



**EMBRİYONİK KÖK HÜCRE VE İNSÜLİN TAŞIYAN LİPOZOM,
NANOPARTİKÜL VE KOHLEAT FORMÜLASYONLARININ
GELİŞTİRİLEREK ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ**

Çiğdem YÜCEL

**DOKTORA TEZİ
FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

OCAK 2015

Çiğdem YÜCEL tarafından hazırlanan “Embriyonik Kök Hücre ve İnsülin Taşıyan Lipozom, Nanopartikül ve Kohleat Formülasyonlarının Geliştirilerek Etkinliğinin İncelenmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile Gazi Üniversitesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Zelihağül DEĞİM

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Başkan: Prof. Dr. Nevin ÇELEBİ

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Üye: Prof. Dr. Füsün ACARTÜRK

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Üye: Prof. Dr. Figen TIRNAKSIZ

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Üye: Prof. Dr. İmran VURAL

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Tez Savunma Tarihi: 26/01/2015

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Doktora Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....

Doç. Dr. Ufuk KOCA ÇALIŞKAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Çiğdem Yücel
26/01/2015

EMBRİYONİK KÖK HÜCRE VE İNSÜLİN TAŞIYAN LİPOZOM, NANOPARTİKÜL VE KOHLEAT FORMÜLASYONLARININ GELİŞTİRİLEREK ETKİNLİĞİNİN

İNCELENMESİ

(Doktora Tezi)

Çiğdem YÜCEL

GAZİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ocak 2015

ÖZET

Diyabet, pankreastaki beta hücrelerinden insülin yapımının yetersiz oluşu ya da üretilen insülinin yeterince etki göstermemesi nedeni ile karbonhidrat, yağ, protein metabolizmasındaki bozuklukla karakterize kronik bir hastalıktır. Diyabet tedavisindeki en önemli araçlardan biri olan insülin Langerhans adasının beta hücreleri tarafından salgınır. Diyabette bu hücreler hasar gördüğü için farklı kaynaklardan yeniden eldesi ile yeni hücrelerin oluşturulması düşüncesi kök hücre çalışmalarına hız kazandırmıştır. Embriyonik kök hücreler sınırsız olarak çoğalabilme yeteneğinden dolayı diyabet, miyokart enfarktüsü ve parkinson gibi hemen hemen bütün dejeneratif ve hasar görmüş dokuların yenilenmesinde kullanılabilir. Çalışmamızda, beş farklı formülasyon (lipozom, pegile lipozom, nanokohleat, pegile nanokohleat ve nanopartikül) hazırlandı. İnsülin ve fare embriyonik kök hücre ile hazırlanan lipozomal ve nanopartiküler formülasyonların glukoz ve streptozosin çözeltisi ile diyabetik hale getirilmiş pankreatik beta TC hücreleri ve farelere uygulanmasının ardından hem in vitro hem de in vivo etkinliği incelendi. Formülasyonlarda kullanılacak maddelerin farklı derişimleri için MTT testleri yapıldı. Hazırlanan lipozom, nanokohleat ve nanopartikül formülasyonlarının karakterizasyonu (morfoloji, partikül büyüklüğü, zeta potansiyel ve yükleme etkinliği) ve üç farklı sıcaklıkta (4°C ve 25°C) stabilite çalışmaları yapıldı. EKH ile hazırlanan formülasyonlarda yükleme etkinliği insülin ile hazırlanan formülasyonlardan farklı olarak hücre sayımı ve western blot yöntemi ile de analiz edilmiştir. İnsülinin pankreatik beta TC hücre kültürlerinden geçiş özellikleri, formülasyonlardan salım kinetikleri kıyaslanarak incelendi. Hücre kültürü geçiş çalışmaları sonucunda geçirgenlik katsayıları ve elektriksel dirençleri hesaplandı. İnsülin yüklü lipozomlarda en yüksek geçirgenlik katsayısı ve en düşük direnç elde edildi. Diyabetik hale getirilmiş hücrelere formülasyonların uygulanmasının ardından glukoz ve insülin miktarlarındaki değişimler kit ile ölçüldü. İn vivo çalışmalarda insülin yüklü formülasyonların i.p. uygulanmasının ardından 24 saat boyunca belirli zaman aralıklarında alınan örneklerden glukoz ve insülin miktarı tayini yapıldı. İnsülin yüklü formülasyonların aynı örnek alma zamanlarında hücre geçiş çalışmaları ile kan örnekleri arasındaki in vivo-in vitro korelasyon incelendi. İnsülin yüklü lipozomlarda en yüksek korelasyon katsayısı bulundu ($r^2=0,967$). Diyabet tedavisindeki yeni yaklaşımlardan olan kök hücre ile hazırlanan formülasyonlar hem i.p. hem de pankreas içi uygulandı ve farelerin pankreasları histopatolojik olarak incelendi. Özellikle lipozomlar ile Langerhans adacık sayısı ve kapladığı alan bakımından en yüksek sonuçlar elde edilmiş ($p<0,01$) ve bu formülasyonların diyabet tedavisinde umut vaat ettiği, tedaviye katkıda bulunacağı düşünülmüştür.

Bilim Kodu : 1020
Anahtar Kelimeler : Diyabet, Embriyonik kök hücre, pankreatik beta TC hücre, lipozom, nanopartikül, nanokohleat, insülin
Sayfa Adedi : 229
Danışman : Prof. Dr. Zelihağül DEĞİM

DEVELOPMENT AND INVESTIGATION OF EFFICIENCY OF EMBRYONIC
STEM CELL AND INSULIN-LOADED LIPOSOME, NANOPARTICLE AND
COCHLEATE FORMULATIONS

(Ph. D. Thesis)

Çiğdem YÜCEL

GAZİ UNIVERSITY

INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

January 2015

ABSTRACT

Diabetes is a chronic disease that takes place because of insufficient insulin build in the beta cells located in pancreas or inability of the insulin to act resulted in an imbalance in the carbohydrate, lipid and protein metabolism. Insulin is released by the beta cells of the islands of Langerhans that is one of the most important tools in the treatment of diabetes. Because of these cells are damaged in diabetes, the stem cell studies are increasing rapidly due to regain of beta cells from different sources. Embryonic stem cells (ESCs) because their ability to proliferate without limitation, may be used in the regeneration of damaged tissue. such as diabetes, myocardial infarction and Parkinson. In our study, we used five (liposome, Peg-liposome, nanocochleate, Peg-nanocochleate and nanoparticle) different formulations. After administration of liposomal and nanoparticulate formulations prepared with insulin and mouse embryonic stem cells to diabetic pancreatic beta TC cells and mice by glucose and streptozocin solution, activity was investigated both in vitro and in vivo. For different concentrations of the substance to be used in the formulations, MTT assays were performed. Characterisation (morphology, particle size, zeta potential and encapsulation efficiency) of liposomes, nanocochleates and nanoparticulate formulations were performed and stability was investigated under three different conditions (4°C and 25°C). Encapsulation efficiency of ECHs formulations were calculated by cell counting and were also analyzed by western blotting unlike insulin formulations. Permeation properties of insulin through pancreatic beta TC cell line, release kinetics of formulations were investigated and compared. The permeability coefficient and electrical resistance of formulations were calculated after cell culture permeation studies. The highest permeability coefficient and lowest resistance is obtained from insulin-loaded liposomes. After applying formulations to diabetic pancreatic beta TC cell, changes in glucose and insulin concentrations were measured with the kit. In in vivo studies, after the intraperitoneal administration of insulin-loaded liposome formulation, samples were assayed for glucose and insulin amounts at determined time periods during 24 hours. At the same sampling time, calculated insulin amount from cell transport studies and blood samples were examined for the in vivo-in vitro correlation. Insulin-loaded liposomes were found in the highest correlation coefficient ($r^2=0,967$). Formulations that were prepared with new approaches in the treatment of diabetes stem cells administered both intraperitoneally and intrapancreas and pancreases of mice were examined histopathologically. The highest results ($p<0,01$) were obtained with liposomes in terms of the number of islets of Langerhans and the covered area and these formulations shown promise in the treatment of diabetes, which is thought to contribute to therapy.

Science Code : 1020
Key Words : Diabetes mellitus, Embryonic stem cells, pancreatic beta TC cell line, liposome, nanoparticle, nanocochleate, insulin
Page Number : 229
Supervisor : Prof. Dr. Zelihağül DEĞİM

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren, kıymetli tecrübelerinden faydalandığım, benden hoşgörüsünü, sabrını ve güler yüzünü hiçbir zaman esirgemeyen danışmanım Sayın Prof. Dr. Zelihagül DEĞİM'e, fikirleri, samimiyeti ve tecrübeleriyle desteğini her zaman hissettiğim Sayın Prof. Dr. Tuncer DEĞİM'e, bilgi birikimlerinden faydalandığım, içten ve anlayışlı tavırlarıyla yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Füsun ACARTÜRK'e ve Sayın Prof. Dr. Nevin ÇELEBİ'ye, eğitimim boyunca desteğini gösteren Sayın Prof.Dr. Figen TIRNAKSIZ'a, Sayın Prof. Dr. Sevgi TAKKA'ya ve Sayın Doç. Dr. Zeynep Şafak TEKSİN'e, Sayın Arş. Gör. Dr. Sibel İLBASMIŞ TAMER'e, Sayın Arş. Gör. Dr. Fatmanur TUĞCU DEMİRÖZ'e, Sayın Arş. Gör. Dr. Tuba İNCEÇAYIR'a, Sayın Arş. Gör. Dr. N.Başaran MUTLU AĞARDAN'a, Sayın Arş Gör. Dr. Şeyda AKKUŞ'a, Sayın Arş. Gör. Serdar TORT'a ve Sayın Fatma ÇELİK'e, yardımlarından ötürü ŞAP Enstitüsünde görev alan Sayın Uzm. Bio. Şükran YILMAZ'a ve Dr. Can ÇOKÇALIŞKAN'a, hayatım boyunca desteklerini esirgemeyen AİLEM'e, bu tezin tüm kahrını benimle çeken ARZU ve LEVİN ablama, bu süreçte yanımda olan Sayın Doç. Dr. Yeşim AKTAŞ'a "Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı", Sayın Prof. Dr. Müberra KOŞAR'a "Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekanı" ve Sayın Arş. Gör. Gökçe ŞEKER KARATOPRAK'a "Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi", Sayın Arş. Gör. Selen İLGÜN'e "Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi" ve Sayın Arş. Gör. Berrak ALTINSOY'a "Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi" ve teze maddi destek sağlayan "112S405" kodlu proje için TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	xii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xvi
RESİMLERİN LİSTESİ	xxiv
SİMGELER VE KISALTMALAR	xxviii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Diyabet.....	5
2.1.1. Diyabetin klinik sınıflandırılması ve tanı kriterleri	6
2.1.2. Tip I ve Tip II diyabette tedavi yolları.....	8
2.2. İnsülin.....	10
2.2.1. İnsülinin fizikokimyasal özellikleri	12
2.2.2. İnsülin miktar tayini	12
2.2.3. İnsülin tipleri	12
2.2.4. İnsülin tedavisi ve tedavinin amaçları.....	13
2.2.5. Oral antidiyabetikler	14
2.3. Embriyonik Kök Hücre.....	14
2.3.1. Embriyonik kök hücrelerin eldesi	16
2.3.2. Embriyonik kök hücrelerin kullanım alanları.....	17
2.4. Lipozomlar.....	18
2.4.1. Lipozomların avantajları	19

	Sayfa
2.4.2. Lipozomların sınıflandırılması	20
2.4.3. Lipozomların hazırlanışı	20
2.4.4. Özel karakterli lipozomlar	21
2.4.5. Lipozom hazırlamada kullanılan fosfolipitler	22
2.4.6. Lipozomların özellikleri (karakterizasyonu)	23
2.4.7. Lipozomlara ilaç yüklemesi	23
2.4.8. Lipozomların hücre etki mekanizmaları	24
2.4.9. Lipozomların stabilitesi	24
2.4.10. Lipozomların tedavide kullanılışları	26
2.4.11. Lipozomların ticari preparat örnekleri	30
2.5. Kohleatlar	30
2.5.1. Kohleatların yapımında kullanılan fosfolipitler	31
2.5.2. Kohleatların avantajları	32
2.5.3. Kohleat hazırlama yöntemleri	33
2.5.4. Kohleatların kullanım alanları	34
2.5.5. Kohleatların hücre ile ilişkisi	35
2.6. Nanopartiküller	36
2.6.1. Nanopartikül hazırlamada kullanılan polimerler	37
2.6.2. Nanopartikül hazırlama yöntemleri	37
2.6.3. Nanopartiküllerin avantajları	39
2.6.4. Nanopartiküllerin tedavide kullanışı	40
2.6.5. Nanopartiküllerin in vitro karakterizasyonu	42
2.6.6. Nanopartiküllerin sterilizasyonu	43
2.6.7. Nanopartikül ticari preparat örnekleri	43
2.7. Poli laktik ko-glikolik asit (PLGA) Polimeri ve Özellikleri	44
2.8. Hücre Kültürü	45

	Sayfa
2.8.1. Pankreatik beta TC hücreleri	46
3. GEREÇ VE YÖNTEM	47
3.1. Gereç	47
3.1.1. Etkin maddeler	47
3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler	47
3.1.3 Kullanılan alet ve malzemeler	48
3.2. Yöntem	49
3.2.1. İnsülin ile yapılan çalışmalar	49
3.2.2. Embriyonik kök hücre miktar tayini yönteminin geliştirilmesi	65
3.2.3. Pankreatik hücrelerle yapılan çalışmalar	67
3.2.4. Western blot ile analiz	70
3.2.5. İnsülin ve embriyonik kök hücre ile yapılan in vivo çalışmalar ..	72
4. BULGULAR	77
4.1. İnsülin'e Ait Çalışmalarla İlgili Bulgular	77
4.1.1. UV spektrofotometrede insülinin Lowry protein miktar tayini yöntemi validasyonuna ait bulgular	77
4.1.2. Diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) analizine ait bulgular	85
4.1.3. MTT testine ait bulgular	88
4.1.4. Etkin madde içermeyen formülasyonların karakterizasyon çalışmaları	92
4.1.5. İnsülin formülasyonlarının karakterizasyon çalışmaları	96
4.1.6. Etkin madde içermeyen ve insülin yüklü formülasyonların stabilitesi	100
4.1.7. İn vitro geçiş çalışmaları	125
4.2. Embriyonik Kök Hücre'ye Ait Çalışmalarla İlgili Bulgular	137
4.2.1. UV spektrofotometrede EKH'nin Lowry protein miktar tayini yönteminin validasyonuna ait bulgular	137

Sayfa

4.2.2. EKH ile hazırlanan formülasyonların karakterizasyon çalışmalarına ait bulgular	140
4.2.3. EKH ile hazırlanan formülasyonların stabilitesine ait bulgular	145
4.3. Glukoz ve İnsülin Tayini Sonuçları	158
4.3.1. Glukoz tayini	158
4.3.2. İnsülin tayini	161
4.4. Western Blot ile Analiz Sonuçları	164
4.5. İn Vivo Çalışmalara Ait Bulgular	165
4.5.1. İnsülin yüklü formülasyonlar ile yapılan çalışmalar	165
4.5.2. EKH formülasyonları ile yapılan çalışmalar	167
4.5.3. Histopatoloji çalışmalarına ait bulgular	170
4.6. İn Vitro-İn Vivo Korelasyon Çalışmalarına Ait Bulgular	182
5. TARTIŞMA	185
5.1. İn Vitro Çalışmalara Ait Bulguların Değerlendirilmesi	185
5.1.1. Analiz yöntemlerinin seçimi	185
5.1.2. Diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) analizine ait bulguların değerlendirilmesi	186
5.1.3. MTT yöntemine ait bulguların değerlendirilmesi	186
5.1.4. İn vitro ve in vivo çalışmalarda kullanılan lipozomların karakterizasyonuna ait bulguların değerlendirilmesi	189
5.1.5. İn vitro ve in vivo çalışmalarda kullanılan nanokohleatların karakterizasyonuna ait bulguların değerlendirilmesi	191
5.1.6. İn vitro ve in vivo çalışmalarda kullanılan nanopartiküllerin karakterizasyonuna ait bulguların değerlendirilmesi	192
5.1.7. İn vitro ve in vivo çalışmalarda kullanılan formülasyonların stabilitesine ait bulguların değerlendirilmesi	195
5.1.8. İnsülinin in vitro geçiş çalışmalarına ait bulguların değerlendirilmesi	198

Sayfa

5.1.9. Glukoz ve insülin tayini sonucu elde edilen bulguların değerlendirilmesi	202
5.1.10. Western blot ile analiz sonuçlarının değerlendirilmesi	204
5.2. İn Vivo Çalışmalara Ait Bulguların Değerlendirilmesi	205
5.2.1. İnsülin yüklü formülasyonlarla yapılan in vivo çalışmalara ait bulgular	205
5.2.2. EKH'li formülasyonlarla yapılan in vivo çalışmalara ait bulgular	206
5.2.3. Histopatolojik çalışma ile elde edilen verilerin değerlendirilmesi	208
5.3. İn Vitro-İn Vivo Korelasyon Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi.....	209
6. SONUÇ.....	211
KAYNAKLAR	215
ÖZGEÇMİŞ	229

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Diyabetin sınıflandırılması	7
Çizelge 2.2. İnsülin tipleri ve etki süreleri.....	13
Çizelge 2.3. Lipozomların büyüklüklerine göre sınıflandırılması	20
Çizelge 2.4. Lipozomların hazırlanma metotlarına göre sınıflandırılması	20
Çizelge 2.5. Polimerlerin sınıflandırılması	37
Çizelge 2.6. Nanopartiküllerin hazırlanma teknikleri ve kullanılan polimer tipleri	38
Çizelge 3.1. Farelere uygulanan insülin ve EKH formülasyonları (n=3).....	73
Çizelge 4.1. İnsülinin fosfat tamponu içinde Lowry metodu uygulandıktan sonra geri elde ile hesaplanan miktarları (n=3)	78
Çizelge 4.2. İnsülinin fosfat tamponu içindeki tekrar edilebilirlik sonuçları	79
Çizelge 4.3. İnsülinin tekrar edilebilirlik sonuçları	79
Çizelge 4.4. İnsülinin fosfat tamponu içindeki çözeltisine (25°C) Lowry metodu uygulandıktan sonra deneyler arası kesinlik sonuçları	79
Çizelge 4.5. İnsülinin DMEM içerisindeki çözeltisine Lowry metodu uygulandıktan sonra geri elde ile hesaplanan miktarları (n=3)	83
Çizelge 4.6. İnsülinin DMEM içerisindeki tekrar edilebilirlik sonuçları	83
Çizelge 4.7. İnsülinin DMEM içerisindeki tekrar edilebilirlik sonuçları	83
Çizelge 4.8. İnsülinin DMEM içindeki çözeltisine (25°C) Lowry metodu uygulandıktan sonra deneyler arası kesinlik sonuçları	84
Çizelge 4.9. Boş formülasyonların karakterizasyon parametreleri (n=3)	93
Çizelge 4.10. İnsülin içeren formülasyonların karakterizasyon parametreleri (n=3)	97
Çizelge 4.11. Boş lipozomların stabilite verileri	101
Çizelge 4.12. İnsülin lipozomların stabilite verileri	101
Çizelge 4.13. Boş pegile lipozomların stabilite verileri	103
Çizelge 4.14. İnsülin pegile lipozomların stabilite verileri	104
Çizelge 4.15. Boş nanokohleatların stabilite verileri	106

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.16. İnsülin nanokohleatların stabilite verileri	106
Çizelge 4.17. Boş pegile nanokohleatların stabilite verileri	109
Çizelge 4.18. İnsülin pegile nanokohleatların stabilite verileri	109
Çizelge 4.19. Boş nanopartiküllerin stabilite verileri	111
Çizelge 4.20. Boş nanopartiküllerin stabilite verileri	112
Çizelge 4.21. İnsülin lipozom formülasyonu içindeki stabilitesine ait reaksiyon kinetikleri	115
Çizelge 4.22. İnsülin pegile lipozom formülasyonu içindeki stabilitesine ait reaksiyon kinetikleri	115
Çizelge 4.23. İnsülin nanokohleat formülasyonu içindeki stabilitesine ait reaksiyon kinetikleri	119
Çizelge 4.24. İnsülin pegile nanokohleat formülasyonu içindeki stabilitesine ait reaksiyon kinetikleri	119
Çizelge 4.25. İnsülin nanopartikül formülasyonu içindeki stabilitesine ait reaksiyon kinetikleri	123
Çizelge 4.26. İnsülin yüklü formülasyonların farklı sıcaklıklardaki uyum ölçütleri ve raf ömürleri	125
Çizelge 4.27. İnsülin çözeltisinin pH 7,4 fosfat tamponunda, in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi	127
Çizelge 4.28. İnsülin katyonik lipozomlardan pH 7,4 fosfat tamponunda, insülinin in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi	128
Çizelge 4.29. İnsülin yüklü pegile katyonik lipozomlardan pH 7,4 fosfat tamponunda, insülinin in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi	128
Çizelge 4.30. İnsülin yüklü nanokohleatlardan pH 7,4 fosfat tamponunda, insülinin in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi	128
Çizelge 4.31. İnsülin yüklü pegile nanokohleatlardan pH 7,4 fosfat tamponunda, insülinin in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi	129
Çizelge 4.32. İnsülin yüklü nanopartiküllerden pH 7,4 fosfat tamponunda, insülinin in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi	129
Çizelge 4.33. Pankreatik beta TC hücrelerinin geçiş deneylerinden sonraki elektriksel direnç değerlerinin ölçülmesi	134

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.34. Pankreatik beta TC hücrelerinde formülasyonlara ait k değerleri	134
Çizelge 4.35. BSA'nın geri elde ile hesaplanan miktarları (n=6).....	138
Çizelge 4.36. BSA'nın tekrar edilebilirlik sonuçları	139
Çizelge 4.37. BSA'nın tekrar edilebilirlik sonuçları	139
Çizelge 4.38. BSA'nın deneylerarası (25°C) kesinlik sonuçları.....	140
Çizelge 4.39. EKH ile hazırlanan formülasyonların karakterizasyon parametreleri (n=3).....	142
Çizelge 4.40. EKH lipozomları stabilite verileri	145
Çizelge 4.41. EKH pegile lipozomları stabilite verileri.....	147
Çizelge 4.42. EKH nanokohleatları stabilite verileri	150
Çizelge 4.43. EKH pegile nanokohleatları stabilite verileri.....	152
Çizelge 4.44.EKH nanoparikülleri stabilite verileri	155
Çizelge 4.45. Western blot ile bulunan bantların dansiteleri (%)	165
Çizelge 4.46. İnsülin yüklü formülasyonların farelere i.p. uygulanması sonucu elde edilen insülin ve % insülin konsantrasyonu-zaman grafiğinden hesaplanan AUC değerleri.....	167
Çizelge 4.47. Formülasyonların farelere pankreas içi uygulama sonrası (48 saat) değişen glukoz konsantrasyonları	167
Çizelge 4.48. Formülasyonların farelere i.p. uygulama sonrası (48 saat) değişen glukoz konsantrasyonları	168
Çizelge 4.49. Formülasyonların farelere i.p. uygulama sonrası (120 saat) değişen glukoz konsantrasyonları (5.gün).....	169
Çizelge 4.50. İnsülin çözeltisi ve insülin yüklü formülasyonların uygulanmasının ardından pankreastaki Langerhans adacıklarının kapladıkları alan ve parankimdeki doku hasarının semikantitatif analizi	170
Çizelge 4.51. EKH formülasyonlarının ve insülin yüklü lipozomun i.p. uygulama sonrası (2. gün) pankreastaki Langerhans adacıklarının kapladıkları alan ile parankimdeki doku hasarının semikantitatif analizi	175

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.52. EKH formülasyonlarının ve insülin yüklü lipozomun i.p. uygulama sonrası (5. gün) pankreastaki Langerhans adacıklarının kapladıkları alan ile parankimdeki doku hasarının semikantitatif analizi	176
Çizelge 4.53. EKH formülasyonlarının pankreas içi uygulanmasının ardından pankreastaki Langerhans adacık sayısı ve parankimdeki doku hasarının semikantitatif analizi (2.gün)	178

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Çeşitli kaynaklardan elde edilen ada ve beta hücreleri transplante edilmektedir	9
Şekil 2.2. İnsülinin iki polipeptit zincirinden oluşan kimyasal yapısı	10
Şekil 2.3. İnsülin salınma mekanizması	11
Şekil 2.4. Embriyonik kök hücre (ATCC)	15
Şekil 2.5. Bölünme ve farklılaşma evrelerine göre embriyonik kök hücreler	17
Şekil 2.6. Lipozomun üç boyutlu yapısı	18
Şekil 2.7. Lipozom ve hücre membranı yapı benzerliği	19
Şekil 2.8. Lipozom ile hücreler arasındaki farklı etkileşim çeşitleri	24
Şekil 2.9. Liyofilizasyon işlemi sırasında kullanılan kriyoprotektanların lipozom stabilitesi üzerindeki etkisi	26
Şekil 2.10. Kohleat yapısının şematik gösterimi	30
Şekil 2.11. Lipozom ve kohleat özelliklerinin karşılaştırılması	31
Şekil 2.12. Kohleatın hücre membranı ile ilişkisi	36
Şekil 2.13. Nanokapsül ve nanoküre modelleri	36
Şekil 2.14. Nanopartiküle bağlanan farklı işlevleri olan gruplar (1: polimerik nanopartiküler matriks yapı içerisindeki boş alanlar, 2: Polimerik nanopartiküler matriks içinde yer alan etkin madde molekülleri, 3: Nanopartiküler taşıyıcının yüzeyine bağlanarak kan dolaşımında daha uzun süre kalmasını sağlayan PEG gibi sterik yapılı koruyucu polimer kaplama, 4: Hedefleme kısmı, 5: Tanı, görüntüleme amaçlı bağlanmış görüntüleme parçası)	39
Şekil 3.1. MTT reaksiyonunun kimyasal gösterimi	53
Şekil 4.1. İnsülin'e ait pH 7,4 fosfat tamponu içerisindeki 600-800 nm arası dalga boyu taraması (756nm)	77
Şekil 4.2. İnsülin'in fosfat tamponu içinde UV spektrofotometre yöntemiyle elde edilen kalibrasyon grafiği (n=6)	78
Şekil 4.3. DOPE (a), DOPS (b) ve PLGA (c)'ya ait dalga boyu taraması	80
Şekil 4.4. İnsüline'e ait distile su içerisindeki dalga boyu taraması (754nm)	81

Şekil	Sayfa
Şekil 4.5. İnsüline'e ait DMEM içerisindeki dalga boyu taraması (754nm).....	82
Şekil 4.6. İnsülin'in DMEM içerisinde UV spektrofotometre yöntemiyle elde edilen kalibrasyon grafiği (n=6).....	82
Şekil 4.7. DOPE (a), DOPS (b) ve PLGA (c)'ya ait dalga boyu taraması.....	84
Şekil 4.8. Kolesterol ve insülin (1:1) karışımlarının DSC termogramı	85
Şekil 4.9. PEG-PE2000 ve insülin (1:1) karışımlarının DSC termogramı.....	86
Şekil 4.10. DOPE ve insülin (1:1) karışımlarının DSC termogramı	86
Şekil 4.11. PVA ve insülin (1:1) karışımlarının DSC termogramı	87
Şekil 4.12. DOPS ve insülin (1:1) karışımlarının DSC termogramı	87
Şekil 4.13. PLGA ve insülin (1:1) karışımlarının DSC termogramı	88
Şekil 4.14. CaCl ₂ ve insülin (1:1) karışımlarının DSC termogramı	88
Şekil 4.15. İnsülin çözeltisinin pankreatik beta TC hücrelerindeki MTT testi sonuçları	89
Şekil 4.16. Benzalkonyum klorürün pankreatik beta TC hücrelerindeki MTT testi sonuçları.....	89
Şekil 4.17. Boş lipozom formülasyonunun DMEM içerisindeki farklı yüzdelerinin pankreatik beta TC hücrelerindeki MTT testi sonuçları	90
Şekil 4.18. Boş pegile lipozom formülasyonunun DMEM içerisindeki farklı yüzdelerinin pankreatik beta TC hücrelerindeki MTT testi sonuçları	90
Şekil 4.19. Boş nanokohleat formülasyonunun DMEM içerisindeki farklı yüzdelerinin pankreatik beta TC hücrelerindeki MTT testi sonuçları	90
Şekil 4.20. Boş pegile nanokohleat formülasyonunun DMEM içerisindeki farklı yüzdelerinin pankreatik beta TC hücrelerindeki MTT testi sonuçları	91
Şekil 4.21. Boş nanopartikül formülasyonunun DMEM içerisindeki farklı yüzdelerinin pankreatik beta TC hücrelerindeki MTT testi sonuçları	91
Şekil 4.22. Streptozosin çözeltisinin pankreatik beta TC hücrelerindeki MTT testi sonuçları.....	91
Şekil 4.23. Boş lipozomlara ait partikül büyüklüğü sonuçları	101

Şekil	Sayfa
Şekil 4.24. Boş lipozomlara ait polidispersite sonuçları	102
Şekil 4.25. Boş lipozomlara ait zeta potansiyel değerleri sonuçları	102
Şekil 4.26. İnsülin lipozomlara ait partikül büyüklüğü sonuçları	102
Şekil 4.27. İnsülin lipozomlara ait polidispersite sonuçları	103
Şekil 4.28. İnsülin lipozomlara ait zeta potansiyel değerleri sonuçları	103
Şekil 4.29. Boş pegile lipozomlara ait partikül büyüklüğü sonuçları	104
Şekil 4.30. Boş pegile lipozomlara ait polidispersite sonuçları	104
Şekil 4.31. Boş pegile lipozomlara ait zeta potansiyel değerleri sonuçları	105
Şekil 4.32. İnsülin pegile lipozomlara ait partikül büyüklüğü sonuçları	105
Şekil 4.33. İnsülin pegile lipozomlara ait polidispersite sonuçları	105
Şekil 4.34. İnsülin pegile lipozomlara ait zeta potansiyel değerleri sonuçları....	106
Şekil 4.35. Boş nanokohleatlara ait partikül büyüklüğü sonuçları	107
Şekil 4.36. Boş nanokohleatlara ait polidispersite sonuçları	107
Şekil 4.37. Boş nanokohleatlara ait zeta potansiyel değerleri sonuçları	107
Şekil 4.38. İnsülin nanokohleatlara ait partikül büyüklüğü sonuçları	108
Şekil 4.39. İnsülin nanokohleatlara ait polidispersite sonuçları	108
Şekil 4.40. İnsülin nanokohleatlara ait zeta potansiyel değerleri sonuçları	108
Şekil 4.41. Boş pegile nanokohleatlara ait partikül büyüklüğü sonuçları	109
Şekil 4.42. Boş pegile nanokohleatlara ait polidispersite sonuçları	110
Şekil 4.43. Boş pegile nanokohleatlara ait zeta potansiyel değerleri sonuçları	110
Şekil 4.44. İnsülin pegile nanokohleatlara ait partikül büyüklüğü sonuçları	110
Şekil 4.45. İnsülin pegile nanokohleatlara ait polidispersite sonuçları	111
Şekil 4.46. İnsülin pegile nanokohleatlara ait zeta potansiyel değerleri sonuçları	111
Şekil 4.47. Boş nanopartiküle ait partikül büyüklüğü sonuçları	112
Şekil 4.48. Boş nanopartiküle ait polidispersite sonuçları	112

Şekil	Sayfa
Şekil 4.49. Boş nanopartiküle ait zeta potansiyel değerleri sonuçları	113
Şekil 4.50. İnsülin nanopartiküle ait partikül büyüklüğü sonuçları	113
Şekil 4.51. İnsülin nanopartiküle ait polidispersite sonuçları	113
Şekil 4.52. İnsülin nanopartiküle ait zeta potansiyel değerleri sonuçları	114
Şekil 4.53. Stabilité çalışmalarında insülin lipozomlarının içindeki insülin miktarının zamana göre değişimi	114
Şekil 4.54. Stabilité çalışmalarında insülin pegile lipozomlarının içindeki insülin miktarının zamana göre değişimi	115
Şekil 4.55. Stabilité çalışmalarında insülin nanokohleatlarının içindeki insülin miktarının zamana göre değişimi	118
Şekil 4.56. Stabilité çalışmalarında insülin pegile nanokohleatlarının içindeki insülin miktarının zamana göre değişimi	119
Şekil 4.57. Stabilité çalışmalarında insülin nanopartiküllerinin içindeki insülin miktarının zamana göre değişimi	122
Şekil 4.58. İnsülin çözeltisinden pH 7,4 fosfat tamponunda diyaliz membrandan 37°C'deki salım profili (n=3)	125
Şekil 4.59. İnsülin lipozom ve pegile lipozomlardan pH 7,4 fosfat tamponunda diyaliz membrandan 37°C'deki insülin çözeltisi ile karşılaştırmalı insülin salım profili (n=3) (çözelti-lipozom, pegile lipozom $p<0,02$)	126
Şekil 4.60. İnsülin nanokohleat ve pegile nanokohleatlardan pH 7,4 fosfat tamponunda diyaliz membrandan 37°C'deki insülin çözeltisi ile karşılaştırmalı insülin salım profili (n=3) (çözelti-nanokohleat, pegile nanokohleat $p<0,002$)	126
Şekil 4.61. İnsülin nanopartiküllerden pH 7,4 fosfat tamponunda diyaliz membrandan 37°C'deki insülin çözeltisi ile karşılaştırmalı insülin salım profili (n=3) (çözelti-nanopartikül $p<0,001$)	127
Şekil 4.62. Hücre içermeyen membranda insülin çözeltisi geçişi (n=6)	130
Şekil 4.63. Hücre içermeyen membranda lipozom ve pegile lipozomlardan insülin çözeltisi ile karşılaştırmalı insülin geçişi (n=6) (çözelti-lipozom ve pegile lipozom, $p<0,0001$)	130
Şekil 4.64. Hücre içermeyen membranda nanokohleat ve pegile nanokohleatlardan insülin çözeltisi ile karşılaştırmalı insülin geçişi (n=6) (çözelti- nanokohleat-pegile nanokohleat, $p<0,0001$)	131

Şekil	Sayfa
Şekil 4.65. Hücre içermeyen membranda nanopartiküllerden insülin çözeltisi ile karşılaştırmalı insülin geçişi (n=6) (çözelti-nanopartikül, $p<0,01$).....	131
Şekil 4.66. Pankreatik beta TC hücrelerinden insülin çözeltisi geçişi (n=6)	132
Şekil 4.67. Lipozom ve pegile lipozomlardan insülinin üzerinde pankreatik beta TC hücreleri bulunan polikarbonat membrandan geçişi(n=6) ($p<0,001$).....	132
Şekil 4.68. Nanokohleat ve pegile nanokohleatlardan insülinin üzerinde pankreatik beta TC hücreleri bulunan polikarbonat membrandan geçişi (n=6) ($p<0,01$).....	133
Şekil 4.69. Nanopartiküllerden insülinin üzerinde pankreatik beta TC hücreleri bulunan polikarbonat membrandan geçişi (n=6) ($p<0,001$).....	133
Şekil 4.70. Pankreatik beta TC hücrelerinde insülin çözeltisine ait k değerinin hesaplanmasına ait grafik	135
Şekil 4.71. Pankreatik beta TC hücrelerinde insülin lipozomlarına ait k değerinin hesaplanmasına ait grafik.....	135
Şekil 4.72. Pankreatik beta TC hücrelerinde insülin pegile lipozomlarına ait k değerinin hesaplanmasına ait grafik.....	135
Şekil 4.73. Pankreatik beta TC hücrelerinde insülin nanokohleatlarına ait k değerinin hesaplanmasına ait grafik.....	136
Şekil 4.74. Pankreatik beta TC hücrelerinde insülin pegile nanokohleatlarına ait k değerinin hesaplanmasına ait grafik.....	136
Şekil 4.75. Pankreatik beta TC hücrelerinde insülin nanopartiküllerine ait k değerinin hesaplanmasına ait grafik	136
Şekil 4.76. BSA'nın fosfat tamponu içerisindeki çözeltisine Lowry metodunun uygulanmasının ardından dalga boyu taraması (759 nm).....	137
Şekil 4.77. BSA'nın fosfat tamponu içindeki çözeltisine Lowry metodu uygulanması sonrası UV yöntemiyle elde edilen kalibrasyon grafiği (n=6).....	138
Şekil 4.78. EKH lipozomları partikül büyüklüğü sonuçları	146
Şekil 4.79. EKH lipozomları polidispersite değerleri sonuçları	146
Şekil 4.80. EKH lipozomları zeta potansiyel değerleri sonuçları	146
Şekil 4.81. EKH pegile lipozomları partikül büyüklüğü sonuçları	147

Şekil	Sayfa
Şekil 4.82. EKH pegile lipozomları polidispersite değerleri sonuçları	147
Şekil 4.83. EKH pegile lipozomları zeta potansiyel değerleri sonuçları	148
Şekil 4.84. EKH nanokohleatları partikül büyüklüğü sonuçları.....	151
Şekil 4.85. EKH nanokohleatları polidispersite değerleri sonuçları.....	151
Şekil 4.86. EKH nanokohleatları zeta potansiyel değerleri sonuçları	151
Şekil 4.87. EKH pegile nanokohleatları partikül büyüklüğü sonuçları	152
Şekil 4.88. EKH pegile nanokohleatları polidispersite değerleri sonuçları	152
Şekil 4.89. EKH pegile nanokohleatları zeta potansiyel değerleri sonuçları	153
Şekil 4.90. EKH nanopartikülleri partikül büyüklüğü sonuçları	156
Şekil 4.91. EKH nanopartikülleri polidispersite değerleri sonuçları	156
Şekil 4.92. EKH nanopartikülleri zeta potansiyel değerleri sonuçları	156
Şekil 4.93. Pankreatik beta TC hücrelerinin glukoz ve streptozosin ile muamelesi sonrası artan glukoz miktarları.....	158
Şekil 4.94. Glukozlu KRB çözeltisi ile stimüle edilmiş ve insülin ile hazırlanan formülasyonlar ile 48 saat inkübasyona bırakılmış pankreatik beta TC hücrelerinden tayin edilen % glukoz miktarları	159
Şekil 4.95. Glukozlu KRB çözeltisi ile stimüle edilmiş ve EKH ile hazırlanan formülasyonlar ile 48 saat inkübasyona bırakılmış pankreatik beta TC hücrelerinden tayin edilen % glukoz miktarları	159
Şekil 4.96. Streptozosin ile inhibe edilmiş ve insülin ile hazırlanan formülasyonlar ile 48 saat inkübasyona bırakılmış pankreatik beta TC hücrelerinden tayin edilen % glukoz miktarları	160
Şekil 4.97. Streptozosin ile inhibe edilmiş ve EKH ile hazırlanan formülasyonlar ile 48 saat inkübasyona bırakılmış pankreatik beta TC hücrelerinden tayin edilen % glukoz miktarları	160
Şekil 4.98. Standart insülin çözeltileriyle yapılan kalibrasyon grafiği	161
Şekil 4.99. Pankreatik beta TC hücrelerinin glukoz ve streptozosin ile muamelesi sonrası azalan insülin miktarları	162
Şekil 4.100. Glukozlu KRB ile stimüle edilmiş ve insülin ile hazırlanan formülasyonlar ile 48 saat hücre inkübasyonu sonrası pankreatik beta TC hücrelerinden tayin edilen % insülin miktarları	162

Şekil	Sayfa
Şekil 4.101. Glukozlu KRB ile stimüle edilmiş ve EKH ile hazırlanan formülasyonlar ile 48 saat hücre inkübasyonu sonrası pankreatik beta TC hücrelerinden tayin edilen % insülin miktarları	163
Şekil 4.102. Streptozosin ile inhibe edilmiş ve insülin ile hazırlanan formülasyonlar ile 48 saat hücre inkübasyonu sonrası pankreatik beta TC hücrelerinden tayin edilen % insülin miktarları	163
Şekil 4.103. Streptozosin ile inhibe edilmiş ve EKH ile hazırlanan formülasyonlar ile 48 saat hücre inkübasyonu sonrası pankreatik beta TC hücrelerinden tayin edilen % insülin miktarları	164
Şekil 4.104. İnsülin yüklü formülasyonların farelere i.p. uygulanması sonucu elde edilen glukoz konsantrasyonu-zaman grafiği (n=6) (lipozom ve pegile lipozomlar için anlamlı olmayan fark $p>0,001$, diğer formülasyonlar için anlamlı fark $p<0,05$)	165
Şekil 4.105. İnsülin yüklü formülasyonların farelere i.p. uygulanması sonucu elde edilen insülin konsantrasyonu-zaman grafiği (n=6) (lipozom ve pegile lipozomlar için anlamlı olmayan fark $p>0,002$, diğer formülasyonlar için anlamlı fark $p<0,02$)	166
Şekil 4.106. İnsülin yüklü formülasyonların farelere i.p. uygulanması sonucu elde edilen % insülin konsantrasyonu-zaman grafiği (n=6) (lipozom ve pegile lipozomlar için anlamlı olmayan fark $p>0,002$, diğer formülasyonlar için anlamlı fark $p<0,02$)	166
Şekil 4.107. EKH formülasyonların farelere pankreas içi uygulama sonrası (48 saat) değişen glukoz konsantrasyonları (2. gün) (*kontrol grubu ile anlamlı olmayan fark $p>0,05$, **kontrol grubu ile anlamlı fark $p<0,001$)	168
Şekil 4.108. EKH formülasyonların farelere i.p. uygulama sonrası (48 saat) değişen glukoz konsantrasyonları (2. gün) (*kontrol grubu ile anlamlı olmayan fark $p>0,005$, **kontrol grubu ile anlamlı fark $p<0,001$)	169
Şekil 4.109. EKH formülasyonların farelere i.p. uygulama sonrası (120 saat) değişen glukoz konsantrasyonları (5.gün) (*kontrol grubu ile anlamlı olmayan fark $p>0,005$, **kontrol grubu ile anlamlı fark $p<0,002$)	170
Şekil 4.110. İnsülin çözeltisi için in vivo-in vitro korelasyon grafiği	182
Şekil 4.111. İnsülin lipozomları için in vivo-in vitro korelasyon grafiği	182
Şekil 4.112. İnsülin pegile lipozomları için in vivo-in vitro korelasyon grafiği	183
Şekil 4.113. İnsülin nanokohleatları için in vivo-in vitro korelasyon grafiği	183

Şekil	Sayfa
Şekil 4.114. İnsülin pegile nanokohleatları için in vivo-in vitro korelasyon grafiği.....	183
Şekil 4.115. İnsülin nanopartikülleri için in vivo-in vitro korelasyon grafiği	184

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. Pankreatik beta hücrelerinin mikroskop görüntüsü	54
Resim 3.2. Farklı konsantrasyonlardaki maddelerin DMEM içerisinde hücreye tatbik edilmesi.....	55
Resim 3.3. Ölçüm sırasında kullanılan Evom Voltmeter aleti	65
Resim 3.4. Glukoz tayini için kullanılan kit.....	68
Resim 3.5. Embriyonik kök hücrenin mikroskop görüntüsü (doku kültürü mikroskobu, Olympus IX 71)	72
Resim 3.6. Farenin çıkarılan pankreası	74
Resim 3.7. Farelere pankreas içi formülasyonların uygulanışı	74
Resim 3.8. Farelerden intrakardiyak olarak kan alınması	75
Resim 4.1. Boş lipozomların TEM görüntüleri x49000.....	94
Resim 4.2. Boş pegile lipozomların TEM görüntüleri x9300	94
Resim 4.3. Boş nanokohleatların TEM görüntüleri x11000.....	95
Resim 4.4. Boş pegile nanokohleatların TEM görüntüleri x9300	95
Resim 4.5. Boş nanopartiküllerin TEM görüntüleri x4800.....	96
Resim 4.6. İnsülin içeren lipozomların TEM görüntüleri x49000	98
Resim 4.7. İnsülin içeren pegile lipozomların TEM görüntüleri x49000	98
Resim 4.8. İnsülin içeren nanokohleatların TEM görüntüleri x18500.....	99
Resim 4.9. İnsülin içeren pegile nanokohleatların TEM görüntüleri (oklar: pegilasyon görüntüsü) x18500	99
Resim 4.10. İnsülin içeren nanopartiküllerin TEM görüntüleri x2900	100
Resim 4.11. Altı aylık stabilite çalışması süresinin sonunda +4°C'de saklanan, insülin lipozom formülasyonlarının TEM görüntüleri x68000	116
Resim 4.12. Altı aylık stabilite çalışması süresinin sonunda +4°C'de saklanan, insülin pegile lipozom formülasyonlarının TEM görüntüleri (oklar: pegilasyon görüntüsü) x120000	117

Resim	Sayfa
Resim 4.13. Altı aylık stabilite çalışması süresinin sonunda +25°C'de saklanan, insülin lipozom formülasyonlarının TEM görüntüleri x120000	117
Resim 4.14. Altı aylık stabilite çalışması süresinin sonunda +25°C'de saklanan, insülin pegile lipozom formülasyonlarının TEM görüntüleri x150000	118
Resim 4.15. Altı aylık stabilite çalışması süresinin sonunda +4°C'de saklanan, insülin nanokohleat formülasyonlarının TEM görüntüleri x30000	120
Resim 4.16. Altı aylık stabilite çalışması süresinin sonunda +4°C'de saklanan, insülin pegile nanokohleat formülasyonlarının TEM görüntüleri x13000	121
Resim 4.17. Altı aylık stabilite çalışması süresinin sonunda +25°C'de saklanan, insülin nanokohleat formülasyonlarının TEM görüntüleri x30000	121
Resim 4.18. Altı aylık stabilite çalışması süresinin sonunda +25°C'de saklanan, insülin pegile nanokohleat formülasyonlarının TEM görüntüleri x13000	122
Resim 4.19. Altı aylık stabilite çalışması süresinin sonunda +4°C'de saklanan, insülin nanopartikül formülasyonlarının TEM görüntüleri x30000	124
Resim 4.20. Altı aylık stabilite çalışması süresinin sonunda +25°C'de saklanan, insülin nanopartikül formülasyonlarının TEM görüntüleri x30000	124
Resim 4.21. EKH lipozomların TEM görüntüleri x9300	143
Resim 4.22. EKH pegile lipozomların TEM görüntüleri x6800	143
Resim 4.23. EKH nanokohleatların TEM görüntüleri x4800	144
Resim 4.24. EKH pegile nanokohleatların TEM görüntüleri x11000	144
Resim 4.25. EKH nanopartiküllerin TEM görüntüleri (oklar: nanopartiküller) x4800	145
Resim 4.26. Altı aylık stabilite çalışması süresinin sonunda +4°C'de saklanan, EKH lipozom formülasyonlarının TEM görüntüleri x68000	148
Resim 4.27. Altı aylık stabilite çalışması süresinin sonunda +4°C'de saklanan, EKH pegile lipozom formülasyonlarının TEM görüntüleri x98000	149

Resim	Sayfa
Resim 4.28. Altı aylık stabilite çalışması süresinin sonunda +25°C'de saklanan, EKH lipozom formülasyonlarının TEM görüntüleri x180000	149
Resim 4.29. Altı aylık stabilite çalışması süresinin sonunda +25°C'de saklanan, EKH pegile lipozom formülasyonlarının TEM görüntüleri x180000	150
Resim 4.30. Altı aylık stabilite çalışması süresinin sonunda +4°C'de saklanan, EKH nanokohleat formülasyonlarının TEM görüntüleri x4800	153
Resim 4.31. Altı aylık stabilite çalışması süresinin sonunda +4°C'de saklanan, EKH pegile nanokohleat formülasyonlarının TEM görüntüleri x11000	154
Resim 4.32. Altı aylık stabilite çalışması süresinin sonunda +25°C'de saklanan, EKH nanokohleat formülasyonlarının TEM görüntüleri x30000	154
Resim 4.33. Altı aylık stabilite çalışması süresinin sonunda +25°C'de saklanan, EKH pegile nanokohleat formülasyonlarının TEM görüntüleri x11000	155
Resim 4.34. Altı aylık stabilite çalışması süresinin sonunda +4°C'de saklanan, EKH nanopartikül formülasyonlarının TEM görüntüleri x49000	157
Resim 4.35. Altı aylık stabilite çalışması süresinin sonunda +25°C'de saklanan, EKH nanopartikül formülasyonlarının TEM görüntüleri x49000	157
Resim 4.36. Glukozun değişen konsantrasyonuna bağlı olarak oluşan renk değişimi.....	161
Resim 4.37. EKH ile yapılan formülasyonlardan western blot sonrası elde edilen bantlar	164
Resim 4.38. Kontrol grubu (hiçbir işlem yapılmamış) fare pankreasındaki normal ölçüdeki bir Langerhans adacığı X 20.	171
Resim 4.39. STZ uygulanan fare pankreasındaki Langerhans adacıklarındaki beta hücrelerinde vakuoler dejenerasyon (oklar) X 40	172
Resim 4.40. İnsülin yüklü lipozom grubundaki fare pankreasındaki normal ölçüdeki Langerhans adacığı X 20.	172
Resim 4.41. İnsülin yüklü pegile lipozom uygulanan gruptaki normal ölçüde Langerhans adacığı ve sentroasiner hücre çekirdeklerinde piknoz ile karakterize dejenerasyon (oklar) ve nekroz X 20.....	173

Resim	Sayfa
Resim 4.42. İnsülin yüklü nanokohleat uygulanan gruptaki Langerhans adacığı ve pankreası çevreleyen yağ dokuda çoğunluğunu mononükleer hücrelerin oluşturduğu yangı hücresi infiltrasyonu X 10.	173
Resim 4.43. İnsülin yüklü pegile nanokohleat grubundaki fare pankreasındaki Langerhans adacığı X 40.	174
Resim 4.44. İnsülin yüklü nanopartikül grubundaki fare pankreasındaki normal ölçüdeki bir Langerhans adacığı X 20.	174
Resim 4.45. EKH lipozomu 5.gun grubundaki fare pankreasında normal ölçülerdeki bir Langerhans adacığı X 10.	177
Resim 4.46. EKH pegile nanokohleatı 5. gün grubundaki fare pankreas parankiminde görülen Langerhans adacıkları X 10.	177
Resim 4.47. EKH'nin kendisi süspande halde pankreas içi uygulama grubundaki fare pankreasındaki bir parankiminde nötrofil lökosit infiltrasyon ile sentroasiner hücrelerde dejenerasyon (oklar) X 20.	179
Resim 4.48. EKH lipozomunun pankreas içi uygulanan fare pankreasındaki oluşan dejenerasyon (oklar) X 20.	179
Resim 4.49. EKH pegile lipozomunun pankreas içi uygulanan fare pankreasındaki oluşan dejenerasyon (oklar) X 20.	180
Resim 4.50. EKH nanokohleatının pankreas içi uygulama grubundaki fare pankreasındaki bir parankiminde nötrofil lökosit infiltrasyon ile sentroasiner hücrelerde dejenerasyon (oklar) X 20.	180
Resim 4.51. EKH pegile nanokohleatının pankreas içi uygulama grubundaki fare pankreasındaki yaygın dejenerasyon, nekroz ve şiddetli nötrofil lökosit infiltrasyonuna yol açan nanokohleat parçacığı (oklar) X 20.	181
Resim 4.52. EKH nanopartikülünün pankreas içi uygulama grubundaki fare pankreasında sentroasiner hücreler ile tubuluslarında dejenerasyon ve nekroz (oklar) X 20.	181

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
CaCl₂	Kalsiyum klorür
IU	International (Uluslararası) Ünite
µm	Mikrometre
nm	Nanometre
λ_{maks}	Maksimum dalga boyu
Kısaltmalar	Açıklama
BSA	Bovin Serum Albümin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DOPE	Dioleyil fosfatidil etanolamin
DOPS	Dioleyil fosfatidil serin
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
EKH	Embriyonik Kök Hücre
KDa	Kilodalton
KRB	Krebs-Ringer Bikarbonat
MTT	3-(4,5-dimetilthiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium bromit
NaTC	Sodyum Taurokolat
PEG	Poli Etilen Glikol
PEG-PE2000	Poli Etilen Glikol-Fosfatidil Etanolamin 2000
PLA	Poli laktik asit
PGA	Poli glikolik asit
PLGA	Poli laktik ko-glikolik asit
PVA	Polivinil alkol

1. GİRİŞ

Diabetes mellitus, insülinin yetersiz miktarda üretilmesi veya üretilen insülinin periferik dokularda etkisini gösterememesi sonucu ortaya çıkan karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasındaki bozuklukla karakterize [1], kronik bir metabolizma hastalığıdır. Diyabet insülin bağımlı Tip I ve insülin bağımsız Tip II diyabeti olmak üzere iki tiptedir. Tip II diyabette Langerhans adacıklarının beta hücresi hasar gördüğü için insülin yetmezliği ya da yokluğu gözlenir.

İnsülin, pankreastaki beta hücrelerinde salgılanan bir hormon olup Langerhans adacık hücrelerinin % 70-80'ini oluşturur. Beta hücrelerinin temel fonksiyonu, vücuttaki tüm dokuların fonksiyonları için besinlere, hormonlara, sinirsel stimülasyonlara yanıt olarak plazmadaki glukozun fizyolojik oranının devamlılığını sağlamak amacıyla yeterli biyoaktif insülinin salımıdır. Bu beta hücrelerinin yıkımı sonucunda ise insülin yetmezliği gözlenir. İnsülin, diyabet tedavisindeki en önemli araçlardan biridir. İnsülinin temini ve tedavisinin kolay uygulanır olması sonucu, diyabet tedavisinde aldığı yer ve önem giderek artmıştır. Ancak insülinin mevcut uygulama yolu parenteral yoldur. Oral yoldan uygulanamaması ve sadece parenteral olarak uygulanması tedavide yeni arayışlara yönelmesine neden olmuştur. Bunun yanında, beta hücrelerinin farklı kaynaklardan yeniden elde edilmesi ile ya da olgun hücrelerin replikasyonu ile yeni hücrelerin oluşturulması düşüncesi sonucu diyabette insülin tedavisine alternatif olarak kök hücre çalışmaları önem kazanmıştır.

Embriyonik kök hücreler (EKH), kendini yenileyen, onaran hücrelerdir ve özel immünolojik ve mekanik yöntemler kullanılarak iç hücre kütesinden elde edilirler [37]. İç hücre kütesi denen tabaka embriyonun gelişiminde son derece önemli bir role sahiptir; bir yetişkinin vücudunda bulunan tüm tabakaların kaynağı olan üç temel embriyonik tabakanın (ektoderm, endoderm ve mezoderm) öncüsüdür. Hücre kaybına bağlı gelişen hastalıklarda kullanılan ve sınırsız olarak çoğalabilen bu embriyonik kök hücreler, dejeneratif ve hasar görmüş dokuların yenilenmesinde kullanılırlar. Diyabet tedavisinde öne çıkan kök hücreler, hücre replasman tedavisi olarak önemli bir kaynak oluştururlar.

Mikro ve nanopartiküler ilaç şekilleri konvansiyonel ilaç şekilleriyle sağlanan tedavi etkinliğinin artırılması, tedavide kullanılan terapötik dozun ve yan etkilerinin azaltılması amacıyla üzerinde yoğun olarak çalışılan bir gruptur. Hastanın yaşam kalitesini artırmak, daha düşük dozda, dozlama aralığını uzatarak yan ve zararlı etkilerden arınmak amacını karşılayacak olan nano ve mikropartiküler sistemler ile kontrollü salım sistemlerinin kullanımı artmıştır. Çalışmamızda üç farklı ilaç taşıyıcı sistem hazırlanmıştır. Hazırlanan ilaç taşıyıcı sistemlerin ilki olan lipozomlar, 0,02-3,5 µm çapında lipit çift tabaka ve sulu fazdan oluşan küresel veziküllerdir. Lipozomlar, vücudun yapı taşı olan fosfolipitlerden oluştukları için biyolojik olarak yıkılırlar ve biyomembranlara benzerlik göstermeleri sayesinde biyogeçimli ve biyoparçalanabilir özelliktedirler. Diğer taşıyıcı sistem, nanokohleatlar, lipit bazlı, stabil, silindirik, katı lipit bilayer tabaka taşıyan sistemlerdir. Nanokohleat formülasyonların makromoleküllere ve küçük molekül yapıdaki, çok çeşitli ilaçlara uygulanabilir olduğu ve düşük olan biyoyararlanımı iyileştirdiği için protein, peptit, nükleik asit ve diğer duyarlı biyofarmasötik moleküllerin stabilizasyonu için önemli ilaç taşıyıcı sistemlerdir. Hazırlanan bir diğer formülasyon olan nanopartiküller, çözünmüş, hapsedilmiş veya adsorbe olan etkin maddeyi kontrollü olarak salan, nanometre boyutlarında katı kolloidal partiküllerdir. Nanopartiküller biyolojik olarak parçalanmanın yanında biyoyumlu, toksik olmayan, yapımında doğal ve sentetik polimerlerin kullanıldığı, yüksek ilaç yükleme kapasitesine sahip taşıyıcı sistemlerdir.

Tez çalışmamızda hücre kültürü çalışmaları önemli bir yer tutmaktadır. Pankreatik beta TC hücreleri (insülin salan hücreler) tezimizin in vitro çalışmalarında büyük bir yer kaplamaktadır.

Hücre kültürü, hücrelerin kontrollü koşullar altında canlılık özellikleri korunarak yaşatılmasına dayanan bir laboratuvar işlemi olup in vivo-in vitro arası özellik gösterirler. Hücre kültürü çalışmalarının in vivo korelasyonunun yüksek olması da önemli bir avantajdır. Günümüzde ilaç absorpsiyonunun in vitro olarak değerlendirilmesinde de yaygın olarak kullanılan sistemlerdir. Hücre kültürü çalışmalarında pankreatik beta hücreler kullanılmıştır. Bu hücreler, insülin salımını sağlayan hücrelerdir.

Yukarıda verilen bilgiler ışığında çalışmamızda insülin ve embriyonik kök hücre ile lipozom, nanokohleat ve nanopartikül formülasyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan bu formülasyonlar glukoz ve streptozosin ile diyabetik hale getirilmiş pankreatik beta TC hücreleri ile inkübe edilmiş, formülasyon etkinlikleri ölçülen glukoz miktarına ve insülin salımına göre in vitro olarak değerlendirilmiştir. Bulunan sonuçlar in vivo deneyler ile de desteklenmiştir.

Hücre kültürü çalışmalarına başlamadan önce formülasyonlarda kullanılacak insülinin, formülasyonlarda kullanılan lipit ve polimerlerin hücre canlılığı üzerine etkilerini incelemek amacıyla sitotoksite çalışması yapılmıştır. Formülasyonlarda kullanılacak madde miktarlarına bu şekilde karar verilmiştir.

Bu çalışmada amacımız, pankreastaki beta hücrelerinden salınan insülinin yetersizliği ya da üretilen insülinin yeterince etki gösterememesi nedeniyle görülen diyabet hastalığında kullanmak üzere, güçlü bir tedavi aracı olarak kabul edilen embriyonik kök hücrelerin yeni geliştirilen lipozomal, nanokohleat ve nanopartiküler yapıdaki ilaç taşıyıcı sistemlerinin insülin yüklü lipozomal, nanokohleat ve nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler ile karşılaştırılmalı olarak etkisini incelemektir.

Hazırlanan lipozom, nanopartikül ve nanokohleat formülasyonlarının:

- Pankreatik beta TC hücrelerinden geçişleri, çözelti formülasyonlarıyla kıyaslamalı olarak incelenmesi,
- Diyaliz membranından geçişi, çözelti formülasyonlarıyla kıyaslamalı olarak incelenmiştir. Formülasyonlardan insülinin salım kinetik özelliklerinin araştırılması,
- Embriyonik kök hücre ile hazırlanan lipozom, nanopartikül ve nanokohleat formülasyonlarının yükleme etkinliklerinin ve stabiliteilerinin incelenmesi,
- Embriyonik kök hücre ve insülin ile hazırlanan bu formülasyonların diyabetik hale getirilmiş pankreatik beta TC hücreleri ve diyabet oluşturulan fareler

zerindeki iyileştirici etkilerinin in vitro, in vivo ve histopatolojik olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Diyabet

Diyabet, Langerhans adasının pankreatik beta hücrelerinden salınan insülin sekresyonunda ya da insülin aktivitesinde azalma sonucu gözlenen, vücudun karbonhidrat, yağ ve proteinlerden yeterince faydalanamadığı ve idrardan glukoz atılımı ile karakterize olan, sürekli bakım gerektiren bir hastalıktır. Dünya genelinde en hızla artan hastalıklardan biri olup hala tam bir tedavi şekli bulunamamıştır [1,2,17].

Glukoz insan kanında bulunan en önemli monosakkarittir. Glukoz insan ve hayvan dokularının enerjisini sağlar. Diyabette, artan glukozu karşı düzenli glisemik kontrol şarttır. Diyabet tedavisinde en çok tercih edilen, insülin replasman tedavisidir ve iyi bir glisemik kontrol sağlar. Çocuklarda daha sık görülen tip (Tip 1 diyabet), juvenil tip diyabet olarak da tanımlanmaktadır ve mutlak insülin eksikliği vardır. Hücrelerde glukozun aktif alımında hücre zarındaki alıcı reseptör yetersizliği olan tip ise (Tip II diyabet), erişkinlerde daha çok görülür. Tip II diyabette etkiler yaşa bağlı olup diyabetik genetik ve aşırı kilo ile ilişkilidir [3-8].

Tip I diyabette insülin eksikliği gözlenirken, Tip II diyabet insülin direnci ile karakterize olup her ikisinde de enerji metabolizmasında bozulma gözlenir. Bu değişikliklerin hepsi ikincil hastalıklara neden olur ki bunlar; kardiyovasküler rahatsızlıklar, diyabetik retinopati, nefropati ve nöropatidir [9]. Ayrıca diyabetli hastalarda tükürük salgısının azalması ve koyulaşması nedeniyle tükürüğün dişleri yıkayıcı etkisi kaybolmaktadır ve diyabetin periodontitis gibi bakteriyel enfeksiyonlar için yüksek risk grubu olduğu belirtilmiştir [2].

Tüm diyabet vakalarının % 80'ini oluşturan Tip II diyabetin toplumumuzda % 2-5 civarında görülmekte olduğu tahmin edilmektedir. Özellikle yaşam tarzı büyük ölçüde değişikliğe uğramış ülkemiz gibi endüstrileşmekte ve gelişmekte olan ülkelerde Tip II diyabetin görülme sıklığı artmaktadır [10].

Diyabet gelişmekte olan ÷lkelerde yaklaşık olarak % 5, gelişmiş ÷lkelerde ise % 10 oranında gör÷lmektedir. Sıklığı yaşla birlikte artar. Ayrıca her ge÷en gün diyabete bağlı hastalık ve öl÷m oranı da artmaktadır. ABD’de öl÷m nedenleri arasında diyabet üç÷nc÷ sıradadır. Yaşam süresi, 40-49 yaşları arasında diyabet ortaya çıkanlarda 7-10 yıl, 60-69 yaşları arasında ortaya çıkanlarda ise 3-5 yıl kısalmaktadır. Türkiye Diyabet Epidemiyolojisi (TUDEP) çalışmasında diyabet sıklığı 20-80 yaş grubunda % 7,2 olarak belirlenmiştir. Ayrıca Dünya Sağlık Örg÷tü (WHO) tarafından günümüzde dünyada 240 milyon insanın diyabetli olduğu belirtilmiştir [11]. Diyabet, ayrıca çok sayıda ve seçilmiş bazı merkezlerde yapılan çalışma sonuçlarına göre toplumsal tedavi, tanı ve hizmet giderleri nedeniyle çok sayıda dolaylı maliyet getiren bir hastalıktır [12].

Diyabetin gör÷lme sıklığını etkileyen başlıca faktörler, yaşanan coğrafya, yaş ve cinsiyet, genetik faktörler, obezite, gebelik ve çevre koşulları (dengesiz beslenme, enfeksiyon, bilinçsiz ilaç kullanımı vb.) şeklinde sıralanabilir [10].

2.1.1. Diyabetin klinik sınıflandırılması ve tanı kriterleri

Diyabeti, “İnsüline bağımlı diyabet” ve “İnsüline bağımlı olmayan diyabet” olarak sınıflandırmak mümkün olsa da tedaviye dayalı bir sınıflamayı yansıttığı ve karışıklığa yol açtığı için pek kullanılmamaktadır. Yerine Tip I ve Tip II diyabet tanımları kullanılmaktadır. Bunların dışında çok çeşitli sebeplerle gözlenen diyabet türleri vardır (Çizelge 2.1) [10].

- Tip I; ketoasidoza eğilimli, idiyopatik ya da otoimmün kaynaklı beta hücre hasarı sonucu gelişen diyabet vakalarını kapsar.
- Tip II; daha yaygın olan, insülin sekresyon defekti ile insülin rezistansının bir arada etkili olduğu diyabet formlarının dahil olduğu diyabet grubudur [12].

Tip I diyabet, diğer bir ifadeyle, insülin bağımlı diyabet, pankreatik adacıktan insülin salan beta hücrelerinin yıkımı neticesinde meydana gelmektedir. Beta hücrelerinin yıkımının ardından insülin üretilmemesi sonucu, glukoz hücrelere giremez ve kanda birikimi gözlenir. Diğer diyabet türü olan Tip II diyabette ise kas, yağ ve karaciğerde insülin direnci gözlenir ve Tip I’e nazaran on kat daha fazla

görülme sıklığı vardır. Vücuttaki insülin etkin olarak kullanılamadığında Tip II diyabet gözlenir. Her iki diyabette de sonuçta Langerhans adasının beta hücreleri hasar gördüğü için insülin yetmezliği ya da yokluğu söz konusudur [6,13,14].

Ayrıca yatkınlığı olan kişilerde, gebelikte üretilen bazı hormonlara ve metabolik yükteki artışa bağlı olarak gebelik sırasında ortaya çıkan gestasyonel (gebelik) diyabeti de gözlenebilir. Bu tip diyabette, kan şekeri hamilelik sonrasında genellikle normale döner. Ancak bu kişilerin yaklaşık % 40'ında, sonraki 15 yıl içerisinde Tip II diyabet gelişebilmektedir [10,14].

Çizelge 2.1. Diyabetin sınıflandırılması

Türler	Ozellikleri ve/veya nedenleri
Tip I	- İnsüline bağımlı (IDDM) - Otoimmün bozuklukla karakterize - İdiyopatik
Tip II	- İnsüline bağımlı olmayan (NIDDM) - Non-obez - Obez
Sekonder diyabet	- Endokrin hastalıklar: - Agromegali veya atrojenik nedenlere bağlı seyreden diyabet - Cushing sendromu ile ortaya çıkan diyabet - Feokromositoma - Hipertroidi - Otoimmün poliglandüler sendrom - Büyüme hormonu yetersizliği - Multipl endokrin neoplazi sendromları (MEN) - İlaçlar, kimyasal ajanlar ve toksinlerden kaynaklanan diyabet - Diüretikler - Tiazid grubu antihipertansifler - Beta adrenerejik reseptör blokerleri - Psikoaktif ajanlar - Antikonvulzifler - Antineoplastik ajanlar - Antiprotozoer ilaçlar - Pankreatik hastalıklar: - Pankreatektomi - Pankreas tümörü - Pankreatit indüklü diyabet - Malnutrisyona bağlı diyabet (J tipi diyabet) - Hemokromatozis - Genetik Sendromlar: - β-hücre fonksiyonunun genetik bozukluğunun neden olduğu diyabet - İnsülin direnci sendromları - Kistik fibroz - Glikojen depo hastalığı - İnsülin reseptör anomalilerine bağlı olarak ortaya çıkan diyabet
Gestasyonel diyabet	Gebelik diyabeti
Malnutrisyona bağlı diyabet	Beslenme bozukluklarına bağlı seyreder
Pre-diyabet	Gizli şeker

Diyabette görülen bazı semptomlar, polifaji (çok yemek yemek), polidipsi (çok su içmek), poliüri (çok idrara çıkmak), kilo kaybı (çok yemeğe karşın), kuvvet azalması, ağız kuruluğu, bulanık görme, deri enfeksiyonu ve kaşıntı, yara iyileşmesinde gecikme, baş ağrısı, halsizlik, erkeklerde iktidarsızlık (impotans) şeklinde sıralanabilir [15].

Diyabet tanısı, klasik semptomlar ve komplikasyonlar var ise kolaylıkla konabilir. Bununla birlikte erken tanı ve bazı laboratuvar yöntemlerinin doğru şekilde kullanılması, sonuçların tanı kriterlerine uygun olarak değerlendirilmesi önemlidir. Son olarak 1998 yılında Amerikan Diyabet Birliği (ADA) ve Avrupa Diyabet Politikası Belirleme Grubu (EDPG) tarafından tanı göstergeleri gözden geçirilerek geliştirmiştir [12].

2.1.2. Tip I ve Tip II diyabette tedavi yolları

Tip I diyabet tedavisinde;

- 1- İnsülin enjeksiyonları (injektör, kalem veya pompa ile uygulanabilir)
- 2- Tıbbi beslenme tedavisi
- 3- Fiziksel aktivite
- 4- Eğitim (diyabetlinin kendi kendini izlemi ve tedavisi)
- 5- Evde kan glukoz (self monitoring of blood glucose: SMBG) izlemi önerilmektedir.

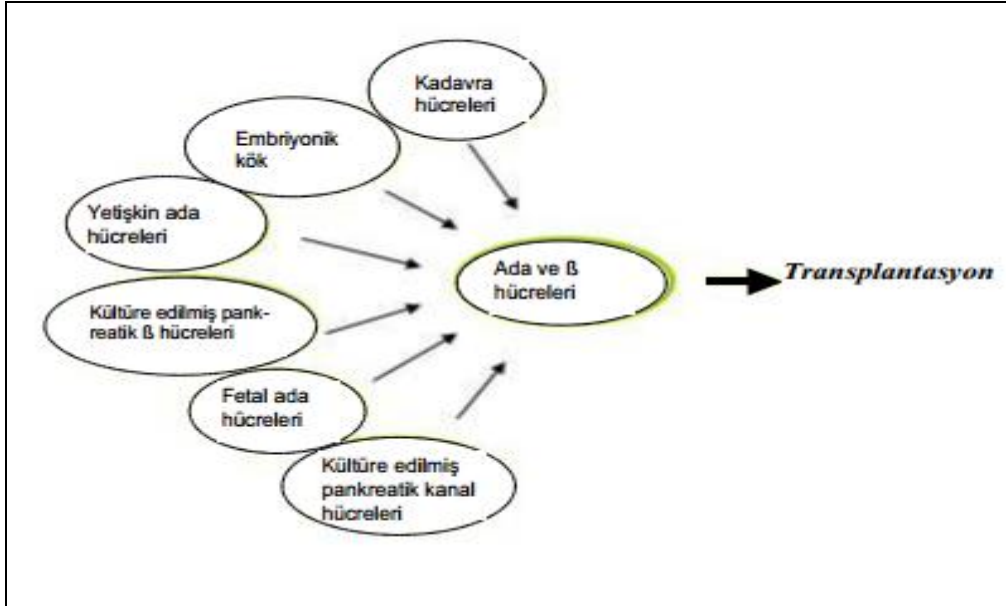
Tip II diyabet tedavisinde;

- 1- Diyet ve kilo kontrolü
- 2- Fiziksel aktivite
- 3- Oral antidiyabetik (OAD) ilaçlar (insülin duyarlılaştırıcı ilaçlar, insülin sekretogogları, alfa glukozidaz inhibitörleri) ve gerektiğinde insülin
- 4- Hasta tarafından kan glukoz izlemi (SMBG)
- 5- Eğitim (diyabetlinin kendi kendini izlemi ve tedavisi)
- 6- Eşlik eden hastalıkların (hipertansiyon; HT, dislipidemi vb.) tedavisi ve antiagreganlar

Diyabette görülen beta hücreleri hasarının tedavisinde izlenen yollardan biri de beta hücrelerinin yeni bir kaynaktan elde edilmesi ya da olgun hücrelerin replikasyonu ile yeni hücrelerin oluşturulması şeklindedir. Bu da diyabetik kök hücre çalışmalarına hız kazandırmıştır.

Günümüzde diyabet tedavisi için geleneksel insülin tedavisi yetersiz kalmaktadır. Bir diğer tedavi şekli ise endojen kaynaklı insülin eksikliğini kalıcı olarak gidermek amacıyla beta hücresi replasman tedavisidir. İzole edilen pankreatik ada hücrelerinin transplantasyonu diyabet hastalığının tedavisi için önemli bir alternatiftir.

İnsan embriyonik kök hücrelerini izole edilebilme yöntemlerinin keşfi ile birlikte Tip I ve Tip II diyabet tedavisinde yeni ümitler ortaya çıkmıştır. Diyabet tedavisinde yapay pankreas üretimi, pankreas transplantasyonu, hücre kökenli tedaviler, gen tedavileri gibi birçok yol üzerinde çalışmalar söz konusudur ve tüm bu tedavilerin temelinde beta hücresinin yerine konması yatmaktadır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Çeşitli kaynaklardan elde edilen ada ve beta hücreleri transplante edilmektedir

Yukarıda bahsedilen tedavi yollarından biri olan embriyonik kök hücrelerin kültür ortamında insülin üreten hücrelere farklılaşabildikleri gösterilmiştir [16]. Embriyonik

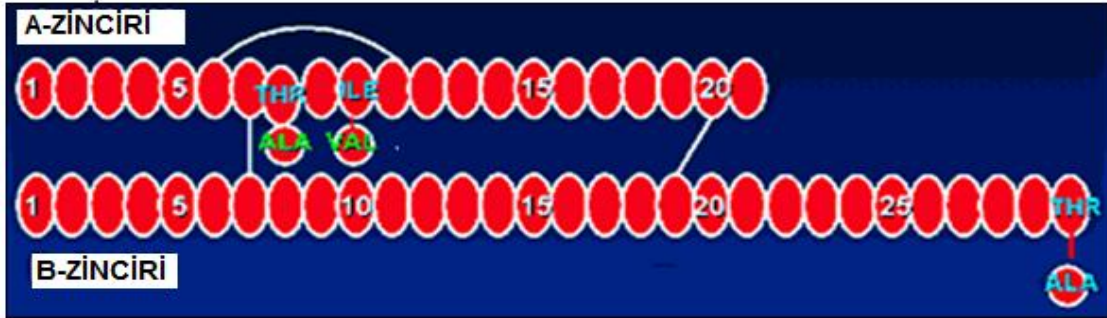
kök hücre kültürlerindeki çeşitlilikler, beta hücreleri özelliğinde hücreler üretilmesini sağlamaktadır [6,17].

2.2. İnsülin

İnsülin, polipeptit yapılı ve vücuttaki karbonhidrat ve yağ metabolizmasının düzenlenmesinde glukagon ile birlikte rol alan bir majör, anabolik hormondur [14].

İnsülin, ilk defa 1921 yılında Sir Frederick Grant Banting ve Charles Herbert Best tarafından köpeklerin pankreatik dokusundan ekstre edilen [15] ve 1955 yılında moleküller arası rekombinant teknoloji ile sentezlenen ilk proteindir [14,15,18,19].

Yapısı itibariyle insülin molekülü iki polipeptit zincirinden oluşmaktadır. A zinciri 21 aminoasitten, B zinciri 30 aminoasitten oluşmaktadır. Zincirler arası iki disülfid bağıyla bağlıdır. A zincirinde üçüncü bir disülfid bağı daha vardır (Şekil 2.2.) [15]. İnsülin yaklaşık 6 kilodalton (kDa) molekül ağırlığına sahip, 51 amino asitten oluşan diyabet tedavisinde parenteral kullanımı olan proteindir [20]. Hem asidik hem de fizyolojik pH'larda çözünür.

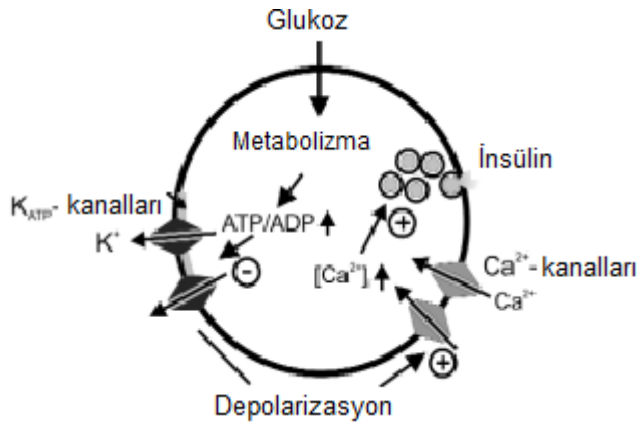


Şekil 2.2. İnsülinin iki polipeptit zincirinden oluşan kimyasal yapısı

İnsülin, midenin arka tarafına yerleşmiş pankreasın beta hücrelerinden salınan bir hormondur. Kanda serbest olarak dolaşan şekerin hücre içine girmesini sağlayarak hem kandaki şeker düzeyini normal seviyede tutar hem de yaşam için enerji sağlanmış olur. Hücrelere glukozun girişi için insülin gereklidir ve diyabetlilerde pankreas yeterli insülini üretememesi ya da üretilen insülinin vücutta etkili bir şekilde kullanılamaması gözlenir. Bu da kan şekerinin yükselmesine

neden olur. Bu durumda vücut için hayati öneme sahip olan insülinin dışarıdan sağlanması gerekmektedir [18].

İnsülinin salınımında en önemli faktör, ATP bağımlı K^+ kanallarıdır. İnsülin salınması için ATP'nin varlığı önemlidir. GLUT-II (glukoz transporter II aracılığıyla kolaylaştırılmış difüzyon) aracılığıyla beta-hücreleri içine giren glukoz, glukokinaz enzimi ile yıkılır ve hücre içinde ATP düzeyi yükselir. Bu durum ATP bağımlı K^+ kanallarını kapatarak depolarizasyona neden olur. Depolarizasyon membrandaki voltaj bağımlı kalsiyum kanallarını açarak, dışarıdan içeriye giren Ca^{++} aracılığıyla insülin salgılanmasını artırır. İnsülinin salgılanması esas olarak besinlere ve besinlerde bulunan glukoz miktarına bağlı olup kandaki glukoz oranının artması sonucu insülin salınması artar (Şekil 2.3.) [21,22].



Şekil 2.3. İnsülin salınma mekanizması

Artan glukozun beta hücrelerine girişi sonucu, proinsülin, onu takiben insülin oluşumu başlar. Proteolitik enzimler yardımıyla proinsülininden insülin meydana gelir [23].

İnsülin, yıllar boyunca diyabet tedavisindeki en önemli araçlardan biri olmuştur [24]. Fakat insülin tek başına kan şekeri düzeyini kontrol edemez. İnsülin tedavisi ile birlikte gerekli egzersiz ve diyet programı diyabeti kontrol altına almada etkili olmaktadır. Kullanılan insülinin tipi, etki süresi, maksimum etki zamanı ve hastaya verilen eğitim de önemlidir [18,25].

2.2.1. İnsülinin fizikokimyasal özellikleri

İnsülin gibi çok fazla fonksiyonel gruba sahip peptit, protein yapısındaki ilaçlar saklama koşullarına bağlı olarak kimyasal ve fiziksel değişime uğrarlar. Bu durum güvenilirliğini ve ilacın etkinliğini kaybetmesine neden olabilir. Enzimatik olarak ya da enzimatik yol dışında kimyasal reaksiyonlar ile parçalanırlar. Ortam sıcaklığı, pH, iyon gücü, primer, sekonder ve tersiyer yapı ve özel molekül içi etkileşimler gibi nedenler ile bu değişime uğrayabilirler. Konformasyonel değişimler ve agregasyon gibi fiziksel değişimler de insülin gibi protein yapısının stabilite ve biyoaktivitesini etkiler [18,25].

2.2.2. İnsülin miktar tayini

İnsülin miktar tayini birçok yol kullanılarak yapılabilir. Bunlar;

1. Spektrofotometrik absorbans ölçümü (Lowry, Biüre, Bradford metodu vb.)
2. Radyokimyasal metod (γ sayıcı vb.)
3. Biyolojik aktivite ölçümleri (Kan glukozunun azalması vb.)
4. Kromatografik metotlar (HPLC vb.)
5. Elektroforez (SDS-PAGE, Western Blot vb.) yöntemleridir [18,26].

2.2.3. İnsülin tipleri

İnsülinin keşfedilmesinden sonraki ilk dönemlerde domuz ve sığır pankreasından elde edilmiş, 1979 yılından itibaren de biyosentetik insan insülinleri üretilmiştir. Günümüzde diyabet tedavisinde otoantikor oluşma ve allerjik etkilerinin daha az oluşu nedeniyle saflaştırılmış insan insülinleri tercih edilmektedir [19].

En sık kullanılan insülinler, insan insülini ve analog insülinlerdir. İnsülinler rekombinant DNA teknoloji ile üretilmektedir. Etki sürelerine göre, uzun etkili, orta etkili ve kısa etkili olarak sınıflandırılabilir. İnsülin preparatlarının standart olarak her 1 mL'sinde 100 IU insülin bulunmaktadır (Çizelge 2.2.) [15,19,27].

Çizelge 2.2. İnsülin tipleri ve etki süreleri

İnsülin Tipi	Etkinin Başlama zamanı	Zirve Zamanı	Etki süresi
Çok kısa etkili insülinler	5-15 dak.	0,5-1,5 saat	3 saat
Kısa etkili insülinler	0,5-1 saat	2-4 saat	4-6 saat.
Orta etkili insülinler	1-4 saat	4-12 saat	12-16 saat
Uzun etkili insülinler	2-4 saat	6-12 saat	12-28 saat

2.2.4. İnsülin tedavisi ve tedavinin amaçları

İnsülin tedavisinin amaçları;

- Kan şekerini normale getirmek
- Komplikasyonları önlemek
- Önlenemeyecek düzeyde komplikasyonların ilerlemesini durdurmak,
- Çocuklar için büyüme ve gelişmenin yolunda gitmesini sağlamak,
- Hamilelik ve gebelikle ilgili komplikasyonları önlemektir.

Protein ve polipeptit yapılı ilaçlar oral kullanım sonucu gastrointestinal sistemde enzimatik parçalanmaya uğrayarak etkilerini kaybetmektedir. Günümüzde tedavide insülinin oral kullanımı yoktur ancak oral yolla antidiyabetik, hipoglisemik ajanlar diyabet tedavisinde kullanılmaktadır. Diyabetlilerde kandaki glukozu azaltmak için insülin sekresyonu sağlayan insülinotropik ajanlar etkili glisemik kontrol sağlarlar [7,25,28].

Oral yolla uygulandığında, gastrointestinal sistemdeki proteolitik enzimlerle parçalandığından insülinin biyoyararlanımı düşüktür. Oral yolla kullanım için polimerik mikro/nanopartiküller, lipozomlar vb formülasyonlar üzerinde çalışılmasına [14,20,34] rağmen, çoğunlukla subkütan enjeksiyonla uygulanır. Uygulamadan sonra, bazı ciddi yan etkilerle karşılaşılabilir ve hastaların çoğu uyunc açısından günde bir enjeksiyonu tercih etmektedirler. Bu sorunları ortadan kaldırmak için, bukkal, rektal ve vajinal [25], transdermal, intranazal, intragastrik ve pulmoner uygulama yolları da incelenmiştir [14,20,29]. Literatürlerde yapılan araştırmalar bu uygulamaların umut vaad edici sonuçlar verdiğini bildirmektedir [15,26,30].

Yüksek moleköl ağırlığına sahip peptit ve proteinler, oral alım sonrası zayıf absorpsiyon ve kısa yarı ömürle karakterizedir. Bu nedenle terapötik etkinin sağlanabilmesi için yüksek doz alım söz konusudur. Bu makromleküller mide asidinin pH'sı gibi faktörlere duyarlıdır ve yüksek doz alımı ile toksik etkiler gözlenir. Polimer bazlı hazırlanan ilaç taşıyıcı sistemler etkinliği ve güvenirliliği sağlayarak terapötik indeksi artırırılar. Ayrıca yan etkiler azaltılırken, istenilen bölgeye hedefleme yapılabilir [14,31,32].

2.2.5. Oral antidiyabetikler

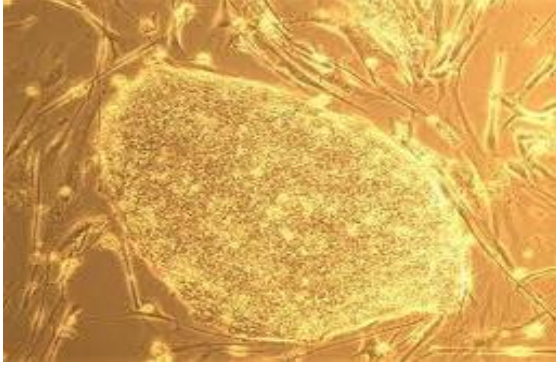
Tip II diyabette tıbbi beslenme tedavisi ve yaşam tarzı değışikliğı ile plazma glukozu istenilen seviyede tutulamadığı durumlarda tedaviye oral antidiyabetikler eklenir. Oral antidiyabetik (OAD) ajanlar genel olarak insülin sekresyonunu arttırma, insüline duyarlılığı arttırma veya karbonhidrat absorpsiyonunu azaltma yoluyla etki gösterirler. İdeal bir antidiyabetik ajan plazma glukozu değerlerini normal aralığa çekerken, yan etkileri en az olmalı ve mikro-makrovasküler komplikasyon gelişimini de engellemelidir. Kan şekerini kontrol etmeye yarayan çok sayıda ve farklı gruplarda ajanlar mevcuttur. Bu ilaçların tek başına ya da kombinasyonlar halinde kullanılmasıyla, hastalarda hedeflenen glisemi değerlerine ulaşılması mümkün olabilir. Bu grup ilaçlar şöyledir;

1. Sülfonilüre türevleri ve benzerleri
2. Miglitinidler
3. Biguanid türevleri,
4. α - glukozidaz inhibitörleri,
5. İnsüline duyarlaştırmıcılar,
6. Aldoz redüktaz inhibitörleri
7. Diğerleri [33].

2.3. Embriyonik Kök Hücre

Embriyonik kök hücreler (EKH), kendini yenileyen ve onaran hücreler olup erken gelişim döneminde embriyolardan elde edilirler [35-37] (Şekil 2.4.). Özel immünolojik ve mekanik yöntemler kullanılarak 5-6 günlük [35] blastositin iç hücre

kütlesinden ayrıştırılarak elde edilirler [38] ve hücre kaybına bağlı gelişen hastalıklarda kullanılan hücrelerdir. Üzerinde yapılan çalışmalar sonucu bu hücrelerin yakın gelecekte birçok hastalığın tedavisinde etkin rol oynayacaklarını göstermektedir.



Şekil 2.4. Embriyonik kök hücre (ATCC)

(<http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-11632.aspx>)

Hücresel tedavinin amacı, hasar gören bir hücre/doku veya organın biyolojik işlevini yerine koymak, tamir etmek veya genişletmektir. Bir hedef organa, o organın işlevlerini eski haline getirmeye yetecek sayıda ve kalitede izole edilmiş hücrelerin nakledilmesi ile hücresel tedavi sağlanabilir. Yenileyici (rejeneratif) veya tamir edici (reperatif) tıp olarak da adlandırılan bu alanda kök hücreler oldukça önemli kullanım potansiyeline sahiptirler [39].

EKH'ler pluripotent hücrelerdir [40]. Bu türe özgü kök hücreler; nöral, pankreatik, epidermal, karaciğer, kardiyak ve gastrointestinal hücrelerdir. Embriyonik kök hücrelerin önemli özelliğinden biri de kanser hücrelerine benzer bölünebilme özelliğine sahip olmalarıdır. Ancak bu hücrelerden farklı olarak normal bir karyotip yapısına sahiptirler [36].

Sınırsız olarak çoğalabilen EKH'ler özellikle kendini yenileme ve onarım kapasitesi olmayan hücrelerin kaybına bağlı olarak gelişen hastalıklar; örneğin diyabet, miyokard enfarktüsü, Parkinson, merkezi sinir sistemi hastalıkları, karaciğer hastalıkları ve transplantasyonu, kalp hastalıkları gibi dejeneratif ve hasar görmüş dokuların yenilenmesinde kullanılırlar [35,39,41,42]. EKH'lerin farklı hücrelere farklılaşabilme özelliklerinden yararlanılarak doku hasarında daha hızlı iyileşmenin

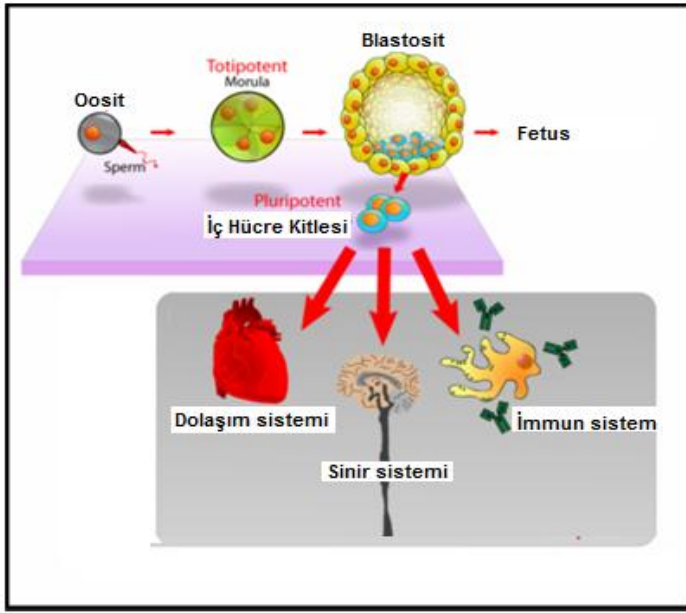
sağlanması veya sinir hücresi gibi hasarlandıktan sonra yerine konması mümkün olmayan hücrelere farklılaştırılarak yara tamirlerinde kullanılması son yıllardaki en önemli araştırma konularındandır [39].

