

**T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İNSÜLİNİN POLİMER TAŞIYICILAR İLE KONJUGASYON REAKSİYONLARININ
İNCELENMESİ**

ÖZLEM HORZUM BAYIR

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI
BİYOMÜHENDİSLİK PROGRAMI**

**DANIŞMAN
YRD. DOÇ. DR. ZEYNEP MUSTAFAEVA AKDESTE
EŞ DANIŞMAN
DR.YASEMİN BUDAMA KILINÇ**

İSTANBUL, 2015

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNSÜLİNİN POLİMER TAŞIYICILAR İLE KONJUGASYON REAKSİYONLARININ
İNCELENMESİ

Özlem HORZUM BAYIR tarafından hazırlanan tez çalışması 10.04.2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. Zeynep Mustafaeva AKDESTE
Yıldız Teknik Üniversitesi

Eş Danışman

Dr. Yasemin BUDAMA KILINÇ
Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Yrd. Doç. Dr. Zeynep Mustafaeva AKDESTE
Yıldız Teknik Üniversitesi

Dr. Yasemin BUDAMA KILINÇ
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEV
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Işıl ALBENİZ
İstanbul Üniversitesi

Doç. Dr. Fatma YÜCEL
TÜBİTAK MAM

Bu alışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nün **2013-07-04-GEP03** numaralı “İnsülin ile Kimyasal Kontrollü İlaç Salınım Sistemlerinin Oluşturulması” isimli projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Tez çalışmam süresince sonsuz bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, beraber çalışmaktan gurur duyduğum çok saygıdeğer hocam Yrd. Doç. Dr. Zeynep Mustafaeva Akdeste'ye,

Her zaman için bilgi, yardım ve manevi desteğini esirgemeyen, tez çalışmam süresince her konuda yanımda olan eş danışmanım Dr. Yasemin Budama Kılınç'a,

Tez çalışmam süresince yardımlarıyla destek olan bölüm başkanımız Prof. Dr. İbrahim Işıldak ve çok saygıdeğer bölüm hocalarına ve araştırma görevlilerine,

Bu günlere gelmemde büyük emeği geçen maddi manevi desteklerini esirgemeyen sevgili aileme,

Her zaman olduğu gibi beni bu zorlu süreçte de yalnız bırakmayan ve desteğini esirgemeyen eşim İbrahim Bayır'a,

Tez çalışmamda bana yardımcı olan sevgili arkadaşlarım Ceren Demir, Pelin Pelit Arayıcı ve Tayfun Acar'a,

Samimi sıcak dostluklarıyla her zaman yanımda olan manevi desteklerini hep üzerimde hissettiğim sevgili dostlarım Gülşen Yılmaz, Sevtap Doğan, Şule Koca, Figen Yılmaz ve Peyman Mahouti'ye

Sonsuz teşekkür ederim.

Nisan, 2015

Özlem HORZUM BAYIR

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGE LİSTESİ	viii
KISALTMA LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
ÇİZELGE LİSTESİ	xii
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xv
BÖLÜM 1	
GİRİŞ.....	17
1.1 Literatür Özeti.....	17
1.2 Tezin Amacı.....	18
1.3 Hipotez.....	18
BÖLÜM 2	
GENEL BİLGİLER.....	20
2.1 Proteinler	20
2.1.1 Proteinlerin Yapısı.....	20
2.2 İnsülin	21
2.2.1 İnsülinin Yapısı	21
2.3 Taşıyıcı Polimerler	23
2.3.1 Lineer Yapılı Taşıyıcı Polimerler	23
2.3.1.1 Anyonik Polimerler	25
Poliakrilik asit (PAA)	26
2.3.2 Küresel Yapıda Taşıyıcı Polimerik Partiküller	28
2.3.2.1 Mikropartiküller	28
2.3.2.2 Nanopartiküller	29
Polimerik Nanopartiküller	30
Polimerik Nanopartikül Hazırlama Teknikleri	30
Emülsifikasyon Solvent Evaporasyon/Ekstraksiyon/ Difüzyon Yöntemi. 31	

Çift Emülsiyon (w/o/w) Yöntemi.....	31
'Salting Out' Yöntemi	32
Çözücü Yer Değiştirme / Çökeltme Yöntemi.....	32
2.4 Biyokonjugasyon.....	33
2.4.1 İnsülinin Lineer Polimerler ile Biyokonjugatları	34
2.4.1.1 İnsülinin Lineer Yapılı Polimerler ile Biyokonjugasyonu için Çapraz Bağlayıcılar	36
2.4.2 İnsülinin Polimerik Nanopartiküller ile Biyokonjugasyonu.....	36
BÖLÜM 3	
MATERYAL VE METOT.....	39
3.1 Deneylerde Kullanılan Malzeme ve Ekipmanlar	39
3.1.1 Kullanılan Kimyasallar	39
3.1.2 Kullanılan Cihazlar	40
3.2 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler.....	40
3.2.1 0,01 M 'lık PBS Tamponu (pH=7)	40
3.2.2 % 2,5'lik PVA Çözeltisi	41
3.3 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Ölçüm Yöntemleri.....	41
3.3.1 GPC (Jel Geçirgenlik-Moleküler Eleme Kromatografisi)	41
3.3.2 Floresans Spektroskopisi	42
3.3.3 Boyut ve Zeta Potansiyel Ölçümleri	43
3.3.4 UV-VIS Spektroskopisi (Ultraviyole-Görünür Bölge Spektroskopisi)	44
3.3.5 FT-IR Spektroskopisi (Fourier Transform Infrared Spektroskopisi)	46
3.3.6 AFM (Atomik Kuvvet Mikroskopisi)	47
BÖLÜM 4	
DENEYSEL KISIM.....	49
4.1 İnsülinin Poliakrilikasit (PAA) Polimeri ile Biyokonjugatlarının Sentezi	49
4.1.1 İnsülin - PAA Biyokonjugatlarına Ait Hesaplamalar	49
4.1.1.1 İnsülinin Artan Oranlarında Konjugasyon.....	49
4.2 Poli(Laktik-ko-glikolik) Asit (PLGA) Nanopartiküllerinin Oluşturulması....	50
4.2.1 Yükleme Veriminin Hesaplanması	51
4.3 İnsülinin PAA Polimeri ile Biyokonjugatlarının Analizi.....	51
4.3.1 GPC Analizi	51
4.3.2 Floresans Analizi	54
4.3.3 Zetasizer Analizi	55
4.3.4 UV Analizi	56
4.4 Poli(Laktik-ko-glikolik) Asit (PLGA) Nanopartiküllerinin Analizi.....	57
4.4.1 Zeta Sizer Analizi	57
4.4.2 FTIR Analizi	58
4.4.3 AFM Analizi	60
4.4.4 Yükleme Veriminin Hesaplanması	65

BÖLÜM 5

SONUÇ VE ÖNERİLER	67
5.1 İnsülin – Poliakrilik asit (PAA) Biyokonjugatlarına Ait Sonuçlar	67
5.2 İnsülin – Poli (laktik-ko-glikolik) asit (PLGA) Nanopartiküllerine Ait Sonuçlar	69
KAYNAKLAR.....	73
ÖZGEÇMİŞ.....	80

SİMGE LİSTESİ

°C	Santigrat derece
L	Litre
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
mg	Miligram
µm	Mikrometre
nm	Nanometre
Da	Dalton
kDa	Kilodalton
M	Molar
n	Mol

KISALTMA LİSTESİ

AFM	Atomik Kuvvet Mikroskopisi (Atomik Force Microscopy)
EDC	Karbodiimid
FITC	Floresin İzotiyosiyanat
FT-IR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (Fourier Transform Infrared Spectroscopy)
GPC	Jel Geçirgenlik kromatografisi (Gel Permeation Chromatography)
HCl	Hidroklorik Asit
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Disodyum hidrojen fosfat heptahidrat
NaCl	Sodyum klorür
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Sodyum dihidrojen fosfat dihidrat
NaN_3	Sodyum azid
Np	Nanopartikül
PAA	Poliakrilikasit
PBS	Fosfat Tamponu
PDI	Polidispersite indeksi
PGA	Poliglikolidler
pI	İzoelektrik nokta
PLA	Polilaktidler
PLGA	Poli(laktik-ko-glikolik)asit
PVA	Polivinilalkol
RALS	Işık Saçılması
UV	Ultra Violet

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2. 1	İnsülinin sentezlenme mekanizması [14]..... 23
Şekil 2. 2	İnsan insülini. İnsan insülininin A ve B zincirlerini ve 3 disülfid bağı gösteren aminoasit diyagramı [15] 23
Şekil 2. 3	Poliakrilik asitin yapısı [21]..... 26
Şekil 2. 4	İlaç yüklü mikro/nanopartiküllerin hazırlanması için solvent emülsifikasyon yönteminin şematik olarak gösterilmesi [52] 31
Şekil 2. 5	EDC karbodiimid varlığında biyokonjugasyon mekanizması. (1) ve (2) karboksilat ve primer amin grupları içeren peptid, protein veya herhangi bir kimyasal olabilir [64] 34
Şekil 2. 6	Poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA)'nın yapısı ve monomerleri [74]..... 37
Şekil 3. 1	Floresans spektrofotometre cihazı ve parçaları [84].....43
Şekil 3. 2	Elektromanyetik spektrum.....45
Şekil 3. 3	AFM cihazının şematik diyagramı [91].....47
Şekil 4. 1	pH 7'de hazırlanmış polimer (PAA), insülin ve insülin-PAA biyokonjugatına ait 3 boyutlu GPC UV dedektörü grafiği 52
Şekil 4. 2	pH 7'de hazırlanmış polimer (PAA), insülin ve insülin-PAA biyokonjugatına ait 3 boyutlu GPC RALS grafiği..... 52
Şekil 4. 3	pH 7'de hazırlanmış $n_{ins} = 0,5; 1; 3; 5; 7; 9; 11$ insüline ait 3 boyutlu GPC UV dedektörü grafiği..... 53
Şekil 4. 4	pH 7'de hazırlanmış $n_{ins}/n_{PAA} = 0,5; 1; 3; 5; 7; 9; 11$ insülin-PAA biyokonjugatlarına ait 3 boyutlu GPC UV dedektörü grafiği..... 53
Şekil 4. 5	pH 7'de hazırlanmış $n_{ins}/n_{PAA} = 0,5; 1; 3; 5; 7; 9; 11$ insülin-PAA biyokonjugatına ait 3 boyutlu GPC RALS grafiği 54
Şekil 4. 6	pH 7'de hazırlanmış insülinin 0,5 (♦); 1 (♦); 3 (♦); 7 (♦); 9 (♦); 11 (♦) oranlarına ait Floresans spektrumları 54
Şekil 4. 7	pH 7'de hazırlanmış $n_{ins}/n_{PAA} = 0,5 (♦); 1 (♦); 3 (♦); 5 (♦); 7 (♦); 9 (♦); 11 (♦)$ insülin-PAA biyokonjugatına ait Floresans spektrumları..... 55
Şekil 4. 8	pH 7'de hazırlanmış 0,5; 1; 3; 5; 7; 9; 11 insülin oranlarına ait UV spektrofotometre değerleri 56
Şekil 4. 9	pH 7'de hazırlanmış $n_{ins}/n_{PAA} = 0,5; 1; 3; 5; 7; 9; 11$ insülin-PAA biyokonjugatına ait UV spektrofotometre değerleri 57
Şekil 4. 10	PLGA polimerine ait FT-IR spektrumu.....58
Şekil 4. 11	Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan boş nanopartiküllere ait FT-IR spektrumu (1. Np) 58

Şekil 4. 12	Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan FITC yüklü nanopartiküllere ait FT-IR spektrumu (2. Np).....	59
Şekil 4. 13	Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan insülin yüklü nanopartiküllere ait FT-IR spektrumu (3. Np).....	59
Şekil 4. 14	Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan FITC ve insülin yüklü nanopartiküllere ait FT-IR spektrumu (4. Np).....	60
Şekil 4. 15	Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan boş nanopartiküllere (1. Np) ait sırasıyla 2D ve 3D AFM görüntüsü ($1 \times 1 \mu\text{m}^2$ 'lik alan).....	60
Şekil 4. 16	Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan boş nanopartiküllere (1. Np) ait sırasıyla 2D ve 3D AFM görüntüsü ($2 \times 2 \mu\text{m}^2$ 'lik alan).....	61
Şekil 4. 17	Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan boş nanopartiküllere (1. Np) ait sırasıyla 2D ve 3D AFM görüntüsü ($4 \times 4 \mu\text{m}^2$ 'lik alan).....	61
Şekil 4. 18	Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan boş nanopartiküllere (1. Np) ait sırasıyla 2D ve 3D AFM görüntüsü ($8 \times 8 \mu\text{m}^2$ 'lik alan).....	62
Şekil 4. 19	Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan FITC yüklü nanopartiküllere (2. Np) ait sırasıyla 2D ve 3D AFM görüntüsü ($3 \times 3 \mu\text{m}^2$ 'lik alan).....	62
Şekil 4. 20	Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan insülin yüklü nanopartiküllere (3. Np) ait sırasıyla 2D ve 3D AFM görüntüsü ($2 \times 2 \mu\text{m}^2$ 'lik alan).....	63
Şekil 4. 21	Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan insülin yüklü nanopartiküllere (3. Np) ait sırasıyla 2D ve 3D AFM görüntüsü ($4 \times 4 \mu\text{m}^2$ 'lik alan).....	63
Şekil 4. 22	Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan insülin yüklü nanopartiküllere (3. Np) ait sırasıyla 2D ve 3D AFM görüntüsü ($4 \times 4 \mu\text{m}^2$ 'lik alan).....	64
Şekil 4. 23	Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan FITC + insülin yüklü nanopartiküllere (4. Np) ait sırasıyla 2D ve 3D AFM görüntüsü ($1 \times 1 \mu\text{m}^2$ 'lik alan).....	64
Şekil 4. 24	Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan FITC + insülin yüklü nanopartiküllere (4. Np) ait sırasıyla 2D ve 3D AFM görüntüsü ($4 \times 4 \mu\text{m}^2$ 'lik alan).....	65
Şekil 4. 25	Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan FITC + insülin yüklü nanopartiküllere (4. Np) ait sırasıyla 2D ve 3D AFM görüntüsü ($8 \times 8 \mu\text{m}^2$ 'lik alan).....	65
Şekil 4. 26	İnsülin UV standart eğrisi.....	66
Şekil 5. 1	Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan (1. Np: Boş, 2. Np: FITC yüklü, 3. Np: İnsülin yüklü, 4. Np: FITC+İnsülin yüklü) nanopartiküllere ait Zetasizer boyut değerlerinin karşılaştırılması.....	70
Şekil 5. 2	Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan sırasıyla 1. Np: Boş ($4 \times 4 \mu\text{m}^2$), 2. Np: ($3 \times 3 \mu\text{m}^2$) 3. Np: İnsülin yüklü ($4 \times 4 \mu\text{m}^2$), 4. Np: FITC+İnsülin yüklü ($4 \times 4 \mu\text{m}^2$) nanopartiküllere ait 2D AFM görüntüsü.....	72

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2. 1	Poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA)-insülin nanopartiküllerinden elde edilen bazı boyut değerleri [77-79].....	38
Çizelge 3. 1	Deneyssel çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin özellikleri.....	39
Çizelge 4. 1	pH 7'de hazırlanmış $n_{ins}/n_{PAA} = 0,5; 1; 3; 5; 7; 9; 11$ biyokonjugatlarına ait Zetapotansiyel değerleri.....	55
Çizelge 4. 2	Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan (1. Np: Boş nanopartikül, 2. Np: FITC yüklü, 3. Np: insülin yüklü, 4. Np: FITC ve insülin yüklü) nanopartiküllere ait boyut değerleri.....	57
Çizelge 4. 3	Nanopartiküllere ait UV280nm değerleri ve % yükleme miktarları.....	66
Çizelge 5. 1	İnsülin – PLGA nanopartiküllerinde bulunan fonksiyonel gruplar ile FTIR spektrumundan elde edilen fonksiyonel grupların eşleştirilmesi.....	70

İNSÜLİNİN POLİMER TAŞIYICILAR İLE KONJUGASYON REAKSİYONLARININ İNCELENMESİ

Özlem HORZUM BAYIR

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Zeynep Mustafaeva AKDESTE

Eş Danışman: Dr. Yasemin BUDAMA KILINÇ

Biyokonjugasyon yeni bir kompleks oluşturmak için iki ya da daha fazla molekülün farklı özelliklerinin biraraya getirilmesiyle bağlanmasını içerir. Son yıllarda malzeme bilimi polimerik malzemelere odaklanmıştır. Polimerler üzerinde istenen değişiklikler kolay ve kontrollü olduğundan, polimerler çeşitli biyolojik uygulamalarda kullanılmaktadır. Polimerler ilaç salımı, antijen salımı, doku mühendisliği, medikal cihaz implantasyonu gibi medikal uygulamaların yanında biyoteknolojinin birçok uygulamasında da yer almaktadır. Polimerler ilaç, peptid, hormon vb. yapıların vücuda iletilmesinde taşıyıcı rolü oynamaktadırlar.

İnsülin vücuttaki şeker metabolizmasında önemli bir rol oynamaktadır. İnsülin aktivitesinin yetersizliğinde ortaya çıkan diyabet hastalığına karşı geleneksel yöntemlerin yetersiz olması araştırmacıları aktiviteyi arttıran yeni yöntemler araştırmaya yöneltmiştir. İnsülin uygulaması sadece parenteral yolla yapıldığı için, oral, nazal, rektal, pulmoner ve oküler gibi farklı uygulama yolları üzerinde geniş ölçüde araştırmalar yapılmaktadır. İnsülin moleküllerinin anyonik polimerlerle biyokonjugatları ve insülinin nanokapsüller, nanoküreler ya da mikroküreler gibi biyobozunur nano ve mikro yapılarda enkapsüle edilmesi insülin aktivitesini arttıran yöntemler olarak sıralanır.

Bu tez kapsamında farklı polimerlerle insülin biyokonjugatları oluşturularak diyabet hastalığının tedavisi için kontrollü ilaç salınım sistemi tasarlanmıştır. Bu doğrultuda

lineer yapılı Poliakrilik asit ve küresel yapıdaki Poli(laktik-ko-glikolik asit) nanopartikülleri olmak üzere iki farklı polimer kullanılmıştır: (i) İlki lineer anyonik bir polimer olan ve yüksek mukoadesiflik ve özellikle düşük moleköl ağırlıklarında düşük toksisitesine bağılı olarak en çok çalışılan mukoadesif polimerlerden biri olan PAA polimeridir. (ii) İkinci olarak, poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) biyopolimeri bir haftadadan birkaç aya kadar sürekli etki gösteren kontrollü ve destekleyici ilaç iletim sistemi olarak kullanılmaktadır. PLGA çoklu enjeksiyon, yüksek toksisite gibi sorunları aşmak ve kısa in vivo yarı ömürlü molekülleri koruyarak istenen tedavi etkisini sağlamak amacıyla tercih edilmektedir.

Bu tez çalışmasında insülinin poliakrilik asit (PAA) ile kovalent biyokonjugatı sentezlenmiş ve ayrıca poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) kullanılarak insülin nanopartikülleri elde edilmiştir. Elde edilen kovalent biyokonjugatlar GPC, UV spektrofotometri, Zetasizer, Floresans spektrofotometre cihazlarıyla incelenmiştir. Poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) polimeriyle oluşturulan insülin nanopartikülleri zetasizer ve FTIR yöntemiyle analiz edilmiştir. İnsülinin nanopartiköl içine yükleme verimi hesaplanmıştır. Atomik kuvvet mikroskobu ile nanopartiköl oluşumu incelenmiştir.

Bu tez çalışmasının, lineer polimer ve polimerik nanopartiküller ile tasarlanan insülin-polimer biyokonjugatları ve nanopartikülleri kullanılarak insülin kontrollü ilaç salım sistemlerinin oluşturulmasıyla ilgili çalışmalara ışık tutması hedeflenmektedir.

Anahtar Kelimeler: Biyokonjugasyon, polimer, insülin, nanopartiköl, kromatografi, spektroskopi, atomik kuvvet mikroskop.

**ANALYSIS OF INSULIN CONJUGATION REACTIONS WITH CARRIER
POLYMERS**

Özlem HORZUM BAYIR

Department of Bioengineering

MSc. Thesis

Advisor: Assist. Prof. Dr. Zeynep Mustafaeva AKDESTE

Co-Advisor: Dr. Yasemin BUDAMA KILINÇ

Bioconjugation includes combining different properties of two or more molecules to form a new complex. Recently, materials science has focused on softer materials such as polymers. Since the desired modification on the polymer is controlled and easy, polymers are used in various biological applications. Polymers are used in various medical applications such as drug release, antigen release, tissue engineering and also in many applications of biotechnology.

Insulin plays a central role in glucose metabolism in the body. Because the traditional methods for diabetes arising due to inadequacy of insulin activity is inadequate, researchers focus on new methods to improve activity. Since parenteral administration is the only route for insulin treatment, it has been extensively investigated new routes such as oral, nasal, rectal, pulmonary and ocular. Bioconjugation of insulin with anionic polymers or encapsulation of insulin in biodegradable nano and micro structures such as nanocapsules, nanospheres or microspheres is considered the methods to enhances the insulin activity.

In scope of this thesis, it was designed controlled drug delivery system forming insulin bioconjugates with different polymers for diabetes treatment. Accordingly, it was used two different polymers: (i) First, a linear anionic polymer, PAA, is the one of the most popular mucoadhesive polymer due to its high mucoadhesive functionality, low toxicity

especially with low molecular weight. (ii) Secondly, poly (lactic -co -glycolic acid) (PLGA) polymer is used as a controlled and sustained drug delivery system with continuous effect from one week to several months. PLGA is preferred to overcome problems such as multiple injections and high toxicity and provide the desired therapeutic effect by protecting the molecules with short in vivo half- life.

In this thesis study, it was synthesized covalent bioconjugate of insulin and polyacrylic acid and obtained insulin nanoparticles using poly(lactic-co-glycolic acid). The obtained bioconjugates were analysed with GPC, UV spectrophotometry, Zetasizer, Fluorescence spectrophotometry. Insulin nanoparticles formed by poly(lactic-co-glycolic acid) polymers were analysed with Zetasizer and FTIR. Nanoparticle formation was investigated with Atomic Force Microscope.

In this thesis study, it aims to provide an insight for future studies related to insulin controlled drug release systems using insulin-polymer bioconjugates and nanoparticles designed with linear polymer and polymeric nanoparticles.

Keywords: Bioconjugation, polymers, insulin, nanoparticle, chromatography, spectroscopy, atomic force microscope.

1.1 Literatür Özeti

Diyabet uzun dönemde dejeneratif komplikasyonlara yol açabilen kronik bir hastalıktır. İnsülinin keşfi, hem diyabet çalışmasında hem de diyabetik hastaların bakımında çığır açan bir olaydır. İnsülini saflaştırma ve modifiye etme prosedürlerinin geliştirilmesi ek olarak 30 sene almıştır [1].

Günümüzde, insülin salımı subkutanöz ya da intramusküler yolla gerçekleştirilmektedir. İnsülin bağımlı diyabet mellitus (IDDM) hastalarında kronik diyabet komplikasyonlarını önlemek için diyabetiklerde yeterli metabolik kontrol gerekli olduğundan, glikoz kontrolü günde birden fazla enjeksiyonla yoğun bir insülin terapisi gerekmektedir [2]. Alternatif olarak, deri altına yerleştirilmiş kalıcı bir iğneye bağlanmış bir insülin pompası kullanarak sürekli enfüzyon yoluyla terapi gerçekleştirilir. Ancak bu sistemle ilgili spesifik dezavantajlar yaygın kullanımını sınırlamaktadır [3]. Ayrıca parenteral yolla ilgili dezavantajlar, kendine enjeksiyon sırasında acı ve rahatsızlığa bağlı olarak hasta uyumluluğunun zayıf olması, subkutanöz olarak verilen insülinin absorpsiyonunun yavaş ve devamlı olması ve diyabetik olmayanlarda gözlemlenen endojen olarak salınan insülinin fizyolojik pulsatil modelini taklit etmede başarısız olması, glisemik kontrolde birey içi ve bireyler arası değişkenliğin büyük olması, enjeksiyon bölgesinde enfeksiyonların meydana gelebilmesi [2, 4] şeklinde sıralabilir.

Bu tez çalışmasında ilk olarak Poliakrilik asit (PAA) ile insülin “1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorid (EDC)” çapraz bağlayıcısı varlığında ve insülinin değişen molar oranlarında suda çözünebilen İnsülin - PAA biyokonjugatları

sentezlendi. Elde edilen İnsülin – PAA biyokonjugatlarının, insülin ve PAA polimeri ile karşılaştırmalı olarak GPC, Zetasizer ve Floresans Spektrofotometre ve UV-Vis Spektrofotometre cihazları ile analizleri yapıldı.

Ayrıca, sentezlenen biyokonjugatların yanında insülinin hem tek başına hem de floresein izotiyosiyanat (FITC) boyası ile beraber yüklendiği Poli(laktik-ko-glikolik) asit (PLGA) nanopartikülleri üretildi. Elde edilen nanopartiküllerin boyut analizleri Zetasizer cihazı ile gerçekleştirildi. Nanopartiküllerin yükleme verimi hesaplandı. FT-IR analizleri de gerçekleştirilen nanopartiküllerin daha sonra AFM görüntüleri alınarak ayrıntılı olarak karakterize edildi.

1.2 Tezin Amacı

Dünya genelinde oldukça yaygın olan diyabet hastalığı için günümüzde uygulanan insülin tedavilerinin dezavantajlarının oluşturduğu olumsuz etkileri hafifletecek ya da yok edecek alternatif kontrollü salım sistemi modellerinin ayrıntılı şekilde karakterizasyonunun yapılmasıdır.

