T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

NANOBİYOTEKNOLOJİDE HEDEFLENDİRİLEBİLEN MUKOZAYA YAPIŞABİLİR SALIM SİSTEMLERİNİN SENTEZİ ve KARAKTERİZASYONU

Emine Büşra FİDAN

DANIŞMAN
Prof. Dr. Saadet Kevser PABUCCUOĞLU
(danışman imzalı olacaktır)

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Kimyasal Teknolojiler, Doktora Programı

Kasım, 2024

TEZ KABUL VE ONAYI

Emine Büşra FİDAN tarafından, **Prof. Dr. Saadet Kevser PABUCCUOĞLU** danışmanlığında hazırlanan **" NANOBİYOTEKNOLOJİDE HEDEFLENDİRİLEBİLEN MUKOZAYA YAPIŞABİLİR SALIM SİSTEMLERİNİN SENTEZİ ve KARAKTERİZASYONU "** başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından **18/11/2024** tarihinde yapılan sınav sonucunda **oy birliği** ile başarılı bulunarak **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

		İmza	**Sonuç**
DANIŞMAN	Prof. Dr. Saadet Kevser PABUCCUOĞLU İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Prof. Dr. Tülin Banu İYİM İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Prof. Dr. E. Ş. Nazlı ARDA İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Prof. Dr. Aysel KANTÜRK FİGEN Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Prof. Dr. Gülten GÜRDAĞ İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve bilimsel etik kuralları içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını ve her türlü hukuki sorumluluğu aldığımı kabul ederim.

Emine Büşra FİDAN

(İmza)

Hayattaki en büyük şansım Annem' e ve en güzel mucizem Kızım' a ithaf ediyorum…

BÜTÇE DESTEKLERİ

NANOBİYOTEKNOLOJİDE HEDEFLENDİRİLEBİLEN MUKOZAYA YAPIŞABİLİR SALIM SİSTEMLERİNİN SENTEZİ ve KARAKTERİZASYONU

Bu tez çalışması için herhangi bir kurumdan bütçe desteği alınmamıştır.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bilgisini, ilgisini ve desteğini esirgemeyen, bu süreçte mesleğimi bana sevdiren değerli Hocam Prof. Dr. Saadet Kevser PABUCCUOĞLU' na tüm kalbimle en içten teşekkürlerimi sunarım.

Doktora çalışmalarımda beni cesaretlendiren, Ar-Ge yapmayı öğreten, bana gösterdiği sabır, anlayış ve bilgisiyle beni rahatlatan değerli hocam Doç. Dr. Mehmet Koray GÖK' e teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim süresince elindeki tüm imkanlar ile desteklerini esirgemeyen İ.Ü.C. Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı öğretim üyelerinden değerli hocam Prof. Dr. Serhat PABUCCUOĞLU' na ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum değerli hocam Prof. Dr. Kamber DEMİR' e teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitim süresince gösterdikleri katkıdan dolayı İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknolojiler Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof Dr. Erdal CEVHER' e ve Dr. Öğr. Üyesi Melike SESSEVMEZ' teşekkürlerimi sunarım.

Tez izleme komitesi üyelerim, değerli hocalarım Prof. Dr. Tülin Banu İYİM ve Prof. Dr. E. Ş. Nazlı ARDA gösterdikleri ilgi ve destekleri için teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim sürecimde katkılarından dolayı Kimya Mühendisliği Bölümü, Kimyasal Teknolojiler Anabilim Dalı Başkanı Hocam Prof. Dr. Gülten GÜRDAĞ ve bölümde bulunan tüm değerli hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Doktora sürecinin tüm zorluklarını beraber göğüslediğimiz ve destekleriyle hayatımı da güzelleştiren, kıymetlerini her geçen gün daha çok anladığım çok değerli yol arkadaşlarım Öğr. Gör. Dr. Kevser BAL' a, Dr. Sema ŞENTÜRK' e, Araş. Gör. Sibel ÇELİK' e, Araş. Gör. Dr. Özlem KAPLAN' a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımı gerçekleştirebilmem için laboratuvarını açan ve imkanlarından faydalanmamı sağlayan Altınbaş Üniversitesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. N. Buket AKSU' ya ve desteğini esirgemeyen yol arkadaşım Arş. Gör. Dr. Gizem YEĞEN' e teşekkürlerimi sunarım.

Doktora süresince aynı laboratuvarda çalıştığımız, çalışmalarımı kolaylaştırmak için gösterdikleri anlayış ve destekler için Araş. Gör. Oğuz YÜCEL' e ve Araş. Gör. Dr. Demet H. ÖZALTUN' a teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimime başlamam konusunda beni cesaretlendiren ve destekleyen değerli arkadaşım Samsun Üniversitesi, Biyomedikal Mühendisliği Bölümü Öğretim Üyesi Doç. Dr. Fatma Ünal' a tüm katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

YÖK 100/2000 kapsamında doktora eğitimim süresince maddi olarak destek sağlayan Yüksek Öğrenim Kurumuna teşekkürlerimi sunarım.

Tez kapsamında nanopartikül çalışmalarımızı gerçekleştirebilmek için ehemmiyet arz eden HORIBA nanoPartica SZ-100V2 (Japonya) cihazının DPT-2019K12-149071 nolu proje kapsamında grubumuza temin edilmesini sağlayan Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Müdürü Prof. Dr. Günnur DENİZ' e teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim hayatım boyunca desteğini esirgemeyen babama, ilk öğretmenim ve daima kılavuzum olan, hayatta olduğu sürece her an yanımda olacağından şüphe duymadığım ve en büyük şansım olan anneme tüm kalbimle teşekkürlerimi sunarım.

Tez yazma sürecimi bana güzelleştiren kızım Azra' ya tüm kalbimle teşekkürlerimi sunarım.

Özellikle, bu zorlu yolu başarı ile bitirdiğim için KENDİM' e çok teşekkür ederim.

Kasım 2024 Emine Büşra FİDAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ KABUL VE ONAYI ..... **ii**
BEYAN ..... **iii**
BÜTÇE DESTEKLERİ ..... **v**
TEŞEKKÜR ..... **vi**
İÇİNDEKİLER ..... **viii**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **xii**
TABLO LİSTESİ ..... **xiv**
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ ..... **xvi**
ÖZET ..... **xviii**
ABSTRACT ..... **xx**
1. GİRİŞ **1**
2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE **3**
2.1. MUKOADEZYON 3
2.1.1. Mukozal Membran Yapısı 4
2.2. MUKOADEZYON MEKANİZMASI 7
2.3. MUKOADEZYONU ETKİLEYEN FAKTÖRLER 9
2.3.1. Polimere ait Faktörler 9
2.3.2. Çevresel Faktörler 11
2.4. MUKOADEZİF POLİMERLER 11
2.4.1. Kaynağına göre Sınıflandırılan Mukoadezif Polimerler 13
2.4.2. Yüzey Yüküne göre Sınıflandırılan Mukoadezif Polimerler 13
2.4.3. Yeni Jenerasyon Mukoadezif Polimerler 14
2.4.4. Mukoadezif Polimerlere Örnekler 15
2.5. KİTOSAN 16
2.5.1. Mukoadezif Özelliği ve Hidrofobisitesi Arttırılmış Kitosana ait Yapılan Çalışmaların Özetlenmesi 18
2.6. KİTOSANIN NANOPARTİKÜL FORMÜLASYONLARININ HAZIRLANMASI 25
2.6.1. İyonik Jelasyon Yöntemi (İyonik Çapraz Bağlanma) 26
2.7. NANOPARTİKÜLER SİSTEMLERİN FİZİKOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ 26
2.7.1. Partikül Boyutu 27
2.7.2. Partikül Şekli 28

2.7.3. Partikül Yüzey Özellikleri 29
2.7.4. Sertlik 31
3. YÖNTEM 34
3.1. KİMYASAL MADDELER 34
3.2. KULLANILAN CİHAZLAR 34
3.2.1. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometresi (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) (FTIR) 34
3.2.2. Proton Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopi Cihazı (Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy) (^{1}H-NMR) 34
3.2.3. Jel Geçirgenlik Kromatografi Boyutlarına Göre Ayırma (Gel Permeation Chromatography- Size Exlusion Chromatography) (GPC-SEC) Sistemi 34
3.2.4. *Texture* Analizi Cihazı 35
3.2.5. UV/Görünür Spektrofotometresi 35
3.2.6. Nanopartiküler Sistemlerin Dinamik Işık Saçılımı Analizi (DLS) 35
3.2.7. *In Vitro* Sitotoksisite Kullanılan Cihazlar 35
3.2.8. Liyofilizatör 36
3.2.9. Santrifüj 36
3.2.10. Ultrasonikasyon Cihazı 36
3.3. DENEYSEL YÖNTEMLER 36
3.3.1. Depolimerize Kitosan (DChi) sentezi 36
3.3.2. Chi' nın PA ile Modifikasyon Reaksiyonu Ürünlerinin (Chi-PA) Sentezi 36
3.3.3. Chi-PA ve DChi-PA Ürünlerinin Tiyolleme Reaksiyonları 38
3.4. ÜRÜNLERİN KARAKTERİZASYONU 39
3.4.1. FTIR Analizi 39
3.4.2. ^{1}H-NMR Analizi 39
3.4.3. GPC-SEC Analizi 39
3.4.4. Tiyollenmiş Ürünlerin Tiyol Grubu Tayini 39
3.4.5. Çözünürlük Denemeleri 40
3.5. ÜRÜNLERİN NANOPARTİKÜLER SİSTEMLERİNİN ELDE EDİLMESİ İÇİN YAPILAN OPTİMİZASYON ÇALIŞMALARI 40
3.5.1. Ultrasonikasyon Yöntemi ile Yapılan Denemeler 40
3.5.2. İyonik Jelasyon Yöntemi ile Yapılan Denemeler 41
3.6. *IN VITRO* SİTOTOKSİSİTE ÇALIŞMALARI 41
3.7. ÜRÜNLERİN MUKOADEZYON ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ 42
3.7.1. *Texture* Analiz Yöntemi 43

3.7.2. Mukozal Membran Yüzeyinde Nanopartikül Sistemin Alıkonması/Yıkama Metodu 44
4. BULGULAR 46
4.1. FTIR ANALİZİ 46
4.2. ^{1}HNMR ANALİZİ 48
4.3. GPC/SEC ANALİZİ 49
4.4. TİYOL GRUBU TAYİNİ 49
4.5. ÜRÜNLERİN ÇÖZÜNÜRLÜKLERİN İNCELENMESİ 50
4.6. DChi ve MODİFİYE DChi ÜRÜNLERİNİN NANOPARTİKÜLER SİSTEMLERİNİN HAZIRLANMASI İÇİN OPTİMİZASYON ÇALIŞMALARI 51
4.6.1. Ultrasonikasyon Yöntemi ile TGA-Chi-PA$_{(1:0,50)}$ Nanopartiküler Sistemin Hazırlanması 51
4.6.2. nDChi, nDChi-PA$_{(1:0,25)}$ ve nTGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ Formülasyonun İyonik Jelasyon Yöntemi ile Optimizasyonu 52
4.7. Polimerlerin MTT Yöntemi ile Sitotoksisite Özelliklerinin Belirlenmesi 54
4.8. POLİMERLERİN MUKOADEZYON ÖZELLİĞİNİNİNCELENMESİ 55
4.8.1. DChi, DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ve TGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ Ürünlerinin Mukoadezyon Özelliğinin *Texture* Analizi ile Belirlenmesi 55
4.8.2. nDChi, nDChi-PA$_{(1:0,25)}$ ve nTGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ Sistemlerin Alıkonması/Yıkama Metodu ile Mukoadezyon Özelliğinin İncelenmesi 57
5. TARTIŞMA 59
5.1. ÜRÜNLERİN KARAKTERİZASYONU 59
5.1.1. FTIR Spektra Değerlendirme 59
5.1.2. ^{1}H-NMR Analiz Sonucunun Değerlendirilmesi 64
5.1.3. GPC-SEC Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi 65
5.1.4. Tiyollenmiş Ürünlerin Tiyol Grubu Tayini 65
5.1.5. Ürünlerin Çözünürlük Davranışlarının Değerlendirilmesi 65
5.2. Ürünlerin Nanopartiküler Sistemlerinin Elde Edilmesi İçin Yapılan Optimizasyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi 65
5.2.1. Ultrasonikasyon Yönteminin Değerlendirilmesi 66
5.2.2. İyonik Jelasyon Yönteminin Değerlendirilmesi 66
5.2.3. nTGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ Formülasyonun Stabilitesinin Değerlendirilmesi 68
5.3. *In Vitro* Sitotoksisite Çalışmalarının Değerlendirilmesi 68
5.4. Ürünlerin Mukoadezyon Özelliklerinin Değerlendirilmesi 69
5.4.1. *Texture* Analiz Yöntemi 69

5.4.2. Mukozal Membran Yüzeyinde Nanopartikül Sistemin Alıkonması/Yıkama Metodu 70
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 72
KAYNAKLAR 74
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI 88
ETİK KURUL İZİN YAZISI 89
KURUM İZNİ YAZILARI 90
ÖZGEÇMİŞ 91

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Mukoadezyondan sorumlu mukus ve musin yapısı 5

Şekil 2.2: Burun boşluğu ve nazal mukoza 7

Şekil 2.3: Mukoadezyon mekanizması adımları 8

Şekil 2.4: Polimer- mukozal membran etkileşimiyle farklı bağların oluşumu 14

Şekil 2.5: Tiyollenmiş polimer (A) ve nişasta esaslı biyopolimerin TGA ile reaksiyonu sonucu oluşan tioeter/tioester yapının (B) ile müsin glikoproteinleri arasında oluşan kovalent bağların reaksiyon mekanizması. 15

Şekil 2.6: Kitin ve kitosanın kimyasal yapısı 17

Şekil 2.7: Mukoadesif Kitosan Nanopartiküller ile İlaç Taşıma Mekanizması 18

Şekil 2.8: İyonik jelasyon ile kitosan nanopartiküllerinin oluşumu ve mekanizması 26

Şekil 2.9: Nanopartiküllerin uygulamada etkin olan karakteristikleri 27

Şekil 2.10: Kolloidal bir çözeltideki zeta potansiyeli oluşum mekanizması 30

Şekil 3.1: Texture analiz cihazı. 35

Şekil 3.2: Chi ve DChi' nin PA ile modifikasyonuna ait reaksiyon mekanizması. 37

Şekil 3.3: TGA-Chi-$PA_{(1:0,50)}$ ürününün sentezine ait reaksiyon mekanizması..... 38

Şekil 3.4: Koyun burun mukoza dokusu. 43

Şekil 3.5: Test için kullanılan ürünlerin tabletleri DChi (a) DChi-$PA_{(1:0,25)}$ (b), TGA-DChi-$PA_{(1:0,25)}$ (c). 43

Şekil 3.6: Mukozal membran yüzeyinde nanopartiküller sistemin alıkonması/yıkama yönteminin çalışma prensibine ait adımların şematik gösterilmesi 45

Şekil 4.1: Farklı PA oranlarında Chi ve DChi modifikasyon ürünlerine ait FTIR spektra..... 46

Şekil 4.2: PA'e ait FTIR spektra. 47

Şekil 4.3: TGA-Chi-$PA_{(1:0,50)}$ ürününe ait FTIR spektra. 47

Şekil 4.4: DChi, Deneme 5 DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ve Deneme 8 TGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ürünlerine ait FTIR spektra. 48

Şekil 4.5: DChi' e ait ^{1}H NMR spektra. 48

Şekil 4.6: DChi-PA$_{(1:0,25)}$' e ait ^{1}H NMR spektra. 49

Şekil 4.7: nDChi-PA$_{(1:0,25)}$ ve nTGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ürünlerinin A)0,1 mg/mL, B)0,25 mg/mL nanopartikül konsantrasyonlarında HEK293 hücreleri üzerindeki sitotoksisite özellikleri. 55

Şekil 4.8: (a); DChi, (b); DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ve (c); TGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ürünlerin nazal doku üzerine 3 N 120 sn çalışma koşullarında Texture analiz ölçüm grafikleri. 56

Şekil 4.9: (a); DChi, (b); DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ve (c); TGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ürünlerin nazal doku üzerine 1 N 60 sn çalışma koşullarında Texture analiz ölçüm grafikleri. 57

Şekil 4.10: (a); DChi, (b); DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ve (c); TGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ürünlerin musin çözeltisi ile 1 N 60 sn çalışma koşullarında Texture analiz ölçüm grafikleri. 57

Şekil 4.11: FITC ile işaretlenmiş nDChi, nDChi-PA$_{(1:0,25)}$ ve nTGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ sistemlerin nazal mukozal doku üzerinden yıkama metodu uygulanarak toplanan süpernatantların kümülatif absorbans değerlerine ait grafik. 58

Şekil 4.12: FITC ile işaretlenmiş nDChi, nDChi-PA$_{(1:0,25)}$ ve nTGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ formülasyonların nazal mukozal doku üzerinde alıkonma/yıkama analizine ait floresan görüntüleri (20X). 58

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 4.1: GPC/SEC analizinden elde edilen Chi ve DChi ait M_n ve M_w değerleri. 49

Tablo 4.2: Ürünlerin serbest tiyol grubu miktarı. 50

Tablo 4.3: Ürünlerin çözünürlük özellikleri. 50

Tablo 4.4: Ultrasonikasyon koşulları ve elde edilen partikül özellikleri. 51

Tablo 4.5: %80A 60-30 sn koşullarında 5 dk 1.ultrasonikasyon koşullarını takiben değişen şartlarda 2.ultrasonikasyon uygulanmasıyla elde edilen partikül özellikleri. 51

Tablo 4.6: Farklı DCM miktarlarında uygulanan ultrasonikasyon sonrası elde edilen partikül özellikleri. 52

Tablo 4.7: 0,1 mg/mL nanopartikül konsantrasyonunda farklı Polimer:TPP (a:a) oranlarında 250 rpm 1 saat karıştırma ile elde edilen nTGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ formülasyonun özellikleri. ..52

Tablo 4.8: 0,1 mg/mL nanopartikül konsantrasyonunda Polimer:TPP (a:a); 4:1 oranında farklı karıştırma hızlarında 1 saat karıştırma ile elde edilen nTGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ formülasyonun özellikleri. 53

Tablo 4.9: Polimer:TPP (a:a); 4:1 oranında 250 rpm 1 saat karıştırma ile farklı nanopartikül konsantrasyonlarında elde edilen nTGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ formülasyonun özellikleri. 53

Tablo 4.10: Ürünlerinin 0,1 mg/mL nanopartikül konsantrasyonunda Polimer:TPP (a:a); 4:1 oranında 250 rpm 1 saat karıştırma ile elde edilen nDChi, nDChi-PA$_{(1:0,25)}$ ve nTGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ formülasyonlarının özellikleri. 53

Tablo 4.11: TGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ürününün 0,1 mg/mL nanopartikül konsantrasyonunda Polimer:TPP (a:a); 4:1oranında 250 rpm 1 saat karıştırma ile farklı pH değerlerinde elde edilen nTGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ formülasyonun özellikleri. 54

Tablo 4.12: 0,1 mg/mL nanopartikül konsantrasyonunda Polimer:TPP (a:a); 4:1oranında 250 rpm 1 saat karıştırma ile farklı etanol miktarlarında elde edilen nTGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ formülasyonun özellikleri. 54

Tablo 4.13: 0,1 mg/mL nanopartikül konsantrasyonunda Polimer:TPP (a:a); 4:1 oranında 250 rpm 1 saat karıştırma ile elde edilen nTGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ formülasyonun oda koşullarında stabilitesi. 54

Tablo 4.14: Ürünlerin koyun nazal mukozal membran üzerine *Texture* analiz sonuçları. 56

Tablo 4.15: Ürünlerin musin çözeltisi ile selülöz asetat membran filtre üzerine mukoadezyon özellikleri. 56

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
M_w	: Ağrılıkça Ortalama Molekül Ağırlığı
M_n	: Sayıca Ortalama Molekül Ağırlığı
M_v	: Vizkozite Ortalama Molekül Ağırlığı
N	: Newton
ºC	: Santigrat Derece
µL	: Mikrolitre
mm	: Milimetre
µmol	: Mikromol
µm	: Mikrometre
nm	: Nonometre
g	: gram
µg	: Mikrogram
dk	: Dakika
sn	: Saniye
a	: Ağırlık
h	: Hacim
A	: Genlik
mV	: Milivolt (Zeta Potansiyeli)
PDI	: Polidisperslik İndeksi

Kısaltmalar	Açıklama
Chi	: Kitosan
DChi	: Depolimerize kitosan
PA	: Palmitik Asit
TGA	: Tiyoglikolik Asit
TPP	: Sodyum Tripolifosfat
EDAC	: N-(3-Dimetilaminopropil)-N′-Etilkarbodiimid hidroklorür
NHS	: N-Hidroksisüksinimid

FITC	: Floresan 5(6)-İzotiyosiyanat
DD	: Deasetilasyon Derecesi
aa	: Asetik Asit
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DMF	: Dimetil Formamid
DCM	: Diklorometan
FTIR	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
^{1}HNMR	: Proton Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
GPC-SEC	: Gel Geçirgenlik Kromatografi-Boyutlarına Göre Ayırma Kromatografi
DLS	: Dinamik Işık Saçılımı Analizi
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür
HEK293	: İnsan Embriyonik Böbrek Hücresi
SD	: Standart Sapma

ÖZET

DOKTORA TEZİ

NANOBİYOTEKNOLOJİDE HEDEFLENDİRİLEBİLEN MUKOZAYA YAPIŞABİLİR SALIM SİSTEMLERİNİN SENTEZİ ve KARAKTERİZASYONU

Emine Büşra FİDAN

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Kimyasal Teknolojiler, Doktora Programı

Danışman: Prof. Dr. Saadet K. PABUCCUOĞLU

Mukozaya yapışabilen ilaç salım sistemlerinin en önemli avantajları ilacın sistemik dolaşıma geçirgenliğinin ve ilacın biyoyararlanımının artmasını sağlamaktır. Bu nedenle, mukozal membranlar yoluyla ilaç taşıyıcı sistemler olarak yaygın kullanılan mukoadezif polimerler, toksik olmayan, biyouyumlu ve ekonomik olmasının yanında etkin ve güvenli bir mukoadezif ilaç salım sistemi geliştirmek için gerekli olan bazı moleküler karakteristiklere de sahip olmalıdırlar.

Bu tez çalışmasında biyouyumlu, biyobozunabilir, toksik olmayan, mukozal membran yoluyla ilaç taşımaya uygun karakteristiklere sahip yeni mukoadezif ilaç taşıyıcı sistemlerin sentezi, karakterizasyonu ile nanoformülasyonların hazırlanması ve özelliklerinin incelenmesi amaçlandı.

Bu amaçla öncelikle farmasötik uygulamalarda ilaç taşıyıcı olarak sıklıkla kullanılan biyopolimer olan kitosan (Chi) düşük molekül ağırlıklı Chi ürünü (DChi) elde etmek için depolimerize edildi. DChi hücre membranı ile etkileşimi yüksek palmitik asit (PA) ile ilk defa modifiye edilerek palmitoil kitosan (DChi-PA) sentezlendi ve karakterize edildi. Takiben DChi-PA ürününe mukoadezif özelliği kazandırmak için de ilk defa tiyoglikolik asit (TGA) ile

konjugatı tiyollenmiş palmitoil kitosan (TGA-DChi-PA) ürünleri sentezlendi ve karakterize edildi. Ürünlerin nanopartikül formülasyonları iyonik jelasyon yöntemi ile hazırlandı, *in vitro* sitotoksisite analizi ve mukoadezyon özellikleri değerlendirildi. Ürünlerin moleküler yapılarının aydınlatılması Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) ve Proton Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi (^{1}H NMR) analizleri ile gerçekleştirildi. TGA-DChi-PA ürünün yapısındaki tiyol grubu miktarı iyodimetrik titrasyon yöntemi ile tayin edildi. Ürünlerin nanopartikül formülasyonlarının karakterizasyonu Dinamik Işık Saçılımı Analizi (DLS) yöntemi ile partikül boyutu (nm), polidisperslik indeksi (PDI) ve zeta potansiyeli (mV) değerleri ölçülerek gerçekleştirildi. *In vitro* sitotoksisite özellikleri MTT yöntemi ile insan embriyonik böbrek hücre hattı (HEK293) kullanılarak incelendi. Ürünlerin mukoadezyon özelliği *ex vivo* koyun nazal mukozal membran ve *in vitro* 0,20 µm selüloz asetat membran filtre üzerine iki ayrı uygulama ile *Texture* analiz yöntemi ile değerlendirildi. Nanopartikül formülasyonların mukoadezif özelliğinin değerlendirilmesi *ex vivo* koyun nazal mukozal membran yüzeyinde nanopartiküllerin alıkonması/yıkama metodu ile gerçekleştirildi.

Bu tez çalışmasında gerçekleştirilen *ex vivo* ve *in vitro* uygulamalar neticesinde yeni DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ürünün hücre penetrasyonu arttırıcı etkisinin yanında mukoadezyonu da arttırdığı yapıya tiyol grubunun katılmasıyla sentezlenen yeni TGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ konjugat ürünün ise mukoadeziflik özelliğini daha da iyileştirdiği görüldü.

Sonuç olarak ilk defa bu çalışmada sentezlenen yeni TGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ esaslı nanopartikül formülasyonun nanobiyoteknolojide mukozal membran yoluyla biyouyumlu, toksik olmayan bir mukozaya yapışabilir nanotaşıyıcı olarak büyük önem taşıyacağı aşikardır.

Kasım 2024 , 112 sayfa.

Anahtar kelimeler: Kitosan, palmitoil kitosan, tiyollenmiş kitosan, mukozaya yapışabilir nanopartiküler sistemler

ABSTRACT

Ph.D. THESIS

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF TARGETED MUCOADHESIVE DELIVERY SYSTEMS IN NANOBIOTECHNOLOGY

Emine Büşra FİDAN

İstanbul University-Cerrahpaşa

Institute of Graduate Studies

Department of Chemical Engineering

Department of Chemical Thecnologies

Supervisor : Prof. Dr. Saadet Kevser PABUCCUOĞLU

The most important advantages of the mucoadhesive drug delivery systems are to provide increased permeability of drug into the systemic circulation and bioavailability of the drug. Therefore, mucoadhesive polymers, which were extensively used as drug delivery systems via mocasal membranes, besides being non-toxic, biocompatible and economical must possess some molecular characteristics required to develop an effective and safe mucoadhesive drug delivery system.

In this thesis study, it was aimed that synthesis and characterization of the novel biocompatible, biodegradable, non-toxic, mucoadhesive drug carrier systems, which have suitable characteristics for drug carrying via mucosal membrane, and preparation of their nanoformulations and investigation of their properties.

For this purpose, firstly, Chitosan (Chi), which is a biopolymer frequently used as drug carrier in the pharmaceutical applications, was depolymerized to obtain low molecular weight Chi product (DChi). To obtain the palmitoyl chitosan (DChi-PA), DChi was modified with palmitic acid (PA), which has high interaction with cell membrane, and characterized for the first time. Then, to gain the mucoadhesiveness to DChi-PA product, its conjugate TGA-DChi-PA was synthesized by the reaction with thioglycolic acid (TGA) and characterized, for the first time. Nanoparticle formulations of the products were prepared by ionic gelation method, their *in vitro* cytotoxicity analysis and mucoadhesion properties were evaluated.

Characterization of the molecular structures of the products were realized by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (^{1}H NMR) analyses. The amount of thiol group in the structure of the TGA-DChi-PA product was determined by iodimetric titration method. Characterization of the nanoparticle formulations of the products were realized using Dynamic Light Scattering Analysis (DLS) method by measuring their particle size (nm), polydispersity index (PDI) and zeta potential (mV) values. *In vitro* cytotoxicity properties were investigated by using MTT assay on human embryonic kidney cell line (HEK293).

The mucoadhesion properties of the products were evaluated by *Texture* analysis method with two separate applications on *ex vivo* sheep nasal mucosal membrane and *in vitro* 0.20 µm cellulose acetate membrane filter. The evaluation of nanoparticle formulations was evaluated by the retention/rinse method of nanoparticles on the *ex vivo* sheep nasal mucosal membrane surface.

As a result of the *ex vivo* and *in vitro* applications carried out in this thesis study, it was observed that the new DChi-PA$_{(1:0,25)}$ product increased mucoadhesion in addition to its cell penetration enhancing effect and that the new TGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ conjugate synthesized by adding the thiol group to the structure further improved the mucoadhesiveness property. In conclusion, it is obvious that the nanoparticle formulation based on TGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ synthesized in this study for the first time, will be great importance as a biocompatible non-toxic mucoadhesive nanocarrier via mucosal membrane in the nanobiotechnology.

November 2024, 112 pages.

Keywords: Chitosan, palmitoyl chitosan, thiolated chitosan, mucoadhesive nanoparticle systems

1. GİRİŞ

Nanoteknoloji bilimi doğal, sentetik, yarı sentetik polimerler, lipitler ve metallerden oluşan nanometre ölçeğinde malzemelerin geliştirilmesiyle enerji, elektronik, malzeme bilimi, biyomedikal ve daha birçok alanda gelişim göstermektedir. Biyomedikal alanda nano ölçekli tıbbi araçların geliştirilmesinde, görüntülemede, hastalıkların teşhis edilmesinde, doku mühendisliğinde ve ilaçların hedef bölgeye taşınmasında uygulama alanı bulmaktadır [1].

Nanopartiküllerin tasarlanabilir molekül yapısı ve yüzey özelliklerine sahip olması istenilen bölgeye/dokuya hedeflendirilebilmesini sağlamakla birlikte stabilite arttırıcı etkisi ile de ilacın toksik etkisini azaltmakta ve kanda dolaşım süresini arttırarak biyoyararlanımını arttırmak gibi birçok avantaj sağlamaktadır. İlacın hedeflenen bölgede farmakolojik etki gösterebilmesi için, oral, parenteral ve mukozal (nazal, gastrointestinal, oküler, vajinal) gibi çeşitli uygulama yöntemleri kullanılmaktadır [2,3].

Mukoza yüzeyinden ilaç taşınması, mukozal membran yapısında yoğun kan damarlarının bulunmasıyla ilacın kolayca kan dolaşımına emiliminin sağlanabilmesi, acısız olması, hastaya kolay uygulanabilir olması önemini arttırmaktadır. Mukozaya yapışabilirlik (mukoadezyon) sentetik, yarı sentetik veya doğal polimerlerin mukozal membranlara yapışabilme/adezyon yeteneği olarak ifade edilmektedir. Mukoadezyonun gerçekleşmesiyle mukozal membran yüzeyi ile ilaç taşıyıcı nanopartiküler sistem arasındaki etkileşim neticesinde nanopartiküler sistemin temas süresinin uzamasını sağlayarak etken maddenin mukozal membran yüzeyinde alıkonmasını böylelikle teröpatik etkisini arttırmaktadır. Ayrıca hedeflenen bölgede maksimum dozda kontrollü ve uzatılmış salım gerçekleştirilebilmektedir [4].

Bu tez çalışmasında biyouyumlu, biyobozunabilir, toksik olmayan, mukozal membran yoluyla ilaç taşımaya uygun karakteristiklere sahip yeni mukoadezif ilaç taşıyıcı sistemlerin sentezi, karakterizasyonu ile nanoformülasyonların hazırlanması ve özelliklerinin incelenmesi amaçlandı.

Bu amaç doğrultusunda başlangıç polimeri olarak yarı sentetik polimerlerden olan biyouyumlu, biyobozunur ve mukoadezif özellikteki farmasötik teknolojilerde ilaç/gen taşımada yüksek başarı gösteren biyopolimer olan kitosan (Chi) tercih edildi. Literatür araştırma neticesinde hücre membran yapısında bulunan lipitlerden olan palmitik asit (PA) molekülünün Chi' ın yapısına katılmasıyla hücre penetrasyonunu arttırıcı etkisi görülmekle birlikte mukoadezyon arttırıcı etkisi de olduğu belirtilmiştir [5–7]. Bu tez kapsamında öncelikle kaynaklarda rastlanmayan Chi' ın depolimerizasyonu ile küçük moleküllü kitosan yapıların (DChi) eldesi gerçekleştirildi, takiben PA' in DChi ile reaksiyonu sonucu palmitoil kitosan (DChi-PA) modifikasyon ürünü hazırlandı. Mukoadezif özelliğinin daha da iyileştirilmesi amacıyla musin yapısı ile disülfit kovalent bağ oluşumu üzerinden mukoadezyonu arttırıcı etkisi kesinleşmiş tiyol gruplarının [8,9] DChi yapısına katılması amacıyla DChi-PA ürünü tiyoglikolik asit (TGA) ile tiyollenme reaksiyonu sonucu ilk defa bu tez çalışmasında elde edilen tiyollenmiş palmitoil kitosan ürünü başka deyişle konjugatı (TGA-DChi-PA) sentezlendi. Tüm ürünler karakterize edildi.

Chi' ın ortalama molekül ağırlığı ve dağılımı Jel Geçirgenlik Kromatografisi (GPC) yöntemi ile ölçüldü. Modifikasyon ürünlerin molekül yapılarının aydınlatılması için FTIR ve ^{1}H NMR analiz yöntemleri kullanıldı ve reaksiyonların başarılı olarak gerçekleştiği doğrulandı. TGA-DChi-PA ürünün tiyol grubu miktarı iyodimetrik titrasyon yöntemi ile hesaplandı. Ürünlerin nanopartiküler formülasyonları iyonik jelasyon yöntemi ile hazırlandı ve formülasyonların karakterizasyonu Dinamik Işık Saçılımı Analizi (DLS) yöntemi ile partikül boyutları (nm), polidisperslik indeksi (PDI) ve zeta potansiyeli (mV) değerleri olarak gerçekleştirildi. Nanopartiküler formülasyonların *in vitro* sitotoksisite özellikleri (MTT) analiz yöntemi ile HEK293 hücre hattında değerlendirildi. Ürünlerin mukoadezif özelliği *ex vivo* koyun nazal mukozal membran ve *in vitro* 0,20 µm selüloz asetat membran filtre üzerine iki ayrı uygulama ile *Texture* analiz yöntemi ile değerlendirildi. Nanopartikül formülasyonların değerlendirilmesi *ex vivo* koyun nazal mukozal membran yüzeyinde nanopartiküllerin alıkonması/yıkama metodu ile değerlendirildi.

2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE

2.1. MUKOADEZYON

Adezyon genel anlamda iki yüzeyin birbirine bağlanması olarak ifade edilen bir kavramdır. Biyoyapışabilirlik veya biyoadezyon terimi ise doğal veya sentetik polimerlerin biyolojik yüzeylere (yumuşak dokuya sahip epitel hücreler) bağlanması veya yapışması olarak ifade edilmektedir. Mukozaya yapışabilirlik veya mukoadezyon ise esas olarak biyoyapışabilirlik/ biyoadezyon ile aynı anlamda olup daha spesifik deyişle sentetik veya doğal polimerlerin nazal, ağız, vajina, gastrointestinal (GI) sistem gibi mukus yapısına sahip mukozal membranlara yapışabilme/adezyonu yeteneği olarak tanımlanır [10].

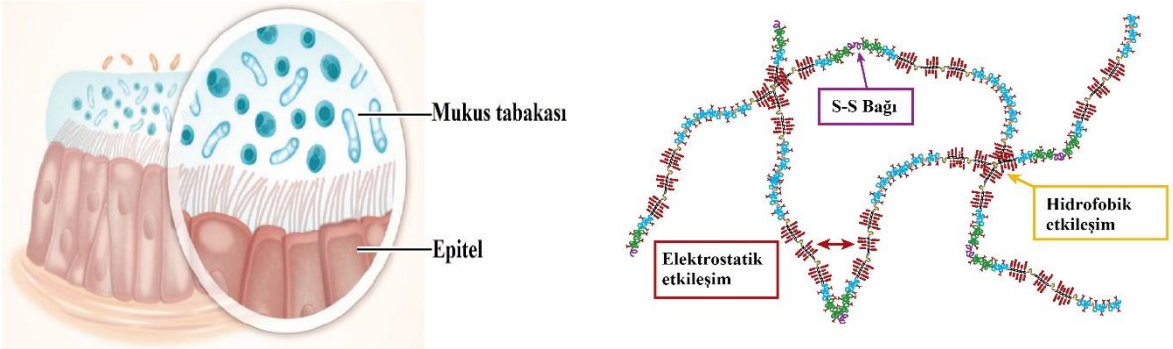
Mukoadezyon teorisi ilk olarak 1980' li yılların başlarında kontrollü ilaç salım sistemlerin uygulanması ile tanımlanmıştır. Taşıyıcı sistemin mukozal membran üzerine adezyonunun ve penetrasyonunun sağlanması, mukozal membran üzerinde temas süresini uzatması ve en önemlisi de etken maddenin penetrasyonunu ve biyolojik olarak korunarak biyoyararlanımını arttırması ile ilaç taşıma sistemlerinde biyo ve mukoadezyon kavramları önem kazanmıştır [4,11–13].