Kök hücreleri diğer hücrelerden ayıran iki önemli karakteristik özellik bulunmaktadır. Bunlardan biri, özelleşmemiş olmaları ve devamlı kendini yenileyebilmesidir. Diğeri ise, nakledildiği dokunun ya da organın hücrelerine değişim gösterebilmesidir. Buna örnek olarak pankreasa nakil edilen kök hücreler, insülin salgılayan hücrelere değişim göstermektedir [35]. EKH'ler pankreatik rahatsızlıklarda da diyabet tedavisinde hücre replasman tedavisi olarak önemli bir kaynaktır [43]. Diyabetik farelerde yapılan çalışmada, üç haftada embriyonik kök hücre kullanılarak hiperglisemik durum tersine çevrilmiştir. Ayrıca fare embriyonik kök hücreler değişim göstererek insulin sekresyonunu sağlamışlardır [44]. Bu hücreler, diyabet tedavisinde umut vaad edici olarak görülmektedir [45].

EKH'lerinin kültür ortamlarında insülin üreten hücrelere dönüştükleri gösterilmiştir. Fare embriyonik kök hücreleri ile yapılan in vitro çalışmalarda insülin üreten hücrelerin embriyoid cisimden dönüşebildikleri gösterilmiştir. EKH kültürlerindeki çeşitlilikler, beta hücreleri özelliğinde hücreler üretilmesini sağlamaktadır. İnsülin üreten hücrelerden köken alan EKH'lerin transplantasyonu ile kemirgenlerde bu hücrelerin insülin üretilip, insülin salgılayan hücrelere dönüştüğü gözlenmiştir. Pankreatik kök hücre çalışmaları insüline bağımlı bir hastalık olan tip I diyabetin tedavisi için büyük umutlar vaad etmektedir [6,13].

2.3.1. Embriyonik kök hücrelerin eldesi

Embriyonik gelişim sürecinin erken dönemlerinde, döllenmiş yumurtanın sürekli bölünerek 16 blastomerli hale geldiği evrede blastosit adını alır ve blastosit hücreleri ortada adeta bir havuz oluşturarak gelişimine devam eder. Ortadaki havuzda bulunan hücre yığınınına ise iç hücre kitlesi denir ve fetal yapıyı oluştururlar. Buradan elde edilen hücreler, özel yöntemlerle ayrıştırılarak özel besi yeri ve büyüme faktörü içeren ortamlarda inkübe edilerek EKH'ler elde edilir [37,41,46,47] (Şekil 2.5.).



Şekil 2.5. Bölünme ve farklılaşma evrelerine göre embriyonik kök hücreler

İlk defa 1981 yılında Evans ve Kaufman tarafından tarif edilen embriyonik kök hücrelerin eldesinde genel olarak immunocerrahi ve izolasyon-mekanik izolasyon gibi teknikler kullanılır [39,40].

EKH'leri, ileri moleküler tanımlama teknikleri kullanılarak tanımlanabilirler. İmmünolojik olarak tanımlanabilmeleri erken dönemde ekspresyon gösteren işaretleyiciler (SSEA-1, 3, 4, TRA-1-60 ve 81 vb) veya gen ürünlerinin yardımıyla (OCT-4, Alkalın Fosfataz vb.) yapılabilmektedir [36,38,40].

Yukarıda bahsedilen işaretleyiciler ve gen ürünleri fare embriyonik kök hücre tanımlamada kullanılır. Bunların yanında birçok çalışmada β -aktin hem kontrol protein olarak hem de hücrenin temel proteinlerinden olduğu için hücre varlığını tespit etmek için Western blot çalışmasında kullanılmaktadır. Embriyonik kök hücre tanımlama çalışmalarında β -aktin de kullanılmaktadır [48,49].

2.3.2. Embriyonik kök hücrelerin kullanım alanları

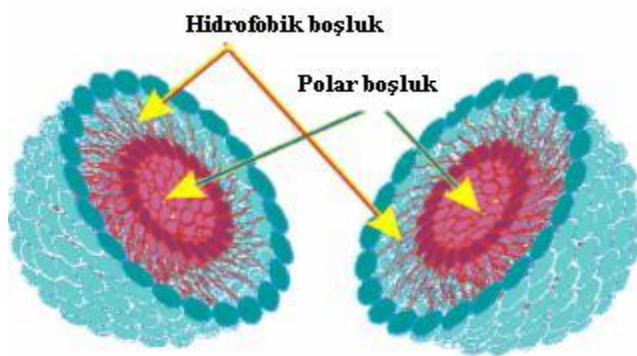
EKH'ler, özgün hücre serilerine farklılaşabilmesi nedeniyle yeni ilaçlar için gen hedeflerinin tanımlanmasında, teratolojik ve toksik bileşiklerin tanımlanmasında, hücrelerin ve dokuların üretilmesinde kullanılabileceği düşünülerek ümit

vaadettmektedir. Ayrıca pek çok hastalığın tedavisinde kullanılmak üzere ilaç geliştirmede faydalı olacağı umulmaktadır [37,41].

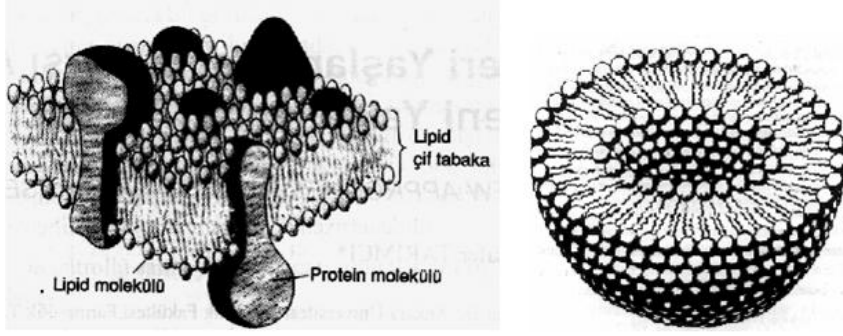
2.4. Lipozomlar

Lipozomlar; iç kısmında sulu (polar) faz bulunan, biyolojik membrana benzeyen bir veya birden fazla lipid tabakalarının oluşturduğu, 0.02-3.5 μm boyutlarında, küre şeklindeki yapılardır (Şekil 2.6.) [50,57]. Lipozomlar biyolojik hücrelere benzer şekilde, iç kısmında hidrofilik (polar) dış kısımda ise hidrofob (apolar) boşluklar içermektedir. Bu sayede suda çözünebilen maddeleri polar boşluklarında, yağda çözünebilen maddeleri ise hidrofobik boşluklarında hapsederek bunlar için taşıyıcı vazifesi görebilmektedirler [18,50-55].

Lipozomlar ilk olarak 1965’de keşfedilmiş ve lipozomlarla ilgili ilk çalışma Bangham ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Hücre membranına model oluşturmak için başlayan çalışmalarla, lipozomların etkin madde taşıyıcısı olarak kullanılabileceği sonucuna ulaşılmıştır [54,56]. Bu fikirden yola çıkarak, lipozomların temel yapılarının hücre membran yapısına çok benzemesi nedeniyle in vitro araştırmalarda model membran olarak kullanılabilen ilaç taşıyıcı sistemlerdir [51,54,58] (Şekil 2.7.).



Şekil 2.6. Lipozomun üç boyutlu yapısı



Şekil 2.7. Lipozom ve hücre membranı yapı benzerliği

2.4.1. Lipozomların avantajları

1. FDA tarafından onaylı bazı lipozomal farmasötik ürünler mevcuttur. Önemli ve başarılı ilaç taşıyıcı sistemler olarak karşımıza çıkmaktadırlar.
2. Lipozomlar vücudun yapıtaşı olan fosfolipitlerden oluştukları için biyoyumlu, toksik ve immünojenik olmayan sistemlerdir. Biyolojik olarak yıkılırlar.
3. İstenilen partikül büyüklüğünde üretilen lipozomlar nano boyutlarda da formüle edilebilirler.
4. Küçük dozlarda etkili olabilen, dozlama aralığını uzatan, permeabiliteyi artırabilen ve vücutta uzun süre kalabilen sistemlerdir.
5. Hem hidrofilik hem de hidrofobik yapıdaki etkin maddeleri taşıyabilirler.
6. Lipozomal formülasyonlar, ilaçların yan etkisini ve toksisitesini azaltır, onları enzimatik etkilerden korur ve terapötik indekslerini geliştirirler.
7. Duyarlı molekülleri (DNA, RNA, oligonükleotitler vb) korur ve hücre içi geri alımını iyileştirir ve hapsedilen molekülün farmakokinetiğini, biyodağılımını değiştirir, yarılanma ömrünü uzatırlar.
8. Lipozomlar etkinin uzatılmasında, adsorbsiyonun geliştirilmesinde, aktif maddelerin stabilize edilmesinde ve hedef bölgeye gönderilmesinde kullanılmaktadır.

9. Lipozomların tip, büyüklük ve lipid bütünlüğü bakımından çeşitlilik göstermesi, geniş yelpazede ilaç yüklenmesi ve taşınmasına olanak sağlar.
10. Lipozomlar yarı ömrü kısa ilaçların vücutta kalış süresini artırarak hastanın ilaçtan yararlanmasını en üst düzeye ulaştıran sistemlerdir [18,50,53-56,59,61-67,69-71].

2.4.2. Lipozomların sınıflandırılması

Lipozomlar büyüklüklerine, tabaka sayısı ve hazırlama metotlarına göre çeşitli şekillerde sınıflandırılabilirler (Çizelge 2.3. ve 2.4.) [18,50,56,70-74].

Çizelge 2.3. Lipozomların büyüklüklerine göre sınıflandırılması

MLV	Multilameler kesecikler , > 0,5 μm
OLV	Oligolameler kesecikler, 0.1-1 μm
UV	Tek tabakalı kesecikler (her boyutta olabilir)
SUV	Küçük tek tabakalı kesecikler, 20-100 nm
MUV	Orta büyüklükte tek tabakalı kesecikler
LUV	Büyük tek tabakalı kesecikler, > 100 nm
GUV	Çok büyük tek tabakalı kesecikler (çapları 1 μm 'den büyük)
MVV	Çoklu veziküler kesecikler, > 1 μm

Çizelge 2.4. Lipozomların hazırlanma metotlarına göre sınıflandırılması

REV	Ters faz evaporasyon metodu ile hazırlanan tek veya oligolameller kesecikler
MLV-REV	Ters faz evaporasyon metodu ile hazırlanan çok tabakalı kesecikler
FATMLV	Dondurup çözme ile hazırlanan çok tabakalı kesecikler
VET	Ekstrüksiyon ile hazırlanan kesecikler
LUVET	Ekstrüksiyon ile hazırlanan büyük tek tabakalı kesecikler
DRV	Dehidrasyon-Rehidrasyon kesecikleri

2.4.3. Lipozomların hazırlanışı

Lipozomların hazırlanmasında birçok yöntem kullanılır. Bunlardan en çok film hidrasyon diğer bir adıyla Bangham metodu kullanılır [73]. Film hidrasyon metodu ile çok tabakalı lipozomlar (MLV) oluşturulur. Bu yöntem hem birçok ilaç için kullanışlı ve basit bir yöntemdir. Bu yöntemin dışında da;

- solvan uçurma
- sonikasyon
- ekstrüksiyon
- solvan enjeksiyon metodu
- ters faz uçurma
- mikrofludizasyon
- deterjan bazlı işlemler ve homojenizasyon yöntemleri de lipozomların hazırlanmasında kullanılır [18,57,67,74].

2.4.4. Özel karakterli lipozomlar

Bazı lipozomlar özel amaç için hazırlanırlar. Bunlar;

1. Sıcaklığa hassas lipozomlar: Lipozomların lipit tabakasının sıcaklığa bağlı faz değiştirme özelliğinden yararlanılarak hazırlanırlar. Lipitlerin faz değiştirme sıcaklığında (T_c) lipozom membranının geçirgenliği artar ve bu özellikten yararlanılarak istenen hedef bölge sıcaklığı, faz değiştirme sıcaklığına getirilince etkin maddenin salımı gerçekleşir.

2. pH'ya hassas lipozomlar: Bu lipozomlar, içlerindeki aktif maddeleri sitoplazmaya verebilmeleri için geliştirilmişlerdir. pH'ya hassas lipozomlar fizyolojik pH'da stabildir. Ancak yapılarına bazı maddeler (oleik asit vb.) ilave edilerek lipozomun yapısı değişir ve içeriğini hedef hücre içine girince endozom membranı ile birleşerek salar. Fosfatidil etanol (PE) ile oleik asitin çeşitli oranlarda karıştırılmasıyla elde edilen pH-duyarlı lipozomlar ile yapılan çalışmalar vardır [82].

3. Katyonik lipozomlar: RES korumalı lipozomların tersine hücre membranına ilgileri çok fazladır ve genellikle genetik maddeleri (RNA, oligonükleotitler gibi) hücre içine taşımak için kullanılırlar. Hücre membranı ile lipozomlar füzyon yaparak birleşir ve içeriğini salarlar.

4. Retiküloendotelial sistem (RES) korunmalı veya sirkülasyonda uzun süre kalabilen veya Stealth® lipozomlar: Lipozomlar intravenöz verilmesinin ardından RES tarafından tutulurlar. Bunu engellemek ve dolaşımda uzun süre kalabilmeleri

için lipozomun yapısına bazı maddeler ilave edilir. Lipozom PEG ile kaplanmışsa Stealth® veya 'sterik stabil' olarak isimlendirilirler. Pasif veya aktif olarak hedeflendirilen lipozomların etki edecekleri yere ulaşabilmeleri için dolaşımdan hızla uzaklaşmalarını önlemek ve dolaşımda kalış sürelerini uzun tutmak gerekir. Bu amaçla, PEG ile kaplanmış lipozomların sirkülasyonda daha uzun kaldığı ve doza bağımlı olmayarak kandan yavaş uzaklaştığı belirtilmiştir [57,68].

5. Polimerize lipozomlar: Aşıların oral verilebilmesi için polimerize lipozomlar kullanılmıştır.

6. Hedeflenen lipozomlar: Lipozomların etki etmesi istenilen bölgeye gönderilebilmesi için hazırlanırlar ve bu yapılan hedeflendirme aktif veya pasif olarak yapılabilir.

7. Kaplı lipozomlar: Mukozaya yapışma, özel bölgeye gönderilebilme, stabilite artırma, vücutta dağılım ve farmakokinetiği değiştirme gibi amaçlar için lipozomların yüzeyi polimerlerle kaplanabilir [56,66,67,74].

2.4.5. Lipozom hazırlamada kullanılan fosfolipitler

Lipozomların hazırlanmasında başlıca doğal, yarı sentetik ve sentetik fosfolipitler kullanılır. En çok kullanılan fosfolipitler, yumurta veya soya fosfatidilkolin (PC), dipalmitoilfosfatidilkolin (DPPC), distearilfosfatidilkolin (DSPC), fosfatidilserin (PS), fosfatidilinositol (PI), fosfatidiletanolamin (PE) ve sfingomiyelin (SM)'dir.

Oluşacak lipit tabakasında değişiklik yapmak için bazı maddeler ilave edilebilir. Örneğin, steroller lipit tabakaya sertlik katarak hapsedilmiş lipit tabakanın geçirgenliğini azaltır ve bileşiklerin permeabilitesini azaltır. En yaygın kullanılan sterol kolesteroldür [57,73]. Lipit tabakaya stearilamin ilavesi ile lipozomun pozitif yük kazanması, disetilfosfat veya fosfatidik asit ilavesi ile negatif yük kazanması sağlanabilir. Lipozomların plazmada daha uzun süre kalması için hidrofilik uzun zincir polimerler, hedef bölgeye gönderebilmek için bazı moleküller ilave edilebilir [18,56,53,69,73].

2.4.6. Lipozomların özellikleri (karakterizasyonu)

Lipozomların fiziksel ve kimyasal özellikleri, hem in vivo hem de in vitro davranışlarını etkilediği için oldukça önemlidir. Bu sebeple karakterizasyonun tam ve doğru olarak yapılması gerekmektedir.

Lipozomların fizikokimyasal özellikleri; lipitlerin çeşidi, lipozomun büyüklüğü, lipozomal yüzeydeki yük (pozitif, negatif veya nötral), pH duyarlılığı, sıcaklık duyarlılığı, lipozomal membranın akışkanlığı gibi özelliklerdir. Lipozomların davranışını etkileyen fizikokimyasal parametreler ise:

- Büyüklük
- Lamel sayısı
- İnternal morfoloji
- Yük
- Tabakaların akışkanlık özellikleridir [55,68].

2.4.7. Lipozomlara ilaç yüklemesi

İlaçların molekül ağırlığına, çözünürlüğüne ve polaritesine bağlı olarak lipozomlara farklı yollarla yüklenebilirler.

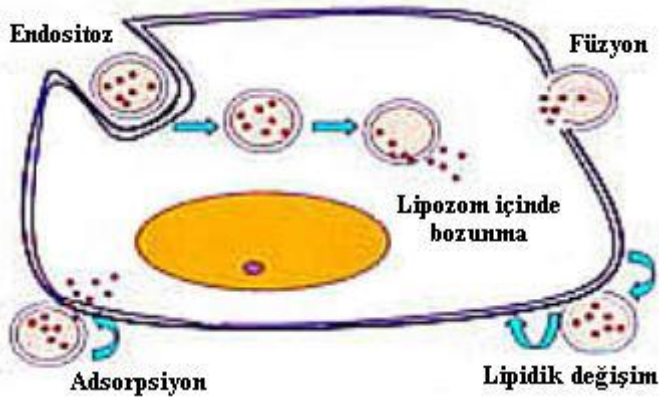
Etkin madde lipozoma hazırlanma sırasında ya da hazırlanan boş lipozomlara sonradan yüklenebilir. Genel olarak hazırlanma sırasında etkin maddeler formülasyona eklenir. Diğer yöntemde ise, öncelikle boş lipozomlar hazırlanır. Daha sonra ultrasonik ses dalgaları yardımıyla banyo tipi ya da çubuk tipi sonikatörler [57], çok kuvvetli karıştırma gibi işlemler uygulanarak etkin maddeler lipozomlara yüklenir. Yapılan bir çalışmada kuru lipit film tabakası, ketoprofen-siklodekstrin kompleksini içeren distile su ile hidrate edilip ultrasonik banyoda etkin madde yüklemesi yapılmış ve % 61,6 yükleme etkinliği elde edilmiştir [77].

Bu işlemlerden bir diğeri dondurup-çözme işlemidir. Etkin madde ve boş lipozomlar karıştırılarak sıvı azot altında dondurulur ve çözündürülür. İşlem birkaç kez tekrarlanarak etkin madde tutulması sağlanır [56,67,73].

Ayrıca uzaktan yükleme, kademeli pH'da yükleme olarak isimlendirilen yöntemde, lipozomun iç ve dış kısmındaki pH farklılıklarına bağlı olarak madde yüklenebilir. Bu işlem sırasında lipozomlar belli pH ve sıcaklıktaki etkin madde çözeltisi ile bir süre bekletilir. Birçok antrasiklin (örneğin; doksorubisin, daunorubisin) ve vinka alkaloitleri (örneğin; vinkristin, vinblastin) bu yol ile % 90'ların üzerinde yükleme etkinliği göstermişlerdir [56].

2.4.8. Lipozomların hücre etki mekanizmaları

- Adsorbsiyon: Hücre yüzeyine lipozomun tutunması: Adsorbsiyon intakt (bozulmamış) haldeki lipozomların hücre içine girmeksizin hücre yüzeyi ile birleşmesidir.
- Endositoz: Fagositoz yoluyla lipozomun hücre içine alınmasıdır.
- Füzyon: Hücre ile lipozomun dış kısmının birleşmesidir.
- Lipit değişimi: Hücre ve lipozom yapısındaki lipitlerin yerdeğiştirmesidir (Şekil 2.8.) [50,78].



Şekil 2.8. Lipozom ile hücreler arasındaki farklı etkileşim çeşitleri

2.4.9. Lipozomların stabilitesi

Lipozomların kimyasal ve fiziksel stabilitelerinin korunmasında öncelikle lipozomun yapısı, etkin maddenin lipozomda tutulduğu faz, lipozomun büyüklüğü, yükü, hazırlama koşulları ve etkin maddenin fizikokimyasal özellikleri önemli rol oynamaktadır [58].

Lipozomların kimyasal stabilitesi

Lipozomların stabilitesini etkileyen en önemli faktör, bunların temel yapılarını oluşturan fosfolipitlerin kimyasal stabiliteleridir [75]. Fosfolipitler, lipozom yapısı içinde iki şekilde kimyasal parçalanmaya uğrayabilirler.

Oksidasyon (lipit peroksidasyonu)

Doğal fosfolipitlerin kimyasal yapısı, oksidatif hidrolitik işlemler yoluyla bozulmaya meyillidir. Lipozomlarda kullanılan fosfolipitlerin çoğu molekül yapı olarak doymamış açıl zinciri içerirler. Bu zincirler oksidatif parçalanmaya karşı dayanıksızdırlar. Özellikle doymamış yağ asidi içeren fosfolipitlerle hazırlanan lipozomlar peroksidasyona uğrayabilir [58].

Hidroliz (yağlı asit esterlerinin hidrolizi)

Hidroliz olayında, pH, sıcaklık, zaman, tampon, iyonik güçler, fosfolipit'in zincir uzunluğu ve yapısı en etkili faktörlerdendir. Bir fosfolipit molekülünde mevcut olan ester bağları su varlığında hidroliz olur [58].

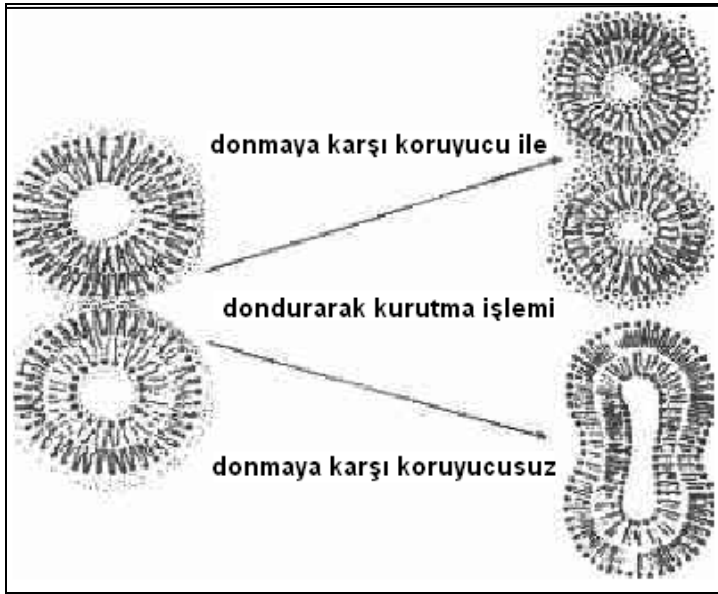
Lipozomların fiziksel stabilitesi

Lipozomların fiziksel stabilitesi, lipozomun yapısına, kullanılan etkin maddenin hidrofilik ya da hidrofobik olmasına ve lipozomların depolanma şartlarına önemli ölçüde bağlıdır. Genellikle lipozomlarda fiziksel değişiklikler, veziküllerin agregasyonu ya da lipozom hacminin büyümesi şeklinde görülür. Veziküllerde meydana gelen sızma ve füzyon olayları lipozomların üretimi sırasında membran yapısında bazı zararlara neden olmaktadır. Etkin maddenin lipozom yapısından dışarı sızması tek tabakalı lipozomlarda daha çok görülmekte, çok tabakalı lipozomlarda bu olaya daha ender rastlanmaktadır. Çok tabakalı lipozomun, lipit tabakasında tutulmuş etkin maddenin dışarı sızması iç kısımdaki sulu fazdan sızmasına göre daha zordur. Molekül ağırlığı büyük olan etkin maddelerin lipozomlardan dışarı sızmaları daha güçtür ($M.A. > 1000$). Faz geçiş sıcaklığında, özellikle küçük tek tabakalı lipozomlar membranın eğrisel yapısından ileri gelen direncin az olması nedeniyle füzyona meyillidir. Lipozomların faz geçiş

sıcaklığında meydana gelen bu olayı önlemek faz geçiş sıcaklığından farklı bir sıcaklıkta lipozomların saklanması gerekir [58].

Saklama süresince lipozomların stabilite sorunu, uygulanabilirlikleri açısından ciddi sorunlar yaratabilir. Lipozomların fiziksel ve kimyasal stabilitelerini artırmak için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda lipozomların stabilitesini artırmak için en fazla uygulanan yöntemin liyofilizasyon olduğu belirtilmiştir. (Şekil 2.9.).

Liyofilizasyon işleminde trehaloz, mannitol, glukoz, laktoz gibi karbonhidrat yapılı kriyoprotektanlar kullanılır. Bu kriyoprotektanlar ile lipozomlarda füzyon, faz ayrışması ve lipozomlardan içerik kaybı gibi zararlı membran etkilerini önledikleri belirtilmiştir [58,60].



Şekil 2.9. Liyofilizasyon işlemi sırasında kullanılan kriyoprotektanların lipozom stabilitesi üzerindeki etkisi

2.4.10. Lipozomların tedavide kullanılışları

Lipozomlar tıpta teşhis, tedavi ve koruma amaçlı kullanılırlar [56]. Lipozomlar kanser, enfeksiyon, artirit, astım, psöriasis ve oftalmik rahatsızlıkların tedavisinde kullanılırlar [54]. Oküler, pulmoner, nazal, oral, intramüsküler, subkütan, topikal ve intravenöz gibi birçok yol ile kullanılabilirler [69].

Lipozomlanmış etkin maddeler arasında kanser kemoterapisinde kullanılanlar önemli yer tutarlar. Bu etkin maddeler serbest halde kullanıldıklarında normal dokulara toksiktir, organ ve dokularda tahribat yaparlar. Lipozom formülasyonu ile bu tahribat azaltılır ya da ortadan kalkar. Kanserli dokulardaki kapiler permeabilitenin artışı ile lipozomlar hastalıklı bölgeye kolay ulaşır. Doksorubisin içeren lipozomlar Kaposi's sarcoma tedavisinde kullanıldığında lipozomların bu bölgede fazla biriktiği ve başarılı sonuçlar alındığı belirtilmiştir [56].

Lipozomlar antineoplastik ajanların, antimikrobiyal bileşiklerin ve immünomodülatörlerin uzatılmış etki göstermesini sağlar. Lenfokinler, interferonlar ve muramil dipeptit gibi immünomodülatör ajanların taşıyıcısı olmaktadır ve lipozoma hapsedilmiş ajanların başarılı uygulama ile karaciğer metastazını engellediği belirtilmiştir. Ayrıca makrofaj aktivatörü yüklenmiş lipozomların sistemik uygulama ile pulmoner metastazı yok edebildiği belirtilmiştir. Geniş yayılım göstermiş tümörlerin yok edilmesinden ziyade küçük metastazların veya tümör kitlelerinin tedavisinde etkili olduğu belirtilmiştir [61].

Lipozomlar, kemoterapötik ajanlar, biyolojik makromoleküller, genler ve aşılarda taşınmasında kullanılan taşıyıcı sistemlerden biridir [76].

İntraselüler enfeksiyonların tedavisinde birçok ilaç için taşıyıcı olarak görev yapabilir. Amfoterisin B ile hazırlanan lipozomlar mikotik enfeksiyonlar için kullanılmaktadır. Serbest ilaç ile lipozomal formülasyonun terapötik etkinliğinin eşdeğer olmasının yanı sıra lipozomların kırmızı kan hücrelerini ilacın etkisinden koruduğu bildirilmiştir [61].

Oküler uygulamada, genel olarak çözelti ve süspansiyon formülasyonları bulunmaktadır. Bu formülasyonların hızla elimine olması ve zayıf penetrasyonu nedeniyle gözlenen düşük biyoyararlanımı önlemek amacıyla düşük molekül ağırlıklı kitosan kaplı lipozomlar uzun etki sağlamak amacıyla hazırlanmış ve kitosan nedeniyle oluşan pozitif yüklü lipozomlar biyoadeziv özellik kazanmakla birlikte uzun süreli ilaç salımı sağlamıştır [52,61,79].

Retiküloendotelyal sistem (RES) hücrelerinde hücre içi parazitlerin oluşturduğu hastalıklar canlılar için çok önemlidir. Leishmania türünün oluşturduğu paraziter hastalık için tedavide kullanılan ve serbest halde yüksek toksisiteye sahip bileşiklerin sistemik toksisitelerini lipozoma hapsedilerek azaltılabileceği düşünülmüştür. Lipozom formülasyonu ile etkin maddenin serbest haline göre 700 kat daha etkin olduğu belirtilmiştir [61].

Lipozomlar diagnostik amaçla kullanılabilirler. Görüntüleme ajanları için taşıyıcı sistemler kullanılarak farmakokinetik özellikleri değiştirilerek istenilen organı ve lezyonları görüntülemek mümkündür. Ajanın görüntülenecek bölgede yeterli süre kalması önemlidir [56,61,76].

Enzim eksikliği nedeniyle meydana gelen hastalıklarda lipozomlar kullanılabilirler. Tedavide enzimin dışarıdan verilmesi, enzimin etki göstermesi istenen bölgeye ulaşana kadar inaktive olması nedeniyle oldukça güçtür. Bu enzimler lipozom içine hapsedildiklerinde, lipozomlar RES tarafından fagosit edilecek enzim lizozom içinde lokalize olması sağlanır [61].

Vajinit tedavisinde antimikrobiyal ajanların vajinal kullanımı amacıyla terapötik etkiyi artıran ve uzun süreli etki sağlayabilen clotrimazol ve metronidazol içeren lipozomlar hazırlanmış ve ilacın salımı yavaşlatılarak daha uzun süreli etki elde edilmiştir [62].

Lipozomlar kan yedeği olarak kullanılabilirler. Kan yedeği olarak kullanılan sıvılar, kan depolarının tükendiği kazalarda kullanılırlar. Hemogloblin lipozoma yüklendiğinde kan dolaşımında serbest ilaçtan daha uzun süre kaldığı ve raf ömrünün uzadığı tespit edilmiştir [61].

Topikal kullanımda özellikle dermatolojide lipozomlar geniş kullanım alanına sahip sistemlerdir. İlacın topikal uygulama sonrası düşük absorpsiyon gösteren ilaçların derideki penetrasyonunu lokalize etkiyle ve yavaş salımla artırılırlar [71,83]. Transdermal olarak verilen lipozomlanmış ekanazolün serbest maddeye göre deride daha uzun kaldığı saptanmıştır [56,63].

Lipozomlar kozmetikte, çoğunlukla molekül taşıyıcı olarak kullanılmaktadır. Deri sağlığı için gerekli olan değişik tipte yağlar, vitaminler ve iyonlar, lipozomların içerisine enkapsüle edilerek deriye doğrudan uygulanabilmektedir. Lipozomların lipit bütünlüğü, yapısı ve stratum korneumla olan etkileşimi sayesinde konvansiyonel formülasyonlara göre daha etkilidir. Kozmetikte lipozom kullanımının sağladığı en büyük avantaj, uzun süreli ve kontrollü madde salımıdır [51,64,81]. Lipozom temelli kozmesötikler (Örn. Niosome, Capture) farmasötik ürünler olarak bulunmaktadır [80].

Hormonlar oral yolla verildiğinde mide-bağırsak enzimleri tarafından parçalanırlar. Lipozomlanmış hormonların değişik yollarla uygulanması sonrası başarılı sonuçlar alınmıştır. Estradiol yüklü lipozomların deriden geçişine bakmak için serbest şekliyle karşılaştırılmış ve serbest şekline göre 8 kat daha fazla deride biriktiği söylenmiştir [56].

Aşılama amaçlı olarak da lipozomlar kullanılabilir. Lipozom aşısı hazırlanırken suda çözünen maddeler lipozomun içindeki sulu bölgeye, lipitte çözünen maddeler ise vezikül oluşumu sırasında lipit katmana karıştırılarak eklenir. Bu lipozomlar birçok hücre tarafından absorbe edilir ve hücre içine girdiğinde içerdikleri maddeleri salar. Bu aşılar genellikle makrofajları ve diğer fagositik hücreleri hedef almaktadırlar. Lipozomlar, amaca uygun antijen eklenerek vücuda verildikten sonra, hücreye girer girmez içlerindeki antijeni hücreye salarlar. Antijenle karşılaşan hücreler bir immun yanıt oluşturur [81].

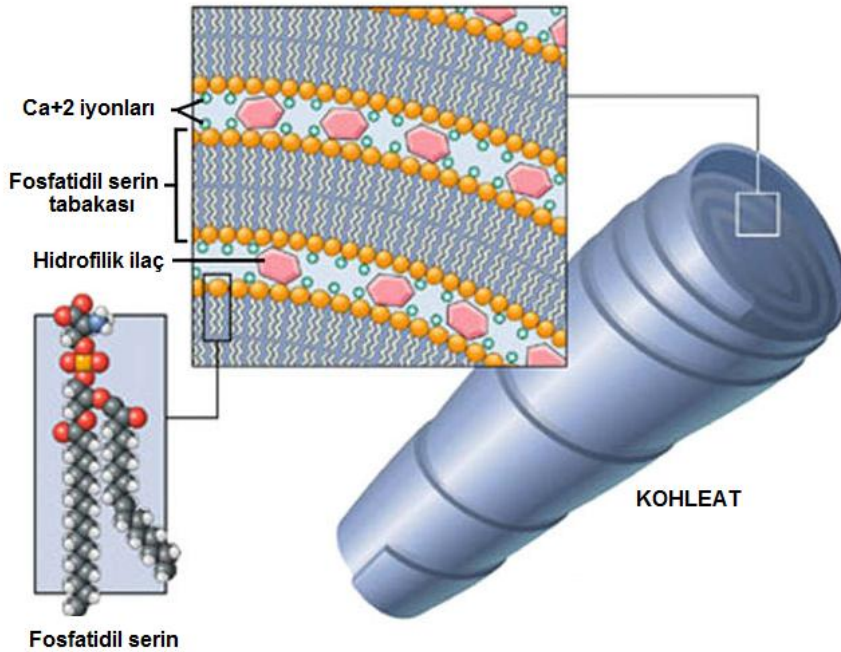
Lipozomlar pulmoner yolla verildiğinde birçok avantaja sahip sistemlerdir. İnsanlarda yapılan çalışmalarda, pulmoner yolla uygulanan ilacın alveollere ulaşabilmesi için 1-5 μm partikül boyutuna sahip olması gerekmektedir. 5 μm 'den küçük partiküller alt solunum yolunda birikirken, daha küçük 3 μm olan partiküller ise alveollere kadar ulaşabilmektedir. Lipozomlar, belirtilen aralıkta kolayca hazırlanabilmelerinden dolayı, pulmoner ilaç verilmesi için oldukça uygun sistemlerdir. Pulmoner yolla verilebilen insülin içeren Exubera[®], 1-5 μm aralığında hazırlanan bir ilaç taşıyıcı sistemdir [53].

2.4.11. Lipozomların ticari preparat örnekleri

Günümüzde lipozom formülasyonu preparatlar piyasada bulunmaktadır. Lipozomlar piyasada sıvı halde ya da daha sonra sulandırılmak üzere hazırlanmış toz şeklinde bulunabilirler. Mantar enfeksiyonunda kullanılan Ambisome[®], Abelcet[®], Nyotran[®], AIDS ve kanser tedavisinde kullanılan DaunoXome[®], Doxil[®], Antragen[®], bakteri enfeksiyonlarında kullanılan Mikasome[®], Menenjitte kullanılan Depocy[®] piyasada bulunan lipozom formülasyonu preparatlardır. Bunların yanında, klinik araştırma aşamasında olan çalışmalar da devam etmektedir [56,80].

2.5. Kohleatlar

Kohleatlar, lipit bazlı, veziküler olmayan, negatif yüklü bir lipit ile bir katyon yapısının (örneğin; fosfatidilserin ve kalsiyum gibi) çöktürülmesiyle elde edilen, stabil, silindirik, katı lipit çift tabaka taşıyan sistemlerdir. Diğer bir deyişle, kohleatlar, fosfolipit içeren mikro ve nanopartiküllerin tabakalar şeklinde yığılmasıyla elde edilen silindirik yapılardır (Şekil 2.10.) [84-89,91].



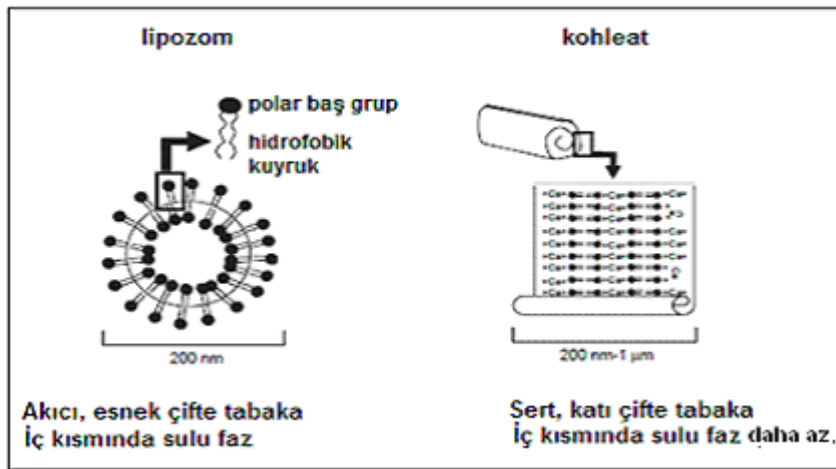
Şekil 2.10. Kohleat yapısının şematik gösterimi

Kohleatlar 1975 yılında Dr. D. Papahadjopoulos ve arkadaşları tarafından keşfedilmiş ve peptit ve antijenlerin transportu için 80 ve 90'lı yıllarda kullanılmıştır [86,87,90,91]. Kohleat ve nanokohleat sistemleri terapötik ajanların lipid çift tabakaları arasında köprüleyici ajanların varlığı sonucunda terapötiklerin taşınması ve enkapsülasyonu için kullanılırlar [90].

2.5.1. Kohleatların yapımında kullanılan fosfolipitler

Kohleat yapımında en çok kullanılan anyonik fosfolipit fosfatidilserindir (PS). Bunun dışında, dioleil fosfatidilserin (DOPS), fosfatidilinositol (PI), fosfatidik asit (PA), fosfatidilgliserol (PG) veya bu lipidlerin karışımı kullanılan fosfolipitlerdir [56,86,90].

Kohleatlar, anyonik lipozom süspansiyonu içerisine katyonların ilavesiyle elde edilirler. Lipozomlar ile önemli ve kritik farklılıklar içerirler (Şekil 2.11.). Kohleatlar basit, fosfatidilserin, kolesterol ve kalsiyumdan oluşan yapılardır. Lipozomlardan farklı olarak silindirik, katı ve içinde sulu kısmı çok az içeren ya da içermeyen, stabil yapılardır. Fosfolipitin tek negatif yükü ile kalsiyum iyonunun iki pozitif yükünün etkileşimi neticesinde silindirik yapı kazanırlar. Daha sonra kohleatlar, kalsiyum iyonu içeren tampon içerisinde, kullanım öncesinde sulandırılmak üzere liyofilize toz halde saklanabilirler [86,92].



Şekil 2.11. Lipozom ve kohleat özelliklerinin karşılaştırılması

2.5.2. Kohleatların avantajları

1. Kohleat formülasyonlarının makromoleküllere ve küçük molekül yapıdaki, hidrofobik, amfifilik, negatif veya pozitif yüklü çeşitli ilaçlara uygulanabilir olduğu ve düşük olan biyoyararlanımı iyileştirdiği ifade edilmiştir [91]. Kohleatlar, klinik kullanımda önemli olan birçok ilacın oral ve sistemik kullanımları için yeni bir teknolojidir.
2. Düşük pH'larda lipozomlara göre daha dayanıklı yapılardır. Membrandan geçişte ilaç absorpsiyonunu artırmak için kullanılan yollardan biri lipit bazlı ilaç dağılım sistemleridir. Örneğin lipozomlar hücre membranıyla benzeşmesi nedeniyle tercih edilirler. Lipozomlara göre kohleatların daha dayanıklı yapılar olması nedeniyle özellikle hidrofilik yapıdaki peptitlerin, DNA ve aşılarda taşınmasında tercih edilirler [91].
3. Kohleatlar hidrofobik ilaç molekülleri için uygun taşıyıcı sistemlerdir. Çift tabakadaki fosfolipitle ilaç molekülü birleşerek kohleat ile taşınırlar. Kohleatların yapımında ilave edilen kalsiyum gibi çoklu iyonlar ile bu makromoleküller iyonik kompleks yaparak enkapsüle edilebilirler [90].
4. Nano ve mikrometre boyutlarında elde edilirler [86,97]. Kohleatlar, toksik olmayıp yan etkileri azaltırlar ve etkinliği artırır [90,91].
5. Gastrointestinal sistemdeki degradasyondan ilaçları koruyan ve bu nedenle de protein, peptit, nükleik asit, DNA ve diğer duyarlı biyofarmasötik moleküllerin stabilizasyonu için bu ilaç taşıyıcı sistemler yeni bir yoldur. İçeriklerini hücre membranına füzyon yoluyla dağıtırlar.
6. Kohleat formülasyonu ile etkin madde daha düşük dozda etkili olabildiği gibi toksisitesi de azaltılabilir. İntranazal, oral, intramüsküler veya subkütan yollarla kullanılabilen kohleatlar, liyofilizasyon sonrası yapılarını koruyabilir ve DNA gibi duyarlı moleküllerin korunmasında da rol oynarlar [84,86,90,93-96,].
7. Lipit oksidasyonu az olduğu için stabil sistemlerdir [90].

2.5.3. Kohleat hazırlama yöntemleri

Yakalama (Tripping) /Film hidrasyon metodu

Kohleatlar, yakalama metodunda film hidrasyon metoduyla hazırlanmış lipozom süspansiyonundan hareketle hazırlanırlar. Kalsiyum klorür çözeltisinin anyonik yapıdaki lipozom süspansiyonuna damla damla ilave edilmesiyle nanokohleatlar elde edilir [87,93].

Hidrojel metodu

Bu metotta, küçük lipozomlar film metodu ile hazırlanırlar. Daha sonra dekstran gibi bir polimerle karıştırılır ve bu karışım çözünmeyen bir polimer (örneğin PEG) çözeltisi içerisine enjekte edilir. Su-su emülsiyonuna kalsiyum eklenir. Daha sonra PEG sürekli fazından yavaşça dekstran-lipozom fazına difüze olur ve daha küçük boyutta kohleatlar elde edilir. Nano boyuttaki kohleatlar bu metodla hazırlanırken mikro boyutlardaki kohleatlar yakalama metodu ile elde edilirler [84,86,93]. Kohleatlar, çoğunlukla dioleyil fosfatidil serin ve kalsiyum klorür gibi gıda içinde bulunan doğal içeriğin kullanımı ile elde edilirler. Kalsiyum çinko iyonları veya organik katyonlar ile de yer değiştirebilir [84].

Kohleat öncesi lipozom diyaliz metodu

Lipit ve deterjan madde başlangıç materyali olarak kullanılır. Deterjanın uzaklaştırılması için çift dializ yapılır. Karışım ilk olarak tamponla diyaliz edilir ve sonrasında kalsiyum klorür çözeltisi kohleat oluşumu için eklenir. Bu metod, hidrofobik ilaçların enkapsülasyonu için uygundur [86,90].

Kalsiyum diyaliz metodu

Lipozom formulasyonunu oluşturulmasına gereksinim duymadan kohleatlar, daha büyük boyutta oluşturulur. Lipit ve deterjan karışımı direkt olarak kalsiyum klorür çözeltisine karşı diyaliz edilir [86,90].

2.5.4. Kohleatların kullanım alanları

Kohleatlar, peptit, protein, polinükleotit, antiviral ajanlar, anestezik, antikanser ajanlar, immün sistem baskılayıcı ajanlar, steroidal ve steroidal olmayan antienflamatuar ajanlar, bitki kaynaklı ürünler, vitaminler ve vazodilatör ajanlar için uygun taşıyıcı sistemlerdir.

Amfoterisin B içeren lipozomdan Santangelo ve arkadaşları, kohleat formülasyonunu hidrojel metodu kullanarak hazırlamışlardır. Elde edilen kohleatlar yaklaşık 400 nm boyutlarındadır. Farelerde, fungal enfeksiyona karşı denenen bu formülasyon oldukça etkili olmuştur. Ayrıca Amfoterisin B kohleatları geliştirilmiş stabilite ve düşük dozlarda etkinlik göstermiştir. Hasta uyumunda da gelişim göstermişlerdir. Ayrıca etkin maddenin spiral tabakalar arasında gastrointestinal sisteminin sert ortamına karşı korunmasını sağlamıştır [86,87].

Nano boyutlardaki kohleatlar ile yapılan hayvan deneylerinde, sindirim sistemi epitelinde geçebildikleri ve hedef hücrelere ilacı taşıdıkları belirtilmiştir. Bu nedenle de birçok etkin maddenin oral biyoyararlanımını artırmak için tercih edilen sistemlerdir [90].

Vitamin A içeren kohleat formülasyonunun vitamin A'yı ışık, oksijen varlığında gözlenen degradasyondan koruyarak stabilitesini koruduğu belirtilmiştir [84].

Faktör VIII ile hazırlanan kohleat formülasyonu ile hem in vitro çalışmalar ile yavaş ve uzatılmış bir salım sağlanmış hem de bu formülasyonun hemofilik farelerde in vivo yapılan çalışmalarla etkili olduğu, fareleri aşırı olan kanamalardan koruduğu belirtilmiştir [85].

Kohleatlar, protein, peptit ve DNA'nın aşı ve gen terapisi uygulamalarında kullanılmaktadır [86,87]. Peptitler gibi birçok terapötik ajan çözünür olmasına rağmen doku membranlarına karşı düşük geçirgenlik gösterirler. Bu moleküllerin membranlar arası geçişini kontrol etmeleri açısından kohleat taşıyıcı sistemler geniş kullanım alanı bulabilmektedir [90].

Kohleatlar, bakterisit aktivitenin geliştirilmesi ve toksisitenin azaltılmasında avantajlı sistemlerdir. Aminoglikozitler ve siklik veya lineer peptitlerin oral kullanımına izin verirler. Antibakteriyal ilaç modeli olan klofaziminin kullanımında kohleatlar başarılı olmuşlardır [86].

Doğal olarak var olan lipoprotein, ApoA1, kolesterolün enzimatik esterifikasyonunda önemli rol alır ve aterosikleroza karşı damarları korur. Kohleatlar ApoA1 için uygun taşıyıcı sistemlerdir ve aterosiklozun ve diğer kalp hastalıklarının tedavisinde önemli katkısı vardır [86].

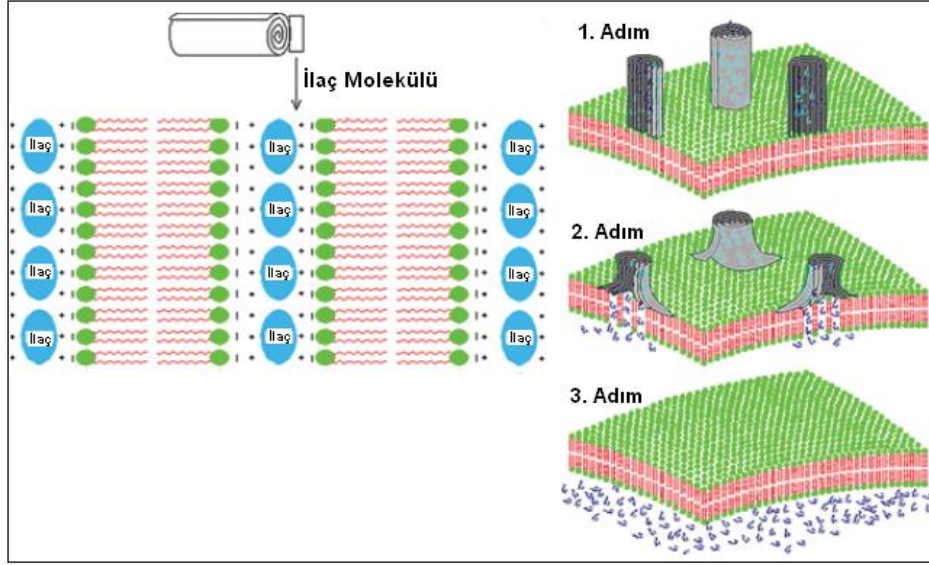
Mukozal ve sistemik immün cevabı artırmak için koleraya neden olan *Vibrio Cholerae*'dan hareketle diyaliz yöntemiyle kohleatlar hazırlanmış ve 2-3 doz şeklinde intranazal uygulanarak *Cholerae* antijenine karşı immün cevap alınmıştır [89].

Birçok antienflamatuar ajan (aspirin, ibuprofen, naproksen, COX2 inhibitörleri gibi) için kohleatlar uygun taşıyıcı sistemlerdir. Aspirin ile hazırlanan kohleat formülasyonu ile gastrik irritasyon azaltılmış ve aspirinin antienflamatuar etkisi artırılmıştır [86].

Kohleatlar, parenteral tedavide olduğu gibi mukozal yolla da kullanım ile aşı dağılım sistemleri için uygun taşıyıcı sistemler olarak kullanılmıştır [96].

2.5.5. Kohleatların hücre ile ilişkisi

Kohleatların floresan madde ile işaretlenerek ve insan fibroblast hücreleri ile inkübe edilerek yapılmış çalışmalarında hücre yüzeyinde kohleatlar parlak floresan vermiştir. Bu da şunu göstermektedir; kohleatlar hücre yüzeyi ile füzyon yaparlar. Silindirik yapıda oldukları için uç kenarları sayesinde hücre yüzeyi ile birleşir ve ikili tabakanın iç kısmına yüklenmiş olan ilaç, hücre içine salınır (Şekil 2.12.). Bu konuda tobramisinle yapılmış çalışmada, ilacın çözelti formuna göre kohleat formülasyonu daha yüksek antibakteriyal aktivite göstermiştir [90].

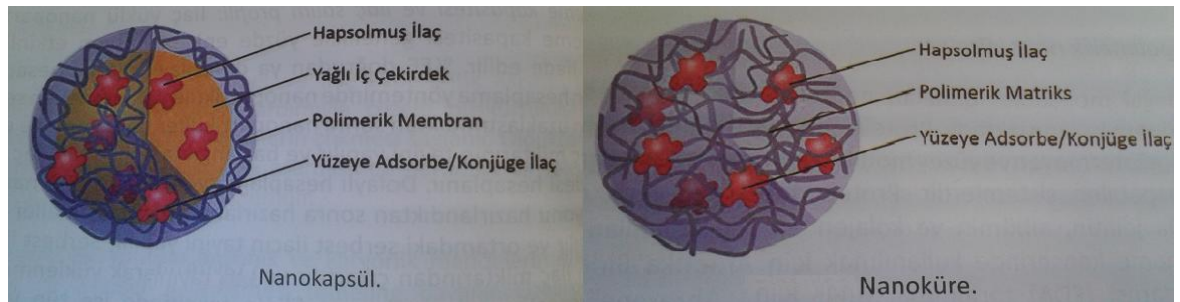


Şekil 2.12. Kohleatın hücre membranı ile ilişkisi

2.6. Nanopartiküller

Nanopartiküller, nanometre boyutunda partikül büyüklüğüne sahip, doğal ya da sentetik polimerlerle hazırlanan, çözünmüş, hapsedilmiş veya adsorbe edilmiş olan etkin maddeyi kontrollü olarak salan katı koloidal partiküllerdir [56,98-101].

Nanopartiküller, iki farklı sınıfa ayrılırlar. Bunlar; nanokapsül ve nanoküre. Nanokapsüller, polimerik bir zarf için veya yağlı bir iç çekirdekten oluşan membran tipi ilaç taşıyıcı sisteme denir. Hazırlanan nanopartikül yüzeyine etkin maddenin adsorbe ettirilmesi veya polimer yapı içinde çözünmesi ile matriks yapı oluşturularak nanoküre elde edilir (Şekil 2.13.) [56,98,101-106]. Her iki sistemde de kullanılan polimerler aynıdır. Hazırlanma sırasındaki en önemli farklılıkları nanokapsüllerde organik faza yağ eklenmesidir. Bu yağ çekirdeği oluşturur [57].



Şekil 2.13. Nanokapsül ve nanoküre modelleri

2.6.1. Nanopartikül hazırlamada kullanılan polimerler

Nanopartikül hazırlanmasında doğal ve sentetik polimerler kullanılır. Doğal polimerler polisakkarit ve proteinler olarak, sentetik polimerler ise önceden sentezlenen ve nanopartikül hazırlanması sırasında sentezlenen polimerler olarak da sınıflandırılabilirler [99].

Nanopartikül yapımında en çok jelatin, kitosan, aljinat gibi doğal polimerler ve poli laktik asit, poli glikolik asit, poli alkil siyano akrilat ve poli laktik-ko-glikolik asit gibi sentetik polimerler kullanılır. Sentetik bir polimer olan poli laktik-ko-glikolik asit (PLGA) ilaç dağılım sistemlerinde en çok kullanılan polimerdir (Çizelge 2.5.). [56,57,73,99,104,106-108,117].

Nanotaşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi ile polimerlerde de gelişmeler olmuştur. Bu amaçla kendine has özelliklere sahip polimerler tasarlanmıştır. İlk zamanlar ilacı çözündürmek, stabilize etmek gibi amaçlar için kullanılırken son yıllarda hedefleme, doku penetrasyonunu artırma gibi amaçlarla polimerler geliştirilmiştir [57].

Çizelge 2.5. Polimerlerin sınıflandırılması

Sentetik polimerler	Polimerin Açık Adı	Kısaltması
	Poli laktik asit	PLA
	Poli(laktid-ko-glikolid)	PLGA
	Poli(akrilat) ve (metakrilat)	Eudragit®
	Poli metil metakrilat	PMM
	Polianhidrit, polikaprolakton	PCL
	Polisiyano-akrilat	PACA
Doğal polimerler	Kitozan	
	Aljinat	
	Jelatin	
	Albumin	
Kolloit stabilizörler	Dekstran	
	Pluronik F68	F68
	Poli(vinil alkol)	PVA
	Tween® 20 veya Tween® 80	

2.6.2. Nanopartikül hazırlama yöntemleri

Nanopartiküller çok çeşitli yöntemlerle hazırlanabilirler. Yöntemler genel olarak şöyle sınıflandırılırlar;

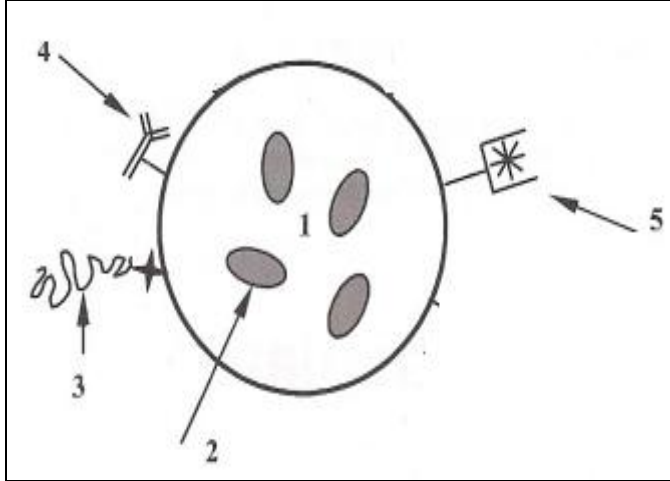
- Misel Polimerizasyonu
- Emülsiyon Polimerizasyonu
- Emülsiyon-Çözücü Buharlaştırma Yöntemi
- Nanopresipitasyon Tekniği
- Yüzeyleylerarası Polimerizasyon
- Aktif Maddenin Nanopartiküllere Adsorpsiyonu
- Tuzla Çöktürme
- İyonik Jelasyon
- Su / Yağ Emülsiyonunda Isı Denatürasyonu ve Çapraz Bağlanma [99,100, 104,105,109].

Nanopartiküllerin hazırlanma yöntemleri ve bu yöntemlerde kullanılan polimer tipleri aşağıdaki Çizelge 2.6.'da da özetlenmiştir.

Çizelge 2.6. Nanopartiküllerin hazırlanma teknikleri ve kullanılan polimer tipleri

Hazırlama Tekniği	Polimer Tipi
Emülsiyon Polimerizasyon	Hidrofobik
Yüzeyleylerarası y/s polimerizasyon	Poli(alkilsiyanoakrilat)
Çözücü ekstraksiyon-buharlaştırma	Poliesterler (PLA, PLGA, PECL)
Çözücü uzaklaştırma veya nano çöktürme	PLA, PLGA
Tuzla çöktürme	Selüloz asetat ftalat, Poli(alkil metakrilat)
Sulu ortamda çapraz bağlanma	Aljinat, Kitozan,Dextran
Sulu ortamda çözünmeme ve çapraz bağlanma	Albumin, Jelatin
İyonik jelasyon	Albumin, Jelatin,Aljinat

Çeşitli hazırlama yöntemleri ile elde edilen aktif madde yüklü nanopartiküllerin istenilen bölgeye başarılı hedeflendirilmelerine yönelik yapılan araştırmaların çoğu, nanopartiküllerin yüzey özelliklerinin ya uygun bir sürfaktan ile kaplanarak (kaplanmış nanopartiküller) ya da polietilen glikol (PEG) ile konjuge edilerek (pegilasyon işlemi, PEG ile konjuge edilmiş nanopartiküller) modifiye edilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır [99,108]. PEG ile kaplama neticesinde, immünojenite azaltılır, RES tarafından nanopartiküllerin fagosite edilmesi engellenir ve ilacın kan dolaşımında kalma süresi artırılır [108].



Şekil 2.14. Nanopartiküle bağlanan farklı işlevleri olan gruplar (1: polimerik nanopartiküler matris yapı içerisindeki boş alanlar, 2: Polimerik nanopartiküler matris içinde yer alan etkin madde molekülleri, 3: Nanopartiküler taşıyıcının yüzeyine bağlanarak kan dolaşımında daha uzun süre kalmasını sağlayan PEG gibi sterik yapılı koruyucu polimer kaplama, 4: Hedefleme kısmı, 5: Tanı, görüntüleme amaçlı bağlanmış görüntüleme parçası)

2.6.3. Nanopartiküllerin avantajları

- 1- Yüksek miktarda ilaç yükleme kapasitesine sahiptirler.
- 2- Nanopartiküler sistemler, ilaçların istenilen bölgeye hedeflenmesini sağlarlar [57,107]. Hedeflenen bölgede, enjeksiyonu takiben günler, haftalar süren etkin madde salımına olanak verirler [99].
- 3- Uzun süreli ilaç salımını mümkün kılan nanopartiküller, basit hazırlama yöntemleri ve yüksek fiziksel stabiliteleri sayesinde kronik hastalıkların tedavisinde uygun sistemlerdir [105].
- 4- İlacın kontrollü olarak salınmasını sağlarlar [56]. Katı kolloidal partikül olması nedeniyle, kontrollü ilaç salımı ve daha tek düze partikül dağılımı imkanına sahiptirler [73]. Nano ölçekteki boyutları önemli bir üstünlüktür. İlaç taşıyıcı sistemler için partikül büyüklüğü çok önemlidir ve iyi bir taşıyıcı sistemin partikül büyüklüğü kan damarından sızmayacak kadar büyük, mononükleer fagositik sistem tarafından algılanmayacak kadar küçük olmalıdır [57].
- 5- Biyoparçalanabilir, biyolojik olarak uyumlu, kendisi ve parçalanma ürünleri toksik olmayan, ve mukoadhesif sistemlerdir [56,100,105,108,109].

- 6- Pasif olarak hedefleme yapılabildiği gibi biyospesifik ligandlarla konjuge olarak hedef doku ya da organa ulaşmasını sağlarlar.
- 7- Hedef dokuda ilacın ya da genin uzun süreli etkisini sağlarlar, terapötik indeksini artırır [100,109].
- 8- Birçok ilaç, molekül, proteinler, genler, aşılar ve oligonükleotitler için taşıyıcı sistem olarak kanserli ya da hastalıklı dokularda başarılı bir şekilde kullanılırlar [100,108,110].
- 9- Terapötik ajanların özellikle peptit, protein yapılı ajanların enzimatik parçalanmaya karşı stabilitesini sağlarlar. İlaçların biyoyararlanımını iyileştirir ve gastrointestinal sistemde ve saklama boyunca stabil kalırlar [57,107,118,109].
- 10- Oral biyoyararlanımı artırır.
- 11- Küçük boyutları nedeniyle dokular arası penetre olabilir ve çeşitli hücreler tarafından alınabilir [111].
- 12- Nanopartiküller gene dağılımında, yüksek transfeksiyon etkinliği gösterirler ve herhangi bir toksisite ya da yan etki olmaksızın diğer viral olmayan vektörlere göre daha uzun süre ekspresyon sağlarlar [110].
- 13- Sterilize edilebilir sistemlerdir [56].
- 14- Üretim teknikleri ve ölçek büyütme genel olarak basit ve kolaydır [57,99,100,103].
- 15- Liyofilize edilebilirler ve kuru toz sulandırıldıktan sonra da stabil kalabilir [100].

2.6.4. Nanopartiküllerin tedavide kullanışı

Nanopartiküller hem tıp alanında hem de tıp dışı alanlarda kullanılırlar. Antikanserojen, antiparaziter, antienflamatuar, aşı adjuvanı olarak, peptit, protein

yapılı ilaçların taşınmasında, oral, pulmoner, transdermal, oküler ve intravenöz (i.v.) gibi birçok yolla kullanılırlar [56,110].

Nanopartiküllere yüklenmiş antibiyotiklerin intravenöz yolla verilmesinin ardından mononükleer fagosit sistem tarafından algılanan bu partiküller partikül büyüklüğüne bağlı olarak istenilen organa, dokuya pasif hedefleme yolu ile ulaştırılabilirler. Akut ve kronik enfeksiyonlarda, nanopartiküle yüklenen ampisilin ile yapılan tedavide serbest ampisiline göre 20 kat daha düşük dozla aynı etkinliğin sağlandığı, antibiyotiğin terapötik indeksinin arttığı belirtilmiştir [109].

Birçok antikanser ajanlar lipit nanopartiküllere yüklenerek in vivo ve in vitro etkinlikleri artırılmıştır. Etkinlik artırılırken sitotoksik ilaçların yan etkileri azaltılmıştır. Paklitaksel lipit nanopartikülleri mikroemülsiyon tekniği ile yapılmış ve 100 nm'nin altında partikül büyüklüğü sağlanmıştır. Diğer bir antikanser ajan tamoksifen göğüs kanseri tedavisinde kullanılmıştır. MCF-7 hücrelerinde in vitro antitümör aktivitesi ölçülmüş ve uzun salım gösteren nanopartiküller göğüs kanser tedavisinde kullanışlı bulunmuştur [112].

Karaciğer rahatsızlıklarında nanopartiküller, parenteral uygulama sonucu RES (Retikülo endotelyal sistem) tarafından kan dolaşımından hızla uzaklaştırılır ve pasif hedefleme ile karaciğerde lokalize olur. Hepatoprotektif ajan olan oksimatin ile hazırlanan nanopartiküller sıçanlara uygulanmış ve ajanın çözelti formuna göre hedefleme etkinliği % 360 olarak bulunmuştur [112].

Prednisolon içeren nanopartiküller romatoid artrit tedavisinde antienflamatuvar olarak kullanılmışlardır [56].

Nanopartiküller nöronal kanserlerde (glioblastoma multiforme) kullanılır. Kan beyin bariyerinin nöroterapötik ajanların geçişinde sınırlayıcı faktör olması önemli bir dezavantajdır. Ancak nanoteknoloji sayesinde bu aşılabilir [102]. Doksorubisin içeren nanopartiküller ile polisorbat 80 kaplı doksorubisin nanopartiküllerini sıçanlara i.v. olarak uyguladıktan sonra beyindeki konsantrasyonları ölçülmüş ve Polisorbat 80 kaplı nanopartiküllerin kan beyin engelini aşarak beyne hedeflendiği gösterilmiştir [105,113]. Ayrıca PLGA kullanılarak hazırlanan nanokürelerinde kan

beyin bariyerini geçerek merkezi sinir sistemi rahatsızlıklarında kullanımı belirtilmiştir [114].

Nanopartiküler taşıyıcı sistem stratum korneumu geçtikten sonra boynuzsu tabakada mikrozervuar görevi görerek biriktiği ve ilacın derinin alt tabakalarına geçerek absorpsiyonun arttığı belirtilmiştir [56,106].

Solunum sisteminde kullanılacak terapötik ajanların nanopartiküle yüklenerek verilmesi mümkündür. Astım, kronik pulmoner enfeksiyonlar, akciğer kanseri ve sistik fibrozis gibi bir çok rahatsızlıkta ilaçların lokal kullanımı caziptir. Hem lokal hem de sistemik uygulamalarda ilacın etkinliği mukosilyer klirens ile azalmaktadır. Yapılan çalışmalar ile nanopartiküllerin ilacın etkinliğini artırdığı, epitelden ilacın geçişini sağladığı ve mukosilyer klirensden ilacı koruduğu belirtilmiştir [66].

Yavaş salım ve mukoadesif özellikleri nedeniyle nanopartiküller, gözde uzun terapötik etki için tercih edilirler ve oküler uygulamada uygun hale gelir [106,115]. Nanopartiküller ile oküler uygulamada başarılı sonuçlar alınmış ve gözün kornea epitelinden geçebilmişlerdir [56].

İnsülin ile hazırlanan nanopartiküllerin diyabetik sıçanlara intragastrik uygulanması ile glisemi % 50-60 oranında azaltılmış ve bu etki 2 gün sonrasında da devam etmiştir [1]. Ayrıca insülini proteolitik enzimlere karşı koruyarak daha uzun süreli etki ve geliştirilmiş biyoyararlanım sağlanmıştır [106].

Floresin ve türevi ile yüklü nanopartiküller, ^{99m}Tc ile işaretli nanopartiküller tanıda kullanılmaktadır. Ayrıca tıp dışı uygulamalarda da dezenfektan olarak, pestisit ve gübre içeren nanopartiküllerin de kontrollü olarak pestisitleri ve gübreyi salınmasını sağladıkları için tercih edilir [56,116].

2.6.5. Nanopartiküllerin in vitro karakterizasyonu

Nanopartiküllerin terapötik uygulamalarına bağlı olarak in vitro karakterizasyonu da farklılık gösterir. Genel olarak nanopartiküller, partikül büyüklüğü ve dağılımı, terapötik ajanın enkapsülasyonu, salım profili, nanopartiküllerin yüzey özellikleri ile karakterize edilirler. Karakterizasyon metodları aşağıda belirtilmiştir [106].

<u>Parametre</u>	<u>Karakterizasyon metodu</u>
Partikül büyüklüğü ve dağılımı	Foton korelasyon spektroskopisi Lazer difraktometrisi Transmisyon elektron mikroskopisi Tarama elektron mikroskopisi
Yük belirleme	Lazer dopler anemometre Zeta potansiyel ölçer
Yüzey hidrofobisitesi	Rosa Bengal (boya) bağlama Hidrosfobik etkileşim kromatografisi
Yüzeyin kimyasal analizi	Statik sekonder iyon kütle spektrometresi
İlaç-Taşıyıcı etkileşimi	Diferansiyel tarama kalorimetresi
Salım profili	Fizyolojik ve sink koşul altında in vitro salım
İlaç stabilitesi	Nanopartiküllerin ilaç içeriği biyoölçümü İlacın kimyasal analizi

2.6.6. Nanopartiküllerin sterilizasyonu

Özellikle parenteral amaçlı kullanılacak nanopartiküllerin steril olması gerekmektedir. Bu nedenle nanopartiküller, aseptik üretim, steril filtrasyon, otoklavda 121°C’de 15-20 dakika tutularak ve γ -radyasyonu ile sterilize edilebilir [56].

2.6.7. Nanopartikül ticari preparat örnekleri

Nanopartiküller yaklaşık 35 yıldır eczacılık ve tıp alanında uygulanmaktadır. İlk ticari nanopartikül ürünü, Abraxane™, paklitaksel içeren nanopartiküllerdir. Son on yıldır diagnostik amaçlı nanopartikül preparatları piyasada bulunmaktadır. Diğer bir ürün Doxorubicin-Transdrug®, doksorubisin içeren poli (izoheksil siyanoakrilat) nanopartikülleridir. Ayrıca birçok etkin madde ile faz I/II klinik çalışmaları da devam etmektedir [57,101].

2.7. Poli laktik ko-glikolik asit (PLGA) Polimeri ve Özellikleri

Poli laktik ko-glikolik asit (PLGA), poli laktik asit ve poli glikolik asidin kopolimeri olup nanopartikül yapımında oldukça fazla kullanıma sahiptir. PLGA ile hazırlanan mikroküreler, konvansiyonel tedavi rejimlerine alternatif olarak kontrollü ilaç salımı sağlar. Lipit taşıyıcılarla karşılaştırıldığında da daha stabil bir alternatif sunmaktadır. PLGA partiküllerinin boyutu kimyasal bileşimini ve üretim yöntemini değiştirerek ayarlanabilir. PLGA nanopartiküllerden ilaç salımı, degradasyon hızını etkileyen molekül ağırlığındaki değişikliklerle kontrol edilebilir. PLGA ile hazırlanmış ilaç sistemlerinin konvansiyonel sistemlere göre çok sayıda avantajı bulunmaktadır. Bu avantajlardan biri, ilaçların uzatılmış salım özelliklerinin günler, haftalar veya aylarca devam edebilmesidir. PLGA'nın yaygın kullanımının diğer sebepleri ise biyolojik olarak parçalanabilir olması, biyolojik olarak geçimli olması ve FDA (Gıda ve İlaç İdaresi) tarafından onaylanmış olmasıdır. Çeşitli aktif farmasötik ajanların yanısıra, protein, peptid, gen, aşı, antijen, insan büyüme faktörleri, vasküler endotelial büyüme faktörleri gibi makromoleküler yapıdaki çeşitli ilaçlar, PLGA ile hazırlanmış ilaç sistemleri içerisine başarılı bir şekilde yüklenebilmektedir. Bu sistemler genel olarak ilaçların hedeflendirilmesinde (hücrel veya doku temelinde) kullanılmaktadır. Bunun yanında biyoyararlanımı artırır, ilaç salımını uzatır, gastrointestinal geçiş sırasında ilacı korur. Gelecekte yapılacak araştırma ve geliştirme çalışmalarında PLGA ile hazırlanmış ilaç sistemleri çeşitli avantajlarından dolayı ilgi çekici bir alandır.

Poli (glikolik asit) (PGA), Poli (laktik asit) (PLA) ve bunların kopolimerlerinin uygulamalarında diğer biyoparçalanır polimerlere göre daha fazla araştırma yapılmaktadır. PLA/PGA vücut içinde ester omurgasından basit hidroliz ile zararsız ve toksik olmayan bileşiklere hidroliz olan biyoparçalanır polimerlerdir.

PLGA'nın biyoparçalanma derecesi laktik ve glikolik asitin polimer zincirindeki molar oranlarına, polimerin molekül ağırlığına ve camsı geçiş sıcaklığına göre farklılık gösterir. PLA ve PGA'nın çeşitli oranlarda (35:65, 50:50, 65:35, 75:25) bir araya gelmesinden oluşan PLGA'lar mevcuttur. Bu oran değiştikçe yani laktik asit oranı azaldıkça parçalanma hızı ve ilacın salım yüzdesi de artmaktadır [119,120].

Ticari olarak piyasada bulunan PLGA kopolimerleri fonksiyonel gruplarına göre üçe ayrılır. Bu fonksiyonel gruplar serbest karboksilik asit grubu, ester grubu ve alkil esteri grubu olabilir. PLGA'nın aynı zamanda çeşitli molekül ağırlıkları ticari olarak bulunmaktadır. PLGA'nın ticari tiplerinin isimlendirilmesinde molekül ağırlığı ve fonksiyonel grupları gözönünde bulundurulmaktadır. Ester ve alkil esteri taşıyan PLGA tipleri, serbest karboksilik asit içerenlere göre daha uzun degradasyon süresi gösterirler. PLGA mikro/nano taşıyıcıya hapsedilmiş olan ilaç kontrollü olarak salınır ve böylece hedef bölgede belirli süre istenen konsantrasyonda ilaç bulunması sağlanır [96,107,108,114,121-124].

PLGA ile hazırlanan nanopartiküller genellikle emülsiyon-solvan uçurma sistemi ile polivinil alkol (PVA)'ün emülsifiyer olarak kullanılmasıyla hazırlanır [108].

2.8. Hücre Kültürü

Hücre kültürü, mekanik veya enzimatik parçalanma ile bir dokudan ayrılmış olan hücrelerin üretilmesi işlemidir. Orjinal bir dokudan alınan disperse hücrelerden, primer kültürlerden veya bir hücre serisinden/soyundan, enzimatik veya mekanik yolla elde edilen hücrelerin çoğaltılması işlemi olarak da ifade edilebilir [125].

Hücre kültürü ortamında fizikokimyasal çevre ve buna bağlı olarak fizyolojik koşullar daha iyi kontrol edilebilir. Sıcaklık, pH, ozmotik basınç, O₂ ve CO₂ kısmi basınçları gibi fizikokimyasal koşullar hücre kültüründe daha kolay sağlanabilir. Doku örnekleri çoğunlukla heterojendir ancak birkaç pasajlamadan sonra kültüre edilmiş hücreler, homojen hale gelirler. Hücrelerin homojenitesi, elde edilen hücrelerin homojenitesi açısından son derece önemlidir. Bunun yanında hücre kültürleri ekonomiktir ve zaman kaybı ve pahalı hayvan çalışmaları minimuma indirilir. Bunlara ek olarak, ürün eldesinde endüstriyel amaçlı olarak kullanılabilmesi de önemli avantajlarından [126,127].

Hücre kültürleri ile yapılan ilk çalışmalarda dokulardan elde edilen doğal ortamlar veya vücut sıvıları kullanılmıştır (tavuk yumurtası embriyo ekstraktı, serum, lenf). Hücre serileri çoğaldıkça daha fazla ortama ihtiyaç duyulmuş ve bu da kimyasal yollarla ortamlar hazırlama ve bu ortamları kullanmayı gerektirmiştir.

Bu ortamlardan bazıları; MEM (Eagle's minimum EssentialMedium), DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), F12, DMEM/F12, α MEM, CMRL1066, RPMI1640 (Rapid Prototyping & Manufacturing Institue), M199, L15, MB 752/1, McCoy's 5A, Fischer'dir [125].

Hücre kültürü besiyerleri, laboratuvar ortamında hücrelerin metabolik aktivitelerini sürdürebilmeleri için gerekli olan mikroçevreyi sağlayan besleyici çözeltilerdir. Hücrelerin canlılıklarının devamı ve çoğalmaları için aminoasitler, karbonhidratlar, lipitler, vitaminler, iyonlar ve proteinlerin ortamda bulunması şarttır ve hücre kültürü bu içerikle hücrelerin gelişimini desteklerler. Laboratuvar ortamında hücrelerin çoğaltılabilmesi için uygun pH, sıcaklık ve nemin sağlanması çok önemlidir [126,127].

2.8.1. Pankreatik beta TC hücreleri

Erişkin insanda, ağırlıkları pankreas ağırlığının % 2'si civarında olan yaklaşık 2 milyon ada bulunmaktadır. Adacıklardaki hücreler, morfoloji ve boyanma özelliklerine göre ayrılırlar. Alfa (α) hücreleri glukagon, beta (β) hücreleri insülin, delta (Δ) hücreleri somatostatin, F hücreleri polipeptit salgılar.

Beta hücreleri temel fonksiyonu, vücuttaki tüm dokuların optimal fonksiyonu için besinlere, hormonlara ve sinirsel stimülasyonlara yanıt olarak plazmadaki glukozun fizyolojik oranının devamlılığını sağlamak amacıyla yeterli biyoaktif insülin salımıdır. Beta hücreleri anatomik yapı dikkate alındığında, komşu hücrelerin de fonksiyonlarını düzenler [6].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Etkin maddeler

İnsülin (Humulin R)	Lilly,
Embriyonik kök hücre (EKH)	ATCC® (CRL-1934)

3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler

Benzalkonyum Klorür (%10luk)	Tekkim
Bovin Serum Albumin (BSA)	Sigma, ABD
1,2-dioleil- <i>sn</i> -glisero-3-fosfo-L-serin (DOPS)	Avanti Polar Lipids Inc, ABD
1,2 dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE)	Avanti Polar Lipids Inc, ABD
Diklorometan	Merck, Almanya
Diyaliz membran (M.A<12,000 Da)	Sigma, ABD
Dulbelco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Biochrom, Almanya
Folin-Cocalteau ayırıcı	Merck, Almanya
Kalsiyum klorür (CaCl ₂ .2H ₂ O)	Merck, Almanya
Kloroform	Merck, Almanya
Kolesterol (Ch)	Sigma, ABD
Membran peroksidaz substratı	Thermo-Pierce
Metanol	Merck, Almanya
MTT (3-(4,5-dimetilthiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium bromit)	Sigma, ABD
Methoxy-poly(ethyleneglycol)2000-distearoylphosphatidylethanolamine PEG-PE	Avanti Polar Lipids Inc, ABD
Pikrik asit	Ateks Kimya
Polilaktik ko-glikolik Asit (PLGA 50:50)	Sigma, ABD
Polivinil alkol (PVA)	Wecker-Almanya
Potasyum Dihidrojen Fosfat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Almanya

RPMI 1640	Biochrom, Almanya
Sodyum hidroksit	Merck, Almanya
Sodyum karbonat	Merck, Almanya
Sodyum nitrat	Merck, Almanya
Sodyum potasyum tartarat	Merck, Almanya

3.1.3 Kullanılan alet ve malzemeler

Bidistile su ünitesi	Milipore®
Direnç ölçüm aleti	Evohm® Voltmeter
Etüv (CO ₂ 'li)	Heraeus
Dikey difüzyon hücresi	Çalışkan Cam
Doku kültür mikroskobu (Inverted mikroskop)	Olympus, IX71)
Franz difüzyon hücreleri	Çalışkan Cam
Hücre kültürü sarf malzemeleri	Granier Gmbh
Flasklar (25 cm ² ve 75 cm ²), Steril pipetler, 96 kuyucuklu plaklar	
Luminesans görüntüleme cihazı	Kodak
Manyetik karıştırıcı	Snijders
Mouse İnsulin ELISA Kit	Shibayagi
Partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel ölçüm aleti	Malvern Zeta Sizer
pH metre	Ph Meter CG 840
Rotaevaporatör	Heidolph
Terazi	Shimadzu AW 320
Termostatlı ısıtıcı	Heidoph
Ultrasonik banyo	Brainsonic 221
Ultrasantrifüj	Hitachi GX serisi
UV spektrofotometresi	Shimadzu UV 1700
Vorteks	Nüve-NM 110
Western Blot aparatları	BioRad

3.2. Yöntem

Çalışmamızda iki farklı etkin madde (insülin ve embriyonik kök hücre (EKH)) kullanılmıştır. Öncelikle bu etkin maddelerle yapılan çalışmalar, ardından elde edilen bulgular verilecektir.

Yöntem kısmındaki ortak bölümler insülin ile yapılan çalışmalar kısmında anlatılacak olup EKH kısmında da o bölüme atıf yapılacaktır.

3.2.1. İnsülin ile yapılan çalışmalar

İnsülin ile yapılan in vitro çalışmalar

İnsülinin miktar tayini yönteminin geliştirilmesi ve validasyonu

İnsülinin miktar tayini için protein tayin yöntemlerinden Lowry yöntemi kullanıldı. Lowry yöntemi, etkin maddenin hücre kültüründen geçiş çalışmalarında, stabilite çalışmalarında, in vitro diyaliz membran geçiş çalışmalarında kullanıldı.

Lowry metodunun esası; peptit bağlarının alkali koşullarda bakır iyonları ile biüre reaksiyonu sonucu bakırın indirgenmesi ve Folin-Ciocalteu ayırıcı ile tirozin ve triptofan amino asitlerinin tepkimeye girerek mavi renkli kompleks meydana getirmesidir. Oluşan kompleks 600-800 nm arasında absorbans piki verir.

Analiz çalışmalarına başlamadan önce insülin için Lowry metodu uygulandıktan sonra 200-800 nm arasında UV spektrofotometrede, dalga boyu taraması yapıldı ve λ_{maks} değeri saptandı.

Validasyon, kullanılan yöntemin sürekli olarak doğru ve güvenilir şekilde beklenen sonuçları verdiğinin kanıtlanması için yapılan işlemlerin tamamıdır. Bu validasyon işlemleri o yöntemin doğruluk, kesinlik ve güvenilirliğinin kanıtlanmasına yönelik olarak gerçekleştirilmektedir.

Validasyon işlemleri diyaliz membrandan geçiş çalışmalarında da kullanılacak pH 7,4 fosfat tamponunda, DMEM ve distile su içinde gerçekleştirildi.

Bu koşullar kullanılarak validasyon işlemleri yapılmış ve aşağıdaki parametreler incelenmiştir.

pH 7.4 fosfat tamponu ve DMEM içerisinde insülin validasyonu

Validasyon alışmaları için fosfat tamponu içerisinde insülin çözeltisinin 50 $\mu\text{g/mL}$ derişimde zeltisi, DMEM içerisinde 30 $\mu\text{g/mL}$ hazırlandı. Dalga boyu taraması kre karşı yapıldı.

Doğrusallık

Hazırlanan numunedeki etkin madde miktarının çalışılan aralık içindeki derişimi ile elde edilen yanıtın orantılı olduğunu ifade eder.

İnsülinin fosfat tamponu içerisinde 16 farklı derişimde (0.25 - 60 $\mu\text{g/mL}$), DMEM içerisinde 14 farklı derişimde (30-0,0625 $\mu\text{g/mL}$) 6 ayrı seri çözeltisi hazırlandı. Lowry yöntemi uygulandı ve UV spektrofotometrede oluşan rengin absorbensları ölçüldü.

İnsülin derişimlerine karşılık bulunan absorbens değerlerine en küçük kareler yöntemi uygulandı ve standart doğru denklemi elde edildi. Gerekli istatistiksel parametreler hesaplandı.

Doğruluk ve geri elde

Doğruluk, saptanan madde miktarı ile hazırlanan numune içerisindeki gerçek etkin madde miktarının yakınlığıdır. Yöntemin doğruluğunu kanıtlamak için bilinen konsantrasyonda örneklerin analizi yapılır. Yöntemin doğruluğu geri elde etme yüzdesine bağlıdır. Elde edilen değer % 95 olasılıkla daha önceden kabul edilen aralıkta olmalıdır. İnsülinin fosfat tamponu ve DMEM içerisinde çözeltiden, lipozomdan, nanopartikülden ve nanokohleattan kalibrasyon denklemi kullanılarak geri elde edilen miktarları hesaplandı ve gerekli istatistiksel parametreler değerlendirildi.

Kesinlik

Miktar tayini için kullanılan analiz yöntemiyle, aynı derişimde hazırlanan numunenin ardı ardına yapılan ölçümlerinin birbirine yakınlığı yöntemin kesinliğini, kesinlik de tekrar edilebilirliği gösterir. Kesinlik standart sapma ve bağıl sapma değerleri ile değerlendirilir.

a) Deney içi kesinlik

İnsülinin kalibrasyon doğru denklemini oluşturmak için fosfat tamponu içerisindeki stok çözeltisinden uygun seyreltmeler yapılarak hazırlanan 60 ve 40 µg/mL derişimdeki çözeltilere, DMEM içerisindeki stok çözeltisinden uygun seyreltmeler yapılarak hazırlanan 20 ve 7.5 µg/mL derişimdeki çözeltilere Lowry metodu uygulandıktan sonra UV'de ard arda 10 kere absorbands ölçümü yapıldı. UV'de okunan absorbands değerlerinin ortalaması, standart sapması ve varyasyon katsayısı hesaplandı.

b) Deneyler arası kesinlik

İnsülinin fosfat tamponu içerisindeki 60, 40, 15, 3 ve 1 µg/mL derişimlerdeki çözeltilerinin, DMEM içerisindeki 20, 10, 7,5, 5 ve 1 µg/mL derişimlerdeki çözeltilerinin birbirini takip eden 3 gün içinde 3'er kez Lowry metodu uygulandıktan sonra UV'de absorbandsları ölçüldü. Elde edilen absorbands değerlerine karşılık gelen derişimlerin ortalaması, standart sapması ve varyasyon katsayısı hesaplandı.

Özgünlük ve seçicilik

Kullanılan analiz yönteminin sadece analiz edilmesi istenilen maddeyi saptayabilmesi gerekmektedir. Formülasyona giren etkin madde dışındaki diğer maddelerin aynı dalga boyunda saptanıp saptanmadığı kontrol edilmelidir.

Bu amaçla DOPE, DOPS ve PLGA'nın insülinin pik verdiği dalga boyunda absorbandslarına bakıldı.

Duyarlılık ve saptama sınırı

Kullanılan analiz yönteminin güvenilir şekilde analiz edebildiği en küçük derişimi saptamak için yapılan işlemlerdir. Duyarlılık ve saptama sınırı aşağıdaki denklemlerle hesaplanır:

$$\text{Duyarlılık sınırı(LOD)} = (3.3 \times \sigma) / S$$

$$\text{Saptama sınırı(LOQ)} = (10 \times \sigma) / S$$

σ : kalibrasyon aralığındaki en düşük derişimin standart sapması

S: kalibrasyon eğrisinin eğimi

Distile su içerisinde insülin validasyonu

Distile su ile seyreltilerek hazırlanan insülin çözeltisinin dalga boyu taraması yapıldı ve fosfat tamponu ile hazırlanan çözelti ile aynı dalga boyunda maksimum absorbans verdiği için validasyon çalışmaları ayrıca yapılmamıştır.

Diferansiyel taramalı kalorimetre analizi

Çalışmalar, DSC (Differential Scanning Calorimetry) kullanılarak 10°C/dk tarama hızında 250°C'ye kadar yapıldı. Etkin madde (insülin) ve formülasyon hazırlamada kullanılan tüm yardımcı maddelerin tek başlarına ve etkin maddeyle 1:1 oranındaki karışımları kullanılarak yapıldı. Örnekler 2 mg tartılarak alüminyum örnek kaplarına kondu. Alüminyum kapak kapatılarak pellet basıldı ve ardından aletin ısıtma hücresine yerleştirildi. 20-250°C sıcaklık arasında azot atmosferi altında ölçümler gerçekleştirildi. DSC çalışmalarında, kullanılan maddeler:

Dioktil fosfatidil serin (DOPS)

Dioleyil fosfatidil etanolamin (DOPE)

Kolesterol (Ch)

Kalsiyum klorür (CaCl_2)

Polilaktid-ko-glikolik asit (PLGA 50:50)

Polivinil alkol (PVA)

Methoxy-poly(ethyleneglycol) 2000-distearoylphosphatidylethanolamine-PEG-PE

İnsülin + DOPS

İnsülin + DOPE

İnsülin + Ch

İnsülin + CaCl_2

İnsülin + PLGA

İnsülin + PVA

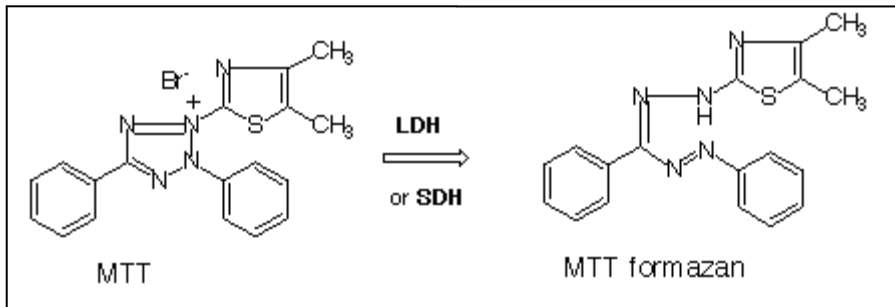
İnsülin + Methoxy-poly(ethyleneglycol)2000 distearoyl phosphatidyl ethanolamine-PEG-PE

Hücre kültürü çalışmaları

MTT (Sitotoksite) testi

Gelişme fazındaki hücreler, sitotoksik ilaca maruz bırakılır. Hücrelerin ilaca maruz kalacağı süre genellikle maksimum hücre hasarının oluşması için gereken süredir. Bu süre aynı zamanda ilacın stabilitesine de bağlıdır. İlacın uzaklaştırılmasından sonra, hücrelerin 2-3 kez bölünmesi için belli bir süre beklenir. Böylece görünür durumda olup üreyemeyen hücreler ile hem görünen hem de üreyebilen hücreler ayırt edilmiş olur. Yaşayan hücreler, MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium bromit) boyasının redüksiyonu ile dolaylı olarak teşhis edilir.