Bu amaçla iki yöntemle polimer taşıyıcıların insüline bağlanması hedeflenmektedir. Bu yöntemlerden ilki, insülinin lineer bir polimerle kovalent konjugasyonunu içermektedir. İkinci yöntem, son zamanlarda ilaç, peptid, hormon vb. yapıları taşımada ön plana çıkan küresel polimerik nanopartiküllerin içerisine insülinin yüklenmesini içermektedir.

Bu tez çalışmasında, lineer polimer ve polimerik nanopartiküller ile tasarlanan insülin-polimer biyokonjugatları ve nanopartikülleri kullanılarak insülin kontrollü ilaç salım sistemlerinin oluşturulması hedeflenmektedir.

1.3 Hipotez

Tez çalışmasında, insülin ile poliakrilik asit (PAA) polimerlerinin biyokonjugasyonun sağlanması ve sabit polimer ve artan insülin miktarıyla oluşturulan lineer yapılı biyokonjugatların fizikokimyasal özelliklerinin kromatografik ve spektroskopik olarak incelenmesi, ayrıca insülinin poli(laktik-ko-glikolik) (PLGA) polimeri ile nanopartiküllerinin oluşturulması ve oluşturulan nanopartiküllerin kromatografik,

spektroskopik ve mikroskopik yöntemlerle incelenerek oluşumların mikroskopik olarak gösterilmesi beklenmektedir.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1 Proteinler

Proteinler hücrede en sık karşılaşılan organik moleküller olup hücre kuru kütlesinin en az %50'sini oluştururlar. Biyolojik proseslerin hemen tamamında önemli rol oynarlar. Doğal ortamları dışında çok kararlı değildirler ve hücre içi kompartımanlar ve hücre dışı sıvılar arasında önemli farklılıklar gösterirler. Her bir protein değişen sayıda 20 farklı α -L-aminoasidin kombinasyonundan oluşur. Aminoasitlerin dizisi, her bir yan grubun pozisyonu; molekülün fonksiyonunu gösterdiği en son kararlı yapısını oluşturur. Bu bağlamda çok çeşitli fonksiyonu üstlenen proteinler yapılarındaki aminoasit dizileri açısından farklılık gösterirler [5].

İnsan vücudundaki binlerce protein, tablo halinde sunulamayacak kadar çok işlev gerçekleştirir. Bu işlevler arasında vitaminler, oksijen ve karbon dioksiti taşımanın yanı sıra yapısal, kinetik, katalitik ve bilgi aktarıcı roller bulunmaktadır [6].

2.1.1 Proteinlerin Yapısı

Peptid ve proteinler;

- Karbon (C),
- Hidrojen (H),
- Oksijen (O),

- Azot (N),
- ve bazıları da Sülfür (S) içermektedir.

Peptidler aminoasit monomerlerinin peptid (amid) bağları ile bir araya gelmesinden oluşan doğal polimerlerdir. Peptidlerin biyolojik sistemlerdeki şaperonlar aracılığıyla katlanması sonucu ise proteinler oluşmaktadır.

Peptid bağı; bir aminoasitteki karboksil grubunun karbon atomu ile diğer aminoasitteki amino grubunun azot atomu arasında oluşan kovalent bağıdır.

2.2 İnsülin

Hücreler moleküler bir posta sistemi ile iletişim kurmaktadır: Kan bir taşıyıcı, hormonlar da taşınan mesajlardır. İnsülin kanda her daim bulunan şeker miktarını tanımlayan mesajları taşıyan en önemli hormonlardan biridir. İnsülin pankreasta üretilir ve yemeklerden sonra şeker seviyeleri yükseldiğinde kana salınır. Bu sinyal karaciğere, kaslara ve yağ hücrelerine kadar vücut boyunca yayılır. İnsülin kandaki glikozu bu organlara götürür ve glikojen ya da yağ şeklinde depolar [7].

Son yüzyıl boyunca insülin, peptid kimyası, farmakoloji, hücre sinyal iletimi ve yapısal biyolojinin ilerlemesinde merkezi bir rol sergilemiştir. Bu keşifler diyabetle başa çıkmak zorunda olanlar için yaşam kalitesi ve süresini geliştirmeyi sağlamıştır. Ortak çalışma, daha uygun hale getirilmiş tedaviyi sağlayabilen insülin analog ve taklitlerinin geliştirilmesi için bir zemin sağlamaktadır. Hasta bakımındaki ilerleme semisentez, yüksek performans kromatografisi, rekombinant DNA-biyosentezi gibi temel teknolojilerdeki yeniliklerle hızlanmaktadır. Çok sayıda insülin analogu insülin faaliyetini anlaşılmada ilk seviyeyi sağlamak için biyokimyasal sinyal iletimi ve yapısal biyolojiyi koordine ederek göstermektedir. İnsülin çalışması geniş kimyasal çeşitliliğinin girmesi, bütün kimyasal sentezdeki verimsizlik ve rekombinant DNA-biyosentezi ve semisentezik yaklaşımlardaki doğal kısıtlar yoluyla sınırlanmıştır [8].

2.2.1 İnsülinin Yapısı

İnsülin kan boyunca hızlıca hareket eder ve mesajını iletirken hücre yüzeylerindeki reseptörler tarafından kolaylıkla yakalanır. Küçük proteinler hücrelere bir zorluk

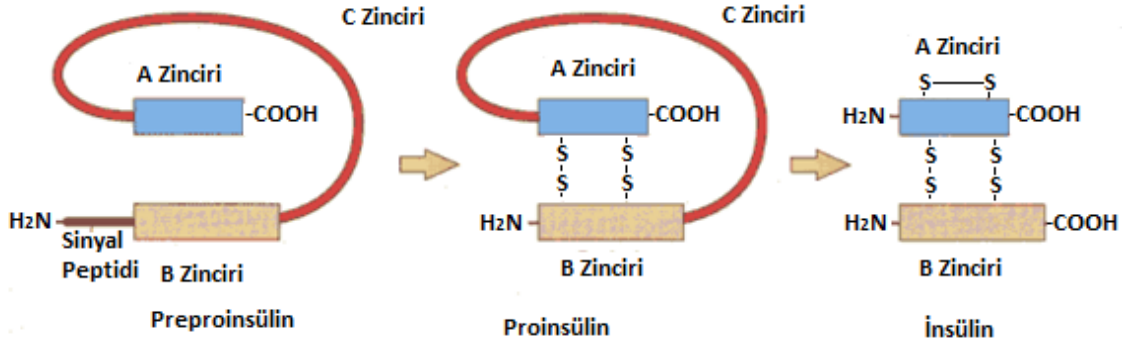
yaratmaktadır: Stabil bir yapıya katlanacak küçük bir protein oluşturmak zordur. Hücreler bu problemi uygun bir yapıya katlanan daha uzun bir protein zinciri sentezleme yoluyla çözmektedir [7].

İnsülin, artan kan glikozu seviyelerine yanıt olarak endokrin pankreasın Langerhans adacıklarının β -hücreleri yoluyla salgılanan bir polipeptid hormondur. İnsülin işlenmemiş endoplazmik retikuluma bağlı ribozomlar yoluyla sentezlenir. İnsülinin ilk öncüsü preproinsülinidir. Preproinsülin amino ucunda, endoplazmik retikulumun hücre zarları aracılığıyla preproinsülinin taşınmasını kolaylaştıran hidrofobik bir sinyal peptidi içerir. Endoplazmik retikulumun lümeni içerisindeki sinyal peptidi proinsülin üretmek için proteazlar tarafından parçalanır. Proinsülin, insüline dönüştürüleceği Golgi kompleksine taşınır. Proinsülin üç bölge içerir: A zinciri (21 aminoasit rezidüsüyle), B zinciri (30 aminoasit rezidüsüyle) bunları birbirine bağlayan C zinciri [9, 10]. İki sistein aminoasitinin birleşmesiyle oluşan iki disülfid bağı aracılığıyla bağlanmış iki polipeptid yapılmaktadır. Ayrıca A zinciri 6 ve 11 rezidüsüne disülfid köprü bağlantısı yapan bir iç zincir içerir. A ve B zincirine bağlanan C zinciri, proinsülinin dağılmasından sonra insülinle serbestleşir. İnsülin monomerleri dimer ve hegzamerler oluşturmak için agregre olurlar [10]. Şekil 2. 1 insülinin sentezlenme mekanizmasını özetlemektedir.

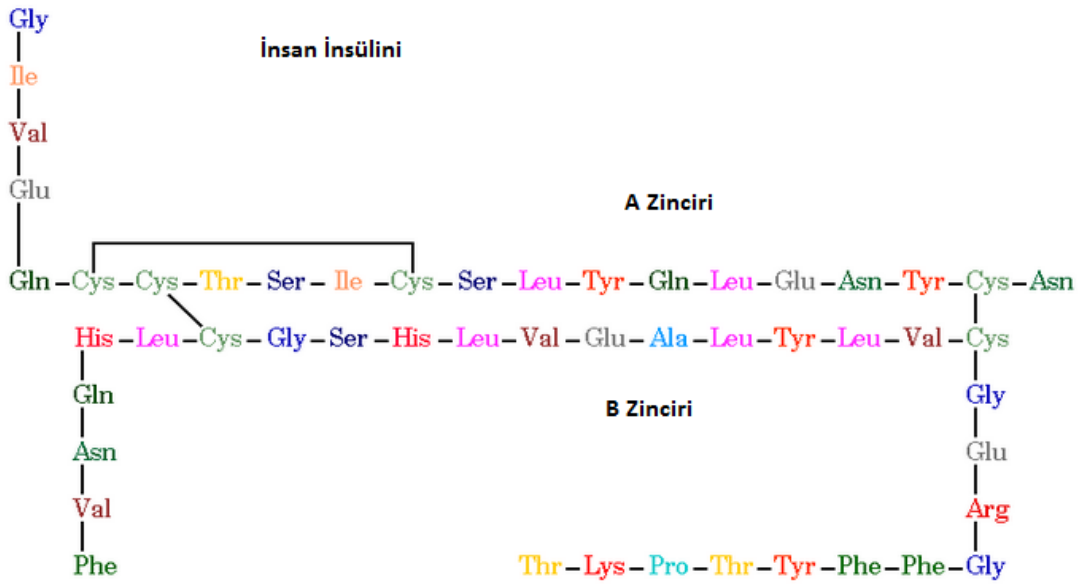
İnsülin molekülü pozitif olarak yüklenebilen 6 aminoasit rezidü ve negatif olarak yüklenebilen 10 aminoasit rezidünün varlığına bağlı olarak çok sayıda iyonlaşabilen grup içermektedir. İzoelektrik noktası pH 5. 4'tür [11].

İnsülin pH 2-8'deki sulu çözeltilerin yüksek konsantrasyonlarında stabil dimerlere ve çinko iyonlarının varlığında hegzamerlere agregre olma eğilimindeyken sadece düşük konsantrasyonlarda monomer olarak bulunur. Polar yüzeyin çoğunluğunu oluşturan A zincirindeki hegzamer 5 nm çapında ve 3,5 nm boyunda neredeyse küresel bir yapıdadır [12].

İnsülinin insan vücudunda kullanışlı olmak için yapısındaki değişimi onu özel kılan yönlerinden biridir [13].



Şekil 2. 1 İnsülinin sentezlenme mekanizması [14]



Şekil 2. 2 İnsan insülini. İnsan insülininin A ve B zincirlerini ve 3 disülfid bağı gösteren aminoasit diyagramı [15]

2.3 Taşıyıcı Polimerler

2.3.1 Lineer Yapılı Taşıyıcı Polimerler

Canlı sistemlerde taşıyıcı olarak sıklıkla tercih edilen polielektrolitler yapılarında pozitif veya negatif yüklü gruplar bulunduran makromoleküllerdir.

Polielektrolit terimi kovalent olarak bağlı anyonik veya katyonik grupları ve bu gruplara bağlı "counter" iyonları olan polimer sistemleri için kullanılmaktadır [16]. Tüm monomerlerinde aynı işaretli yüklere sahip polielektrolitlere homopolielektrolit adı verilmektedir. Hem anyonik hem de katyonik grupların kovalent olarak bağlı bulunduğu makro moleküller ise poliamfolitler olarak isimlendirilmektedirler. Doğada bol miktarda

protein yapılı poliamfolit bulunmakla birlikte sentetik yollarla da poliamfolitler elde edilebilir. Poliamfolitlerin izoelektrik noktalarında molekül üzerindeki net yük toplamı sıfıra eşittir [17].

Polielektrolitler iyonlaşabilen gruplara sahip polimerlerdir ve sadece organik çözücülerde çözünebilen çoğu nötral hidrokarbon polimerlerinin aksine suda çözünürdür[16, 18]. Su gibi polar çözücülerde, bu gruplar polimer zincirleri üzerinde yükler bırakarak ve çözeltide zıt yükler salarak ayrışabilir [16]. Bu polimer konformasyonu üzerinde güçlü bir etkidir. Yüksüz bir polimer rastgele bir yumak oluştururken, polielektrolitler daha açılmış yapılar sergiler. Ayrıca elektrolit çözeltisi ve çözelti molekülleri daha viskozdur.

Fosfat gruplarına bağlı olarak negatif olarak yüklenmiş DNA gibi biyolojik bir iyon K^+ , Na^+ , Ca^{+2} ve Mg^{+2} pozitif anyonlarla çevrelenir. Doğal polielektrolitlere örnek olarak nükleik asitler (anyonik), poli(L-glutamik asit) (anyonik), poli (L-lizin) (katyonik) verilebilir [18].

Polistiren sülfonat, poliakrilik ve polimetakrilik asit ve tuzları ve diğer poliasit ve polibazlar polielektrolitlere örnek olarak verilebilir. Yükler arasındaki elektrostatik etkileşimler polielektrolit çözeltilerinin yüksüz polimerlere kıyasla çok farklı davranışlar kazanmasını sağlar. Örneğin:

1. Seyreltik durumdan yarı seyreltik duruma geçiş nötral zincirli çözeltilere göre çok daha düşük polimer konsantrasyonlarında gerçekleşir.
2. Homojen polielektrolit çözeltilerinin saçılma fonksiyonunda belirgin bir pik vardır. Bu pike karşılık gelen dalga vektörünün büyüklüğü konsantrasyonla $c^{1/2}$ şeklinde artar. Nötral polimerlerin çözeltilerinde böyle bir pik yoktur.
3. Tuz içermeyen çözeltilerdeki polielektrolitlerin ozmotik basıncı eş polimer konsantrasyonlardaki nötral polimerlerin ozmotik basıncını aşar. Polimer konsantrasyonu ile hemen hemen doğrusal olarak artar ve polimer konsantrasyonlarının geniş bir aralığında zincir molekül ağırlığından bağımsızdır. Eklenmiş tuza güçlü bağıllığıyla ozmotik basıncın bu yaklaşık doğrusal konsantrasyona bağıllığı ozmotik basıncın temel olarak zıt yük katkısına bağlı olduğunu göstermektedir.

4. Aynı konsantrasyondaki yüksüz polimer çözeltileri için viskozite polimer konsantrasyonu ile orantılıyken polielektrolit çözeltilerinin viskozitesi polimer konsantrasyonun karekökü ile $\eta \sim c^{1/2}$ (Fuoss' kanunu [19]) orantılıdır. Nötral polimer çözeltilerinin indirgenmiş viskozitesinin η/c , polimer konsantrasyonu ile azalması konsantrasyon rejimi yoktur.

5. Yarı seyreltik durumdaki polielektrolit zincirleri çok daha geniş bir konsantrasyon aralığında karmaşık olmayan dinamikleri izler ve yüksüz polimer çözeltilerine göre zincir aşma konsantrasyonundan daha uzakta karmaşık dinamiklere geçiş yapar.

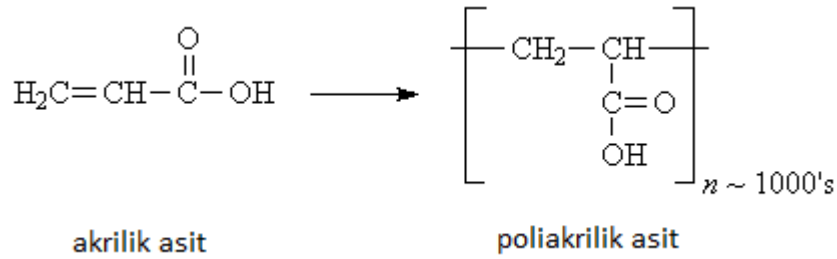
Yüzeyler ve ara yüzeylerdeki polielektrolit zincirleri, lokal polimer konsantrasyonu adsorbe eden substrat ve polielektrolit zincirleri arasındaki etkileşimler yoluyla kontrol edildiğinde hem iki hem de üç boyutlu bir polielektrolit çözeltisi örneği sunar. Yüzey yük yoğunluğu artarken, adsorbe edilen zincirlerin seyreltik çözeltileri iki boyutlu yarı seyreltik bir çözeltiye dönüşür. Eğer yüzey yük yoğunluğu daha da artarsa, adsorbe edilen tabakadaki zincirler yüzey yük yoğunluğu artan kalınlıkla birlikte konsantre bir polielektrolit çözeltisi oluşturur. Adsorbe edilen tabakalarda gözlemlenen yeni ve alışılmadık olay, adsorbe edilen polielektrolit zincirleri yoluyla yüzeyin fazla yüklenmesidir. Yüzeyin fazla yüklenme miktarı çözelti iyonik dayanımının değiştirilmesiyle ayarlanabilir. Yük değişimi tabaka tabaka birikim tekniğinde merkezi bir rol oynar [16].

2.3.1.1 Anyonik Polimerler

Bu polimerlerin üzerindeki yük tipi negatiftir. Anyonik polimerler çeşitli tiplerde olabilir. Çeşitli anyonik polimerler arasında akrilamid bazlı olanlar en yaygın olanlarıdır. Bu polimerler molekül ağırlığı ve yük yoğunluğu özellikleriyle değerlendirilebilirler. Anyonik makromolekül zincirinin uzunluğu düşük molekül ağırlığından kontrol edilebilir. Anyonik makromoleküller boyunca negatif yük yoğunluğu 0'dan %100'e kadar çeşitlenebilir.

Poliakrilik asit (PAA)

Akrilik asit organik doymamış bir asittir. Akrilik asit, akrilamid ve türevleri en popüler suda çözünür monomerlerdir. Bunlar arasında en yaygın olanı kayda değer çözünebilirliği ile akrilik asittir. Bu monomer kolaylıkla polimerize edilebilir ve pH'sı inorganik bir baz ile ayarlanabilir. Sonuçta oluşan polimer düz zincirli ise sulu bir çözeltide kolaylıkla çözünebilir. Ancak çapraz bağlayıcı bir ajan ya da suda çözünmeyen bir malzeme üzerine graft yapıldığında su moleküllerini adsorplayacaktır ve şişecektir, fakat çözünmeyecektir. Bu monomerler sulu çözelti ya da diğer polimerizasyon prosesleri yoluyla farklı ko-monomerlerden oluşan çapraz bağlı homopolimer ya da kopolimeri sentezlemek için kullanılabilinmektedir [20].



Şekil 2. 3 Poliakrilik asitin yapısı [21]

Akrilik asitin polimerizasyonu için birçok yöntem bulunmaktadır. Genellikle akrilik asit suda çözünür başlatıcılar ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) [22] ya da yağda çözünür başlatıcılar (2,2'azoizobütironitril (AIBN) [23] kullanılarak başlatılır ve polimerize edilir.

Hem lineer hem de çapraz bağlı poli(akrilik asit) makromolekül zincirlerindeki karboksil gruplarından dolayı hidrofiliktir.

Poliakrilik asit çok sayıda endüstriyel uygulaması olan biyobozunur suda çözünür bir polimerdir. Bu polimerin molekül ağırlığı dağılımı polimerin hangi amaçla kullanılacağını etkileyen önemli bir parametredir [24]. PAA türevi olan polikarbofil (Noveon®) ve karbomerler (Carbopol®), gastrointestinal bölgeye hedeflendirilmek için kullanılan mukoadhezif ilaç taşıyıcı sistemlerde yaygın olarak kullanılmışlardır [25-27].

Polikarbofil (Noveon AA1), Carbopol 971P ve Carbopol 974P çapraz bağlanma koşulları farklılık gösteren poliakrilatlardır. Carbopol 971P'in daha fazla çapraz bağ içeren ve yüksek viskoziteli analogu Carbopol 974P, deriye (insan), göze (tavşan) karşı iritasyona

sebeup olmaz ve oral olarak toksik değildir (fare ve köpekler). Bu yüzden bu üç polimer FDA tarafından GRAS (Generally Recognized As Safe, Genel Olarak Güvenli Olarak Tanımlanmış) sayılmaktadır [28].

Polikarbofiller sulu ortamda çözünmez fakat nötr pH değerlerinde şişme kapasiteleri yüksektir ve suyu absorblama ve tutma yeteneğine bağlı olarak antidiyareik ve laksatif özelliklere sahiptir [28-30]. Polikarbofillerin sulu ortamda nötr pH'da kütlesi 100 kat artmaktadır [27, 29]. Buna ek olarak non-iyonize karboksilik asit grupları hidrojen bağ etkileşimi ile mukozal yüzeylere bağlanmaktadır [27, 31].

Karbomer ve polikarbofil çapraz bağlanma seviyesi ve çapraz bağlayıcı ajan seçiminde farklılıklar gösterir. Polikarbofil polimerleri divinil glikol ile çapraz bağlanırken, karbomerler alil sükroz veya alil pentaeritritol ile çapraz bağlanır. Her iki bileşik de benzer akrilik iskeletine sahiptir ancak içerdikleri çapraz bağ yoğunlukları değişkenlik gösterir [27].

Bu poliakrilik asitlerin suyu absorplaması, şişmesi, ilaç salımı ve mukoadesyonu ortamın pH'sı ve iyonik gücünden etkilenmektedir [28, 32-35].

Literatüre göre poliakrilik asit (PAA), akrilik asitin başlatıcı olarak benzoilperoksit ile birlikte toluen içerisinde radikal polimerizasyonu ve etil asetatla fraksiyonel çökeltme yoluyla metanolde %3'ten 4'lük çözeltiye fraksiyonlamasıyla hazırlanmaktadır [36].

Poliakrilik Asitin Tıpta Uygulamaları

Poliakrilik asit mukozal ilaç salım formülasyonlarına mukoadesif bir katkı olarak kovalent çapraz bağlanmış formda kullanılmasının yanında tıpta da uygulamaları mevcuttur (örn: dental dolgular). [37].

Poliakrilik polimerleri biyoadesif büyük moleküller olduğundan ve intestinal epitelyum aracılığıyla absorbe olmadığından herhangi bir sistemik toksisiteye yol açmamaktadır ve bu nedenle peptid hormonlarının oral absorpsiyonunun geliştirilmesi için avantajlar sunmaktadır.

Çok sayıda karboksilik asit grubu içeren poliakrilik polimerleri yerel geçici bir asidik kalkan yaratarak intestinal lümende çok sayıda protonu salabilir ve böylece peptid ve protein ilaçları lümenal enzimlerin saldırısından koruyabilir. Bu asidik ortamdaki

optimum pH'sı 7.5'dan büyük olan pankreatik enzimler çok daha düşük ya da önemsiz olacaktır [38].

2.3.2 Küresel Yapıda Taşıyıcı Polimerik Partiküller

2.3.2.1 Mikropartiküller

Mikropartiküller partikül boyutunun 1 mikrondan birkaç milimetreye kadar uzandığı bir ilaç salım sistemi tipidir. Bu mikroenkapsülasyon teknolojisi ilacın ortamdan korunmasını, hassas ilaç maddelerinin stabilizasyonunu, imkompabilitelerin elimine edilmesini ya da hoş olmayan tadın gizlenmesini sağlamaktadır [39].

Mikropartiküller enkapsüle edilmiş ilacı bozunmaya karşı (örn: enzimatik) etkili şekilde koruyarak makromoleküllerin çeşitli yollarla salınımını sağlar ve ilaçların atılımını birkaç saatten aylara uzanan periyotlarda etkili biçimde kontrol eder [40]. Mikropartikül ilaç salım sistemlerinin avantajları aşağıdaki gibi sıralabilir:

- Mikropartiküllerin partikül boyutu ve yüzey karakteristikleri parenteral yolla verilışinden sonra hem pasif hem de aktif ilaç hedeflemeyi sağlamak için kolaylıkla manipüle edilebilir.
- Lokasyon bölgesinde, gönderim sırasında ilacın teröpatik etkisini arttırmak ve yan etkilerini azaltmak için ilacın salımını ilacın organdaki dağılımını ve ilacın klirensini değıştirerek kontrol ederler.
- Kontrollü salım ve partikül bozunma karakteristikleri matriks içeriklerinin seçimiyle kolaylıkla ayarlanabilir.
- Bölge-spesifik hedefleme partiküllerin yüzeyine hedefleme ligandları bağlanarak ya da manyetik rehberlik kullanılarak sağlanabilir. Sistem oral, nazal, parenteral, intra-oküler gibi çok çeşitli ilaç verilme yollarında kullanılabilir [39, 41].

Bunların yanında mikropartiküllerin bazı dezavantajları bulunmaktadır: Malzemelerin maliyeti, polimer matriksin ortama olası etkisi, plastikleştiriciler, stabilizatörler, antioksidanlar ve dolgular gibi polimer ek maddelerinin olası etkileri, tekrar üretilebilirliğin düşük olması, proses koşullarındaki değışimin enkapsüle edilecek

partiküllerin stabilitesine etkisi, polimer matriksin çözünen ürünlerinin ortamda yaratabileceği etkiler [42].

2.3.2.2 Nanopartiküller

Nanoteknoloji ya da nanobilim, bilim ve teknolojiyi atomik ve moleküler ölçüde (0.1-100 nm) yapıları yaratmak, anlamak ve kullanmak ve nano boyutta cihaz ve malzemeler üretmek için uygulanan oldukça multidisipliner bir alandır. Nanoteknoloji mühendislik, elektronik, fizik ve malzeme bilimi, moleküler ya da mikron altı seviyede üretim prensiplerini uygular. Nanopartikül, nanosensör, nanotel, nanobağ ve nanoağ gibi birçok malzemenin nanoyapısı geliştirilmiştir. Bu malzemeler genel olarak her üç boyutuyla birlikte 100 nm'den küçüktür [43].

