede gerçekleştiği gösterilmiştir. Bu salım profile ise literatürde yer alan ICG yüklü PLGA nanopartiküllerine benzerdir (198).

5.2. Kitosan Nanopartiküllerinin Partikül Büyüklüğüne Etki Eden Faktörlerin Belirlenmesi, Beyine Hedeflendirilmiş Kitosan Nanopartiküllerinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Kitosan kullanılarak hazırlanmış nanopartiküller ilaç taşıyıcı sistemlerin oral, parenteral ve nazal olarak kullanılması birçok avantaj sağlamaktadır. Bu nanopartiküllerin partikül büyüklüğü nanopartiküllerin biyolojik bariyerleri aşmasında önem taşımaktadır (199). Kitosan nanopartiküllerin hazırlanmasında polimerin çapraz bağlanmasıyla nanopartikül oluşturulması sıklıkla kullanılan bir metot haline gelmiştir (60). Kitosan çözündüğünde serbestleşen pozitif yüklü amin grupları, TPF gibi çoklu anyonlarla bu pozitif grupların çapraz bağlanarak nanopartiküler yapının oluşmasını sağlamaktadır. Oluşan bu nanopartiküllerin karakteristiğine etki eden faktörler olaraksa literatürde kitosan konsantrasyonu, TPF-kitosan oranı, kitosanın moleküler ağırlığı gibi faktörlerin belirtildiği görülmektedir (60). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda özellikle solvanın iyonik şiddetinin kitosan nanopartiküllerin hazırlanmasında partikül büyüklüğünü ve sıklığını etkilediği belirtilmiştir (66). Bu çalışmada solvanda tuz bulunması durumunda partikül büyüklüğünün küçüldüğü net bir şekilde gösterilmiştir. Dahası nanopartiküllerin sıklığının da arttığı gösterilmiştir (66). Bu nedenle bu çalışmada kitosan nanopartikülleri hazırlanırken NaCl'de kullanılmıştır. Deney tasarımı incelenecek parametreler olarak kitosan miktarı, TPF miktarı ve NaCl miktarları belirlenmiştir.



Şekil 5.2. Düşük iyonik şiddete sahip (A) ve yüksek iyonik şiddete sahip çözeltilerde (B) kitosan nanopartiküllerinin oluşumunun şematik olarak gösterimi (200).

Bu metotla hazırlanan nanopartiküllerin önceki çalışmalardaki (66) parçacık büyüklükleri incelenerek kitosan seviyeleri 5-10 mg, TPF seviyesi 0.5-1 mg ve NaCl seviyesi 15-45 mg olarak belirlenmiştir. Hidrofobik bir boya olan Dil'in kitosan nanopartiküllerine yüklenmesinde genel bilgiler kısmında listelenen metotlardan biri olan, boyanın suyla karışabilen bir özellikte bir solvanda çözündükten sonra eklenerek sulu ortamda dağılmasının sağlanmasının ardından, çapraz bağlanan polimere hapsedilmesi ile nanopartiküller hazırlanmıştır. Bu yöntemde etanolde çözünen Dil'in kullanılmasıyla başarıyla boyanın nanopartiküllere yüklenmesi sağlanmıştır. Dil'in santrifüj sırasında kolloidal halde süpernatanda bulunduğu belirlenmiş, kontrol amacıyla ortamda kitosan ve/veya TPF olmadan aynı işlemler gerçekleştirilmiş ve santrifüj sonrasında herhangi bir çökme gözlenmemiştir. Tüm bu analizlere rağmen partiküller arasında veya yüzeyinde de PLGA'in FTIR analizlerinde gösterildiği gibi boya kalma olasılığı bulunmaktadır. Bu nanopartiküle tam yüklenmeyen boya miktarının da salım çalışmalarıyla incelenerek yorumlanması gerekmektedir. Bu

durum ilaçların nanopartiküllere yüklenmesinde de söz konusudur. Bu nedenle nanopartiküllerin taklit edilecek ilaca benzer özellikte boya ile işaretlenmesi bu analizlerle, gerçeğe çok daha yakın sonuç alma fırsatını sunmaktadır (190, 191). Çalışma sonuçları partikül büyüklüğüne etki eden temel parametrenin kitosanın miktarı olduğu belirlenmiştir. Değişen TPF veya NaCl miktarları partikül büyüklüğünü anlamlı seviye etkilememiştir. NaCl'ün partikül büyüklüğünü etkilememesi 15 mg NaCl ile gerekli iyonik şiddetin sağlanabilmesinden kaynaklanmaktayken, literatürde genelde gözlemlenen durum TPF miktarının partikül büyüklüğünü değiştirmesidir (60). Fakat NaCl'ün iyonik şiddeti ayarlamasıyla TPF'de bu seviyedeki değişimin partikül büyüklüğüne olan etkisinin ortadan kaldırıldığı daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (66). Bu sonuçlar deney tasarımı içinde sadece polimer miktarı değiştirilerek PLGA ile benzer büyüklükte partiküllerin elde edilebileceğini göstermiştir. Elde edilen nanopartiküllerin hücre kültürü ortamında stabilitesinin değerlendirilmesi amacıyla ön deneyler yapıldığında ise floresan işaretli kitosan nanopartiküllerinin agrege olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum literatürde daha önce tanımlanmış, sebebinin tamamlanmış hücre kültürü ortamında bulunan anyonik maddelerin kitosanın pozitif yüklü gruplarıyla etkileşmesi olarak gösterilmiştir (59, 201). Kitosan nanopartiküllerinin partikül büyüklüklerinin stabilitesini korumaması partikül büyüklüğüne bağlı olarak hücre içine alımın kitosan nanopartikülleriyle karşılaştırılmasını olanaksız kılmıştır. Fakat bu sonuç kitosan nanopartiküllerinin agrege olmalarıyla birlikte nasıl kan-beyin engelini geçebildiği sorusunu akıllara getirmiştir. Bu nedenle çalışmalara daha önce beyine geçişi gösterilen (175, 202, 203) Kitosan-PEG-Biyotin-CD71 (TfRMAb (+)) nanopartikülleri kullanılarak devam edilmiştir. Bu amaçla bu nanopartiküller deney tasarımı sonuçlarından yola çıkarak, nanopartiküllere olan enkapsülasyonu arttırmak için polimer miktarı en üst seviyede, oluşan nanopartikül sıklılığını arttırmak için TPF miktarı üst seviyede ve NaCl'in fazlasının iyonik şiddette fazladan bir avantaj sağlamadığının belirlenmesiyle alt seviyede sabitlenerek nanopartiküller hazırlanmıştır.

Hazırlanan bu nanopartiküllerin partikül büyüklükleri incelendiğinde TfRMAb (-) ve TfRMAb (+) nanopartiküllerinin ortalama partikül büyüklüklerinin, aynı şartlarda hazırlanan kitosan nanopartiküllerine göre büyük olduğu ve PDI değerinin

arttığı görülmektedir. Yüzey modifikasyonlarına rağmen birbirlerine yakın zeta potansiyelleri elde edildiği belirlenmiştir. PDI değerlerinin kitosan nanopartiküllerinde daha yüksek bulunması literatürde sıklıkça yer alan bir durumdur ve elde edilen bulgular literatür sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir (204). TfrMAb (-) ve TfrMAb (+) nanopartiküllerinin tamamlanmış besiyerindeki partikül büyüklüğü stabiliteleri incelendiğinde ise agregasyon sorununun hala devam ettiği belirtilmiştir. TEM görüntüleri analiz edildiğinde ise nanopartiküllerin antikor konjugasyonu sonrasında küresel yapıda olduğu görülmektedir. Antikor konjuge edilmiş ve edilmemiş nanopartiküllerin 3. saat sonundaki salım miktarları benzer bulunmuştur. Bunun sebebi antikor konjugasyonu dışında tüm süreçlerin diğer nanopartiküllere de uygulanarak kontrol grubunun hazırlanamamasıdır. Bu sonuçlar çalışma kapsamında konjugasyonun salımı anlamlı seviyede değiştirmedığını göstermektedir.

5.3. PLGA₂₃₀ ve PLGA₁₆₀ Nanopartiküllerinin Sitotoksitelerinin, Hücre İçine Alımlarının ve İntraperitoneal Alınma Zamanlarının Değerlendirilmesi

Aynı hücreye aynı sayıda nanopartikül uygulandığında PLGA₂₃₀ nanopartiküllerinin PLGA₁₆₀ nanopartiküllerine oranla her konsantrasyonda daha sitotoksik olduğu gözlemlenmiştir. Bunun muhtemel sebebi olarak PLGA₂₃₀ nanopartiküllerinin aynı sayıda PLGA₁₆₀ nanopartiküllerine kıyasla daha geniş yüzey alanına ve daha fazla ağırlığa sahip olması gösterilebilmektedir (205). İlerleyen çalışmalarda hücre içine alımın net bir şekilde karşılaştırılabilmesi için canlılığı bozmayan konsantrasyon olan 1.25×10^{10} sayı/ml uygulanarak analizler gerçekleştirilmiştir. Nanopartiküllerin hücre içine alımları incelendiğinde 24 saat inkübasyon sonrasında PLGA₂₃₀ ve PLGA₁₆₀ nanopartiküllerinin sırasıyla % 63,1±4,9 ve % 34,9 ±8,6 hücreyi floresan olarak işaretlediği belirlenmiştir. Yine hücre içine alım kinetikleri incelendiğinde hücrelerin MFI'larının PLGA₂₃₀ ve PLGA₁₆₀ nanopartikülleri için sırasıyla 1,5 ve 6 saat sonunda platoya ulaştığı belirlenmiştir. Bu farklı zamanlarda hücre içine alım için muhtemel sebeplerden biri nanopartiküllerin partikül büyüklüğüne bağlı olarak plakaların dibinde bulunan hücrelerin üzerine farklı sedimentasyon hızlarıyla çökmeleri ve farklı zamanlarda hücrelerle temas etmeleridir.

