

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÇEŞİTLİ HESPERETİN NANOSÜSPANSİYONLARINDAN FARKLI
BİYOMALZEMELER İLE STABİLİZE EDİLMİŞ HESPERETİN
MİKROÇUBUKLARININ ELDE EDİLMESİ VE
KARAKTERİZASYONU

Yeşim KARAHAAN

DOKTORA TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Fizikokimya Programı

Danışman

Doç. Dr. Dolunay ŞAKAR DAŞDAN

Haziran, 2022

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇEŞİTLİ HESPERETİN NANOSÜSPANSİYONLARINDAN FARKLI
BİYOMALZEMELER İLE STABİLİZE EDİLMİŞ HESPERETİN
MİKROÇUBUKLARININ ELDE EDİLMESİ VE KARAKTERİZASYONU**

Yeşim KARAHAHAN tarafından hazırlanan tez çalışması 22.06.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Fizikokimya Programı **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Dolunay ŞAKAR DAŞDAN
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Dolunay ŞAKAR DAŞDAN, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Ayfer SARAÇ ÖZKAN, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Yelda YALÇIN GÜRKAN, Üye
Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi

Doç. Dr. Arzu HATİPOĞLU, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Gülay BAYSAL, Üye
İstanbul Aydın Üniversitesi

Danışmanım Doç. Dr. Dolunay ŞAKAR DAŞDAN sorumluluğunda tarafımda hazırlanan Çeşitli Hesperetin Nanosüspansiyonlarından Farklı Biyomalzemeler ile Stabilize Edilmiş Hesperetin Mikroçubuklarının Elde Edilmesi ve Karakterizasyonu başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Yeşim KARAHAN

İmza



Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin FDK-2020-3853 numaralı projesi ile desteklenmiştir.



Evren'e

TEŞEKKÜR

Tüm doktora sürecinde, fikirleri ve manevi desteği ile bana yol gösteren, daima yanımda olan, tezimin yönetimini üstlenen ve yönlendiren sevgili danışmanım Doç. Dr. Dolunay ŞAKAR DAŞDAN'a, benden desteğini esirgemeyen Prof. Dr. Ferdane KARAMAN ve Prof. Dr. Nevin SAN'a teşekkür ederim.

Doktora çalışmam sırasında 100/2000 YÖK Doktora Bursu ile finansal destek sağlayan Yükseköğretim Kurulu'na, Ekim 2018-Eylül 2019 tarihleri arasında çalışmamın bir kısmını Saarland Üniversitesi, Almanya'da tamamlamam için olanak ve maddi destek sağlayan Yıldız Teknik Üniversitesi ERASMUS+ program birimine ve laboratuvar imkanlarını kullanmama olanak sağlayan ve çalışmalarımda beni yönlendiren Prof. Dr. Marc SCHNEIDER ve Saarland Üniversitesi'ne ve Floresans mikroskoplarını kullanarak sayım yapılmasına olanak sağlayan Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU'na, Yıldız Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümüne ve sayım işlemini yapan Gülşah AKBAŞ ve İrem METEOĞLU'na teşekkür ederim.

Yeşim KARAHAN

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ	ix
KISALTMA LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ	xii
TABLO LİSTESİ	xviii
ÖZET	xx
ABSTRACT	xxii
1 GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti.....	1
1.2 Tezin Amacı	14
1.3 Hipotez	14
2 GENEL BİLGİLER	15
2.1 İlaç.....	15
2.2 Kontrollü İlaç Salım Sistemleri.....	15
2.2.1 Kontrollü İlaç Salım Sistemlerin Sınıflandırılması.....	16
2.2.2 Pulmoner İlaç Salımı	19
2.3 İlaç Taşıyıcı Sistemler.....	24
2.3.1 Polimer Bazlı İlaç Taşıyıcı Sistemler	24
2.3.2 Lipid Bazlı İlaç Taşıyıcı Sistemler.....	26
2.3.3 Viral Partiküller	27
2.3.4 Karbon Nanotüpler	28
2.4 İlaç Taşımada Kullanılan Bazı Biyomalzemeler	31
2.4.1 Kitosan	31
2.4.2 Agaroz.....	33
2.4.3 D-Mannitol	34
2.4.4 Aljinat.....	35
2.5 Hesperetin.....	36
2.6 Template-Assisted Tekniğin Partikül İnfiltrasyon Yaklaşımı	37
2.7 Zeta-sizer Ölçümleri.....	39
2.7.1 Partikül Boyutu ve Polidispersite	39
2.7.2 Mobilite	40
2.7.3 Zeta Potansiyel	40

3 DENEYSEL KISIM	45
3.1 Kullanılan Malzeme ve Cihazlar	45
3.2 Hesperetin-Plantacare(2000) Nanosüspansiyonundan Template-assisted Teknik ile Hesperetin Mikroçubuk eldesi.....	47
3.2.1 Hesperetin-PC(2000) Nanosüspansiyonunun İnfiltrasyonu için Optimum Konsantrasyonun Belirlenmesi	48
3.2.2 Hesperetin-PC(2000) Nanosüspansiyonunun İnfiltrasyonu Sonrası Membranlardaki Safsızlıkların Giderilmesi için Uygulanan Yöntemler ...	48
3.2.3 Hesperetin Mikroçubukların Agaroz ve D-Mannitol ile Stabilizasyonu.....	50
3.2.4 Hesperetin Mikroçubuklarını Toplama	51
3.3 Hesperetin-PVA Nanosüspansiyonundan Template-Assisted Tekniği ile Hesperetin Mikroçubuk Eldesi.....	53
3.3.1 Hesperetin-PVA Nanosüspansiyonunun İnfiltrasyonu için Optimum Şartların Belirlenmesi.....	53
3.3.2 Hesperetin Mikroçubukların Agaroz ve D-Mannitol ile Stabilizasyonu.....	54
3.3.3 Hesperetin Mikroçubuklarını Toplama	55
3.4 Hesperetin-PC(2000) ve Hesperetin-PVA Nanosüspansiyonlarından Elde Edilen Mikroçubukların Karakterizasyonu.....	55
3.4.1 Hesperetin Mikroçubukların Sayımı.....	55
3.4.2 Hesperetin Mikroçubukların Uzunluk ve Çaplarının Belirlenmesi	55
3.4.3 Hesperetin Mikroçubukların Farklı Ph lardaki Kararlılığı ve Aktivitesi	56
3.4.4 Hesperetin Mikroçubuklarının PBS Çözeltisi İçindeki Kararlılığı ve Aktivitesinin Zamana Bağlı Değişimi	56
4 DENEYSEL VERİLER	57
4.1 Hesperetin-PC(2000) Nanoüspansiyonundan Template-Assisted Teknik ile Hesperetin Mikroçubuk eldesi.....	57
4.1.1 Hesperetin-PC(2000) Nanosüspansiyonunun İnfiltrasyonu için Optimum Konsantrasyonun Belirlenmesi	57
4.1.2 0.1 mg/mL Hesperetin-Plantacare 2000 (~180nm) Nanosüspansiyonunun İnfiltrasyonu Sonrası Membranlardaki Safsızlıkların Giderilmesi İçin Uygulanan Yöntemlerden Elde Edilen Membranların Karakterizasyonu	61
4.1.3 Hesperetin Mikroçubukları Toplama	78
4.2 Hesperetin-PVA Nanosüspansiyonundan Template-Assisted Teknik ile Hesperetin Mikroçubuk eldesi	85

4.2.1 Hesperetin-PVA Nanosüspansiyonun İnfiltrasyonu için Optimum Şartların Belirlenmesi.....	85
4.2.2 Hesperetin Mikroçubukların Toplanması.....	90
4.3 Hesperetin-PC(2000) ve Hesperetin-PVA Süspansiyonlarından Elde Edilen Mikroçubukların Karakterizasyonu.....	91
4.3.1 Hesperetin Mikroçubuklarının Sayımı.....	91
4.3.2 Hesperetin Mikroçubukların Uzunluk ve Çaplarının Belirlenmesi .	92
4.3.3 Hesperetin Mikroçubukların Farklı Ph lardaki Kararlılığı ve Aktivitesinin İncelenmesi	93
4.3.4 Hesperetin Mikroçubuklarının PBS Çözeltisi İçindeki Kararlılığı ve Aktivitesinin Zamana Bağlı Değişimi	107
5 SONUÇ VE ÖNERİLER	123
KAYNAKÇA	127
A ERASMUS	143
B ERASMUS ÜLKE KODLARI	144
C BURSLAR	145
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR	146

SİMGE LİSTESİ

ϵ_r	Bağıl geçirgenlik/dielektrik sabiti
AR	Boy/en oranı
k_B	Boltzmann sabiti
λ	Dalga Boyu
κ	Debye-Hückel sabitini
$^{\circ}\text{C}$	Derece Santigrat
ϵ	Dielektrik sabiti
$D\tau$	Difüzyon Katsayısı
$G\tau$	Elektrik Alan Korelasyon Faktörü
E	Elektrik Alan Şiddeti
μe	Elektroforetik Mobilite
$t_{1/2}$	Harcanma Yarı Zamanı
R_h	Hidrodinamik Yarıçap
$f(K_a)$	Henry fonksiyonu
v	Kayma Hızı
A_{template}	Membran yüzey alanı
N_1	Membranın $1 \mu\text{m}^2$ deki gözenek sayısı
d	Mikroçubuk eni (çapı)
l	Mikroçubuk boyu (uzunluğu)
μm	Mikrometre
mV	Milivolt
η	Mutlak vizkozite
nm	Nanometre
N_2	Sayım sonucu elde edilen mikroçubuk sayısını
T	Sıcaklık
Ψ_d	Stern tabakasının potansiyeli
χ	Uzaklık
ϵ_0	Vakumun Dielektrik Sabiti
ϵ_0	Vakum geçirgenliği
a	Yarıçap
ζ	Zeta Potansiyeli