Malzemeler yığın formda sergilemedikleri bazı spesifik fizikokimyasal özellikleri nanoboyutlarda gösterebilmektedirler. Bu özellikler nanopartikülleri birçok biyomedikal uygulamada öne çıkarmaktadır. Mikropartiküllerle karşılaştırıldığında, nanopartiküller daha yüksek bağlanma verimliliği anlamına gelen daha geniş yüzey alanı/hacim oranı göstermektedirler.

Farklı parçaların nanopartiküllere konjugasyonu uygulama alanlarını genişletir ve bu parçalara yeni ve zenginleştirilmiş özellikler kazandırır. Parçaların çoğu biyolojik membranı geçebilme gibi seçici ve açık avantajlar gösterir [44].

Nanopartiküllerin bu özellikleri, hastalıklarda önemli rol oynayan protein yapılı biyomoleküllerin yokluğu ya da eksikliğinin daha etkili bir şekilde tedavi edilmesinde kullanılmaktadır [45].

Bu avantajların yanında, polivinil alkolün aşırı kullanımıyla gündeme gelebilecek toksisite sorunları, tedavinin duraklatılmasının mümkün olmaması, hücresel toksisiteye sebep olabilmesi, pulmoner inflamasyon ya da pulmoner karsinogeneze oluşturma riski, alveoler inflamasyon oluşturma riski gibi dezavantajları mevcuttur [46].

Polimerik Nanopartiküller

Polimerik nanopartiküller 10-1000 nm boyutlarında, lipid, sentetik ve doğal polimerler gibi çeşitli malzemelerden hazırlanan katı kolloidal taşıyıcılardır [45].

Kontrollü ilaç salımı için biyobozunur polimerik nanopartiküllerin kullanımı önemli terapötik bir potansiyel göstermiştir. Aynı zamanda, hedefli salım teknolojileri bilimsel araştırmalarda giderek artan bir önemli hale gelmektedir [47]. Biyobozunur nanopartiküller yüksek biyobulunabilirlikleri, daha iyi enkapsüle edilebilme yetenekleri, salım kontrolü ve daha az toksik özelliklerine bağlı olarak ilaç salım araçları olarak sıkça kullanılmaktadır [48].

Polimerler adaptasyon (non-toksosite) ve non-antijenite konularında vücutla uyumlu, biyobozunur ve biyouyumlu olmalıdır [49].

Polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında en yaygın olarak kullanılan doğal polimerler; kitosan, jelatin, sodyum aljinat ve albümindir.

Polilaktidler (PLA), poliglikolidler (PGA), poli(laktid-ko-glikolid) (PLGA), polianhidridler, poliortoesterler, polisiyanoakrilatlar, polikaprolakton, poliglutamik asit, polimalik asit, poli (N-vinil piroolidon), poli (metil metakrilat), poli (vinil alkol), poli (akrilik asit), poliakrilamid, poli (etilen glikol), poli (metakrilik asit) gibi birçok sentetik polimer bulunmaktadır [50].

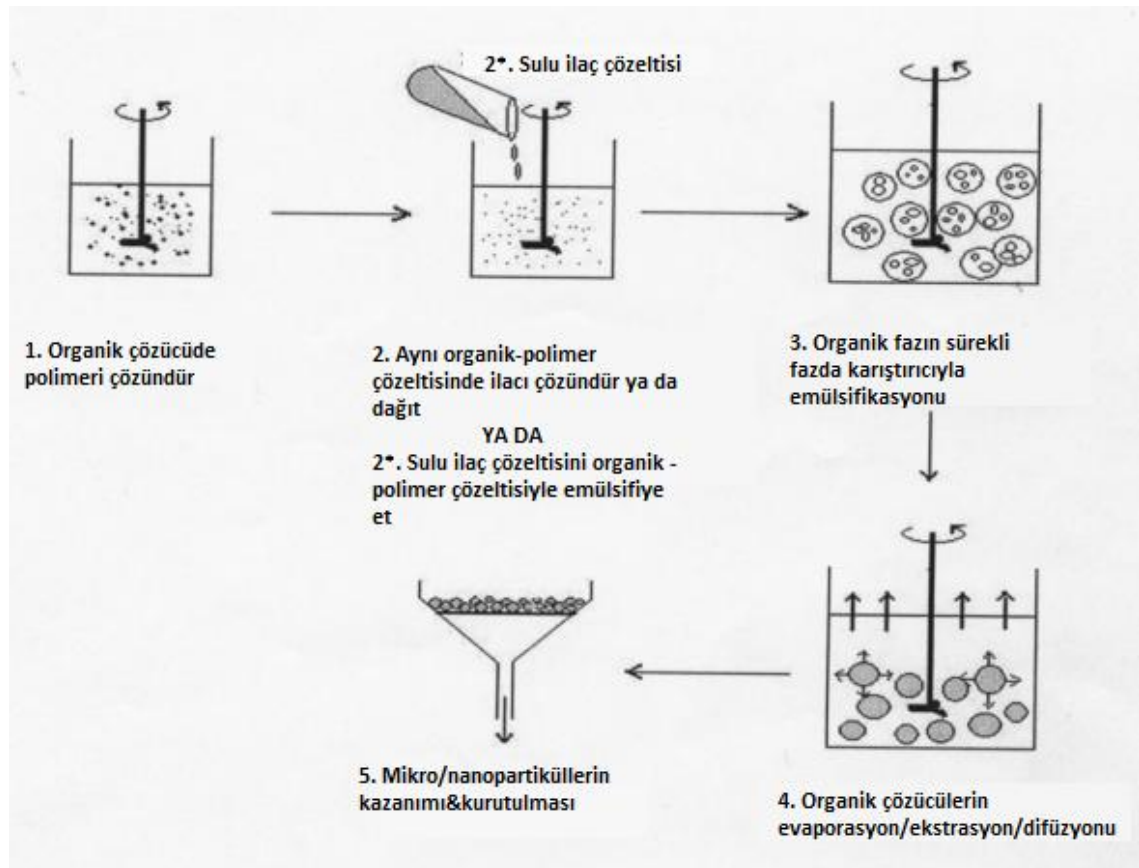
Polimerik Nanopartikül Hazırlama Teknikleri

Biyobozunur polimerik nanopartiküller ilaç, gen ve aşı salım sistemleri gibi biyomedikal sistemlerdeki potansiyelleri yüzünden çok ilgi çekmektedirler. Yüklenmiş ilaçların biyobozunma hızı ve salım kinetikleri kompozisyon oranı, polimerin moleküler ağırlığı ve blok/aşı kopolimerler yoluyla kontrol edilebilmektedir. Üstelik, polimer karakteristiklerinin ayarlanmasıyla, optimal terapötik etkinlik için hedef bir dokuda istenilen bir terapötik seviyeyi sağlamak adına nanopartiküllerden oluşan terapötik bir ajanın salımı kontrol edilebilir [51].

Polimerik nanopartiküllerin özellikleri uygulamasına bağlı olarak optimize edilmelidir. İlgili özelliklerin gerçekleştirilmesi için hazırlama modu önemli bir rol oynamaktadır. [50].

Emülsifikasyon Solvent Evaporasyon/Ekstraksiyon/ Difüzyon Yöntemi

Bu yöntem bir emülsiyonun başlangıç fazının karıştırılmasıyla evaporasyonuna bağlıdır. Bu nedenle yüksek sıcaklıklara veya ajanları indükleyerek faz ayırımına gerek yoktur. Temel olarak aşağıdaki adımlar ilaç yüklü mikro ve/veya nanopartiküllerin hazırlanmasını içermektedir.



Şekil 2. 4 ilaç yüklü mikro/nanopartiküllerin hazırlanması için solvent emülsifikasyon yönteminin şematik olarak gösterilmesi [52]

Çift Emülsiyon (w/o/w) Yöntemi

Çift emülsiyon metodunun ilk adımı, sulu çözeltinin hidrofilik aktif komponent ve organik fazın polimer ve uygun bir sürfaktan içerdiği bir su-yağ (w/o) oluşumudur. Miniemülsiyon yüksek kayma gerilimi altında (sonikasyon, mikrosıvılaştırma, yüksek hızlı homojenleştirme gibi) oluşturulur. Sonra, su-yağ-su (w/o/w) emülsiyonu oluşumu

damlacık boyutunun indirgenmesi için sonike edilir ya da homojenleştirilir. Bu ikinci boyut indirgenmesi harici sulu faza hidrofilik aktif komponent difüzyonunu minimize etmek için kontrol edilmelidir. Son adım, evaporasyon, organik çözücüyü uzaklaştırmak için kullanılmaktadır. Evaporasyon polimer ve aktif komponentin zarar görmesini engellemek ve son nanopartikül boyutunun indirgenmesini sağlamak için vakum altında gerçekleştirilir.

Çift emülsiyon yönteminin temel dezavantajı büyük nanopartiküllerin oluşumu ve düşük tutuklanma verimliliklerinden sorumlu hidrofilik aktif komponentinin sızıntısıdır. Dikkate alınması gereken önemli parametreler: polimer/süpfaktanlar oranı, polimer konsantrasyonu, süpfaktan yapısı, viskozite, çözücü yapısı, kayma gerilimi, evaporasyon, ek maddeler ve birinci/ikinci faz oranıdır [53].

‘Salting Out’ Yöntemi

Salting out suda çözünebilir bir çözücünün sulu çözeltiden salting-out etkisiyle ayrılmasına dayanır [54]. Polimer ve ilaç ilk olarak salting-out ajanları (magnezyum klorid ve kalsiyum klorid gibi elektrolitler ya da süzkroz gibi elektrolit olmayanlar) ve polivinilpirolidon ya da hidroksetiliselüloz gibi koloidal bir stabilizatör içeren sulu bir jel içinde emülsifiye edilen bir çözeltide çözündürülür. Bu yağ/su emülsiyonu yeterli hacimde su ya da sulu çözelti ile çözücünün sulu faza difüzyonunu arttırmak için seyreltilir, böylece nanokürelerin oluşumu indüklenir [55].

Salting out sıcaklık artışına ihtiyaç duymaz bu nedenle ısı hassasiyeti olan maddelerin işlenmesinde kullanışlı olabilir [56].

Çözücü Yer Değiştirme / Çökeltme Yöntemi

Çözücü değiştirme önceden oluşturulmuş bir polimerin organik bir çözeltiden çökeltilmesi ve organik çözücünün süpfaktan varlığında ya da yokluğunda sulu ortamda difüzyonunu içerir. Polimerler, ilaç ve/veya lipofilik süpfaktanlar aseton ya da etanol gibi yarı polar suda çözünebilir çözeltilerde çözündürülür. Çözelti sonrasında boşaltılır ya da manyetik karıştırma altında stabilizatör içeren sulu bir çözeltiye enjekte edilir. Nanopartiküller hızlı çözücü difüzyonu yoluyla hemen oluşturulur. Çözücü daha sonra

indirgenmiş basınç altında süspansiyondan uzaklaştırılır. Organik fazın sulu faza eklenme hızları partikül boyutlarına etki eder [57]. Nano çökeltme yöntemi çoğu az çözünen ilaçlar için oldukça uygundur [58].

2.4 Biyokonjugasyon

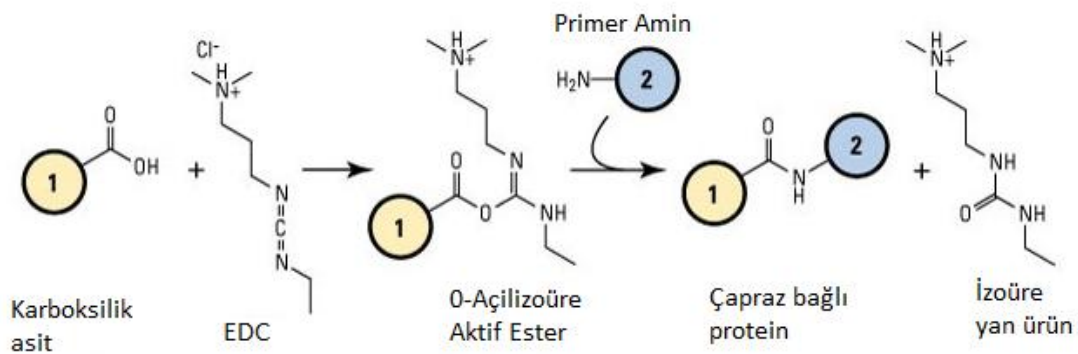
Biyokonjugasyon özel bileşenlerinin kombine edilmiş özelliklerine sahip olan yeni bir kompleks oluşturmak için iki ya da daha fazla molekülün bağlanmasını içerir. Biyokonjugasyon teknolojisi biyolojinin birçok alanından etkilenmiştir [59].

Peptid ve proteinlerin sulu koşullar altında modifikasyonları için yöntemlerin geliştirilmesi hem endüstriyel hem de akademik laboratuvarlarda ilgi toplamıştır [60]. Protein ve polimerlerden oluşmuş iyi tanımlanmış hibrit malzemeler sensörlerin, aktüatörlerin ve ilaç salım sistemlerinin yapılmasında belirgin fırsatlar sunmaktadır. Bu malzemelerin konseptini sağlayan proteinin spesifik fonksiyonu ile sentetik polimerlerin yığın özellikleri ve işlenebilirliğidir. Kısmen iyi tanımlanmış bir örnekte Murphy ve ark. biyomoleküler bir çapraz bağ oluşturarak iki spesifik protein bölgesine polimerin kovalent bağlanmasını göstermiştir. Bu öncü çalışmalar güzel fırsatlar vadederken, tüm protein ve polimerlere genellemenin zor olduğu bağlama tekniklerine bel bağlamışlardır [61].

Konjuge polimerler yüksek polarlıkta bir ortamda çözünebilen iyonik gruplar ve kullanışlı optik (ve/veya elektronik) özelliklere sahip bir *p*-konjuge iskelet içeren yeni malzemelerdir. Konjuge polimerler organik optoelektronik cihazlarda ve çoklu tabakalı ışık yayan diyotlar, ışık yayan elektrokimyasal hücreler, floresans bazlı biyosensörler gibi biyolojik assaylerde kullanılmaya başlanmıştır [62].

Biyokonjugatlarının geleneksel yöntemlerle sentezlenmesi makromoleküllerin sulu çözeltideki fonksiyonel gruplarının aktivasyonu ile gerçekleşmektedir. Bilinen tüm biyokonjugasyon reaksiyonlarında taşıyıcı moleküllerin fonksiyonel gruplarının aktivasyonu ve proteinlere bağlanması için 1-etil -3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür (EDC) gibi çeşitli çapraz bağlayıcılar kullanılmaktadır. 1-etil -3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür aracılığı ile polimerlerin karboksil gruplarının modifikasyonu ve proteinlerin amino gruplarının, aktifleştirilmiş polimer

gruplarına amid bağı oluşturarak kovalent olarak bağlanması iki adımda gerçekleşmektedir: İlk adımda taşıyıcı özellikteki polimerin karboksil grupları karbodiimid ile aktive edilmekte ve O-açilizoüre kararsız ara ürünü oluşmaktadır. Sonrasında ortama ilave edilen proteindeki amino grupları bu kararsız ara ürüne saldırarak reaksiyon vermekte ve amid bağı oluşumu üzerinden polimer-protein biyokonjugatları sentezlenmektedir. Polimerin karboksil gruplarının proteinin amino gruplarına bağlanmasıyla gerçekleşen kondenzasyon reaksiyonunda yan ürün olarak üre türevi meydana gelmekte ve diyaliz ya da ultrafiltrasyon gibi çeşitli saflaştırma yöntemleri ile uzaklaştırılmaktadır [63].



Şekil 2. 5 EDC karbodiimid varlığında biyokonjugasyon mekanizması. (1) ve (2) karboksilat ve primer amin grupları içeren peptid, protein veya herhangi bir kimyasal olabilir [64]

2.4.1 İnsülinin Lineer Polimerler ile Biyokonjugatları

Biyoaktif peptidler ve proteinlerin biyokimyasal ve farmakolojik özellikleri polimerlerle konjugasyon yoluyla değiştirilebilir.

Tip 1 diyabetin tedavisinde kullanılan insülinin oral yolla salımı diyabet araştırmalarının en önemli uzun dönem hedeflerinden biri olarak görülmektedir. Ancak oral olarak uygulanan insülinin biyobulunurluğu, gastrointestinal bölgede enzimatik bozunmasıyla ve makromoleküler boyut ve hidrofiliğine bağlı olarak proteinin zayıf intestinal absorpsiyonuyla tehlikeye girmektedir [65]. İnsülinin vücuda verilmesinde en etkili yolların araştırılmasıyla birlikte, insülinin daha büyük makromoleküllerle biyokonjugat haline getirilerek vücuda verilmesi stratejisi de gelişmiştir.

Bir çalışmada, insülinin GlyA1 insülin amino grubu aracılığıyla karboksimetil dekstranın (CMD, MW=51 000) aktive edilmiş karboksil gruplarına bölgeye-spesifik bağlanması

sağlanmıştır. Çalışmanın sonucunda, insülinin CMD'ye konjugasyonunun uzatılmış yanıt ile biyoaktif bir konjugata götürdüğü sonucuna varılmıştır [66].

İnsan insülini dört farklı konjugatla sonuçlanan PheB1 ya da LysB29'un amino gruplarına kısa zincirli (750 ve 2000 Da) metoksipoli (etilen glikol)'un (mPEG) kovalent olarak bağlanmasıyla modifiye edilmiştir: mPEG(750)-PheB1-insülin, mPEG(2000)-PheB1-insülin, mPEG(750)-LysB29-insülin ve mPEG(2000)-LysB29-insülin. İn vivo farmakodinamik assayler, mPEG(750)'in insülin B-zinciri üzerindeki konuma konjugasyonundan sonra biyolojik aktivitesinde bir kayıp olmadığı ortaya konmaktadır. Ancak, mPEG(2000)'in bağlanması %85 civarında konjugatların biyoaktivitesini azaltmıştır [67].

Başka bir çalışmada, ipek serisin peptidleri çapraz bağlayıcı reaktif glutaraldehit ile birlikte insülinle kovalent olarak konjuge edilmiştir. İpek serisin-insülin biyokonjugatlarının biyolojik aktiviteleri in vitro ve in vivo saptanmıştır. İnsan serumunda in vitro sonuçlar sentezlenen ipek serisin-insülin türevinin yarı ömrünün sığır serum albümin-insülin konjugatlarından ve tam insülinde sırasıyla 2.3 ve 2.7 kat daha fazla olduğunu göstermektedir. İpek serisin- insülin biyokonjugatlarının farmakolojik aktivitesi farelerde in vivo doğal insülinde dört kat uzun olarak 21 saat olarak ölçülmüştür. İnsülinin ipek serisin ile biyokonjugasyonu insülinin hem fizikokimyasal hem de biyolojik stabilitesini arttırmıştır [68].

Bir çalışmada, sıvı ipek fibroin glutaraldehit kullanılarak güçlü polar yan gruplar aracılığıyla insülin molekülleriyle kovalent olarak birleştirilmiştir. İpek fibroin- insülin biyokonjugatlarının fizikokimyasal özellikleri insülinin kantitatif ölçümü için enzim-bağlı immünosorbent assay (ELISA) yoluyla araştırılmıştır. İnsülin biyokonjugatlarının biyolojik aktiviteleri in vitro ve in vivo karakterize edilmiştir. 5 saatlik çapraz bağlama yoluyla elde edilen ipek fibroin-insülin yapıları insan serumunda in vitro sığır serum albümin-insülin türevlerinden daha yüksek stabildedir. İpek fibroin- insülin biyokonjugatlarının farmakolojik aktivitesi farelerde in vivo doğal insülinde dört kat uzun olarak 21 saat olarak ölçülmüştür. İnsülinin ipek fibroin ile biyokonjugasyonu insülinin hem fizikokimyasal hem de biyolojik stabilitesini arttırmıştır [69].

2.4.1.1 İnsülinin Lineer Yapılı Polimerler ile Biyokonjugasyonu için Çapraz Bağlayıcılar

Biyokonjugatların geleneksel yöntemlerle sentezlenmesi makromoleküllerin sulu çözeltideki fonksiyonel gruplarının aktivasyonu ile gerçekleşmektedir. Bilinen tüm biyokonjugasyon reaksiyonlarında taşıyıcı moleküllerin fonksiyonel gruplarının aktivasyonu ve proteinlere bağlanması için 1-etil -3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür (EDC) gibi çeşitli çapraz bağlayıcılar kullanılmaktadır [70].

Yeni bir bağlama reaktifi olarak, meta-maleimidobenzoil N-hidroksisüksinimid ester sentezlenmiştir. Bu reaktifler kullanılarak, insülin nötral, sulu çözeltide β -D-galaktosidaz ile kolaylıkla konjuge edilmiştir. Bağlanma prosedürü esnasında enzim aktivitesinde herhangi bir indirgenme gözlemlenmemiştir [71].

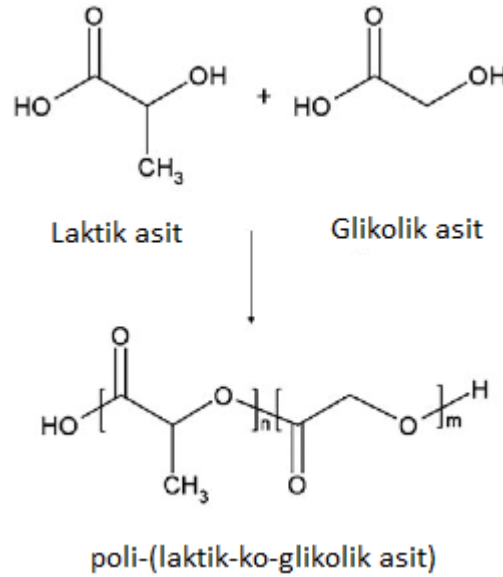
Protein amino gruplarının modifikasyonu için spesifik reaktifler grubu olarak imidoesterlerin olası kullanımı araştırılmıştır. Model bileşiklerin kullanımı yoluyla proteinlerde bulunan reaktif gruplardan yalnızca amino grubunun sulu çözeltilerde imidoesterlerle reaksiyon verdiği belirlenmiştir. pH 9.5'da glisin ve metil benzimidat arasındaki reaksiyonun denge çalışmaları amino grubunun tek bir reaksiyon ürününe dönüştürüldüğüne işaret etmiştir. İnsülin-imidoester reaksiyonları oda sıcaklığında ve pH>7 ve pH<10 değerlerinde yürütülmüştür. Çok miktarda reaktif ile reaksiyon, protein α - ve ϵ -amino gruplarının, reaksiyondan sonra tripsine dirençli olan lizil peptid bağının tam kaybı ile sonuçlanmıştır. Hem lizil hem de N-terminal glisil rezidüsü benzer amidine tamamiyle dönüşmüştür fakat N-terminal fenilalanin rezidüsünde veya yakınında bazı küçük yan reaksiyonlar alifatik imidoesterlerle proteinin reaksiyonu esnasında gerçekleşmiştir [72].

2.4.2 İnsülinin Polimerik Nanopartiküller ile Biyokonjugasyonu

Son yıllarda polimerik nanopartiküller için yapılan sayısız çalışma insülinin farklı salım yolları üzerine odaklanmıştır. İnsülinin nanopartiküller ile birlikte kullanımı insülini bozunmadan korumak ve ince bağırsak içerisinde emilimini arttırmak için tasarlanmıştır.

Son yıllarda insülin salımı için taşıyıcı olarak hem hidrofilik hem de hidrofobik polimerik nanopartiküllerin kullanımına yönelik ilgi artmıştır. İnsülin salımı için kitosan, dekstran sülfat – vitamin B12, katı lipid nanopartikülleri, polilaktid asit (PLA), poliglikolik asit (PGA), Poli(ε-kaprolakton) (PCL) ve poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) en sık kullanılan yapılardır [73].

Poli(laktid-ko-glikolid) (PLGA) en iyi geliştirilmiş biyobozunur polimerlerden biridir.



Şekil 2. 6 Poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA)'nın yapısı ve monomerleri [74]

Polimerik nanopartiküller oluşturmak için geliştirilmiş farklı polimerler arasında, PLGA çekici özelliklerine bağlı olarak belirgin bir ilgi toplamıştır: (i) biyobozunurluk ve biyoyumluluk, (ii) paranteral ilaç salımı için ilaç salım sistemlerinde FDA ve European Medicine Agency onayı, (iii) hidrofilik ya da hidrofobik küçük molekül ya da makromoleküller gibi farklı tip ilaçlara uyarlanmış formülasyon ve üretim yöntemlerinin iyi tanımlanması, (iv) ilacı bozunmadan koruması, (v) devamlı salım sağlayabilme (vi) biyolojik malzemelerle daha iyi etkileşimi ya da gizliliği sağlamak için yüzey özelliklerini modifiye edebilme ve (vii) nanopartikülleri spesifik organ ya da hücrelere hedefleyebilme [75].

Farklı fiziksel karakteristiklerde (boyut, boyut dağılımı, morfoloji, zeta potansiyel) poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), kullanılan sentez yöntemine göre spesifik parametrelerin kontrolüyle sentezlenebilir [76].

Literatürde yapılan PLGA-insülin nanopartiküllerine ait partikül boyutu çalışmaları sonuçları Çizelge 2. 1' de verilmiştir.