Mukoza yüzeyinden ilaç taşınması, mukozal membran yapısında yoğun kan damarlarının bulunmasıyla ilacın kolayca kan dolaşımına emiliminin sağlanabilmesi, ağrı/acısız ve hastaya kolay uygulanabilir olması mukozal yoldan ilaç taşımanın önemini arttırmaktadır. Ayrıca geleneksel ilaç uygulamada en çok tercih edilen oral yol uygulamasıyla ilaçların GI sistemde enzimatik ve kimyasal bozunmaya uğraması sebebiyle terapötik etkisi kısıtlanmaktadır. Epitelyum dokuyu örten ve koruyan mukoza tabakası ilacın lokalize olmasını ve dolaşım sistemine emilimini engeller. Bu güçlüklerin üstesinden gelmek için ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılan polimerler etken maddeleri bozunmaya karşı korurken, aynı zamanda biyoyapışabilir polimerler tercih edilerek de mukozal membran engelinin oluşturduğu sorunlar çözülebilmektedir. Böylelikle, etken maddenin tedavi etkisini sağlaması için hedeflenen bölgede maksimum dozda kontrollü ve istenilen süre içerisinde salımı gerçekleştirilebilmektedir. Uygulama yöntemi olarak kolaylık sağlaması ve ilaç alım sıklığını azaltması ile de hastaya uyumluluğunu iyileştirmektedir [4,14].

2.1.1. Mukozal Membran Yapısı

Mukozal membran veya mukoza olarak ifade edilen yapı vücudun dışarı açılan kısımlarında bulunan ve iç organların yüzeyini kaplayan bir zar türüdür. Mukozal membran epitel dokuyu mikrobial ve fiziksel zararlardan korumaktan sorumludur. Mukozal membranı oluşturan en önemli yapı mukus olarak ifade edilmektedir. Mukus solunum yolu, GI ve üreme sistemi dahil olmak üzere vücudun nemli bölgelerinde epitel yüzeyini yağlayan biyolojik bir hidrojeldir. Bu yapı epitel yüzeyini kayganlaştırıcı etkisiyle fiziksel zararlardan koruduğu gibi toksinler, ağır metaller, virüsler, parazitler gibi yabancı ve zararlı maddeleri yakalayıp engellerken su, gaz, hormon, besin gibi belirli moleküler yapıların taşınmasına, değiştirilmesine izin veren dinamik fizikokimyasal yarı geçirgen bariyer görevine de sahiptir [15,16]. Mukus ömrü veya temizlenme süresi dakikalar ve saatlerle ifade edilirken bu kısa zaman diliminde mukus tabakasının dökülme, atılma veya sindirilmesi ile yok olurken epitelyum dokunun yeni mukus yapısı oluşturmasıyla yenilenir. Bu nedenle biyolojik veya sentetik partiküllerin, hedef bölgelerine ulaşmak için mukusa doğal döngüden daha hızlı nüfuz etmeleri gerekmektedir [15,17,18].

Mukus %95’ i su ve %5’ lik kısmı ise %0,5-1’ i elektrolitler, %1-2’ i lipidler, %0,5’ i küçük proteinler, %1-5’ i büyük glikoprotein yapısındaki musin, enzimler ve bakterilerden oluşan karmaşık sulu bir sıvıdır. Mukusun birincil en önemli yapısı musindir ve farklı glikoprotein içeriğine sahip yaklaşık %80’ i glikozlanmış proteinlerden oluşan yapılar içermektedir [18–21]. Glikoprotein zinciri esnek ve rastgele sarmal yapı ile örgü şeklinde morfolojiye sahiptir ve molekül ağırlığı 40 MDa’ dan 0,5 MDa’ na kadar çeşitlilik göstermekte olup mukus salgısının hidrasyon, kayganlaştırıcı, viskoelastik özelliklerinden ve mukozaya yapışabilirlikten sorumlu olan kısmıdır [12,21]. Musin amin ve karboksil sonlu protein zincir yapısında proline, threonine ve/veya serin moleküllerinin değişen sayılarda tekrar etmesi ile birlikte zincir boyunca sisteince zengin kısımların dağılmış halde bulunduğu yapıdır. Sisteince zengin bölgelerde bulunan yüksek siyalik asit ve sülfat içeriği sulu koşullar altında iyonizasyonu sonucu molekül içi itmeye sebep olan negatif yüke sahiptir (Şekil 2.1) [18,22].



Şekil 2.1: Mukoadezyondan sorumlu mukus ve musin yapısı [19].

Mukozal membran bulunduğu dokuya bağlı olarak farklı pH, enzim, yüzey alanına, bakteri ve farklı musin yapısı içerdiğinden dolayı hedeflenen bölgeye uygun taşıma sisteminin tasarlanması gerekmektedir [23]. Mukozal membran yoluyla ilaç taşımada uygulanacak yerlerin (göz, ağız boşluğu, GI, vajina, burun boşluğu vb.) yapısının bilinmesi önem taşımaktadır. Aşağıda bunlara ilişkin bilgiler özetlenmiştir.

Göz; anatomisi gereği inorganik tuzlar ve pH değeri 7,3-7,7 gözyaşı salgısı içermektedir. Göz kapaklarının sürekli açılıp kapanmasıyla oluşturduğu basınç içerisine giren yabancı bir maddeyi uzaklaştırmaktadır. Bu durum topikal ilaç salım sistemlerini başarılı bir şekilde uygulamayı güçleştirdiğinden ilacın etkinliğini arttırmak için kitosan, poli(akrilik asit), poloksomer metil selüloz, hidroksi etil selüloz, poli(amidoamin), dendrimerler, poli(vinil prolidon) ve tiyollenmiş biyoyapışabilir polimerler tercih edilmektedir [24–26].

Ağız boşluğu (oral); yanak içi mukozası ve dilaltı mukozasından oluşur. Ağız boşluğuna lokal uygulamalarda amaç hepatik ilk geçiş metabolizması (ilk geçiş etkisi) önlenerek etken maddenin farmakolojik olarak sistemik dolaşım sistemine geçişini arttırmaktadır bu da etken maddenin kan dolaşımında miktarının artmasına ve dolayısıyla etkisinin artmasına sebep olduğu için ilaç taşımada önemli bir hedef doku olmaktadır. Ağız boşluğu mukozasının yüzey alanı azdır fakat ilaç taşıma sisteminin uygulanması kolaydır. Dilaltı mukozası hareket etmeyen yoğun düz kaslardan oluşmaktadır, ancak kan damarlarınca zengin olduğundan yanak mukozasına göre çok daha geçirgendir. Bu özellikleri sebebiyle hızlı salım gerçekleştirirken dil altı mukozasına+, kontrollü salım sistemlerinde yanak mukozasına uygulama yapılması tercih edilmektedir. Taşıma sistemi olarak poli(akrilik asit), sodyum

karboksimetil selüloz, hyaluronik asit, polikarbofil, kitosan ve gellan vb. biyoyapışabilir polimerler ve tiyollenmiş türevleri kullanılmaktadır [14,27,28].

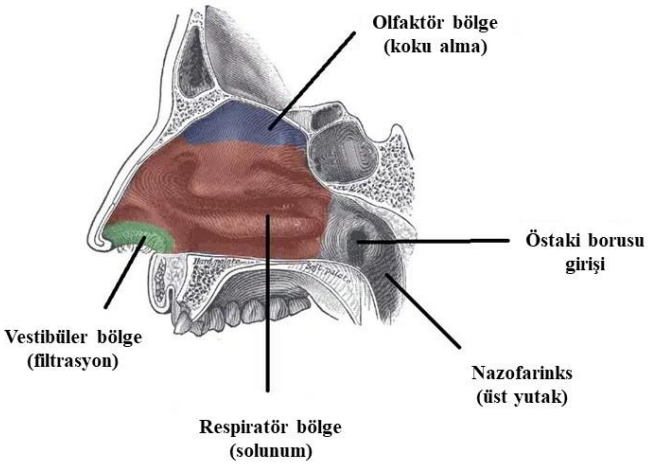
Gastointestinal sistem (GI); asidik pH sıvıya sahip olması ve enzimatik hidroliz sebebiyle besin veya ilaç maddelerini kimyasal bozunmaya uğratması ilaçların biyoyararlanımını ve mukozal membran geçirkenliğini azaltmaktadır. Etken maddeyi asidik enzim ortamında korumak için enzim inhibitörü konjuge edilmiş polimerler veya lipid ile kaplanarak kullanılmaktadır. Farklı ilaç tasarımları sunması, damar içi ve kas altı uygulamalarına göre kolaylık sağlaması ve doğal bir yol olması en çok araştırılan uygulama yolu olmasına sebep olmaktadır. Kitosan, poli(akrilik asit), alginat ve sodyum karboksimetil selüloz biyoyapışabilir polimerler ve tiyollenmiş türevleri GI için geliştirilmeye çalışılan polimerlere örnek verilebilir [29,30].

Vajina mukozası; özel proteinler ve epitelyum dokusu glikojen içermektedir. Glikojen enzimleri ve bakteriler parçalanarak asit oluşmaktadır bu durum da pH' nın düşük (pH=4-5) olmasına sebep olmaktadır. Vajinal salgının içeriği yaşa, bakterilere, virüs içeriğine, hormon miktarlarına göre sürekli değişim göstermektedir. Vajinal formülasyonların lokalize olarak uygulanabilmesi, yoğun kan damarlarına sahip olmasıyla sistemik dolaşım sistemine geçirgenliği arttırması bölgesel hastalıkların tedavisinde ve doğum kontrolünde kolaylık sağlamasına avantaj oluşturmaktadır. İlaç taşıyıcı biyopolimerlerden gelan gum, nişasta, kitosan, karbomer, poloksomer ve tiyollemiş yapıları örnek verilebilir [24,31,32].

Burun/geniz boşluğu/nazal mukoza; ortada bulunan septum ile ayrılmış iki boşluktan oluşmaktadır. 12-14 cm derinliğinde, 5 cm yüksekliğinde, yaklaşık 150-160 cm^2 yüzey alanına sahip özel epitel dokusuyla farklı işlevi olan 3 bölge bulunmaktadır (Şekil 2.2). Solunum ile koku alma bölgelerinden ilaç taşımanın gerçekleştiği düşünülmektedir. Burun boşluğunun yüzey alanının geniş olması, enzim aktivitesinin düşük olması ve zengin damar yapısına sahip olması bilhassa beyine hedefledirmede ilaçların taşınmasında nazal yol ile uygulamanın tercih edilmesini sağlamaktadır [33,34].

Burun/nazal boşluğu oluşturan kısımlar;

1. Rörespiratör bölge (solunum)
2. Olfaktör bölge (koku alma)
3. Vestibüler bölge (filtrasyon)



Şekil 2.2: Burun boşluğu ve nazal mukoza [35].

Bu bölgenin mukozal membran yapısında yüzeyde solunan hava içindeki partikülleri tutmaya yarayan 5-10 µm boyutlarında silya adı verilen tüycükler ve havanın nemlendirilmesini sağlayan mukus salgısı içermektedir. Mukus salgısı 5,5-6,5 pH değerine sahip olup taşınma hızı yaklaşık 5-8 mm/dakikadır, bu sebeple de silyalı mukoza yapısının yabancı moleküllere, partiküllere karşı temizleme görevi (mukosiliyer klirens) bulunduğundan yabancı maddenin mukozada alıkonma süresi 10-20 dk olmaktadır [36–39].

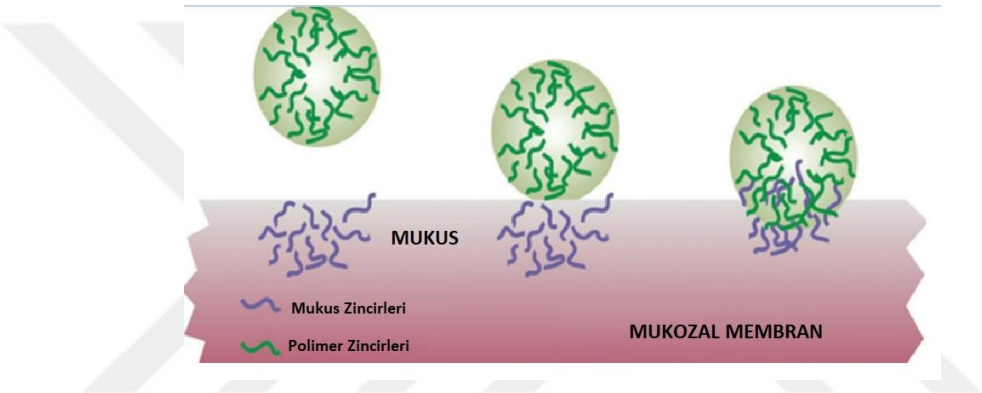
Nazal yol uygulamalarında 25-200 µl küçük hacimlerde çalışılabilmekte ve ilacın mukosiliyer klirens etkisiyle kısa sürede nazal boşluktan atılmaktadır ve ayrıca formülasyonun toksik ve irritasyon etki gösterebilmesi gibi dezavantajlarla karşılaşılmaktadır. Fakat uygulama kolaylığı sağlaması, hepatik ilk geçiş metabolizma etkisi oluşturmaması ve en önemlisi de beyin hedeflemede kan beyin bariyerine (KBB) takılmadan merkezi sinir sistemine (MSS) geçiş sağlaması ile nörodejenaratif hastalıkların tedavisinde önemli bir terapötik etki göstermesi gibi avantajlar göz önüne alındığında nazal yol ile ilaç taşımanın önemi artmaktadır. Nazal uygulamalarında kitosan, poli(akrilik asit), sodyum karboksimetil selüloz, carbopol, gellan gum ve tiyollenmiş türevleri tercih edilmektedir [34,40–44].

2.2. MUKOADEZYON MEKANİZMASI

Mukoadezyon mekanizmasından sorumlu mukus ile polimerin maksimum etkileşimini sağlayan 3 etkin bölgenin var olması gerekmektedir. Bu bölgeler;

1. Mukoadezif polimerin yüzeyi
2. Mukozal membranın ilk tabakası olan mukozal membran ve dolayısıyla mukus
3. Mukozal membran ile mukoadezif polimer arasındaki ara yüzey

Mukoadezyon mekanizması, temelde mukoadezif polimer ile mukozal membran ara yüzeyinde polimerin özelliğinden kaynaklanan ıslanması, şişmesi, genişlemiş yüzey alanı mukozal membran yapısı ile etkileşip polimer zincirlerin membran dokusuna penetrasyonu ve polimer zincirleri ile mukusun etkileşime girmesiyle fiziksel ve/veya kimyasal bağ oluşturarak adezyonun gerçekleşmesi olarak açıklanmaktadır. Bu husus yani mukoadezyon mekanizması 6 teori ile açıklanmaktadır [45–48].



Şekil 2.3: Mukoadezyon mekanizması adımları [49].

1.Islanma/Islanabilirlik teorisi; sıvı veya düşük viskoziteli mukoadezif polimerlerin mukoza yüzeyinde yayılma kabiliyeti ve mukusun yüzey gerilimi ile ilişkilendirilir. Mukoadezif polimer mukoza ile temas ettiğinde yüzeyin düzensiz kısmından nüfuz eder, sertleşir ve yüzey ve arayüz enerjilerindeki değişim nedeniyle yüzeylere yapışır. Polimerlerin mukozal dokuların yüzeyinde yayılma yeteneğinin daha iyi olması genellikle güçlü mukoadezif davranış ile ilişkilidir [47,50].

2.Adsorpsiyon teorisi; mukoadezif polimerler ile mukus yapısının etkileşimi kovalent ve kovalent olmayan (Van Der Waals, hidrojen ve hidrofobik) bağlarla gerçekleşmektedir. Zayıf (kovalent olmayan) bağlar oluşmasına rağmen birçok etkileşim alanı oluşturması sebebiyle yoğun bağlanma ve mukoadezyon gerçekleşebilmekte ve bu teori mukoadezyon/biyoadezyon mekanizmasının temeli olarak kabul edilmektedir [10,51].

3.Difüzyon teorisi; mukoadezif polimer zincirleri ile mukus glikoproteinlerin iç içe geçmesi ve dolaşması sonucu yarı kalıcı bağların oluşmasını ifade etmektedir. Bağ gücü penetre

olan mukoadezif polimer zincirinin çokluğu ile artmaktadır. Mukoadezif polimerin mukus yapısına penetrasyonu ve dolaşması ise polimer zincirlerinin esnekliğine, kimyasal yapısına, konsantrasyonuna, difüzyon katsayısına ve temas süresine bağlıdır [52,53].

4.Elektrostatik teori; negatif yüklü musin ile pozitif yüklü polimerin temas etmesi ile elektrostatik etkileşime girerek elektron alışverişi sonucu ara yüzeyde elektriksel çift tabakanın oluşması olarak açıklanmaktadır [10,54].

5.Kırılma/Kopma teorisi; daha önce yapıştırılmış iki yüzeyin ara yüzeyden ayrılması için gereken kuvvet ile yapışma derecesini ilişkilendirmektedir. Ayırma deneylerinde yapışkan birleşiminin kırılma özelliklerini değerlendirirken yapışkan bağın bozulmasının biyoadezif ara yüzeyde meydana geldiği kabul edilmektedir [55,56].

6.Mekanik teori; adezyonun gerçekleşmesi etkileşime giren iki yüzeyin pürüzsüzlüğüne ve etkileşim için gerekli olan alanın uygunluğuna bağlıdır [55,57].

2.3. MUKOADEZYONU ETKİLEYEN FAKTÖRLER

Mukoadezyon mekanizmasını etkileyen ve göz önünde bulundurulması gereken birçok parametre mevcuttur [58,59]. Bunlar polimere ait ve çevresel faktörler olmak üzere 2 ana başlık altında ele alınabilmektedir;

2.3.1. Polimere ait Faktörler

Hidrofilik grup içeriği; mukoadezif polimerlerin mukus ile hidrojen bağı oluşturabilmesi için hidrofilik yapıda olmalı başlıca karboksil, hidroksil, amin, sülfat vb. grupları içermelidir [10,57].

Hidrasyon derecesi; mukoadezif polimerler yeterli hidrasyon derecesinde şişme üzerinden jel oluşturup yüksek zincir hareketliliği sağlarlar ve zincir hareketliliği mukus yapısı ile interpenetrasyonu (içi içe geçmesi) ve mukoadezyonu arttırmaktadır [54]. Yeterli hidrasyon derecesi ise polimer konsantrasyonu ve ortamdaki su miktarına bağlı olarak meydana gelir. Aşırı şişme olması da mukoadezyonu negatif yönde etkilemesinin aksine birçok polimerin sınırlı hidrasyon göstermesine rağmen kuru polimer ile ıslak mukoza yüzeyi arasındaki osmatik basınç kuvveti ile mukoadezif özellik gösterebilmektedir [56,60].

Polimer yapısı; polimerin ortalama molekül ağırlığı (M_w ve M_n), zincir uzunluğu ve zincir yapısı (modifikasyon oranı, konformasyonu vb.) mukoadezyonu etkilemektedir. Polimer molekül ağırlığının yüksek olması ve zincir uzunluğunun yeterli büyüklükte olması mukoadezyonun yüksek olmasını sağlamaktadır. [10,61–63].

Polimer zincirlerinin esnekliği; mukoadezif polimerlerin viskozite, difüzyon katsayısı ve zincir esnekliği ortamdaki suyu alarak şişmesi ile jel oluşumu sağlandığından polimerin bu özelliğinin mukoadezyon mekanizması üzerine önemli bir etkisi bulunmaktadır. Yeterli esnekliğe sahip olmayan polimer zincirlerinin mukus ile interpenetrasyonunun zor/düşük olmasıyla mukoadezyon bağları daha zayıf olmaktadır [59,62].

Polimer konsantrasyonu; güçlü mukoadezyon bağlarının oluşabilmesi için ortamda optimum polimer konsantrasyonu gereklidir. Optimum konsantrasyonda zincir hareketliliği yeterli derecede oluşmakta ve zincirlerin mukus yapısına interpenetrasyonu sağlanarak mukoadezyon gerçekleşmektedir. Çok yüksek konsantrasyonlarda zincirlerin yoğun sarmal yapıda olması ve hareketliliğinin az olması sebebiyle mukus interpenetrasyonu azalmakta tam aksine düşük konsantrasyonda ise yeteri kadar interpenetre olabilecek polimer zinciri bulunmadığından adezyon bağ yoğunluğunun daha az olmasına sebep olmaktadır. Dolayısıyla optimum konsantrasyon önem taşımaktadır [62,64,65].

Çapraz bağ yoğunluğu; çapraz bağ yapısının mukoadezif polimerin şişme kapasitesi üzerine önemli bir etkisi bulunmaktadır. Yüksek oranda çapraz bağ yapısı zincir hareketliliğini kısıtlamakta ve polimerin hidrasyonu/şişmesi de azalmaktadır. Böylece zincirlerin mukus yapısına interpenetrasyonu azalmakta ve mukoadezyon negatif etkilenmektedir [56,58,62,66].

Yüzey yükü; pozitif ve negatif yüklü polimerlerin yüksüz olanlara göre biyolojik yüzeylere adezyonu daha yüksektir. Negatif yüzey yüküne sahip karbomer gibi anyonik polimerler mukus ile hidrofobik etkileşim, hidrojen bağı veya Van der Walls bağları oluşturarak yüksek mukoadezif özelliği gösterirken kitosan gibi pozitif yüzey yüküne sahip polimerler de amin grupları ile mukus yapısındaki musin siyalik grupları ile kuvvetli elektrostatik etkileşim sonucu güçlü mukoadezif özelliği göstermektedir [10,59,67].

pKa; mukoadezif polimerin asidik veya bazik karakterini belirtmekte ve mukozal membranın bulunduğu pH ortamında gösterdiği iyonik gerilim davranışı ile mukoadezyon mekanizmasını etkilemektedir [10,56,68].

2.3.2. Çevresel Faktörler

pH; ortamın pH değerinin fonksiyonel grupların dissosiyasyonuna olan etkisiyle polimer ve mukusa ait yüzey yük yoğunluğu ve polimerin şişme derecesi etkilenmekte böylece mukoadezyon mekanizması etkilenmektedir [62,68]. Ayrıca ortamdaki iyonik kuvvetlerin varlığı mukoadezyonu etkilemekte iyon etkisiyle yapışmayı sağlayacak fonksiyonel bölgeler etkileşim sonucu korunabilmekte böylece mukoadezyon azalmaktadır [10,62].

Temas süresi/basınç; mukoadezif polimerlerin mukozal membran yüzeyinde alıkonmasını optimum bir zaman süresinde gerçekleşmesi mukoadezyon işinin gerçekleşmesi için önemlidir [62,69].

Mukus yapısı; mukus yapısında bulunan musin türleri polimer ile mukus arasındaki etkileşimi etkilediğinden mukoadezyon doğrudan etkilenmektedir ve sistein bakımından zengin musin glikoproteinlerin varlığı disülfit bağlarının tiyomerler oluşturması ile hidrojen bağı veya elektrostatik etkileşimle oluşan yapışabilirliğe kıyasla yüksek mukoadezyon göstermektedir [70].

Mukus döngüsü; mukus belirli periyodlarda jel tabakası yüzeyinden uzaklaştırılıp belirli bir kalınlığı ve viskozitesi korunak taze üretilmektedir. Bu durum mukozal membranın bulunduğu bölgeye göre değişiklik göstermekte olup bu döngü mukozal membran yüzeyindeki materyalin temas süresini etkilediğinden dolayı mukoadezyonu doğrudan etkilemektedir. Yüksek mukoadezyon özelliği kazandırılmış polimerler hazırlanarak temas süresi arttırılıp yapışabilirlik/mukoadezyon iyileştirilebilmektedir [62,69].

2.4. MUKOADEZİF POLİMERLER

Mukozal membranın bulunduğu ortama bağlı olarak çeşitli pH değerine sahip olması, enzim, bakteri vb. içermesi ve mukusun belirli zaman aralıklarında yenilenmesi sebebiyle ilaç molekülünün degredasyonuna sebep olması neticesinde terapötik etkinliğinde azalma ve mukozal membran yüzeyinde alıkonma süresini kısıtlanması gibi etkiler ilaç biyoyararlanımını azaltmaktadır. Oral mukoza aracılığıyla protein ve peptid yapıdaki ilaçlar incelendiğinde oral mukozal membranın biyokimyasal yapısı nedeniyle biyoyararlanımının %5’ ten az olduğu gözlemlenmektedir [71,72]. Bu dezavantajların üstesinden gelmek için hem ilacın degredasyonunu engellemek hem de mukozal membran yüzeyinde alıkonma zamanını arttırarak ilacın terapötik etkinliğinin ve biyoyararlanımının arttırılmasını sağlayarak kontrollü

uzatılmış ilaç salımı gerçekleştirmek amacıyla mukoadezif polimerler önemli bir potansiyel oluşturmaktadır [47].

Mukoadezif polimerlerin hidrasyonuyla şişmenin gerçekleşmesi neticesinde polimer zincirlerin musin zincirleriyle interpenetrasyonu ve dolaşmasıyla etkileşim gerçekleşir. Zincirlerin etkileşimi neticesinde nonpolar grupların arasındaki hidrofobik etkileşim, polar gruplar arasındaki iyonik etkileşim, şeker üniteleri arasındaki hidrojen bağı ve/veya mukoadezifliği arttırıcı kovalent bağ oluşturmak için tiyollenmiş polimerler ile disülfit bağı oluşumunu sağlayan sisteince zengin mukus glikoproteinlerin etkileşimi ile mukoadezyon gerçekleşmektedir [53,70,73]. Polimer molekülündeki polimer zincirleri ile mukus arasındaki etkileşimle ortaya çıkabilecek bağlar başlıca:

İyonik bağ; anyonik veya katyonik yüzey yüküne sahip iyonik özellikteki polimer ile mukus yapısı arasındaki elektrostatik etkileşim sonucu oluşur.

Hidrojen bağı; hidrojen bağı yapabilecek elektronegatif yüke sahip atomları (H, O, F ve N) içeren zayıf pozitif yüke sahip polimerin mukus yapısındaki diğer elektronegatif atomu etkilemesi sonucu oluşur.

Van der Walls etkileşimi; mukoadezif polimer ile mukus yapısındaki nonpolar gruplar arasındaki indüklenmiş dipol ve/veya polar grupları arasında ise dipol-dipol etkileşimi ile zayıf bağ oluşumudur.

Kovalent bağ; ilk önceleri mukoadezif polimerlerin yapısına serbest tiyol grubu (-SH) içerecek şekilde başlıca L-sistein olmak üzere tiyolleme reaktifleriyle reaksiyonla “tiomer” adı verilen polimerler elde edilmesi bu alandaki önemli araştırmalar ortaya koyulmuş olup halen günümüzde de önemli yer tutmaktadır. Molekülde serbest -SH gruplarının varlığı sisteince zengin yapıdaki mukus glikoproteinleri arasında disülfit bağı oluşturarak kuvvetli kovalent bağ oluşumu gerçekleşir böylece alıkonma zamanı ve ilacın biyoyararlanımı artmaktadır. Yapısı gereği hızlı şişme ve su alım davranışı göstermesi de diğer bir avantajdır [73,74]. Oysaki yapılan bir diğer çalışmada nişasta esaslı biyopolimerin tiyolleme reaktifi olarak tiyoglikolik asit (TGA) kullanıldığında, yapısında serbest -SH grubunun olmamasına rağmen tiyoeter/tiyoester bağlarının varlığı mukoadezyonu oldukça yüksek mukoadezif polimerlerin elde edilebileceğini ortaya koyulmuştur [75].

Mukoadezif polimerler kaynaklarına göre sentetik, modifiye doğal veya yarı sentetik ve doğal polimerler olarak 3 grupta incelendiği gibi yüzey yüküne bağlı olarak ise katyonik, anyonik veya noniyonik olarak da 3 grupta sınıflandırılmaktadır. Ayrıca yapısında serbest tiyol grubu veya polimer zincirlerinde tekrarlanan birimlerde S atomu içeren bağlar içerenler ise Tiyomer adı altında yeni jenerasyon mukoadezif polimerler olarak ayrı bir sınıf olarak da ele alınmaktadır. Tüm bu sınıflandırmalar kapsamında olan polimer yapılar ise sentetik, doğal veya modifiye doğal denilen yarı doğal polimerler esaslı olmaktadır [58,70,76].

2.4.1. Kaynağına göre Sınıflandırılan Mukoadezif Polimerler

- ***Sentetik Polimerler***

Poli(akrilik asit) polimerleri (karbopol, polikarbofil, poliakrilat polimerleri) ve poli(etilen glikol)(PEG), poli(etilen oksit), pol,(vinil alkol), poli(vinil pirolidon) ve tiyollenmiş polimerler bu sınıftandır [55,70].

- ***Yarı Sentetik Polimerler***

Yarı sentetik veya modifiye doğal polimerlerin en önemli üyesi olan kitosan ve selüloz türevleri (karboksi metil selüloz, karboksi metil selüloz tuzları, hidroksi etil selüloz, hidroksi propil selüloz vb.) vb. doğal kaynaklardan elde edilen yapıların kimyasal işlemlere maruz bırakılmasıyla elde edilirler [46,70].

- ***Doğal Polimerler***

Polisakkarit türevleri (sodyum alginat, agarose, guar gam, xanthan gam, gellan gam, pektin, nişasta (soluble), hyaluronik asit, kitin vb.) ve doğal peptit olan jelatin örnek verilebilir [46,58].

2.4.2. Yüzey Yüküne göre Sınıflandırılan Mukoadezif Polimerler

Doğal, sentetik veya modifiye doğal kaynaklı hidrofilik yapıda ve hidroksil, karboksil ve amino organik fonksiyonel gruplarına sahip veya hidrojen bağı oluşturabilen geleneksel mukoadezif polimerler kastedilmektedir. Yüzey yüküne göre 3 gruba ayrılmaktadır [10,55].

- ***Katyonik Mukoadezif Polimerler;***

Polimer ana zincir yapısındaki katyonik grupların varlığı polimere net pozitif yüzey yükü kazandırır. Pozitif yük yapısında olması negatif yüklü musin molekülleriyle iyonik/elektrostatik etkileşim oluşturduğundan mukoadezif ilaç taşıma sistemlerinde tercih edilmesini sağlayan

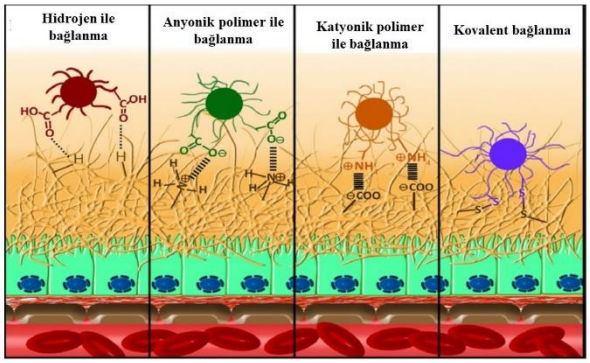
önemli bağ yapma gücü gösterirler. Bu gruba aminodextran, dimetilaminoetil dextran ve kitosan, trimetil kitosan vb. örnek verilebilir [10,77].

- ***Anyonik Mukoadezif Polimerler;***

Polimer pKa' sının üzerindeki pH değerlerine sahip ortamlarda yapısında karboksil ve sülfat gruplarının varlığıyla net negatif yüzey yüküne sahip polimerleri içerisine alan sınıftır. Bu sınıfın en geniş kullanım alanına sahip polimerlerine poli(akrilik asit), az yoğun çapraz bağlı poli(akrilik asit), sodyum karboksi metil selüloz, polikarbofil ve polikarbomer örnek verilebilir [10,78].

- ***Non-İyonik Mukoadezif Polimerler;***

Bu gruptakiler moleküler yapılarında polimer zincirlerinde iyonize olmayan gruplar içermektedirler ve mukoadezif polimerlerin modifikasyonuyla elde edildiği gibi yeni mukoadezif polimerlerden oluşturulan bir sınıftır. Nişasta, hidroksietil nişasta, poli(vinil alkol)(PVA), poli(etilen glikol)(PEG), poli(etilen oksit), poloksamerler, hidroksipropil selüloz, hidroksimetil selüloz, sodyum alginate, sodyum karboksi metil selüloz vb. örnek verilebilir [10,77].

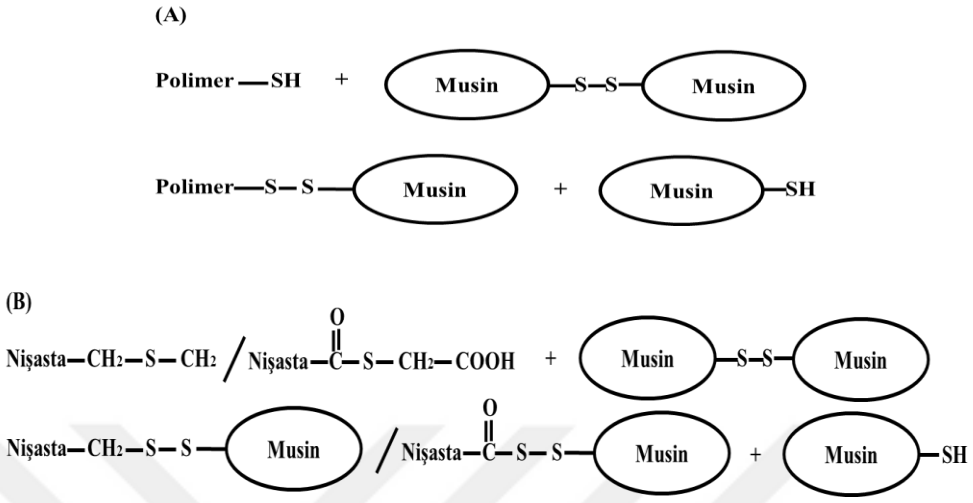


Şekil 2.4: Polimer- mukozal membran etkileşimiyle farklı bağların oluşumu [70].

2.4.3. Yeni Jenerasyon Mukoadezif Polimerler

Tiyomerler diğer mukoadezif polimerlerden faklı olarak mukus glikoproteinlerin sisteince zengin kısımlarıyla tiyol-disülfür bağları kurarak kovalent bağ oluşturma yeteneğine sahiptir. Mukoadezif polimerlerin yapısına tiyol-disülfür grupları katılarak mukozal yüzeye

kovalent bağ oluşumu ile mukus glikoproteinlerin doğal mekanizmasını taklit etme kabiliyeti kazandırılmış tiyollenmiş polimerler elde edilir [75,79,80].



Şekil 2.5: Tiyollenmiş polimer (A) [74] ve nişasta esaslı biyopolimerin TGA ile reaksiyonu sonucu oluşan tioeter/tioester yapının (B) [75] ile müsin glikoproteinleri arasında oluşan kovalent bağların reaksiyon mekanizması.

2.4.4. Mukoadezif Polimerlere Örnekler

Poliakrilik asit polimerleri; poliakrilik asit (PAA), karbomer olarakta bilinen akrilik asitin yüksek molekül ağırlıklı polimeridir. Sentetik polimer sınıfında olduğu gibi yüzey yükü bakımdan da anyonik mukoadezif polimerler sınıfına da aittir. Doğal pH ortamında karboksil gruplarının iyonize olmasıyla güçlü molekül içi itme kuvveti oluşur ve bu kuvvetin etkisiyle zincirlerin birbirinden uzaklaşır. Yapısındaki karboksil gruplarının musin yapısındaki siyalik grupları ile hidrojen bağı oluşturmasıyla yüksek mukoadeziflik özelliği gösterirler [77,81,82]. Poliakrilatlar doğrusal veya yüksek molekül ağırlıklı PAA' in divinilglikol, polialkenileter ile çapraz bağlanarak modifiye edilmiş yüksek mukoadezif özellik gösteren türevleridir. Biyomedikal ve farmasötik uygulamalarda protein, vitamin, insülin, ilaç ve gen yüklü ilaç formülasyonları mukozal yapıdaki oral, göz, nazal, vajinal vb. uygulama yolları ile geniş bir kullanım alanına sahip olmakla birlikte ticari kullanımı da mevcuttur [32,83–85].

Polietilen glikol (PEG); noniyonik sentetik polimerlerden olup hidrofilik yapısı ile mukozal membran yüzeyinde uzatılmış alıkonma zamanı ve hızlı penetrasyon özelliği göstermektedir. PEG ile modifiye edilmiş partiküllerin modifiye edilmemiş partiküllere kıyasla daha yüksek hücre içi birikim göstermektedir [86,87].