Hücre kültürü çalışmalarında yaşanabilecek bu teknik problem Cho ve ark. ve Agarwal ve ark. tarafından da gösterilmiştir (206, 207).

Hücreler tarafından alınan nanopartiküllerin MFI değerleri incelendiğinde ise PLGA₂₃₀ nanopartikülleri aynı sayıda PLGA₁₆₀ nanopartikülüne göre daha hızlı ve daha fazla boya transferi sağladığı görülmektedir. Bu nanopartiküller aynı sayıda uygulandığında içerdikleri boya miktarının da farklı olacağı açıktır. Bu nedenle bu nanopartiküllerin taşıdıkları boya miktarına göre MFI değerleri normalize edilerek nanopartiküllerin transfer etkinlikleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar PLGA₁₆₀ nanopartiküllerinin daha etkin bir taşıyıcı olduğunu göstermiştir. Yine aynı ağırlıkta hücre içine alımları karşılaştırıldığında PLGA₁₆₀ nanopartiküllerinin PLGA₂₃₀ nanopartiküllerine göre daha etkin bir şekilde hücre içine alındığı gösterilmiştir. Bu nanopartiküller aynı ağırlıkta uygulandığında küçük nanopartiküllerin sahip olduğu daha yüksek yüzey alanıyla açıklanabilmektedir. Artan yüzey alanı hücrelerle temas yüzeyini ve hücre içine alımı arttırabilmektedir (208). Hücre içine alım mekanizmaları içinse çeşitli farmakolojik inhibitörler kullanılmış ve hücrelerin MFI'larındaki değişiklik analiz edilmiştir. HEK293 hücreleri endositik proseslerin belirlenmesinde sıklıkla kullanılan bir hücre hattı olduğundan bu çalışmada özellikle tercih edilmiştir (207, 209).

Sonuçlar incelendiğinde hem klatrin hem kaveol hem de makropinositozun inhibisyonunun PLGA₂₃₀ ve PLGA₁₆₀ nanopartiküllerinin hücre içine alımını azalttığı gösterilmiştir. Daha önceki çalışmalarda 200 nm'nin altındaki nanopartiküllerin klatrin aracılı endositozla hücre içine alınabildiği gösterilmiştir. PLGA nanopartiküllerinin hücre kültürü ortamında yüzeyinin proteinle kaplanması bu yolağın tetiklenmesinin ayrı bir sebebi olarak görülebilmektedir (185). Bu çalışmada kaveol ve makropinositozunda gözükmeleri PLGA nanopartiküllerinin her ne kadar dar bir partikül büyüklüğü dağılımına sahip olsa da farklı hücre içine alım yollarını tetikleyebilecek seviyede bir partikül büyüklüğü dağılımına sahip olmasıyla açıklanmaktadır (145). Hücre içine alımın sodyum azid ile azaldığı fakat bu azalmanın anlamlı seviyeye ulaşmadığı gözükmemektedir. Bu dış kaynaklı ATP varlığı veya hücrenin bu inhibisyonu aşacak kadar ATP üretmesiyle açıklanabilmektedir (157). Hücre içine alım +4 °C'de incelendiğinde PLGA nanopartiküllerinin hücrelere boya transferinin devam ettiği belirlenmiştir. Bu boya transferi ve diğer sonuçlar

toplandığında, PLGA nanopartiküllerinin hücre içine alımında üç mekanizmanın aynı anda rol oynayabileceğini göstermiştir. Bunlardan ilkinin endositoz, diğerinin hücre dışında boya salımı veya membrana temasla doğrudan boya aktarımı olabileceği belirtilmiştir. Ön çalışma olarak değerlendirilen kitosan nanopartiküllerinin hücre içine alımının incelenmesi ve PLGA'le karşılaştırılmasında ise hücre içine alımın kitosan nanopartiküllerinde zamana karşı sabit bir artışla olduğu gözlemlenmiştir. Kitosanın hücre içine alımına dair özellikler beyin endotel hücreleriyle yapılan çalışma sonuçları üzerinde daha detaylı olarak tartışılmıştır. Fakat bu noktada literatürde yer alan PLGA ve kitosan nanopartiküllerinin hücre içine alımının karşılaştırıldığı çalışmalarda nanopartikülün hücrelerle inkübasyon süresinin önemine dikkat çekilmelidir.

PLGA₁₆₀ ve PLGA₂₃₀ nanopartiküllerinin intraperitoneal enjeksiyondan sonra peritonda alıkonma zamanları incelendiğinde ise her iki nanopartikülünde ICG solüsyonuna göre daha fazla ve daha uzun süre sinyal sağladığı görülmektedir. Bunun muhtemel sebeplerinden biri PLGA nanopartiküllerinin peritonda kalarak boyayı kontrollü bir şekilde salması olabilir. PLGA₂₃₀ nanopartiküllerinin PLGA₁₆₀ nanopartiküllerinden uzun süre peritonda sinyal alınmasına olanak tanınmasının muhtemel sebebi ise nanopartiküllerin in vitro şartlarda sink koşul altında düşük seviyede kalan salım farkının in vivo koşullarda daha fazla ortaya çıkmış olabileceği, büyük nanopartiküllerin peritondan dolaşıma daha yavaş penetre olabilmesi veya büyük nanopartiküllerin makrofajlar tarafında peritonda daha fazla tutulması olarak gösterilebilir. Bu olası sebeplerin daha net bir şekilde açıklanması için çalışmalar sürdürülmekle beraber ilaçların peritonda uzun süre tutulmasının sağlanması peritoneal karsinomatozis tedavisi için fırsat sunmaktadır (210).

5.4. Beyin Endotel Hücrelerine Hedeflendirilmiş Kitosan Nanopartiküllerinin Kan-Beyin Engeli Hücreleri ile Etkileşiminin İncelenmesi

Daha önce yapılan in vivo çalışmalarda TfRMAb (+) nanopartiküllerinin uygulamanın ardından 1-2 saat gibi kısa bir süre sonra beyin dokusuna ulaştığı gözlemlenmiştir (211). Ayrıca kitosanın hücre içine alım seviyesinin incelenmesinde 3. saat sonunda yapılacak analizlerin antikorla hedeflendirilmiş ve hedeflendirilmemiş

nanopartiküllerin hücre içine alımının karşılaştırılmasında yeterli olacağı öngörülmüştür. Çalışma süresi belirlendikten sonra HEK293 hücreleri üzerinde sitotoksosite göstermeyen ve analizlerde istenilen kalitede intensitenin alınabileceği doz olan 250 µg/ml ile çalışılmaya karar verilmiş olup öncelikle bu konsantrasyonda nanopartikül uygulanmasının hücrelerin canlılığına etkisi incelenmiştir. Hücrelerin canlılığının hem TfRMAb (-) hem de TfRMAB (+) için alım çalışmalarında uygun olduğunun değerlendirilmesinin ardından hücrelerin üç saat sonundaki floresan intensiteleri akım sitometri ve floresan mikroskobu ile değerlendirilmiştir. Sonuçlarda antikora hedeflendirilen nanopartiküllerin istatistiksel olarak anlamlı seviyede daha fazla miktarda hücre içine alındığı gösterilmiştir. Mikroskop görüntüleri ise antikora hedeflendirilmiş nanopartiküllerin çekirdeğe daha yakın olduğu sonucunu desteklemektedir. Antikora hedeflendirilmemiş nanopartiküllerin ise daha ziyade membrana yapışmış bir şekilde hücre yüzeyinde bulunduğu sonucuna varılmıştır. Bu hücre içine alım farkının reseptör aracılı endositoz olması muhtemel sebep olarak öngörülmüştür (212). Fakat kitosan nanopartiküllerinin agregasyonu partikül büyüklüğünü arttırmakta ve literatürde genellikle 200 nm civarındaki parçacıkların reseptör aracılı endositozla hücre içine alındığı sonucuyla çelişmektedir (185). Bu nedenle nanopartiküllerin hangi mekanizmayla hücre içine alındığının belirlenmesi önem kazanmıştır. Bu çalışma öncesinde kullanılan inhibitörlerin hedef alım yollarını inhibe ettiği gösterilmiştir. Yapılan çalışma açık bir şekilde antikora konjuge olmamış nanopartiküllerin makropinositozla hücre içine alındığını göstermektedir. Kitosan nanopartiküllerinin agregasyonu bunun sebebini oluşturmaktadır. Bununla birlikte antikora hedeflendirilmiş kitosan nanopartiküllerinin hücre içine alımında hCMEC/D3 hücrelerinin, makropinositoza ek olarak reseptör aracılı endositozu kullandığı da göstermiştir. Hücreler üzerine eklenen nanopartiküllerin bir kısmının agreve olmadan kısa süre içerisinde hücreler tarafından alınması bir ihtimal olmakla birlikte, büyüklüğü 1 µm olan partiküllerin de reseptör aracılı endositozu kullanabildiği de önceki çalışmalarda gösterilmiştir (213).