Çizelge 2. 1 Poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA)-insülin nanopartiküllerinden elde edilen bazı boyut değerleri [77-79]

<i>Polimer oran</i>	<i>Sürfaktan</i>	<i>Partikül Boyutu (nm)</i>
PLGA (50:50)	PVA %1	437±4
	PVA %2	256±17
	Pluronic %1	1289 ± 232
	Pluronic %2	426 ± 13
	Tween %1	455 ± 23
	Tween %2	565 ± 34
PLGA [75:25]	Pluronic %1	419 ± 28
	Pluronic %2	357 ± 22
	Tween %1	374 ± 61
	Tween %2	121 ± 12
PLGA (oran belirtilmemiş)	PVA	615
PLGA (oran belirtilmemiş)	-	~400

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOT

3.1 Deneylerde Kullanılan Malzeme ve Ekipmanlar

3.1.1 Kullanılan Kimyasallar

Deneyisel çalışmalarda kullanılan kimyasalların isimleri, alındıkları firmalar ve katalog numaraları Çizelge 3. 1’de verilmiştir.

Çizelge 3. 1 Deneyisel çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin özellikleri

Kimyasalın Adı	Alındığı Firma	Katalog No
Insulin human MP BIO	Sigma	I2643
1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorid (EDC)	Sigma	E-7750
Sodyum dihidrojen fosfat, (NaH ₂ PO ₄)	Riedel-de Haën	04361
Sodyum hidrojen fosfat, (Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O)	Fluka	71647
Sodyum klorür, (NaCl)	Fluka	71376
Sodyum hidroksit, (NaOH)	Fluka	06203
Hidroklorik asit, (HCl)	Riedel-de Haën	07102
Sodyum azid, (NaN ₃)	Applichem	A1430
Diklorometan (DCM)	Riedel-de Haen	24233
Polivinilalkol (PVA)	Aldrich	363073
Poli-Laktik-ko-Glikolik Asit (PLGA)	Aldrich	719900
Poliakrilikasit (PAA)	Aldrich	52392-5

3.1.2 Kullanılan Cihazlar

- Finnpipette Micropipet (1-10 mL, 100-1000 µL, 5-50 µL)
- WTW pH level 1 pH metre
- Hanna Instruments pH 211
- Precisa XB 220A Terazı
- Sartorius CP 225D Hassas Terazı
- Heraeus Biofuge Stratos Santrifüj Cihazı
- Heildolph MR 3000 Manyetik Karıştırıcı
- Heildolph MR 3001 Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı
- IKAMAG Çoklu Karıştırıcı
- Milipore-Q Gradient Ultra Saf Su Cihazı
- Jasco V-530 UV-VIS Spektrofotometre
- Zetasizer Nano ZS (Malvern)
- Jel Geçirgenlik Kromatografisi (Gel Permeation Chromatography-GPC)
- Shimadzu Scanning Probe Microscope-SPM 9600
- Fourier Transform Infrared Spektrofotometresi (FT-IR) (Shimadzu)

3.2 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler

3.2.1 0,01 M 'lik PBS Tamponu (pH=7)

2,6807g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($M_w=268,07$ g/mol) tartılarak 500 ml ultra saf suda çözünür. Daha sonra 1,56g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($M_w=156,01$ g/mol) tartılarak 450 ml ultra saf suda çözünür. Hazırlanan 400 ml'lik NaH_2PO_4 çözeltisi 1 L'lik balon joje içerisindeki Na_2HPO_4 çözeltisinin üzerine eklenir ve karıştırılır. Bu karışıma son olarak 8.766 g NaCl eklenir ve tekrar karıştırılır. Karışımın pH'ı ölçülür ve 1 M NaOH ya da 1 M HCl kullanılarak pH=7'ye ayarlanır. Ultra saf su kullanılarak çözelti hacmi 1 L olacak şekilde hacim tamamlanır.

3.2.2 % 2,5'lik PVA Çözeltisi

2,5 g polivinil alkol tartılır ve üzerine 100 ml ultra saf eklenip homojen çözelti elde edilene kadar karıştırılır.

3.3 Deneyisel Çalışmalarda Kullanılan Ölçüm Yöntemleri

3.3.1 GPC (Jel Geçirgenlik-Moleküler Eleme Kromatografisi)

Kromatografi, kimyasal yapıları birbirine yakın olan kimyasal madde veya karışımların, fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre ayrılmasında kullanılan bir yöntemdir. Kromatografide genel olarak bir sabit (stasyoner) faz, bir de hareketli (mobil) faz bulunmaktadır. Kromatografide durgun faz, bir katı veya katı yüzeyine kaplanmış bir sıvı fazdır. Durgun fazın üzerinden akan hareketli faz ise bir gaz veya sıvı fazdır. Hareketli fazın sıvı olduğu kromatografi türüne sıvı kromatografi; hareketli fazın gaz olduğu kromatografi türüne ise gaz kromatografi denir. Gaz kromatografi, uçucu sıvı ve katı karışımlar için uygulanan bir tekniktir. Sıvı kromatografi ise özellikle ısıl kararsız ve uçucu olmayan örnekler için uygulanır. Gaz ve sıvı kromatografinin uygulama alanları farklıdır; ancak birçok bileşen her iki kromatografiyle de ayrılabilir. Amaca uygun seçim yapılır [80].

Kromatografi, düzlemsel veya bir kolonda uygulanabilir. Düzlemsel Kromatografi klasik anlamda üçe ayrılmaktadır. Kağıt kromatografi, ince tabaka kromatografisi ve jel kromatografi düzlemsel kromatografiye örnek gösterilebilir. Bu kromatografik yöntemler, çözücünün doğal hareketi ile gerçekleştirilebildiği gibi elektriksel alanda gerçekleştirilen elektroforez tekniği de düzlemsel kromatografide sıkça kullanılmaktadır.

Moleküler eleme kromatografisi proteinleri molekül büyüklüğüne göre ayırır. Kolon, jel boncuklar [dekstran ya da agaroz veya poliakrilamid gibi polimerler-ticari isimleri; sephadex, sepharose, biojel-, (genellikle 0,1 mm çaplıdır) polisakkarid veya poliakrilamid polimer] ile doldurulur. Protein karışımını içeren tampon, kolondan geçirilir.

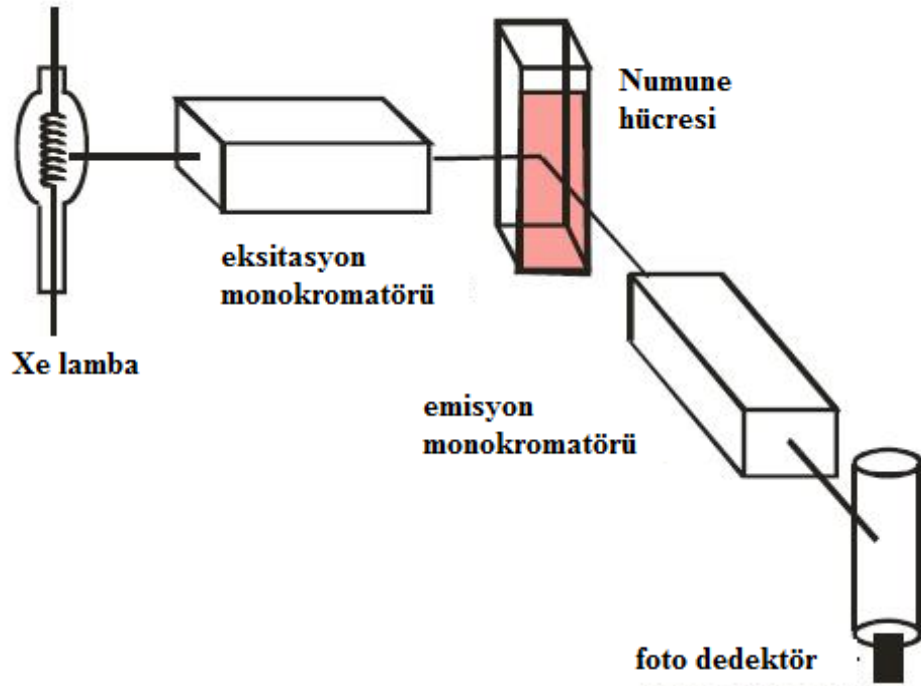
Proteinlerin, matriksteki porlara takılma yüzdesi, büyüklüğü ile ters orantılıdır. Porlara takılan proteinler daha yavaş sürüklenirler. Bu yöntemin büyük miktarda protein karışımını saflaştırabilmesi gibi bir avantajı varken, yavaş ayırım yapması da dezavantajıdır. En iyi ayırışma için kolon içine konulan örnek hacmi kolon hacminin %5'ini aşmamalıdır. Bu yüzden elde edilen örneğin hacmi küçük olmaktadır [81].

Çalışmamızda kullanılan İnsülinin molekül boyutu, PAA polimerinden çok daha küçüktür. Bu şekilde farklı boyutlardaki moleküllerin karışımından oluşan çözeltide her bir molekülün hidrodinamik çapı ve hidrodinamik hacmi birbirlerinden farklı olacaktır. Konjugat karışımında bulunan serbest insülin gibi küçük moleküller gözeneklerde daha uzun kalarak kolondan daha geç çıkacaklardır. Bunun yanında molekül çapı çok daha büyük olan polimer gibi moleküllerin gözenekler ile etkileşimi çok daha az olacağından kolonda daha kısa süre kalacak ve sistemden daha çabuk çıkacaktır. Bu şekilde molekül çapı büyüdükçe kolonda kalma süresi buna ters orantılı olarak azalacaktır. Sistemi terk eden moleküller ise UV ve ışık saçılması detektörlerinde saptanacak ve sinyale dönüştürülerek kromatogram elde edilecektir.

3.3.2 Floresans Spektroskopisi

Floresans spektroskopisi oldukça yüksek hassasiyet ve seçiciliğine bağlı olarak analitik bilimin birçok alanında önemli bir araçtır [82].

Floresans analitin moleküllerinin belli bir dalga boyunda radyasyon yoluyla harekete geçirildiği ve farklı bir dalga boyunda radyasyonun yayıldığı bir analiz metodudur. Uygun bir dalga boyunun ışını bir molekül tarafından absorplandığı zaman molekülün elektronik hali zemin halinden harekete geçen elektronik hallerin birindeki birçok titreşimsel seviyelerin birine dönüşür. Harekete geçmiş elektronik hal genellikle ilk harekete geçen singlet S1 halidir. Molekül bir kez bu harekete geçmiş haldeyken, bazı prosesler aracılığıyla dinlenme meydana gelebilir. Floresans ışığın emisyonu da bu proseslerden ve sonuçlardan biridir [83].



Şekil 3. 1 Floresans spektrofotometre cihazı ve parçaları [84]

3.3.3 Boyut ve Zeta Potansiyel Ölçümleri

Bir maddenin kendisi için çözücü olmayan bir ortamda 10^{-5} - 10^{-7} cm boyutlarında dağılmasıyla oluşan çözeltiye kolloidal çözelti denir. Kolloidal sistemlerin doğalarını gösteren en önemli özelliklerden ikisi, partikül boyutu ve yüzey özellikleridir.

Kolloidal partikül difüzyon hızları genellikle elektroforetik hareketliliklerden saptanan ışık saçılması ve zeta potansiyel yoluyla ölçülmektedir. Hidrodinamik çap Stokes-Einstein eşitliğinin kullanımıyla difüzyondan hesaplanabilmektedir [85].

Çalışmamızda kullandığımız Zetasizer Nano ZS agregatların daha güçlü saptanması ve 'NIBS' optikleriyle dinamik ışık saçılmasını kullanarak küçük ya da seyreltik örnekler ve çok düşük ya da yüksek konsantrasyonlardaki örnekler için yüksek performanslı iki açılı partikül ve molekül boyut analizleyicisidir. Ayrıca partiküller, moleküller ve yüzeyler için elektroforetik ışık saçılmasını kullanan bir zeta potansiyel analizatörü ve statik ışık saçılmasıyla molekül ağırlığı analizatörüdür.

Aşağıdaki denklikle partikül boyutu hesaplanmaktadır:

$$D = \frac{k.T}{3.\pi.\eta.R} \quad k = \text{Boltzman Sabiti, } T = \text{Mutlak sıcaklık, } \eta = \text{Çözücü vizkozitesi} \quad (3.1)$$

Çalışmamızda zeta potansiyel ölçümü için pH=7'de negatif yüklü olan insülin ve PAA polimeri temel alınmıştır. Oluşturulan İnsülin - PAA konjugatı negatif yüklü olduğundan ortamda pozitif yüklü iyonları çeker ve partikül yüzeyinin dışında Stern tabakası denen pozitif yüklü iyon tabakasını oluşturur. Bu tabakadaki elektrik potansiyeline Stern potansiyeli adı verilir. Stern tabakasının ardından iyonların daha serbest olduğu difüz bölgesi bulunur. Bu bölgede varsayımsal olarak bir kayma düzlemi bulunur ve bu bölgedeki elektrik potansiyeline de Zeta potansiyeli adı verilir. Zeta potansiyeli aşağıdaki denklikle hesaplanmaktadır.

$$U_E = \frac{2.\varepsilon.z.f(ka)}{3.\eta} \quad (3.2)$$

U_E = Elektroforetik hareketlilik,

ε = Ortamın dielektrik sabiti,

η = Ortamın vizkozitesi ve

$f(ka)$ = Henry Fonksiyonu

3.3.4 UV-VIS Spektroskopisi (Ultraviyole-Görünür Bölge Spektroskopisi)

Elektromagnetik dalgayla (enerjiyle), maddenin etkileşimini inceleyen bilim dalına spektroskopi denir. Söz konusu madde çekirdek, atom veya molekül olabilir.

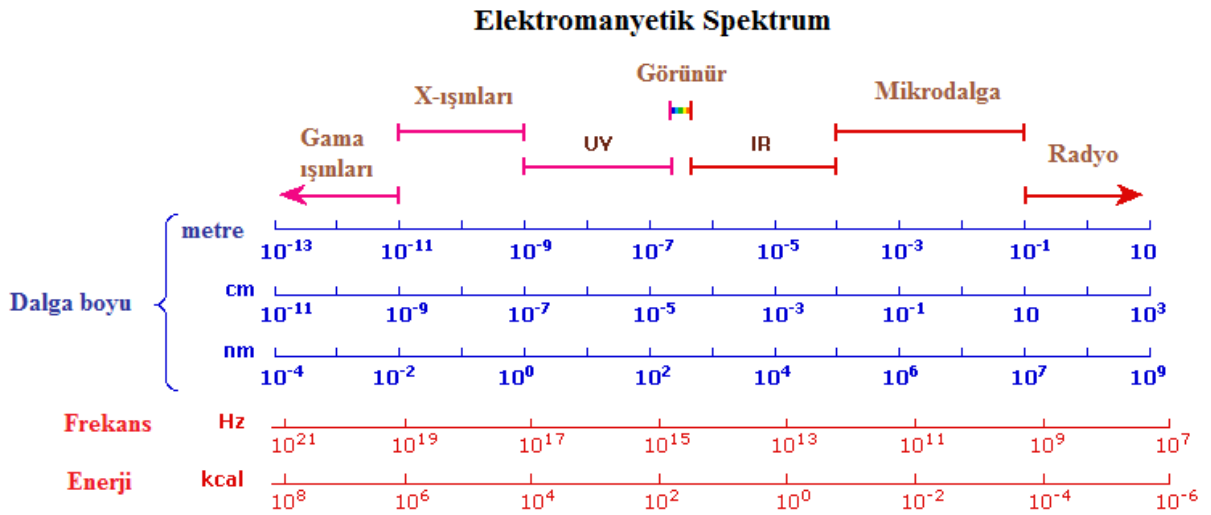
Bir madde, üzerine düşürülen çeşitli dalga boylarından (ultraviyole ışınlarından radyo dalgalarına kadar) ancak bazılarını absorplar. Maddenin bu özelliğinden yararlanılarak yapısı, konsantrasyonu vs. tayin edilebilir. Bunun için madde üzerine dalga boyu 110 nm den 3000 nm ye kadar değişen ışınlar düşürülür. Bütün bu dalga boylarını verecek ve hangi dalga boylarının absorplandığını tespit edecek tek bir cihaz mümkün olmadığından, belirli dalga boylarındaki ışınlarla çalışan cihazlar geliştirilmiştir. 110-1000 nm dalga boylarında çalışan cihazlara ultraviyole ve görünür alan, 2500-25000 nm dalga boylarında çalışan cihazlara infrared ve dalga boyları yüzlerce metreye kadar değişen radyo dalgalarıyla çalışan cihazlara da nükleer manyetik rezonans cihazları denir. Bu cihazların geçerli oldukları alan spektroskopilerine de sırasıyla ultraviyole UV

ve görünür (elektronik), infrared IR (titreşim) ve nükleer magnetik rezonans (NMR) spektroskopileri adı verilir.

Elektronik spektroskopide maddenin absorpladığı enerji, yapısında bulunan bir elektronu bir üst enerji seviyesine çıkarır.

Hem organik, hem de inorganik maddeler UV ve görünür alanda absorpsiyon yaparlar [86].

Elektromanyetik Spektrum: Görünür (visible) spektrum toplam radyasyon spektrumun sadece küçük bir kısmını oluşturur. Etrafımızı saran radyasyonun çoğunu göremeyiz ama cihazlarla farkedilir. Bu elektromanyetik spektrum çok küçük dalga boylarından (gama ve x-ray leri içerir) çok uzun dalga boylarına kadar uzanır (mikro dalgalar ve radyo dalgalarını içerir).



Şekil 3. 2 Elektromanyetik spektrum

Spektrumun verilen bir bölgesiyle ilişkilendirilmiş enerji frekansı ile orantılıdır. Altta ki eşitlik bu ilişkiyi tanımlamaktadır:

$$u = c/\lambda \quad u = \text{frekans}, \lambda = \text{dalga boyu}, c = \text{ışık hızı} (c = 3 \times 10^{10} \text{ cm/sn}) \quad (3.3)$$

$$\Delta E = h \times u \quad E = \text{enerji}, u = \text{frekans}, h = \text{Planck sabiti} (h = 6,6 \times 10^{-27} \text{ erg/sn}) [87] \quad (3.4)$$

Bir molekülün fiziksel ve kimyasal özellikleri atomlara, dayanıma ve kimyasal bağlanmanın türlerine bağlıdır. Kimyasal reaksiyonların büyük bir çoğunluğu çözeltilerde gerçekleşir. Hidrojen bağı ve Van der Waals bağlarının ikisi de bir çözelti

ortamında önemlidir. Bir moleküler sistemin elektronik yapısı, moleküllerin boyutu, geometrisi, konsantrasyonu ve moleküller arası uzaklık etkileşim türlerine bağlıdır.

Bir moleküldeki ışığın absorpsiyonu ortamdaki etkileşim türlerine bağlıdır. Absorpsiyon yoğunluğu hakkında iki ampirik yasa formülize edilmiştir. Lambert yasası absorbe edilen gelen ışığın kırılmasının kaynağın yoğunluğundan bağımsız olduğunu belirtmiştir. Beer yasası absorpsiyonun absorbe eden moleküllerin sayısı ile orantılı olduğunu belirtmiştir. Bu yasalardan aşağıdaki eşitlik tanımlanmıştır:

$$\log I_0/I = A = \epsilon \cdot c \cdot l \quad (3.5)$$

I_0 ve I sırasıyla gelen ve iletilen ışığın yoğunluklarıdır, l santimetrede absorbe eden çözeltinin yol uzunluğu ve c mol/litrede konsantrasyondur. $\log_{10}(I_0/I)$ absorbans ya da optik yoğunluk; ϵ molar ekstinksiyon olarak bilinir.

Molar absorptivite ışının dalga boyuyla değişir. Bu çalışılan atomik ya da moleküler sistem için karakteristik bir niteliktir. Bu yüzden, molar absorptivite farklı ortamdaki atomik ya da moleküler sistem için hesaplanmalıdır.

Lambert- Beer yasası seyreltik çözeltiler için sınırlandırılmış bir yasadır. Lambert- Beer yasasına göre hem sıcaklık hem de dalga boyu sabittir. Oysa ki, eğer sıcaklık değişirse, çözeltinin konsantrasyon, hacim ve refraktif indeksi de değişebilir.

Eğer bir çözeltinin konsantrasyonu değişirse, absorbans eğrisinde de bazı değişimler olacaktır. Bu olay bir çözücü ve bir çözünen arasındaki etkileşimlerle oluşturulabilir [88].

3.3.5 FT-IR Spektroskopisi (Fourier Transform Infrared Spektroskopisi)

FTIR matematiksel Fourier dönüşümü yöntemi ile ışığın infrared yoğunluğuna karşı dalga sayısını ölçen bir kimyasal analitik yöntemidir. Elektromanyetik ışık dizisinin kızıl ötesi bölgesi 14000 cm^{-1} ile 10 cm^{-1} arasındadır ve yakın dalga boylu kızıl ötesi (NIR; $4000 \sim 14000 \text{ cm}^{-1}$), orta dalga boylu kızıl ötesi (MIR; $400 \sim 4000 \text{ cm}^{-1}$) ve uzak dalga boylu kızıl ötesi (FIR; $4 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$) olmak üzere üç ana bölgeden oluşmaktadır [89].

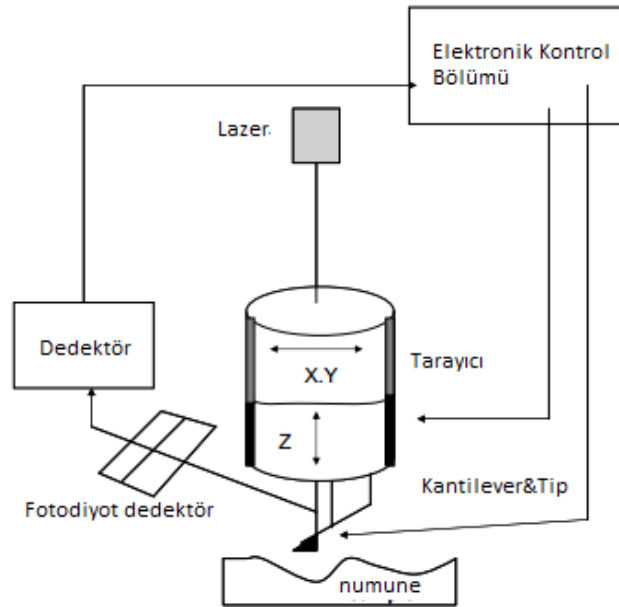
Kızılötesi bölgesinde absorpsiyon, moleküllerin titreşim ve dönme düzeylerini uyarır. Teknik, bu uyarımın ölçümü esasına dayanır. Kızılötesi ışının absorpsiyonu, çeşitli

titreşim ve dönme halleri arasındaki enerji farklarının küçük olması nedeniyle çoğunlukla moleküler yapılarla sınırlıdır. Dalga sayısı hem enerji hem de frekans ile doğru orantılı olduğundan FT-IR spektroskopisi incelemelerinde dalga sayısı ölçek olarak kullanılır [90].

Çalışmada kullanılan ve w/o/w ikili emülsiyon yöntemi ile oluşturulan PLGA-İnsülin nanopartikülleri katı olarak ve hiçbir ön işlem uygulanmadan FTIR cihazı ile analiz edildi.

3.3.6 AFM (Atomik Kuvvet Mikroskopisi)

AFM bir kantilevere bağlanmış sivri bir probtan oluşur. Problar tipik olarak silikon ya da yaklaşık 5-20 nm eğrilik yarıçaplı bir tip ile silikon nitritten yapılmaktadır. Prob numune yüzeyini taradığında, tip ile numune yüzeyindeki atom arasındaki etkileşim Van der Waals kuvvetleri ve diğer kimyasal bağ ve kuvvetlerin sonucu olarak kantileverin eğilmesine sebep olur. Kantileverin eğilmesi ya da bükülmesi Hook Yasasıyla ilgilidir. Kantileverin bükülmesi, kantileverin arkasından ışık saçan bir lazer ışınıyla saptanır, bir fotodiyot ya da lazer dedektörüne yansıtılır ve bilgisayar aracılığıyla işlenir.



Şekil 3. 3 AFM cihazının şematik diyagramı [91]

w/o/w ikili emülsiyon yöntemi ile oluşturulan nanopartiküller Shimadzu Scanning Probe Microscope-SPM 9600 ile incelenmiştir.

AFM cihazının prob yüzeyine önce 20 µl saf su damlatıldı ve 10 sn sonrasında su uzaklaştırıldı ve 5 µl örnek prob yüzeyine yüklendi. 5 dakika bekletildikten sonra örnek sıvısı tekrardan uzaklaştırıldı. 10 µl su ile prob yüzeyi tekrar yıkandı ve 30 dakika kuruması beklendikten sonra örnekler AFM cihazında analiz edildi.

BÖLÜM 4

DENEYSEL KISIM

4.1 İnsülinin Poliakrilikasit (PAA) Polimeri ile Biyokonjugatlarının Sentezi

Bu tez çalışmasında İnsülin ile Poliakrilikasit (PAA) kullanılarak EDC çapraz bağlayıcısı varlığında farklı molar oranlarda konjugatlar sentezlendi.

4.1.1 İnsülin - PAA Biyokonjugatlarına Ait Hesaplamalar

İnsülinin artan oranlarında ($n_{ins}/n_{PAA}=0,1; 0,5; 1; 3; 5; 7; 9; 11$) konjugatlar sentezlendi.

4.1.1.1 İnsülinin Artan Oranlarında Konjugasyon

Klasik Konjugasyon Yöntemi ile EDC varlığında $n_{ins}/n_{PAA}= 0,5; 1; 3; 5; 7; 9$ ve 11 olmak üzere 7 farklı oranda konjugat sentezlendi.

PAA konsantrasyonu çözelti içerisinde 0,5 mg/ml olacak şekilde hazırlandı.