Polisakkarit türevleri; negatif yüzey yüküne sahip heterojen polisakkarit yapısında narenciye kabuğu veya elma posası gibi çeşitli bitkisel kaynaklardan elde edilen doğal polimerdendir [88]. Aynı yüklere ait elektrostatik itme etkisi ile musin molekülü ile hidrojen bağı oluşumu sağlayarak mukoadezif özellik göstermektedir [89]. Pektin mukozal membran yüzeyinden kontrollü ilaç salımı, gıda ve ilaç endüstrisinde uzun yıllardır başarılı bir şekilde kullanılmakta olup insan tüketimi için güvenli kabul edilmektedir [90,91]. Hyaluronik asit yapısı gereği biyouyumlu ve biyoparçalanır anyonik doğal kaynaklı nazal, oral, topikal ve parenteral yol üzerinden ilaç taşımada tercih edilen mukoadezif polimerlerdendir [92]. Ayrıca hyaluronik asitin tiyollenmesi ile oluşan türevi daha da yüksek mukozaya yapışabilirlik göstermektedir [93]. Alginat güvenilir olarak bilinen ve mukoadezif özelliği ile ilaç alıkonma zamanını arttıran ve farklı mukozal membran yüzeylere uygulanabilen doğal anyonik mukoadezif polimerlerdendir. Birçok uygulamada alginatın diğer mukoadezif polimerler ile modifiye türevlerinden oluşturan formülasyonlarından faydalanılmaktadır. Nişasta-alginat mikrokürecikleri ile oral uygulama [94], kitosan-alginat boncukları ile vajinal uygulama [95] ve polietilen glikol akrilat- alginat formülasyonun ile de bağırsak mukozası üzerinden mukoadezif özellik göstermektedir [96].

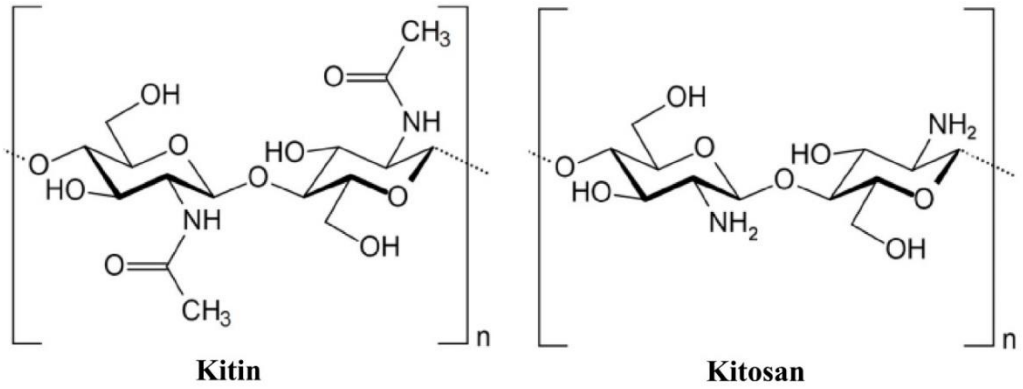
Selüloz türevleri; selüloz doğada bol bulunan biyopolimerlerden olup D-glikoz birimlerinin doğrusal bir zincirini içerir ve birçok yarı sentetik eter ve ester türevleri elde edilmektedir. Anyonik özellikte karboksi metil selüloz (CMC), yapısındaki karboksilik grupların varlığı ile müsinlerin oligosakarit zincirleriyle etkileşimi sonucu hidrojen bağları oluşturarak mukoadezif özellik göstermektedir. CMC nin manyetik nano taşıyıcılar, nanokompozitler ve hidrojeller gibi faklı ilaç taşıma sistemlerinin farmasötik endüstrisinde faydalanılmakta olup ticari kullanımı mevcuttur [97–99].

Tez kapsamında yapılan çalışmalarda sentezlenen mukoadezif polimer kitosan esaslı olduğu için aşağıda kitosan daha geniş olarak ele alınmıştır.

2.5. KİTOSAN

Kitosan yengeç, karides ve ıstakoz gibi kabuklular tarafından üretilen doğal polimer olan kitinin deasetilenmesiyle elde edilen yarı doğal bir polisakkarit esaslı bir biyopolimerdir. Kitosanın molekül yapısı β-(1-4) glikozidik bağ ile bağlanan D-glukozamin ve N-asetil-D-

glukozamin ünitelerinden oluşmakta olup doğrusal polimer zincir yapısında bir polisakkarittir (Şekil 2.6) [100].

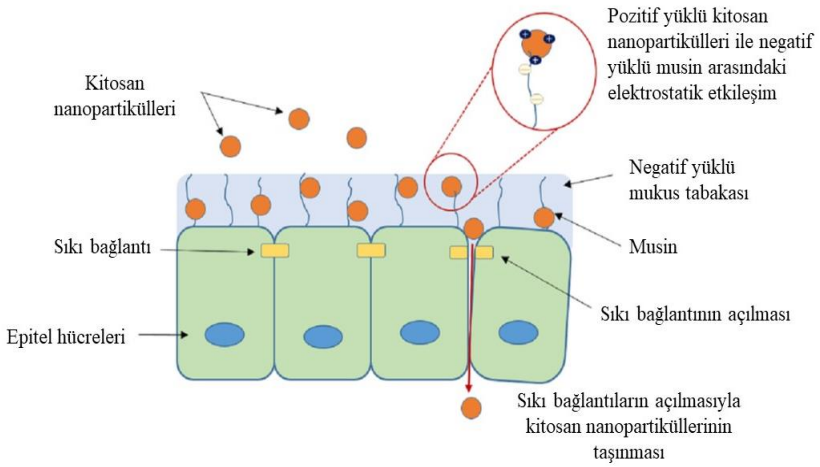


Şekil 2.6: Kitin ve kitosanın kimyasal yapısı [100].

Kitosan yapısındaki hidroksil ve amin fonksiyonel grupları kitosanın çözünürlük özelliğinde kilit rol oynamakla birlikte deasetilasyonun derecesi (DD), kitosanın moleküler yapısındaki amin gruplarının miktarını belirtmektedir. Biyomedikal uygulamalar için %75-98 DD sahip kitosan kullanımı tercih edilmektedir [101]. Amin grupları varlığı ~ 6,5 pKa değerine sahip olmasına ve pH <6,5 olan asidik ortamlarda protonlanarak çözünmesiyle birlikte kitosan molekülünün pozitif yüklü (katyonik) olmasına sebep olmaktadır. Kitosanın suda ve çoğu organik çözücüde çözünmemesi, birçok alanda kullanımını sınırlandırmaktadır. Kitosanın özelliklerinin iyileştirilmek amacıyla (hidrofilliğinin/hidrofobluğunun/katyonik yük yoğunluğunun veya mukoadezifliğinin arttırılması vb.) modifiye edilerek kitosan türevleri sentezlenir böylece kitosanın kimyasal modifikasyonu onun fizikokimyasal özelliklerini arttırır ve uygulama alanının genişlemesine sebep olmaktadır. Ayrıca kitosanın biyouyumluluk, biyolojik olarak bozunabilirlik, mukoadezif özelliği, antijenik olmama, toksik özellik göstermemesi ve düşük maliyetli olması biyomedikal uygulamalarda [101,102] gen aktarımı [103,104], aşı uygulamalarında adjuvan olarak [101,105] ilaç taşıyıcı sistemler [106], doku mühendisliği, biyogörüntüleme, implantlar, kontakt lensler, protein bağlama, yara iyileşmesi gibi geniş kapsamlı farmasötik uygulamalara yönelik taşıyıcı (vektör) malzeme olarak [107–109] kullanımının yanında gıda teknolojisi, tekstil endüstrisinde ve su arıtma sistemleri alanlarında da yer bulmaktadır [99]. Kitosan biyopolimerinden hidrojeller, mikropartiküller, nanopartiküller, membranlar, süngerler veya lifler gibi çeşitli formülasyon yapılarının elde edilebilmesi istenilen amaca uygun çeşitli kullanım alanında tasarlanmasına olanak sağlamaktadır.

2.5.1. Mukoadezif Özelliği ve Hidrofobisitesi Arttırılmış Kitosana ait Yapılan Çalışmaların Özetlenmesi

Kitosanın mukoadezifliği, yapısındaki amin gruplarının varlığıyla katyonik özellik göstermesine dayanmaktadır. Mukoadezyon mekanizması ise mukusun yapısındaki siyalik asit gruplarının anyonik özellik göstermesi pozitif yüklü kitosan molekülleri arasında elektrostatik etkileşimin oluşmasına dayanmaktadır [110]. Bununla birlikte hidrojen bağı oluşumu ve hidrofobik etkileşim gerçekleştirmesi de önemli katkı sağlamaktadır [111,112]. Ayrıca katyonik özellikte olan kitosan moleküleri, mukus zarı ile etkileşime girerek hücreler arasındaki sıkı bağlantıyla ilişkili proteinlerin yeniden düzenlenmesine yol açar ve mukozal hücreler üzerinden geçişi uyarır böylece ilacın nüfuz etmesini arttırmaktadır. Bu durumda kitosanın geçirkenlik arttırıcı özelliği olarak vurgulamaktadır (Şekil 2.7) [113,114]. Kitosanın mukoadezyon özelliği optimum değere kadar ağırlıkça ortalama molekül ağırlığının (M_w) artmasıyla artmakta ve ayrıca DD yüksek olmasıyla da artış gösterirken çapraz bağlanma derecesinin artmasıyla da azalmaktadır [115].



Şekil 2.7: Mukoadesif Kitosan Nanopartiküller ile İlaç Taşıma Mekanizması [110].

Kitosan molekülünün kimyasal modifikasyonlarının gerçekleştirilmesiyle ilaç alıkonma zamanının, çözünürlüğünün, geniş pH aralığında ilaç taşıma sistemi olarak faydalanabilirliğinin, hidrofobikliğinin veya hidrofilikliğinin, stabilitesinin, sürdürelibilir ilaç salım davranışının, nüfuz edebilme yeteneğinin, geçirgenliğinin ve mukoadezifliğinin iyileştirilmesi amaçlanmaktadır [112,116].

Kitosanın mukoadeziflik özelliğini iyileştirmek amacıyla elde edilen modifiye sentez türevlerine trimetil kitosan (TMC), tiyollenmiş kitosan, hidrofobikliği arttırılmış kitosan, PEGilasyonlu kitosan yapıları örnek verilebilir [117,118].

Trimetil Kitosan (TCM); yapısına [$–N^+(CH_3)_3$] protonlanmış grup kazandırılmış olup suda çözünürlüğü iyileştirilmiştir bir türevidir. TCM türevinin kalıcı katyonik özelliğinin doğal sonucu olarakta bu özellik onu güçlü mukoadezif polimerlerden biri yapmaktadır. Shinde ve diğ. [119] flurbiprofen yüklü TCM ve kitosan polimerlerinden iyonik jelasyon yöntemi kullanarak tripolifosfat (TPP) ile elde ettikleri nanopartiküler sistemleri göz (ocular) mukozal membran üzerinden ilaç taşıma vektörü olarak incelemişlerdir. TCM nanopartiküler sistemin kitosana göre mukoadezif özelliği artmakta ve uzatılmış ilaç salım davranışı gösterdiğini, geleneksel vektörlere göre ise daha yüksek ilaç yükleme kapasitesinin olduğunu ve güçlü mukoadezifliği sayesinde göz mukozal membran üzerinden ilaç alıkonma zamanını arttırmasıyla da flurbiprofen' in biyoyararlanımını arttırdığını bildirmişlerdir. He ve Yin [120] bir çalışmasında kanser tedavisinde kullanılan paclitaxel yüklü folik asit modifiye elde etmişler. TMC nanopartiküler sistemlerin oral ve intravenöz yol üzerinden uygulama sağladığını bildirerek, tavşan bağırsak mukozal membran üzerinde yapılan analiz sonucunda folatlanmiş TCM nanopartikülerinin daha güçlü mukozaya yapışabilirlik gösterdiğini, formülasyonun paclitaxel' in kanda kalış süresi ve tümör hücresinde birikimin arttırdığını böylece antitümör etkisini iyileştirdiğini ileri sürmüşlerdir.

PEGilasyonlu Kitosan; kitosanınn poli(etilen glikol) (PEG) ile modifiye edilmiş türevidir. Polimer zincirleri arasında çapraz bağlanmayı engellemek amacıyla çoğunlukla metoksi-poli(etilen glikol) tercih edilmektedir. Suda çözünürlüğü arttırmanın yanında kitosanın biyouyumluluğunu arttırmakta, enzimatik kimyasallara karşı daha iyi stabilite sağlamakta böylece *in vivo* ilaç biyoyararlanımını da iyileştirmektedir. Jintapattanakit ve diğ. [121] yapısında PEG içeren TCM kopolimeri sentezleyerek mukoadeziflik özelliği değerlendirmişler, insülin yüklü nanokompleks yapının pozitif yükü arttıkça mukadezifilik özelliğini ve insülin yükleme kapasitesini arttırdığını, ayrıca mukoadezif özelliği PEG' lenmiş TCM nanokompleks yapının pozitif yük etkisine ek olarak PEG zincirinin mukus içine nüfus edebilme kabiliyetiyle daha da artmış olduğunu bildirmişlerdir.

Hidrofobisitesi Arttırılmış Kitosan; kitosanın hidrofobikliği başka deyişle hidrofobik modifikasyonun uygulanması, hidrofobik özellikteki alkil zincirlerinin kovalent bağlanmasıyla

arttırılabilmektedir. Bu bileşikler hücre membran yapısındaki fosfolipit alanların akışkanlığını arttırarak hücre penetrasyonunu arttırmaktadır. Ayrıca kitosanın yapısına katıldığında hücre yapısındaki lipitlerin hidrofobik gruplarıyla hidrofobik etkileşime girerek kitosanın mukoadeziflik özelliğini güçlendirmektedir [117,118]. Hidrofobik özelliğinin arttırılmasının diğer bir etkisi de vektörün hidrasyonunun azalmasıyla bulunduğu ortam enzimleri (mide enzimleri gibi) tarafından parçalanmaya karşı daha yüksek direnç göstermekte böylece kitosanın stabilitesini arttırmaktadır [122,123].

Tien ve diğ. [124] çalışmalarında (C_6-C_{16}) yağ asitlerini kullanarak kitosanın hidrofobik özelliğini arttırmak için yapısındaki amin grupları ile yağ asitlerinin klor tuzları kullanılarak amid bağı üzerinden hidrofobik karakterinin arttığını ve yapısal özelliklerinde önemli değişikliklerin gözlemlendiğini bildirmişlerdir. Palmitoil kitosandan elde edilen tabletlerin daha iyi mekanik özellik gösterdiğini ve stabilitesini koruduğunu, uzun alkil zincir yapısının ve modifikasyon derecesinin etkisiyle oluşan güçlü hidrofobik etkileşimin sonucu olarak uzatılmış ilaç salımı sağlanabileceğini de ortaya koymuşlardır.

Sharma ve Singh [6] gen transferi için vektör olarak C_6-C_{20} farklı alkil zincir uzunluklarına sahip yağ asitleri kullanarak (kaproik asit, kaprilik asit, kaprik asit, laurik asit, miristik asit, palmitik asit, stearik asit ve arakidik asit) yağ asitlerinin karboksil grupları ile kitosanın amin grupları arasındaki amidasyon reaksiyonu ile hidrofobikliğini arttırmışlardır. Çalışmalarında hidrofobik alkil zincir yapısı lipofilik hücre membranına penetrasyonu güçlendirdiğini ve palmitoil kitosan nanomisel formülasyonu diğer yağ asidi modifikasyon formülasyonları ile kıyaslandığında en yüksek hücre içi alımı gösterdiğini ve pDNA hücre içinde güvenli ve etkili bir şekilde serbest bırakılmasını sağlayarak en yüksek gen transfeksiyon etkinliği de gösterdiğini bildirmişlerdir.

Ramalingam ve Ko [125] tarafından yapılan bir çalışmada oral biyoyararlanımı ve stabilitesi düşük resveratrol terapötik ajan yüklü palmitik asit ile modifiye edilmiş TMC (TMC-g-PA) nanopartiküler formülasyonu değerlendirmişler. *In vitro* ilaç salımı ve sürdürülebilir ilaç salım analizleri neticesinde TMC-g-PA nanopartiküler sistemin 3,8 kat daha fazla biyoyararlanımı arttırdığını ve oral yol uygulamalarında potansiyel bir ilaç taşıma vektörü olarak kullanılabileceğini önermişlerdir.

Xie ve diğ. [126] palmitoil kuaterner amonyum kitosan modifiye polimerden kendiliğinden oluşan (self assembly) nanopartiküler sistem elde ederek stabil olmayan, GI

sistemde mukozal membran geçme kabiliyeti bulunmayan hidrofobik kurkumin teröpatik ajanını enkapsüle etmişler. Formülasyon oral yol uygulamasında kontrollü ve sürekli ilaç salımı göstermekte ayrıca serbest kurkumin ile karşılaştırıldığında üstün sitotoksik, antimikrobiyal ve antioksidan özelliklere sahip olduğu da bildirmişlerdir.

Benforini ve diğ. [7] çalışmalarında palmitoil glikol kitosan (PGC) misel formülasyonunu *ex vivo* domuz korneası, *in vitro* tavşan kornea epitel hücre hattı (RCE) üzerinde ve Caco-2 (insan kolorektal adenokarsinom hücreleri) hücreleri üzerinde incelemişlerdir. PGC misel yapısının epitelyal kornea hücre hattında sıkı bağlantı noktalarını açarak penetrasyonu arttırdığını ve kornea içine teröpatik etki göstermekle birlikte yeterli seviyede ilaç penetrasyonunu da iyileştirdiğini ifade etmişlerdir. Modifiye türevi ile kıyaslandığında ise kitosanın mukoadezif özelliğinin iyileştirdiğini kornea yüzeyi ile temas etme süresini de arttırdığı sonucuna varmışlardır.

Pyro ve diğ. [127] palmitik asit modifikasyon oranı %18, yüzey yükü pozitif N-palmitoil-N-monometil-N,Ndimetil-N,N,N-trimetil-6-O-glikolkitosan (GCPQ) polimeri ile Covid 19 pandemisine sebep olan SARS-COV-2 virüsünü inhibe edici nazal sprey formülasyonunu elde ederek *in vitro, ex vivo* ve *in vivo* transgenik fareler üzerinde denemeler gerçekleştirmişlerdir. In vitro Vero E6 ve A549 hücre üzerine yapılan çalışmalarda toksik olmayan GCPQ polimer konsantrasyonlarında SARS-CoV2 replikasyonunu inhibe edici etki gösterdiğini, *ex vivo* insan solunum yolu epitel (HAE) hücreleri üzerindeki uygulamada GCPQ formülasyonunun inhibe edici etkisinin doğrulandığını ve *in vivo* fare burun deliklerine uygulanan GPCQ polimerinin sprey formülasyonunun ise 24 saat süresince mukoadeziflik özelliğinin etkisi değerlendirildiğinde bu özelliğinden dolayı burun mukozal yüzeyinde uzun alıkonma süresi gösterdiğini açıklamışlardır. Böylece GPCQ formülasyonunun SARS-COV-2 enfeksiyonundan koruyabilmesinin yanında virüsün beyne ulaşmasını da sınırlandırarak nörolojik rahatsızlıkların olasılığını azaltabileceğini öngörmüşlerdir.

Tiyollenmiş Kitosan; kitosanın tiyol grubuna sahip tiyolleme ajanlarıyla modifikasyonu sonucu oluşan türevidir. Tiyolleme ajanları sistein (Cys), tiyoglikolik asit (TGA), 2-iminotiyolan, 4-tiyobutilamidin (TBA), N-asetil sistein, izopropil-S-asetil tiyoasetamidi, glutatyon örnek verilebilir. Farmasötik ve biyomedikal amaçlı polimerlerin mukoadezyonunu arttırmak amacıyla gerçekleştirilen tiyolleme tekniğine Bernkop-Schnürch ve arkadaşları [8]

öncülük etmektedir. Kitosanın mukoadezif özelliğinin iyileştirilebilmesi farmasötik ve biyomedikal uygulamalarda kullanımını daha da arttırmaktadır.

Bu konuda yapılan çalışmalarda, kitosanın tiyollenmesi onun sadece mukoadezif özelliğini iyileştirmekle kalmadığını aynı zamanda geçirgenliğini de arttırıcı etkisini iyileştirdiği gibi yerinde jelleşme özelliği (çapraz bağlanma) de kazandırdığı, ayrıca enzim inhibasyonu sağladığı ve yapısı gereği de biyobozunur olduğu ifade edilmektedir [123,128–130].

Mukoadezifliği arttırıcı özelliği; yapıya katılan tiyol gruplarının, polimer ile mukus arasında oluşan sekonder etkileşimin ve fiziksel etkileşimin yanında mukus glikoproteinlerin sistein açısından zengin yapıları ile güçlü mukoadeziflik sağlayan disülfit kovalent bağı oluşmasına dayanmaktadır [114,129].

Geçirkenliği arttırıcı özelliği; katyonik özellikteki kitosanın negatif yüklü hücre zarı ile etkileşime girmesi ve sıkı bağlantıyla ilişkili proteinlerin yapısal olarak yeniden düzenlenmesi sonucu oluşmaktadır. Fakat bununla birlikte mukus tabakasına kitosan zincirlerinin boyutu sebebiyle sınırlı difüzyon ve/veya müsin ile rekabetçi yük etkileşimleri oluşturması epitelyuma ulaşmasını engelleyerek geçirgenlik özelliğini azaltmaktadır. Tiyol gruplarının varlığında ise disülfit bağı oluşumuyla sıkı bağlantı noktalarının (tight junctions) açılması ve kapanmasından sorumlu geçirgen membran proteini tirozin fosfatazın inhibisyonuyla sıkı bağlantıların yapısal bütünlüğündeki değişim sonucu sıkı bağlantıların açılması gerçekleşmektedir [131–134].

Yerinde jelleşme özelliği (çapraz bağlanma); tiyollenmiş polimerin yerinde jelleşme özelliğinden fizyolojik pH değerlerinde oksidasyonunun gerçekleşmesi sebebiyle moleküller arası ve molekül içi disülfit bağları oluşturması polimer zincirleri arasında çapraz bağ oluşumu gözlemlenmektedir. pH değeri 5-6 aralığında moleküller arası ve molekül içi disülfit bağlarının oluşmasıyla üç boyutlu bir ağ yapı meydana gelmekte ve bu yapı taşıyıcı vektörün daha stabil olmasını sağlarken ilacın uzatılmış kontrollü salımına da imkân vermektedir. Bu özellik tiyollenmiş kitosanların vajinal, nazal, bukkal ve oküler mukozaya uygulanmasını mümkün kılmaktadır [114,135–137].

Enzim inhibe etkisi; aminopeptidazlar ve karboksipeptidazlar gibi çinkoya bağımlı proteazlar, tiyomerler tarafından inhibe edilmektedir. İnhibisyon mekanizması, tiyomerlerin çinko iyonlarını bağlama kapasitesine sahip olma özelliğine dayanmaktadır. Bu inhibe edici

etkisinin ağız yolu ile peptit ve protein kaynaklı ilaçlarının uygulanmasında kullanımını sağlamaktadır [114,138].

Kaynaklardaki yapılan farklı çalışmalarda elde edilen sonuçlar şunu yansıtmaktadır;

Kitosan-tiyoglikolik asit modifikasyonu tiyollenmemiş kitosanla karşılaştırıldığında yavaş şişme davranışı ve arttırılmış penetrasyon ile daha yüksek mukoadezyon yeteneği göstermektedir [139]. Tiyollenmiş kitosanın, tiyollenmemiş kitosanla karşılaştırıldığında nazal mukoza yoluyla daha üstün taşıma özelliği göstermektedir [138,140]. Tiyollenmiş kitosanın geçirgenliği arttırması *in vivo* olarak değerlendirildiğinde kitosan-N-asetilsistein ile kaplanmış nanoyapılı lipit taşıyıcı ile modifiye edilmemiş kitosanla kaplanan nano lipit formülasyonlarının kıyaslanması için oküler yol ilaç salımı özellikleri değerlendirildiğinde albino tavşanı gözyaşlarındaki kurkumin miktarını 2,4 kat arttırdığı görülmüştür [141].

Farklı tiyol gruplarına sahip kitosan tablet formülasyonları ile yapılan domuz bağırsağı mukozası üzerinde yapılan çalışmada kitosan-tiyoglikolik asit konjugatından hazırlanan tabletlerin mukoadezif özelliği çekme çalışmaları ve dönen silindir yöntemi sonuçları göre sırasıyla 6,3 ve 10,3 artmakta ve bunun neticesinde alıkonma süresinin arttığı belirtilmiştir [9]. Kitosan-tiyoetilamidin (TEA) konjugat tablet formülasyonların mukoadezif özelliğinde sırasıyla 3 ile 9 kat artış değeri tespit edildiği, formülasyonun kontrollü ilaç salımında taşıyıcı olarak kullanım potansiyeline sahip olduğu da belirtilmiştir [142]. Kitosan-N-asetil sistein konjugat tabletlerinde ise 8,3 kat artma meydana geldiği, mukoadezif ve biyolojik olarak parçalanabilen formülasyonların geliştirilmesinde faydalı olabilecek umut verici yeni bir taşıyıcı olarak değerlendirildiği ileri sürülmüştür [143].

Diğer bir çalışmada ise, klotrimazol yüklü kitosan-tiyoglikolik asit konjugatların sırasıyla 160 ve 280 mM/g tiyol grubu içeren konjugat A ve konjugat B hazırlanarak klotrimazol etken maddenin vajinal yol ile taşınması değerlendirmişler. Klotrimazol yüklü konjugat A ve konjugat B' nin parçalanma süresinde sırasıyla 1,6 kat ve 100 kat artış gözlenmekte olup güçlü mukoadeziflik özelliği sayesinde kontrollü ilaç salım davranışı gösterdiği, kitosan-TGA konjugatların vajinal enfeksiyonların tedavisinde kullanılabileceği de belirtilmiştir [144].

Teofilin yüklü tiyoglikolik asit-kitosan nanopartiküler (TCNs) formülasyonun nazal yol uygulamasında antienflamatuvar etkisi değerlendirilmiş. Çalışmada belirtildiği üzere; *in vivo*

alerjik astımlı fareler üzerinde yapılan çalışmada teofilinin bronş üzerine toksik etkisini azaltmakta, aşırı mukus salgısını inhibe etkisi göstermekte ve akciğer hücrelerinde apoptosisi arttırdığı gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde teofiline kıyasla teofilin yüklü TCNs nanopartiküler sistemin artan mukoadezif etkisi ile alerjik astım tedavisinde kullanılması biyoyaralanımını arttırdığı öne sürülmüştür [145].

PPR araştırma grubumuz tarafından gerçekleştirilen çalışmada [105] ise, amin grubu arttırılmış kitosanın (atChi) tiyoglikolik asit ile konjugatından sığır serum albümini (BSA) yüklü nanopartiküller sistemlerin *in vivo* burun içi ve deri altı aşılama çalışmaları fareler üzerinde değerlendirilmiştir. Modifiye edilmemiş kitosana göre IgG serum antikor cevabı en yüksek değere toksik olmayan atChi konjugatı esaslı nanaopartiküler sistem ile elde edildiği, molekülde tiyol grubu varlığı kitosanın mukoadezif özelliğinde artışa neden olduğu ve burun mukozasında uzatılmış antijen varlığı oluşturarak güçlendirilmiş bağışıklık tepkilerinin gözlendiği dolayısıyla nazal yol uygulamalarında potansiyel bir taşıyıcı olarak kullanılabileceği ortaya koyulmuştur.

Mahmood ve diğ. [146] tiyoglikolik asit-stearik asit kitosan (CAS-TGA) konjugatından elde edilen kurkumin yüklü nanomisel yapıları bağırsak ve vajina mukozası üzerinde mukoadezyon özelliğini değerlendirmişler. CAS-TGA nanomiselleri CAS miselleri ile kıyaslandığında tiyol grubu varlığı mukoadezif özelliğinde bağırsak mukozasında 51,6 kat vajina mukozasında ise 28,6 kat artış oluştuğunu belirtmişler. Ayrıca nanomisellerin toksisite etkisi incelendiğinde Caco-2 hücrelerinde ≥%85 değerinde canlılık oranına sahip olduğu ve mukoadezif özelliğinin etkisiyle de uzatılmış ilaç salım etkisi gösterdiğini ifade etmişlerdir.

Diğer bir çalışmada ise N-asetilsistein kitosan palmitik asit konjugatından elde edilen kumarin 6 yüklü nanomisellerin (NAC-COS-PA) *ex vivo* insan kornea epitelinde ve *in vivo* tavşan gözü üzerinde kumarin 6' ya göre 1,97 kat daha fazla ilaç taşıma etkinliği gösterdiği ve ilaç penetrasyonunu güçlendirdiğini belirtmişlerdir. Nanomisel yapı musin ile güçlü bağlanma gösterdiği ve *in vivo* çalışmada saf flurbiprofen (FB) bileşiğine göre ilaç konsantrasyonunda 1,92 ve 2,44 kat artış gösterdiği ve en iyi antiinflamatuar etkinliğe tiyollenmiş nanomisellerin sahip olduğunu saptamışlardır. NAC-COS-PA nanomiselleri topikal uygulama yoluyla oküler hastalıkların tedavisi için ilaç taşıma sistemi olarak kullanıma uygun olduğunu da incelemişlerdir [147].

2.6. KİTOSANIN NANOPARTİKÜL FORMÜLASYONLARININ HAZIRLANMASI

Nanopartiküler ilaç taşıma sistemlerinin etken maddenin biyoyararlanımını arttırması, stabilite sağlaması, yüksek kapsüllenme etkinliği göstermesi, kontrollü salım gerçekleştirmesi ve daha az toksik özellik göstermesi sebebiyle biyofarmasötik alanda kullanımı büyük bir önem kazanmıştır [148].

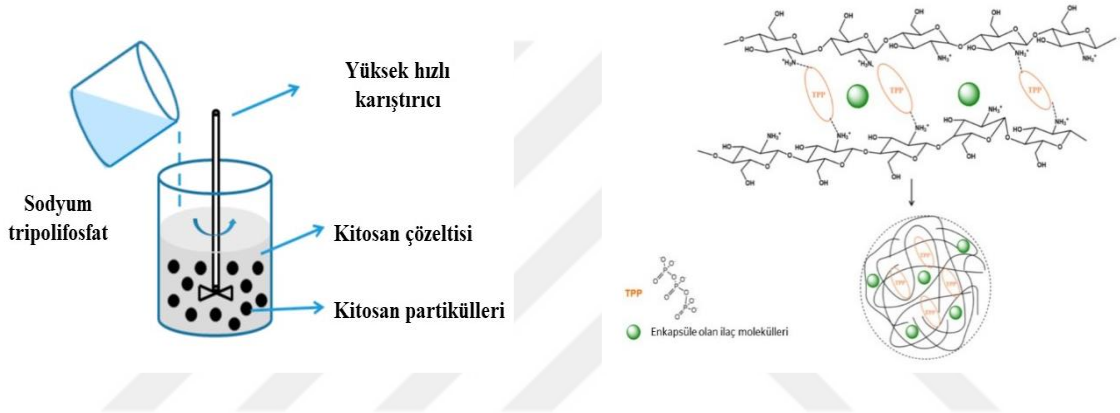
Kitosan' dan elde edilen nanopartiküler sistemlerin biyobozunur, biyouyumlu, toksik olmaması, kontrollü ilaç salımı, asidik koşullarda katyonik özelliğe sahip olması sebebiyle endo-lizozomal kaçış gerçekleştirmesi, güçlendirilmiş geçirkenlik ve alıkonma etkisi (enhanced permeability retention - EPR), yüksek ilaç yükleme kapasitesi, ilaç salım davranışının difüzyon, şişme ve erozyon üzerinden gerçekleşmesi gibi özellikler ilaç taşıma sistemi olarak kullanılmasında potansiyel vektör olarak aday haline getirmektedir. Ayrıca biyoadezif özellikteki kitosandan elde edilen nanopartiküler sistemin bu özelliği göstermesi onu biyoaktif maddelerin ve ilaç moleküllerin mukozal yol üzerinden taşınmasında tercih edilen taşıyıcı olmasını sağlayarak kitosan nanopartiküllerin kanser hastalıkları, mide, bağırsak, akciğer hastalıkları, göz enfeksiyonlarının tedavisinde, beyne ilaç taşınması ve parenteral olmayan ilaç taşınması gibi çeşitli uygulamalarda tercih edilmektedir [116,149,150].

Kitosan biyopolimerinden jel, boncuk, misel, küre oluşturma kabiliyeti nedeniyle istenilen mikro/nanopartikül formülasyonlarını hazırlanmak için emülsifikasyon çapraz bağlama, emülsiyon solvent difüzyonu, emülsiyon damlacık birleşimi, iyonik jelasyon, ters miselizasyon, desolvasyon, nanoçöktürme ve püskürtme ile kurutma yöntemleri yaygın olarak kullanılmaktadır [116]. Tercih edilen formülasyon sonucu hazırlanan nanopartiküler sistemin fizikokimyasal karakteristik özellikleri olan partikül boyutu, partikül boyutu dağılımı/polidisperslik indeksi (PDI)) ve yüzey yükü değerlendirilmektedir. Bu özellikler kitosanın ortalama molekül ağırlığı, DD ve nanopartikül formülasyon konsantrasyonundan doğrudan etkilemektedir [150–153].

Bu tez çalışması kapsamında sentezlenen kitosan modifiye ürünlerinden iyonik jelasyon yöntemi kullanılarak nanopartiküler sistem elde edildiğinden aşağıda (Bölüm 2.6.1) bu yönteme ait bilgiler ayrıntılı olarak sunulmuştur.

2.6.1. İyonik Jelasyon Yöntemi (İyonik Çapraz Bağlanma)

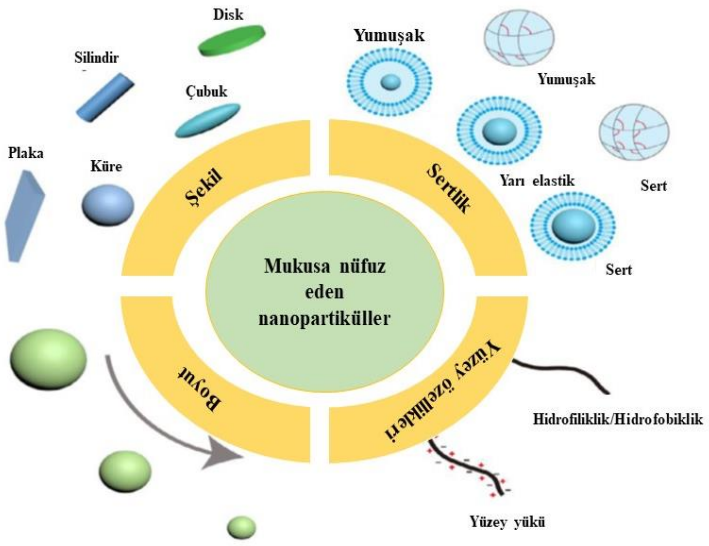
Bu yöntemde polikatyonik özellikteki kitosanın asetik asit gibi asidik ortamda çözünmesinden faydalanarak pozitif yüzey yüküne sahip olması sağlanır. Oda koşullarında ve mekanik karıştırma altında kitosan çözeltisi üzerine en çok tercih edilen çapraz bağlayıcı olan polianyonik özellikteki sodum tripolifosfat (TPP) sulu çözeltisi ilave edilerek pozitif ve negatif yüklerin elektrostatik etkileşimi sonucu iyonik/fiziksel çapraz bağlanma üzerinden küresel nanopartiküller oluşturulur (Şekil 2.8). Elde edilen nanopartiküllerin partikül boyutu ve yüzey yükü gibi fizikokimyasal özelliklerin istenen değerlerde elde edilmesi çözelti ortam pH'ı, kitosan ve TPP konsantrasyonlarının optimizasyonuyla gerçekleştirilmektedir [150,154,155].



Şekil 2.8: İyonik jelasyon ile kitosan nanopartiküllerinin oluşumu ve mekanizması [155,156].

2.7. NANOPARTİKÜLER SİSTEMLERİN FİZİKOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ

Nanopartiküler sistemlerin partikül boyutu, partikül şekli, yüzey yükü (zeta potansiyeli), hidrofobisitesi ve sertlik gibi fizikokimyasal özellikleri biyolojik ortamdaki karakteristik davranışını belirlemektedir (Şekil 2.9) [157–159].



Şekil 2.9: Nanopartiküllerin uygulamada etkin olan karakteristikleri [159].