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Tez kapsamında yapılan çalışmalar derlendiğinde;

- Benzer büyüklükte floresan olarak işaretli PLGA ve kitosan nanopartiküllerinin sırasıyla nanopresipitasyon ve iyonik jelasyon metoduyla başarıyla elde edilebileceği,
- Bu metotla elde edilen kitosan nanopartiküllerin PLGA nanopartikülleri ile karşılaştırıldığında daha yüksek PDI'ya sahip olduğu,
- PLGA nanopartiküllerinin partikül büyüklüğünün hücre kültürü ortamında stabilitesini korurken kitosan nanopartiküllerinin agrege olduğu,
- PLGA nanopartiküllerinin kitosan nanopartiküllerine kıyasla HEK293 hücreleri üzerinde daha yüksek sitotoksosite gösterdiği,
- PLGA nanopartiküllerinin uygulandığı hücrelerdeki ortalama floresan şiddetindeki artışın partikül büyüklüğüne bağlı olarak 6 saat içerisinde platoya ulaşırken, kitosan nanopartiküllerinin hücre içine alımının 24 saat süresince lineer bir artış gösterdiği,
- Kitosan nanopartiküllerinin hücre kültürü ortamındaki agregasyonu nedeniyle partikül büyüklüğüne bağlı olarak hücre içine alımının karşılaştırılamayacağı,
- Polimer miktarı değiştirilerek hazırlanan farklı büyüklükteki PLGA nanopartiküllerinin karşılaştırılması sonucunda PLGA₂₃₀ nanopartiküllerinin PLGA₁₆₀ nanopartiküllerine göre daha yüksek enkapsülasyon etkinliğine sahip olduğu ve daha yavaş salım gösterdiği,
- Aynı sayıda hücre başına aynı sayıda nanopartikül içerecek şekilde farklı büyüklükteki PLGA nanopartikülleri HEK293 hücrelerine uygulandığı zaman PLGA₂₃₀ nanopartiküllerinin PLGA₁₆₀ nanopartiküllerine göre daha hızlı ve daha yüksek boya transferi sağladığı, fakat aynı ağırlıkta uygulandıklarında PLGA₁₆₀ nanopartiküllerinin daha etkin bir taşıyıcı olduğu,
- HEK293 hücrelerinin PLGA₂₃₀ ve PLGA₁₆₀ nanopartiküllerinin hücre içine alımında kltrin aracılı endositozu, kaveol aracılı endositozu ve makropinositozu kullandığı,

- PLGA nanopartiküllerinin hücrelere boya transferinde endositoz yollarına ek olarak membrana temasla veya hücre dışında boya salımıyla boya aktarabileceği,
- PLGA₂₃₀ nanopartikülleriyle PLGA₁₆₀ nanopartiküllerine göre daha uzun intraperitoneal tutulum sağlanabileceği,
- Transferrin reseptörüne hedeflendirilmiş kitosan nanopartiküllerinin hücre kültürü ortamında agregre olmasına rağmen hCMEC/D3 hücreleri tarafından reseptör aracılı endositozla hücre içine alınabildiği gösterilmiştir.

Tüm bu sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde PLGA ve kitosan nanopartiküllerinin hücre kültürü testleri ile karşılaştırılmasının farklı yapıları sebebiyle uygun olmadığı, nanopresipitasyon yöntemiyle elde edilen PLGA nanopartiküllerinin partikül büyüklüğündeki küçük bir değişikliğin bile nanopartiküllerin karakteristikleri, hücrelere alım etkinliklerini ve intraperitoneal tutunma zamanlarını önemli seviyede etkileyebileceği ve beyine hedeflendirilmiş kitosan nanopartiküllerinin gösterdikleri agregasyona rağmen beyin endotel hücrelerine reseptör aracılı endositozla alındığı sonuçlarına varılmıştır. Bu sonuçlar göz önünde bulundurularak nanopartiküllerin hücrelerle etkileşiminin değerlendirilmesinde birçok değişkenin eş zamanlı olarak göz önünde bulundurulması önerilmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Toumey C. Plenty of room, plenty of history. *Nat Nanotechnol.* 2009;4(12):783-4.
2. Ramsden J. *Nanoteknolojinin Esasları*. Ankara: ODTÜ Yayıncılık; 2011.
3. Couvreur P. Nanoparticles in drug delivery: past, present and future. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013;65(1):21-3.
4. Couvreur P, Tulkens P, Roland M, Trouet A, Speiser P. Nanocapsules: A new type of lysosomotropic carrier. *FEBS Lett.* 1977;84(2):323-6.
5. Birrenbach G, Speiser PP. Polymerized micelles and their use as adjuvants in Immunology. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 1976;65(12):1763-6.
6. Marty JJ, Oppenheim RC, Speiser P. Nanoparticles--a new colloidal drug delivery system. *Pharmaceutica Acta Helvetiae.* 1978;53(1):17-23.
7. Couvreur P, Kante B, Roland M, Guiot P, Bauduin P, Speiser P. Polycyanoacrylate nanocapsules as potential lysosomotropic carriers: Preparation, morphological and sorptive properties. *J Pharm Pharmacol.* 1979;31(5):331-2.
8. Gurny R, Peppas NA, Harrington DD, Banker GS. Development of biodegradable and injectable latices for controlled release of potent drugs. *Drug Development and Industrial Pharmacy.* 1981;7(1):1-25.
9. Calvo P, Remuñán-López C, Vila-Jato JL, Alonso MJ. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *Journal of Applied Polymer Science.* 1997;63(1):125-32.
10. Wicki A, Witzigmann D, Balasubramanian V, Huwyler J. Nanomedicine in cancer therapy: challenges, opportunities, and clinical applications. *J Control Release.* 2015;200:138-57.
11. Gullotti E, Yeo Y. Beyond the imaging: limitations of cellular uptake study in the evaluation of nanoparticles. *J Control Release.* 2012;164(2):170-6.
12. Cho EJ, Holback H, Liu KC, Abouelmagd SA, Park J, Yeo Y. Nanoparticle characterization: state of the art, challenges, and emerging technologies. *Mol Pharm.* 2013;10(6):2093-110.
13. Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2010;75(1):1-18.
14. Makadia HK, Siegel SJ. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers.* 2011;3(3):1377-97.
15. Danhier F, Ansorena E, Silva JM, Coco R, Le Breton A, Préat V. PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *J Control Release.* 2012;161(2):505-22.
16. Prokop A, Davidson JM. Nanovehicular intracellular delivery systems. *J Pharm Sci.* 2008;97(9):3518-90.

17. Vert M, Mauduit J, Li S. Biodegradation of PLA/GA polymers: increasing complexity. *Biomaterials*. 1994;15(15):1209-13.
18. Sah E, Sah H. Recent Trends in Preparation of Poly(lactide-co-glycolide) Nanoparticles by mixing polymeric organic solution with antisolvent. *Journal of Nanomaterials*. 2015;2015:22.
19. Bala I, Hariharan S, Kumar MN. PLGA nanoparticles in drug delivery: The state of the art. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. 2004;21(5):387-422.
20. Anton N, Benoit JP, Saulnier P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates-A review. *J Control Release*. 2008;128(3):185-99.
21. Ganachaud F, Katz JL. Nanoparticles and nanocapsules created using the ouzo effect: Spontaneous emulsification as an alternative to ultrasonic and high-shear devices. *Chem Phys Chem*. 2005;6(2):209-16.
22. Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JP, Ammoury N, Benita S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics*. 1989;55(1):R1-R4.
23. Huang J, Zhang H, Yu Y, Chen Y, Wang D, Zhang G, et al. Biodegradable self-assembled nanoparticles of poly (d,l-lactide-co-glycolide)/hyaluronic acid block copolymers for target delivery of docetaxel to breast cancer. *Biomaterials*. 2014;35(1):550-66.
24. Dinarvand R, Sepehri N, Manoochehri S, Rouhani H, Atyabi F. Polylactide-co-glycolide nanoparticles for controlled delivery of anticancer agents. *Int J Nanomedicine*. 2011;6:877-95.
25. Reis CP, Martinho N, Rosado C, Fernandes AS, Roberto A. Design of polymeric nanoparticles and its applications as drug delivery systems for acne treatment. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2014;40(3):409-17.
26. De Paula CS, Tedesco AC, Primo FL, Vilela JMC, Andrade MS, Mosqueira VCF. Chloroaluminium phthalocyanine polymeric nanoparticles as photosensitisers: Photophysical and physicochemical characterisation, release and phototoxicity in vitro. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013;49(3):371-81.
27. Chen YC, Hsieh WY, Lee WF, Zeng DT. Effects of surface modification of PLGA-PEG-PLGA nanoparticles on loperamide delivery efficiency across the blood-brain barrier. *Journal of Biomaterials Applications*. 2013;27(7):909-22.
28. Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. Influence of process and formulation parameters on the formation of submicron particles by solvent displacement and emulsification-diffusion methods critical comparison. *Adv Colloid Interface Sci*. 2011;163(2):90-122.
29. Kumar A, Sawant KK. Application of multiple regression analysis in optimization of anastrozole-loaded PLGA nanoparticles. *J Microencapsul*. 2014;31(2):105-14.