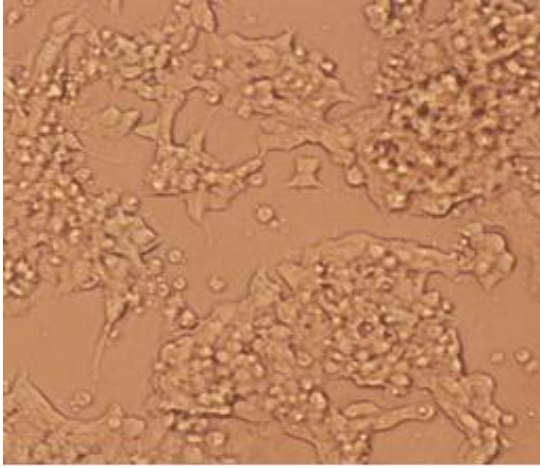
MTT testinin esası, sarı renkli çözünebilir özellikteki MTT boyasının, metabolik olarak aktif olan hücrelerin mitokondrilerinde bulunan süksinat dehidrogenaz (SDH) enzimi ile koyu mavi renkli çözünmez özellikteki formazan ürününe dönüşmesidir (Şekil 3.1). Oluşan formazan ürünü çözünür hale getirilir ve oluşan mor renk spektrofotometrik olarak ölçülür.



Şekil 3.1. MTT reaksiyonunun kimyasal gösterimi

İnsülin ve formülasyon hazırlamada kullanılan benzalkonyum klorür için MTT testi uygulandı. Ayrıca etkin madde içermeyen lipozom, nanopartikül ve nanokohleat formülasyonlarına da MTT testi uygulandı. Amaç, hücrelerden geçiş çalışmasını yapacağımız çözelti, lipozom, nanopartikül ve nanokohleat formülasyonlarında kullanılan etkin maddeyi, hücreler canlı kalacak şekilde, maksimum hangi miktarda kullanabileceğinin görülmesidir.

Testte pankreatik beta hücrelerinin canlılıkları 48 saat izlendi. Resim 3.1’de pankreatik beta hücrelerinin DMEM ile inkübe edildikten sonra inverted mikroskop fotoğrafları görülmektedir.



Resim 3.1. Pankreatik beta hücrelerinin mikroskop görüntüsü

İnsülin için, 2, 8, 10, 20 IU/mL derişimlerde DMEM ile çözeltileri ayrı ayrı hazırlandı.

Lipozom ve nanokohleat formülasyonlarında kullanılan benzalkonyum klorür çözeltisi % 10, % 5 ve % 1’lik olacak şekilde DMEM ile ayrı ayrı hazırlandı.

Lipozom formülasyonunda kullanılacak lipidlerin hücrelere etkisini görmek için etkin madde içermeyen, sadece DOPE ve Ch’den oluşan lipozomlar, DOPS ve Ch’den oluşan nanokohleatlar, % 25, % 50 ve % 75’lik olarak hazırlandı.

Nanopartikül formülasyonunda da etkin madde içermeyen, sadece % 0,4 lük polivinil alkol (PVA) çözeltisi ve diklorometan:metanol içinde oda sıcaklığında

çözünen polimerden (PLGA) oluşan nanopartiküller % 25, % 50 ve % 75 'lik olarak hazırlandı.

Hazırlanan numuneler deney yapılincaya kadar +4°C'de saklandı. Test için 37°C'ye getirildikten sonra kullanıldı.

Test için kullanılacak pankreatik beta hücreleri 96 kuyucuklu doku kültür kaplarında üretildi. Kuyucuklara 100'er µL DMEM eklendi ve 24 saat 37°C'de CO₂'li etüvde bekletildi. Hücre grubu için hiçbir madde içermeyen sadece DMEM içeren kontrol grupları belirlendi. Ardından kaplar boşaltıldı ve değişen derişimlerde test maddelerinin DMEM içerisindeki çözeltileri (100 µL) kuyucuklara eklendi (Resim 3.2.) ve 48 saat 37°C'de CO₂'li etüvde bekletildi. 48 saatin sonunda kaplardaki içerik boşaltılarak, tüm kuyucuklara 100 µL taze DMEM ile 13 µL MTT çözeltisi eklendi. Kültür kapları hemen alüminyum folyo ile sıkıca sarıldı ve 4 saat 37°C'de CO₂'li etüvde bekletildi. 4 saatin sonunda etüvden çıkarılan kaplar boşaltıldı ve kuyucuklara 100'er µL izopropanol ilave edildi. Oluşan mor renk spektrofotometrik olarak 570 nm'de tayin edildi. Farklı derişimlerdeki maddeler için farklı absorbans değerleri elde edildi ve bu değerlerden hareketle yüzde canlılık hesapları yapıldı. MTT testi sırasında çekilmiş bir fotoğraf, Resim 3.2'de görülmektedir.



Resim 3.2. Farklı konsantrasyonlardaki maddelerin DMEM içerisinde hücreye tatbik edilmesi

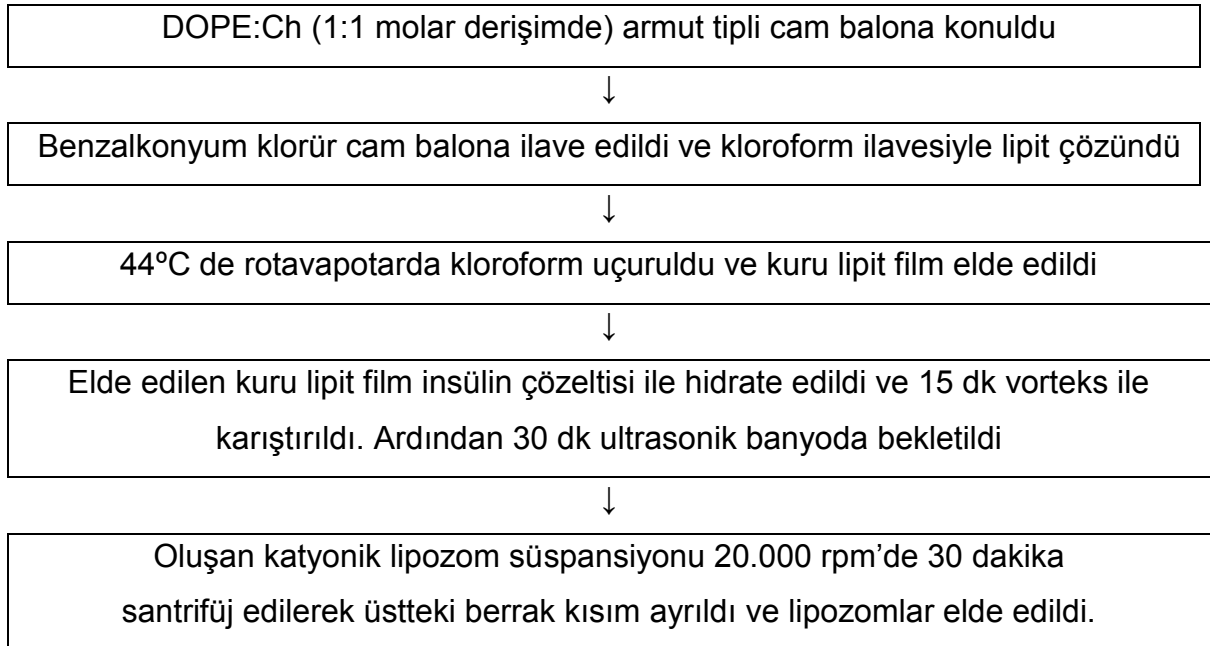
İn vitro çalışmalarda kullanılan insülin formülasyonları

İn vitro geçiş çalışmalarında çözelti, lipozom, nanopartikül ve nanokohleat tipi formülasyonlar kullanıldı. Formülasyon içeriğinde kullanılan insülin miktarı MTT testi sonuçları göz önüne alınarak belirlendi. Geçiş çalışmalarında kullanılan formülasyonlar:

- İnsülin çözeltisi
- İnsülin lipozomları
- İnsülin-PEG lipozomları
- İnsülin nanopartikülleri
- İnsülin nanokohleatları
- İnsülin-PEG nanokohleatları

Lipozomların hazırlanması

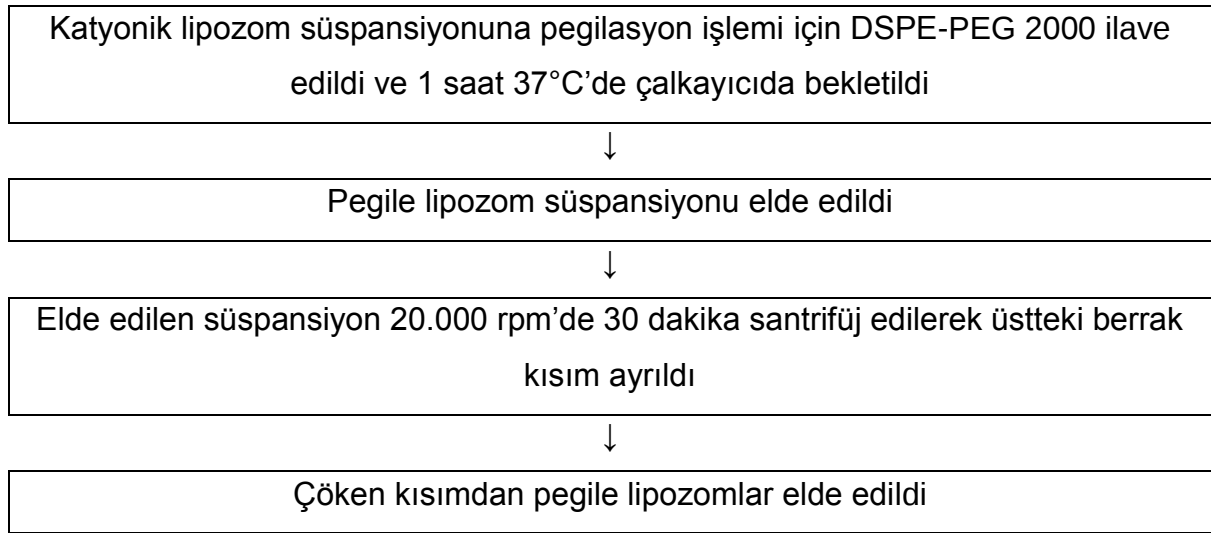
Tez çalışmamızda, katyonik lipozomlar ve pegile katyonik lipozomların yapımında, fosfolipit olarak DOPE, stabilite artırıcı olarak kolesterol (Ch) kullanılarak Bangham yöntemi [129] ile aşağıda belirtildiği gibi hazırlandı.



İnsülin ile hazırlanan lipozomlar, vorteks ile karıştırılmasının ardından elde edilen ile elde edilmiştir. Yükleme etkinliği etkin madde miktar tayini ile belirlenmiştir.

EKH içeren lipozomların hazırlanması ise, önce boş olarak hazırlanan lipozomların 1 saat hücre ($1,2 \times 10^6/\text{mL}$) ile inkübasyonu (37°C % 5 CO_2 'li etüv) ve daha sonra ortamın uzaklaştırılıp taze DMEM ilavesiyle 48 saat inkübasyonu yapılarak etkin madde (EKH) yüklemesi yapılmıştır. Yükleme etkinliği, hücre sayımı, Lowry protein tayin yöntemi ve Western blot ile yapılmıştır.

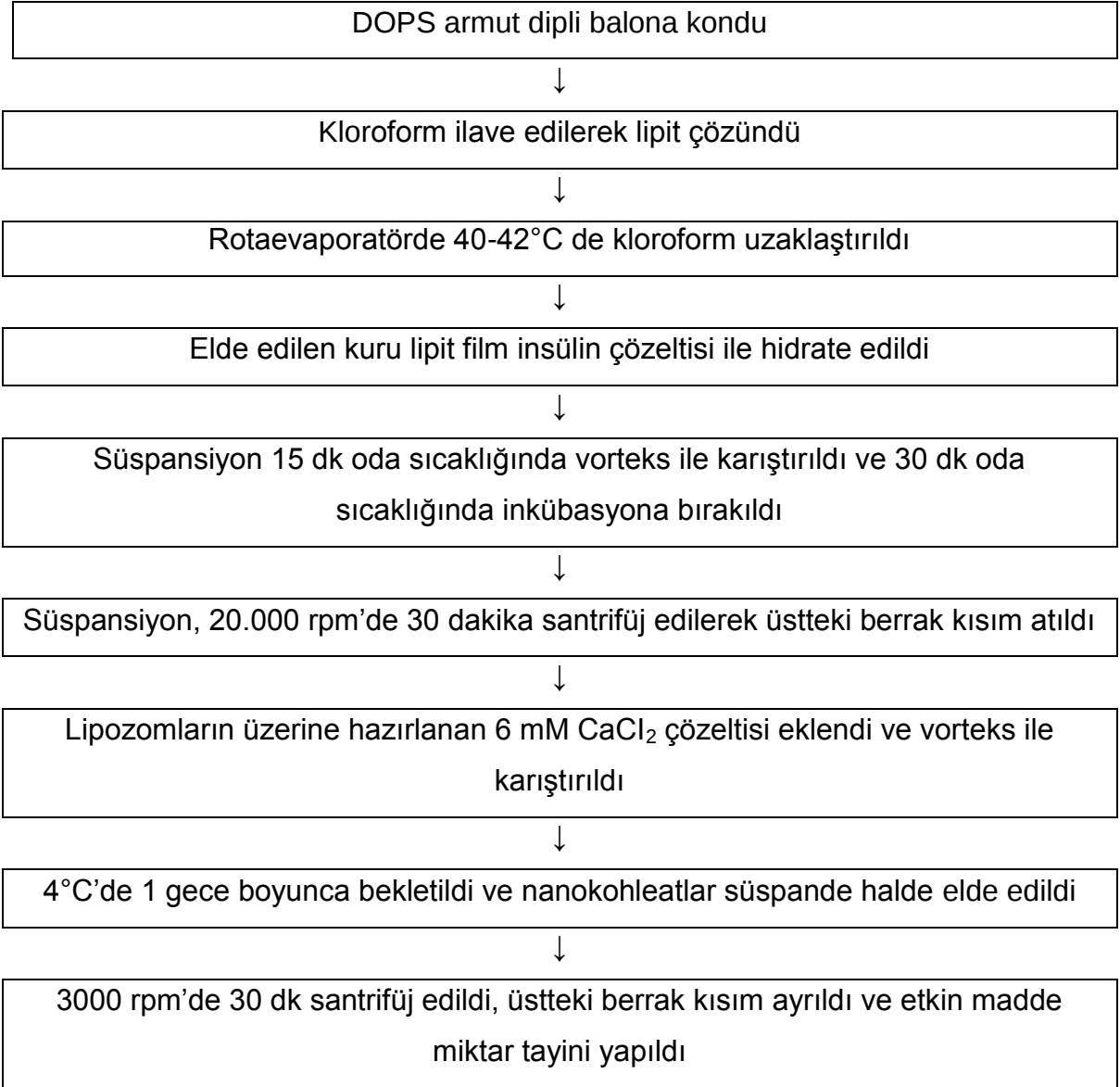
Pegile lipozomlar ise aşağıda belirtildiği gibi hazırlandı.



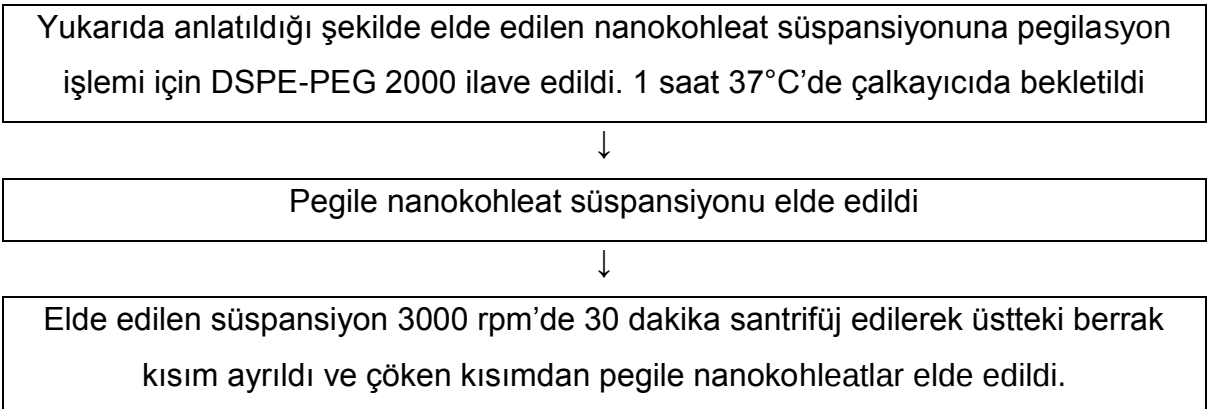
Hazırlanan insülin yüklü kasyonik lipozomlar ve kasyonik pegile lipozomlar, MTT sitotoksikite çalışmalarında, hücre kültürü geçişlerinde, diyaliz membranından Franz difüzyon deneylerinde ve in vivo deneylerde kullanıldı.

Nanokohleatların hazırlanması

Nanokohleatların hazırlanmasına yönelik yapılan literatür taramalarında bir takım metotlar bulunmuş olup [94] anyonik yapıdaki fosfolipit olarak DOPS kullanılmıştır. Nanokohleatların hazırlanışı aşağıda belirtilmiştir.



Pegile nanokohleatlar ise aşağıda belirtildiği gibi hazırlandı.

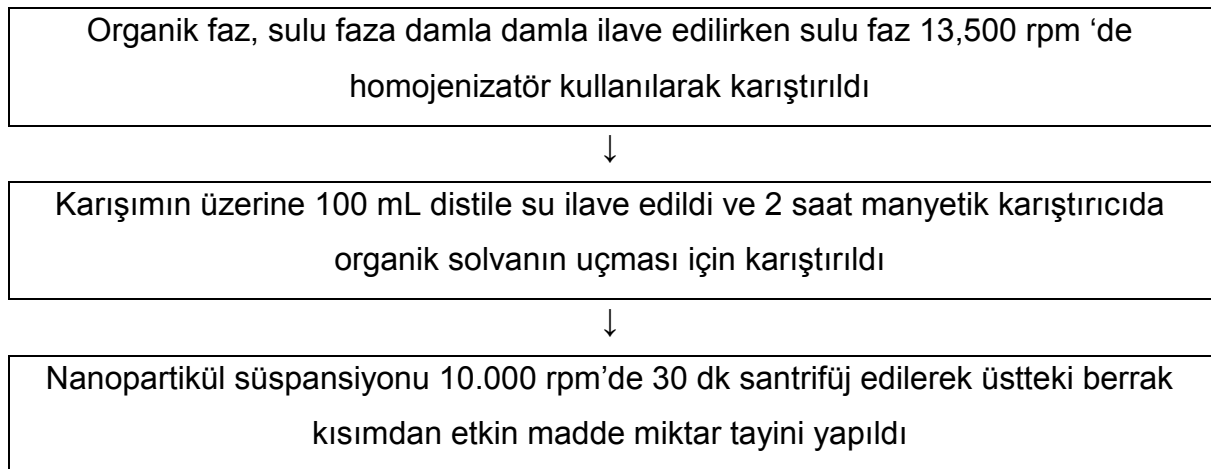


EKH ile hazırlanan nanokohleatların hazırlanması ise, önce boş olarak hazırlanan nanokohleatların 1 saat hücre ($1,2 \times 10^6/\text{mL}$) ile (37°C % 5 CO_2 'li etüv), daha sonra ortamın uzaklaştırılıp taze DMEM ilavesiyle 48 saat inkübasyonu yapılarak etkin madde (EKH) yüklemesi yapılmıştır. Yükleme etkinliği, hücre sayımı, Lowry protein tayin yöntemi ve Western blot ile yapılmıştır.

Hazırlanan insülin nanokohleatlar ve pegile nanokohleatlar, MTT sitotoksosite çalışmalarında, hücre kültürü geçişlerinde, diyaliz membranından Franz difüzyon deneylerinde ve in vivo çalışmalarda kullanıldı.

Nanopartiküllerin hazırlanması

Tez çalışmamızda, nanopartikül yapımında, PLGA polimer olarak kullanılmış olup izlenen yol aşağıda belirtilmiştir: Sulu faz, % 0,4 lük PVA çözeltisini, organik faz ise; PLGA polimeri diklorometan: metanol (90:10) karışımı içinde çözündü.



EKH ile hazırlanan nanopartiküller, nanopartiküllerin önce boş olarak hazırlanması sonrası EKH ($1,2 \times 10^6/\text{mL}$) ile 1 saat inkübasyon (37°C % 5 CO_2 'li etüv), daha sonra taze ortam ilavesiyle 48 saat inkübasyon (37°C % 5 CO_2 'li etüv) daha yapılarak etkin madde (EKH) yüklemesi yapılmıştır [157]. Yükleme etkinliği, hem hücre sayımı, hem Lowry protein tayin yöntemi hem de Western blot ile yapılmıştır.

Hazırlanan insülin yüklü nanopartiküller, MTT sitotoksisite çalışmalarında, hücre kültürü geçişlerinde, diyaliz membranından Franz difüzyon deneylerinde ve in vivo çalışmalarda kullanıldı.

Pegilasyonun spektrofotometrik tayini

Pegilasyon işlemi sonucu hazırlanan lipozom ve nanokohleatlara bağlanan DSPE-PEG2000 lipit tayini için spektrofotometrik yöntem olan pikrat metodu [150] kullanılmıştır. Yöntemin esası; polietilenlerin sodyum iyonu ile oluşturduğu kompleksin, 1,2-dikloroetan içinde pikrat olarak ekstraksiyonu sonrası spektrofotometrik tayinidir.

Bu yöntemde sodyum nitrat-pikrat çözeltisi; 3,33 M sodyum nitrat, 0,02 M pikrik asit ve 0,1 M sodyum hidroksit içerecek şekilde hazırlanır ve bu çözelti sulu fazı oluşturur.

Organik fazı oluşturan 1,2-dikloroetan içerisine, örnek süpernatantını içeren sulu faz, organik faz:sulu faz 5:15 (h/h) oranında olacak şekilde ilave edilmiş ve ardından kuvvetlice çalkalanmıştır. 1500 g'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra üstteki sulu faz ayrılmış ve organik fazdan spektrofotometrik olarak 378 nm'de ölçüm yapılmıştır.

DSPE-PEG2000 lipit çözeltisinin (50 µg/mL) bir seri çözeltisi ile oluşturulan kalibrasyon denklemi kullanılarak örnek içindeki PEG-lipit tayini yapılmıştır.

İnsülin yüklü lipozom, nanokohleat ve nanopartiküllerin karakterizasyonu

Partikül büyüklüğü ve dağılımı

Hazırlanan lipozom, nanopartikül ve nanokohleatların partikül büyüklüğü ve dağılımı Malvern Zeta Sizer-Nano ZS aleti ile ölçüldü. Malvern Zeta-Sizer-Nano ZS cihazı ile partikül büyüklüğü, zeta potansiyeli, molekül ağırlığı ölçümleri yapılabilmektedir. Partikül büyüklüğü ölçüm aralığı 0,6-6000 nm arasındadır. Alet, Dynamic Light Scattering (DLS) (Dinamik Işık Saçılımı) teknolojisi kullanılarak

ölçüm yapar. Ortam içerisinde Brown hareketleri yapan partiküllerin boyutunun büyümesi Brown hareketlerini yavaşlatırken, sıcaklığın artması hızlandırır.

Hazırlanan formülasyonların partikül büyüklüğü ve dağılımının zamanla değişip değişmediği stabilite çalışmalarıyla incelenmiştir.

Lipozom, nanokohleat ve nanopartiküllerin yüzey özelliklerinin incelenmesi

Hazırlanan lipozom, nanopartikül ve nanokohleatların şekli TEM (Transmission Electron Microscopy) ile Orta Doğu Teknik Üniversitesi TEM Laboratuvar'nda görüntülendi. TEM'de görüntüleme için hacimli örneklerimiz uygun derecede seyreltikten sonra 2-3 mm çaplı disklerde bir gece kurumaya bırakıldı ve görüntülemeye alındı.

Lipozom, nanokohleat ve nanopartiküllerin içine hapsedilen miktar tayini

İnsülin içeren lipozom, nanopartikül ve nanokohleatların süspansiyon halinde elde edilmesi sonrası santrifüj edilip üstteki berrak kısım (süpernatant) uygun oranlarda seyreltilerek Lowry metodu ile protein tayini yapılmıştır.

Zeta potansiyeli ölçümleri

Hazırlanan lipozom, nanopartikül ve nanokohleatların zeta potansiyel ölçümleri Malvern Zeta Sizer-Nano ZS aleti kullanılarak yapıldı. Aletin çalışma prensibi elektroforeze dayanır. Elektroforez, ortamda bulunan partiküllerin elektriksel alandaki hareketini ifade eder. Elektroforetik hız, elektroforetik mobilite ile orantılıdır. Elektroforetik mobilite, ölçülebilir bir parametredir ve zeta potansiyel ile ilişkilidir.

İnsülin içeren formülasyonların stabilitesi

İnsülin içeren lipozomlar, nanokohleatlar ve nanopartiküller hazırlanmış ve formülasyonlar, 4°C, 25°C±%60 bağıl nem ve 40°C±%75 bağıl nem ortamlarında 6 ay süreyle muhafaza edilmiştir.

Formülasyonların partikül büyüklüğü ve dağılımları ve zeta potansiyelleri

Hazırlanan formülasyonların partikül büyüklüğü ve dağılımı ve polidispersite değerleri Malvern Zeta Sizer Nano-ZS aleti ile 0.gün (başlangıç) ve. 1.,2.,3.,4.,5. ve 6. aylarda tayin edildi.

Hazırlanan formülasyonların zeta potansiyelleri Malvern Zeta Sizer Nano-ZS aleti ile 0.gün (başlangıç) ve. 1.,2.,3.,4.,5. ve 6. aylarda tayin edildi.

Formülasyonlarda insülin miktar tayini

İnsülin, lipozom, nanokohleat ve nanopartiküllerden Lowry protein tayin yöntemiyle, 0.gün (başlangıç) ve. 1.,2.,3.,4.,5. ve 6. aylarda tayin edildi.

Formülasyonların TEM görüntüleri

Stabilite çalışmalarına tabi tutulacak formülasyonların başlangıçta ve 6. ayda TEM görüntüleri çekilmiştir.

İn vitro geçiş çalışmaları

Diyaliz membran geçişleri

Diyaliz membran (12000 Da) geçişleri pH 7,4 fosfat tamponunda yapıldı. Bu pH'nın seçilmesinin nedeni hücre kültürü çalışmalarında kullanılan DMEM'in pH'sının 7,38 olarak ölçülmesidir. Çözeltilerin, lipozomların, nanokohleatların ve nanopartiküllerin diyaliz membrandan geçiş çalışmaları yapıldı.

Kullanılan diyaliz membran 24 saat boyunca pH 7,4 fosfat tamponunda ıslatıldı. Diyaliz membran geçişleri Franz difüzyon hücreleri kullanılarak yapıldı. Diyaliz membran bu Franz hücresinin arasına yerleştirildi. Hücrelerin alt kısmına 2 mL pH 7,4 fosfat tamponu, üst kısmına ise geçişi incelenecek formülasyonlar konuldu. Ortam sıcaklığı 37⁰C'de tutuldu, sabit hızda karıştırma deney süresince devam etti.

15., 30., 45., dakikalarda, 1., 2., 3., 4., 6., 8., 12., 24. ve 48. saatlerde alt kısımdan 2 mL örnek alındı. Ortamın hacminin değişmemesi için örnek alımından sonra, alt kısma örnek hacmi kadar sıcaklığı 37°C'ye ayarlanmış pH 7,4 fosfat tamponundan ilave edildi. Alınan örneklerdeki insülin miktar tayini UV spektrofotometresi ile yapıldı. Hücrelerden geçen yüzde kümülatif ilaç miktarları zamana karşı grafiğe geçirildi, 48 saat boyunca yüzde kümülatif geçen miktarlar hesaplandı.

Geçiş çalışmalarında kullanılan ve üzerinde hücre bulunmayan filtrelerden geçiş çalışmaları

Hücre geçişi çalışmalarında kullanılan filtrelerin, geçiş üzerine etkisi olup olmadığını görmek amacıyla üzerinde hücre tek tabakası olmayan filtrelerden çözelti, lipozom, nanokohleat ve nanopartikül formülasyonları geçişleri incelendi.

Hücre geçiş çalışmalarında kullanılmak üzere pankreatik beta hücrelerinin üretilmesi

-196°C'de dondurularak saklanmış pankreatik hücreler çıkartılarak 37°C'lik su banyosunda çözüldü. 800 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj edildi. Üstteki berrak kısım ayrılarak atıldı. Çökelti, 5 mL % 10'luk fetal bovin serum, % 1 sodyum bikarbonat (toplamda % 7,5 olacak şekilde) ve % 1 içeren DMEM ile homojenize edildi ve 25 cm²'lik doku kültürü şişesine alındı. Hücreler, doku kültürü şişesi içinde 37°C'de CO₂'li etüvde üremeye bırakıldı. 48 saatte bir vasat değiştirildi. Hücrelerin üreme durumları mikroskop ile kontrol edildi. Hücrelerin % 100 tek tabaka şeklinde ürediği görüldükten sonra 75 cm²'lik doku kültürü şişesine pasajlama yapıldı.

Doku kültürü şişesinin yüzeyine tutunmuş hücreleri uzaklaştırmak için tripsinizasyon işlemi uygulandı. Tripsinizasyon işleminin ardından hücreler tripan mavisi ile boyanarak, bruker lamında mikroskop ile sayıldı. Hücre yoğunluğu hesaplandı. Hücreler hazırlandıktan sonra filtreler üzerine aktarıldı. 48 saatte bir vasat tazelenildi.

Pankreatik beta TC hücrelerinden geçiş alışmaları

Hücre kültürlerinden geçişi incelenecek formülasyonlarda kullanılacak madde miktarlarının belirlenmesinde MTT testi sonuçları esas alındı. MTT testi sonuçlarında hücrelerin canlılığını etkilemeyecek biçimde kullanılabilecek maksimum insülin derişimi 10 IU/mL olarak belirlendi. Çözeltiler, lipozom, nanopartikül ve nanokohleat içine hapsedilen insülin miktarları da göz önünde bulundurularak hazırlandı.

Geçiş çalışmalarında kullanılan pankreatik beta hücreleri 0,4 µm por çaplı filtreler üzerinde üretildi. Üzerinde hücre tek tabakası olan filtreler, difüzyon hücresinin apikal ve bazolateral kısımlarının ara bölümüne yerleştirildi. Difüzyon sisteminin sıcaklığı 37°C'ye ayarlandı. Apikal kısımdan bazolateral kısma doğru geçişler incelendi.

Geçiş alışmaları için hazırlanan çözelti, lipozomlar, nanopartiküller ve nanokohleatlar DMEM ile 4 mL hacme tamamlandı. Difüzyon hücresinin apikal kısmına DMEM içerisinde bu formülasyonlar, basolateral kısmına da 4 mL DMEM ilave edildi.

15., 30., 45. dakikalarda, 1.,2., 4., 6., 8., 12., 24. ve 48. saatlerde bazolateral kısımdan 4 mL örnek alındı. Örnek alımından sonra, bazolateral kısma örnek hacmi kadar ilaçsız 37°C'ye getirilmiş DMEM ilave edildi. Alınan örneklerdeki insülin miktar tayini Lowry metodu uygulanarak yapıldı. Hücrelerden geçen yüzde kümülatif ilaç miktarları zamana karşı grafiğe geçirildi, 48 saatin sonunda yüzde kümülatif geçen miktarlar hesaplandı.

Pankreatik beta TC hücrelerinin bütünlüğünün değerlendirilmesi

Hücre kültürlerinde hücre bütünlüğünün tespitinde kullanılan yöntemlerden birisi de elektriksel direncin ölçülmesidir. Bu amaçla; Voltmeter (WPI, USA) direnç ölçüm aleti kullanılmıştır. Elektrotlardan biri DMEM'li ortama, diğeri ise DMEM bulunan hücre tabakasına daldırılarak değler ohm (Ω) cinsinden ölçüldü. Ölçüm sırasında kullanılan alet Resim 3.3'te görölmektedir.



Resim 3.3. Ölçüm sırasında kullanılan Evom Voltmeter aleti

İnsülinin geçirgenlik katsayısının ($k=P_{app}$) hesaplanması

İnsülinin lipozom, nanopartikül, nanokohleat ve çözelti formülasyonlarıyla gerçekleştirilen geçiş çalışmaları sonunda elde edilen yüzde kümülatif insülin miktarlarından hareketle k değerleri hesaplandı.

Geçirgenlik katsayısı birimi cm/saat'tir ve Eş 3.1'deki formüle göre hesaplanır [130-132].

$$\text{Eş. 3.1. } P_{app} = (dQ / dt) \times (1 / A \times C_0)$$

Bu formülde; P_{app} : Geçirgenlik katsayısını (cm/saat), (dQ / dt) : Geçirgenlik hızını, A : Membran alanını, C_0 : Donör kompartmandaki konsantrasyonu ifade eder.

3.2.2. Embriyonik kök hücre miktar tayini yönteminin geliştirilmesi

Embriyonik kök hücre ile yapılan in vitro çalışmalar

Embriyonik kök hücre miktar tayini yönteminin geliştirilmesi ve validasyon çalışmaları

Bölüm 3.2.1.'de anlatıldığı üzere EKH'nin miktar tayininin geliştirilmesinde Lowry yöntemi kullanılmıştır. Yine bu bölümde yöntemin esası belirtilmiş olup EKH için

Bovin Serum Albumin (BSA) referans protein olarak kullanılmış ve validasyon çalışmaları BSA ile yapılmıştır.

BSA miktar tayini için de Lowry metodu uygulanmasının ardından UV spektrofotometrisi kullanıldı. BSA'nın maksimum dalga boyunu saptamak için su içinde 500 µg/mL derişimde 200-800 nm arasında UV spektrofotometrede dalga boyu taraması yapıldı.

Doğrusallık

BSA'nın su içerisinde hazırlanan stok çözeltisinden hareketle 16 farklı derişimde (1-500 µg/mL) 6 ayrı seri çözelti hazırlandı. Her birine Lowry metodu uygulandı ve absorbansları ölçüldü. BSA derişimlerine karşılık gelen absorbans değerlerine doğrusal en küçük kareler yöntemi uygulandı. Standart doğru denklemi elde edildi. Gerekli istatistiksel parametreler hesaplandı.

Doğruluk ve geri elde

BSA'nın çözeltiden geri elde edilen miktarları hesaplandı. Geri elde edilen miktarlar, gerekli istatistiksel parametrelerle değerlendirildi.

Kesinlik

a) Deneyiçi kesinlik

BSA'nın su içerisinde 200 ve 75 µg/mL'lik çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilere Lowry metodunun uygulanmasının ardından, UV'de ard arda 10 kere okundu. Elde edilen derişimin ortalaması, standart sapması ve varyasyon katsayısı hesaplandı.

b) Deneylerarası kesinlik

BSA'nın su içerisinde 400, 250, 100, 50, 20, 10, 4 µg/mL derişimlerde çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilere Lowry metodu uygulandıktan sonra bu numunelerin absorbansları ardarda 3 gün 3'er kez UV'de ölçüldü. Elde edilen absorbans

değerlerine karşılık gelen derişimlerin ortalaması, standart sapması ve varyasyon katsayısı hesaplandı.

Özgünlük ve seçicilik

Kullanılan analiz yönteminin sadece analiz edilmesi istenilen bileşigi saptadığını göstermek için, formülasyona giren etkin madde dışındaki bileşenlerin UV’de verdikleri absorbands değerlerinin saptanması gerekmektedir.

Duyarlılık ve Saptama Sınırı

Duyarlılık ve saptama sınırı daha önce 3.2.1’de belirtildiği gibi hesaplanmıştır.

EKH ile hazırlanan lipozom, nanopartikül ve nanokohleatların karakterizasyonu

Bölüm 3.2.1.’de insülin yüklü formülasyonlar için belirtilen karakterizasyon çalışmaları EKH ile hazırlanan formülasyonlar için de yapılmıştır. EKH yükleme etkinliği hem Lowry metodu hem hücre sayımı hem de Western blot tayini ile yapılmıştır.

EKH içeren formülasyonların stabilitesi

EKH ile lipozomlar, nanokohleatlar ve nanopartiküller hazırlanmış ve formülasyonlar, 4°C, 25°C±% 60 bağıl nem ortamlarında 6 ay süreyle muhafaza edilmiştir. Altı ayın sonundaki görüntüleri TEM mikroskobu ile çekilmiş ve bulgular kısmında gösterilmiştir.

3.2.3. Pankreatik hücrelerle yapılan çalışmalar

Pankreatik beta TC hücreleri ile üç grup oluşturularak çalışma yapılmıştır.

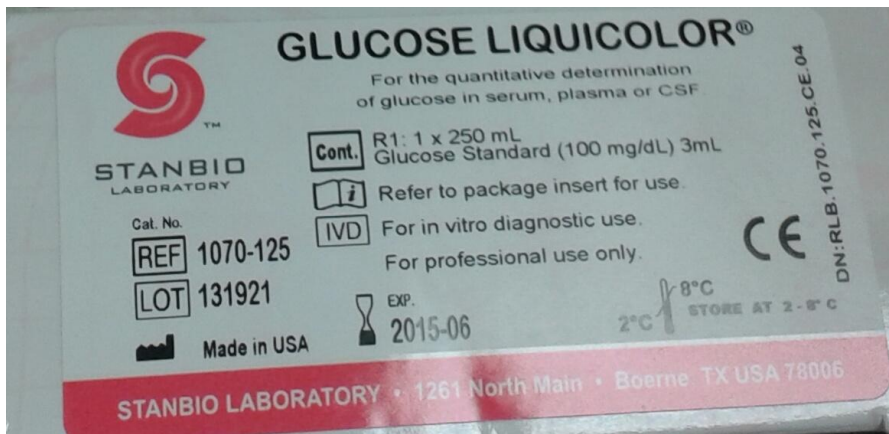
- 1.grup; kontrol grubu
- 2.grup, glukozla stimüle edilmiş hücreler
- 3.grup, streptozosin ile inhibe edilmiş hücreler

Kontrol grubuna hiçbir işlem yapılmamış olup sadece başlangıç glukoz ve insülin tayini yapılmıştır. İkinci grupta ise 25 mM glukoz içeren Krebs-Ringer Bikarbonat (KRB) çözeltisi (119 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 2,54 mM CaCl₂, 1,19 mM MgSO₄, 1,19 mM KH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃) ile hücreler stimüle edilmiş ve daha sonra glukoz ve insülin tayini için örnekler alınmıştır. Üçüncü grupta ise streptozosin ile inhibe edilmiş pankreatik hücrelerden alınan örnekler ile glukoz ve insülin tayini yapılmıştır. MTT testindeki % canlılık değerleri esas alınarak streptozosin çözeltisi pH 4,5 sitrat tamponu ile hazırlanmış ve hücrelere uygulanmıştır. Daha sonra glukoz ve insülin tayini için örnekler alınmıştır.

Formülasyonlardan glukoz tayini

Glukoz ile stimüle edilen ve streptozosin ile inhibe edilen pankreatik beta TC hücrelerine insülin ve EKH ile hazırlanan formülasyonlar (1 mL) uygulanmış ve 48 saat inkübasyon (37°C % 5 CO₂'li etüv) öncesinde ve sonrasında alınan örneklerden glukoz tayini yapılmıştır.

Glukoz tayini için, "Glucose Liquicolor" glukoz kiti kullanılmıştır (Resim 3.4). Kitin içinde bulunan standart (100 mg/dL) ve eldeki örnekler glukoz reajanından ilave edildikten sonra 37°C'de 5 dakika su banyosunda bekletilmiştir. Daha sonra oluşan pembe rengin absorbanı UV spektrofotometrede 500 nm'de ölçülmüştür.



Resim 3.4. Glukoz tayini için kullanılan kit

Formülasyonlardan insülin tayini

Hem glukoz ile hem de streptozosin ile muamele edilmiş $2,5 \times 10^5$ /mL pankreatik beta TC hücrelerine insülin (10 IU) ve EKH ($1,2 \times 10^6$ /mL) ile hazırlanan formülasyonlar uygulanmış ve 48 saat (37°C % 5 CO_2 'li etüv) sonrasında alınan örneklerden insülin tayini yapılmıştır.

İnsülin tayini için "Mouse Insulin ELISA" kiti kullanılmıştır. Kit ile ölçüm için yapılan işlemler sırasıyla aşağıda verilmiştir.

-Oda sıcaklığına getirilen plağın kapağı açılır.

-300 μL yıkama tamponu ile plak 4 kez yıkanır.

-45 μL Biotin konjuge anti insülin çözeltisi tüm kuyucuklara eklenir. Plak çalkalayıcı 600-1200 rpm de 10 saniye x 3 kez çalkalanır.

-5 μL örnek örnekler için belirlenmiş kuyucuklara eklenir ve 5 μL standart çözeltilerden belirlenmiş kuyucuklara eklenir.

-Plak çalkalayıcıda çalkalanır ve 2 saat boyunca $20-25^\circ\text{C}$ 'de plak inkübe edilir.

-Daha sonra reaksiyon karışımı atılır ve yukarıda anlatıldığı gibi yıkama tamponu ile kuyucuklar yıkanır.

-50 μL HRP konjuge streptavidin tüm kuyucuklara konur ve çalkalanır. 30 dakika $20-25^\circ\text{C}$ 'de inkübe edilir.

-Reaksiyon karışımı atılır ve tekrar yıkama işlemi yapılır.

- 50 μL substrat kromojen reajan (TMB) tüm kuyucuklara konur ve çalkalanır. 30 dakika $20-25^\circ\text{C}$ 'de inkübe edilir.

-50 μL reaksiyon durdurucu çözelti kuyucuklara eklenir, çalkalanır ve plak ELISA'da 450 nm'de 30 dakika içinde okunur.

3.2.4. Western blot ile analiz

Dokudaki spesifik bir proteini analiz etmemizi sağlayan moleküler biyoloji tekniğidir. Bu teknik sayesinde dokuda bulunan bir proteinin varlığı, büyüklüğü, konsantrasyonu, konsantrasyon değişimleri, farklı gruplar arasındaki konsantrasyonlarının karşılaştırılması vb. araştırılabilir. Yöntem genel olarak örneklerin hazırlanması, yükleme ve transfer, ilgili proteinin işaretlenmesi ve boyanması ve görüntüleme ve analiz kısımlarından oluşur.

Embriyonik kök hücre (Resim 3.5.) yüklü formülasyonlarımızda yükleme etkinliğini bulmak için β -aktin ile protein tayini yapılmış olup, Western blot yönteminin aşamaları ve prosedürü aşağıda belirtilmiştir.¹

Jellerin hazırlanması

Küçük porlu ayırma jeli %12

Reaktif Adı	Miktar
Ultra saf su	2,175 mL
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	1,250 mL
% 10 SDS (BioRad®)	0,050 mL
Akrilamid/bis-Akrilamid	1,5 mL
Çözültisi 40%	
Amonum per sülfat (%10)	0,025 mL
TEMED	0,010 mL

Büyük porlu yükleme jeli %4

Reaktif Adı	Miktar
Ultra saf su	3,215 mL
0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	1,250 mL
% 10 SDS (BioRad®)	0,050 mL
Akrilamid/bis-Akrilamid	0,5 mL
Çözültisi 40%	
Amonyum per sülfat	0,025 mL
TEMED	0,010 mL

Camlar hazırlandıktan sonra, % 12'lik jel hazırlanmış, üzerine su eklenerek düzgün yüzey oluşturması sağlandıktan sonra tarakların 1 cm altına kadar % 4'lük jel dökülüp tarak yerleştirildi. Jel oluşumundan sonra tarak çıkarıldı.

Örnek tamponu

Örnekler örnek tamponu (sample buffer) içerisinde 1/1 oranında hazırlandı. Örnek tamponu içeriği aşağıdaki gibidir.

¹ Western blot çalışmaları ŞAP Enstitüsü'nde yapılmıştır. Yardımlarından ötürü Sayın Dr. Can Çokçalışkan'a teşekkür ederiz.

Reaktif adı	Miktar
Ultra saf su	3,8 mL
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	1,0 mL
Gliserol	0,8 mL
%10 SDS (BioRad® SDS Cat No: 161-0301 ABD)	1,6 mL
2-mercaptoetanol	0,4 mL
% 1 bromfenol blue	0,4 mL
Toplam	8 mL

Yürütme

Jele 30 µL yüklenen örnekler 200 V akımda 40-50 dakika yürütme tamponu (running buffer) içerisinde yürütüldü.

Transfer

Yürümeden sonra jel ultra saf su ile bir defa yıkandı ve transfer tamponu içine kondu. Transfer tamponu; 25 mM Tris, 250 mM Glisin ve % 15 Metanol içerir.

Kurutma kâğıtları da aynı şekilde transfer buffer içinde bekletildi. Nitroselüloz membran ultra saf su ile ıslatılıp 9 kat kurutma kâğıdı üzerine kondu ve tekrar 9 kat kurutma kâğıdı kondu. Üzerinden pipet yuvarlanarak arada hava kabarcıkları kalması engellendi. 25 V akımda 25 dakika süre ile transfer işlemi yarı kuru şekilde gerçekleştirildi. Süre bitiminde membran ultra saf su ile bir defa yıkandı ve bloklama işlemine alındı

Bloklama

Yüzde 5 Süt tozu (Marwell) TBS içerisinde hazırlanır. 30 dakika yavaş karışım da sıcaklığında bırakılır. Süre sonunda TBS ile bir defa yıkanır. Daha sonra, primer antikor, önceden belirlenen konsantrasyonda % 5 süt tozu içeren bloklama tamponu ile sulandırılır. 1 saat oda ısısında ya da gece boyunca +4°C'de yavaşça çalkalanarak bekletilir. Süre sonunda bir durulama ve 3 x 5 dakika TBS ile yıkama yapılır. Sekonder antikor yine önceden belirlenen konsantrasyonda blocking buffer içerisinde sulandırılır. 1 saat oda ısısında hafif karıştırılarak inkubasyonda tutulur.

Süre sonunda 1 durulama ve 3 x 5 dakika TBS ile yıkama yapılır. Yıkama sonunda membran üzerindeki sıvı iyice süzdürülür

Substrat ile muamele

Membran peroksidaz substratı (West Pico Chemiluminescent substrate/Thermo-Pierce) oluşturan iki karışımdan 5'er mL alınarak, doğrudan ışığa maruz kalmayacak şekilde, 15 dakika hafif çalkalanarak oda ısısında bekletilir. Süre sonunda oluşan luminesans görüntüleme cihazında tüm filtreler çıkarılarak okutulur (2 dakika ve 4 dakika pozlama denenir).



Resim 3.5. Embriyonik kök hücrenin mikroskop görüntüsü (doku kültürü mikroskobu, Olympus IX 71)

3.2.5. İnsülin ve embriyonik kök hücre ile yapılan in vivo çalışmalar

İn vivo çalışmalar kapsamında insülin ve EKH içeren lipozom, nanokohleat ve nanopartikül formülasyonlarının intraperitoneal yolla ve EKH içeren formülasyonların pankreas içi olarak streptozosin (150 mg/kg) ile diyabet oluşturulmuş Balb-C albino tipi farelere uygulanmasının ardından plazmadan glukoz tayini, farelerin çıkarılan pankreaslarından histopatolojik çalışma sonucunda Langerhans adacık sayısı, Langerhans adacıklarının kapladığı alan ve oluşan dejenerasyon şiddetleri değerlendirilerek semikantitatif analizler yapılmıştır. Diyabet oluşturmak üzere streptozosin çözeltisi, hücre kültürü çalışmasında da belirtildiği gibi pH 4,5 sitrat tamponu içerisinde çözüldükten sonra farelere uygulanmıştır.

İn vivo çalışmalarda kullanılan hayvanlar

İn vivo çalışmalarımızda 2-3 haftalık, yaklaşık 30 gram ağırlığındaki erkek Balb-C albino tipi fareler kullanıldı. İn vivo deneyler, Gazi Üniversitesi Rektörlüğü Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığı'ndan (G.Ü.ET-12.075) onay alınarak etik kurallara uygun biçimde Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı'nda veteriner hekim eşliğinde yapıldı.

Deneyin yapılışı

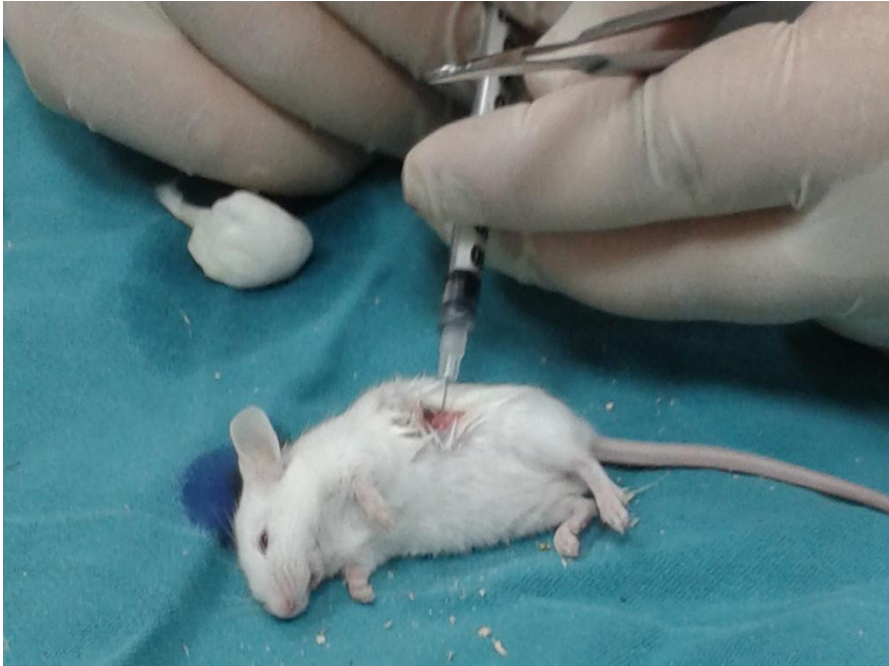
İn vivo deneyler için fareler her grupta 3 paralel örnek olacak şekilde deney grupları oluşturulmuştur. Çizelge 3.1'de insülin ve EKH formülasyonlarının uygulandığı gruplar görülmektedir. Hayvanlar deney başlamadan önce tartılarak ortalama hayvan ağırlıkları belirlenmiştir. EKH formülasyonları hem pankreas içi hem de intraperitoneal (i.p.) olarak verilmiştir (Resim 3.7). İnsülin yüklü formülasyonlar (10 IU/fare) ise intraperitoneal olarak verilmiş ve 24 saat boyunca 15 ve 30. dakikalarda, 1., 2., 4., 6., 8. ve 24. saatlerde intrakardiyak olarak kanları alınmıştır (Resim 3.8.). Kanlar alınır alınmaz plazmaları ayrılıp ve insülin ve glukoz ölçümleri yapılmıştır.

Çizelge 3.1. Farelere uygulanan insülin ve EKH formülasyonları (n=3)

Grup Numarası	Grup Adı	Uygulama Yolu
Grup 1	Kontrol	Uygulama yapılmadı
Grup 2	İnsülin çözeltisi	Intraperitoneal
Grup 3	İnsülin lipozomları	Intraperitoneal
Grup 4	İnsülin pegile lipozomları	Intraperitoneal
Grup 5	İnsülin nanokohleatları	Intraperitoneal
Grup 6	İnsülin pegile nanokohleatları	Intraperitoneal
Grup 7	İnsülin nanopartikülleri	Intraperitoneal
Grup 8	EKH (süspande hücre)	Intraperitoneal
Grup 9	EKH lipozomları	Intraperitoneal
Grup 10	EKH pegile lipozomları	Intraperitoneal
Grup 11	EKH nanokohleatları	Intraperitoneal
Grup 12	EKH pegile nanokohleatları	Intraperitoneal
Grup 13	EKH nanopartikülleri	Intraperitoneal
Grup 14	EKH (süspande hücre)	Pankreas içi
Grup 15	EKH lipozomları	Pankreas içi
Grup 16	EKH pegile lipozomları	Pankreas içi
Grup 17	EKH nanokohleatları	Pankreas içi
Grup 18	EKH pegile nanokohleatları	Pankreas içi
Grup 19	EKH nanopartikülleri	Pankreas içi



Resim 3.6. Farenin çıkarılan pankreası



Resim 3.7. Farelere pankreas içi formülasyonların uygulanışı



Resim 3.8. Farelerden intrakardiyak olarak kan alınması

Farelerden alınan kanlardan ayrılan plazmalardan Bölüm 3.3.1’de anlatıldığı gibi glukoz tayinleri yapılmıştır. İnsülin yüklü formülasyonlar için 24 saat boyunca alınan örneklerin glukoz tayinleri yapılarak zaman-glukoz miktarı grafikleri oluşturulmuştur.

EKH formülasyonları için farelere formülasyonların verilmesinden 48 saat sonunda ölçülen glukoz miktarları grafiklendirilmiştir.

Histopatolojik doku hazırlığı

İnkübasyon süresi sonunda fareler anestezi altında iken alınan pankreas örnekleri sağlıklı farelerin pankreasları ile kıyaslanmak üzere patolojiye gönderilmiştir.

Farelerden alınan pankreaslar % 10’luk formaldehit çözeltisinde bekletildi. Rutin işlemlerden sonra hazırlanan parafin bloklardan 5 µm kalınlığında doku kesitleri alındı².

² Patolojik incelemeler Samsun 19 Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı’nda yapılmıştır. Yardımlarından ötürü Sayın Doç. Dr. Mahmut Sözmen’e teşekkür ederiz.

Ardından, bir Langerhans adacığının çapının ortalama olarak $116 (\pm 80) \mu\text{m}$ [133] olması nedeni ile aynı örnek $110 \mu\text{m}$ kalınlığında kesilerek $5 \mu\text{m}$ kalınlığında bir doku kesiti daha alındı. Kesilen dokular Hematoksilen-Eosin (H&E) ile boyanarak ışık mikroskopunda (Olympus BX51; Olympus Optical Co., Osaka, Japonya) değerlendirildi. Bütün gruptaki pankreas yüzey alanındaki dejenerasyonların şiddet ve yaygınlıkları semikantitatif olarak derecelendirildi; “0: normal; 1: minimal; 2: hafif; 3: orta; 4: belirgin; 5: şiddetli” . Ayrıca incelenen tüm grupta aynı örnekten alınan iki pankreas kesiti 10'luk büyütmede taranarak tespit edilebilen tüm Langerhans adacıklarının çapları ölçüldü ve toplanarak toplam çapları bulundu. Ardından, Langerhans adacıklarının bir pankreas kesitinde yaklaşık olarak kapladıkları alan πr^2 formülüne göre hesaplanarak alanları mm^2 cinsinden ifade edildi.

Ayrıca uygun görülen formülasyonların i.p. uygulamasının ardından 2. günün sonunda örnek alınmasına rağmen çalışma 5. güne kadar devam ettirilmiş ve 5. günün sonunda da örnek alınıp, Langerhans adacık sayısındaki ve kapladığı alandaki artış, oluşan dejenerasyon değerlendirilmiştir.

İn vitro-in vivo korelasyon çalışmaları

Aynı örnek alma zamanlarında, hücre kültürlerinde hesaplanan % kümülatif geçen insülin miktarı ile aynı örnek alma zamanlarında alınan plazma numunelerinden insülin miktarı analizi ile bulunan plazma konsantrasyonu grafiğe geçirilerek korelasyon çalışması i.p. verilen insülin yüklü tüm formülasyon tipleri için gerçekleştirilmiştir.

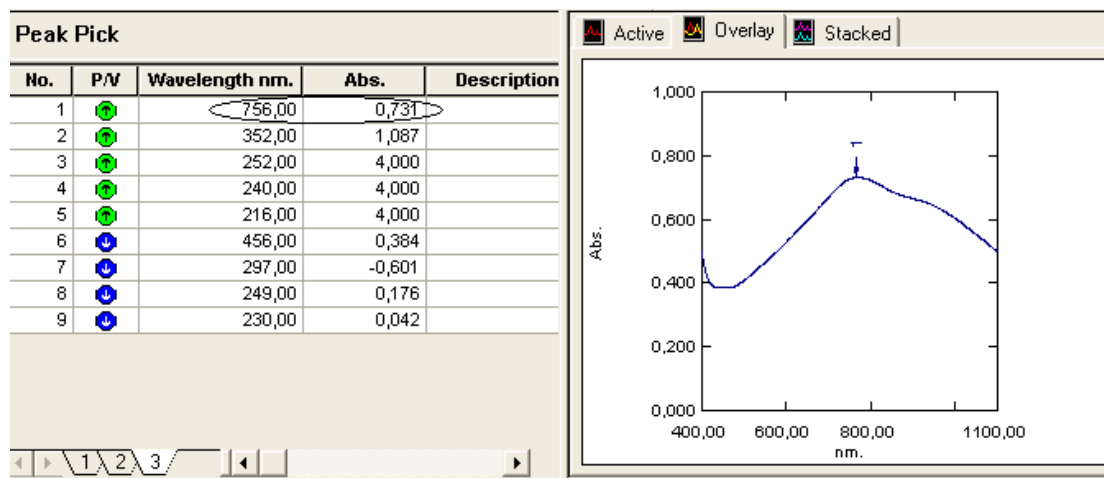
Sonuçların istatistiksel olarak değerlendirilmesi

Yapılan çalışmalar sonucu elde edilen sonuçlar INSTAT GraphPad versiyon 04 adlı istatistik programı kullanılarak tek yönlü varyans analizi (tek yönlü ANOVA) yöntemi, Tukey'in karşılaştırmalı testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. İnsülin'e Ait Çalışmalarla İlgili Bulgular

İnsülinin Lowry protein tayin metodu uygulandıktan sonra fosfat tamponu içerisindeki spektrumu Şekil 4.1'de gösterilmiştir. Dalga boyu taraması sonucunda insülin'in maksimum dalga boyu verdiği absorbansın (λ_{max}) 756 nm olduğu görüldü.



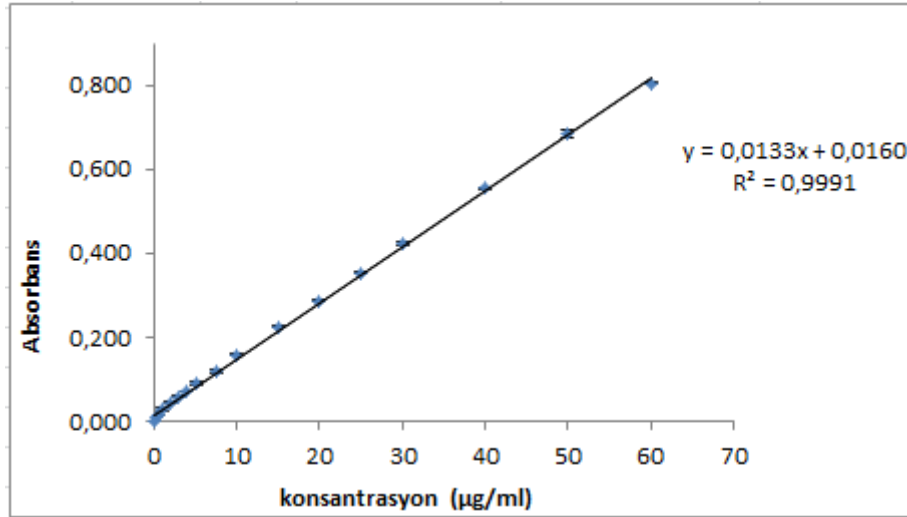
Şekil 4.1. İnsülin'e ait pH 7,4 fosfat tamponu içerisindeki 600-800 nm arası dalga boyu taraması (756nm)

4.1.1. UV spektrofotometrede insülinin Lowry protein miktar tayini yöntemi validasyonuna ait bulgular

İnsülinin fosfat tamponu içinde Lowry metodu validasyonuna ait bulgular

Doğrusallık

Çalışmalar, Bölüm 3.2.1.'de belirtildiği gibi yapıldı. Ölçülen absorbans değerlerine karşılık konsantrasyonlar grafiğe geçirildi. Standart doğru denklemi bulundu ve doğrusallığı kanıtlandı. Elde edilen absorbans-konsantrasyon grafiği Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. İnsülin'in fosfat tamponu içinde UV spektrofotometre yöntemiyle elde edilen kalibrasyon grafiği (n=6)

Doğruluk ve geri elde

Çalışmalar Bölüm 3.2.1.'de anlatıldığı gibi yapıldı. Sonuçlar Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. İnsülinin fosfat tamponu içinde Lowry metodu uygulandıktan sonra geri elde ile hesaplanan miktarları (n=3)

Çözeltilerdeki insülin yüzdesi	Çözeltilerdeki insülin miktarı (µg/mL)	Hesapla bulunan insülin miktarı± GS	BS Ortalama
% 80	40	39,7±0,102	0,502
% 100	50	49,9±0,105	0,141
% 120	60	59,2±0,110	0,162

Kesinlik

Çalışmalar Bölüm 3.2.1.'de anlatıldığı gibi yapıldı.

a) Deneyiçi kesinlik

İnsülinin fosfat tamponu içindeki kesinlik sonuçları Çizelge 4.2 ve 4.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. İnsülinin fosfat tamponu içindeki tekrar edilebilirlik sonuçları

Örnek No	İnsülin çözeltisinin derişimi ($\mu\text{g/mL}$)	Hesapla Bulunan İnsülin derişimi ($\mu\text{g/mL}$)
1	60	58,8
2	60	58,9
3	60	58,9
4	60	59,2
5	60	59,1
6	60	59,3
7	60	59,4
8	60	59,0
9	60	58,9
10	60	59,1
Ortalama	60	59,1
SS		0,204
BS		0,345
$\pm\text{GS}$		0,110

Çizelge 4.3. İnsülinin tekrar edilebilirlik sonuçları

Örnek No	İnsülin çözeltisinin derişimi ($\mu\text{g/mL}$)	Hesapla Bulunan İnsülin çözeltisi derişimi ($\mu\text{g/mL}$)
1	40	40,1
2	40	39,9
3	40	39,5
4	40	39,6
5	40	39,4
6	40	39,9
7	40	40,1
8	40	40,1
9	40	40,1
10	40	39,8
ort	40	39,9
SS		0,303
BS		0,759
$\pm\text{GS}$		0,212

b) Deneylerarası kesinlik

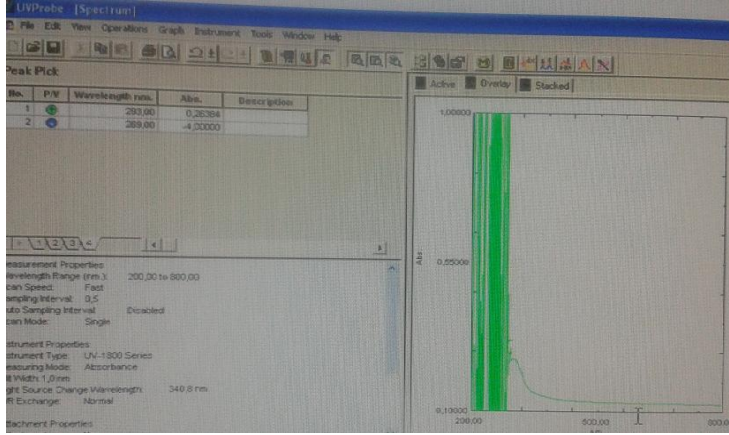
İnsülinin fosfat tamponu içindeki deneyler arası kesinlik sonuçları Çizelge 4.4'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. İnsülinin fosfat tamponu içindeki çözeltisine (25°C) Lowry metodu uygulandıktan sonra deneyler arası kesinlik sonuçları

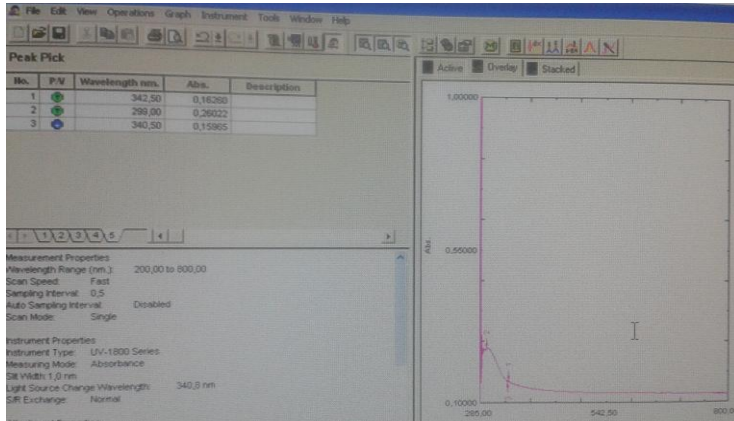
Derişim($\mu\text{g/mL}$)	1.gün	2.gün	3.gün	ORT	SS	SEM	BS
60	59,24	59,17	58,94	59,1	0,200	0,115	0,338
40	39,69	39,39	39,54	39,5	0,210	0,116	0,506
15	14,95	14,58	15,18	14,9	0,308	0,174	2,06
3	3,00	2,77	2,40	2,72	0,301	0,173	11,1
1	0,67	1,20	0,97	0,94	0,260	0,150	27,6

Özgünlük ve seçicilik

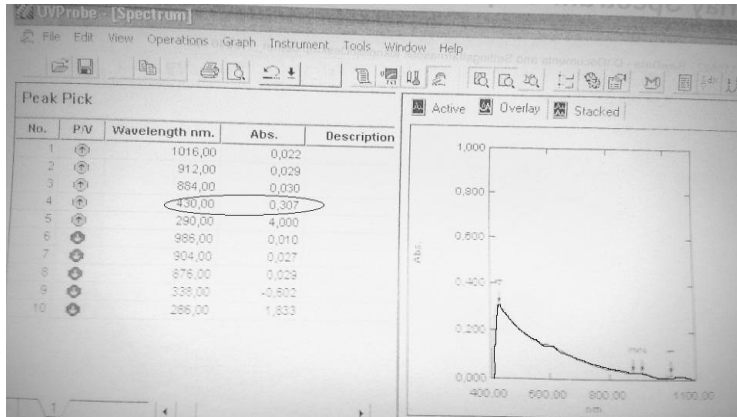
Çalışmalar Bölüm 3.2.1’de belirtildiği gibi yapıldı. İnsüline ait spektrumda insülinin maksimum absorbands verdiği dalga boyunda DOPE, DOPS ve PLGA’nın pik vermediği gösterildi (Şekil 4.3). Yöntemin protein tayininde spesifik olduğuna ve insülin tayinine uygun olduğuna karar verildi.



a



b



c

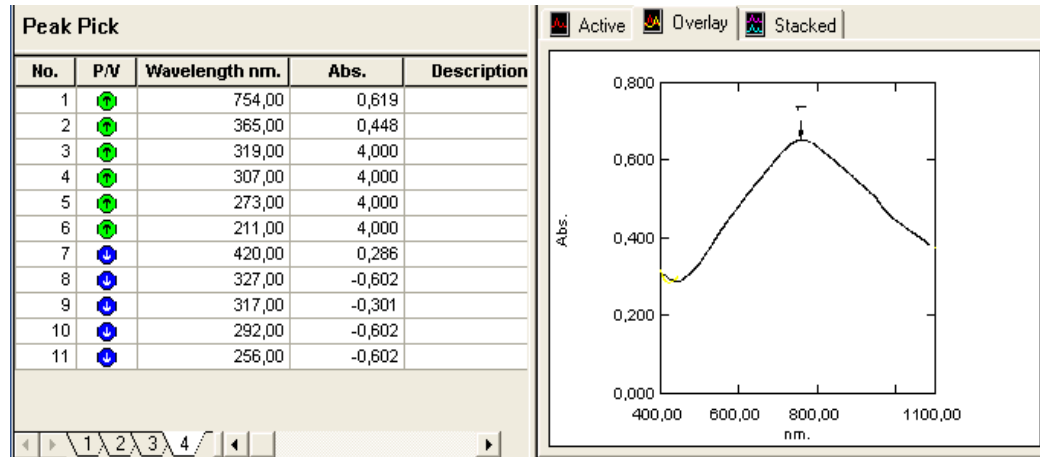
Şekil 4.3. DOPE (a), DOPS (b) ve PLGA (c)’ya ait dalga boyu taraması

Duyarlılık ve Saptama Sınırı

Hesaplar Bölüm 3.2.1’de verilen formüllere göre yapıldı. Analitik yöntemin duyarlılığı 0,248 µg/mL, saptama sınırı 0,752 µg/mL olarak bulundu.

İnsülinin distile su çözeltisindeki validasyonuna ait bilgiler

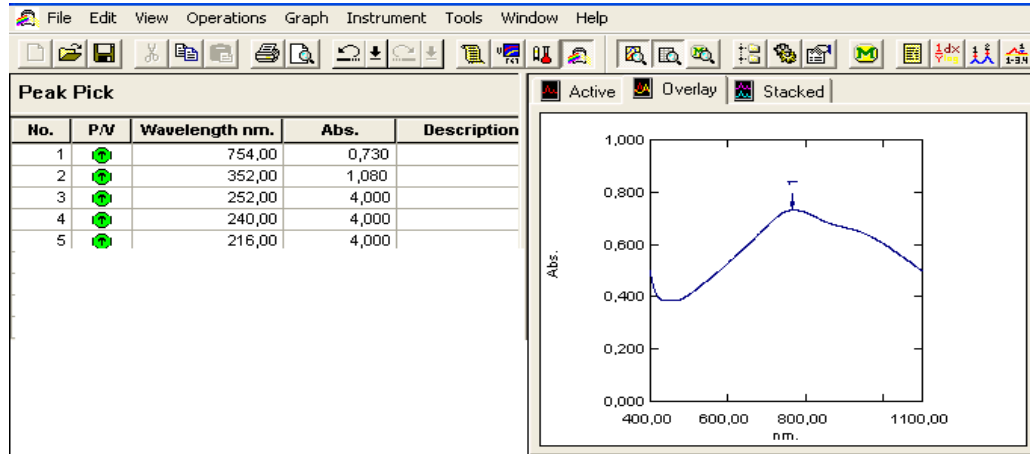
İnsülinin Bölüm 3.2.1’de belirtildiği şekilde distile su ile hazırlanan çözeltisinin dalga boyu taraması yapıldı ve 754 nm de pik vermesi nedeniyle validasyon çalışmaları tekrarlanmamış olup fosfat tamponu ile yapılan validasyon çalışmaları bulguları kullanılmıştır (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. İnsüline’e ait distile su içerisindeki dalga boyu taraması (754nm)

İnsülin’in DMEM içindeki Lowry metodu validasyonuna ait bulgular

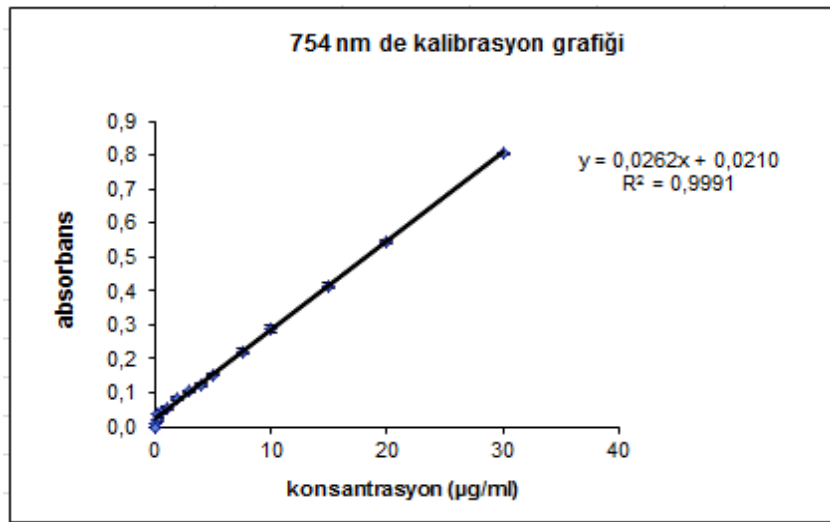
İnsülinin DMEM ile hazırlanan çözeltisinin dalga boyu taraması yapıldı ve 754 nm de pik vermiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. İnsüline'e ait DMEM içerisindeki dalga boyu taraması (754nm)

Doğrusallık

Çalışmalar, Bölüm 3.2.1'de belirtildiği gibi yapıldı. Ölçülen absorbans değerlerine karşılık konsantrasyonlar grafiğe geçirildi. Standart doğru denklemi bulundu ve doğrusallığı kanıtlandı. Elde edilen absorbans-konsantrasyon grafiği Şekil 4.6'da gösterilmiştir.



Şekil 4.6. İnsülin'in DMEM içerisinde UV spektrofotometre yöntemiyle elde edilen kalibrasyon grafiği (n=6)

Doğruluk ve Geri Elde

Çalışmalar Bölüm 3.2.1'de anlatıldığı gibi yapıldı. Sonuçlar Çizelge 4.5'te verilmiştir.

Çizelge 4.5. İnsülinin DMEM içerisindeki çözeltisine Lowry metodu uygulandıktan sonra geri elde ile hesaplanan miktarları (n=3)

Çözeltideki İnsülin yüzdesi	Çözeltideki insülin miktarı (µg/mL)	Hesapla bulunan insülin miktarı(µg/ml) ± GS	BS Ortalama
% 80	16	15,2±0,096	1,05
% 100	20	19,7±0,141	0,958
% 120	24	23,5±0,130	0,812

Kesinlik

Deneyiçi kesinlik

DMEM içindeki deneyiçi kesinlik sonuçları Çizelge 4.6 ve 4.7’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.6. İnsülinin DMEM içerisindeki tekrar edilebilirlik sonuçları

Örnek No	İnsülin çözeltisinin derişimi (µg/mL)	Hesapla Bulunan İnsülin çözeltisi derişimi (µg/mL)
1	20	19,6
2	20	19,4
3	20	19,5
4	20	19,5
5	20	19,5
6	20	19,5
7	20	19,4
8	20	19,5
9	20	19,5
10	20	19,5
Ort	20	19,5
SS		0,154
BS		0,789
±GS		0,030

Çizelge 4.7. İnsülinin DMEM içerisindeki tekrar edilebilirlik sonuçları

Örnek No	İnsülin Çözeltisinin Derişimi (µg/mL)	Hesapla Bulunan İnsülin Çözeltisi Derişimi (µg/mL)
1	7,5	7,4
2	7,5	7,5
3	7,5	7,4
4	7,5	7,4
5	7,5	7,4
6	7,5	7,5
7	7,5	7,6
8	7,5	7,5
9	7,5	7,5
10	7,5	7,4
Ort	7,5	7,4
SS		0,098
BS		1,32
±GS		0,04

Deneyler arası Kesinlik

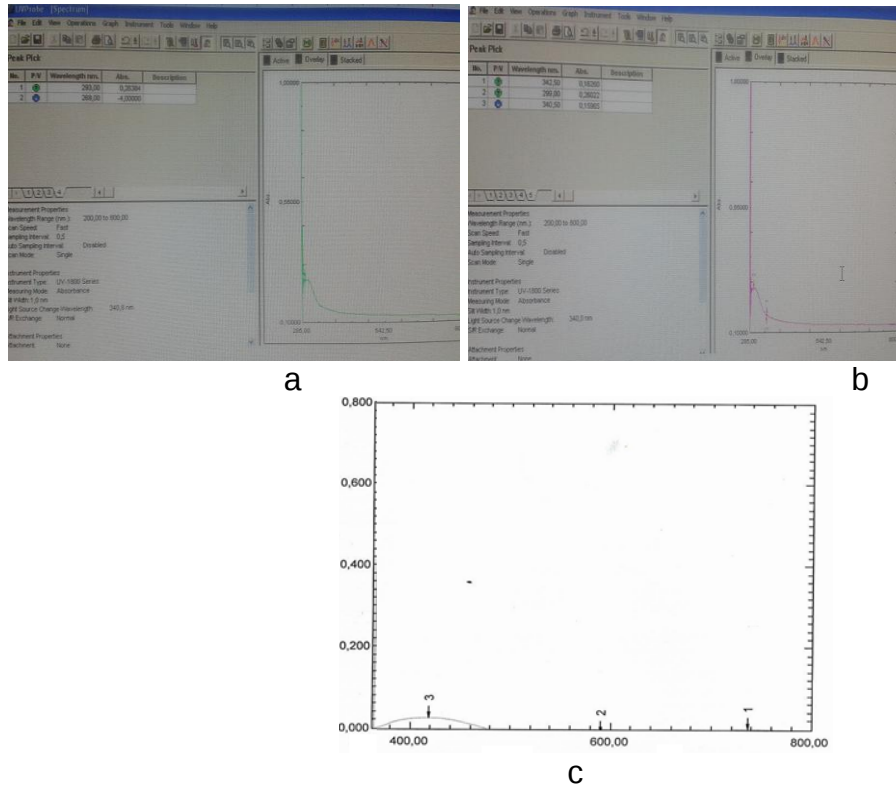
İnsülinin DMEM içerisindeki deneyler arası kesinlik sonuçları Çizelge 4.8’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.8. İnsülinin DMEM içindeki çözeltisine (25°C) Lowry metodu uygulandıktan sonra deneyler arası kesinlik sonuçları

Derişim($\mu\text{g/mL}$)	1.gün	2.gün	3.gün	ORT	SS	SEM	BS
20	19,62	19,43	19,47	19,5	0,100	0,057	0,512
10	9,89	9,92	10,00	9,94	0,057	0,035	0,573
7,5	7,52	7,44	7,21	7,39	0,161	0,092	2,18
5	4,85	4,92	4,96	4,91	0,056	0,034	1,14
1	0,92	0,99	0,80	0,90	0,096	0,055	10,6

Özgünlük ve seçicilik

Çalışmalar Bölüm 3.2.1’de belirtildiği gibi yapıldı. İnsüline ait spektrumda insülinin maksimum absorbands verdiği dalga boyunda (600-800 nm) DOPE, DOPS ve PLGA’nın pik vermediği gösterildi (Şekil 4.7). Yöntemin protein tayinine uygun olduğuna karar verildi.



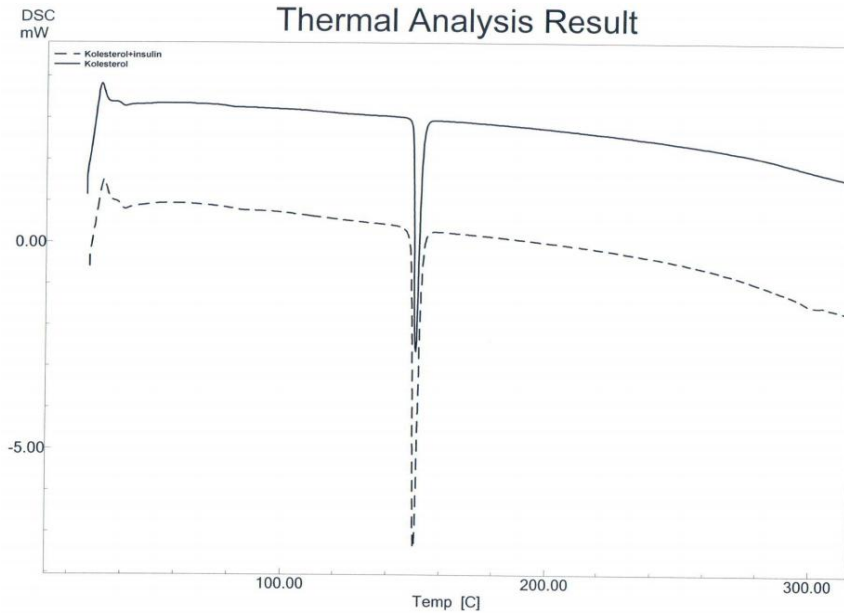
Şekil 4.7. DOPE (a), DOPS (b) ve PLGA (c)’ya ait dalga boyu taraması

Duyarlılık ve saptama sınırı

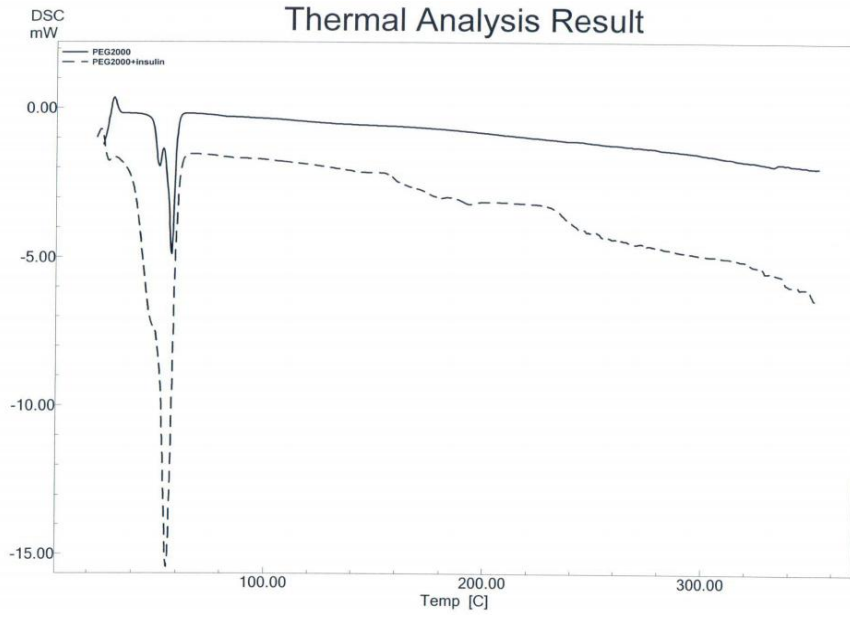
Hesaplar Bölüm 3.2.1’de verilen formüllere göre yapıldı. Analitik yöntemin duyarlılığı 0,629 µg/mL, saptama sınırı 1,91 µg/mL olarak bulundu.

4.1.2. Diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) analizine ait bulgular

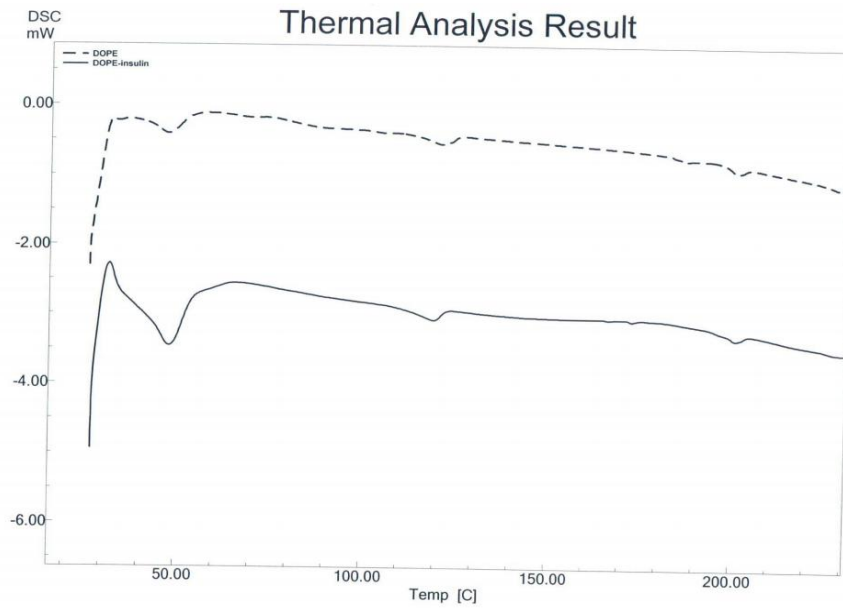
Çalışmalar, DSC (Differential Scanning Calorimetry) kullanılarak 10°C/dk tarama hızında ve 250°C’ye kadar yapıldı. İnsülin ve formülasyon hazırlamada kullanılan tüm yardımcı maddelerin tek başına ve etkin maddeyle 1:1 oranındaki karışımları kullanarak yapıldı. Çalışmanın nasıl yapıldığı ve çalışmada kullanılan maddeler Bölüm 3.2.1 ‘de belirtilmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen grafikler Şekil 4.8 ve 4.14 arasında görülmektedir.