2.7.1. Partikül Boyutu

Nanopartikül sistemlerin *in vivo* davranışını, özellikle kan dolaşımında kalma süreleri, immünojenitik etkisi ve doku/hücre etkileşimini etkileyen önemli bir fizikokimyasal özelliklerdir [157,160]. Nanopartiküller taşıyıcı sistemin biyodağılımı, hücre içine alımı, kan dolaşımdaki yarılanma ömrünü ve bağışıklık sistemi tarafından atılmasına etki etmektedir [161]. Nanopartiküler sistemlerin küçük boyutları kan dolaşımında nispeten daha uzun süre bulunmasını sağlarken tetiklenen bağışıklık tepkisi boyuta doğrusal olarak bağlı olmasa da etkileşimin önlenmesinde etkilidir [162,163]. 5 nm boyutundan küçük nanopartiküller bağışık sistemi tarafından hızla uzaklaştırılırken [164] 30-50 nm boyutundaki nanopartiküllerin geniş yüzey alanına sahip olması sebebiyle hücre yüzeyiyle etkileşimi nedeniyle etkili hücre alımı göstermektedir [165]. Ancak nanopartiküllerin 100 nm' den küçük olması durumunda ise sınırlı miktarda ilaç taşıma kapasitesi sebebiyle teröpatik etki gösterememektedir. Yeterli ilaç konsantrasyonunun yüklenebilmesi için 100-200 nm arasında olan nanopartiküler sistemlerin gerekli yüzey alanı/hacim oranına sahip olduğu görülmektedir [166]. Nanopartiküllerin boyutu arttıkça, ilaç yükleme kapasitesinde artış olmakta ve bu artış ilaç salım kinetiğini iyileştirmekte ve terapötik etkinliğini arttırmaktadır. Böylece boyut büyüklüğü nanaopartiküler sistemin sürekli ilaç salım davranışı göstermesine sahip olmasını sağlarken daha küçük boyuttaki nanopartiküller sistemler ise *in vitro/vivo* uygulamalarda ani salım (burst effect) davranışı göstermektedir [167].

Mukozal membran üzerinden ilaç taşınmasında boyut, mukus geçirgenliği için önemli bir parametredir ve 10 nm' den küçük ve yüzey yüküne sahip olmayan partiküller mukusu herhangi bir engel olmadan geçebilmektedir. 30-60 nm boyutundaki partiküller ise (antikorlar gibi), müsinlerle zayıf etkileşime girerler ve yavaş engellenme etkisiyle servikovajinal mukus matrislerini geçebilmektedir [168]. 50 nm partikül boyutuna sahip karboksil polistren nanopartiküller müsin ile hidrofobik etkileşime girerken 200 nm değere sahip, yapısında amin grubu bulunan polistren nanopartikülleri hidrofobik etkinin yanı sıra müsin yapısıyla pozitif yüzey yük etkisiyle etkileşim oluşturarak mukoadezif özellik göstermektedir [167,169]. 50 ve 100 nm boyutlarındaki nanopartiküllerin mukoadezyon davranışı ile kıyaslandığında 200 nm' lik partiküller mukozal membranın daha derin bölgelerine hızla nüfuz ettiği tespit edilirken partikül boyutu ve yüzey yükü adezyon davranışını güçlü bir şekilde belirlemektedir [170].

2.7.2. Partikül Şekli

Nanopartiküllerin hücre içi alımı, alım kinetiği ve mekanizması, hücre içi dağılımı ve sitotoksisitesi üzerinde dikkate değer bir etkiye sahip olan önemli bir özelliktir [171].

Küresel olmayan partiküller sistemlere antijenlerin yüklenmesiyle hazırlanan nanopartiküller sistemin immünolojik tepkisindeki değişim *in vitro* hücre alım çalışmaları neticesinde değerlendirildiğinde küresel olmayan parçacıkların makrofajlar tarafından alımının, küresel parçacıklara kıyasla daha düşük olduğu görülmektedir [172].

In vivo insan tümör hücresinde manyetik nanoçubukların, küresel nanopartiküllere göre hedefleme vektörü olarak kullanıldığında daha üstün özelliğe sahip olduğu görülmekte ve tümör hedeflemede antikanser ilaçların taşınmasında vektör olarak tercih edilmesi iyileştirilmiş terapötik etkinlik ve biyoyararlanım göstermektedir [173]. Zhou ve diğ. [174] gerçekleştirmiş olduğu çalışmada antikanser ilacı taşıyan nanoçubuklar küresel nanopartiküller ile kıyaslamışlar ve nanoçubuk ilaç taşıyıcı sistemin uzatılmış kan dolaşımı, fare tümör hücrelerinde artan birikim gösterdiğini ve biyoyararlanımı arttırdığını belirtmişlerdir [174].

Küresel ve küresel olmayan polistiren nanopartiküllerin biyodağılımı incelendiğinde silindirik şekle sahip taşıyıcı sistemlerin vasküler endotele yapışma etkisine sahip olduğu görülmektedir [175]. Nanopartiküllerin biyoadezif molekülle kaplanarak partikül şeklinin etkisi değerlendirildiği diğer bir çalışmada ise eliptik disk şeklindeki partiküler sistemin kan dolaşımda daha uzun yarılanma ömrü göstererek, karaciğerde daha az birikme meydana geldiği

ayrıca hedeflenen bölgede küresel partiküllere göre daha fazla birikim oluştuğu ve vasküler adezyonu arttırdığı ifade edilmiştir [176].

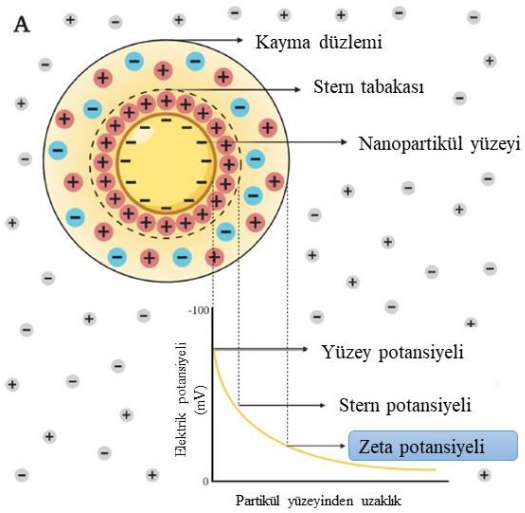
2.7.3. Partikül Yüzey Özellikleri

2.7.3.1. Partikül Yüzey Yükü

Nanopartiküler sistemin hazırlandığı ya da uygulandığı ortamda partiküllerin kazanmış olduğu elektriksel yük olarak ifade edilmektedir. Partiküller negatif, pozitif ve birlikte hem negatif hem de pozitif yüzey yüküne sahip (amfoterik) olabilirler. Yüzey yükü stabilite, kan dolaşımında kalış süresi, hücre içi alımı, biyodağılım ve biyolojik ortamla etkileşimini belirleyen önemli bir parametredir. Aktive edilmiş pozitif yüzey yükü nanopartikül sistemlerin hedeflenen hücrelere adezyonunu arttırmakta ve hücresel alımı, endozomal kaçışı ve mitokondriyal hedeflemeyi kolaylaştırmaktadır [177]. Pozitif yüklü nanopartiküler sistemlerde nötr ve negatif yüklü nanopartiküllere göre daha kolay hücre içi alımı gözlenmektedir [178]. Kitosanın asidik ortam koşullarında yapısındaki amino gruplarının protonlanması sonucu pozitif yüzey yüke sahip olması birçok biyomedikal uygulama alanında önemli bir aday haline gelmesini sağlarken özellikle ilaçların mukozal yollardan taşınmasında ve mukus yapısına sahip olmayan hücre yapısına da adezyon göstermesi kullanımını arttırmaktadır [116].

Zeta Potansiyeli

Nanopartiküllerin kolloidal dispersiyonlarının sahip olduğu yüzey yükünü/elektrokinetik potansiyelini ifade eden karakteristik bir değerdir. Nanopartiküllerin zeta potansiyeli, partiküllerin çözelti içindeki stabilitesini ve aglemerasyon davranışını belirtmektedir. Yüzey yüküne sahip partiküllerin çevresinde partikül yüküne zıt yüklü iyonlar bulunmasıyla partikülle birlikte hareket eden sabit elektriksel çift tabaka yapısı oluşur. Zeta potansiyeli, hareketli partikül dispersiyon ortamındaki nanopartiküllerin kayma/kesilme düzlemi ile sabit çift tabakadaki (DL) elektrik potansiyelinden oluşan ölçüsüdür ve milivolt (mV) birimi ile ifade edilir. Başka bir deyişle zeta potansiyeli, dispersiyon ortamı ile dağılmış parçacığa bağlı sabit sıvı katmanı arasındaki potansiyel farkıdır (Şekil 2.10) [179].



Şekil 2.10: Kolloidal bir çözeltideki zeta potansiyeli oluşum mekanizması [158].

Nanopartiküllerin zeta potansiyelinin oluşmasına etki eden en önemli parametre dispersiyon ortamının pH değeridir. Ortamdaki $–H^+$ iyonu partikül yüzeyinin pozitif yüklenmesini sağlarken $–OH^-$ iyonu ise negatif yük yüklenmesini sağlayarak zeta potansiyelin negatif veya pozitif değer almasını sağlar. Sıcaklık, iyonik güç ve dispersiyon ortamına katılan diğer maddeler de zeta potansiyel değerini etkilemektedir [180].

Nanopartiküller sistemin sahip olduğu -10 mV ile +10 mV arasındaki zeta potansiyel değerleri elektriksel olarak nötr kabul edilirken < -30 mV zeta potansiyeli kuvvetli anyonik ve > +30 mV zeta potansiyeli kuvvetli katyonik özellik göstermektedir. Zeta potansiyeli değeri -30 mV' den düşük veya +30 mV' den büyük olan nanopartiküler sistemler daha iyi stabilite gösterirken daha zayıf aglamerasyon eğilimine sahiptirler. Bu özellikler nanopartiküler sistemlerin hücresel nüfuz etme yeteneğini etkilemektedir. Hücre membran yapısının – negatif yüke sahip olması sebebiyle yüksek katyonik özellikteki nanopartikülleri membran bozulmasına neden olabilmekte ve daha yüksek toksisite göstermektedir. Diğer yandan yüksek katyonik özellik hücre alımını kolaylaştırabilmektedir [181]. Kuvvetli katyonik özellikteki nanopartiküller sistemler, kuvvetli anyoniklere göre daha yüksek toksisite göstermektedir [182]. Katyonik özelliğe sahip nanopartiküler sistemlerin mukozal membran üzerine adezyon davranışı nötr ve anyonik özellikteki nanopartiküllere kıyasla negatif yüklü musin yapısıyla elektrostatik etkileşim oluşturması sebebiyle daha güçlüdür [183].

2.7.3.2. Hidrofobiklik

Nanopartikülerin hidrofobisite seviyesi nano taşıyıcıların farmakokinetiğini, biyodağılımını ve toksisitesini belirleyen önemli parametrelerden biridir. Hidrofobisite değeri yüksek bir nanopartiküler sistem *in vivo* uygulamada plazma proteini emme eğilimi yüksek olduğundan RES (retikülo endotelyal sistem) tarafından yakalanmaları daha olasıdır ve kan dolaşım sisteminden daha hızlı temizlenirler. Nanopartiküller sistemi RES' ten korumak ve biyoyararlanımı arttırmak amacıyla nano yapının hidrofobisitesinin azaltmak için yapıya PEG, kitosan, dekstran, poloksamer, poli(oksietilen) gibi hidrofilik yapıdaki polimerler katılmaktadır. Bu polimerler arasında en yaygın olarak tercih edileni PEG' tir [157,158]. Huang ve diğ. [184] tarafından yapılan çalışmada PEG' lenmiş katyonik özellikteki lipozomlarda düşük karaciğer alımı gözlemlenirken tümör hücrelerinde birikimin arttığını gözlemlenmiştir.

Wang ve diğ. [185] ise hidrofilik, hidrofobik ve amfifilik nanopartiküllerin bir lipit çift tabakası aracılığıyla hücresel içi alımını değerlendirmişlerdir. Hidrofilik nanopartiküllerin davranışı gözlemlendiğinde hidrofilik yapıdaki nanopartiküllerin yüzeyi ile fosfolipitlerin polar başları arasındaki çekim kuvveti ve fosfolipitlerin yapısındaki apolar kuyruklar arasındaki itme kuvveti nedeniyle lipit çift katmanlarının dış yüzeyi üzerinde dağılma ve düzleşme eğiliminde olduğunu gözlemlemişlerdir. Diğer yandan hidrofobik nanopartiküllerin ise partikül yüzeyi ile apolar kuyruklar arasındaki afinite nedeniyle hücre membranından daha kolay yayılma eğilimi görülürken bu etki nanopartiküler yapıda gerilmeye sebep olduğu gibi membrandan ayrılmayı da zorlaştırdığını belirmişlerdir. Amfifilik yapıya sahip nanopartiküller değerlendirildiğinde ise hidrofobik özellikteki partiküller sistemler ile benzer davranış göstererek lipit çift katmanından geçtikleri gözlenmiş, ancak amfifilik yapının daha az deformasyona uğradığını belirtmişlerdir.

2.7.4. Sertlik

Nanopartikül yapısının sertlik derecesi kan dolaşım sisteminde kalış süresi, biyoyararlanımı, biyodağılımını ve hücre içi penetrasyonunu etkileyen diğer bir parametre olup yapının deforme olabilme yeteğini ifade etmektedir [157,159].

Anselmo ve diğ. [186] sert yapının kan dolaşım süresi üzerindeki etkisinin incelemişler daha yumuşak parçacıkların (~10 kPa) daha sert parçacıklara (~3000 kPa) kıyasla daha iyi dolaşım sağladığı belirtmişlerdir. Ayrıca daha yumuşak parçacıkların *in vitro* deneyler sırasında makrofajlar, endotel hücreleri ve kanser hücrelerinde daha az tutulum gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Zhang ve diğ. [187] poli(karboksibetain) nanojellerin sert ve yumuşak yapıda olduklarındaki davranışını gözlemlemişler ve daha yumuşak nanopartiküllerin daha sert

olanlara göre dalak filtrasyonundan daha kolay geçebildiğini böylece kan dolaşım sisteminde daha uzun kalabildiğini ve daha uzun yarılanma ömrüne sahip olduğunu belirtmişlerdir. Nanotaşıyıcıların elastikiyeti tümör hedefleme uygulamalarında da araştırılmıştır. Son zamanlarda, Guo ve diğ. [188] yumuşak nanolipojellerin (~45 kPa) daha sert muadillerine göre tümör tutulumunda 2,6 kat artış gösterdiğini (~19 MPa) ve daha sert muadillerinin karaciğerde yüksek birikim gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Elastiklik, nanotaşıyıcıların dolaşımını etkilemekte ve daha yumuşak parçacıkların dalak filtrasyonu gibi biyolojik bariyerlerden kaçabilmesi ve tümör dokusu gibi belirli bölgelerde seçici olarak birikebilmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Bu durum daha sert nanoparçacıklara kıyasla damar sisteminden sızabilme, dışarı doğru hareket etme ve deforme olma kabiliyetleriyle açıklanabilmektedir [157].

Yu ve diğ. [189] yumuşak, yarı elastik ve sert yapıdaki poli(laktik-koglikolik asit) (PLGA)-lipit nanopartiküller sistemlerin mukus penetrasyon yeteneklerini değerlendirmişlerdir. Orta sertliğe (~50 MPa) sahip nanopartiküllerin bağırsak mukusunda gelişmiş difüzyon sergilediğini belirtmişlerdir. Oral yoldan uygulanan yarı elastik yapıdaki nanopartiküllerin, yumuşak ve sert yapıdakilere kıyasla etken maddenin biyoyararlanımını daha da artırdığını tespit etmişler ve yumuşak nanopartiküllerin mukus yapısı tarafından engellendiğini gözlemlemişlerdir. Li ve diğ. [190] gerçekleştirdiği çalışmada ise kısa nanotüpler ve çapraz bağlı kısa nanotüpler sentezlemişlerdir. Mukus içindeki parçacık hareketini değerlendirdiklerinde yumuşak kısa nanotüplerin sert çapraz bağlı kısa nanotüplere kıyasla penetrasyon hızının daha yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir [159].

Bu tez çalışmasında ilk defa sentezlenen tiyollenmiş palmitoil kitosan (TGA-Chi-$PA_{(1:0,25)}$) yapısına katılan palmitik asit ve tiyoglikolik asit moleküllerin kitosan karakteristiğine kazandıracağı özellikler literatür araştırması neticesinde belirlenmiştir:

Palmitik asit hücre membranında bulunan fosfolipit yapılarındaki toplam yağ asitlerinin %20-30' unu ve yağ triasilgliserollerini oluşturan doymuş yapıdaki en yaygın yağ asididir [191]. Palmitik asit gen ve ilaç taşımada nanopartiküler sistemin yapısına katıldığında hücre penetrasyonu arttırıcı etkisi ile bilinmekle birlikte yağ asitleri arasında hücre penetrasyonu arttırıcı etkisi en fazla olan yağ asitlerindendir [6,7]. Ayrıca mukoadezifliği arttırıcı etkisi de bulunmakta [5], ilaç biyoyararlanımı iyileştirmekte ve uzatılmış ilaç salımı sağlamaktadır [7,124]. Kitosanın mukoadezif özelliğinin daha da iyileştirilmesi amacıyla güçlü mukoadezif etki gösteren tiyol gruplarının kitosan yapısında bulunması için tiyol grubu içeren tiyoglikolik

asit ile konjugasyonu gerçekleştirilerek oluşturulan nano taşıyıcı sistemlerin müsin yapısıyla kovalent bağ oluşturarak güçlü mukoadezyon özelliği kazandığı belirlenmiştir [8,9,105].

Bu tez kapsamında sentezlenen TGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ modifiye ürünün karakterizasyonu yapıldı, nanopartiküler formülasyonları hazırlandı ve HEK293 canlı hücre hattı üzerine *in vitro* sitotoksisite analizi gerçekleştirildi. Mukoadezif özelliklerinin belirlenmesi amacıyla koyun nazal mukozal membran üzerinde *ex vivo* ve *in vitro 0,20 µm* selüloz asetat membran filtre üzerine mukoadezyon analizleri gerçekleştirildi.

3. YÖNTEM

3.1. KİMYASAL MADDELER

Depolimerize kitosan (DChi) sentezi için Sigma-Aldrich ürünü kitosan (Chi) viskozite ortalama molekül ağırlığı M_v= 50-190 kDa; ağırlıkça ortalama molekül ağırlığı ise M_w = 268.3 kDa dur. DD %75-85, sodyum nitrit (NaNO2) (Merck), HCl (%37) (Merck) ve NaOH (Sigma-Aldrich) kullanıldı. Chi' nin modifikasyonunda palmitik asit (PA), %98 saflıkta ve tiyolleme reaktifi olarak da tiyoglikolik asit (TGA) (Sigma-Aldrich), > %99 saflıkta, kullanıldı. N-(3-Dimetilaminopropil)-N′-Etilkarbodiimid hidroklorür (EDAC) (Sigma-Aldrich) ve N-Hidroksisüksinimid (NHS) (Sigma-Aldrich) kullanıldı. Mukoadezyon tayini için domuz midesinden alınan Musin Tip II (Sigma-Aldrich), işaretleme reaktifi olarak ise Floresan 5(6)-İzotiyosiyanat (FITC) (>90% Sigma-Aldrich) kullanıldı. Çözücü olarak asetik asit (glasiyal, %100 susuz, IsoLab Chemicals), saflık oranı ≥ 99,9 etanol (IsoLab Chemicals) ve aseton ≥ 99,5 (IsoLab Chemicals) kullanıldı. Nanopartiküler taşıyıcı sistemlerin eldesi için sodyum tripolifosfat (TPP) (Sigma-Aldrich) kullanıldı. Tüm çalışmalarda su deiyonize olarak kullanıldı.

3.2. KULLANILAN CİHAZLAR

3.2.1. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometresi (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) (FTIR)

Ürünlerin yapılarını aydınlatmak için Agilent Technologies-Cary 630 (ABD) FTIR cihazı kullanıldı.

3.2.2. Proton Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopi Cihazı (Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy) (^{1}H-NMR)

DChi ve Palmitoil-Kitosan (DChi-$PA_{(1:0,25)}$) ürünlerinin yapı aydınlatılması için UNITY INOVA ^{1}H NMR cihazı (Varian; Kanada) kullanıldı.

3.2.3. Jel Geçirgenlik Kromatografi Boyutlarına Göre Ayırma (Gel Permeation Chromatography- Size Exlusion Chromatography) (GPC-SEC) Sistemi

DChi ortalama molekül ağırlıklarının ve dağılımının belirlenmesi için GPC/SEC cihazı (Tosoh Bioscience, Japonya) kullanıldı.

3.2.4. *Texture* Analizi Cihazı

Ürünlerin mukozaya yapışabilirlik özelliklerini incelemek için Exponent Software yazılımı kullanılarak TA.XT plusC-*Texture* Analyser (USA) cihazı (Şekil 3.1**)** kullanıldı.

Şekil 3.1: Texture analiz cihazı.

3.2.5. UV/Görünür Spektrofotometresi

Ürünlerinin doku üzerinde alıkonma miktarı absorbans değeri olarak 80+ UV/VIS Spektrometer (PG Instruments Ltd.) cihazı kullanılarak UV-Win Spektrofotometre Software (Ver 5.2.0.1205) programı ile ölçüldü.

3.2.6. Nanopartiküler Sistemlerin Dinamik Işık Saçılımı Analizi (DLS)

Nanopartikül sistemlerin partikül boyutu (nm) ve poldisperslik indeksi (PDI) değerleri ile zeta potansiyeli (mV) ölçümleri dinamik ışık saçılımı (DLS) ve elektroforetik ışık saçılımı (ELS) tekniğinden faydalanarak HORIBA NanoPartica SZ-100V2 (Japonya) cihazı ile ölçüldü.

3.2.7. *In Vitro* Sitotoksisite Kullanılan Cihazlar

Ürünlerin *in vitro* sitotoksisite özelliklerinin belirlenmesi için uygulanan MTT yönteminde İÜC Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumla Anabilim Dalı IVF laboratuvarlarında hazırlanan insan embriyonik böbrek hücre hattı (HEK293) kullanıldı. Sonuçlar mikroplaka okuyucu prensibine sahip spektrofotometre cihazı Epoch 2 (Bio Tek, A.B.D) ile değerlendirildi. Hücrelerin MTT testi sonrası durumlarının görüntülenmesini sağlamak için IX71 model Olypus ters mikroskop (A.B.D.) kullanıldı.

3.2.8. Liyofilizatör

Ürünlerin saflandırma aşamasında çözücünün uzaklaştırılması ve aynı zamanda ürünün kurutulmasında liyofilizatör işlemi için (dondurarak kurutma yöntemi) Labogene-Scanvac model (Danimarka) ve Lyovac GT2E-Steris (Almanya) liyofilizatör cihazları kullanıldı.

3.2.9. Santrifüj

Santrifüj işlemlerinin gerçekleştirilmesi için maksimum 15000 rpm ve soğutma koşullarında çalışan Universal 320 R (Hettich-Almanya) modeli santrifüj cihazı kullanıldı.

3.2.10. Ultrasonikasyon Cihazı

Ultrasonikasyon yöntemi ile nanopartiküler sistem elde etme denemeleri Bandelin Sonoplus HD4100 Homojenizatör (Almanya) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi.

3.3. DENEYSEL YÖNTEMLER

3.3.1. Depolimerize Kitosan (DChi) sentezi

1 gram Chi 200 mL 50 mM HCI (%37' lik) çözeltisinde 24 saat oda sıcaklığında karıştırılarak çözünmesi sağlandı. Takiben içerisine $NaNO_2$, Chi molekülündeki 1 mol glikoz amin ünitesi başına 0,1 mol $NaNO_2$ olacak şekilde ilave edilerek 16 saat oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda bekletildi. pH=10-11 de çöktürülerek pH=7 olana kadar deiyonize su ile yıkama yapıldı ve elde edilen ürün 0,01 mbar basınçta -50 ± 1 °C'de liyofilize (Lyovac GT2E, Steris, Almanya) edilip ürün DChi +4 °C' da buzdolabında saklandı [103].

3.3.2. Chi' nın PA ile Modifikasyon Reaksiyonu Ürünlerinin (Chi-PA) Sentezi

Chi molekülünün PA ile modifikasyonunda Chi ve DChi kullanılarak, bunun yanında Chi:PA oranını ve diğer kimyasalları farklı oranlarda kullanarak aşağıda ayrıntıları belirtilen Deneme1-6 gerçekleştirildi [6,146].

Deneme 1: Chi-PA$_{(1:0,50)}$ Sentezi

Chi %1' lik sulu asetik asit çözeltisinde (%1 aa (%h/h)) konsantrasyonu %1 (a/h) olacak şekilde oda sıcaklığında karıştırılarak çözündü. Öncelikle PA molekülündeki COOH gruplarının aktivasyonu için PA (0,50 mol PA/1 mol glukozamin ünitesi) 40 mL etanol içinde çözündü ve PA:EDAC:NHS oranı molce eşit (1:1:1) olacak şekilde EDAC ve NHS 10 mL etanolde çözündü ve bu çözelti oda sıcaklığında karıştırılan PA çözeltisine damla damla ilave edildi. Aktivasyonun tamamlanması için 45-60 dk oda sıcaklığında karıştırmaya devam edildi.

Takiben aktive edilmiş PA çözeltisi yağ banyosunda 70 ºC' de ısıtılan Chi çözeltisine N_2 ortamında damla damla ilave edilip 24 saat 70 ºC' da yağ banyosunda karıştırılarak reaksiyon gerçekleştirildi. Bu süre sonunda, soğutulan reaksiyon karışımının pH'ı 1 N NaOH ile pH 7' ye ayarlandı ve saflandırma işlemi birinci adımda 3,5 kDa'luk diyaliz tüpü (VISKING(R), rejenere selüloz, Serva) kullanılarak 5 gün süresince deiyonize suya karşı diyaliz gerçekleştirildi. Ürün 0,01 mbar basınçta -50 ± 1 °C' de liyofilize edildi. Saflandırmanın ikinci adımında ise reaksiyona girmemiş PA' in uzaklaştırılması için liyofilize edilmiş ürün 3 kez etanol ile yıkanıp deiyonize suda dağıtıldı ve tekrar 0,01 mbar basınçta -50 ± 1 °C'de liyofilize edilerek ürün Chi-$PA_{(1:0,5)}$ +4 °C' de saklandı.

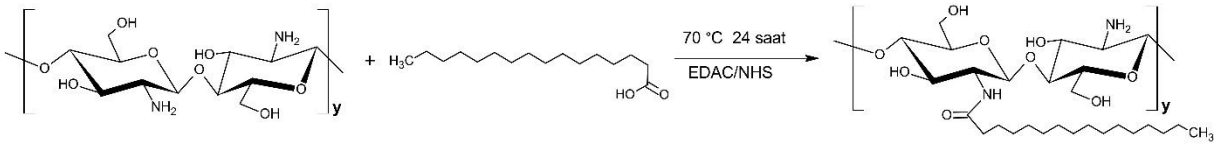
Deneme 2-4: Chi-$PA_{(1:0,05)}$, Chi-$PA_{(1:0,10)}$ ve Chi-$PA_{(1:0,25)}$ Sentezi

Bu grupta, yukarıda Deneme 1'de belirtilen aynı koşullarda Chi' nın PA ile modifikasyonu, PA miktarı 3 farklı oranda kullanılarak (0,05 mol PA/1 mol glukozamin ünitesi), (0,10 mol PA/1 mol glukozamin ünitesi) ve (0,25 mol PA/1 mol glukozamin ünitesi) Deneme 2-3-4 gerçekleştirildi. Bu deneylerde elde edilen saflandırılmış ürünler sırasıyla Chi-$PA_{(1:0,25)}$, Chi-$PA_{(1:0,1)}$ ve Chi-$PA_{(1:0,05)}$ olarak tanımlandı.

Deneme 5-6: DChi-$PA_{(1:0,25)}$ ve DChi-$PA_{(1:0,50)}$ Sentezi

Bu grupta, yukarıda Deneme 1'de belirtilen aynı koşullarda DChi' nın PA ile modifikasyonu, PA miktarı 2 farklı oranda kullanılarak (0,25 mol PA/1 mol glukozamin ünitesine (0,5 mol PA/1 mol glukozamin ünitesi) Deneme 5-6 gerçekleştirildi. Bu deneylerde elde edilen saflandırılmış ürünler sırasıyla DChi-$PA_{(1:0,25)}$ ve DChi-$PA_{(1:0,50)}$ olarak tanımlandı.

Şekil 3.2'de Chi ve DChi' nin PA ile modifikasyonuna ait reaksiyon mekanizması görülmektedir.



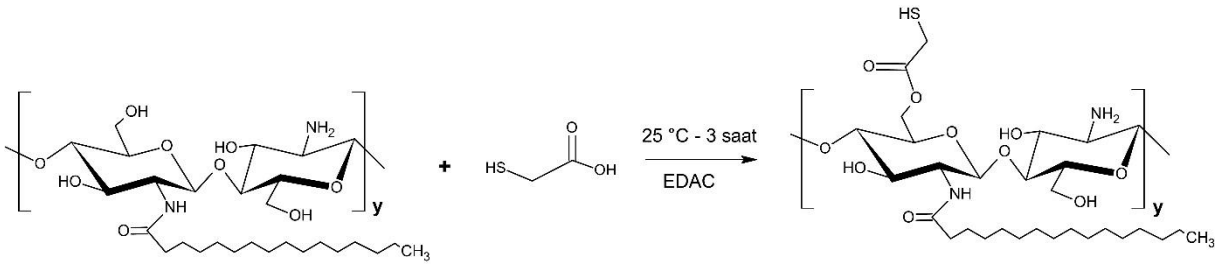
Şekil 3.2: Chi ve DChi' nin PA ile modifikasyonuna ait reaksiyon mekanizması.

3.3.3. Chi-PA ve DChi-PA Ürünlerinin Tiyolleme Reaksiyonları

Bu grupta Deneme 1 ürünü Chi-PA$_{(1:0,50)}$ ve Deneme 5 ürünü DChi-PA$_{(1:0,25)}$ kullanılarak bu ürünlerin TGA tiyolleme reaktifi ile reaksiyonları aşağıda belirtildiği şekilde Deneme 7 ve Deneme 8' de gerçekleştirildi.

Deneme 7: Chi-PA$_{(1:0,50)}$ ürününün TGA ile Reaksiyonu

Deneme 1 ürünü Chi-PA$_{(1:0,50)}$ konsantrasyonu %0,5 (%a/h) olacak şekilde %1 (%h/h) sulu asetik asit çözeltisinde oda sıcaklığında karıştırılarak çözündü. TGA miktarı Chi-PA$_{(1:0,50)}$: TGA oranı 1:1 (a/a) olacak şekilde alınarak 5 mL deiyonize suda çözündü. 50 mM EDAC 5 mL deiyonize suda çözülüp TGA çözeltisine oda sıcaklığında damla damla ilave edilerek 45-60 dk. süresince aktivasyon gerçekleştirildi. Chi-PA$_{(1:0,50)}$ çözeltisinin pH'ı 1 N NaOH ile 5,0' e ayarlandı ve aktivasyon çözeltisi N_2 gazı ortamında damla damla ilave edilip 3 saat oda sıcaklığında karıştırma altında reaksiyon gerçekleştirildi. Saflandırma işlemi için 3,5 kDa diyaliz sakı (VISKING(R), rejenere selüloz, Serva) kullanılarak 1 gün süresince deiyonize suya karşı diyaliz edildi. Ürün 0,01 mbar basınçta -50 ± 1 °C'de liyofilize edildi +4 °C' de saklandı. Saf ürün TGA-Chi-PA$_{(1:0,50)}$ olarak tanımlandı. Tüm çalışmalar TGA bileşiğinin bozunmasını önlemek, tiyolleme reaksiyonun istenildiği şekilde yürümesini sağlamak ve dolayısıyla son ürünü yüksek verimle elde etmek için ışıktan korunarak karanlık ortamda gerçekleştirildi. Reaksiyon mekanizması Şekil 3.3' de verilmiştir.



Şekil 3.3: TGA-Chi-PA$_{(1:0,50)}$ ürününün sentezine ait reaksiyon mekanizması.

Deneme 8: DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ürününün TGA ile Reaksiyonu

Deneme 5 ürünü DChi-PA$_{(1:0,25)}$ kullanılarak TGA ile tiyolleme reaksiyonu Deneme 7'de belirtilen aynı koşullarda gerçekleştirildi. Elde edilen saf ürün TGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ olarak tanımlandı.

3.4. ÜRÜNLERİN KARAKTERİZASYONU

3.4.1. FTIR Analizi

Chi, DChi ve modifikasyon ürünlerinin yapı aydınlatılması FTIR analizi ile Bölüm 3.2.1' de belirtilen cihaz kullanılarak gerçekleştirildi. Örnekler IR saflıktaki potasyum bromür (KBr) ile örnek/KBr oranı (a/a) 1/200 olacak şekilde seyreltilerek homojen bir karışım elde edildi ve basınç altında ince tablet haline getirildi. FTIR spektra 4000-600 cm^{-1} dalga sayısı aralığında kaydedildi.

3.4.2. ^{1}H-NMR Analizi

Seçilen ürün DChi ve DChi-$PA_{(1:0,25)}$ ürünlerinin yapı aydınlatılmasının sağlanması için ^{1}H-NMR analizi Bölüm 3.2.2' de belirtilen ^{1}H-NMR cihazı ile gerçekleştirildi. Analizler CD_3OD, 500 MHz ve 25 °C çalışma şartlarında gerçekleştirildi.

3.4.3. GPC-SEC Analizi

DChi' nin sayısal ortalama molekül ağırlığı (M_n), ağırlıkça ortalama molekül ağırlığı (M_w) ve polidispersite indeksi (PDI= M_w/M_n) değerleri Bölüm 3.2.3' de belirtilen GPC-SEC cihazı kullanılarak tayin edildi. DChi %1 aa' lik (%h/h) çözeltisinde çözündü. Son konsantrasyon 1 mg / ml olacak şekilde 0,2 M sodyum asetat çözeltisi ilave edilip 0,22 µm gözenek boyutuna sahip selüloz asetat membran filtreden geçirilerek 1 mL hacimde viallere alındı. Numuneler 1 mL/dakika akış hızında, 200 µl enjeksiyon hacmi ve sıcaklık 35 °C olacak şekilde TSK gel GMPWXL 7,8 mm x 30cm, 13 µm kolonu (Tosoh Bioscience, Japonya) kullanılarak analizler gerçekleştirildi. Analiz verilerinin hesaplanmasında ASTRA yazılımından faydalanıldı. Sonuçlar Bölüm 4.3' de belirtildi.

3.4.4. Tiyollenmiş Ürünlerin Tiyol Grubu Tayini

Bölüm 3.3.3' de belirtilen tiyollenmiş ürünlerin yapısında bulunan tiyol grubu miktarının hesaplanması Gök ve diğ. [75] çalışmasında belirtilen iyodimetrik titrasyon yöntemi kullanılarak aşağıda belirtilen Denklem (3.1) ile hesaplandı.

$$2RSH + I_2 \longrightarrow RS\text{-}SR + 2HI$$

- 10 mg ürün 3 ml deiyonize suda çözülerek çözeltinin pH'sı 1 N HCl ile 2-3 aralığına ayarlandı.
- İndikatör olarak 150 µl %1' lik (%a/h) sulu nişasta çözeltisinden katıldı.

- 1,0 mM iyod çözeltisi ile kalıcı mavi-mor renk elde edilinceye kadar titre edildi ve tiyol grubu miktarı (µmol/g polimer) aşağıdaki Eşitlik 1'e göre hesaplandı.

$$T = \frac{N \times F \times S}{1000} \qquad \text{Denklem (3.1)}$$

T: Tiyol grubu miktarı (µmol / g polimer)

N: İyod çözeltisinin normalitesi (mmol / litre)

F: İyod çözeltisinin faktörü

S: Sarfiyat miktarı (ml)

3.4.5. Çözünürlük Denemeleri

Chi ve Chi-PA$_{(1:0,50-1:0,25-1:0,10-1:0,05)}$, DChi-PA$_{(1:0,25)}$, TGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ modifiye ürünlerin 1mg/mL konsantrasyonda olacak şekilde deiyonize su, farklı derişimlerde asetik asit çözeltilerinde; %1 aa (%h/h), %4 aa (%h/h), DMSO, DMF, DCM, etil asetat, etanol çözücülerinde ve eşit hacimlde %1 aa (%h/h) ile etanolden oluşan çözücü karışımında (%1aa:Etanol, 1:1, h:h) oda sıcaklığında orta karıştırma hızında 24 saat süre boyunca çözünme davranışları gözlemlendi.