KISALTMA LİSTESİ

AA	Alternatif akım
AC	Adenilat siklaz
AKT1	Protein kinaz B
Anti-VCAM-1	Anti-vazküler hücre adezyon molekülü
ApoE ^{-/-}	Apolipoprotein eksik fare
ARE	Antioksidan yanıt ögesi
AR	Boy/en oranı
B(a)P	Benzo(a)piren
bEnd.3	Serebral mikrovaskülatür hücreleri
BmimCl	1-Butil-3-metilimidazolyum klorür
cAMP	Adenozin 3',5' siklik monofosfat
COX-2	Siklooksijenaz
CYP1A1	Sitokrom p450 enzimleri
DA	Doğrusal akım
DEP	Dizel egzoz partikülleri
DLS	Dinamik ışık saçılımı
DMF	Dimetilformamid
DMSO	Dimetil sülfoksit
DOX	Doksorubisin
ERK-1/2	Protein kinaz hücre içi sinyal faktörü
FA	Formamid
GSK-3 β	Glikojen sentaz kinaz 3 beta
hCMEC/D3	Kan/beyin bariyer hattı hücreleri
IFN	İnterferon
Ig	İmmünoglobulin
IL	İnterlökin
IL-1 β	İnterlökin-1beta
IL6	İnterlökin-6
KOAH	Kronik obstrüktif akciğer hastalığı
LAK	Lewis akciğer karsinomu
MDA	Malondialdehit

MHB	Metil 4-hidroksibenzoat
miR-410	MicroRNA-410
MMP	Matrix metalloproteinaz
MMP9	Matrix metalloproteinaz 9
NF-kB	Nükleer faktör kappa B
Nrf2	Nükleer Faktör Eritroid ile İlişkili Faktör2
MFA	N-metilformamid
OA·Fe3O4	Oleik asit kaplı manyetit nanoparçacıklar
PBS	Fosfat Tamponlu Salin Çözeltisi
PC2000	Plantacare 2000
PCNA	Proliferatif hücre nükleer antijeni
PDE4	Fosfodiesteraz
PEO	Polietilen oksit
PGE2	Prostoglandin 2
P-gp	P-glikoprotein
PKA	Protein kinaz A
PKC	Protein kinaz C
PLGA	Poli(laktid-ko-glikolid)
PLLA	Poli(l-laktit)
PVA	Polivinilalkol
ROS	Reaktif oksijen türleri
RT-PCR	gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
siRNA	Küçük interferans RNA sı
SR	Sarkoplazmik retikula
Th	T-yardımcı hücreler
TNF	Tümör nekroz faktörü
TNF-a	Tümör Nekroz Faktör Alfa
TP53	Tümör protein 53
UGT1A3	UDP-Glukuronosil Transferaz
VEGFA	Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1	Hesperetinin Akciğer kanserinde B(a)P hasarına karşı olası koruma mekanizması[1]	1
Şekil 1.2	BaP ve nikotin kaynaklı akciğer karsinogenezini bloke etmede hesperidin ve hesperetinin işlevleri[3]	2
Şekil 1.3	Hesperetinin akut akciğer hasarını önleme mekanizmasının şematik gösterimi [5]	4
Şekil 1.4	Hesperetinin, CS ve üretan tarafından indüklenen KOAH'lı fare akciğer kanserinde AKT1, IL6, VEGFA, MMP9 ve TP53'ü düzenleyerek KOAH'ı ve akciğer kanserine ilerlemesini önlemesinin şematik gösterimi.....	5
Şekil 1.5	Hesperetinin mekanizmasının şematik gösterimi[9].....	6
Şekil 2.1	İnsan solunum yolu[51] ve alt solunum yolu[50]	21
Şekil 2.2	İlaç taşıma sistemleri a) polimerik nanopartikül[80], b) polimerik misel[81], c) dendrimer[81], d) hidrojelden dış etkenler yoluyla ilaç salınımı[82], e) lipozom[81], f) katı lipit nanopartiküller [83], g) viral nanopartikül[84], h) karbon nanotüp ilaç taşıma sistemleri[79]	29
Şekil 2.3	Kitosanın kimyasal yapısı[102]	31
Şekil 2.4	Agarozun kimyasal formülü[124]	33
Şekil 2.5	D-mannitolün kimyasal yapısı	34
Şekil 2.6	Sodyum Alginatın kimyasal yapısı[157]	35
Şekil 2.7	Hesperetinin kimyasal yapısı.....	36
Şekil 2.8	Template-assisted tekniği infiltrasyon yaklaşımı ile mikroçubuk eldesi prosesinin şematik gösterimi.....	39
Şekil 2.9	Dinamik ışık saçılması ölçümü[181]	39
Şekil 2.10	Zeta potansiyelin şemasal ifadesi [183]	41
Şekil 2.11	Elektroforetik ışık saçılımı ile Zeta potansiyel ölçümünün enstrümantasyonunu gösteren şema[182]	44
Şekil 3.1	a) Fuchs-Roenthal lamı b) Sayma alanı.....	47
Şekil 3.2	İnfiltrasyonun şematik gösterimi	48
Şekil 3.3	Agaroz ile stabilize edilmiş membranın lamel üzerindeki görüntüsü	50
Şekil 3.4	D-Mannitol ile stabilize edilmiş membranın lamel üzerindeki görüntüsü	51
Şekil 3.5	PVA (4-88) ile kaplanmış petri kabı	51
Şekil 3.6	PVA(4-88) Tabakasına yapıştırılmış membran görüntüsü.....	52

Şekil 4.1	0.01 mg/mL Hesperetin-PC2000(~180nm) nanosüspansiyonu infiltire edilmiş örneklerin SEM görüntüleri: (a) membranın parlak yüzeyi (b) membranın parlak olmayan yüzeyi (c) dolu ve boş gözeneklerin yakından görünümü.....	57
Şekil 4.2	0.05 mg/mL Hesperetin-PC2000(~180nm) nanosüspansiyonu infiltire edilemiş örneklerin SEM görüntüleri (a) membranın parlak yüzeyi (b) membranın parlak olmayan yüzeyi (c) gözeneklerin daha yakından görünümü.....	58
Şekil 4.3	0.1 mg/mL Hesperetin-PC2000(~180nm) nanosüspansiyon infiltire edilmiş örneklerin SEM görüntüleri (a) membranın parlak yüzeyi (b) membranın parlak olmayan yüzeyi (c) infiltre edilmiş porlar ve parlak olmayan yüzeye tutunmuş hesperetin-PC 2000 katısı.....	59
Şekil 4.4	0.2 mg/mL Hesperetin-PC2000(~180nm) nanosüspansiyonu infiltire edilmiş örneklerin SEM görüntüleri (a) membranın parlak yüzeyi (b) membranın parlak olmayan yüzeyi	59
Şekil 4.5	0.3 mg/mL Hesperetin-PC2000(~180nm) nanosüspansiyonu infiltire edilmiş örneklerin SEM görüntüleri (a) membranın parlak yüzeyi (b) membranın parlak olmayan yüzeyi	60
Şekil 4.6	0.01; 0.05; 0.1; 0.2 ve 0.3 mg/mL Hesperetin-PC 2000(~180nm) nanosüspansiyonlarının infiltrasyon verimi.....	60
Şekil 4.7	Hesperetin-PC2000 (~180nm) infiltre edilmiş membranın yüzeyinin SEM görüntüsü	61
Şekil 4.8	Yıkama tekniği ile temizlenmiş membranın a) parlak yüzeyinin b) parlak olmayan yüzeyinin SEM görüntüleri	62
Şekil 4.9	0.1 mL/dk hızla 1*3mL programı ile infiltre edilmiş ve (a) MilliQ su ile nemlendirilmiş mendille temizlenmiş (b) MilliQ su ile yıkanmış ve mendille silinmiş membranların SEM görüntüsü.....	63
Şekil 4.10	1*6mL 0.1 mL/dk programla infiltre edilmiş ve (a) MilliQ su ile nemlendirilmiş mendille temizlenmiş (b) yıkama tekniği uygulanmış membranın SEM görüntüsü	64
Şekil 4.11	2*3mL 0.1 mL/dk programla infiltre edilmiş ve (a) MilliQ su ile nemlendirilmiş mendille temizlenmiş (b) yıkama tekniği uygulanmış membranın SEM görüntüsü	65
Şekil 4.12	37.5 °C de MilliQ su kullanılarak (a) nemlendirilmiş mendille temizlenmiş (b) yıkama tekniği uygulanmış membranın SEM görüntüsü	66
Şekil 4.13	47.5 °C de MilliQ su kullanılarak (a) nemlendirilmiş mendille temizlenmiş (b) yıkama tekniği uygulanmış membranın SEM görüntüsü	66
Şekil 4.14	57.5 °C de MilliQ su kullanılarak (a) nemlendirilmiş mendille temizlenmiş (b) yıkama tekniği uygulanmış membranın SEM görüntüsü	67