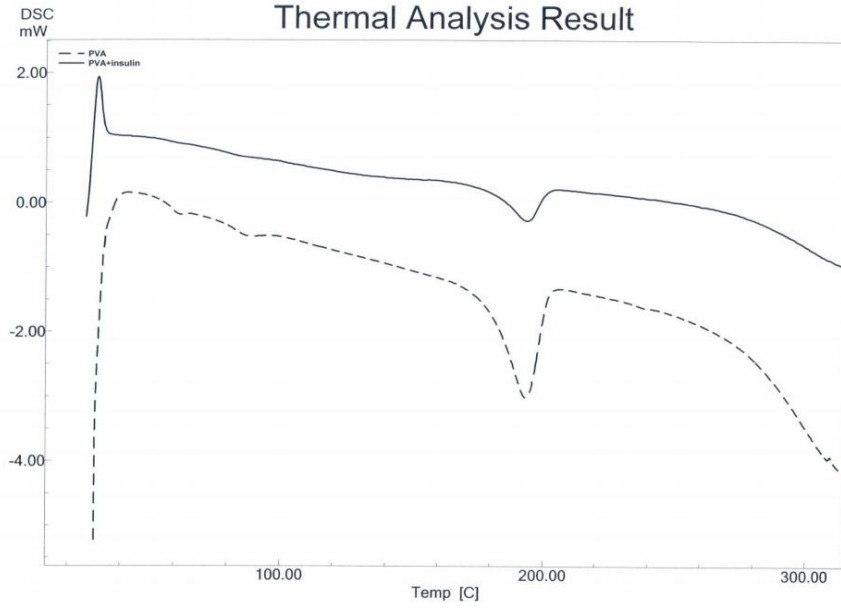
Şekil 4.8. Kolesterol ve insülin (1:1) karışımlarının DSC termogramı



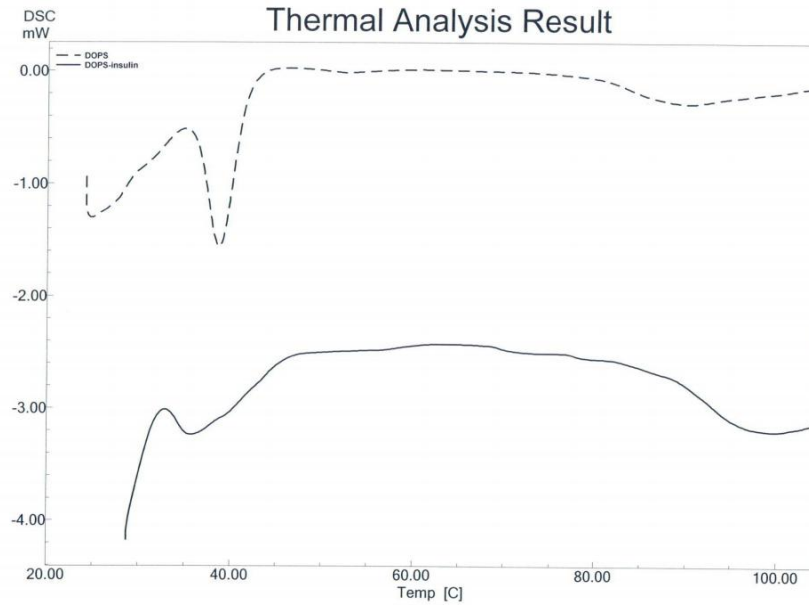
Şekil 4.9. PEG-PE2000 ve insülin (1:1) karışımlarının DSC termogramı



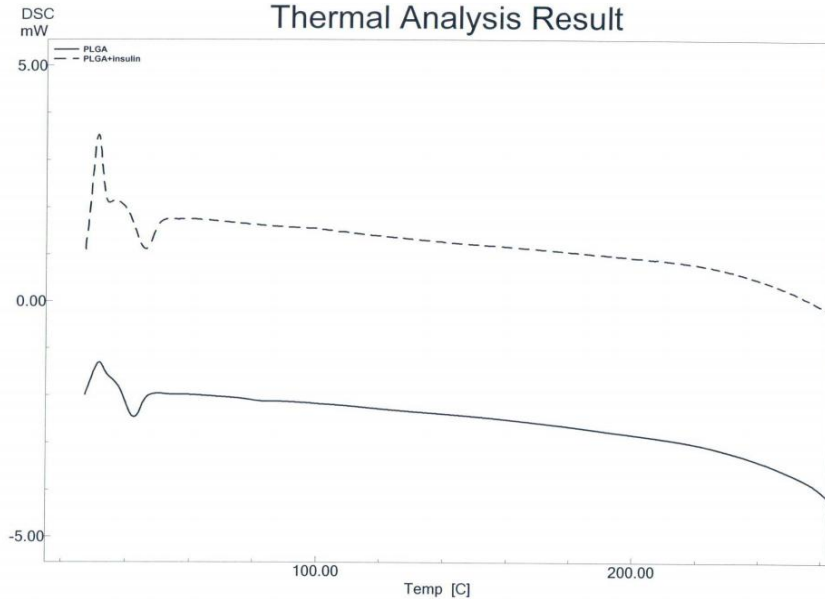
Şekil 4.10. DOPE ve insülin (1:1) karışımlarının DSC termogramı



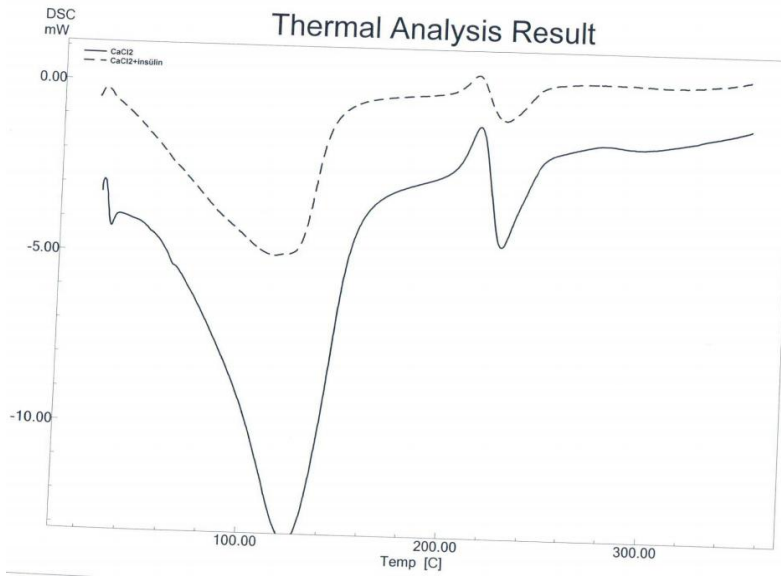
Şekil 4.11. PVA ve insülin (1:1) karışımlarının DSC termogramı



Şekil 4.12. DOPS ve insülin (1:1) karışımlarının DSC termogramı



Şekil 4.13. PLGA ve insülin (1:1) karışımlarının DSC termogramı

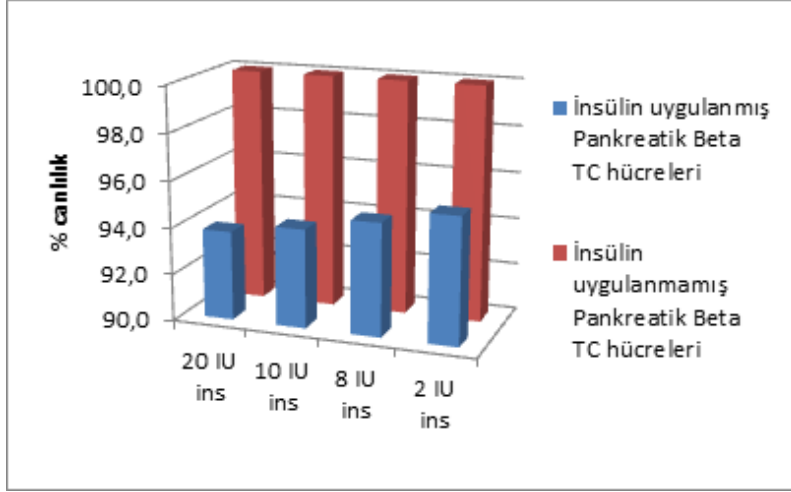


Şekil 4.14. CaCl₂ ve insülin (1:1) karışımlarının DSC termogramı

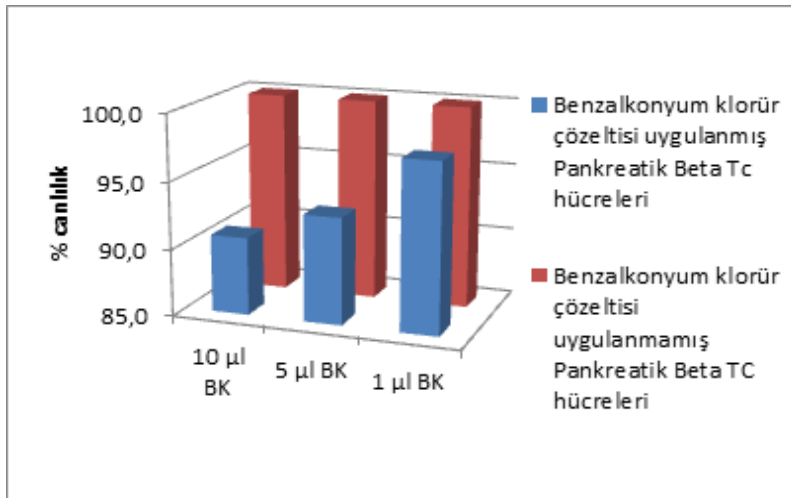
4.1.3. MTT testine ait bulgular

İnsülin ve katyonik lipozom hazırlanmasında kullanılan benzalkonyum klorürün pankreatik beta hücrelerine olan toksik etkileri 48 saat sonunda incelendi. Boş lipozom, nanopartikül ve nanokohleat formülasyonunun % 25, % 50 ve % 75 oranındaki miktarlarının ve pankreatik beta TC hücrelerini diyabetik hale getirmek için kullanılan streptozosinin 3 farklı derişimdeki çözeltisi ile MTT testi yapılmış,

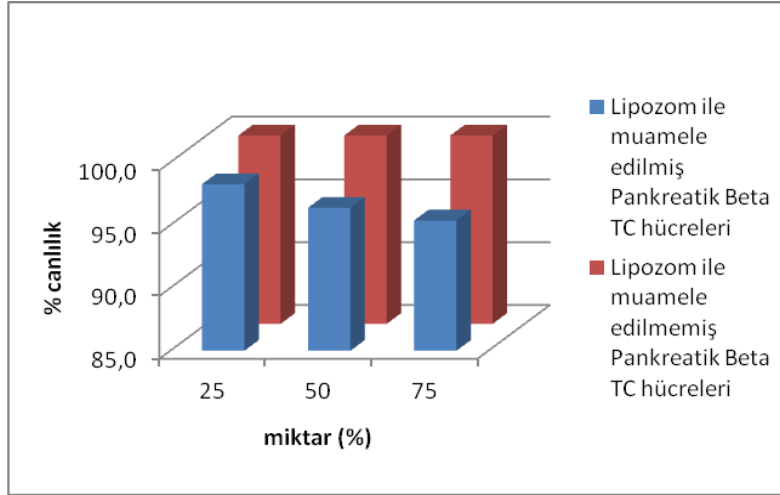
hücreler üzerine etkileri incelenmiştir. Tüm elde edilen % canlılık değerlerine ait bulguların grafikleri Şekil 4.15-4.22'da verilmiştir.



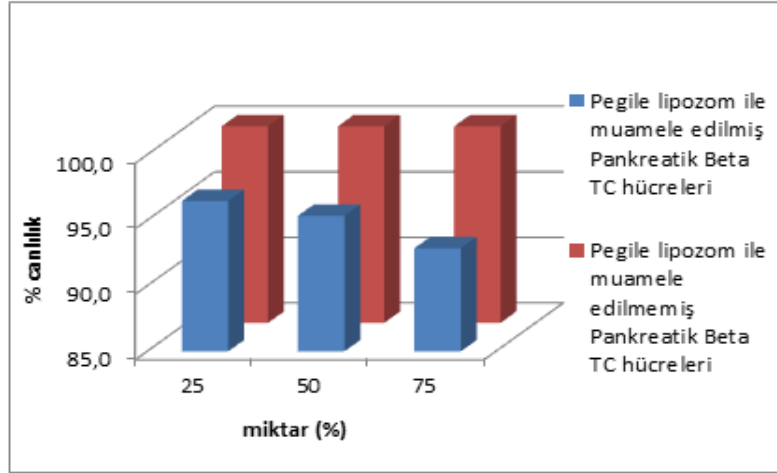
Şekil 4.15. İnsülin çözeltisinin pankreatik beta TC hücrelerindeki MTT testi sonuçları



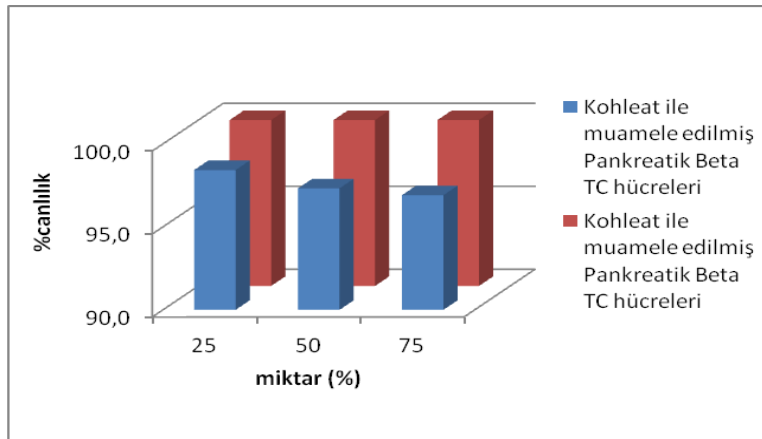
Şekil 4.16. Benzalkonyum klorürün pankreatik beta TC hücrelerindeki MTT testi sonuçları



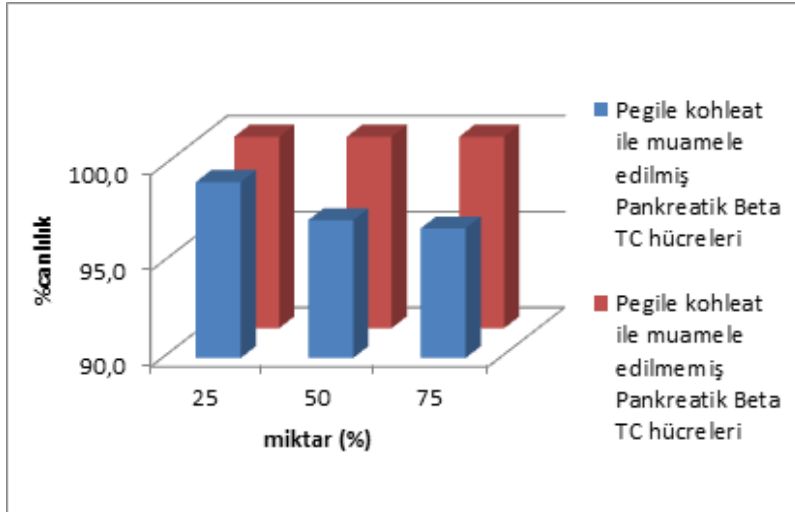
Şekil 4.17. Boş lipozom formülasyonunun DMEM içerisindeki farklı yüzdelerinin pankreatik beta TC hücrelerindeki MTT testi sonuçları



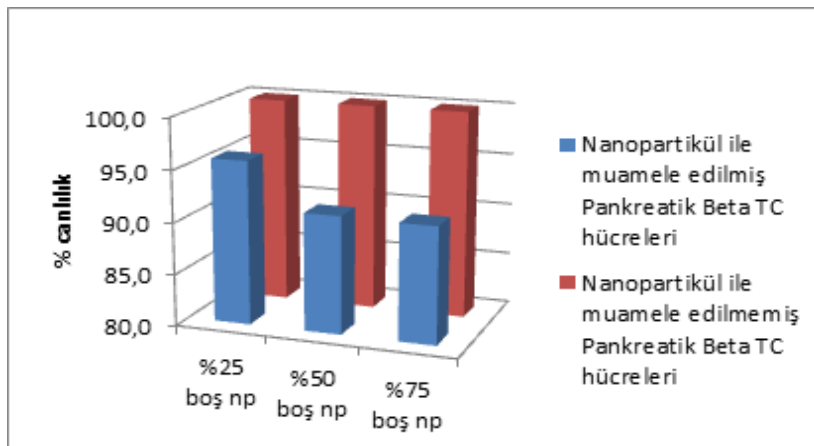
Şekil 4.18. Boş pegile lipozom formülasyonunun DMEM içerisindeki farklı yüzdelerinin pankreatik beta TC hücrelerindeki MTT testi sonuçları



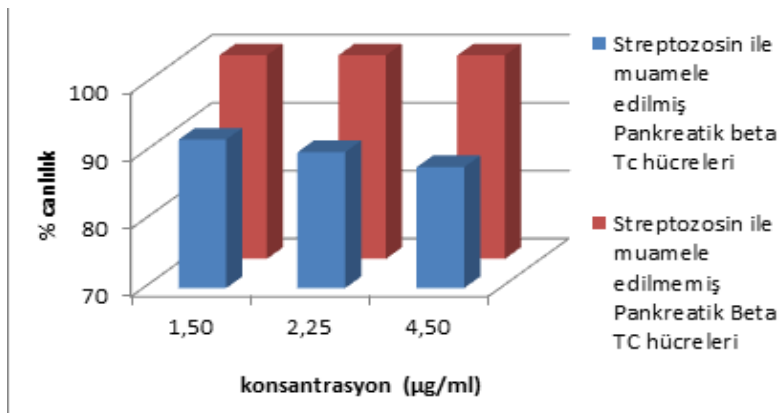
Şekil 4.19. Boş nanokohleat formülasyonunun DMEM içerisindeki farklı yüzdelerinin pankreatik beta TC hücrelerindeki MTT testi sonuçları



Şekil 4.20. Boş pegile nanokohleat formülasyonunun DMEM içerisindeki farklı yüzdelерinin pankreatik beta TC hücrelerindeki MTT testi sonuçları



Şekil 4.21. Boş nanopartikül formülasyonunun DMEM içerisindeki farklı yüzdelерinin pankreatik beta TC hücrelerindeki MTT testi sonuçları



Şekil 4.22. Streptozosin çözeltisinin pankreatik beta TC hücrelerindeki MTT testi sonuçları

Pegilasyonun spektrofotometrik tayini

Bölüm 3.2.1’de belirtildiği şekilde hazırlanan ve pikrat metodu ile yapılan ölçümde pegile lipozom ve pegile nanokohleatlarda % $68,4 \pm 3,31$ ve % $60,9 \pm 2,14$ bağlanma tayin edilmiştir.

4.1.4. Etkin madde içermeyen formülasyonların karakterizasyon çalışmaları

Boş formülasyonların karakterizasyonu

Boş formülasyonların partikül büyüklüğü ve dağılımı, polidispersite değerleri ve zeta potansiyel ölçümlerine ait bulgular

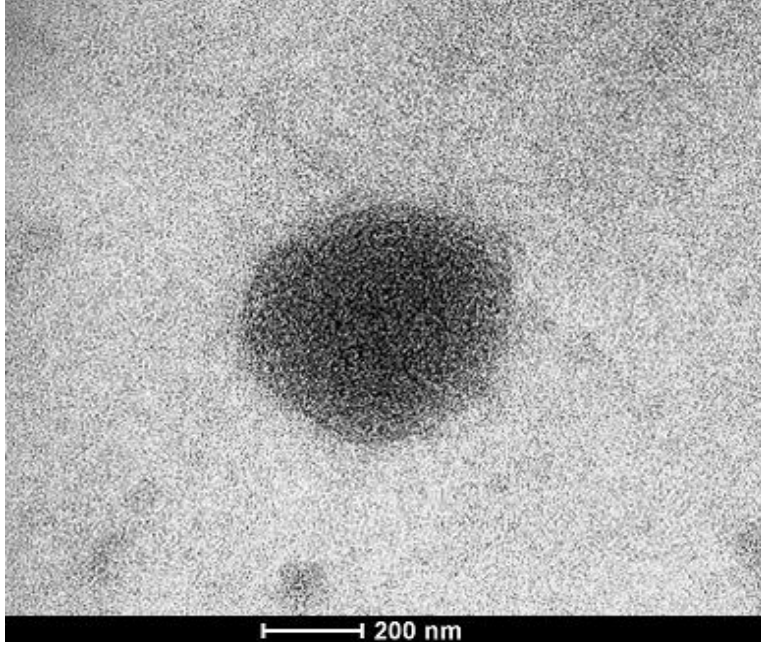
Bütün formülasyonların partikül büyüklüğü ve dağılımları, zeta potansiyel değerleri Malvern Zeta Sizer Nano ZS ile ölçüldü. Alınan sonuçların ortalaması hesaplanarak polidispersite indeksi ile birlikte Çizelge 4.9’da verilmiştir.

Boş formülasyonların şekline ait bulgular

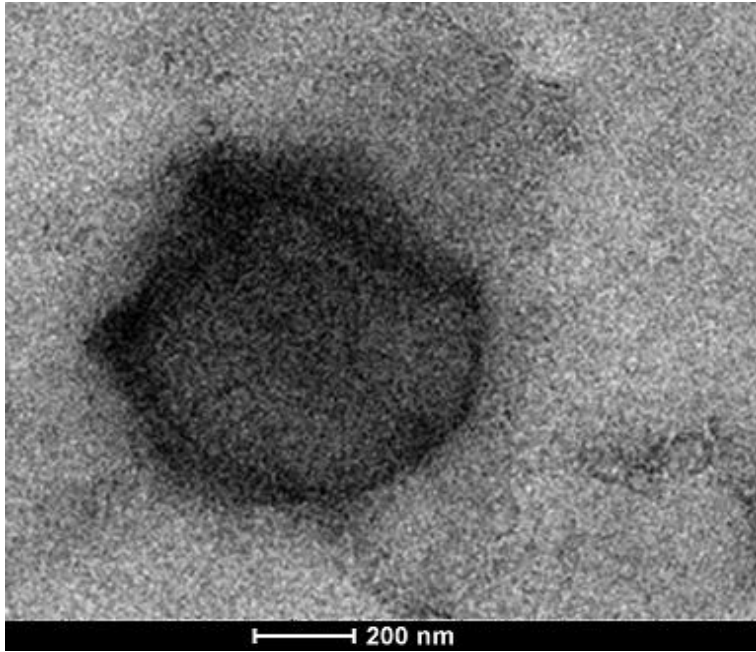
Bütün formülasyonların görüntüleri TEM mikroskobu ile incelendi ve elde edilen görüntüler Resim 4.1-4.5’te verilmiştir.

Çizelge 4.9. Boş formülasyonların karakterizasyon parametreleri (n=3)

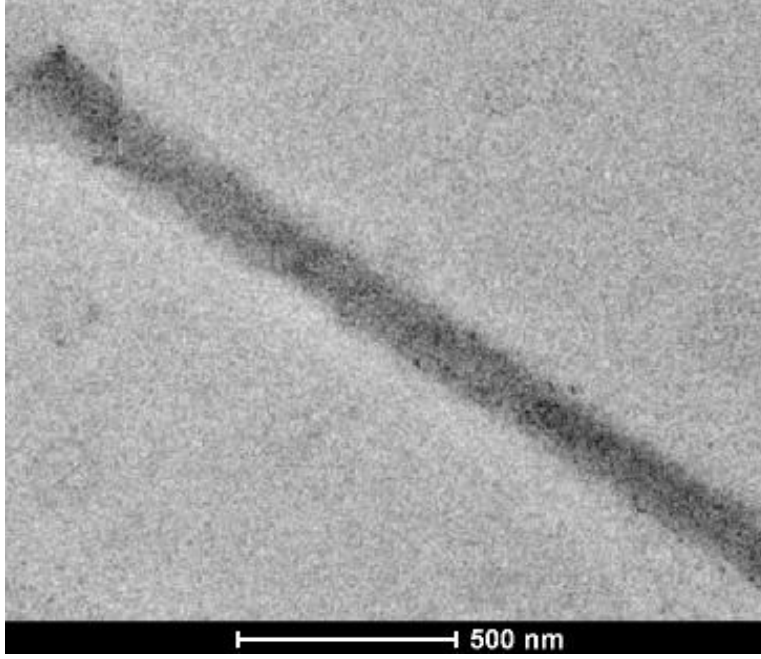
Formülasyon Tipi	Partikül Büyüklüğü (µm) ±SS	PDI±SS	Zeta Potansiyel (mV) ±SS
Boş lipozomlar	0,232±0,004	0,312±0,003	22,5±1,0
Boş pegile lipozomlar	0,245±0,007	0,357±0,003	19,5±0,56
Boş nanokohleatlar	0,410±0,012	0,398±0,008	18,6±0,7
Boş pegile nanokohleatlar	0,420±0,012	0,400±0,015	16,3±0,8
Boş nanopartiküller	0,645±0,007	0,415±0,004	4,6±0,1



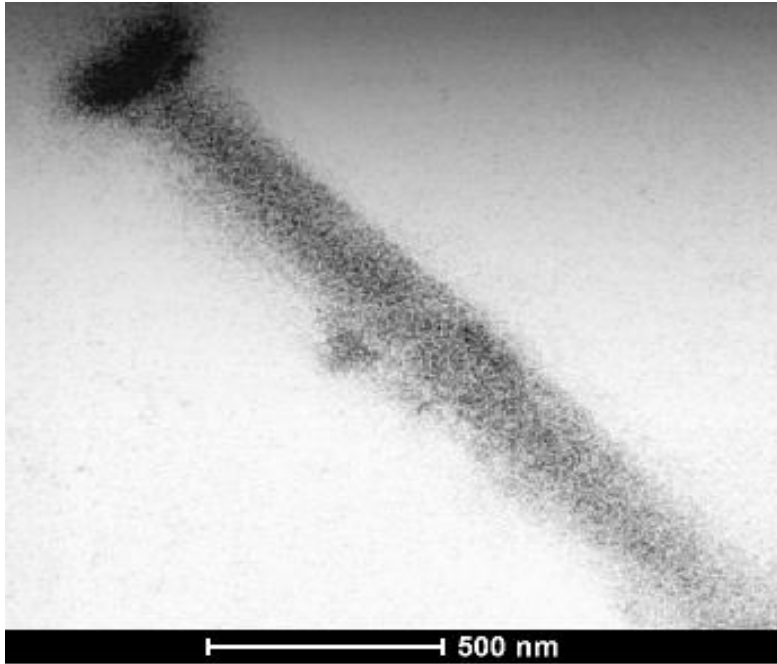
Resim 4.1. Boş lipozomların TEM görüntüleri x49000



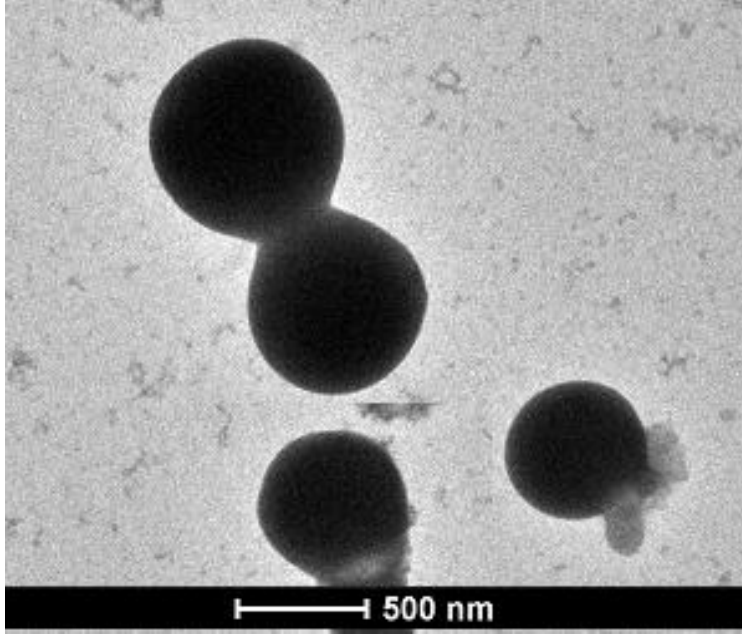
Resim 4.2. Boş pegile lipozomların TEM görüntüleri x9300



Resim 4.3. Boş nanokohleatların TEM görüntüleri x11000



Resim 4.4. Boş pegile nanokohleatların TEM görüntüleri x9300



Resim 4.5. Boş nanopartiküllerin TEM görüntüleri x4800

4.1.5. İnsülin formülasyonlarının karakterizasyon çalışmaları

İnsülin formülasyonlarının karakterizasyonu

İnsülin formülasyonların partikül büyüklüğü ve dağılımı, polidispersite değerleri ve zeta potansiyel ölçümlerine ait bulgular

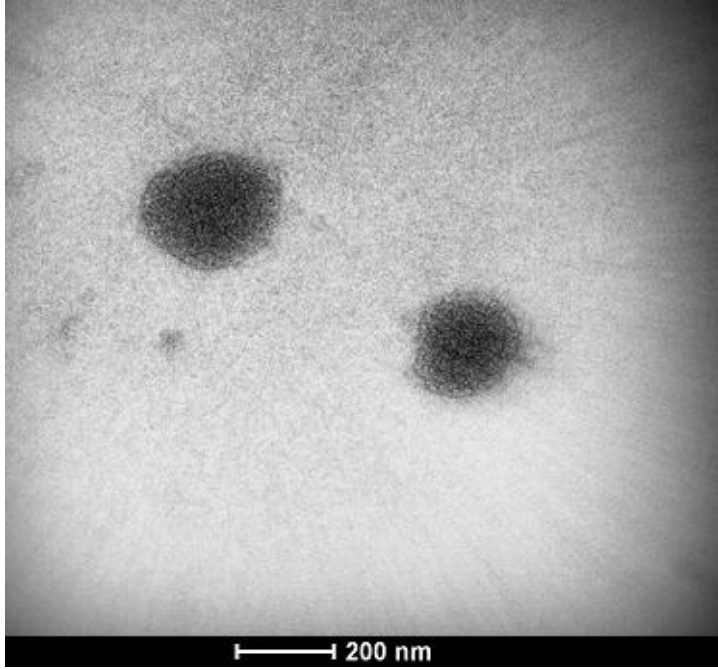
Bütün insülin yüklü formülasyonların partikül büyüklüğü ve dağılımları, zeta potansiyel değerleri Malvern Zeta Sizer Nano ZS ile ölçüldü. Alınan sonuçların ortalaması hesaplanarak polidispersite indeksi ile birlikte Çizelge 4.10'da verilmiştir.

İnsülin formülasyonlarının şekline ait bulgular

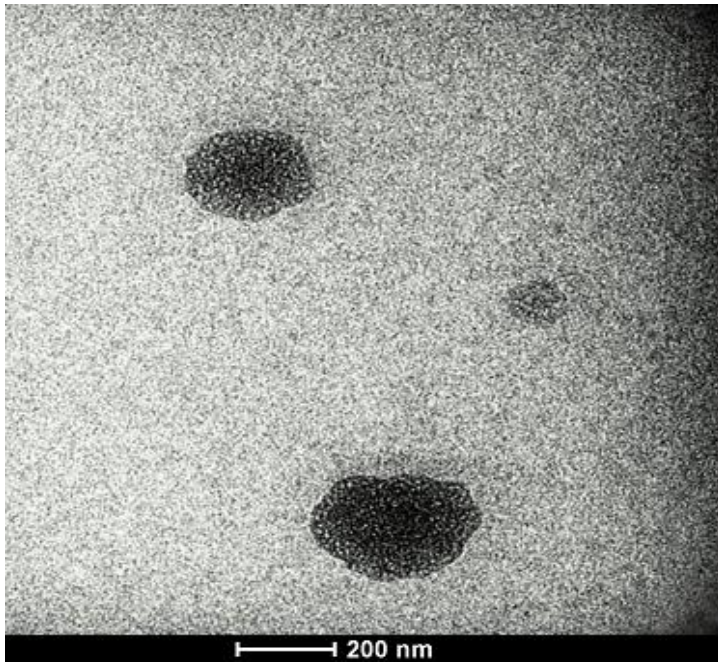
Bütün formülasyonların görüntüleri TEM mikroskobu ile incelendi ve elde edilen görüntüler Resim 4.6-4.10'da verilmiştir.

Çizelge 4.10. İnsülin içeren formülasyonların karakterizasyon parametreleri (n=3)

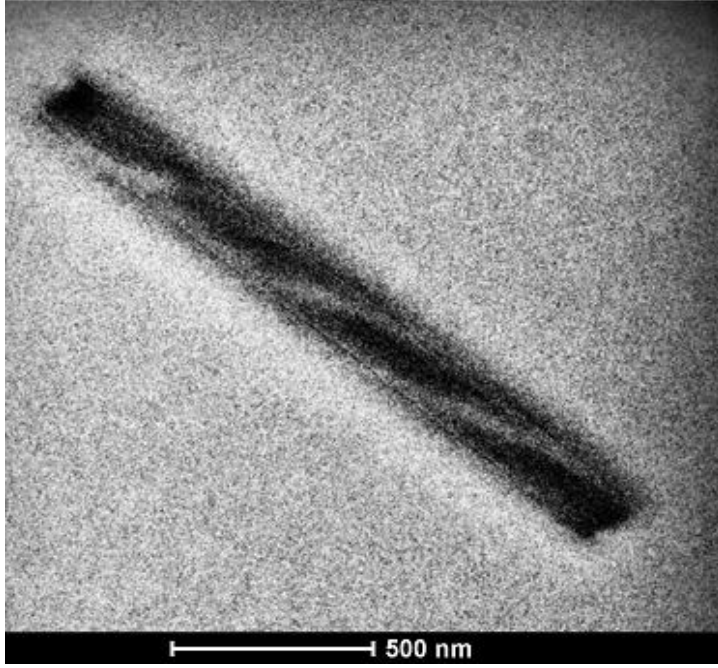
Formülasyon Tipi	Partikül Büyüklüğü (μm) $\pm$ SS	PDI $\pm$ SS	Zeta Potansiyel(mV) $\pm$ SS	% Enkapsülasyon Verimi $\pm$ SS
İnsülin içeren lipozomlar	0,215 $\pm$ 0,004	0,277 $\pm$ 0,067	27,3 $\pm$ 2,3	66,0 $\pm$ 2,7
İnsülin içeren pegile lipozomlar	0,226 $\pm$ 0,007	0,377 $\pm$ 0,023	21,9 $\pm$ 0,4	62,1 $\pm$ 2,1
İnsülin içeren nanokohleatlar	0,421 $\pm$ 0,012	0,430 $\pm$ 0,027	17,5 $\pm$ 1,3	59,3 $\pm$ 2,0
İnsülin içeren pegile nanokohleatlar	0,427 $\pm$ 0,032	0,470 $\pm$ 0,009	16,1 $\pm$ 0,4	52,0 $\pm$ 2,9
İnsülin içeren nanopartiküller	0,713 $\pm$ 0,036	0,506 $\pm$ 0,024	3,60 $\pm$ 0,96	50,1 $\pm$ 1,5



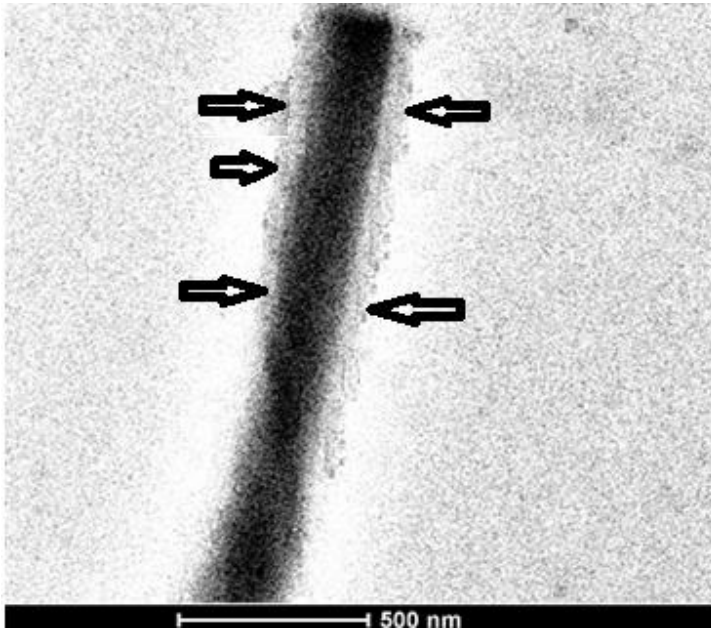
Resim 4.6. İnsülin içeren lipozomların TEM görüntüleri x49000



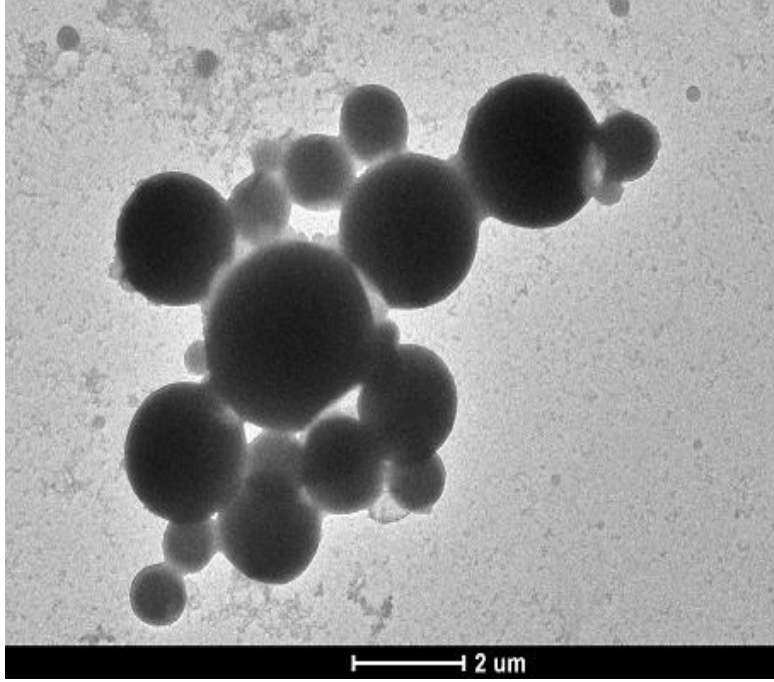
Resim 4.7. İnsülin içeren pegile lipozomların TEM görüntüleri x49000



Resim 4.8. İnsülin içeren nanokohleatların TEM görüntüleri x18500



Resim 4.9. İnsülin içeren pegile nanokohleatların TEM görüntüleri (oklar: pegilasyon görüntüsü) x18500



Resim 4.10. İnsülin içeren nanopartiküllerin TEM görüntüleri x2900

4.1.6. Etkin madde içermeyen ve insülin yüklü formülasyonların stabilitesi

Boş ve insülin yüklü tüm formülasyonların stabilitesi

Boş ve insülin yüklü formülasyonların partikül büyüklüğü dağılımı, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel değerleri

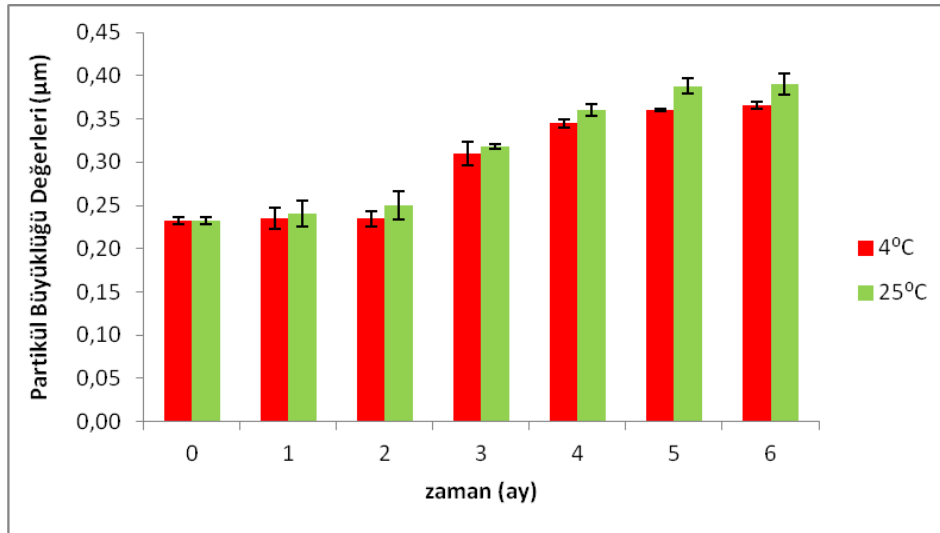
Boş ve insülin ile hazırlanan tüm formülasyonların ölçülen partikül büyüklüğü, polidispersite değerleri ve zeta potansiyellerinin zamanla değişip değişmediğini incelemek için 4°C ve 25°C saklanan formülasyonların 0.,1.,2.,3.,4.,5. ve 6. aylarda yapılan partikül büyüklüğü, polidispersite ve zeta potansiyel ölçümlerinin sonuçları Çizelge 4.11-4.20’de ve Şekil 4.23-4.52’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.11. Boş lipozomların stabilite verileri

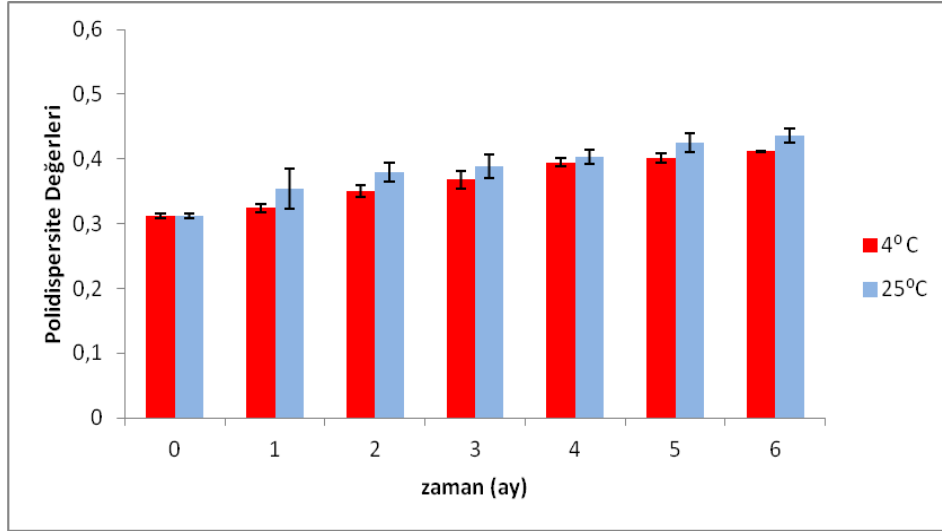
Zaman (ay)	Ortalama Çap (µm)	4°C	Zeta Potansiyel (mV)	Ortalama Çap (µm)	25°C	Zeta Potansiyel (mV)
		PDI			PDI	
0	0,232±0,004	0,312±0,003	22,5±1,0	0,232±0,004	0,312±0,003	22,5±1,0
1	0,235±0,012	0,324±0,006	21,5±1,1	0,240±0,015	0,354±0,031	23,3±0,5
2	0,235±0,009	0,351±0,009	20,3±0,6	0,250±0,016	0,380±0,015	21,3±1,0
3	0,310±0,013	0,368±0,014	19,8±0,3	0,318±0,003	0,388±0,018	19,8±1,1
4	0,345±0,005	0,395±0,007	14,5±0,9	0,360±0,007	0,404±0,011	15,3±1,6
5	0,360±0,001	0,402±0,007	12,3±1,1	0,388±0,009	0,425±0,014	11,4±0,4
6	0,366±0,004	0,412±0,001	10,5±0,5	0,390±0,012	0,436±0,011	9,65±1,1

Çizelge 4.12. İnsülin lipozomların stabilite verileri

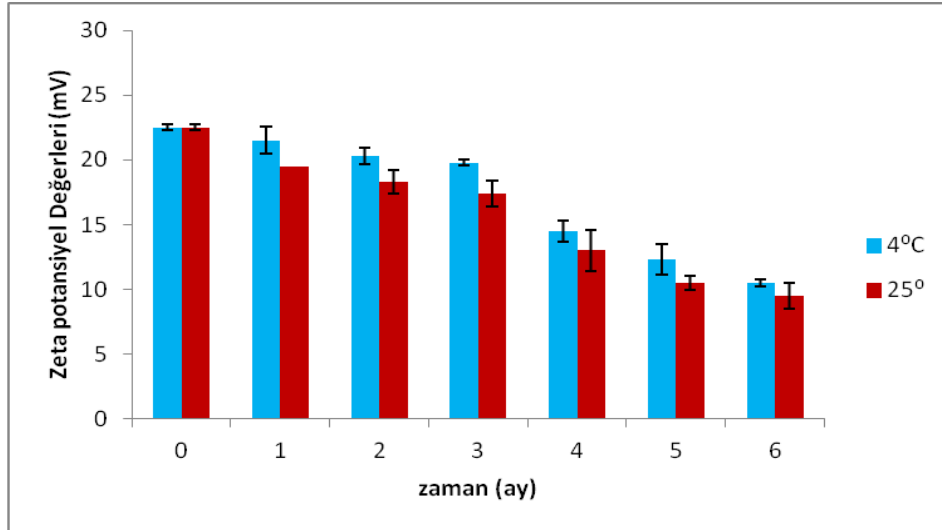
Zaman (ay)	Ortalama Çap (µm)	4°C	Zeta Potansiyel (mV)	Ortalama Çap (µm)	25°C	Zeta Potansiyel (mV)
		PDI			PDI	
0	0,215±0,004	0,277±0,067	27,3±2,3	0,215±0,004	0,277±0,067	27,3±2,3
1	0,220±0,010	0,303±0,063	25,3±1,9	0,225±0,008	0,294±0,051	23,3±0,4
2	0,232±0,009	0,313±0,060	21,6±0,3	0,240±0,006	0,314±0,058	21,3±0,9
3	0,345±0,023	0,343±0,045	20,3±0,6	0,348±0,003	0,374±0,058	19,8±1,1
4	0,355±0,005	0,378±0,067	18,6±1,2	0,360±0,002	0,404±0,071	15,3±0,2
5	0,377±0,021	0,393±0,067	15,6±1,2	0,385±0,027	0,426±0,055	11,4±0,5
6	0,400±0,004	0,405±0,041	12,3±0,3	0,415±0,023	0,436±0,071	9,6±1,01



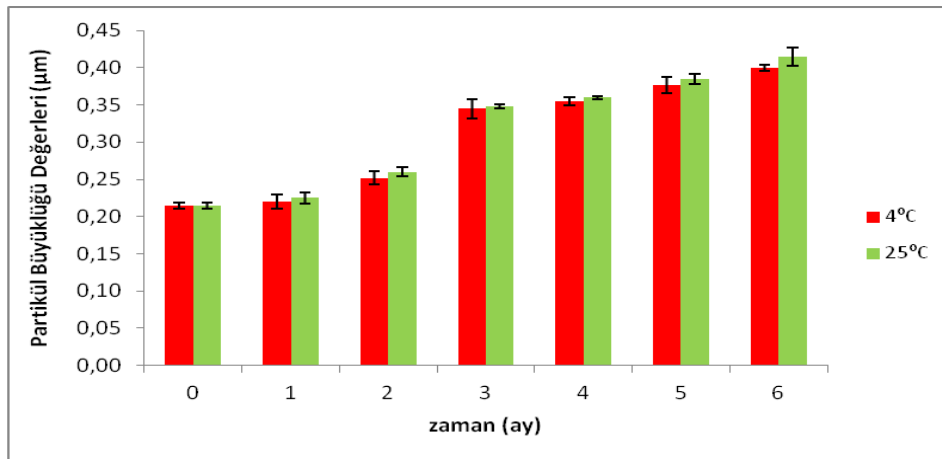
Şekil 4.23. Boş lipozomlara ait partikül büyüklüğü sonuçları



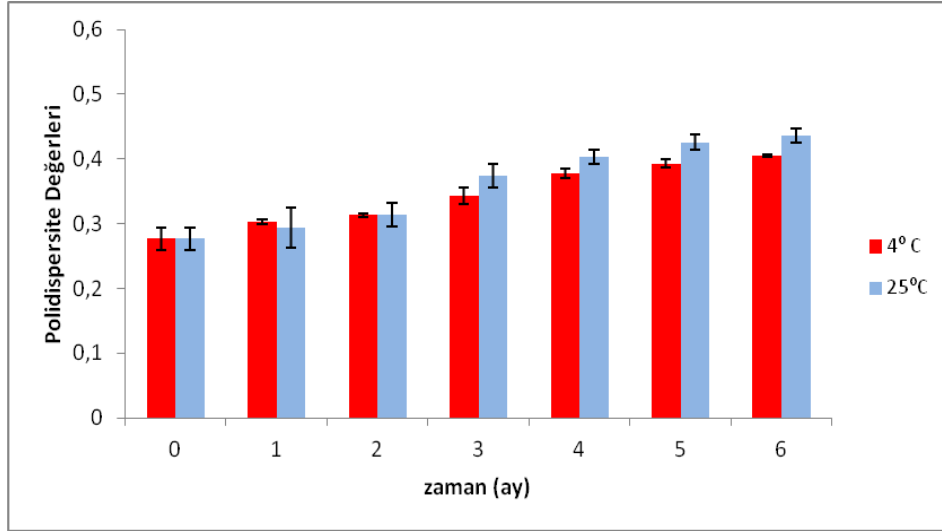
Şekil 4.24. Boş lipozomlara ait polidispersite sonuçları



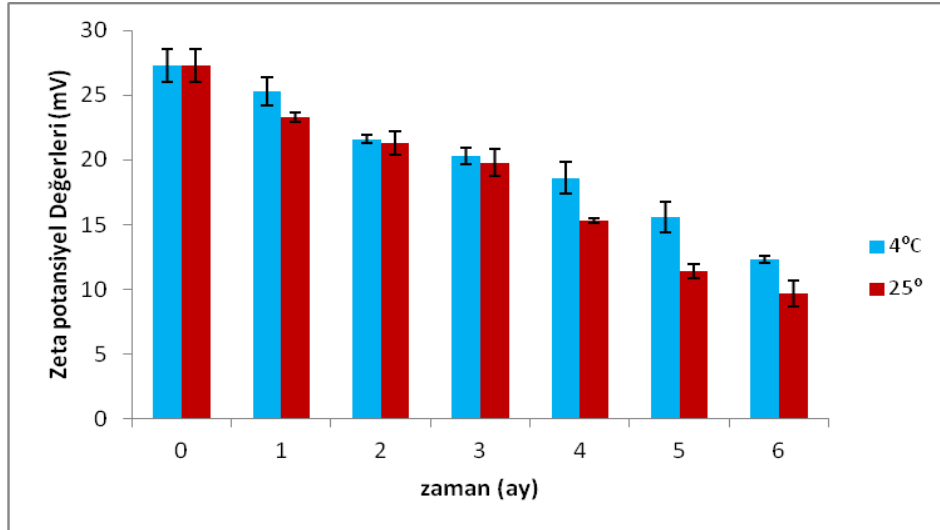
Şekil 4.25. Boş lipozomlara ait zeta potansiyel değerleri sonuçları



Şekil 4.26. İnsülin lipozomlara ait partikül büyüklüğü sonuçları



Şekil 4.27. İnsülin lipozomlara ait polidispersite sonuçları



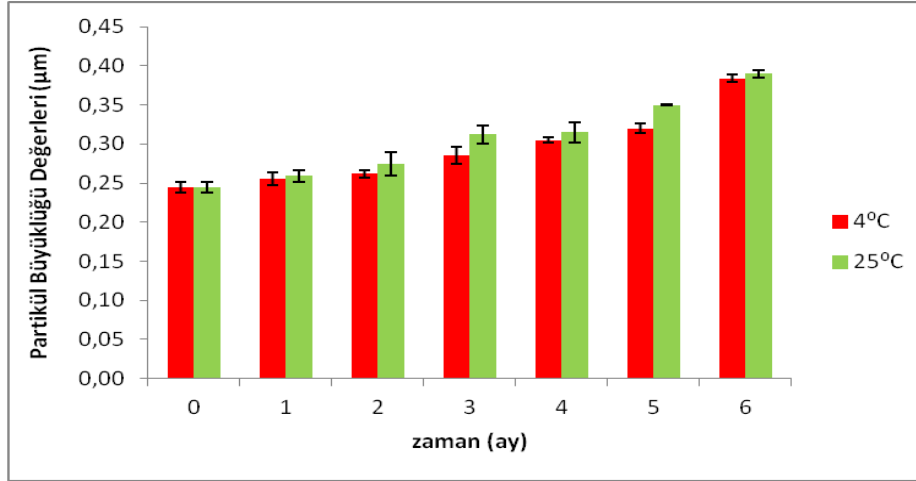
Şekil 4.28. İnsülin lipozomlara ait zeta potansiyel değerleri sonuçları

Çizelge 4.13. Boş pegile lipozomların stabilite verileri

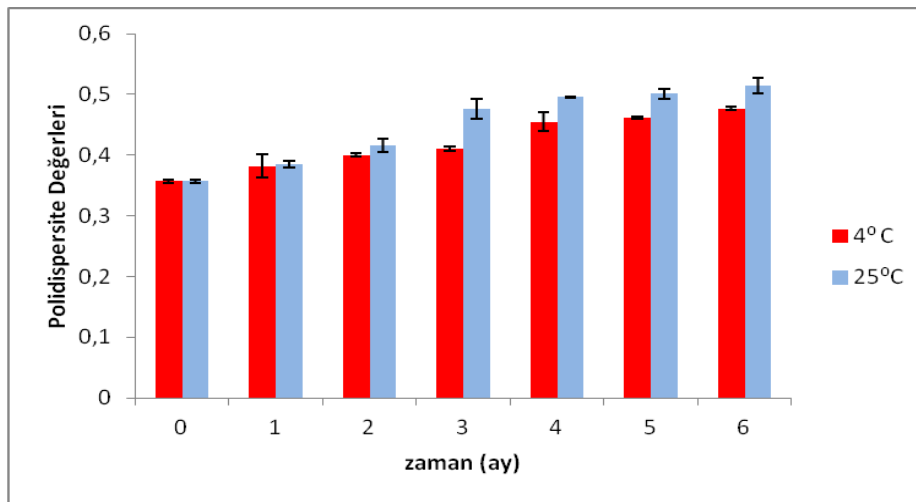
Zaman (ay)	Ortalama Çap (µm)	4°C	Zeta Potansiyel (mV)	Ortalama Çap (µm)	25°C	Zeta Potansiyel (mV)
		PDI			PDI	
0	0,245±0,007	0,357±0,003	19,5±0,6	0,245±0,007	0,357±0,003	19,5±0,6
1	0,255±0,008	0,382±0,019	18,5±0,6	0,259±0,008	0,380±0,005	17,5±1,1
2	0,262±0,005	0,400±0,003	17,0±0,1	0,275±0,015	0,416±0,012	16,5±1,3
3	0,285±0,011	0,410±0,004	15,3±0,6	0,312±0,012	0,476±0,015	14,1±0,2
4	0,305±0,003	0,455±0,015	12,5±1,0	0,315±0,013	0,495±0,002	11,5±1,0
5	0,320±0,006	0,461±0,005	11,6±0,6	0,350±0,001	0,501±0,008	10,6±0,7
6	0,384±0,005	0,478±0,003	10,3±0,4	0,390±0,005	0,514±0,014	9,0±0,18

Çizelge 4.14. İnsülin pegile lipozomların stabilite verileri

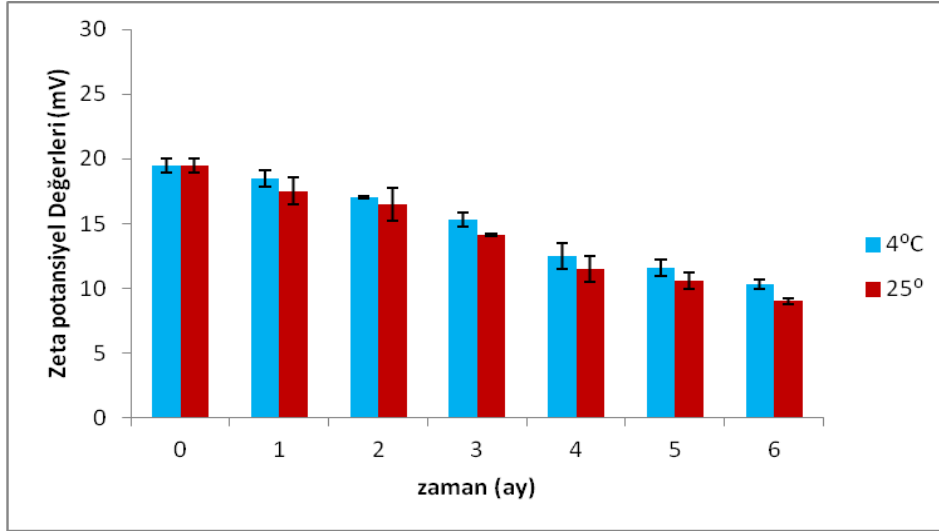
Zaman (ay)	Ortalama Çap (µm)	4°C	Zeta Potansiyel (mV)	Ortalama Çap (µm)	25°C	Zeta Potansiyel (mV)
		PDI			PDI	
0	0,226±0,007	0,377±0,023	21,9±0,4	0,226±0,007	0,377±0,023	21,9±0,4
1	0,252±0,018	0,382±0,019	21,5±0,6	0,259±0,018	0,385±0,035	20,9±1,1
2	0,262±0,005	0,398±0,067	21,0±0,9	0,265±0,015	0,400±0,071	19,2±1,3
3	0,350±0,033	0,413±0,057	19,5±0,7	0,357±0,012	0,406±0,036	17,5±0,1
4	0,355±0,003	0,415±0,041	17,5±1,0	0,362±0,023	0,416±0,071	16,3±1,0
5	0,380±0,006	0,421±0,042	15,0±0,6	0,384±0,001	0,436±0,068	12,4±0,5
6	0,415±0,027	0,427±0,043	11,2±0,4	0,420±0,005	0,438±0,073	10,3±0,2



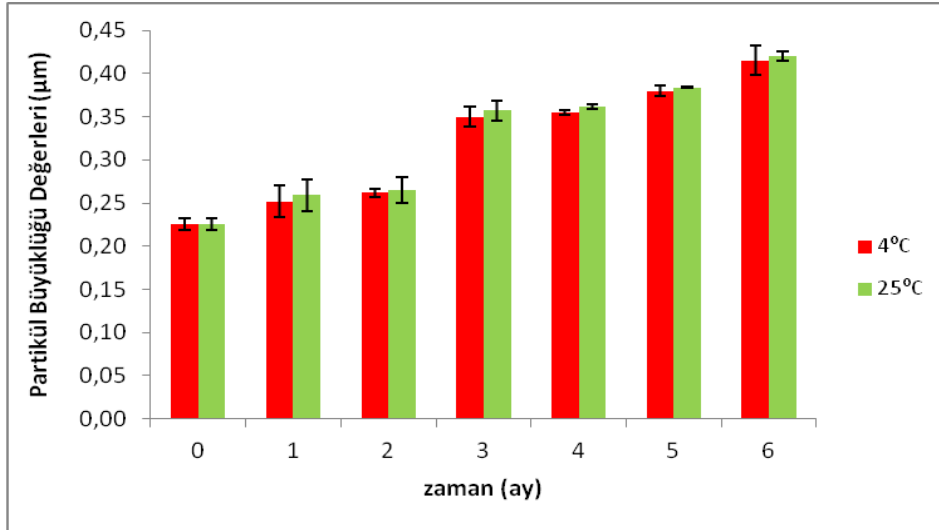
Şekil 4.29. Boş pegile lipozomlara ait partikül büyüklüğü sonuçları



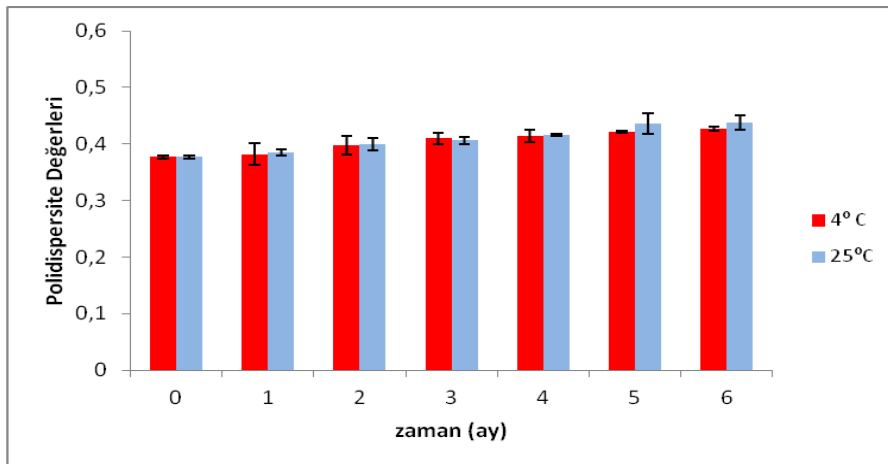
Şekil 4.30. Boş pegile lipozomlara ait polidispersite sonuçları



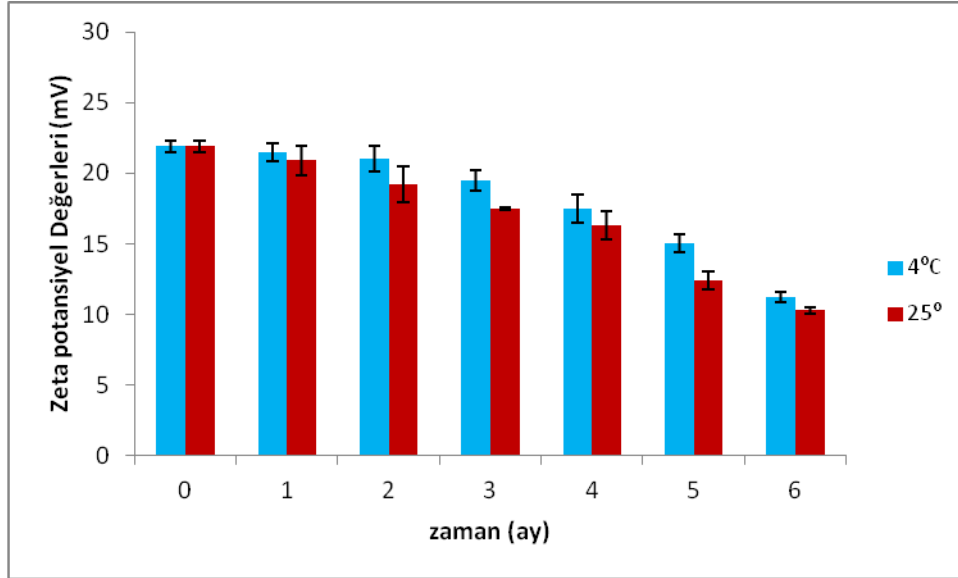
Şekil 4.31. Boş pegile lipozomlara ait zeta potansiyel değerleri sonuçları



Şekil 4.32. İnsülin pegile lipozomlara ait partikül büyüklüğü sonuçları



Şekil 4.33. İnsülin pegile lipozomlara ait polidispersite sonuçları



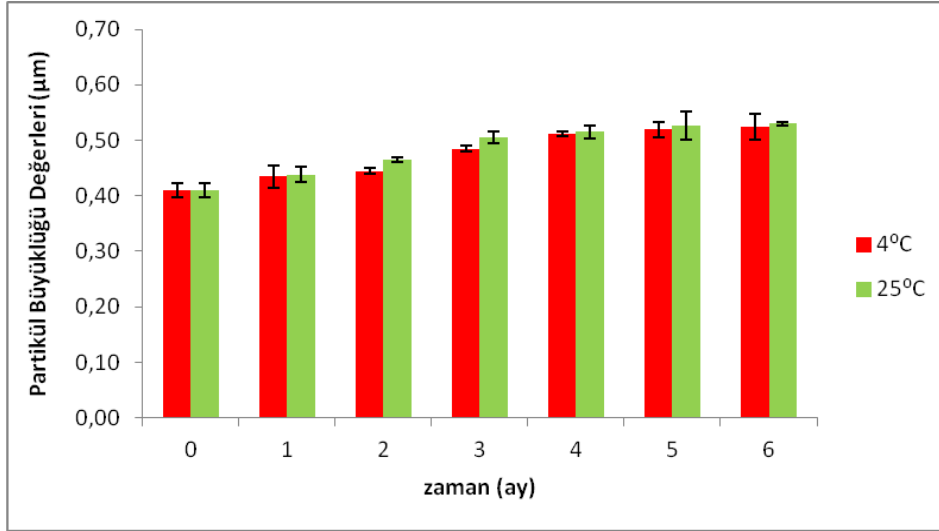
Şekil 4.34. İnsülin pegile lipozomlara ait zeta potansiyel değerleri sonuçları

Çizelge 4.15. Boş nanokohleatların stabilite verileri

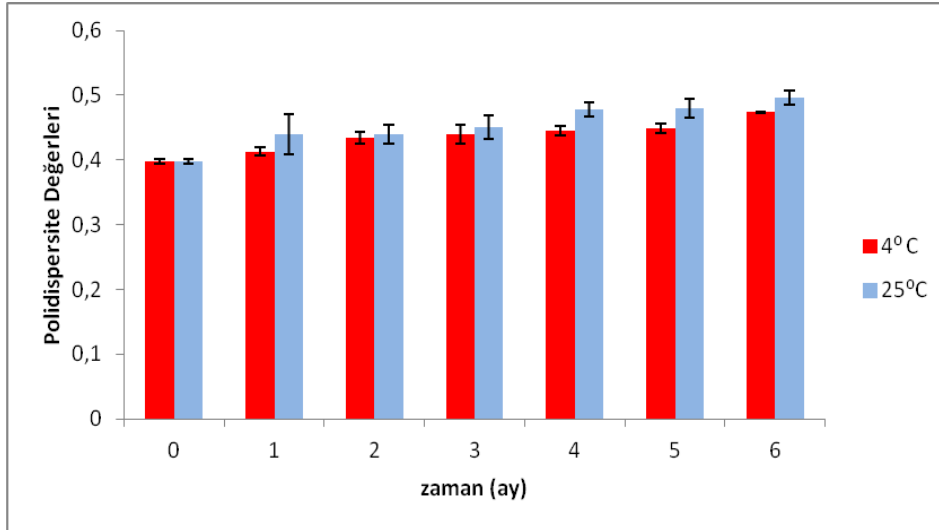
Zaman (ay)	Ortalama Çap (µm)	4°C	Zeta Potansiyel (mV)	Ortalama Çap (µm)	25°C	Zeta Potansiyel (mV)
		PDI			PDI	
0	0,410±0,012	0,398±0,008	18,6±0,7	0,410±0,012	0,398±0,008	18,6±0,7
1	0,435±0,020	0,413±0,008	16,6±0,8	0,438±0,004	0,413±0,028	14,5±0,4
2	0,445±0,005	0,435±0,010	15,6±1,0	0,465±0,005	0,435±0,012	15,2±1,7
3	0,485±0,005	0,442±0,017	14,0±0,6	0,505±0,010	0,442±0,017	13,0±2,0
4	0,512±0,004	0,445±0,008	12,6±1,2	0,515±0,011	0,445±0,012	12,5±1,2
5	0,520±0,014	0,451±0,008	10,3±1,58	0,526±0,025	0,451±0,011	9,66±1,36
6	0,525±0,023	0,474±0,005	9,56±1,08	0,530±0,003	0,474±0,012	8,06±1,56

Çizelge 4.16. İnsülin nanokohleatların stabilite verileri

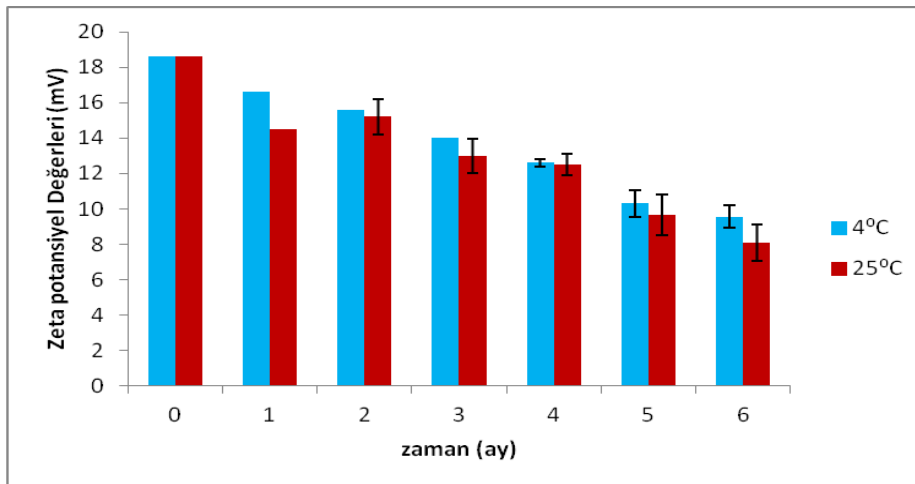
Zaman (ay)	Ortalama Çap (µm)	4°C	Zeta Potansiyel (mV)	Ortalama Çap (µm)	25°C	Zeta Potansiyel (mV)
		PDI			PDI	
0	0,421±0,012	0,430±0,027	17,5±1,3	0,421±0,012	0,430±0,027	17,5±1,3
1	0,435±0,020	0,430±0,018	16,8±0,8	0,442±0,014	0,440±0,017	16,3±0,3
2	0,480±0,005	0,435±0,019	15,6±1,0	0,485±0,005	0,445±0,018	15,2±1,0
3	0,512±0,021	0,439±0,078	14,5±0,6	0,520±0,007	0,451±0,019	13,8±1,0
4	0,535±0,012	0,441±0,021	11,0±0,2	0,540±0,021	0,478±0,052	10,5±0,6
5	0,600±0,014	0,449±0,045	9,8±0,78	0,620±0,025	0,480±0,074	8,8±1,1
6	0,621±0,023	0,460±0,078	8,4±0,65	0,638±0,003	0,496±0,022	8,0±0,2



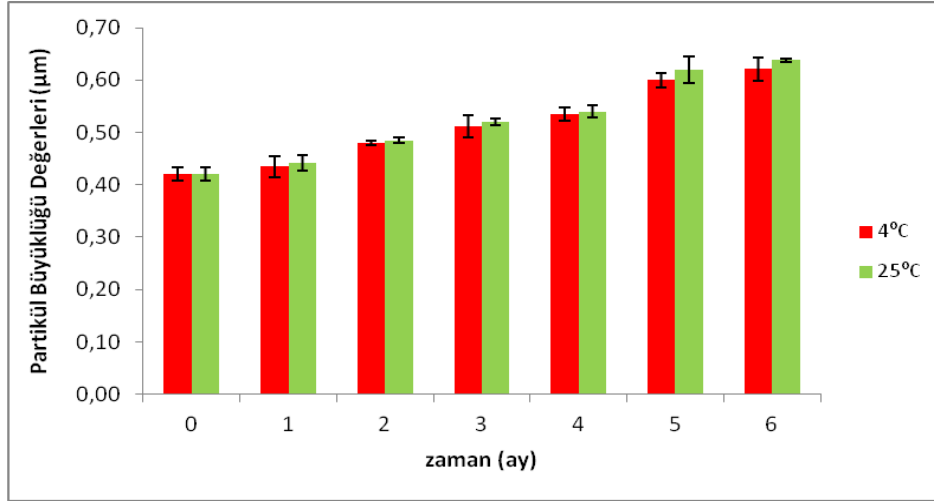
Şekil 4.35. Boş nanokohleatlara ait partikül büyüklüğü sonuçları



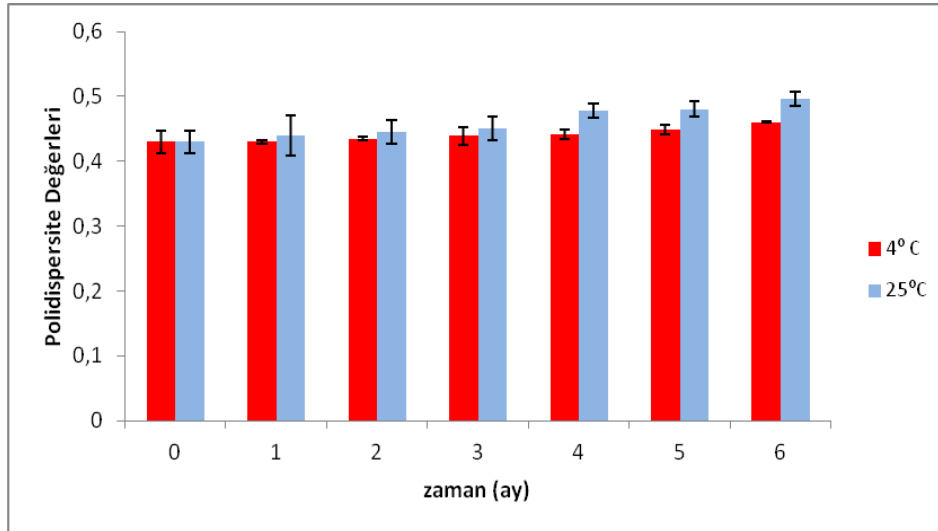
Şekil 4.36. Boş nanokohleatlara ait polidispersite sonuçları



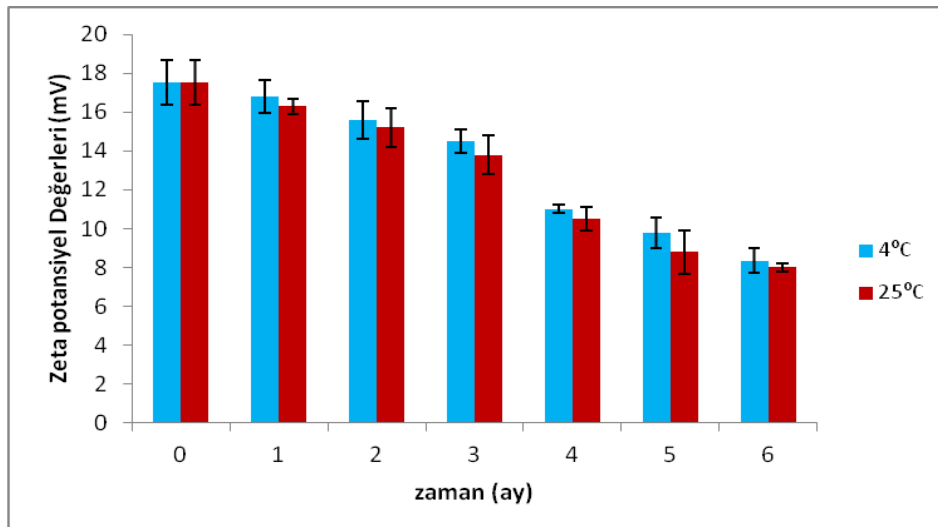
Şekil 4.37. Boş nanokohleatlara ait zeta potansiyel değerleri sonuçları



Şekil 4.38. İnsülin nanokohleatlara ait partikül büyüklüğü sonuçları



Şekil 4.39. İnsülin nanokohleatlara ait polidispersite sonuçları



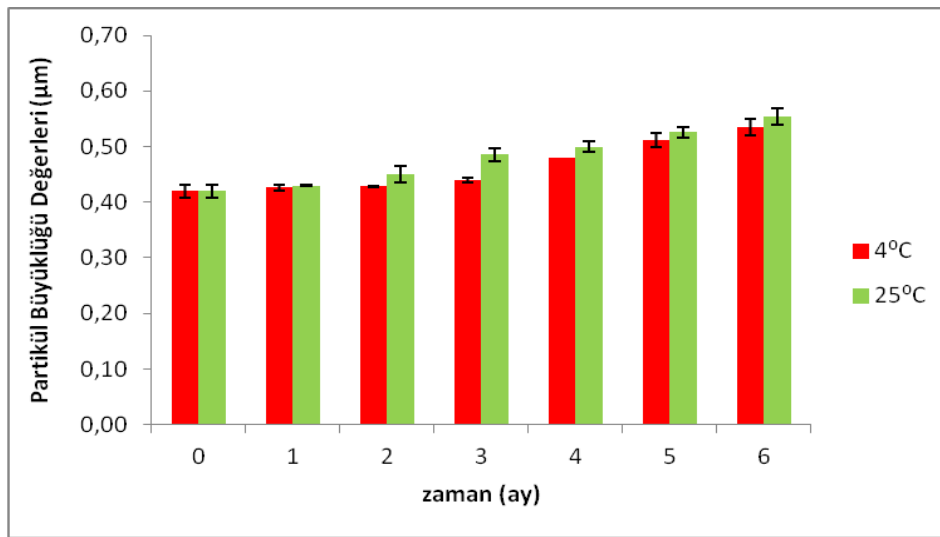
Şekil 4.40. İnsülin nanokohleatlara ait zeta potansiyel değerleri sonuçları

Çizelge 4.17. Boş pegile nanokohleatların stabilite verileri

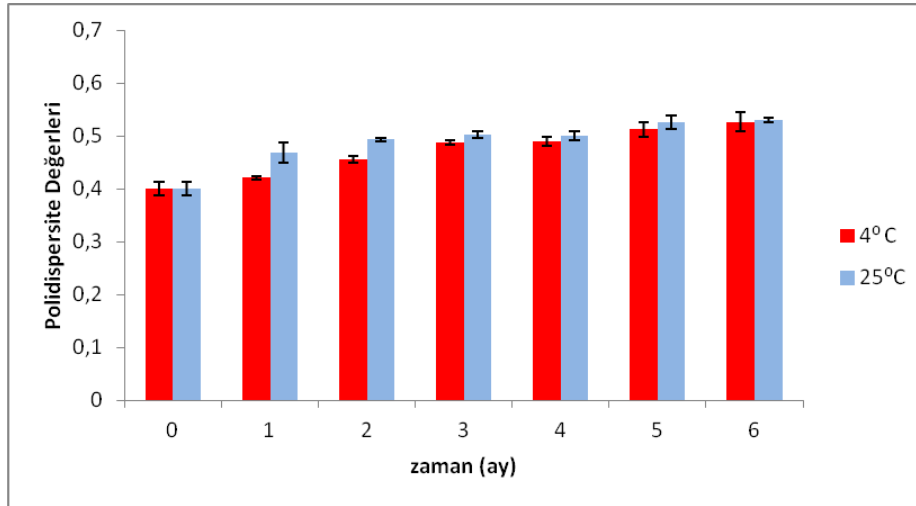
Zaman (ay)	Ortalama Çap (µm)	4°C	Zeta Potansiyel (mV)	Ortalama Çap (µm)	25°C	Zeta Potansiyel (mV)
		PDI			PDI	
0	0,420±0,012	0,400±0,015	16,3±0,8	0,420±0,012	0,400±0,015	16,3±0,8
1	0,426±0,006	0,421±0,005	15,0±1,0	0,430±0,001	0,469±0,023	14,4±0,3
2	0,429±0,004	0,456±0,007	13,6±0,5	0,450±0,015	0,493±0,005	12,5±1,2
3	0,440±0,008	0,488±0,004	12,4±1,1	0,486±0,014	0,502±0,008	11,7±0,3
4	0,480±0,003	0,492±0,011	10,2±0,8	0,500±0,010	0,500±0,010	9,8±0,65
5	0,512±0,012	0,512±0,015	9,5±0,36	0,526±0,010	0,526±0,015	9,0±1,00
6	0,535±0,014	0,526±0,018	8,6±0,82	0,555±0,015	0,534±0,005	8,0±0,75

Çizelge 4.18. İnsülin pegile nanokohleatların stabilite verileri

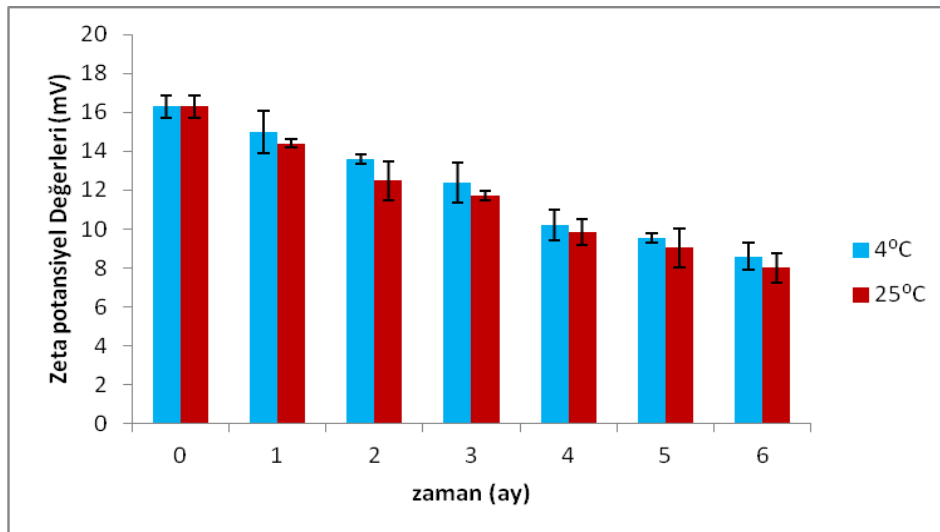
Zaman (ay)	Ortalama Çap (µm)	4°C	Zeta Potansiyel (mV)	Ortalama Çap (µm)	25°C	Zeta Potansiyel (mV)
		PDI			PDI	
0	0,427±0,032	0,470±0,009	16,1±0,4	0,427±0,032	0,470±0,009	16,1±0,4
1	0,454±0,026	0,481±0,043	15,2±2,9	0,459±0,031	0,489±0,039	14,4±2,2
2	0,470±0,030	0,490±0,044	14,3±0,3	0,475±0,005	0,493±0,040	13,8±1,7
3	0,522±0,005	0,494±0,045	13,5±1,0	0,530±0,012	0,502±0,057	12,8±0,2
4	0,538±0,001	0,496±0,079	11,0±0,8	0,545±0,013	0,513±0,098	10,9±0,6
5	0,615±0,012	0,501±0,053	9,7±0,3	0,630±0,015	0,516±0,072	9,0±1,0
6	0,625±0,030	0,506±0,048	6,4±0,7	0,640±0,020	0,520±0,040	6,0±0,8



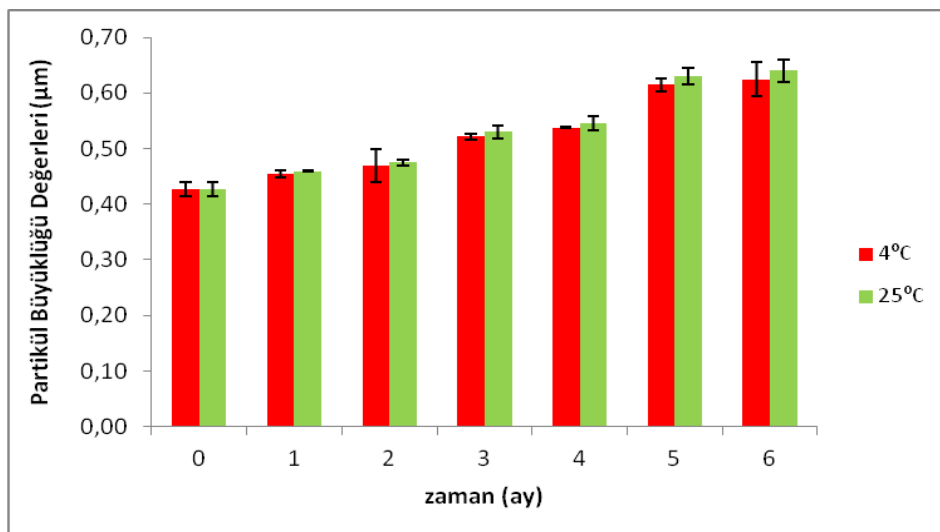
Şekil 4.41. Boş pegile nanokohleatlara ait partikül büyüklüğü sonuçları



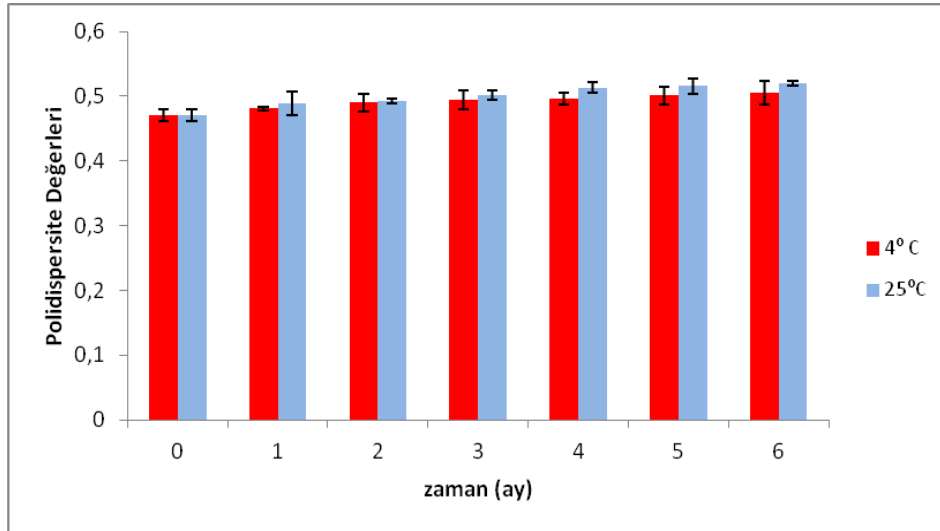
Şekil 4.42. Boş pegile nanokohleatlara ait polidispersite sonuçları



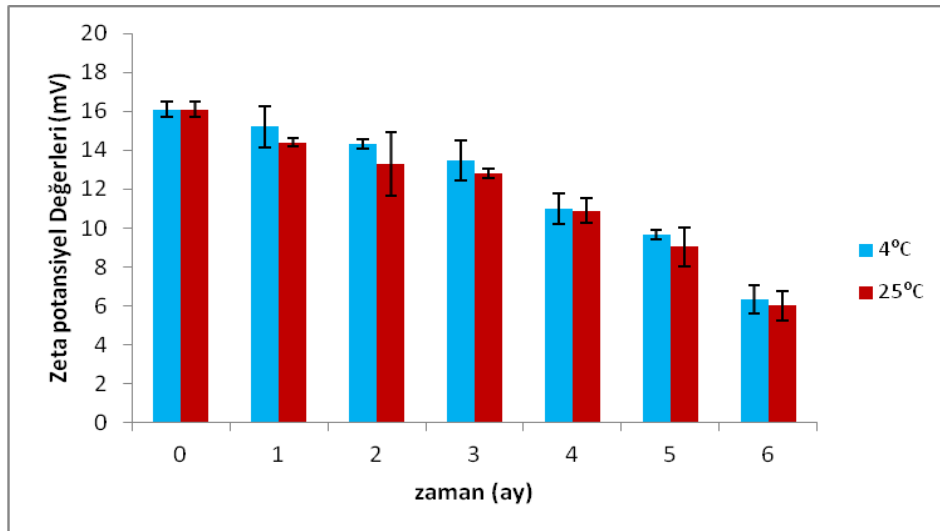
Şekil 4.43. Boş pegile nanokohleatlara ait zeta potansiyel değerleri sonuçları



Şekil 4.44. İnsülin pegile nanokohleatlara ait partikül büyüklüğü sonuçları



Şekil 4.45. İnsülin pegile nanokohleatlara ait polidispersite sonuçları



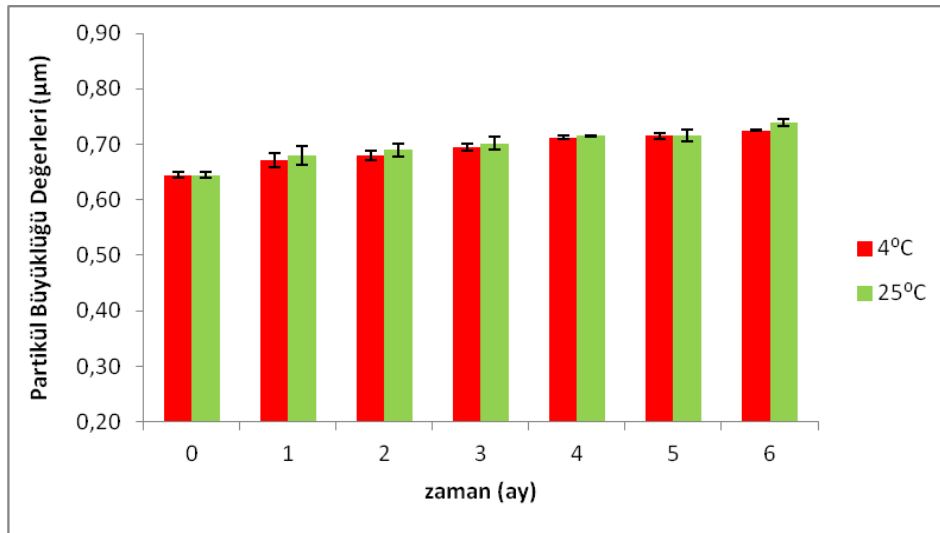
Şekil 4.46. İnsülin pegile nanokohleatlara ait zeta potansiyel değerleri sonuçları

Çizelge 4.19. Boş nanopartiküllerin stabilite verileri

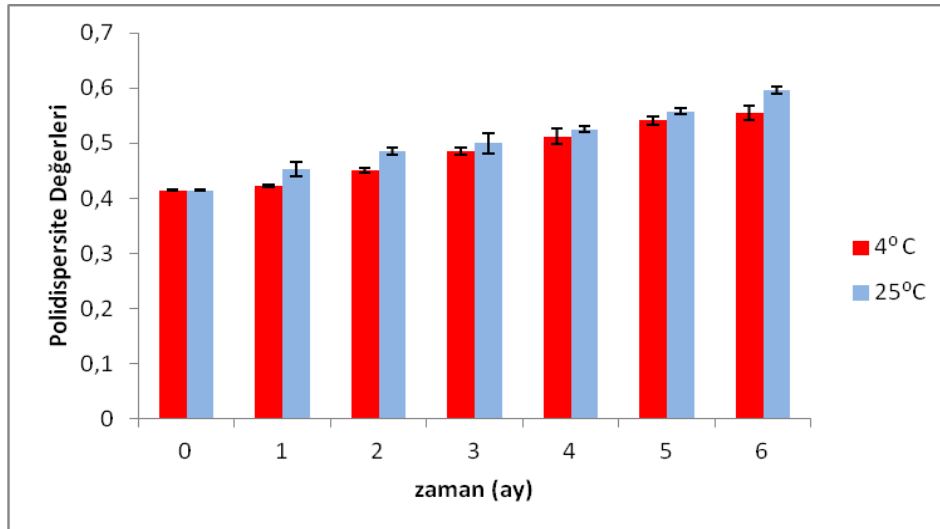
Zaman (ay)	Ortalama Çap (µm)	4°C	Zeta Potansiyel (mV)	Ortalama Çap (µm)	25°C	Zeta Potansiyel (mV)
		PDI			PDI	
0	0,645±0,007	0,415±0,004	4,56±0,06	0,645±0,007	0,415±0,004	4,56±0,06
1	0,672±0,013	0,423±0,004	3,65±0,20	0,680±0,018	0,453±0,012	3,06±0,03
2	0,680±0,009	0,451±0,005	3,02±0,09	0,690±0,012	0,486±0,006	2,74±0,30
3	0,695±0,006	0,486±0,010	1,56±0,55	0,702±0,011	0,500±0,018	1,54±0,32
4	0,712±0,003	0,512±0,014	1,23±0,78	0,715±0,001	0,525±0,005	1,30±0,45
5	0,715±0,005	0,541±0,010	1,00±0,52	0,716±0,010	0,558±0,007	0,96±0,28
6	0,725±0,002	0,556±0,013	0,86±0,18	0,740±0,008	0,596±0,009	0,74±0,35

Çizelge 4.20. Boş nanopartiküllerin stabilite verileri

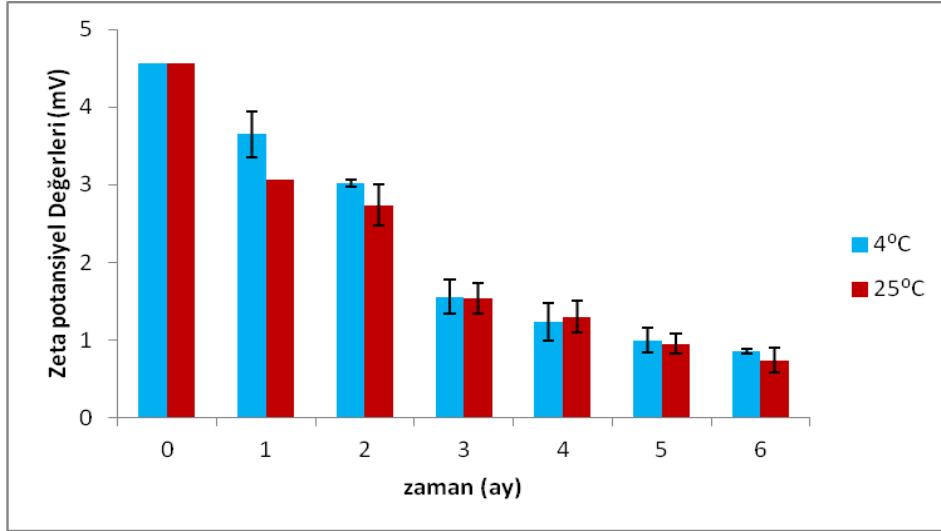
Zaman (ay)	Ortalama Çap (µm)	4°C	Zeta Potansiyel (mV)	Ortalama Çap (µm)	25°C	Zeta Potansiyel (mV)
		PDI			PDI	
0	0,713±0,036	0,506±0,024	3,60±0,96	0,713±0,036	0,506±0,024	3,60±0,96
1	0,736±0,053	0,515±0,015	3,20±0,15	0,739±0,027	0,522±0,012	3,02±0,33
2	0,755±0,042	0,518±0,016	2,88±0,04	0,814±0,042	0,525±0,013	2,67±0,37
3	0,756±0,006	0,522±0,097	1,88±0,22	0,850±0,012	0,528±0,018	1,67±0,20
4	0,815±0,030	0,526±0,018	1,67±0,42	0,900±0,001	0,535±0,015	1,45±0,21
5	0,820±0,005	0,528±0,078	1,44±0,16	0,912±0,012	0,548±0,096	1,18±0,41
6	0,840±0,035	0,531±0,068	1,11±1,03	0,954±0,007	0,569±0,017	1,00±0,36



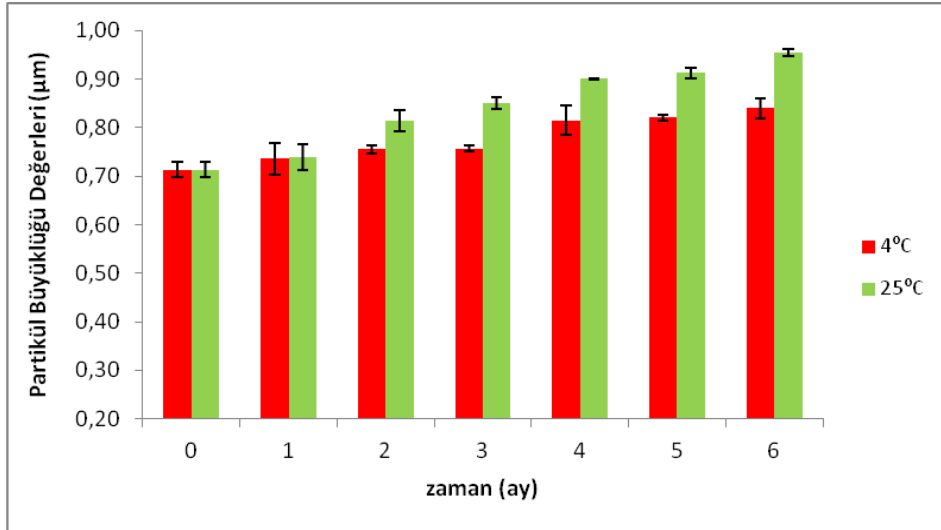
Şekil 4.47. Boş nanopartiküle ait partikül büyüklüğü sonuçları



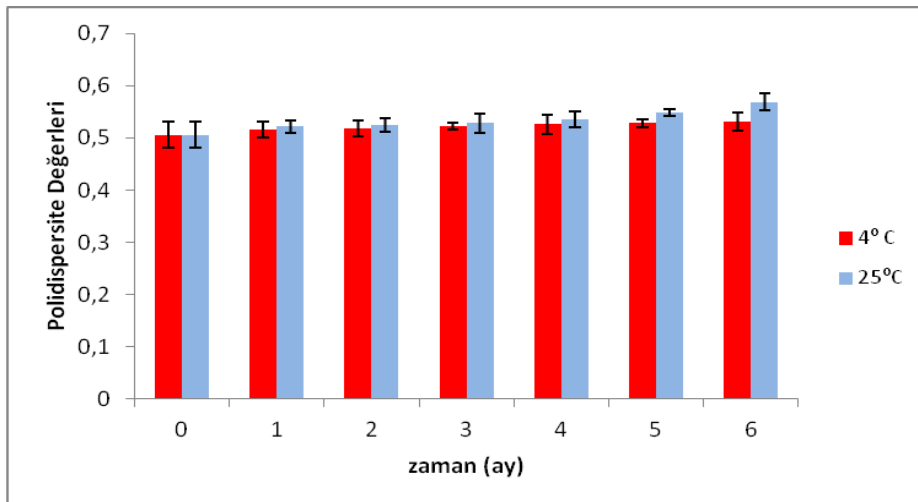
Şekil 4.48. Boş nanopartiküle ait polidispersite sonuçları



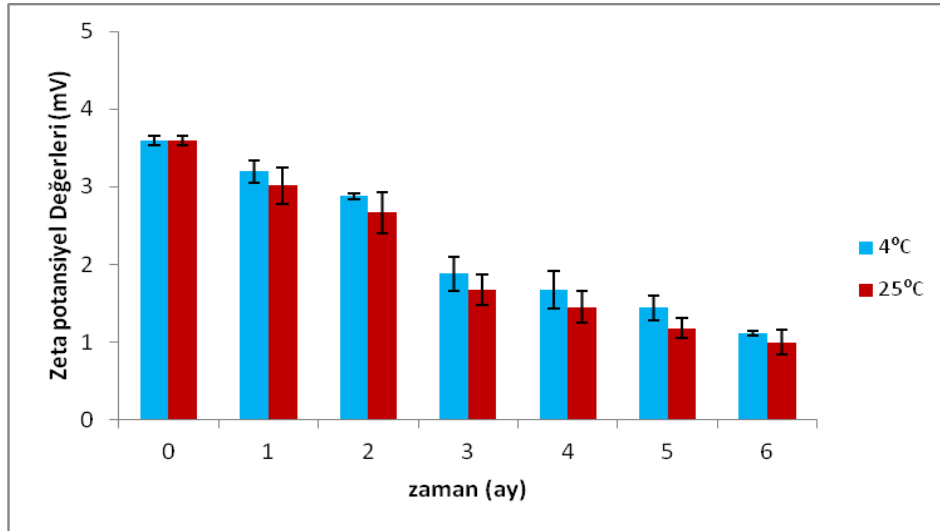
Şekil 4.49. Boş nanopartiküle ait zeta potansiyel değerleri sonuçları



Şekil 4.50. İnsülin nanopartiküle ait partikül büyüklüğü sonuçları



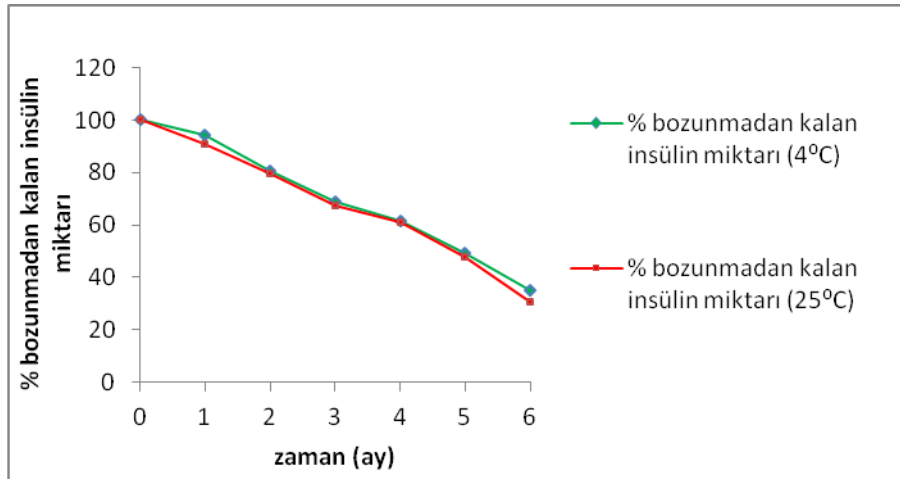
Şekil 4.51. İnsülin nanopartiküle ait polidispersite sonuçları



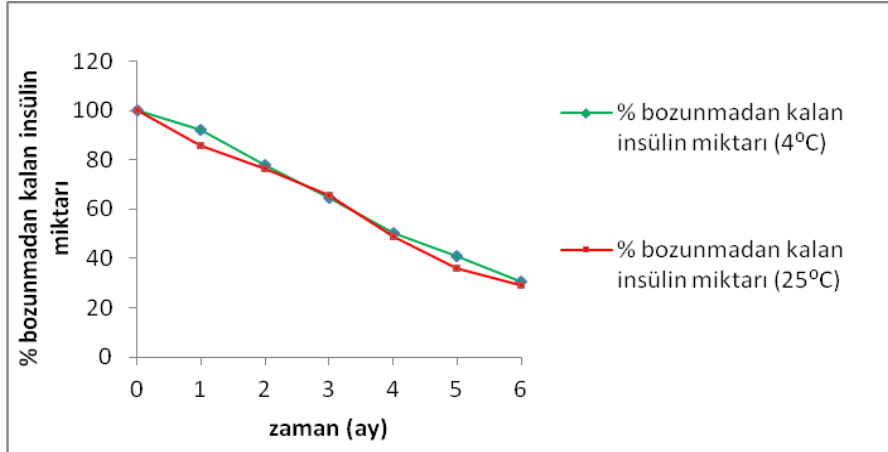
Şekil 4.52. İnsülin nanopartiküle ait zeta potansiyel değerleri sonuçları

İnsülinin lipozom ve pegile lipozom formülasyonları içindeki miktar değişimine ait bulgular

Farklı saklama koşullarında (4°C ve 25°C) 180 gün bekletilen lipozom formülasyonlarında insülin miktarının zamanla değişimine ait sonuçlar Şekil 4.53 ve 4.54'te gösterilmiştir.



