

**GIDA TAKVİYESİ TABLET FORMÜLASYONLARINDA
KULLANILMAK ÜZERE KİTRE ZAMKI TEMELLİ
TAŞIYICILARININ GELİŞTİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MÜGE AŞIK UĞURLU

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI**

**MERSİN
TEMMUZ- 2019**

**GIDA TAKVİYESİ TABLET FORMÜLASYONLARINDA
KULLANILMAK ÜZERE KİTRE ZAMKI TEMELLİ
TAŞIYICILARININ GELİŞTİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MÜGE AŞIK UĞURLU

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**


**KİMYA MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI**

**Danışman
Doç. Dr. Rûkan GENÇ ALTÜRK**

**MERSİN
TEMMUZ - 2019**

ONAY

Müge AŞIK UĞURLU tarafından Doç. Dr. Rukan GENÇ ALTÜRK danışmanlığında hazırlanan "Gıda Takviyesi Tablet Formülasyonlarında Kullanılmak Üzere Kitre Zamkı Temelli Taşıyıcılarının Geliştirilmesi" başlıklı çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından 12/07/2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavı sonucunda oy birliği/çokluğu ile Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Görevi	Ünvanı, Adı ve Soyadı	İmza
Başkan	Prof. Dr. Erdal BEDİR	
Üye	Doç. Dr. Rukan GENÇ ALTÜRK	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi ONUR DÖKER	

Yukarıdaki Jüri kararı Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 08/08/2019 tarih ve 2019.31/1167 sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, tablo ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

ETİK BEYAN

Mersin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğinde belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
 - Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlâk kurallarına uygun olarak sunduğumu,
 - Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
 - Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak kullandığımı,
 - Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
 - Bu tezin herhangi bir bölümünü Mersin Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,
 - Tezin tüm telif haklarını Mersin Üniversitesi'ne devrettiğimi
- beyan ederim.

ETHICAL DECLARATION

This thesis is prepared in accordance with the rules specified in Mersin University Graduate Education Regulation and I declare to comply with the following conditions:

- I have obtained all the information and the documents of the thesis in accordance with the academic rules.
- I presented all the visual, auditory and written informations and results in accordance with scientific ethics.
- I refer in accordance with the norms of scientific works about the case of exploitation of others' works.
- I used all of the referred works as the references.
- I did not do any tampering in the used data.
- I did not present any part of this thesis as an another thesis at Mersin University or another university.
- I transfer all copyrights of this thesis to the Mersin University.

12./07/2019

İmza / Signature

Öğrenci Adı ve Soyadı / Student Name and Surname

Müge ASIK UĞURLU

ÖZET

Bu yüksek lisans tezinde, in vivo ve in vitro' da bağışıklık sistemi aktivatörü olduğu kanıtlanan bir saponin türevi Astragalosit-VII (AST-VII) etken maddesinin biyoyararlanımını arttıracak ve gıda takviyesi tablet formülasyonlarında kullanılacak bir nanotaşıyıcı sistemin üretilmesi amaçlanmıştır. Astragalus bitkisi kökenli kitre zamkı (KZ) temelli nanotaşıyıcının üretiminde, saponinler ile kolesterol arasındaki etkileşim kullanılmış ve nanoboyutta üç bileşenin agregasyonu içeren bir yöntem geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaç doğrultusunda, KZ konsantrasyonu, kolestrol / kitre zamkı hacim oranı, sonikasyon basamağı ve sonikasyon süresi, tampon çözelti türü ve pH gibi parametrelerin nanotaşıyıcı çapı ve dağılımı üzerindeki etkileri incelenmiştir. Elde edilen bulgular doğrultusunda laboratuvar ölçeğinde 50-80 nm arasında hidrodinamik çapa sahip oldukça homojen, %11,85 oranında AST-VII içeren KZ/Kolesterol nanotaşıyıcıları başarı ile elde edilmiş ve optimize edilen üretim süreci daha sonra orta ölçeğe taşınmıştır. Elde edilen malzemenin kurutulması aşaması, vakumlu etüv (60°C), liyoflizasyon ve sprey (püskürtmeli) kurutma teknikleri ile gerçekleştirilmiş ve bu teknikler parçacık çapı ve bütünlüğü üzerindeki etkileri açısından karşılaştırılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kitre Zamkı, Astragalosit VII, Astragalus, Polisakarit Nanotaşıyıcılar, Gıda takviyeleri.

Danışman: Doç. Dr. Rükân GENÇ ALTÜRK, Mersin Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Mersin.

ABSTRACT

The purpose of this master's thesis is to produce a nanocarrier system for improving the bioavailability of Astragaloside-VII (AST-VII), a saponine derivative shown to be immune activator, for its further use in food supplement tablet formulations. The interaction between saponins and cholesterol has been used in the production of nanocarrier mainly based on the Gum Tragachant (TG) that was produced from astragalus plant. To do so, development of a method involving aggregation of these three components in nanoscale was aimed. Effect of many different parameters including TG concentration, cholesterol / gum volume ratio, sonication step and sonication time, buffer solution type and pH on nanocarrier diameter and distribution were investigated. Following the obtained results, highly homogeneous TG/ Cholesterol based nanocarriers with hydrodynamic diameter of 50-80 nm and 11.85% AST-VII content were successfully obtained at laboratory scale, the optimized production process was then applied to medium-scale production. Drying of the obtained material was carried out by different techniques (vacuum dryer (65°C), lyophilization and spray drying techniques) and each technique was discussed by their effect on the nanoparticle size and integrity.

Keywords: Gum tragacanth, Astragaloside-VII, Astragalus, Polysaccharide based Nanocarriers, Food supplements.

Advisor: Assoc. Prof. Rükân GENÇ ALTÜRK, Department of Chemical Engineering, University of Mersin, Mersin.

TEŞEKKÜR

Sunduđum bu yüksek lisans tezi, TÜBİTAK (Proje numarası: 116Z958) tarafından desteklenmiŐ olup, Doç Dr. Rkan GENÇ ALTÜRK danışmanlığında gerçekteŐirilmiŐtir. Bu teze finansal katkılarında dolay TÜBİTAK' a teŐekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans süreci boyunca bana yol gösteren, tecrübelerini ve bilgilerini her daim paylaŐan, her türlü sorunumda desteğini esirgemeyen, daima yanımda hissettiğim ve kendimi her zaman Őanslı hissettiren değerli danıŐmanım Doç. Dr. Rkan GENÇ ALTÜRK' e emeği, desteği ve bana olan güveni için sonsuz teşekkür ederim. Ayrıca deneysel çalıŐmalarım boyunca fikirleri ile destek olan ve değerli bilgileriyle beni yönlendiren Prof. Dr. Erdal BEDİR' e yol göstericiliği ve paylaŐımları için teŐekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans süreci boyunca katkı ve yardımlarında dolay Fonksiyonel Nanomalzemeler Araştırma Grubumuzun her bir üyesine teŐekkürlerimi sunarım.

Son olarak tüm eğitim hayatım boyunca bana maddi ve manevi destek ve yardımlarını esirgemeyen, her zaman yanımda hissettiğim aileme; annem Gülay AŞIK' a, babam mit AŞIK' a ve ablam Gaye AŞIK' a sonsuz teŐekkürlerimi sunarım.

Her zaman yanımda olan, tecrübelerini ve bilgilerini benimle her zaman paylaŐan, sevgisini ve desteğini her zaman hissettiğim sevgili eŐim Mustafa UğURLU' ya tezime katkıları için sonsuz teŐekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK	i
ONAY	ii
ETİK BEYAN	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
KISALTMALAR ve SİMGELER	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Kitre Zamkı ve Astragalosit VII	2
1.2. İlaç Taşıyıcı Sistemler	4
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI	7
3. MATERYAL ve YÖNTEM	20
3.1. Materyal	20
3.2. Yöntem	20
3.2.1. Kitre Zamkının Ön İşlenmesi	20
3.2.2. KZ' nin İzoelektrik Noktasının Belirlenmesi	21
3.2.3. KZ Nanoparçacıkların Kritik Agregasyon Konsantrasyonu (KAK)	21
3.2.4. Sonikasyon Süresinin KZ Nanoparçacıkların Morfolojik Yapısı Üzerine Etkisi	21
3.2.5. KZ Nanoparçacıkların morfolojik özelliklerinin TEM ve SEM Cihazları ile Analizi	22
3.2.6. Elde Edilen KZ Nanoparçacıklara AST-VII Entegrasyonu	22
3.2.7. Kolesterol miktarının KZ Nanoparçacıklarının Oluşumu Üzerine Etkisi	22
3.2.8. Tampon Çözeltilerin Farklı Kolesterol Oranlarında ASTCOLNP' lerin Çapı ve Parçacık Yüzey Yükü Açısından Karşılaştırılması	23
3.2.9. Tampon Çözeltilerin Farklı Kolesterol Oranlarında ASTCOLNP' lerin İç Polaritesi Üzerindeki Etkisi	24
3.2.10. Orta Ölçekte ASTCOLNP' lerin Üretim Çalışmaları	24
3.2.10.1. 1 L Toplam Hacimde Üretim	24
3.2.10.2. 4 L-20 L Toplam Hacimde Üretim	25
3.2.11. Nanokürelerin Kurutulması	27
3.2.12. HPLC Analizi Nanoformülasyonun İhtiva Ettiği AST-VII Miktarının Belirlenmesi	28
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	30
4.1. KZ' nin İzoelektrik Noktasının Belirlenmesi	30
4.2. Kritik Agregasyon Konsantrasyonu (KAK)	31
4.3. Sonikasyon Süresinin KZ Nanoparçacıklarının Oluşumu Üzerine Etkisi	32
4.4. Elde Edilen KZ Nanoparçacıkların Görüntülenmesi ve Sulu Ortamdaki Stabiliteleri	33
4.5. Elde Edilen KZ Nanoparçacıkların Kurutulması	34
4.6. Elde Edilen KZ Nanoparçacıklara AST-VII Entegrasyonu	35
4.7. Kolesterol Varlığında Ast-VII Entegrasyonunun İncelenmesi	36
4.7.1. Tampon Çözeltilerin Farklı Kolesterol Oranlarında ASTCOLNP' lerin iç polaritesi üzerindeki etkisi	36
4.7.2. Tampon Çözeltilerin Farklı Kolesterol Oranlarında NP Çapı ve Parçacık Yüzey Yükü Açısından Karşılaştırılması	37
4.7.3. Değişen pH' larda HEPES İçerisinde Hazırlanan Nanotaşıyıcıların Hidrodinamik Çap (Rh) Ve Yüzey Net Yüklerindeki Değişimlerin Değerlendirilmesi	39
4.7.4. ASTCOLNP' lerin Sonikasyon Süresinin Değerlendirilmesi	40
4.8. Orta Ölçekte Üretimin Optimizasyonu	42
	viii

	Sayfa
4.8.1. Etap I: 1.5 L Toplam Hacim	42
4.8.2. Etap II: 4 L Toplam Hacim	43
4.9. Nanokürelerin Kurutulması	46
4.9.1. Nanoformülasyonun İhtiva Ettiği AST-VII Miktarının Belirlenmesi	47
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	49
KAYNAKLAR	50
ÖZGEÇMİŞ	53



TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. Ghayempour ve arkadaşlarının hazırlamış oldukları TGNC' lerin kodlanması.	14
Tablo 3.1. Farklı kolestrol miktarlarında hazırlanan çözeltiler.	23
Tablo 3.2. HPLC analiz metodu.	29
Tablo 4.1. İzoelektrik nokta ilk ve son pH değerleri.	30
Tablo 4.2. 65°C' de farklı sonikasyon sürelerinin hidrodinamik çap, PDI ve zeta potansiyel değerleri. (*)PDI<0,5 homojen nanoparçacık koloidal çözeltiliklerini göstermektedir.	41
Tablo 4.3. Orta ölçek üretiminden elde edilen nanoformülasyonun farklı yöntemlerle kurutulması sonrası hidrodinamik çap, polidispersite indeksi ve net yüzey yükleri.	47

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1. Doğal Sakızlar	1
Şekil 1.2. Kitre zambının kimyasal yapısı	3
Şekil 1.3. Astragalosit VII (a) ve Makrofilosaponin B. (b) saponinlerinin kimyasal yapısı	4
Şekil 1.4. Viral dış kabuğunun bir deterjan tarafından parçalanmasının şematik gösterimi, böylece bir protein-deterjan kompleksi salınır. Deterjanın alınmasıyla, kolesterol, fosfolipid ve Quillaja saponin varlığında, amfipatik proteinler, simetrik ve küresel olarak birleştirilir	6
Şekil 2.1. GT-bazlı hidrojenlerin sentezi için şematik gösterim	8
Şekil 2.2. Farklı çapraz bağlayıcı (glutaraldehit) oranlarının zamana göre sodyum aljinat / kitre zambı (80:20) ilaç yüklü hidrojel membranlarının % şişmesinin değişimi	8
Şekil 2.3. İlaç yüklü olmayan membranlar (a ve b) ve ilaç yüklü membranların taramalı elektron mikroskopi (SEM) fotoğrafları	9
Şekil 2.4. pH 7.4 tampon çözeltisinde (a) Farklı miktarda TG içeren sodyum aljinat / kitre zambı (TG) karışımından VPL' nin kümülatif olarak salınım yüzdesi: (◇)%30 TG, (◆)%20 TG, (△)%10 TG ve (▲)%0 TG (b) Farklı miktarlarda VPL içeren SA / TG karışımı hidrojel membranlardan VPL kümülatif salımı: (○) %30 VPL, (▲) %20 VPL, (△)%10 VPL (c) Farklı miktarlarda çapraz bağlayıcı içeren SA / TG karışımından VPL salımı yüzdesi: (▲) 2 mL GA, (■) 3 mL GA ve (◆) 4 mL GA.	10
Şekil 2.5. CP yüklü TG-LC nanojelin tasarımı, özellikleri ve şematik gösterimi ve TG-LC' nin değişen konsantrasyonlarda (a), %1.2 (b), %5.2 (c) ve %8.5 (d) CP yüklemelerindeki TEM görüntüleri	11
Şekil 2.6. Farklı pHlarda (pH 2 ve 7.4) PBS içerisinde TG-LC-CP' den (%5.2 CP) CP salınımı	12
Şekil 2.7. Farklı parametrelerin kitre zambı graft yüzdesi (Pg) üzerine optimizasyonu. Çapraz bağlayıcı (a) başlatıcı (b)	12
Şekil 2.8. (a) Zamanın ve (b) sıcaklığın şişme yüzdesine (Ps) etkisi	13
Şekil 2.9. TGNC nanokapsüllerinin oluşum şeması	14
Şekil 2.10. (a) çapraz bağlama maddesi konsantrasyonunun, (b) TG konsantrasyonunun, (c) emülgatör konsantrasyonunun ve (d) işlem süresinin TGNC' lerin büyüklüğü üzerindeki etkisi	15
Şekil 2.11. Hazırlanan TGNC' lerin optimum koşullarda FESEM görüntüleri. (a) TGNC / UA, (b) TGNC / UC, (c) TGNC / MA ve (d) TGNC / MC	16
Şekil 2.12. Yağ salımından önce (a) ve sonra (b) mikrokapsüllerin mikrofotografaları. (30 dakika 6 mL GA ile muamele edilirken, 500 dev/dk' da homojenleştirici ile karıştırıldı)	16
Şekil 2.13. Optik mikroskopi (Sırayla 20x, 40x) ile elde edilen çekirdek madde olarak kurutulmuş su ekstraktının basit emülsiyonunun mikrografisi (a,b); Optik mikroskopi (Sırayla 20x, 40x) ile elde edilen çift emülsiyon işleminin mikrografisi (c,d); Optik mikroskopi (Sırayla 20x, 40x) ile elde edilen koaservasyon işlemi ile elde edilen mikro kapsülünün (dondurularak kurutmadan önce) mikrografisi	17
Şekil 2.14. Tamoksifen Sitrat yüklü Guar zambı nanoküreleri SEM mikrografisi (a) 7.66 kX ve (b) 18.66 kX	18
Şekil 2.15. ACG nanoparçacıkların IND içermeyen (A) ve içeren (B) parçacık hidrodinamik çap dağılımı	18
Şekil 2.16. IND ile yüklü ACG nanoparçacıkların in vitro ilaç salım profili	19
Şekil 3.1. KZ' nin ham hali ve öğütülerek toz haline getirilmiş halinin görüntüsü: (a) KZ' nin ham hali, (b) KZ' nin toz hali.	20
Şekil 3.2. KZ çözeltisinin karıştırıcıda karıştırılması.	25

	Sayfa
Şekil 3.3. Orta ölçekte ASTCOLNP çözeltisinin yapımı.	25
Şekil 3.4. Toz KZ' nin homojenizatör varlığında elek yarımı ile üretim tankına eklenmesi.	26
Şekil 3.5. Liyofilizasyon tekniği ile kurutulan numuneler.	27
Şekil 3.6. Sprey kurutucu cihazı	28
Şekil 3.7. 2 ve 6 kat konsantre 4 l' lik üretimin püskürtmeli kurutucuda kurutulması.	28
Şekil 4.1. KZ' nin izoelektrik noktası (a), KZ nanoparçacıklarının hidrodinamik çaplarının pH ile değişimi (b).	31
Şekil 4.2. (a) TG' nin konsantrasyona göre jelleşmesini gösterir şekil ve (b) bu konsantrasyonlardaki hidrodinamik çapları (Rh).	31
Şekil 4.3. Kritik misel konsantrasyonunu açıklayan şekil.	32
Şekil 4.4. NR' nin KZ çözeltisinin değişik konsantrasyonlardaki floresans şiddetine bağlı absorbans pH 5.5 ve 25 °C' deki değerleri (a). NR' nin KZ çözeltisinin değişik konsantrasyonlardaki sonikasyon süresine bağlı absorbans değerleri (b).	33
Şekil 4.5. KZ nanokürelerinin değişen büyütmelerdeki TEM mikrografisi.	33
Şekil 4.6. Nanokapsüllerin asidik pH 3' de bozduğunu gösterir TEM görüntüleri.	34
Şekil 4.7. (a) KZ nanoyapısı ve (b) nanoyapıların vakumlu etüvde kurutulduktan sonraki 250 kX HRSEM görüntüleri.	34
Şekil 4.8. Liyofilizasyon sonrası elde edilen nanokürelerin oluşturduğu A. Süngerimsi yapı ve KZ nanokürelerinin farklı büyütmelerde çekilmiş HRSEM görüntüleri b. 100kX ve c. 200kX.	35
Şekil 4.9. AST-VII içeren nanokapsüllerin oluşumuna etkisini gösterir TEM görüntüsü.	35
Şekil 4.10. Su içerisinde hazırlanmış ASTCOLNP' lerin (a) ortalama hidrodinamik çap dağılımları ve(b) buna karşı gelen yüzey yüklerindeki 65°C ve 60 dk sonikasyondan sonraki değişimleri.	36
Şekil 4.11. Farklı tampon çözeltilerinde hazırlanan nanotaşıyıcılara NR hapsedildikten sonra ölçülen floresans şiddetlerinin karşılaştırılması.	37
Şekil 4.12. HEPES içerisinde hazırlanmış ASTCOLNP' lerin (a) ortalama hidrodinamik çap dağılımları ve (b) buna karşı gelen yüzey yüklerindeki değişimler (65°C).	38
Şekil 4.13. MES içerisinde hazırlanmış ASTCOLNP' lerin (a) ortalama hidrodinamik çap dağılımları ve (b) buna karşı gelen yüzey yüklerindeki değişimler (65°C).	38
Şekil 4.14. PBS içerisinde hazırlanmış ASTCOLNP' lerin (a) ortalama hidrodinamik çap dağılımları ve (b) buna karşı gelen yüzey yüklerindeki değişimler (65°C).	39
Şekil 4.15. Farklı kolesterol konsantrasyonlarında HEPES içerisinde hazırlanmış parçacıkların 24 saat sonrasına ait dijital görüntüleri. %50 kolesterol oranı geçildiğinde, bekletilen örneklerde çökmeler gözlenmiştir.	39
Şekil 4.16. HEPES içerisinde %25 kolestrol oranı ile hazırlanmış parçacıkların pH 3' de, izoelektrik nokta 5.5' da ve pH 7' de ortalama (a) hidrodinamik çap dağılımları ve (b) buna karşı gelen yüzey yükleri.	40
Şekil 4.17. HEPES içerisinde hazırlanan ASTCOLNP' lerin 30 dakika sonikasyon süresindeki TEM mikrografisi (40kX (a) 200kX (b) 250kX (c)).	41
Şekil 4.18. HEPES içerisinde hazırlanan ASTCOLNP' lerin 60 dakika sonikasyon süresindeki TEM mikrografisi (30kX(a) 100 kX(b) 250kX (c)).	41
Şekil 4.19. HEPES içerisinde hazırlanan ASTCOLNP' lerin 120 dakika sonikasyon süresindeki TEM mikrografisi (50kX(a) 60 kX(b)).	42
Şekil 4.20. ASTCOLNP' lerin orta ölçek büyütme TEM görüntüleri. 25 kX (a) 15 kX (b) 100 kX (c).	42
Şekil 4.21. Orta ölçekte elde edilen ASTCOLNP' lerin kurutma öncesi ve sonrası hidrodinamik çaplarındaki değişimi gösterir grafik.	43
Şekil 4.22. Doğrudan ölçek büyütme işlemiyle 20 L üretimde elde edilen nanoparçacıkların parçacık boyut dağılımı (Her renk farklı bir ölçümü göstermektedir).	44

	Sayfa
Şekil 4.23. 4 L' lik üretimde AST VII-Kol-KZ nanoformülasyonunun sıvı formu.	44
Şekil 4.24. (a) Filtre kullanılmadan ve (b) 0.4 µm filtreden geçirildikten sonra 20 L' lik üretimdeki AST VII-Kol-KZ formülasyonuna ait parçacık boyut dağılımı.	45
Şekil 4.25. 20 L' lik üretimdeki AST VII-Kol-KZ formülasyonuna ait TEM fotoğrafı.	45
Şekil 4.26. Püskürtme ile kurutma yöntemi ile farklı ön-yoğuşturmalarda elde edilmiş kuru nanoformülasyonun görüntüsü: YPK-2 (a) ve YPK-6 (b).	46
Şekil 4.27. YPK-2 örneğine ait CAD ve DAD-205 nm kromatogramları.	47
Şekil 4.28. YPK-6 örneğine ait CAD ve DAD-205 nm kromatogramları.	48



KISALTMALAR ve SİMGELER

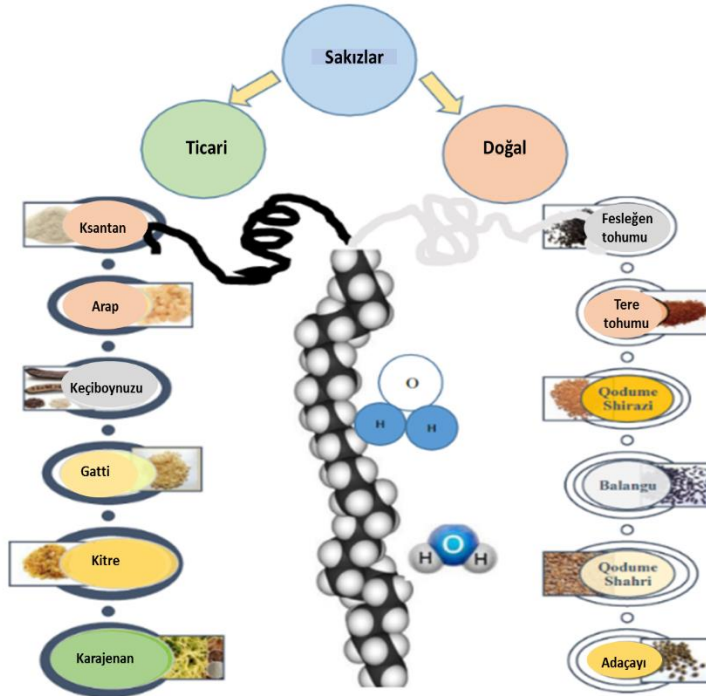
Kısaltma/Simgesi	Tanım
ANC	Antosiyanin
APTES	Aminopropiltrioksolan
ASTCOLNP	AST VII yüklü kolesterol içeren TG nanoparçacıklar
AST VII	Astragalosit VII
CP	Sisplatin
Dev/dk	Devir/Dakika
DLS	Dinamik ışık saçılımı
EtOH	Etanol
Exc	Uyarım
Em	Emisyon
FE-SEM	Alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu
FT-IR	Fourier dönüşümlü kızıl ötesi ve raman spektrometresi
FTS	Fesleğen tohumu sakızı
GA	Gluteraldehit
GDE	Gliserol diglisidil eter
GO	Grafen oksit
HCl	Hidroklorik asit
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazineetansulfonik asit
HR-TEM	Yüksek çözünürlüklü geçirimli elektron mikroskobu
IND	Indomethacin
kDa	Kilodalton
kg	Kilogram
KAK	Kritik agregasyon konsantrasyonu
kHz	Kilohertz
KNO ₃	Potasyum nitrat
Kol	Kolesterol
KZ	Kitre zamkı
LC	Lesitin
Mac B	Macrophyllsaponin B
MBA	Metilen-bis-akrilamid
MeOH	Metanol
MES	2-(N-morpholino)ethanesulfonik asit
mg	Miligram
mL	Mililitre
nm	Nanometre
NaOH	Sodyum hidroksit
NP	Nanopartikül
NR	Nile Red
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PDI	Polidispersite
PVA	Polivinil alkol
Rh	Hidrodinamik çap
RIV	Rivastigmin
SA	Sitrik asit
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
TC	Tamoksifen sitrat
TEM	Geçirimli elektron mikroskobu
TGA	Termogravimetrik analiz
UV-Vis Spektrofotometre	Ultraviyole ve görünür ışık absorpsiyon spektroskopisi

Kısaltma/Simge	Tanım
XRD	X-Ray difraktometre
W	Watt
μm	Mikrometre
μL	Mikrolitre



1. GİRİŞ

Doğal polimerik malzemeler üzerindeki araştırmalar son zamanlarda artan bir ilgiye tanık olmuştur. Biyopolimerler veya doğal polimerler biyolojik olarak ayrışabilen polimerlerin çekici bir sınıfı haline gelmiştir. Hem sentetik hem de doğal polimerler mevcuttur, ancak doğal malzemelerin kullanımı, sentetik uygulamalar üzerinde avantajlara sahiptir. Doğal polimerler farmasötik uygulamalar için toksik değildir, ilaç dağıtım sistemleri için maliyeti daha düşüktür, kolayca temin edilebilir, biyolojik olarak parçalanabilir ve uygun reaktiflerle modifiye edilebilir malzemelerdir. Ayrıca birkaç istisna ile birlikte biyolojik olarak uyumlu olan kimyasal değişiklikler de yapılabilirler [1,2]. Polisakkaritler genel olarak, biyolojik olarak uyumlu ve biyobozunabilir olmalarından dolayı özellikle doku mühendisliği ve ilaç sanayi uygulanabilirlikleri açısından büyük ilgi görmektedirler [3].