Şekil 4.15	67.5 °C de MilliQ su kullanılarak (a) nemlendirilmiş mendille temizlenmiş (b) yıkama tekniği uygulanmış membranın SEM görüntüsü	67
Şekil 4.16	77.5 °C de MilliQ su kullanılarak (a) nemlendirilmiş mendille temizlenmiş (b) yıkama tekniği uygulanmış membranın SEM görüntüsü	68
Şekil 4.17	0.001M HCl ile (a) nemlendirilmiş mendille temizlenmiş (b) yıkama tekniği uygulanmış membranın SEM görüntüsü.....	69
Şekil 4.18	0.01M HCl ile (a) nemlendirilmiş mendille temizlenmiş (b) yıkama tekniği uygulanmış membranın SEM görüntüsü.....	69
Şekil 4.19	0.1M HCl ile (a) nemlendirilmiş mendille temizlenmiş (b) yıkama tekniği uygulanmış membranın SEM görüntüsü.....	70
Şekil 4.20	1M HCl ile (a) nemlendirilmiş mendille temizlenmiş (b) yıkama tekniği uygulanmış membranın SEM görüntüsü.....	71
Şekil 4.21	0.01M NaOH ile (a) nemlendirilmiş mendille temizlenmiş (b) yıkama tekniği uygulanmış membranın SEM görüntüsü	72
Şekil 4.22	0.1M NaOH ile (a) nemlendirilmiş mendille temizlenmiş (b) yıkama tekniği uygulanmış membranın SEM görüntüsü.....	73
Şekil 4.23	1M NaOH ile (a) nemlendirilmiş mendille temizlenmiş (b) yıkama tekniği uygulanmış membranın SEM görüntüsü.....	74
Şekil 4.24	Metanol ile (a) nemlendirilmiş mendille temizlenmiş (b) yıkama tekniği uygulanmış membranın SEM görüntüsü.....	74
Şekil 4.25	Asetona maruz kalan membranın görüntüsü.....	75
Şekil 4.26	0.5 µm lik blok membran kullanılarak infiltre edilmiş membranın a) parlak yüzeyinin b) parlak olmayan yüzeyinin SEM görüntüsü	75
Şekil 4.27	0.6 µm lik blok membran kullanılarak infiltre edilmiş membranın a) parlak yüzeyinin b)parlak olmayan yüzeyinin SEM görüntüsü	76
Şekil 4.28	1 µm lik blok membran kullanılarak infiltre edilmiş membranın a) parlak yüzeyinin b)parlak olmayan yüzeyinin SEM görüntüsü	76
Şekil 4.29	%5 lik Hesperetin-PC2000(~400nm) sulu nanosüspansiyonu infiltre edilip (a) MilliQ suyla nemlendirilmiş mendille mekanik temizlenen (b) su ile yıkanan membranın SEM görüntüleri	77
Şekil 4.30	0.1 mg/mL Hesperetin-PC2000(~180nm) ve Hesperetin-PC2000(~400nm) nanosüspansiyonlarının Milli-Q suyla nemlendirilmiş mendil ile temizlenmiş membranların infiltrasyon verimliliği	77
Şekil 4.31	PVA (4-88) membrana aktarılma yoluyla alınan örneklerin görüntüsü	78
Şekil 4.32	10000 rpm 20 dk 200C ayarlarıyla CHCl ₃ kullanılarak elde edilmiş mikroçubukların SEM görüntüleri.....	79

Şekil 4.33	Benzileter ile muamele edilen membrandan toplanan mikroçubuklar	80
Şekil 4.34	Kloroform-Benzileter karışımı ile muamele edilen membrandan toplanan mikroçubuklar	80
Şekil 4.35	Kloroform-Toluen karışımı ile muamele edilen membrandan toplanan mikroçubuklar.....	81
Şekil 4.36	Süzme yoluyla elde edilen mikroçubukların SEM görüntüsü.....	81
Şekil 4.37	10000 rpm 20 dk 20 0C ayarlarıyla CHCl ₃ kullanılarak elde edilmiş mikroçubukların SEM görüntüleri	82
Şekil 4.38	Benzileter ile muamele edilen memrandan toplanan mikroçubuklar	82
Şekil 4.39	Kloroform-Benzileter karışımı ile muamele edilen membrandan toplanan mikroçubuklar.....	83
Şekil 4.40	Kloroform-Toluen karışımı ile muamele edilen membrandan toplanan mikroçubuklar.....	83
Şekil 4.41	Süzme yoluyla elde edilen mikroçubukların SEM görüntüsü.....	84
Şekil 4.42	0.1 mg/mL Hesperetin-PVA(~200nm) nanosüspansiyonu infiltire edilmiş örneklerin SEM görüntüleri: (a) membranın parlak yüzeyi (b) membranın parlak olmayan yüzeyi	85
Şekil 4.43	0.1 mg/mL Hesperetin-PVA(~400nm) nanosüspansiyonu infiltire edilmiş örneklerin SEM görüntüleri: (a) membranın parlak yüzeyi (b) membranın parlak olmayan yüzeyi	85
Şekil 4.44	0.2 mg/mL Hesperetin-PVA(~200nm) nanosüspansiyonu infiltire edilmiş örneklerin SEM görüntüleri: (a) membranın parlak yüzeyi (b) membranın parlak olmayan yüzeyi	86
Şekil 4.45	0.2 mg/mL Hesperetin-PVA(~400nm) nanosüspansiyonu infiltire edilmiş örneklerin SEM görüntüleri: (a) membranın parlak yüzeyi (b) membranın parlak olmayan yüzeyi	86
Şekil 4.46	0.3 mg/mL Hesperetin-PVA(~200nm) nanosüspansiyonu ile infiltire edilmiş örneklerin SEM görüntüleri: (a) membranın parlak yüzeyi (b) membranın parlak olmayan yüzeyi	86
Şekil 4.47	0.3 mg/mL Hesperetin-PVA(~400nm) nanosüspansiyonu ile infiltire edilmiş örneklerin SEM görüntüleri: (a) membranın parlak yüzeyi (b) membranın parlak olmayan yüzeyi	87
Şekil 4.48	0.1; 0.2 ve 0.3 mg/mL Hesperetin-PVA (~200nm) ve Hesperetin-PVA (~400nm) nanosüspansiyonlarınınin infiltrasyon verimi	87
Şekil 4.49	0.2 mg/mL Hesperetin-PVA(~200nm) nanosüspansiyonu 3*3 mL programı ile infiltire edilmiş örneklerin SEM görüntüleri: (a) membranın parlak yüzeyi (b) membranın parlak olmayan yüzeyi....	88
Şekil 4.50	0.2 mg/mL Hesperetin-PVA(~400nm) nanosüspansiyonu 3*3 mL programı ile infiltire edilmiş örneklerin SEM görüntüleri: (a) membranın parlak yüzeyi (b) membranın parlak olmayan yüzeyi....	88

Şekil 4.51	0.2 mg/mL Hesperetin-PVA(~200nm) nanosüspansiyonu 4*3 mL programı ile infiltire edilmiş örneklerin SEM görüntüleri: (a) membranın parlak yüzeyi (b) membranın parlak olmayan yüzeyi....	88
Şekil 4.52	0.2 mg/mL Hesperetin-PVA(~400nm) nanosüspansiyonu 4*3 mL programı ile infiltire edilmiş örneklerin SEM görüntüleri: (a) membranın parlak yüzeyi (b) membranın parlak olmayan yüzeyi....	89
Şekil 4.53	0.2 mg/mL Hesperetin-PVA(~200nm) ve 0.2 mg/mL Hesperetin-PVA(~400nm) nanosüspansiyonlarının 3*3 mL ve 4*3 mL programlarıyla infiltrasyonun verimi.....	89
Şekil 4.54	Hesperetin-PVA(~200nm)/Agaroz mikroçubukları.....	90
Şekil 4.55	Hesperetin-PVA(~200nm)/D-mannitol mikroçubukları.....	91
Şekil 4.56	Mikroçubuk sayımı için seçilen karelerden iki tanesinin mikroskop görüntüsü	91
Şekil 4.57	Boyut ölçümü yapılan mikroçubukların boy/en oranlarına (AR) göre dağılımı.....	92
Şekil 4.58	Hesperetin-PC2000 (~180nm)/Agaroz mikroçubuklarının farklı pH lardaki aktivitesi	94
Şekil 4.59	Hesperetin mikroçubukların pH değişimi ile aktivitesi	95
Şekil 4.60	Hesperetin-PC2000 (~180nm)/D-Mannitol mikroçubuklarının farklı pH lardaki aktivitesi.....	98
Şekil 4.61	Hesperetin mikroçubuklarının farklı pH lardaki aktivitesi	98
Şekil 4.62	Hesperetin-PVA(~200nm)/Agaroz mikroçubuklarının farklı pH lardaki aktivitesi	101
Şekil 4.63	Hesperetin mikroçubukların pH değişimi ile aktivitesi	102
Şekil 4.64	Hesperetin-PVA(~200nm)/D-Mannitol mikroçubuklarının farklı pH lardaki aktivitesi	105
Şekil 4.65	Hesperetin mikroçubukların aktivitesinin pH ile değişimi	105
Şekil 4.66	Hesperetin-PC2000(~180nm)/Agaroz mikroçubukların 37°C de PBS içindeki aktivitesinin zamana bağlı değişimi	108
Şekil 4.67	Hesperetin mikroçubuklarının 37 °C de PBS içindeki aktivitesinin zaman ile değişimi	109
Şekil 4.68	Hesperetin-PC2000(~180nm)/D-Mannitol mikroçubukların 37 °C PBS içindeki aktivitesinin zamana bağlı değişimi	112
Şekil 4.69	Hesperetin mikroçubukların 37°C PBS içindeki aktivitesinin zamana bağlı değişimi.....	112
Şekil 4.70	Hesperetin-PVA(~200nm)/Agaroz mikroçubukların 37 °C PBS içerisindeki aktivitesi.....	115
Şekil 4.71	Hesperetin mikroçubukların 37 °C de PBS içindeki aktivitesinin zaman ile değişimi	115