Şekil 4.53. Stabilité çalışmalarında insülin lipozomlarının içindeki insülin miktarının zamana göre değişimi



Şekil 4.54. Stabilite çalışmalarında insülin pegile lipozomlarının içindeki insülin miktarının zamana göre değişimi

Çizelge 4.21. İnsülin lipozom formülasyonu içindeki stabilitesine ait reaksiyon kinetikleri

REAKSİYON DERECEŚİ VE DENKLEMİ	SICAKLIK (°C)	EĞİM (K)	KESİŞİM (C ₀)	DETERMİNASYON KATSAYISI (R ²)	SAPMA KARELERİ TOPLAMI (SKT)
Sıfır derece C= C ₀ - k.t	4	0,362	102,5	0,996	27,4
	25	0,370	101,4	0,994	38,5
Birinci derece C= C ₀ . e ^{-kt}	4	0,005	4,70	0,975	176,2
	25	0,006	4,69	0,964	221,3
İkinci derece C ⁻¹ = (C ₀ ⁻¹ + k.t)*	4	0,94 x10 ⁻⁴	7,61X10 ⁻³	0,930	1186,3
	25	1,07X10 ⁻⁴	7,20X10 ⁻³	0,903	1823,4

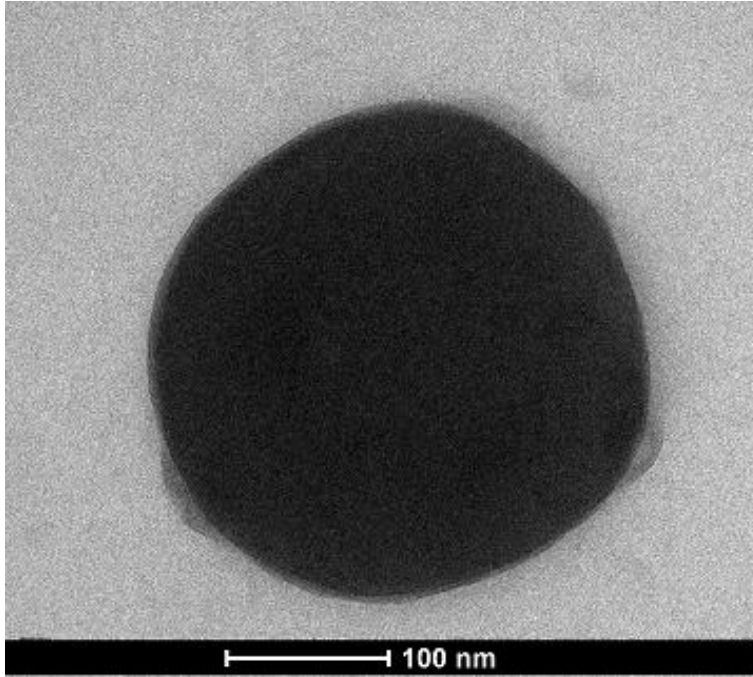
Çizelge 4.22. İnsülin pegile lipozom formülasyonu içindeki stabilitesine ait reaksiyon kinetikleri

REAKSİYON DERECEŚİ VE DENKLEMİ	SICAKLIK (°C)	EĞİM (K)	KESİŞİM (C ₀)	DETERMİNASYON KATSAYISI (R ²)	SAPMA KARELERİ TOPLAMI (SKT)
Sıfır derece C= C ₀ - k.t	4	0,400	101,4	0,998	17,7
	25	0,405	99,5	0,997	28,3
Birinci derece C= C ₀ . e ^{-kt}	4	0,007	4,70	0,989	145,9
	25	0,070	4,69	0,982	182,9
İkinci derece C ⁻¹ = (C ₀ ⁻¹ + k.t)*	4	1,20X10 ⁻⁴	7,12X10 ⁻³	0,956	1815,1
	25	1,35X10 ⁻⁴	6,83X10 ⁻³	0,952	2471,9

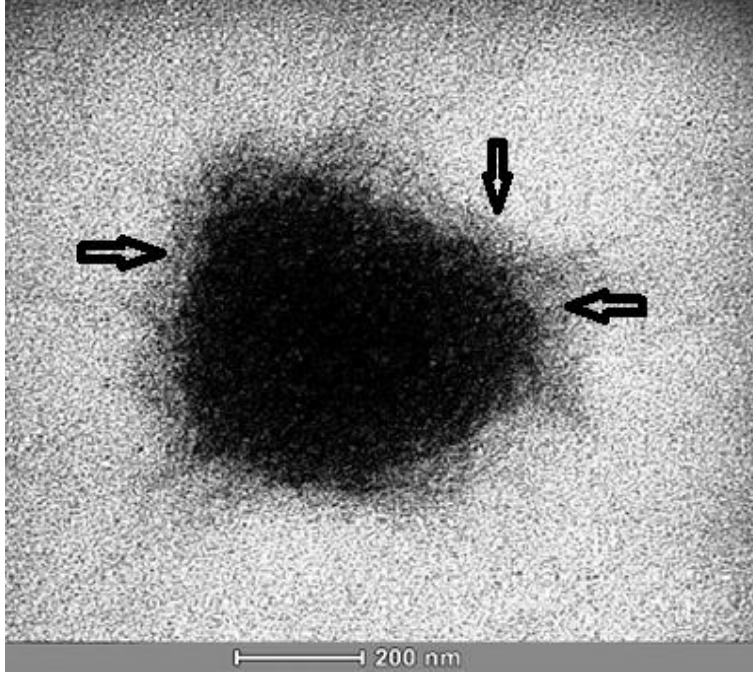
Determinasyon katsayısı, sapma kareleri toplamı gibi uyum ölçütleri incelenerek elde edilen profiller kinetik açıdan incelenmiş, insülin içeren lipozomda ve insülin içeren pegile lipozomda bozunmanın sıfırdan dereceden olduğu gösterilmiştir. Kinetik hesapları Çizelge 4.21 ve 4.22'de gösterilmiştir.

İnsülin içeren lipozom ve pegile lipozom formülasyonlarının şekline ait bulgular

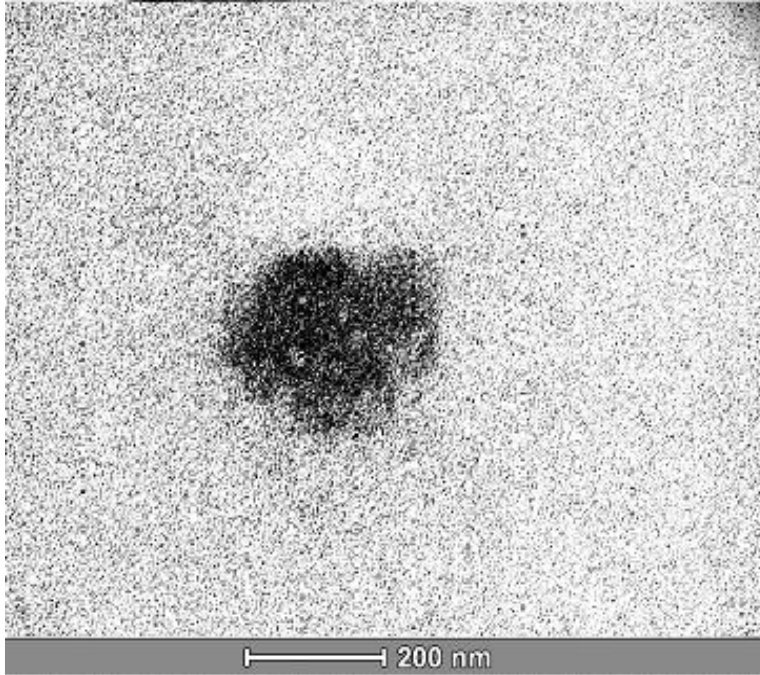
İnsülin içeren lipozomların görüntüleri 6 ayın sonunda TEM mikroskobu ile incelendi ve elde edilen görüntüler Resim 4.11-4.14'te verilmiştir.



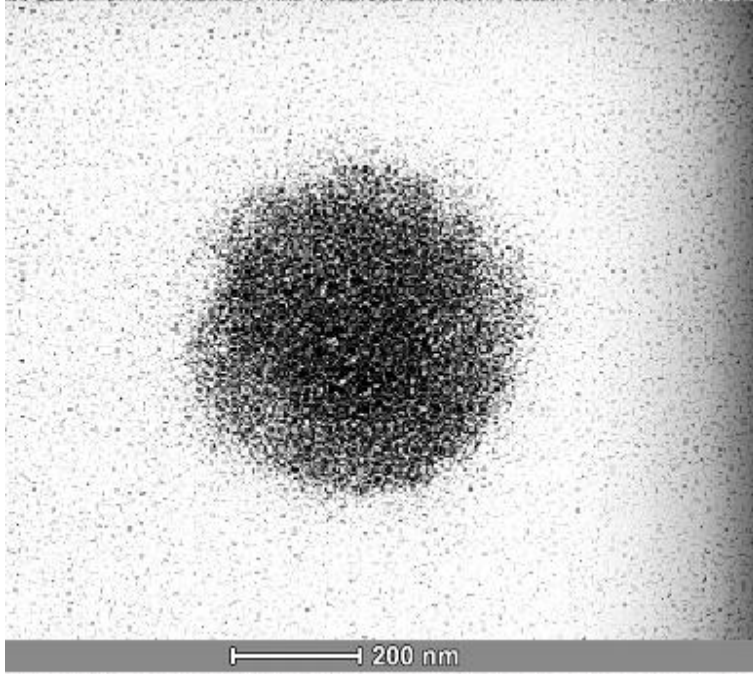
Resim 4.11. Altı aylık stabilite çalışması süresinin sonunda +4°C'de saklanan, insülin lipozom formülasyonlarının TEM görüntüleri x68000



Resim 4.12. Altı aylık stabilite çalışması süresinin sonunda +4°C'de saklanan, insülin pegile lipozom formülasyonlarının TEM görüntüleri (oklar: pegilasyon görüntüsü) x120000



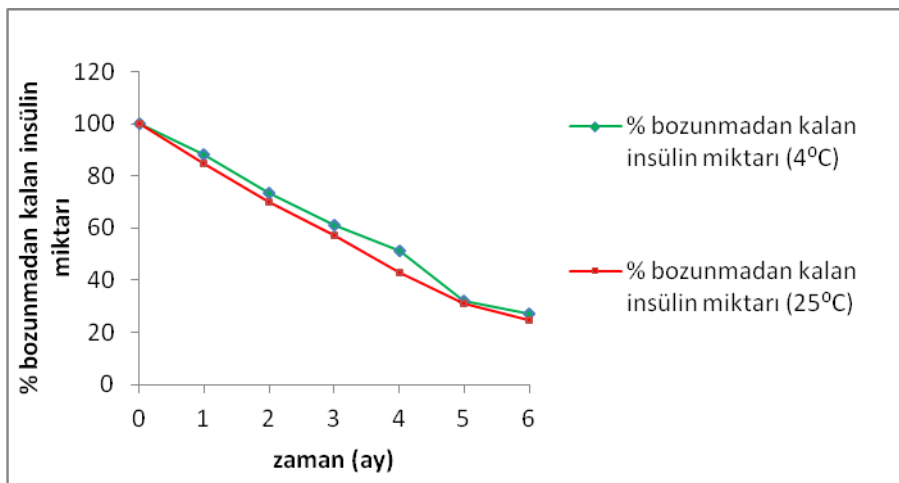
Resim 4.13. Altı aylık stabilite çalışması süresinin sonunda +25°C'de saklanan, insülin lipozom formülasyonlarının TEM görüntüleri x120000



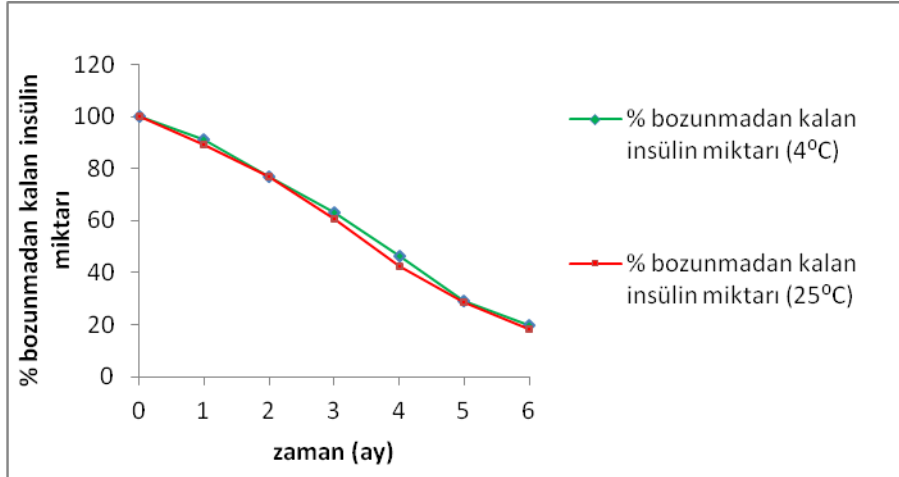
Resim 4.14. Altı aylık stabilite çalışması süresinin sonunda +25°C'de saklanan, insülin pegile lipozom formülasyonlarının TEM görüntüleri x150000

İnsülinin nanokohleat ve pegile nanokohleat formülasyonları içindeki miktar değişimine ait bulgular

Farklı saklama koşullarında (4°C ve 25°C) 180 gün bekletilen nanokohleat formülasyonlarında insülin miktarının zamanla değişimine ait sonuçlar Şekil 4.55 ve 4.56'da gösterilmiştir.



Şekil 4.55. Stabilite çalışmalarında insülin nanokohleatlarının içindeki insülin miktarının zamana göre değişimi



Şekil 4.56. Stabilite çalışmalarında insülin pegile nanokohleatlarının içindeki insülin miktarının zamana göre değişimi

Çizelge 4.23. İnsülin nanokohleat formülasyonu içindeki stabilitesine ait reaksiyon kinetikleri

REAKSİYON DERECEŚİ VE DENKLEMİ	SICAKLIK (°C)	EĞİM (K)	KESİŞİM (C ₀)	DETERMİNASYON KATSAYISI (R ²)	SAPMA KARELERİ TOPLAMI (SKT)
Sıfır derece C= C ₀ - k.t	4	0,421	99,8	0,996	35,3
	25	0,435	100,1	0,991	82,7
Birinci derece C= C ₀ . e ^{-kt}	4	0,008	4,70	0,995	202,1
	25	0,007	4,67	0,994	92,3
İkinci derece C ⁻¹ = (C ₀ ⁻¹ + k.t)*	4	1,46x10 ⁻⁴	6,59x10 ⁻³	0,934	2966,2
	25	1,67x10 ⁻⁴	6,33x10 ⁻³	0,962	3652,4

Çizelge 4.24. İnsülin pegile nanokohleat formülasyonu içindeki stabilitesine ait reaksiyon kinetikleri

REAKSİYON DERECEŚİ VE DENKLEMİ	SICAKLIK (°C)	EĞİM (K)	KESİŞİM (C ₀)	DETERMİNASYON KATSAYISI (R ²)	SAPMA KARELERİ TOPLAMI (SKT)
Sıfır derece C= C ₀ - k.t	4	0,470	103,2	0,997	38,5
	25	0,474	102,2	0,997	38,4
Birinci derece C= C ₀ . e ^{-kt}	4	0,009	4,79	0,973	603,9
	25	0,009	4,78	0,991	560,8
İkinci derece C ⁻¹ = (C ₀ ⁻¹ + k.t)*	4	2,09x10 ⁻⁴	3,46x10 ⁻³	0,912	3633,8
	25	2,20x10 ⁻⁴	3,23x10 ⁻³	0,915	4452,8

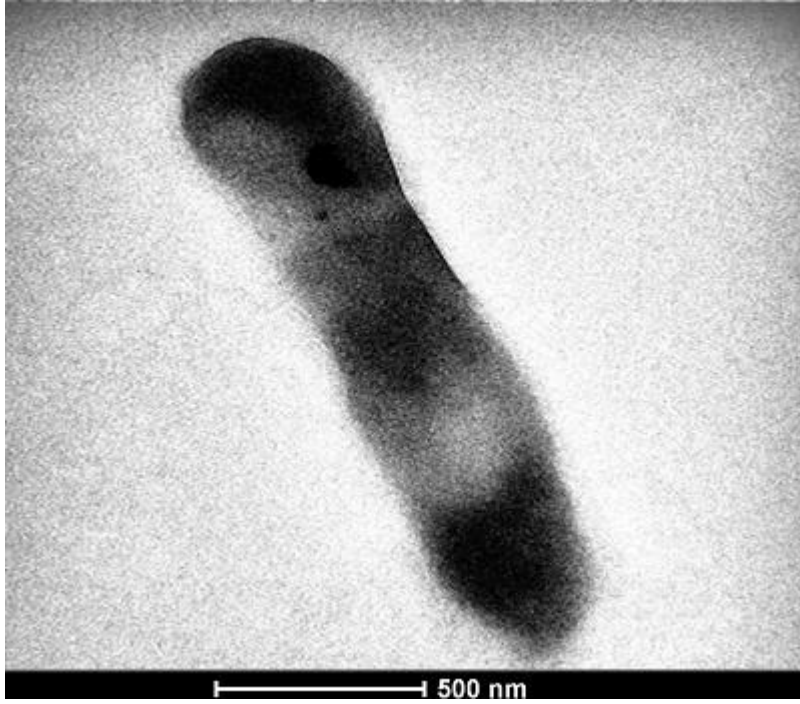
Determinasyon katsayısı, sapma kareleri toplamı gibi uyum ölçütleri incelenerek elde edilen profiller kinetik açıdan incelenmiş, insülin içeren nanokohleatta ve insülin içeren pegile nanokohleatta bozunmanın sıfırdan dereceden olduğu bulunmuştur. Kinetik hesapları Çizelge 4.23 ve 4.24'te gösterilmiştir.

İnsülin içeren nanokohleat ve pegile nanokohleat formülasyonlarının şekline ait bulgular

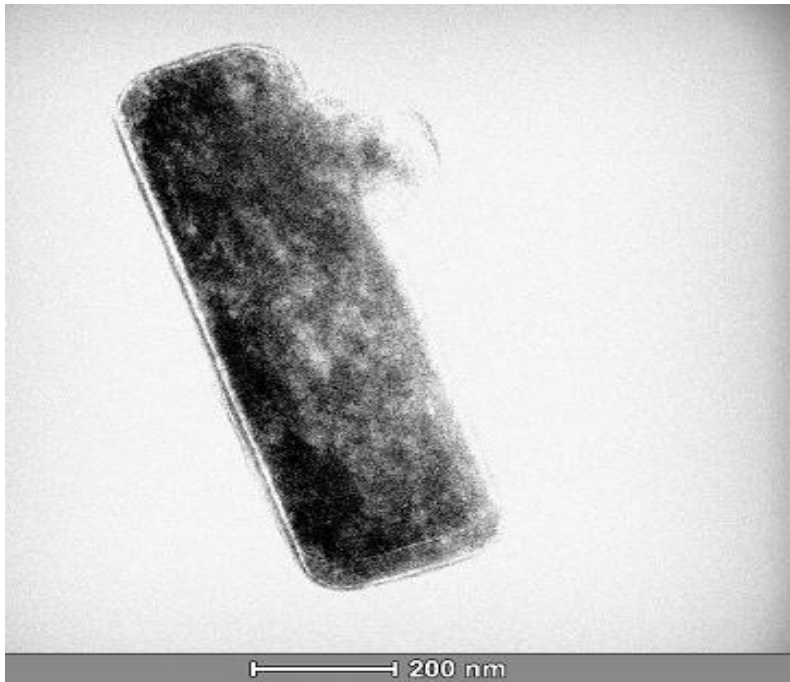
İnsülin içeren nanokohleatların görüntüleri 6. ayın sonunda TEM mikroskobu ile incelendi ve elde edilen görüntüler Resim 4.15-18'de verilmiştir.



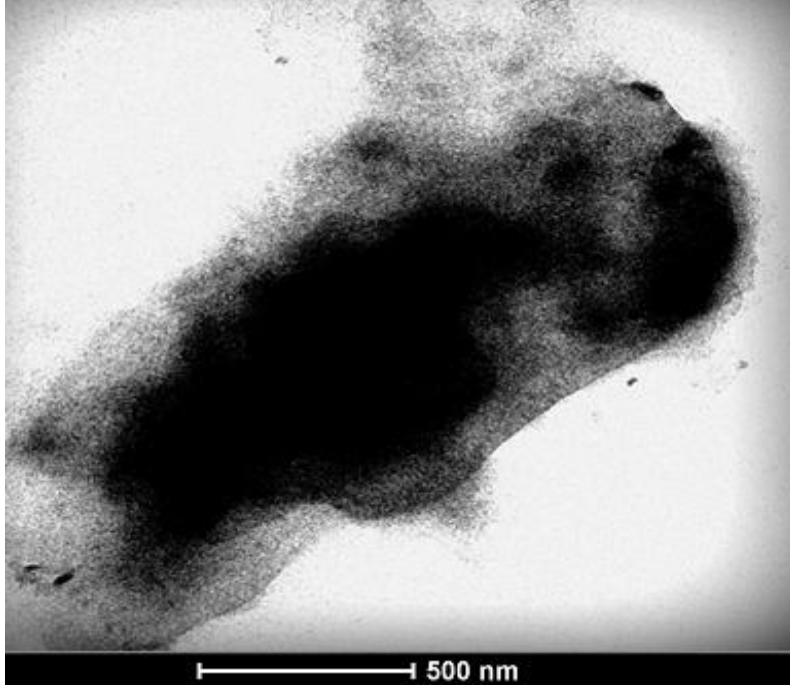
Resim 4.15. Altı aylık stabilite çalışması süresinin sonunda +4°C'de saklanan, insülin nanokohleat formülasyonlarının TEM görüntüleri x30000



Resim 4.16. Altı aylık stabilite çalışması süresinin sonunda +4°C'de saklanan, insülin pegile nanokohleat formülasyonlarının TEM görüntüleri x13000



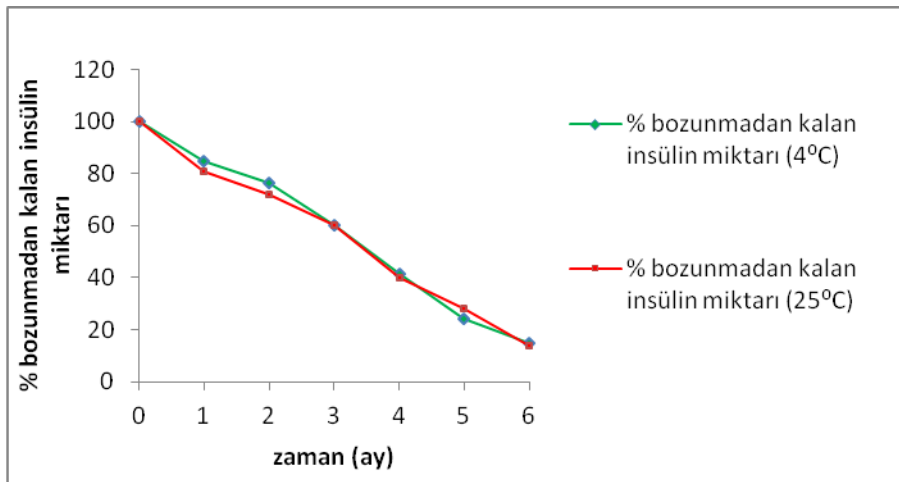
Resim 4.17. Altı aylık stabilite çalışması süresinin sonunda +25°C'de saklanan, insülin nanokohleat formülasyonlarının TEM görüntüleri x30000



Resim 4.18. Altı aylık stabilite çalışması süresinin sonunda +25°C’de saklanan, insülin pegile nanokohleat formülasyonlarının TEM görüntüleri x13000

İnsülinin nanopartikül formülasyonu içindeki miktar değişimine ait bulgular

Farklı saklama koşullarında (4°C ve 25°C) 180 gün bekletilen nanopartikül formülasyonlarında insülin miktarının zamanla değişimine ait sonuçlar Şekil 4.57’de gösterilmiştir.



Şekil 4.57. Stabilite çalışmalarında insülin nanopartiküllerinin içindeki insülin miktarının zamana göre değişimi

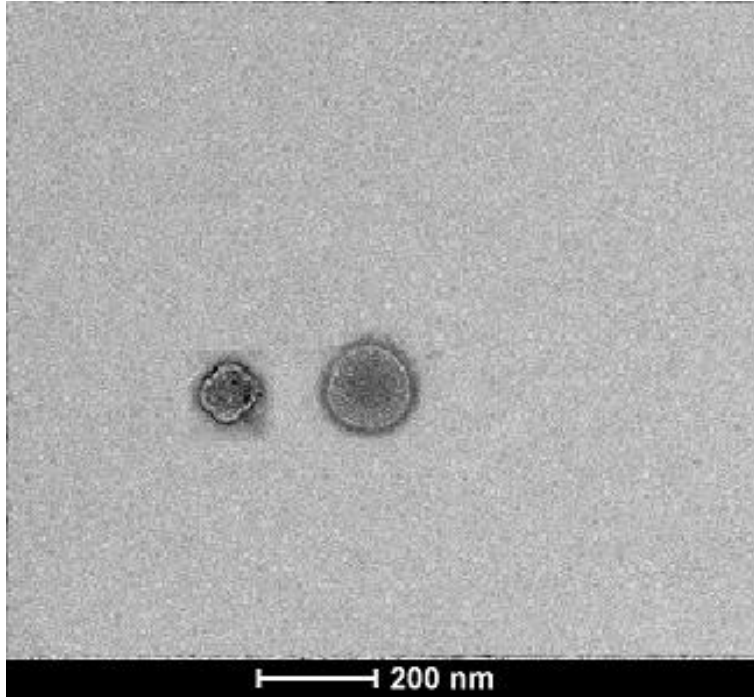
Çizelge 4.25. İnsülin nanopartikül formülasyonu içindeki stabilitesine ait reaksiyon kinetikleri

REAKSIYON DERECEİ VE DENKLEMİ	SICAKLIK (°C)	EĞİM (K)	KESİŞİM (C ₀)	DETERMINASYON KATSAYISI (R ²)	SAPMA KARELERİ TOPLAMI (SKT)
Sıfır derece C= C ₀ - k.t	4	0,490	101,4	0,996	49,1
	25	0,471	98,9	0,997	35,1
Birinci derece C= C ₀ . e ^{-kt}	4	0,011	4,81	0,967	874,9
	25	0,010	4,78	0,961	695,9
İkinci derece C ⁻¹ = (C ₀ ⁻¹ + k.t)*	4	2,87x10 ⁻⁴	5,05x10 ⁻⁴	0,891	3535,4
	25	2,92x10 ⁻⁴	1,69x10 ⁻⁴	0,861	3625,5

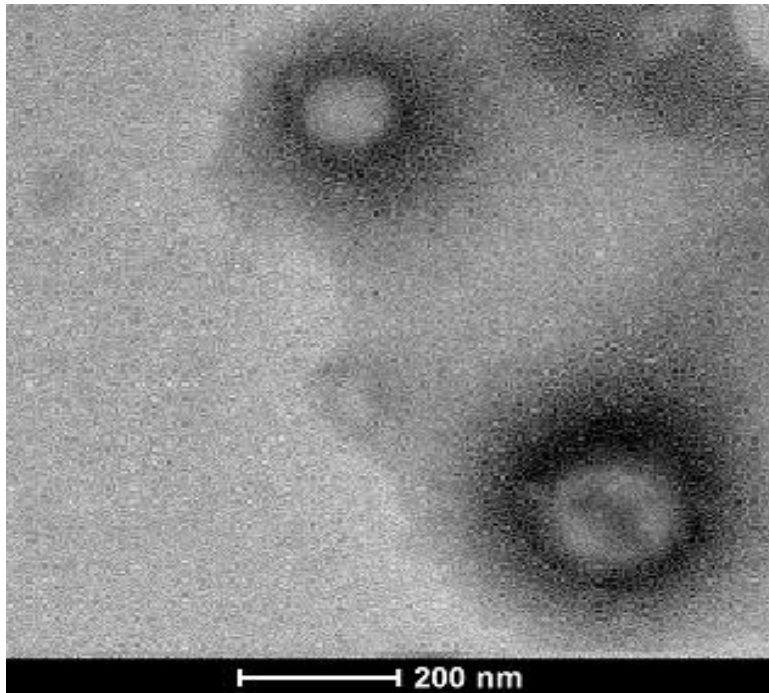
Determinasyon katsayısı, sapma kareleri toplamı gibi uyum ölçütleri incelenerek elde edilen profiller kinetik açıdan incelenmiş, insülin içeren nanopartikülde bozunmanın sıfırdan dereceden olduğu bulunmuştur. Kinetik hesapları Çizelge 4.25'te gösterilmiştir.

İnsülin içeren nanopartikül formülasyonlarının şekline ait bulgular

İnsülin içeren nanopartiküllerin görüntüleri 6. ayın sonunda TEM mikroskobu ile incelendi ve elde edilen görüntü Resim 4.19 ve Resim 4.20'de verilmiştir.



Resim 4.19. Altı aylık stabilite çalışması süresinin sonunda +4°C'de saklanan, insülin nanopartikül formülasyonlarının TEM görüntüleri x30000



Resim 4.20. Altı aylık stabilite çalışması süresinin sonunda +25°C'de saklanan, insülin nanopartikül formülasyonlarının TEM görüntüleri x30000

İnsülin içeren formülasyonların raf ömrüne ait bulgular

Stabilite çalışmaları kapsamında altı ayın sonunda her sıcaklık ortamı için hesaplanan raf ömürleri (gün) aşağıdaki Çizelge 4.26'da verilmiştir.

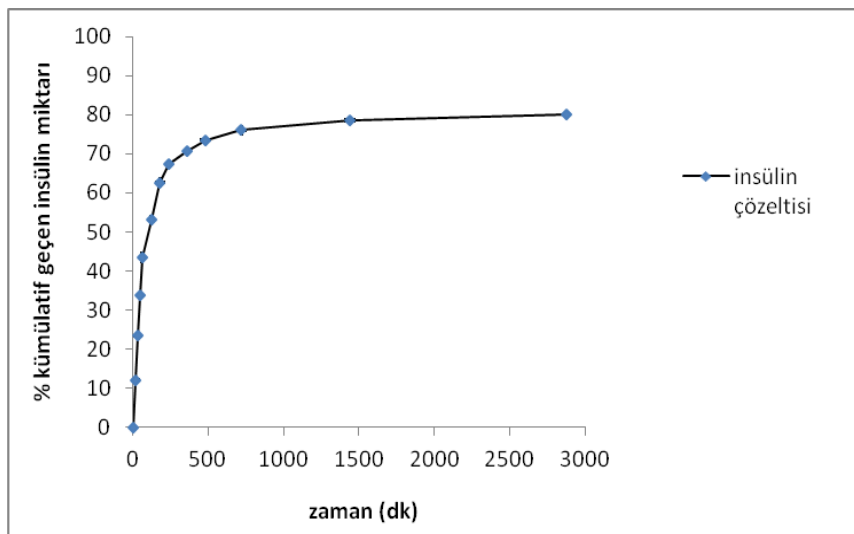
Çizelge 4.26. İnsülin yüklü formülasyonların farklı sıcaklıklardaki uyum ölçütleri ve raf ömürleri

Formülasyonlar	4°C			25°C		
	SKT	r^2	Raf ömrü (gün)	SKT	r^2	Raf ömrü (gün)
Lipozom	27,4	0,996	28	38,5	0,994	27
Peg lipozom	17,7	0,998	26	28,3	0,997	24
Nanokohleat	35,3	0,996	24	82,7	0,991	22
Peg nanokohleat	35,5	0,997	26	38,4	0,997	24
Nanopartikül	49,1	0,996	21	35,1	0,997	20

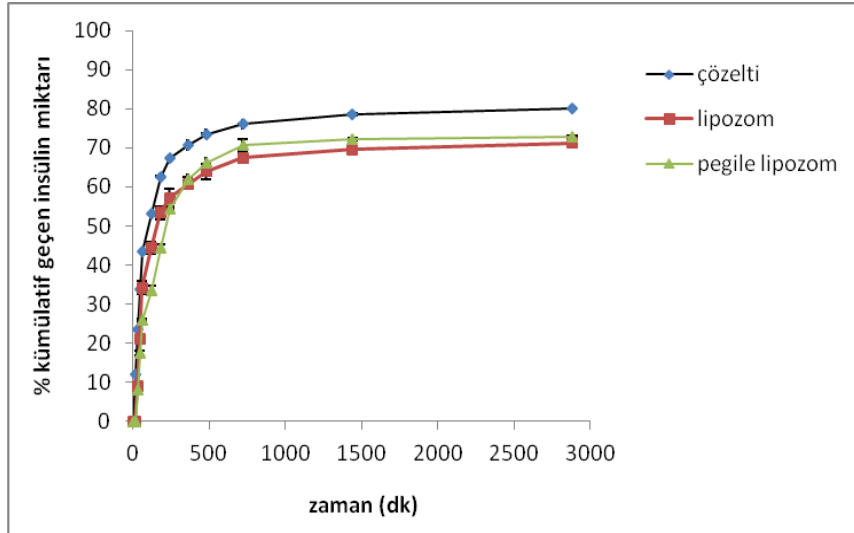
4.1.7. İn vitro geçiş çalışmaları

Diyaliz membran geçiş çalışmalarına ait bulgular

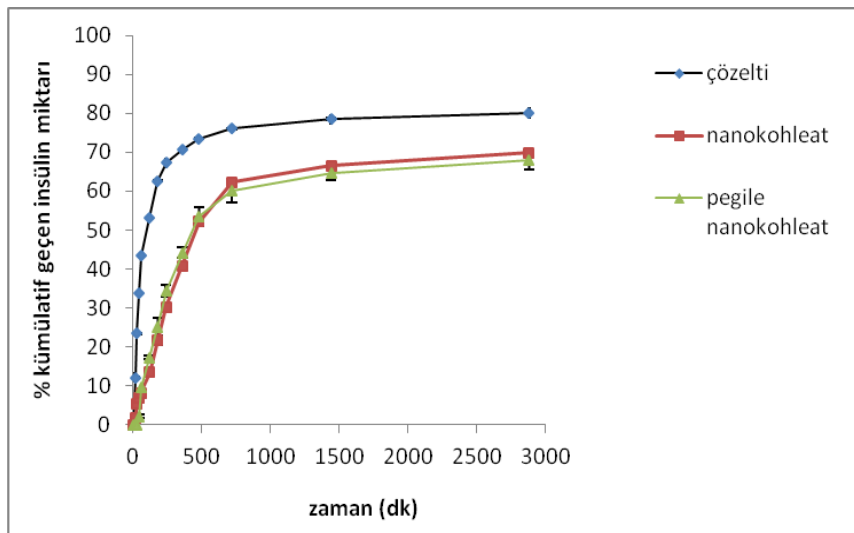
Bölüm 3.2.1'de in vitro geçiş çalışmalarında anlatıldığı şekilde insülin çözeltisinin, lipozomların, nanopartiküllerin ve nanokohleatların diyaliz membrandan geçiş özellikleri incelenmiştir. Formülasyonlardan insülin salım profilleri Şekil 4.58-4.61'de verilmiştir. Yüzde kümülatif salınan insülin miktarları hesaplanmıştır.



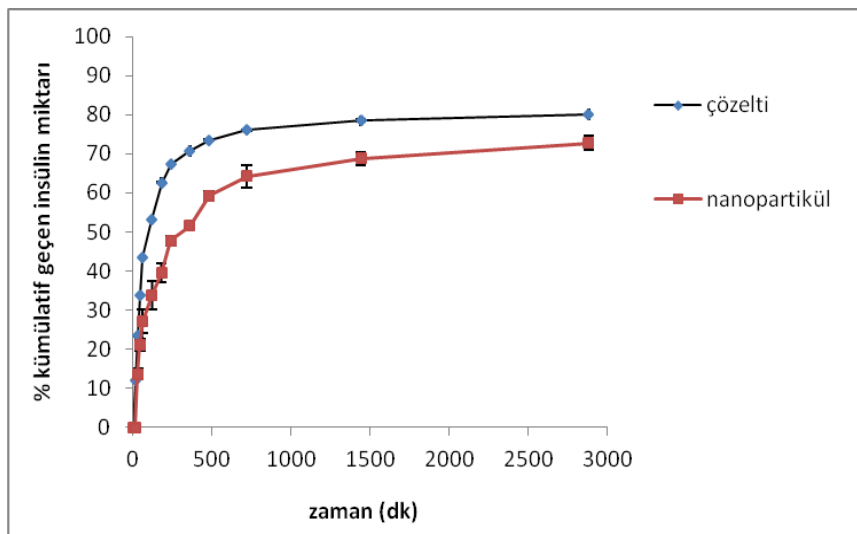
Şekil 4.58. İnsülin çözeltisinden pH 7,4 fosfat tamponunda diyaliz membrandan 37°C'deki salım profili (n=3)



Şekil 4.59. İnsülin lipozom ve pegile lipozomlardan pH 7,4 fosfat tamponunda diyaliz membrandan 37°C'deki insülin çözeltisi ile karşılaştırmalı insülin salım profili (n=3) (çözelti-lipozom, pegile lipozom $p<0,02$)



Şekil 4.60. İnsülin nanokohleat ve pegile nanokohleatlardan pH 7,4 fosfat tamponunda diyaliz membrandan 37°C'deki insülin çözeltisi ile karşılaştırmalı insülin salım profili (n=3) (çözelti-nanokohleat, pegile nanokohleat $p<0,002$)



Şekil 4.61. İnsülin nanopartiküllerden pH 7,4 fosfat tamponunda diyaliz membrandan 37°C'deki insülin çözeltisi ile karşılaştırmalı insülin salım profili (n=3) (çözelti-nanopartikül p<0,001)

Diyaliz membran geçişlerinden elde edilen sonuçların kinetik olarak değerlendirilmesine ait bulgular

Diyaliz membran geçiş çalışmaları sonucunda insülin çözeltisi ve tüm insülin yüklü formülasyonlar için zamana karşı % kümülatif salınan insülin miktarının değişik kinetiklere olan uyumu incelenmiştir. Çözelti için elde edilen kinetik tablosu Çizelge 4.27'de verilmiş olup insülin salımının Rosin-Rommler-Sperling-Bennett-Weillbull (RRSBW) salım kinetiğine uyum sağladığı görülmüştür.

Çizelge 4.27. İnsülin çözeltisinin pH 7,4 fosfat tamponunda, in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi

Kinetik model	Kinetik ölçütler			
	m	n	r ²	SKT
Birinci derece	-0,0004	3,8933	0,4994	3474,103
Hixson Crowel	0,0004	0,9501	0,4519	24812,18
Sıfır derece	0,0166	47,1324	0,3651	30358,87
RRSBW	0,4587	-2,6926	0,8522	724,10
BTA	0,4088	-5,3543	0,8301	943,96
Higuchi	1,2094	33,7267	0,6086	2281,82

Lipozomlar için elde edilen kinetik tabloları Çizelge 4.28 ve 4.29'da verilmiştir. İnsülin salımının, insülin içeren katyonik lipozom formülasyonlarında RRSBW salım kinetiğine, pegile lipozomlarda ise RRSBW salım kinetiğine uyum sağladığı görülmüştür.

Çizelge 4.28. İnsülin katyonik lipozomlardan pH 7,4 fosfat tamponunda, insülinin in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi

Kinetik model	Kinetik ölçütler			
	m	n	r^2	SKT
Birinci derece	-0,0003	4,0238	0,4835	2551,656
Hixson Crowel	0,0004	0,7983	0,4448	18210,29
Sıfır derece	0,0147	41,424	0,3718	21586,14
RRSBW	0,4865	-3,1546	0,7593	955,42
BTA	0,4445	-5,9658	0,7378	1177,69
Higuchi	1,0828	28,599	0,5951	1747,28

Çizelge 4.29. İnsülin yüklü pegile katyonik lipozomlardan pH 7,4 fosfat tamponunda, insülinin in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi

Kinetik model	Kinetik ölçütler			
	m	n	r^2	SKT
Birinci derece	-0,0004	4,0841	0,5128	2911,33
Hixson Crowel	0,0004	0,7164	0,4822	15104,75
Sıfır derece	0,0177	37,383	0,4217	18568,66
RRSBW	0,5733	-3,7301	0,8414	875,99
BTA	0,5243	-6,8260	0,8244	1131,85
Higuchi	1,2907	22,211	0,6601	1878,55

Nanokohleatlar için elde edilen kinetik tabloları Çizelge 4.30 ve 4.31’de verilmiştir. İnsülin salımının, hem insülin içeren nanokohleat formülasyonlarında hem de pegile nanokohleat formülasyonlarında RRSBW salım kinetiğine uyum sağladığı görülmüştür.

Çizelge 4.30. İnsülin yüklü nanokohleatlardan pH 7,4 fosfat tamponunda, insülinin in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi

Kinetik model	Kinetik ölçütler			
	m	n	r^2	SKT
Birinci derece	-0,0004	4,3878	0,7175	2045,51
Hixson Crowel	0,0006	0,3178	0,6859	5030,19
Sıfır derece	0,0242	18,318	0,6229	6788,39
RRSBW	0,8448	-5,8923	0,9478	812,64
BTA	0,8028	10,131	0,9402	1141,01
Higuchi	1,5976	1,9053	0,8454	1131,99

Çizelge 4.31. İnsülin yüklü pegile nanokohleatlardan pH 7.4 fosfat tamponunda, insülinin in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi

Kinetik model	Kinetik ölçütler			
	m	n	r^2	SKT
Birinci derece	-0,0004	4,3024	0,6761	1831,78
Hixson Crowel	0,00005	0,4378	0,6394	6411,79
Sıfır derece	0,0203	24,747	0,5665	8352,10
RRSBW	0,8572	-5,9671	0,8235	1090,70
BTA	0,8085	-10,187	0,8056	1447,67
Higuchi	1,4305	7,4016	0,7804	1128,57

Nanopartikül için elde edilen kinetik tablosu Çizelge 4.32’de verilmiş olup insülin salımının RRSBW salım kinetiğine uyum sağladığı görülmüştür.

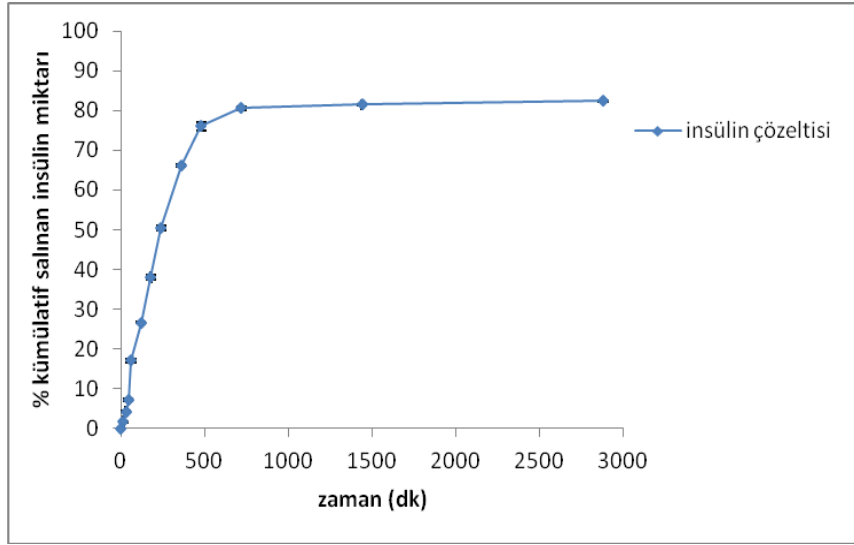
Çizelge 4.32. İnsülin yüklü nanopartiküllerden pH 7,4 fosfat tamponunda, insülinin in vitro salımının kinetik değerlendirilmesi

Kinetik model	Kinetik ölçütler			
	m	n	r^2	SKT
Birinci derece	-0,0004	4,1564	0,6924	1411,88
Hixson Crowel	0,0004	0,6383	0,6506	12087,23
Sıfır derece	0,0174	35,0852	0,5677	15254,55
RRSBW	0,4669	-3,1628	0,9377	238,093
BTA	0,4242	-5,8726	0,9256	327,732
Higuchi	1,1992	21,558	0,7931	821,603

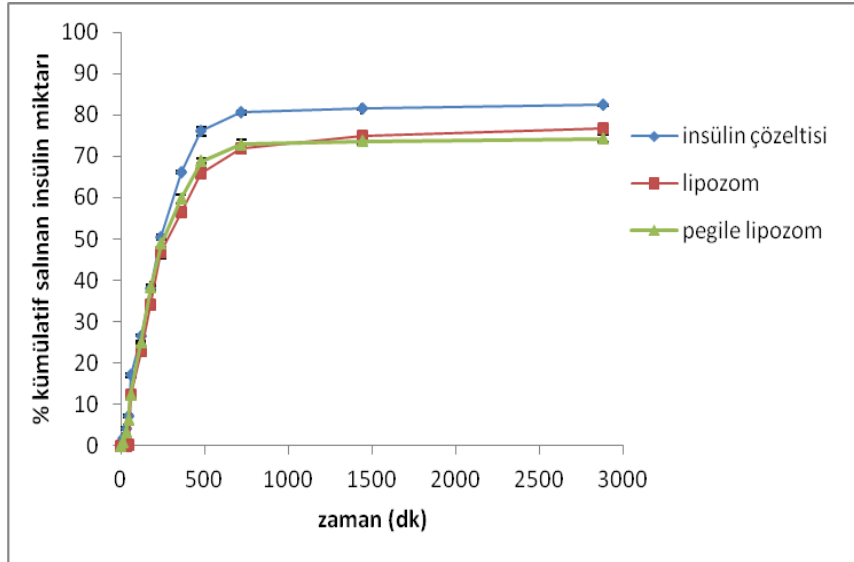
Hücre içermeyen polikarbonat membran filtre geçişleri

Hücre içermeyen membranlardan insülin çözeltisi, lipozomlar, nanokohleatlar ve nanopartikül geçişleri çözelti formülasyonu ile karşılaştırmalı olarak Bölüm 3.2.1’de anlatıldığı gibi gerçekleştirildi.

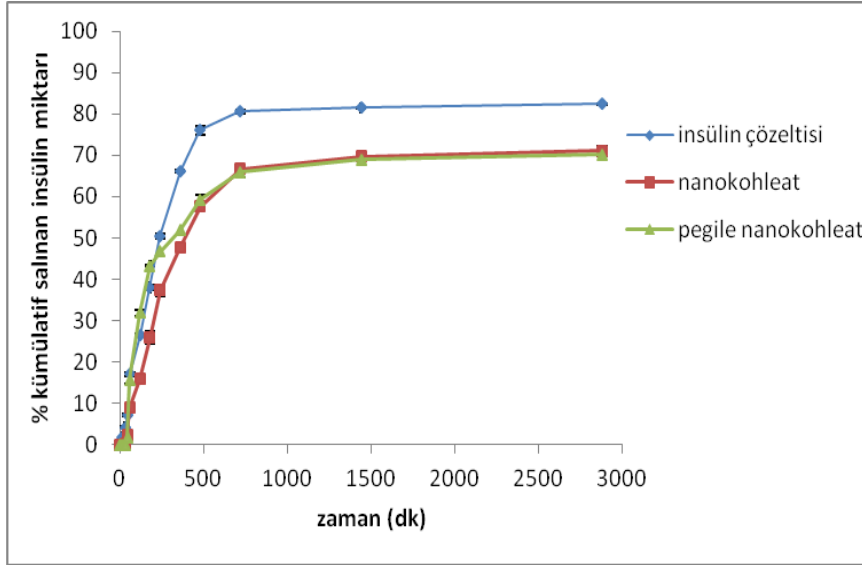
Elde edilen sonuçlar Şekil 4.62-4.65’de görülmektedir.



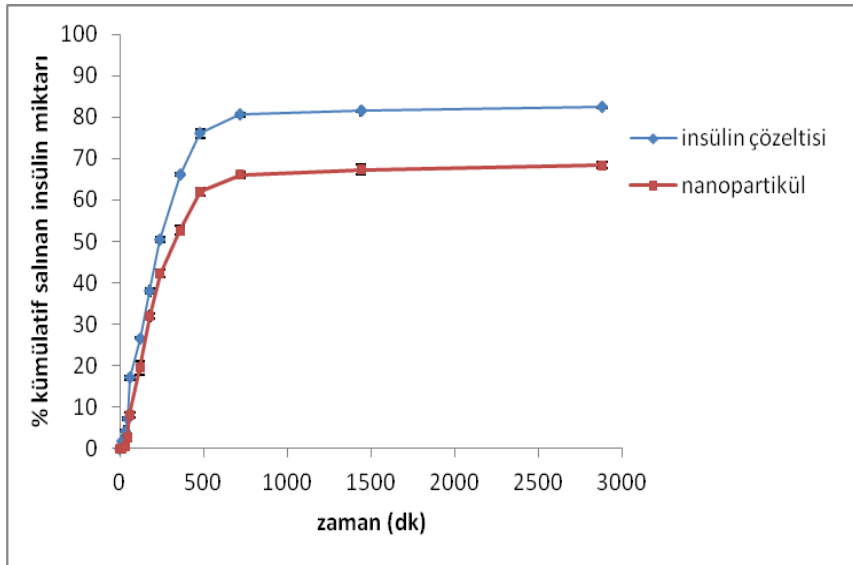
Şekil 4.62. Hücre içermeyen membranda insülin çözeltisi geçişi (n=6)



Şekil 4.63. Hücre içermeyen membranda lipozom ve pegile lipozomlardan insülin çözeltisi ile karşılaştırmalı insülin geçişi (n=6) (çözelti-lipozom ve pegile lipozom, $p < 0,0001$)



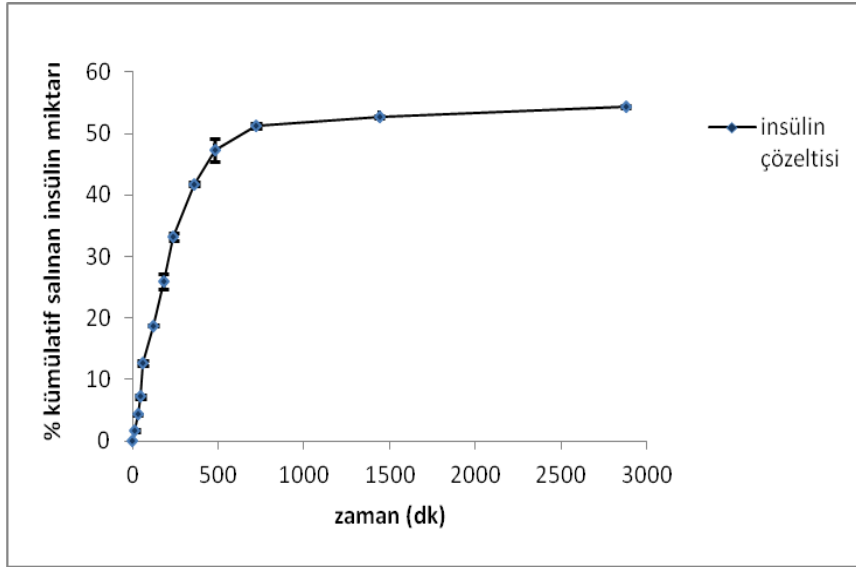
Şekil 4.64. Hücre içermeyen membranda nanokohleat ve pegile nanokohleatlardan insülin çözeltisi ile karşılaştırmalı insülin geçişi (n=6) (çözelti- nanokohleat-pegile nanokohleat, $p<0,0001$)



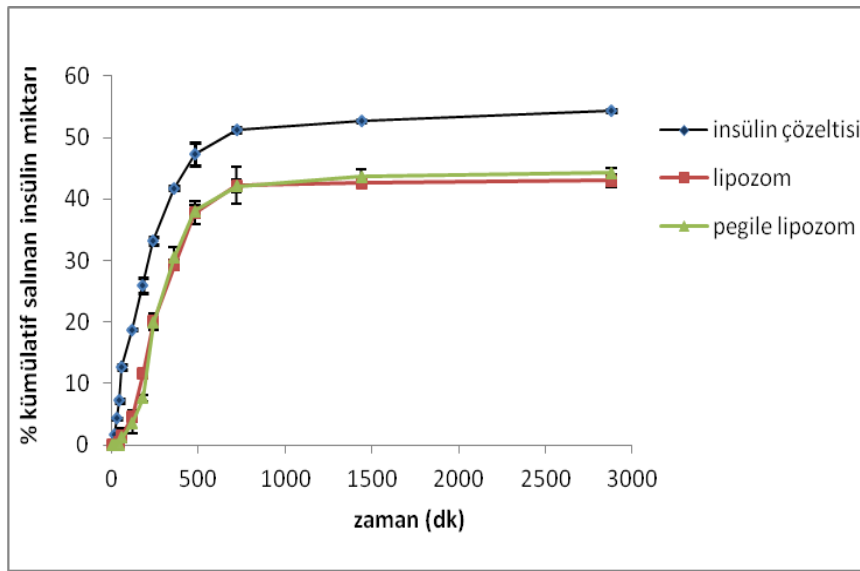
Şekil 4.65. Hücre içermeyen membranda nanopartiküllerden insülin çözeltisi ile karşılaştırmalı insülin geçişi (n=6) (çözelti-nanopartikül, $p<0,01$)

Pankreatik beta TC hücrelerinden geçiş çalışmaları

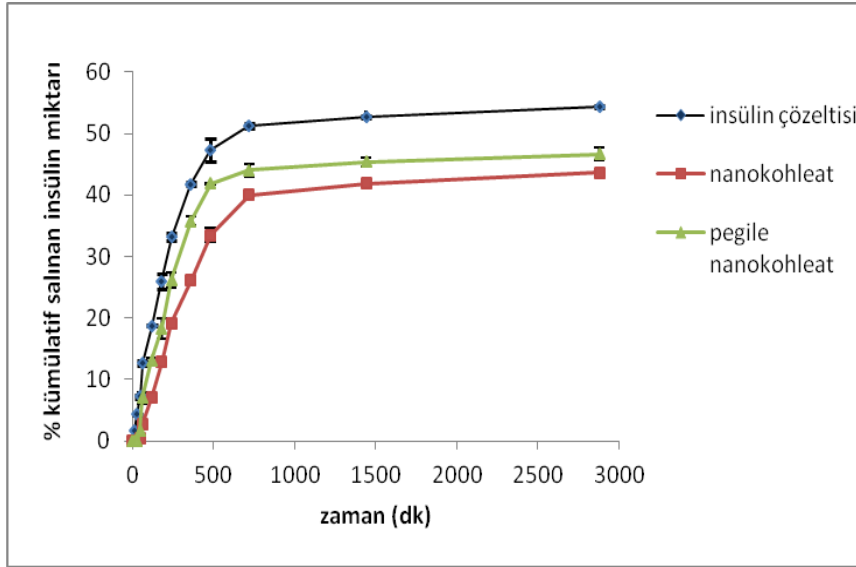
Bölüm 3.1.2'de in vitro geçiş çalışmalarında belirtildiği şekilde 48 saat boyunca insülin çözeltisinin, lipozom, nanopartikül ve nanokohleat formülasyonlarının pankreatik beta TC hücrelerinden geçiş çalışmaları çözelti formülasyonu ile karşılaştırmalı olarak yapılmış ve elde edilen sonuçlar aşağıdaki Şekil 4.66-4.69'da verilmiştir.



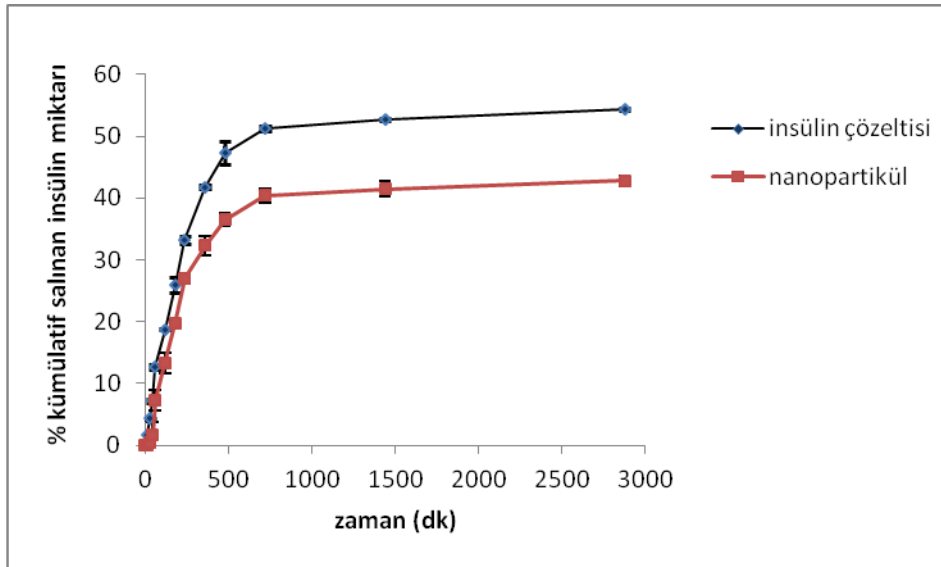
Şekil 4.66. Pankreatik beta TC hücrelerinden insülin çözeltisi geçişi (n=6)



Şekil 4.67. Lipozom ve pegile lipozomlardan insülinin üzerinde pankreatik beta TC hücreleri bulunan polikarbonat membrandan geçişi (n=6) (p<0,001)



Şekil 4.68. Nanokohleat ve pegile nanokohleatlardan insülinin üzerinde pankreatik beta TC hücreleri bulunan polikarbonat membrandan geçişi (n=6) ($p<0,01$)



Şekil 4.69. Nanopartiküllerden insülinin üzerinde pankreatik beta TC hücreleri bulunan polikarbonat membrandan geçişi (n=6) ($p<0,001$)

Pankreatik beta TC hücrelerinin bütünlüğünün değerlendirilmesi

Bölüm 3.2.1'de belirtildiği gibi hücrelerin geçiş çalışması ve öncesindeki dirençleri ölçülmüş ve sonuçlar aşağıdaki Çizelge 4.33'de verilmiştir.

Çizelge 4.33. Pankreatik beta TC hücrelerinin geçiş deneylerinden sonraki elektriksel direnç değerlerinin ölçülmesi

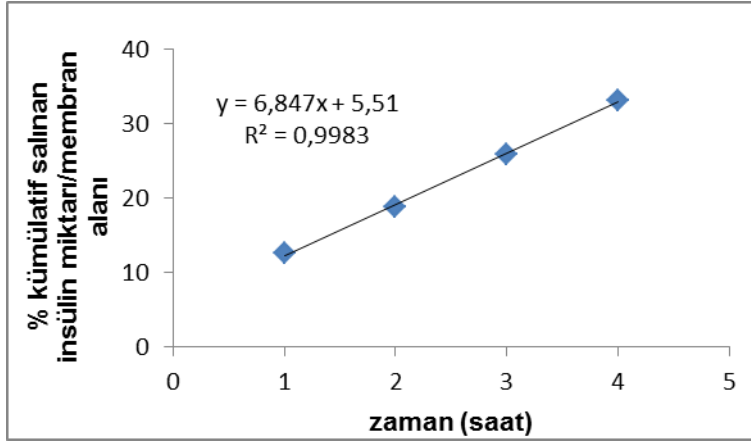
ÖRNEKLER	ELEKTRİKSEL DİRENÇ (Ω)
Geçiş deneyi yapılmadan önce pankreatik beta TC hücre tabakası	79
İnsülin çözeltisi ile geçiş tamamlandıktan sonra pankreatik beta TC hücre tabakası	76
İnsülin lipozomları ile geçiş tamamlandıktan sonra pankreatik beta TC hücre tabakası	57
İnsülin pegile lipozomları ile geçiş tamamlandıktan sonra pankreatik beta TC hücre tabakası	64
İnsülin nanokohleatları ile geçiş tamamlandıktan sonra pankreatik beta TC hücre tabakası	65
İnsülin pegile nanokohleatları ile geçiş tamamlandıktan sonra pankreatik beta TC hücre tabakası	71
İnsülin nanopartikülleri ile geçiş tamamlandıktan sonra pankreatik beta TC hücre tabakası	72
Boş membran	0-5

İnsülinin geçirgenlik katsayısının ($k=P_{app}$) hesaplanması

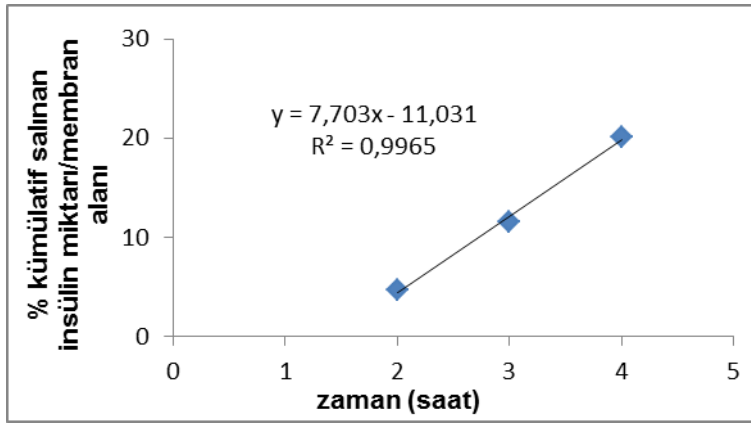
Geçirgenlik katsayısı (k) (cm/saat) değerleri Bölüm 3.2.1’de belirtildiği gibi hesaplanmış ve değerler aşağıdaki Çizelge 4.34’te verilmiştir. Şekil 4.70-4.75’de k değerlerinin hesaplandığı grafikler görülmektedir.

Çizelge 4.34. Pankreatik beta TC hücrelerinde formülasyonlara ait k değerleri

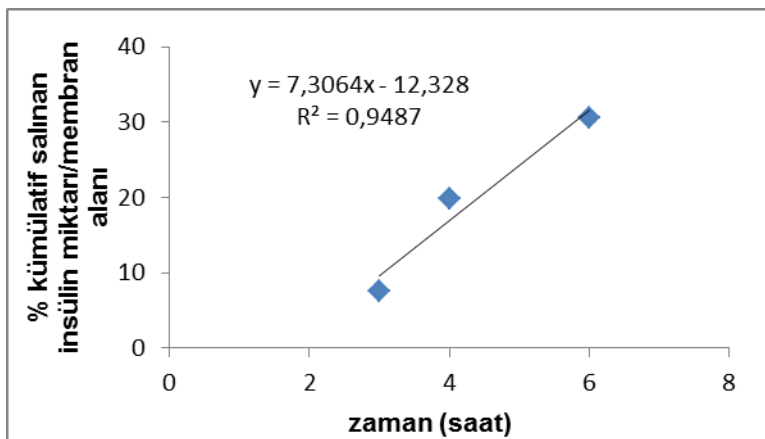
Örnekler	k değerleri
İnsülin çözeltisi	1,04±0,04
İnsülin lipozomları	1,17±0,96
İnsülin pegile lipozomları	1,10±1,90
İnsülin nanokohleatları	1,07±0,10
İnsülin pegile nanokohleatları	1,09±0,99
İnsülin nanopartikülleri	1,06±1,02



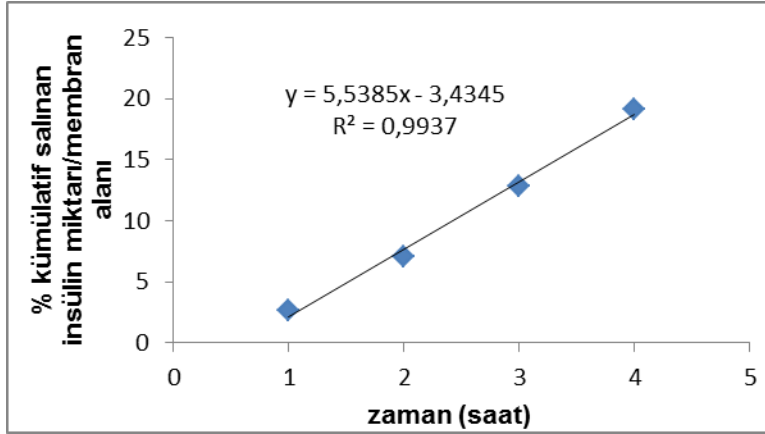
Şekil 4.70. Pankreatik beta TC hücrelerinde insülin çözeltisine ait k değerinin hesaplanmasına ait grafik



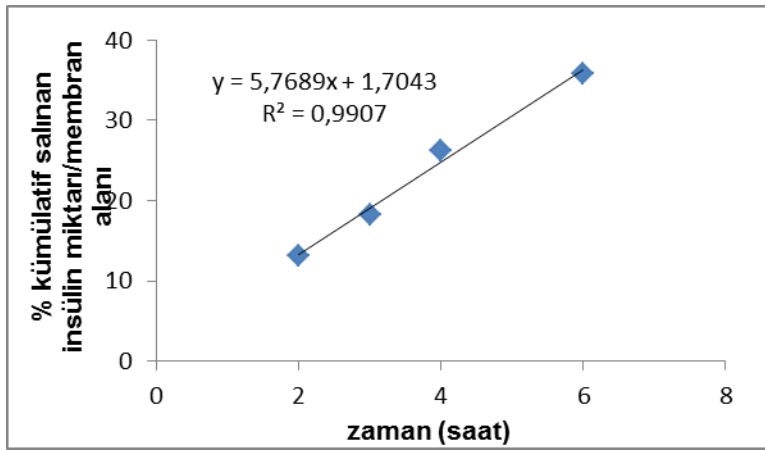
Şekil 4.71. Pankreatik beta TC hücrelerinde insülin lipozomlarına ait k değerinin hesaplanmasına ait grafik



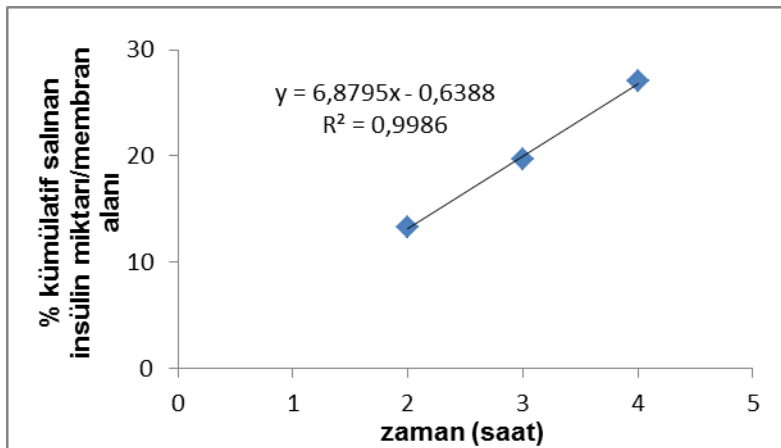
Şekil 4.72. Pankreatik beta TC hücrelerinde insülin pegile lipozomlarına ait k değerinin hesaplanmasına ait grafik



Şekil 4.73. Pankreatik beta TC hücrelerinde insülin nanokohleatlarına ait k değerinin hesaplanmasına ait grafik



Şekil 4.74. Pankreatik beta TC hücrelerinde insülin pegile nanokohleatlarına ait k değerinin hesaplanmasına ait grafik



Şekil 4.75. Pankreatik beta TC hücrelerinde insülin nanopartiküllerine ait k değerinin hesaplanmasına ait grafik

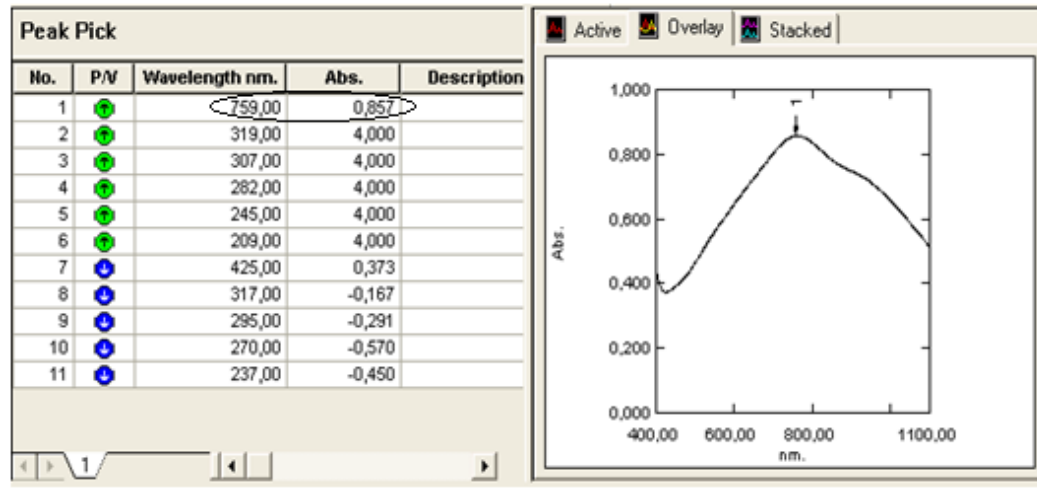
4.2. Embriyonik Kök Hücre'ye Ait Çalışmalarla İlgili Bulgular

4.2.1. UV spektrofotometrede EKH'nin Lowry protein miktar tayini yönteminin validasyonuna ait bulgular

Bölüm 3.2.2'de belirtildiği şekilde EKH validasyon çalışmaları referans protein BSA ile yapılmıştır.

Bovin serum albümin'in UV spektrumuna ait bulgular

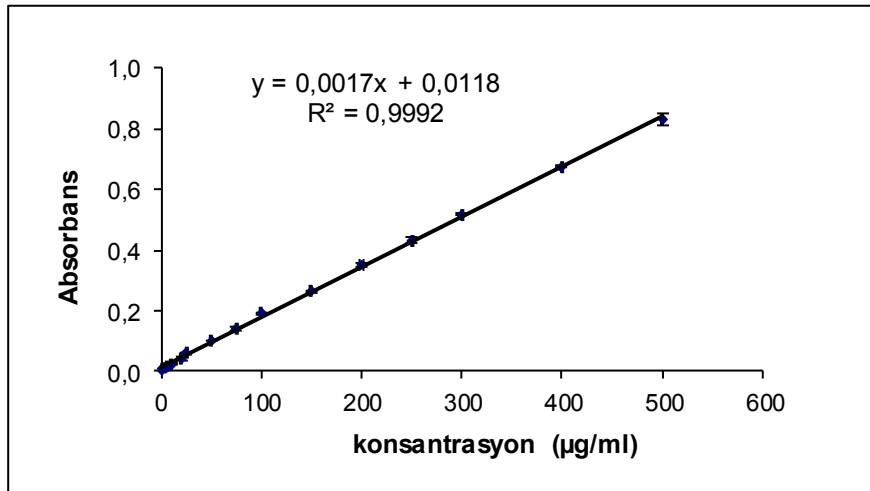
BSA'nın fosfat tamponu içindeki çözeltisinin dalga boyu taraması sonucunda maksimum dalga boyu verdiği absorbansın 759 nm olduğu görüldü (Şekil 4.76).



Şekil 4.76. BSA'nın fosfat tamponu içerisindeki çözeltisine Lowry metodunun uygulanmasının ardından dalga boyu taraması (759 nm)

Doğrusallık

Çalışmalar, Bölüm 3.2.2'de belirtildiği gibi yapıldı. Ölçülen absorbans değerlerine karşılık konsantrasyonlar grafiğe geçirildi. Standart doğru denklemi bulundu ve doğrusallığı kanıtlandı. Elde edilen absorbans-konsantrasyon grafiği Şekil 4.77'de gösterilmiştir.



Şekil 4.77. BSA'nın fosfat tamponu içindeki çözeltisine Lowry metodu uygulanması sonrası UV yöntemiyle elde edilen kalibrasyon grafiği (n=6)

Doğruluk ve geri elde

Çalışmalar Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı gibi yapıldı. Sonuçlar Çizelge 4.35'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.35. BSA'nın geri elde ile hesaplanan miktarları (n=6)

Çözeltideki BSA yüzdesi	Çözeltideki BSA (µg/mL)	Hesapla bulunan BSA miktarı (µg/mL) ± GS	BS Ortalama
% 80	80	78,7±0,5	0,8
% 100	100	98,7±0,6	0,8
% 120	120	119,4±0,8	0,9

Kesinlik

Çalışmalar Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı gibi yapıldı.

a) Deneyiçi kesinlik

BSA'nın deney içi kesinlik sonuçları Çizelge 4.36 ve 4.37'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.36. BSA'nın tekrar edilebilirlik sonuçları

Örnek No	BSA Çözeltilisinin Derişimi (µg/mL)	Hesapla Bulunan BSA Çözeltisi Derişimi (µg/mL)
1	200	200,1
2	200	198,9
3	200	200,1
4	200	198,9
5	200	197,8
6	200	198,9
7	200	197,8
8	200	196,6
9	200	196,0
10	200	196,6
Ort	200	198,2
SS		1,52
BS		0,766
±GS		0,802

Çizelge 4.37. BSA'nın tekrar edilebilirlik sonuçları

Örnek No	BSA çözeltisinin derişimi (µg/mL)	Hesapla Bulunan BSA çözeltisi derişimi (µg/mL)
1	75	74,2
2	75	74,2
3	75	74,8
4	75	74,2
5	75	74,2
6	75	75,4
7	75	74,8
8	75	74,2
9	75	73,6
10	75	75,4
Ort	75	74,5
SS		0,605
BS		0,812
±GS		0,314

b) Deneylelerarası kesinlik

BSA'nın deneylelerarası kesinlik sonuçları Çizelge 4.38'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.38. BSA'nın deneylelerarası (25°C) kesinlik sonuçları

Derişim($\mu\text{g/mL}$)	1.gün	2.gün	3.gün	ORT	SS	SEM	BS
400	398,4	397,2	398,9	398,2	0,902	0,524	0,226
250	250,1	248,9	248,9	249,3	0,705	0,409	0,282
50	50,7	48,9	48,9	49,5	1,02	0,593	2,06
10	10,7	9,5	9,5	9,9	0,754	0,438	7,61
4	4,24	3,65	3,65	3,84	0,341	0,198	8,88

Özgünlük ve seçicilik

Çalışmalar Bölüm 3.2.2'de belirtildiği gibi DOPE, DOPS ve PLGA'nın insüline ait dalga boyunda pik vermediği gözlenmiş olup yöntemin protein tayininde spesifik olduğuna ve BSA tayinine uygun olduğuna karar verildi (Bakınız Şekil 4.3).

Duyarlılık ve saptama sınırı

Hesaplar, Bölüm 3.2.2'de verilen formüllere göre yapıldı. Analitik yöntemin duyarlılığı 5,82 $\mu\text{g/mL}$ saptama sınırı 17,6 $\mu\text{g/mL}$ olarak bulundu.

4.2.2. EKH ile hazırlanan formülasyonların karakterizasyon çalışmalarına ait bulgular

EKH formülasyonlarının karakterizasyonuna ait bulgular

EKH formülasyonlarının partikül büyüklüğü ve dağılımı, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel değerlerine ait bulgular

Bütün formülasyonların partikül büyüklüğü ve dağılımları, zeta potansiyelleri Malvern Zeta Sizer Nano ZS ile ölçüldü. Alınan sonuçların ortalaması hesaplanarak Polidispersite indeksi ile birlikte Çizelge 4.39'da verilmiştir.

EKH miktar tayinine ait bulgular

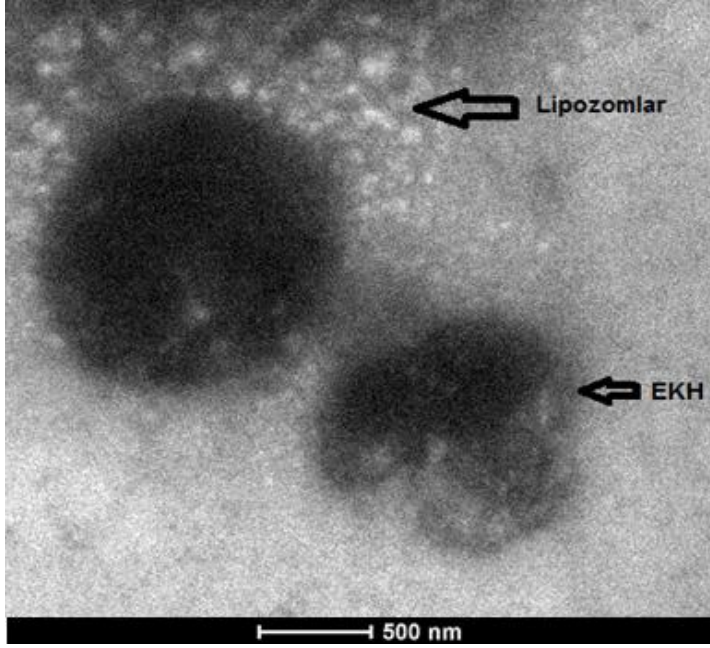
EKH miktarı ortalamaları hesaplanarak Çizelge 4.39'da verilmiştir.

Formülasyonların şekline ait bulgular

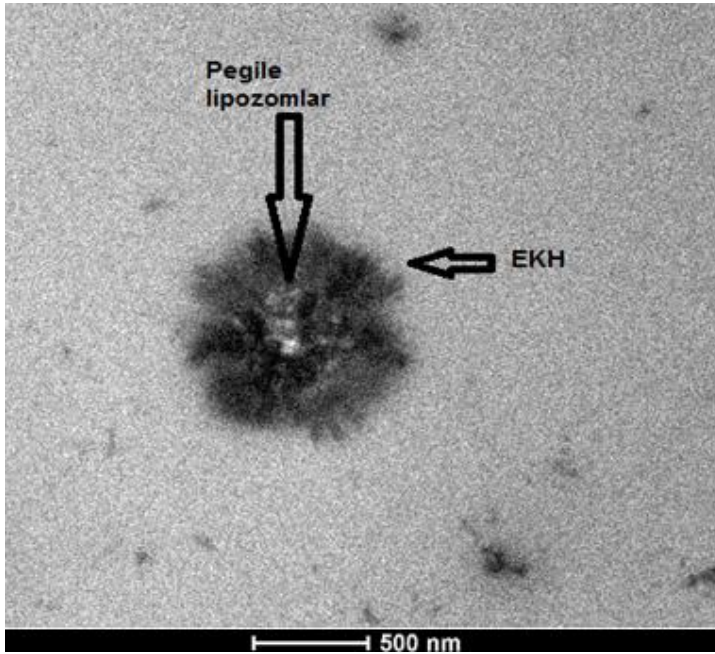
Formülasyonların şekilleri TEM mikroskobu ile incelendi. Elde edilen görüntüler Resim 4.21- 4.25'te verilmiştir.