30. Simsek S, Eroglu H, Kurum B, Ulubayram K. Brain targeting of Atorvastatin loaded amphiphilic PLGA-b-PEG nanoparticles. *J Microencapsul.* 2013;30(1):10-20.
31. Ali ME, Lamprecht A. Polyethylene glycol as an alternative polymer solvent for nanoparticle preparation. *International Journal of Pharmaceutics.* 2013;456(1):135-42.
32. Paul A, Das S, Das J, Samadder A, Khuda-Bukhsh AR. Cytotoxicity and apoptotic signalling cascade induced by chelidone-loaded PLGA nanoparticles in HepG2 cells in vitro and bioavailability of nano-chelidone in mice in vivo. *Toxicology Letters.* 2013;222(1):10-22.
33. de Paula CS, Tedesco AC, Primo FL, Vilela JM, Andrade MS, Mosqueira VC. Chloroaluminium phthalocyanine polymeric nanoparticles as photosensitisers: Photophysical and physicochemical characterisation, release and phototoxicity in vitro. *Eur J Pharm Sci.* 2013;49(3):371-81.
34. Wang ZH, Wang ZY, Sun CS, Wang CY, Jiang TY, Wang SL. Trimethylated chitosan-conjugated PLGA nanoparticles for the delivery of drugs to the brain. *Biomaterials.* 2010;31(5):908-15.
35. Shen H, Hu X, Szymusiak M, Wang ZJ, Liu Y. Orally administered nanocurcumin to attenuate morphine tolerance: comparison between negatively charged PLGA and partially and fully PEGylated nanoparticles. *Mol Pharm.* 2013;10(12):4546-51.
36. Tao W, Zeng X, Liu T, Wang Z, Xiong Q, Ouyang C, et al. Docetaxel-loaded nanoparticles based on star-shaped mannitol-core PLGA-TPGS diblock copolymer for breast cancer therapy. *Acta Biomater.* 2013;9(11):8910-20.
37. Musumeci T, Ventura CA, Giannone I, Ruozzi B, Montenegro L, Pignatello R, et al. PLA/PLGA nanoparticles for sustained release of docetaxel. *Int J Pharm.* 2006;325(1-2):172-9.
38. Gan CW, Feng SS. Transferrin-conjugated nanoparticles of Poly(lactide)-d- α -Tocopheryl polyethylene glycol succinate diblock copolymer for targeted drug delivery across the blood-brain barrier. *Biomaterials.* 2010;31(30):7748-57.
39. Martin-Banderas L, Alvarez-Fuentes J, Duran-Lobato M, Prados J, Melguizo C, Fernandez-Arevalo M, et al. Cannabinoid derivative-loaded PLGA nanocarriers for oral administration: formulation, characterization, and cytotoxicity studies. *Int J Nanomedicine.* 2012;7:5793-806.
40. Kwon HY, Lee JY, Choi SW, Jang Y, Kim JH. Preparation of PLGA nanoparticles containing estrogen by emulsification-diffusion method. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.* 2001;182(1-3):123-30.
41. Vega E, Antònia Egea M, Calpena AC, Espina M, Luisa García M. Role of hydroxypropyl- β -cyclodextrin on freeze-dried and gamma-irradiated PLGA and PLGA-PEG diblock copolymer nanospheres for ophthalmic flurbiprofen delivery. *International Journal of Nanomedicine.* 2012;7:1357-71.

42. Chen YC, Hsieh WY, Lee WF, Zeng DT. Effects of surface modification of PLGA-PEG-PLGA nanoparticles on loperamide delivery efficiency across the blood-brain barrier. *J Biomater Appl.* 2013;27(7):909-22.
43. Musumeci T, Bucolo C, Carbone C, Pignatello R, Drago F, Puglisi G. Polymeric nanoparticles augment the ocular hypotensive effect of melatonin in rabbits. *Int J Pharm.* 2013;440(2):135-40.
44. Bhattacharyya SS, Paul S, De A, Das D, Samadder A, Boujedaini N, et al. Poly (lactide-co-glycolide) acid nanoencapsulation of a synthetic coumarin: cytotoxicity and bio-distribution in mice, in cancer cell line and interaction with calf thymus DNA as target. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2011;253(3):270-81.
45. Jeon HJ, Jeong YI, Jang MK, Park YH, Nah JW. Effect of solvent on the preparation of surfactant-free poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles and norfloxacin release characteristics. *Int J Pharm.* 2000;207(1-2):99-108.
46. Su WP, Cheng FY, Shieh DB, Yeh CS, Su WC. PLGA nanoparticles codeliver paclitaxel and Stat3 siRNA to overcome cellular resistance in lung cancer cells. *Int J Nanomedicine.* 2012;7:4269-83.
47. Moraes CM, de Matos AP, de Lima R, Rosa AH, de Paula E, Fraceto LF. Initial development and characterization of PLGA nanospheres containing ropivacaine. *J Biol Phys.* 2007;33(5-6):455-61.
48. Jeong YI, Shim YH, Kim C, Lim GT, Choi KC, Yoon C. Effect of cryoprotectants on the reconstitution of surfactant-free nanoparticles of poly(DL-lactide-co-glycolide). *J Microencapsul.* 2005;22(6):593-601.
49. Lalani J, Rathi M, Lalan M, Misra A. Protein functionalized tramadol-loaded PLGA nanoparticles: preparation, optimization, stability and pharmacodynamic studies. *Drug Dev Ind Pharm.* 2013;39(6):854-64.
50. Paiva AM, Pinto RA, Teixeira M, Barbosa CM, Lima RT, Vasconcelos MH, et al. Development of noncytotoxic PLGA nanoparticles to improve the effect of a new inhibitor of p53-MDM2 interaction. *Int J Pharm.* 2013;454(1):394-402.
51. Joshi G, Kumar A, Sawant K. Bioavailability enhancement, Caco-2 cells uptake and intestinal transport of orally administered lopinavir-loaded PLGA nanoparticles. *Drug Delivery.* 2016:1-13.
52. Wu J, Zhang J, Deng C, Meng F, Zhong Z. Vitamin E-Oligo(methyl diglycol l-glutamate) as a Biocompatible and Functional Surfactant for Facile Preparation of Active Tumor-Targeting PLGA Nanoparticles. *Biomacromolecules.* 2016;17(7):2367-74.
53. Ghosh S, Mondal L, Chakraborty S, Mukherjee B. Early Stage HIV Management and Reduction of Stavudine-Induced Hepatotoxicity in Rats by Experimentally Developed Biodegradable Nanoparticles. *AAPS PharmSciTech.* 2016:1-13.
54. Lepeltier E, Bourgaux C, Couvreur P. Nanoprecipitation and the "Ouzo effect": Application to drug delivery devices. *Adv Drug Deliv Rev.* 2014;71:86-97.

55. Beck-Broichsitter M, Rytting E, Lebhardt T, Wang X, Kissel T. Preparation of nanoparticles by solvent displacement for drug delivery: a shift in the "ouzo region" upon drug loading. *Eur J Pharm Sci.* 2010;41(2):244-53.
56. Beck-Broichsitter M, Nicolas J, Couvreur P. Solvent selection causes remarkable shifts of the "Ouzo region" for poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles prepared by nanoprecipitation. *Nanoscale.* 2015;7(20):9215-21.
57. Sahin A, Caban S, Abdykerim Kyzy G, Yerlikaya F, Aktas Y, Capan Y., Determination of Critical Parameters of Paclitaxel and Flurbiprofen Co-Loaded PLGA Nanoparticles Prepared By Nanoprecipitation. American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS) Annual Meeting and Exposition 2015; October 25-29 2015; Orlando; USA.
58. Shigemasa Y, Minami S. Applications of chitin and chitosan for biomaterials. *Biotechnol Genet Eng Rev.* 1996;13:383-420.
59. Hoemann CD, Guzman-Morales J, Tran-Khanh N, Lavallee G, Jolicoeur M, Lavertu M. Chitosan rate of uptake in HEK293 cells is influenced by soluble versus microparticle state and enhanced by serum-induced cell metabolism and lactate-based media acidification. *Molecules.* 2013;18(1):1015-35.
60. Bugnicourt L, Ladavière C. Interests of chitosan nanoparticles ionically cross-linked with tripolyphosphate for biomedical applications. *Progress in Polymer Science.* 2016;60:1-17.
61. Tokumitsu H, Ichikawa H, Fukumori Y, Block LH. Preparation of gadopentetic acid-loaded chitosan microparticles for gadolinium neutron-capture therapy of cancer by a novel emulsion-droplet coalescence technique. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 1999;47(6):838-42.
62. El-Shabouri MH. Positively charged nanoparticles for improving the oral bioavailability of cyclosporin-A. *Int J Pharm.* 2002;249(1-2):101-8.
63. Banerjee T, Mitra S, Kumar Singh A, Kumar Sharma R, Maitra A. Preparation, characterization and biodistribution of ultrafine chitosan nanoparticles. *Int J Pharm.* 2002;243(1-2):93-105.
64. Sarmiento B, Martins S, Ribeiro A, Veiga F, Neufeld R, Ferreira D. Development and Comparison of Different Nanoparticulate Polyelectrolyte Complexes as Insulin Carriers. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics.* 2006;12(2):131-8.
65. Grenha A. Chitosan nanoparticles: a survey of preparation methods. *J Drug Target.* 2012;20(4):291-300.
66. Jonassen H, Kjoniksen AL, Hiorth M. Stability of chitosan nanoparticles cross-linked with tripolyphosphate. *Biomacromolecules.* 2012;13(11):3747-56.
67. Nagarwal RC, Singh PN, Kant S, Maiti P, Pandit JK. Chitosan nanoparticles of 5-fluorouracil for ophthalmic delivery: characterization, in-vitro and in-vivo study. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 2011;59(2):272-8.