Şekil 4.72	Hesperetin-PVA($\sim 200\text{nm}$)/D-Mannitol mikroçubukların 37°C PBS içerisindeki aktivitesi.....	119
Şekil 4.73	Hesperetin mikroçubukların 37°C de PBS içindeki aktivitesinin zaman ile değişimi	119



TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1	Farklı dağıtım prosesleri süresince biyodavranışlarda şekil etkisi[27]	13
Tablo 2.1	İlaç taşıma sistemleri ve piyasadaki örnekleri[63, 72]	29
Tablo 3.1	5,0 μm lik gözenek boyutuna sahip track-etched polikarbonat membranın gözenek özellikleri	46
Tablo 4.1	Elde edilen Hesperetin mikroçubuklarının ortalama boy, en ve boy/en oranları	92
Tablo 4.2	Hesperetin-PC2000($\sim 180\text{nm}$)/Agaroz mikroçubuklarının farklı pH lardaki zetasizer ölçüm sonuçları	93
Tablo 4.3	Hesperetin-PC2000($\sim 180\text{nm}$)/Agaroz mikroçubukların UV/VIS piklerinin pH değişimi ile durumu	95
Tablo 4.4	Hesperetin-PC2000($\sim 180\text{nm}$)/D-Mannitol mikroçubukların farklı pH lardaki zetasizer ölçüm sonuçları	97
Tablo 4.5	Hesperetin-PC2000($\sim 180\text{nm}$)/D-Mannitol mikroçubukların UV/VIS piklerinin pH değişimi ile durumu	99
Tablo 4.6	Hesperetin-PVA($\sim 200\text{nm}$)/Agaroz mikroçubukların farklı pH lardaki zetasizer ölçüm sonuçları	100
Tablo 4.7	Hesperetin-PVA($\sim 200\text{ nm}$)/Agaroz mikroçubukların UV/VIS piklerinin pH değişimi ile durumu	102
Tablo 4.8	Hesperetin-PVA ($\sim 200\text{nm}$)/D-Mannitol mikroçubukların farklı pH lardaki Zetasizer ölçüm sonuçları	104
Tablo 4.9	Hesperetin-PVA($\sim 200\text{nm}$)/D-Mannitol mikroçubukların UV/VIS piklerinin pH değişimi ile durumu	106
Tablo 4.10	Hesperetin-PC2000($\sim 180\text{nm}$)/Agaroz mikroçubukların 37 $^{\circ}\text{C}$ deki PBS çözeltisi içerisindeki zetasizer ölçüm sonuçları	107
Tablo 4.11	Hesperetin-PC2000($\sim 180\text{nm}$)/Agaroz mikroçubukların 37 $^{\circ}\text{C}$ de PBS içerisindeki UV/VIS piklerinin zamana göre durumu	109
Tablo 4.12	Hesperetin-PC2000($\sim 180\text{nm}$)/D-Mannitol mikroçubukların 37 $^{\circ}\text{C}$ deki PBS çözeltisi içerisindeki zetasizer ölçüm sonuçları	111
Tablo 4.13	Hesperetin-PC2000($\sim 180\text{nm}$)/D-Mannitol mikroçubukların 37 $^{\circ}\text{C}$ de PBS içerisindeki UV/VIS piklerinin zamana göre durumu	113
Tablo 4.14	Hesperetin-PVA($\sim 200\text{ nm}$)/Agaroz mikroçubukların 37 $^{\circ}\text{C}$ deki PBS çözeltisi içerisindeki Zetasizer ölçüm sonuçları	114
Tablo 4.15	Hesperetin-PVA($\sim 200\text{nm}$)/Agaroz mikroçubukların 37 $^{\circ}\text{C}$ de PBS içerisindeki UV/VIS piklerinin zamana göre durumu	116

Tablo 4.16 Hesperetin-PVA(~200nm)/D-Mannitol mikroçubukların 37 °C deki PBS çözeltisi içerisindeki Zetasizer ölçüm sonuçları	118
Tablo 4.17 Hesperetin-PVA(~200nm)/D-Mannitol mikroçubukların 37°C de PBS içerisindeki UV/VIS piklerinin zamana göre durumu	120



Çeşitli Hesperetin Nanosüspansiyonlarından Farklı Biyomalzemeler ile Stabilize Edilmiş Hesperetin Mikroçubuklarının Elde Edilmesi ve Karakterizasyonu

Yeşim KARAHAN

Kimya Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Danışman: Doç. Dr. Dolunay ŞAKAR DAŞDAN

Solunum yolu hastalıkları, akciğer kanseri ile birlikte düşünüldüğünde Türkiye İstatistik Kurumu 2019 verilerine göre ölüm nedeni sıralamasında ikinci sıradadır. Son yıllarda görülme sıklığı artan solunum yolu hastalıklarının başında astım, KOAH ve akciğer kanseri gelmektedir. Genel olarak, bu hastalıklarda solunum yollarında oksidatif stres ve inflamasyon gerçekleşmektedir. Pekçok terapötik etkiye sahip olan Hesperetin etken maddesi, özellikle antioksidan, antiinflamatuvar ve antikanserojen özellikleri nedeniyle ilgi çekmektedir. Literatürde Hesperetin'in solunum yolları hastalıkları üzerindeki olumlu etkisine dair pekçok çalışma mevcuttur.

İlaç taşıyıcıları olarak küresel olmayan partiküllerin kullanıldığı kontrollü pulmoner ilaç dağıtım sistemleri günümüzde büyük ilgi görmektedir. Bu tür anizotropik morfolojiler, akciğer hava yollarında daha derine inebilir, böylece terapötik bileşiklerin ilgilenilen noktada verimli bir şekilde birikmesini ve ardından bunların sürekli salımlarını mümkün kılar. Bu nedenle, Hesperetin'in oral

yolla alımı yerine pulmoner yolla mikroçubuk şeklinde alınmasıyla, direkt akciğere ulaşmasından dolayı daha verimli sonuç alınabileceği öngörülebilir.

Bu çalışmada, Hesperetin etken maddesinin pulmoner yolla alımına uygun mikroçubuklar halinde elde edilmesi ve bu mikroçubukların karakterizasyonunun yapılması amaçlanmıştır. Bunun için PC2000 (plantacare 2000) ve PVA (polivinilalkol) ile stabilize edilmiş Hesperetin nanosüspansiyonlarından (Hesperetin-PC2000 ve Hesperetin-PVA), Hesperetin mikroçubukları elde etmek amacıyla Template-assisted tekniğin infiltrasyon yaklaşımı uygulanmış ve uygun koşullar (konsantrasyon, partikül boyutu, infiltrasyon sayısı, çözücü, santrifüj ayarları vb.) saptanarak tekniğin optimizasyonu sağlanmıştır. Mikroçubukların stabilizasyonunda, doğal biyomalzeme olan agaroz ve D-mannitol kullanılmıştır. Mikroçubukların karakterizasyonu SEM, ImageJ-Win64, floresans mikrokobu ile yapılmış, mikroçubukların farklı pH lardaki ve 37°C PBS (pH 7.4± 0.1) içerisindeki kararlılığı ve aktivitesinin zamana göre değişimi ise Zetasizer ölçümleri ve UV/vis spektrofotometresi ile incelenmiştir.

Çalışma sonucunda elde edilen tüm mikroçubukların pulmoner yolla alıma uygun oldukları, akciğer koşullarında, yapılarındaki radikal süpürme yeteneğine sahip -OH ve -CH gruplarının aktif olmasıyla, akciğerde antioksidan, antiinlamatuar ve antikanserojen etki göstereceği ve solunum yolu hastalıkları tedavisinde oldukça etkili olacağı düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Hesperetin, Mikroçubuk, Biyomalzeme, Template-assisted Teknik, Pulmoner yolla ilaç alımı

Obtaining and Characterization of Hesperetin Microrods Stabilized by Different Biomaterials from Various Hesperetin Nanosuspensions

Yeşim KARAHAN

Department of Chemistry

Doctor of Philosophy Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Dolunay ŞAKAR DAŞDAN

When respiratory tract diseases and lung cancer are considered together, it is the second cause of death according to the 2019 data of the Turkish Statistical Institute. Asthma, COPD and lung cancer are the leading respiratory diseases whose incidence has increased in recent years. Generally, oxidative stress and inflammation occur in the respiratory tract in these diseases. Hesperetin, which has many therapeutic effects, attracts attention especially because of its antioxidant, anti-inflammatory and anticarcinogenic properties. In the literature, there are many studies on the positive effect of Hesperetin on respiratory tract diseases.