Çizelge 4.39. EKH ile hazırlanan formülasyonların karakterizasyon parametreleri (n=3)

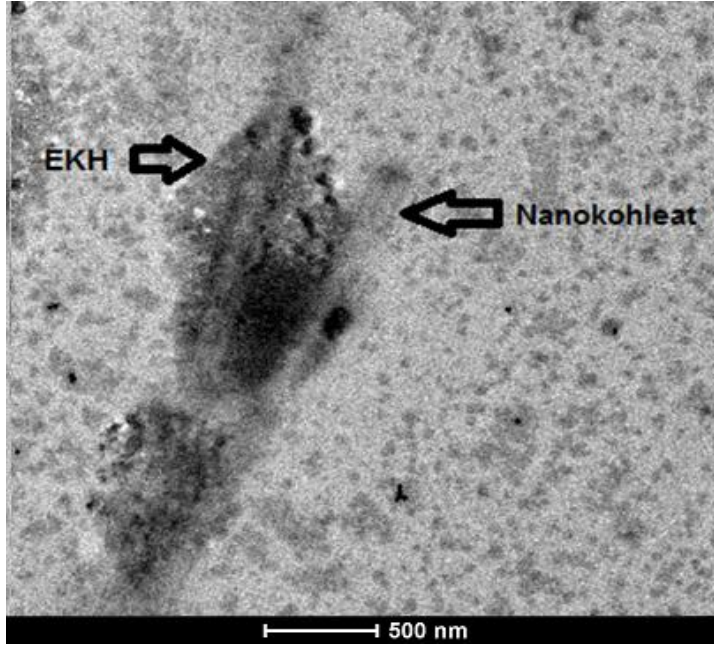
Formülasyon Tipi	Partikül Büyüklüğü (μm) $\pm$ SS	PDI $\pm$ SS	Zeta Potansiyel (mV) $\pm$ SS	Enkapsülasyon Verimi (%)
EKH lipozomlar	0,319 $\pm$ 0,002	0,329 $\pm$ 0,005	24,3 $\pm$ 0,3	53,1 $\pm$ 2,0
EKH pegile lipozomlar	0,236 $\pm$ 0,008	0,356 $\pm$ 0,011	20,7 $\pm$ 0,1	52,7 $\pm$ 1,8
EKH nanokohleatlar	0,423 $\pm$ 0,028	0,434 $\pm$ 0,001	16,5 $\pm$ 0,2	52,0 $\pm$ 1,5
EKH pegile nanokohleatlar	0,533 $\pm$ 0,009	0,486 $\pm$ 0,007	14,8 $\pm$ 0,2	50,9 $\pm$ 2,1
EKH nanopartiküller	0,672 $\pm$ 0,007	0,517 $\pm$ 0,006	4,20 $\pm$ 0,05	50,4 $\pm$ 1,4



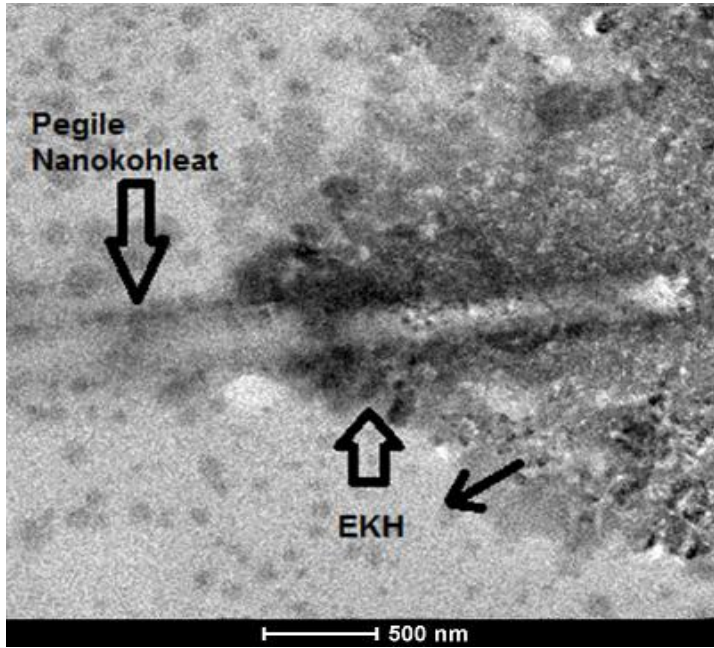
Resim 4.21. EKH lipozomların TEM görüntüleri x9300



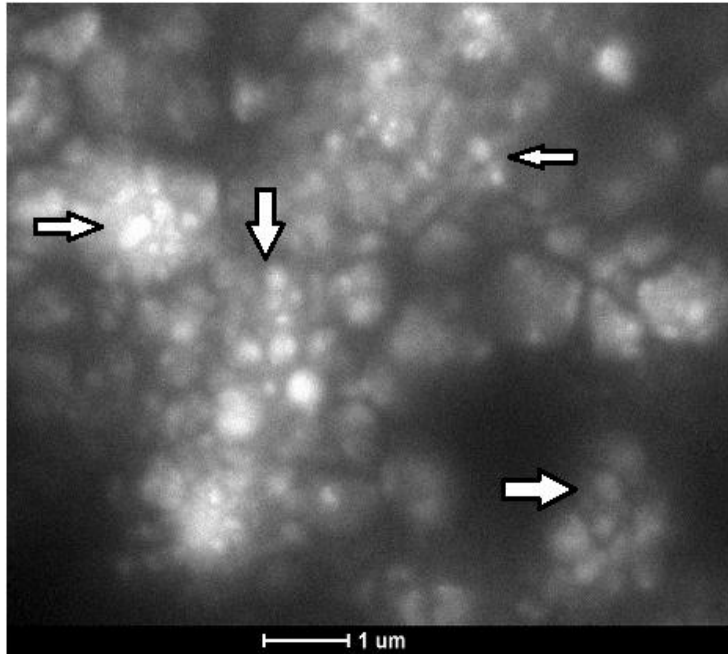
Resim 4.22. EKH pegile lipozomların TEM görüntüleri x6800



Resim 4.23. EKH nanokohleatların TEM görüntüleri x4800



Resim 4.24. EKH pegile nanokohleatların TEM görüntüleri x11000



Resim 4.25. EKH nanopartiküllerin TEM görüntüleri (oklar: nanopartiküller) x4800

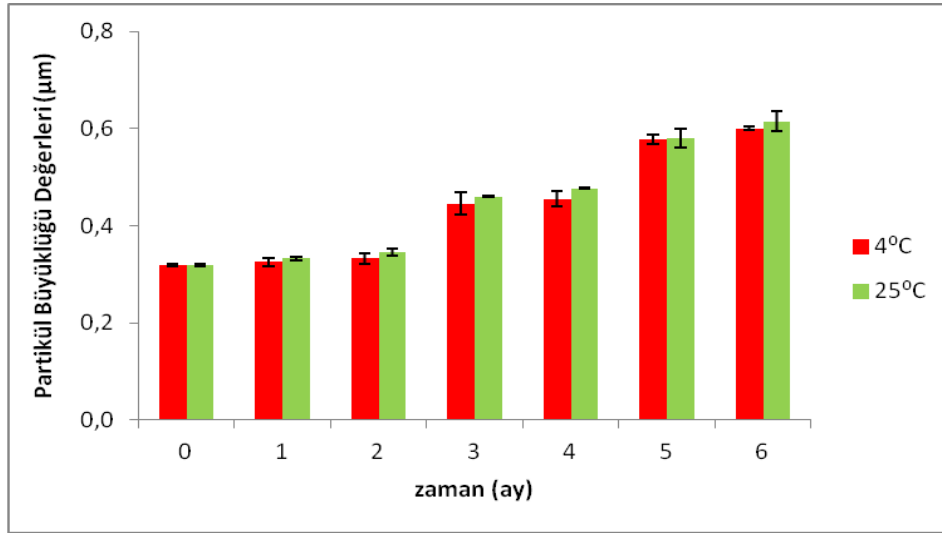
4.2.3. EKH ile hazırlanan formülasyonların stabilitesine ait bulgular

EKH formülasyonlarının partikül büyüklüğü ve dağılımı, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel değerlerine ait bulgular

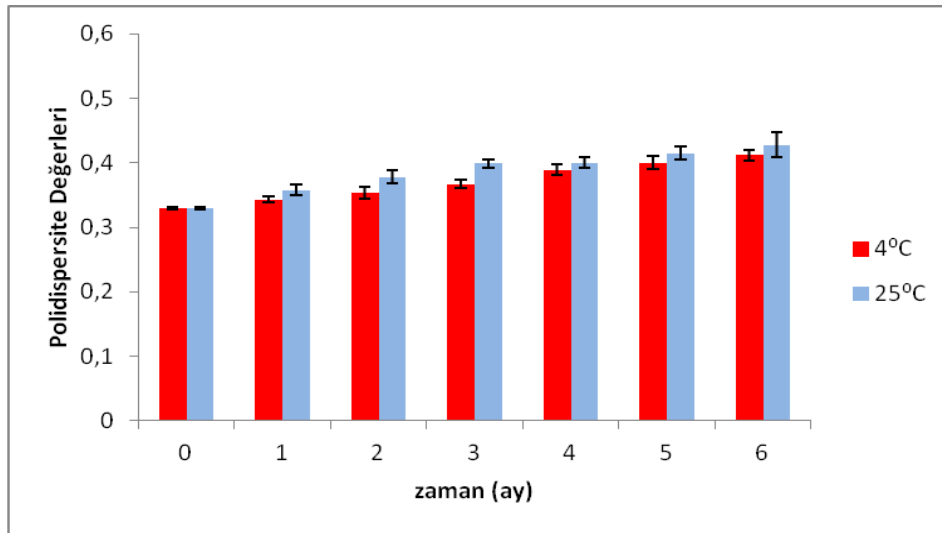
EKH ile hazırlanan tüm formülasyonların ölçülen partikül büyüklüğü, polidispersite ve zeta potansiyel değerlerinin zamanla değişip değişmediğini incelemek için 4°C ve 25°C’de saklanan formülasyonların 0.,1.,2.,3.,4.,5. ve 6. aylarda yapılan ölçümlerin sonuçları Çizelge 4.40-4.44’te ve Şekil 4.78-4.92’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.40. EKH lipozomları stabilite verileri

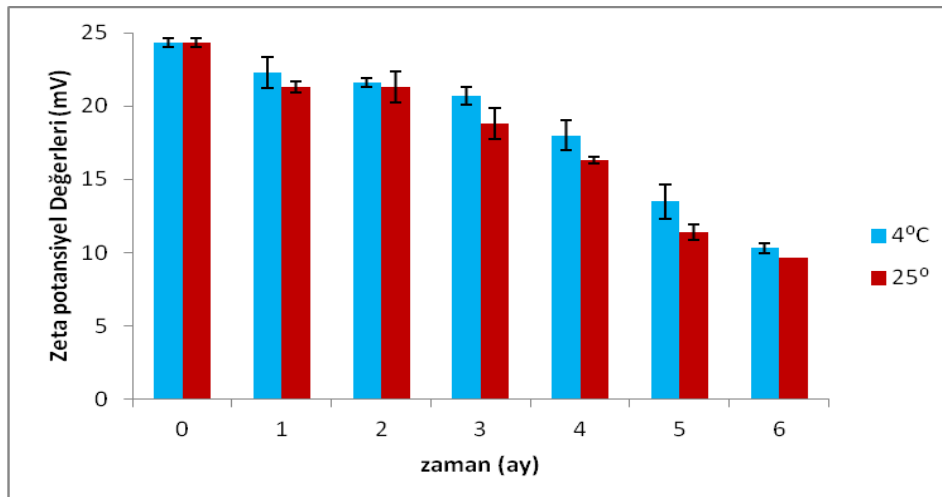
Zaman (ay)	Ortalama Çap (μm)	4°C	Zeta Potansiyel (mV)	Ortalama Çap (μm)	25°C	Zeta Potansiyel (mV)
		PDI			PDI	
0	0,319±0,002	0,329±0,005	24,3±0,3	0,319±0,002	0,329±0,005	24,3±0,3
1	0,325±0,009	0,343±0,002	22,3±1,0	0,332±0,004	0,358±0,009	21,3±0,4
2	0,332±0,012	0,353±0,009	21,6±0,3	0,345±0,007	0,378±0,010	21,3±1,1
3	0,445±0,023	0,367±0,006	20,7±0,6	0,460±0,005	0,399±0,006	18,8±1,1
4	0,455±0,015	0,389±0,008	18,0±1,0	0,477±0,002	0,400±0,008	16,3±0,2
5	0,577±0,010	0,400±0,010	13,5±1,2	0,580±0,010	0,415±0,010	11,4±0,5
6	0,600±0,004	0,412±0,008	10,3±0,3	0,615±0,013	0,428±0,020	9,7±0,01



Şekil 4.78. EKH lipozomları partikül büyüklüğü sonuçları



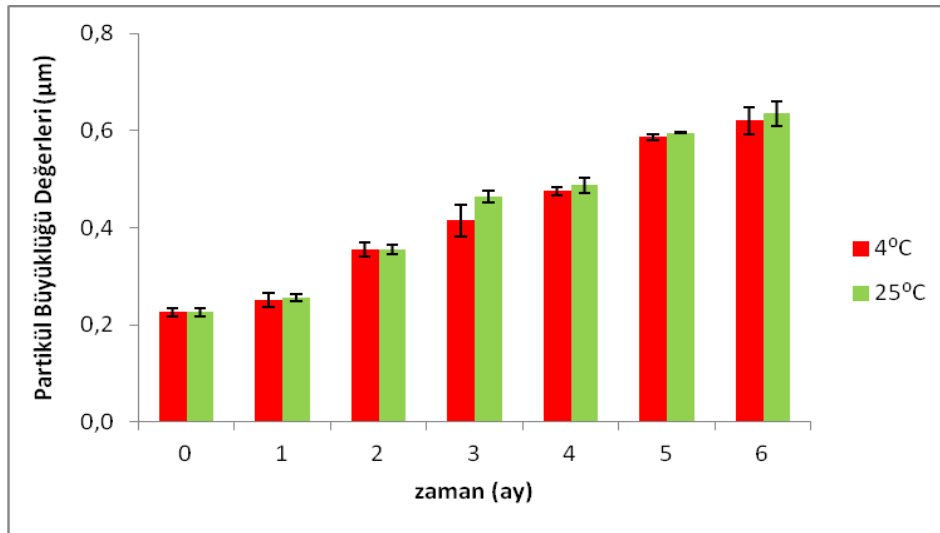
Şekil 4.79. EKH lipozomları polidispersite değerleri sonuçları



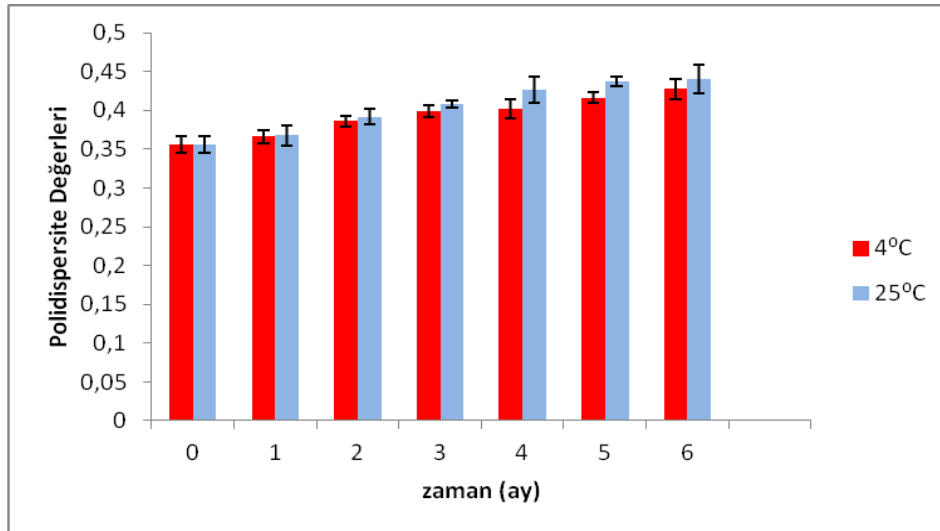
Şekil 4.80. EKH lipozomları zeta potansiyel değerleri sonuçları

Çizelge 4.41. EKH pegile lipozomları stabilite verileri

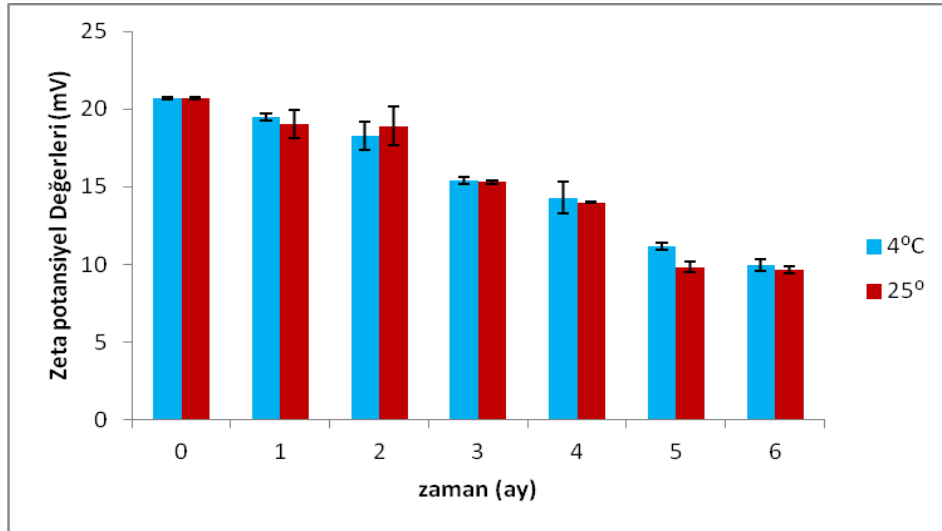
Zaman (ay)	Ortalama Çap (µm)	4°C	Zeta Potansiyel (mV)	Ortalama Çap (µm)	25°C	Zeta Potansiyel (mV)
		PDI			PDI	
0	0,236±0,008	0,356±0,011	20,7±0,1	0,236±0,008	0,356±0,011	20,7±0,1
1	0,251±0,015	0,366±0,008	19,5±0,2	0,256±0,008	0,368±0,013	19,0±0,9
2	0,355±0,015	0,386±0,007	18,3±0,9	0,355±0,010	0,392±0,010	18,9±1,3
3	0,415±0,033	0,399±0,007	15,4±0,2	0,464±0,012	0,408±0,005	15,3±0,1
4	0,475±0,080	0,402±0,013	14,3±1,0	0,487±0,015	0,427±0,017	14,0±0,3
5	0,587±0,006	0,416±0,007	11,2±0,23	0,595±0,001	0,437±0,006	9,8±0,35
6	0,620±0,027	0,428±0,013	9,9±0,38	0,635±0,025	0,440±0,018	9,6±0,23



Şekil 4.81. EKH pegile lipozomları partikül büyüklüğü sonuçları



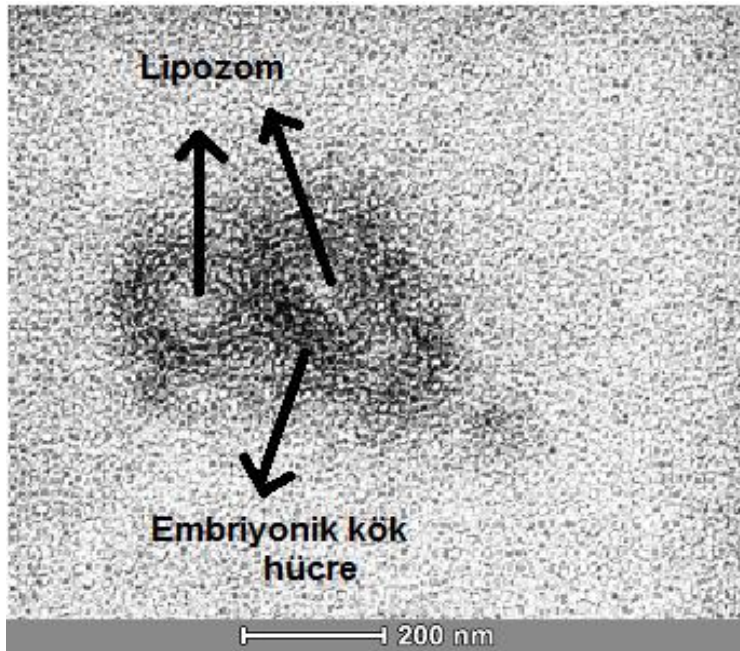
Şekil 4.82. EKH pegile lipozomları polidispersite değerleri sonuçları



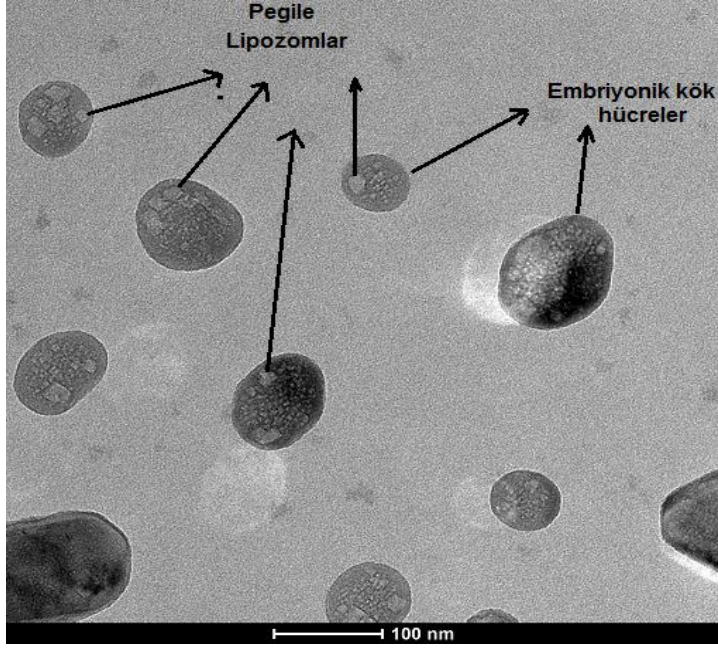
Şekil 4.83. EKH pegile lipozomları zeta potansiyel değerleri sonuçları

Lipozom ve pegile formülasyonlarının şekline ait bulgular

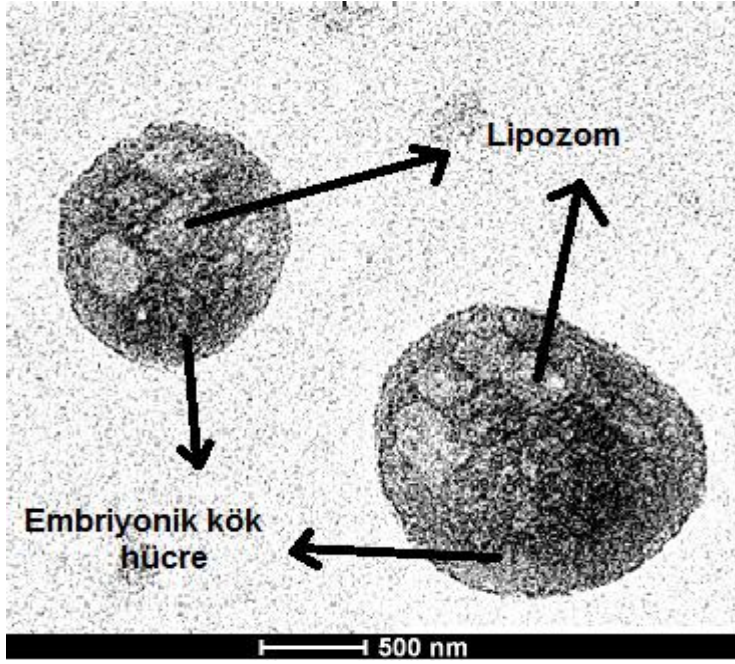
EKH lipozomlarının görüntüleri 6. ayın sonunda TEM mikroskobu ile incelendi ve elde edilen görüntüler Resim 4.26-4.29'da verilmiştir.



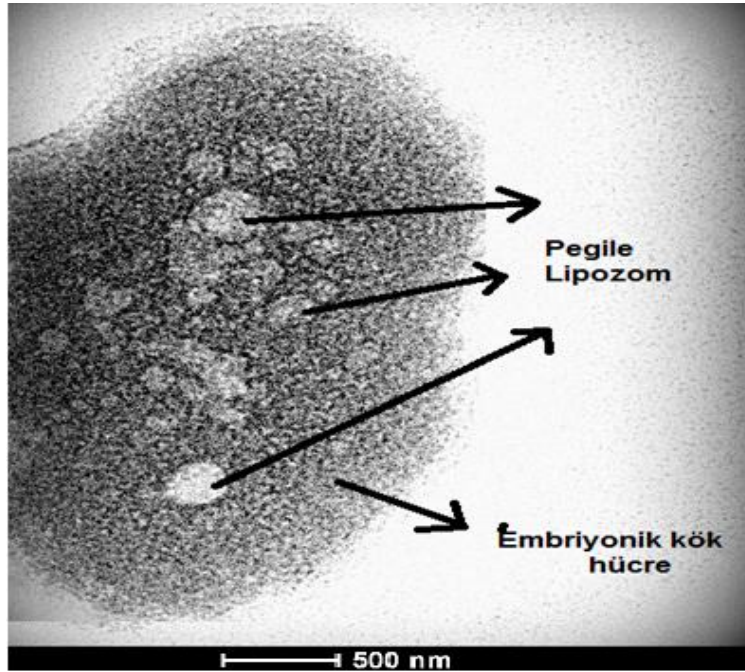
Resim 4.26. Altı aylık stabilite çalışması süresinin sonunda +4°C'de saklanan, EKH lipozom formülasyonlarının TEM görüntüleri x68000



Resim 4.27. Altı aylık stabilite çalışması süresinin sonunda +4°C'de saklanan, EKH pegile lipozom formülasyonlarının TEM görüntüleri x98000



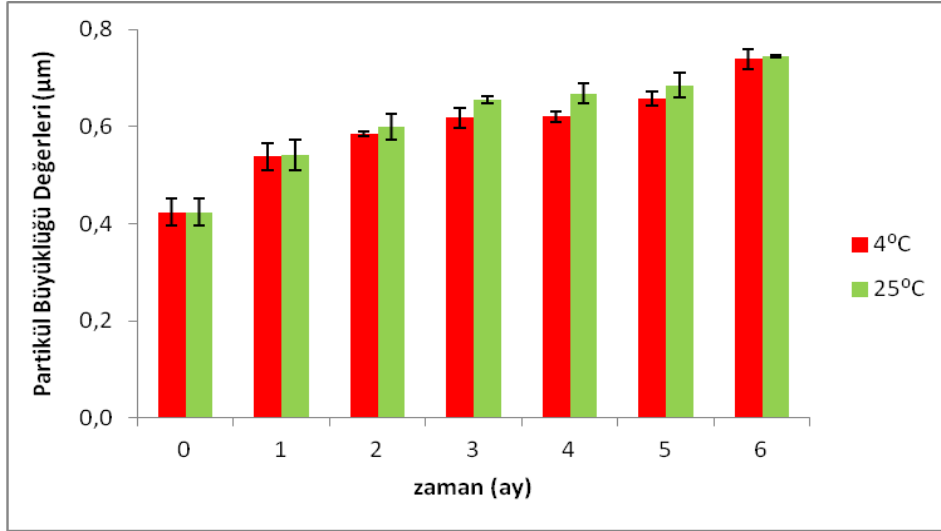
Resim 4.28. Altı aylık stabilite çalışması süresinin sonunda +25°C'de saklanan, EKH lipozom formülasyonlarının TEM görüntüleri x180000



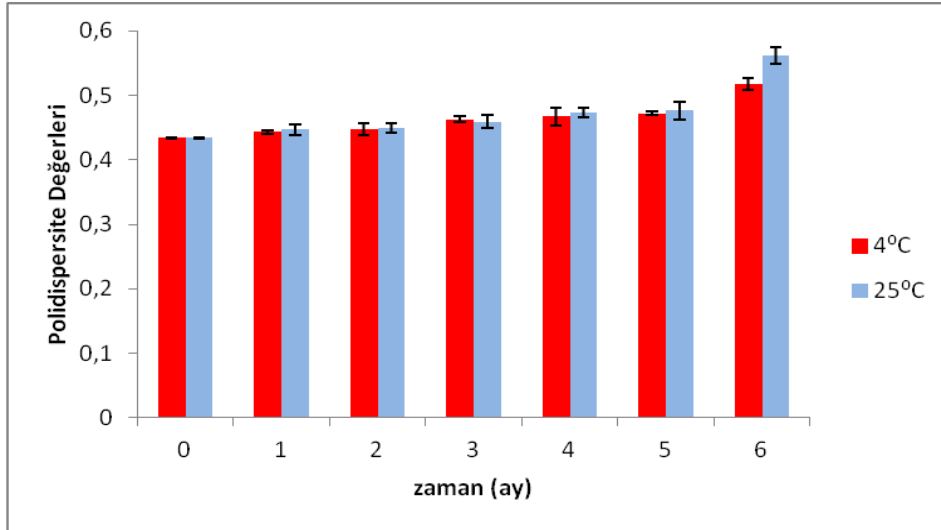
Resim 4.29. Altı aylık stabilite çalışması süresinin sonunda +25°C’de saklanan, EKH pegile lipozom formülasyonlarının TEM görüntüleri x180000

Çizelge 4.42. EKH nanokohleatları stabilite verileri

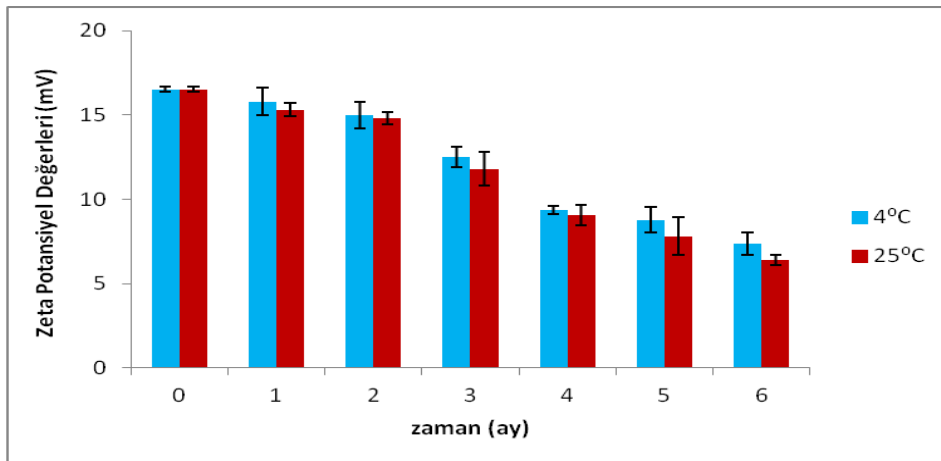
Zaman (ay)	Ortalama Çap (µm)	4°C	Zeta Potansiyel (mV)	Ortalama Çap (µm)	25°C	Zeta Potansiyel (mV)
		PDI			PDI	
0	0,423±0,028	0,434±0,001	16,5±0,2	0,423±0,028	0,434±0,001	16,5±0,2
1	0,538±0,028	0,443±0,003	15,8±0,8	0,542±0,031	0,447±0,008	15,3±0,4
2	0,585±0,005	0,447±0,009	15,0±0,8	0,600±0,027	0,449±0,007	14,8±0,4
3	0,618±0,020	0,463±0,005	12,5±0,6	0,655±0,007	0,459±0,001	11,8±1,0
4	0,620±0,010	0,467±0,014	9,36±0,2	0,668±0,021	0,473±0,007	9,1±0,61
5	0,658±0,014	0,472±0,003	8,8±0,78	0,685±0,025	0,476±0,013	7,8±1,13
6	0,739±0,020	0,517±0,009	7,3±0,65	0,745±0,003	0,561±0,013	6,4±0,31



Şekil 4.84. EKH nanokohleatları partikül büyüklüğü sonuçları



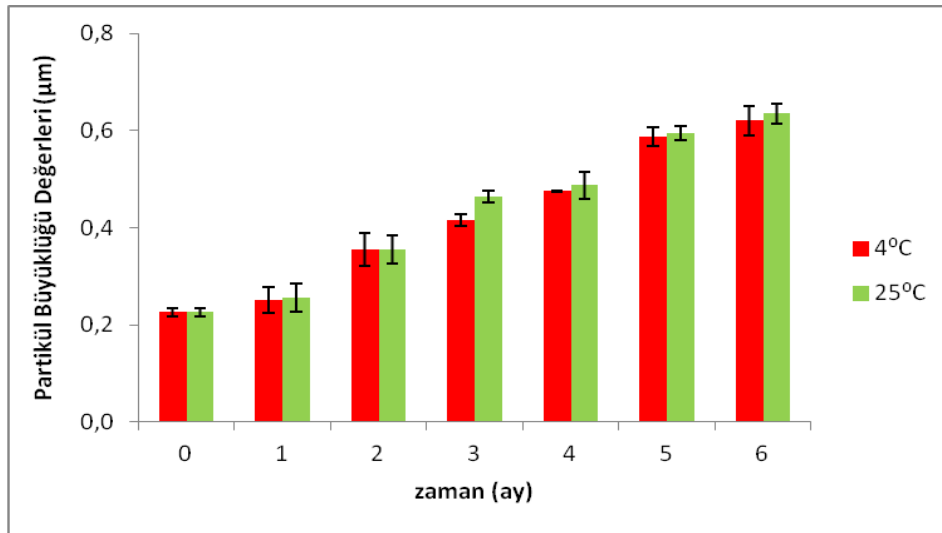
Şekil 4.85. EKH nanokohleatları polidispersite değerleri sonuçları



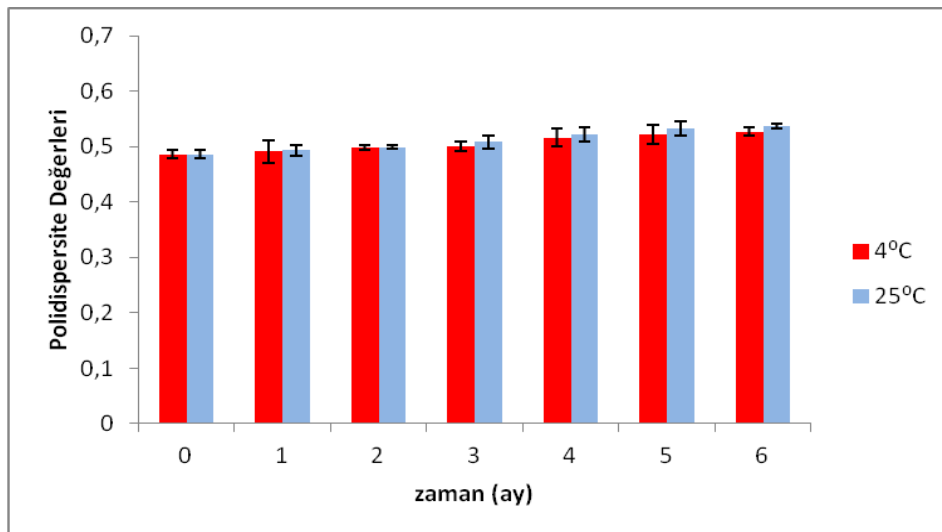
Şekil 4.86. EKH nanokohleatları zeta potansiyel değerleri sonuçları

Çizelge 4.43. EKH pegile nanokohleatları stabilite verileri

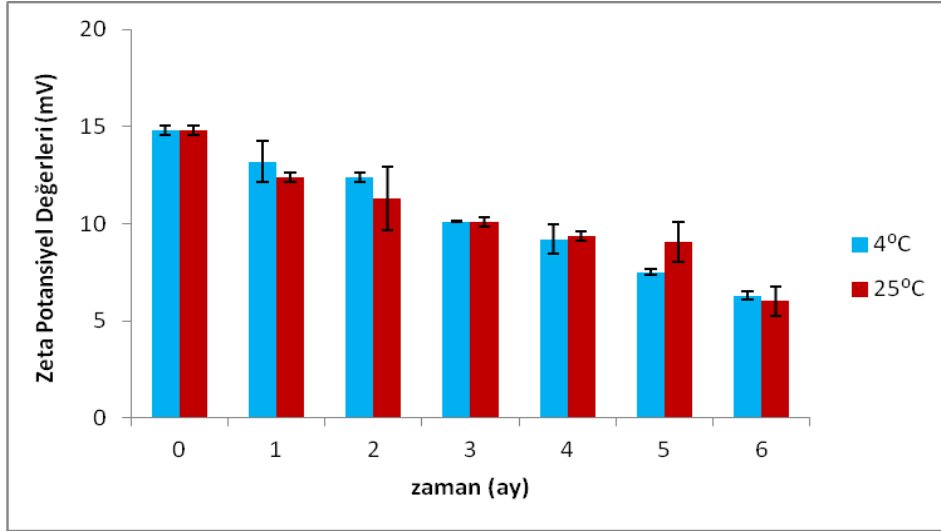
Zaman (ay)	Ortalama Çap (µm)	4°C	Zeta Potansiyel (mV)	Ortalama Çap (µm)	25°C	Zeta Potansiyel (mV)
		PDI			PDI	
0	0,533±0,009	0,486±0,007	14,8±0,2	0,533±0,009	0,486±0,007	14,8±0,2
1	0,556±0,026	0,491±0,020	13,2±1,1	0,563±0,029	0,493±0,009	12,4±0,2
2	0,595±0,033	0,498±0,004	12,4±0,3	0,610±0,028	0,499±0,003	11,3±1,7
3	0,620±0,012	0,500±0,008	10,1±0,0	0,665±0,012	0,508±0,012	10,1±0,2
4	0,624±0,001	0,516±0,016	9,2±0,78	0,670±0,027	0,522±0,012	9,4±0,26
5	0,660±0,020	0,522±0,017	7,5±0,16	0,700±0,015	0,533±0,013	9,0±1,03
6	0,745±0,030	0,527±0,008	6,3±0,23	0,735±0,020	0,537±0,004	6,0±0,78



Şekil 4.87. EKH pegile nanokohleatları partikül büyüklüğü sonuçları



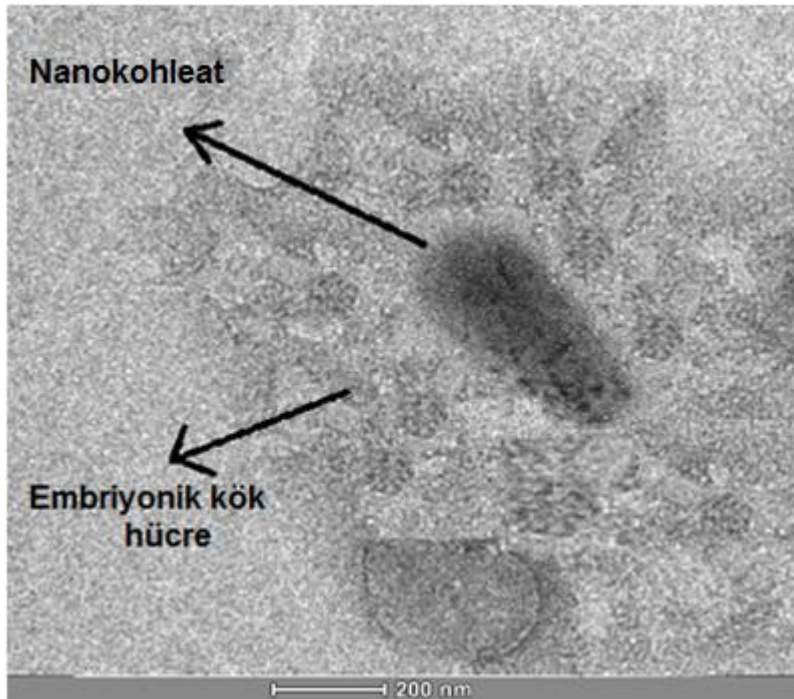
Şekil 4.88. EKH pegile nanokohleatları polidispersite değerleri sonuçları



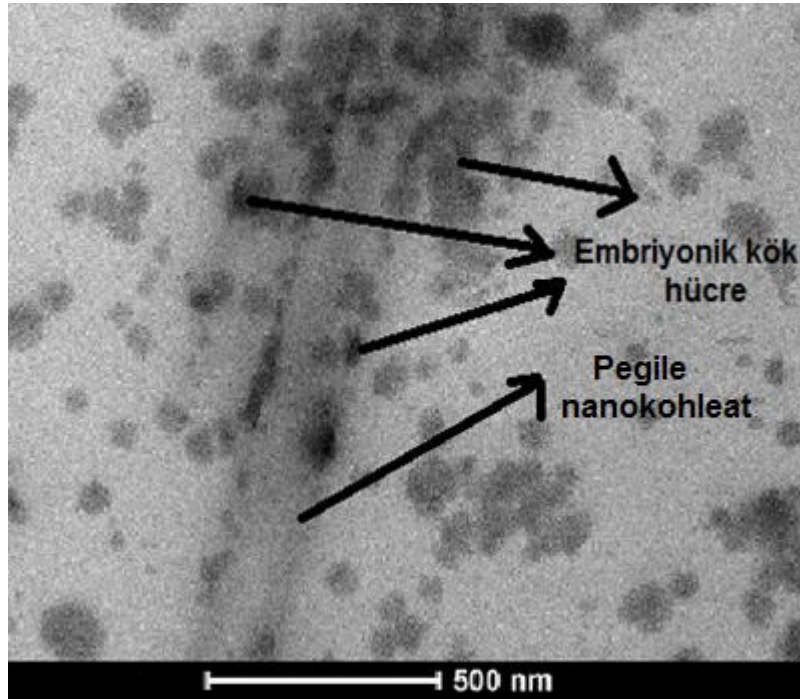
Şekil 4.89. EKH pegile nanokohleatları zeta potansiyel değerleri sonuçları

Nanokohleat ve pegile nanokohleat formülasyonlarının şekilne ait bulgular

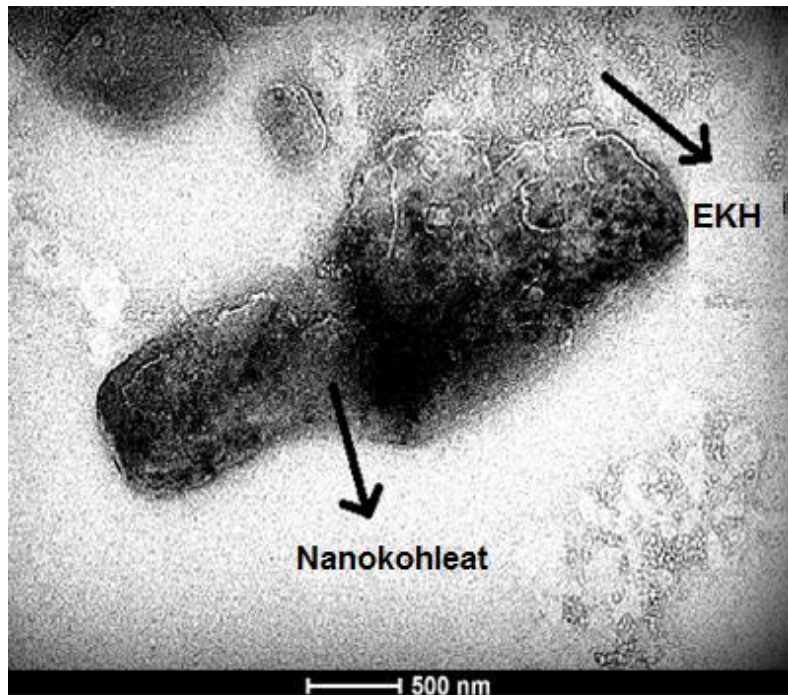
EKH nanokohleatlarının görüntüleri 6. ayın sonunda TEM mikroskobu ile incelendi ve elde edilen görüntüler Resim 4.30-4.33'te verilmiştir.



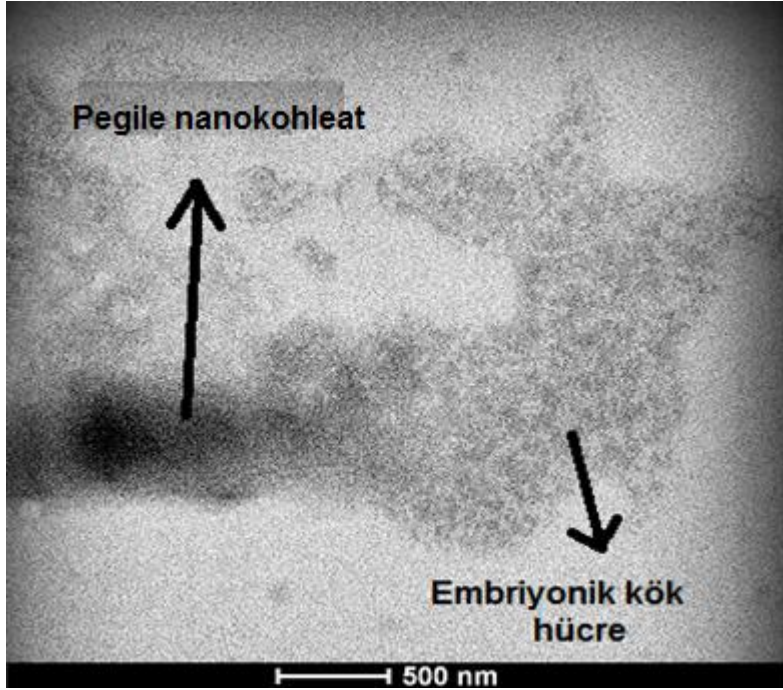
Resim 4.30. Altı aylık stabilite çalışması süresinin sonunda +4°C'de saklanan, EKH nanokohleat formülasyonlarının TEM görüntüleri x4800



Resim 4.31. Altı aylık stabilite çalışması süresinin sonunda +4°C’de saklanan, EKH pegile nanokohleat formülasyonlarının TEM görüntüleri x11000



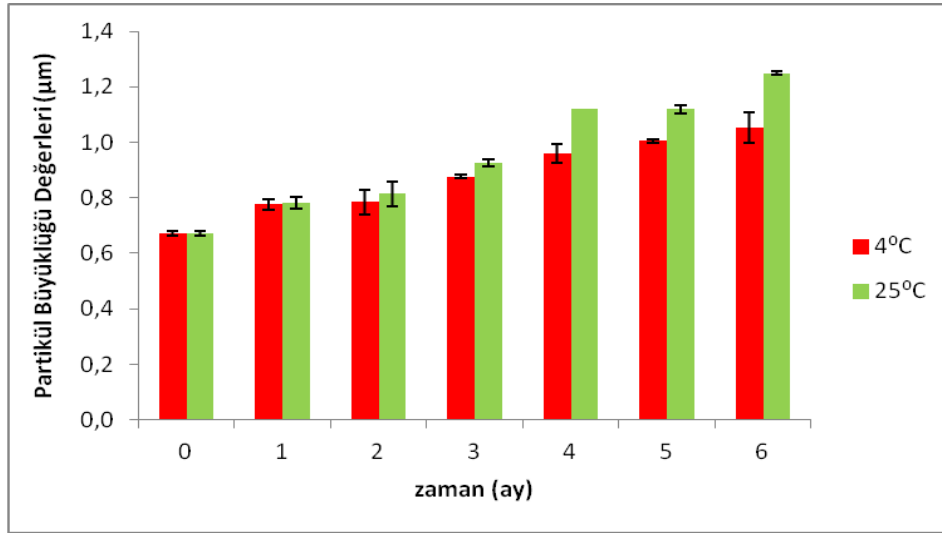
Resim 4.32. Altı aylık stabilite çalışması süresinin sonunda +25°C’de saklanan, EKH nanokohleat formülasyonlarının TEM görüntüleri x30000



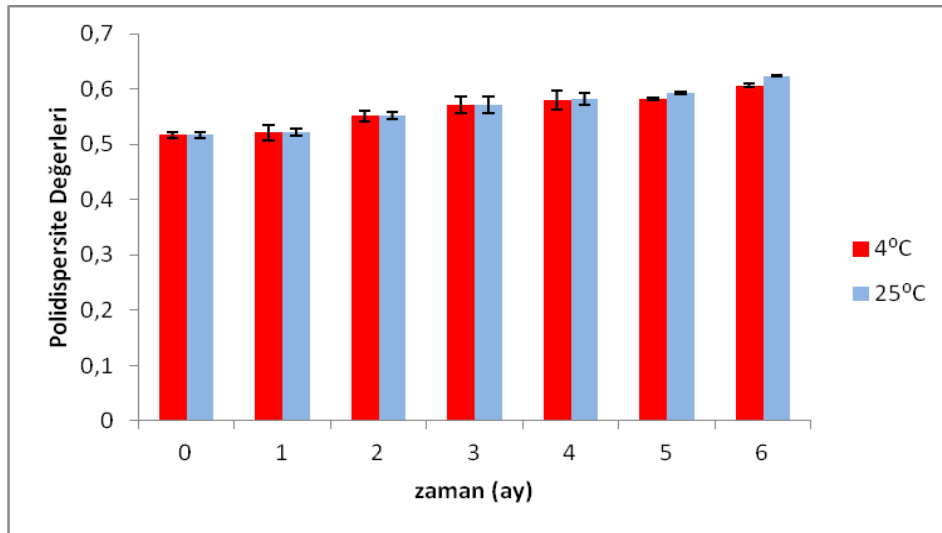
Resim 4.33. Altı aylık stabilite çalışması süresinin sonunda +25°C’de saklanan, EKH pegile nanokohleat formülasyonlarının TEM görüntüleri x11000

Çizelge 4.44.EKH nanoparikülleri stabilite verileri

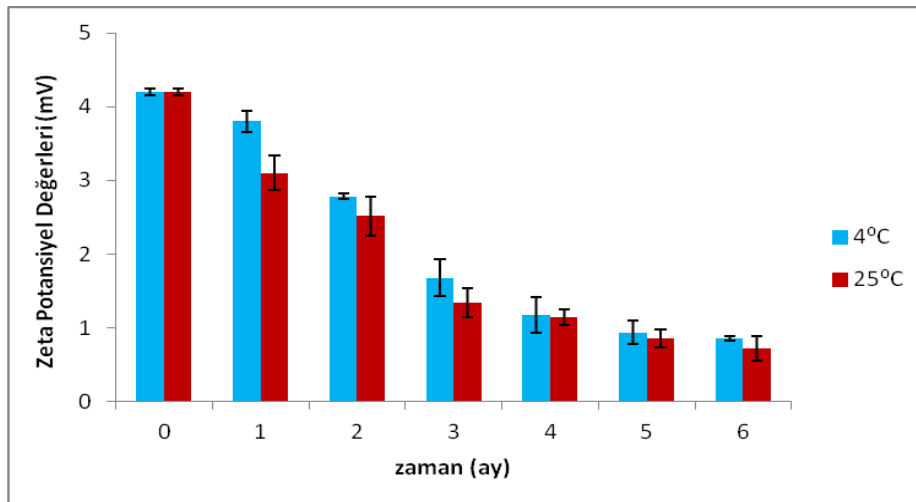
Zaman (ay)	Ortalama Çap (µm)	4°C	Zeta Potansiyel (mV)	Ortalama Çap (µm)	25°C	Zeta Potansiyel (mV)
		PDI			PDI	
0	0,672±0,007	0,517±0,006	4,20±0,05	0,672±0,007	0,517±0,006	4,20±0,05
1	0,776±0,020	0,521±0,014	3,80±0,15	0,782±0,022	0,522±0,006	3,10±0,23
2	0,755±0,045	0,551±0,009	2,78±0,04	0,814±0,045	0,552±0,007	2,52±0,27
3	0,876±0,006	0,571±0,015	1,68±0,25	0,925±0,012	0,572±0,015	1,34±0,20
4	0,960±0,033	0,580±0,017	1,17±0,24	1,122±0,001	0,582±0,010	1,15±0,11
5	1,005±0,005	0,583±0,002	0,94±0,16	1,120±0,014	0,592±0,002	0,86±0,13
6	1,055±0,005	0,606±0,003	0,85±0,03	1,250±0,007	0,624±0,001	0,72±0,16



Şekil 4.90. EKH nanopartikülleri partikül büyüklüğü sonuçları



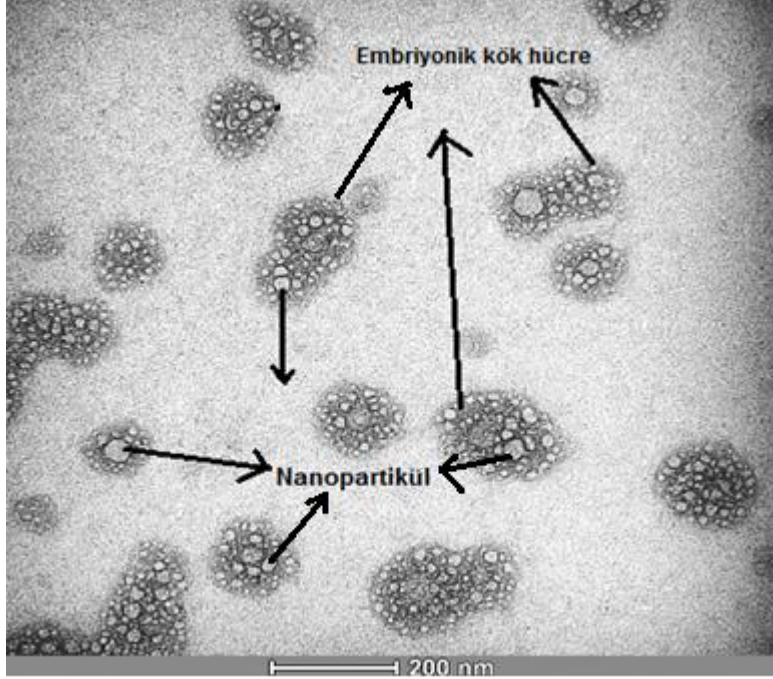
Şekil 4.91. EKH nanopartikülleri polidispersite değerleri sonuçları



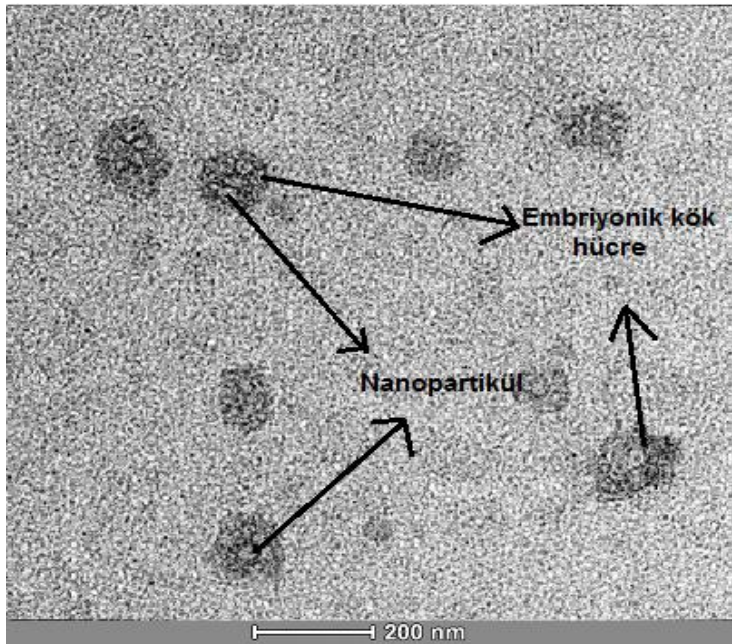
Şekil 4.92. EKH nanopartikülleri zeta potansiyel değerleri sonuçları

EKH nanopartiküllerinin şekline ait bulgular

EKH nanopartiküllerinin görüntüleri altıncı ayın sonunda TEM mikroskobu ile incelendi ve elde edilen görüntüler Resim 4.34-4.35'te verilmiştir.



Resim 4.34. Altı aylık stabilite çalışması süresinin sonunda +4°C'de saklanan, EKH nanopartikül formülasyonlarının TEM görüntüleri x49000

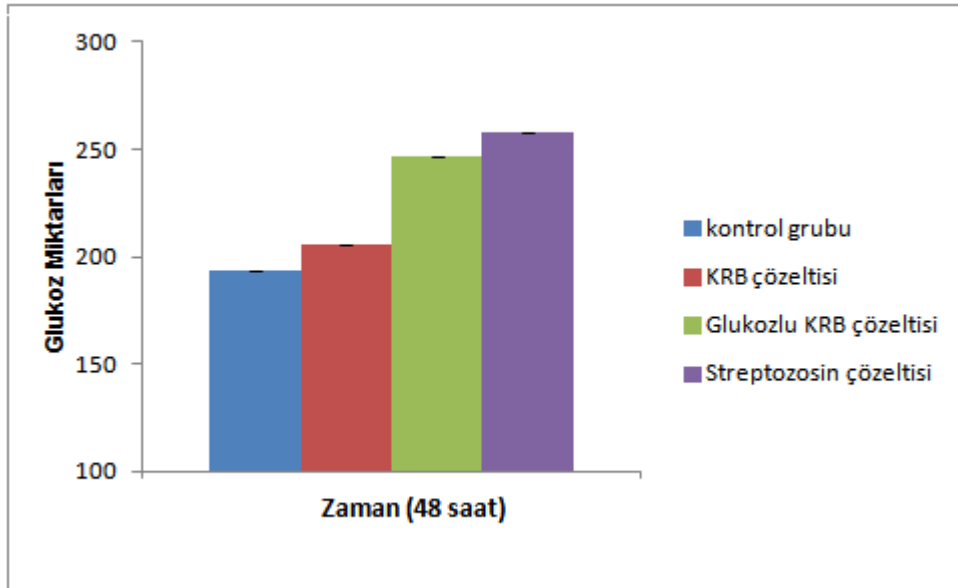


Resim 4.35. Altı aylık stabilite çalışması süresinin sonunda +25°C'de saklanan, EKH nanopartikül formülasyonlarının TEM görüntüleri x49000

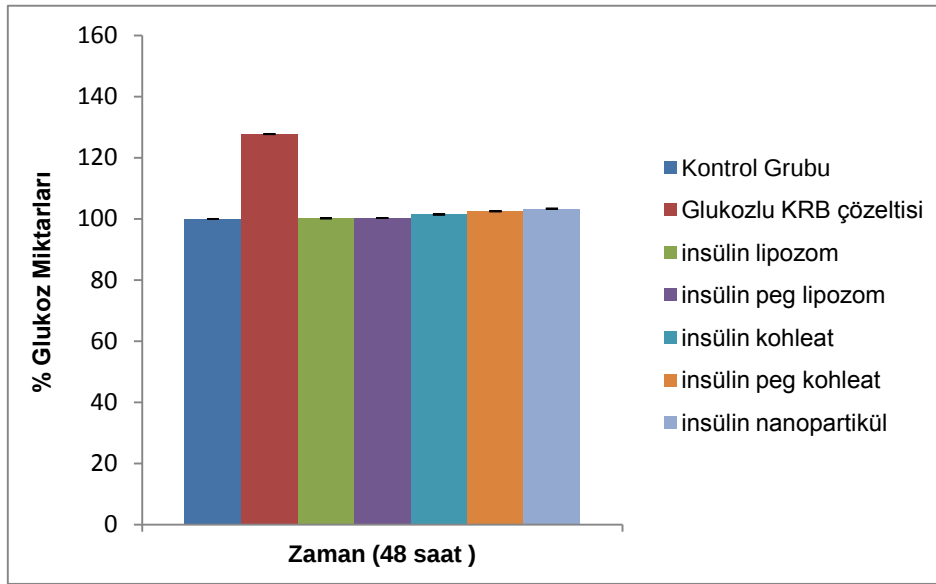
4.3. Glukoz ve İnsülin Tayini Sonuçları

4.3.1. Glukoz tayini

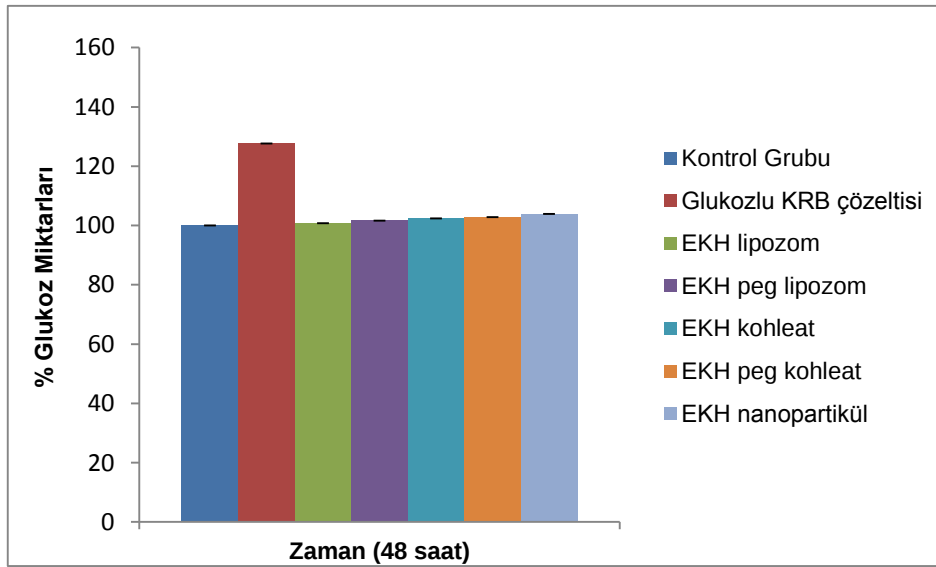
Glukoz tayini Bölüm 3.2.3'te belirtildiği şekilde kit ile yapılmıştır. Değişen glukoz miktarlarına göre oluşan renk değişimi Resim 4.36'da gösterilmiştir. Başlangıçtaki kontrol grubunun, KRB çözeltisi ile, glukoz içeren KRB çözeltisi ile ve streptozosin ile muamele sonrası elde edilen glukoz miktarı Şekil 4.93'te gösterilmiştir. Glukoz ile indüklenen ve streptozosin ile inhibe edilerek diyabetik hale getirilmiş hücreler ile insülin ve EKH yüklü formülasyonların 48 saat boyunca inkübasyonu sonucunda elde edilen sonuçlar aşağıdaki Şekil 4.94-4.97'de verilmiştir. Kontrol grubu olarak deneye başlamadan önceki pankreatik beta TC hücrelerindeki glukoz miktarı alınmış ve % 100 olarak kabul edilmiştir.



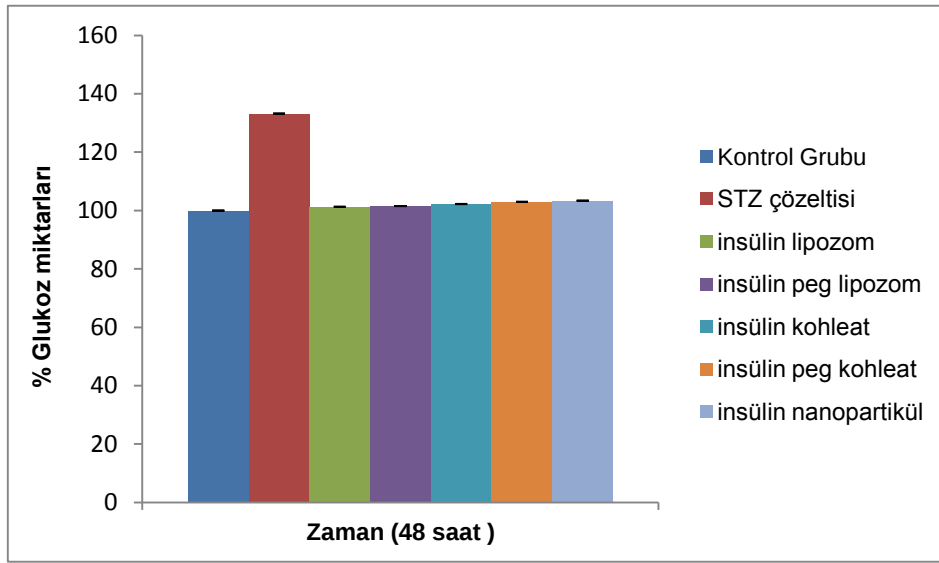
Şekil 4.93. Pankreatik beta TC hücrelerinin glukoz ve streptozosin ile muamelesi sonrası artan glukoz miktarları



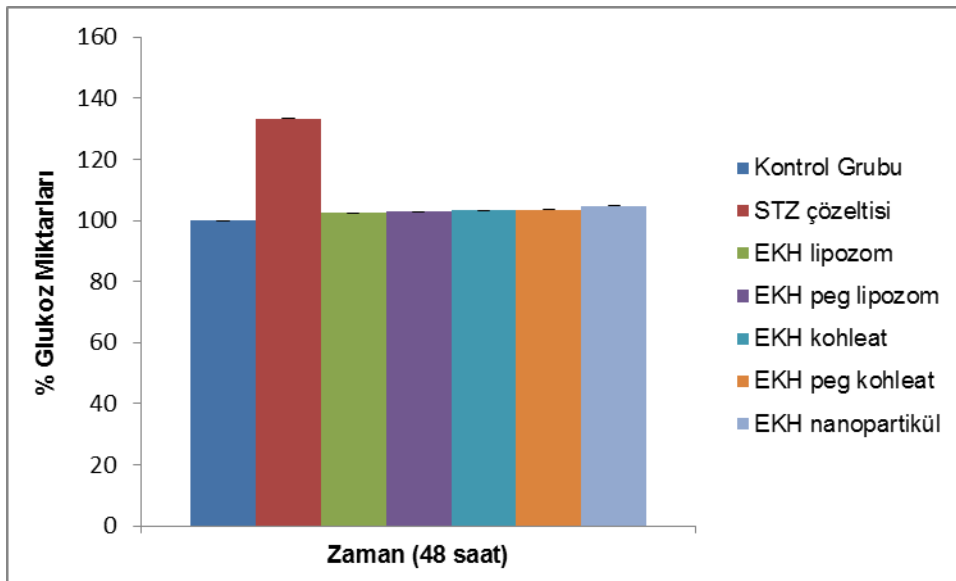
Şekil 4.94. Glukozlu KRB çözeltisi ile stimüle edilmiş ve insülin ile hazırlanan formülasyonlar ile 48 saat inkübasyona bırakılmış pankreatik beta TC hücrelerinden tayin edilen % glukoz miktarları



Şekil 4.95. Glukozlu KRB çözeltisi ile stimüle edilmiş ve EKH ile hazırlanan formülasyonlar ile 48 saat inkübasyona bırakılmış pankreatik beta TC hücrelerinden tayin edilen % glukoz miktarları



Şekil 4.96. Streptozosin ile inhibe edilmiş ve insülin ile hazırlanan formülasyonlar ile 48 saat inkübasyona bırakılmış pankreatik beta TC hücrelerinden tayin edilen % glukoz miktarları



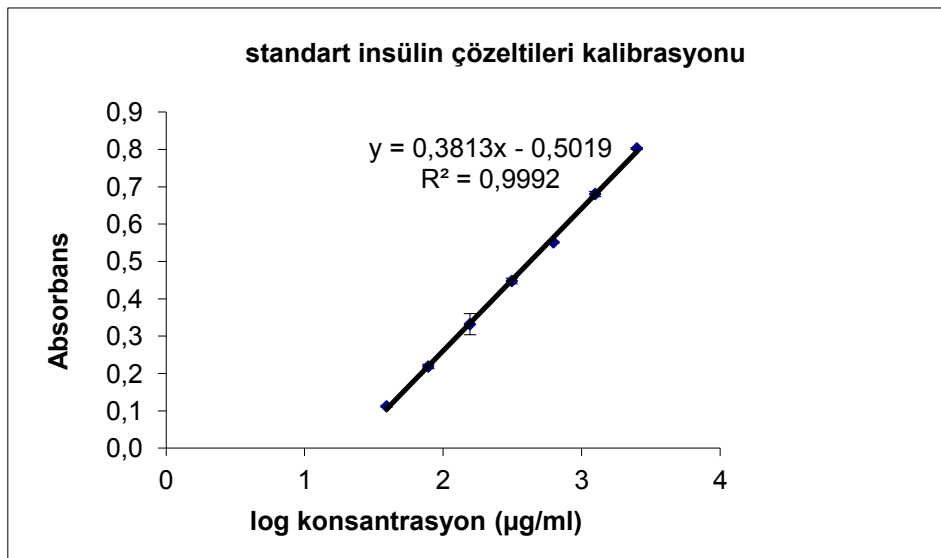
Şekil 4.97. Streptozosin ile inhibe edilmiş ve EKH ile hazırlanan formülasyonlar ile 48 saat inkübasyona bırakılmış pankreatik beta TC hücrelerinden tayin edilen % glukoz miktarları



Resim 4.36. Glukozun değişen konsantrasyonuna bağlı olarak oluşan renk değişimi

4.3.2. İnsülin tayini

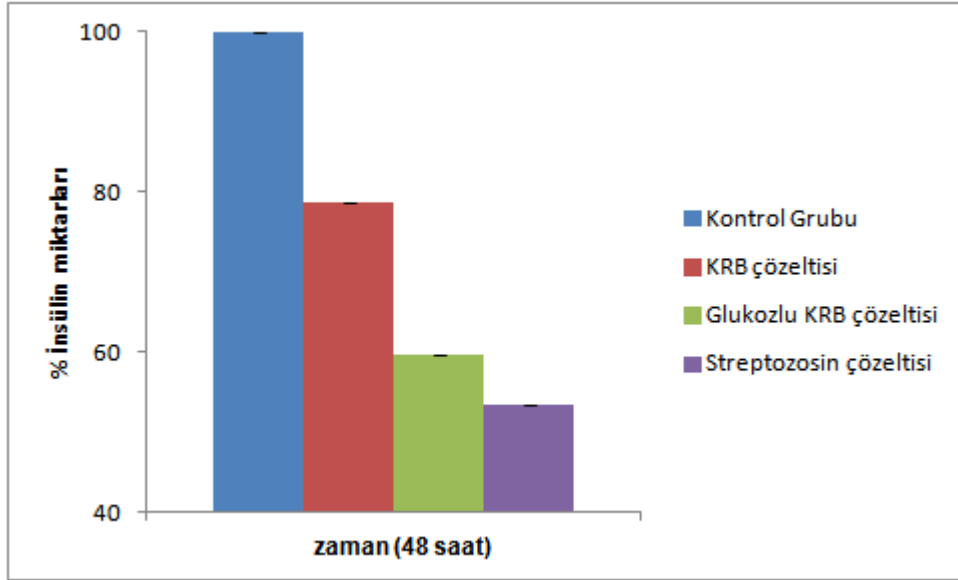
İnsülin tayini ise Bölüm 3.2.3'te anlatıldığı gibi İnsülin ELISA Kiti kullanılarak yapılmıştır. Kit ile tayinde standart insülin çözeltileriyle kit içindeki prosedürde belirtilen şekilde kalibrasyon yapılmış ve grafiği Şekil 4.98' de gösterilmiştir.



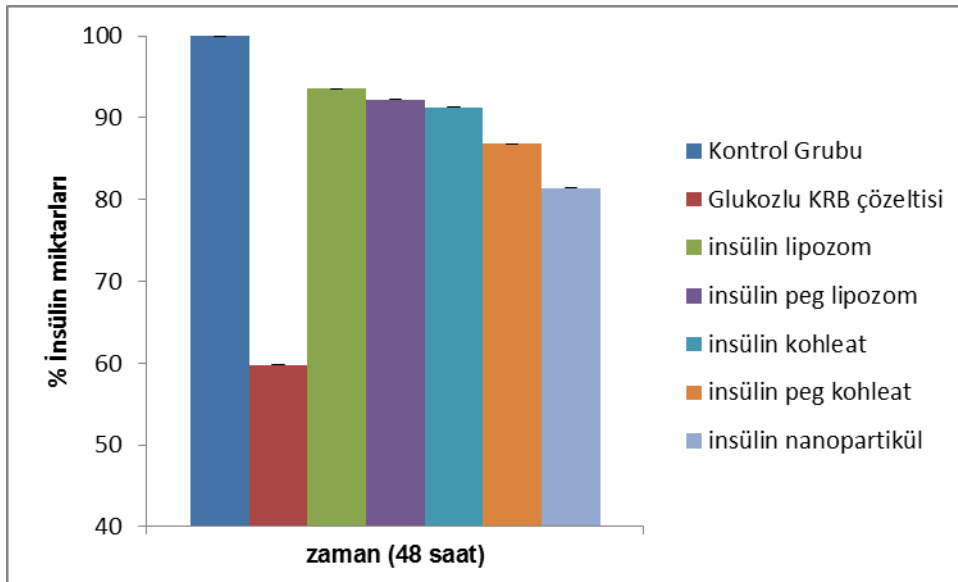
Şekil 4.98. Standart insülin çözeltileriyle yapılan kalibrasyon grafiği

Başlangıçtaki kontrol grubuna ait insülin miktarı, glukozlu KRB çözeltisi ve streptozosin çözeltisi ile muamele sonrası hücrelerdeki insülin miktarları

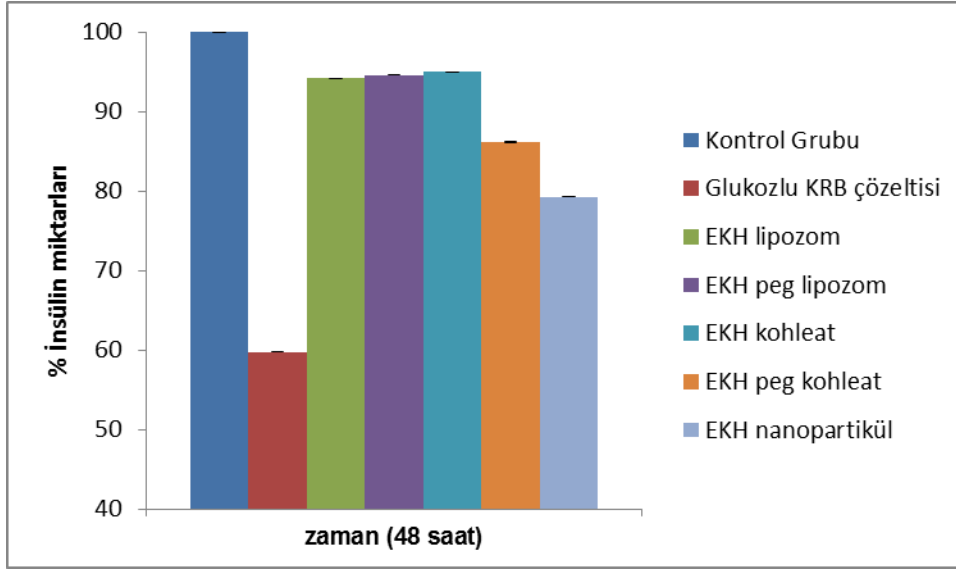
belirlenmiş ve Şekil 4.105'te sonuçlar verilmiştir. İnsülin ve EKH yüklü formülasyonların 48 saat inkübasyonu sonrası değişen insülin miktarları da Şekil 4.99-4.103'de gösterilmiştir.



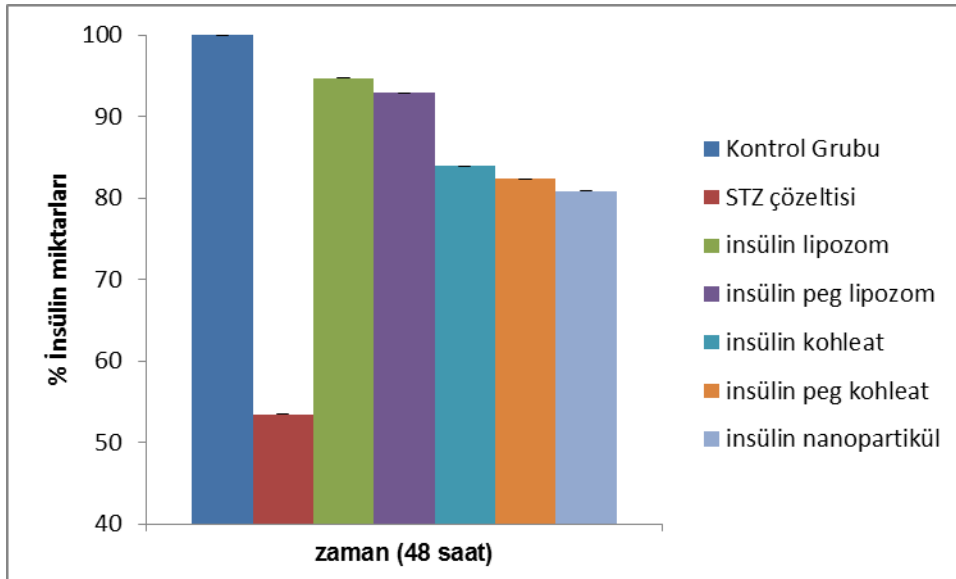
Şekil 4.99. Pankreatik beta TC hücrelerinin glukoz ve streptozosin ile muamelesi sonrası azalan insülin miktarları



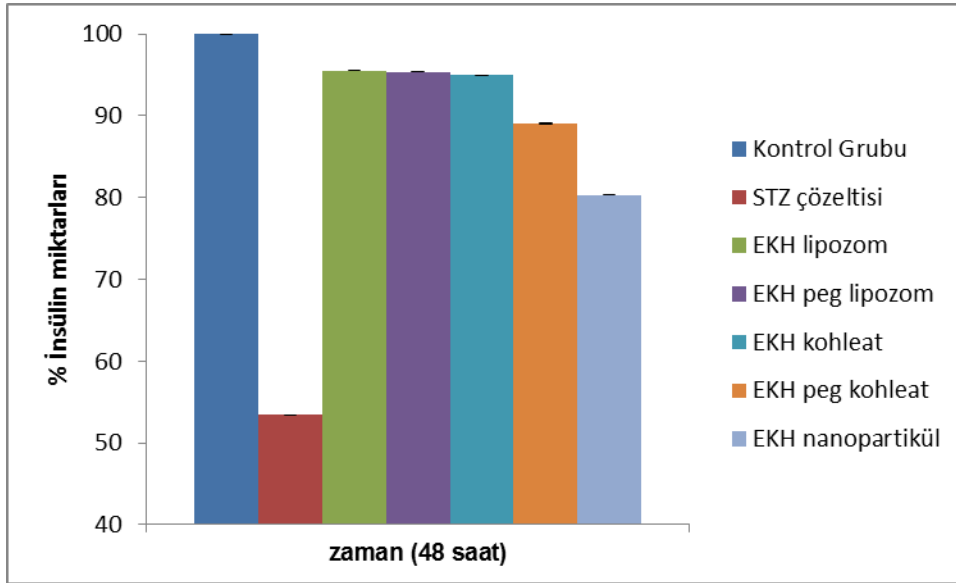
Şekil 4.100. Glukozlu KRB ile stimüle edilmiş ve insülin ile hazırlanan formülasyonlar ile 48 saat hücre inkübasyonu sonrası pankreatik beta TC hücrelerinden tayin edilen % insülin miktarları



Şekil 4.101. Glukozlu KRB ile stimüle edilmiş ve EKH ile hazırlanan formülasyonlar ile 48 saat hücre inkübasyonu sonrası pankreatik beta TC hücrelerinden tayin edilen % insülin miktarları



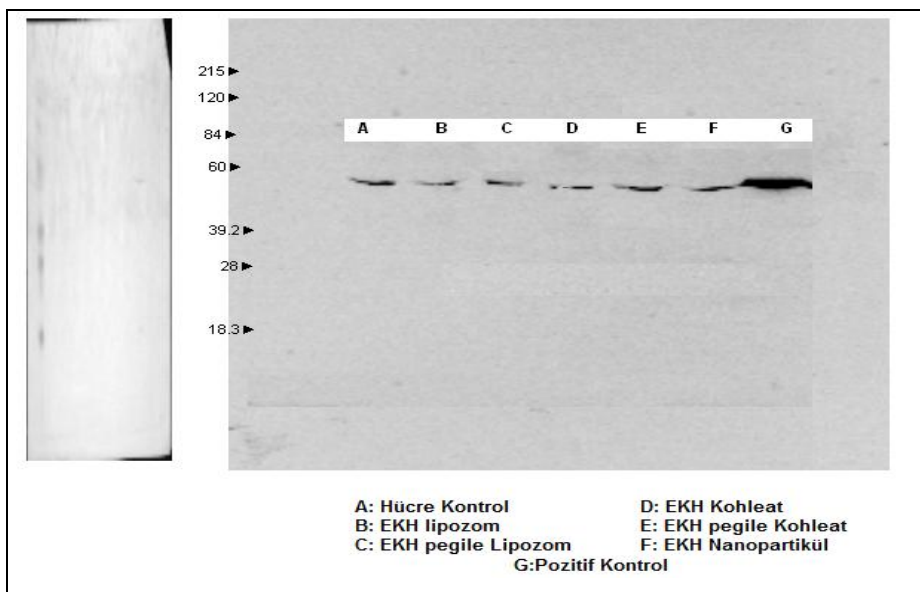
Şekil 4.102. Streptozosin ile inhibe edilmiş ve insülin ile hazırlanan formülasyonlar ile 48 saat hücre inkübasyonu sonrası pankreatik beta TC hücrelerinden tayin edilen % insülin miktarları



Şekil 4.103. Streptozosin ile inhibe edilmiş ve EKH ile hazırlanan formülasyonlar ile 48 saat hücre inkübasyonu sonrası pankreatik beta TC hücrelerinden tayin edilen % insülin miktarları

4.4. Western Blot ile Analiz Sonuçları

EKH'nin yükleme etkinliği için beta aktinle (42 kDa) yapılan ve daha önce sayımla da bulunan % yükleme etkinliğine paralel olarak Bölüm 3.2.4'te anlatıldığı gibi yapılan işlemler sonrası elde edilen görüntü ve bantların dansitelerinden hesaplanan değerler aşağıda Resim 4.37 ve Çizelge 4.45'te verilmiştir.



Resim 4.37. EKH ile yapılan formülasyonlardan western blot sonrası elde edilen bantlar

Çizelge 4.45. Western blot ile bulunan bantların dansiteleri (%)

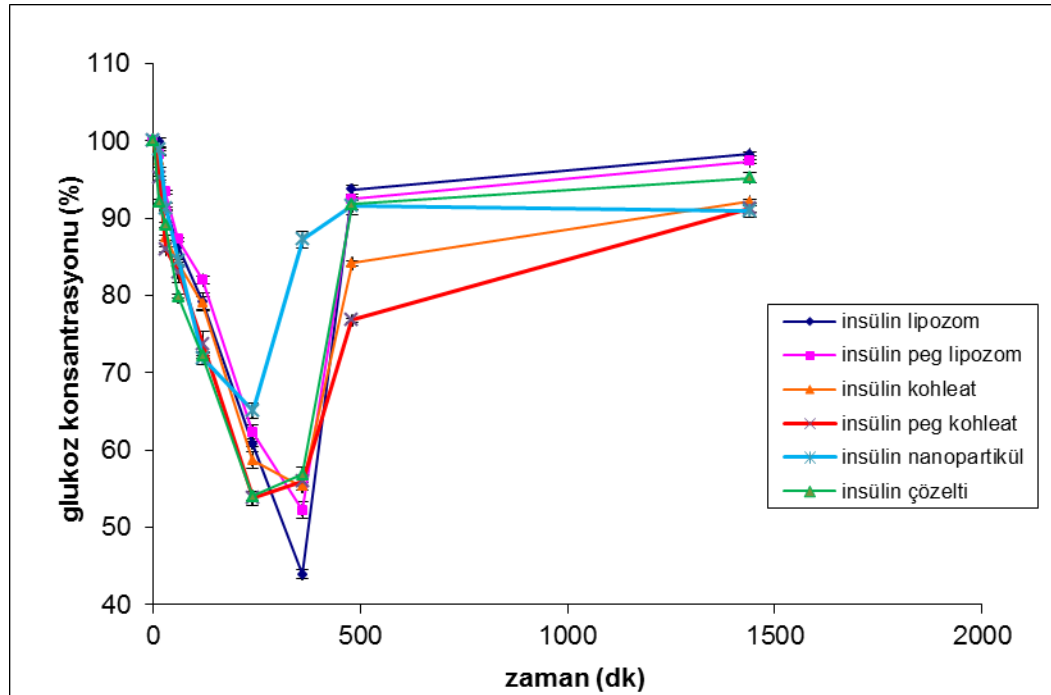
Embriyonik Kök Hücre (A)	EKH lipozom (B)	EKH pegile lipozom (C)	EKH nanokohleat (D)	EKH pegile nanokohleat (E)	EKH nanopartikül (F)
100	54,1	53,7	53,3	52,8	51,2

EKH'nin formülasyonlara yükleme etkinlikleri, hem sayımla hem de Western blot ile analiz edilmiş ve elde edilen sayısal değerler paralel çıkmıştır.

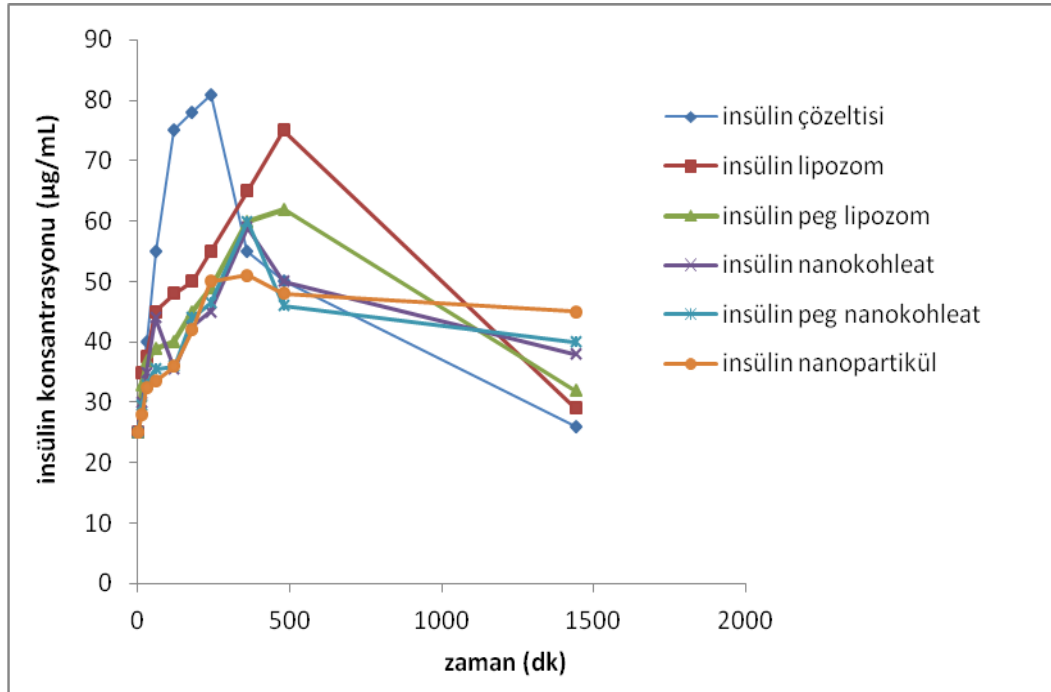
4.5. İn Vivo Çalışmalara Ait Bulgular

4.5.1. İnsülin yüklü formülasyonlar ile yapılan çalışmalar

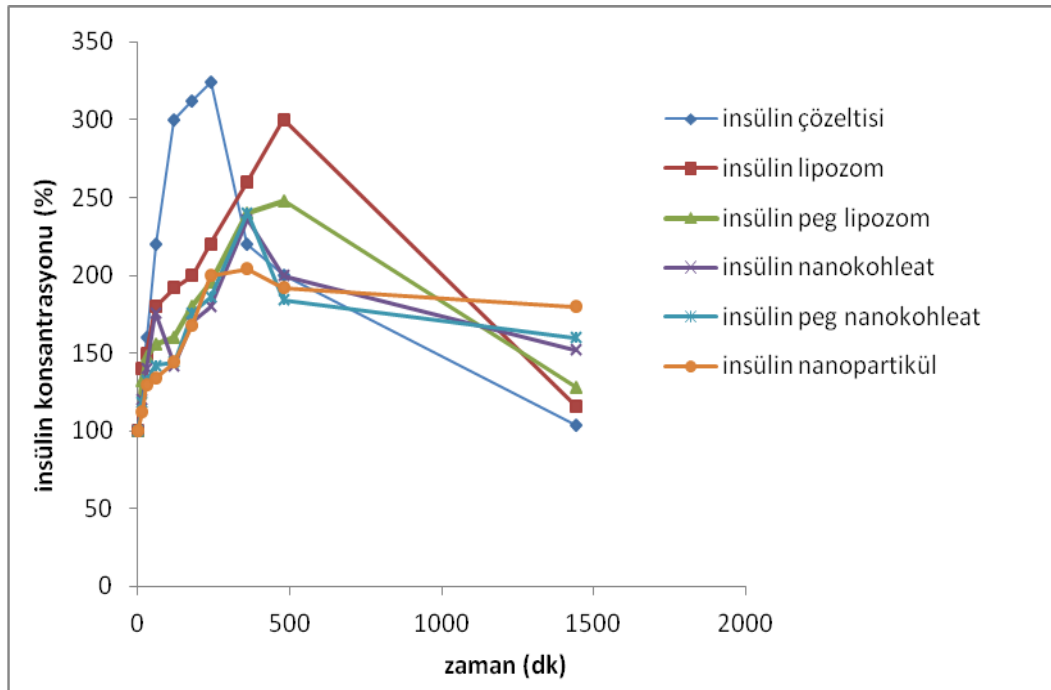
İnsülin yüklü lipozom, nanokohleat ve nanopartikül formülasyonları Bölüm 3.2.5'te belirtildiği şekilde hayvanlara verildikten sonra alınan kan örneklerinden glukoz ve insülin ölçümleri (hem miktar hem de % miktar olarak) yapılmış ve elde edilen sonuçlar ve hesaplanan eğri altında kalan alan (AUC) Şekil 4.104-4.106'da ve Çizelge 4.46'da verilmiştir.