68. Li P, Wang Y, Peng Z, She F, Kong L. Development of chitosan nanoparticles as drug delivery systems for 5-fluorouracil and leucovorin blends. *Carbohydrate Polymers*. 2011;85(3):698-704.
69. Miladi K, Sfar S, Fessi H, Elaissari A. Enhancement of alendronate encapsulation in chitosan nanoparticles. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2015;30, Part B:391-6.
70. Jang KI, Lee HG. Stability of chitosan nanoparticles for L-ascorbic acid during heat treatment in aqueous solution. *J Agric Food Chem*. 2008;56(6):1936-41.
71. Md S, Khan RA, Mustafa G, Chuttani K, Baboota S, Sahni JK, et al. Bromocriptine loaded chitosan nanoparticles intended for direct nose to brain delivery: pharmacodynamic, pharmacokinetic and scintigraphy study in mice model. *Eur J Pharm Sci*. 2013;48(3):393-405.
72. Aameeduzzafar, Ali J, Bhatnagar A, Kumar N, Ali A. Chitosan nanoparticles amplify the ocular hypotensive effect of catechol in rabbits. *Int J Biol Macromol*. 2014;65:479-91.
73. Zhang H, Jung J, Zhao Y. Preparation, characterization and evaluation of antibacterial activity of catechins and catechins-Zn complex loaded beta-chitosan nanoparticles of different particle sizes. *Carbohydr Polym*. 2016;137:82-91.
74. Kailaku SI, Mulyawanti I, Alamsyah AN. Formulation of Nanoencapsulated Catechin with Chitosan as Encapsulation Material. *Procedia Chemistry*. 2014;9:235-41.
75. Jamil B, Habib H, Abbasi S, Nasir H, Rahman A, Rehman A, et al. Cefazolin loaded chitosan nanoparticles to cure multi drug resistant Gram-negative pathogens. *Carbohydr Polym*. 2016;136:682-91.
76. Chronopoulou L, Nocca G, Castagnola M, Paludetti G, Ortaggi G, Sciubba F, et al. Chitosan based nanoparticles functionalized with peptidomimetic derivatives for oral drug delivery. *N Biotechnol*. 2016;33(1):23-31.
77. Tripathy S, Das S, Chakraborty SP, Sahu SK, Pramanik P, Roy S. Synthesis, characterization of chitosan-tripolyphosphate conjugated chloroquine nanoparticle and its in vivo anti-malarial efficacy against rodent parasite: a dose and duration dependent approach. *Int J Pharm*. 2012;434(1-2):292-305.
78. Bhavna, Md S, Ali M, Ali R, Bhatnagar A, Baboota S, et al. Donepezil nanosuspension intended for nose to brain targeting: In vitro and in vivo safety evaluation. *Int J Biol Macromol*. 2014;67:418-25.
79. Trapani A, De Giglio E, Cafagna D, Denora N, Agrimi G, Cassano T, et al. Characterization and evaluation of chitosan nanoparticles for dopamine brain delivery. *Int J Pharm*. 2011;419(1-2):296-307.
80. Soares PI, Sousa AI, Silva JC, Ferreira IM, Novo CM, Borges JP. Chitosan-based nanoparticles as drug delivery systems for doxorubicin: Optimization and modelling. *Carbohydr Polym*. 2016;147:304-12.

81. Janes KA, Fresneau MP, Marazuela A, Fabra A, Alonso MaJ. Chitosan nanoparticles as delivery systems for doxorubicin. *J Control Release*. 2001;73(2–3):255-67.
82. Derakhshandeh K, Fathi S. Role of chitosan nanoparticles in the oral absorption of Gemcitabine. *Int J Pharm*. 2012;437(1-2):172-7.
83. Ekinci M, Ilem-Ozdemir D, Gundogdu E, Asikoglu M. Methotrexate loaded chitosan nanoparticles: Preparation, radiolabeling and in vitro evaluation for breast cancer diagnosis. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2015;30, Part A:107-13.
84. Cerchiara T, Abruzzo A, di Cagno M, Bigucci F, Bauer-Brandl A, Parolin C, et al. Chitosan based micro- and nanoparticles for colon-targeted delivery of vancomycin prepared by alternative processing methods. *Eur J Pharm Biopharm*. 2015;92:112-9.
85. Kumar GP, Sanganal JS, Phani AR, Manohara C, Tripathi SM, Raghavendra HL, et al. Anti-cancerous efficacy and pharmacokinetics of 6-mercaptopurine loaded chitosan nanoparticles. *Pharmacol Res*. 2015;100:47-57.
86. Niaz T, Shabbir S, Manzoor S, Rehman A, Rahman A, Nasir H, et al. Antihypertensive nano-ceuticals based on chitosan biopolymer: Physico-chemical evaluation and release kinetics. *Carbohydr Polym*. 2016;142:268-74.
87. Yoksan R, Jirawutthiwongchai J, Arpo K. Encapsulation of ascorbyl palmitate in chitosan nanoparticles by oil-in-water emulsion and ionic gelation processes. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2010;76(1):292-7.
88. Esmaeili A, Asgari A. In vitro release and biological activities of Carum copticum essential oil (CEO) loaded chitosan nanoparticles. *Int J Biol Macromol*. 2015;81:283-90.
89. Akhtar F, Rizvi MM, Kar SK. Oral delivery of curcumin bound to chitosan nanoparticles cured Plasmodium yoelii infected mice. *Biotechnol Adv*. 2012;30(1):310-20.
90. Chuah LH, Roberts CJ, Billa N, Abdullah S, Rosli R. Cellular uptake and anticancer effects of mucoadhesive curcumin-containing chitosan nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2014;116:228-36.
91. Chuah LH, Billa N, Roberts CJ, Burley JC, Manickam S. Curcumin-containing chitosan nanoparticles as a potential mucoadhesive delivery system to the colon. *Pharm Dev Technol*. 2013;18(3):591-9.
92. Woranuch S, Yoksan R. Eugenol-loaded chitosan nanoparticles: I. Thermal stability improvement of eugenol through encapsulation. *Carbohydr Polym*. 2013;96(2):578-85.
93. Woranuch S, Yoksan R. Eugenol-loaded chitosan nanoparticles: II. Application in bio-based plastics for active packaging. *Carbohydr Polym*. 2013;96(2):586-92.

94. Panwar R, Pemmaraju SC, Sharma AK, Pruthi V. Efficacy of ferulic acid encapsulated chitosan nanoparticles against *Candida albicans* biofilm. *Microb Pathog.* 2016;95:21-31.
95. Abul Kalam M, Khan AA, Khan S, Almalik A, Alshamsan A. Optimizing indomethacin-loaded chitosan nanoparticle size, encapsulation, and release using Box-Behnken experimental design. *Int J Biol Macromol.* 2016;87:329-40.
96. Jafarinejad S, Gilani K, Moazeni E, Ghazi-Khansari M, Najafabadi AR, Mohajel N. Development of chitosan-based nanoparticles for pulmonary delivery of itraconazole as dry powder formulation. *Powder Technology.* 2012;222:65-70.
97. Arunkumar R, Harish Prashanth KV, Baskaran V. Promising interaction between nanoencapsulated lutein with low molecular weight chitosan: Characterization and bioavailability of lutein in vitro and in vivo. *Food Chemistry.* 2013;141(1):327-37.
98. Wan A, Sun Y, Gao L, Li HL. Preparation of aspirin and probucol in combination loaded chitosan nanoparticles and in vitro release study. *Carbohydrate Polymers.* 2009;75(4):566-74.
99. Rejinold NS, Muthunarayanan M, Muthuchelian K, Chennazhi KP, Nair SV, Jayakumar R. Saponin-loaded chitosan nanoparticles and their cytotoxicity to cancer cell lines in vitro. *Carbohydrate Polymers.* 2011;84(1):407-16.
100. Saharan V, Mehrotra A, Khatik R, Rawal P, Sharma SS, Pal A. Synthesis of chitosan based nanoparticles and their in vitro evaluation against phytopathogenic fungi. *International Journal of Biological Macromolecules.* 2013;62:677-83.
101. Joseph JJ, Sangeetha D, Gomathi T. Sunitinib loaded chitosan nanoparticles formulation and its evaluation. *International Journal of Biological Macromolecules.* 2016;82:952-8.
102. Chen X, Gu S, Chen BF, Shen WL, Yin Z, Xu GW, et al. Nanoparticle delivery of stable miR-199a-5p agomir improves the osteogenesis of human mesenchymal stem cells via the HIF1a pathway. *Biomaterials.* 2015;53:239-50.
103. Malathi B, Mona S, Thiyagarajan D, Kaliraj P. Immunopotentiating nano-chitosan as potent vaccine carrier for efficacious prophylaxis of filarial antigens. *International Journal of Biological Macromolecules.* 2015;73:131-7.
104. Gan Q, Wang T. Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier - Systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release. *Colloid Surface B.* 2007;59(1):24-34.
105. Mattu C, Li R, Ciardelli G. Chitosan nanoparticles as therapeutic protein nanocarriers: The effect of pH on particle formation and encapsulation efficiency. *Polym Composite.* 2013;34(9):1538-45.
106. Zhang H, Oh M, Allen C, Kumacheva E. Monodisperse chitosan nanoparticles for mucosal drug delivery. *Biomacromolecules.* 2004;5(6):2461-8.
107. Rishi P, Bhogal A, Arora S, Pandey SK, Verma I, Kaur IP. Improved oral therapeutic potential of nanoencapsulated cryptdin formulation against *Salmonella* infection. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2015;72:27-33.