Şekil 1.1. Doğal Sakızlar [4].

Doğal sakızlar, yeşil, ekonomik ve kolayca bulunabilen ve bitkilerde doğal olarak oluşabilen polimerlerdir (Şekil 1.1.) [5]. Biyopolimerlerin bir sınıfı olan sakızlar, bitkilerden elde edilebilen doğal bir polimer olduğu için, canlı biyolojisi için zararsız bir malzemedir [6]. Doğal sakızlar, genellikle dallanmış polimerlerdir. Sakızların, malzeme bağlayıcı, ilaç salım sistemleri, kaplamalar veya viskozite arttırıcı, stabilizatör, parçalayıcı, çözücü, emülgatör, askıya alma ajanı, jelleştirici madde ve biyoyapışkan gibi farklı fonksiyonları bulunmaktadır [7]. Doğal sakızlar, ilaç salım sistemlerinde kullanılmak üzere modifiye edilebilir ve piyasada bulunan sentetik

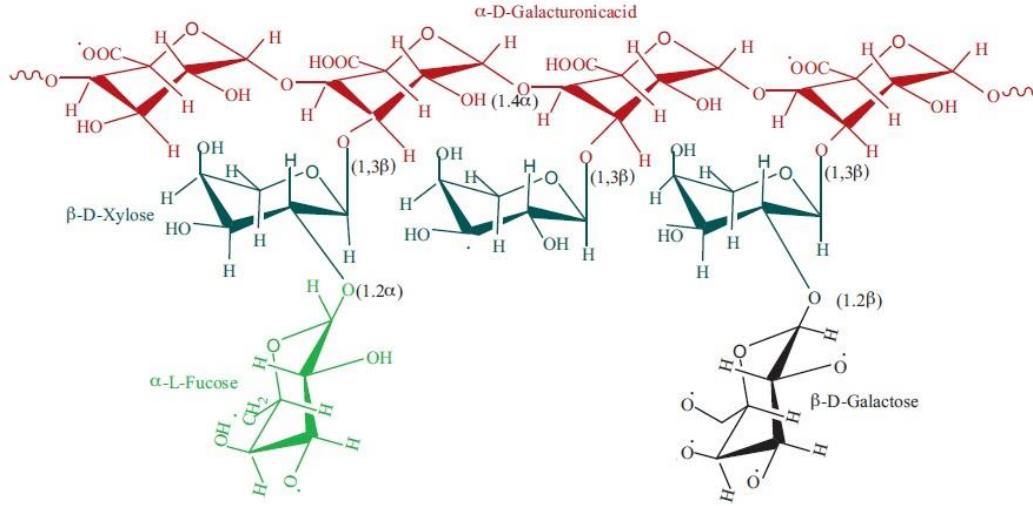
polimerler ile rekabet edebilmektedir. Doğal zamklar, büyük moleküller oluşturmak için birbirine bağlı çoklu şeker birimlerinden oluşan polisakaritlerdir. Sakızlar, doğada bitkilerde doku yaralanmaları sonrası yaralanan bölgenin korunması için üretilirler [8].

1.1. Kitre Zamkı ve Astragalosit VII

Asya' daki Astragalus türlerinin gövdelerinden ve dallarından elde edilen kurutulmuş bir bitki özütü olan kitre zamkı, polimer ile yüksek oranda dallanmış, heterojen hidrofilik karbonhidrat olan doğal bir polisakarittir [9, 10] (Şekil 1.2.). Ayrıca, gıda ürünlerinde dengeleyici, emülgatör, koyulaştırıcı olarak yoğun kullanımları, film kaplama ajanları, implantlar, hidrojeller, mikroküreler, dağıtıcı, süspanse edici ajanlar, emülsifiye edici ajan, matris kontrollü sistem ve bağlayıcı olarak ilaç salımında sayısız uygulamaya sahiptir [2, 11-13]. *Papilionaceae* familyasına ait dünyada yaklaşık 2.500 tür içeren Astragalus cinsi ağırlıklı olarak Yakın Doğu ve Orta Doğu' da yayılmıştır ve Kitre zamkı üreten türler dünyanın birçok ılıman bölgesinde ve hatta Afrika' nın orta kesimlerinde gelişmiştir. Ticari sakız kaynağı olan Asya *Astragalus* türleri, Küçük Asya ülkelerine özgüdür (İran, Türkiye, Irak, Suriye, Lübnan, Afganistan ve Rusya' nın bazı bölgeleri). Suya ihtiyaç duysalar da genellikle daha kuru dağlık bölgelerde bulunurlar. *A. echidnaeformis* Sirjaev, *A. gossypinus* Fisch., *A. kurdicus* Boiss ve *A. versus* gibi bazı türler genellikle kitre zamkının kaynağı olarak belirtilir. Daha iyi sakız veren türler küçük, alçak ve gürdür, genellikle yastık benzeri bir formda bulunur ve çok yıllık bitkilerdir. Bunların arasında *A. gossypinus*, yüksek kalitede sakız üreten 8-12 cm yüksekliğinde alçak, yaygın ve gür bir çalıdır ve bitki örtüsünün en karakteristik özelliklerinden birini oluşturur. Kitre, *Astragalus* cinsinin çeşitli türlerinden kurutulmuş saplarından elde edilen doğal bir zamktır. Türlerinin verimi, kesildiğinde düz, şerit şeklinde parçalar veya delindiğinde solucansı yırtıklar oluşturmasıyla anlaşılır. Tahran' daki bitkilerden elde edilen Kitre zamkı (Gum Tragachant), büyük oranda kullanılan en iyi ticari kaliteye sahip tipik temiz beyaz şeritlerdedir ve genellikle tıpta ve şekerlemelerde kullanılır. Sakız dışarı çıktıkça kurur ve hızla toplanır. Kaba görünüm ve dokuyu tanımlayabilen Yunancada “Tragos” ve “Akantha”, sırasıyla “keçi boynuzu” anlamına gelen “Tragacanth” kelimesinin türetildiği söylenir.

Kitre Zamkı (KZ), iki ana bileşenden oluşur: Bu, bassorin denilen çözünmez fakat suda şişebilen bir fraksiyondan ve tragaksantin adlı bir suda çözünür fraksiyondur [14]. KZ suda neredeyse çözünmez, ancak yapısından dolayı sert bir jel oluşturmak için şişer. Bu bölümlerin yüzdesi, yapısal özelliklerle sonuçlanan çeşitliliğe ve ayrıca gıda sistemleri için farklı işlevsellik ve uygulamalara bağlıdır [15,16]. KZ' nin moleküler ağırlığı yüksektir ve yaklaşık 840 kDa' dır. Küçük oranlarda protein (% 4' ten az) ve az miktarda nişasta ve selülozik madde içeren, karmaşık, hafif asitli bir polisakarittir. Asit hidrolizinden sonra, kitre zamkı genellikle D-galakturonik asit,

D-galaktoz, L-fukoz (6-deoksi-Lgalaktoz), D-ksiloz, L-arabinoz, L-rhamnozun şekerlerini üretir. Her şekerin tam oranı farklı türler arasında ve farklı yerlerden elde edilen KZ' ye göre değişir [9].

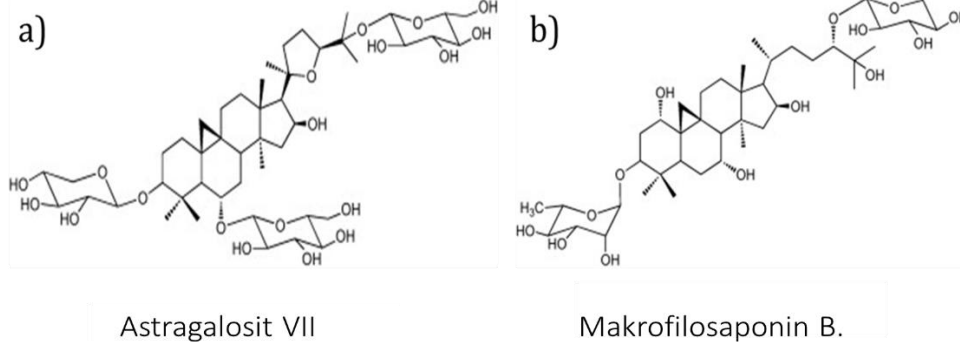


Şekil 1.2. Kitre zamkının kimyasal yapısı [17].

Doğal sakızlar ve bunların türevlerinin, ilaçların sürekli salınımında taşıyıcı olarak kullanılması için yeni gelişmeler araştırılmaktadır [18]. Doğal sakız bazlı farmasötik yardımcı maddelerin kullanımı, değişen fiziksel parametrelerde özelliklerini büyük oranda değiştirmeden, moleküler ağırlıklarını koruyabilme yeteneklerinden dolayı, kontrollü dozajda madde salınımını sağlayabilen, doğal ilaç taşıyıcı polimerler olarak önemli hale gelmişlerdir [19].

Astragalus köklerinin, biyolojik olarak aktif iki ana bileşik olan polisakkarit ve saponin sınıfından zengin olduğu bilinmektedir [20]. Astragalus saponinler, immünostimülasyon, anti-protozoal, antiviral, sitotoksik ve kardiyotonik aktiviteler dahil olmak üzere ilginç farmakolojik özellikler göstermektedir. Ayrıca, Astragalus türlerinde bulunan yaygın olarak görülen bir sikloartan-typeaponin olan Astragalosit IV' ün, nöro-koruyucu bir ajan olduğu kanıtlanmıştır ve Parkinson hastalığının tedavisinde potansiyel bir ajan olarak önerilmiştir. Astragalus saponinlerinin biyolojik aktivitesi üzerine birçok çalışma bulunmaktadır. Astragalus saponinlerinin bağışıklık sisteminin uyarılmasıyla lösemi tedavisinde etkin olabileceği gösterilmiştir. Astragalus saponinleri incelendiğinde araştırmalar, Makrofilosaponin B. nin (Mac B, Astragalus oleifolius türlerinin en aktif ana saponini) ve Astragalosit VII'nin (AST VII) (Astragalus' un en aktif bileşiği) belirgin IL-2 indükleyici aktiviteye sahip olduğunu, yani Astragalus türlerinin bağışıklığı stimüle ettiği ve anti-kanser etkilerinde katkıda bulunan bir role sahip olabileceğini göstermiştir. Geleneksel tıpta immün sistemi uyarmak amacı ile kullanıldığı

rapor edilen bitkiler rapor edilmiştir. Geleneksel Çin Tıbbı hastanelerinde kemoterapiyi desteklemek amacıyla en fazla kullanılan tıbbi droglardan biri de *Astragalus membranaceus* köküdür (Radix Astragali) ve bilimsel çalışmalar bu drogun etkinliğini doğrulamaktadır [20,21].



Şekil 1.3. Astragalosit VII (a) ve Makrofilosaponin B. (b) saponinlerinin kimyasal yapısı [20].

1.2. İlaç Taşıyıcı Sistemler

Bir ilacın yanı sıra, ilacın salım sistemi, dozajı, etkili dozajı, uygulama şekli (enjeksiyon soluma, vb.), yan etkileri, ilacın yarı ömrü, farmakokinetiği, hastanın ikna olması ve uyumu gibi önemli özellikleri de düşünülmesi gerekmektedir. Özel olarak tasarlanmış malzemeler kullanılarak, bir ilaç salım sistemindeki değişkenler daha iyi kontrol edilebilir. Böylece ilaç daha etkili ve daha güvenli olmaktadır.

Etkin madde salınımı, dozaj formu içerisinde kullanılan polimerin özellikleri ile bağlantılıdır [22]. Bu nedenle kullanılacak olan polimerin özelliklerinin, formülasyona uygunluğunun ayrıntılı olarak tetkik edilmesi gerekmektedir. Kontrollü salınım sistemlerinin temel hedefi, kan plazma konsantrasyonundaki etkin madde miktarını sabitlemektir [23]. Kontrollü ilaç salınım sistemleri; pH, iyonik kuvvetler, enzim gibi fizyolojik koşulları oluşturan faktörlerden etkilenmektedir. Tedavi edici oranda ilaç düzeyinin sürekli korunması, zararlı etkilerin azaltılması, önerilen ilaç rejimine hastanın uyumunu geliştirecek şekilde dozaj miktarının azaltılabilmesi, kısa yarılanma ömrüne sahip ilaçlar (örneğin proteinler ve peptid ilaçlar) için ilaç yönteminin kolaylaştırılması, kontrollü ilaç salımının yararlarındandır. Çeşitli bilim dallarında, özellikle sağlık alanında nanoteknoloji uygulamalarının yaygınlaşıp yeni teknolojiye sahip ilaçların geleneksel ilaçların yerini alması süreci gittikçe hızlanmaktadır. Bu süreçte; nanoteknoloji ve biyoteknoloji dalı, farmasötik endüstrilerince üretilmiş sayısız ilacın geliştirilmesine ön ayak olmaktadır [22, 23]. Etkin madde parçalanmasını ve kaybını en aza indirmek, zararlı yan etkilerini önlemek, biyoyararlanım ve etki yerlerinde bulunan oranlarını artırmak için, çeşitli etken madde salım sistemleri ve hedefleme sistemleri geliştirilmiştir [11,12].

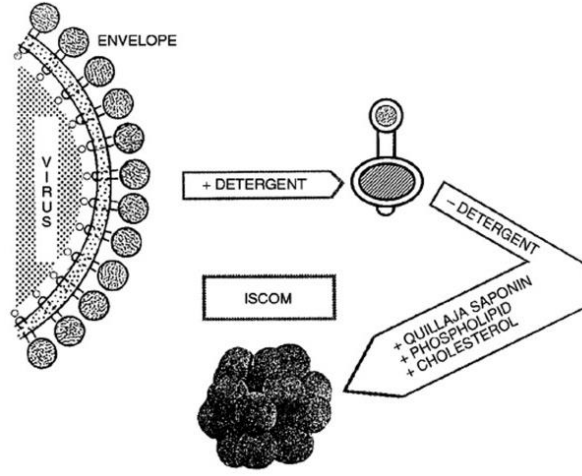
Kitre zımkı (sakızı) (KZ), toksik değildir, biyolojik sistemlere karşı uyumludur, ilaç salımı ve doku mühendisliği için uygulanabilir ve güvenlidir [3]. Polimerik nanoparçacıkların yapımında oil-emülsiyon yöntemler, sprej kurutma, çözücü faz oluşturma, çözücü uçurma, kovalent bağlama vb. birçok yöntem kullanılmaktadır. Guar zımkı, Ksantan sakızı ve Fesleğen tohumu zımkı ile yapılan nanotaşıyıcıların literatürdeki oranı oldukça fazla iken, kitre zımkından taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi üzerine yapılan çalışma sayısı ise oldukça sınırlıdır [24-29]. Kitre zımkı ayrıca, AST-VII' nin elde edildiği kök bölgesinde oldukça yoğun bulunmaktadır ve bu nedenle birlikte formülizasyonlarında, AST-VII' nin biyoyararlanımını artırma ihtimali yüksektir.

Gıda takviyesi, ilaçların biyoyararlanımı üzerinde karmaşık bir etkiye neden olabilir. Gıda takviyesi gastrointestinal hacimde artış, artan peristaltik hareketler, gastrointestinal mukozada artan perfüzyon, mide pH' sındaki değişiklikler, gastrointestinal akışkanın hacmindeki artış gibi değişiklikler yaratmaktadır. Bu değişikliklerin ilaçların farmakokinetiği ve emilimini büyük ölçüde etkileyebileceği rapor edilmiştir. Gıdalar oral yoldan alındığında, ilaçlar farklı şekillerde etkilenebilir. Örneğin, griseofulvin ve mebendazol gibi suda çözünmeyen ilaçlar, yağlı yiyeceklerin varlığında yutulduğunda biyoyararlanımı artmıştır. Bunun aksine, propranolol ve metoprolol gibi antihipertansif ve anti-aritmik ilaçlar, gıda varlığında biyoyararlanımı artırır [30].

Nanoformülasyonlar, nano skaladaki büyüklükleri sayesinde farmakokinetik engellerin önüne geçebilirler ve bu nedenle günümüzde yaygınlaşmışlardır. Nanoteknoloji tabanlı ilaç dağıtım sistemleri, örneğin nano-kristal süspansiyonları, polimerik nano partiküller, lipozomlar ve dendrimerler; ilacın etkinliği arttırmak, sistemik yan etkileri ve günlük dozaj kontrol sayısını azaltmak ve bu şekilde daha iyi hasta uyumu elde etmek için tasarlanmıştır. Moleküler optimizasyonla sınırlandırılmış olan geleneksel yaklaşımlar, günümüzde mikro ve nano büyüklükteki ilaç formülasyonların gelişimine dönüşmüştür [30].

Güney Amerika' da yetişen *Quillaja saponaria* adlı ağaçtan elde edilen saponinin aşı endüstrisinde adjuvan olarak kullanılabilmesi yapılan çeşitli araştırmalarla bildirilmiştir [31]. Quillaja saponinleri tek başına yaygın kullanılırken aynı zamanda alüminyum tuzları, lipozomlar ve su içinde yağ emülsiyonları veya amfipatik proteinlerle ve deterjan/lipid/saponin kompleksleri oluşturan lipidler aracılığıyla bağışıklık uyarıcı olarak adlandırılan kompleksler de kullanılmıştır (ISCOMlar). *Quillaja saponaria* Molina ağacının kabuğundan antijen, kolesterol, fosfolipid ve saponinlerden oluşan partiküllü bir adjuvan sistemi olan ISCOM' lar, Morein ve arkadaşları tarafından 1984' te [32] keşfedilmesinden bu yana ISCOM' lar yurtdışında çeşitli viral, bakteri veya parazit kökenli antijenlerle formüle edilmiştir. İnsan olmayan primatlar dahil olmak üzere birçok hayvan türünde antikor ve hücrel bağışıklık tepkilerini indükledikleri

gösterilmiştir. Günümüzde insanlarda, HIV, Alzhemier, Varicella zoster hastalıklarında, DNA ve diğer kanser aşıları için adjuvan olarak denenmektedir [30].



Şekil 1.4. Viral dış kabuğunun bir deterjan tarafından parçalanmasının şematik gösterimi, böylece bir protein-deterjan kompleksi salınır. Deterjanın alınmasıyla, kolesterol, fosfolipid ve *Quillaja* saponin varlığında, amfipatik proteinler, simetrik ve küresel olarak birleştirilir [33].

Bu tez çalışmasında, AST-VII yüklenmiş kitre zamkı temelli nanotaşıyıcı sistemlerin tablet formunda gıda takviye formülasyonlarında kullanılması amacı ile üretimleri için süreç geliştirme çalışmaları yapılmıştır. Bu kapsamda laboratuvar ölçeğinden (mg), pilot ölçeğe (g) üretim süreçlerinin optimizasyonu hedeflenmiştir. Gıda desteği pazarına sunulmak üzere immün sistem modülatörü olan yeni bir ürünün formülasyonuna yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, saponin türevi AST-VII molekülü, kitre zamkından elde edilen taşıyıcı sistemlere yüklenmiş, bu şekilde hapsedilen molekülün biyoyararlanımını ve dayanımını arttıracak ucuz ve biyoyumlu taşıyıcı sistemin geliştirilmesini sağlamıştır. Gıda sektöründe sıkça kullanılan ve *Astragalus* kökünde AST-VII' ye ev sahipliği yapan kitre zamkı, AST-VII' nin biyoyararlanımını ve dayanımını arttıracak ucuz ve biyoyumlu nanotaşıyıcı sistemin geliştirilmesinde önemli role sahip olmuştur. Bu amaçla, Kitre zamkının kolesterol ve zamk arasında pH ile ayarlanabilir bir elektrostatik etkileşime dayanarak 200 nm' den küçük homojen nanoparçacıklar üretilmiştir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

Polimer malzemeler kullanılarak yapılan kontrollü ilaç salımı, birçok ilacın terapötik etkinliğini ve biyoyararlanımını artırırken, sağlıklı doku ve organları korumayı ve istenilen dozun istenilen sürede sisteme verilmesi gibi avantajlar sağlamaları nedeniyle günümüz sağlık endüstrisinde oldukça büyük bir yere sahiptir. Daha hızlı oranda ilaç iletimi sağlayan geleneksel dozaj formları, başlangıçta kanda ilaç seviyelerinin alçalıp yükselmesine yol açmaktadır. Kan ve dokulardaki ilaç seviyesindeki dalgalanmaları en aza indirme ihtiyacı, kontrollü ilaç dağıtım sisteminin geliştirilmesine yol açmıştır. İlacı kontrollü bir oranda salan, kısa yarı ömürlü ilaçların sürekli girişine izin veren polimerler, kullanılan ana sistemlerden biridir. Polimer tarafından absorbe edilen veya kapsüllenen ilaçların salınımı, ilacın polimerik malzemeden veya polimer malzeme ile birlikte yavaş veya kontrollü difüzyonunu içerir [34].

Son yıllarda, tabletler, hidrojeller, hidrojel membranlar, mikroküreler gibi çeşitli formüle edilmiş ürünlerden ilaçların kontrollü salınımının kontrol edilmesi için ajan olarak polisakkaritlerin kullanılmasıyla güvenli ve etkin ilaç dağıtım sistemlerinin geliştirilmesine yönelik önemli araştırma çabaları gösterilmiştir [10, 35, 36]. Kapsüllemenin önemli avantajı çekirdek malzemenin kontrollü salımı sayesinde daha yüksek ürün verimliliği sağlamasıdır. Malzemelerin kapsüllemesinde kitre zamkından elde edilen hidrokolloidlerin önemli uygulamalarına rağmen, bu alanda kitre zamkı kullanımı hakkında birkaç çalışma bildirilmiştir [37].

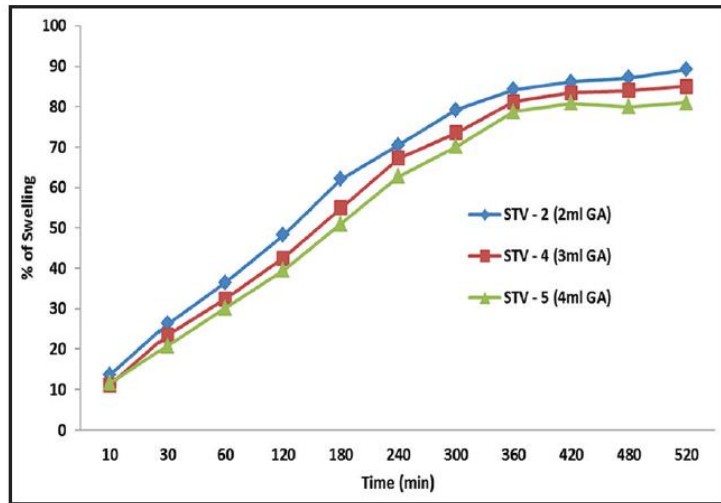
2018 yılında Rahmani ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, “tragacanth” (GT) polisakkariti ve “grafen oksit” (GO) temelli, çapraz bağlayıcı olarak Ca^{+2} ve Ba^{+2} ve porlu bir yapı oluşturmak için kalsiyum karbonat partikülleri, ve model bir ilaç olarak Rivastigmin (RIV) kullanarak (RIV, Alzheimer tedavisinde onaylanmıştır.) suda çözünür, küresel, pH' a duyarlı gözenekli hidrojeller hazırlanmıştır. Hidrojellerin hazırlanmasında, GT' lerin yapısında bulunan ve Ca^{+2} ve Ba^{+2} gibi iyonlar varlığında hidrojel yapabilen hidroksil ve karboksilat grupları kullanılmıştır. GO, ilacın fiziksel adsorpsiyonu için ultra yüksek yüzey alanı, suda ve diğer çözücüler içinde kolayca dağılması, fiziksel dolgu maddesi olarak mekanik özellikleri iyileştirilmesi, seri üretim için düşük maliyetli olması ve işlevsellik için hidroksil, karboksil ve epoksi gibi bol oksijen içeren gruplar içermesi gibi potansiyel avantajları nedeniyle araştırmacılar tarafından kullanılmıştır. Hidrojellerin şişme davranışı, jellerin çapraz bağlayıcı içeriği, çapraz bağlayıcı tipi, jellerin bileşimi ve pH' dan etkilenmiştir. Bu hidrojeller ilaç salınımını incelemek amacıyla mide (pH 1.2) ve bağırsak (pH 7.4' te ~97%) ortamında simüle edilmiş ve pH duyarlılığı sergilemiştir. GO' nun hidrojel içerisine dahil edilmesi, şişme kapasitesini, tutma verimini ve sıkışmış ilacın kontrollü bir şekilde salınmasını sağlamıştır. Yüksek GO konsantrasyonlarında,

termal kararlılığın arttığı ve bununda, jel yapısındaki iyonik çapraz bağların, GO ve GT makromolekülleri arasında ki etkileşim oranının artmasına bağlamışlardır [38].