($M_{PAA}= 100\ 000$ Da; $M_{insülin} = 5807,57$ Da)

1. $n_{ins}/n_{PAA} = 0,5$ olan 5 ml İnsülin - PAA Konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{ins}}{n_{PAA}} = \frac{C_{ins} \cdot M_{PAA}}{C_{PAA} \cdot M_{ins}} \Rightarrow 0,5 = \frac{C_{ins} \cdot 100000}{5807,57 \cdot 0,5} \Rightarrow C_{ins} = 0,0726 \text{ mg insülin/ 5 ml}$$

2. $n_{ins}/n_{PAA} = 1$ olan 5 ml İnsülin - PAA Konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{ins}}{n_{PAA}} = \frac{C_{ins} \cdot M_{PAA}}{C_{PAA} \cdot M_{ins}} \Rightarrow 1 = \frac{C_{ins} \cdot 100000}{5807,57 \cdot 0,5} \Rightarrow C_{ins} = 0,145 \text{ mg insülin/ 5 ml}$$

3. $n_{ins}/n_{PAA} = 3$ olan 5 ml İnsülin - PAA Konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{ins}}{n_{PAA}} = \frac{C_{ins} \cdot M_{PAA}}{C_{PAA} \cdot M_{ins}} \Rightarrow 3 = \frac{C_{ins} \cdot 100000}{5807,57 \cdot 0,5} \Rightarrow C_{ins} = 0,435 \text{ mg insülin / 5 ml}$$

4. $n_{ins}/n_{PAA} = 5$ olan 5 ml insülin - PAA Konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{ins}}{n_{PAA}} = \frac{C_{ins} \cdot M_{PAA}}{C_{PAA} \cdot M_{ins}} \Rightarrow 5 = \frac{C_{ins} \cdot 100000}{5807,57 \cdot 0,5} \Rightarrow C_{ins} = 0,726 \text{ mg insülin / 5 ml}$$

5. $n_{ins}/n_{PAA} = 7$ olan 5 ml insülin - PAA Konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{ins}}{n_{PAA}} = \frac{C_{ins} \cdot M_{PAA}}{C_{PAA} \cdot M_{ins}} \Rightarrow 7 = \frac{C_{ins} \cdot 100000}{5807,57 \cdot 0,5} \Rightarrow C_{ins} = 1,016 \text{ mg insülin / 5ml}$$

6. $n_{ins}/n_{PAA} = 9$ olan 5 ml insülin - PAA Konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{ins}}{n_{PAA}} = \frac{C_{ins} \cdot M_{PAA}}{C_{PAA} \cdot M_{ins}} \Rightarrow 9 = \frac{C_{ins} \cdot 100000}{5807,57 \cdot 0,5} \Rightarrow C_{ins} = 1,306 \text{ mg insülin / 5ml}$$

7. $n_{ins}/n_{PAA} = 11$ olan 5 ml insülin - PAA Konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{ins}}{n_{PAA}} = \frac{C_{ins} \cdot M_{PAA}}{C_{PAA} \cdot M_{ins}} \Rightarrow 11 = \frac{C_{ins} \cdot 100000}{5807,57 \cdot 0,5} \Rightarrow C_{ins} = 1,597 \text{ mg insülin / 5ml}$$

İnsülinin olacağı hesaplanarak insülin ana stok çözeltisi hazırlandı. Herbir konjugat için sabit konsantrasyondaki polimer çözeltisi üzerine belirtilen konsantrasyonlardaki insülin çözeltisinden eklendi ve karışımların pH değerleri 5'e ayarlandı, çözeltiler 4°C'de karıştırıldı aktivasyon için her bir çözeltiye EDC eklendi. Oluşturulan karışım gece boyu soğuk odada 4 °C'de karıştırıldı. Ertesi gün tüm çözeltilerin pH değerleri 7'ye ayarlandı. Örnekler 2 saat karıştırıldı ve sentezlenen konjugatların oluşum mekanizması, fizikokimyasal özellikleri ve elektriksel yükleri Viscotek, Floresans Spektrofotometre ve Zetasizer cihazları ile incelendi.

4.2 Poli(Laktik-ko-glikolik) Asid (PLGA) Nanopartiküllerinin Oluşturulması

PLGA nanopartiküller ikili emülsiyon yöntemiyle üretilmiştir. 150 mg PLGA 2 ml diklorometan içerisinde çözüldü ve 200 µl su fazını oluşturan çözelti ile karıştırılarak 3 dakika 50 W enerji altında sonikasyona tabi tutuldu. Daha sonra oluşan w/o emülsiyonu 4 ml %2,5'luk polivinilalkol (PVA) çözeltisi ile karıştırıldı ve w/o/w emülsiyonunu elde etmek için 3 dakika 50 W enerji altında tekrar sonikasyon yapıldı. Elde edilen örnekler çözücünün uzaklaşması için 12 saat manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. 12 saat sonrasında örnekler 10000 g'de 20 dakika santrifüj edildi, ultra saf su ile yıkandı ve santrifüj işlemi tekrar yapıldı. Üst fazın uzaklaştırılması ile elde edilen

katı nanopartiküller liyofilizasyon yöntemi ile kurutularak analiz edilmek üzere donduruldu.

4.2.1 Yükleme Veriminin Hesaplanması

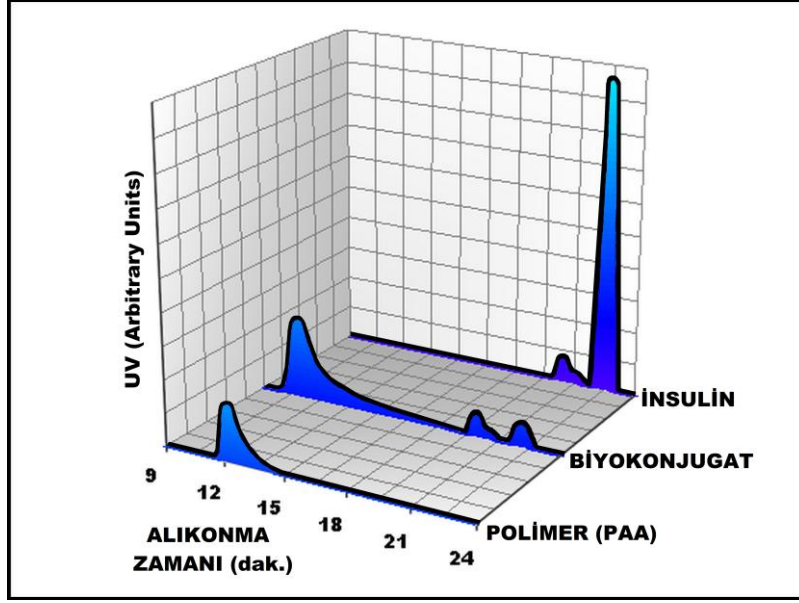
Hazırlanan nanopartiküllerin yükleme verimi, santrifüj aşamasında tüp içerisinde ayrılan üst fazlardaki serbest insülin miktarının UV spektrofotometre ile 280 nm dalga boyunda yapılan ölçümlerden alınan sonuçlarla gerçekleştirildi. 1. Np -Boş nanopartikül blank olarak kabul edildi. Üst faz çözeltisinden 1 ml alınarak UV okundu ve daha önceden konsantrasyonu bilinen insülin çözeltilerinden yola çıkılarak hazırlanan kalibrasyon eğrisi yardımı ile nanopartikülün içerisine girmeyen serbest haldeki insülin miktarı tayin edildi. Serbest haldeki insülin miktarının hesaplanmasının ardından % yükleme miktarı aşağıda verilen genel formül ile hesaplandı.

$$\% \text{ Yükleme} = \frac{[\text{Eklenen madde (mg)} - \text{Uzaklaştıran madde (mg)}]}{[\text{Eklenen madde (mg)}]} \times 100 \quad (4.1)$$

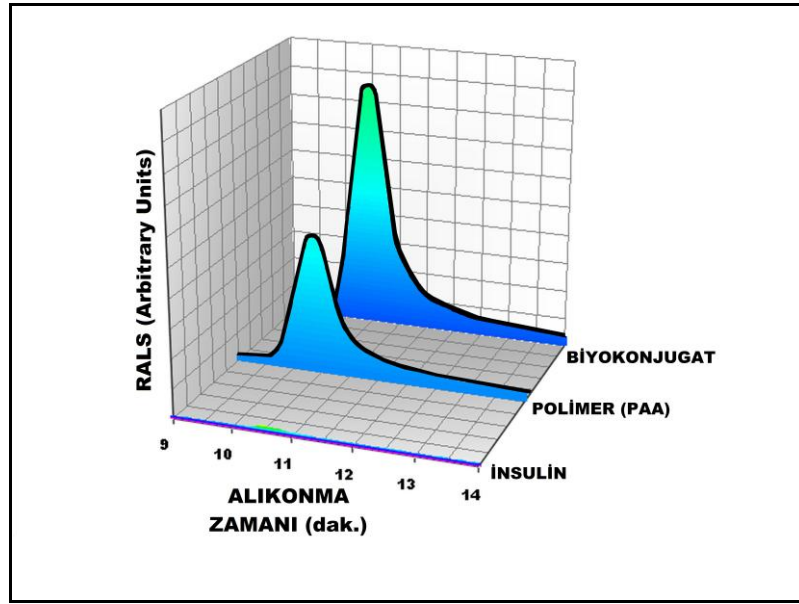
4.3 İnsülinin PAA Polimeri ile Biyokonjugatlarının Analizi

4.3.1 GPC Analizi

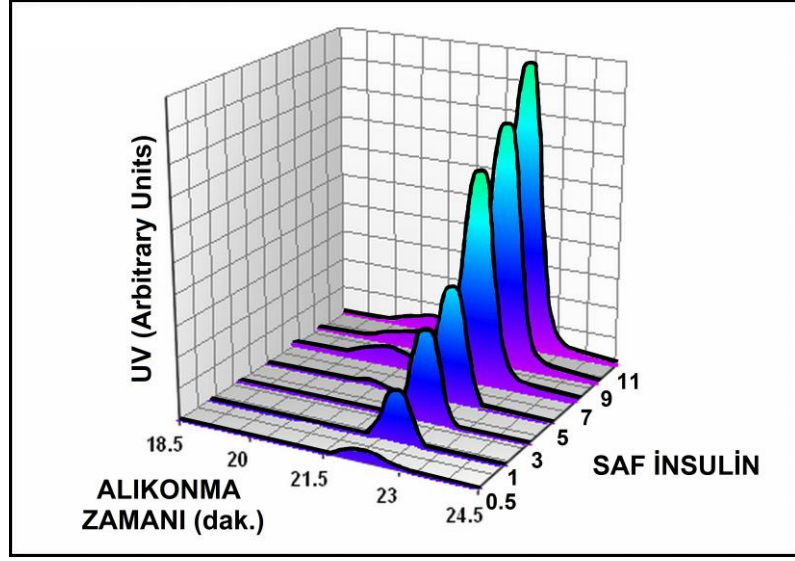
Karbodiimid yöntemi ile hazırlanan $n_{\text{ins}}/n_{\text{PAA}} = 0,5; 1; 3; 5; 7; 9; 11$ oranlarındaki konjugatlar GPC cihazı ile analiz edildi ve elde edilen GPC kromatogramları Şekil 4. 1 - 4. 5'de verildi.



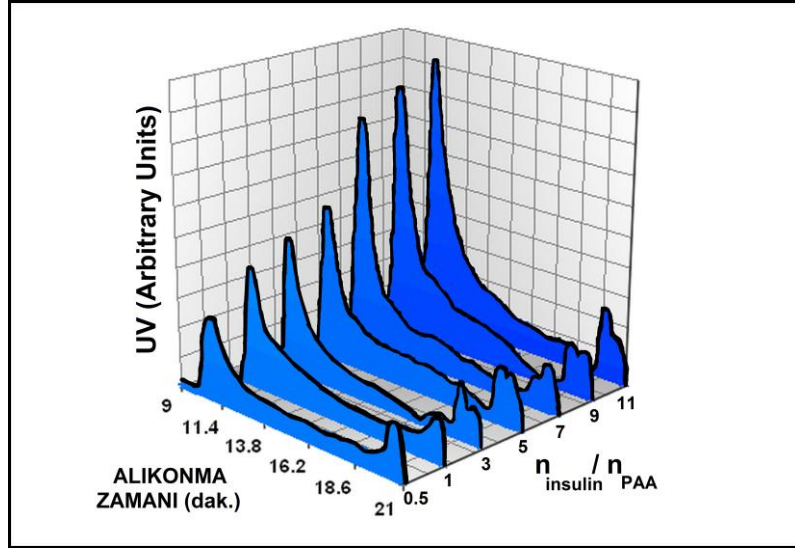
Şekil 4. 1 pH 7’de hazırlanmış polimer (PAA), insülin ve insülin-PAA biyokonjugatına ait 3 boyutlu GPC UV dedektörü grafiği



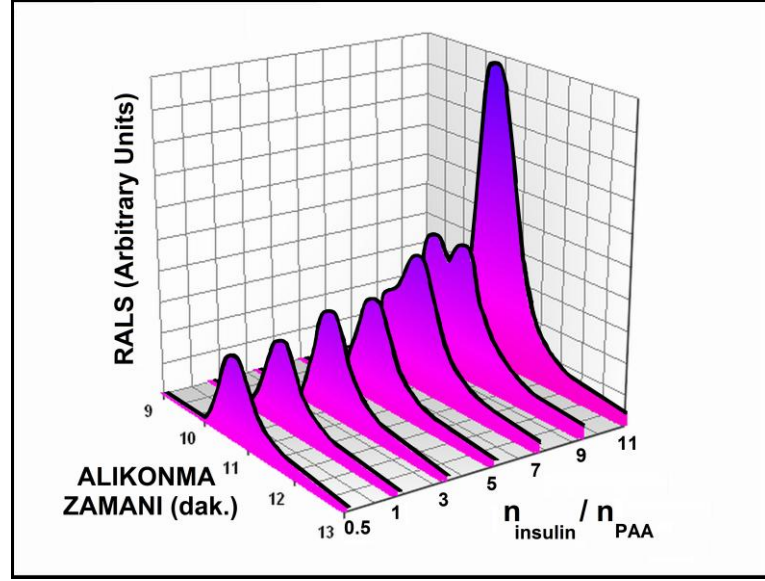
Şekil 4. 2 pH 7’de hazırlanmış polimer (PAA), insülin ve insülin-PAA biyokonjugatına ait 3 boyutlu GPC RALS grafiği



Şekil 4. 3 pH 7’de hazırlanmış $n_{ins} = 0,5; 1; 3; 5; 7; 9; 11$ insüline ait 3 boyutlu GPC UV dedektörü grafiği



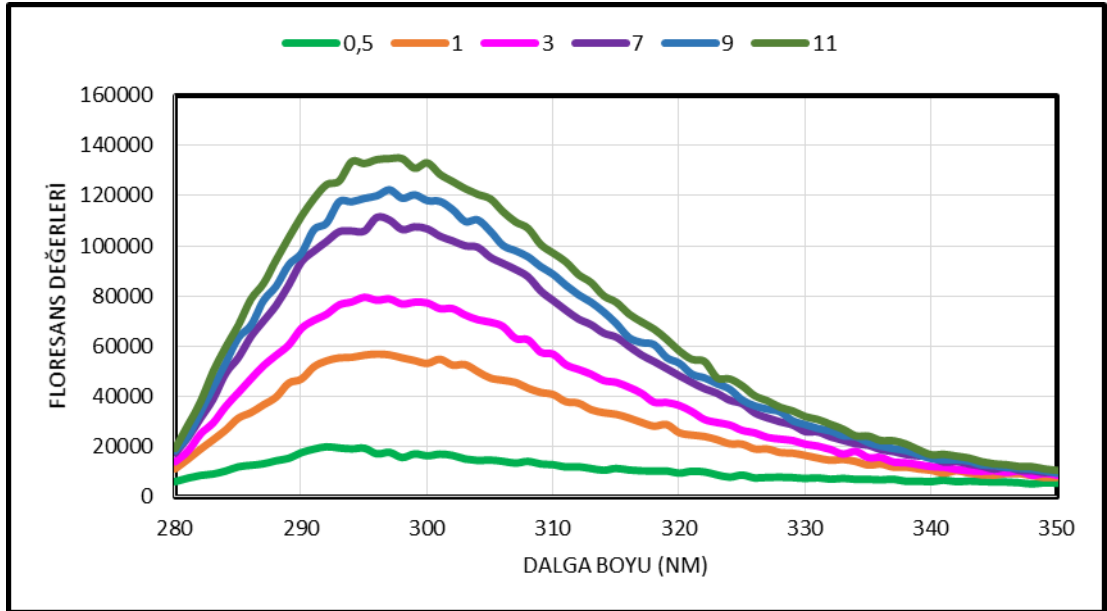
Şekil 4. 4 pH 7’de hazırlanmış $n_{ins}/n_{PAA} = 0,5; 1; 3; 5; 7; 9; 11$ insülin-PAA biyokonjugatlarına ait 3 boyutlu GPC UV dedektörü grafiği



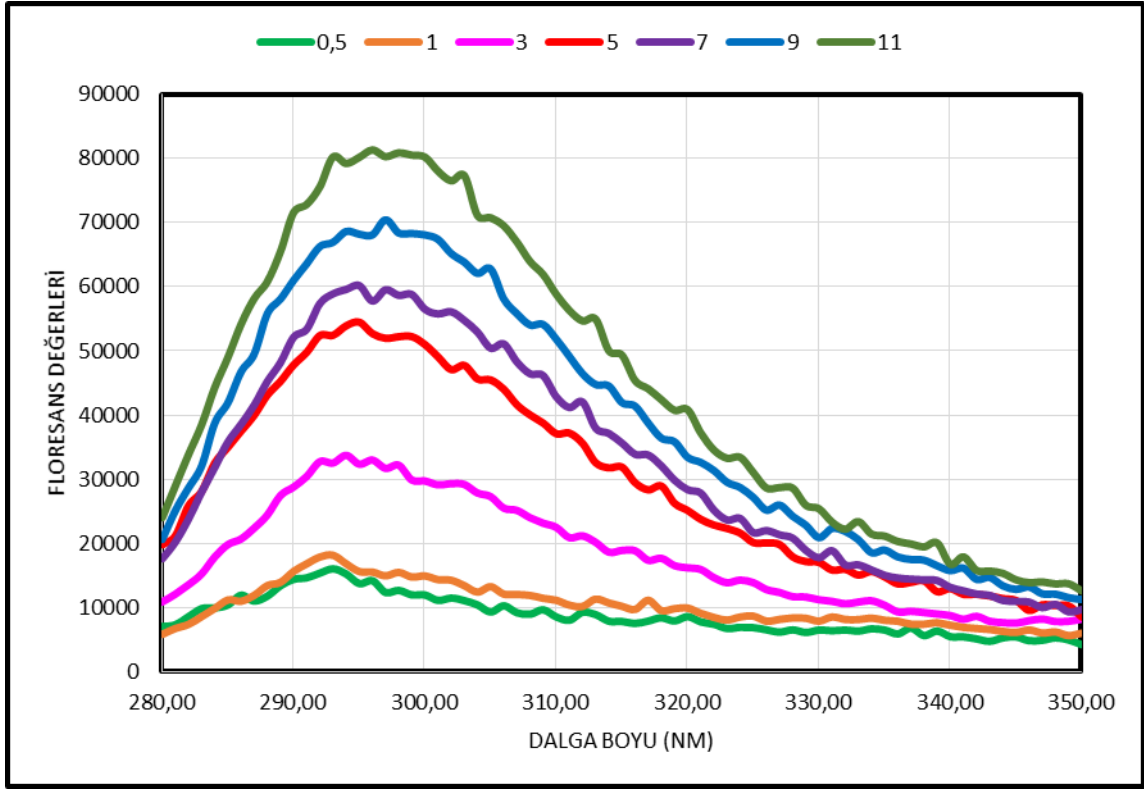
Şekil 4. 5 pH 7’de hazırlanmış $n_{\text{ins}}/n_{\text{PAA}} = 0,5; 1; 3; 5; 7; 9; 11$ insülin-PAA biyokonjugatına ait 3 boyutlu GPC RALS grafiği

4.3.2 Floresans Analizi

Karbodiimid yöntemi ile hazırlanan $n_{\text{ins}}/n_{\text{PAA}} = 0,5; 1; 3; 5; 7; 9; 11$ oranlarındaki biyokonjugatların Floresans Spektrofotometre ile ölçümleri yapıldı ve elde edilen spektrumlar Şekil 4. 6 ve 4. 7’de verildi.



Şekil 4. 6 pH 7’de hazırlanmış insülinin 0,5 (◆); 1 (◆); 3 (◆); 7 (◆); 9 (◆); 11 (◆) oranlarına ait Floresans spektrumları



Şekil 4. 7 pH 7’de hazırlanmış $n_{ins}/n_{PAA} = 0,5$ (◆); 1 (◆); 3 (◆); 5 (◆); 7 (◆); 9 (◆); 11 (◆) insülin-PAA biyokonjugatına ait Floresans spektrumları

4.3.3 Zetasizer Analizi

Karbodiimid yöntemi ile hazırlanan $n_{ins}/n_{PAA} = 0,5$; 1; 3; 5; 7; 9; 11 oranlarındaki biyokonjugatlar Zetasizer cihazı ile analiz edildi ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4. 1’de verildi.

Çizelge 4. 1 pH 7’de hazırlanmış $n_{ins}/n_{PAA} = 0,5$; 1; 3; 5; 7; 9; 11 biyokonjugatlarına ait Zetapotansiyel değerleri

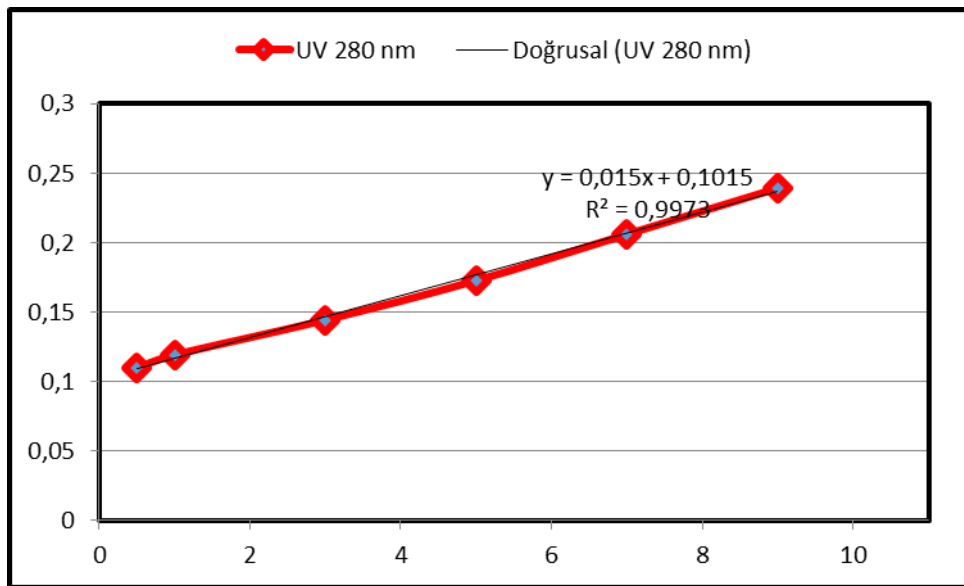
Numune Adı	Zeta Potansiyel mV
İnsülin	-8,22
PAA	-25,8
$n_{ins}/n_{PAA} = 0,5$	-22,2
$n_{ins}/n_{PAA} = 1$	-19,1
$n_{ins}/n_{PAA} = 3$	-22,8

Çizelge 4. 1 pH 7’de hazırlanmış $n_{ins}/n_{PAA}= 0,5; 1; 3; 5; 7; 9; 11$ biyokonjugatlarına ait Zetapotansiyel değerleri (devamı)

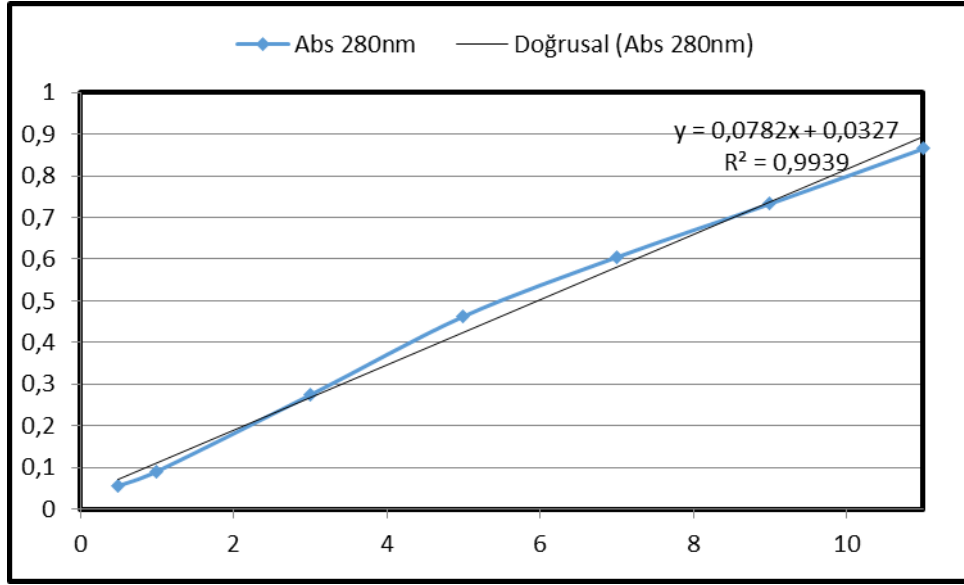
Numune Adı	Zeta Potansiyel mV
$n_{ins}/n_{PAA}= 5$	-21,2
$n_{ins}/n_{PAA}= 7$	-20,8
$n_{ins}/n_{PAA}= 9$	-17,2
$n_{ins}/n_{PAA}= 11$	-20,9
$n_{ins}/n_{PAA}= 5$	-21,2

4.3.4 UV Analizi

$n_{ins}= 0,5; 1; 3; 5; 7; 9; 11$ oranlarında insülinin ve karbodiimid yöntemi ile hazırlanan $n_{ins}/n_{PAA}= 0,5; 1; 3; 5; 7; 9; 11$ oranlarındaki biyokonjugatların UV Spektrofotometre ile ölçümleri yapıldı ve elde edilen spektrumlar Şekil 4. 8 ve 4. 9’ da verildi.