108. De Campos AM, Sanchez A, Alonso MJ. Chitosan nanoparticles: a new vehicle for the improvement of the delivery of drugs to the ocular surface. Application to cyclosporin A. *International Journal of Pharmaceutics*. 2001;224(1-2):159-68.
109. Wang XM, Chi N, Tang X. Preparation of estradiol chitosan nanoparticles for improving nasal absorption and brain targeting. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2008;70(3):735-40.
110. Al-Qadi S, Alatorre-Meda M, Martin-Pastor M, Taboada P, Remunan-Lopez C. The role of hyaluronic acid inclusion on the energetics of encapsulation and release of a protein molecule from chitosan-based nanoparticles. *Colloid Surface B*. 2016;141:223-32.
111. Al-Qadi S, Grenha A, Carrion-Recio D, Seijo B, Remunan-Lopez C. Microencapsulated chitosan nanoparticles for pulmonary protein delivery: In vivo evaluation of insulin-loaded formulations. *Journal of Controlled Release*. 2012;157(3):383-90.
112. Makhlof A, Tozuka Y, Takeuchi H. Design and evaluation of novel pH-sensitive chitosan nanoparticles for oral insulin delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2011;42(5):445-51.
113. Xu QM, Guo LC, Gu XH, Zhang BA, Hu X, Zhang JJ, et al. Prevention of colorectal cancer liver metastasis by exploiting liver immunity via chitosan-TPP/nanoparticles formulated with IL-12. *Biomaterials*. 2012;33(15):3909-18.
114. Sipoli CC, Radaic A, Santana N, de Jesus MB, de la Torre LG. Chitosan nanoparticles produced with the gradual temperature decrease technique for sustained gene delivery. *Biochem Eng J*. 2015;103:114-21.
115. Kim BG, Kang IJ. Evaluation of the effects of biodegradable nanoparticles on a vaccine delivery system using AFM, SEM, and TEM. *Ultramicroscopy*. 2008;108(10):1168-73.
116. Rudzinski WE, Palacios A, Ahmed A, Lane MA, Aminabhavi TM. Targeted delivery of small interfering RNA to colon cancer cells using chitosan and PEGylated chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*. 2016;147:323-32.
117. Wang SL, Yao HH, Guo LL, Dong L, Li SG, Gu YP, et al. Selection of optimal sites for TGFB1 gene silencing by chitosan-TPP nanoparticle-mediated delivery of shRNA. *Cancer Genet Cytogen*. 2009;190(1):8-14.
118. Aktas Y, Andrieux K, Alonso MJ, Calvo P, Gursoy RN, Couvreur P, et al. Preparation and in vitro evaluation of chitosan nanoparticles containing a caspase inhibitor. *International Journal of Pharmaceutics*. 2005;298(2):378-83.
119. Blanco E, Shen H, Ferrari M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nat Biotech*. 2015;33(9):941-51.
120. Hoo CM, Starostin N, West P, Mecartney ML. A comparison of atomic force microscopy (AFM) and dynamic light scattering (DLS) methods to characterize nanoparticle size distributions. *Journal of Nanoparticle Research*. 2008;10(1):89-96.

121. Lu X-Y, Wu D-C, Li Z-J, Chen G-Q. Chapter 7 - Polymer Nanoparticles. In: Antonio V, editor. Progress in Molecular Biology and Translational Science. Volume 104: Academic Press; 2011. p. 299-323.
122. Mahl D, Diendorf J, Meyer-Zaika W, Epple M. Possibilities and limitations of different analytical methods for the size determination of a bimodal dispersion of metallic nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2011;377(1–3):386-92.
123. Boyd RD, Pichaimuthu SK, Cuenat A. New approach to inter-technique comparisons for nanoparticle size measurements; using atomic force microscopy, nanoparticle tracking analysis and dynamic light scattering. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2011;387(1–3):35-42.
124. Murdock RC, Braydich-Stolle L, Schrand AM, Schlager JJ, Hussain SM. Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to in vitro exposure using dynamic light scattering technique. *Toxicol Sci*. 2008;101(2):239-53.
125. Bowen P. Particle Size Distribution Measurement from Millimeters to Nanometers and from Rods to Platelets. *Journal of Dispersion Science and Technology*. 2002;23(5):631-62.
126. Kamaly N, Yameen B, Wu J, Farokhzad OC. Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling Drug Release. *Chem Rev*. 2016;116(4):2602-63.
127. Hoffman AS. The origins and evolution of "controlled" drug delivery systems. *J Control Release*. 2008;132(3):153-63.
128. Anhalt K, Geissler S, Harms M, Weigandt M, Fricker G. Development of a New Method to Assess Nanocrystal Dissolution Based on Light Scattering. *Pharmaceutical Research*. 2012;29(10):2887-901.
129. Shang J, Gao X. Nanoparticle counting: towards accurate determination of the molar concentration. *Chem Soc Rev*. 2014;43(21):7267-78.
130. Mendes LP, Delgado JMF, Costa ADA, Vieira MS, Benfica PL, Lima EM, et al. Biodegradable nanoparticles designed for drug delivery: The number of nanoparticles impacts on cytotoxicity. *Toxicology in Vitro*. 2015;29(6):1268-74.
131. Unciti-Broceta JD, Cano-Cortés V, Altea-Manzano P, Pernagallo S, Díaz-Mochón JJ, Sánchez-Martín RM. Number of nanoparticles per cell through a spectrophotometric method - A key parameter to assess nanoparticle-based cellular assays. *Scientific Reports*. 2015;5:10091.
132. Slater K. Cytotoxicity tests for high-throughput drug discovery. *Curr Opin Biotechnol*. 2001;12(1):70-4.
133. Decker T, Lohmann-Matthes ML. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J Immunol Methods*. 1988;115(1):61-9.
134. Flow Cytometry Protocol for Analysis of Cell Viability using Propidium Iodide [Internet]. [Erişim Tarihi 18 Ekim 2016]. Erşimi adresi:

<https://www.rndsystems.com/resources/protocols/flow-cytometry-protocol-analysis-cell-viability-using-propidium-iodide>

135. Ducat E, Evrard B, Peulen O, Piel G. Cellular uptake of liposomes monitored by confocal microscopy and flow cytometry. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2011;21(6):469-77.
136. Wang T, Bai J, Jiang X, Nienhaus GU. Cellular uptake of nanoparticles by membrane penetration: A study combining confocal microscopy with FTIR spectroelectrochemistry. *ACS Nano*. 2012;6(2):1251-9.
137. Fernando LP, Kandel PK, Yu J, McNeill J, Ackroyd PC, Christensen KA. Mechanism of cellular uptake of highly fluorescent conjugated polymer nanoparticles. *Biomacromolecules*. 2010;11(10):2675-82.
138. Xu P, Gullotti E, Tong L, Highley CB, Errabelli DR, Hasan T, et al. Intracellular drug delivery by poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles, revisited. *Mol Pharm*. 2009;6(1):190-201.
139. Reisch A, Klymchenko AS. Fluorescent Polymer Nanoparticles Based on Dyes: Seeking Brighter Tools for Bioimaging. *Small*. 2016;12(15):1968-92.
140. Brown M, Wittwer C. Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. *Clin Chem*. 2000;46(8 Pt 2):1221-9.
141. Grabowski N, Hillaireau H, Vergnaud J, Santiago LA, Kerdine-Romer S, Pallardy M, et al. Toxicity of surface-modified PLGA nanoparticles toward lung alveolar epithelial cells. *Int J Pharm*. 2013;454(2):686-94.
142. Vranic S, Boggetto N, Contremoulins V, Mornet S, Reinhardt N, Marano F, et al. Deciphering the mechanisms of cellular uptake of engineered nanoparticles by accurate evaluation of internalization using imaging flow cytometry. *Part Fibre Toxicol*. 2013;10:2.
143. Fluorescence microscope [Internet]. [Erişim Tarihi 18 Ekim 2016]. Erşimi adresi: https://en.wikipedia.org/wiki/Fluorescence_microscope
144. Filters for Flow Cytometry. [Internet]. [Erişim Tarihi 18 Ekim 2016]. Erşimi adresi: <https://www.semrock.com/flow-cytometry.aspx>
145. Sahay G, Alakhova DY, Kabanov AV. Endocytosis of nanomedicines. *J Control Release*. 2010;145(3):182-95.
146. Doherty GJ, McMahon HT. Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem*. 2009;78:857-902.
147. Rappoport JZ. Focusing on clathrin-mediated endocytosis. *Biochem J*. 2008;412(3):415-23.
148. Higgins MK, McMahon HT. Snap-shots of clathrin-mediated endocytosis. *Trends Biochem Sci*. 2002;27(5):257-63.
149. Parton RG, Simons K. The multiple faces of caveolae. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(3):185-94.

150. Kerr MC, Teasdale RD. Defining macropinocytosis. *Traffic*. 2009;10(4):364-71.
151. Dutta D, Donaldson JG. Search for inhibitors of endocytosis: Intended specificity and unintended consequences. *Cell Logist*. 2012;2(4):203-8.
152. Orlandi PA, Fishman PH. Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains. *J Cell Biol*. 1998;141(4):905-15.
153. Wang LH, Rothberg KG, Anderson RG. Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. *J Cell Biol*. 1993;123(5):1107-17.
154. Sofer A, Futerman AH. Cationic amphiphilic drugs inhibit the internalization of cholera toxin to the Golgi apparatus and the subsequent elevation of cyclic AMP. *J Biol Chem*. 1995;270(20):12117-22.
155. Smart EJ, Foster DC, Ying YS, Kamen BA, Anderson RG. Protein kinase C activators inhibit receptor-mediated potocytosis by preventing internalization of caveolae. *J Cell Biol*. 1994;124(3):307-13.
156. Chang J, Jallouli Y, Kroubi M, Yuan XB, Feng W, Kang CS, et al. Characterization of endocytosis of transferrin-coated PLGA nanoparticles by the blood-brain barrier. *Int J Pharm*. 2009;379(2):285-92.
157. Ulrich S, Huth RS, and Regine Peschka-Süss. Spectral Imaging for the Investigation of the Intracellular Fate of Liposomes. In: Gregoriadis G, editor. *Liposome Technology*: Informa Healthcare; 2007. p. 341-72.
158. Chang C-C, Wu M, Yuan F. Role of specific endocytic pathways in electrotransfection of cells. *Molecular Therapy — Methods & Clinical Development*. 2014;1:14058.
159. Iversen TG, Frerker N, Sandvig K. Uptake of ricinB-quantum dot nanoparticles by a macropinocytosis-like mechanism. *Journal of Nanobiotechnology*. 2012;10(1):1-11.
160. Veldhoen S, Laufer SD, Restle T. Recent developments in peptide-based nucleic acid delivery. *Int J Mol Sci*. 2008;9(7):1276-320.
161. Trofymchuk K, Reisch A, Shulov I, Mely Y, Klymchenko AS. Tuning the color and photostability of perylene diimides inside polymer nanoparticles: towards biodegradable substitutes of quantum dots. *Nanoscale*. 2014;6(21):12934-42.
162. Reisch A, Didier P, Richert L, Oncul S, Arntz Y, Mély Y, et al. Collective fluorescence switching of counterion-assembled dyes in polymer nanoparticles. *Nat Commun*. 2014;5.
163. Reul R, Tsapis N, Hillaireau H, Sancey L, Mura S, Recher M, et al. Near infrared labeling of PLGA for in vivo imaging of nanoparticles. *Polymer Chemistry*. 2012;3(3):694-702.