Şekil 2.1. GT-bazlı hidrojellerin sentezi için şematik gösterim [38]

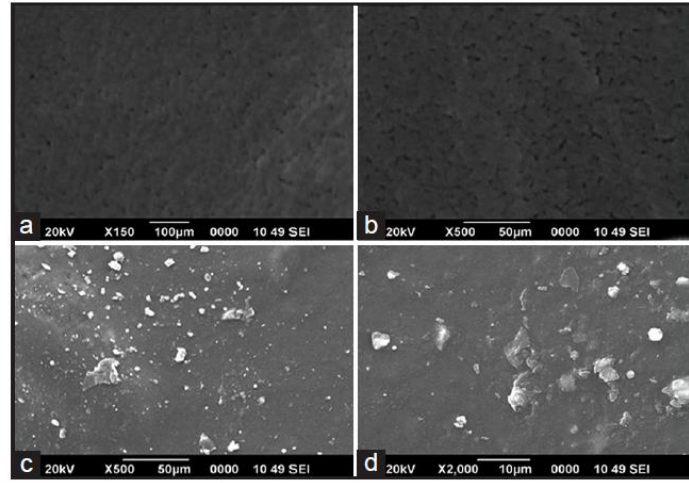
Nagarjuna ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, verapamilin bir antihipertansif ilacın kontrollü salımı için Sodyum aljinat (SA) ve kitre zamkı (TG) karışımı hidrojel membranlar glutaraldehit (GA) ile çapraz bağlayarak hazırlamışlardır. İn vitro salım çalışmaları, salım hızının çapraz bağlanma, ilaç yükleme miktarı ve karışım bileşimi miktarına bağlı olduğunu göstermişlerdir. Sonuçlar, 12 saate kadar uzayan yavaş salım hızlarını ortaya koymuştur [34].



Şekil 2.2. Farklı çapraz bağlayıcı (glutaraldehit) oranlarının zamana göre sodyum aljinat / kitre zamkı (80:20) ilaç yüklü hidrojel membranlarının % şişmesinin değişimi [34].

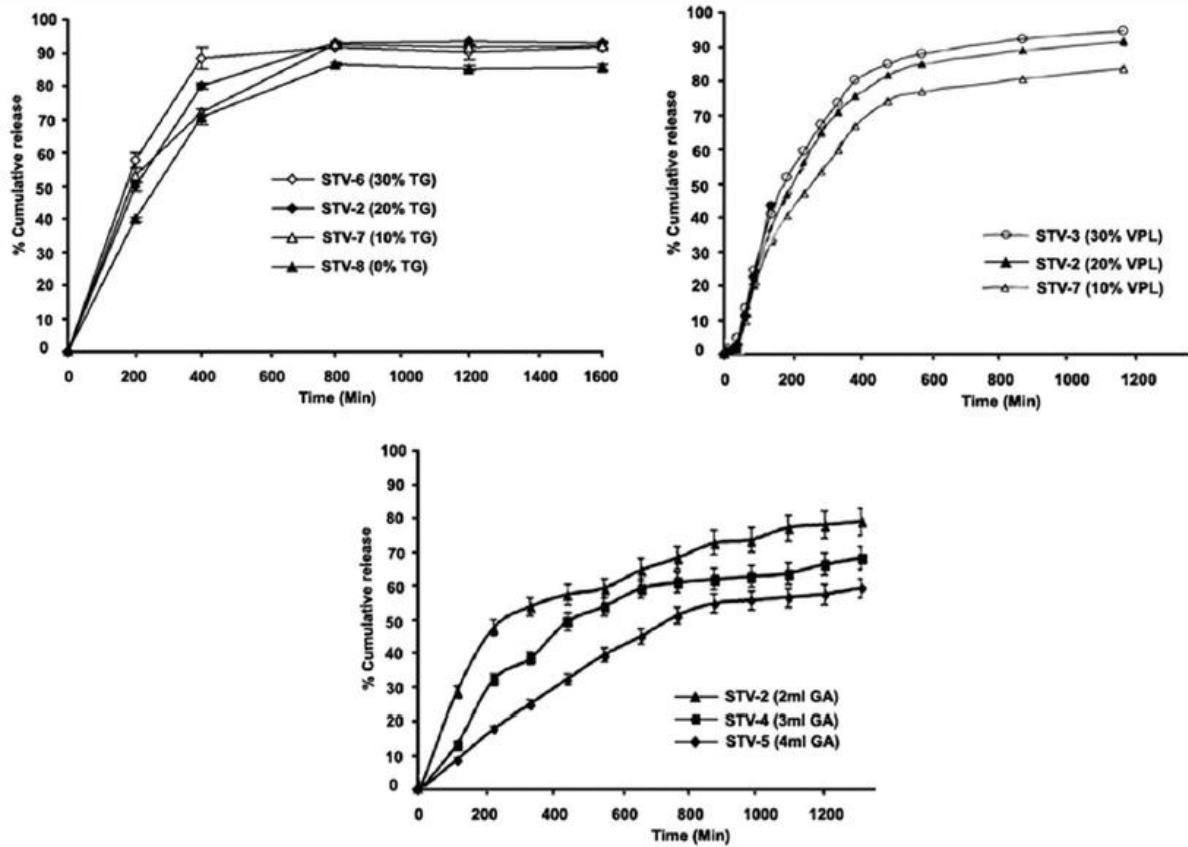
Şekil 2.2.' de farklı çapraz bağlayıcı içerikli hidrojel membranlarının % şişmesinin 6 saate kadar hızlı olduğu ve bu sürenin ötesinde kademeli olarak dengeye ulaştığını fark etmişlerdir.

Hidrojel membranın su bağlama kabiliyetinin, hidrojel membranında bulunan hem SA hem de TG'nin hidrofilik yapısına bağlı olduğunu düşünmüşlerdir. Hidrofilik grup sayısındaki azalmanın yanı sıra yapısal genişlemede daha yoğun kovalent olarak bağlı ağlardan dolayı, % şişme oranı çapraz bağlama derecesi arttıkça azalmaktadır. Kapsülleme verimliliği çapraz bağlayıcıdaki (GA) artışıyla azalmıştır, çapraz bağlama yoğunluğundaki artış, sonuç olarak sert yapının oluşmasına, polimer matris içindeki serbest hacminin düşmesine ve böylece kapsülleme verimlerinin düşmesine neden olabileceğini düşünmüşlerdir.



Şekil 2.3. İlaç yüklü olmayan membranlar (a ve b) ve ilaç yüklü membranların taramalı elektron mikroskopi (SEM) fotoğrafları [34].

Nagarjuna ve arkadaşlarının yapmış olduğu ilaç yüklenmiş ve yüklenmemiş hidrojel membranların SEM yüzey görüntüleri Şekil 2.3.' de gösterilmiştir. Şekil 2.3.a, Şekil 2.3.b. bu polimerlerin tamamen karışabilirliğini gösteren düz bir yüzeyi göstermektedir. Şekil 2.3.c ve Şekil 2.3.d, SA / TG (80/20) hidrojel membranının ilaç ile yüklenmiş ve GA ile çapraz bağlanmış yüzeyini göstermektedir. Şekil 2.3. (c ve d), ilaç moleküllerinin fiziksel olarak birleştirildiğini ve polimer zarın yüzeyinde adsorbe edildiğini gösteren sert ve yoğun bir yüzeye sahiptir. Yoğun yüzeyin görünümü, zarı küçülttüğü için çapraz bağlayıcıdan kaynaklanabileceğini düşünmüşlerdir [34].



Şekil 2.4. pH 7.4 tampon çözeltisinde (a) Farklı miktarda TG içeren sodyum aljinat / kitre zamkâ (TG) karışımından VPL' nin kümülatif olarak salınım yüzdesi: (\diamond)% 30 TG, (\blacklozenge)%20 TG, (Δ)%10 TG ve (\blacktriangle)%0 TG (b) Farklı miktarlarda VPL içeren SA / TG karışımı hidrojel membranlardan VPL kümülatif salımı: (\circ) %30 VPL, (\blacktriangle) %20 VPL, (Δ)%10 VPL (c) Farklı miktarlarda çapraz bağlayıcı içeren SA / TG karışımından VPL salımı yüzdesi: (\blacktriangle) 2 mL GA, (\blacksquare) 3 mL GA ve (\blacklozenge) 4 mL GA [34].

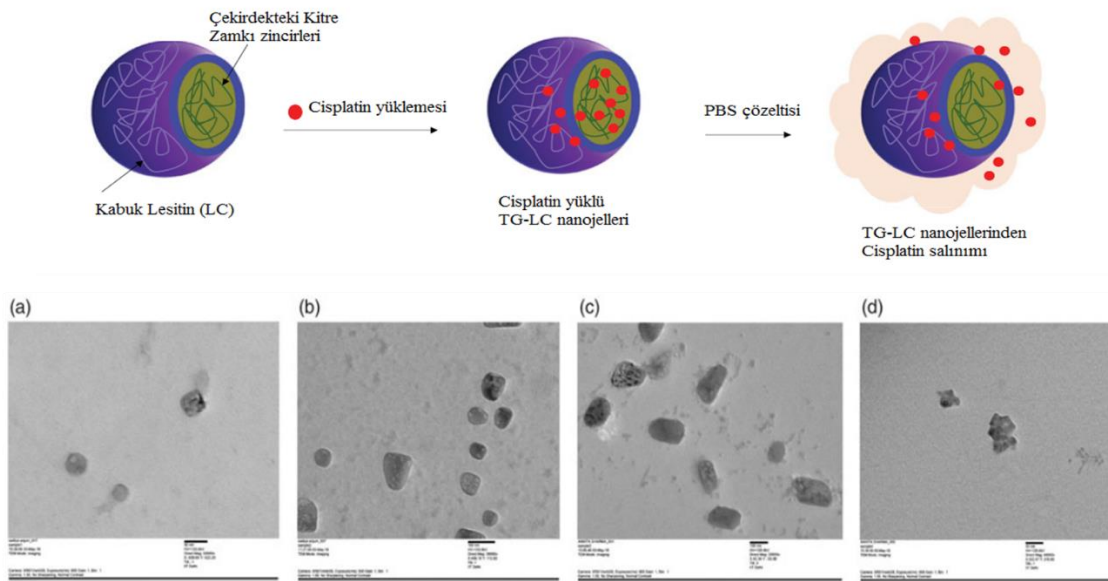
SA/TG karışımı hidrojel membranda TG miktarı arttığında, ilaç salımında bir artış gözlenmiştir. Bunun nedeni olarak, matrisin hidrofobikliğini artırarak VPL' den kontrollü salım hızlarını gösterdiklerini belirtmişlerdir (Şekil 2.4.a.).

Şekil 2.4.b, farklı miktarlarda ilaç (%10, %20 ve %30) ile yüklü SA/TG harman membranlarının kümülatif salımını göstermektedir. Salım verileri, yüksek miktarda ilaç içeren formülasyonların, daha düşük miktarda ilaç içeren formülasyonlardan daha hızlı ve daha yüksek salım hızları sergilediğini göstermiştir. Daha düşük miktarda ilaç içeren formülasyon için salınan bir süre gözlenmiş ve matristeki azalan ilaç miktarı ile birlikte, salınan oranın oldukça yavaş olduğunu fark etmişlerdir. Bunun nedeni daha az sayıda ilaç molekülünün taşınacağı daha fazla boş boşluk alanının mevcudiyeti olduğunu ve karışım zarlarından ilaç salımı difüzyon mekanizmasıyla sürdürüldüğü için salım hızları düşük miktarlarda daha yavaş olduğunu belirtmişlerdir.

Şekil 2.4.c.' de sabit miktarda bir ilaç ve sabit bir polimer karışım membranında değişen miktarda GA içeren ilaç yüklü karışım membranlar için zamana karşı kümülatif salım verilerinin

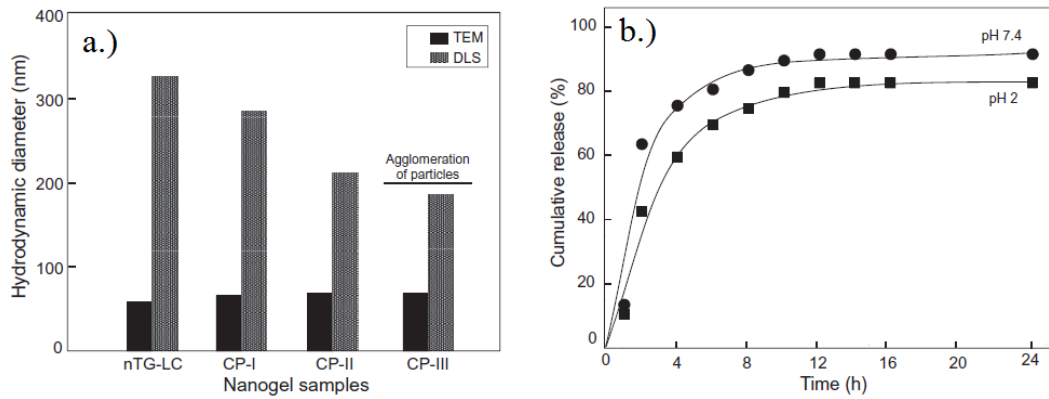
yüzdesi (kümülatif %) gösterilmiştir. Salım, daha düşük GA miktarında oldukça hızlı ve yüksektir ve daha yüksek GA miktarında daha düşük çıkmaktadır. Nagarjuna ve arkadaşları, bunun sebebinin daha yüksek GA konsantrasyonunda, polimerik zincirlerin, mikro boşlukların büzülmesinden dolayı sertleşeceğini ve böylece polimerik matrisler boyunca VPL' nin kümülatif salımını azaltabileceğini düşünmüşlerdir.

Verma ve çalışma arkadaşları, cisplatin (CP) ile yüklenen Tragacanth Gum (TG) (Kitre zamkı) - lesitin (LC) nanojellerini nanoemülsiyon işlemi hazırlamışlardır. CP partiküllerinin TG çekirdeğine gömüldüğü olduğu ve kabuk olarak LC ile kaplanmış nanojeller oluşturmuşlardır. Nanojelle farklı konsantrasyonlarda CP eklenmiş ve nanojellerin şekli ve büyüklüğü incelenmiştir. Nanojel hazırlamak için (TG) polisakkarit olarak ve nanosisteme ek işlevsellik kazandırması için lesitin (LC) kullanmışlardır (Şekil 2.5.). Kapsüllemiş CP miktarını ilaç yüklü TG-LC nanojellerin santrifüjü ile hesaplamışlardır. Elde edilen süpernatant konsantrasyonundan yararlanarak CP miktarını UV-Spektrofotometre cihazında incelemişlerdir [39].



Şekil 2.5. CP yüklü TG-LC nanojelin tasarımı, özellikleri ve şematik gösterimi [39] ve TG-LC' nin değişen konsantrasyonlarda (a), %1.2 (b), %5.2 (c) ve %8.5 (d) CP yüklemelerindeki TEM görüntüleri [39].

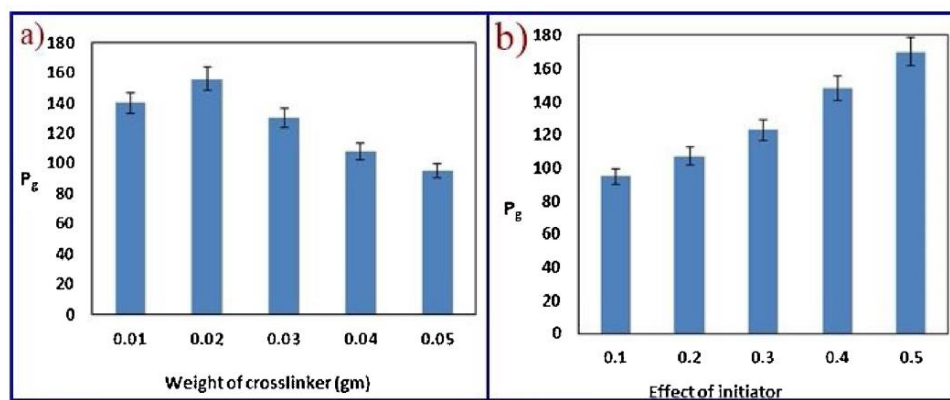
Nanojel partiküllerinin yığılmış morfoloji ile 58nm – 70nm ortalama parçacık çapında olduklarını gözlemlemişlerdir (Şekil 2.6.).



Şekil 2.6. Farklı pHlarda (pH 2 ve 7.4) PBS içerisinde TG-LC-CP' den (%5.2 CP) CP salınımı [39].

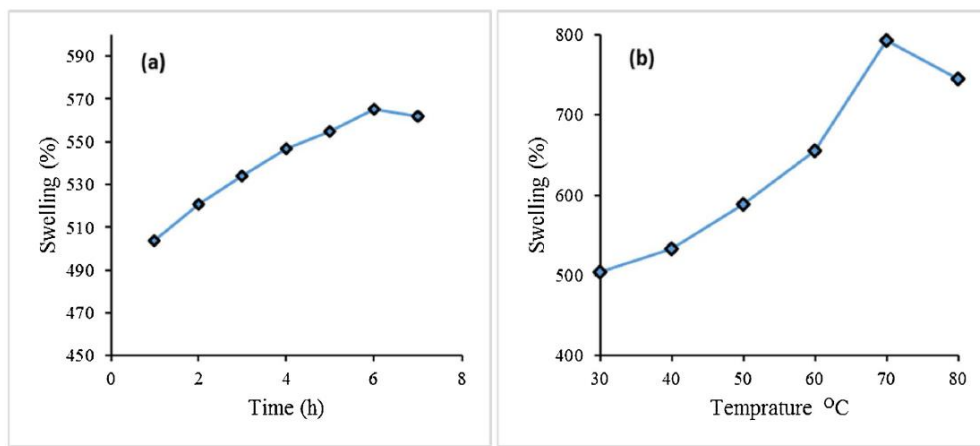
Dinamik ışık saçılımı (DLS) ile ölçülen $326 \pm 10,5$ nm çaptaki nanojellerin, su içerisinde hidrodinamik çapa sahip olduklarından, TEM analizi ile ölçülenlerden (Şekil 2.6.a) daha büyük çaplara sahip olduklarını gözlemlemişler ve çaptaki artışın TG nanojellerin hidrojel yapısından dolayı şişmelerinin sonucu olduğunu düşünmüşlerdir. Toplam ilaç kapsülleme verimini sırasıyla %68 ve %5.2 olarak gözlemlemişler ve TG-LC nanogellerden salım profili incelediklerinde önce aniden salım gerçekleşmiş ve ardından ilacın sürekli salımı Şekil 2.6.b.' de gösterilmiştir. TG içeren hidrojellerin şişmesi sonucu, hidrojel zincirlerinin gevşediği ile ani salımın görüldüğünü düşünmüşlerdir [39].

Pathania ve arkadaşları mikrodalga radyasyonları kullanarak kitre (tragacanth) zankının nanohidrojellerini, ampisilin ilacının kontrollü salınımı için kullanmışlardır. Kitre zankının çapraz bağlayıcı olarak N, N1-metilen-bis-akrilamid (MBA) ve başlatıcı olarak potasyum persülfat kullanılarak ikonik asit varlığında graft kopolimerizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Hidrojellerin farklı pH değerlerinde (2.2, 5.4 ve 9.4) *in vitro* çalışmaları incelenmiştir 2.2 pH' ı, maksimum ilaç salımı için optimize edilmiş pH olarak kabul etmişlerdir.



Şekil 2.7. Farklı parametrelerin kitre zankı graft yüzdesi (Pg) üzerine optimizasyonu. Çapraz bağlayıcı (a) başlatıcı (b) [40].

Şekil 2.7.a.' da graft verimi üzerindeki çapraz bağlayıcı (MBA) konsantrasyon etkisini incelemişler ve elde ettikleri sonuçlara göre başlangıçta verim artmış ve daha sonra konsantrasyondaki artışla farklı polimerik zincirlerin çapraz bağlanmasından dolayı azaldığını gözlemlemişlerdir. Şekil 2.7.b.' de graft verimi üzerindeki başlatıcı konsantrasyon etkisini incelemişlerdir. 0.500 g potasyum persülfat kullanarak en yüksek graft verimi %160 kaydetmiş ve daha sonra başlatıcı konsantrasyonu arttıkça graft veriminde azalma görmüşlerdir. Başlatıcının polimer omurgasında aktif bölgeler ve monomerler oluşturduğunu, bu nedenle graft veriminin arttığını ve her aktif bölgenin doldurulması ile de graft verimini azalttığını düşünmüşlerdir.

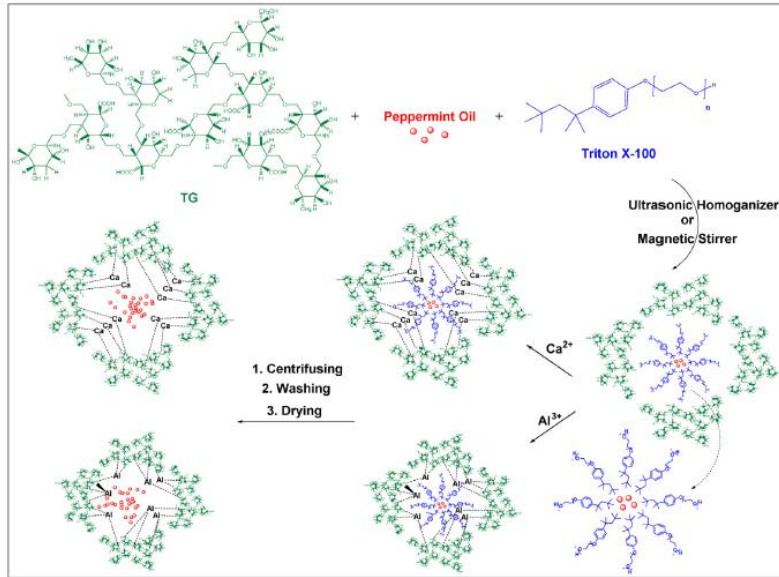


Şekil 2.8. (a) Zamanın ve (b) sıcaklığın şişme yüzdesine (Ps) etkisi [40].

Nanohidrojel şişmesi üzerine zamanın etkisi değerlendirmiş ve farklı zaman aralıklarında % şişme miktarını hesaplamışlardır. Elde edilen sonuçlar, Şekil 2.8.a.' da gösterilmiştir. Zamanla nanohidrojin şişme oranının arttığını, ayrıca maksimum 6 saat sonra yaklaşık %565 şişlik elde ettiğini gözlemlemişlerdir. Sıcaklık arttıkça başlangıçta nanohidrojin şişme oranının arttığını ve yaklaşık 70 °C' de maksimum %800 değere ulaştığını, daha sonra yüzde şişmenin, artan sıcaklıkla azaldığını gözlemlemişlerdir. Elde edilen sonuçlar Şekil 2.8.b.' de gösterilmiştir [40].

Ghayempour ve arkadaşları 2015' de, ultrasonik ve manyetik karıştırıcı ile alüminyum ve kalsiyum klorür varlığında nanokapsülleri farklı parametreler ile hazırlamıştır ve bu parametrelerin nanokapsüllerin ortalama büyüklüğü üzerindeki etkisini araştırmışlardır (Tablo 2.1.). Alüminyum klorür (22 nm) kullanılarak ultrasonik olarak hazırlanan nanokapsüllerin ortalama hidrodinamik çaplarının diğer ürünlerden daha küçük olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu çalışmada, nane yağı TG tarafından manyetik karıştırıcı ve ultrasonik homojenizatör kullanarak enkapsüle edilmiş ve Triton X-100 emülgatör; alüminyum veya kalsiyum klorür ise çapraz

bağlama maddeleri olarak kullanılmıştır. Nanokapsüllerin oluşum şeması Şekil 2.9.' da gösterilmiştir [37].