3.5. ÜRÜNLERİN NANOPARTİKÜLER SİSTEMLERİNİN ELDE EDİLMESİ İÇİN YAPILAN OPTİMİZASYON ÇALIŞMALARI

Modifiye ürünlerden hazırlanan partiküler sistemlerin analizleri 25 ºC ortam sıcaklığında kuvarz küvet kullanılarak Bölüm 3.2.6' de belirtilen DLS cihazı kullanılarak 3 tekrar olacak şekilde gerçekleştirildi.

3.5.1. Ultrasonikasyon Yöntemi ile Yapılan Denemeler

Deneme 1 ürünü Chi-PA$_{(1:0,50)}$ %1 aa (%h/h) çözeltisi içinde konsantrasyonu 0,1 mg/ mL olacak şekilde çözeltisini hazırlamak için oda sıcaklığında 1 gece karıştırıldı. Bölüm 3.2.10' da belirtilen ultasonikasyon cihazı kullanılarak nanomisel yapı elde etmek amacıyla 5 mL çözelti hacimlerinde buz banyosunda farklı genlik (amplitüde), süre, konsantrasyonlarda ve DCM oranlarında çalışılarak ultrasonikasyon gerçekleştirildi. Ultrasonikasyon sırasında DCM damla damla ilave edilerek ultrasonikasyon süresi sonunda DCM' nın uzaklaştırılması için deneme ürünleri 37 ºC 30 dk. bekletildi ve ardından partikül boyutları ölçüldü [192].

3.5.2. İyonik Jelasyon Yöntemi ile Yapılan Denemeler

3.5.2.1. TGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ Ürününden Nanopartiküler Sistem Elde Edilmesi

Deneme 8 ürünü TGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ %1 aa (%h/h) ve etanol (1:1 (h:h)) çözücü karışımı içerisinde 0,4 mg/mL konsantrasyon olacak şekilde 1 gece karıştırılarak çözünmesi sağlandı. Çözelti 0,22 µm PES membrandan geçirilerek denemeler yapıldı. 0,5 mg/mL konsantrasyonda sulu TPP çözeltisi hazırlandı. Toplam nanopartikül hacmi 5 mL olacak şekilde oda koşullarında çeşitli TPP oranlarında, manyetik karıştırma hızlarında, farklı konsantrasyonlarda nTGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ formülasyonun elde edilmesine ait optimizasyon çalışmaları yapıldı.

3.5.2.2. DChi ve DChi-PA$_{(1:0,25)}$ Ürünlerinden Nanopartiküler Sistem Elde Edilmesi

Deneme 3 ürünü DChi' nin %1 aa (%h/h) çözeltisi içerisinde 1 mg/mL konsantrasyon olacak şekilde 1 gece karıştırılarak çözünmesi sağlandı. Diğer koşullar Bölüm 3.5.2.1' de belirtildiği gibi nTGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ formülasyonunu hazırlama koşullarıyla aynı olacak şekilde hazırlandı.

Deneme 5 DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ürününden nDChi-PA$_{(1:0,25)}$ formülasyonu da Bölüm 3.5.2.1' de belirtildiği gibi nTGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ formülasyonunu hazırlama koşullarıyla aynı olacak şekilde hazırlandı.

3.5.2.3. nTGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ Formülasyonun Stabiletesi

nTGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ formülasyonu hazırlandıktan sonra oda koşullarında bekletildi ve 1, 7, 15 ve 21. gün boyut, PDI ve zeta değerleri ölçüldü. Sonuçlar Tablo 4.13' de verildi.

3.6. *IN VITRO* SİTOTOKSİSİTE ÇALIŞMALARI

In vitro sitotoksisite (MTT) analiz yöntemi prensip olarak MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) bileşiğinin canlı hücrelerde bulunan mitokondriyal dehidrogenaz enzim ile aktivesi sonucu çözünmeyen formazan kristallerinin oluşturmasına dayanmaktadır [193]. Bu yöntem ile oluşan formazan kristallerin 0,04 M HCI içeren izopropil alkol çözeltisinde çözünmesi sağlandı ve Bölüm 3.2.7' de belirtilen spektrofotometre mikroplaka okuyucusunda absorbans değerleri ölçüldü. Aşağıda belirtilen denklem (3.2)' den yararlanarak hazırlanan nanopartiküler formülasyonun HEK293 hücre hattındaki etkisi hücre canlılığı olarak hesaplandı. Her bir kuyucuk $1x10^4$ canlı HEK293 hücresi içerek şekilde 96 kuyucuklu petrilere ekildi ve kuyucuk başına 150 µL %10 FCS içeren DMEM ilave edilerek 37 °C ve %5 CO_2 koşullarında inkubatörde 24 saat bekletildi. Süre sonunda hücreler üzerindeki

çözelti uzaklaştırıldı. Takiben 0,1 mg/mL ve 0,25 mg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan DChi, DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ve TGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ nanopartiküler sistemlerden 100, 75, 50, 25, 10 µg / mL konsantrasyonlar sağlanacak miktarlarda hücrelere ekilip toplam hacim 100 µL olacak şekilde DMEM ile tamamlandı. Uygulama sonrası hücreler 4 saat inkübe edildikten sonra hücrelerin üzerindeki medyum uzaklaştırıldı ve 100 µL MTT (0,5 mg/mL MTT) çözeltisi ilave edilerek tekrar 4 saat inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sonunda oluşan formazan kristallerini çözmek için her bir kuyucuğa 100 µL 0,04M HCI içeren izopropil alkol çözeltisi ilave edilerek Bölüm 3.2.7' de belirtilen spektrofotometre mikroplaka okuyucusunda 550 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldü ve aşağıda belirtilen formül (Denklem 3.2) kullanılarak hücre canlılığı hesaplandı.

$$\text{Hücre canlılığı } (\%) = \frac{\text{A polimer}}{\text{A DMEM}} \times 100 \qquad \text{Denklem (3.2)}$$

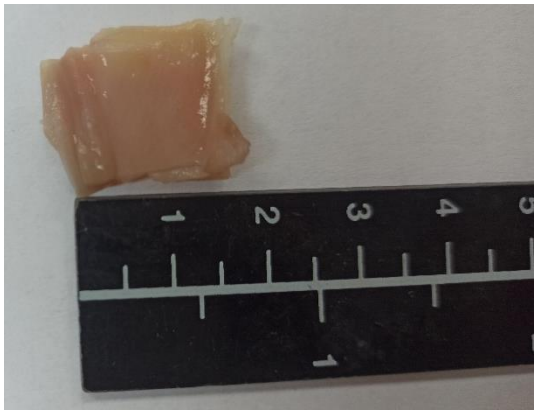
A $_{\text{polimer}}$; hazırlanan polimer nanopartiküler sistemlerin ilave edildiği hücrelerin absorbans değerini,

A $_{\text{DMEM}}$; nanopartiküler sistem uygulanmamış, DMEM ilavesi yapılmış kontrol grubunun absorbans değerini belirtmektedir.

3.7. ÜRÜNLERİN MUKOADEZYON ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

İlaç taşıyıcı sistemlerin "mukoadezyon özelliklerinin" belirlenmesi için uygulanan *in vitro* ve *ex vivo* analizler, mukoadezif ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesinde büyük öneme sahiptir. Uygulanan analiz yöntemleri ilacın nüfuz etmesinin, ilaç salım davranışının, ilaç taşıma sistemin fiziksel ve mekanik stabilitesinin, mukoadezif/biyoadezif etkileşiminin değerlendirilmesine ve iyileştirilmesine katkı sağlamaktadır. Bu testlerin bazılarında *in vivo* koşullar simüle edilerek ilaç taşıma sisteminin hastaya uygulanması durumunda nasıl bir davranış göstereceğinin anlaşılmasına olanak sağlamaktadır [11,45].

Ex vivo mukoadezyon analizleri koyun nazal mukozal membran kullanılarak gerçekleştirildi. Mezbahadan taze kesilmiş koyun kellelerinden elde edilen nazal mukozal dokular analizler gerçekleştirilene kadar -18 °C de derin dondurucuda saklandı. Analiz öncesi çözünme ve nemlenmenin sağlanması için %100 nem ve 37 °C sıcaklıkta inkübatörde 4 saat bekletildi.

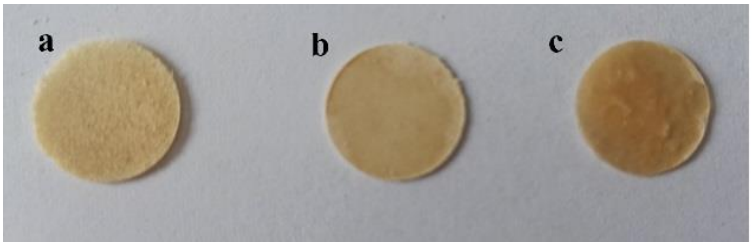


Şekil 3.4: Koyun burun mukoza dokusu.

Ex vivo denemeler DChi ve DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ve TGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ modifiye ürünlerin tablet formu kullanılarak *Texture* analiz yöntemi ve nanopartiküler formülasyonlarının mukozal yüzeyde alıkonması/yıkama metodu kullanılarak iki farklı yöntem ile değerlendirildi.

3.7.1. *Texture* Analiz Yöntemi

Ex vivo koyun nazal mukozal membran ve *in vitro* 0,20 µm selüloz asetat membran filtre üzerine iki ayrı çalışma olacak şekilde gerçekleştirildi. DChi, DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ve TGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ modifiye ürünlerin mukozaya yapışabilirlik ölçümleri için 50 mg tartılarak 0,35 mm x 10 mm ebatlarına sahip 5000 psi basınç altında tabletler hazırlandı. Mukoadezyon özelliği adezyon işi (N.mm) ve aderans kapasitesi/tepe noktası kuvveti (ayrılma/adezyon kuvveti) Newton (N) olarak Bölüm 3.2.4' de belirtilen *Texture* analiz cihazıyla 3 tekrarlı olacak şekilde ölçüldü ve hesaplandı.



Şekil 3.5: Test için kullanılan ürünlerin tabletleri DChi (a) DChi-PA$_{(1:0,25)}$ (b), TGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ (c).

- ***Ex Vivo Nazal Mukozal Membran Yöntemi***

Ex vivo koyun nazal mukozal yapılar inkübatörde nemlendirilmesi sağlandıktan sonra cihaz aparatına yerleştirilip sıkıştırıldı ve doku yüzeyi 100 µl miktarda nazal sıvının simüle edildiği tampon çözelti (1,29 mg/mL KCl, 0,32 mg/mL $CaCl_2.2H_2O$ ve 7,45 mg/mL NaCl (pH 5,7-6,0)) ile ıslatıldı. 10 mm çapında cihaz probuna tabletler çift taraflı bant ile yapıştırıldı. Tabletlerin nazal mukozaya temas süresi 120 sn ve 60 sn, temas kuvveti 3N ve 1N olacak şekilde ve prob iniş hızı 1 mms^{-1} ve ayrılma hızı 1 mms^{-1} olacak şekilde ayarlanarak ölçümler adezyon kuvveti (N) ve adezyon işi (Nxmm) olarak hesaplandı.

- ***In Vitro* Selülöz Asetat Membran Filtre kullanılarak Mukoadezyon Tayini**

0,22 µm selüloz asetat (SA) membran filtrenin kullanıldığı analiz yönteminde SA membran filtre cihazın sabit kısmına sıkıştırılarak 100 µl %8 (a/h) doğal musin (müsin tip II) çözeltisi ile ıslanması sağlandı. Proba yerleştirilmiş olan tabletler 1mms^{-1} hızla yaklaştırıldıktan sonra temas süresi 60 sn olacak şekilde musin çözeltisi ile yeterli sürede 1 N kuvvet altında temas ettirilip 1 mms^{-1} prob hızında ayrılma gerçekleştirildi ve sonuçlar adezyon kuvveti (N) ve adezyon işi (N x mm) olarak hesaplandı.

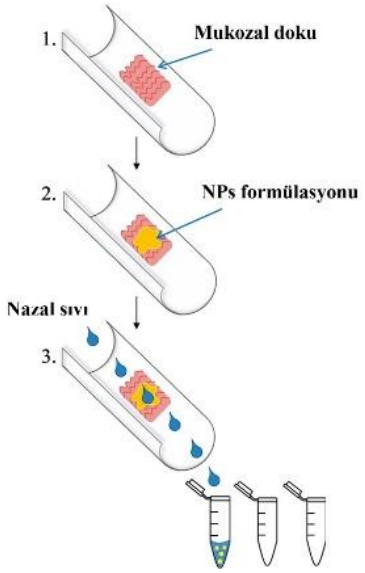
3.7.2. Mukozal Membran Yüzeyinde Nanopartikül Sistemin Alıkonması/Yıkama Metodu

DChi' nin mukoadezif özelliğinin iyileştirilmesi için yapılan modifikasyon ürünlerinde mukozaya yapışabilirlik özelliğinin iyileştirildiğinin değerlendirilmesi amacıyla floresan özellik gösteren FITC bileşiği polimer yapısında katılarak hazırlanan nanopartiküler formülasyonlar analiz için hazırlanan nazal mukozal yüzeyde alıkonması/yıkama metodu ile değerlendirildi.

100 mg DChi 10 mL %1 aa (%h/h) çözeltisinde 24 saat oda sıcaklığında karıştırılarak çözündü ve pH=5,0 ayarlandı. 5:1000 oranında (5 mol FITC/1000 mol glukozamin ünitesi) olacak şekilde 0,5 mg FITC/500 µL etanolden hazırlanan çözelti ilave edilip 20 saat oda sıcaklığında reaksiyona bırakıldı. Takiben, reaksiyon karışımı liyofilize edildikten sonra toz halinde etanol içerisinde dağıtıldı. Ardından UV spektrofotometrede 485 ± 20 nm dalga boyunda absorbans değeri ölçülmeyene kadar etanol ile yıkama gerçekleştirildi ve suda dağıtılarak 0,01 mbar basınçta -50 ± 1°C'de liyofilize edildi, işaretlenmiş DChi, DChi-$PA_{(1:0,25)}$ ve TGA-DChi-$PA_{(1:0,25)}$ ürünleri +4 °C' de saklandı.

Yukarıda belirtilen aynı işlemler 100 mg TGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ve 100 mg DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ürünleri kullanılarak da ayrı örnek hazırlama olarak gerçekleştirildi.

Ex vivo koyun nazal mukozal yapılar %100 nem ve 37 °C sıcaklıkta inkübatörde 4 saat bekletildikten sonra analiz için 1,5 x 2 cm boyutlarında kesilerek lam üzerine yerleştirilerek 50 µL hacimde FITC işaretli nanopartikül formülasyonlar mukoza üzerine uygulandı. Nanopartikül formülasyonun uygulanmasından sonra nazal dokular 0 dk, 1 dk, 10 dk ve 30 dk olarak farklı sürelerde inkübatörde 37 °C %100 nem ortamında bekletildi. Ardından her bir doku 45 °C açıyla yerleştirilip 2 mL/dk hızda olacak şekilde 4 mL tampon çözeltisi ile yıkama yapıldı. Tampon çözelti olarak nazal mukoza yapısını simüle eden pH değeri 5,80 olacak şekilde 7,45 mg/mL NaCl, 1,29 mg/mL KCI ve 0,32 mg/mL $CaCl_2.2H_2O$ içeriğe sahip çözelti hazırlandı. Yıkama sırasında her biri ~500 µL' lik olacak şekilde alikotlar toplandı ve bir UV-Vis spektrofotometre kullanarak 485 ± 20 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldü. Analiz 3 tekrar olacak şekilde ve karanlık ortamda gerçekleştirildi. Nazal mukozal membran yüzeyine adezyonu gerçekleşmemiş nanopartikül miktarı, alikotların ölçülmesi ile absorbans değerleri kümülatif olacak şekilde hesaplandı. Yıkama sonrası dokular floresan mikroskopu ile görüntülendi. Aşağıdaki Şekil 3.6' da yöntemin çalışma prensibine ait adımları gösteren şema sunulmuştur [194].

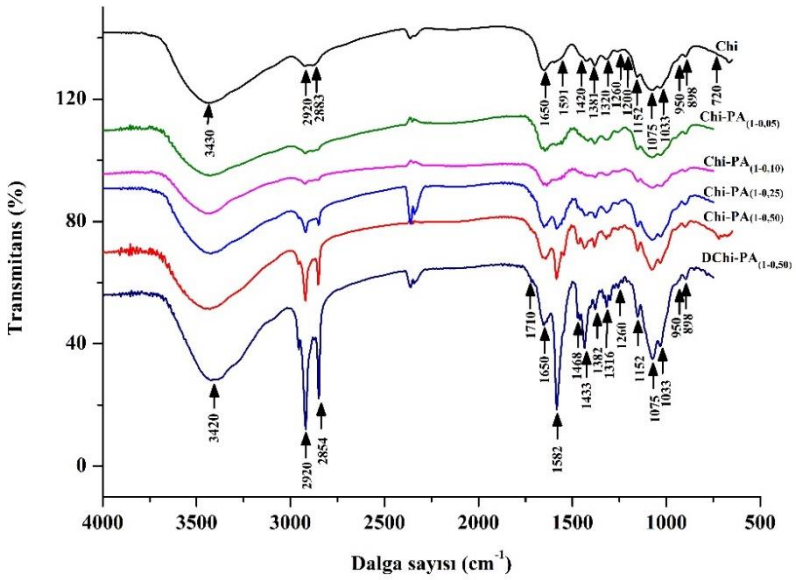


Şekil 3.6: Mukozal membran yüzeyinde nanopartiküller sistemin alıkonması/yıkama yönteminin çalışma prensibine ait adımların şematik gösterilmesi [194].

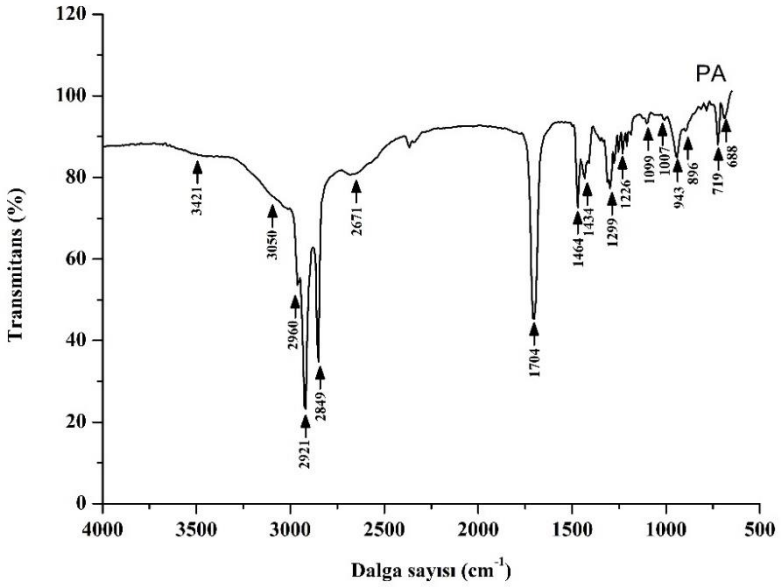
4. BULGULAR

4.1. FTIR ANALİZİ

Chi ve Bölüm 3.3.2' de belirtilen koşullarda sentezlenen Deneme 1, 2, 3, 4 ve 5 ürünlerine ait FTIR spektra Şekil 4.1' de, PA' e ait FTIR spektra ise Şekil 4.2' de gösterilmektedir.

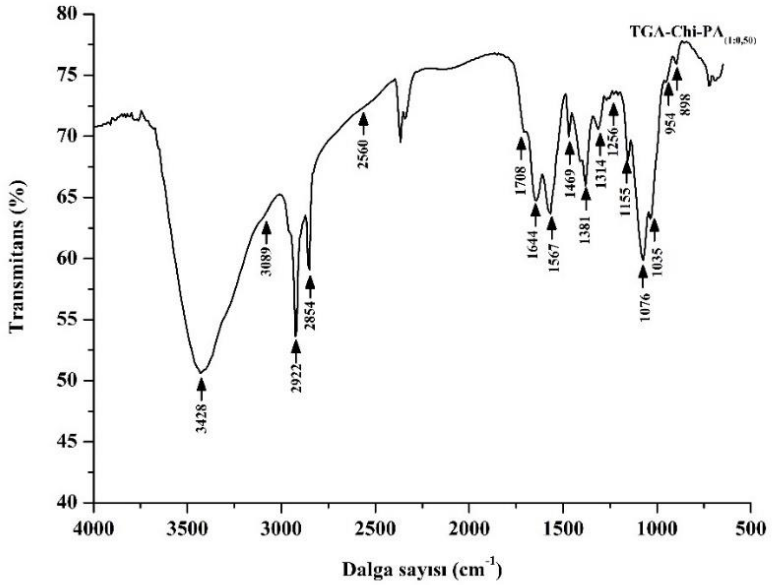


Şekil 4.1: Farklı PA oranlarında Chi ve DChi modifikasyon ürünlerine ait FTIR spektra.

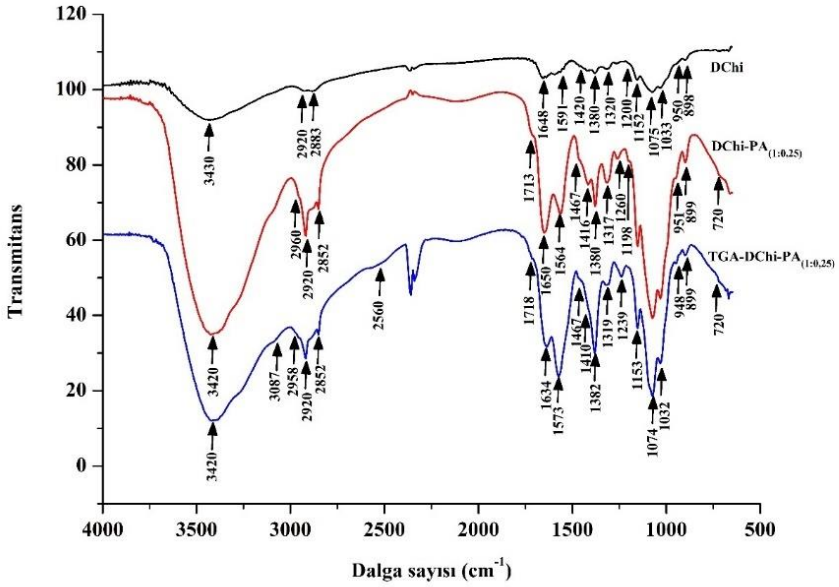


Şekil 4.2: PA'e ait FTIR spektra.

Şekil 4.3' de Deneme 7 ürünü TGA-Chi-PA$_{(1:0,50)}$ ait FTIR spektra, Şekil 4.4' de ise DChi, Deneme 5 ürünü DChi-PA $_{(1:0,25)}$ ve Deneme 8 ürünü TGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ait FTIR spektra verilmiştir.



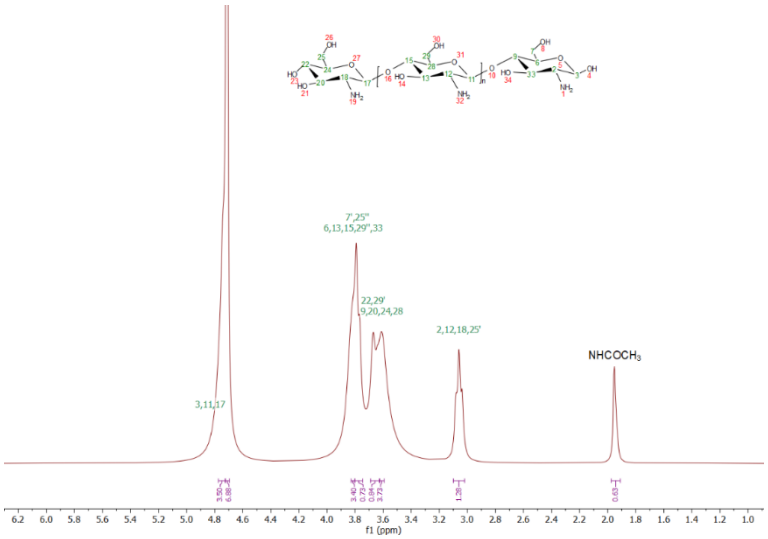
Şekil 4.3: TGA-Chi-PA$_{(1:0,50)}$ ürününe ait FTIR spektra.



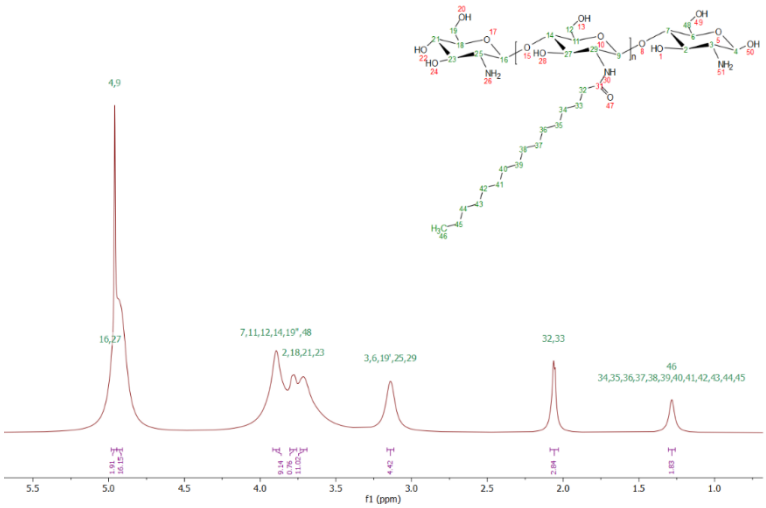
Şekil 4.4: DChi, Deneme 5 DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ve Deneme 8 TGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ürünlerine ait FTIR spektra.

4.2. ^{1}H NMR ANALİZİ

Bölüm 3.3.2' de belirtilen DChi-PA $_{(1:0,25)}$' e ait ^{1}H-NMR analizi Bölüm 3.4.2' de bahsedildiği şeklide gerçekleştirildi ve spektra Şekil 4.5 ve Şekil 4.6' da verilmiştir.



Şekil 4.5: DChi' e ait ^{1}H NMR spektra.



Şekil 4.6: DChi-PA$_{(1:0,25)}$' e ait ^{1}H NMR spektra.

4.3. GPC/SEC ANALİZİ

Chi ve DChi'e ait GPC/SEC analizi Bölüm 3.4.3' de ifade edildiği gibi gerçekleştirildi ve sonuçlar M_n ve M_w olarak Tablo 4.1' de sunulmaktadır.

Tablo 4.1: GPC/SEC analizinden elde edilen Chi ve DChi ait Mn ve Mw değerleri.

	M_n (kDa)	M_w (kDa)	PDI (M_w/M_n)
Chi	103,1	268,3	2,601
DChi	8,3	10,7	1,286

4.4. TİYOL GRUBU TAYİNİ

Bölüm 3.3.3' de ifade edilen Deneme 7 TGA-Chi-PA$_{(1:0,50)}$ ve Deneme 8 TGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ tiyollenme reaksiyonları ürünlerinin serbest tiyol grubu tayini Bölüm 3.4.4' de anlatılan iyodimetrik titrasyon yöntemiyle gerçekleştirildi Sonuçlar Tablo 4.2' de gösterilmektedir.

Tablo 4.2: Ürünlerin serbest tiyol grubu miktarı.

Polimer	Tiyol Grubu Miktarı (µmol/g Polimer)
TGA-Chi-PA$_{(1:0,50)}$ (Deneme 7)	37
TGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ (Deneme 8)	90,1

4.5. ÜRÜNLERİN ÇÖZÜNÜRLÜKLERİN İNCELENMESİ

Bölüm 3.3.2 ve Bölüm 3.3.3' de belirtilen Deneme 1, 2, 3, 4, 5, 6 ve 8 çözünürlük testi Bölüm 3.4.5' de anlatıldığı gibi gerçekleştirildi ve ürünlerin çözünürlük özellikleri Tablo 4.3' de gösterilmektedir.

Tablo 4.3: Ürünlerin çözünürlük özellikleri.

Ürünler*	D.Su	%1 aa	%4 aa	DMSO	DMF	DCM	Etil Asetat	Etanol	%1 aa:Etanol (1:1 (h:h))
Chi	X	+	+	X	X	X	X	X	+
Chi-PA$_{(1:0,50)}$	X[c]	Dispers [b]	Dispers	X	X	X	X	X	X
Chi-PA$_{(1:0,25)}$	X	Dispers	Dispers	X	X	X	X	X	X
Chi-PA$_{(1:0,10)}$	X	Dispers	Dispers	X	X	X	X	X	X
Chi-PA$_{(1:0,05)}$	X	Dispers	Dispers	X	X	X	X	X	X
DChi-PA$_{(1:0,50)}$	X	Dispers	Dispers	X	X	X	X	X	X
DChi-PA$_{(1:0,25)}$	X	Dispers	Dispers	X	X	X	X	X	+[a]
TGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$	X	Dispers	Dispers	X	X	X	X	X	+

Ürünlerin ilgili çözücüdeki 1 mg/ml lik çözeltileri hazırlanarak test edildi, % 1 aa, % 4 aa (%h/h)

[a]: Tam çözünme; [b]: Çözünme yok polimer ince ince dağılmış halde; [c]: Çözünme yok

4.6. DChi ve MODİFİYE DChi ÜRÜNLERİNİN NANOPARTİKÜLER SİSTEMLERİNİN HAZIRLANMASI İÇİN OPTİMİZASYON ÇALIŞMALARI

4.6.1. Ultrasonikasyon Yöntemi ile TGA-Chi-PA$_{(1:0,50)}$ Nanopartiküler Sistemin Hazırlanması

Bölüm 3.3.2 ve Bölüm 3.3.3' de belirtilen koşullarda sentezlenen Deneme 7 TGA-Chi-PA$_{(1:0,50)}$ ürününden Bölüm 3.5.1' de belirtilen ultrasonikasyon yöntemi ile nanopartikül elde etme koşulları ve partiküllerin özellikleri Tablo 4.4, 4.5 ve 4.6' da verilmektedir.

Tablo 4.4: Ultrasonikasyon koşulları ve elde edilen partikül özellikleri.

		Ultrasonikasyon Koşulları	
Boyut (nm)	**PDI**	**Genlik - Titreşim**	**Süre (dk)**
5935,8	11,434	%20A 30-30 sn	5
6378	3,397		10
3593,2	7,041		15
3367,5	2,042		20
921,5	0,688	%40A 30-30 sn	15
551,2	0,986	%60A 30-30 sn	
423,3	0,729	%80A 30-30 sn	
764,9	1,485	%90A 30-30 sn	

Tablo 4.5: %80A 60-30 sn koşullarında 5 dk 1.ultrasonikasyon koşullarını takiben değişen şartlarda 2.ultrasonikasyon uygulanmasıyla elde edilen partikül özellikleri.

		Ultrasonikasyon Koşulları Genlik – Titreşim - Süre	
Boyut (nm)	**PDI**	**1.**	**2.**
424,1	0,552	%80A 60-30 sn/5 dk	%20A 30-30 /10 dk
1249,4	5,457		%40A 30-30 /10 dk
424,4	0,633		%60A 30-30 /10 dk
511,4	0,56		%80A 30-30 /10 dk
461,3	0,80		%100A 30-30 /10 dk

Tablo 4.6: Farklı DCM miktarlarında uygulanan ultrasonikasyon sonrası elde edilen partikül özellikleri.

%80A 60-30 sn 5 dk + %60A 30-30 sn 10 dk

Boyut (nm)	PDI	DCM (µL)
1942	3,588	100
1237,3	2,505	150
1044,1	2,528	200
1085,3	2,591	250
2810,7	0,811	400
1617,8	2,321	500
1089,6	0,864	600

4.6.2. nDChi, nDChi-PA$_{(1:0,25)}$ ve nTGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ Formülasyonun İyonik Jelasyon Yöntemi ile Optimizasyonu

Bölüm 3.3.1, Bölüm 3.3.2 ve Bölüm 3.3.3' de anlatılan koşullarda elde edilen DChi, DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ve TGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ürünlerinden Bölüm 3.5.2' de anlatılan iyonik jelasyon yöntemi ile elde edilen nDChi, nDChi-PA$_{(1:0,25)}$ ve nTGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ formülasyonların özellikleri Tablo 4.7- 4.13' de verilmektedir.

Tablo 4.7: 0,1 mg/mL nanopartikül konsantrasyonunda farklı Polimer:TPP (a:a) oranlarında 250 rpm 1 saat karıştırma ile elde edilen nTGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ formülasyonun özellikleri.

Polimer:TPP oranı (a/a)	Boyut (nm) ± SD	PDI ± SD	Zeta Potansiyeli (mV) ± SD
2:1		aglomerasyon	
3:1	1646,2 ± 2040,6	3,227 ± 3,56	----
4:1	234,4 ± 10,3	0,310± 0,060	18,4 ± 1,8
5:1	221,5 ± 31,3	0,538 ± 0,100	16,6 ± 0,7
6:1	336,5 ± 166,1	1,812 ± 0,720	----
8:1	524,6 ± 305,2	3,241	----
10:1	1896,0 ± 2867,5	3,651	----

Tablo 4.8: 0,1 mg/mL nanopartikül konsantrasyonunda Polimer:TPP (a:a); 4:1 oranında farklı karıştırma hızlarında 1 saat karıştırma ile elde edilen nTGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ formülasyonun özellikleri.

Karıştırma Hızı (rpm)	Boyut (nm) ± SD	PDI ± SD	Zeta Potansiyeli (mV) ± SD
250	266,7 ± 12,2	0,323 ± 0,06	18,3 ± 1,2
500	378,2 ± 31,6	0,532 ± 0,072	20,1 ± 0,75
750	707,8 ± 363,2	0,964 ± 1,533	14,6 ± 3,15
1000	1791,2 ± 364,2	3,629 ± 1,690	9,7 ± 2,77

Tablo 4.9: Polimer:TPP (a:a); 4:1 oranında 250 rpm 1 saat karıştırma ile farklı nanopartikül konsantrasyonlarında elde edilen nTGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ formülasyonun özellikleri.

Nanopartikül Konst. (mg/mL)	Boyut (nm) ± SD	PDI ± SD	Zeta Potansiyeli (mV) ± SD
0,10	204,6 ± 9,2	0,287 ± 0,039	18,5 ± 0,9
0,25	279,9 ± 22,3	0,403 ± 0,069	16,5 ± 0,8
0,50	366,7 ± 35,7	0,564 ± 0,088	17,1 ± 0,4

Tablo 4.10: Ürünlerinin 0,1 mg/mL nanopartikül konsantrasyonunda Polimer:TPP (a:a); 4:1 oranında 250 rpm 1 saat karıştırma ile elde edilen nDChi, nDChi-PA$_{(1:0,25)}$ ve nTGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ formülasyonlarının özellikleri.

	Nanopartikül Konsantrasyonu (mg/mL)					
	0,1			0,25		
	Boyut (nm) ± SD	PDI ± SD	Zeta Potansiyeli (mV) ± SD	Boyut (nm)±SD	PDI ± SD	Zeta Potansiyeli (mV) ± SD
nDChi	45,8 ± 0,8	0,441 ± 0,069	48,2 ± 1,5	56,8 ± 0,1	0,300 ± 0,016	44,1 ± 3,2
nDChi-PA $_{(1:0,25)}$	238,0 ± 37,0	0,481 ± 0,140	20,5 ± 1,8	288,4 ±5,8	0,429 ± 0,063	18,2 ± 2,5
nTGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$	217,4 ± 12,0	0,241 ± 0,050	19,7 ± 0,8	277,4 ± 5,7	0,409 ± 0,049	20,1 ± 1,8

Tablo 4.11: TGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ürününün 0,1 mg/mL nanopartikül konsantrasyonunda Polimer:TPP (a:a); 4:1oranında 250 rpm 1 saat karıştırma ile farklı pH değerlerinde elde edilen nTGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ formülasyonun özellikleri.

pH	Size (nm) ± SD	PDI ± SD	Zeta (mV) ± SD
3,75*	270,3 ± 16,2	0,380 ± 16,2	17,3 ± 3,1
5,00	280,8 ± 16,7	0,502 ± 0,099	4,9 ± 1,8
5,50	693,3 ± 60,4	2,613	----
6,00	1036,7 ± 78,1	10,107	----

Tablo 4.12: 0,1 mg/mL nanopartikül konsantrasyonunda Polimer:TPP (a:a); 4:1oranında 250 rpm 1 saat karıştırma ile farklı etanol miktarlarında elde edilen nTGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ formülasyonun özellikleri.