Şekil 4. 8 pH 7’de hazırlanmış 0,5; 1; 3; 5; 7; 9; 11 insülin oranlarına ait UV spektrofotometre değerleri



Şekil 4. 9 pH 7’de hazırlanmış $n_{ins}/n_{PAA} = 0,5; 1; 3; 5; 7; 9; 11$ insülin-PAA biyokonjugatına ait UV spektrofotometre değerleri

4.4 Poli(Laktik-ko-glikolik) Asit (PLGA) Nanopartiküllerinin Analizi

4.4.1 Zeta Sizer Analizi

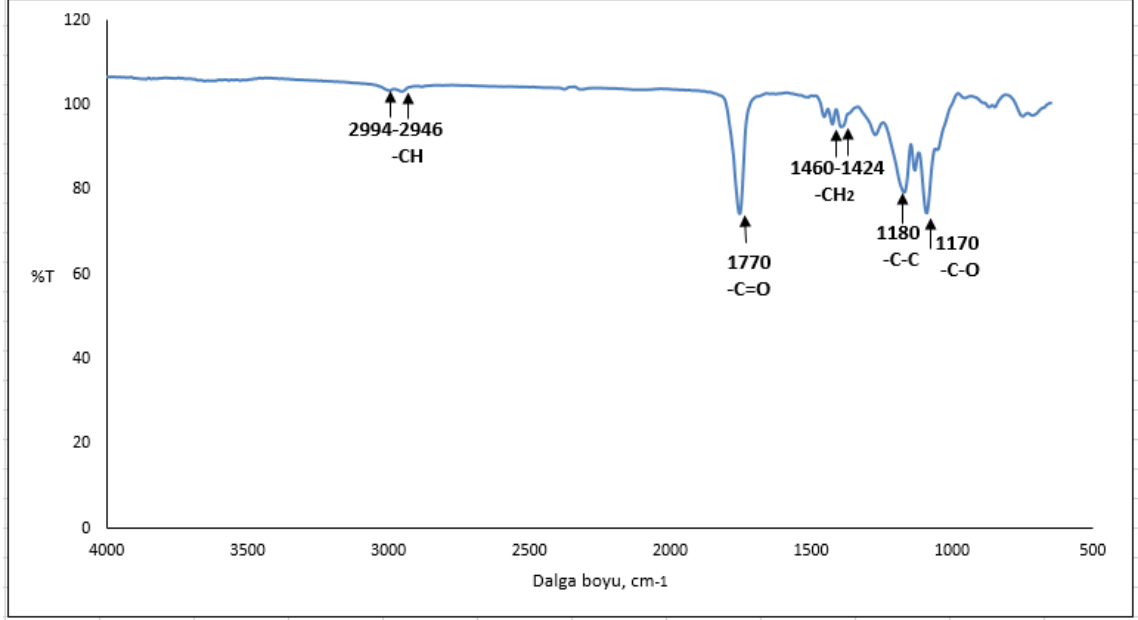
PLGA polimeri ve bu polimer kullanılarak su/yağ/su emülsiyon (w/o/w) çözücü buharlaştırma tekniği ile üretilen nanopartiküllere ait boyut ölçümleri Çizelge 4. 2’de verildi.

Çizelge 4. 2 Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan (1. Np: Boş nanopartikül, 2. Np: FITC yüklü, 3. Np: insülin yüklü, 4. Np: FITC ve insülin yüklü) nanopartiküllere ait boyut değerleri

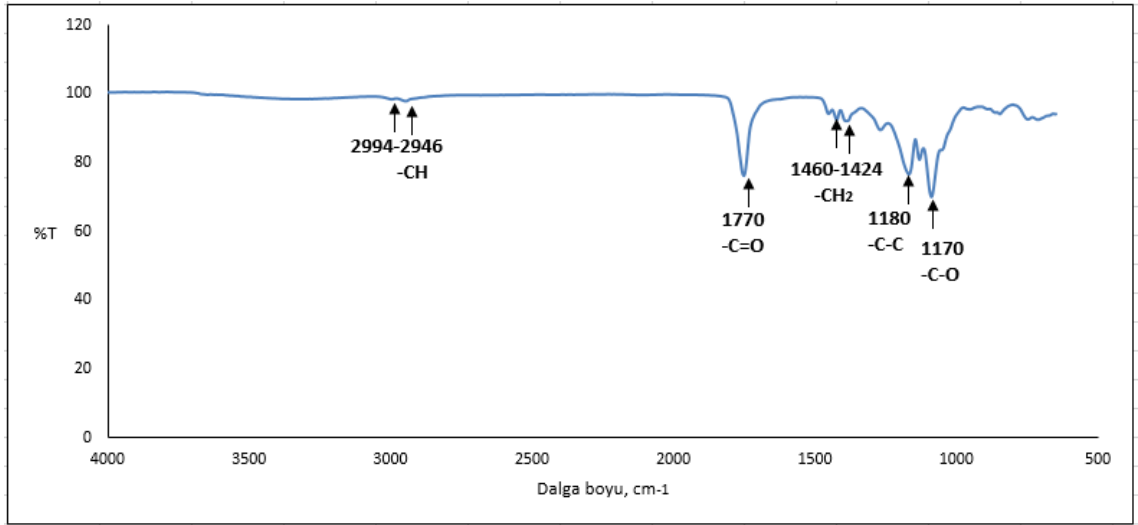
Numune	Boyut (nm)	PDI
1. Np	290,1	0,938
2. Np	315,9	0,887
3. Np	465,3	0,953
4. Np	482,7	0,902

4.4.2 FTIR Analizi

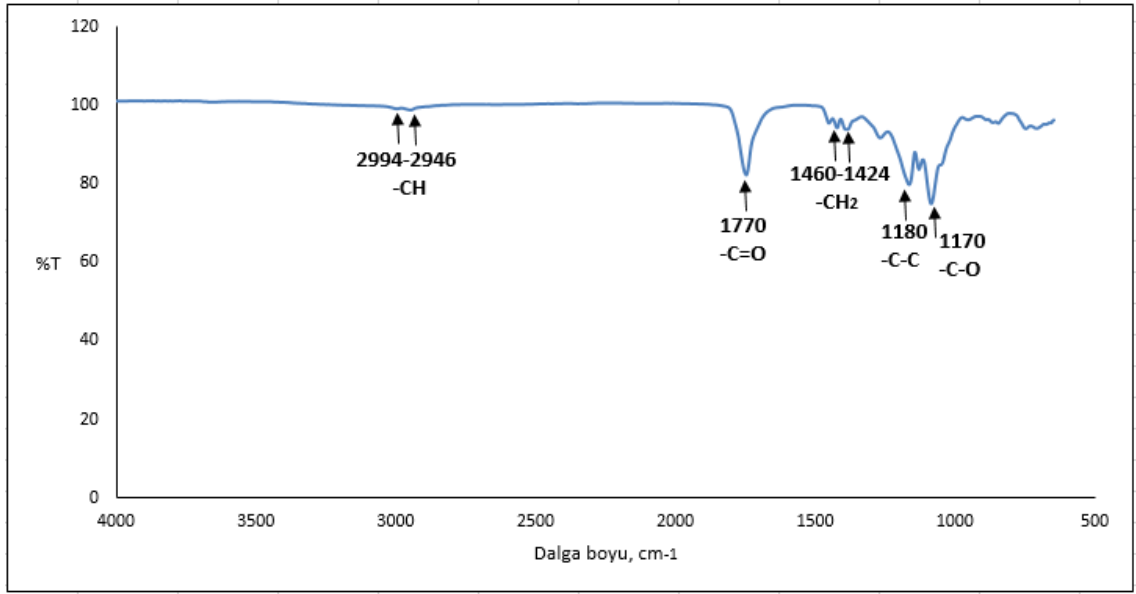
PLGA polimeri ve bu polimer kullanılarak su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan nanopartiküllere ait FT-IR spektrumları Şekil 4. 10-Şekil 4. 14’de verildi.



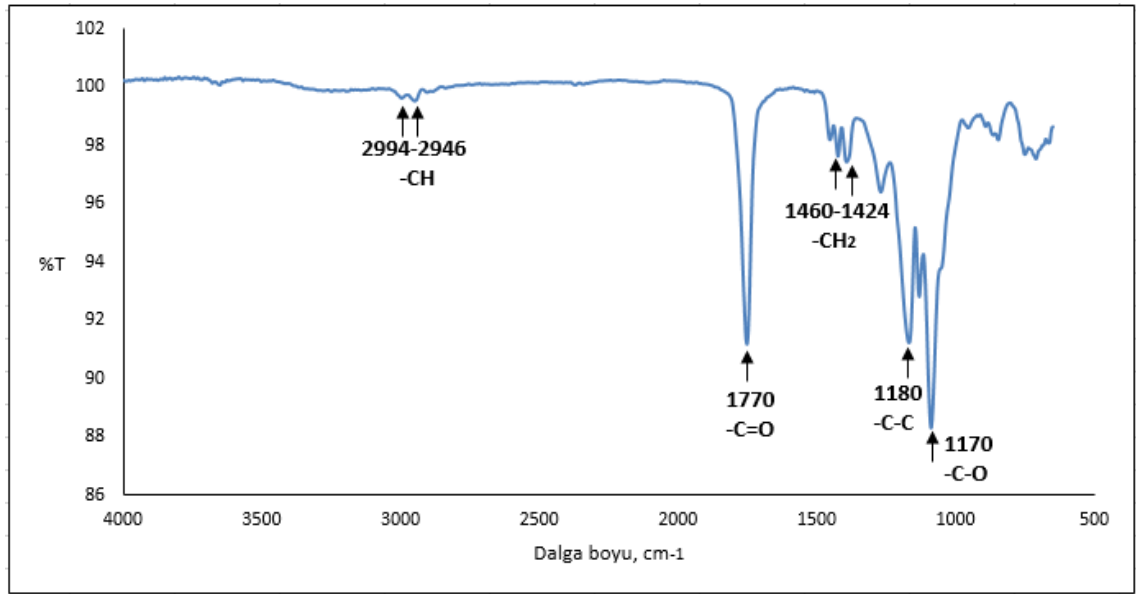
Şekil 4. 10 PLGA polimerine ait FT-IR spektrumu



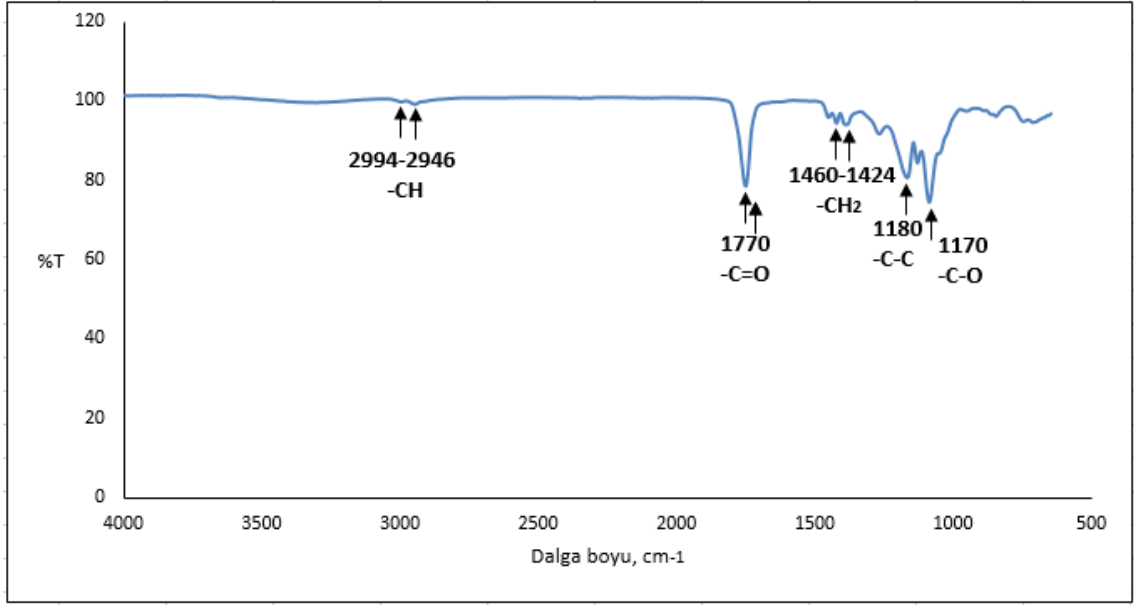
Şekil 4. 11 Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan boş nanopartiküllere ait FT-IR spektrumu (1. Np)



Şekil 4. 12 Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan FITC yüklü nanopartiküllere ait FT-IR spektrumu (2. Np)



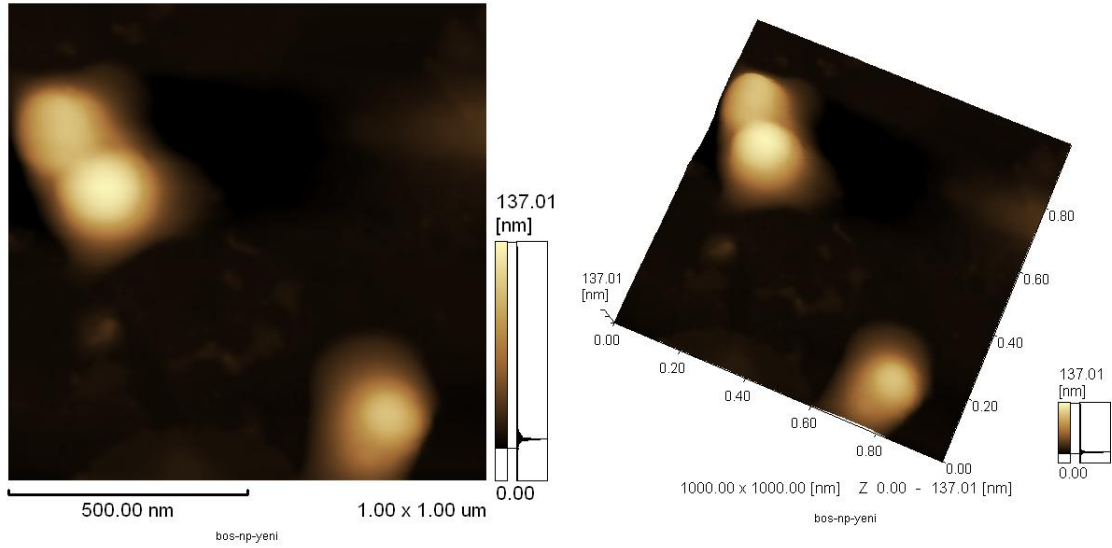
Şekil 4. 13 Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan insülin yüklü nanopartiküllere ait FT-IR spektrumu (3. Np)



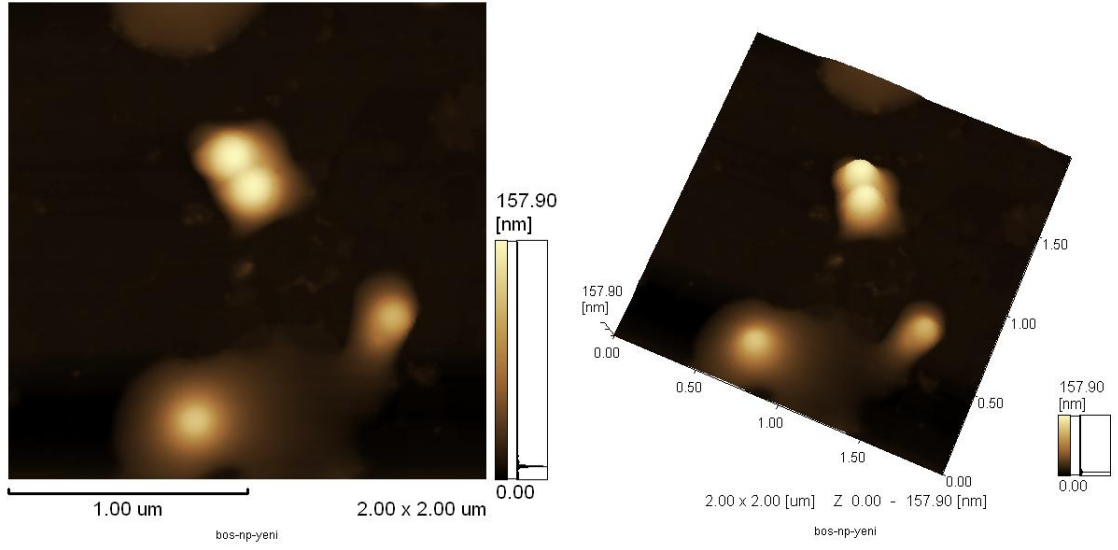
Şekil 4. 14 Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan FITC ve insülin yüklü nanopartiküllere ait FT-IR spektrumu (4. Np)

4.4.3 AFM Analizi

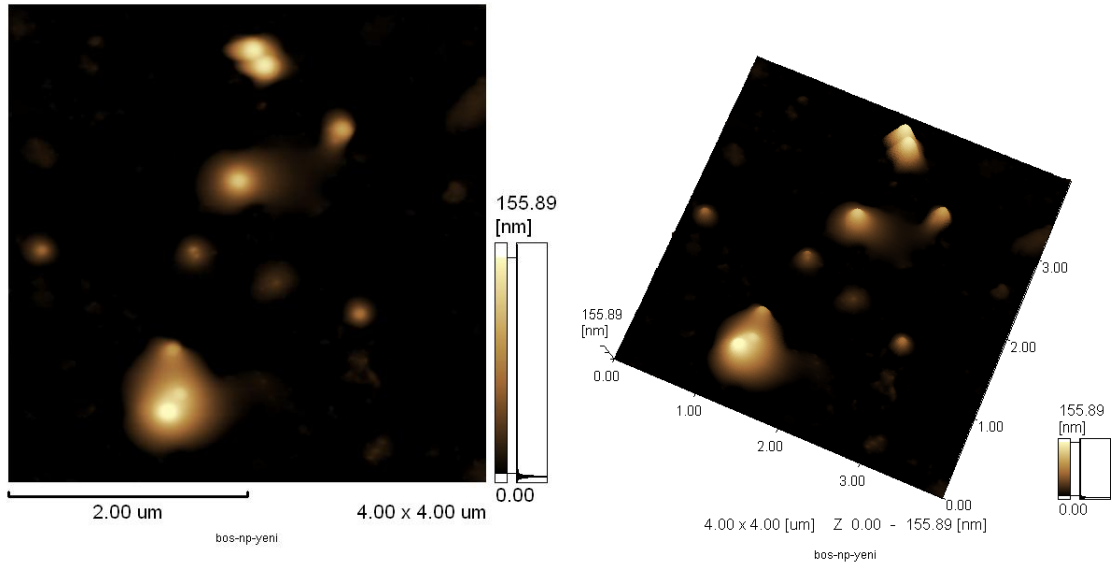
PLGA polimeri ve bu polimer kullanılarak su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan nanopartiküllere ait AFM görüntüleri Şekil 4. 15-Şekil 4. 25’de verildi.



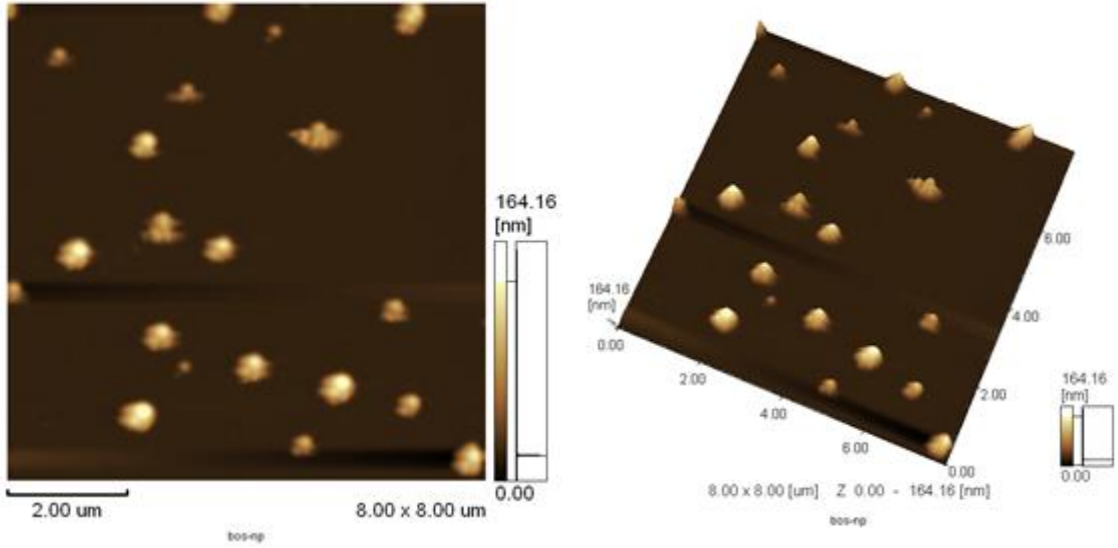
Şekil 4. 15 Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan boş nanopartiküllere (1. Np) ait sırasıyla 2D ve 3D AFM görüntüsü (1x1 µm²'lik alan)



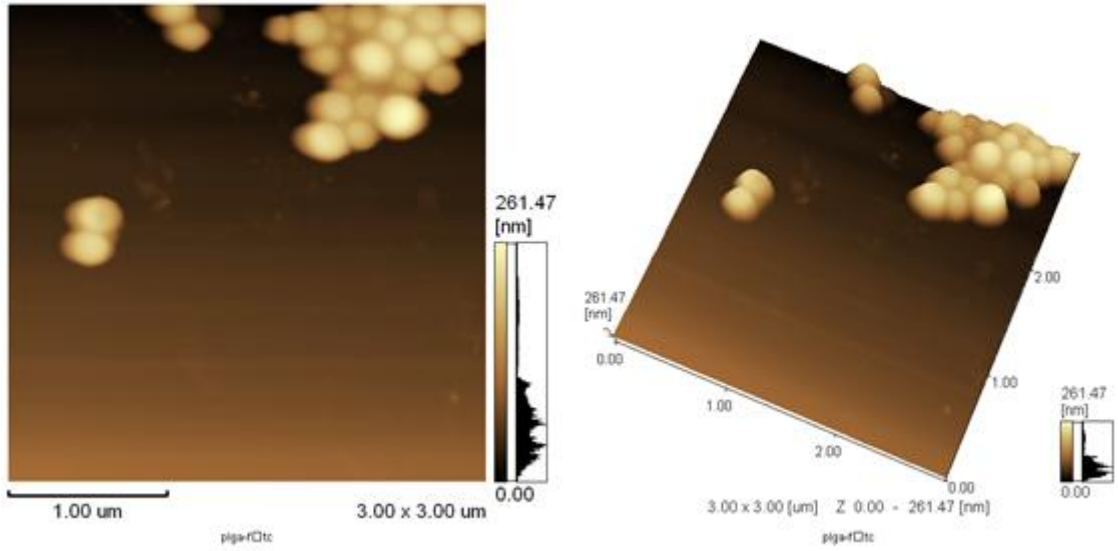
Şekil 4. 16 Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan boş nanopartiküllere (1. Np) ait sırasıyla 2D ve 3D AFM görüntüsü ($2 \times 2 \mu\text{m}^2$ 'lik alan)



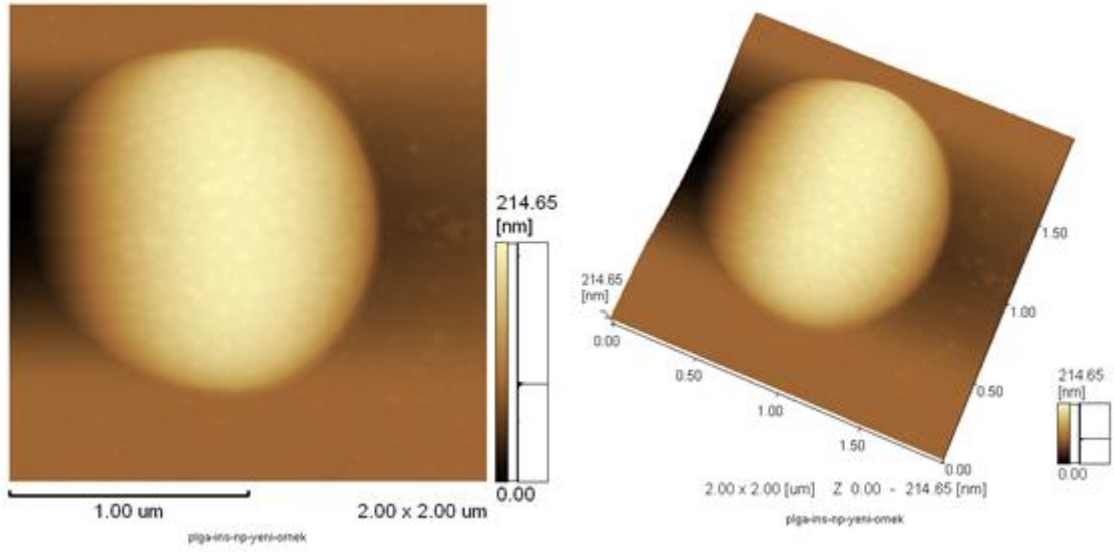
Şekil 4. 17 Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan boş nanopartiküllere (1. Np) ait sırasıyla 2D ve 3D AFM görüntüsü ($4 \times 4 \mu\text{m}^2$ 'lik alan)