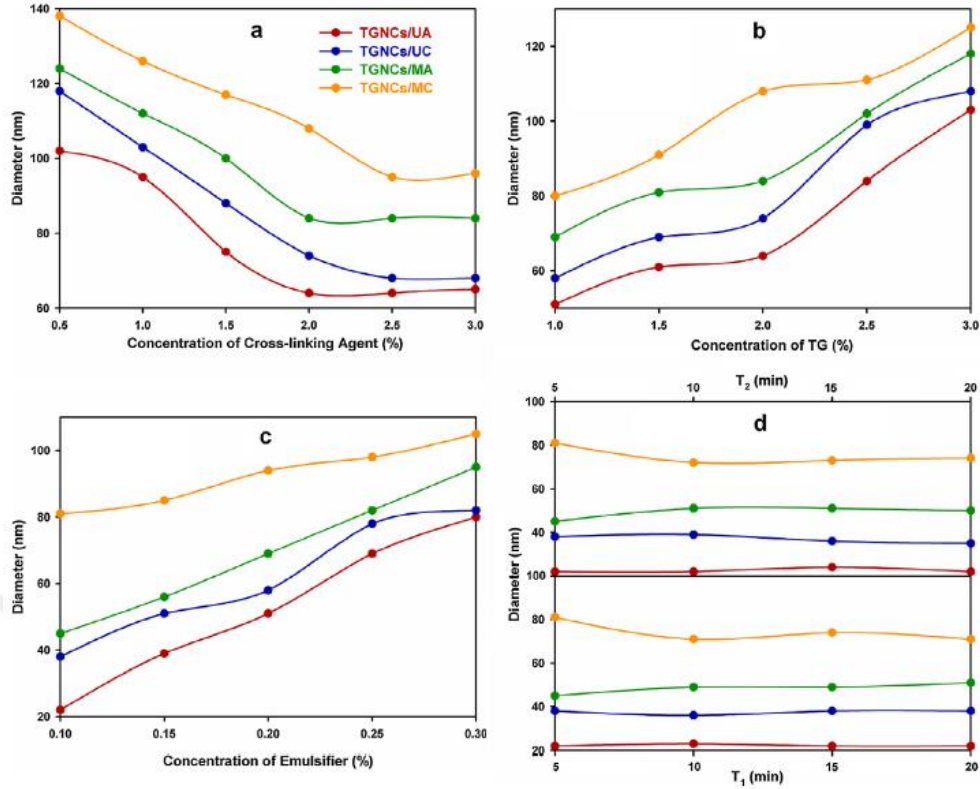


Şekil 2.9. TGNC nanokapsüllerinin oluşum şeması [37].

TGNC' lerin ortalama büyüklüğü, TG' nin bütün karboksil gruplarının belirli miktarda çapraz bağlama maddesi eklendikten sonra bağlanarak tıkanması nedeniyle daha fazla çapraz bağlama maddesi artışıyla değiştirilemez. Şekil 2.10.a.' da sonikasyon yoluyla hazırlanan alüminyum klorür TGNC' lerin, diğer TGNC' lerden daha küçük çapta olduğu gösterilmiştir. Bunun sebebi olarak, üç değerli alüminyum katyonunun, TG' nin üç karboksil grubu ile çapraz bağlanabilir olduğu ve bu nedenle alüminyum klorürün küçük ve kompleks polimerik kapsüllerin oluşumuna yol açtığını düşünmüşlerdir.

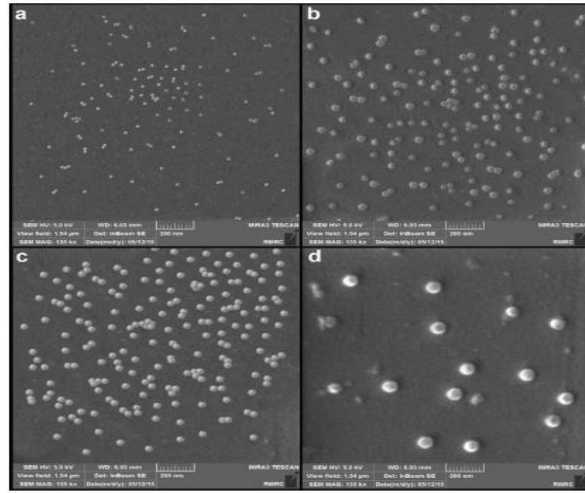
Tablo 2.1. Ghayempour ve arkadaşlarının hazırlamış oldukları TGNC' lerin kodlanması.

KZ (mg)	AST VII (mg)	Kolestrol (mg)	Toplam (mg)	Toplam hacim (mL)	% ağı. (KZ+Kol)/ % ağı. Kol
5.00	2.5	0.00	7.5	5	0
4.50	2.5	0.50	7.5	5	10
3.75	2.5	1.25	7.5	5	25
2.50	2.5	2.50	7.5	5	50
1.25	2.5	3.75	7.5	5	75
0.50	2.5	4.50	7.5	5	90



Şekil 2.10. (a) çapraz bağlama maddesi konsantrasyonunun, (b) TG konsantrasyonunun, (c) emülgatör konsantrasyonunun ve (d) işlem süresinin TGNC' lerin büyüklüğü üzerindeki etkisi [37].

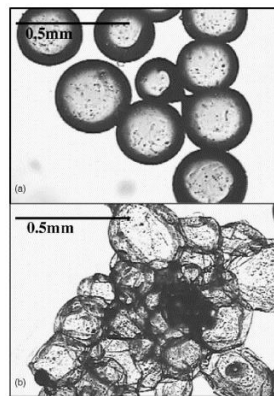
TG konsantrasyonunun TGNC' lerin büyüklüğü üzerindeki etkisini araştırmışlar ve daha düşük TG konsantrasyonunun, tüm numunelerde daha küçük kapsüllere yol açtığını, ancak TG %0.5 (ağ / hac) ile hiçbir kapsül oluşturulmadığını, (Şekil 2.10.b.) en iyi sonuçları, TG %1 (ağ / hac) konsantrasyonda gözlemlemişler. Emülgatör yüzey gerilimini azalttığından, mikro emülsiyon düşük enerji tüketimi ile oluşur. Ayrıca, topaklanmayı önlemek için parçacıkların etrafında koruyucu bir katman oluşturur [41]. Emülgatör konsantrasyonunun TGNC' lerin büyüklüğündeki etkisini araştırmışlar ve TGNC' lerin oluşturulması için %0.1' lik minimum konsantrasyonun gerekli olduğunu, ancak Triton X-100 konsantrasyonunun daha da artmasının TGNC' lerin çapını arttırmaya yol açtığını gözlemlemişlerdir (Şekil 2.10.c.). Bunun, polimer yapısının aşırı değişmesi nedeniyle su / yağ ara yüzünün fazla miktarda kapsanmasına bağlamışlardır. Şekil 2.10.d.' de kapsülleme süresi gösterilmektedir. Kapsülleme süresi mikroemülsiyon (T1) ve çapraz bağlama maddesi eklendikten sonra TGNClerin oluşumu (T2) olarak iki aşamada tamamlanmış ve TGNC' lerin oluşması için gereken minimum süreyi 5 dk olarak belirlemişlerdir. T1 ve T2' yi arttırmanın, hazırlanan TGNC' lerin çapı ve sayısı üzerinde önemli bir etkisi olmadığını gözlemlemişlerdir ve TGNC' ler ilk 5 dakika içinde oluştuğunu ve daha fazla karıştırma süresinin kapsüllerin boyutu üzerinde etkisi olmadığı sonucuna varmışlardır [41].



Şekil 2.11. Hazırlanan TGNC' lerin optimum koşullarda FESEM görüntüleri. (a) TGNC / UA, (b) TGNC / UC, (c) TGNC / MA ve (d) TGNC / MC [41].

Hazırladıkları TGNC' ler, pürüzsüz yüzeyli küresel şekli göstermektedir. Karıştırıcı tipi hazırlanan nanokapsüllerin çapında ve morfolojisinde de önemli bir role sahiptir [41]. Alüminyum klorür ile hazırlanan ortalama TGNC' lerin çapının, değerlikteki farklılık nedeniyle kalsiyum klorürden daha düşük olduğunu gözlemlemişlerdir. Ortalama çapları TGNC / UA için 22 nm, TGNC / UC için 38 nm, TGNC / MA için 45 nm ve TGNC / MC için 81 nm olan nanoküreler elde etmişlerdir (Şekil 2.11.).

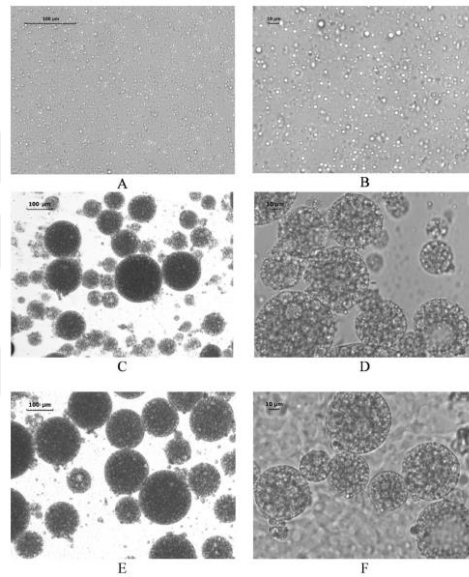
Chang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, polistiren ve kafur yağı içeren jelatin ile karıştırılmış Arap Zamkı (Gum Arabic) mikrokapsüllerini koaservasyon yöntemi ile üretmişlerdir. Yağ / duvar hacim oranı, emülsifiye etme karıştırma hızı, çapraz bağlama maddesi konsantrasyonu, işlem süresi ve parametreleri yağ salma özelliklerini incelemişlerdir [42].



Şekil 2.12. Yağ salımından önce (a) ve sonra (b) mikrokapsüllerin mikrofotografı. (30 dakika 6 mL GA ile muamele edilirken, 500 dev/dk' da homojenleştirici ile karıştırılmıştır.) [42].

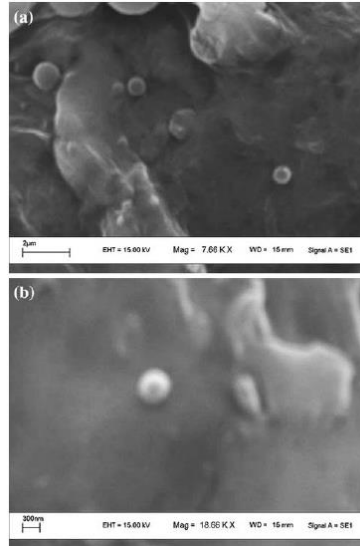
Kafur yağı içeren nanokürelerin homojenizatör varlığında, 6 mL çapraz bağlayıcı madde konsantrasyonu ve 30 dakika çapraz bağlama süresinden sonra kapsülasyon verimini incelemişlerdir. Yağ salımını gösteren mikroskop görüntüsü Şekil 2.12.' de gösterilmiştir.

Shaddel ve arkadaşlarının 2017 yılında yapmış olduğu çalışmada antosiyaninlerinin (ANC'ler) suda çözünür bileşikler olarak, özellikle de sert işlem ve depolama koşullarında, kararsızlığını azaltmak için jelatin ve Arap zamkı kullanılarak kompleks koaservasyondan önce çift emülsiyon tekniği ile kara ahududu suyu ekstraktlarını mikrokapsüle etmişlerdir ve dondurarak kurutma (liyofilizasyon) yöntemiyle kurutmuşlardır. Mikrokapsüller, ortalama büyüklükleri 35.34 ± 3.21 ila 80.22 ± 5.21 nm arasında ve yüksek yükleme kapasitesi (29.67 ± 0.66 – $38.54 \pm \%0.08$) göstermişlerdir (Şekil 2.12.) [43].



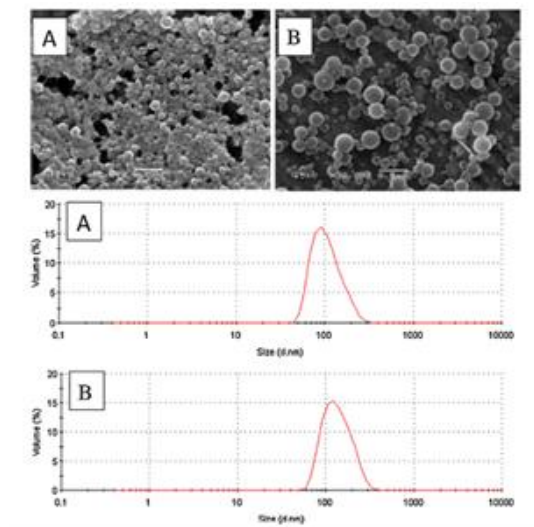
Şekil 2.13. Optik mikroskopi (Sırayla 20x, 40x) ile elde edilen çekirdek madde olarak kurutulmuş su ekstraktının basit emülsiyonunun mikrofrafisi (a,b); Optik mikroskopi (Sırayla 20x, 40x) ile elde edilen çift emülsiyon işleminin mikrofrafisi (c,d); Optik mikroskopi (Sırayla 20x, 40x) ile elde edilen koaservasyon işlemi ile elde edilen mikro kapsülünün (dondurularak kurutmadan önce) mikrofrafisi [43].

Sarmah ve arkadaşları yaptığı çalışmada meme kanseri tedavisinde kullanılan tamoksifen sitrat (TC) içeren Guar zamkı nanotaşıyıcılarını, kanser hücrelerini hedeflemek bir ilaç taşıyıcı olarak kullanmışlardır. Polimer çapraz bağlanmada tek kademeli emülsiyon metodu kullanarak polimer kaplı ilaç nanoparçacıkları hazırlamışlardır. Kolon spesifik bir ilaç olarak farmasötik uygulamaları yaygın kullanılan guar zamkını model polimer olarak kullanmışlardır. Span 80' i emülsifer; Glutaraldehit' i ise çapraz bağlayıcı olarak kullanmışlardır [44] (Şekil 2.14.).

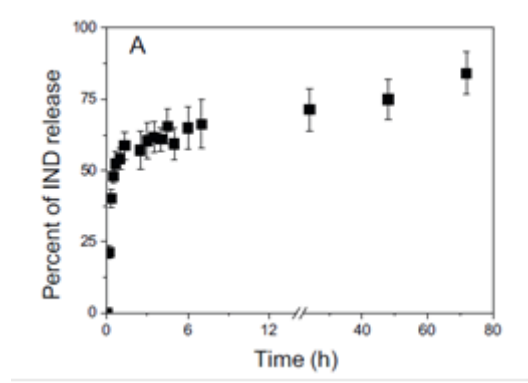


Şekil 2.14. Tamoksifen Sitrat yüklü Guar zamkı nanoküreleri SEM mikrografı (a) 7.66 kX ve (b) 18.66 kX [44].

Pitombeira ve arkadaşları, asetillenmiş kaju zamkı sentezlemiş ve organik solventle (DMSO) diyalizinden kendiliğinden oluşan nanoküreler elde edilmişlerdir. Kendiliğinden oluşan NP' lerin ortalama parçacık çaplarını 179 nm olarak belirlemişlerdir. Nanotaşıyıcıların hazırlanmasını takiben, model ilaç olarak kullanmış indomethacin (IND) ve hidrofobize edilmiş polisakkarit içine hapsedilmiştir. İlaç yüklü ve boş NP' lerin çapları sırasıyla 70-170 nm ve 108-314 nm bulunmuştur (Şekil 2.15.). Kontrollü ilaç salımı diyaliz membran kullanılarak 72 saate kadar gözlemlenmiştir (Şekil 2.16.) [45].



Şekil 2.15. ACG nanoparçacıklarının IND içermeyen (A) ve içeren (B) parçacık hidrodinamik çap dağılımı [45].



Şekil 2.16. IND ile yüklü ACG nanoparçacıkların *in vitro* ilaç salım profili [45].

Seeli ve arkadaşları, guar zıncını kontrollü ilaç salımı için kimyasal olarak modifiye edip taşıyıcı olarak kullanmışlardır. İlaç taşıyıcısı olarak pH duyarlı guar zıncını, yağ-su emülsiyon yöntemine göre hazırlamışlardır. Guar zıncı mikropartiküllerinin ilaç taşıyıcısı olarak kullanma olasılığını değerlendirmek için, parçacıklara kolon spesifik ilaç modeli olarak İbuprofen yüklenmiş, ve bunların *in vitro* ilaç salınım davranışları incelenmiştir [46].

Tabasi ve arkadaşları, bu çalışmada fesleğen tohumu sakızı (FTS) nanopartiküllerden (NP) Glututasyon ilacının salım potansiyelini değerlendirmişlerdir. Kalsiyum klorürü bağlayıcı ajan olarak kullanmışlardır. Küresel NP' lerin davranışlarını farklı pHlarda (1.2 ve 6.8) incelemişlerdir. FTS nanopartiküllerinin glutatyon salınımı, bağırsak pH' ına (6.8) kıyasla pH 1.2' de daha yüksek bir hıza sahip olduğunu gözlemlemişlerdir [27].

Hosseini ve arkadaşları, ilaç salımı için kitre zıncı biyopolimeri destekli nanohidrojel hazırlamışlardır. Çapraz bağlayıcı olarak 4 farklı kimyasal kullanarak nanohidrojel ağları oluşturmuşlardır (Gluteraldehit (GA), polivinil alkol (PVA), gliserol diglisidil eter (GDE), 3-Aminopropyltriethoxysilane (APTES)). Nanohidrojellerin şişme davranışı değişik pH aralıklarında incelenmiştir. Model ilaç olarak indomethacin kullanılmış ve şişme-yayıma yöntemi kullanılarak hidrojelin içine hapsedilmiştir [47].

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

%99 saflığa sahip Etanol, %99.5' dan daha yüksek saflıktaki HEPES, MES, PBS ve %98' den daha yüksek saflıktaki Nile Red (NR), Sigma Aldrich firmasından satın alınmıştır. %95 saflıktaki Kolesterol Acros Organics firmasından, Sitrik asit ise Merck firmasından temin edilmiştir. Yüksek kalite sınıfındaki Kitre Zamkı (KZ), İran' dan, lokal bir marketten tedarik edilmiştir. Tüm deneylerde, çift distile deiyonize su (ddiSu) kullanılmıştır.

Nanoküre eldesi sürecinde; morfolojik karakterizasyon için Jeol marka 100CX II modeli geçirimli elektron mikroskop (TEM), Carl Zeiss marka Supra 55 model yüksek çözünürlüklü taramalı elektron mikroskobu (HRSEM), sentezde ultrasonik banyo, VELP marka karıştırıcı, WiseStir marka WSH-20A modeli ısıtıcılı karıştırıcı, Labconco marka Freezone 2.5 model liyofilizatör, Agilent marka Cary Eclipse Floresans Spektrofotometre, Malvern marka Zeta Sizer Nano ZS, Shimadzu marka UV-1800 modeli UV-Vis Spektrofotometre, Agilent marka Cary Eclipse Floresans Spektrofotometre ve Perkin Elmer marka Frontier FT-IR kullanılmıştır. Standart koşul sağlamak için çalkalamalı su banyosu kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Kitre Zamkının Ön İşlenmesi

Kitre zamkı, öncelikle değirmende öğütülerek parçacık büyüklükleri küçültülmüş ve toz formuna getirilmiştir (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. KZ' nin ham hali ve öğütülerek toz haline getirilmiş halinin görüntüsü: (a) KZ' nin ham hali, (b) KZ' nin toz hali.

3.2.2. KZ' nin İzoelektrik Noktasının Belirlenmesi

İzoelektrik nokta, bir malzemenin, tampon çözelti ya da su içerisindeki net yükünün sıfır olduğu pH' ıdır. İzoelektrik noktanın üzerindeki çözelti pH' sında, yüzey baskın olarak negatif yüklenir ve bu nedenle, benzer yüklü moleküller itici güç sergilerler. Benzer şekilde, izoelektrik noktanın altındaki bir çözelti pH' sında, molekül baskın olarak pozitif yüklenir ve aralarında moleküller arası itme meydana gelir. Bununla birlikte, izoelektrik noktada, negatif ve pozitif yükler dengelendiğinde, itici elektrostatik kuvvetler azalır ve çekim kuvvetleri baskın hale gelir, agregasyona ve çökelmeye neden olur [1].

KZ' nin izoelektrik noktası Singh ve arkadaşlarının optimize ettiği katı ekleme metodu ile ölçülmüştür [48]. Bu metoda göre, 100 mL' lik erlenlere 22.5 mL 0.1 M KNO₃ çözeltileri eklenmiştir. HCl ve NaOH çözeltileri kullanılarak çözeltilerin pH' ları 2' den 11' e kadar ayarlanmıştır. pH' ları ayarlanan çözeltilere hacimleri 25 mL oluncaya kadar 0.1 M KNO₃ çözeltisi eklenmiş ve her çözeltinin başlangıç değerleri (pH_i) ölçülmüştür. Erlenlere 0.5 g KZ tozu eklenip ağzuları kapatılmıştır. 48 saat boyunca çözeltilerin dengeye gelmesi beklenmiştir. 48 saat sonra dengeye gelen çözeltilerin pH değerleri (pH_f) belirlenmiştir. Değişen pH' larda ayarlanmış çözeltilerin başlangıç ve son pH' ları arasındaki fark grafiği çizilmiştir.

3.2.3. KZ Nanoparçacıkların Kritik Agregasyon Konsantrasyonu (KAK)

Polimerlerin kritik agregasyon konsantrasyonları, indikatör boya NR' nin kullanılmasıyla Rodrigo ve arkadaşlarının floresans metoduna göre hesaplanmıştır [49]. Bu metoda göre, NR yardımı ile KAK' nın belirlenmesi için değişen konsantrasyonlarda (0-2 mg/mL) zank çözeltisi hazırlanmış ve her bir çözeltiliye 10 µL NR (5 mg/mL EtOH) eklenip 365 nm Exc. değerinde 350-450 nm arasındaki dalga boylarında floresans şiddeti ölçülmüştür.

3.2.4. Sonikasyon Süresinin KZ Nanoparçacıkların Morfolojik Yapısı Üzerine Etkisi

Elde edilen KZ çözeltilerinin homojenitesini arttırmak ve parçacık oluşumunu kinetik bir kuvvetle uyarabilmek için uygulanan sonikasyon işleminin süresi optimize edilmiştir. Nanokürelerin eldesinde sonikasyonun etkisi NR belirteç boyasının enkapsülasyonu yolu ile membran polarizasyonunun ölçülmesi ile tartışılmıştır. Bunun için, 0.5 mg/mL KZ çözeltisi (pH 5.6) sonik su banyosuna yerleştirilerek, 40 µL stok NR çözeltisi bu çözelti içerisine eklenmiştir. Daha sonra farklı zaman aralıklarında sonikatör (RT, 240 W, 40 kHz) içerisinde bekletilen örneklerin absorban değerleri ölçülmüştür.

3.2.5. KZ Nanoparçacıkların Morfolojik Özelliklerinin TEM ve SEM Cihazları ile Analizi

Parçacıkların, TEM ile görüntülenmesinde, 0.5 mg/mL KZ varlığında elde edilen nanoküreler, su içerisinde 10 kat seyreltilmiştir. Formar kaplı bakır gridleri üzerine 20 µL örnek eklenmiş ve filtre kağıdı üzerinde 1 dk süresince kurumaya bırakılmıştır. Ardından örnekler tersiyer fiksatif olarak uranil asetat ile muamele edilmiş ve oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Hazırlanan örnekler JEOL TEM (100kV) ile incelenmiştir.

SEM ile görüntüleme ise, vakumlu etüvde kurutma (Metod I) ve liyofilizasyon (Metod II) teknikleri kullanılmıştır. Metod I için, Wang ve arkadaşlarının prosedürüne göre vakumlu etüvde kurutma yöntemi denenmiştir [50]. Bu metoda göre, sulu nanoküre çözeltisi vakumlu etüvde 60°C' de 1 gece boyunca kurutulmuş ve elde edilen toz form numune kabından kazanmıştır. Nep ve Conway' in dondurarak kurutma metoduna (Metod II) göre [51], sulu nanoküre çözeltisi liyofilizasyona hazırlanmak için önce -20°C' de 2 saat, ardından -80°C' de bir gece donmaya bırakılmıştır. Donmuş olan çözelti, liyofilizatöre koyulmuş ve kuruyana kadar beklenmiştir. Elde edilen kuru örnek HR-SEM ile incelenmiştir.

3.2.6. Elde Edilen KZ Nanoparçacıklara AST-VII Entegrasyonu

Bu aşamada, elde edilen nanokürelere AST-VII entegrasyonu çalışmaları başlatılmıştır. Bunun için önceki in vivo çalışmalarda AST-VII' nin etkin konsantrasyonunun 100 katına denk gelen 0.1 mg/mL konsantrasyonla başlanmış, öncelikle kuru KZ ile AST-VII karıştırılmış, daha sonra bu karışım toplamda 0.5 mg/mL KZ olacak şekilde su içerisinde çözünmüştür. Elde edilen karışım uzun süre vortekslenmiş, ardından sonikasyon işlemine geçilmiştir. Kurutulmadan sıvı içerisinde bulunan numune TEM ile görüntülenmiştir.

3.2.7. Kolesterol Miktarının KZ Nanoparçacıklarının Oluşumu Üzerine Etkisi

AST VII entegrasyonu başarı olmadığı için, elde edilen KZ nanokürelere AST-VII entegrasyonunu sağlamak amacı ile ISCOM' dan esinlenerek saponinlerle etkileşime girdiği bilinen kolesterolün (Kol) Ast-VII varlığında nanokürelerin morfolojik bütünlüğüne etkisi incelenmiştir.

Bunun için nanoformülasyona Tablo 3.1.' de gösterilen oranlarda kolesterol eklenmiştir, bu oranlar kütlece kolesterolün toplam KZ+Kol' e oranı olarak (%) hesaplanmıştır (%0-90). Sadece KZ' nin kullanıldığı sisteme Ast-VII' nin yüklenemediğini görüldüğü için Kolesterol ile saponin arasında ki etkileşimin, Ast VII' nin sisteme eklenmesini arttıracığı ve oluşan bu olumsuzluğu ortadan kaldıracığı düşünülmüştür [52].

Daha önce yapılan çalışmalarda optimum konsantrasyon olarak belirlenen 0.5 mg/mL KZ çözeltisi ile (pH 5.6), toplam madde içeriği 7.5 mg olacak şekilde farklı kolesterol miktarlarında (0, 0.5, 1.25, 2.5, 3.75, 4.5 mg) AST VII/KZ/Kolesterol çözeltileri hazırlanmıştır. Ve karışımdaki % içeriği olacak şekilde kodlanmıştır.