Şekil 4.104. İnsülin yüklü formülasyonların farelere i.p. uygulanması sonucu elde edilen glukoz konsantrasyonu-zaman grafiği (n=6) (lipozom ve pegile lipozomlar için anlamlı olmayan fark $p>0,001$, diğer formülasyonlar için anlamlı fark $p<0,05$)



Şekil 4.105. İnsülin yüklü formülasyonların farelere i.p. uygulanması sonucu elde edilen insülin konsantrasyonu-zaman grafiği (n=6) (lipozom ve pegile lipozomlar için anlamlı olmayan fark $p>0,002$, diğer formülasyonlar için anlamlı fark $p<0,02$)



Şekil 4.106. İnsülin yüklü formülasyonların farelere i.p. uygulanması sonucu elde edilen % insülin konsantrasyonu-zaman grafiği (n=6) (lipozom ve pegile lipozomlar için anlamlı olmayan fark $p>0,002$, diğer formülasyonlar için anlamlı fark $p<0,02$)

Çizelge 4.46. İnsülin yüklü formülasyonların farelere i.p. uygulanması sonucu elde edilen insülin ve % insülin konsantrasyonu-zaman grafiğinden hesaplanan AUC değerleri

İnsülin formülasyonları	Çözelti	Lipozom	Pegile Lipozom	Nanokohleat	Pegile Nanokohleat	Nanopartikül
AUC (konsantrasyon µg/mL)	30,127 ^a	26,711,25 ^b	23,700 ^c	22,312.5 ^d	21,915 ^e	21,026.25 ^f
AUC (% konsantrasyon)	120,630 ^a	106,845 ^b	94,800 ^c	88,860 ^d	87,660 ^e	84,105 ^f

a-b; p>0,02

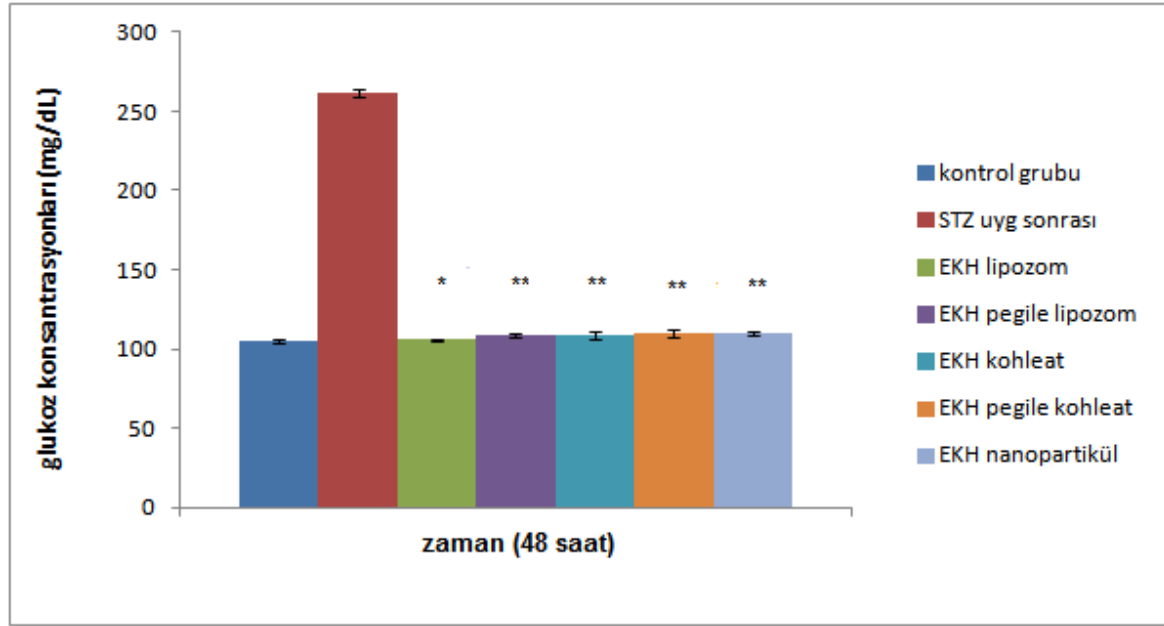
a-c; a-d; a-e; a-f = p<0,001

4.5.2. EKH formülasyonları ile yapılan çalışmalar

EKH formülasyonları farelere hem pankreas içi hem de i.p. olarak uygulanmış ve 48 saat sonundaki alınan kan örneklerinden glukoz ölçümleri yapılmıştır. Pankreas içi ve i.p. verilen formülasyonlardan elde edilen sonuçlar Çizelge 4.47-4.48 ve Şekil 4.107 ve 4.108'de verilmiştir.

Çizelge 4.47. Formülasyonların farelere pankreas içi uygulama sonrası (48 saat) değişen glukoz konsantrasyonları

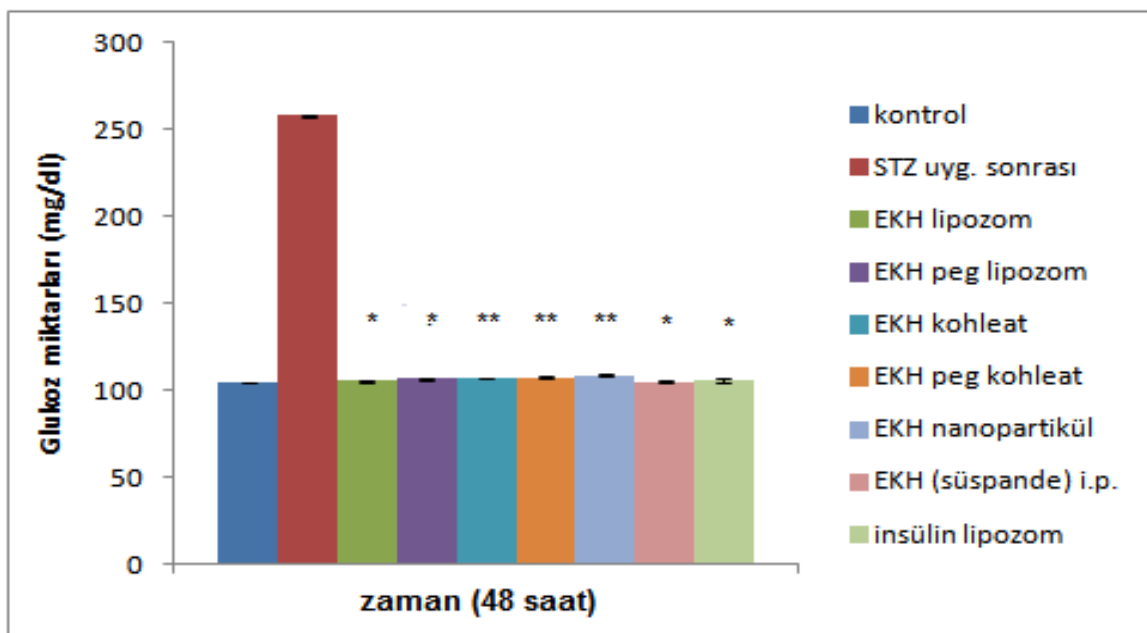
Formülasyonlar	Glukoz miktarları (mg/dL)	SS
kontrol grubu	105,3	1,25
STZ uyg. sonrası	261,5	2,77
Lipozom	106,1	0,554
Pegile lipozom	108,2	1,26
Nanokohleat	108,7	2,35
Pegile nanokohleat	109,5	2,59
Nanopartikül	109,8	1,30



Şekil 4.107. EKH formülasyonların farelere pankreas içi uygulama sonrası (48 saat) değişen glukoz konsantrasyonları (2. gün) (*kontrol grubu ile anlamlı olmayan fark $p>0,05$, **kontrol grubu ile anlamlı fark $p<0,001$)

Çizelge 4.48. Formülasyonların farelere i.p. uygulama sonrası (48 saat) değişen glukoz konsantrasyonları

Formülasyonlar	Glukoz miktarları (mg/dL)	SS
kontrol grubu	104,5	0,325
STZ uyg. sonrası	258,0	0,341
Lipozom	106,5	0,872
Pegile lipozom	106,8	0,444
Kohleat	107,7	0,505
Pegil kohleat	108,9	1,09
Nanopartikül	105,4	0,437
EKH (süspande)	105,1	0,528
İnsülin lipozom	105,9	1,63

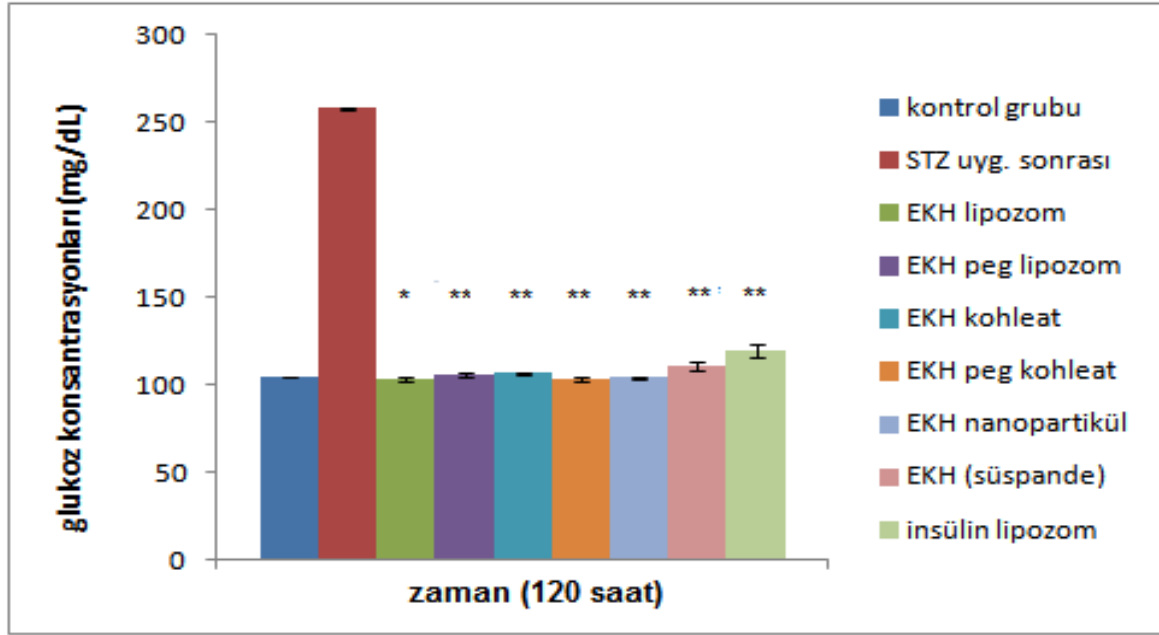


Şekil 4.108. EKH formülasyonların farelere i.p. uygulama sonrası (48 saat) değişen glukoz konsantrasyonları (2. gün) (*kontrol grubu ile anlamlı olmayan fark $p>0,005$, **kontrol grubu ile anlamlı fark $p<0,001$)

İntraperitoneal verilen EKH formülasyonlarından ve EKH'nin süspande halde verilmesinden ayrıca insülin yüklü lipozom formülasyonunun en iyi sonucu vermesi nedeniyle elde edilen verilerin ve histopatolojik incelemelerden elde edilen sonuçların birlikte değerlendirilmesi sonucunda deney 5. güne devam ettirilmiş ve 5. günün sonunda elde edilen glukoz konsantrasyonları Çizelge 4.49 ve Şekil 4.109'da verilmiştir.

Çizelge 4.49. Formülasyonların farelere i.p. uygulama sonrası (120 saat) değişen glukoz konsantrasyonları (5.gün)

Formülasyonlar	Glukoz miktarları (mg/dL)	SS
kontrol grubu	104,5	0,32
STZ uyg. sonrası	258,0	0,34
Lipozom	106,0	0,95
Pegile lipozom	106,5	0,45
Kohleat	103,5	0,99
Pegil kohleat	104,0	1,05
Nanopartikül	103,2	1,47
EKH (süspande)	110,9	3,01
İnsülin lipozom	119,3	3,47



Şekil 4.109. EKH formülasyonların farelere i.p. uygulama sonrası (120 saat) değişen glukoz konsantrasyonları (5.gün) (*kontrol grubu ile anlamlı olmayan fark $p>0,005$, **kontrol grubu ile anlamlı fark $p<0,002$)

4.5.3. Histopatoloji çalışmalarına ait bulgular

İnsülin yüklü formülasyonlara ait bulgular

Bölüm 3.2.5'te belirtildiği şekilde yapılan incelemeler sonucunda insülin yüklü formülasyonların ve insülin çözeltisinin i.p. uygulanmasının ardından incelenen pankreas örneklerinden elde edilen sonuçlar Çizelge 4.50'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.50. İnsülin çözeltisi ve insülin yüklü formülasyonların uygulanmasının ardından pankreastaki Langerhans adacıklarının kapladıkları alan ve parankimdeki doku hasarının semikantitatif analizi

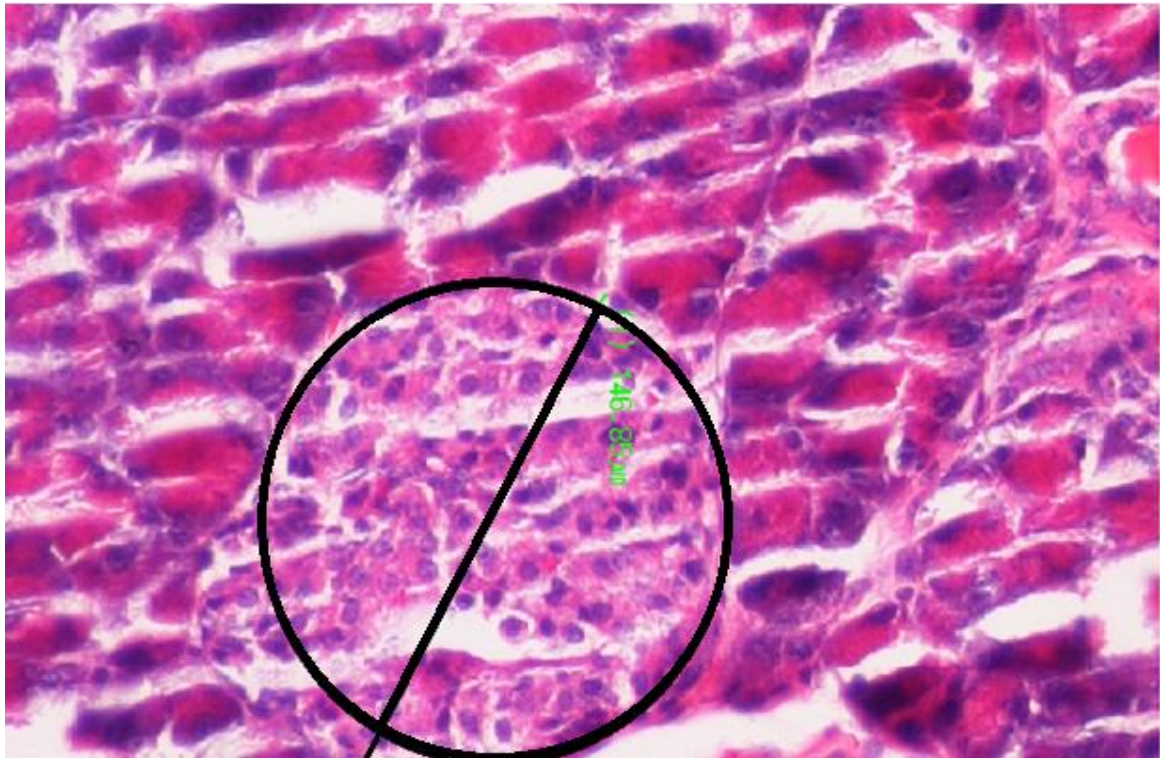
Gruplar	Bir kesitte alınan Langerhans adacıkları toplam yarıçapı (μm)	Bir pankreas kesitindeki Langerhans adacıkları toplam kapladığı alan (mm^2)	Langerhans adacıklarında oluşan dejenerasyon*
Kontrol	430	0,54	0
Çözelti	289	0,36	0,10
Lipozom	397	0,49	0
Peg lipozom	269	0,33	0,18
Nanokohleat	243	0,29	0,16
Peg nanokohleat	217	0,15	0
Nanopartikül	238	0,18	0

*Pankreasta ilgili lezyonun derecesi; 0: normal; 1: minimal; 2: hafif; 3: orta; 4: belirgin; 5: şiddetli

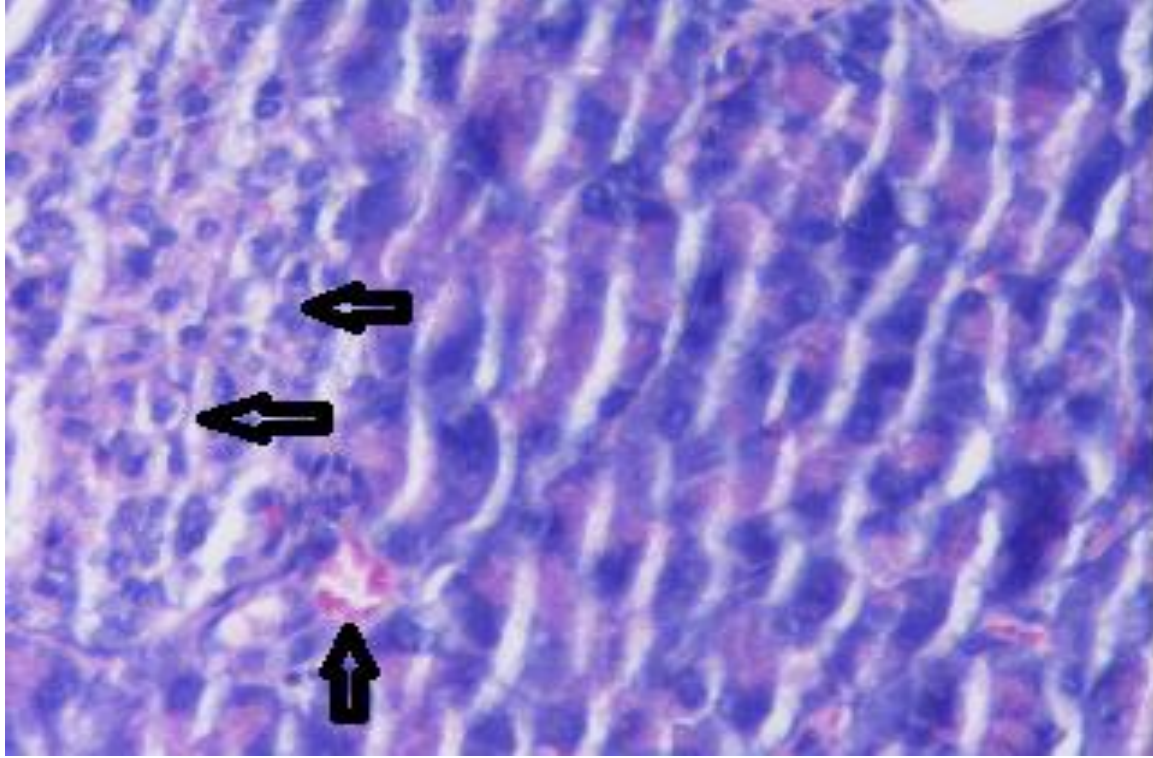
İncelenen tüm gruplar arasında en geniş Langerhans adacık yüzey alanının insülin yüklü lipozom formülasyonuna ait olduğu görüldü. Yapılan mikroskopik analizlerde Langerhans adacıklarındaki hücrelerde vakuoler dejenerasyon ile hücre çekirdeklerinde dejeneratif değişikliklerin oldukça sınırlı olduğu görülmüştür. Bu bakımdan gruplar arasında kayda değer bir farklılık görülmediği belirtilmiştir.

Ayrıca, insülin yüklü lipozom formülasyonundan elde edilen iyi sonuç neticesinde i.p. uygulama yapılan grup ile 5. güne kadar deney devam ettirilerek sonuçlar incelenmiştir (Bakınız Çizelge 4.52).

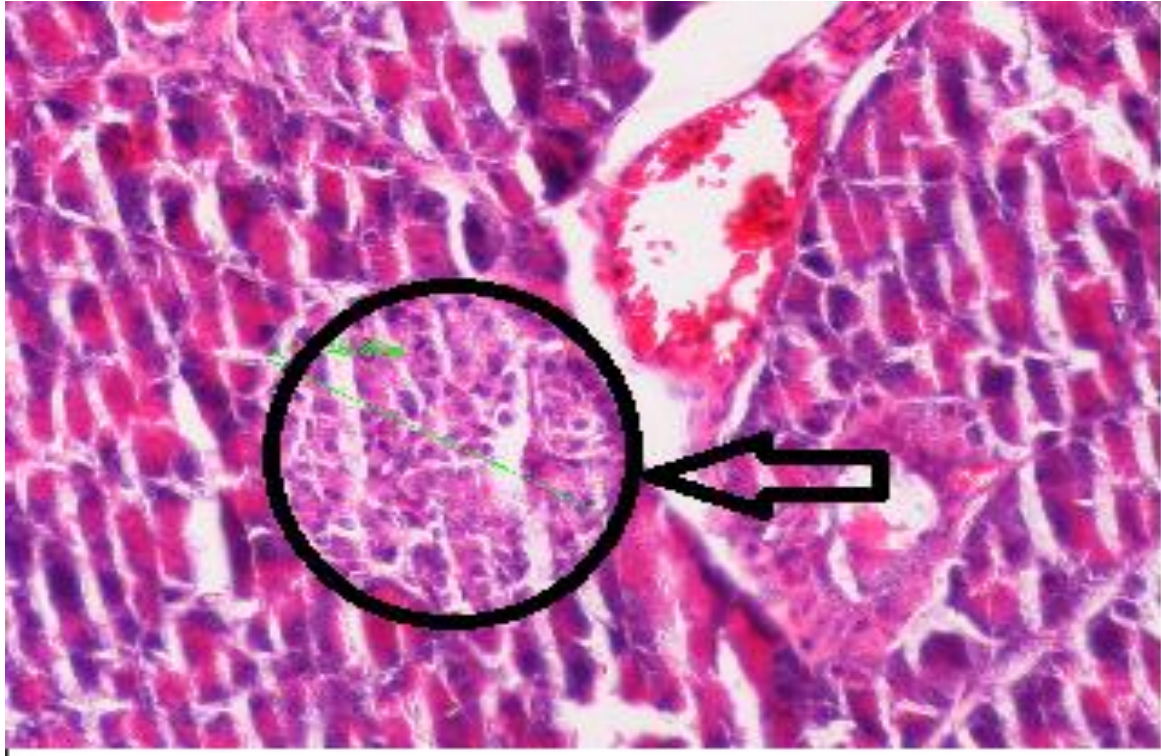
Hiçbir işlem yapılmamış grup, streptozosin uygulanmış grup ve insülin yüklü formülasyonların uygulanan gruplardan alınan pankreas kesitlerinin patolojik incelenmesi sonucu Resim 4.38-4.44'te verilen görüntüler elde edilmiştir.



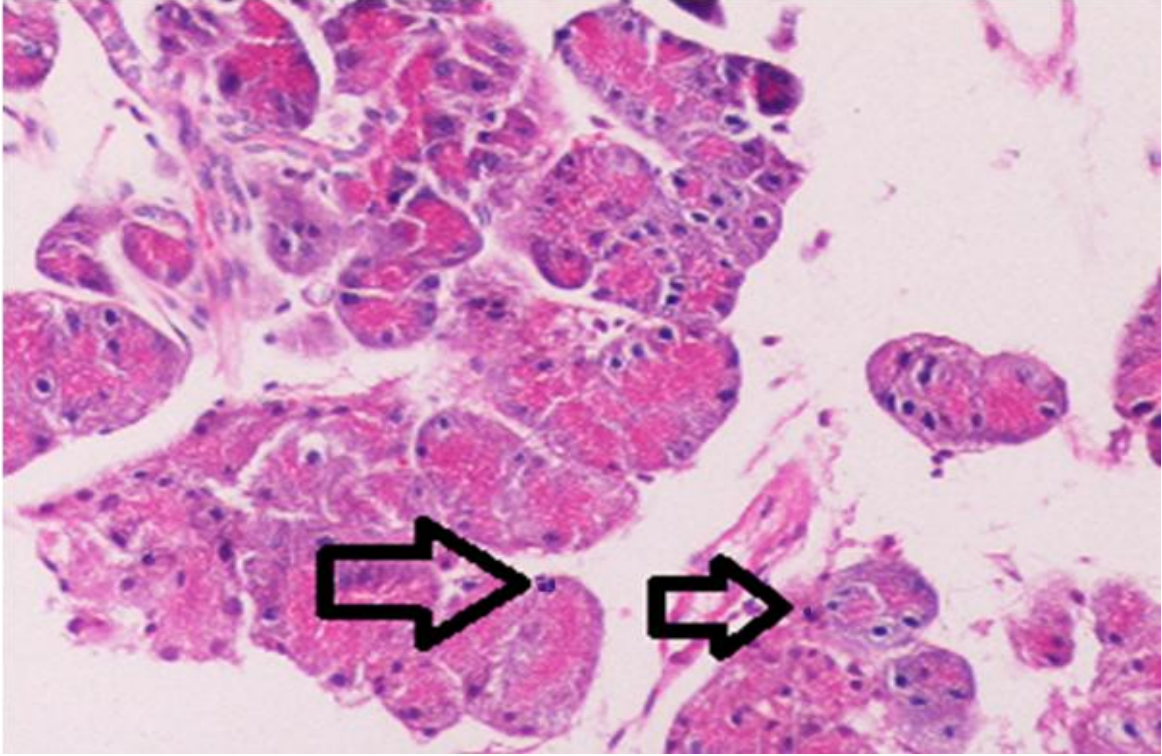
Resim 4.38. Kontrol grubu (hiçbir işlem yapılmamış) fare pankreasındaki normal ölçüdeki bir Langerhans adacığı X 20.



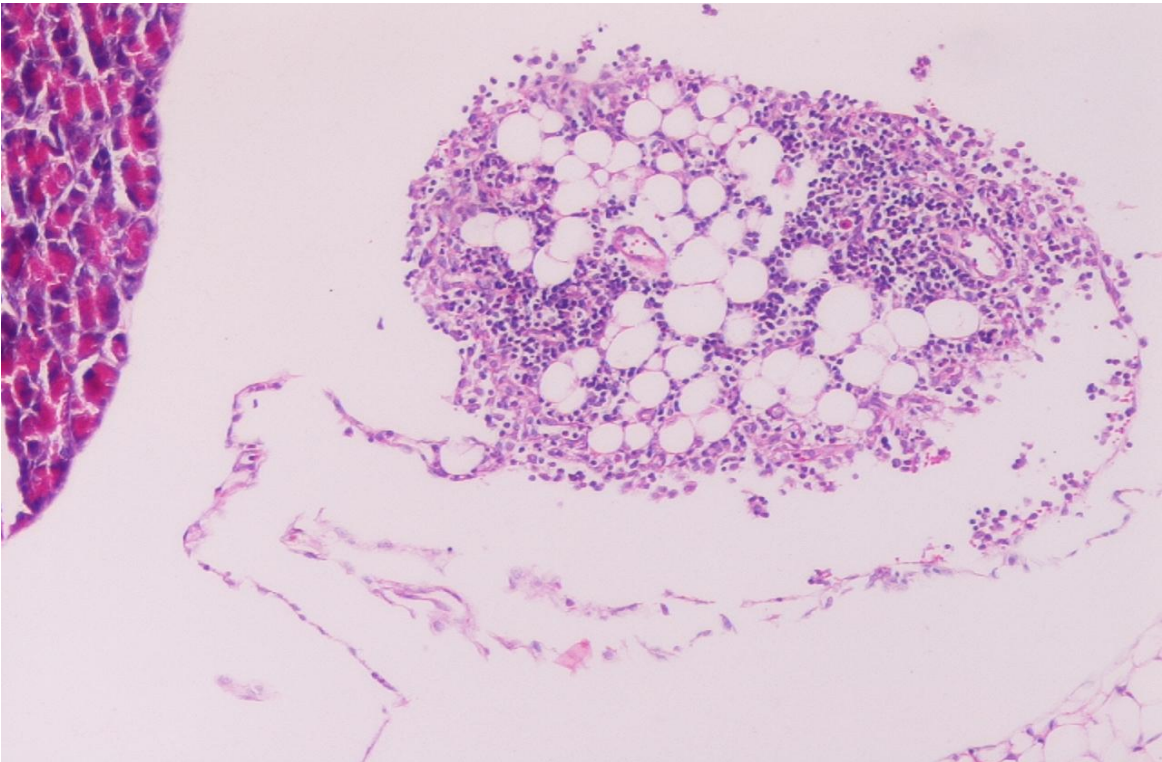
Resim 4.39. STZ uygulanan fare pankreasındaki Langerhans adacıklarındaki beta hücrelerinde vakuoler dejenerasyon (oklar) X 40



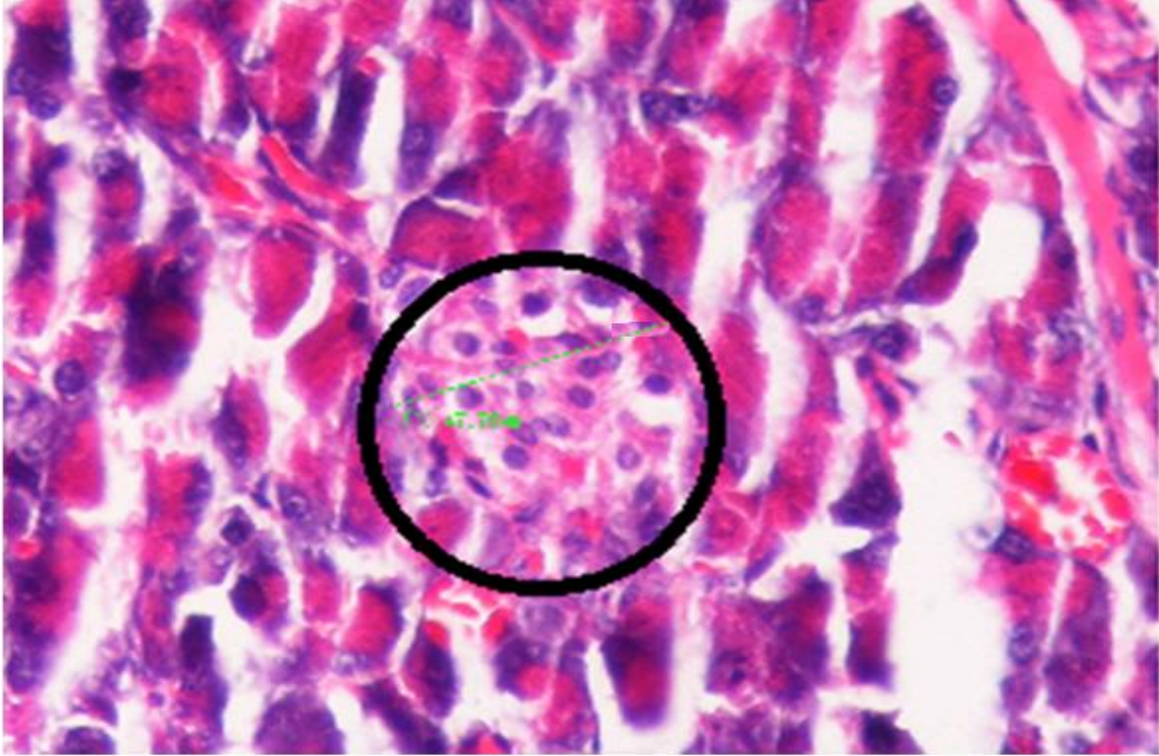
Resim 4.40. İnsülin yüklü lipozom grubundaki fare pankreasındaki normal ölçüdeki Langerhans adacığı X 20.



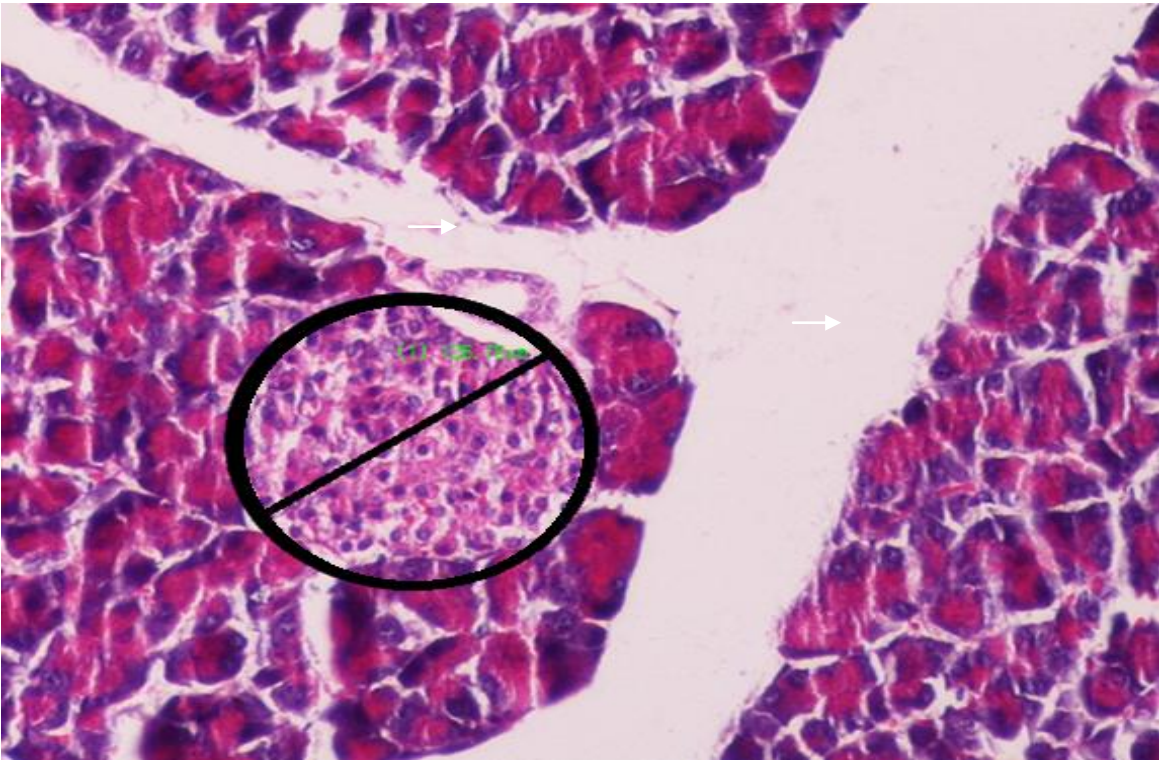
Resim 4.41. İnsülin yüklü pegile lipozom uygulanan gruptaki normal ölçüde Langerhans adacığı ve sentroasiner hücre çekirdeklerinde piknoz ile karakterize dejenerasyon (oklar) ve nekroz X 20.



Resim 4.42. İnsülin yüklü nanokohleat uygulanan gruptaki Langerhans adacığı ve pankreası çevreleyen yağ dokuda çoğunluğunu mononükleer hücrelerin oluşturduğu yangı hücreli infiltrasyonu X 10.



Resim 4.43. İnsülin yüklü pegile nanokohleat grubundaki fare pankreasındaki Langerhans adacığı X 40.



Resim 4.44. İnsülin yüklü nanopartikül grubundaki fare pankreasındaki normal ölçüdeki bir Langerhans adacığı X 20.

EKH formülasyonlara ait bulgular

EKH formülasyonların i.p. uygulaması ile elde edilen bulgular

Bölüm 3.2.5'te belirtildiği şekilde yapılan incelemeler sonucunda EKH formülasyonların ve EKH'nin süspande halde i.p uygulamasının ardından hem 48 saat sonra hem de deney beşinci güne kadar devam ettirilmiştir. İkinci ve beşinci günün sonunda alınan pankreaslardan hesaplanan Langerhans adacık sayısı, adacıklarda oluşan dejenerasyon Çizelge 4.51 ve 4.52'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.51. EKH formülasyonlarının ve insülin yüklü lipozomun i.p. uygulama sonrası (2. gün) pankreastaki Langerhans adacıklarının kapladıkları alan ile parankimdeki doku hasarının semikantitatif analizi

Gruplar	Bir kesitte alınan Langerhans adacıkları toplam yarıçapı (µm)	Bir pankreas kesitindeki Langerhans adacıkları toplam kapladığı alan (mm ²)	Langerhans adacıklarında oluşan dejenerasyon*
Kontrol	654	1,34	0
Süspande EKH	214	0,438	0
Lipozom	437	0,894	0
Peg lipozom	257	0,526	0
Nanokohleat	251	0,514	1,0
Peg nanokohleat	414	0,889	0
Nanopartikül	335	0,686	1,0
İnsülin yüklü Lipozom	409	0,837	0,0

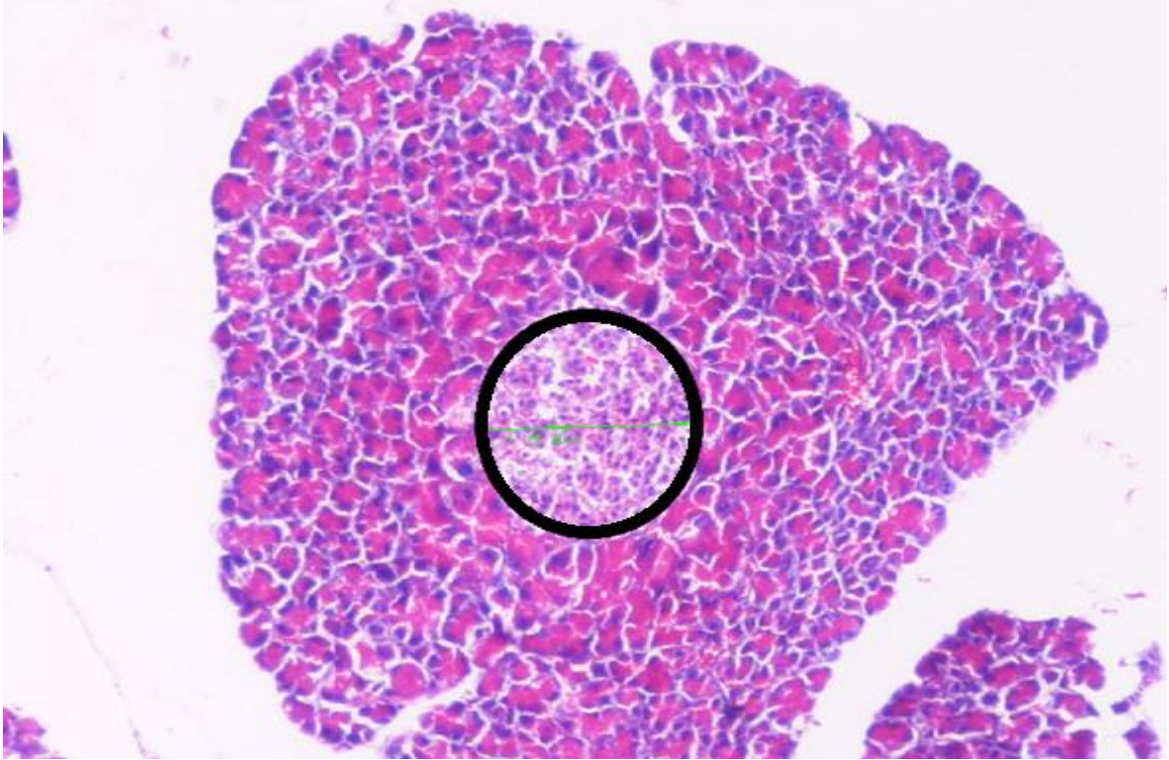
*Pankreasta ilgili lezyonun derecesi; 0: normal; 1: minimal; 2: hafif; 3: orta; 4: belirgin; 5: şiddetli

Çizelge 4.52. EKH formülasyonlarının ve insülin yüklü lipozomun i.p. uygulama sonrası (5. gün) pankreastaki Langerhans adacıklarının kapladıkları alan ile parankimdeki doku hasarının semikantitatif analizi

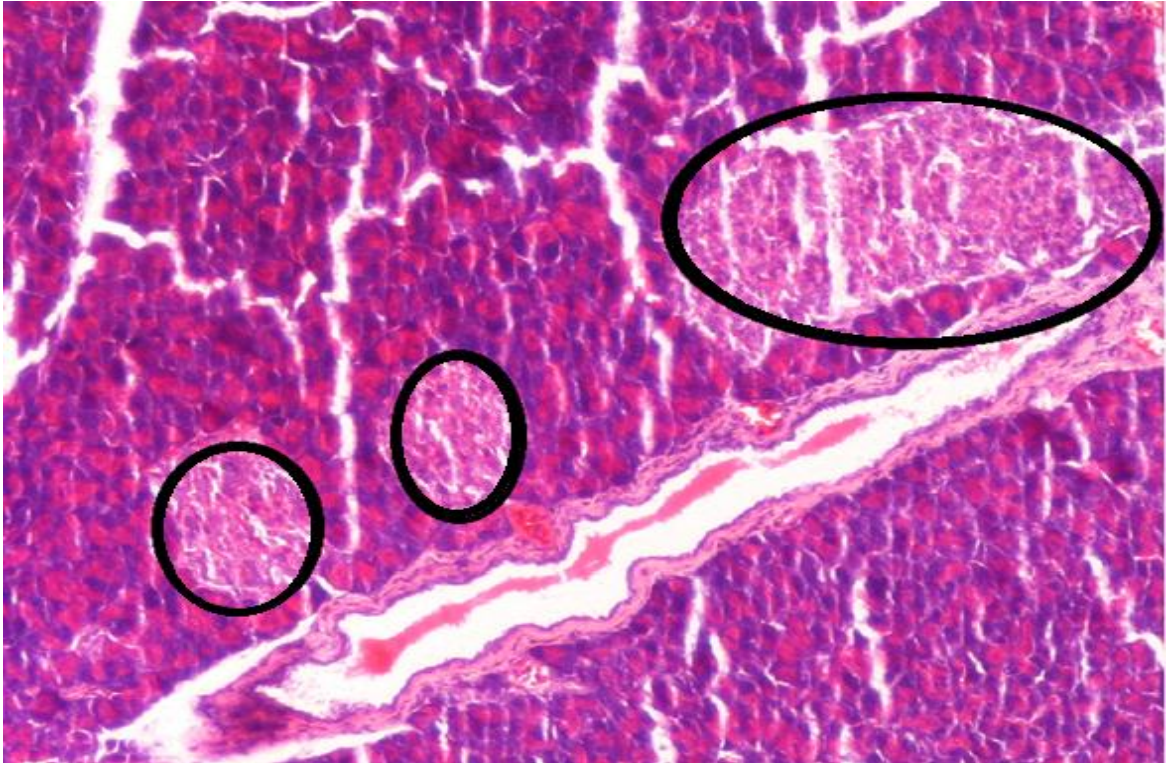
Gruplar	Bir kesitte alınan Langerhans adacıkları toplam yarıçapı (μm)	Bir pankreas kesitindeki Langerhans adacıkları toplam kapladığı alan (mm ²)	Langerhans adacıklarında oluşan dejenerasyon*
Kontrol	756	0,450	0
Süspande EKH	692	0,530	0
Lipozom	1425	2,93	0
Peg lipozom	838	0,533	0
Nanokohleat	818	0,514	0
Peg nanokohleat	1416	2,91	0,2
Nanopartikül	1092	2,24	0,1
İnsülin yüklü Lipozom	528	0,420	2,0

*Pankreasta ilgili lezyonun derecesi; 0: normal; 1: minimal; 2: hafif; 3: orta; 4: belirgin; 5: şiddetli

Farelere EKH formülasyonların uygulamasının ardından 5. gün alınan pankreas kesitlerinin patolojik incelenmesi sonucu Langerhans adacıklarına ait görüntüler elde edilmiştir. Çizelge 4.52’de görüldüğü üzere lipozom ve pegile nanokohleat formülasyonlarının hem Langerhans adacıklarının kapladığı alan hem de oluşan dejenerasyon göz önüne alınarak en iyi sonuçları verdikleri düşünülmüş ve bu gruplara ait görüntüler Resim 4.45 ve Resim 4.46’da verilmiştir.



Resim 4.45. EKH lipozomu 5.gun grubundaki fare pankreasında normal ölçülerdeki bir Langerhans adacığı X 10.



Resim 4.46. EKH pegile nanokohleatı 5. gün grubundaki fare pankreas parankiminde görülen Langerhans adacıkları X 10

EKH formülasyonların pankreas içi uygulaması ile elde edilen bulgular

Ayrıca EKH formülasyonlarının ve EKH'nin süspande halde pankreas içine uygulanmasının ardından hesaplanan Langerhans adacık sayısı, adacıklarda oluşan dejenerasyon Çizelge 4.53'te gösterilmiştir. (Bu uygulama sonrası Langerhans adacıklarının sayıları ölçülmüştür).

Çizelge 4.53. EKH formülasyonlarının pankreas içi uygulanmasının ardından pankreastaki Langerhans adacık sayısı ve parankimdeki doku hasarının semikantitatif analizi (2.gün)

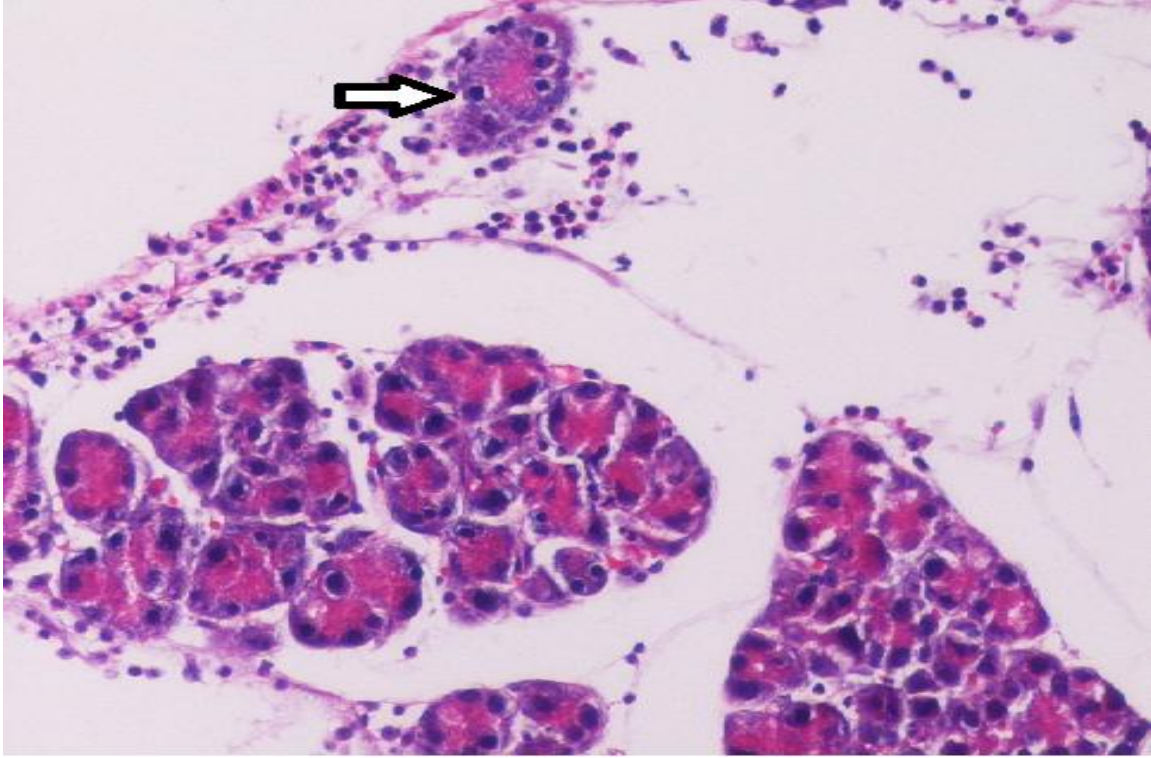
Gruplar	Bir kesitte alınan Langerhans adacık sayısı	Langerhans adacıklarında oluşan dejenerasyon*
Kontrol	5,6	0
Süspande EKH	5,0	1,5
Lipozom	6,8	0,4
Peg lipozom	3,6	0,5
Nanokohleat	3,3	1
Peg nanokohleat	3,0	1,3
Nanopartikül	2,7	1,6

*Pankreasta ilgili lezyonun derecesi; 0: normal; 1: minimal; 2: hafif; 3: orta; 4: belirgin; 5: şiddetli

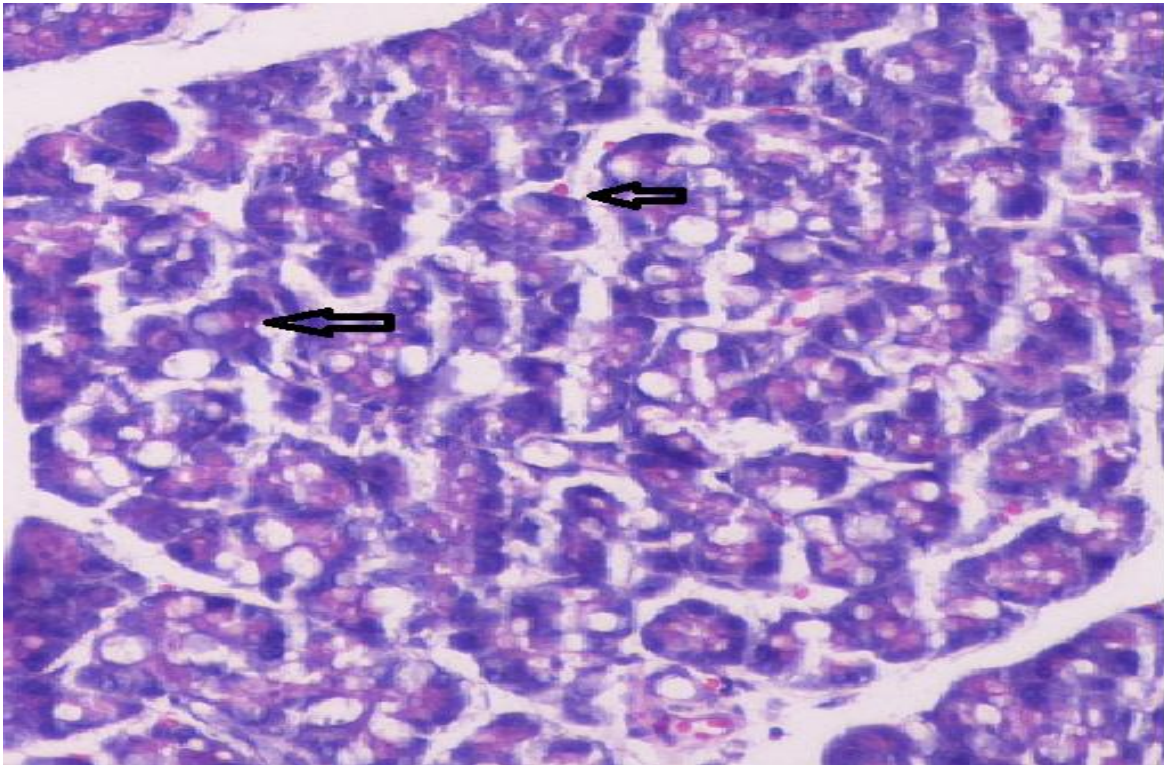
Sonuçlara bakıldığında EKH lipozom formülasyonu en çok Langerhans adacık sayısı ve normal seviyelerde kabul edilen dejenerasyon ile en iyi sonuç alınan formülasyon olarak düşünülmüştür.

Bunun yanında pankreas içi uygulama sonucunda formülasyonların hepsinde özellikle nanopartikül uygulanan grupta şiddetli immün yanıtı yol açmış ve bu reaksiyon sonucunda hücrelerde yaygın dejenerasyon ve enfeksiyon gözlenmiştir.

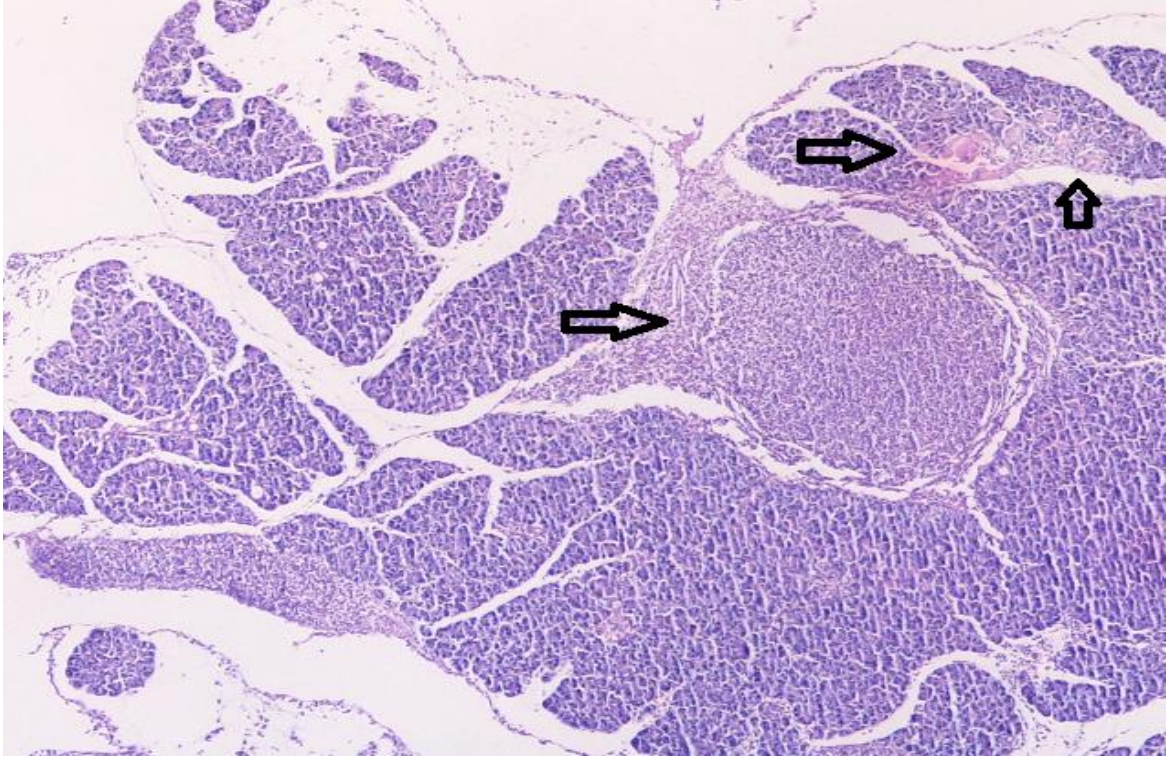
EKH'nin süspande halde ve tüm formülasyonların pankreas içi uygulanmasının ardından uygulama yolu nedeniyle oluşan travma, bölgedeki yangısal ve nekrotik reaksiyonlar, dejenerasyonlar Resim 4.47-4.52'de verilmiştir.



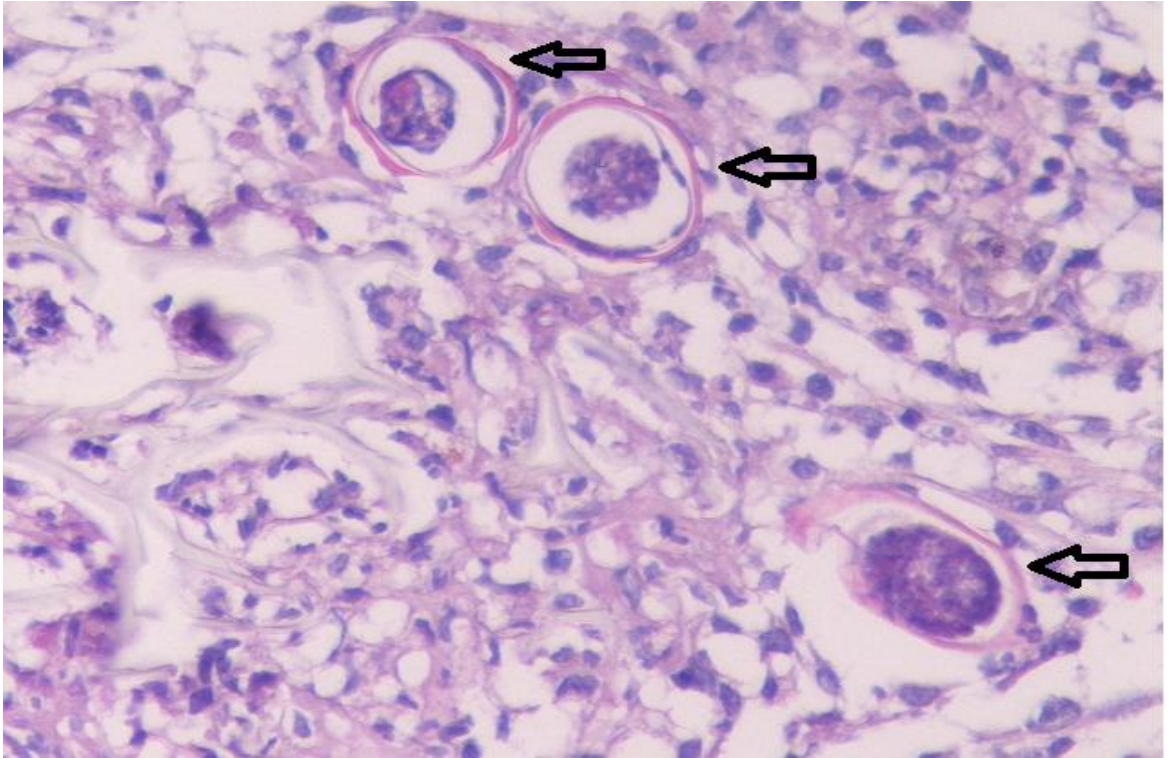
Resim 4.47. EKH'nin kendisi süspende halde pankreas içi uygulama grubundaki fare pankreasındaki bir parankiminde nötrofil lökosit infiltrasyon ile sentroasiner hücrelerde dejenerasyon (oklar) X 20



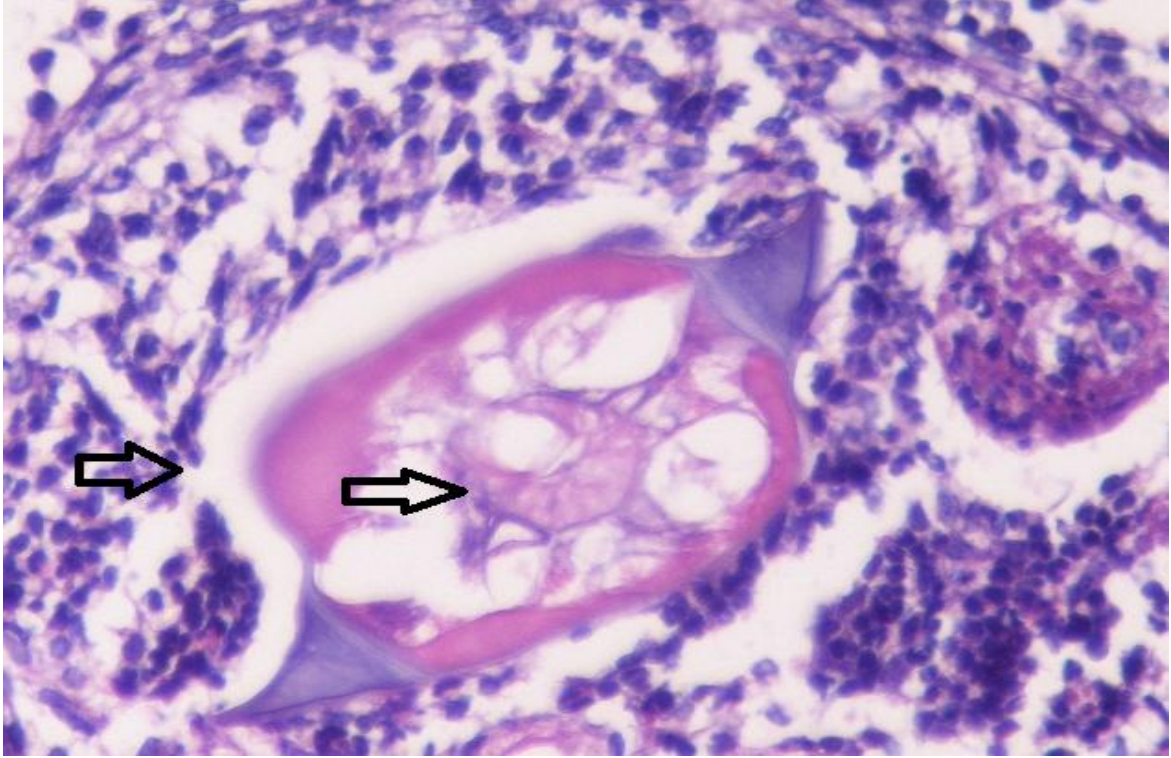
Resim 4.48. EKH lipozomunun pankreas içi uygulanan fare pankreasındaki oluşan dejenerasyon (oklar) X 20



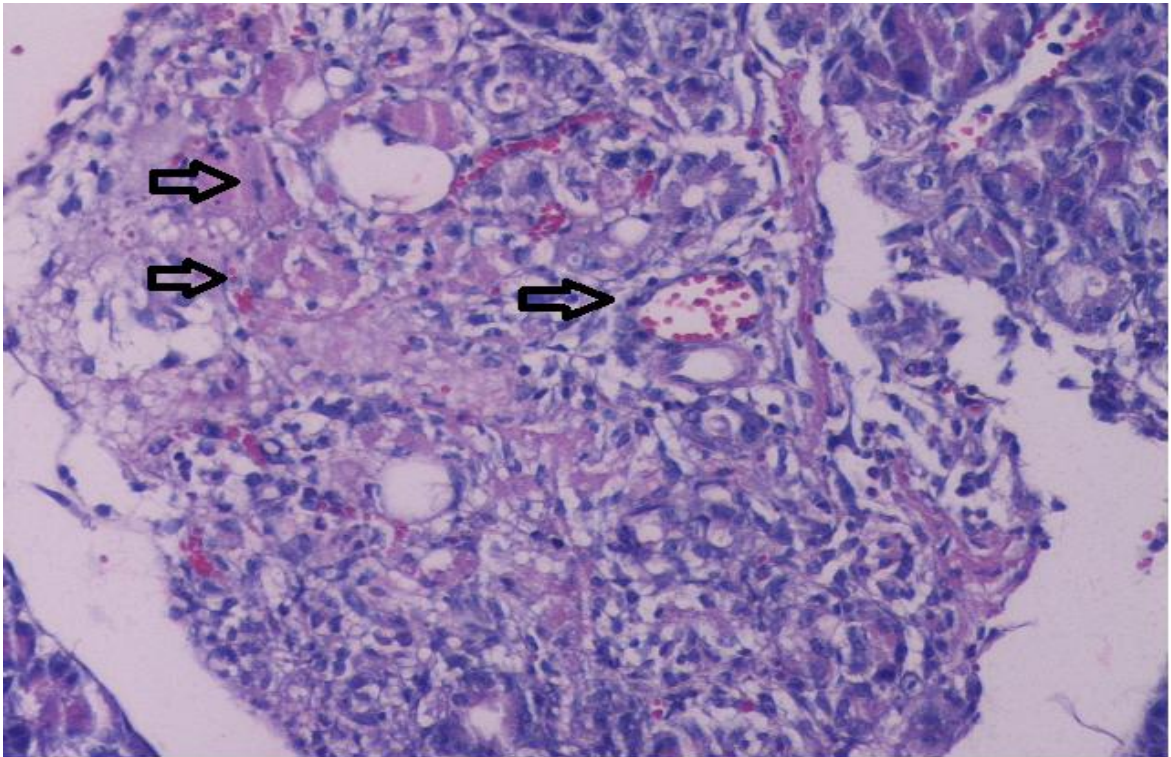
Resim 4.49. EKH pegile lipozomunun pankreas içi uygulanan fare pankreasındaki oluşan dejenerasyon (oklar) X 20



Resim 4.50. EKH nanokohleatinın pankreas içi uygulama grubundaki fare pankreasındaki bir parankiminde nötrofil lökosit infiltrasyon ile sentroasiner hücrelerde dejenerasyon (oklar) X 20



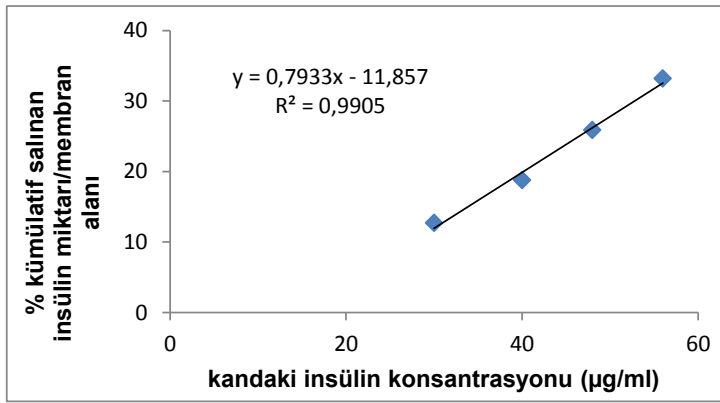
Resim 4.51. EKH pegile nanokohleatının pankreas içi uygulama grubundaki fare pankreasındaki yaygın dejenerasyon, nekroz ve şiddetli nötrofil lökosit infiltrasyonuna yol açan nanokohleat parçacığı (oklar) X 20



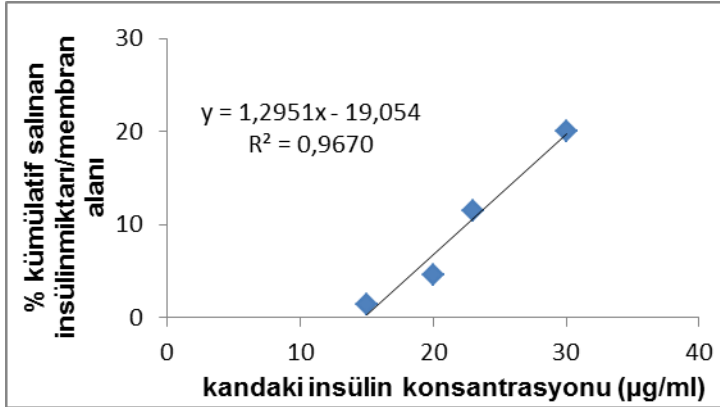
Resim 4.52. EKH nanopartikülünün pankreas içi uygulama grubundaki fare pankreasında sentroasiner hücreler ile tubuluslarında dejenerasyon ve nekroz (oklar) X 20

4.6. İn Vitro-İn Vivo Korelasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

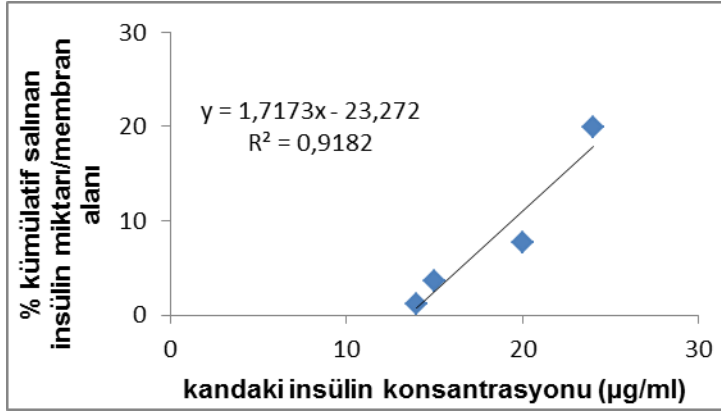
Aynı örnek alma zamanlarında, hücre kültürlerinde hesaplanan % kümülatif geçen insülin miktarı ile kandaki insülin miktarı grafiğe geçirilerek korelasyon çalışması insülin yüklü formülasyon tipleri için gerçekleştirildi. Korelasyon çalışması yapmamızdaki amaç, pankreatik beta TC hücrelerinin deney prosedürümüz gereği hazırlanan formülasyonların in vitro olarak değerlendirilmesinde kullanılan hücreler olmasıdır. Korelasyon sonuçları Şekil 4.110-4.115’de verilmiştir.



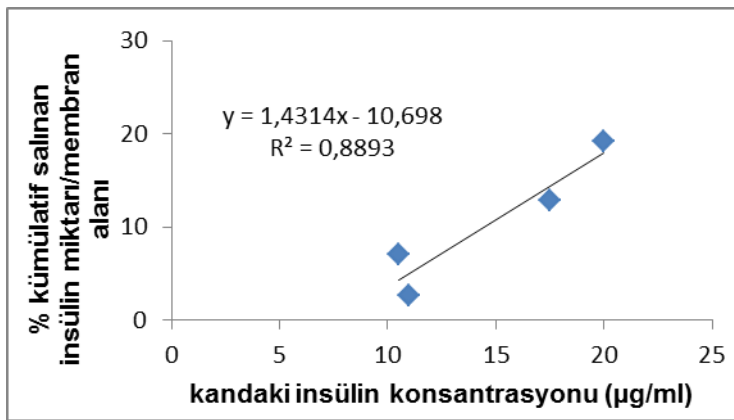
Şekil 4.110. İnsülin çözeltisi için in vivo-in vitro korelasyon grafiği



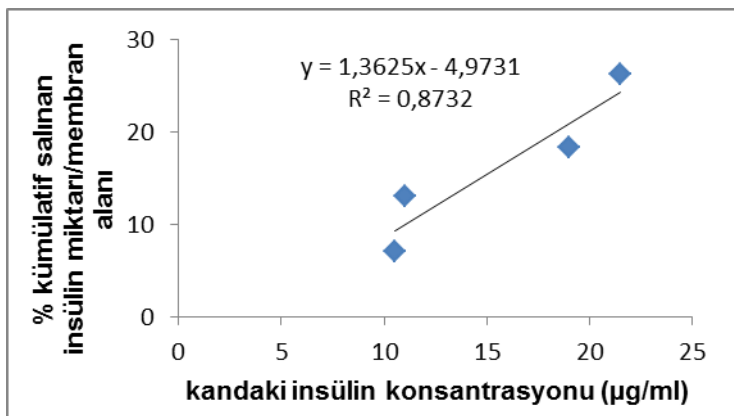
Şekil 4.111. İnsülin lipozomları için in vivo-in vitro korelasyon grafiği



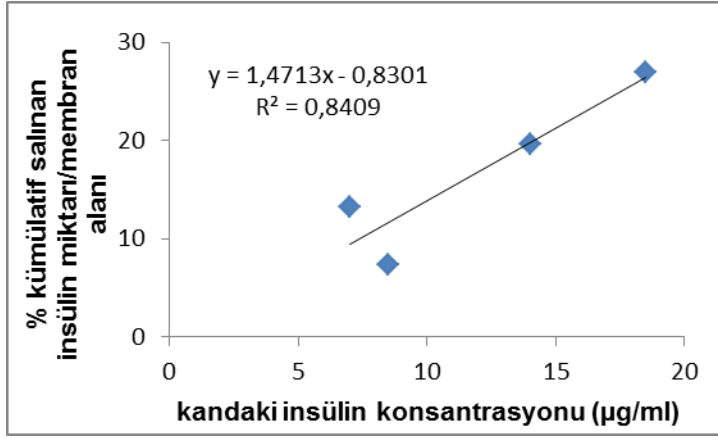
Şekil 4.112. İnsülin pegile lipozomları için in vivo-in vitro korelasyon grafiği



Şekil 4.113. İnsülin nanokohleatları için in vivo-in vitro korelasyon grafiği



Şekil 4.114. İnsülin pegile nanokohleatları için in vivo-in vitro korelasyon grafiği



Şekil 4.115. İnsülin nanopartikülleri için in vivo-in vitro korelasyon grafiği

5. TARTIŞMA

5.1. İn Vitro Çalışmalara Ait Bulguların Değerlendirilmesi

5.1.1. Analiz yöntemlerinin seçimi

Çalışmamızda insülin içeren formülasyonların etkin madde miktar tayinlerinde ve hem diyaliz membran hem de hücre kaplı membrandan geçiş çalışmalarında protein tayin yöntemi olan Lowry metodu kullanılmıştır. Yöntemin esası; peptit bağlarının alkali koşullarda bakır iyonları ile biüre reaksiyonu sonucu bakırın indirgenmesi ve Folin-Ciocalteu ayırıcı ile tirozin ve triptofan amino asitlerinin tepkimeye girerek mavi renkli kompleks meydana getirmesidir. Oluşan bu kompleks 600-800 nm arasında absorbands piki verir.

İnsülin protein yapıda olduğu için protein tayininde Lowry metodu kullanılmıştır. Yapılan çalışmalarda, insülin yüklü nanotaşıyıcılarda protein tayini için yaygın olarak tercih edilen Lowry metodu kullanılmıştır [134,135]. Bu yöntem ile doğru, güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçlar alındığı görülmüştür. Yöntemin esasına göre oluşan bileşiğin görünür sahada (600-800 nm) pik vermesi sonucu insülin için dalga boyu taraması yapılmış ve dalga boyu 754 nm olarak bulunmuştur.

Validasyon çalışmaları doğrusallık yönünden hem pH 7,4 fosfat tamponunda içerisinde hem DMEM’li ortamda hem de distile su içerisinde değerlendirilmiştir. Her bir koşulda da kalibrasyon doğrusunun r^2 değerleri 0,999’un üstünde bulunmuştur. Bulunan yüksek korelasyon katsayıları ile yöntemdeki seçiminin doğruluğu gösterilmiştir. Formülasyonlarda kullanılan DOPE, DOPS ve PLGA’nın fosfat tamponu içerisindeki insülin için bulunan maksimum dalga boyunda (756 nm) pik vermediği gözlenmiştir.

Diğer bir etkin madde olarak kullanılan EKH için ise referans protein Bovin serum albümin (BSA) model protein olarak kullanılmıştır [136]. Taranan birçok literatürde BSA ile yüklenmiş çeşitli denetimli salım sistemlerinden tayin için Bikinkoninik asit (BCA), Lowry [141], Bradford [136-140] gibi protein tayin yöntemleri kullanılmıştır.

Bizim çalışmamızda BSA ile Lowry metodu kullanılarak validasyon çalışmaları tamamlanmış, BSA ile yapılan kalibrasyonda r^2 değerleri 0,999'un üstünde bulunmuştur. Yöntemin insülin ve BSA tayinine uygun olduğuna karar verilmiştir. UV spektrofotometri yöntemi kullanılan fosfat tamponu, distile su, DMEM gibi ortamlar için doğru, kesin, özgün ve hassas bulunmuştur.

5.1.2. Diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) analizine ait bulguların değerlendirilmesi

DSC çalışmaları, 10°C/dk tarama hızında ve 250°C'ye kadar yapıldı. Formülasyon hazırlamada kullanılan tüm yardımcı maddelerin tek başına ve etkin maddemiz olan insülin ile 1:1 oranındaki karışımları kullanarak gerçekleştirildi.

İnsülinin kolesterol ile karışımında kolesterol piki 150°C'de, PEG-PE 2000 ile olan karışımda PEG-PE2000 piki 55,6°C'de, DOPE ile olan karışımda DOPE piki 120,9°C'de, PVA ile olan karışımda PVA piki 193°C'de, DOPS ile olan karışımda DOPS piki 42°C'de, PLGA ile olan karışımda PLGA piki 42,5°C'de, CaCl₂ ile olan karışımda CaCl₂ piki 227°C'de gözlenmiştir. Bizim çalışmamızda insülinin çözeltisi kullanılmış olup toz olmaması sebebiyle yardımcı madde pikleri değerlendirilmiştir.

Sarmiento ve arkadaşlarının yapmış olduğu insülin yüklü aljinat nanopartiküllerinin DSC ile karakterizasyonu çalışmasında insülinin, kullanılan polimerlerin ve karışımlarının, insülin yüklü nanopartiküllerin verdiği pikler belirlenmiş ve insülin için pikin 48,1°C'de olduğu belirtilmiştir [142].

Bölüm 4.1.2'de verilen DSC termogramları incelendiğinde, etkin madde ve yardımcı madde karışımlarının hiç birinde etkin madde yardımcı madde etkileşimine rastlanmamıştır. Bu sonuçlar da bize hazırlanan formülasyonların uygun, etkin ve güvenilir olduğunu göstermiştir.

5.1.3. MTT yöntemine ait bulguların değerlendirilmesi

Hücre kültür çalışmaları yapılmadan önce, deneylerde kullanılması düşünülen maddelerin hücreler üzerindeki sitotoksik etkileri incelenmeli, deneylerde kullanılacak etkin ve yardımcı madde miktarları buna göre seçilmelidir.

Sitotoksosite testi sonucunda hücre canlılık oranları % 50'nin üzerinde olmalıdır [143].

Hücrelerin canlılık oranlarının değerlendirilmesinde en yaygın kullanılan metod MTT testidir. MTT testi kolorimetrik bir yöntemdir. MTT testinin esası, sarı renkli çözünebilir özellikteki MTT boyasının, metabolik olarak aktif olan hücrelerin mitokondrilerinde bulunan süksinat dehidrogenaz (SDH) enzimi ile koyu mavi renkli çözünmez özellikteki formazan ürününe dönüşmesidir. Oluşan formazan ürünü çözünür hale getirilir ve oluşan mor renk spektrofotometrik olarak ölçülür.

MTT testleri Bölüm 3.2.1'de anlatıldığı gibi geçiş çalışmalarının gerçekleştirildiği pankreatik beta TC hücreleri kullanılarak yapıldı. Amaç, hücrelerden geçiş çalışmasını yapacağımız çözelti, lipozom, nanokohleat ve nanopartikül formülasyonlarını oluşturan etkin ve yardımcı maddelerin, hücreler canlı kalacak şekilde, maksimum hangi miktarlarda kullanabileceğinin görülmesidir.

Çalışmamızda lipozom, nanokohleat ve nanopartikül formülasyonu çalıştığımız ve uzun süreli etki görmeyi amaçladığımız için MTT testinin 48 saat için yapılmasına karar verilmiştir. Test sonuçları 48 saat hücrelerin canlı kalabildiğini göstermiş olduğundan, hücre kültürlerinden geçiş çalışmaları 48 saat gerçekleştirilmiştir.

İnsülin için, 2, 8, 10, 20 IU/mL derişimlerde, benzalkonyum klorür için, % 10'luk çözeltisinden 10 µL, 5 µL ve 1 µL olacak şekilde alınarak DMEM ile ayrı ayrı hazırlandı.

Lipozom, nanokohleat ve nanopartikül formülasyonları ise % 75, % 50 ve % 25 olacak şekilde DMEM ile ayrı ayrı hazırlanarak MTT testine tabi tutuldu.

Hücre kültür kaplarında MTT testi sonucunda meydana gelen renk değişimleri gözlemlendi. Test sonucunda hücre kontrol gruplarının mor renkte olduğu görüldü. Mor renkli hücre kontrol gruplarıyla aynı renkte olan kısımlardaki madde konsantrasyonlarının toksik etki meydana getirmediklerine bakılarak veya meydana gelen mor renk tonunun hücre kontrol grubuna yakınlığına bağlı olarak meydana gelen toksik etkiyi kantitatif olarak değerlendirmek mümkündür. Test

sonucu şeffaf renk oluşumuna neden olan madde derişimlerinin toksik olduğuna karar verilebilir. Kültür kaplarında gözle görülebilen renk değişimi bir ön izlenim vermesine rağmen bu yeterli değildir. Analiz sonucunda elde edilen absorbans değerlerinden hareketle hesaplanan yüzde canlılık değerlerinin derişime karşı grafiğe geçirilmesiyle elde edilen grafiklerle kesin kantitatif sonuçlar elde edilmiştir.

Yapılan literatür taramasında insülin ve benzalkonyum klorür için herhangi bir hücre tipi üzerinde yapılan MTT testi sonuçlarına rastlanmamıştır. İnsülinin pankreatik beta TC hücrelerindeki yüzde canlılık değerleri incelendiğinde, insülinin derişimi arttıkça yüzde canlılık değerlerinin azaldığı gözlenmiştir. 10 IU/mL insülin çözeltisi ile yüzde canlılık % 94,2 olarak bulunmuştur. Formülasyonlar bu derişim kullanılarak hazırlanmış olup, hücre kültüründen geçiş çalışmalarında da kullanılmak üzere insülinin derişimi 10 IU/mL olarak karar verilmiştir. Literatürlerde de benzer şekilde sitotoksikite testleri yapılmış olup % 50'nin üzerindeki canlılık oranının uygun olduğu bildirilmiştir [145,146].

Benzalkonyum klorür için pankreatik beta TC hücrelerinde MTT testi yapmadan önce başka hücre çeşidi olan L-929 hücresinde test uygulanmış olup derişim arttıkça yüzde canlılığın azaldığı gözlenmiştir. L-929 hücreleri fare fibroblast hücresi olup birçok örneğin sitotoksik konsantrasyonlarını belirlemede sıklıkla kullanılırlar [144]. Ayrıca uluslararası standartlar (ISO 10993 part 5, 1999; ISO 7405, 1997) tarafından sitotoksikite testi için referans hücre olarak gösterilirler [144,147].

Ayrıca benzalkonyum klorür, katyonik lipozom ve nanokohleatların yapımında kullanılmıştır. Ölçülen zeta potansiyel değerlerinin 5 µL benzalkonyum klorür kullanıldığında olumlu sonuç vermesi neticesinde formülasyonlarda 5 µL kullanılmasına karar verilmiştir. Pankreatik beta TC hücrelerinde de 5 µL kullanılan benzalkonyum klorür % 96,2 canlılık göstermiştir.

Hazırlanan formülasyonların en derişik (% 75) olanlarda bile yüzde canlılık değerleri % 90'ın üzerinde bulunmuştur. Geçiş çalışmalarında kullanılacak formülasyonların MTT testine tabi tutulduktan sonra elde edilen yüksek % canlılık

değerleri, formülasyonların güvenle, hücre canlılığını düşürmeksizin kullanabileceğini göstermiştir.

5.1.4. İn vitro ve in vivo çalışmalarda kullanılan lipozomların karakterizasyonuna ait bulguların değerlendirilmesi

Literatürlere baktığımızda insülin ile hazırlanmış katyonik lipozom çalışmaları mevcuttur. Genellikle kuru film metodu ile hazırlanan bu lipozomlarda katyonik lipozom elde edebilmek için pozitif yüklü fosfolipitler; Dioleil fosfatidiletanolamin (DOPE), Dioleil trimetilamonyum propan (DOTAP) genellikle kullanılır. Bu lipitlerin yanında lipozomal yapıya sertlik kazandırmak için kolesterol kullanılan çalışmalar da vardır. Ayrıca katyonik ve pegile lipozom elde etmek için DSPE-PEG 2000 genellikle toplam lipitin % 5 molü olacak şekilde kullanılmıştır [148,149,151].

Bizim çalışmamızda da katyonik lipit olarak DOPE kullanılmıştır. Ayrıca yapılan ön formülasyon çalışmalarında DOPE ile yeterince pozitif yük elde edemememiz nedeniyle lipozom formülasyonunda benzalkonyum klorür çözeltisinden sitotoksikite deneyine uygun konsantrasyonda kullanılmıştır.

Çalışmamızda, pegile lipozom elde edildikten sonra pegilasyon tayininde spektrofotometrik yöntem kullanılmıştır. Birçok örnek içindeki pegile farmasötiklerin belirlenmesi ve ölçülmesinde spektrofotometrik, kromatografik yöntemler, ELISA ve radyoaktif işaretleme kullanılmaktadır [150].

Pikrat metodu ile yapılan tayinde pegile lipozomlarda % $68,4 \pm 3,31$ bağlanma yüzdesi bulunmuştur.

Shimada ve arkadaşlarının pikrat metodu ile yaptığı tayinde lipozomlarda % 57 bağlanma bulunmuştur [151]. Bizim çalışmamızda bulunan bağlanma yüzdesi uygun bulunmuştur. Ayrıca pegilasyon, TEM ile çekilen formülasyon görüntülerinde de görülmektedir.

Çalışmamızda insülin içeren katyonik lipozomların karakterizasyonuna baktığımızda, partikül büyüklüğü 215 nm, zeta potansiyeli 27,3 mV, enkapsülasyon verimleri % 66,0 bulunmuştur. Pegile lipozomların ise partikül

büyükülüğü 226 nm, zeta potansiyeli 21,9 mV, enkapsülasyon verimleri % 62,2 bulunmuştur.

Literatürlere baktığımızda, lipit olarak DOTAP, DOPE ve kolesterol kullanılarak insülin ile hazırlanmış katyonik lipozomların partikül büyüklüğü 265,4 nm ile 334,9 nm arasında değişmiştir. Lipitlerin farklı oranda kullanımı ile bu değişiklik elde edilmiştir. Zeta potansiyellerine baktığımızda ise 0,81 mV ile 9,67 mV arasında farklı değerler elde edilmiştir. Yine aynı çalışmada fosfat tamponu ile hidrate edilen lipozomlarda enkapsülasyon verimi % 50,3 olarak bulunmuştur [148].

PEG kaplanmış katyonik lipozomlar ile yapılan bir çalışmada ise lipit olarak DOPE ve kolesterol aynı oranda kullanılarak lipozomlar hazırlanmış ve karakterizasyon çalışması yapılmıştır. Partikül büyüklüğü 116,2 nm zeta potansiyeli 29,5 mV olarak bulunmuştur ancak enkapsülasyon verimi ile ilgili bir bilgi yoktur [149].

Tez çalışmamızda kullandığımız lipitler ile yapılan ve yukarıda bahsedilen çalışmalarda enkapsülasyon verimleri ve zeta potansiyel değerleri bizim çalışmamızda hazırlanan lipozomlara göre düşük, partikül büyüklükleri ise bir çalışmada yüksek diğer çalışmada ise düşük bulunmuştur. Bu tip farkların, kullanılan lipit ve etkin madde kaynağı farklarından, laboratuvar koşullarından ve kullanılan aletlerden kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

6-lauroksiheksil lizinat (LHLN) ile yapılmış başka bir çalışmada, katyonik lipozomların hazırlanmasında da DOPE fosfolipit olarak kullanılmış ve bu lipozomların pozitif yükü nedeniyle negatif yüklü olan hücre membranı ile etkileşiminin daha yüksek olacağı düşünülmüş ve pulmoner yoldan etkinliği incelenmiştir. Karakterizasyon çalışmasında, partikül büyüklüğü 120,6 nm, zeta potansiyeli ise 38,9 mV olarak bulunmuştur [152].

Ayrıca, Lasic tarafından yayınlanan bir derlemede, lipozomlarda enkapsülasyon veriminin teorik olarak % 70'in üzerinde olabileceğinin düşünülmesine karşın, bu değer deneyssel olarak hiçbir zaman sağlanamadığı belirtilmiştir. % 50 civarında bulunan enkapsülasyon veriminin yüksek bir sonuç olduğu kabul edilmiştir [153].

Çalışmamızda, diğer etkin maddemiz EKH ile hazırlanan lipozomların partikül büyüklüğü 319 nm, zeta potansiyeli 24,3 mV, enkapsülasyon verimleri % 53,1 bulunmuştur. Pegile lipozomların ise partikül büyüklüğü 226 nm, zeta potansiyeli 20,7 mV, enkapsülasyon verimleri % 52,7 bulunmuştur. Enkapsülasyon verimleri hem Lowry metoduna göre hem hücre sayımı ile hem de Western blot analizi ile yapılmış ve tüm sonuçlar birbiriyle uyumlu çıkmıştır.

EKH ile yapılan çalışmalara baktığımızda lipozom formülasyonu ile yapılan bir çalışmaya rastlanmamıştır.

5.1.5. İn vitro ve in vivo çalışmalarda kullanılan nanokohleatların karakterizasyonuna ait bulguların değerlendirilmesi

Nanokohleatlar ilaç taşıyıcı sistemler olarak diğer taşıyıcı sistemlere nazaran çok daha yeni kullanılan sistemlerdir. Nanokohleatlar ile ilgili literatür taraması yapıldığında, çok fazla çalışmaya rastlamak mümkün olmamakla birlikte genellikle oral yolla kullanılacak ilaçların taşınması ile ilgili çalışmalar mevcuttur. Genellikle benzer hazırlama yöntemleri karşımıza çıkmaktadır. Çalışmaların çoğunda, hidrojel metodu olarak belirtilen, katyonik bir lipid olan dioleil fosfatidil serin (DOPS) ile hazırlanan lipozom süspansiyonuna dekstran (% 20-% 40 a/h) disperse edilerek PEG 8000 (% 15 a/a) gibi yoğun viskoziteli bir çözeltiyle karıştırılması ve bir süre sonra CaCl_2 gibi katyon içeren bir çözeltinin damla damla ilave edilirken karıştırılması şeklindedir. Ayrıca trapping (yakalama) metodu olarak da belirtilen DOPS lipozom süspansiyonuna CaCl_2 çözeltisinin damlatılarak nanokohleatların elde edilmesi de literatürlerde belirtilen yöntemdir [90,94,97].

Nanokohleatların pegilasyonuna baktığımızda ise bağlanma yüzdesi ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bizim pegile nanokohleat formülasyonumuzda % $60,9 \pm 2,14$ bağlanma yüzdesi bulunmuştur.

Nanokohleatların karakterizasyonunu değerlendirdiğimizde, yapılan bir çalışmada, fosfolipit olarak DOPS kullanılarak polilizin ve tobramisin ile CaCl_2 , EDTA gibi farklı maddeler kullanılarak nanokohleatlar hazırlanmıştır. Farklı Polilizin: lipozom oranları (4:1 ve 3:1) kullanılarak farklı partikül büyüklüğü değerleri elde edilmiştir.

Sırasıyla $111,3 \pm 57,8$ ve $160,1 \pm 88,9$ olarak bildirmişlerdir. Partikül büyüklüklerin arasındaki bu farkın anlamlı olmadığını belirtmişler ve nanometre boyutlarında olan tobramisin yüklü bu nanokohleatların hücre membranlarıyla etkileşiminin çok başarılı olduğunu, antimikrobiyal aktivitesinin yüksek olduğunu söylemişlerdir [97].

Zarif ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise, amfoterisin B model madde olarak seçilmiş ve bu etkin maddeyi içeren piyasa preparatları olan Fungizone® ve Ambisome® ile etkinlikleri karşılaştırılmıştır. Nanokohleatlar yukarıda anlatılan hidrojel metodu ile hazırlanmış partikül büyüklüğü 500 nm olarak belirtilmiştir. *Candida albicans* ile enfekte edilmiş farelere hem oral hem de parenteral olarak verilen nanokohleatlar, Ambisome ve Fungizone ile karşılaştırıldığında aynı dozda daha yüksek etkinlik gösterdiği belirtilmiştir [93].