Nowadays, controlled pulmonary drug delivery systems using non-spherical particles as drug carriers are of great interest. Such anisotropic morphologies can penetrate deeper into the lung airways, enabling efficient deposition of therapeutic compounds at the point of interest followed by their sustained release. Therefore, it can be predicted that more efficient results can be obtained by taking

Hesperetin in the form of microrods by pulmonary route instead of oral ingestion, since it reaches the lungs directly.

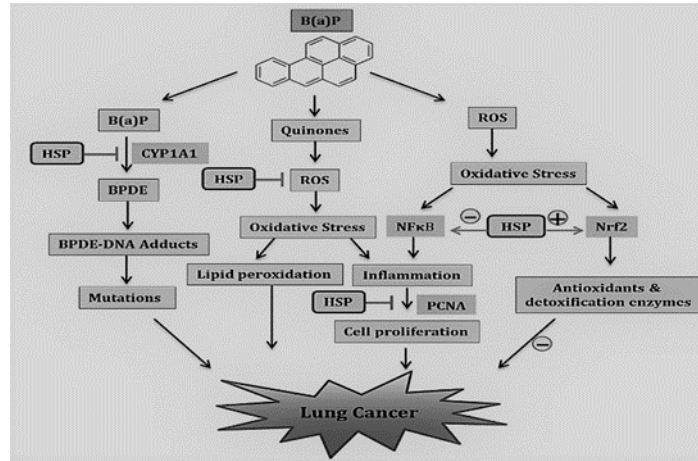
In this study, it was aimed to obtain the Hesperetin as microrods suitable for pulmonary intake and to characterize these microrods. For this, the infiltration approach of the Template-assisted technique was applied to obtain Hesperetin microrods from Hesperetin nanosuspensions (Hesperetin-PC2000 and Hesperetin-PVA) stabilized with PC2000 (plantacare 2000) and PVA (polyvinylalcohol), and the optimization of the technique was ensured by determining the appropriate conditions (concentration, particle size, infiltration number, solvent, centrifuge settings, etc.). Natural biomaterials agarose and D-mannitol were used to stabilize the microrods. The characterization of the microrods was made with SEM, ImageJ-Win64, fluorescence microscopy, and change of the stability and activity of the microrods at different pHs and 37°C PBS (pH 7.4 ± 0.1) over time were examined by Zetasizer measurements and UV/vis spectrophotometer.

It was thought that all microrods obtained as a result of the study were suitable for pulmonary uptake, and that they would have antioxidant, anti-inflammatory and anticarcinogenic effects in the lung, and would be very effective in the treatment of respiratory tract diseases, with the active -OH and -CH groups that have radical scavenging ability in lung conditions.

Keywords: Hesperetin, Microrods, Biomaterials, Template-assisted Technic, Pulmonary drug delivery

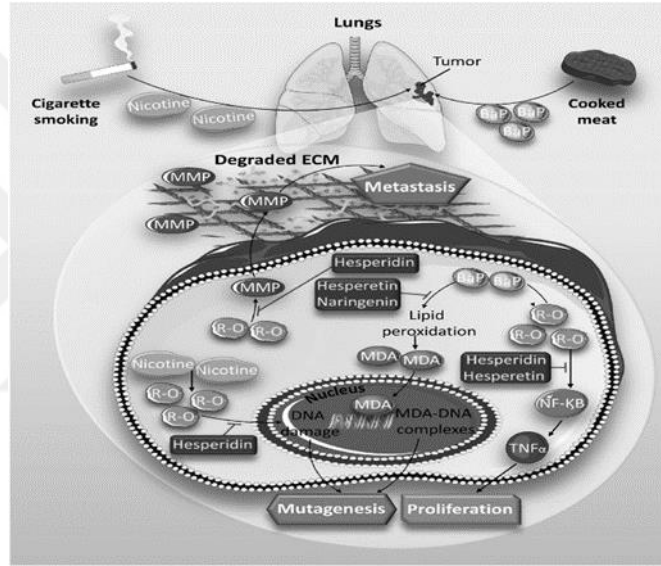
1.1 Literatür Özeti

Hesperetin, serbest radikal süpürücü, antioksidan, antiinflamatuvar, antiproliferatif özellikleri nedeniyle özellikle antikarsinojen etkiye sahip bir bioflavanoid olduğundan oldukça dikkat çekmektedir. Literatürde özellikle kanser tedavisi amaçlı çalışmalarda sıklıkla yer almaktadır. Örneğin; İsviçreli albino fareler üzerinde yapılan bir çalışmada; morfolojik, biyokimyasal, histopatolojik ve immünoiblot analizine referansla elde edilen sonuçlar Hesperetin kullanımının lipit peroksidasyonu azaltarak ve antioksidan savunma sisteminin tüm bileşenlerini artırarak, B(a)P (Benzo(a)piren)in neden olduğu oksidatif hasara karşı akciğerleri koruduğunu, ayrıca proinflamatuvar sitokin (TNF- α : Tümör Nekroz Faktör Alfa) seviyesini azalttığı ve NF- κ B(Nükleer faktör kappa B), PCNA (Proliferatif hücre nükleer antijeni), CYP1A1(Sitokrom p450 enzimleri) ve Nrf2(Serum Nükleer Faktör Eritroid ile İlişkili Faktör2)'nin protein ekspresyonunu modüle ettiği, böylelikle akciğer kanseri modelinde çarpıcı bir kemopreventif etkinlik gösterdiği tespit edilmiştir[1].



Şekil 1.1 Hesperetin Akciğer kanserinde B(a)P hasarına karşı olası koruma mekanizması[1]

Hesperetin antioksidan etkilerinden kaynaklanan antikanser potansiyeline sahiptir. Akciğer kanseri hücrelerinde, hesperetin, BaP ile indüklenen reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini takiben malondialdehit (MDA) gibi lipid peroksidasyon ürünlerinin salınımını önler. Bu, MDA'nın DNA ile etkileşimini engeller ve ortaya çıkan zararlı olayları geçersiz kılar [1]. Mutajenezi dengelemenin yanı sıra, hesperetin ayrıca bu hücrelerin BaP ile indüklenen proliferasyonunu durdurma yeteneğine de sahiptir. Hesperetin'in antiproliferatif etkilerine BaP/ROS/NF- κ B yolunun inhibisyonu ve ardından proliferatif transkripsiyon faktörü TNF- α 'nın ekspresyonunun hafifletilmesi aracılık eder (Şekil 1.2) [1, 2].



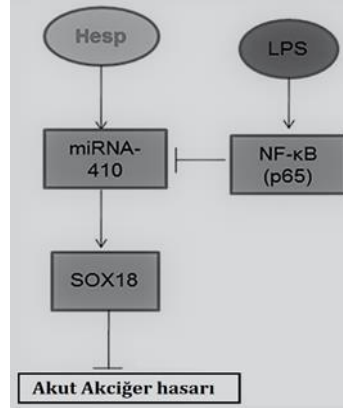
Şekil 1.2 BaP ve nikotin kaynaklı akciğer karsinogenezini bloke etmede hesperidin ve hesperetin işlevleri[3]

Pişmiş ette bulunan bir kanserojen olan BaP, akciğer kanseri hücrelerinde oksidatif stresi teşvik eder. Bu, sırayla proliferatif etkileri hızlandıran NF- κ B/TNF- α ekseninin aktivasyonuna yol açar. Bununla birlikte, hesperidin ve hesperetin, NF- κ B'nin ROS aracılı aktivasyonunu ve bunun sonucunda akciğer kanseri hücrelerinin çoğalmasını önleme kapasitesine sahiptir. Ayrıca, BaP maruziyeti lipid peroksidasyonunu ve MDA üretimini indükleyebilir. İkincisinin, DNA ile genotoksositeye yol açan kompleksler oluşturduğu bilinmektedir. İlginç bir şekilde, hesperetin BaP'nin neden olduğu lipid peroksidasyonunu önleyebilir ve böylece mutajenezi önleyebilir. Benzer bir sonuç, nikotin kaynaklı DNA hasarına karşı

hesperidin tarafından da elde edilir. Son olarak, hesperidin, MMP(matrix metalloproteinaz)'lerin aktivitesinin ROS aracılı tanıtımını hafifletebilir, bu nedenle metastazı engelleyebilir[3].

Bir başka invivo çalışmada ise, kanser tedavisinde sık kullanılan Cisplatine karşı direnç gösteren hastaların tedavisi için, adenokarsinom/Cisplatin hücrelerine Hesperetin eklenmesiyle kemoterapinin etkisiz olmasına neden olan proteinin, P-gp (P-glikoprotein), ekspresyonunu belirgin şekilde azalttığı ve adenokarsinom hücrelerinde P-gp substratının hücre içi birikimini arttırdığı ve ayrıca adenokarsinom/Cisplatin hücrelerinin hesperetin ile ön tedavisi, (NF)- κ B (p65) (nükleer faktör) aktivitesini ve nükleer translokasyonunu önemli ölçüde inhibe ettiği saptanmış ve sonuçta hesperetinin, NF- κ B sinyal yolunun inhibisyonu ile ilişkili olan adenokarsinom/Cisplatin hücrelerinde P-gp ekspresyonunu azaltarak P-gp aracılı çoklu ilaç direncini tersine çevirdiğini göstermiştir[4].