Tablo 3.1. Farklı kolesterol miktarlarında hazırlanan çözeltiler.

KZ (mg)	AST VII (mg)	Kolesterol (mg)	Toplam (mg)	Toplam hacim (mL)	% ağırlık (KZ+Kol)/ % ağırlık Kol
5.00	2.5	0.00	7.5	5	0
4.50	2.5	0.50	7.5	5	10
3.75	2.5	1.25	7.5	5	25
2.50	2.5	2.50	7.5	5	50
1.25	2.5	3.75	7.5	5	75
0.50	2.5	4.50	7.5	5	90

Yapılan çalışmalarda kolesterolü çözmek amacıyla önce kolesterol 200 µL etanolde çözülmüş, AST VII ve KZ içeren örnekler ise distile suda hazırlanmış ve sonik su banyosunda (RT, 240 W, 40 kHz) 30 dakika ayrı ayrı bekletilmiştir. Daha sonra her bir çözelti için hazırlanan AST VII, sonikatör esnasında KZ çözeltilerine damla damla ekleme yöntemiyle [53] eklenmiş ve ekleme sırasında homojenizatör yardımıyla homojenlik sağlanmıştır. Farklı operasyon sürelerinde istenilen sıcaklıkta sonike edilmiştir.

Kolesterol ve AST VII içeren KZ Nanoparçacıklar, "ASTCOLNP" olarak kodlanmıştır.

3.2.8. Tampon Çözeltilerin Farklı Kolesterol Oranlarında ASTCOLNP' lerin Çapı ve Parçacık Yüzey Yükü Açısından Karşılaştırılması

Nanoparçacıkların ve nanovesiküllerin kendiliğinden toparlanma (Self-assembly) ile oluşumu süreci ortamın iyonik kuvveti ve pH' dan oldukça etkilenmektedir. Biyolojik çalışmalarda kullanılan çeşitli tampon çözeltileri bu nedenle parçacıkların oluşumu ve yüzey yükleri, dolayısı ile agregasyona karşı korunumları açısından denenmiştir. Bunun için, tampon çözeltileri olarak ddissu yerine 0.01 M PBS, 0.5 M MES ve 0.1 M HEPES kullanılmıştır. Tablo 1' de gösterilen örnekler aynı şekilde hazırlanmış ve karakterize edilmiştir. HEPES tampon çözeltisinde hazırlanan %25 kolesterol içerikli seçilen formülasyonda nanokürelerin farklı pH'lardaki parçacık çapı ve yapısal davranışlarını incelemek amacıyla pH ayarlamaları yapılmıştır. Bunun için aynı formülasyondan çözeltiler hazırlanmış ve 0.1 M NaOH ve 0.1 M HCl

çözeltileri ile farklı pH' larda örnekler elde edilmiş ve bu pH' lardaki parçacık çapı ve zeta potansiyel değerleri zeta sizer cihazı ile ölçülmüştür.

3.2.9. Tampon Çözeltilerin Farklı Kolesterol Oranlarında ASTCOLNP' lerin İç Polaritesi Üzerindeki Etkisi

AST VII moleküllerinin KZ nanokürelerine katılması, kolesterolün oluşturacağı yüzey polaritesinde ki değişiklikler Nile Red floresans boyası ile ölçülmüştür. Nile Red' in hassas bir polarite ajanı olarak kullanılabilirliği ile ilgili floresans ölçümleri Sardan ve ark. Tarafından liozomlar üzerinde gösterilmiştir [54]. Nile Red boyası sulu ortamlarda genellikle renksizdir. Ancak hidrofobik boyanın çevresindeki değişimler nanokürelerin polarlığını apolarlığa çevirir ve bu da floresans emisyonunda artışa veya düşük dalga boylarında kaymaya sebep olur [54]. Böylece KZ' nin farklı kolesterol oranlarındaki Nile Red çözünürlüğü ölçüldü ve AST VII enkapsüle edebilen ve edemeyen nanokürelerin varlığı karşılaştırıldı. Bunun için, örnekleri içeren çözeltilere 25 µL Nile Red stok çözeltisinden (50 µM) eklendi. KZ nanokürelerinin floresans yoğunluğu ($\lambda_{exc} = 520 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 525-800 \text{ nm}$) Cary Eclipse Floresans Spektrofotometresi ile ölçüldü. Nile Red floresans yoğunluğu, boyanın çevre polaritesine duyarlılığı sayesinde ölçülmüş ve farklı konsantrasyonlardaki çözeltilerin AST VII moleküllerini içeren ve içermeyen nanokürelerin varlığı karşılaştırıldı.

Seçilen %25 kolestrollü KZ çözeltinin homojenitesini arttırmak ve parçacık oluşumunu kinetik bir kuvvetle uyarabilmek için sonikasyon işlemi uygulanmıştır. Sonikasyon süresinin nanokürelerin morfolojik ve yapısal özelliklerini incelemek amacıyla sabit sıcaklıkta ve farklı zaman aralıklarında sonikatör içerisinde bekletilen örneklerin TEM görüntüleri, parçacık çapları ve potansiyelleri incelenmiştir.

3.2.10. Nanokürelerin Orta Ölçekte Üretimi ve Karakterizasyon Çalışmaları

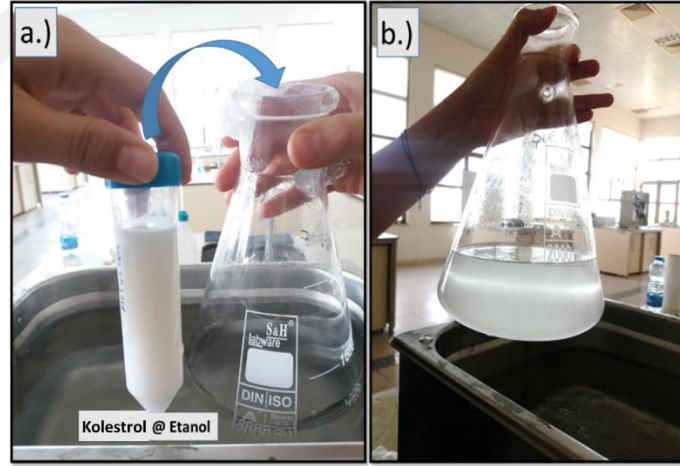
3.2.10.1. 1 L Toplam Hacimde Üretim

Başlangıç olarak 1.5 gr toplam formülasyon içeriği için üretim süreci denenmiştir. Bunun için; 750 mg KZ, 65 °C ısıtılmış su banyosu içerisinde bekletilmiş 0,1 M HEPES çözeltisine karıştırmalı homojenizatör varlığında kademeli olarak eklendi (Şekil 3.2.). Karıştırma işleminden sonra, yine 65 °C' de ısıtılmış sonik banyoya alındı ve içerisine 500 mg AST VII HEPES çözeltisinde çözülüp kademeli olarak eklendi ve karışım homojen bir görüntü alınca kadar sonikatörde yarım saat bekletildi. Bu sırada 250 mg kolesterol, 40 mL etanolde çözüldü ve sonik su banyosunda karıştırılmaya bırakıldı. Sonik su banyosu 65 °C' ye ulaştığında AST VII karışımı, yavaşça

erlendeki KZ çözeltisine eklendi (Şekil 3.3) Birlikte 60 dk boyunca sonikatörde bekletildi ve daha sonra oda sıcaklığında soğumaya bırakılıp analiz için hazırlandı.



Şekil 3.2. KZ çözeltisinin karıştırıcıda karıştırılması.



Şekil 3.3. Orta ölçekte ASTCOLNP çözeltisinin yapımı.

3.2.10.2. 4 L-20 L Toplam Hacimde Üretim

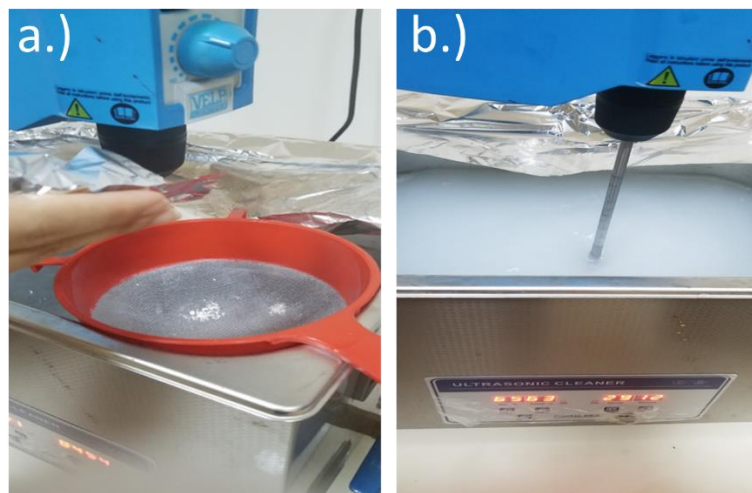
1 L' lik formülasyonun eldesinden sonra 4 L ve 20 L hacimlerde ölçek büyütme çalışmaları yapılmıştır. İlk olarak, 4 L' lik üretim için 95.2 g HEPES distile su ile çözdürülmüş ve pH' ı 0.1 M HCl özeltisi kullanılarak 5.5 değerine getirilmiştir. Sonikatör tankı seri etanol ve su yıkamaları ile temizlenmiş ve üretim doğrudan tank içerisinde gerçekleştirilmiştir.

1. aşamada 4 L HEPES içerisinde 40 mL, AST-VII çözeltisinin hazırlanması için ayrılmıştır. 3.96 L' lik HEPES çözeltisi sonikatör tankına aktarılmış ve tank sıcaklığı 65 °C' ye ayarlanmıştır. Bu sırada, 1 g kolesterol 40 mL etanol içerisinde ve 2 g AST VII ise ddsu içerisinde 65 °C' ye ayarlanmış ayrı birer su banyosunda karıştırmaya bırakılmıştır.

2. aşamada ilk olarak sadece sonikasyon varlığında gerçekleştirilmiş olup, KZ' nin bu skalada doğrudan su ile karışmasında jelimsi topakların oluştuğu gözlenmiştir. Bu nedenle topaklanmayı engellemek için çalışma, ek olarak homojenizatör (Şekil 3.2.) varlığında devam ettirilmiştir. Her iki üretime ait sonuçlar aşağıda raporlanmıştır. Sonikatör suyunun sıcaklığı, 65 °C' ye geldiğinde homojenizatör 600 dev/dk' ya ve sonikasyon süresi ise 30 dakika ayarlanmıştır. Bu sırada, 3 g KZ homojenizatörün bıçaklarına veya tankın yüzeyine gelmeyecek şekilde bir elek yardımı (Şekil 3.4.a.) ile yavaş yavaş HEPES içerisine eklenmiştir. Topaklanma olmaması için bu süreç dikkatli ve periyodik olarak gerçekleştirilmiştir. KZ' nin tamamı HEPES içerisine eklenip homojen bir çözelti elde edilene kadar yaklaşık 30 dk sonikasyona ve karıştırmaya devam edilmiştir. Karıştırma ve sonikasyon sonraki her aşamada kullanılmıştır.

3. aşamada elde edilen homojen KZ çözeltisi içerisine önce AST-VII çözeltisi damla damla eklenmiş ve 10 dk sonikasyon süresi sonunda saydam bir çözelti elde edilmiştir.

4. aşamada etanol içerisinde tamamen çözdürülmüş olan kolesterol (askıda veya dipte çözünmeyen malzeme kaldıysa vorteks ve sonikasyon yardımı ile çözdürülür) yine damla damla KZ/AST-VII çözeltisi içerisine karıştırmanın olduğu yerden eklenmiştir. Elde edilen beyaz karışım (Şekil 3.4.b.) sonikatörde 1 saat homojenizatör varlığında karıştırılmıştır. Bu süreçlerde su kaybını engellemek için tank kapağı kapalı tutulmuştur.



Şekil 3.4. Toz KZ' nin homojenizatör varlığında elek yardımı ile üretim tankına eklenmesi.

Aşama 5. 1 saat sonunda hazırlanan formülasyon önce oda sıcaklığında soğumaya bırakılmış daha sonra da buzdolabına +4 °C' de ileri analizler için stoklanmıştır. 20 L' lik KZ formülasyonu 4 L' de yapılan aşamalar bire bir takip edilerek üretilmiştir. Elde edilen nanokürelerin şekilsel ve parçacık boyut analizi geçirimli elektron mikroskopu, parçacık boyut dağılımı ve yüzey yükleri ise Malvern Zeta Sizer NanoZS ile ölçülmüştür.

3.2.11. Nanokürelerin Kurutulması

Nanokürelerin kurutulması işleminde püskürtmeli kurutucu ve liyofilizatör ile kurutmaya dair ön çalışma başlatılmıştır. Kurutma sonrası örnekler suda çözülürülerek 1/10 oranında HEPES' le dilüe edilmiştir. Örneklerin partikül büyüklüğü ve yüzey zeta potansiyelleri 3 tekrarlı olacak şekilde analiz edilmiştir.

Liyofilizasyon tekniği, Nep ve Conway' in dondurarak kurutma metoduna göre [51] yapılmıştır. Bu metoda göre orta ölçekte hazırlanan ASTCOLNP çözeltisinin bir miktarı liyofilizasyona hazırlanmak için önce -20 °C' de 2 saat, ardından -80 °C' de bir gece donmaya bırakılmıştır. Donmuş olan çözelti, liyofilizatöre koyulmuş ve kuruyana kadar bekletilmiştir (Şekil 3.5.). Elde edilen bir miktar kuru örnek HEPES içerisinde çözülmüş, parçacık çapı ve zeta potansiyel değerleri incelenmiştir.



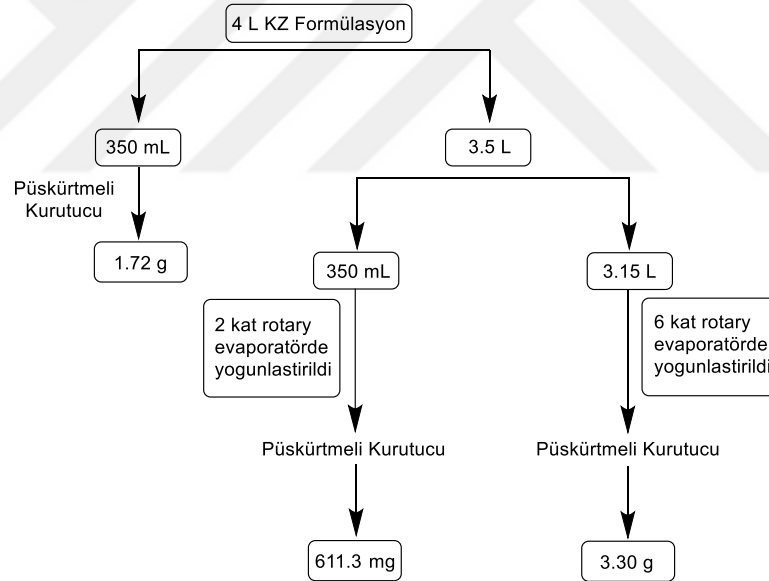
Şekil 3.5. Liyofilizasyon tekniği ile kurutulan numuneler.

Sprey (püskürtmeli) kurutma tekniği, Jin ve Deng' in sprej kurutma metoduna göre [33] yapılmıştır (Şekil 3.5.). Bu metoda göre elde edilen örneklerin yüzey görüntüleri SEM cihazında incelenmiştir. Püskürtmeli kurutucu için çözelti yoğunluğu düşük geldiğinden öncelikle, 4 L' lik üretim 2 ve 6 kat konsantre edilmiş ve püskürtmeli kurucuya (Şekil 3.6.) verilmiştir

(Yoğunlaştırılmış püskürtmeli kurutucu: YPK-2 ve YPK-6). Konsantre edilen hacimler ve oranlar Şekil 3.7.' de verilmiştir.



Şekil 3.6. Sprey kurutucu cihazı



Şekil 3.7. 2 ve 6 kat konsantre 4 L' lik üretimin püskürtmeli kurutucuda kurutulması.

3.2.12. HPLC Analizi Nanoformülasyonun İhtiva Ettiği AST-VII Miktarının Belirlenmesi

50 mL' lik hacimsel bir balon joje içinde yaklaşık 25 mg AST-VII Referans Standardı çözülmüş, MeOH ile balon joje hacmine kadar tamalanmış ve karıştırılmıştır. Aynı işlem test edilecek olan YPK-2 ve YPK-6 örneklerine yapılarak test solüsyonu hazırlanmıştır. Kör olarak kullanılan MeOH 1 kez, referans ve test edilecek nanoformülasyon ise 3 kez enjekte edilmiştir. Analiz koşulları Tablo 3.2.' deki gibidir:

Kolon sıcaklığı: 35 °C
 UV: 203, 205, 210 ve 254 nm
 Örnek hacmi: 5 µL
 Metot süresi: 15 dk
 Yıkama süresi: 5 dk (ACN; 0.5 mL/dk)
 Şartlama süresi: 5 dk
 A Akımı: Ultra Saf Su (USS)
 B Akımı: Asetonitril (ACN)

Tablo 3.2. HPLC Analiz metodu

Zaman (dk)	Akış Hızı (mL/dk)	A: Ultrasaf Su (%)	B: HPLC Grade Asetonitril (%)
0.0	0.75	70	30
1.5	0.75	70	30
11.5	0.75	45	55
13.0	0.75	45	55
13.01	0.75	70	30
15.0	0.75	70	30

HPLC analizi sonrası, 3 kere enjekte edilen referans çözeltisi ile test solüsyonunun alanlarının ortalaması alınmıştır. Test edilen örneğin tahlili ortalama standart alanla ayrı olarak hesaplanmıştır. Ardından AST-VII tahlili (%) bulunmuştur.

$$\text{AST-VII Tahlili (\%)} = \frac{A_1 \times \left(m_2 \times \frac{100-L_2}{100} \right) \times P}{A_2 \times \left(m_1 \times \frac{100-L_1}{100} \right)}$$

A1 = Test solüsyonu ile elde edilen kromatogramda AST-VII' ye bağlı pik alanı;

A2 = Referans solüsyonu ile elde edilen kromatogramda AST-VII' ye bağlı zirvenin alanı;

m1 =Test edilen AST-VII preparasyonunun mg cinsinden kütlesi;

m2 = Referans standardının kütlesi mg cinsinden;

p1 = Referans standardında AST-VII yüzdesi;

L1 = Test edilecek AST-VII su içeriğinin % ' si;

L2 = Standardın su içeriğinin % ' si.

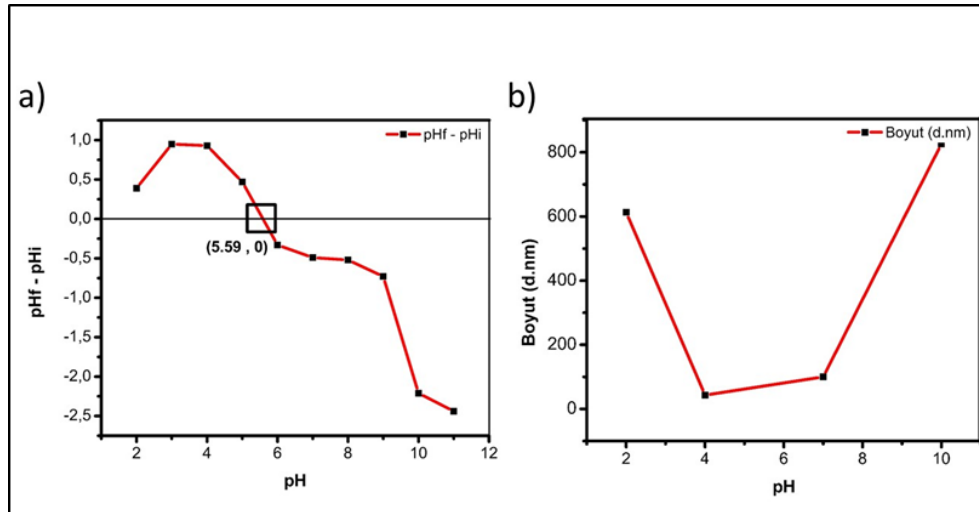
4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. KZ' nin İzoelektrik Noktasının Belirlenmesi

Kitre zamkının izoelektrik noktası katı ekleme metodu ile elde edilmiştir (Tablo 4.1.). Şekil 4.1.a' da da verildiği gibi çizilen grafikteki noktaların x eksenini kestiği pH olan 5.59, zamkın izoelektrik noktası olarak belirlenmiştir. Bu değer literatürde belirtilen değerlerle uyumludur [1]. Şekil 4.1.b' de farklı pH' larda hazırlanan, 0.4 mg/mL KZ çözeltilerinin KNO₃ eklenmeksizin ölçülmüş hidrodinamik çapları (Rh) gösterilmiştir. Beklendiği üzere izoelektrik noktaya yakın değerlerde parçacık Rh' sı 40-50 nm değerlerine düşmektedir. İleri ki çalışmalarda bu değer nanoformülasyonların eldesinde kullanılmıştır.

Tablo 4.1. İzoelektrik nokta ilk ve son pH değerleri.

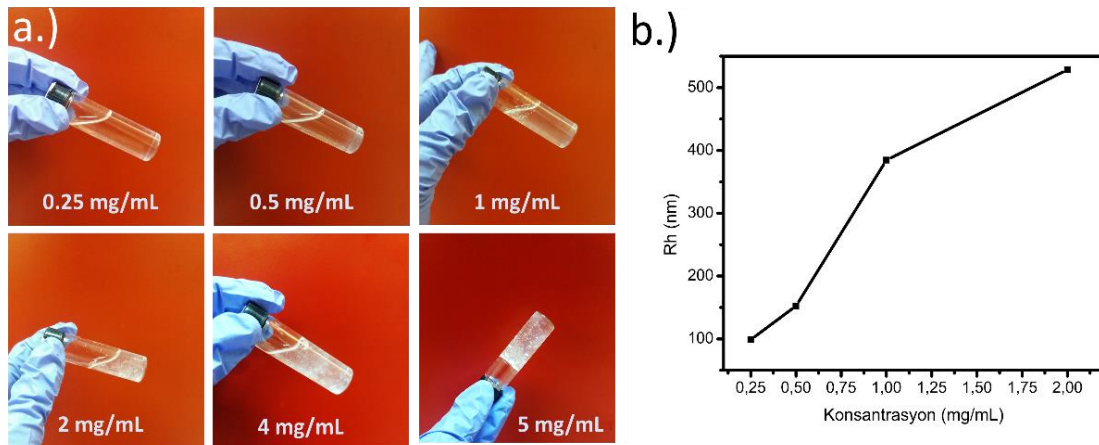
pH	pHi	pHf	ΔpH
2	2.06	2.45	0.39
3	3.04	3.99	0.95
4	4.05	4.98	0.93
5	5.07	5.54	0.47
6	6.08	5.75	-0.33
7	6.55	6.06	-0.49
8	7.28	6.76	-0.52
9	7.33	6.6	-0.73
10	9.12	6.91	-2.21
11	10.55	8.11	-2.44



Şekil 4.1. KZ' nin izoelektrik noktası (a), KZ nanoparçacıklarının hidrodinamik çaplarının pH ile değişimi (b).

4.2. Kritik Agregasyon Konsantrasyonu (KAK)

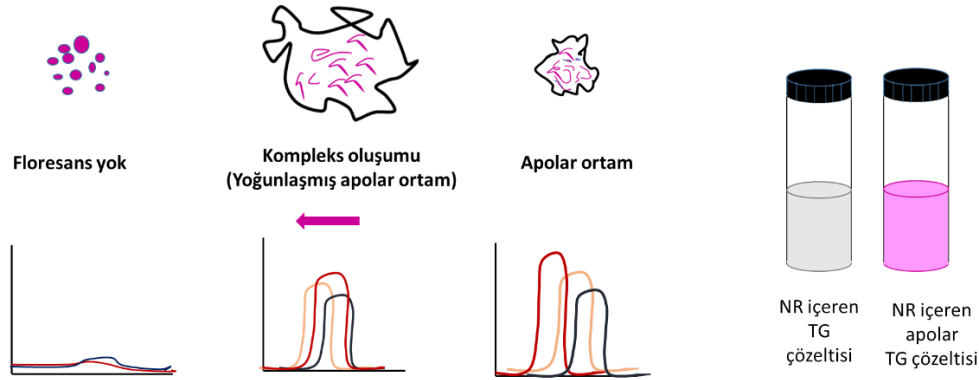
KZ' nin farklı konsantrasyonları (0.25, 0.5, 1, 2, 4, 5 mg/mL) su içerisinde çözülmüş ve KZ konsantrasyonu arttıkça çözeltinin jelleştiği görülmüştür (Şekil 4.2.a). Bunun için optimum konsantrasyon olan 0.5 mg/mL KZ çözeltisi seçilmiştir. Şekil 4.2.b' de TG konsantrasyonu arttıkça hidrodinamik çapların da arttığı görülmüştür. Bu nedenle seçilen konsantrasyondaki KZ çözeltisinin (0.5 mg/mL) parçacık çaplarının nanotaşıyıcı sistem için uygun olduğu düşünülmüştür.



Şekil 4.2. (a) TG' nin konsantrasyona göre jelleşmesini gösterir şekil ve (b) bu konsantrasyonlardaki hidrodinamik çapları (Rh).