Segarra ve arkadaşlarının çalışmasında, hazırladıkları nanokohleatların partikül büyüklüğünü 407 ± 233.8 nm olarak bildirmişlerdir. Çalışmamızda elde ettiğimiz partikül büyüklüğünün uygun olduğu düşünülmüştür. Literatürde nanokohleat formülasyonlarının enkapsülasyon verimlerine dair bir veri bulunmamaktadır. Nanokohleatların lipozomlardan hareketle hazırlandığını göz önünde bulundurursak [154] bulunan enkapsülasyon verimlerinin iyi olduğu düşünülmektedir (Çizelge 4.25 ve 4.58).

Nanokohleatların yeni ilaç taşıyıcı sistemler olması nedeniyle taranan literatürlerde insülin ve EKH ile hazırlanan çalışmalara rastlanmamıştır. İnsülin nanokohleatları ve EKH nanokohleatları ilk olarak bizim çalışmamızda yapılmıştır. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçların literatüre katkı veren önemli sonuçlar olduğu düşünülmektedir.

5.1.6. İn vitro ve in vivo çalışmalarda kullanılan nanopartiküllerin karakterizasyonuna ait bulguların değerlendirilmesi

Polimerik nanopartikül yapımında PLGA polimeri ilaçları degradasyondan koruması ve stabilitesini artırması sebebiyle oldukça yaygın kullanılmaktadır [155]. İnsülin ile hazırlanmış PLGA nanopartikülleri, mikroküreleri ile ilgili oldukça yoğun çalışmalar vardır. Özellikle diyabet tedavisinde nanoteknolojinin kullanımı dikkat

çekmektedir. Polimerik nanopartiküllerin oral ve parenteral kullanımı ile etkililiği önemli derecede artırdığı, farmasötik ajanın yüksek konsantrasyonda istenilen bölgeye ulaşmasını sağladığı belirtilmiştir. Bu nedenle de diyabet tedavisinde ideal sistemler olduğu söylenmektedir [156].

PLGA, poli laktik asit ve poli glikolik asidin kopolimeridir. PLGA'nın biyoparçalanma derecesi laktik ve glikolik asitin polimer zincirindeki molar oranlarına bağlıdır. PLA ve PGA'nın çeşitli oranlarda bir araya gelmesinden oluşan PLGA'ların parçalanma hızı ve ilacın salım yüzdesi de değişmektedir. Bizim çalışmamızda FDA onaylı polimer olan PLGA (50:50) kullanılmıştır. Bu polimer, çalışmalarda çok sık kullanılması, parçalanma hızının PLA ve PGA polimerlerinin diğer oranlarda birleşmesiyle oluşan PLGA kopolimerine göre ortalama bir değer göstermesi [119] ve birçok protein yüklü nanopartikül hazırlanmasında [120] tercih edilen bir polimer olması nedeniyle çalışmamızda tercih edilmiştir.

PLGA nanopartikülleri çoğunlukla emülsifikasyon-solvan uçurma tekniği ile hazırlanmaktadır. Sürfaktanın (ör. PVA, Polisorbat-80) organik solvanda çözünen polimere eklenmesi ve ardından organik solvanın uçurulması ile elde edilirler [155]. Bizim de bu yöntemi kullanarak hazırladığımız insülin içeren nanopartiküllerin partikül büyüklüğü $713 \pm 0,036$ nm, zeta potansiyeli $3,60 \pm 0,96$ mV, enkapsülasyon verimleri % 50,1 bulunmuştur.

Zhang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada insülin yüklü PLGA nanopartiküllerin partikül büyüklüğü 121,3 nm, zeta potansiyeli -1,72 mV olarak belirtilmiştir. Çalışmada biyoadhezif yapıyı sağlamak için nanopartiküller kitozan ile kaplanmış ve bu nanopartiküllerin partikül büyüklüğü 134,4 nm, zeta potansiyeli 43,1 mV olarak bulunmuştur. Enkapsülasyon etkinliği ise bizim de çalışmamızda kullandığımız yöntem olan nanopartiküllerin santrifüj sonrası üstteki berrak kısımdan serbest insülinin belirlenmesi ile hesaplanmış ve sırasıyla % 46,9 ve % 52,8 olarak bulunmuştur [157]. İnsülin yüklü PLGA nanopartiküllerinin diyabetik sıçanlar üzerindeki in vitro etkinliğinin incelendiği bir başka çalışmada, nanopartiküllerin partikül büyüklükleri 130 ile 180 nm arasında, zeta potansiyelleri ise -2,5 ile -5,4 mV arasında değişmektedir. % 80'lerde olan enkapsülasyon verimi ise pH 7,4 PBS ortamında salınan insülin miktarını yüksek tutmuştur (% 86 ± 6) [158].

Zeta potansiyelin pozitif elde edilmesi negatif yüklü olan hücre membranı ile etkileşim açısından önemlidir ve bizim çalışmamızda elde ettiğimiz zeta potansiyel değerleri yukarıda bahsedilen çalışmalardaki değerlere nazaran uygun bulunmuştur.

Başka bir çalışmada, katyonik aljinat/kitozan nanopartiküllerine katyonik β -siklodekstrin ile insülin kompleksi yüklenmiş ve kontrollü salımı araştırılmıştır. İnsülin yüklü nanopartikülün partikül büyüklüğü 750 nm olarak belirtilmiştir. Zeta potansiyeli -28 mV olan insülinin zeta potansiyel değeri β -siklodekstrin ile kompleks yapımının ardından -0,4 mV 'a kadar çıkmıştır. Değişen oranlarda kullanılan aljinat/kitozan polimerleri ile enkapsülasyon verimi % 58'lerden % 80'e kadar artırılmıştır [34].

Çalışmamızda diğer etkin maddemiz olan EKH ile hazırlanan nanopartiküllerin partikül büyüklüğü $0,672 \pm 0,007 \mu\text{m}$, zeta potansiyeli $4,20 \text{ mV} \pm 0,050$, enkapsülasyon verimi ise % 50,7 bulunmuştur.

Literatürlere baktığımızda, EKH ile hazırlanan nanopartiküler sisteme rastlanmamıştır. Ancak yapılan bir çalışmada kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre kullanılarak demir oksit nanopartikülleri farklı boyutlarda ve yüzey özelliklerinde hazırlanmıştır. Hücrelerin nanopartiküle etiketlenme etkinliğinin incelendiği bu çalışmada, pullulan polimer olarak kullanılmıştır. Partikül büyüklüğü demir oksit-pullulan oranının değişimine bağlı olarak 200-250 nm arasında değişmiştir. Pullulan ve türevlerinin kullanıldığı nanopartiküllerde 100 nm'den az bulunmuştur. Zeta potansiyeli yaklaşık 12 mV olarak belirtilmiştir. Nanopartiküllerin küçük yapıları ve pozitif yükleri nedeniyle mezenkimal kök hücre içersine % 70 oranında giriş yapmıştır [159].

Bizim çalışmamızda nanopartiküllerimizin daha büyük boyutlarda olmasının, embriyonik kök hücresinin mikrometre boyutlarında olması [160,161] ve hücre içine nanopartiküllerin girmesi ve yüzeyine adsorbe olmasından ileri geldiği düşünülmüştür. Sadece nanopartiküller için değil diğer hazırladığımız lipozomlar ve nanokohleatların da TEM'deki görüntüleri göz önüne alındığında pozitif yükün

etkisini de düşünerek hücre içerisine girdiği hem de hücre yüzeyine adsorbe olduğu şeklinde yorumlanmıştır.

5.1.7. İn vitro ve in vivo çalışmalarda kullanılan formülasyonların stabilitesine ait bulguların değerlendirilmesi

İnsülin ile hazırlanan lipozom ve pegile lipozom formülasyonları ile 6 ay süreyle 4°C ve 25°C'de stabilite çalışması yapılmıştır. Bu sıcaklıklarda saklanan lipozomların her ay etkin madde miktar tayinleri yapıldı. Her ay yapılan ölçümlerle yüzde bozunmadan kalan etkin madde miktarları hesaplandı. Bu hesaplanan veriler kullanılarak elde edilen profiller kinetik açıdan değerlendirilerek hangi kinetiğe uygun olarak bozundukları uyum ölçütleri göz önünde bulundurularak hesaplanmıştır.

Bölüm 4.1.7'de verilen her iki lipozom formülasyonuna ait raf ömürleri incelendiğinde sıcaklığın artışı ile raf ömrünün azaldığı gözlenmiştir. Katyonik insülin lipozomlarının raf ömrünün daha yüksek olduğu görülmektedir.

Lipozom formülasyonlarında özellikle 25°C sıcaklıklarda partikül büyüklüklerinin zamanla arttığı gözlenmiştir. Bunun nedeni olarak lipozomların birleşmeye meyil gösteren formülasyonlar olmalarından kaynaklanmaktadır. Zamanla birleşen veziküllerin partikül büyüklükleri artmıştır. Ayrıca etkin madde miktarındaki azalış özellikle 25°C'de bekletilen formülasyonlar için daha net görülmektedir.

Lipozom formülasyonlarının katyonik yapıları nedeniyle zeta potansiyelleri stabilite çalışmalarına başlarken pozitif olarak ölçülmüştür. Altıncı ayın sonunda da pozitif zeta potansiyel değerlerine sahip olmalarına karşın özellikle 25°C sıcaklıkta bekletilen formülasyonlarda belirgin düşüş gözlenmektedir.

Yapılan stabilite çalışmaları incelendiğinde Amfoterisin B'nin katyonik lipozom formu hazırlanmış ve yaklaşık bir yıl gözlenmiştir. Çözelti formülasyonunun raf ömrü 4 gün, Amfoterisin B lipozomunun liyofilize toz formununun raf ömrü 14 gün olarak belirtilmiştir [177]. Dolayısıyla tezde elde edilen raf ömürlerinin literatüre uygun olduğu düşünülmüştür.

İnsülin ile hazırlanan nanokohleat ve pegile nanokohleat formülasyonları 6 ay süreyle 4°C ve 25°C sıcaklıklarda stabilite çalışmasına tabi tutulmuştur. Lipozomlarda da olduğu gibi her ay etkin madde miktar tayinleri yapıldı. Her ay yapılan ölçümlerle yüzde bozunmadan kalan etkin madde miktarları hesaplandı. Bu hesaplanan veriler kullanılarak elde edilen profiller kinetik açıdan değerlendirilerek hangi kinetiğe uygun olarak bozundukları uyum ölçütleri göz önünde bulundurularak hesaplanmıştır.

Bölüm 4.1.7’de verilen her iki nanokohleat formülasyona ait raf ömürlerine bakıldığında sıcaklığın artışı ile raf ömrünün azaldığı gözlenmiştir. Özellikle 4.aydan itibaren de madde miktarında daha fazla düşüş gözlenmiştir. Bunun 6. ayın sonunda fotoğraflarda da izlendiği gibi sarmal yapılı nanokohleatların, zamanla uçlardan kopma ve etkin maddeyi sızdırmasına bağlı olduğu düşünülmüştür. Ayrıca pegile formülasyonların fotoğraflarında pegilasyonun varlığı gözlenmekle birlikte baştaki formülasyonların hazırlandığı zaman var olan pegilasyonun varlığının azaldığını görmekteyiz.

Yapılan çalışmalara bakıldığında nanokohleat taşıyıcı sistemine yüklenmiş insülin formülasyonu daha önce hazırlanmamıştır. Nanokohleatlar çok yeni taşıyıcı sistemler olmakla birlikte daha çok model maddeler kullanılarak oral kullanımına yönelik çalışmalar mevcuttur.

İnsülin yüklü nanopartiküllerin stabilite çalışmalarına baktığımızda partikül büyüklüğünün sıcaklığın artışı ile 6 ayın sonunda daha çok arttığını gözlemekteyiz. Zeta potansiyel değerleri amacımıza uygun olarak pozitif elde edilse de sıcaklığın ve zamanın etkisi olarak azalmaktadır.

Yapılan bir çalışmada PLGA ile hazırlanan bevacizumab nanopartiküllerinin 6 hafta kadar stabilitesi partikül büyüklüğü ve zeta potansiyeli incelenerek değerlendirilmiş ve 5. haftanın sonunda partikül büyüklüğünde anlamlı bir artış ve zeta potansiyelinde ise 3. haftanın sonunda anlamlı kabul edilen bir azalma gözlenmiştir. Partiküllerin agregasyonu ile partikül büyüklüğünde artış ve yüzeyinin negatif olduğu belirtilmiştir [163].

Tüm formülasyonlarımızı karşılaştırdığımızda insülin ile hazırlanan lipozom formülasyonu raf ömrü en uzun formülasyondur (Çizelge 4.26). Bulgular bölümünde stabilite öncesinde ve sonrasında çekilen TEM fotoğraflarında nanokohleatlar incelendiğinde $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan nanokohleatların çubuk şeklinde spiral yapısını $+25^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan nanokohleatlara göre daha iyi koruduğu gözlenmiştir. Nanokohleat formülasyonlarının stabilite sonunda çekilen TEM görüntülerinde sıcaklığın ve zamanın etkisine bağlı olarak kopma, sızıntı gibi olumsuzluklar görülmektedir. $+4^{\circ}\text{C}$ 'de bekletilen nanokohleat formülasyonu diğer sıcaklıklardaki formülasyonlara nazaran daha iyi durumda olduğu düşünülse de lipozom formülasyonlarının fotoğraflarında veziküler yapısını, bütünlüğünü koruduğu daha net gözlenmektedir. Bunun nedeninin benzalkonyum klorürün aynı zamanda koruyucu olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bunların yanında, bir diğer formülasyonumuz, nanopartiküllerin $+4^{\circ}\text{C}$ 'de etkin madde kaybının az olduğu, yapısını daha iyi koruduğu, $+25^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan nanopartiküllerde etkin madde sızıntısı TEM fotoğraflarında belirgin şekilde görülmektedir.

EKH ile hazırlanan formülasyonların 6 ay boyunca partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel değerleri ölçülmüştür. Buradaki amacımız formülasyonların bu süre boyunca karakterizasyonundaki değişimi gözlemlemektir. Sahip oldukları pozitif yükü kaybetmedikleri ve partikül büyüklüğünde özellikle sıcaklığın artışı ile artış gözlenmiştir.

Her ay etkin madde olan EKH miktar tayini yapmak mümkün olmamıştır. Çünkü formülasyonlar embriyonik kök hücre ile inkübasyona bırakılarak hazırlanmıştır. Uzun vadeli olarak bu formülasyonların beklemesi mümkün görünmemektir. Ölen hücrelerin bıraktığı protein kalıntılarını tespit edebileceğimizi düşündüğümüz için miktar tayini her ay olacak şekilde 6 ay boyunca yapılmamıştır. Sadece 6. ayın sonundaki TEM'de çekilmiş resimler incelenmiştir. Bu kadar uzun süre beklemiş hücreler artık canlı değildir ve formülasyonların etrafında öbekler oluşturarak yığılmışlardır. Özellikle sıcaklığın arttığı resimlerde hem formülasyonlar kendi yapısal özelliklerini kaybetmeye başlamış hem de etrafında yığılmış hücreler çoğalmıştır.

Kendisini yenileme gücüne sahip olan kök hücreler, diğer hücre türleri için tükenmez bir kaynak görevi üstlenmektedirler. Gerekli ortam sağlandığında bu hücreler bilinen yaklaşık 200 hücre türüne dönüşebilmektedirler. Laboratuvar koşullarında da gerekli ortam ve sinyaller sağlandığında çok daha fazla hücre türüne dönüşebileceklerdir. Ancak bunu farklı sıcaklık ve nem bulunan ortamlarda ve uzun süre kültür ortamı değişimi olmadan yaşayamazlar, değişik hücre türlerine dönüşemezler. Bu nedenle EKH ile hazırlanan formülasyonların inkübasyon yolu ile hazırlanmaları da göz önüne alınarak uzun süreli bekletilemez oldukları düşünülmüştür.

5.1.8. İnsülinin in vitro geçiş çalışmalarına ait bulguların değerlendirilmesi

Diyaliz membrandan salım çalışmalarına ait bulguların değerlendirilmesi

Diyaliz membrandan insülin çözeltisi, insülin lipozomu, insülin pegile lipozomu, insülin nanopartikülü, insülin nanokohleat ve pegile nanokohleatı ile geçiş çalışmaları pH 7,4 fosfat tamponu ortamında yapılmış ve elde edilen yüzde kümülatif salınan insülin miktarları bulunmuştur.

Formülasyonların diyaliz membrandan geçiş çalışmalarının ardından yapılan kinetik hesaplamalarla, Bölüm 4.1.7’de verilen çizelgeler elde edilmiştir. Kinetik türü seçerken r^2 ve SKT uyum ölçütleri göz önüne alınmıştır. Formülasyonların hepsinin RRSBW salım kinetiğine uygun olduğu görülmüştür. RRSBW salım kinetiğine göre, şekil faktörü (β), korelasyon katsayısı, sapma kareleri toplama ve zamana karşı vitro geçişten elde edilen veri grafiğindeki ilk ve son eğim önemlidir. Çalışmanın başında elde edilen dik eğim son kısmında artık düzleşerek kuyruk şeklini alır [164,165].

Yapılan bir çalışmada piroksikam ile hazırlanan Eudragit® RS nanopartiküllerinden etkin madde salım çalışması yapılmış ve uyum gösteren kinetik modeli belirlemek için kinetik modeller araştırılmıştır. Çalışma sonundaki elde edilen grafikten ilk zaman aralıklarında hızlı bir salım daha sonra ise düzleşen yavaş bir salım gözlenmiştir. Hesaplanan korelasyon katsayısı ve sapma kareleri toplamına bakılarak en uygun kinetik model olarak RRSBW kinetiği seçilmiştir [166].

Çalışmada, insülin çözeltisinden, lipozomlarından, nanokohleatlarından ve nanopartiküllerinden 48 saat boyunca salım çalışması yapılmış ve sonunda en yüksek salım çözelti formülasyonunundan sonra lipozom ve nanopartikül formülasyonlarından sırasıyla % 72,7 ve % 72,4 olarak elde edilmiştir. Pankreatik beta TC hücrelerinden geçiş ile karşılaştırıldığında; diyaliz membranla yapılan çalışma sonucu elde edilen yüzdeler daha yüksektir ($p < 0,001$). Bunun sebebi hücrenin daha yüksek TEER değerine sahip olması ve pankreatik beta TC hücre tek tabakaları geçişi sınırlayıcı durumda olması şeklinde değerlendirilmiştir.

Yapılan literatür taramalarında, insülin yüklü katı lipit nanopartiküllerden diyaliz membran kullanılarak yapılan pH 7,4 fosfat tamponundan 48 saat süren salım çalışması sonucu, % 39 insülin salımı gözlenmiştir [167].

Diyabetik fareler üzerindeki etkinliğini incelemek için insülin yüklenmiş PLGA nanopartikülleri ile yapılan fosfat tamponu içindeki başka bir salım çalışmasında ise, 5 saat süren salım çalışması sonucunda % salınan insülin miktarı % 86 olarak bulunmuştur [158].

Diğer bir çalışmada ise insülin ile hazırlanan pegile katyonik lipozomlardan pH 7,4 fosfat tamponunda 0,1 μm yarı geçirgen membran kullanılarak 72 saat boyunca salım çalışması yapılmıştır. İlk 30 dakikada patlama etkisi (% 34) gözlenirse de 72 saatin sonunda % 73 salım gözlenmiştir. Bu elde edilen sonucun, katyonik lipozomların insülini kontrollü olarak saldıgını, bunun da tedavide önemli bir yeri olduğunu desteklediği şeklinde yorumlanmıştır [148].

İnsülin yüklü nanokohleatlar ile ilgili literatür taraması yapıldığında ise diyaliz membran kullanılarak yapılan herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Hücre tek tabakası içermeyen filtrelerden geçiş çalışmalarına ait bulguların değerlendirilmesi

Hücre kültüründen geçiş çalışmalarına başlamadan önce hücre içermeyen boş membrandan geçiş yapılması membranın madde geçişine etkisi olup olmadığının anlaşılmasında önemlidir. Bu nedenle insülin çözeltisinin, lipozomlarının,

nanokohleatlarının ve nanopartikülün hücre içermeyen boş membranlardan geçiş çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bölüm 4.1.8'de hücre içermeyen boş membrandan geçiş çalışmalarına ait grafikler verilmiştir.

Sonuçlar incelendiğinde, insülin çözeltisinin en yüksek geçiş gösterdiği görülmektedir (% 82,4) ($p < 0,0001$). Bunun sebebinin, formülasyonun çözelti olması ve çözelti formunun diğer formülasyonlara insülinin daha az yüklenebilmesine bağlı olarak daha yüksek geçiş göstermesi olduğu düşünülmüştür.

Lipozom ve nanokohleat formülasyonlarını kendi içlerinde pegile formları ile karşılaştırdığımızda ise % salınan insülin miktarının anlamlı bir fark oluşturmadığını gözlemledik ($p > 0.05$). Ancak nanopartikül formülasyonu ile elde edilen % salınan insülin miktarı diğer formülasyonlara göre daha az bulunmuştur ($p < 0.01$).

Lipozomları hidrofobik yapıda ve yağ bazlı formülasyonlar olması nedeniyle geçişin çözeltiden sonra en fazla olduğu formülasyon olarak değerlendirmek mümkündür. Nanokohleatlar ise lipozomdan hareketle hazırlanırlar ve aynı şekilde düşünmek mümkündür. Nanopartiküller ise su bazlı yapıda olmaları nedeniyle hem hücre içermeyen hem de hücre içeren filtrelerden geçişlerinin daha az olduğu görülmektedir.

İnsülinin pankreatik beta TC hücrelerinden geçiş çalışmalarına ait bulguların değerlendirilmesi

İnsülinin pankreatik beta TC hücrelerinden geçişini incelemeye başlamadan önce literatür taraması yapılarak, pankreatik beta TC hücrelerinin inkübasyon süresine ve hücre ekim yoğunluğuna karar verildi. Literatür taraması sonucunda 3 gün inkübe edilen pankreatik beta TC hücrelerinin $2,5 \times 10^5$ hücre/kuyucuk yoğunlukta kullanılmasına karar verildi [168].

Bölüm 4.1.8'de grafiklerle belirtilen sonuçlara göre; insülin çözeltisinin 48 saatin sonunda apikal kısımdan bazolateral kısma yüzde kümülatif insülin geçişi en

yüksektir. Çözeltiden sonra diğer formülasyonlara bakıldığında lipozomlardan daha fazla insülin geçişi elde edilmiştir.

Literatür taraması yapıldığında, hücre kültüründen ilaç geçişi yapılmış bir çalışmada insülin ve permeasyon artırıcı sodyum taurokolat (NaTC) ile hazırlanan lipozomların Caco-2 hücrelerinden geçiş çalışması yapılmış ve sadece 40 IU /mL insülin içeren lipozomlardan 30 saatin sonunda yaklaşık % 18, NaTC içeren lipozomlarda ise % 29'larda salım gözlenmiştir [24].

Başka bir çalışmada ise, tavşan nazal mukozası kullanılarak yapılan in vitro çalışmada çeşitli ortamlarda ve absorpsiyon artırıcılar kullanılarak insülin çözeltileri hazırlanmış ve artan absorpsiyon artırıcılarına karşılık mukoza membranından geçen insülin miktarı da artış göstermiştir. En fazla yüzde geçen insülin miktarı % 0,13 olarak belirtilmiştir [169].

Bu çalışmalarda elde edilen sonuçlara bakıldığında, bizim çalışmamızdaki pankreatik hücreden insülin geçişleri oldukça yüksektir. Pankreatik beta TC hücreleri kullanılarak yapılmış geçiş çalışmasına literatürlerde rastlanmamıştır. Bu nedenle de çalışmamızda elde edilen bulguların önemli bir veri olarak literatürlere gireceği düşünülmektedir.

İnsülinin pankreatik beta TC hücrelerinden geçirgenlik katsayısına ait bulguların değerlendirilmesi

Formülasyonlarımızdan elde ettiğimiz geçirgenlik katsayılarına bakıldığında, en yüksek geçirgenlik katsayısı katyonik lipozomlarda daha sonra ise pegile katyonik lipozomlarda görülmüştür. Bunun nedeni olarak lipozomların membran yapısına daha benzer bir yapıda olması ve hücre tabakasına daha iyi penetre olduğu şeklinde değerlendirilmiştir.

Pankreatik beta TC elektriksel dirençlerine ait bulguların değerlendirilmesi

48 saatlik pankreatik beta TC hücreleriyle geçiş deneylerinin öncesinde ve tamamlanmasından hemen sonra TEER değerleri ölçülmüş, hiçbir formülasyon

geçiş yapılmadan önce ölçülen hücrelerin TEER değerleri ile kıyaslanarak sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Bölüm 4.1.8'de belirtilen elektriksel direnç değerleri incelendiğinde hücrelerin başlangıç TEER değeri 79 Ω olarak ölçüldü. Boş membranın TEER değeri ise 0 - 5 Ω arasında bulundu. Bu sonuç bize üzerinde hücre tabakası olmayan boş membranın direnç göstermediği bulgusuna ulaştırdı.

İnsülin içeren lipozomların, nanokohleatların ve nanopartiküllerin geçişlerinin yapıldığı hücre membranlarından yapılan ölçümler sonucu lipozom ile geçiş sonucu direnç 57 Ω , pegile lipozom ile geçiş sonrası ise 64 Ω olarak ölçülmüştür. Diğer nanokohleat, nanopartikül ve çözelti formülasyonlarına baktığımızda lipozom formülasyonlarında elektriksel dirençte en fazla düşüş olduğu gözlenmiştir ($p<0.01$). Geçirgenlik katsayıları da göz önünde bulundurulduğunda lipozom formülasyonları, direncin daha düşük olması sonucu en iyi geçirgenliği göstermişlerdir. Elde edilen TEER değerleri permeabilite katsayıları ile birlikte değerlendirildiğinde, birbirleriyle uyumlu oldukları gözlenmiştir. Lipozomun yapısında bulunan fosfolipitlerin varlığı nedeniyle hücre membranı ile benzerlik göstermesinin, bu sonuçların elde edilmesinin nedeni olduğu düşünülmektedir.

5.1.9. Glukoz ve insülin tayini sonucu elde edilen bulguların değerlendirilmesi

Pankreatik beta TC hücreleri ile üç grup oluşturularak çalışma yapılmıştır. Kontrol grubuna hiçbir işlem yapılmamış olup sadece başlangıç glukoz ve insülin miktar tayini yapılmıştır. Diğer iki gruptan da alınan örnekler ile glukoz ve insülin miktar tayini yapılmıştır. 25 mM glukoz içeren KRB çözeltisi ile stimüle edilen grupta kontrol grubuna göre anlamlı farklılık oluşturan glukoz artışı gözlemlenmiştir ($p<0.0001$). Streptozosin çözeltisi ile inhibe edilen üçüncü grupta da glukoz artışında kontrol grubuna göre anlamlı farklılık gözlenmiştir ($p<0.002$).

Yapılan literatür taramalarında, streptozosin ile inhibisyonda glukoz seviyesinin 250 mg/dL'nin üstüne çıkması diyabetik hücreler oluştuğunu göstermiştir [170,171]. Streptozosin ile muamele sonucu ölçülen glukoz miktarı 257,7 mg/dL

olarak bulunmuştur. Bu aşamadan sonra hücrelere uygulanan insülin ve EKH ile hazırlanan formülasyonların 48 saat pankreatik hücrelerle muamele sonrasında alınan örneklerin glukoz ve insülin miktarları ölçülmüştür. Başlangıçtaki pankreatik hücrelerin glukoz miktarı, glukozla indüklenen ikinci grup hücrelere uygulanan insülin lipozom ve pegile lipozom formülasyonları ve EKH lipozom formülasyonu kontrol grubu ile anlamlı olmayan fark oluşturmuştur ($p < 0,1$).

Üçüncü grup olan streptozosin ile inhibe edilmiş hücrelerde ise insülin lipozom ve pegile lipozom formülasyonları ile glukoz miktarı kontrol grubu ile anlamlı fark oluşturmayan seviyelere düşmüştür ($p < 0,1$).

İnsülin tayininde ise insülin miktarında pankreatik beta TC hücrelerinin 25 mM glukoz içeren KRB çözeltisi ve streptozosin çözeltisi ile muamele sonrasında beklendiği şekilde başlangıç miktarına kıyasla insülin miktarında oldukça anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($p < 0,0001$).

İnsülin ve EKH ile hazırlanan formülasyonlarla pankreatik beta TC hücrelerinin 48 saat boyunca muamelesi sonrasında başlangıçtaki ölçülen kontrol grubu insülin miktarına en yakın, glukozla indüklenmiş gruba uygulanan insülin lipozom ve pegile lipozom formülasyonları ile streptozosin ile inhibe edilmiş gruba uygulanan EKH lipozom, pegile lipozom ve nanokohleat formülasyonlarıdır. Bu formülasyonlar ile en iyi sonuçlar alınmış olup kontrol grubu ile anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0.05$).

Glukoz ve insülin ölçümleri yapılmış literatürler tarandığında, glukoz ölçümleri için kitler [172] ya da birkaç dakikada ölçüm yapabilen glukometreler kullanılmaktadır [173].

ELISA kiti kullanılarak insülin tayini yapılan bir çalışmada, genistein isimli insülin sekresyonunu artıran biyoaktif bir bileşiğin pankreatik beta TC hücreleri üzerindeki etkisine bakılmıştır. Glukoz içeren KRB çözeltisi ile insülin salgılayan INS-1E hücrelerinin 48 saat muamelesi sonrasında değişen glukoz konsantrasyonlarına göre salınan insülin miktarları kit ile tayin edilmiş ve kullanılan biyoaktif madde genisteinin etkisi değerlendirilmiştir [28]. Dolayısıyla bizim çalışmamızda

kullandığımız kit ile tayin yönteminin güvenilir ve doğru sonuçlar verdiği düşünülmektedir.

5.1.10. Western blot ile analiz sonuçlarının değerlendirilmesi

Embriyonik kök hücreleri, ileri moleküler tanımlama teknikleri (Western blot, immüno floresans konfokal mikroskobu, floresan hareketli hücre sınıflandırma vb.) kullanılarak gösterilebilirler [49].

Tez çalışmamızda, EKH ile hazırlanan formülasyonlarda EKH'nin yükleme etkinliği üç farklı şekilde tespit edilmiştir. Bu yöntemlerden bir tanesi de Western blot yöntemidir. Western blot, aranan proteinin olup olmadığını ve varsa ne kadar olduğunu anlamak için kullanılan bir yöntemdir.

Çalışmamızda, Western blot ile EKH yükleme etkinliği için referans protein olarak β -aktin kullanılmıştır. Aktin, yuvarlak şekilli yapısal bir proteindir. Aktin filamentleri hücreye mekanik destek sağlayarak, hücrenin hareketini sağlar. β -aktin ise aktinin 6 izoformundan biridir ve PCR, Western blot gibi protein analiz yöntemlerinde, hücre bütünlüğünün tayininde sıklıkla kullanılan, 42 kDa ağırlığında bir proteindir [140].

Literatürlerde beta aktin birçok Western blot ile analiz çalışmalarında referans olarak tercih edilmiş olup, bazı çalışmalarda değişen beta aktin konsantrasyonuna göre elde edilen bantların dansiteleri incelenmiş, artan protein konsantrasyonuna bağlı olarak bantların dansitelerinde artış gözlenmiştir [174,175].

Bölüm 3.2.4'te tüm işlem basamaklarının anlatıldığı Western blot ile yapılan çalışmamızın sonunda, membran üzerinde EKH formülasyonlarından ve kontrol grubundan elde edilen bantların dansiteleri hesaplanarak yükleme etkinlikleri yüzde olarak bulunmuş ve Bölüm 4.4'te verilmiştir. Bu elde edilen yüzdeler, diğer yükleme etkinliği yöntemleri olan Lowry metodu ve hücre sayımı ile elde edilen yüzdelerle benzer bulunmuştur.

5.2. İn Vivo Çalışmalara Ait Bulguların Değerlendirilmesi

5.2.1. İnsülin yüklü formülasyonlarla yapılan in vivo çalışmalara ait bulgular

Çalışmamızın başında streptozosin ile diyabetik hale getirilmiş farelere Bölüm 3.2.5'te belirtildiği şekilde insülin yüklü formülasyonlar intraperitoneal olarak verilmiş ve 24 saat boyunca farelerden alınan kandan glukoz ve insülin tayini yapılmıştır. Buna ek olarak da çıkarılan pankreaslarından histopatolojik çalışmalar (Langerhans adacık sayısı, Langerhans adacıkları kapladığı alan, dejenerasyon miktarı vb.) yapılmıştır.

Bölüm 4.5.1'de verilen grafikte de insülin ile hazırlanan lipozom ve pegile lipozom formülasyonları başlangıç konsantrasyonuna en çok yaklaşan gruplar olmuş olup başlangıç konsantrasyonu ile aradaki fark anlamlı bulunmamıştır. ($p>0.001$). Ayrıca bu formülasyonlar 6 saat boyunca glukoz seviyesinde düşüşü sağlamış ardından glukoz miktarı başlangıç konsantrasyonuna dönmüştür.

İnsülin yüklü nanokohleat, pegile nanokohleat ve nanopartikül formülasyonları 4 saat boyunca kandaki glukoz seviyesini düşürmüş ve ardından tekrar yükselme gözlenmiştir. Ancak 24 saatin sonundaki yükselme seviyesi başlangıç konsantrasyonuna tam olarak ulaşamamış olup aradaki fark anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).

İnsülin yüklü lipozom ve pegile lipozom formülasyonları diğer formülasyonlarımıza kıyasla daha uzun süreli insülin salımı göstermişlerdir.

İnsülin konsantrasyonu-zaman grafiğine baktığımızda, hesaplanan eğri altında kalan alan (AUC) değerleri açısından insülin çözeltisi ile lipozom formülasyonları arasında anlamlı olmayan bir fark elde edilmiştir ($p>0,02$). Diğer formülasyonlardan elde edilen AUC değerleri kıyaslandığında ise insülin çözeltisi ile aralarında anlamlı fark oluşmaktadır ($p<0,001$).

Literatürler tarandığında, yapılan bir çalışmada, insülin yüklü lipozomlar sadece insülin yüklü ve absorpsiyon artırıcı olarak sodyum taurokolat (NaTC) da içerecek şekilde iki farklı formülasyon hazırlanmış ve Swiss-Albino dişi farelere

uygulanmıştır. 24 saatin sonunda alınan kan örneklerinden glukoz kiti (Human GmbH) kullanılarak % glukoz tayini yapılmıştır. NaTC içeren lipozomlar en iyi sonuç vermiş olup ok yüksek in vivo in vitro korelasyon vermiştir [24].

Başka bir çalışmada ise yeni bir formülasyon olan kaplı insülin fibriller, lipozomdan hareketle lipit olarak soya fosfatidil kolin (SPC) ve dipalmitoil fosfatidil etanolamin (DPPE) kullanılarak hazırlanmıştır. STZ; 150 mg/kg doz ile diyabetik hale getirilmiş farelere bu formülasyon verildikten sonra kan glukoz miktarları glukometre kullanılarak kuyruktan alınan kan ile ölçülmüştür. 8 saatin sonunda eğri altında kalan (AUC) değerleri hesaplanmış artan glukoz seviyesini düşürdüğü ve kontrol altına aldığı belirtilmiştir [176]. Bu literatürden hareketle insülin ile hazırlanan lipozom formülasyonları ile bizim çalışmamızda da olduğu gibi daha uzun salım elde edilebilmekte ve lipozomların uygun formülasyonlar olduğu düşünülmektedir.

5.2.2. EKH'li formülasyonlarla yapılan in vivo çalışmalara ait bulgular

EKH ile hazırlanan formülasyonlar ve EKH'nin hiçbir formülasyon haline getirilmemiş süspande hali farelere hem intraperitoneal hem de pankreas içi uygulanmış ve sonuçlar değerlendirilmiştir.

Bölüm 4.5.2'de verilen grafiklerde de belirtildiği gibi EKH ile hazırlanan formülasyonların farelere intraperitoneal ve pankreas içi uygulanması sonrası kontrol grubuna en çok yaklaşan formülasyon her iki uygulama yolu için de lipozom formülasyonları olmuştur. Lipozom formülasyonları ile kontrol grubu glukoz miktarlarına bakıldığında aralarındaki farkın anlamlı olmadığı bulunmuştur. ($p>0,005$). Diğer nanokohleat, pegile nanokohleat ve nanopartikül formülasyonlarının uygulanması sonrası ulaşılan glukoz miktarları ise kontrol grubu glukoz miktarına yaklaşmış olsa da anlamlı derecede fark bulunmuştur ($p<0,001$).

Alınan kan örneklerinden formülasyonların farelere verilmesinden 48 saat sonra glukoz ölçümleri yapılmıştır. Lipozom formülasyonunun histopatolojik çalışma sonucu en iyi formülasyon olarak belirlenmesinin ardından hem insülin ile hazırlanan hem de EKH ile hazırlanan lipozom formülasyonunun 48 saatin

sonunda deneyi devam ettirerek ayrıca 300 saat (5 gün) sonundaki alınan kan örneklerinden de glukoz ölçümleri yapılmış ve formülasyonların etkinliği incelenmiştir.

Formülasyonların etkinliği incelenirken aynı zamanda EKH'nin formülasyon haline getirilmemiş süspande hali farelere uygulanmış ve taşıyıcı sistemlerin etkinliği de değerlendirilmiştir.

Grafiklere bakıldığında (Şekil 4.108), insülin yüklü lipozom formülasyonunda 2. günden sonra kandaki glukoz miktarı artmış ve 5. günün sonunda kontrol grubundan daha yüksek seviyede glukoz miktarı bulunmuş olup bu aradaki fark anlamlı bulunmuştur ($p<0,001$).

EKH'nin süspande halde intraperitoneal verilmesinin ardından yine 2. ve 5. günlerde alınan örneklerdeki ölçüm sonucunda hem 2. gündeki hem de 5. gündeki bulunan glukoz miktarları azalmış olsa da kontrol grubuna yaklaşılamamış olup aradaki fark anlamlı bulunmuştur ($p<0,002$).

EKH ile hazırlanmış lipozomlarda ise; 5. günün sonunda bile halen kontrol grubuna yakın ($p>0,005$) seviyelerde glukoz miktarları ölçülmüş, EKH ile hazırlanan lipozomal formülasyonların insülin ile hazırlanan lipozomlara kıyasla daha uzun süre glukoz seviyesini istenilen seviyede tuttuğu şeklinde değerlendirilmiştir. Bu sonuçlar EKH'nin lipozomal yapıdan yavaş salındığı ve hasar görmüş pankreasa ulaşarak oradaki hücre yenilenmesini sağladığı şeklinde yorumlanmıştır.

EKH'ler çok önemli iki özelliğe sahiptir. Bunlardan biri; kendisini yenilerken farklılaşmadan proliferere olabilmesi, diğeri ise farklılaşma için indüklendiği zaman özelleşmiş hücre türleri oluşturma potansiyeline sahip olmasıdır [41]. Bu nedenle EKH'nin diyabetik farelerde hasar görmüş olan pankreasa ulaşarak ve pankreatik beta TC hücrelerine dönüşerek oradaki doku hasarını giderdiği düşünülmektedir.

5.2.3. Histopatolojik çalışma ile elde edilen verilerin değerlendirilmesi

Farelere uygulanan ilk grup; insülin yüklü formülasyonların ve çözeltisinin uygulanmasının ardından farelerden alınan pankreaslardaki Langerhans adacıkları toplam yarıçapı, kapladığı alan, oluşan dejenerasyon incelendiğinde Bölüm 4.5.3'te verilen çizelgede insülin yüklü lipozom formülasyonundaki Langerhans adacıkları toplam yarıçapı ve buna bağlı olarak hesaplanan kapladığı alan kontrol grubuna en yakın olarak bulunmuştur ($p>0,001$). Oluşan dejenerasyonlara bakıldığında ise insülin yüklü lipozomda dejenerasyonun olmadığı görülmektedir. Her ne kadar ölçülen glukoz miktarlarında kontrol grubu değerlerine yaklaşan insülin yüklü lipozomlar olsa da diğer formülasyonların pankreasta oluşturduğu dejenerasyon, Langerhans adacıkları toplam yarıçapı ve kapladığı alan bakımından birbirine yakın olup Resim 4.38-4.44'te de belirtildiği üzere gruplar arasında kayda değer bir farklılık görülmemiştir.

Diğer etkin maddemiz EKH ile hazırlanan formülasyonlara baktığımızda ise i.p. olarak uygulanmalarının ardından incelenen pankreaslarda, 2. günün sonunda EKH lipozom ve nanokohleat formülasyonları ile kontrol grubuna en yakın sonuçlar elde edilmiştir. Pankreasta dejenerasyonun görülmemesi de Langerhans adacıkları toplam yarıçapı ve kapladığı alan ile de uyumludur. Bunların yanında insülin yüklü formülasyonlardan en iyi grup olan insülin lipozomları farelere yeniden verilmiştir. Daha uzun süreli sonuç alabilmek amacıyla 5. güne kadar deney devam ettirilmiş, 5. günün sonunda kan glukoz miktarları ölçülmüştür. İncelenen pankreaslarda tüm EKH ile hazırlanan formülasyonlardan kontrol grubuna kıyasla daha fazla adacık sayısı ve kapladığı alan elde edilmesi, EKH'nin ilaç taşıyıcı sistemler ile uzun sürede etki ettiği, kök hücrenin pankreatik hücrelere dönüşüp pankreasta oluşan hasarı düzenlemiş olabileceği şeklinde yorumlanmıştır. Ölçülen glukoz miktarları ile beraber düşünüldüğünde artan Langerhans adacık sayısı, kapladığı alan ile uyumlu olarak artmış glukoz seviyesini kontrol grubu ile aynı seviyelere düşürerek öne çıkan formülasyon EKH lipozom formülasyonu olmuştur.

İnsülin yüklü lipozom formülasyonumuza baktığımızda deneyin 5. günü sonunda ölçülen glukoz miktarı kontrol grubuna göre anlamlı olarak yükselmiştir ($p<0,002$).

EKH ile hazırlanan formülasyonlar ise pankreatik beta TC hücrelerini yenileyerek hücrelerde oluşan hasarı giderdiğinden 5. günde bile glukoz seviyesinin kontrol grubuyla aynı seviyede devam ettiği görülmüştür.

EKH ile hazırlanan formülasyonların diğer uygulama yolu olan pankreas içi uygulamalarına baktığımızda ise oluşan adacık sayısı ve dejenerasyon açısından sadece lipozom formülasyonu kontrol grubunun verilerini aşmıştır. Diğer formülasyonların kontrol grubunun verilerinin altında kalmasının ve tüm formülasyonlarda dejenerasyonun i.p. uygulamaya göre daha fazla olmasının sebebi olarak, formülasyonların pankreas içi uygulama ile taşıdıkları kök hücrelerin farelerde şiddetli bir immün yanıtı neden olduğu ve bunun sonucunda pankreatik asiner hücrelerde yaygın dejenerasyona yol açtığı şeklinde yorumlandı. Bu tür istenmeyen sonuçların elde edilmesinde en önemli nedenin pankreasa direkt uygulama olduğu, uygulanan maddenin serum fizyolojik gibi zarar vermeyecek bir madde olsa dahi direkt uygulama ile travmanın oluşabildiği, bölgede yangısal ve nekrotik reaksiyona yol açabildiği düşünülmektedir.

5.3. İn Vitro-İn Vivo Korelasyon Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Aynı örnek alma zamanlarında, hücre kültürlerinde hesaplanan yüzde kümülatif geçen etkin madde-insülin miktarı ile kandaki insülin miktarları grafiğe geçirilerek korelasyon çalışması tüm formülasyon tipleri için gerçekleştirildi. Pankreatik beta TC hücreleri in vitro yapılan çalışmalarda kullanıldı.

İnsülin yüklü lipozom formülasyonlarında korelasyon katsayısı lipozomlar için, $r^2=0,967$, pegile lipozomlar için $r^2=0,918$ olarak hesaplanmıştır. Diğer formülasyon tiplerinde de bulunan korelasyon katsayıları değerlendirildiğinde in vitro yöntemin ve yapılan in vivo çalışmaların seçiminin ve doğruluğunun bir göstergesidir.

Lipozomlar için bulunan korelasyon katsayıları oldukça yüksektir ve bu da bize, in vitro ve in vivo veriler arasında oldukça iyi bir uyum olduğunu göstermiştir.

Literatürde yapılan bir çalışmada insülin yüklü lipozomlar hazırlanmış ve hücre kültür tabakası kullanılmıştır. Bulunan yüksek korelasyon hücre kültürünün in vivo özellikleri tahmin etmekte başarılı bir model olduğu sonucuna varılmıştır [24]. Ancak yapılan araştırma sonucunda pankreatik beta TC hücreleri kullanılarak in vivo-in vitro korelasyon çalışmasına rastlanmamıştır.

Tüm grupların sonuçları değerlendirildiğinde, pankreatik beta TC ile yapılan hücre kültürü çalışmaları in vivo özellikleri tahmin etmekte başarılı bir kültür model olarak düşünülmüştür.

6. SONUÇ

Tez çalışmamızda insülin ve EKH kullanılarak in vitro ve in vivo çalışmalar yapılmıştır. Bu iki etkin madde ile lipozom, nanokohleat ve nanopartikül formülasyonları hazırlanmış ve etkinlikleri araştırılmıştır. Çalışmamızda elde edilen sonuçlar aşağıda maddeler halinde verilmiştir:

- ✓ Formülasyon hazırlamada kullanılması planlanan yardımcı maddelerin etkin maddemiz insülin ile etkileşip etkileşmediğini görmek için DSC çalışmaları yapıldı. Herhangi bir etkileşime rastlanmamıştır.
- ✓ Hücre kültürü çalışmalarına başlamadan önce, çalışmalar sadece insülin içeren formülasyonlar ile yapılmış olup insülin ve insülin yüklü bu formülasyonların hücreler üzerinde toksik etki göstermeden kullanılabilecek maksimum miktarlarının belirlenmesi amacıyla, MTT testleri gerçekleştirildi. Test çalışmaları sonucunda, insülinin 10 IU/mL konsantrasyonda, 5 µL % 10'luk benzalkonyum klorür çözeltisinin ve formülasyonlarda kullanılan hiçbir yardımcı maddenin hücreler üzerinde toksik etkisi görülmedi.
- ✓ Hazırlanan insülin yüklü formülasyonların karakterizasyonu yapıldı ve uygunluklarına karar verildi.
- ✓ Pankreatik beta TC hücrelerinden geçiş çalışmaları yüzde kümülatif geçen etkin madde miktarı ve permeabilite katsayıları (log k) hesaplanarak değerlendirildi. En yüksek permeabilite katsayısının katyonik lipozomlara ait olduğu bulundu. Permeabilite katsayıları üzerinde genel olarak düşünüldüğünde, lipit yapılı formülasyonlar olan lipozom ve nanokohleatların nanopartiküllere nazaran hücre membran yapısına benzerliği nedeniyle daha iyi sonuç verdiği düşünülmüştür.
- ✓ Pankreatik beta TC hücrelerinden geçiş çalışmaları sonunda yapılan TEER ölçümlerinin, permeabilite katsayıları ile birlikte değerlendirildiğinde, birbirleriyle uyumlu oldukları gözlemlendi.

- ✓ Diyaliz membrandan geçiş çalışmalarında en yüksek geçişi insülin yüklü lipozom ve nanopartikül formülasyonları göstermiştir. Diyaliz membran geçiş sonuçlarının kinetik olarak değerlendirilmesiyle formülasyonların genellikle RRSBW salım kinetiğine uygun olduğu görüldü.
- ✓ Stabilit alışmaları sonucunda, insülin ile hazırlanan lipozom ve nanokohleat formülasyonlarının nanopartiküllere nazaran daha yüksek raf ömrüne sahip olduğu belirlenmiştir ($p < 0,001$).
- ✓ Diyabetik hale getirilmiş pankreatik beta TC hücrelerine uygulanması ardından ölçülen glukoz ve insülin miktarlarına bakıldığında insülin yüklü lipozom ve pegile lipozom ve EKH lipozomları etkinliği en iyi olan formülasyonlar olmuştur.
- ✓ Western blot ile EKH'nin formülasyonlara yükleme yüzdeleri elde edilen bantların dansiteleri ile ölçülmüş ve diğer yöntemler olan hücre sayımı ve Lowry protein tayin metodu ile bulunan yüzdelerle uyumlu bulunmuştur.
- ✓ İn vivo yapılan çalışmalarda, insülin yüklü formülasyonların etkinliği 24 saat boyunca alınan kan örnekleri ile incelenmiş ve insülin yüklü lipozom ve pegile lipozom formülasyonları daha uzun süre salım yaparak artan glukoz seviyesini düşürmüş, 24 saatin sonunda ise glukoz miktarları başlangıç konsantrasyonuna dnmştir (şekil 4.105).
- ✓ EKH ile hazırlanan formülasyonlar hem intraperitoneal hem de pankreas içi verilmiştir. İntraperitoneal verilen formülasyonlardan artmış glukoz seviyesini kontrol grubu ile aynı seviyeye düşürerek ne çıkan lipozom formülasyonu olmuştur. Histopatolojik bulgularda artmış Langerhans adacık sayıları, kapladığı alan ve dejenerasyon bakımından intraperitoneal yol ile kayda değer sonuçlar alınmıştır. Pankreas içi uygulamada ise direkt uygulamanın etkisiyle dejenerasyon daha çok gözlenmiştir.
- ✓ İn vitro/in vivo korelasyon çalışmalarının sonucunda lipozom formülasyonlarının daha yüksek korelasyon katsayılarına sahip olduğu görüldü.

- ✓ Günümüzde diyabet tedavisinde var olan ve vazgeçilmez tedavi aracı insülin ile hazırlanan formülasyonlar, EKH formülasyonları ile karşılaştırma amaçlı hazırlanmış olup EKH lipozomları öne çıkan formülasyon olmuştur.
- ✓ EKH'nin amacımıza uygun olarak uzun süreli diyabet tedavisinde insüline alternatif olabileceği, hücre replasman tedavisi ile diyabette daha kesin sonuçlar elde edilebileceği düşünülmüştür.
- ✓ Araştırmalara bakıldığında EKH ile yapılmış çalışmalar çok az olmakla birlikte ilaç taşıyıcı sistemler ile yapılmış çalışmalara rastlanılmamaktadır. EKH ile hazırlanan lipozom ve nanokohleat formülasyonlarından alınan bu sonuçlar ve ayrıca insülin ile hazırlanan nanokohleatlar literatürlerde bir ilk olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Surya, S., Salam, AD., Tomy, DV., Carla, B., Kumar, RA., Sunil, C. (2014). Diabetes mellitus and medicinal plants-a review, *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4 (5), 337-347.
2. Balcioğlu, E., Yay, A., Alkan, BA., Kara, M., Özdamar, S., Sönmez, MF. (2012). Diyabetli hastalarda diş taşı yapısı ve mineral dansitesinin incelenmesi, *Erciyes Tıp Dergisi* 34 (1), 10-14.
3. Heydari, I., Radi V., Razmjou S., Amiri A. (2010). Chronic complications of diabetes mellitus in newly diagnosed patients, *International Journal of Diabetes Mellitus*, 2, 61-63.
4. Westpal, SA., Palumbo, PJ. (2006). A case for introducing insulin early in the treatment of type 2 diabetes mellitus, *Insulin*, 1, 65-69.
5. Raccach, D. (2006). Insulin therapy in patients with type 2 diabetes mellitus: treatment to target fasting and postprandial blood glucose levels, *Insulin*, 1, 158-165.
6. Cilaker Mıcılı, S., Özoğul C. (2007). Diyabette kök hücreler, *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 21 (2), 109-117.
7. Carino, GP., Mathiowitz, E. (1999). Oral insulin delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 35, 249 –257.
8. He, P., Liu, H., Tang, Z., Deng, M., Yang, Y., Pang, X., Chen, X. (2013). Poly(ester amide) blend microspheres for oral insulin delivery, *International Journal of Pharmaceutics*, 455, 259-266.
9. Blake, R., Trounce, IA. (2014). Mitochondrial dysfunction and complications associated with diabetes, *Biochimica et Biophysica Acta* 1840, 1404–1412.
10. Bağrıaçık, N. (1997, 18-19 Aralık). *Diyabetes mellitus: Tanımı, tarihçesi, sınıflaması ve sıklığı*, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Diyabetes Mellitus Sempozyumunda sunuldu, İstanbul.
11. Han, HW., Yan, XL., Dong, RX., Ban, G., Li, K. (2009). Analysis of serum from type II diabetes mellitus and diabetic complication using surface-enhanced Raman spectra (SERS), *Applied Physics B*, 94, 667-672.
12. Durna, Z. (2002). Diyabetin Sınıflandırılması ve Tanı Kriterleri, *Türk Diyabet Hemşireleri Derneği Kitabı*, 14-18.
13. Efrat, S. (2008). Beta-cell replacement for insulin-dependent diabetes mellitus, *Advanced Drug Delivery Review* 60, 114-123.

14. Rekha, MR., Sharma, CP. (2013). Oral delivery of therapeutic protein/peptide for diabetes-Future perspectives, *International Journal of Pharmaceutics*, 440, 48-62.
15. Uca, İ., Şahin, NÖ. (2006). *İntranazal insülin preparatlarının hazırlanması, farmasötik bakım-klinik eczacılık açısından in vitro/in vivo incelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mersin, 3-26.
16. Assady, S., Maor, G., Amit, M., Itskovitz-Eldor, J., Skorecki, KL., Tzukerman, M. (2001). Insulin production by human embryonic stem cells, *Diabetes*, 50, 1691-1697.
17. Reimann, M., Bonifacio, E., Solimena, M., Schwarz, PEH., Ludwig, B., Hanefeld, M., Bornstein, SR. (2009). An update on preventive and regenerative therapies in diabetes mellitus, *Pharmacology&Therapeutics* 121, 317-331.
18. Tabakhian, M. (1998). *Oral Delivery of Insulin by Polymer-Coated Liposomes*, Doktora Tezi, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Edmonton, Alberta, 34-39.
19. Özcan, Ş. (2002). İnsülin Tedavisinin Yönetimi, *Türk Diyabet Hemşireleri Derneği Kitabı*, 39-53.
20. Çilek, A., Çelebi, N., Tırnaksız, F., Tay, A. (2005). A lecithin-based microemulsion of rh-insulin with aprotinin for oral administration: Investigation of hypoglycemic effects in non-diabetic and STZ-induced diabetic rats, *International Journal of Pharmaceutics*, 298, 176–185.
21. Saraya, A., Yokokura, M., Gonoı, T., Seino, S. (2004). Effects of fluoroquinolones on insulin secretion and h-cell ATP-sensitive K⁺ channels. *European Journal of Pharmacology*, 497, 111 – 117.
22. Rorsman, P., Eliasson, L., Renström, E., Gromada, J., Brag, S., Göpel, S. (2000). The Cell Physiology of Biphasic Insulin Secretion, *Physiology* 15, 72-77.
23. Akı-Yalçın, E. Farmasötik Kimya Anabilim Dalı Oral Antidiyabetik İlaçlar, Ders Notu.
24. Değim, Z., Ünal, N., Eşsiz, D., Abbasoğlu, U. (2004). The effect of various formulations on insulin penetration across Caco-2 cell monolayer, *Life Sciences*, 75, 2819-2827.
25. Değim, Z., Değim, T., Acarturk, F., Erdogan, D., Özogul, C., Koksall, M. (2005). Rectal and vaginal administration of insulin-chitosan formulations: An experimental study in rabbits. *Journal of Drug Targeting* 13(10), 563-572.

26. Builders, PF., Kunle, OO., Okpaku, LC., Builders, MI., Attama AA., Adikwu, MU. (2008). Preparation and evaluation of mucinated sodium alginate microparticles for oral delivery of insulin, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 70(3), 777-783.
27. Karakoç, A., Konca, C. (2010). Diabetes Mellitus'ta İnsülin Tedavisi, *Türk Eczacılar Birliği, Eczacılık Akademisi*, 14-18.
28. Fu, Z., Liu, D. (2009). Long-term exposure to genistein improves insulin secretory function of pancreatic β -cells, *European Journal of Pharmaceutics*, 616, 321-327.
29. Elsayeda A., Remawi MA, Qinn N., Farouka A., Badwan A. (2009). Formulation and characterization of an oily-based system for oral delivery of insulin, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 73, 269–279.
30. Möbus, K., Siepmann, J., Bodmeier, R. (2012). Zinc–alginate microparticles for controlled pulmonary delivery of proteins prepared by spray-drying, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 81 (1), 121-130.
31. Holgado, MA., Cozar-Bernal MJ., Salas S., Arias JL., Alvarez-Fuentes J., Fernandez-Arevalo M. (2009). Protein-loaded PLGA microparticles engineered by flow focusing: Physicochemical characterisation and protein detection by reversed-phase HPLC, *International Journal of Pharmaceutics*, 380, 147-154.
32. Değim İT., Çelebi, N. (2007). Controlled Delivery of Peptides and Proteins, *Current Pharmaceutical Design*, 13, 99-117.
33. Ayvaz, G., Kan, E. (2010). Tip 2 Diabetes Mellitus Tedavisinde Oral Antidiyabetik İlaçlar Tip 2 Diabetes Mellitus Tedavisi, *Türk Eczacılar Birliği, Eczacılık Akademisi*, 23-24.
34. Zhang, N., Li, J., Jiang, W., Ren, C., Li, J., Xin, J., Li, K. (2010). Effective protection and controlled release of insulin by cationic-cyclodextrin polymers from alginate/chitosan nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics* 393, 212–218.
35. Erol, H., Arıcan, M. (2008). Stem Cell Treatment in Horses With Tendinitis I: What are Stem Cells, and Why are They Important? What is Application Field in Veterinary Medicine, *Konya Veteriner Cerrahi Dergisi*, 14(2), 26-31.
36. Sağsöz, H., Ketani, MA. (2008). Kök Hücreler *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 1(2), 29 – 33.
37. Björklund, LM., Sañchez-Pernaute, R., Chung, S., Andersson, T., Yin Ching Che, I., St. P. McNaught, K., Brownell, AL., Jenkins, BG., Wahlestedt, C., Kim, KS., Isacson, O. (2002). Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model, *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United State of America*, 99(4), 2344-2349.

38. Al, Y., Liu, Q., Li, Y., Duan, T. (2014). Progesterone signaling/miR-200a/zeb2 axis regulates self-renewal of mouse embryonic stem cells, *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 68(2), 201-208.
39. Vatansever, HS. (2006). Embriyonik Kök Hücreler, *Sağlıkta Birikim Dergisi*, 1(5), 25-44.
40. Goh, SY., Abdullah, RB., Khadijah, WEW. (2002). Characterization of caprine embryonic stem cell-like outgrowths derived from the inner cell mass isolation, *Small Ruminant Research*, 107, 38–44.
41. Karaşahin, T. (2012). Embriyonik kök hücreler, *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 9(1), 65-71.
42. Bishop, A., Buttery, LDK., Polak, JM. (2002). Embryonic stem cells, *Journal of Pathology*, 197, 424–429.
43. Fairchild, PJ., Nolan, KF., Cartland, S., Waldmann, H. (2005). Embryonic stem cells: a novel source of dendritic cells for clinical applications *International Immunopharmacol*, 5(1), 13-21.
44. Fujikawa, T., Oh, S., Pi, L., Hatch, HM., Shupe, T., Petersen, BE. (2005). Teratoma formation leads to failure of treatment for type I diabetes using embryonic stem cell-derived insulin-producing cells, *American Journal of Pathology*, 166 (6), 1781-1791.
45. Deliloğlu Gürhan, İ. (2009). Embriyonik Kök Hücreler, *Sağlıkta Birikim* 1(5), pp: 81-142.
46. Rippon, HJ., Bishop, AE. (2004). Embryonic stem cells, *Cell Proliferation*, 37, 23-34.
47. Luft, S., Pignalosa, D., Nasonova, E., Arrizabalaga, O., Helm, A., Durante, M., Ritter, S. (2014). Fate of D3 mouse embryonic stem cells exposed to X-rays or carbon ions, *Mutation Research*, 760, 56-63.
48. Jeong Beom Kim, JB et al. (2008). Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors, *Nature*, 454, 646-651.
49. Van Hoof, D. et. al. (2006). A Quest for Human and Mouse Embryonic Stem Cell-specific Proteins, *Molecular & Cellular Proteomics*, 5, 1261-1273.
50. Yurdakul, A., Atav, R. (2007). Lipozomların yapısı ve sınıflandırılması, *Tekstil ve Konfeksiyon Dergisi*, 4, 243-247.
51. Karaman, S., Dönderici, L. (1993). Deri Nemlenmesi ve Lipozomlar, *Türkiye Klinikleri Journal of Dermatoloji*, 3(3), 146-52.
52. Meisner, D., Mezei, M. (1995). Liposome ocular delivery systems, *Advanced Drug Delivery Reviews* 16(1), 75–93.

53. Çilek, A., Çelebi, N. (2008). *İnterlökin-2'nin pulmoner yoldan uygulanabilecek lipozom formülasyonunun geliştirilmesi ve invitro-in vivo değerlendirilmesi*, (Doktora Tezi), Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 26-29.
54. Barker, SA., Cottrell, SP., Giblin, SR., Jayasooriya, UA. (2006). Preliminary SR studies on the incorporation of steroidal drug molecules into liposomes, *Physica B*, 375, 332-335.
55. Drulis-Kawa, Z., Dorotkiewicz-Jach A. (2010). Liposomes as delivery systems for antibiotics, *International Journal of Pharmaceutics*, 387(1-2), 187-198.
56. Zırh Gürsoy, A. (Editör) (2002). *Kontrollü salım sistemleri.1*. İstanbul: Kontrollü Salım Sistemleri Derneği, 82-88, 113-117.
57. Zırh Gürsoy, A. (Editör) (2014). *Nanofarmasötikler ve Uygulamaları*, İstanbul: Kontrollü Salım Sistemleri Derneği, 23-39, 53-63.
58. Bozkır, A., Koçyiğit, S. (1995). Lipozomların Fiziksel ve Kimyasal Stabilitelerinin İncelenmesi, *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi* 24, 1.
59. Cern, A., Golbraikh, A., Sedykh, A., Tropsha, A., Barenholz, Y., Goldblum, A. (2012). Quantitative structure - property relationship modeling of remote liposome loading of drugs, *Journal of Control Release*, 160(2), 147–157.
60. Stark, B., Pabst, G., Prassl, R. (2010). Long-term stability of sterically stabilized liposomes by freezing and freeze-drying: Effects of cryoprotectants on structure, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 41, 546–555.
61. Taylan, B., Özer, Y. (1991). Lipozomların Tıpta Uygulanmaları, *Pharmacia*, 31(1), 16-35.
62. Pavelić, Z., Skalko-Basnet, N., Jal'senjak, I. (2005). Characterisation and in vitro evaluation of bioadhesive liposome gels for local therapy of vaginitis, *International Journal of Pharmaceutics*, 30, 140–148.
63. Westerhof, W. (1985). Possibilities of liposomes as dynamic dosage form in dermatology, *Medical Hypotheses*, 16(3), 283-8.
64. Akkuş Arslan, Ş., İnceçayır, T, Tırnaksız, F. (2010). In Vitro Comparison of O/W Type Emulsion Gel and Liposome Gel for Cosmetic Application of Kinetin, *FABAD Journal of Pharmaceutical. Sciences*, 35, 35-44.
65. Peschka, R., Dennehy, C., Szoka, FC Jr. (1998). A simple in vitro model to study the release kinetics of liposome encapsulated material, *Journal of Control Release*, 56(1-3), 41-51.
66. Melgardt M. De Villiers, Pornanong Aramwit, Glen S. Kwon. (Editörler) (2009). *Nanotechnology in Drug Development and Life Cycle Management*, Nanotechnology in Drug Delivery, 600.

67. Cullis, PR., Chonn, A. (1998). Recent advances in liposome technologies and their applications for systemic gene delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 30(1-3), 73-83.
68. Kreuter J. (Editör) (1994). Colloidal drug delivery systems. 1. NY: Marcel Dekker; 88-119.
69. Swarbrick J. (Ediör) (2007). Liposomes as pharmaceutical dosage forms. *Encyclopedia of pharmaceutical technology*. New York Informa Healthcare, 1-12.
70. Benita, S. (Editör) (2006). Pharmaceutical aspects of liposomes: perspective in, and integration of, academic and industrial research and development. *Microencapsulation methods and industrial applications*. NW: Taylor & Francis group, 260-267.
71. Tabandeh, H., Aboufazeli, R., Ghasemi, Z. (2003). Preparation of Stable Plurilamellar Liposomes Dispersed in Two Soluble Types of Collagens and the Effect of Collagens on the Release Rate of Entrapped Sodium Chromate, *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 161-165.
72. Gulati, M., Grover, M., Singh, S., Singh, M. (1998). Lipophilic drug derivatives in liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, 165, 129-168.
73. Hu, C.J., Zhang, L. (2012). Nanoparticle-based combination therapy toward, *Biochemical Pharmacology*, 83, 1104–1111.
74. Shashi, K., Satinder, K., Bharat, P. (2012). A complete review on: Liposomes, *International Research Journal of Pharmacy*, 3(7), 10-16.
75. Piraube, C., Postaire, E., Lize, JM., Prognon, P., Pradeau, D. (1988). Evidence of Chemical Instability of Phospholipids in Liposomes, *Chemical Pharmaceutical Bull*, 36, 4600-4602.
76. Al-Jamal, W., Kostarelos, K. (2007). Construction of nanoscale multicompartments, *International Journal of Pharmaceutics*, 331(2), 182-5.
77. Maestrelli, F., González-Rodríguez, ML., Rabasco, AM., Mura, P. (2006). Effect of preparation technique on the properties of liposomes encapsulating ketoprofen–cyclodextrin complexes aimed for transdermal delivery, *International Journal of Pharmaceutics*, 312, 53–60.
78. Remington, JP. (2006). *The science and practice of pharmacy* 21. Maryland William&Wilkins Lippincott, 766-955.
79. Li, N., Zhuang, C., Wang, M., Sun, X., Nie, S., Pan, W. (2009). Liposome coated with low molecular weight chitosan and its potential use in ocular drug delivery, *International Journal of Pharmaceutics*, 379 (1), 131-8.
80. Barenholz, Y. (2001). Liposome application: problems and prospects, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 6(1), 66-77.

81. Akman, Ö., Altunay, F., Aşut, G., Bayraktar, T., Uçar, A., Toyran, N., Al-Otaibi, N. (2010). *Lipozomlar*, XII. Öğrenci Grupları Çalışma Raporları, Başkent Üniversitesi, Ankara, Mayıs.
82. Straubinger, RM., Düzgünes, N., Papahadjopoulos, D. (1985). pH-sensitive liposomes mediate cytoplasmic delivery of encapsulated macromolecules, *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 179, 148-154.
83. Kim, M.K., Chung, S.J., Lee, M.H., Cho, A.R., Shim, C.K. (1997). Targeted and sustained delivery of hydrocortisone to normal and stratum corneum-removed skin without enhanced skin absorption using a liposome gel. *Journal Of Controlled Release*, 46(3), 243-251.
84. Loveday, SM., Singh H. (2008). Recent advances in Technologies for vitamin A protection in foods, *Trend in Food Sciences&Technology*, 19, 657-668.
85. Miclea, RD., Varma PR., Peng A., Balu-Iyer S. (2007). Development and characterization of lipidic cochleate containing recombinant factor VIII, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1768, 2890-2898.
86. Ravi Sankar, V., Reddy, YD. (2010). Nanocochleate-A new approach in lipid drug delivery, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical*, 2(4), 220-223.
87. Santangelo, R., Paderu, P., Delmas, G., Chen, ZW., Raphael Mannino, R., Zarif, L., David, S., Perlin, DS. (2000). Efficacy of oral cochleate-Amphotericin B in a Mouse Model of Systemic Candidiasis, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2356-2360.
88. Kernsten, GFA., Crommelin, DJA. (2003). Liposomes and ISCOMs, *Vaccine* 21, 915-920.
89. Avecedo, R et all. (2009). Intranasal administration of proteoliposome-derived cochleates from *Vibrio cholerae* O1 induce mucosal and systemic immune responses in mice, *Methods*, 49, 309–315.
90. Ramasamy, T., Khandasamy, U., Hinabindhu, R., Kona, K. (2009). Nanocochleate – A New Drug Delivery System *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 34, 91–101.
91. A. D'évay, Sz. P'al. (2005). Preparation and examination of cochleates using central composite design, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 25, 1–226.
92. Gould-Fogerite, S., Kheiri, MT., Zhang, F., Wanga, Z., Scolpino, AJ., Feketeova, E., Canki, M., Mannino, RJ. (1998). Targeting immune response induction with cochleate and liposome-based vaccines, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 32, 273-287.
93. Zarif, L., Graybill, JR., Perlin, D., Mannino, RJ. (2000). Cochleates: new lipid-based drug delivery system, *Journal of Liposome Research*, 10(4), 523-538.

94. Evans, CC., Zasadzinski J. (2003). Encapsulating vesicles and colloids from cochleate cyclinders, *Langmuir*, 19, 3109-3113.
95. Hillery, AM. (1998). Microparticulate delivery systems: potential drug/vaccine carriers via mucosal routes, *Pharmaceutical Science & Technology Today* 1 (2), 69-75.
96. Schöll, I., Boltz-Nitulescu G., Jensen-Jarolim E. (2005). Review of novel particulate antigen delivery systems with special focus on treatment of type I allergy, *Journal of Controlled Release*, 104, 1-27.
97. Syed, UM., Woo AF., Plakogiannis F., Jin T., Zhu H. (2008). Cochleates bridged by drug molecules, *International Journal of Pharmaceutics*, 363, 118-125.
98. Reis, CP., Neufeld, RJ., Ribeiro, AJ., Veiga, F. (2006). Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2, 8-21.
99. Şengel-Türk, CT., Hasçıçek, C., Gönül, N. (2007). Beyne ilaç Hedeflendirilmesinde Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler, *Journal of Neurological Sciences*, 24(3), 12, 254-263.
100. Nagarwal, RC., Kant, S., Singh, PN., Maiti, P., Pandit, JK. (2009). Polymeric Nanoparticulate System: A potential Approach for Ocular Drug Delivery, *Journal of Control Release*, 136(1), 2-13.
101. Kreuter J. (2007). Nanoparticles a historical perspective. *International Journal of Pharmaceutics*, 331, 1-10.
102. Yücel, Ç., Değim, Z., Yılmaz, Ş. (2013). Nanoparticle and liposome formulations of doxycycline: Transport properties through Caco-2 cell line and effects on matrix metalloproteinase secretion. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 67, 459-467.
103. Allard, E., Passirani, C., Benoit, J. (2009). Convection-enhanced delivery of nanocarriers for the treatment of brain tumors, *Biomaterials*, 30, 2302-2318.
104. Vauthier, C., Bouchemal, K. (2009). Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles, *Pharmaceutical Research*, 26(5), 1025-58.
105. Olivier, J. (2005). Drug transport to brain with targeted nanoparticles, *Journal of American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 2, 108-119.
106. Labhasetwar, V., Song, C., Levy, RJ. (1997). Nanoparticle drug delivery system for restenosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 24, 63-85.
107. Panyam, J., Labhasetwar, V. (2003). Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55, 329-347.

108. Faraji, AH., Wipf, P. (2009). Nanoparticles in cellular drug delivery. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17, 2950-2962.
109. Pinto-Alphandary, H., Andremont, A., Couvreur, P. (2000). Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 13, 155-168.
110. Cai, X., Conley, S., Naash, M. (2008). Nanoparticle applications in ocular gene therapy, *Vision Research* 48, 319-324.
111. Song, CX., Labhasetwar, V., Murphy, H., Qu, X., Humphrey, WR., Shebuski, RJ., Levy, RJ. (1997). Formulation and characterisation of biodegradable nanoparticles for intravascular local drug delivery, *Journal of Controlled Release*, 43, 197-212.
112. Joshimd Müller, RH. (2009). Lipid nanoparticles for parenteral delivery of actives. *European Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceutical*, 71, 161-172.
113. Kreuter, J. (2001). Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47, 65-81.
114. Kılıç, AC., Capan, Y., Vural, İ., Gürsoy, RN., Dalkara, T., Cuine, A., Hincal, AA. (2005). Preparation and characterization of PLGA nanospheres for the targeted delivery of NR2B-specific antisense oligonucleotides to the NMDA receptors in the brain. *Journal of Microencapsulation*, 22(6), 633-641.
115. Edman, P. (Editör) (1997). Liposomes and nanoparticles as ocular drug delivery systems, *Biopharmaceutics of ocular drug delivery*, 1. Florida: CRC Press, 92-97.
116. Çırpanlı, Y., Bilensoy, E., Calis, S, Hincal, AA. (2007). Stabilization of camptothecin in PLGA nanoparticles. Conference Information, *2nd BBBB Conference on Pharmaceutical Sciences*, Tallinn-Tartu, Estonia.
117. Des Rieux, A., Fievez, V., Garinot, M., Schneider, YJ., Préat, V. (2006). Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach, *Journal of Controlled Release*, 116, 1-27.
118. Bayat, A., Larijani, B., Ahmadian, S., Junginger, H., Rafiee-Tehrani, M. (2008). Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and Arabic gum with ionic gelation method Nanomedicine: Nanotechnology, *Biology and Medicine*, 4, 115-120.
119. Panyam, J. et al. (2003). Polymer degradation and in vitro release of a model protein from poly (D,L-lactide-co-glycolide) nano- and microparticles, *Journal of Controlled Release*, 92, 173–187.
120. Blanco, MD., Alonso, MJ. (1997). Development and characterisation of protein-loaded poly (lactide-co-glycolide) nanospheres, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 43, 287-294.

121. Kerimoğlu O., Alarçin E. (2012). Poly (lactic-co-glycolic acid) based drug delivery devices for tissue engineering and regenerative medicine, *ANKEM Dergisi*, 26(2), 86-98.
122. Öztürk K., Çaban S., Kozlu S., Kadayıkcı E., Yerlikaya F., Çapan Y. (2010). The influence of technological parameters on the physicochemical properties of blank PLGA nanoparticles, *Pharmazie*, 65, 1-5.
123. Ramanlal Chaudhari K. Kumar, A., Megraj Khandelwal, VK., Ukawala, M., Manjappa, AS., Mishra, AK., Monkkonnen, J., Ramachandra Murthy, RS. (2012). Bone metastasis targeting: A novel approach to reach bone using Zoledronate anchored PLGA nanoparticle as carrier system loaded with Docetaxel, *Journal of Controlled Release*, 158, 470-478.
124. Ho ML, Fu YC, Wang GJ, Chen HT, Chang JK, Tsai TH, Wang CK. (2008). Controlled release carrier of BSA made by W/O/W emulsion method containing PLGA and hydroxyapatite, *Journal of Control Release*, 128(2),142-148.
125. Freshney, RI. *Culture of animal cells*. 4. Canada: Wiley-Liss, inc, 1-8, 89-95.
126. Mutlu, İ. (2003). *Hücre Kültürü ve Dişhekimliğindeki Uygulamaları*, Gata Sağlık Bilimleri Enstitüsü Semineri, Ankara.
127. Hsieh, DS. (Editör) (1994). Basic mechanism in transepithelium transport enhancement. Drug permeation enhancement: theory and applications. 1. NY: *Mercel Dekker*, 33-34.
128. Cilaker Mıcılı, S., Özoğul, C. (2007). Diyabette kök hücreler, *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 21(2), 109-117.
129. Bangham, AD., Standish, MM., Watkins, JC. (1965). Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids, *Journal of Molecular Biology*, 13, 238–252.
130. Raimann, J., Törmaletho, S., Yritys, K., Junginger, HE., Mönkkönen, J. (2003). Effects of various absorption enhancers on transport of clodronate through Caco-2 cells, *International Journal of Pharmaceutics*, 261, 129-136.
131. Zerrouk, N., Corti, G., Ancillotti, S., Maestrelli, F., Cirrim Mura, P. (2006). Influence of cyclodextrins and chitosan, separately or in combination on glyburide solubility and permeability. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 62, 241-246.
132. Meaney, CM., O'driscoll, CM. (2000). A comparison of the permeation enhancement potential of simple bile salt and mixed bile salt:fatty acid micellar systems using the Caco-2 cell culture model. *International Journal of Pharmaceutics*, 207, 21-30.
133. Treuting, PM., Dintzis, SM. (Editör) (2012). *Pancreas, In: Comparative Anatomy and Histology A Mouse and Human Atlas*, 1st Ed, Elsevier, 32 Jamestown Road, London UK, 204.

134. Sajeesh, S., Sharma CP. (2006). Cyclodextrin–insulin complex encapsulated polymethacrylic acid based nanoparticles for oral insulin delivery, *International Journal of Pharmaceutics*, 325, 147–154.
135. Babacanoglu, C., Yildirim, N., Sadi, G., Pektas, MB., Akar, F. (2013). Resveratrol prevents high-fructose corn syrup-induced vascular insulin resistance and dysfunction in rats, *Food and Chemical Toxicology*, 60, 160–167.
136. Manish Umrethia, M., Kett, VL., Andrews, GP., Malcolm, RK., Woolfson, AD. (2010). Selection of an analytical method for evaluating bovine serum albumin concentrations in pharmaceutical polymeric formulations, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51, 1175–1179.
137. Lamprecht, A., Ubrich, N., Hombreiro Pe´rez, M., Lehr, CM., Hoffman, M., Maincent, P. (1999). Biodegradable monodispersed nanoparticles prepared by pressure homogenization-emulsification, *International Journal of Pharmaceutics*, 184, 97–105.
138. Bouillot, P., Ubrich, N., Sommer, F., Duc, TM., Loeffler, JP., Dellacherie, E. (1999). Protein encapsulation in biodegradable amphiphilic microspheres, *International Journal of Pharmaceutics*, 181, 159–172.
139. Zamani, M., Prabhakaran, MP., Thiana, ES., Ramakrishna, S. (2014). Protein encapsulated core–shell structured particles prepared by coaxial electrospraying: Investigation on material and processing variables, *International Journal of Pharmaceutics*, 473, 134–143.
140. Gilda, JE., Gomes, AV. (2013). Stain-Free total protein staining is a superior loading control to β -actin for Western Blots, *Analytical Biochemistry*, 440, 186–188.
141. Suthagar, E., Soudamani, S., Yuvaraj, S., Ismail Khan, A., Aruldas, MM., Balasubramanian, K. (2009). Effects of streptozotocin (STZ)-induced diabetes and insulin replacement on rat ventral prostate, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 63, 43–50.
142. Sarmiento, B., Ferreira, D., Veiga, F., Ribeiro, A. (2006). Characterization of insulin-loaded alginate nanoparticles produced by ionotropic pre-gelation through DSC and FTIR studies, *Carbohydrate Polymers*, 66, 1–7.
143. Ingels, F., Deferme, S., Destexhe, E., Oth, M., Van den Mooter, G., Augustijns, P. (2002). Simulated intestinal fluid as transport medium in the Caco-2 cell culture model. *International Journal of Pharmaceutics*, 232, 183–192.
144. Karamustafa, F., Çelebi, N., Değim Z., Yılmaz Ş. (2006). Evaluation of the Viability of L-929 Cells in the Presence of Alendronate and Absorption Enhancers, *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 31, 1–5.

145. Sakaguchi, H., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Kosaka, N., Ito, Y., Yoneyama, K., Sono, S., Itagaki, H., Toyoda, H., Suzuki, H. (2009). The relationship between CD86/CD54 expression and THP-1 cell viability in an in vitro skin sensitization test – human cell line activation test (h-CLAT), *Cell Biological Toxicology*, 25, 109–126.
146. Mutlu, NB., Değim, Z., Yılmaz, Ş., Eşsiz, D., Nacar, A. (2011). New perspective for the treatment of Alzheimer diseases: Liposomal rivastigmine formulations, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 37(7), 775–789.
147. Fischera, D., Lib, Y., Ahlemeyerc, B., Krieglsteinc, J., Kissel, T. (2003). In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis, *Biomaterials*, 24, 1121–1131.
148. Park, S., Choi, SG., Davaa, E., Park J. (2011). Encapsulation enhancement and stabilization of insulin in cationic liposomes, *International Journal of Pharmaceutics*, 415, 267-272.
149. Tagami, T., Suzuki, T., Matsunaga, M., Nakamura, K., Moriyoshi, N., Ishida, T., Kiwada, H. (2012). Anti-angiogenic therapy via cationic liposome-mediated systemic siRNA Delivery, *International Journal of Pharmaceutics*, 422, 280-289.
150. Cheng, T., Chuang, K., Chen B., Roffler, SR. (2011). Analytical measurement of PEGylated molecules, *Bioconjugate Chemistry*, A-L.
151. Shimada, K., Matsuo, S., Sadzuka, Y., Miyagishima, A., Nozawa, Y., Hirota, S., Sonobe, T. (2000). Determination of incorporated amounts of poly(ethyleneglycol)-derivatized lipids in liposomes for the physicochemical characterization of stealth liposomes, *International Journal of Pharmaceutics* 203, 255–263.
152. Li, P., Liu, D., Sun, X., Liu, C., Liu, Y., Zhang, N. (2011). A novel cationic liposome formulation for efficient gene delivery via pulmonary route, *Nanotechnology*, 22, 1-11.
153. Lasic, DD. (1998). Novel applications of liposomes, *Trends in Biotechnology*, 16(7), 307-321.
154. Segarra, I., Movshin, DA., Zarif, L. (2002). Pharmacokinetics and tissue distribution after intravenous administration of a single dose of amphotericin B cochleates, a new lipid-based delivery system, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 91(8), 1827–1837.
155. Danhier, F., Ansorena, E., Silva, JM., Coco, R., Breton, AL., Preat, V. (2012). PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications, *Journal of Controlled Release*, 161, 505-522.
156. Subramani, K., Pathak, S., Hosseinkhani, H. (2012). Recent trends in diabetes treatment using nanotechnology, *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 7 (1), 85-95.

157. Zhang, X., Sun, M., Zheng, A., Cao, D., Bi, Y., Sun, J. (2012). Preparation and characterization of insulin-loaded bioadhesive PLGA nanoparticles for oral administration, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 45, 632-638.
158. Reix, N., Parat, A., Seyfritz, E., Werf, RVD., Epure, V., Ebel, N., Danicher, L., Marchioni, E., Jeandidier, N., Pinget, M., Frere, Y., Sigrast S. (2012). In vitro uptake evaluation in Caco-2 cells and in vivo results in diabetic rats of insulin-loaded PLGA nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics* 437, 213–220.
159. Jo, J., Aoki, I., Tabata, Y. (2010). Design of iron oxide nanoparticles with different sizes and surface charges for simple and efficient labeling of mesenchymal stem cells, *Journal of Controlled Release*, 142, 465-473.
160. Wakayama, T., Rodriguez, I., Perry, ACF., Yanagimachi R., Mombaerts, P. (1999). Mice cloned from embryonic stem cells, *Proceeding of the National Academy of Sciences of USA*, 96(26), 14984-14989.
161. Jo, W. et al. (2014). Large-scale generation of cell-derived nanovesicles, *Nanoscale*, 6, 12056-12064.
162. Johansson, F., Hjertberg, E., Eirefelt, S., Tronde, A., Bengtsson, UH. (2002). Mechanism for absorption enhancement of inhaled insulin by sodium taurocholate, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 17, 63-71.
163. Varshochian, R., Jeddi-Tehrani, M., Mahmoudi, AR., Khoshayand, MR., Atyabi, F., Sabzevar, A., Esfahani, MR., Dinarvand, R. (2013). The protective effect of albumin on bevacizumab activity and stability in PLGA nanoparticles intended for retinal and choroidal neovascularization treatments, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 50, 341–352.
164. Özkan, Y., Savaşer, A., Özalp, Y., Işimer, A. (2000). Dissolution properties of different designed and formulated salbutamol tablet dosage forms, *Acta Polonia Pharmaceutica-Drug Research*, 57(4) 271-276.
165. Özkan, Y., Atay, T., Dikmen, N., Işimer, A., Aboul-Enein, HY. (2000). Improvement of water solubility and in vitro dissolution rate of gliclazide by complexation with β -cyclodextrin, *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 74, 365-370.
166. Aksungur, P., Demirbilek, M., Denkbaş, EB., Vandervoort, J., Ludwig, A., Ünlü, N. (2011). Development and characterization of Cyclosporine A loaded nanoparticles for ocular drug delivery: Cellular toxicity, uptake, and kinetic studies, *Journal of Controlled Release*, 151, 286–294.
167. Soares, S., Fontea, P., Costaa, A., Andradea, J., Seabraa, V., Ferreirac, D., Reisb, S., Sarmentoa, B. (2013). Effect of freeze-drying, cryoprotectants and storage conditions on the stability of secondary structure of insulin-loaded solid lipid nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, 456, 370–381.

168. Suzuki, R., Okada, N., Miyamoto, H., Yoshioka, T., Sakamoto, K., Hiroaki Oka, H., Tsutsumi, Y., Nakagawa, S., Miyazaki, J., Mayumi, T. (2002). Cyotomedical therapy for insulinopenic diabetes using microencapsulated pancreatic h cell lines, *Life Sciences*, 71,1717–1729.
169. Yu, S., Zhao, Y., Wu, F., Zhang, X., Lü, W., Zhang, H., Zhang, Q. (2004). Nasal insulin delivery in the chitosan solution: in vitro and in vivo studies, *International Journal of Pharmaceutics*, 281, 11–23.
170. Bildirici, K., İncedal, HE., Özden, H., Akyüz, F., Cengiz, BP., Altuner, Y. (2005). Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in early diabetic nephropathy: Effect of ACE inhibitors and angiotensin II receptor antagonists, *Türkiye Ekopatoloji Dergisi* 11(1), 1-7.
171. Jagtap, AG., Patil, PB. (2010). Antihyperglycemic activity and inhibition of advanced glycation end product formation by Cuminum cyminum in streptozotocin induced diabetic rats, *Food and Chemical Toxicology* 48, 2030–2036.
172. Grover, JK., Vats, V., Rathi, SS., Dawar, R. (2001). Traditional Indian antidiabetic plants attenuate progression of renal damage in streptozotocin induced diabetic mice, *Journal of Ethnopharmacology*, 76, 233–238.
173. Boyda, HN., Procyshyn, RM., Asiri, Y., Wu, C., Cathy K. Wang, CK., Lo, R., Pang, CCY., Honer, WG., Barr, AM. (2014). Antidiabetic-drug combination treatment for glucose intolerance in adult female rats treated acutely with olanzapine, *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 48, 170–176.
174. Romero-Calvo, I., Ocón, B., Martínez-Moya, P., Suárez, MD., Zarzuelo, A., Martínez-Augustin, O., Sánchez de Medina, F. (2010). Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots, *Analytical Biochemistry*, 401, 318–320.
175. Aldridge, G., Podrebaraca, DM., Greenougha, WT., JeanneWeiler, I. (2008). The use of total protein stains as loading controls: An alternative to high-abundance single-protein controls in semi-quantitative immunoblotting, *Journal of Neuroscience Methods*, 172, 250–254.
176. Dekel, Y., Glucksam, Y., Margalit R. (2010). Novel fibrillar insulin formulations for oral administration: Formulation and in vivo studies in diabetic mice, *Journal of Controlled Release*, 143, 128–135.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı YÜCEL, Çiğdem
 Uyuğu T.C.
 Doğum tarihi ve yeri 16/02/1985
 Medeni hali Bekar
 Telefon 0352 207 66 66/28176
 Faks 0352 438 69 96
 e-posta cyucel@erciyes.edu.tr



Eğitim Derecesi	Okul/Program	Mezuniyet yılı
Doktora	Gazi Üniversitesi /Eczacılık Fakültesi	Devam Ediyor
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi /Eczacılık Fakültesi	2010
Lisans	Gazi Üniversitesi/ Eczacılık Fakültesi	2007

İş Deneyimi, Yıl	Çalıştığı Yer	Görev
2009- devam ediyor	Erciyes Üni. Ecz. Fak.	Arş.Gör.
2008-2009	Türk Eczacılar Birliği	Eczacı
2007-2008	Erciyes Üni. Tıp Fak. Hastane Eczanesi	Eczacı

Yabancı Dili

İngilizce

Yayınlar

- 1- Yücel, Ç., Şeker Karatoprak, G., Aktaş, Y., Koşar, M. (2011). Gallic acid-loaded chitosan nanoparticles: A preliminary study, *Current Opinion in Biotechnology*, 22(1), 127.
- 2- Yücel, Ç., Değim, Z., Yılmaz, Ş. (2012). Nanoparticle and liposome formulation of doxycycline and investigation of transport properties through Caco-2 cell lines. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 35(4), 191-194.
- 3- Büyüktuncel, E., Yücel, Ç., Aktaş, Y., Kaynak, MS. (2012). Development of HPLC method for the determination of cyclosporine A from chitosan nanoparticles, *Latin American Journal of Pharmacy*, 31, 1083-1088.
- 4- Yücel, Ç., Değim, Z., Yılmaz, Ş. (2013). Nanoparticle and liposome formulations of doxycycline: Transport properties through Caco-2 cell line and effects on matrix metalloproteinase secretion. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 67, 459-467.



GAZİ GELECEKTİR