164. Wagh A, Qian SY, Law B. Development of biocompatible polymeric nanoparticles for in vivo NIR and FRET imaging. *Bioconjugate Chemistry*. 2012;23(5):981-92.
165. Merian J, Gravier J, Navarro F, Texier I. Fluorescent nanoprobe dedicated to in vivo imaging: from preclinical validations to clinical translation. *Molecules*. 2012;17(5):5564-91.
166. Bhattacharjee S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *J Control Release*. 2016;235:337-51.
167. Söğüt Ertaş Ö, Kayalı A. Analitik Yöntem Geçerliliğine Genel Bir Bakış. *J Fac Pharm, Ankara*. 2005; 34(1):41-57.
168. Toprak S. Nanojel Formülasyonlarının Dermal İlaç Taşıyıcı Sistem Olarak Tasarımı ve Değerlendirilmesi [Yüksek lisans tezi]. Ankara: Hacettepe Üniversitesi; 2010.
169. Saxena V, Sadoqi M, Shao J. Enhanced photo-stability, thermal-stability and aqueous-stability of indocyanine green in polymeric nanoparticulate systems. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology*. 2004;74(1):29-38.
170. Wang YG, Kim H, Mun S, Kim D, Choi Y. Indocyanine green-loaded perfluorocarbon nanoemulsions for bimodal (19)F-magnetic resonance/nearinfrared fluorescence imaging and subsequent phototherapy. *Quant Imaging Med Surg*. 2013;3(3):132-40.
171. Bjornsson OG, Murphy R, Chadwick VS, Bjornsson S. Physicochemical studies on indocyanine green: molar lineic absorbance, pH tolerance, activation energy and rate of decay in various solvents. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry Zeitschrift fur klinische Chemie und klinische Biochemie*. 1983;21(7):453-8.
172. Barichello JM, Morishita M, Takayama K, Nagai T. Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method. *Drug Dev Ind Pharm*. 1999;25(4):471-6.
173. Nicolas J, Mura S, Brambilla D, Mackiewicz N, Couvreur P. Design, functionalization strategies and biomedical applications of targeted biodegradable/biocompatible polymer-based nanocarriers for drug delivery. *Chem Soc Rev*. 2013;42(3):1147-235.
174. Chavez de Paz LE, Resin A, Howard KA, Sutherland DS, Wejse PL. Antimicrobial effect of chitosan nanoparticles on streptococcus mutans biofilms. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77(11):3892-5.
175. Aktas Y, Yemisci M, Andrieux K, Gursoy RN, Alonso MJ, Fernandez-Megia E, et al. Development and brain delivery of chitosan-PEG nanoparticles functionalized with the monoclonal antibody OX26. *Bioconj Chem*. 2005;16(6):1503-11.
176. Luk BT, Jack Hu C-M, Fang RH, Dehaini D, Carpenter C, Gao W, et al. Interfacial interactions between natural RBC membranes and synthetic polymeric nanoparticles. *Nanoscale*. 2014;6(5):2730-7.

177. Gaudin A, Tagit O, Sobot D, Lepetre-Mouelhi S, Mougin J, Martens TF, et al. Transport mechanisms of squalenoyl-adenosine nanoparticles across the blood–brain barrier. *Chemistry of Materials*. 2015;27(10):3636-47.
178. Akagi J, Kordon M, Zhao H, Matuszek A, Dobrucki J, Errington R, et al. Real-time cell viability assays using a new anthracycline derivative DRAQ7®. *Cytometry Part A*. 2013;83A(2):227-34.
179. Snipstad S, Hak S, Baghirov H, Sulheim E, Morch Y, Lelu S, et al. Labeling nanoparticles: Dye leakage and altered cellular uptake. *Cytometry A*. 2016.
180. Proulx ST, Luciani P, Derzsi S, Rinderknecht M, Mumprecht V, Leroux JC, et al. Quantitative imaging of lymphatic function with liposomal indocyanine green. *Cancer Res*. 2010;70(18):7053-62.
181. Schubert S, Delaney JT, Schubert US. Nanoprecipitation and nanoformulation of polymers: from history to powerful possibilities beyond poly(lactic acid). *Soft Matter*. 2011;7(5):1581-8.
182. Sahoo SK, Panyam J, Prabha S, Labhasetwar V. Residual polyvinyl alcohol associated with poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake. *J Control Release*. 2002;82(1):105-14.
183. Saadati R, Dadashzadeh S. Marked effects of combined TPGS and PVA emulsifiers in the fabrication of etoposide-loaded PLGA-PEG nanoparticles: in vitro and in vivo evaluation. *Int J Pharm*. 2014;464(1-2):135-44.
184. Gaudin A, Yemisci M, Eroglu H, Lepetre-Mouelhi S, Turkoglu OF, Donmez-Demir B, et al. Squalenoyl adenosine nanoparticles provide neuroprotection after stroke and spinal cord injury. *Nat Nanotechnol*. 2014;9(12):1054-62.
185. Rejman J, Oberle V, Zuhorn IS, Hoekstra D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem J*. 2004;377(Pt 1):159-69.
186. Musumeci T, Pellitteri R, Spatuzza M, Puglisi G. Nose-to-brain delivery: evaluation of polymeric nanoparticles on olfactory ensheathing cells uptake. *J Pharm Sci*. 2014;103(2):628-35.
187. Gao H, Yang YW, Fan YG, Ma JB. Conjugates of poly(DL-lactic acid) with ethylenediamino or diethylenetriamino bridged bis(beta-cyclodextrin)s and their nanoparticles as protein delivery systems. *J Control Release*. 2006;112(3):301-11.
188. Abdel-Mottaleb MM, Beduneau A, Pellequer Y, Lamprecht A. Stability of fluorescent labels in PLGA polymeric nanoparticles: Quantum dots versus organic dyes. *Int J Pharm*. 2015;494(1):471-8.
189. Chang J, Paillard A, Passirani C, Morille M, Benoit JP, Betbeder D, et al. Transferrin adsorption onto PLGA nanoparticles governs their interaction with biological systems from blood circulation to brain cancer cells. *Pharm Res*. 2012;29(6):1495-505.
190. Weiss B, Schaefer UF, Zapp J, Lamprecht A, Stallmach A, Lehr C-M. Nanoparticles made of Fluorescence-Labelled Poly(L-lactide-co-glycolide):

Preparation, Stability, and Biocompatibility. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2006;6(9-1):3048-56.

191. Reisch A, Klymchenko AS. Fluorescent Polymer Nanoparticles Based on Dyes: Seeking brighter tools for bioimaging. *Small*. 2016;12(15):1968-92.

192. Makadia HK, Siegel SJ. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers (Basel)*. 2011;3(3):1377-97.

193. Debnath P, Chakraborty S, Deb S, Nath J, Bhattacharjee D, Hussain SA. Reversible transition between excimer and J-aggregate of indocarbocyanine dye in Langmuir–Blodgett (LB) Films. *The Journal of Physical Chemistry C*. 2015;119(17):9429-41.

194. Magenheimer B, Levy MY, Benita S. A new in vitro technique for the evaluation of drug release profile from colloidal carriers - ultrafiltration technique at low pressure. *International Journal of Pharmaceutics*. 1993;94(1):115-23.

195. Singh R, Lillard Jr JW. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Experimental and Molecular Pathology*. 2009;86(3):215-23.

196. Hoffman AS. The origins and evolution of “controlled” drug delivery systems. *J Control Release*. 2008;132(3):153-63.

197. Govender T, Stolnik S, Garnett MC, Illum L, Davis SS. PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. *Journal of Controlled Release*. 1999;57(2):171-85.

198. Saxena V, Sadoqi M, Shao J. Indocyanine green-loaded biodegradable nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and in vitro release. *Int J Pharm*. 2004;278(2):293-301.

199. Ahmed TA, Aljaeid BM. Preparation, characterization, and potential application of chitosan, chitosan derivatives, and chitosan metal nanoparticles in pharmaceutical drug delivery. *Drug Des Devel Ther*. 2016;10:483-507.

200. Fan W, Yan W, Xu Z, Ni H. Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2012;90:21-7.

201. Enriquez de Salamanca A, Diebold Y, Calonge M, Garcia-Vazquez C, Callejo S, Vila A, et al. Chitosan nanoparticles as a potential drug delivery system for the ocular surface: toxicity, uptake mechanism and in vivo tolerance. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47(4):1416-25.

202. Yemisci M, Caban S, Gursay-Ozdemir Y, Lule S, Novoa-Carballal R, Riguera R, et al. Systemically administered brain-targeted nanoparticles transport peptides across the blood-brain barrier and provide neuroprotection. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2015;35(3):469-75.

203. Yemisci M, Gursay-Ozdemir Y, Caban S, Bodur E, Capan Y, Dalkara T. Transport of a caspase inhibitor across the blood-brain barrier by chitosan nanoparticles. *Methods Enzymol*. 2012;508:253-69.