Makromoleküller, çözeltideki belirli ve kritik misel konsantrasyonu denilen dar bir konsantrasyon aralığında bırakıldığında, birkaçı, misel denilen kendiliğinden oluşan kolloidal boyutlu parçacıklar oluşturur. Misellerin oluşumu, molekülleri çevreleyen su molekülleri ve

hidrofobik gruplar arasındaki istenmeyen etkileşimleri azaltır. Eğer çözeltideki makromolekül konsantrasyonu KAK'ın üzerinde kalırsa, agregatlar ayrılmaya karşı termodinamik olarak stabilize olur. KAK'ın altında ise makromoleküller arası etkileşimler azalır ve yapı bozulur.



Şekil 4.3. Kritik misel konsantrasyonunu açıklayan şekil.

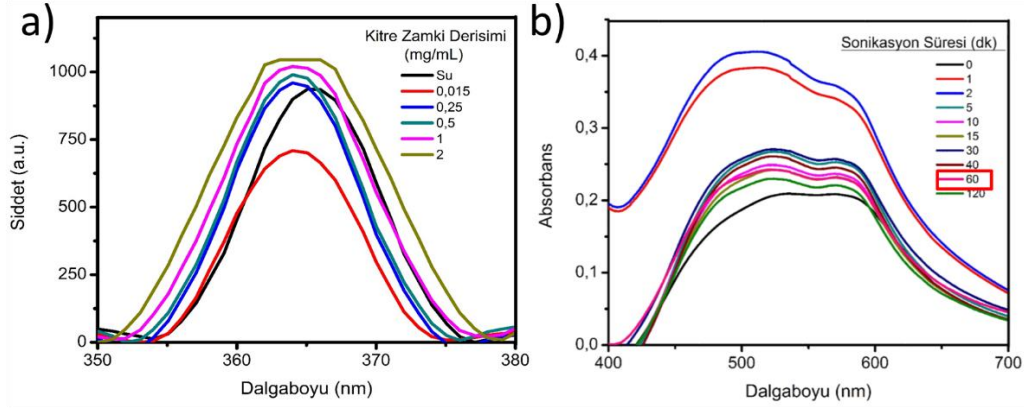
NR oldukça kuvvetli floresans özellik gösteren salvatokromik bir moleküldür ve hidrofobiktir. Değişik çözümlerde değişik karakter sergileyen bu molekül, bu özelliğini görünür ışık spektrumunun farklı bölgelerinde emisyon ile gösterir. Bu sayede NR bulunduğu ortamın polarite derecesinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Polarite yükseldikçe floresans kırmızı bölgeye kayarken, düştüğünde mavi bölgeye doğru kayma gösterir. NR'nin bu özelliği, KAK'nın belirlenmesinde sıkça kullanılmaktadır [3].

Nanokapsüller oluşup NR bu kapsüller içerisine hapsediğinde floresans şiddeti artarken, oluşan ortamın polarlığına göre en yüksek emisyon dalga boyunda kaymalar gözlenmektedir. 0,025 mg/mL polimer konsantrasyonunda suya göre daha polar bir ortam oluşturmuştur. Konsantrasyon arttıkça polimerin nanoküre oluşturması sonucu NR indikatör boyası enkapsüle olmuş ve bunun sonucunda ortam apolarlığı artmaktadır. NR indikatör boyanın yardımı ile KAK değerinin belirlenmesinde artan floresans şiddeti ve tepe noktasının sola doğru kaydığı örnek 0.5 mg/mL polimer konsantrasyon değeri olarak gözlenmiştir (Şekil 4.4.a.). 0.5 mg/mL üzerindeki değerlerde, jelleşme görülmüştür.

4.3. Sonikasyon Süresinin KZ Nanoparçacıklarının Oluşumu Üzerine Etkisi

Şekil 4.4.b.'de gösterildiği gibi, 2. dk'dan itibaren absorbands değeri düşmüş ve bu şekilde artan NR enkapsülasyonu gözlenmiştir. 60 dk sonikasyon sonrasında, absorbands değerinin az da olsa tekrar yükseldiği görülmektedir. Daha uzun süre sonikatör kullanılmasının, hem enerji maliyetini arttıracak hem de parçacıklarda kayıplara sebep olabilecek olması nedeniyle 60 dk sonikasyon süresi optimum olarak belirlenmiştir. Bu değerde parçacıkların Rh değeri

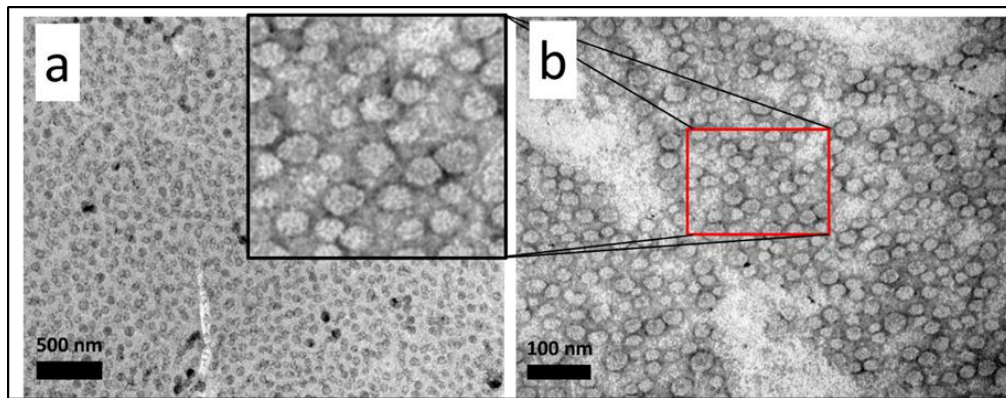
ölçüldüğünde 45 nm çapında, 0.22 polidispersite değerine sahip nanokürelerin elde edilebildiği görülmüştür.



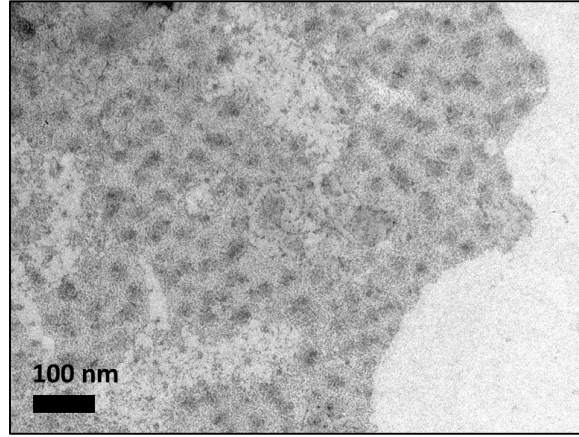
Şekil 4.4. NR' nin KZ çözeltisinin değişik konsantrasyonlardaki floresans şiddetine bağlı absorbans pH 5.5 ve 25 °C' deki değerleri (a). NR' nin KZ çözeltisinin değişik konsantrasyonlardaki sonikasyon süresine bağlı absorbans değerleri (b).

4.4. Elde Edilen KZ Nanoparçacıkların Görüntülenmesi ve Sulu Ortamdaki Stabiliteleri

Sıvı örnekler öncelikle geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile görüntülenmiştir. TEM görüntüleri incelendiğinde Şekil 4.5.' de görüldüğü üzere, yapılan hidrodinamik çap ölçümleri ile uyuşan şekilde oldukça homojen 40-50 nm arasında değişen çaplara sahip nanokürelerin hazırlanan protokolle elde edilebildiği gözlenmiştir. Şekil 4.6.' de görüldüğü gibi, elde edilen nanoküreler asidik pH' ya duyarlıdır ve kapsül yapıları bu pH' de bozulmaktadır.



Şekil 4.5. KZ nanokürelerinin değişen büyütmelerdeki TEM mikrografisi.

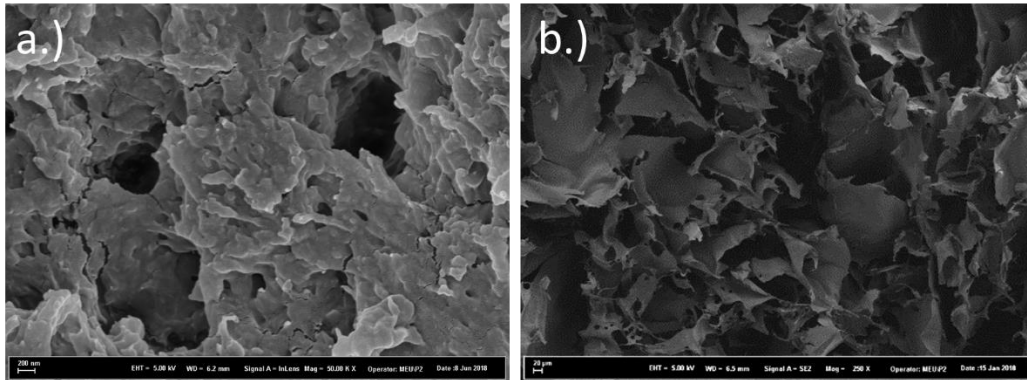


Şekil 4.6. Nanokapsüllerin asidik pH 3' de bozunduğunu gösterir TEM görüntüleri.

4.5. Elde Edilen KZ Nanoparçacıkların Kurutulması

Nanoparçacıkların saklanması, uzun saklama koşullarında dayanımlarının artırılması ve ileri ki aşamalarda tablet formuna dönüştürülebilmesi için kurutma aşaması büyük önem taşımaktadır. Elde edilen parçacıklar iki farklı yöntemle kurutulmaya çalışılmıştır. Bu yöntemlerden birincisi, vakumlu etüv kurutma ve ikincisi liyofilizasyon ile kurutmadır.

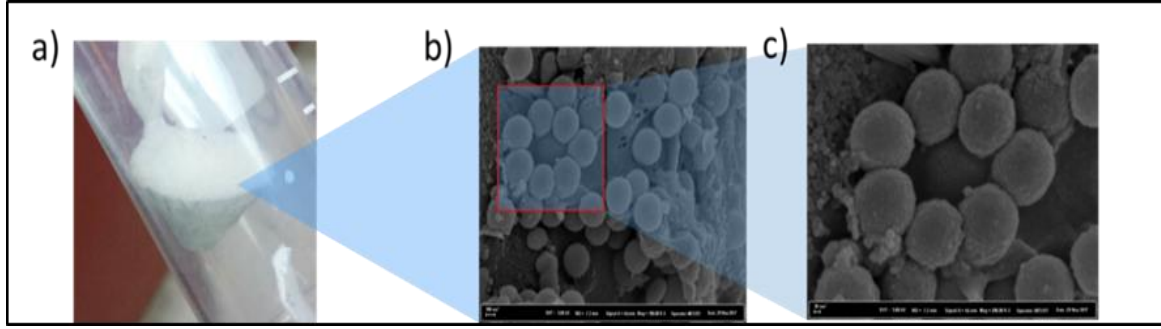
Kurutma Metodu I: Sulu nanoküre çözeltisinin vakumlu etüvde 40 °C' de 24 saat boyunca kurutulması sürecinde nanokürelerde yapışma ve saf kitre zamkı benzeri makroyapılar gözlemlenmiştir (Şekil 4.7.). Örnek büyük oranda bozulmuştur.



Şekil 4.7. (a) KZ nanoyapısı ve (b) nanoyapıların vakumlu etüvde kurutulduktan sonraki 250 kX HRSEM görüntüleri.

Kurutma Metodu II: Liyofilizasyon ile yapılan kurutmada toz değil, süngerimsi bir oluşum gözlenmiştir (Şekil 4.8.a.). Bu sünger malzemedan alınan bir kesit HR-SEM ile incelenmiştir. SEM görüntüleri Şekil 4.8.b. ve Şekil 4.8.c.' de görülmekte olup süngerimsi yapı birbirine tutunmuş oldukça düzenli şekle sahip 100 nm civarında nanoyapılardan oluşmaktadır. Fakat bu yapıların

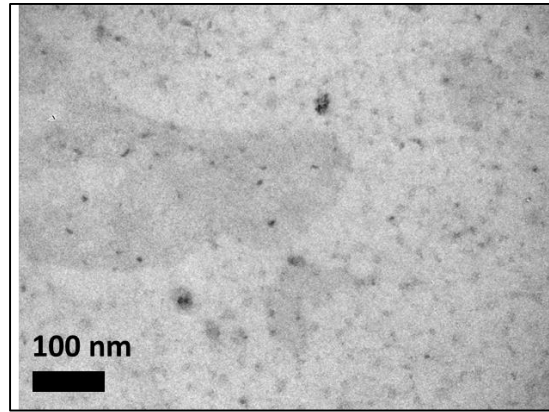
etrafını saran dağılmış zambak çeper, liyofilizasyonun bu şekliyle yeterli bir kurutma yöntemi olmadığı ve yapışmaları engellemediğini göstermektedir.



Şekil 4.8. Liyofilizasyon sonrası elde edilen nanokürelerin oluşturduğu A. Süngerimsi yapı ve KZ nanokürelerinin farklı büyütme ölçeklerinde çekilmiş HRSEM görüntüleri b. 100kX ve c. 200kX.

4.6. Elde Edilen KZ Nanoparçacıklara AST-VII Entegrasyonu

Bu aşamada, elde edilen nanokürelere AST-VII entegrasyonu çalışmaları başlatılmıştır. Nanokürelerin yapımında aynı yöntem kullanılmıştır. 0.1 mg/mL AST-VII' nin 0.5 mg/mL kitre zambakı içerisine hapsedilmesi amaçlanmıştır. Elde edilen sıvı örnek, uranil asetatla boyanarak, TEM ile görüntülenmiştir (Şekil 4.9.). TEM görüntüleme çalışmalarında herhangi bir nanoküre oluşumu gözlenmemiştir.



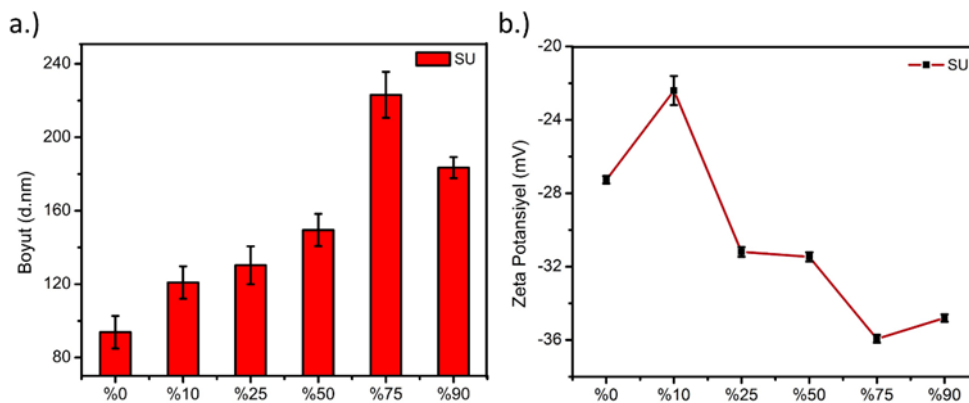
Şekil 4.9. AST-VII içeren nanokapsüllerin oluşumuna etkisini gösterir TEM görüntüsü.

4.7. Kolesterol Varlığında AST-VII Entegrasyonunun İncelenmesi

4.7.1. Tampon Çözeltilerin Farklı Kolesterol Oranlarında ASTCOLNP' lerin iç polaritesi üzerindeki etkisi

AST VII' nin TG içerisine hapsedilemediğinden dolayı, farklı olarak saponin türevleri ile birlikte antijen, kolesterol ve fosfolipid içeren kompleks bir adjuvan olan ISCOM' dan (immünostimulan kompleks) esinlenerek formülasyona kolesterol eklenmesine karar verilmiştir. ISCOM, hem hücrel hem de hümoral immün yanıtı arttıran bir saponindir ve insan için üretilen HIV ve İnfluenza aşılarında klinik denemelerin yapıldığı bildirilmiştir [54, 55].

Kolesterolün camsı erime sıcaklığı (T_g) yani katı-camsı halden sıvı-jel hale dönüşme sıcaklığı kolesterol varlığında değişmektedir. Artan sıcaklıklarda daha esnek bir membran yapı ve düzensizlik elde edileceğinden, sıcaklık değişiminin parçacık oluşumuna etkisi incelenmiştir. Kolesterolün camsı geçiş sıcaklığı $65\text{ }^\circ\text{C}$ olduğu için, çalışmalar bu sıcaklığın üzerinde bir sıcaklık olan $65\text{ }^\circ\text{C}$ ' de yürütülmüştür.

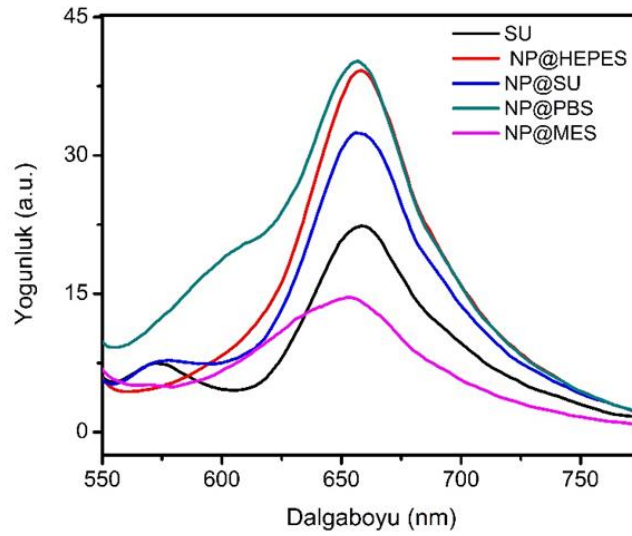


Şekil 4.10. Su içerisinde hazırlanmış ASTCOLNP' lerin (a) ortalama hidrodinamik çap dağılımları ve (b) buna karşı gelen yüzey yüklerindeki $65\text{ }^\circ\text{C}$ ve 60 dk sonikasyondan sonraki değişimleri.

Su içerisindeki formülasyonda kolesterol oranı arttıkça Rh artışı ve agregasyon gözlemlenmiş ve bu nedenle formülasyon, HEPES, MES ve PBS tampon çözeltileri içerisinde oluşturulmuştur (Şekil 4.10.).

Hidrofobik boyanın çevresindeki değişimler nanokürelerin polarlığını apolarlığa çevirir ve bu da grafikte sola kaymaya sebep olur (Şekil 4.11.). Zeta sizer cihazında Rh analizi yapılmış ve apolar bir boya olan Nile Red' in KZ' nin farklı tampon çözeltilerindeki çözünürlüğü bu adımda incelenmiştir. Pik noktaları Şekil 4.10.' de incelendiğinde, HEPES ve PBS içerisinde hazırlanan nanotaşıyıcıların Nile-red tutuklama yetilerinin daha yüksek olduğu ve daha apolar bir yüzeye

sahip oldukları görülmektedir. Bu da kolesterol ve AST-VII nin sisteme bu çözenler içerisinde daha iyi entegre olduğunun bir kanıtı olarak gösterilebilir. PBS ve diğer çözenlerde 550 nm ile 600 nm arasında ikinci bir pik oluşmuştur. Bu pik daha apolar ikinci bir nanotaşıyıcı varlığını da göstermektedir. Kolesterolün tek başına vesikül oluşturmuş olabileceği ihtimali bulunmaktadır. Bu nedenle HEPES' in iyi bir tampon çözelti olarak tercih edilebilecektir.



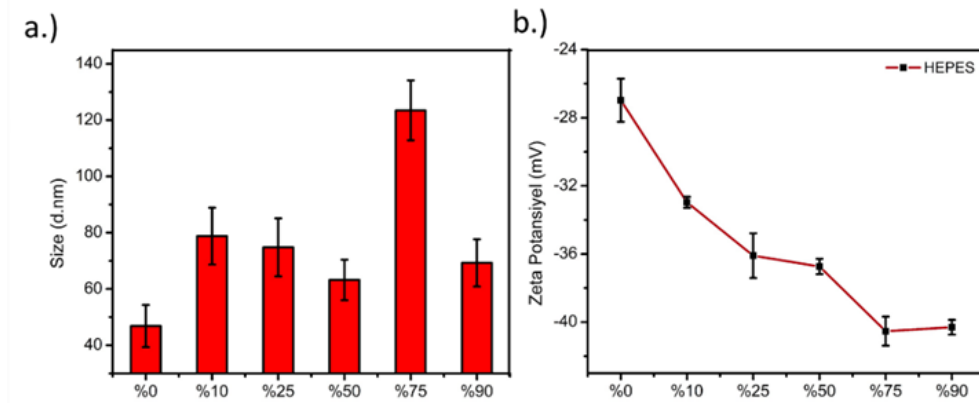
Şekil 4.11. Farklı tampon çözeltilerinde hazırlanan nanotaşıyıcılara NR hapsedildikten sonra ölçülen floresans şiddetlerinin karşılaştırılması.

HEPES ve PBS içerisinde hazırlanan nanotaşıyıcıların hidrofobik boya ile etkileşimi daha yüksek olup daha apolar bir yüzeye sahiptirler.

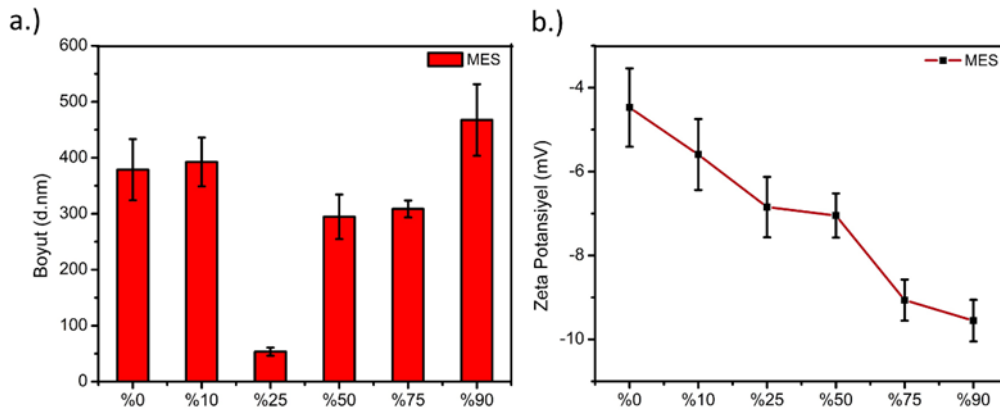
4.7.2 Tampon Çözeltilerin Farklı Kolesterol Oranlarında NP Çapı ve Parçacık Yüzey Yükü Açısından Karşılaştırılması

Şekil 4.12-4.14' de farklı kolesterol içeriklerinde, farklı tampon çözeltilerde hazırlanmış parçacıkların ortalama çap dağılımlarını ve buna karşı gelen yüzey yüklerindeki değişimleri görülmektedir. Deneyler bir önceki çalışmalarda olduğu gibi tüm çözeltilerin pH 5.5' e ayarlanması ile gerçekleştirilmiştir. Genel olarak kolesterol konsantrasyonu arttıkça parçacık çaplarında artış gözlenmektedir. Yaklaşık 80 nm' den %75 kolesterol oranında 220 nm' ye çıkan parçacık çapına karşın daha negatif bir parçacık yüzey görmekteyiz. Buna karşılık tampon çözeltiler kullanıldığında parçacık çapının genel olarak PBS ve HEPES' de 50-100 nm arasında kaldığı, MES' de ise parçacık hidrodinamik çapının 300 nm' ye çıktığını görmekteyiz. MES' in yüzey yük dağılımına baktığımızda -10 mV' ta kaldığı, bu da agregasyona uygun bir yüzey yüküne sahip olduklarını göstermektedir. HEPES içerisinde hazırlanan örnekler ise %25 kolesterol

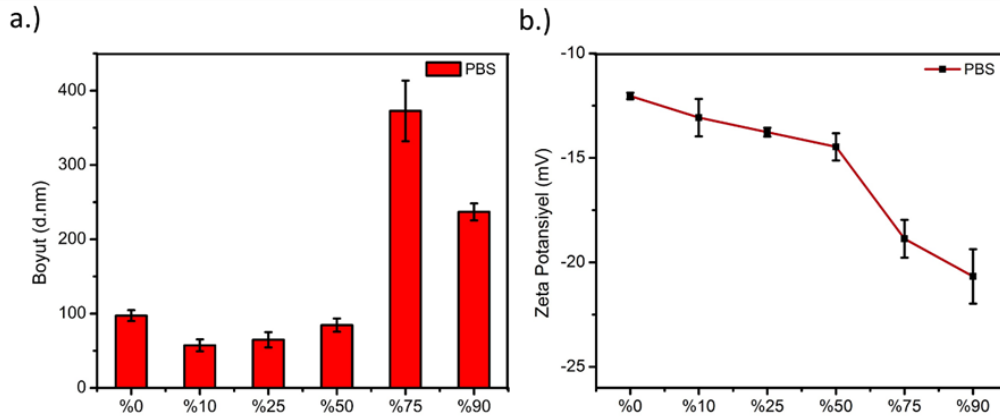
içeriğinden itibaren daha kararlı bir yüzey yükü (>-36 mV) ile sonuçlanmış ve parçacık hidrodinamik çapı 60–70 nm civarında kalmıştır (Grafik 4.11.). Asidik yapısı ile 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonik asit' in (HEPES)' in varlığının parçacıkları stabilize ettiği ve homojenitelerini sağladığı görülmektedir. Bu nedenle ileriki süreçte 0.1 M, pH 5.5 HEPES ile devam edilmesine karar verilmiştir. Şekil 4.15' de HEPES içerisinde hazırlanan örneklerin dijital görüntüleri verilmiştir. 24 saat sonrasında %50 kolesterol oranını aşan örneklerde çökmeler gözlenmeye başlamıştır. Bu da, apolar nanotaşıyıcıların hidrofobik etkileşimle zamanla agregasyonu olduğunu göstermektedir.