Akut akciğer hasarına karşı Hesperetinin tedavi edici etkisinin araştırıldığı bir başka çalışma ise, Hesperetinin sadece akciğerlerdeki histopatolojik değişiklikleri iyileştirmekle kalmadığını, aynı zamanda ıslak/kuru oranını da azalttığını, Hesperetin tedavisinden sonra bronkoalveolar sıvıda toplam hücre sayısı ve nötrofil ve makrofaj sayısı, proinflamatuvar sitokin seviyelerindeki değişikliklerle uyumlu olarak daha düşük olduğunu; akut akciğer hasarlı farelerin Hesperetin tedavisinden sonra, akciğer dokularında MicroRNA-410 (miR-410) seviyeleri önemli ölçüde artış olduğunu, miR-410'un cinsiyet belirleyen bölge Y-box 18'in (SOX18) inhibisyonunu hedeflediğinden Hesperetinin miR-410/SOX18 eksenini bloke ederek inflamatuvar sekresyonu hafifletebileceğini ve bu yolla Hesperetinin akut akciğer hasarını iyileştirdiğini göstermiştir (Şekil 1.3)[5].



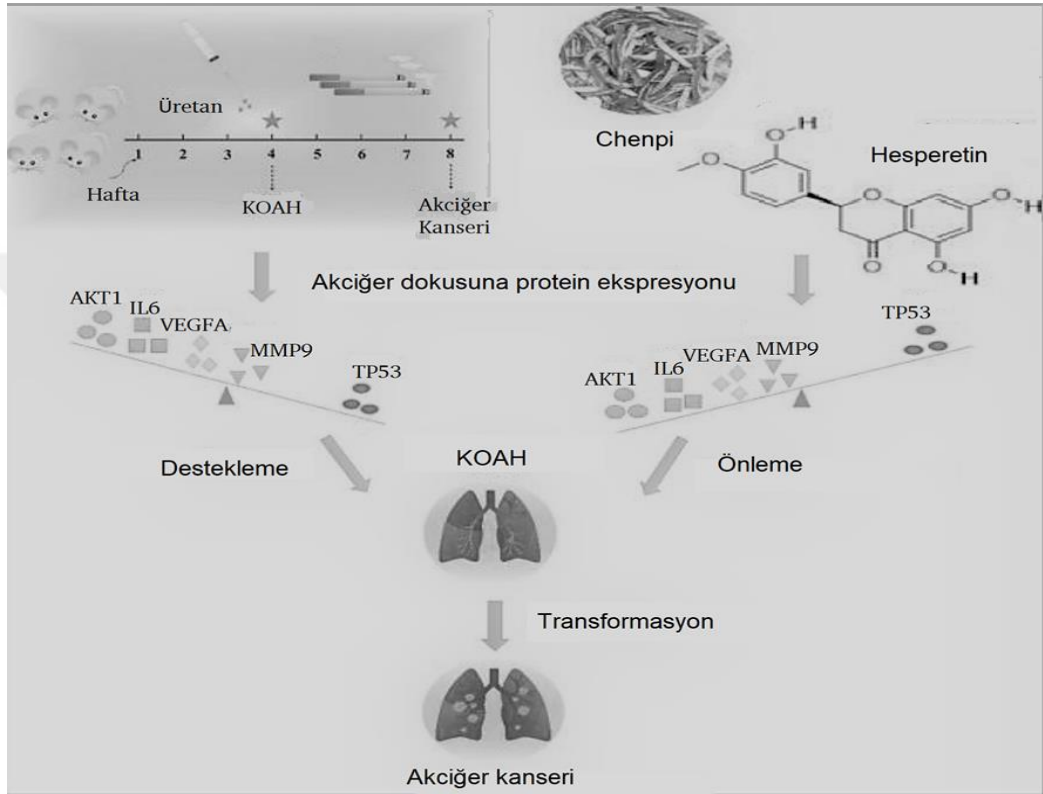
Şekil 1.3 Hesperetinin akut akciğer hasarını önleme mekanizmasının şematik gösterimi [5]

Akciğer adenokarsinomunda, yüksek oranda eksprese edilen ve kötü prognoz ile ilişkili olan UGT1A3 (UDP-Glukuronosil Transferaz) ün akciğer adenokarsinomunun ilerlemesindeki rolünü ve akciğer adenokarsinomunda tedavisinde hesperetin inhibitörünün değerini araştırmak olan bir başka in vivo çalışmada, Hesperetin, akciğer adenokarsinomu hücre çoğalmasını ve göçünü baskıladığı, ve akciğer adenokarsinomu için önemli bir prognostik faktör olan UGT1A3'ü inhibe ederek ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) seviyelerini artırarak platin ilaçları sinerjize edebileceği ve Hesperetin'in platin ile kombinasyon tedavisi, özellikle tek ilaç tedavisi ile karşılaştırıldığında, tümör ilerlemesini daha önemli ölçüde baskıladığı sonucuna ulaşılmıştır[6].

Lewis akciğer karsinomu (LAK) hücreleri ve fareleri kullanarak akroleinin neden olduğu akciğer hasarında hesperetinin koruyucu rolünü araştıran bir diğer in vitro/in vivo çalışmada, LAK hücrelerinin ve farelerin akroleine maruz kalması üzerine, hesperetin oksidatif stresi azaltarak akciğer hasarını iyileştirdiği, hesperetinin hem in vitro hem de in vivo modellerde akciğer hücrelerinin akrolein ile indüklenen apoptozisine karşı koruyucu bir etki sergilediğini göstermişlerdir[7].

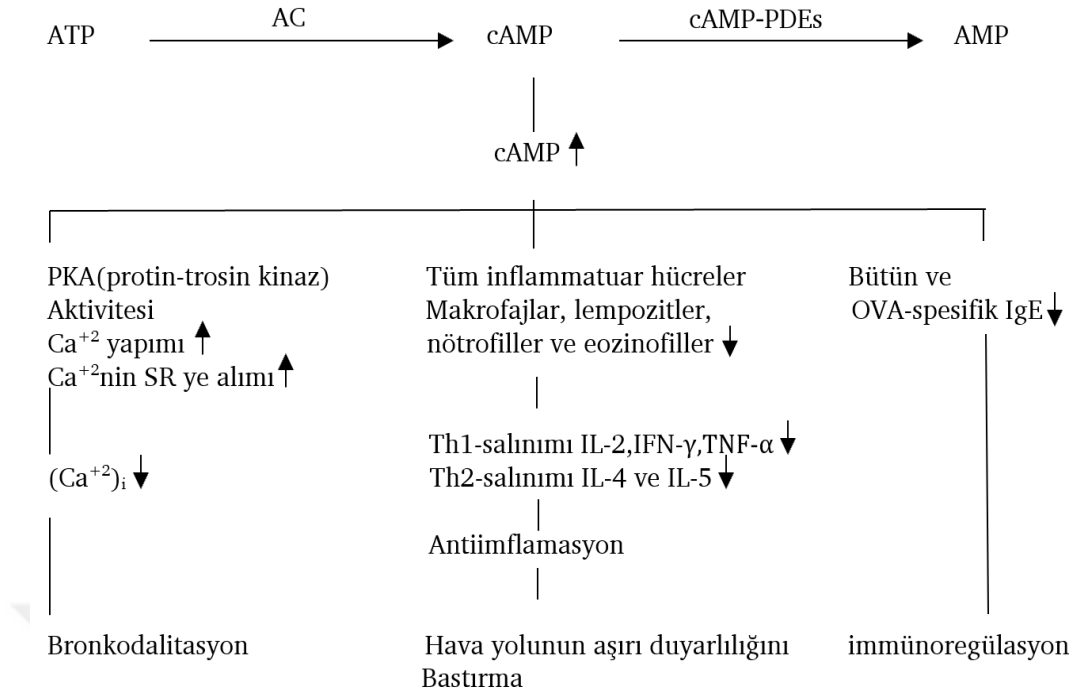
KOAH (Kronik obstrüktif akciğer hastalığı)'lı fare akciğeri kanseri, ürean enjeksiyonu ile birlikte sigara içimi ile indüklenerek, hesperetin'in KOAH'ın akciğer kanserine ilerlemesi ve bunun altında yatan mekanizmalar üzerindeki etkisinin önlenmesini doğrulamak amacıyla yapılan bir in vivo çalışmada ise, Hesperetin, AKT1 (Protein kinaz B), IL6 (interlökin-6), VEGFA (Vasküler

Endotelyal Büyüme Faktörü), MMP9 (Matrix metalloproteinaz) ve TP53(Tumor protein 53)'ü düzenleyerek KOAH'ı ve akciğer kanserine ilerlemesini önlemeye yardımcı olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Ayrıca, KOAH'lı fare akciğer kanserinde, hesperetin ile tedavi doza bağlı olarak sadece KOAH'ta akciğer dokusu hasarını değil, aynı zamanda akciğer kanserinde karsinom lezyonlarını da iyileştirildiği gözlenmiştir(Şekil 1.4)[8].