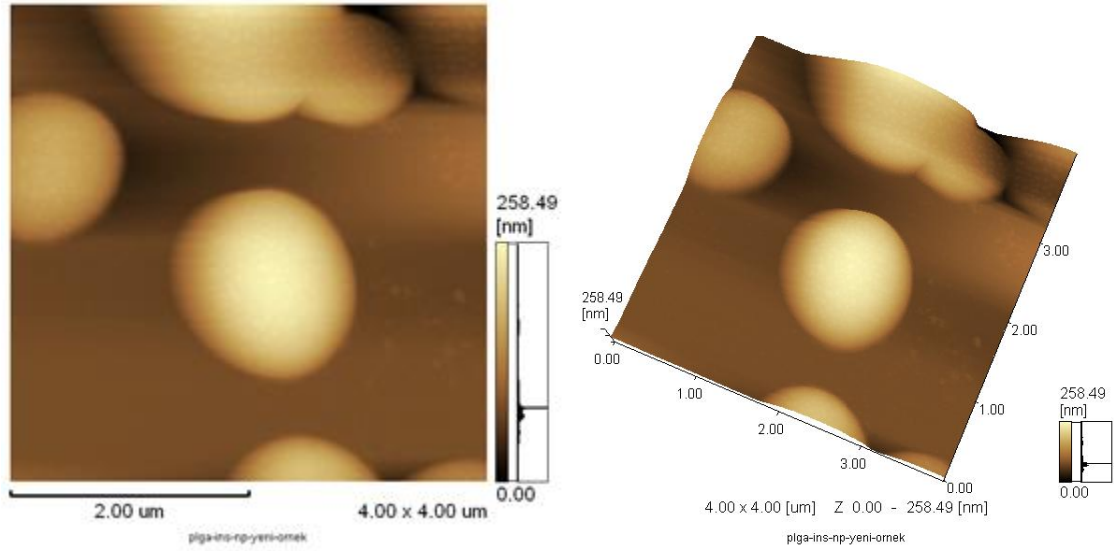
Şekil 4. 18 Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan boş nanopartiküllere (1. Np) ait sırasıyla 2D ve 3D AFM görüntüsü ($8 \times 8 \mu\text{m}^2$ 'lık alan)



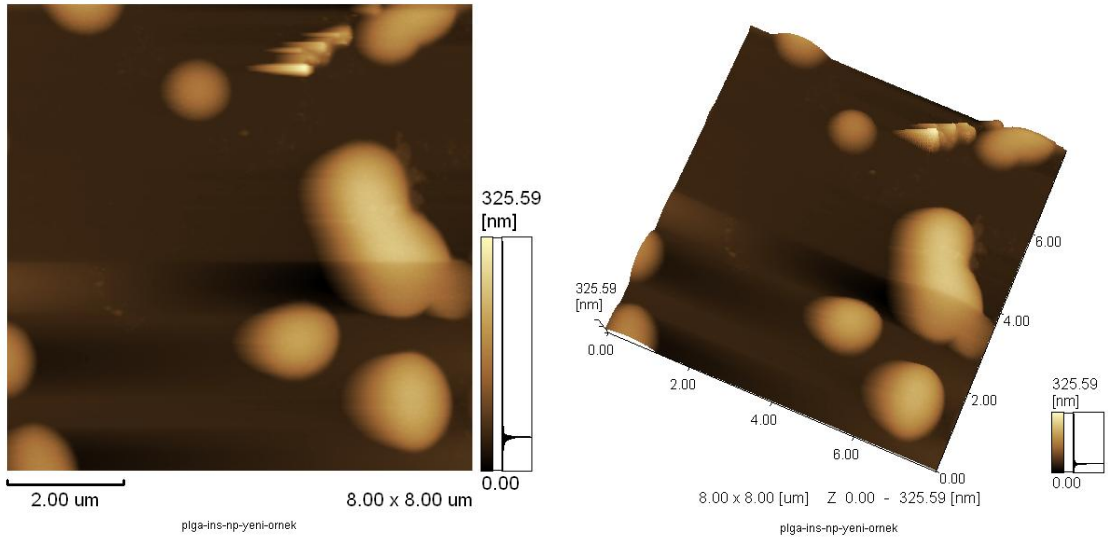
Şekil 4. 19 Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan FITC yüklü nanopartiküllere (2. Np) ait sırasıyla 2D ve 3D AFM görüntüsü ($3 \times 3 \mu\text{m}^2$ 'lık alan)



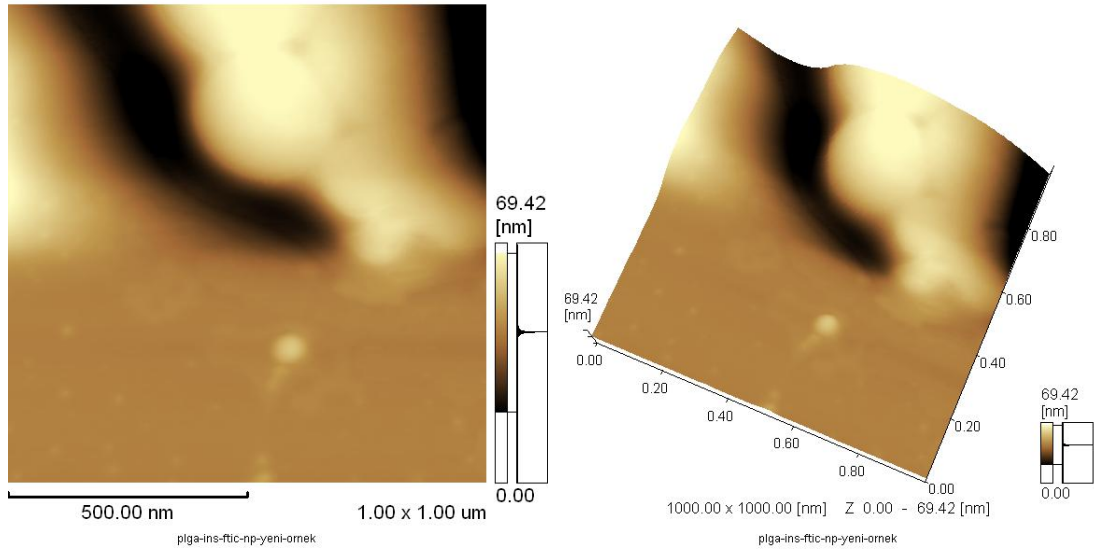
Şekil 4. 20 Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan insülin yüklü nanopartiküllere (3. Np) ait sırasıyla 2D ve 3D AFM görüntüsü ($2 \times 2 \mu\text{m}^2$ ’lik alan)



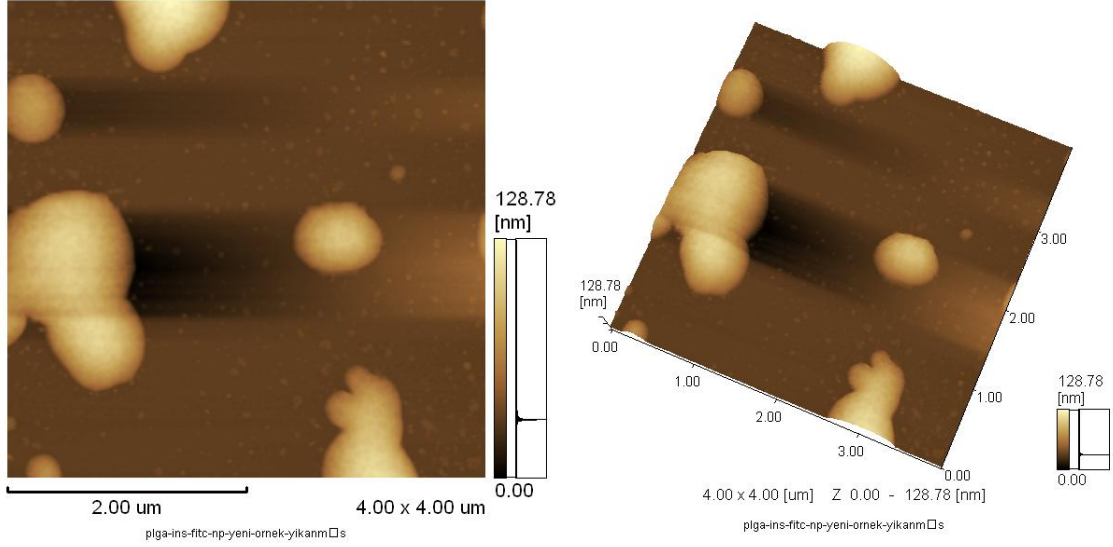
Şekil 4. 21 Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan insülin yüklü nanopartiküllere (3. Np) ait sırasıyla 2D ve 3D AFM görüntüsü ($4 \times 4 \mu\text{m}^2$ ’lik alan)



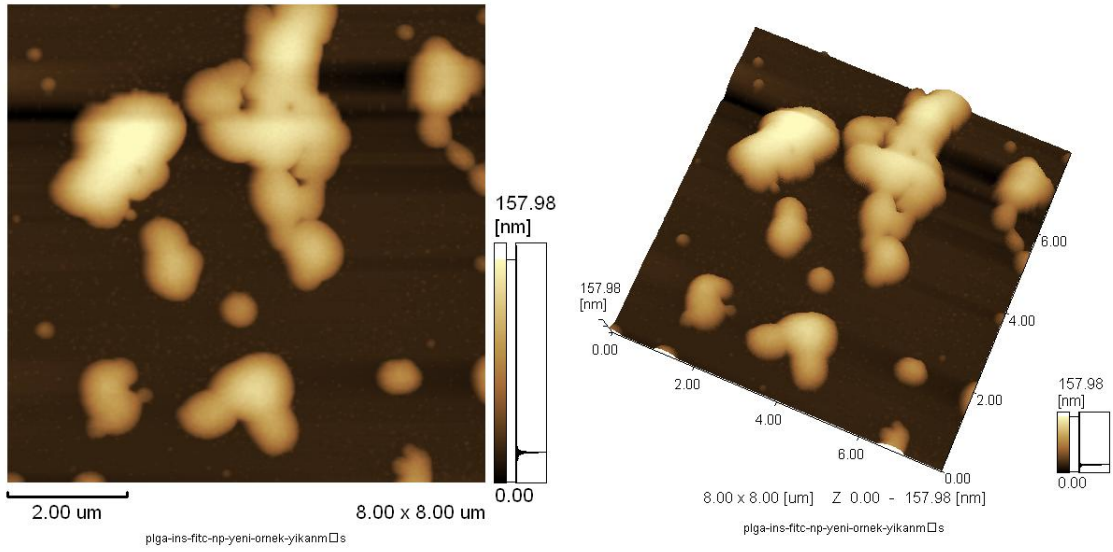
Şekil 4. 22 Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan insülin yüklü nanopartiküllere (3. Np) ait sırasıyla 2D ve 3D AFM görüntüsü ($4 \times 4 \mu\text{m}^2$ 'lik alan)



Şekil 4. 23 Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan FITC + insülin yüklü nanopartiküllere (4. Np) ait sırasıyla 2D ve 3D AFM görüntüsü ($1 \times 1 \mu\text{m}^2$ 'lik alan)



Şekil 4. 24 Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan FITC + insülin yüklü nanopartiküllere (4. Np) ait sırasıyla 2D ve 3D AFM görüntüsü (4x4 μm^2 ’lik alan)

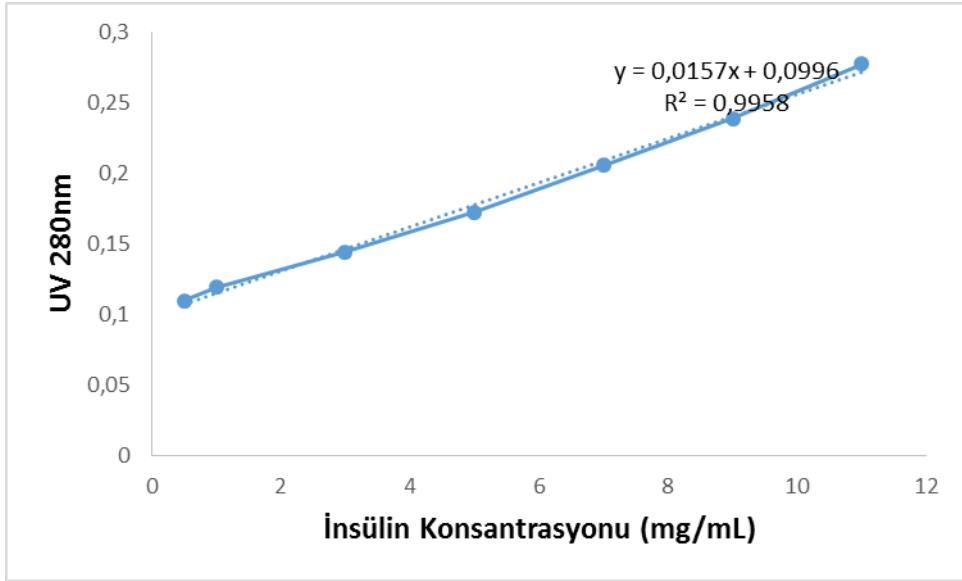


Şekil 4. 25 Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan FITC + insülin yüklü nanopartiküllere (4. Np) ait sırasıyla 2D ve 3D AFM görüntüsü (8x8 μm^2 ’lik alan)

4.4.4 Yükleme Veriminin Hesaplanması

Hazırlanan nanopartiküller için yükleme verimi santrifüj sonrası elde edilen üst fazların UV spektrofotometre ile 280 nm dalga boyunda yapılan ölçümleri ile hesaplandı. Elde edilen değerlere ait insülin miktarları Şekil 4.8’deki insülin standart eğri grafiği kullanılarak saptandı. Nanopartiküllerin yükleme verimleri de serbest insülin

miktarlarından yola çıkılarak hesaplandı. Elde edilen yükleme oranları Çizelge 4.3'te verildi.



Şekil 4. 26 İnsülin UV standart eğrisi

Çizelge 4. 3 Nanopartiküllere ait UV280nm değerleri ve % yükleme miktarları

Örnek	UV _{280nm}	Serbest İnsülin (mg/ml)	% Yükleme
3. Np	0,1000	0,0301	74,77
4. Np	0,1001	0,0330	72,38

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında ilk olarak İnsülin ile Poliakrilik asit (PAA) polimerinin biyokonjugatları sentezlendi ve karakterizasyon çalışması yapıldı. İkinci olarak ise boş, Floresansizotiyosiyanat (FITC), insülin ve FITC + insülin içeren PLGA nanopartiküllerinin ikili emülsiyon w/o/w çözücü buharlaştırma tekniği ile üretilerek, karakterizasyonu ve görüntülenmesi gerçekleştirildi.

5.1 İnsülin – Poliakrilik asit (PAA) Biyokonjugatlarına Ait Sonuçlar

Bu tez çalışmasında İnsülin-Poliakrilik asit biyokonjugatları 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid hidroklorid (EDC) karbodimidi varlığında sentezlenmiştir. Biyokonjugasyon reaksiyonu polimer moleküllerinin sahip olduğu karboksil (-COOH) gruplarının aktivasyonu ve oluşan aktif O-açilisoüre ara ürününün peptidlerin yapısında bulunan amino (-NH₂) grupları ile bağlanması sonucu İnsülin-PAA kovalent biyokonjugatlarının eldesi ile sonuçlanmıştır. Sentezlenen biyokonjugatlar GPC, Floresans Spektrofotometre ve Zetasizer cihazlarında analiz edilerek karakterize edilmiştir.

Bu biyokonjugatlara ait GPC kromatogramları incelendiğinde UV dedektörü ve ışık saçılması (RALS) detektörlerinden elde edilen kromatogramlarda ise PAA ve insülinin birbirine bağlanmasıyla elde edilen biyokonjugatların insülin oranları arttıkça molekül boyutunun da giderek büyüdüğü Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'te görülmektedir.

GPC cihazının Şekil 4.1’de UV dedektöründen elde edilen kromatogramlardan da 10. ile 15. dakikalar arasında biyokonjugasyon oluşumu net bir şekilde gözlemlenmektedir. Saf insülinin alıkonma zamanı 21 ile 23. dakikalar arasında iken polimere kovalent olarak bağlanmış insülin ile oluşan insülin-polimer biyokonjugatının molekül ağırlığı arttığından saf insülinin alıkonma zamanından daha erken kolondan ayrılmıştır. Şekil 4.2’de ise polimer, insülin ve insülin-polimer biyokonjugatının karşılaştırmalı ışık saçılması dedektöründen elde edilen kromatogramlardan, insülinin polimer zincirine kovalent bağlanması ile biyokonjugat oluşumunun sonucunda molekül boyutunun büyüdüğü biyokonjugata ait pik alanının polimerden daha büyük olmasından anlaşılmaktadır.

GPC cihazının UV dedektöründen elde edilen kromatogramlarda ise, I. Pik bölgesinde (10 ve 15. dakikalar arasında) biyokonjugatdaki insülin konsantrasyonunun artması ile değişen mol oranlarında belirgin bir şekilde piklerin şiddetlerinin arttığı görülmektedir. Biyokonjugatlardaki insülin konsantrasyonu arttığında, polimer ile bağlanan insülin moleküllerinin miktarı artmaktadır (Şekil 4.4).

GPC cihazının ışık saçılması dedektöründen elde edilen kromatogramlarda ise, sentezlenen farklı mol oranlarındaki biyokonjugatlarda polimer zincirine bağlanan insülin miktarı arttıkça yani mol oranı arttıkça insülin-polimer biyokonjugatına ait ışık saçılması piklerinin de şiddetlerinin arttığı görülmektedir (Şekil 4.5).

İnsülin yapısında içerdiği 4 tirozin ve 3 fenilalanin aminoasiti sayesinde floresans özellik göstermektedir. Tirozin aminoasitinin en önemli özellikleri arasında hidroksil grubu hidrojen bağı yapabilmesi gelmektedir. Fenilalanine göre daha polardır. Tirozinin bir başka özelliği de alkali pH’da bir proton kaybedebilse de nötral pH’da yüksüzdür.

Hazırlanan İnsülin – PAA biyokonjugatları içerdiği aminoasitlerin yapısından dolayı Floresans spektrofotometresiyle analizi 270 nm’de gerçekleştirildi. Şekil 4.7’de gösterildiği gibi, biyokonjugat içerisinde artan insülin oranlarına bağlı olarak insülin miktarı arttıkça elde edilen floresans değerleri artmaktadır.

Floresans spektrometre cihazı ile yapılan ölçümlerde Şekil 4.6’da görüldüğü gibi insülinin artan mol oranlarında floresans şiddetlerinin de arttığı gözlenmektedir. Maksimum floresans dalga boyu 297 nm olarak gözlenmiştir. Şekil 4.7’de ise insülin-

polimer biyokonjugatlarına ait floresans spektrumları görülmektedir. Polimerin tüm mol oranlarında sabit olduğu ve insülinin artan konsantrasyonlarında sentezlenen biyokonjugatlarda, artan insülin konsantrasyonu ile floresans şiddetinin de arttığı gözlenmiştir. Ancak Tirozin aminoasitinin spektral özelliklerinden dolayı dalga boyunda kayma gözlenmemektedir. Aynı mol oranındaki serbest insülin molekülü ve polimer zinciri ile kovalent bağlanmış insülin-polimer biyokonjugatı arasında sadece floresans şiddetlerinde bir fark gözlenmektedir. Ancak aynı mol oranındaki insülinlere kıyasla insülin-polimer biyokonjugatları daha düşük floresans şiddetine sahiptir. Aynı miktarda insülin içermesine rağmen biyokonjugatta oluşan floresans şiddeti azalması bize biyokonjugat oluşumunu ispatlamaktadır.

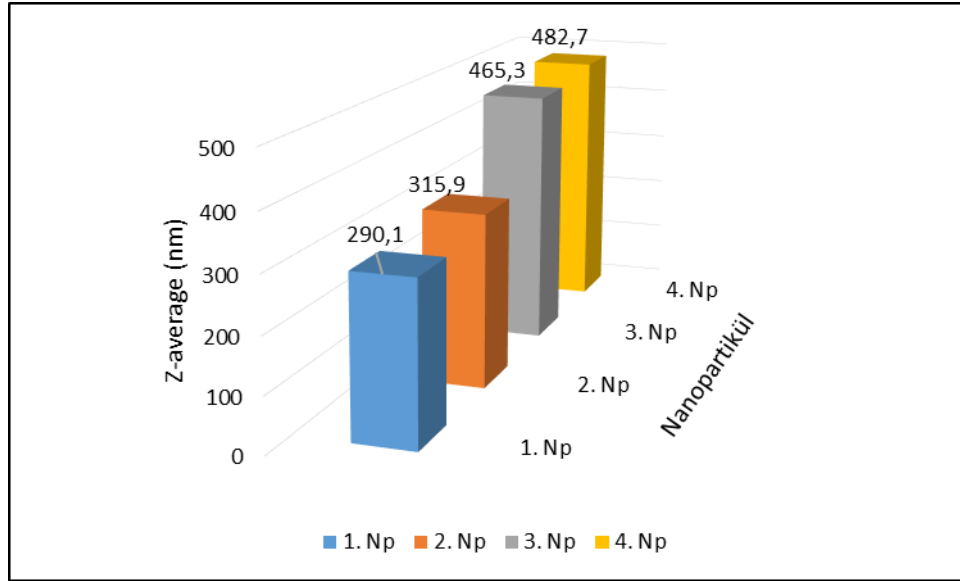
Biyokonjugatların zeta potansiyel değerleri insülinin ve PAA polimerinin zeta potansiyel değerleri ile karşılaştırıldığında, biyokonjugatların zeta potansiyel değerlerinin PAA'ya kıyasla sıfıra yaklaştığı görülmektedir (Çizelge 4.1). İnsülin ve PAA gibii negatif yüke sahip moleküllerin konjugasyonu sonucunda zeta potansiyel değerinin daha sıfıra yaklaşması PAA üzerindeki negatif yüklü karboksil gruplarının (-COOH) peptid üzerindeki amino grupları ile (-NH₂) bağlandığını göstermektedir. Bu şekilde oluşan amid bağları karboksil gruplarının nötürleşmesine neden olarak zeta potansiyel değerinin sıfıra yaklaşmasıyla sonuçlanmaktadır. Bu durum biyokonjugasyon reaksiyonunun gerçekleştiğini kanıtlamaktadır.

Biyokonjugatlara ait UV Spektrofotometre sonuçları da insülin oranının artmasıyla biyokonjugatların UV absorbans değerlerinin doğru orantılı olarak arttığını göstermektedir (Şekil 4.9)

5.2 İnsülin – Poli (laktik-ko-glikolik) asit (PLGA) Nanopartiküllerine Ait Sonuçlar

Su/yağ/su ikili emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanan nanopartiküllere (1. Np: Boş, 2. Np: FITC yüklü, 3. Np: İnsülin yüklü, 4. Np: FITC+İnsülin yüklü) ait Zetasizer cihazından elde edilen boyut değerleri incelendiğinde (Çizelge 4.2) boş nanopartikülün (1. Np) boyut değerinin en düşük olduğu görüldü. Nanopartiküle FITC boya yüklendiğinde (2. Np) boyutun 25,8 nm değerinde arttığı, insülin yüklü nanopartikülde (3. Np) ise bu değer 175,2 nm'ye ulaştığı görüldü. Nanopartikül

içerisine FITC boya ve insülinin aynı anda yüklendiği (4. Np) durumda ise boyuttaki artışın 192,6 nm olduğu elde edilen Zetasizer sonuçlarından görüldü.



Şekil 5. 1 Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan (1. Np: Boş, 2. Np: FITC yüklü, 3. Np: İnsülin yüklü, 4. Np: FITC+İnsülin yüklü) nanopartiküllere ait Zetasizer boyut değerlerinin karşılaştırılması

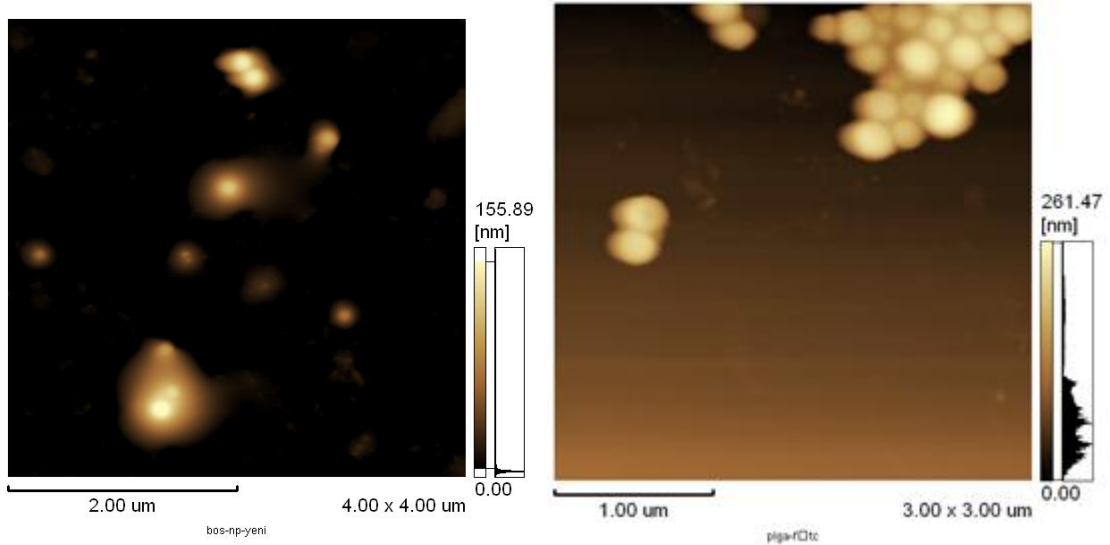
İnsülin – Poli(laktik-ko-glikolik) asit nanopartiküllerine ait FTIR spektrumlarından elde edilen fonksiyonel grup ve dalga boyları Çizelge 5.1’de verilmiştir. İnsülin – PLGA nanopartiküllerinde bulunan fonksiyonel gruplar ile FTIR spektrumundan elde edilen fonksiyonel gruplarla eşleşmiştir.