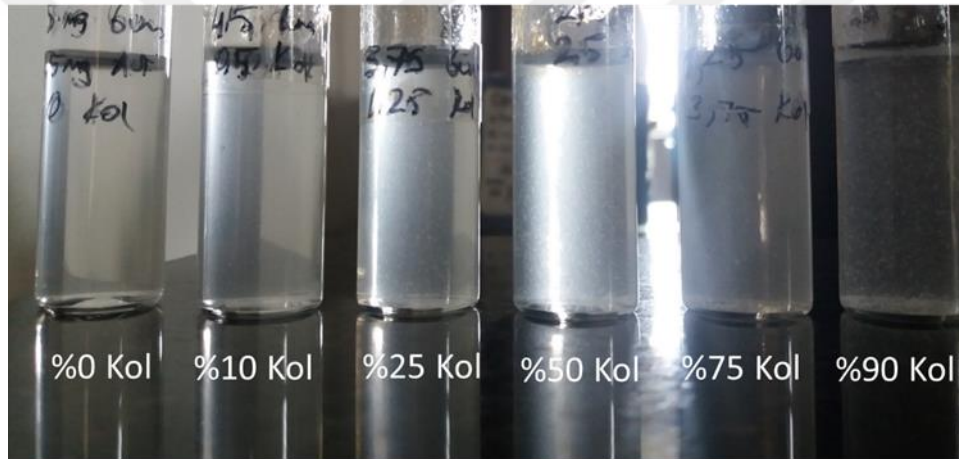
Şekil 4.12. HEPES içerisinde hazırlanmış ASTCOLNP' lerin (a) ortalama hidrodinamik çap dağılımları ve (b) buna karşı gelen yüzey yüklerindeki değişimler (65 °C).



Şekil 4.13. MES içerisinde hazırlanmış ASTCOLNP' lerin (a) ortalama hidrodinamik çap dağılımları ve (b) buna karşı gelen yüzey yüklerindeki değişimler (65 °C).



Şekil 4.14. PBS içerisinde hazırlanmış ASTCOLNP' lerin (a) ortalama hidrodinamik çap dağılımları ve (b) buna karşı gelen yüzey yüklerindeki değişimler (65 °C).



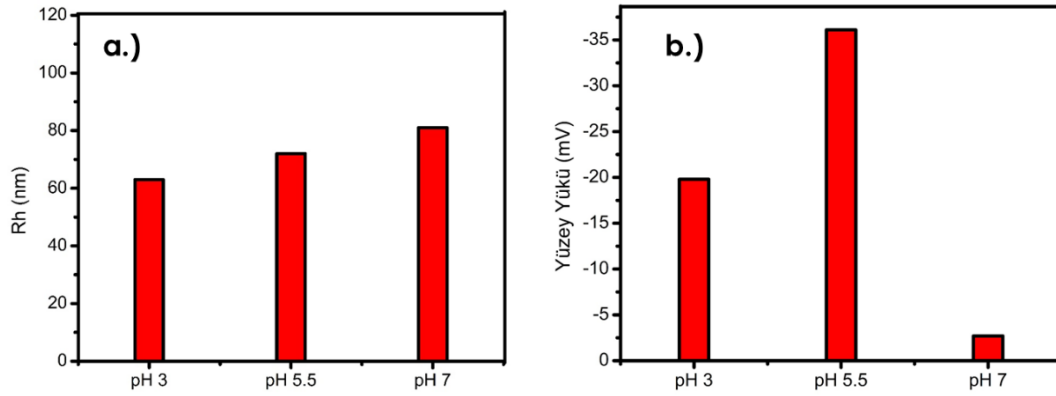
Şekil 4.15. Farklı kolesterol konsantrasyonlarında HEPES içerisinde hazırlanmış parçacıkların 24 saat sonrasında ait dijital görüntüleri. %50 kolesterol oranı geçildiğinde, bekletilen örneklerde çökmeler gözlenmiştir.

%25 kolestrol içeriğinden daha fazla olan kolestrol miktarlarında agregatlar gözlemlenmiş, sonraki çalışmalara %25 kolestrol içeren formülasyon optimize edilmiştir.

4.7.3. Değişen pH' larda HEPES İçerisinde Hazırlanan Nanotaşıyıcıların Hidrodinamik Çap (Rh) Ve Yüzey Net Yüklerindeki Değişimlerin Değerlendirilmesi

pH 5.5' de yapılan deneylerin yanı sıra, HEPES içerisinde farklı pH değerlerinde gerçekleştirilmiş, HEPES varlığından oluşan farklılıklar incelenmiştir. Bu incelemeler, parçacıkların hidrodinamik çaplarının dağılımı ve zeta potansiyel değerlerinin karşılaştırılması ile tartışılmıştır. Formülasyon içeriğinin izoelektrik noktasına göre belirlenen pH 5.5' den daha asidik (pH 3) ve daha bazik (pH 7) iki değer karşılaştırılmıştır. Şekil 4.16.' de gösterildiği üzere,

beklendiği gibi izoelektrik noktasının altında ve üstünde, parçacık çaplarının daha düşük ve daha yüksek, zeta potansiyellerinin ise pH 5.5' de elde edilen değerlere göre negatif yönde oldukça düşük kaldığı gözlemlenmiştir. Yüzey yükü negatif yönde arttıkça dayanımın artacağı için çalışmalara izoelektrik nokta pH' ı olan 5.5 ile devam edilmesine karar verilmiştir.



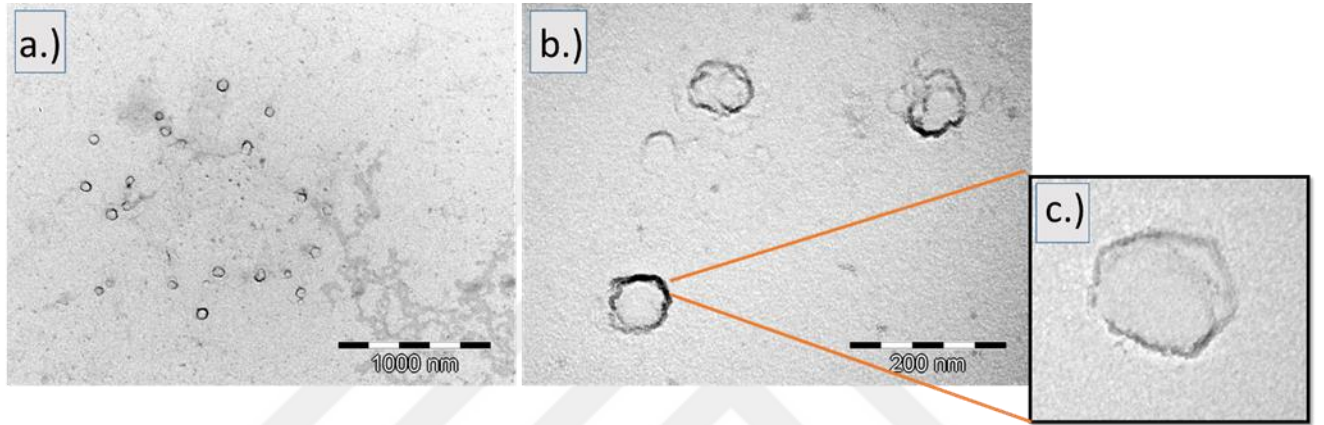
Şekil 4.16. HEPES içerisinde %25 kolesterol oranı ile hazırlanmış parçacıkların pH 3' de, izoelektrik nokta 5.5' da ve pH 7' de ortalama (a) hidrodinamik çap dağılımları ve (b) buna karşılık gelen yüzey yükleri.

4.7.4. ASTCOLNP' lerin Sonikasyon Süresinin Değerlendirilmesi

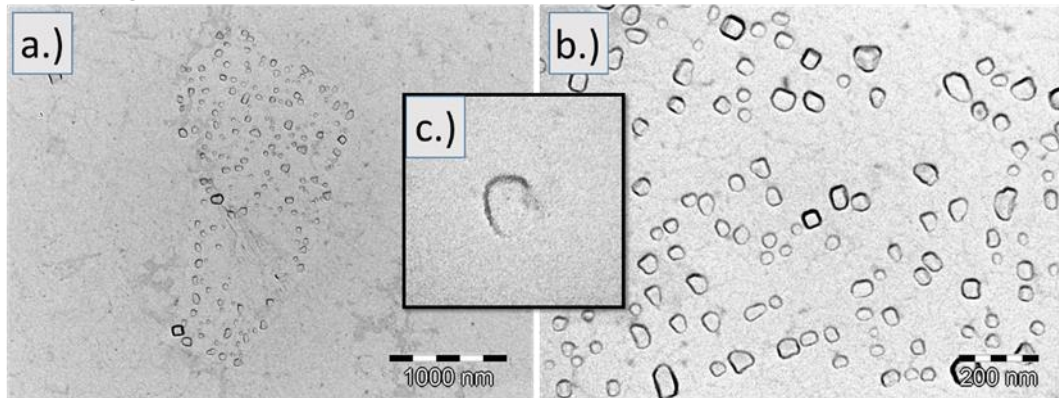
65 °C' de sonikatörde karıştırılan formülasyon içeriği, PDI değerinin düşürülmesi için sonikasyon süresi tekrar optimize edilmiştir. 30, 60 ve 120 dakika boyunca sonikasyon süresinin hidrodinamik çap üzerindeki etkisini gözlemlemek amacıyla sonikasyona bırakılmış, örnekler alınıp parçacık çapları ölçülmüş ve TEM ile morfolojik olarak incelenmiştir. Tablo 4.2.' de verilen sonuçlara göre 60. dakikada çözültideki nanoparçacıkların hidrodinamik boyut dağılımının 30. dakikaya göre yükselmesine rağmen, elektron mikroskopunda ölçülen ortalama değer ise 54.3 nm' de kalmıştır. Ayrıca, parçacık çap dağılımının homojenitesini göstermekte kullanılan polidispersite (PDI) değerinin 60 dakikalık sonikasyonda 0.5' in altına düşmüştür. 120 dakikalık sonikasyonda ise nanoparçacıkların hidrodinamik çapı artmıştır ve net yükü düştüğü için bu durum nanopartiküllerin raf ömrünü kısaltacaktır. Hidrodinamik çapı artmış olmasına rağmen TEM görüntülerinde herhangi bir parçacık çap büyümesi gözlenmemiştir (Şekil 4.17.). TEM şekillerine bakıldığında tüm (Şekil 4.17.-4.19.), parçacıkların morfolojisinde veya hidrodinamik çaplarında herhangi bir fark gözlenmezken, 120 dakikalık sonikasyon süresinde, parçacıkların parçalandığı ve oldukça az örnekle grid üzerinde karşılaşılabildiği gözlenmiştir. Bu nedenle deneyin operasyon süresinin 60 dakika yapılmasına karar verilmiştir.

Tablo 4.2. 65 °C' de farklı sonikasyon sürelerinin hidrodinamik çap, PDI ve zeta potansiyel değerleri. (*)PDI<0,5 homojen nanoparçacık koloidal çözeltiliklerini göstermektedir.

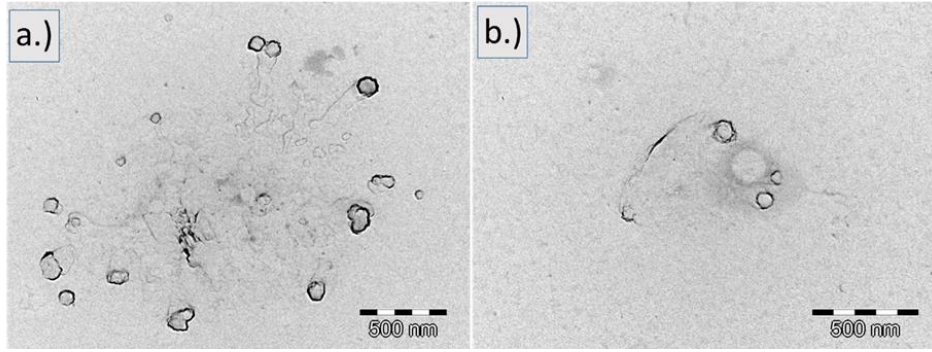
	Hidrodinamik çap (d.nm)	TEM parçacık çapı (nm)	PDI*	Zeta Potansiyel (mV)	Homojenite
30 dk.	75.21 ± 5.60	50.18 ± 3.92	0.947	-35.00 ± 0.70	Homojen değil
60 dk.	101.31 ± 9.01	54.34 ± 10.97	0.301	-36.00 ± 1.24	Homojen
120 dk.	310.43 ± 28.97	58.96 ± 17.45	0.337	-17.96 ± 0.60	Homojen



Şekil 4.17. HEPES içerisinde hazırlanan ASTCOLNP' lerin 30 dakika sonikasyon süresindeki TEM mikrografisi (40kX (a) 200kX (b) 250kX (c)).



Şekil 4.18. HEPES içerisinde hazırlanan ASTCOLNP' lerin 60 dakika sonikasyon süresindeki TEM mikrografisi (30kX(a) 100 kX(b) 250kX (c)).

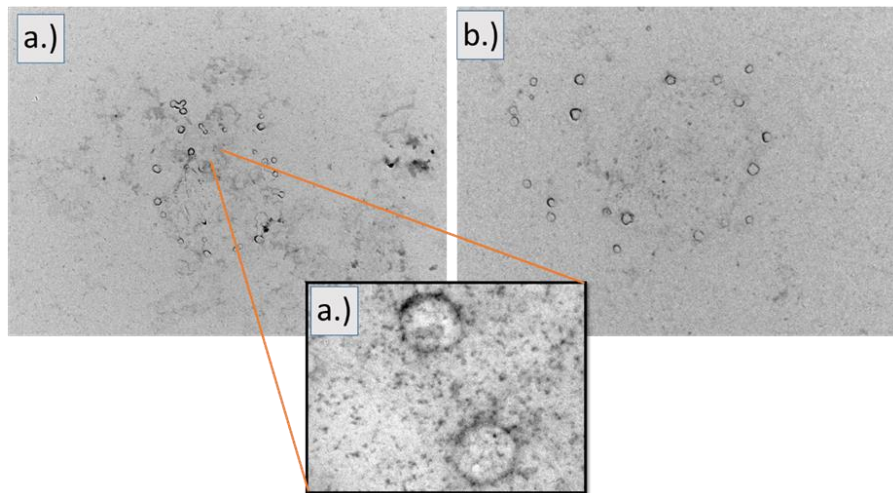


Şekil 4.19. HEPES içerisinde hazırlanan ASTCOLNP' lerin 120 dakika sonikasyon süresindeki TEM mikrografisi (50kX(a) 60 kX(b)).

4.8. Orta Ölçekte Üretimin Optimizasyonu

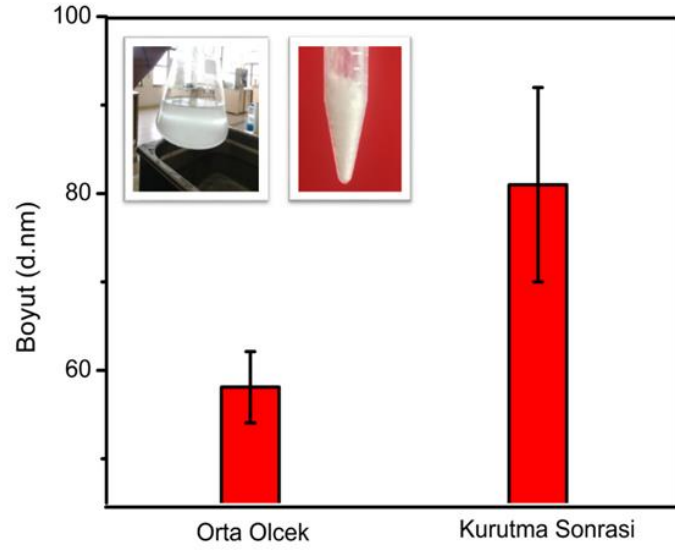
4.8.1. 1 L Toplam Hacimde Üretim

Optimize edilen formülasyon koşullarında ara ölçek olarak 1 L' lik üretime ölçek büyütmesi yapılmıştır. Bunun için ön aşama olarak karıştırılmalı homojenizatörde KZ' nin tampon çözeltide homojen olarak çözülmesi sağlanmıştır. Elde edilen örnekler TEM ve zeta sizer ile analiz edildiğinde, parçacıkların hidrodinamik çaplarının değişmediği gözlenmiştir (Şekil 4.20). Hidrodinamik parçacık çapı 58.7 ± 9.2 nm olarak bulunmuştur.



Şekil 4.20. ASTCOLNP' lerin orta ölçek büyütme TEM görüntüleri. 25 kX (a) 15 kX (b) 100 kX (c).

Liyofilizasyon ile kurutma sonrası parçacıklar tekrar HEPES içerisinde çözdürülmüş ve parçacık hidrodinamik çapı ölçülmüştür. Kurutma sonrası parçacık çapının 80 nm' ye çıktığı gözlenmiştir (Şekil 4.20.). Liyofilizasyon sonrası oluşan parçacıkların çapları TEM ile incelenmek üzere analiz laboratuvarına gönderilmiştir (Şekil 4.19.).

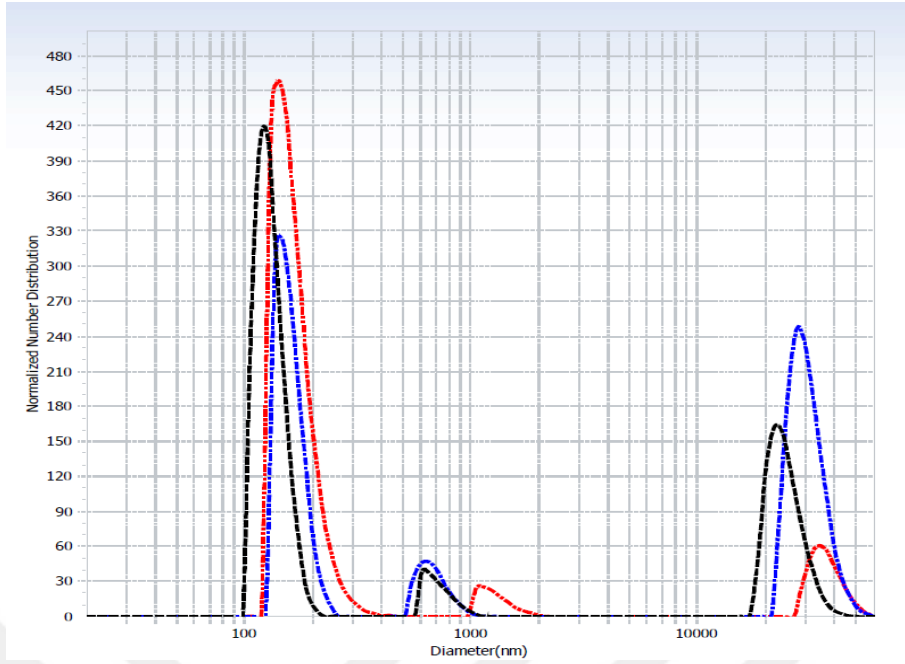


Şekil 4.21. Orta ölçekte elde edilen ASTCOLNP'lerin kurutma öncesi ve sonrası hidrodinamik çaplarındaki değişimi gösterir grafik.

4.8.2. 4 L-20 L Ölçekte Üretilen Nanokürelerin Karakterizasyonları

Optimize edilen formülasyon koşullarında orta ölçek olan 4 L'lik ve daha sonra 20 L'lik üretime ölçek büyütmesi yapılmıştır.

4 L'lik batchler halinde yapılan 20 L'lik üretimde öncelikle sadece sonikatör varlığında nanoformülasyonlar yapılmış olup, üretim sonucunda yüksek oranda topaklanma ile karşılaşmıştır. Bu agregatların uzaklaştırılması için santrifüj işlemine ihtiyaç duyulmuş ve 4000 dev/dk' da 10 dk santrifüj yapılmıştır. Sonikasyon sonrası elde edilen çözelti zeta sizer cihazı ile incelenmiştir. Şekil 4.22.' de verilen sonuçlara göre, elde edilen nanoparçacıklar büyük oranda 100-200 nm olmak ile birlikte, 1000 nm ve mikrobeyuttaki diğer parçacıklarında varlığı gözlemlenmiştir. Yüzey net yükü incelendiğinde ise parçacıkların -20.56 mV değerinde negatif yüklendiği görülmüştür. Bu sonuçlar, doğrultusunda, sadece sonikasyon işlemi bu ölçekte agregasyonu engelleyememiş ve homojen bir nanoparçacık oluşumu sağlanamamıştır.



Şekil 4.22. Doğrudan ölçek büyütme işlemi ile 20 L' üretimde elde edilen nanoparçacıkların parçacık boyut dağılımı (Her renk farklı bir ölçümü göstermektedir).

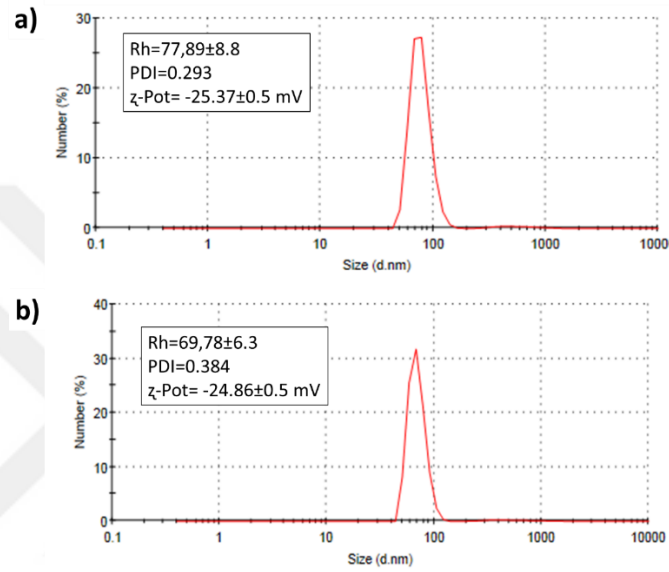
Homojenizatör kullanımının etkisi incelendiğinde, süreç küçük ölçekle aynı ilerlemiş olup tüm nanoküre eldesinde homojenizatör kullanılmıştır (Şekil 3.2.). Üretim süresince herhangi bir topaklanma ile karşılaşılmamış, homojenizatör ~600 dev/dk' da çalıştırıldığında homojenizatörün sağladığı karıştırmanın agregasyonları engellediği gözlenmiştir. Elde edilen opak beyaz renkteki nanoformülasyon Şekil 4.23.' de verilmiştir.



Şekil 4.23. 4L' lik üretimde AST-VII-Kol-KZ nanoformülasyonunun sıvı formu

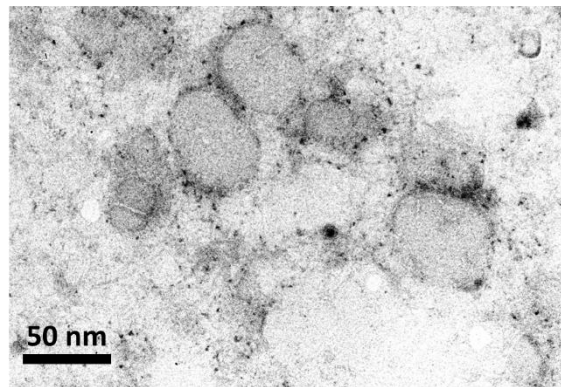
Elde edilen nanoformülasyonun 0.4 μm cut-off membranlardan geçirilmiş ve membrandan geçirilmeden alınan her iki örneğin hidrodinamik çaplarına (R_h) ve net yüzey yüklerine (ζ -Pot) bakılmıştır. Şekil 4.24.' de görüldüğü üzere herhangi bir işlem görmemiş nanoparçacıklar 70-80 nm arasında bir R_h değerine ve -25.37 mV yüzey net yüküne sahiptir. Elde

edilen formülasyondaki nanotaşıyıcıların parçacık çapı açısından dağılımının ne kadar homojen olduğunu gösteren polidispersite indeksi (PDI), bu örnek için 0.5' ten oldukça küçük olan 0.293 olarak belirlenmiştir. Filtreden geçirildikten sonra parçacık çapında küçük bir düşme görülse de PDI değeri yükselmiş, ζ -Pot değeri ise neredeyse hiç değişmemiştir. Filtre agregasyonu azaltsa da parçacık dağılımını (PDI=0.384) kötü yönde etkilemiştir. Hem getireceği maliyet hem de parçacık dağılımına olan kısmi etkisi nedeniyle bundan sonraki süreçlerde (20 L üretim için) herhangi bir filtrasyon veya santrifügasyon işlemine ihtiyaç duyulmadığı sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.24. (a) Filtre kullanılmadan ve (b) 0.4 µm filtreden geçirildikten sonra 20 L' lik üretimdeki AST-VII-Kol-KZ formülasyonuna ait parçacık boyut dağılımı.

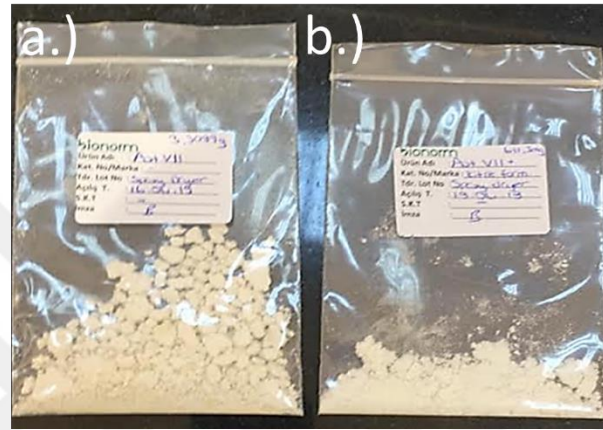
Homojenizasyon varlığında ve herhangi bir ön aşama olmaksızın elde edilen formülasyon, uranil asetat boyaması sonrası geçirimli elektron mikroskopu (TEM) ile incelenmiştir. Şekil 4.25.' de verildiği gibi oldukça homojen 100 nm ve altı nanotaşıyıcıların elde edildiği ve parçacıkların herhangi bir agregasyon göstermediği görülmüştür.