Şekil 1.4 Hesperetinin, CS ve üretan tarafından indüklenen KOAH'lı fare akciğer kanserinde AKT1, IL6, VEGFA, MMP9 ve TP53'ü düzenleyerek KOAH'ı ve akciğer kanserine ilerlemesini önlemesinin şematik gösterimi

Alerjik astımı ve KOAH'ı hesperetin ile iyileştirmenin yolunun, PDE4(fosfodiesteraz) inhibisyonundan kaynaklanan antiinflamasyon, immünoregülasyon ve bronkodilatasyon olduğuna dair yapılan bir başka çalışmada, hesperetinin, bir murin alerjik astım modelinde havayollarının aşırı tepkisini baskılanması ve inflamatuvar hücrelerin ve sitokinlerin ekspresyonlarının azalması dahil olmak üzere anti-inflamatuvar etkiler gösterdiğini, bununla birlikte, ksilazin/ketamin ile indüklenen anesteziyi etkilemediğinden kusturucu etkisinin çok az olduğunu veya hiç olmadığı sonucuna varılmıştır[9].



Şekil 1.5 Hesperetin'in mekanizmasının şematik gösterimi[9]

Şekil 1.5 'te AC: adenilat siklaz; Th: T-yardımcı hücreler; Ig: immünoglobulin; IL: interlökin; IFN: interferon; TNF: tümör nekroz faktörü. Yukarı ve aşağı oklar sırasıyla artış ve azalışları gösterir.

Hesperetin'in etki mekanizmaları(Şekil 1.5). Hesperetin, PDE4 aktivitesini seçici olarak inhibe eder ve cAMP (Adenozin 3',5' siklik monofosfat)'ye bağlı protein kinazı (PKA) aktive eden ve hücre içi boşluktan kalsiyum ekstrüzyonunu ve sarkoplazmik retikula (SR) alımını artıran cAMP'de bir artışa neden olur. Bu nedenle hesperetin, hücre içi kalsiyum ($[Ca^{2+}]_i$) konsantrasyonunu büyük ölçüde azaltır ve bronkodilatasyona neden olur. cAMP'deki artışın ayrıca anti-inflammatuar ve immün düzenleyici etkileri vardır.

Hesperetin'in, akciğer kanseri üzerine etkisine dair bir başka çalışma, H522 akciğer hücreleri üzerinde zamana ve doza bağlı bir şekilde güçlü bir anti-proliferatif etki ettiğini, pro oksidan enzimlerin ekspresyonunu baskılayarak, hücrelerin proliferasyonu ile ilgili hedef genleri inhibe ederek ve apoptozu indükleyerek karsinogenez sürecini inhibe ettiğini göstermiştir[10].

IL-1 β (interlökin-1beta) ile uyarılan akciğer adenokarsinomu hücre proliferasyonu ve COX-2 (siklooksijenaz) aracılı inflamasyonda hesperetin'in antikanser

etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, insan akciğer adenokarsinomu A549 hücreleri, Hesperetin ile veya Hesperetin olmadan serum açlığına maruz bırakılma yoluyla değişen süreler için IL-1 β (interlökin) ile uyarılmış, hücre canlılığı ve proliferasyonu, MTT(dimetilazol-2-il difenil tetrazodum bromür) ve yara iyileştirme deneyleri ile değerlendirilmiş, hücre döngüsü ilerlemesi, akış sitometrisi ile ölçülerek ve sırasıyla COX-2 mRNA ve protein ekspresyonunu incelemek için RT-PCR ve immünoiblotlama yöntemleri kullanılarak elde edilen sonuçlar; Hesperetinin, IL-1 β etkisiyle hücre canlılığı ve proliferasyonunda zamana ve doza bağlı bir artışını, COX-2'nin transkripsiyon ve translasyon seviyelerinde ekspresyonunu, COX-2 proteininin stabilitesini artırdığını ve PGE2(prostoglandin 2) üretimini önemli ölçüde azalttığını göstermiştir. Ayrıca, IL-1 β , A549 hücrelerinde Hesperetin tarafından tersine çevrilen ERK-1/2 (protein kinaz hücre içi sinyal faktörü) ve NF-KB'nin (nükleer faktör) p65 alt biriminin artan fosforilasyonunu uyardığı saptanmıştır. Tüm bunlara dayanarak, Hesperetinin IL-1 β ile uyarılan hücre proliferasyonunu, COX-2 ekspresyonunu ve translasyon seviyesinde düzenlenmesini ve A549 akciğer epitel hücrelerinde PGE2 sentezini inhibe edebildiğini ve bunun akciğer kanseri hücrelerinde anti-inflamatuar ve antikanser potansiyelini gösterdiğini göstermektedir[11].

Ayrıca, Hesperetin beyin-kan bariyerini geçebilme özelliğiyle de alzheimer, demans gibi pekçok nörolojik hastalığın tedavisi içinde araştırma konusudur. Hesperetinin, altta yatan mekanizmalarla ileri glikasyon son ürünü (AGE) ile indüklenen Alzheimer hastalığına benzer patofizyolojik değişikliklerle karşılaşp karşılaşamayacağını araştırmayı hedefleyen bir başka çalışmada ise. hesperetin'in nöroblastom hücrelerini çoklu mekanizmalar yoluyla AGE'nin neden olduğu hasara karşı koruduğu ve bu nedenle glikasyon koşulları altında artan nörodejeneratif bozuklukların potansiyel semptom öncesi tedavisi için mükemmel bir seçenek olabileceği sonucuna ulaşılmıştır[12].

Pankreasın insülin üreten beta hücrelerine özellikle toksik olan doğal olarak oluşan alkilleyici bir antineoplastik ajan kaynaklı Streptozotosin in neden olduğu Diyabetik nefropatide, iskenderiye üçgülünden (Trifolium alexandrinum) ekstrakte edilen hesperetin ve kuersetinin anti diyabetik, antioksidan ve anti-inflamatuar etkilerinin altında yatan terapötik etkileri ve mekanizmaları

değerlendirmek amacıyla erkek albino fareler üzerinde yapılmış bir diğer in vivo çalışmada elde edilmiş veriler, yüksek oranda yağlı diyet ve streptozotisin uygulanan sıçanların Hesperetin ve kersetin ile indüklenen diyabetik nefropatide, antioksidan, antienflamatuar ve antidiyabetik etkiler yoluyla TGF- β , TNF- α ve IL-6 ekspresyonlarını baskılayarak, böbrek biyokimyasal, western blotlama ve histopatolojik bulgulardaki anormallikleri önemli ölçüde iyileştirdiğini, böylece böbrek fonksiyonunu iyileştirdiğini, oksidatif hasarı iyileştirdiğini ve inflammatuar hasarını hafiflettiğini, diyabetik nefropatiye karşı koymak için güçlü terapötik ajanlar olarak kullanılabileceğini göstermiştir[13].

Dizel egzoz partiküllerine (DEP) maruz kalan sıçanlar üzerinde yapılan bir başka çalışma, hesperetinin, DEP'nin oksidatif ve inflammatuar etkilerini azaltarak, sağlık ve uzun ömürlülüğü desteklemeye katkıda bulunarak DEP'nin kardiyovasküler toksik etkilerini yatıştırma yeteneğine sahip olduğunu ve hesperitin, DEP ile indüklenen etkilerin inhibisyonu ile sonuçlanan hedef proteinler için DEP ile rekabet ettiğini göstermiş, narenciye ve diğer sebzelerin tüketimi, dizel egzoz partiküllerinin neden olduğu kardiyovasküler rahatsızlıkların azaltılması/ortadan kaldırılması için etkili bir terapi sağlayabileceğini göstermiştir[14].

Diyabetin tetiklediği anksiyete ve depresif bozuklukların Nrf2 (Nüklear faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör-2)/ARE (antioksidan yanıt ögesi) yolunun yetersizliği ile ilişkili olduğunu ve diyabetle ilişkili merkezi sinir sistemi bozukluklarının önlenmesi ve tedavisinde narenciye türlerinden flavonoidlerin potansiyel bir klinik uygulamasını sağlayan bir çalışmada ise, hesperetinin sıçanlarda diyabetin neden olduğu anksiyete ve depresyon benzeri davranışları iyileştirdiğini ve Glo-1(gliksolaz 1) güçlendirme ve Nrf2/ARE yolu aktivasyonu ile elde edilen kronik yüksek glukoz kaynaklı merkezi nöron hasarlarına karşı nöroprotektif etkiler gösterdiğini ve Nrf2/ARE yolunun hesperetin tarafından aktivasyonu, PKC (protein kinaz C) aktivasyonu ve/veya GSK-3 β (glikojen sentaz kinaz 3 beta) inhibisyonu ile ilişkili olduğunu göstermiştir[15].

İlaç etken maddesinin makrofajlar tarafından fagositesinden kaçınması, başarılı bir şekilde hedefine ulaşması, ilgili hücre tarafından içselleştirilmesi açısından partikül şekli büyük önem taşımaktadır.