204. Sahay G, Alakhova DY, Kabanov AV. Endocytosis of nanomedicines. *Journal of Controlled Release*. 2010;145(3):182-95.
205. Napierska D, Thomassen LC, Rabolli V, Lison D, Gonzalez L, Kirsch-Volders M, et al. Size-dependent cytotoxicity of monodisperse silica nanoparticles in human endothelial cells. *Small*. 2009;5(7):846-53.
206. Cho EC, Zhang Q, Xia Y. The effect of sedimentation and diffusion on cellular uptake of gold nanoparticles. *Nat Nanotechnol*. 2011;6(6):385-91.
207. Agarwal R, Singh V, Journey P, Shi L, Sreenivasan SV, Roy K. Mammalian cells preferentially internalize hydrogel nanodiscs over nanorods and use shape-specific uptake mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(43):17247-52.
208. Muro S, Garnacho C, Champion JA, Leferovich J, Gajewski C, Schuchman EH, et al. Control of endothelial targeting and intracellular delivery of therapeutic enzymes by modulating the size and shape of ICAM-1-targeted carriers. *Mol Ther*. 2008;16(8):1450-8.
209. Chang CC, Wu M, Yuan F. Role of specific endocytic pathways in electrotransfection of cells. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2014;1:14058.
210. De Smet L, Ceelen W, Remon JP, Vervaet C. Optimization of drug delivery systems for intraperitoneal therapy to extend the residence time of the chemotherapeutic agent. *The Scientific World Journal*. 2013;2013:7.
211. Karatas H, Aktas Y, Gursoy-Ozdemir Y, Bodur E, Yemisci M, Caban S, et al. A nanomedicine transports a peptide caspase-3 inhibitor across the blood-brain barrier and provides neuroprotection. *J Neurosci*. 2009;29(44):13761-9.
212. Markoutsas E, Pampalakis G, Niarakis A, Romero IA, Weksler B, Couraud PO, et al. Uptake and permeability studies of BBB-targeting immunoliposomes using the hCMEC/D3 cell line. *Eur J Pharm Biopharm*. 2011;77(2):265-74.
213. Gratton SE, Ropp PA, Pohlhaus PD, Luft JC, Madden VJ, Napier ME, et al. The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(33):11613-8.

8. EKLER

EK-1: Etik Kurul Onay Belgesi

EGE ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

SAYI: 2016-010
KONU: Onay

24.02.2016

Etik kurulumuza yapmış olduğunuz başvuru doğrultusunda **“FARKLI ÖZELLİKLERE SAHİP NANOPARTİKÜL FORMÜLASYONLARININ BİYODAĞILIMLARININ BELİRLENMESİ VE DEĞERLENDİRİLMESİ”** isimli araştırma projeniz değerlendirilmiştir.

Yürütücü: Prof. Dr. Yılmaz ÇAPAN, Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Doç. Dr. Yeliz YILDIRIM, Ege Üniversitesi ARGEFAR/ Fen Fakültesi
Uzm. Ecz. Serhat KOZLU, Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Ecz. Adem ŞAHİN, Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Proje başvuru formunuzda belirtildiği koşullarda deney hayvanı kullanarak araştırmayı gerçekleştirmeniz kurulumuz tarafından uygun bulunmuştur. Saygılarımla bilgilerinizi rica ederim.



Prof. Dr. Lokman ÖZTÜRK
(E.Ü. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı)



Prof. Dr. Gülcihan Mehtap KÖKSAL *Katılmadı* Prof. Dr. Uğur KAYA

Prof. Dr. Hüseyin TEZEL *Katılmadı*

Prof. Dr. Altuğ YAVAŞOĞLU *Katılmadı*

Prof. Dr. Haşmet ÇAĞIRGAN *Katılmadı*

Prof. Dr. Figen KIRKPINAR *Katılmadı*

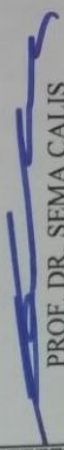
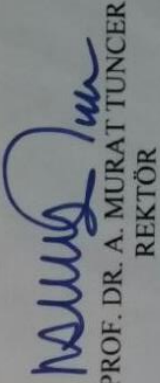
Prof. Dr. N. Ülkü KARABAY YAVAŞOĞLU *Katılmadı*

Yrd. Doç. Dr. Sumru SÖZER KARADAĞLI *Katılmadı*

Özcan NALBANTOĞLU *Katılmadı*

Tingiz ÖZCAN *Katılmadı*

EK-2: Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası

	HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU	
DENEY HAYVANI KULLANIM SERTİFİKASI		
ADEM ŞAHİN		
ÇEVRE VE ORMAN BAKANLIĞI TARAFINDAN ALTI TEMMUZ İKİBİNALTI TARİHİNDE YAYIMLANAN "HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURULLARININ ÇALIŞMA USUL VE ESASLARINA DAİR YÖNETMELİK" UYARINCA EĞİTİM ALMIŞ VE DENEY HAYVANI KULLANIM SERTİFİKASI ALMAYA HAK KAZANMIŞTIR.		
	SERTİFİKA SINIFI: B	
PROF. DR. SEMA ÇALIŞ ETİK KURUL BAŞKANI	BELGE NO: 214 TARİH: 18.02.2014	PROF. DR. A. MURAT TUNCER REKTÖR
* YÖNETMELİK HÜKÜMLERİ ORMAN VE SU İŞLERİ BAKANLIĞI TARAFINDAN YÜRÜTÜLMEKTEDİR.		

9.ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı: Adem Şahin
Doğum yeri ve tarihi: Tercan/1988

II- Eğitimi

Erzincan Nevzat Ayaz Fen Lisesi 2002–2006 (5/5)
Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi 2006-2011 (3,63/4)

III- Bilimsel Faaliyetleri

Yayınları

Sahin, A., Esendagli, G., Yerlikaya, F., Caban Toktas, S., Yoyen Ermis, D., Horzum, U., Aktas, Y., Khan, M., Couvreur, P., Capan, Y. “A small variation in average particle size of PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation leads to considerable change in nanoparticles’ characteristics and efficacy of intracellular delivery” (Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology - DOI: 10.1080/21691401.2016.1276924.)

(Tez kapsamında bugüne kadar üretilen yayınlar italik olarak yazılmıştır)

Sözlü Bildirileri

Sahin, A., Yerlikaya, F., Aktas, Y., Esendagli, G., Capan, Y. “Comparing Intracellular Delivery of PLGA and Chitosan Nanoparticles: Lessons and Challenges” The Globalization of Pharmaceutics Education Network (GPEN) 2016, November 9-12 2016, Kansas, USA.

Sahin, A. “A Pharmacy In James Joyce’s Ulysses: The Sweny’s Pharmacy” XI. National Conference on the History of Turkish Pharmacy, 25-28 May 2014, Kayseri, Turkey.

Sahin, A., Aktas, Y. “Oral Controlled Release Systems in Turkish Health System” 11. Turkish Pharmacy Congress, 18-21 October 2012, Ankara, Turkey.

Poster Bildirileri

Sahin, A., Esendagli, G., Yerlikaya, F., Kozlu, S., Yoyen Ermis, D., Horzum, U., Aktas, Y., Khan, M., Couvreur, P., Capan, Y. “Intracellular delivery and intraperitoneal retention of different sized PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation method” 18th International Pharmaceutical Technology Symposium-IPTS 2016, September 18-21 2016, Antalya, Turkey.

Tonbul, H., Sahin, A., Kaynak, M.S., Capan, Y. "Development and in vitro evaluation of transferrin targeted PLGA nanoparticle" 18th International Pharmaceutical Technology Symposium-IPTS 2016, September 18-21 2016, Antalya, Turkey.

Kozlu, S., Sahin, A., Sahan, S., Yerlikaya, F., Capan, Y. "Co-Encapsulation Studies of Doxorubicin and Celecoxib in PLGA Nanoparticles" 18th International Pharmaceutical Technology Symposium-IPTS 2016, September 18-21 2016, Antalya, Turkey.

Sahin, A., Toktas, S., Aktas, Y., Capan, Y. 'Preparation and in vitro Evaluation of Ziconotide Loaded PLGA and Chitosan Nanoparticles' Barcelona BioMed Conference "Blood Brain Barrier", October 2-4 2015, Barcelona, Spain.

Sahin, A., Toktas, S., Kyzy, G.A., Yerlikaya, F., Aktas, Y., Capan, Y. 'Determination of Critical Parameters of Paclitaxel and Flurbiprofen Co-Loaded PLGA Nanoparticles Prepared by Nanoprecipitation' American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS) Annual Meeting and Exposition 2015, October 25-29 2015, Orlando, USA.

Sahin, A., Toktas, S., Aktas, Y., Capan, Y. 'Particle Size Optimization of Ibuprofen Loaded PLGA Nanoparticles Using Box-Behnken Design' American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS) Annual Meeting and Exposition 2015, October 25-29 2015, Orlando, USA.

Caban-Toktas, S., Lule, S., Sahin, A., Kara, A., Bozdog Pehlivan, S., Vural, I., Karli Oguz, K., Mut Askun, M., Capan, Y. 'In Vitro and In Vivo Evaluation of Paclitaxel and R-Flurbiprofen Loaded Chitosan Coated PLGA Nanoparticles' American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS) Annual Meeting and Exposition 2015, October 25-29 2015, Orlando, USA.

Kyzy, G.A., Toktas, S., Sahin, A., Capan, Y. 'Effects of Combined Surfactants in the Formulation of Docetaxel-Loaded PLGA Nanoparticles' American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS) Annual Meeting and Exposition 2015, October 25-29 2015, Orlando, USA.

Babat, D., Toktas, S., Sahin, A., Yerlikaya, F., Vural, I., Capan, Y. 'Formulation and In Vitro Evaluation of Nanoparticles Containing Docetaxel' American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS) Annual Meeting and Exposition 2014, November 2-6 2014, San Diego, USA.

Güney, S., Toktas, S., Erdogdu, C., Sahin, A., Sagiroglu, M., Capan, Y., Aktas, A. 'Inhibition Of Microbial Leakage at Implant-Abutment Interface with Chitosan Gels' American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS) Annual Meeting and Exposition 2014, San Diego, November 2-6 2014, USA.