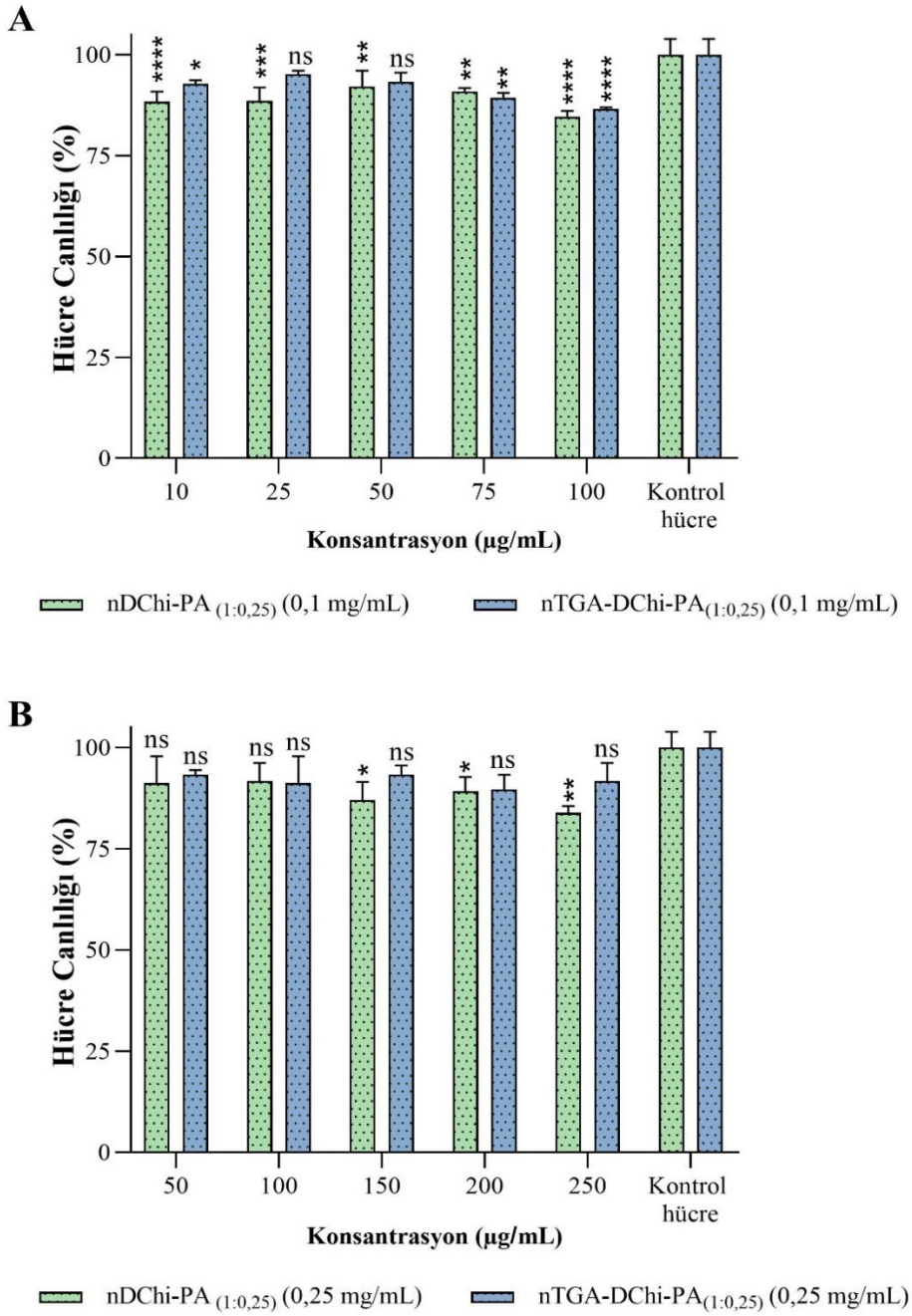
Etanol miktarı (mL)	Size (nm) ± SD	PDI ± SD	Zeta Potansiyeli (mV) ± SD
0		ölçülemedi	
1,00		ölçülemedi	
1,50	2093,4 ±1807,4	4,804	----
1,75	205,3 ± 1,1	0,361	22,0 ± 0,9

Tablo 4.13: 0,1 mg/mL nanopartikül konsantrasyonunda Polimer:TPP (a:a); 4:1 oranında 250 rpm 1 saat karıştırma ile elde edilen nTGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ formülasyonun oda koşullarında stabilitesi.

Süre (gün)	Boyut (nm) ± SD	PDI ± SD	Zeta (mV) ± SD
1.	203,2 ± 18,0	0,350 ± 0,086	15,1 ± 2,2
7.	233,9 ± 20,1	0,352± 0,051	17,2 ± 2,5
15.	771,3 ± 486,1	1,598 ± 1,840	----
21.		aglomerasyon	

4.7. Polimerlerin MTT Yöntemi ile Sitotoksisite Özelliklerinin Belirlenmesi

Deneme 5 ve Deneme 8 ürünlerinden hazırlanan nDChi-PA$_{(1:0,25)}$ ve nTGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ formülasyonların Bölüm 3.6' de anlatılan MTT yöntemi ile *in vitro* sitotoksisite analizi sonuçları Şekil 4.7' de verilmiştir.



Şekil 4.7: nDChi-PA$_{(1:0,25)}$ ve nTGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ürünlerinin A)0,1 mg/mL, B)0,25 mg/mL nanopartikül konsantrasyonlarında HEK293 hücreleri üzerindeki sitotoksisite özellikleri.

4.8. POLİMERLERİN MUKOADEZYON ÖZELLİĞİNİNİNCELENMESİ

4.8.1. DChi, DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ve TGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ Ürünlerinin Mukoadezyon Özelliğinin *Texture* Analizi ile Belirlenmesi

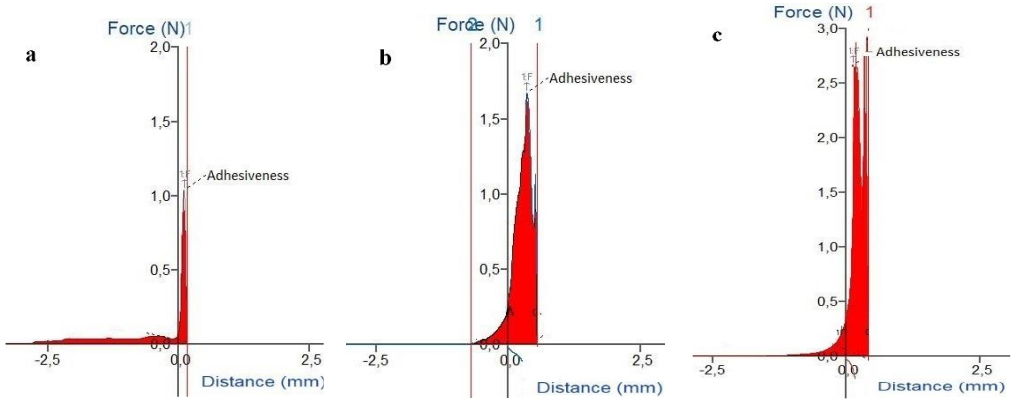
Ürünlerin Bölüm 3.7.1' de anlatıldığı üzere *Texture* analiz yöntemi ile mukoadezyon özellikleri gerçekleştirildi, incelendi ve sonuçlar Tablo 4.14 ve Tablo 4.15' de sunulmuştur.

Tablo 4.14: Ürünlerin koyun nazal mukozal membran üzerine *Texture* analiz sonuçları.

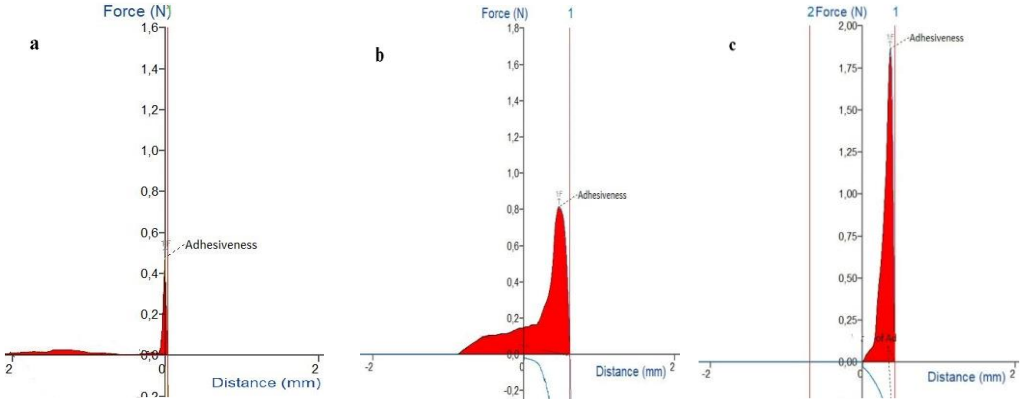
Ürünler	Temas Kuvveti 3 N Temas Süresi 120 sn		Temas Kuvveti 1N Temas Süresi 60 sn	
	Ayrılma Kuvveti ± SD (N)	Ayrılma İşi ± SD (N x mm)	Ayrılma Kuvveti ± SD (N)	Ayrılma İşi ± SD (N x mm)
DChi	1,015 ± 0,303	0,335 ± 0,055	0,410 ± 0,081	0,067 ± 0,016
DChi-PA$_{(1:0,25)}$	1,694± 0,026	0,464 ± 0,190	1,038 ± 0,619	0,299 ± 0,139
TGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$	2,203 ± 1,006	0,641 ± 0,278	1,897 ± 0,517	0,348 ± 0,155

Tablo 4.15: Ürünlerin müsin çözeltisi ile selülöz asetat membran filtre üzerine mukoadezyon özellikleri.

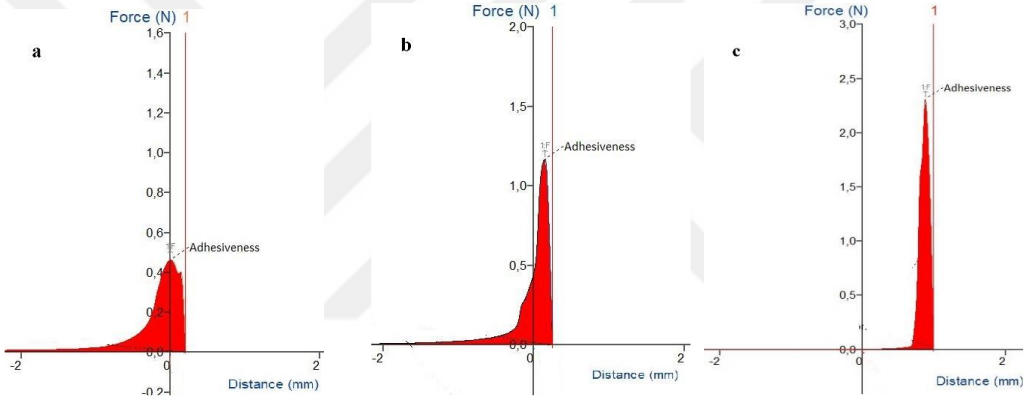
Ürünler	Temas Kuvveti 1 N Temas Süresi 60 sn	
	Ayrılma Kuvveti ± SD (N)	Ayrılma İşi ± SD (N x mm)
DChi	0,436 ± 0,059	0,287 ± 0,019
DChi-PA$_{(1:0,25)}$	1,228 ± 0,126	0,381 ± 0,039
TGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$	1,917 ± 0,525	0,414 ± 0,084



Şekil 4.8: (a); DChi, (b); DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ve (c); TGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ürünlerin nazal doku üzerine 3 N 120 sn çalışma koşullarında Texture analiz ölçüm grafikleri.



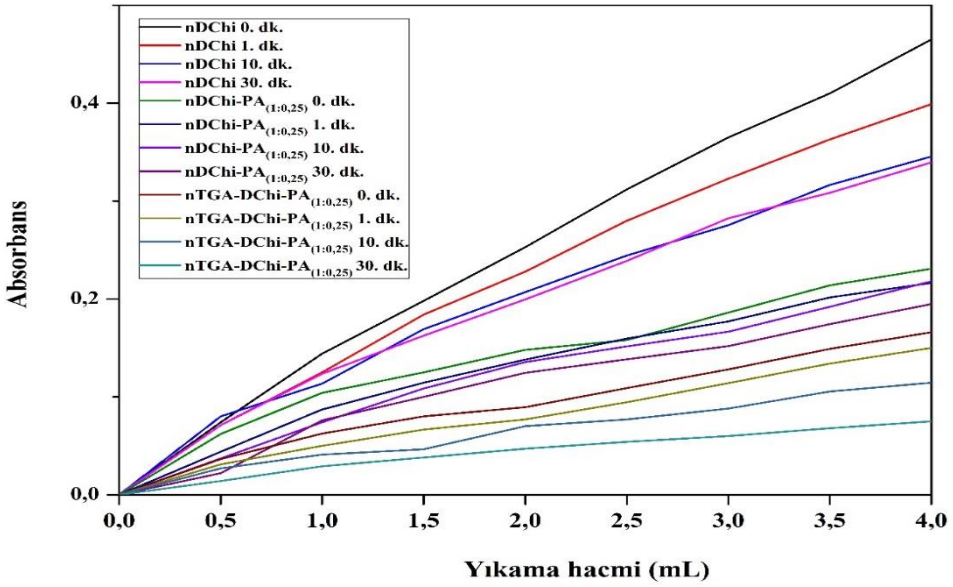
Şekil 4.9: (a); DChi, (b); DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ve (c); TGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ürünlerin nazal doku üzerine 1 N 60 sn çalışma koşullarında *Texture* analiz ölçüm grafikleri.



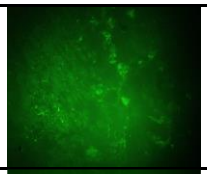
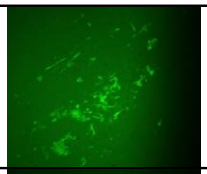
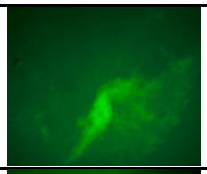
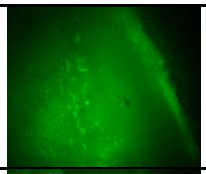
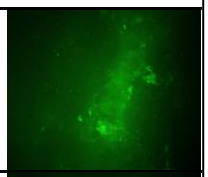
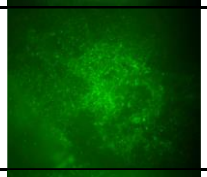
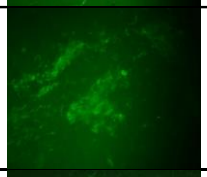
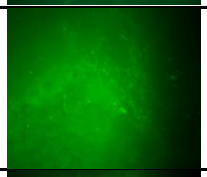
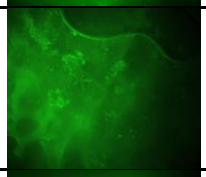
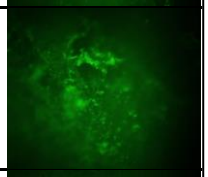
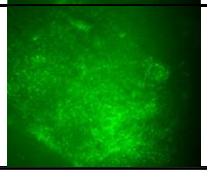
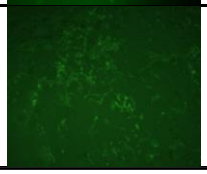
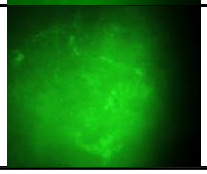
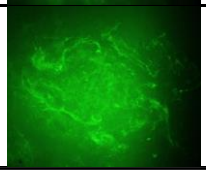
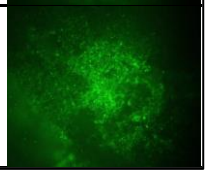
Şekil 4.10: (a); DChi, (b); DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ve (c); TGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ürünlerin musin çözeltisi ile 1 N 60 sn çalışma koşullarında *Texture* analiz ölçüm grafikleri.

4.8.2. nDChi, nDChi-PA$_{(1:0,25)}$ ve nTGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ Sistemlerin Alıkonması/Yıkama Metodu ile Mukoadezyon Özelliğinin İncelenmesi

Bölüm 3.7.2' de belirtildiği gibi FITC ile işaretlenmiş DChi, DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ve TGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ürünlerinin Bölüm 3.5.2' de anlatılan şartlarda nDChi, nDChi-PA$_{(1:0,25)}$ ve nTGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ formülasyonları hazırlandı ve nanopartiküllerin nazal doku üzerinde alıkonması/yıkama metodu ile mukoadezyon özelliği incelendi ve sonuçlar Şekil 4.11' de, floresan özelliğinin tespit edildiği fotoğraflar ise Şekil 4.12' de verilmektedir.



Şekil 4.11: FITC ile işaretlenmiş nDChi, nDChi-PA$_{(1:0,25)}$ ve nTGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ sistemlerin nazal mukozal doku üzerinden yıkama metodu uygulanarak toplanan süpernatantların kümülatif absorbans değerlerine ait grafik.

Ürün	Başlangıç	İnkübasyon Süresi (4 mL Nazal Sıvı ile Yıkama Sonrası)			
		0.dk.	1.dk.	10.dk.	30.dk.
nDChi					
nDChi-PA$_{(1:0,25)}$					
nTGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$					

Şekil 4.12: FITC ile işaretlenmiş nDChi, nDChi-PA$_{(1:0,25)}$ ve nTGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ formülasyonların nazal mukozal doku üzerinde alıkonması/yıkama analizine ait floresan görüntüleri (20X).

5. TARTIŞMA

5.1. ÜRÜNLERİN KARAKTERİZASYONU

5.1.1. FTIR Spektra Değerlendirme

5.1.1.1. Chi ve DChi FTIR spektra

Chi' na ait FT-IR spektra Şekil 4.1.' de ve Bölüm 3.3.1 'de ifade edilen depolimerizasyon reaksiyonuyla elde edilen DChi e ait FTIR spektra ise Şekil 4.4' de görülmektedir. Her iki spektrada incelendiğinde hemen hemen aynı karakteristik absorpsiyon bantlarını sergilediği açıktır; Bunlara ilişkin bantlar ve ilgili olduğu gruplar/bağlar vb. bilgiler aşağıda sunulmuştur:

- ✓ 3508-3300 cm^{-1} bölgesinde primer amin grupları N-H bağı gerilme titreşimlerinden ileri gelen bant, 3394-3350 cm^{-1} bölgesinde piranoz halkadaki metilol grubunun O-H grupları gerilme titreşimlerinden ileri gelen bant ile girişimli olarak 3430 cm^{-1}' da görülmektedir,

- ✓ Asetil amid yapıdaki NH_2 gerilme titreşimlerinden ileri gelen absorbsiyon bantı 2920 cm^{-1}' de ve piranoz halkadaki CH_2 gruplarının C-H bağı simetrik/asimetrik bükülme bantı ve CH_2 gerilme titreşimlerinden ileri gelen bantı ise 2883 cm^{-1}' de görülmektedir,

- ✓ Asetil amid yapının Amid I C=O bağı gerilme titreşiminden ileri gelen ve 1650-1580 cm^{-1} aralığında görülen primer amin grupları N-H bağı deformasyon titreşimlerinden ileri gelen bant ile girişimli olarak tepeleri 1650 cm^{-1} (Şekil 4.1) ve 1648 cm^{-1} de (Şekil 4.4) görülmektedir,

- ✓ Primer amin grupları NH_2 bükülme ve N-H bağı deformasyon titreşimlerinden ileri gelen bant 1591 cm^{-1} de ufak pik olarak 1557 cm^{-1}' e kadar yaygın omuz halinde görülmektedir,

- ✓ Piranoz halkadaki metilol gruplarına ait 1480-1410 cm^{-1} bölgesinde görülen CH_2 grupları deformasyon titreşimlerine, 1390-1280 cm^{-1} bölgesinde görülen CH_2 grupları sallanma titreşimlerine, 1430-1370 cm^{-1} bölgesinde görülen CH-OH bağları gerilme titreşimlerine ait bantlar tepeleri 1420 cm^{-1}, 1380 cm^{-1} ve 1320 cm^{-1} lerde olan bantlar

olarak görülmekte olup asetil amiddeki CH_3 grupları gerilme titreşimi ve amid yapının N-H ve C-N bağlarına ait gerilme titreşimleri ile girişimli olarak görülmektedir,

- ✓ 1200-1000 cm^{-1} bölgesinde görülen metilol grubu C-O bağı gerilme titreşimlerine ait bantın tepesi 1200 cm^{-1}' de görülmektedir,

- ✓ Piranoz halka yapısındaki -CH_2 gruplarına ait gerilme titreşimlerinden ileri gelen bant 1260 cm^{-1}' de, C-O bağları ve C-O-C köprülerinin asimetrik/simetrik gerilme titreşimlerine ait bantlar ~1160-955 cm^{-1} aralığında tepeleri 1152, 1075 ve 1033 cm^{-1}' deki bantlar olarak görülmektedir. Ayrıca primer amin gruplarındaki C-N bağları gerilme titreşimlerine ait bantlar ise 1090-1020 cm^{-1} bölgesinde şiddetli bantlar halinde ve bu bölgedeki diğer bantlar ile girişimli olarak bulunmaktadır.

Sonuç olarak depolimerizasyon reaksiyonu ile elde edilen DChi ile Chi' nın molekül yapısının aynı olduğu, başka deyişle Chi' nın ortalama molekül ağırlığının düşmesiyle moleküler yapısında herhangi bir değişim olmadığı FTIR spektra değerlendirmesiyle doğrulandı.

5.1.1.2. Chi-PA Ürünlerinin FTIR Spektra

Palmitik asitin Chi moleküler yapısına konjugasyonu ile PA' in COOH gruplarının Chi' nın yapısında bulunan primer amin grupları ile amidasyon reaksiyonuna girerek amid bağlarının oluşması beklenmektedir. Şekil 4.1' de farklı oranlarda palmitik asit kullanılarak sentezlenen Chi-PA ürünlerinin FTIR spektrası görülmektedir. Tüm spektra karşılaştırıldığında hemen hemen aynı karakteristik absorpsiyon bantlarının bulunduğu görülmektedir. Bununla birlikte, beklenildiği gibi sentezde kullanılan PA miktarına bağlı olarak bazı bantların şiddetlerinin farklı olması, tepelerinin ise yakın dalga sayılarına kaymış olması da beklenilen bir durumdur. Bu bağlamda seçilen ürün DChi-$PA_{(1:0,25)}$ FTIR spektrasında (Şekil 4.4) bulunan absorbsiyon bantları ve ilgili titreşimler aşağıda belirtilmiştir.

- ✓ Beklenilen reaksiyon sonucu oluşan sekonder amid bağının yapısındaki Amid II N-H bağı gerilme titreşimlerine ait bant 3460-3300 cm^{-1} bölgesinde keskin bant olarak görülmekte olup Chi'nın yapısındaki 3430 cm^{-1}' de görülen primer amin gruplarının N-H bağları ve metilol grubundaki O-H grupları gerilme titreşimlerine ait bantlar ile 3420 cm^{-1}' de diğerleriyle girişimli olarak yaygın ve o bölgenin şiddetini arttırmış olarak görülmektedir,

- ✓ PA yapısındaki uzun zincirli alkil grubu 3000-2800 cm^{-1} bölgesinde CH_3 grubundaki -C-H bağları asimetrik gerilme titreşimlerine ait ve -CH_2- grubuna bağlı asim./sim. C-H bağları gerilme titreşimlerine ait bantlar ise tepesi 2920 cm^{-1}' de ve 2854/ 2852 cm^{-1}'de görülmektedir,

- ✓ Tepeleri 1710/1713 cm^{-1}(Şekil 4.1 ve Şekil 4.4)'de bulunan sekonder amid yapılardaki 1710-1695 cm^{-1} bölgesinde gözlemlenen Amid I (C=O) gerilme titreşimlerine ait bant omuz şeklinde görülmektedir,

- ✓ Amid I C=O gerilme titreşimlerine ait bant tepeleri 1650 cm^{-1} (Şekil 4.1 ve Şekil 4.4) dalga sayılarında ve oluşan yeni amid bağları sebebiyle şiddeti artmış olarak görülmekte olup Chi'nın yapısındaki asetil amid gruplarından dolayı gözlemlenen Amid I C=O gerilme titreşimi ile girişimli olarak bulunmaktadır

- ✓ Amid II N-H deformasyon titreşimlerine ait bant keskin uzun bant olarak tepesi 1582/1564 cm^{-1}' de (Şekil 4.1 ve Şekil 4.4) görülmektedir,

- ✓ 1485-1445 cm^{-1} bölgesinde alkil zincir yapısının –$(CH_2)_n$ grubuna ait C-H bağı deformasyon titreşimlerine ait bant 1468 cm^{-1}' de görülmektedir,

- ✓ 1416 cm^{-1}, 1380 cm^{-1} ve 1320 cm^{-1}'de (Şekil 4.4) Chi' nın serbest metilol grubundan kaynaklanan CH-OH bağları gerilme titreşimlerine ait bantlar ve 1198 cm^{-1} de C-O bağı gerilme titreşimine, PA yapısındaki CH_2 grupları bükülme/makaslama titreşimlerine ait bant, CH_3 gruplarındaki -C-H bağlarının asim. bükülme titreşimlerine, -C-H bağlarının sim. bükülme/deformasyon titreşimlerine ve CH_2 gruplarındaki -C-H bağlarının bükülme/sallanma titreşimlerine ait bantlar ile girişimli olarak ve bant şiddetlerinde bir azalma olmadan bulunmaktadırlar,

- ✓ 1350-1310 cm^{-1} ve 1305-1200 cm^{-1} bölgelerinde görülen Amid III (C-N) gerilme titreşimlerine ait bant tepeleri 1317 cm^{-1} ve 1260 cm^{-1} de görülmekte (Şekil 4.4), Chi' nın piranoz halkasında bulunan -CH_2- gruplarının gerilme titreşimlerine ait bant ise 1260 cm^{-1} de girişimli halde titreşimi artmış olarak görülmektedir,

- ✓ Sekonder amid yapılarında görülen Amid V N-H deformasyon bantı 720 cm^{-1} değerinde görülmekte olup bu bölgede gözlemlenen PA zincir yapısındaki C-H bağları gerilme ve

-$(CH_2)_n$ grupları sallanma titreşimlerine ait bantlar ile girişimli olarak uzamış ve genişlemiş halde görülmektedir,

Sonuç olarak oluşan yeni amid bağlarına ait karakteristik bant değerleri 1650 $cm^{-1'}$ de Amid I C=O gerilme titreşimlerine ait şiddetli absorpsiyon bantı olarak, Chi' nın yapısındaki serbest primer amin NH_2 gruplarının bükülme ve N-H deformasyon titreşimlerine ait bant 1591 cm^{-1} de ufak pik olarak 1557 $cm^{-1'}$ e kadar yaygın omuz halinde görülmekteyken (Şekil 4.1 ve Şekil 4.4) serbest aminlerin COOH grubuna katılmasıyla şiddetleri belirgin bir şekilde azalmış olarak ve Şekil 4.1' de 1582 cm^{-1} ve Şekil 4.4' da 1564 cm^{-1}' de Amid II N-H deformasyon titreşimlerine ait bant ile girişimli olarak hafif omuz halinde ortaya çıkmakta ve ayrıca 1711-1700 cm^{-1} bölgesinde görülen PA' in COOH grubunun karakteristik C=O bağı gerilme titreşimlerine ait bant Şekil 4.2' de 1704 cm^{-1} 'de görülen Şekil 4.1 ve Şekil 4.4 incelendiğinde bu pikin kaybolduğu görülmesi reaksiyonun COOH grubu üzerinden amidasyon şeklinde gerçekleştiğini doğrulamaktadır. Ayrıca FTIR spektradaki Chi' nın metilol gruplarına ait karakteristik bant değerleri ve şiddetleri göz önüne alındığında metilol grubunun OH grubu ile PA' in COOH grupları arasında herhangi bir reaksiyon gerçekleşmediği de doğrulanmıştır.

5.1.1.3. Tiyollenmiş ürün TGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ FTIR Spektra

Bölüm 3.3.3' de anlatıldığı şekilde sentezlenen TGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$-ürününe ait FTIR spektra Şekil 4.4' da görülmekte olup, karakteristik absorpsiyon bantları aşağıda verilmiştir:

- ✓ TGA' in molekül yapısında bulunan CH_2-SH grubunun 2985-2835 cm^{-1} bölgesinde görülen asim. CH_2 gruplarının gerilme titreşimlerine ait bant 2958 cm^{-1} de görülmektedir, -SH grupları gerilme titreşimlerine ait bant ise 2600-2535 cm^{-1} bölgesinde görülmekte olup TGA' in DChi-PA$_{(1:0,25)}$ yapısına katılmasıyla Şekil 4.4' deki spektrada 2560 cm^{-1}' de çanak şeklinde yaygın absorpsiyon bantı olarak görülmektedir,

- ✓ 1730-1715 cm^{-1} aralığında görülen ester yapı C=O bağına ait gerilme titreşimlerinden ileri gelen absorpsiyon bantı 1718 cm^{-1}' de görülmekte olup DChi-PA$_{(1:0,25)}$' ya ait spektrada tepesi 1713 cm^{-1}'de görülen sekonder amid yapılardaki 1710-1695 cm^{-1} bölgesinde gözlemlenen Amid I (C=O) gerilme titreşimlerine ile bant ile girişimli olarak keskin tepeli omuz şeklinde görülmektedir,

- ✓ 1650-1550 cm^{-1} bölgesinde serbest primer amin gruplarındaki N-H bağları deformasyon titreşimlerine ait bant TGA-DChi-$PA_{(1:0,25)}$ ait spektrada 1634 cm^{-1}' de Chi' nın yapısındaki serbest primer amin gruplarındaki N-H bağlarına ait deformasyon titreşimlerinden ileri gelen bant, Chi' nın asetil amid grubundan ve DChi-$PA_{(1:0,25)}$ ürünündeki amid bağının yapısından kaynaklı Amid I C=O gerilme titreşimlerine ait bantlar ile girişimli olarak görülmektedir,

- ✓ 1575-1515 cm^{-1} bölgesinde görülen Amid II N-H deformasyon titreşimlerine ait bat 1573 cm^{-1}' de görülmektedir,

- ✓ Chi' deki piranoz halkadaki metilol gruplarına ait CH_2 gruplarından ileri gelen deformasyon titreşimleri, CH-OH gruplarının gerilme titreşimlerine ait bantlar Chi için 1420 cm^{-1}' de DChi-$PA_{(1:0,25)}$ için ise 1416 cm^{-1}' de ve 1198 cm^{-1}' de görülen C-O bağları gerilme titreşimlerine ait bantlar kaybolmuş ve/veya şiddetleri çok azalmış olarak bulunmaktadır. Ayrıca 1380 cm^{-1}' de, Chi için 1320 cm^{-1}' de, DChi-$PA_{(1:0,25)}$ için ise 1317 cm^{-1}' deki absorpsiyon bantlarının ise titreşimi azalmış olarak TGA-DChi-$PA_{(1:0,25)}$ ürününe ait spektrada 1319 cm^{-1}' de görülmektedir ayrıca 1319 cm^{-1}' de görülen abrsorbsiyon bantı ile Amid III (C-N) gerilme titreşimlerine ait bant ve 1382 cm^{-1}' de görülen absorpsiyon bantı ile amid yapının N-H ve C-N bağlarına ait gerilme titreşim bantları girişimli olarak bulunmaktadır,

- ✓ CH_2-SH yapısının 1460-1410 cm^{-1} bölgesinde görülen CH_2 deformasyon ve makaslama titreşimlerine ait bantlar yaygın omuz şeklinde ~1410 cm-^{1}' de görülmektedir, 1305-1215 cm^{-1} bölgesinde görülen CH_2 gruplarına ait sallanma titreşimlerinden ileri gelen bant 1239 cm^{-1}' de görülmektedir,

- ✓ Tiyollenme reaksiyonu oluşan ester bağı yapısının 1300-1050 cm^{-1} aralığında görülen C-O-C gerilme titreşimlerine ait bantı 1239 cm^{-1} ve 1153 cm^{-1}' de 1305-1200 cm^{-1} bölgesinde görülen Amid III (C-N) gerilme titreşimlerine ait bantı ve Chi' nın piranoz halkasında bulunan -CH_2- grupları gerilme titreşimlerine ait bant ile girişimli olarak görülmektedir.

- ✓ Chi ve DChi-$PA_{(1:0,25)}$ spektrasında 950 cm^{-1}' de görülen piranoz halka yapısından kaynaklı küçük omuzun TGA-DChi-$PA_{(1:0,25)}$ ürünü spektrasında 948 cm^{-1}' de tepe

yaparak küçük bant olarak ortaya çıkması -SH gruplarının gerilme titreşimlerinden kaynaklandığı açıkça göstermektedir.

Sonuç olarak Şekil 4.4' da TGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ürününe ait spektra değerlendirildiğinde TGA bileşiğinin moleküler yapısında bulunan -SH grubuna ait karakteristik bantların ortaya çıktığı, COOH grubunun ise Chi' nın serbest metilol grubundaki -OH grupları ile reaksiyona girmesinden dolayı oluşan ester bağ yapısına ait absorpsiyon bantlarının da ortaya çıktığı ve beklenildiği gibi metilol gruplarına ait bantların kaybolduğu ve/veya şiddetinde çok azalma olduğu dolayısıyla reaksiyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştiği doğrulanmıştır. Ayrıca DChi-PA$_{(1:0,25)}$ molekülündeki amid bağlarına ait bantlar ile alkil zincirlerine ait 2920 cm^{-1} ve 2852 cm^{-1}' de görülen bantların varlığının da korunduğu görülmektedir. Böylece yapıda herhangi bir bozulma yönünde bir değişikliğin de olmadığı, başka deyişle hem DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ürününün temel yapısının korunduğu hem de yapıya serbest -SH grubunun katılmasının da sağlandığı doğrulanmıştır.

5.1.2. ^{1}H-NMR Analiz Sonucunun Değerlendirilmesi

DChi ve DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ürünlerinin yapılarının aydınlatılması ^{1}H-NMR analizi gerçekleştirildi (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6).

Şekil 4.5 DChi ürününe ait ^{1}H-NMR spektra değerleri;

(500 MHz, CD_3OD) [ppm]: δ=1.95 (m, metil (-NHCOC**H**$_3$-), 3.06 (t, -O-CH-C**H**-NH$_2$), 3.40-3.80 (dd, ddd, (OH-C**H**$_2$-CH-), (-O-C**H**-CH$_2$-OH), (-CH-C**H**$_2$-OH), (-CH-O-C**H**-CH-CH$_2$-OH)), 4.49 (m, (OH-C**H**-O-), (-O-C**H**-O-).

Şekil 4.6 DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ürününe ait ^{1}H-NMR spektra değerleri;

(500 MHz, CD_3OD) [ppm]: δ=1.28 (s, C**H**$_3$-(C**H**$_2$)$_{11}$-C**H**$_2$-), 2.06 (d,-CH$_2$-(C**H**$_2$)$_2$-C=O, 3.17 (-CH-C**H**-NH$_2$), (-CH-C**H**-NH-), 3.72-3.90 (m, (OH-C**H**-CH-), (-O-CH-C**H**$_2$-OH), 4.77-5.07 (s, OH-C**H**-CH-), d, (-O-C**H**-O-)).

Şekil 4.5 ve Şekil 4.6 spektra değerlendirilmesi neticesinde kitosan yapısına palmitik asit katılma reaksiyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiği doğrulandı. DD %81,4, modifikasyon oranı %13,09 ve modifikasyon reaksiyonu verimi ise %52,4 olarak hesaplanmıştır.

5.1.3. GPC-SEC Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Chi ve DChi ürünlerinin ortalama molekül ağırlığı tayinleri Bölüm 3.4.3' de ifade edildiği şekilde GPC-SEC sistemi kullanılarak tayin edildi. Analiz sonuçlarına göre (Tablo 4.1) Chi için M_n değeri 103,1 kDa, M_w değeri 268,3 kDa PDI değeri ise 2,601'dir. DChi için ise M_n 8,3 kDa, M_w 10,7 kDa ve PDI değeri ise 1,286'dir. Chi molekülünün depolimerizasyonu ile beklenildiği gibi ortalama molekül ağırlığında düşme gerçekleşirken PDI değerinin 2,601' den 1,286' e kadar düşmüş olması da DChi' nin moleküler yapısının homodispers olduğunu göstermektedir.

5.1.4. Tiyollenmiş Ürünlerin Tiyol Grubu Tayini

TGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ yapısına katılan tiyol grupları miktarının hesaplanması Bölüm 3.4.4' de anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. Chi' a TGA konjugasyon reaksiyonu kaynaklarda belirtildiği [9] üzere moleküle en yüksek tiyol grubu katılmasının sağlandığı koşullarda (azot atmosferinde, pH değerinin 5 olduğu çözücü ortamında) gerçekleştirildi. DChi kitosan yapısına katılan serbest -SH grubunun miktarı iyodimetrik titrasyon yöntemi ile tayin edilerek Denklem (3.1) 'de belirtilen formül kullanılarak 90,1 µmol/ g polimer olarak hesaplandı (Tablo 4.2).