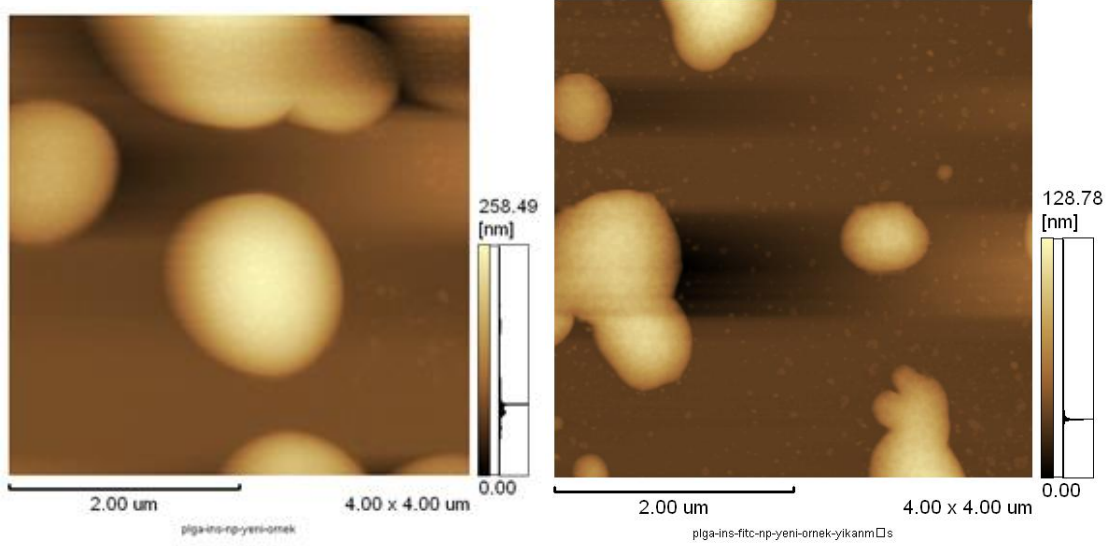
Çizelge 5. 1 İnsülin – PLGA nanopartiküllerinde bulunan fonksiyonel gruplar ile FTIR spektrumundan elde edilen fonksiyonel grupların eşleştirilmesi

Fonksiyonel Gruplar	Dalga boyu (cm ⁻¹)
-C – O	1170
-C – C	1180
-CH ₂	1424 – 1460
-C = O	1770
-CH	2946 - 2994

Polimerik nanopartiküller terimi her tip polimerik nanopartikül için verilmiş genel bir terimdir ama özellikle nanoküre ve nanokapsüller için kullanılmaktadır. Nanoküreler partikülün tamamının küre yüzeyine adsorbe olduğu ya da partikül içerisinde enkapsüle edildiği matriks sistemlerdir. Nanoküreler ise veziküler sistemlerdir; katı dış kabuk ile sarılmış sıvı bir kabuk içererek bu içeriği küre içerisindeki boşluğa hapsederler [92]. FTIR analizine göre lineer poli(laktik-ko-glikolik)asit (PLGA), 1. Np, 2. Np, 3. Np ve 4. Np spektrumları arasında farklılık gözükmemektedir. Bunun sebebi w/o/w yöntemiyle sentezlenmiş İnsülin-PLGA nanopartiküllerinin enkapsülasyonu sırasında İnsülin ile PLGA arasında kimyasal bir bağ oluşumunun gerçekleşmemiş olmasıdır.

AFM analizinden elde edilen sonuçlara göre 1. Np, 2. Np, 3. Np ve 4. Np için küresel nanopartikül oluşumu gözlemlenmektedir. Elde edilen nanopartiküllerin AFM görüntülerinden nanopartiküllerin agreve olmadan ayrı ayrı olduğu görülmektedir.





Şekil 5. 2 Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan sırasıyla 1. Np: Boş ($4 \times 4 \mu\text{m}^2$), 2. Np: ($3 \times 3 \mu\text{m}^2$) 3. Np: İnsülin yüklü ($4 \times 4 \mu\text{m}^2$), 4. Np: FITC+İnsülin yüklü ($4 \times 4 \mu\text{m}^2$) nanopartiküllere ait 2D AFM görüntüsü

Bu tez çalışması, dünya çapında oldukça yaygın olan diyabet hastalığında günümüzde uygulanan insülin tedavilerine alternatif olarak insülin için kontrollü salım sistemi modellerinin geliştirilmesine dair yapılacak çalışmalara ışık tutacak bir ön çalışmadır.

KAYNAKLAR

-
- [1] Shah, S.N., Joshi S.R. ve Parma,DV., (1997). "History of Insulin", J Assoc Physicians Ind 1997; 45 (Suppl 1): 4-9.
 - [2] Jeandidier, N. ve Boivin, S., (1999). "Current Status and Future Prospects of Parenteral Insulin Regiments, Strategies And Delivery Systems For Diabetes Treatment", Adv. Drug Del. Rev. 35: 179-198.
 - [3] Reynolds, L.R., (2000). "Reemergence of Insulin Pump Therapy in the 1990s", Southern Medical Journals 93: 1157-1161.
 - [4] Hinchcliffe, M. ve Illum, L., (1999). "Intranasal Insulin Delivery and Therapy", Avd. Drug Del. Rev. 35: 199-234.
 - [5] Zihnioğlu, F. vd., (2007). Protein Mühendisliği, Ege Üniversitesi Basımevi, 35100, İzmir.
 - [6] Dikmen, N. ve Özgünen, T., (2004). Harper Biyokimya, 25. Baskı, Nobel yayınevi, İstanbul.
 - [7] Goodsell, D., Insulin, <http://www.rcsb.org/pdb/101/motm.do?momID=14>, 7 Mayıs 2013.
 - [8] Mayer, J.P., Zhang, F. ve DiMarchi, RD., (2007). "Insulin Structure and Function", Biopolymers, 88(5):687-713.
 - [9] Rawn, J.D., (1989). Glycogen Metabolism, Gluconeogenesis, Pentose Phosphate Pathway: Insulin Lowers The Concentration Of Glucose In The Blood. In: Patterson N. (Ed.), Biochemistry, Burlington, North Carolina, 395-398.
 - [10] Shashank R. J., Rakesh M. P. ve Das, A. K., (2007). "Insulin History, Biochemistry, Physiology and Pharmacology", Supplement of Japi, 55.
 - [11] Brange, J., (1987). Galenics of Insulin: The Physico-Chemical And Pharmaceutical Aspects Of Insulin And Insulin Preparations, Springer-Verlag, Berlin.
 - [12] Gualandi-Signorini, A.M. ve Giorgi, G., (2001). "Insulin Formulations – A Review", European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 5: 73-83.
 - [13] Bowen, R. (2004). Physiologic Effects of Insulin, http://arbl.cvmbs.colostate.edu/hbooks/pathphys/endocrine/pancreas/insulin_phys.html, 10 Mart 2013.

- [14] Snustad vd. (1997). Post-translational Modification of Tertiary Structure of Insulin, http://www.mun.ca/biology/scarr/Insulin_posttranslational_modification.html, 10 Mart 2013.
- [15] Insulin, <http://www.bio.davidson.edu/courses/molbio/molstudents/spring2005/dresser/my%20favorite%20protein.html>, 10, Mart 2013.
- [16] Dobrynina, A.V. and Rubinstein, M., (2005). " Theory of Polyelectrolytes in Solutions and at Surfaces", Prog. Polym. Sci. 30: 1049–1118.
- [17] Özdemir, Z.Ö. ve Akdeste, Z., (2011). "Development Of Polyelectrolyte Based Bioconjugates Using With Synthetic Viral Peptides", Journal of Engineering and Natural Sciences, Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi, Sigma 29, 65-89.
- [18] Hermann, Prof., Macromolecules, http://wwwcp.tphys.uni-heidelberg.de/biophysics/biophysics_lecture6.pdf, 12 Mart 2013.
- [19] Fuoss RM., (1948). Viscosity Function for Polyelectrolytes, J Polym Sci 3:603.
- [20] Zhang, Y., (2009). Preparation of Copolymers of Acrylic Acid and Acrylamide for Copper (II) Capture from Aqueous Solutions, Master Thesis, University of Waterloo, Chemical Engineering, Waterloo, Ontario, Canada.
- [21] Dr. David Anderson, <http://www.coolspace.org/CoolScience/KidScientists/babydiaper.htm>, 7 Ocak 2014.
- [22] Huang, F., Zheng, Y. and Yang, Y. (2007). "Study on Macromolecular Metal Complexes: Synthesis, Characterization, and Fluorescence Properties of Stoichiometric Complexes for Rare Earth Coordinated with Poly(acrylic acid)", Journal of Applied Polymer Science, 103: 351–357.
- [23] Rivas, B.L., Quilodran, B. and Quiroz, E., (2005). "Metal Ion Retention Properties of Poly(acrylic acid) and Poly[n-3-(dimethylamino)propyl acrylamide-co-acrylic acid]", Journal of Applied Polymer Science, 97: 1385–1394.
- [24] Saunders, G. ve MacCreath, B., (2010). Biodegradable Polymers - Analysis of Biodegradable Polymers by GPC/SEC, Agilent Technologies, Inc., <https://www.chem.agilent.com/Library/applications/US5990-6920EN.pdf>, 13 Mart 2013.
- [25] Singla, AK., Chawla, M., Singh, A. (2000). "Potential Applications of Carbomer in Oral Mucoadhesive Controlled Drug Delivery System: A Review", Drug Dev. Ind. Pharm., 26: 913-924.
- [26] Khutoryanskiy, V., (2007). "Hydrogen-bonded Interpolymer Complexes as Materials for Pharmaceutical Applications", Int. J. Pharm., 334: 15-26.
- [27] Devrim, B., (2009). İnterlökin-2 İçeren İlaç Taşıyıcı Sistemlerin İnhalasyon Formülasyonlarına Yönelik Çalışmalar, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Ankara.
- [28] Ugwoke, MI., Sam, E., Van Den Mooter, G., Verbeke, N. and Kinget, R., (1999). "Nasal Mucoadhesive Delivery Systems Of The Anti-Parkinsonian Drug,

- Apomorphine: Influence Of Drug-Loading On In Vitro And In Vivo Release In Rabbits”, *International Journal of Pharmaceutics* 181, 125–138.
- [29] Robinson, J., Mlynek, G., (1995). “Bioadhesive and Phase-change Polymers for Ocular Drug Delivery”, *Adv Drug Deliv. Rev.*, 16: 45-50.
 - [30] See, N.A., Russell, J., Connors, K.A., Bass, P., (1987). “Adsorption Of Inorganic Ions to Polycarbophil As A Means Of Sustained Release Dosage Formulation”, *Pharm. Res.* 4, 244– 247.
 - [31] Ludwig, A., (2005). “The Use of Mucoadhesive Polymers in Ocular Drug Delivery”, *Adv Drug Deliv. Rev.*, 57: 1595-1639.
 - [32] Ch’ng, H.S., Park, H., Kelly, P., Robinson, J.R., (1985). “Bioadhesive Polymers As Platforms For Oral Controlled Drug Delivery II: Synthesis And Evaluation Of Some Swelling, Water-Insoluble Bioadhesive Polymers”, *J. Pharm. Sci.* 74, 399–405.
 - [33] Morimoto, K., Morisaka, K., (1987). “In Vitro Release And Rectal Absorption Of Barbitol And Aminopyrine From Aqueous Polyacrylic Acid Gel”, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 13, 1293–1305.
 - [34] French, D.L., Himmelstein, K.J., Manger, J.W., (1995). “Physicochemical Aspects Of Controlled Release Of Substituted Benzoic And Naphtoic Acids From Carbopol Gels”, *J. Control. Release* 37, 281–289.
 - [35] Neau, S.H., Chou, M.Y., Durrani, M.J., (1996). “Fabrication And Characterization Of Extruded And Spheronized Beads Containing Carbopol 974P, NF Resin”, *Int. J. Pharm.* 131, 47–55.
 - [36] Miller, M. L. *Encycl Polym Sci Technol* 1978, 1, 445.
 - [37] Buddy, D.R., Hoffman, A.S., Schoen, F.J. and Lemons, J.E., (2012). *Biomaterials Science Third Edition: An Introduction to Materials in Medicine*, 3 edition, Academic Press, Salt Lake City UT 84105 USA.
 - [38] Bai, JPF., Chang, LL ve Guo, JH., (1996). “Effects of Polyacrylic Polymers on the Degradation of Insulin and Peptide Drugs by Chymotrypsin and Trypsin”, *J. pharm. Pharmacol.* 48: 17-21.
 - [39] Gattani, YS., (2010). “Floating Multiparticulate Drug Delivery Sstems: An Overview”, *International Journal of Pharma and Biosciences*, 6(2), 35-40.
 - [40] Siepmann, J., (2006). “Microparticles Used as Drug Delivery Systems, *Progress in Colloidand Polymer Science*, 133,15.
 - [41] Padalkar, AN., Shahi, SR., ve Thube, MW., (2012). “Microparticles: An Approach For Betterment Of Drug Delivery System”, *JPRD*, 3: 1.
 - [42] Markus, A., ve Linder, C., (1988). “Advances in the Technology for Controlled Release Pesticide Formulations”, *Microencapsulation: Methods and Industrial Applications*, Second edition, 158, 55-77.
 - [43] Lü, J.M., Wang, X., Marin-Muller, C., Lin, P.H., Yao, Q. and Chen, C., (2009). “Current advances in research and clinical applications of PLGAbased nanotechnology”, *Expert Rev Mol Diagn.* 9(4):325-41.
 - [44] Arruebo, M., Valladares, M. ve González-Fernández, A., (2009). “Antibody-Conjugated Nanoparticles for Biomedical Application”, *Journal of Nanomaterials*.

- [45] Wang, F., Chen, Y. ve Bensoni H.A.E.. (2008). "Formulation of Nano and Micro PLGA Particles of the Model Peptide Insulin: Preparation, Characterization, Stability and Deposition in Human Skin", *The Open Drug Delivery Journal*, 2: 1-9.
- [46] Shinde, NC., Keskar, NJ., ve Argade, PD., (2012). "Nanoparticles: Advances in Drug Delivery Systems", *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 3:1, 928.
- [47] Chan, J.M, Valencia, P.M, Zhang, L., Langer, R. ve Farokhzad, OC., (2010). "Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery", *Methods Mol Biol* 624:163–175.
- [48] Kumari, A., Yadav, S.K. ve Yadav, SC., (2010). "Biodegradable Polymeric Nanoparticles Based Drug Delivery Systems", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75: 1, 1–18.
- [49] Ghosh, P.K., (2000). "Hydrophilic polymeric nanoparticles as drug carriers", *Indian J Biochem Biophys* 37: 273-282
- [50] Nagavarma, B.V.N., Hemant, K.S.Y., Ayaz, A., Vasudha, L.S. ve Shivakumar, H.G., (2012). "Different Techniques For Preparation Of Polymeric Nanoparticles- A Review", *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 5: 3.
- [51] Akagi, T., Baba, M. ve Akashi, M., (2011). "Biodegradable Nanoparticles as Vaccine Adjuvants and Delivery Systems: Regulation of Immune Responses by Nanoparticle-Based Vaccine", *Advances in Polymer Science*, 247: 31-64.
- [52] Naik, J.B., Lokhande, A.B., Mishra, S. ve Kulkarni, R.D., (2012). "Development Of Sustained Release Micro/Nano Particles Using Different Solvent Emulsification Techniques: A Review", *Int J Pharm Bio Sci*, 4: 573 – 590.
- [53] Astete, C.E., (2005). Synthesis Of Poly(DL-Lactide-Co-Glycolide) Nanoparticles With Entrapped Magnetite, Master's Thesis, Louisiana State University, Department of Biological & Agricultural Engineering, Chile.
- [54] Catarina, PR., Ronald, JN., Antonio, JR., (2006). " Nano capsulation 1. Method of Preparation of Drug – Loaded Polymeric Nanoparticles: Nano Technology", *Biology and Medicine*, 2:8-21.
- [55] Allemann, E., Gurny, R. ve Doekler, E., (1993). " Drug-loaded Nanoparticles Preparation Methods and Drug Targeting Issues", *Eur J Pharm Biopharm.*, 39:173-91.
- [56] Lambert, G., Fattal, E. ve Couvreur, P., (2001). " Nanoparticulate System for the Delivery of Antisense Oligonucleotides", *Adv Drug Deliv Rev.*, 47:99-112.
- [57] Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J-P., Ammoury, N., ve Benita, S., (1989). "Nano Capsule Formation by Interfacial Deposition Following Solvent Displacement", *Int J Pharm.*, 55:R1-R4.
- [58] Chorney, M., DANEuberg, H. ve Golomb, G., (2002). "Lipophilic Drug Loaded Nanospheres by Nano Precipitation: Effect of the Formulation Variables on Size, Drug Recovery and Release Kinetics", *J Control release*, 83: 389-400.
- [59] Hermanson, GT., (1997). "Bioconjugate Techniques", *J. Med. Chem.*, 40, 631.
- [60] Nathani, R., Moody, P., Smith, M.E.B., Fitzmaurice, R.J. ve Caddick, S., "Bioconjugation of Green Fluorescent Protein via an Unexpectedly Stable Cyclic Sulfonium Intermediate", *ChemBioChem*, 13, 1283-1285.

- [61] Esser-Kahn, A.P. ve Francis, M.B., (2008). "Protein-Cross-Linked Polymeric Materials through Site-Selective Bioconjugation", *Angew. Chem.*, 120, 3811 – 3814.
- [62] Jin,Y., Yang, R., Suh, H. ve Woo, HY., (2008). "Cationic and Anionic Conjugated Polyelectrolytes: Aggregation-Mediated Fluorescence Energy Transfer to Dye-Labeled DNA", *Macromol. Rapid Commun.*, 29, 1398–1402.
- [63] Mansuroğlu, B., Kızılbaş, K., Derman, S. ve Mustafaeva, Z., (2011). "Protein-Polielektrolit Kompleks ve Konjugatlarının Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Yöntemi ile İncelenmesi", *Türk Biyokimya Dergisi* [Turkish Journal of Biochemistry–Turk J Biochem], 36 (1) ; 21–28.
- [64] Life Technologies, Carbodiimide Crosslinker Chemistry, <https://www.lifetechnologies.com/tr/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/carbodiimide-crosslinker-chemistry.html>, 15 Şubat 2015.
- [65] Ibie, C.O., (2013). Novel Polyelectrolyte Complexes for Oral Insulin Delivery, Robert Gordon University, Aberdeen, Scotland.
- [66] Baudyš, M., Letourneur, D., Liu, F., Mix, D., Jozefonvicz, J. ve Kim, S.W., (1998). "Extending Insulin Action in Vivo by Conjugation to Carboxymethyl Dextran", *Bioconjugate Chem.*, 9 (2), 176–183.
- [67] Hinds, K., Koh, J.J., Joss, L., Liu, F., Baudyš, M. ve Kim, S.W., (2000). "Synthesis and Characterization of Poly(ethylene glycol)–Insulin Conjugates", *Bioconjugate Chem.*, 11 (2), 195–201.
- [68] Zhang, Y.Q., Ma, Y., Xia, Y.Y., Shen, W.D., Mao, J.P., Xue, R.Y., (2006). "Silk Sericin–Insulin Bioconjugates: Synthesis, Characterization and Biological Activity", *Journal of Controlled Release*, 115: 3, 307–315.
- [69] Zhang, YQ., Ma, Y., Xia, Y.Y., Shen, WD., Mao, J.P., Zha, X.M., Shirai, K., Kiguchi, K., (2006). "Synthesis of silk fibroin-insulin bioconjugates and their characterization and activities in vivo", *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 79B: 2, 275–283.
- [70] Dilgimen, AS., Mustafaeva, Z., Demchenko, M., Kaneko, T., Osada, Y., ve Mustafaev, M., (2001) "Water-Soluble Covalent Conjugates of Bovine Serum Albumin with Anionic Poly(N-isopropylacrylamide) and Their Immunogenicity. *Biomaterials* 22(17): 2383-92.
- [71] Kitagawa, T. ve Aikawa, T., (1976). "Enzyme Coupled Immunoassay of Insulin Using a Novel Coupling Reagent", *J Biochem* 79 (1): 233-236.
- [72] Hunter, M.J. ve Ludwig, M.L., (1962). "The Reaction of Imidoesters with Proteins and Related Small Molecules", *J. Am. Chem. Soc.*, 84 (18), pp 3491–3504.
- [73] Elçioğlu, H.K. ve Sezer, A.D., (2014). "Nanoparticle Insulin Drug Delivery — Applications and New Aspects". In: *Application of Nanotechnology in Drug Delivery*, Edited by Ali Demir Sezer, ISBN 978-953-51-1628-8, 552 pages, Publisher: InTech, 2014.

- [74] Gentile, P., Chiono, V., Carmagnola, I., ve Hatton, PV., (2014). "An Overview of Poly(lactic-co-glycolic) Acid (PLGA)-Based Biomaterials for Bone Tissue Engineering", *Int. J. Mol. Sci.*, 15(3), 3640-3659.
- [75] Danhier, F., Ansorena, E., Silva, J.M., Coco, R., Le Breton, A. ve Préat, V., (2012). "PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications", *J Control Release* 161(2):505-22.
- [76] Astete, C.E. ve Sabliov, CM., (2006). "Synthesis and Characterization of PLGA Nanoparticles", *J Biomater Sci Polym Ed.*, 17(3):247-89.
- [77] Fonte, P., Soares, S., Costa, A., Andrade, JC., Seabra, V., Reis, S., ve Sarmiento, B., (2012). "Effect of Cryoprotectants on the Porosity and Stability of Insulin-Loaded PLGA Nanoparticles After Freezedrying", *Biomater* 2:4, 329–339.
- [78] Liu, J., Zhang, M., Chen, PP., Cheng, L., Zhou, W., Tang, WX., Chen, ZW., ve Ke, CM., (2007). "Controlled Release of Insulin From PLGA Nanoparticles Embedded within PVA Hydrogels", *J Master Sci: Mater Med* 18: 2205-2210.
- [79] Jorgensen, L., ve Nielsen, HM., (2009). "Delivery Technologies for Biopharmaceuticals, Peptides, Proteins, Nucleic Acids and Vaccines", Wiley& Sons, UK.
- [80] Oruç, H., (2006). "Mitotoksinler ve Tanı Yöntemleri ", *Uludag Univ. J. Fac. Vet. Med*, 1-2-3-4: 105-11.
- [81] Ünlüsayın, M. vd., (2009). "Balık Proteinlerinin Saflaştırılmasında Kullanılan Son Yöntemler", *Journal of Fisheries Sciences*, 3(4): 298-309.
- [82] Albani, J.R., (2007). *Principles and Applications of Fluorescence Spectroscopy*, Wiley-Blackwell, West Sussex, UK.
- [83] State University of New York at Oswego, Fluorescence Spectroscopy, [http://www.oswego.edu/~kadima/CHE425/CHE425L/FLUORESCENCE SPECTROSCOPY 08.pdf](http://www.oswego.edu/~kadima/CHE425/CHE425L/FLUORESCENCE%20SPECTROSCOPY%2008.pdf), 20 Mayıs 2014
- [84] The Full Wiki, Spectrofluorometer, <http://www.thefullwiki.org/Spectrofluorometer>, 25 Mayıs 2013.
- [85] Gittings, M.R. and Saville, D.A., (1998). "The Determination of Hydrodynamic Size and Zeta Potential from Electrophoretic Mobility and Light Scattering Measurements", *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 141: 1, 111–117
- [86] Gündüz, T., (1999). *İnstrümental Analiz*, Beşinci baskı, Gazi Kitabevi, Ankara.
- [87] Michigan State University Department of Chemistry, Visible and Ultraviolet Spectroscopy, <http://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/VirtTxtJml/Spectrpy/UV-Vis/spectrum.htm>, 23 Mayıs 2011.
- [88] Tekin, N., (2003). "Measurement Of The Spectroscopic Properties Of Benzoic Acid-Solvent Systems By UV-Spectrophotometer", *BAÜ Fen Bil. Enst. Dergisi*, 5.2 : 55-56.

- [89] Skoog, D.A, Holler, F.J, Nieman, T.A., (1998). "Principles of Instrumental Analysis", 5th Edition. Kılıç. E., Köseoğlu, F.,Yılmaz, H. (çeviri ed), Bilim Yayıncılık, Ankara,. 850.
- [90] Erdik, E., (1993). "Kırmızı ötesi (İnfrared) Spektroskopisi", s: 82-182. Organik Kimyada Spektroskopik Yöntemler, Gazi Büro Kitabevi, Ankara.
- [91] Triampo, D. and Triampo, W., (2009). "The Working of the Atomic Force Microscope for Chemical Mapping", The Open Materials Science Journal, 3, 50-55.
- [92] Rao, J.P., and Geckeler, K.E., (2011). "Polymer nanoparticles: Preparation Techniques and Size Control Parameters", Progress in Polymer Science, 36, 887-913.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Özlem HORZUM BAYIR
Doğum Tarihi ve Yeri : Denizli / 01.01.1989
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : ozlmhrzm@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lisans	Biyomühendislik	Yıldız Teknik Üniversitesi	2011
Lise	Fen Bilimleri	Nazilli Anadolu Lisesi	2007

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2013-	Mia Medikal Tıbbi Ürünler San. ve Tic. Ltd. Şti	Ar-Ge Mühendisi
2012-2013	Occlutech Tıbbi Ürünler San. ve Tic. Ltd. Şti.	Ar-Ge Asistanı

YAYINLARI

Bildiri

1. Budama Kılınç, Y., Horzum Bayır, Ö., Mustafaeva, Z., “Formation of Controlled Drug Delivery Systems with Insulin”, The First Int Bioengineering Conference (BIOENG’14), 132, 2014, İstanbul.

Proje

2. İnsülin ile Kimyasal Kontrollü İlaç Salınım Sistemlerinin Oluşturulması, Y.T.Ü. Araştırma Fonu GEP Projesi, 2013-07-04-GEP03 numaralı