Şekil 4.25. 20 L' lik üretimdeki AST-VII-Kol-KZ formülasyonuna ait TEM fotoğrafı.

4.9. Nanokürelerin Kurutulması

Nanokürelerin orta ölçekte üretimi sonrası en uygun kurutma yönteminin bulunması için bir ön çalışma gerçekleştirilmiştir. Kurutma sonrası örnekler suda çözdürülerek 1/10 oranında HEPES' le dilüe edilmiştir. Örneklerin parçacık hidrodinamik çapı ve yüzey zeta potansiyelleri Malvern Zeta-Sizer cihazında 3 tekrarlı olacak şekilde analiz edilmiştir. Şekil 4.26., püskürterek kurutulmuş YPK-2 (2 kat konsantre) ve YPK-6 (6 kat konsantre) örneklerini göstermektedir.



Şekil 4.26. Püskürtme ile kurutma yöntemi ile farklı ön-yoğuşurmalarda elde edilmiş kuru nanoformülasyonun görüntüsü: YPK-2 (a) ve YPK-6 (b).

Tablo 4.3.' de verilen sonuçlara göre her iki kurutma yöntemi de benzerdir. Fakat, PDI değerleri her örnek için yükselmiştir. Üç kurutma yöntemini karşılaştırdığımızda, 2 kere yoğunlaştırılmış ve püskürtülerek kurutulmuş örneğin, başlangıçtaki malzemeye en çok benzediği ve PDI açısından 0.5' e yaklaştığı görülmüştür. KZ normalde de yüksek konsantrasyonlarda jelleşme eğilimi gösterdiğinden yoğunlaştırmanın da PDI değerinin artmasına katkı sağladığı düşünülmüştür. Ayrıca püskürtmeli kurutma yöntemi için yoğunlaştırma partikül büyüklüğünde bir değişikliğe sebep olmamış ancak PDI değerini arttırmıştır. Bu nedenle ileriki çalışmalarda kurutma tekniklerinin değişik yoğunluklar ve kriyoprotektanlar kullanarak orta ölçekte kurutma işleminin optimizasyonunun yapılması gerekmektedir.

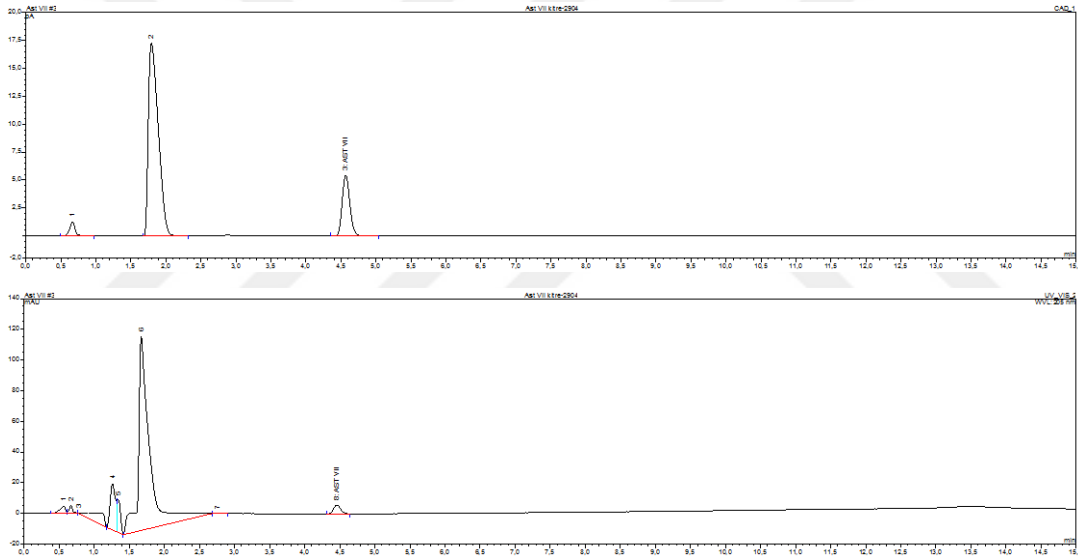
Tablo 4.3 Orta ölçek üretiminden elde edilen nanoformülasyonun farklı yöntemlerle kurutulması sonrası hidrodinamik çap, polidispersite indeksi ve net yüzey yükleri.

	D-LY	D-PK	Y-PK
Hidrodinamik Çap (nm)	54,36 ± 4,591	76,16 ± 7,62	63,98 ± 5,62
PDI	0.706	0.555	0.623
Net Yük (mV)	-20,3 ± 1,014	-25,766 ± 1,069	-25,033 ± 0,321

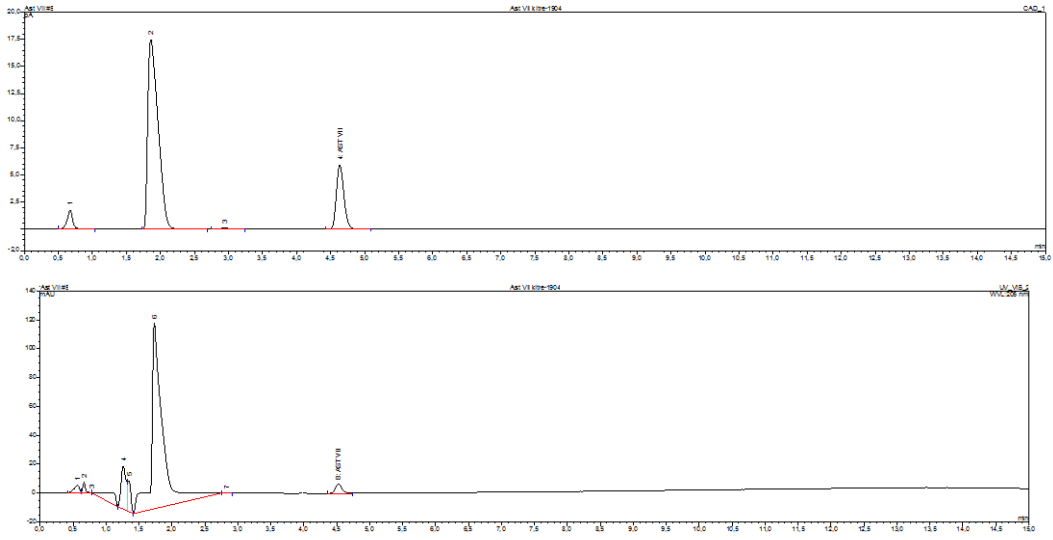
4.9.1. Nanoformülasyonun ihtiva ettiği AST-VII miktarının belirlenmesi

HPLC ile yöntem bölümünde belirtilen protokol kullanılarak püskürtmeyle kurutma (YPK-2 ve YPK-6) ile elde edilen nanoformülasyon içerisindeki AST-VII miktarı belirlenmiştir. Bu örnekler için CAD ve DAD-205 nm kromatogramları Şekil 4.27 ve Şekil 4.28.'de sunulmuştur.

YPK-2 örneğinde AST-VII miktarı %12,23 çıkmışken, YPK-6' da bu değer %11,47 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.27. YPK-2 örneğine ait CAD ve DAD-205 nm kromatogramları.



Şekil 4.28. YPK-6 örneğine ait CAD ve DAD-205 nm kromatogramları.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu yüksek lisans tezinde, doğal bir polimer olan ve endemik Astragalus bitkisinin köklerinden elde edilen kitre zankı kullanılarak, bağışıklık sistemini destekleyen saponin türevlerinden biri olan AST-VII molekülünün biyoyararlanımı arttırabilecek, gıda takviyesi tablet formülasyonlarının geliştirilmesi için bir nanotaşıyıcı sistemin orta ölçekte üretim süreçlerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Elde edilen nanomalzemelere AST-VII molekülünün kolesterol varlığında hapsedilme süreçleri detaylı olarak çalışılmıştır. KZ ve kolesterol konsantrasyonu sonikasyon süresi, tampon çözelti çeşidi ve pH' ın nanoparçacık çapı ve homojenitesi üzerinde ki etkisi birçok yöntemle incelenmiştir. Nanoparçacıkların özelliklerini kaybetmeden kurutulması için denenen etüv, liyofilizasyon ve spreyle kurutma yöntemlerinde, en pratik ve yüksek verimde kurutumayı sağlayan spray ile kurutma tercih edilmiştir. Bu optimizasyon ve süreç geliştirme çalışmaları sonucunda, 50-100 nm arasında ki çaplarda, % 11.85 oranında AST-VII tutuklama verimine sahip nanoparçacıkların verimle 20 L (orta) ölçekte üretimi sağlanmıştır. Elde edilen nanomalzemeler, tablet formülasyonun geliştirilmesine hazır hale getirilmiştir. Kitre zankının ilaç endüstrisinde implantlar, hidrojeller, mikroküreler, dağıtıcı ve süspanse edici olarak; gıda endüstrisinde ise dengeleyici, emülgatör, koyulaştırıcı ve bağlayıcı olarak yoğun kullanımları ve toksik olmaması sayesinde gelecek vadeden doğal polimerik bir taşıyıcı olabileceği bu tez çalışması ile gösterilmiş ve endüstriyel kullanıma hazırlanmıştır.

KAYNAKLAR

- [1]. Jani, G. K.; Shah, D. P.; Prajapati, V. D.; Jain, V. C., Gums and mucilages: versatile excipients for pharmaceutical formulations. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* **2009**, *4*, (5), 309-323.
- [2]. Kulkarni Vishakha, S.; Butte Kishor, D.; Rathod Sudha, S., Natural polymers–A comprehensive review. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences* **2012**, *3*, (4), 1597-1613.
- [3]. Gantar, A.; da Silva, L. P.; Oliveira, J. M.; Marques, A. P.; Correlo, V. M.; Novak, S.; Reis, R. L., Nanoparticulate bioactive-glass-reinforced gellan-gum hydrogels for bone-tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C* **2014**, *43*, 27-36.
- [4]. Taheri, A.; Jafari, S. M., Gum-based nanocarriers for the protection and delivery of food bioactive compounds. *Advances in Colloid and Interface Science* **2019**, *269*, 277-295
- [5]. Darroudi, M.; Sabouri, Z.; Oskuee, R. K.; Zak, A. K.; Kargar, H.; Hamid, M. H. N. A., Sol-gel synthesis, characterization, and neurotoxicity effect of zinc oxide nanoparticles using gum tragacanth. *Ceramics International* **2013**, *39*, (8), 9195-9199.
- [6]. Kaity, S.; Isaac, J.; Kumar, P. M.; Bose, A.; Wong, T. W.; Ghosh, A., Microwave assisted synthesis of acrylamide grafted locust bean gum and its application in drug delivery. *Carbohydrate Polymers* **2013**, *98*, (1), 1083-1094.
- [7]. Prajapati, V. D.; Jani, G. K.; Moradiya, N. G.; Randeria, N. P.; Nagar, B. J., Locust bean gum: a versatile biopolymer. *Carbohydrate Polymers* **2013**, *94*, (2), 814-821.
- [8]. Rana, V.; Rai, P.; Tiwary, A. K.; Singh, R. S.; Kennedy, J. F.; Knill, C. J., Modified gums: Approaches and applications in drug delivery. *Carbohydrate Polymers* **2011**, *83*, (3), 1031-1047.
- [9]. Gavlighi, H. A.; Mikkelsen, J. D.; Meyer, A. S., Tragacanth Gum: Structural Composition, Natural Functionality and Enzymatic Conversion as Source of Potential Prebiotic Activity, Doktora Tezi, Danimarka Teknik Üniversitesi Lyngby, 2013.
- [10]. Balaghi, S.; Mohammadifar, M. A.; Zargaraan, A.; Gavlighi, H. A.; Mohammadi, M., Compositional analysis and rheological characterization of gum tragacanth exudates from six species of Iranian Astragalus. *Food Hydrocolloids* **2011**, *25*, (7), 1775-1784.
- [11]. Jaiswal, A.; Ghosh, S. S.; Chattopadhyay, A., One step synthesis of C-dots by microwave mediated caramelization of poly (ethylene glycol). *Chemical Communications* **2012**, *48*, (3), 407-409.
- [12]. Mehta, V. N.; Chettiar, S. S.; Bhamore, J. R.; Kailasa, S. K.; Patel, R. M., Green synthetic approach for synthesis of fluorescent carbon dots for lisinopril drug delivery system and their confirmations in the cells. *Journal of Fluorescence* **2017**, *27*, (1), 111-124.
- [13]. Darroudi, M.; Sarani, M.; Oskuee, R. K.; Zak, A. K.; Amiri, M. S., Nanoceria: gum mediated synthesis and in vitro viability assay. *Ceramics International* **2014**, *40*, (2), 2863-2868.
- [14]. Kurt, A., Physicochemical, rheological and structural characteristics of alcohol precipitated fraction of gum tragacanth. *Food and Health* **2018**, *4*, (3), 183-193.
- [15]. Shalviri, A.; Liu, Q.; Abdekhodaie, M. J.; Wu, X. Y., Novel modified starch-xanthan gum hydrogels for controlled drug delivery: Synthesis and characterization. *Carbohydrate Polymers* **2010**, *79*, (4), 898-907.
- [16]. Ghayempour, S.; Montazer, M.; Rad, M. M., (. Encapsulation of Aloe Vera extract into natural Tragacanth Gum as a novel green wound healing product. *International Journal of Biological Macromolecules* **2016**, *93*, 344-349.
- [17]. Singh, B.; Sharma, V., Influence of polymer network parameters of tragacanth gum-based pH responsive hydrogels on drug delivery. *Carbohydrate Polymers* **2014**, *101*, 928-940.
- [18]. Bhardwaj, T. R.; Kanwar, M.; Lal, R.; Gupta, A., Natural gums and modified natural gums as sustained-release carriers. *Drug Development and Industrial Pharmacy* **2000**, *26*, (10), 1025-1038.
- [19]. Odeku, O. A.; Okunlola, A.; Lamprecht, A., Microbead design for sustained drug release using four natural gums. *International Journal of Biological Macromolecules* **2013**, *58*, 113-120.

- [20]. Nalbantsoy, A.; Nesil, T.; Erden, S.; Çalış, İ.; Bedir, E., Adjuvant effects of Astragalus saponins macrophyllsaponin B and astragaloside VII. *Journal of Ethnopharmacology* **2011**, 134, (3), 897-903.
- [21]. Nalbantsoy, A.; Nesil, T.; Yılmaz-Dilsiz, Ö.; Aksu, G.; Khan, S.; Bedir, E., Evaluation of the immunomodulatory properties in mice and in vitro anti-inflammatory activity of cycloartane type saponins from Astragalus species. *Journal of Ethnopharmacology* **2012**, 139, (2), 574-581.
- [22]. Sun, Y. P.; Zhou, B.; Lin, Y.; Wang, W.; Fernando, K. S.; Pathak, P.; Luo, P. G., Quantum-sized carbon dots for bright and colorful photoluminescence. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, 128, (24), 7756-7757.
- [23]. Liu, Y.; Liu, Y.; Park, M.; Park, S. J.; Zhang, Y.; Akanda, M. R.; Kim, H. Y., Green synthesis of fluorescent carbon dots from carrot juice for in vitro cellular imaging. *Carbon Letters* **2017**, 21, 61-67.
- [24]. Talukdar, M. M.; Kinget, R., Swelling and drug release behaviour of xanthan gum matrix tablets. *International Journal of Pharmaceutics* **1995**, 120, (1), 63-72.
- [25]. Talukdar, M. M.; Michoel, A.; Rombaut, P.; Kinget, R., Comparative study on xanthan gum and hydroxypropylmethyl cellulose as matrices for controlled-release drug delivery I. Compaction and in vitro drug release behaviour. *International journal of Pharmaceutics* **1996**, 129, (1-2), 233-241.
- [26]. Mundargi, R. C.; Patil, S. A.; Aminabhavi, T. M., Evaluation of acrylamide-grafted-xanthan gum copolymer matrix tablets for oral controlled delivery of antihypertensive drugs. *Carbohydrate Polymers* **2007**, 69, (1), 130-141.
- [27]. Naji-Tabasi, S.; Razavi, S. M. A.; Mehditabar, H., Fabrication of basil seed gum nanoparticles as a novel oral delivery system of glutathione. *Carbohydrate Polymers* **2017**, 157, 1703-1713.
- [28]. Prasad, Y. R.; Krishnaiah, Y. S. R.; Satyanarayana, S., In vitro evaluation of guar gum as a carrier for colon-specific drug delivery. *Journal of Controlled Release* **1998**, 51, (2-3), 281-287.
- [29]. Munday, D. L.; Cox, P. J., Compressed xanthan and karaya gum matrices: hydration, erosion and drug release mechanisms. *International Journal of Pharmaceutics* **2000**, 203, (1-2), 179-192.
- [30]. Sjölander, A.; Drane, D.; Maraskovsky, E.; Scheerlinck, J. P.; Suhrbier, A.; Tennent, J.; Pearse, M., Immune responses to ISCOM® formulations in animal and primate models, *Vaccine* **2001**, 19, (17-19), 2661-2665.
- [31]. Donnelly, J. J., New developments in adjuvants. *Mechanisms of ageing and development* **1997**, 93, (1-3), 171-177.
- [32]. Morein, B.; Sundquist, B.; Höglund, S.; Dalsgaard, K.; Osterhaus, A. D. M. E., Iscom, a novel structure for antigenic presentation of membrane proteins from enveloped viruses. *Nature* **1984**, 308, 457-460.
- [33]. Nagarjuna, G.; Babu, P. K.; Maruthi, Y.; Parandhama, A.; Madhavi, C.; Subha, M. C. S.; Rao, K. C., Sodium alginate/tragacanth gum blend hydrogel membranes for controlled release of verapamil hydrochloric acid. *Indian Journal of Advances in Chemical Science* **2016**, 4, (4), 469-477.
- [34]. Coviello, T.; Matricardi, P.; Marianecchi, C.; Alhaique, F., Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. *Journal of Controlled Release* **2007**, 119, (1), 5-24.
- [35]. Qiu, X.; Leporatti, S.; Donath, E.; Möhwald, H., Studies on the drug release properties of polysaccharide multilayers encapsulated ibuprofen microparticles. *Langmuir* **2011**, 17, (17), 5375-5380.
- [36]. Ghayempour, S.; Montazer, M.; Rad, M. M., Tragacanth gum as a natural polymeric wall for producing antimicrobial nanocapsules loaded with plant extract. *International Journal of Biological Macromolecules* **2015**, 81, 514-520.
- [37]. Verma, C.; Negi, P.; Pathania, D.; Anjum, S.; Gupta, B., Novel Tragacanth Gum-entrapped lecithin nanogels for anticancer drug delivery. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* **2019**, 1-6.
- [38]. Pathania, D.; Verma, C.; Negi, P.; Tyagi, I.; Asif, M.; Kumar, N. S.; Gupta, V. K., Novel nanohydrogel based on itaconic acid grafted tragacanth gum for controlled release of ampicillin. *Carbohydrate Polymers* **2018**, 196, 262-271.

- [39]. Ghayempour, S.; Mortazavi, S. M., Preparation and investigation of sodium alginate nanocapsules by different microemulsification devices. *Journal of Applied Polymer Science* **2015**, 132, (17), 41904-41912.
- [40]. Chang, C. P.; Leung, T. K.; Lin, S. M.; Hsu, C., Release properties on gelatin-gum arabic microcapsules containing camphor oil with added polystyrene. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2006**, 50, (2), 136-140.
- [41]. Shaddel, R.; Hesari, J.; Azadmard-Damirchi, S.; Hamishehkar, H.; Fathi-Achachlouei, B.; Huang, Q., Use of gelatin and Gum Arabic for encapsulation of black raspberry anthocyanins by complex coacervation. *International Journal of Biological Macromolecules* **2018**, 107, 1800-1810.
- [42]. Sarmah, J. K.; Bhattacharjee, S. K.; Mahanta, R.; Mahanta, R., Preparation of cross-linked guar gum nanospheres containing tamoxifen citrate by single step emulsion in situ polymer cross-linking method. *Journal of Inclusion Phenomena and Macroscopic Chemistry* **2009**, 65, (3-4), 329.
- [43]. Pitombeira, N. A.; Neto, J. G. V.; Silva, D. A.; Feitosa, J. P.; Paula, H. C., de Paula, R. C., Self-assembled nanoparticles of acetylated cashew gum: Characterization and evaluation as potential drug carrier. *Carbohydrate Polymers* **2015**, 117, 610-615.
- [44]. Seeli, D. S.; Prabakaran, M., Guar gum succinate as a carrier for colon-specific drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules* **2016**, 84, 10-15.
- [45]. Hosseini, M. S.; Hemmati, K.; Ghaemy, M., Synthesis of nanohydrogels based on tragacanth gum biopolymer and investigation of swelling and drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules* **2016**, 82, 806-815.
- [46]. Letchford, K.; Burt, H., A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2007**, 65, (3), 259-269.
- [47]. Hosseini, M. S.; Hemmati, K.; Ghaemy, M., Synthesis of nanohydrogels based on tragacanth gum biopolymer and investigation of swelling and drug delivery. *International journal of biological macromolecules*, **2016**, 82, 806-815.
- [48]. Wang, Y.; Li, D.; Wang, L. J.; Li, S. J.; Adhikari, B., Effects of drying methods on the functional properties of flaxseed gum powders. *Carbohydrate Polymers* **2010**, 81, (1), 128-133.
- [49]. Nep, E. I.; Conway, B. R., Physicochemical characterization of grewia polysaccharide gum: Effect of drying method. *Carbohydrate Polymers* **2011**, 84, (1), 446-453.
- [50]. Barr, I. G.; Mitchell, G. F., ISCOMs (immunostimulating complexes): the first decade. *Immunology and Cell Biology* **1996**, 74, (1), 8-25.
- [51]. Gupta, A. P.; Verma, D. K., Preparation and characterization of carboxymethyl guar gum nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules* **2014**, 68, 247-250.
- [52]. Sardan, M.; Kilinc, M.; Genc, R.; Tekinay, A. B.; Guler, M. O., Cell penetrating peptide amphiphile integrated liposomal systems for enhanced delivery of anticancer drugs to tumor cells. *Faraday Discussions* **2013**, 166, 269-283.
- [53]. Jin, Y.; Deng, D.; Cheng, Y.; Kong, L.; Xiao, F., Annealing-free and strongly adhesive silver nanowire networks with long-term reliability by introduction of a nonconductive and biocompatible polymer binder. *Nanoscale* **2014**, 6, (9), 4812-4818.
- [54]. Duewell, P.; Kisser, U.; Heckelsmiller, K.; Hoves, S.; Stoitzner, P.; Koernig, S.; Anz, D., ISCOMATRIX adjuvant combines immune activation with antigen delivery to dendritic cells in vivo leading to effective cross-priming of CD8+ T cells. *The Journal of Immunology*, **2011**, 187, (1), 55-63.
- [55]. Jani, G. K.; Shah, D. P.; Prajapati, V. D.; Jain, V. C., Gums and mucilages: versatile excipients for pharmaceutical formulations. *Asian Journal Pharm Sci* **2009**, 4, (5), 309-323.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Müge AŞIK UĞURLU
Doğum Tarihi : 11/04/1995
E-mail : mgeask@gmail.com
Öğrenim Durumu : Lisans

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Kimya Mühendisliği	Mersin Üniversitesi	2017
Yüksek Lisans	Kimya Mühendisliği	Mersin Üniversitesi	2019

ESERLER (Makaleler ve Bildiriler)

Makaleler

1. Çalhan, S. D., Alaş, M. Ö., Aşık, M., Kaya, F. N. D., & Genç, R. (2018). One-pot synthesis of hydrophilic and hydrophobic fluorescent carbon dots using deep eutectic solvents as designer reaction media. *Journal of materials science*, 53(22), 15362-15375.

Bildiriler

1. Çalhan, S.D., Aşık, M., Dinçer-Kaya, F.N., Genç, R. (2017). Synthesis and characterization of fluorescent carbon nanoparticles in deep eutectic solvents. *22nd International Biomedical Science & Technology Symposium bildiriler kitabı* içinde (ss. 14). Ankara: Anadolu Downtown Hotel.
2. Aşık, M., Genç, R. (2018). Florescent Carbon Nanodot Embedding Tragacanth Gum Based Microporous Gels. R. İpek (Ed.). *IV. International Ege Composite Materials Symposium bildiriler kitabı* içinde (ss.910-915). İzmir: Ege Üniversitesi

Projeler

1. AP3 - B Tipi Araştırma Projesi (BAP), Alçak Ötektik Çözücü Ortamında Floresans Nanoparçacıkların Sentezi ve Karakterizasyonu (2017), (Proje kodu: 2017-1-AP3-2123).
2. TÜBİTAK 1003 Projesi, Endemik Astragalus trojanus Bitkisinden Astragaloside VII Molekülünün Pilot Üretimine Yönelik Metotların Geliştirilmesi, Yeni Formülasyonlar Hazırlanması ve Atık Valorizasyonu (2017-2019), (Proje numarası: 116Z95)