5.1.5. Ürünlerin Çözünürlük Davranışlarının Değerlendirilmesi

Chi ve Chi-PA$_{(1:0,50-1:0,25-1:0,10-1:0,05)}$, DChi-PA$_{(1:0,25)}$, TGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ modifiye ürünlerin çözünürlük davranışlarını incelemek için yapılan denemeler Bölüm 3.4.5' de anlatıldığı gibi 1 mg/mL konsantrasyonlarda farklı çözücüler kullanılarak gerçekleştirildi. Tablo 4.3' değerlendirildiğinde Chi' nın asidik ortamda amin gruplarının protonlanmasıyla çözünme gerçekleşirken yapıya PA gibi hidrofobik özellik gösteren alkil zincirinin katılması neticesinde beklenildiği gibi çözünme davranışının değiştiği görüldü. PA modifikasyonu sonucu oluşan yeni yapı farklı oranlardaki % aa (%h/h) çözeltisinde çözünmemekte dispers bir karışım halinde elde edilmekte olup % 1 aa (%h/h) çözücü ortamında elde edilen dispers karışıma eşit hacimde etanol ilavesiyle DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ve TGA- DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ürünlerinde çözünmenin gerçekleştiği görüldü.

5.2. Ürünlerin Nanopartiküler Sistemlerinin Elde Edilmesi İçin Yapılan Optimizasyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Bir nanopartiküler sistemin fizikokimyasal karakteristiklerini ifade eden partikül boyutu (nm), PDI ve zeta potansiyeli (mV) ilaç taşıyıcı olarak kullanılabilirliğini ve etkinliğini belirlemek için en önemli kriterlerdir. Bu fizikokimyasal özellikleri aynı zamanda hücre içine

alım davranışını, kan dolaşım sisteminde kalma süresini, enkapsülasyon etkinliğini, ilaç salım davranışını, toksik etkisini ve biyoyararlanımını etkilemektedir [157,195]. Bu tez çalışmasında Chi için yaygın olarak tercih edilen yöntemlerden biri olan iyonik jelasyon yöntemi ile çapraz bağlayıcı olarak TPP varlığında Bölüm 3.5.2' de anlatıldığı şekilde nanopartikül formülasyonları hazırlandı.

5.2.1. Ultrasonikasyon Yönteminin Değerlendirilmesi

Chi' ın yapısına hidrofobiklik özellik kazandırmak için PA ile modifikasyon durumunda self-assembly nanoyapı oluşturabildiği düşünülerek ultrasonikasyon yöntemi ile nanomisellerin elde edilmesi amaçlandı. Bölüm 3.5.1' de anlatıldığı şekilde ürün %1 aa (%h/h) içerisinde dispers edildi ve yağ fazı olarak farklı miktarlarda DCM ilavesi ve farklı ultrasonikasyon şartlarında (süre, genlik, titreşim) yapılan denemeler neticesinde Tablo 4.4, 4.5 ve 4.6' da görüldüğü gibi nano boyutta partikül değerlerine ulaşılamamıştır.

5.2.2. İyonik Jelasyon Yönteminin Değerlendirilmesi

Bölüm 3.5.2' de ifade edildiği gibi ürünlerin nanoformülasyonlarının elde edilmesi için TPP kullanılarak iyonik jelasyon yöntemi uygulandı. Tablo 4.7' de belirtildiği gibi nTGA-DChi-$PA_{(1:0,25)}$ formülasyonu için 0,1 mg/mL nanopartikül konsantrasyonunda 1 saat 250 rpm hızla karıştırılarak farklı Polimer:TPP (a:a) oranlarının etkisi incelendi. Kabul edilebilir nanopartikül özelliklerinin elde edilebilmesi için bu oranın etkisinin önemli olduğu görüldü. Şöyle ki, Polimer:TPP (a:a) oranı 4:1 den küçük ve 5:1 den büyük olduğunda partikül boyutlarının büyüdüğü ve zeta potansiyeli değerinin çok küçüldüğü/ ölçülemediği görüldü. Kaynaklarda belirtildiği üzere [103,196,197] iyonik jelasyon yöntemi ile stabil pozitif yüklü nanopartikül sistemlerin oluşmasındaki temel prensip başarılı bir jelasyonun olması başka deyişle iyonik çapraz bağlanmanın meydana gelmesidir. Bu bağlamda gerekli etkileşim Chi molekülündeki pozitif yüklü amin grupları ($-NH_3^+$) ile TPP bileşiğinin negatif yüklü fosfat grupları arasında meydana geldiğinden partikül büyüklüğünün nano boyuttan mikrona kadar değişen boyut değerleri arasında kontrol edilmesi için ortamda belirli miktarda bir NH_2/PO_4 oranının bulunması gerekmektedir. Polimer:TPP (a:a) oranı 4:1' den küçük olduğunda partikül boyutlarının çok büyüdüğü, agregatların floküle olduğu dolayısıyla stabil bir süspansiyon elde edilemeyip aglomerasyonun meydana geldiği buna bağlı olarak da zeta potansiyelinin hızla azaldığı da ifade edilmiştir. Bununla birlikte Polimer:TPP (a:a) oranı 6:1' den büyük olduğunda ise dispersiyon ortamında büyük polimer zincirleri bulunacağından partikül boyutlarında büyümenin meydana geldiği de belirtilmektedir. İyonik jelasyonun başarısını etkileyen diğer

bir faktörün de pozitif yüklü nanopartiküllerden doğan elektrostatik itmenin olduğu göz ardı edilmemelidir. Bu çalışmada, çalışmanın amacına uygun kabul edilebilir değerler Polimer:TPP (a:a) oranının 4:1 olduğu durumda partikül boyutu 234,4 nm ± 10,3, PDI değeri 0,310± 0,060 ve zeta potansiyel değerin ise 18,4 mV ± 1,80 olarak elde edildi. Nitekim Polimer:TPP (a:a) oranı 5:1 ve üzeri olduğunda ise parçacık büyüklüğünün arttığı zeta potansiyelinin ise ölçülemediği görüldü (Tablo 4.7). Sonuç olarak bu çalışmada nanoformülasyonların elde edilmesinde Polimer:TPP (a:a) oranının sistemin karakteristiklerine etkisi ve elde edilen bu değerlerin kaynaklarda belirtilen çalışmalardaki sonuçlarla uyumlu olduğu görüldü [103,196–199].

Tablo 4.8' de belirtildiği gibi nTGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ formülasyonun hazırlanmasında kullanılan 250-500-750-1000 rpm karıştırma hızlarının partikül boyutuna etkisi değerlendirildiğinde hızdaki artış ile partikül boyutunda artış görülmekle birlikte formülasyon homodispers yapıdan uzaklaşıp heterodispers bir yapıya dönmektedir. Nanopartikül konsantrasyonun partikül boyutu üzerine etkisi incelendiğinde kaynaklarda da belirtildiği gibi [198] konsantrasyonun artması ile partikül boyutunda beklenen artış görülmüş olup en düşük konsantrasyonda (0,1 mg/mL) partikül boyutu 204,6 nm ± 9,2, PDI değeri 0,287 ± 0,039 ve zeta potansiyel değeri ise 18,5 mV ± 0,9 olarak bulundu (Tablo 4.9). nTGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ formülasyonu ortam pH değeri 3.75' ten 5,0' a yükseltiğinde partikül boyutunda anlamlı bir değişiklik gözlemlenmezken heterodispers bir formülasyon elde edildi. Bunun yanında zeta potansiyeli değeri ise pH değerinin artmasıyla beklenildiği gibi katyonik yük yoğunluğunun azalmasından dolayı 4.9 mV ± 1.8' e düşmektedir (Tablo 4.11). Modifiye ürünler DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ve TGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ile modifiye olmamış DChi' den hazırlanan nDChi, nDChi-PA$_{(1:0,25)}$ ve nTGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ formülasyonlar karşılaştırıldığında partikül boyutu ~ 45 nm' den 238 nm değerlere ulaşmakta zeta potansiyeli ise ~ 48 mV' dan ~18 mV değerine kadar düştüğü görüldü (Tablo 4.10).

TGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ürününün hacimce eşit oranlarda %1 aa (%h/h) ve etanol karışımından oluşan çözücüde çözünmesiyle hazırlanan çözeltiden nTGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ formülasyonun partikül boyutuna etki eden faktörlerden birisinin etanol miktarının olduğu (Tablo 4.12) görüldü. Sonuç olarak ortama 1,75 mL' den az etanol ilavesinin aglomerasyona neden olduğu sonucuna varıldı.

5.2.3. nTGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ Formülasyonun Stabilitesinin Değerlendirilmesi

nTGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ formülasyonun stabilitesi Bölüm 3.5.2.3' de anlatıldığı gibi oda koşullarında 1., 7., 15. ve 21.günlerdeki karakteristiklerinin incelenmesiyle değerlendirildi ve Tablo 4.13' de verilen ölçüm değerleri göz önüne alındığında nanoformülasyonların 1 hafta süre ile stabilitesini koruduğu görüldü. Her ne kadar nTGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ formülasyon stabilitesini 1 hafta boyunca korumuş olsa da (Tablo 4.13) ürünün moleküler yapısında hem serbest -SH gruplarının hem de ester bağlarının bulunması, bu grupların /bağların nanopartikül formülasyonunun hazırlanması koşullarında hidrolizlenerek ayrışabileceği ihtimali de göz önünde bulundurularak tez kapsamında yapılan tüm çalışmalar taze hazırlanmış/1.gün nanopartikül formülasyonları kullanılarak gerçekleştirildi.

5.3. *In Vitro* Sitotoksisite Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Nanopartiküler sistemler etken maddenin biyoyararlanımını arttırmak amacıyla ilaç taşıyıcı sistemler olarak tercih edilirken biyopolimerinin ve nanopartikül formülasyonun toksik özellik göstermemesi istenmektedir. Bu amaçla toksik olmayan nanopartiküler formülasyonların hazırlanması ve ilaç taşıma sistemi olarak uygun olup olmadığının belirlenmesi diğer bir ifadeyle biyouyumluluğunun karakterize edilmesi önem arz etmektedir. Hazırlanan biyopolimer ürünlerinin nanopartiküler formülasyonlarının biyouyumluluğunu ifade eden toksik etkisi sitotoksisite analiz yöntemi kullanılarak değerlendirilmektedir [200].

Bu tez kapsamında hazırlanan nanopartiküler formülasyonların biyouyumluluk özelliğinin belirlenmesi Bölüm 3.6' da anlatıldığı gibi *in vitro* sitotoksisite (MTT) analiz yöntemi uygulanarak değerlendirildi. nDChi-PA$_{(1:0,25)}$ ve nTGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ formülasyonlarının 0,1 mg/mL ve 0,25 mg/mL konsantrasyonların toksik etkisi HEK293 hücre hattı üzerinde 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 µg/mL konsantrasyonlarda incelendi. Şekil 4.7' da görüldüğü gibi DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ve TGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ modifiye ürünlerin tüm konsantrasyonları için hücre canlılığı 4 saat sonunda %75 üzerinde olduğu görülmekte olup nTGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ formülasyonun HEK293 hücreleri üzerine önemli bir toksik etkisinin olmadığı görüldü. Ayrıca bu sonuçlar ile farmasötik alanda düşük toksik etki gösterdiği için birçok ilaç formülasyonunda çözücü olarak kullanılan etanolün nanopartikül formülasyonumuzda bulunmasının hücre canlılığına olumsuz yönde önemli bir etkisi olmadığı da doğrulandı [201–203]. Şekil 4.7 incelendiğinde tüm konsantrasyonlar için nTGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ formülasyonun nDChi-PA$_{(1:0,25)}$ formülasyonuna kıyasla daha az toksik etki gösterdiği

ayrıca konsantrasyon artışı ile toksik etkisinde bir artışın olmadığı da belirlendi. Polimerin yapısındaki tiyol grubu varlığı hücre canlılığı üzerine olumlu etki gösterdiği belirtilmekle birlikte bizim çalışmamızda bu durum gözlemlenmekte olup tiyollenmiş yapının tiyol grubu içermeyen ürüne göre daha az toksik olduğu da doğrulandı [201,202].

5.4. Ürünlerin Mukoadezyon Özelliklerinin Değerlendirilmesi

Bölüm 3.7' de anlatıldığı şekilde koyun nazal mukozal membran hazırlanarak *ex vivo* ve *in vitro* analizler DChi, DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ve TGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ürünleri ile gerçekleştirildi.

5.4.1. *Texture* Analiz Yöntemi

Bölüm 3.7.1' de belirtildiği gibi ürünlerin tablet haline getirilmiş formları ile *Texture* analiz cihazı ile *ex vivo* koyun nazal mukozal membran ve *in vitro* 0,20 µm selüloz asetat membran filtre üzerine iki ayrı uygulama ile ürünlerin mukoadezif özellikleri değerlendirildi.

Ex vivo nazal mukozal membran doku üzerinde gerçekleştirilen analiz 3N ve 1N olarak iki farklı kuvvet altında 120 sn ve 60 sn süre boyunca ürünlerin tablet formu doku ile temas ettirildi ve 3N ve 120 sn koşullarda TGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ürünü için en yüksek ayrılma kuvveti 2,203 ± 1,006 N ve ayrılma işi 0,641 ± 0,278 N x mm olarak elde edildi (Şekil 4.8). Uygulama kuvveti 1N ve temas süresi 60 sn' ye düşürüldüğünde ise en yüksek değer yine tiyollenmiş kitosan TGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ürününde elde edilirken ayrılma kuvveti 1,897 ± 0,517 N ve ayrılma işi 0,348 ± 0,155 N x mm olarak elde edildi (Tablo 4.14).

1N ve 60 sn koşullarında DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ve TGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ürünlerin DChi ye göre ayrılma kuvvet ölçümleri değerlendirildiğinde (Tablo 4.14, Şekil 4.9); DChi-PA$_{(1:0,25)}$ için 1,53 kat, TGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ için ise 3,63 kat artış elde edildi. Ayrılma işi olarak değerlendirildiğinde ise DChi' ye göre DChi-PA$_{(1:0,25)}$ için 3,44 kat artış ve TGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ için ise 4,17 kat artış olduğu açıktır.

In vitro selülöz asetat membran filtre kullanılarak mukoadezyon özelliği 1N ve 60 sn koşullarında incelendiğinde (Tablo 4.15 ve Şekil 4.10); en yüksek mukoadeziflik özellik TGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ürün için elde edilirken DChi ye göre ayrılma kuvvetinde ve ayrılma işinde sırasıyla DChi-PA$_{(1:0,25)}$ için 1,82 kat ve 0,33 kat artış, TGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ürünü için ise 3,40 kat ve 0,44 kat artış olduğu görüldü.

Sonuç olarak nazal membran doku veya selüloz asetat membran müsin çözeltisi ile çalışıldığında her iki durumda da tez kapsamında öngörülen en yüksek mukoadezif özellik davranışının tiyollenmiş TGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ürünün gösterdiği aşikardır. Ayrıca hidrofobikliği arttırılmış DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ürününün de moleküler yapısında PA gruplarının yer almasından dolayı DChi' ye kıyasla mukoadeziflik özelliğinde önemli bir iyileşme görülmektedir. Bu durum başlıca iki nedenle ortaya çıkmaktadır: birincisi PA yapısındaki alkil zincirlerin mukus yapısındaki lipitlerle hidrofobik etkileşimin etkisi olarak açıklanırken diğeri ise molekül yapısına serbest tiyol (-SH) grubunun katılmasıyla sisteince zengin yapıdaki mukus glikoproteinleri ile aralarında disülfit bağı üzerinden kuvvetli kovalent bağ oluşturmasıdır. Böylece, mukoadezyonun artmasını sağladığı açıkça görülmektedir [6,74,74,80].

5.4.2. Mukozal Membran Yüzeyinde Nanopartikül Sistemin Alıkonması/Yıkama Metodu

Bölüm 3.7' de ifade edildiği gibi *ex vivo* koyun nazal mukozal membran üzerine yapılan çalışma Bölüm 3.7.2' de belirtildiği gibi DChi, DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ve TGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ürünlerin yapısına floresan özelliğe sahip FITC molekülü takılarak Bölüm 3.5.2' de anlatıldığı gibi iyonik jelasyon yöntemi kullanılarak hazırlanan nanopartiküler sistemler ile gerçekleştirildi. FITC ile işaretli nDChi, nDChi-PA$_{(1:0,25)}$ ve nTGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ formülasyonların koyun nazal mukozal membran üzerine uygulanmasından sonra 0, 1, 10 ve 30 dk olmak üzere farklı sürelerde inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında nazal mukozal sıvısı simüle edilerek hazırlanan çözelti ile yıkama işlemi yapıldı. Toplanan alikotların UV spektrometre ile gerçekleştirilen absorbans ölçümleri Şekil 4.11 ve floresan mikroskobu ile elde edilen görüntüler Şekil 4.12' de değerlendirildiğinde her bir inkübasyon süresi için en yüksek nanopartiküler tutunma yapısında serbest tiyol (-SH) grubu bulunduran TGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ürününden elde edilen nanopartiküller sistemde gözlemlenmekte ve inkübasyon süresindeki artış ile tutunmanın arttığı görülmektedir. Chi' nın yapısına tiyol grubunun katılması ile öngörüldüğü gibi DChi ye ve DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ürünlerine göre mukoadezif özelliğinde önemli bir artış görülmektedir. Bu durum Chi ile musin arasında gerçekleşen moleküller arası sekonder etkileşime ek olarak yapısına ilave edilen -SH gruplarının varlığı sisteince zengin yapıdaki mukus glikoproteinleri arasında disülfit bağı üzerinden kuvvetli kovalent bağ oluşturarak nanopartiküler sistemlerin alıkonma zamanını arttırmasıyla açıklanmaktadır [74]. Ayrıca DChi ile DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ürünlerin nanopartikülleri kıyaslandığında Chi' nın molekül yapısına PA modifikasyonu ile alıkonma miktarında artışa neden olduğu ve DChi' ye göre mukoadeziflik özelliğinin de iyileştiği görülmektedir (Şekil 4.11 ve Şekil 4.12).

Mukoadezyon analiz sonuçları değerlendirildiğinde, nanopartiküler sistemin hücre penetrasyonunu arttırıcı etkisiyle bilinen PA'in ilk olarak bu tez kapsamında DChi molekül yapısına konjugasyonu ile sentezlenen DChi-$PA_{(1:0,25)}$ ürünün aynı zamanda DChi molekülünün hidrofobikliği arttırdığı için mukus yapısındaki lipitler ile de hidrofobik etkileşime girerek mukoadeziflik özelliğini de arttırdığı görüldü [5–7,80]. İkinci olarak ise yine ilk defa bu tez kapsamında yapılan çalışmalarda hidrofobikliği arttırılmış Chi' nın moleküler yapısına TGA bileşiği ile yapılan tiyolleme reaksiyonu ile serbest -SH grubunun katılması ile de daha yüksek mukoadezif özellik sağlanması gerçekleştirildi [74,112,147].

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez kapsamında biyouyumlu, biyobozunabilir, toksik olmayan, mukoadezif özelliğe sahip ve farmasötik uygulamalarda biyopolimer esaslı ilaç/gen taşıyıcı olarak yaygın kullanılan Chi' nın hem hücre membranı ile etkileşimi yüksek hem de mukoadezif özelliği arttırılmış stabil biyouyumlu nanopartiküler sistemlerinin sentezlenmesi amaçlandı. Bu amaçla, çalışmanın hedefi doğrultusunda iş planı oluşturulurken öncelikle kullanılan Chi' nın ortalama molekül ağırlığının etkisinin de incelenmesi için depolimerizasyon reaksiyonu ile düşük molekül ağırlığına sahip DChi ürünü sentezlendi ve karakterize edildi. Takiben hidrofobikliğini arttırmak ve mukoadezyon özelliklerine katkısını değerlendirmek için ilk defa bu çalışmada PA ile modifikasyon ürünü DChi-PA$_{(1:0,25)}$ sentezlendi ve karakterize edildi. Tiyolleme reaksiyonunun bu ürünün mukoadeziflik özelliği üzerindeki katkısını incelemek için de ilk defa TGA bileşiği ile konjugasyonu gerçekleştirilerek molekülünde serbest -SH grubu içeren TGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ürünü sentezlendi ve karakterize edildi.

Seçilen ürünler olan DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ve TGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ürünlerinin nanopartiküler formülasyonları TPP kullanılarak iyonik jelasyon yöntemi ile gerçekleştirildi ve karakterize edildi. İlaç taşıyıcı olarak boyut, dağılım ve zeta potansiyeli bakımından kabul edilebilir karakteristiklere sahip stabil nanoformülasyonların nDChi-PA$_{(1:0,25)}$ için partikül boyutu 238,0 ± 37,0 nm, PDI değeri 0,481 ± 0,140 ve zeta potansiyeli değeri 20,5 ± 1,8 mV ve nTGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ için partikül boyutu 234,4 ± 10,3 nm, PDI 0,310± 0,060 ve zeta potansiyeli 18,4 ± 1,80 mV), 4:1 (Polimer:TPP) (a:a) oranında 1 saat sürede 250 rpm karıştırma hızında 0,1 mg/mL nanopartikül konsantrasyonunda elde edildi.

nDChi-PA$_{(1:0,25)}$ ve nTGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ formülasyonların biyouyumluluğu diğer bir ifadeyle toksik özelliği *in vitro* sitotoksisite analiz (MTT) yöntemi ile HEK293 hücre hattı ile çalışılarak gerçekleştirildi. Analiz sonucu nanopartikül formülasyonların HEK293 hücreleri üzerinde %75 hücre canlılığı gösterdiği böylece ürünlerin ve nanopartikül formülasyonlarının toksik özelliği kabul edilebilir seviye olduğu bulundu.

DChi, DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ve TGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ürünlerin mukoadeziflik özelliği *Texture* analizi ve nDChi, nDChi-PA$_{(1:0,25)}$ ve nTGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ formülasyonları, nanopartikül

sistemin alıkonması/yıkama metodu ile değerlendirildi. *Texture* analizi *ex vivo* koyun nazal mukozal membran üzerinde 1N ve 60 sn koşullarında çalışıldığında DChi ile kıyaslandığında ayrılma kuvvetinin DChi-PA$_{(1:0,25)}$ 1,53 kat, TGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ için ise 3,63 kat ve ayrılma işi olarak değerlendirildiğinde ise DChi-PA$_{(1:0,25)}$ için 3,44 kat ve TGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ürünü için ise 4,17 kat arttığı görüldü. *In vitro* selülöz asetat membran filtre kullanıldığında ise 1N 60 sn DChi' nin mukoadeziflik özelliğine göre ayrılma kuvvetinde ve ayrılma işinde sırasıyla DChi-PA$_{(1:0,25)}$ için 1,82 kat ve 0,33 kat artış, TGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ürünü için ise 3,40 kat ve 0,44 kat artış görüldü. Ürünlere ait nanopartikül formülasyonların koyun nazal mukozal membran üzerinde alıkonması UV spektrometre ve floresan mikroskobu değerlendirildiğinde DChi' ye göre mukoadeziflik özelliğinin iyileştiği görülmektedir.

Sonuç olarak ilk defa bu tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda biyouyumlu mukoadezif özelliğe sahip toksik özellik göstermeyen TGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ürününün sentezinin ve stabil nTGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ formülasyonunun başarılı bir şekilde elde edilebildiğini ortaya koymuştur. Bununla birlikte ilk defa bu çalışmada gerçekleştirilen *ex vivo* ve *in vitro* uygulamalar TGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ürününün nTGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ formülasyonunun nazal yoldan ilaç taşıma özelliğine sahip toksik olmayan bir mukoadezif konjugat olarak kullanılabileceğini de ortaya koymuştur.

Bundan sonraki çalışmalarda bu formülasyonların nazal yoldan ilaç taşıma özelliklerinin incelenmesi, hedeflendirme ajanı kullanılarak veya kullanılmadan seçilen model ilacın model hücre içerisine salımı yönünde araştırmalar yapılması planlanmaktadır. Başarılı bulunması durumunda diğer mukozal membranlar yoluyla ilaç taşıma özelliklerinin araştırılması da diğer hedefler arasındadır. Sonuç olarak ilk defa bu tez çalışmasıyla nazal mukozal membran üzerinde iyileştirilmiş mukoadezyon özelliğine sahip biyouyumlu yeni TGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ ürününden hazırlanan nTGA-DChi-PA$_{(1:0,25)}$ formülasyonun bilhassa hidrofobik özellikteki ilaçların nazal yoldan taşınmasında kullanabileceği öngörülmektedir. Bu bağlamda çalışmanın nanobiyoteknoloji alanında yeni mukoadezif nazal yoldan ilaç taşıyıcılar konusunda araştırmalar yapan bilim insanlarına ışık tutacağı yönünde yüksek bir potansiyele sahip olduğu da açıktır.

KAYNAKLAR

[1]. Singh, H., and Kaur, K., 2023, Role of nanotechnology in research fields: Medical sciences, military & tribology- A review on recent advancements, grand challenges and perspectives, *Materials today: proceedings.*

[2]. Ciucă, A.G., Grecu, C. I., Rotărescu, P., Gheorghe, I., Bolocan, A., Grumezescu, A.M., Holban, A.M., and Andronescu, E., 2017, *Nanostructures for drug delivery: pharmacokinetic and toxicological aspects*, Nanostructures for Drug Delivery Micro and Nano Technologies, Andronescu, and Grumezescu, A. M., Chapter 30, (Elsevier), pp 941–57.

[3]. Hughes, G.A., 2005, Nanostructure- mediated drug delivery, *Nanomedicine : nanotechnology, biology and medicine,* 1, 22–30.

[4]. Serra, L., Doménech, J., and Peppas, N.A., 2009, Engineering design and molecular dynamics of mucoadhesive drug delivery systems as targeting agents, *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics,* 71, 519–28.

[5]. Efiana, N.A., Mahmood, A., Lam, H.T., Zupancic, O., Leonaviciute, G., and Bernkop-Schnürc A., 2017, Improved mucoadhesive properties of self- nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS) by introducing acyl chitosan, *International journal of pharmaceutics,* 519, 206–12.

[6]. Sharma, D., and Singh, J., 2017, Synthesis and Characterization of Fatty Acid Grafted Chitosan Polymer and Their Nanomicelles for Nonviral Gene Delivery Applications *Bioconjugate chemistry,* 28, 2772–83.

[7]. Bonferoni, M.C., Sandri, G., Dellera, E., Rossi, S., Ferrari, F., Zambito, Y., and Caramella, C., 2016, Palmitoyl glycol chitosan micelles for corneal delivery of cyclosporine, *Journal of biomedical nanotechnology,* 12, 231–40.

[8]. Bernkop-Schnürch, A., Schwarz, V., and Steininger, S., 1999, Polymers with thiol groups: a new generation of mucoadhesive polymers?, *Pharmaceutical research,* 16, 876–81.

[9]. Kast, C.E., and Bernkop-Schnürch, A., 2001, Thiolated polymers- thiomers: development and in vitro evaluation of chitosan– thioglycolic acid conjugates, *Biomaterials,* 22, 2345–52.

[10]. Andrews, G.P., Laverty, T.P., and Jones, D. S., 2009, Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery, *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics,* 71, 505–18.

[11]. Bassi, D., Silva, J., Ferreira, S.B.D.S., De Freitas, O., and Bruschi, M.L., 2017, A critical review about methodologies for the analysis of mucoadhesive properties of drug delivery systems, *Drug development and industrial pharmacy,* 43, 1053–70.

[12]. Cook, M.T., and Khutoryanskiy, V.V., 2015, Mucoadhesion and mucosa- mimetic materials- A mini-review, *International journal of pharmaceutics,* 495, 991–8.

[13]. Bruschi, L.M., De Francisco, L., and Borghi, B.F., 2015, An overview of recent patents on composition of mucoadhesive drug delivery systems, *Recent patents on drug delivery & formulation,* 9, 79–87.

[14]. Tangri, P., and Madhav, N.S., 2011, Oral mucoadhesive drug delivery systems: A review, *International journal of biopharmaceutics,* 2229, 7499.

[15]. Linden, S.K., Sutton, P., Karlsson, N.G., Korolik, V., and McGuckin, M.A., 2008, Mucins in the mucosal barrier to infection, *Mucosal immunology,* 1, 183–97.

[16]. Cone, R.A., 2009, Barrier properties of mucus, *Advanced drug delivery reviews,* 61, 75–85.

[17]. Corfield, A.P., 2015, Mucins: A biologically relevant glycan barrier in mucosal protection, *Biochimica et biophysica acta (BBA)-general subjects,* 1850, 236–52.

[18]. Bustos, N.A., Ribbeck, K., and Wagner, C.E., 2023, The role of mucosal barriers in disease progression and transmission, *Advanced drug delivery reviews,* 200, 115008.

[19]. Wagner, C.E., Wheeler, K.M. and Ribbeck, K., 2018, Mucins and Their Role in Shaping the Functions of Mucus Barriers, *Annual review of cell and developmental biology,* 34, 189–215.

[20]. Bansil, R., and Turner, B.S., 2018, The biology of mucus: Composition, synthesis and organization *Advanced drug delivery reviews,* 124, 3–15.

[21]. Leal, J., Smyth, H.D., and Ghosh, D., 2017, Physicochemical properties of mucus and their impact on transmucosal drug delivery, *International journal of pharmaceutics,* 532, 555–72.

[22]. Bansil, R., and Turner, B.S., 2006, Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications, *Current opinion in colloid & interface science,* 11, 164–70.

[23]. Thwala, L.N., Santander-Ortega, M.J., Lozano, M.V., and Csaba, N.S., 2018, Functionalized polymeric nanostructures for mucosal drug delivery, *Biomedical applications of functionalized nanomaterials*, 449–87.

[24]. Ahuja, A., Khar, R.K., and Ali, J., 1997, Mucoadhesive Drug Delivery Systems, *Drug Development and industrial pharmacy,* 23, 489–515.

[25]. Ludwig, A., 2005, The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery, *Advanced drug delivery reviews,* 57, 1595–639.

[26]. Alonso, M.J., and Sánchez, A., 2010, The potential of chitosan in ocular drug delivery, *Journal of pharmacy and pharmacology,* 55, 1451–63.

[27]. Patel, V.F., Liu, F., and Brown, M.B., 2012, Modeling the oral cavity: in vitro and in vivo evaluations of buccal drug delivery systems, *Journal of controlled release,* 161, 746–56.

[28]. Shinkar, D.M., Dhake, A.S., and Setty, C.M., 2012, Drug delivery from the oral cavity: A focus on mucoadhesive, *PDA Journal of pharmaceutical science and technology,* 66, 466–500.

[29]. Tao, S.L., and Desai, T.A., 2005, Gastrointestinal patch systems for oral drug delivery, *Drug discovery today,* 10, 909–15.

[30]. Byrne, J., Huang, H.W., McRae, J.C., Babaee, S., Soltani, A., Becker, S.L., and Traverso, G., 2021, Devices for drug delivery in the gastrointestinal tract: A review of systems physically interacting with the mucosa for enhanced delivery, *Advanced drug delivery reviews,* 177, 113926.

[31]. Gupta, H., and Sharma, A., 2009, Ion activated bioadhesive in situ gel of clindamycin for vaginal application, *International journal of drug delivery,* 1.

[32]. Gök, M.K., Özgümüş, S., Demir, K., Cirit, Ü., Pabuccuoğlu, S., Cevher, E., Özsoy, Y., and Bacınoğlu, S., 2016, Development of starch based mucoadhesive vaginal drug delivery systems for application in veterinary medicine, *Carbohydrate polymers,* **136,** 63–70.

[33]. Veronesi, M.C., Alhamami, M., Miedema, S.B., Yun, Y., Ruiz-Cardozo, M., and Vannier, M.W., 2020, Imaging of intranasal drug delivery to the brain, *American journal of nuclear medicine and molecular imaging,* 10, 1.

[34]. Erd\Ho, F., Bors, L.A., Farkas, D., Bajza, Á., and Gizurarson, S., 2018, Evaluation of intranasal delivery route of drug administration for brain targeting, *Brain research bulletin,* 143, 155–70.

[35]. Jones, O., 2019, The Nose and sinuses and the nasal cavity, https://teachmeanatomy.info/head/organs/the-nose/nasal-cavity/, Ağustos, 2024

[36]. Marttin, E., Schipper, N.G., Verhoef, J.C., and Merkus, F.W., 1998, Nasal mucociliary clearance as a factor in nasal drug delivery, *Advanced drug delivery reviews,* 29, 13–38.

[37]. Özsoy, Y., 2007, Nazal yolla ilaçların verilmesi, *Ankara üniversitesi eczacılık fakültesi dergisi,* 36, 267–84.

[38]. Ali, M.S., and Pearson, J.P., 2007, Upper Airway Mucin Gene Expression: A Review *The laryngoscope,* 117, 932–8.

[39]. Türker, S., Onur, E., and Özer, Y., 2004, Nasal route and drug delivery systems, *Pharmacy world and science.,* 26, 137–42.

[40]. Md, S., Haque, S., Fazil, M., Kumar, M., Baboota, S., Sahni, J.K., and Ali, J., 2014, Optimised nanoformulation of bromocriptine for direct nose-to-brain delivery: biodistribution, pharmacokinetic and dopamine estimation by ultra-HPLC/mass spectrometry method, *Expert opinion on drug delivery,* 11, 827–42.

[41]. Dufes, C., Olivier, J-C., Gaillard, F., Gaillard, A., Couet, W., and Muller, J-M., 2003, Brain delivery of vasoactive intestinal peptide (VIP) following nasal administration to rats, *International journal of pharmaceutics,* 255, 87–97.

[42]. Slütter, B., and Jiskoot, W., 2010, Dual role of CpG as immune modulator and physical crosslinker in ovalbumin loaded N-trimethyl chitosan (TMC) nanoparticles for nasal vaccination, *Journal of controlled release,* 148, 117–21.

[43]. Gadhave, D., Rasal, N., Sonawane, R., Sekar, M., and Kokare, C., 2021, Nose-to-brain delivery of teriflunomide-loaded lipid-based carbopol-gellan gum nanogel for glioma: Pharmacological and in vitro cytotoxicity studies, *International journal of biological macromolecules,* 167, 906–20.

[44]. Mfoafo, K., Mittal, R., Eshraghi, A., Omidi, Y., and Omidian, H., 2023, Thiolated polymers: An overview of mucoadhesive properties and their potential in drug delivery via mucosal tissues, *Journal of drug delivery science and technology,* 104596.

[45]. Boddupalli, B.M., Mohammed, Z.N.K., Nath, R.A., and Banji, D., 2010, Mucoadhesive drug delivery system: An overview, *Journal of advanced pharmaceutical technology & research,* 1, 381.

[46]. Sosnik, A., Das, Neves, J., and Sarmento, B., 2014, Mucoadhesive polymers in the design of nano-drug delivery systems for administration by non-parenteral routes: A review, *Progress in polymer science,* 39, 2030–75.

[47]. Mansuri, S., Kesharwani, P., Jain, K., Tekade, R.K., and Jain, N.K., 2016, Mucoadhesion: A promising approach in drug delivery system, *Reactive and functional polymers,* 100, 151–72.

[48]. Bandi, S.P., Bhatnagar, S., and Venuganti, V.V.K., 2021, Advanced materials for drug delivery across mucosal barriers, *Acta biomaterialia,* 119, 13–29.

[49]. Chauhan, V., Agrawal, A., and Singh, U.K., 2022, A comprehensive review on mucoadhesive drug delivery, *Journal of drug delivery and therapeutics,* 12, 199–209.

[50]. Khutoryanskiy, V.V., 2011, Advances in Mucoadhesion and Mucoadhesive Polymers *Macromolecular bioscience,* 11, 748–64.

[51]. Chatterjee, B., Amalina, N., Sengupta, P., and Mandal, U.K., 2017, Mucoadhesive polymers and their mode of action: A recent update, *Journal of applied pharmaceutical science,* 7, 195–203.

[52]. Smart, J.D., 2005, The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion, *Advanced drug delivery reviews,* 57, 1556–68.

[53]. Salama, M.M., and Elzoghby, A.O., 2021, Mucoadhesive nanoparticles as promising drug delivery systems, *Theory and applications of nonparenteral nanomedicines,* Kesharwani, P., Taurin S., and Greish, K. ed., Chapter 30, (Academic Press), pp 113–36.

[54]. Panda, N., Jena, S., Kumar, P.R., Pradhan, M.A., Satpathy, P.R., and Mishra, M.M.C., 2023, Evaluation and characterization of bioadhesive drug delivery systems, *Journal of pharmaceutical negative results,* 39–46.

[55]. Mahajan, P., Kaur, A., Aggarwal, G., and Harikumar, S.L., 2013, Mucoadhesive drug delivery system: a review, *International journal drug development research,* **5,** 11–20.

[56]. Kumar, L., Verma, S., Vaidya, B., and Gupta, V., 2017, Bioadhesive Polymers for Targeted Drug Delivery *Nanotechnology based approaches for targeting and delivery of drugs and genes,* Mishra, V., Kesharwani, P., Mohd Amin, M.C.I., and Iyer, A., ed., Chapter 10, (Academic Press), pp 322–62.

[57]. Madsen, F., Eberth, K., and Smart, J.D., 1998, A rheological assessment of the nature of interactions between mucoadhesive polymers and a homogenised mucus gel, *Biomaterials,* 19, 1083–92.

[58]. Bruschi, M.L., de Souza Ferreira, S.B., and Bassi da Silva, J., 2020, Mucoadhesive and mucus-penetrating polymers for drug delivery, *Nanotechnology for oral drug delivery,* Martin, J.P., and Santos, H.A., ed, Chapter 10, (Academic Press), pp 77–141.

[59]. Alawdi, S., and Solanki, A.B., 2021, Mucoadhesive Drug Delivery Systems: A Review of Recent Developments, *Journal of scientific research in medical and biological sciences,* 2, 50–64.

[60]. Mortazavi, S.A., and Smart, J.D., 1993, An investigation into the role of water movement and mucus gel dehydration in mucoadhesion, *Journal of controlled release,* 25, 197–203.

[61]. Huang, Y., Leobandung, W., Foss, A., and Peppas, N.A., 2000, Molecular aspects of muco- and bioadhesion: Tethered structures and site-specific surfaces, *Journal of controlled release,* 65, 63–71.

[62]. Yadav, V.K, Gupta, A.B, Kumar, R., Yadav, J.S., and Kumar, B., 2010, Mucoadhesive polymers: means of improving the mucoadhesive properties of drug delivery system, *Journal of chemical and pharmaceutical research,* 2, 418–32.

[63]. Mishra, N., Nisha, R., Singh, N., Maurya, P., Singh, P., Pal, R.R., Singh, S., and Saraf, S.A., 2023, Bioadhesive and phase change polymers for drug delivery, *Smart polymeric nano-constructs in drug delivery,* pp 151–86.

[64]. Tobyn, M.J, Johnson, J.R., and Dettmar, P.W., 1996, Factors affecting in vitro gastric mucoadhesion, II. Physical properties of polymers, *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics, 42, 56-61.*

[65]. Ugwoke, M.I., Agu, R.U., Verbeke, N., and Kinget, R., 2005, Nasal mucoadhesive drug delivery: background, applications, trends and future perspectives, *Advanced drug delivery reviews,* 57, 1640–65,

[66]. Dodou, D., Breedveld, P., and Wieringa, P.A., 2005, Mucoadhesives in the gastrointestinal tract: revisiting the literature for novel applications, *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics,* 60, 1–16.

[67]. Lehr, C.M., Bouwstra, J.A., Schacht, E.H., and Junginger, H.E., 1992, In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers, *International journal of pharmaceutics,* 78, 43–8.

[68]. Peppas, N.A., and Huang, Y., 2004, Nanoscale technology of mucoadhesive interactions, *Advanced drug delivery reviews,* 56, 1675–87.

[69]. Kavitha, K., Kumar, M.R., and Singh, S.J., 2011, Novel mucoadhesive polymers-a review, *Journal of applied pharmaceutical science,* 37–42.

[70]. Yaqoob, M., Jalil, A., and Bernkop-Schnürch, A., 2021, Mucoadhesive Polymers: Gateway to Innovative Drug Delivery *Modeling and control of drug delivery systems* Azar, A.T. (ed.), Chapter 20, (Academic Press), pp 351–83.

[71]. Zhang, H., Zhang, J., Streisand, J.B., 2002, Oral mucosal drug delivery, *Clinical pharmacokinetics and therapeutic applications,* vol. 41, pp 661-680.

[72]. Streisand, J.B., Zhang, H., and Zhang, J., 2011, Oral Mucoadhesive Drug Delivery, *Clinical pharmacokinetics,* 41, 661–80.

[73]. Bernkop-Schnürch, A., 2005, Mucoadhesive systems in oral drug delivery, *Drug discovery today: Technologies,* 2, 83–7.

[74]. Leitner, V.M., Walker, G.F., and Bernkop-Schnürch, A., 2003, Thiolated polymers: evidence for the formation of disulphide bonds with mucus glycoproteins, *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics,* 56, 207–14.

[75]. Gök, M.K., Demir, K., Cevher, E., Özsoy, Y., Cirit, Ü., Bacınoğlu, S., Özgümüş, S., and Pabuccuoğlu, S., 2017, The effects of the thiolation with thioglycolic acid and l-cysteine on the mucoadhesion properties of the starch-graft-poly(acrylic acid), *Carbohydrate polymers,* 163, 129–36.

[76]. Subramanian, P., 2021, Mucoadhesive delivery system: a smart way to improve bioavailability of nutraceuticals, *Foods,* 10, 1362.

[77]. Singh, I., Pawar, P., Sanusi, E.A., and Odeku, O.A., 2017, Mucoadhesive Polymers for Drug Delivery Systems, *Adhesion in pharmaceutical, biomedical and dental fields,* pp 89–113.

[78]. Khutoryanskiy, V.V., 2007, Hydrogen-bonded interpolymer complexes as materials for pharmaceutical applications, *International journal of pharmaceutics,* 334, 15–26.

[79]. Köllner, S., Dünnhaupt, S., Waldner, C., Hauptstein, S., Pereira de Sousa, I., and Bernkop-Schnürch, A., 2015, Mucus permeating thiomer nanoparticles, *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics,* 97, 265–72.

[80]. Bernkop-Schnürch, A., 2005, Thiomers: a new generation of mucoadhesive polymers, *Advanced drug delivery reviews,* 57, 1569–82.

[81]. Pourmadadi., M., Farokh, A., Rahmani, E., Eshaghi, M.M., Aslani, A., Rahdar, A., and Ferreira, L.F.R., 2023, Polyacrylic acid mediated targeted drug delivery nano-systems: A review, *Journal of drug delivery science and technology,* 80, 104169.

[82]. Dalei, G., and Das, S., 2022, Polyacrylic acid-based drug delivery systems: A comprehensive review on the state-of-art, *Journal of drug delivery science and technology,* 78, 103988.

[83]. Jabbari, E., Wisniewski, N., and Peppas, N.A., 1993, Evidence of mucoadhesion by chain interpenetration at a poly (acrylic acid)/mucin interface using ATR-FTIR spectroscopy, *Journal of controlled release,* 26, 99–108.

[84]. Valenta, C., 2005, The use of mucoadhesive polymers in vaginal delivery, *Advanced drug delivery reviews,* 57, 1692–712.

[85]. Lam, H.T., Zupančič, O., Laffleur, F., and Bernkop-Schnürch, A., 2021, Mucoadhesive properties of polyacrylates: Structure–function relationship, *International journal of adhesion and adhesives,* 107, 102857.

[86]. Lai, S.K., Suk, J.S., Pace, A., Wang, Y.Y., Yang, M., Mert, O., Chen, J., Kim, J., and Hanes, J., 2011, Drug carrier nanoparticles that penetrate human chronic rhinosinusitis mucus, *Biomaterials,* **32,** 6285–90.

[87]. Mahlert, L., Anderski, J., Mulac, D., and Langer, K., 2019, The impact of gastrointestinal mucus on nanoparticle penetration–in vitro evaluation of mucus-penetrating nanoparticles for photodynamic therapy, *European journal of pharmaceutical sciences,* 133, 28–39.

[88]. Nayak, A.K, Hasnain, M.S., Dhara, A.K., and Mandal, S.C., 2022, Herbal biopolysaccharides in drug delivery, *Herbal biomolecules in healthcare applications,* pp 613–42.

[89]. Sriamornsak, P., Wattanakorn, N., and Takeuchi, H., 2010, Study on the mucoadhesion mechanism of pectin by atomic force microscopy and mucin-particle method, *Carbohydrate polymers*, 79, 54–9.

[90]. Mathew, A.A., Mohapathra, S., and Panonnummal, R., 2023, Pectin-based drug delivery systems for biomedical applications, *Natural biopolymers in drug delivery and tissue engineering*, pp 301–46.

[91]. Roman-Benn, A., Contador, C.A., Li, M.W., Lam, H.M., Ah-Hen, K., Ulloa, P.E., and Ravanal, M.C., 2023, Pectin: An overview of sources, extraction and applications in food products, biomedical, pharmaceutical and environmental issues, *Food chemistry advances*, 2, 100192.

[92]. Yadav, A.K., Mishra, P., and Agrawal, G.P., 2008, An insight on hyaluronic acid in drug targeting and drug delivery, *Journal of drug targeting*, 16, 91–107.

[93]. Laffleur, F., Röggla, J., Idrees, M.A., and Griessinger, J., 2014, Chemical modification of hyaluronic acid for intraoral application, *Journal of pharmaceutical sciences*, 103, 2414–23.

[94]. Nayak, A.K., and Pal, D., 2013, Formulation optimization and evaluation of jackfruit seed starch–alginate mucoadhesive beads of metformin HCl, *International journal of biological macromolecules* ,59, 264–72.

[95]. Abruzzo, A., Bigucci, F., Cerchiara, T., Saladini, B., Gallucci, M.C., Cruciani, F., Vitali, B., and Luppi, B., 2013, Chitosan/alginate complexes for vaginal delivery of chlorhexidine digluconate, *Carbohydrate polymers*, 91, 651–8.

[96]. Davidovich-Pinhas, M., and Bianco-Peled, H., 2011, Alginate–PEGAc: A new mucoadhesive polymer, *Acta Biomaterialia*, 7, 625–33.

[97]. Barbucci, R., Leone, G., and Vecchiullo, A., 2004, Novel carboxymethylcellulose-based microporous hydrogels suitable for drug delivery, *Journal of biomaterials science, polymer edition*, 15, 607–19.

[98]. Karimzadeh, Z., Javanbakht, S., and Namazi, H., 2019, Carboxymethylcellulose/MOF-5/Graphene oxide bio-nanocomposite as antibacterial drug nanocarrier agent, *BioImpacts*, 9, 5.

[99]. Brannigan, R.P., and Khutoryanskiy, V.V., 2019, Progress and Current Trends in the Synthesis of Novel Polymers with Enhanced Mucoadhesive Properties, *Macromolecular bioscience*, 19, 1900194.

[100]. Younes, I., and Rinaudo, M., 2015, Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications, *Marine drugs*, 13, 1133–74.

[101]. Chatterjee, R., Maity, M., Hasnain, M.S., and Nayak, A.K., 2022, Chitosan: source, chemistry, and properties, *Chitosan in drug delivery*, Hasnain, M.S., Beg, S., and Nayak, A.K. (ed.), Chapter 1, (Academic Press), pp 1–22.

[102]. Mu, L., Wu, L., Wu, S., Ye, Q., and Zhong, Z., 2024, Progress in chitin/chitosan and their derivatives for biomedical applications: Where we stand, *Carbohydrate polymers*, 122233.

[103]. Çelik, S., Gök, M.K., Demir, K., Pabuccuoğlu, S., and Özgümüş, S., 2022, Relationship between phosphorylamine-modification and molecular weight on transfection efficiency of chitosan, *Carbohydrate polymers*, 277, 118870.

[104]. Gök, M.K., 2019, In vitro evaluation of synergistic effect of primary and tertiary amino groups in chitosan used as a non-viral gene carrier system, *European polymer journal,* 115, 375–83.

[105]. Sinani, G., Sessevmez, M., Gök., M.K., Özgümüş, S., Alpar, H.O., and Cevher, E., 2019, Modified chitosan-based nanoadjuvants enhance immunogenicity of protein antigens after mucosal vaccination, *International journal of pharmaceutics,* 569, 118592.

[106]. Yeğen, G., 2024, *Mukozaya yapışabilen ilaç taşıyıcı sistemlerin tasarımının kalite yaklaşımıyla geliştirilmesi,* Doktora Tezi, T.C. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü: İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa.

[107]. Shariatinia, Z., 2019, Pharmaceutical applications of chitosan, *Advances in colloid and interface science,* 263, 131–94.

[108]. Kedir, W.M., Abdi, G.F., Goro, M.M., and Tolesa, L.D., 2022, Pharmaceutical and drug delivery applications of chitosan biopolymer and its modified nanocomposite: A review, *Heliyon,* 8.

[109]. Cheung, R.C.F., Ng, T.B., Wong, J.H., and Chan, W.Y., 2015, Chitosan: an update on potential biomedical and pharmaceutical applications, *Marine drugs,* 13, 5156–86.

[110]. Harugade, A., Sherje, A.P., and Pethe, A., 2023, Chitosan: A review on properties, biological activities and recent progress in biomedical applications, *Reactive and functional polymers,* 105634.

[111]. Sogias, I.A., Williams, A.C., and Khutoryanskiy, V.V., 2008, Why is Chitosan Mucoadhesive?, *Biomacromolecules,* 9, 1837–42.

[112]. Ways, T.M., Lau, W.M., and Khutoryanskiy, V.V., 2018, Chitosan and its derivatives for application in mucoadhesive drug delivery systems, *Polymers,* 10, 267.

[113]. Smith, J., Wood, E., and Dornish, M., 2004, Effect of Chitosan on Epithelial Cell Tight Junctions, *Pharmaceutical research,* 21, 43–9.

[114]. Mourya, V.K., and Inamdar, N.N., 2008, Chitosan-modifications and applications: Opportunities galore, *Reactive and functional polymers,* 68, 1013–51.

[115]. Issa, M.M., Köping-Höggård, M., and Artursson, P., 2005, Chitosan and the mucosal delivery of biotechnology drugs, *Drug discovery today: technologies,* 2, 1–6.

[116]. Khalaf, E.M., Abood, N.A., Atta, R.Z., Ramírez-Coronel, A.A., Alazragi, R., Parra, R.M.R., Abed, O.H., Abosaooda, M., Jalil, A.T., and Mustafa, Y.F., 2023, Recent progressions in biomedical and pharmaceutical applications of chitosan nanoparticles: A comprehensive review, *International journal of biological macromolecules,* 231, 123354.

[117]. Hasnain, M.S., and Nayak, A.K., 2022, Chitosan as mucoadhesive polymer in drug delivery, *Chitosan in drug delivery,* ed Hasnain, M.S, Beg, S., and Nayak, A.K. (ed.), Chapter 9, (Academic Press), pp 225–46.

[118]. Werle, M., Takeuchi, H., and Bernkop-Schnürch, A., 2009, Modified chitosans for oral drug delivery, *Journal of pharmaceutical sciences,* 98, 1643–56.

[119]. Shinde, U.A., Joshi, P.N., Jain, D.D., and Singh, K., 2019, Preparation and Evaluation of N-Trimethyl Chitosan Nanoparticles of Flurbiprofen for Ocular Delivery, *Current eye research,* 44, 575–82.

[120]. He, R., and Yin, C., 2017, Trimethyl chitosan based conjugates for oral and intravenous delivery of paclitaxel, *Acta biomaterialia*, 53, 355–66.

[121]. Jintapattanakit, A., Junyaprasert, V.B., and Kissel, T., 2009, The role of mucoadhesion of trimethyl chitosan and PEGylated trimethyl chitosan nanocomplexes in insulin uptake, *Journal of pharmaceutical sciences*, 98, 4818–30.

[122]. Shi, L., and Caldwell, K.D., 2000, Mucin adsorption to hydrophobic surfaces, *Journal of colloid and interface science*, 224, 372–81.

[123]. Sonia, T.A., and Sharma, C.P., 2011, Chitosan and Its Derivatives for Drug Delivery Perspective, *Chitosan for biomaterials I*, Advances in Polymer Science, vol 243, Jayakumar, R., Prabaharan, M., and Muzzarelli, R.A.A., (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp 23–53.

[124]. Le Tien, C., Lacroix, M., Ispas-Szabo, P., and Mateescu, M.A., 2003, N-acylated chitosan: hydrophobic matrices for controlled drug release, *Journal of controlled release*, 93, 1–13.

[125]. Li, H., Zhang, Z., Bao, X., Xu, G., and Yao, P., 2018, Fatty acid and quaternary ammonium modified chitosan nanoparticles for insulin delivery, *Colloids and surfaces b: biointerfaces*, 170, 136–43.

[126]. Xie, Y., Gong, X., Jin, Z., Xu, W., and Zhao, K., 2022, Curcumin encapsulation in self-assembled nanoparticles based on amphiphilic palmitic acid-grafted-quaternized chitosan with enhanced cytotoxic, antimicrobial and antioxidant properties, *International journal of biological macromolecules*, 222, 2855–67.

[127]. Pyrć, K., Milewska, A., Duran, E.B., Botwina, P., Dabrowska, A., Jedrysik, M., Benedyk, M., Lopes, R., Arenas-Pinto, A., and Badr, M., 2021, SARS-CoV-2 inhibition using a mucoadhesive, amphiphilic chitosan that may serve as an anti-viral nasal spray, *Scientific reports*, 11, 20012.

[128]. Bernkop-Schnürch, A., and Steininger, S., 2000, Synthesis and characterisation of mucoadhesive thiolated polymers, *International journal of pharmaceutics*, 194, 239–47.

[129]. Bonengel, S., and Bernkop-Schnürch, A., 2014, Thiomers—From bench to market, *Journal of controlled release*, 195, 120–9.

[130]. Mukhtar, M., Fényes, E., Bartos, C., Zeeshan, M., and Ambrus, R., 2021, Chitosan biopolymer, its derivatives and potential applications in nano-therapeutics: A comprehensive review, *European polymer journal*, 160, 110767.

[131]. Bernkop-Schnürch, A., Hornof, M., and Guggi, D., 2004, Thiolated chitosans, *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 57, 9–17.

[132]. Schipper, N.G., Vårum, K.M., Stenberg, P., Ocklind, G., Lennernäs, H., and Artursson, P., 1999, Chitosans as absorption enhancers of poorly absorbable drugs: 3: Influence of mucus on absorption enhancement, *European journal of pharmaceutical sciences*, 8, 335–43.

[133]. Zhang, Y., Zhou, S., Deng, F., Chen, X., Wang, X., Wang, Y., Zhang, H., Dai, W., He, B., and Zhang, Q., 2018, The function and mechanism of preactivated thiomers in triggering epithelial tight junctions opening, *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 133, 188–99.

[134]. Bernkop-Schnürch, A., Krauland, A.H., Leitner, V.M., and Palmberger, T., 2004, Thiomers: potential excipients for non-invasive peptide delivery systems, *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics,* 58, 253–63.

[135]. Kafedjiiski, K., Föger, F., Werle, M., and Bernkop-Schnürch, A., 2005, Synthesis and in Vitro Evaluation of a Novel Chitosan–Glutathione Conjugate, *Pharmaceutical research,* **22,** 1480–8.

[136]. Federer, C., Kurpiers, M., and Bernkop-Schnürch, A., 2021, Thiolated Chitosans: A Multi-talented Class of Polymers for Various Applications, *Biomacromolecules,* 22, 24–56.

[137]. Manna, S., Seth, A., Gupta, P., Nandi, G., Dutta, R., Jana, S., and Jana, S., 2023, Chitosan Derivatives as Carriers for Drug Delivery and Biomedical Applications, *ACS biomaterials science engineering.,* 9, 2181–202.

[138]. Jain, S., Nuwal, K., Mahmood, A., Piplani, M., Chander, S., Dubey, S.K., and Singhvi, G., 2022, Thiolated chitosan as an improved bioadhesive polymer in drug delivery, *Chitosan in drug delivery,* Hasnain, M.S., Beg, S., and Nayak, A.K. (ed.), Chapter 10, (Academic Press), pp 247–76

[139]. Sakloetsakun, D., Hombach, J.M.R., and Bernkop-Schnürch, A., 2009, In situ gelling properties of chitosan-thioglycolic acid conjugate in the presence of oxidizing agents, *Biomaterials,* 30, 6151–7.

[140]. Patel, D., Naik, S., and Misra, A., 2012, Improved transnasal transport and brain uptake of tizanidine HCl-loaded thiolated chitosan nanoparticles for alleviation of pain, *Journal pharmaceutical science,* 101, 690–706.

[141]. Liu, D., Li, J., Pan, H., He, F., Liu, Z., Wu, Q., Bai, C., Yu, S., and Yang, X., 2016, Potential advantages of a novel chitosan-N-acetylcysteine surface modified nanostructured lipid carrier on the performance of ophthalmic delivery of curcumin, *Scientific reports,* 6, 28796.

[142]. Kafedjiiski, K., Krauland, A.H., Hoffer, M.H., and Bernkop-Schnürch, A., 2005, Synthesis and in vitro evaluation of a novel thiolated chitosan, *Biomaterials,* 26, 819–26.

[143]. Schmitz, T., Grabovac, V., Palmberger, T.F., Hoffer, M.H., and Bernkop-Schnürch, A., 2008, Synthesis and characterization of a chitosan-N-acetyl cysteine conjugate, *International journal of pharmaceutics,* 347, 79–85.

[144]. Kast, C.E., Valenta, C., Leopold, M., and Bernkop-Schnürch, A., 2002, Design and in vitro evaluation of a novel bioadhesive vaginal drug delivery system for clotrimazole, *Journal of controlled release,* 81, 347–54.

[145]. Lee, D.W., Shirley, S.A., Lockey, R.F., and Mohapatra, S.S., 2006, Thiolated chitosan nanoparticles enhance anti-inflammatory effects of intranasally delivered theophylline, *Respiratory research,* 7, 112.

[146]. Mahmood, A., Lanthaler, M., Laffleur, F., Huck, C.W., and Bernkop-Schnürch, A., 2017, Thiolated chitosan micelles: Highly mucoadhesive drug carriers, *Carbohydrate polymers,* 167, 250–8.

[147]. Sheng, Y., Sun, X., Han, J., Hong, W., Feng, J., Xie, S., Li, Y., Yan, F., Li, K., and Tian, B., 2022, *N*-acetylcysteine functionalized chitosan oligosaccharide-palmitic acid conjugate

enhances ophthalmic delivery of flurbiprofen and its mechanisms, *Carbohydrate polymers*, 291, 119552.

[148]. Begines, B., Ortiz, T., Pérez-Aranda, M., Martínez, G., Merinero, M., Argüelles-Arias, F., and Alcudia, A., 2020, Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery: Recent Developments and Future Prospects, *Nanomaterials*, 10, 1403.

[149]. Hamedi, H., Moradi, S., Hudson, S.M., Tonelli, A.E., and King, M.W., 2022, Chitosan based bioadhesives for biomedical applications: A review, *Carbohydrate polymers*, 282, 119100.

[150]. Mohammed, M.A., Syeda, J.T., Wasan, K.M., and Wasan, E.K., 2017, An overview of chitosan nanoparticles and its application in non-parenteral drug delivery, *Pharmaceutics*, 9, 53.

[151]. Singh, R., and Lillard, Jr.J.W., 2009, Nanoparticle-based targeted drug delivery, *Experimental and molecular pathology*, 86, 215–23.

[152]. Garg, U., Chauhan, S., Nagaich, U., and Jain, N., 2019, Current advances in chitosan nanoparticles based drug delivery and targeting, *Advanced pharmaceutical bulletin*, 9, 195.

[153]. Jha, R., and Mayanovic, R.A., 2023, A review of the preparation, characterization, and applications of chitosan nanoparticles in nanomedicine, *Nanomaterials*, **13,** 1302.

[154]. Desai, K.G., 2016, Chitosan nanoparticles prepared by ionotropic gelation: An overview of recent advances, *Critical reviews^{TM} in therapeutic drug carrier systems*, 33.

[155]. Detsi, A., Kavetsou, E., Kostopoulou, I., Pitterou, I., Pontillo, A.R.N., Tzani, A., Christodoulou, P., Siliachli, A., and Zoumpoulakis, P., 2020, Nanosystems for the encapsulation of natural products: The case of chitosan biopolymer as a matrix, *Pharmaceutics*, 12, 669.

[156]. Wang, Y., Li, P., Truong-Dinh, Tran, T., Zhang, J. and Kong, L., 2016, Manufacturing techniques and surface engineering of polymer based nanoparticles for targeted drug delivery to cancer, *Nanomaterials*, 6, 26.

[157]. Zhao, Z., Ukidve, A., Krishnan, V., and Mitragotri, S., 2019, Effect of physicochemical and surface properties on in vivo fate of drug nanocarriers, *Advanced drug delivery reviews*, 143, 3–21.

[158]. De Lima, L.S., and Mortari, M.R., 2022, Therapeutic nanoparticles in the brain: A review of types, physicochemical properties and challenges, *International journal of pharmaceutics*, 612, 121367.

[159]. Liu, C., Jiang, X., Gan, Y., and Yu, M., 2021, Engineering nanoparticles to overcome the mucus barrier for drug delivery: Design, evaluation and state-of-the-art, *Medicine in drug discovery*, 12, 100110.

[160]. Mitragotri, S., and Lahann, J., 2009, Physical approaches to biomaterial design, *Nature materials*, 8, 15–23.

[161]. Kiio, T.M., and Park, S., 2021, Physical properties of nanoparticles do matter, *Journal of pharmaceutical investigation*, 51, 35–51.

[162]. Hoshyar, N., Gray, S., Han, H., and Bao, G., 2016, The Effect of Nanoparticle Size on *In Vivo* Pharmacokinetics and Cellular Interaction, *Nanomedicine (Lond.)*, 11, 673–92.

[163]. Liu, Y., Hardie, J., Zhang, X., and Rotello, V.M., 2017, Effects of engineered nanoparticles on the innate immune system, *Seminars in immunology*, vol 34, pp 25–32.

[164]. Soo Choi, H., Liu, W., Misra, P., Tanaka, E., Zimmer, J.P., Itty Ipe, B., Bawendi, M.G., and Frangioni, J.V., 2007, Renal clearance of quantum dots, *Nature biotechnology*, 25, 1165–70.

[165]. Lu, F., Wu, S.H., Hung, Y., and Mou, C.Y., 2009, Size effect on cell uptake in well-suspended, uniform mesoporous silica nanoparticles, *Small*, 5, 1408–13.

[166]. Su, Y.L., Fang, J.H., Liao, C.Y., Lin, C.T., Li, Y.T., and Hu, S.H., 2015, Targeted mesoporous iron oxide nanoparticles-encapsulated perfluorohexane and a hydrophobic drug for deep tumor penetration and therapy, *Theranostics*, 5, 1233.

[167]. Lai, S.K., Wang, Y.Y., and Hanes, J., 2009, Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal tissues, *Advanced drug delivery reviews*, 61, 158–71.

[168]. Lai, S.K., Wang, Y.Y., Wirtz, D., and Hanes, J., 2009, Micro- and macrorheology of mucus, *Advanced drug delivery reviews*, 61, 86–100.

[169]. Wang, Y.Y., Lai, S.K., So, C., Schneider, C., Cone, R., and Hanes, J., 2011, Mucoadhesive Nanoparticles May Disrupt the Protective Human Mucus Barrier by Altering Its Microstructure, *PLoS one*, 6, e21547.

[170]. Froehlich, E., and Roblegg, E., 2014, Mucus as barrier for drug delivery by nanoparticles, *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 14, 126–36.

[171]. Banerjee, A., Qi, J., Gogoi, R., Wong, J., and Mitragotri, S., 2016, Role of nanoparticle size, shape and surface chemistry in oral drug delivery, *Journal of controlled release*, 238, 176–85.

[172]. Jindal, A.B., 2017, The effect of particle shape on cellular interaction and drug delivery applications of micro-and nanoparticles, *International journal of pharmaceutics*, 532, 450–65.

[173]. Park, J., Maltzahn, G., Zhang, L., Derfus, A.M., Simberg, D., Harris, T.J., Ruoslahti E, Bhatia S N and Sailor M J 2009 Systematic Surface Engineering of Magnetic Nanoworms for In vivo Tumor Targeting, *Small*, 5, 694–700.

[174]. Zhou, Z., Ma, X., Jin, E., Tang, J., Sui, M., Shen, Y., Van Kirk, E.A., Murdoch, W.J., and Radosz, M., 2013, Linear-dendritic drug conjugates forming long-circulating nanorods for cancer-drug delivery, *Biomaterials*, 34, 5722–35.

[175]. Muro, S., Garnacho, C., Champion, J.A., Leferovich, J., Gajewski, C., Schuchman, E.H., Mitragotri, S., and Muzykantov, V.R., 2008, Control of endothelial targeting and intracellular delivery of therapeutic enzymes by modulating the size and shape of ICAM-1-targeted carriers, *Molecular therapy*, 16, 1450–8.

[176]. Lee, S.Y., Ferrari, M., and Decuzzi, P., 2009, Design of bio-mimetic particles with enhanced vascular interaction, *Journal of biomechanics*, 42, 1885–90.

[177]. Veider, F., Sanchez, A.E., and Bernkop-Schnürch, A., 2024, Charge-Reversible Nanoparticles: Advanced Delivery Systems for Therapy and Diagnosis, *Small*, 20, 2304713.

[178]. Jo, D.H., Kim, J.H., Lee, T.G., and Kim, J.H., 2015, Size, surface charge, and shape determine therapeutic effects of nanoparticles on brain and retinal diseases, *Nanomedicine: nanotechnology, biology and medicine*, 11, 1603–11.

[179]. Honary, S., and Zahir, F., 2013, Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems-a review (Part 1), *Tropical journal of pharmaceutical research*, 12, 255–64.

[180]. Smith, M.C., Crist, R.M., Clogston, J.D., and McNeil, S.E., 2017, Zeta potential: a case study of cationic, anionic, and neutral liposomes, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 409, 5779–87.

[181]. Clogston, J.D., and Patri, A.K., 2011, Zeta Potential Measurement, Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery, *Methods in molecular biology*, vol 697, McNeil, S.E. (ed.), (Totowa, NJ: Humana Press), pp 63–70.

[182]. Shao, X., Wei, X., Song, X., Hao, L., Cai, X., Zhang, Z., Peng, Q., and Lin, Y., 2015, Independent effect of polymeric nanoparticle zeta potential/surface charge, on their cytotoxicity and affinity to cells, *Cell proliferation*, 48, 465–74.

[183]. Bandi, S.P., Kumbhar, Y.S., and Venuganti, V.V.K., 2020, Effect of particle size and surface charge of nanoparticles in penetration through intestinal mucus barrier, *Journal of nanoparticle research*, 22, 62.

[184]. Li, S.D., and Huang, L., 2009, Nanoparticles evading the reticuloendothelial system: Role of the supported bilayer, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1788, 2259–66.

[185]. Wang, S., Guo, H., Li, Y., and Li, X., 2019, Penetration of nanoparticles across a lipid bilayer: effects of particle stiffness and surface hydrophobicity, *Nanoscale*, 11, 4025–34.

[186]. Anselmo, A.C., Zhang, M., Kumar, S., Vogus, D.R., Menegatti, S., Helgeson, M.E., and Mitragotri, S., 2015, Elasticity of Nanoparticles Influences Their Blood Circulation, Phagocytosis, Endocytosis, and Targeting, *ACS Nano*, 9, 3169–77.

[187]. Zhang, L., Cao, Z., Li, Y., Ella-Menye, J.R., Bai, T., and Jiang, S., 2012, Softer Zwitterionic Nanogels for Longer Circulation and Lower Splenic Accumulation, *ACS Nano*, 6, 6681–6.

[188]. Guo, P., Liu, D., Subramanyam, K., Wang, B., Yang, J., Huang, J., Auguste, D.T., and Moses, M.A., 2018, Nanoparticle elasticity directs tumor uptake, *Nature communications*, 9, 130.

[189]. Yu, M., Xu, L., Tian, F., Su, Q., Zheng, N., Yang, Y., Wang, J., Wang, A., Zhu, C., and Guo, S., 2018, Rapid transport of deformation-tuned nanoparticles across biological hydrogels and cellular barriers, *Nature communications*, 9, 2607.

[190]. Bao, C., Liu, B., Li, B., Chai, J., Zhang, L., Jiao, L., Li, D., Yu, Z., Ren, F., Shi, X., and Li, Y., 2020, Enhanced Transport of Shape and Rigidity-Tuned α-Lactalbumin Nanotubes across Intestinal Mucus and Cellular Barriers, *Nano letters*, 20, 1352–61.

[191]. Carta, G., Murru, E., Banni, S., and Manca, C., 2017, Palmitic Acid: Physiological Role, Metabolism and Nutritional Implications, *Frontiers in physiology*, 8.

[192]. Chen, X.G., Lee, C.M., and Park, H.J., 2003, O/W Emulsification for the Self-Aggregation and Nanoparticle Formation of Linoleic Acid Modified Chitosan in the Aqueous System, *Journal of agricultural and food chemistry*, 51, 3135–9.

[193]. Gök, M.K., Demir, K., Cevher, E., Özgümüş, S., and Pabuccuoğlu, S., 2019, Effect of the linear aliphatic amine functionalization on in vitro transfection efficiency of chitosan nanoparticles, *Carbohydrate polymers*, 207, 580–7.

[194]. Eliyahu, S., Aharon, A., and Bianco-Peled, H., 2018, Acrylated chitosan nanoparticles with enhanced mucoadhesion, *Polymers*, 10, 106.

[195]. Yusuf, A., Almotairy, A.R.Z., Henidi, H., Alshehri, O.Y., and Aldughaim, M.S., 2023, Nanoparticles as drug delivery systems: a review of the implication of nanoparticles' physicochemical properties on responses in biological systems, *Polymers*, 15, 1596.

[196]. Rampino, A., Borgogna, M., Blasi, P., Bellich, B., and Cesàro, A., 2013, Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability, *International journal of pharmaceutics*, 455, 219–28.

[197]. Koukaras, E.N., Papadimitriou, S.A., Bikiaris, D.N., and Froudakis, G.E., 2012, Insight on the Formation of Chitosan Nanoparticles through Ionotropic Gelation with Tripolyphosphate, *Molecular pharmaceutics*, 9, 2856–62.

[198]. Sreekumar, S., Goycoolea, F.M., Moerschbacher, B.M., and Rivera-Rodriguez, G.R., 2018, Parameters influencing the size of chitosan-TPP nano-and microparticles, *Scientific reports*, 8, 4695.

[199]. Jonassen, H., Kjøniksen, A.L., and Hiorth, M., 2012, Stability of Chitosan Nanoparticles Cross-Linked with Tripolyphosphate, *Biomacromolecules*, 13, 3747–56.

[200]. Jong D., 2008, Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards, *International journal of nanomedicine*, 133.

[201]. Kazemi, M.S., Mohammadi, Z., Amini, M., Yousefi, M., Tarighi, P., Eftekhari, S., and Tehrani, M.R., 2019, Thiolated chitosan-lauric acid as a new chitosan derivative: Synthesis, characterization and cytotoxicity, *International journal of biological macromolecules*, 136, 823–30.

[202]. Patel, D., Naik, S., Chuttani, K., Mathur, R., Mishra, A.K., and Misra, A., 2013, Intranasal delivery of cyclobenzaprine hydrochloride-loaded thiolated chitosan nanoparticles for pain relief, *Journal of drug targeting*, 21, 759–69.

[203]. Kushwaha, S.K.S., Keshari, R.K., and Rai, A.K., 2011, Advances in nasal trans-mucosal drug delivery, *Journal of applied pharmaceutical science*, 21–8.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

Emine Büşra FİDAN Doktora Tezi

ORİJİNALLİK RAPORU

%7	%6	%4	%2
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%2
2	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	%1
3	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
4	www.tandfonline.com İnternet Kaynağı	<%1
5	Inderbir Singh, Vikas Rana. "Enhancement of Mucoadhesive Property of Polymers for Drug Delivery Applications", Reviews of Adhesion and Adhesives, 2013 Yayın	<%1
6	Uzun, Sibel. "Bazı Organokillerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu", Ankara Universitesi (Turkey), 2024 Yayın	<%1
7	dspace.gazi.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1

ETİK KURUL İZİN YAZISI

Uyarı: Canlı denekler üzerinde yapılan tüm araştırmalar için Etik Kurul Belgesi alınması zorunludur.

☐ **Etik Kurul izni gerekmektedir.**

☒ **Etik Kurul izni gerekmemektedir.**

Emine Büşra FİDAN
(İmza)

KURUM İZNİ YAZILARI

Uyarı: Canlı ve cansız deneklerle yapılan tüm çalışmalar için kurum izin belgelerinin eklenmesi zorunludur. Gizlilik ve mahremiyet içeren durumlarda kurum adı kapatılmalıdır.

☐ **Kurum izni gerekmektedir.**

☒ **Kurum izni gerekmemektedir.**

Öğrenci Adı SOYADI
(İmza)