Altın nanopartiküllerinin geometrileri ve yüzey karakteristiklerinin, biyolojik dağılım ve makrofajlar tarafından alımı üzerindeki etkisini inceleyen bir çalışmada, ortotopik epiteryal over kanseri taşıyan fareler kullanılarak PEGillenmiş altın nanoçubukların ve benzer boyuttaki kürelerin biyolojik dağılımı araştırılması sonucu, her iki nanopartikülün karaciğer ve dalakta önemli ölçüde birikme yaparken, diğer organlarda nanoçubukların daha çok biriktiği saptanmıştır. Bununla beraber, çubuk şeklindeki nanopartiküllerin kanda daha uzun bir dolaşım süresine sahip olduğu ve tercihen katı tümörlerde küresel nanopartiküllere kıyasla daha fazla biriktiği belirlenmiş, altın nanoçubukların makrofajlar tarafından in vitro olarak nanokürele kıyasla daha az oranda alındığı sonucuna ulaşılmıştır[16].

Çeşitli boyutlarda, farklı geometrilerde polimerik mikropartiküllere Doksorubisin konjuge edilip, biyokonjugatlar karakterize edilerek, solunan taşıyıcıların partikül şeklinin aerodinamik özellikleri ve makrofaj alımı üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, yeni nesil bir intersepsiyon (çarpma) tertibatı kullanılarak gerçekleştirilen in vitro akciğer birikiminin sonuçları, aynı eşdeğer hacme sahip küresel parçacıklara kıyasla, yüksek boy/en oranı (AR) na sahip çubuk şeklindeki parçacıkların aerodinamik özelliklerinde önemli bir gelişme olduğu, yüksek boy/en oranlı parçacıkların küresel parçacıklardan daha az fagosit edildiği gösterilmiştir. Ayrıca, bu doksorubisin konjuge partiküllerinin sitotoksitesi, murin makrofajlarına karşı belirlenmiş, bu da küresel partiküllere kıyasla yüksek boy/en oranlı partiküllerle işlendiğinde toksisitenin azalmasına neden olduğu tespit edilmiştir[17].

Partikül şeklinin, tümöre alımı ve dağılımı üzerindeki etkisi değerlendirilmek üzere, benzer boyutlarda ancak çeşitli şekillerde üretilen altın nanoyapılar (nanoküreler, nanodiskler, nanokafesler ve nanoçubuklar) meme kanseri taşıyan farelere intravenöz olarak enjekte edildiğinde, kübik ve çubuk şekilli partiküllerin küresel ve disk şeklindeki partiküller, tümör yüzeyine daha yüksek alımla ancak daha az penetrasyon eğilimi göstermiştir. Ancak, nanoçubuk ve nanokafeslerin ise, tümörün içine nüfuz ederek yüksek birikim gösterdiğinden kanserin fototermal tedavisi için uygun olduğu belirlenmiştir[18].

Boyut, şekil ve yüzey kimyasının tam kontrolü ile tek tip organik mikro ve nano partikül popülasyonları oluşturabilen PRINT adı verilen yukarıdan aşağıya bir partikül üretim tekniği kullanılarak hazırlanan, boyut, şekil ve yüzey yükünün bir fonksiyonu olarak özel olarak tasarlanmış, monodispers hidrojel partiküllerinin HeLa hücrelerine içselleştirilmesi üzerine yapılmış bir diğer çalışmada; geleneksel biyolojik teknikler ve transmisyon elektron mikroskobu kullanılarak elde edilen sonuçlara göre, HeLa hücrelerinin, birkaç farklı endositoz mekanizması kullanılarak, küresel olmayan parçacıkları kolayca içselleştirdiği gösterilmiştir. Ayrıca, çubuk benzeri parçacıkların, birçok çubuk benzeri bakterinin fagositik olmayan hücrelerde içselleştirme için sahip olduğu avantajı anımsatan, içselleştirme oranları söz konusu olduğunda kayda değer bir avantaja sahip olduğu bulunmuştur[19].

Küresel olmayan parçacıkların teorik olarak küresel parçacıklardan daha yüksek bir yüzey-yapışkan etkileşim alanına sahip olduğu bilgisine dayalı olarak, eritrosit açısından zengin kan akışında duvar lokalizasyon davranışlarını araştırmak için nano-mikro ölçekte çeşitli parçacık boyutu ve şekil parametrelerini entegre eden ayrıntılı bir sistematik çalışmada, nano-mikro ölçekli boyutları kapsayan dört farklı şekildeki (küresel, yassı, oval, çubuk) parçacıkları kullanan hesaplamalı ve deneysel çalışmalar yürütülmüştür. Yapılan bu hem hesaplamalı hem de deneysel çalışmada, kan akışında tutulmaları için farklı parçacık boyutları ve şekillerinin eşzamanlı analizi sağlanmış ve eritrosilerin varlığında, mikro ölçekli küresel olmayan parçacıkların nano ölçekli küresel parçacıklara kıyasla gelişmiş 'marjinasyon+adezyon' geçirdiğini ve daha yüksek bağlanma oranıyla sonuçlandığını göstermiştir[20].

Intravasküler sistemde, küresel ve çubuk şekilli olmak üzere iki farklı şekle sahip polistiren nanoparçacıkların bağlanma afiniteleri karşılaştırıldığı bir çalışmada. nanoparçacık şeklinin parçacık yapışması üzerindeki etkisini değerlendirmek için, anti-VCAM-1 (anti-vazküler hücre adezyon molekülü) ile kaplanan nanoparçacıklar, statik koşullar altında serebral mikrovaskülatür hücreleri (bEnd.3) ile kaplanmış hücre kültürü kaplarında ve hCMEC/D3 (kan/beyin bariyer hattı hücreleri) ile kaplı mikroakışkan kanallarda dinamik akış koşulları altında test edilmiş ve parçacık şeklinin birikim üzerindeki etkisi, sistemik

iltihaplanma ve lokal beyin iltihabı dahil olmak üzere iki in vivo modelde de değerlendirilmiştir. Uzatılmış çubuk şeklindeki partiküllerin, in vitro olarak daha büyük bağlanma kabiliyeti gösterdiği ve statik kültürler için birikimde 2.5 kat ve akış koşulları için 1.5 kat artışa ulaştığı, anti-VCAM-1 kaplı çubuklar, kontrol çubuklarına kıyasla beyin birikiminde 3.5 kat artış gösterdiği sonuçlarına ulaşılmıştır[21].

ApoE^{-/-} gelişmiş aterosklerozlu fareler kullanarak, boyut ve şeklin vasküler hedefli bir taşıyıcı sistemin iltihaplı endotel hücrelerini plak üzerinden bağlama kapasitesini nasıl etkilediğinin değerlendirildiği bir in vivo çalışmada, hedeflenen elipsoidal mikropartiküllerin, özellikle aterosklerotik plaklar içeren segmentlerde, benzer hacimli mikrokürelerden daha yüksek seviyelerde fare aortasına yapıştığı, mikropartiküllerin, hem elipsoidal hem de küresel nanopartiküllere kıyasla adezyon yeteneğinin daha fazla olduğu ve plak ile ilişkili inflamasyonu hedefleyen mikropartiküllerin, büyük ölçüde pulmoner endotel ile moleküler etkileşime bağlı olarak, hedeflenmemiş partiküllere göre akciğerlerde daha yüksek seviyelerde tutulduğu gösterilmiştir[22].

Manyetitsiz (ağırlıkça %0 OA-Fe₃O₄) ve manyetit yüklü (ağırlıkça %50 ve %70 Fe₃O₄) mikro çubukların üretimi, hazırlanan elektrospun elyafların UV ışınmasına tabi tutulması ve ardından sonikasyona tabi tutulmasıyla gerçekleştirilen ve model farmasötik bileşik olarak metil 4-hidroksibenzoat (MHB) içeren ilaç yüklü mikro çubukların üretildiği ve her ikisinden de ilaç salım profili, ilaç yüklü membranlar ve ilgili mikro çubuklar sulu ortamda araştırıldığı, Poli(l-laktit) (PLLA), polietilen oksit (PEO) ve oleik asit kaplı manyetit nanoparçacıklardan (OA-Fe₃O₄) oluşan elektrospun süperparamanyetik polimer bazlı biyolojik olarak bozunabilir mikro çubukların üretimine odaklanmış olan bir başka çalışma, ilk kez olarak üretilen bu malzemelerin manyetik özelliklerinden AA (alternatif akım) manyetik alan altında uzaktan hipertermi indüksiyonu için yararlanılırken, havadaki mikro çubukların DA (doğrusal akım) manyetik alan tarafından manipüle edilmesiyle taşıma kayıplarını azaltma ve alt hava yollarına hedeflenen teslimatı artırma olasılığı da gösterilmiştir[23].

Tek aşamalı elektrospreyleme yoluyla hazırlanan, tek tip çubuk benzeri morfolojiye sahip, histerezis eğrisi ve flüoresans spektrumunun sonuçlarına göre mükemmel manyetik ve flüoresan özellik gösteren $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{NaYF}_4:\text{Eu}^{3+}/\text{PLGA}$ manyetik-floresan iki fonksiyonlu mikro çubuklar, aynı hacimdeki manyetik floresan iki işlevli mikro küreler ile karşılaştırıldığında, mikro çubukların daha düşük bir su temas açısı gösterdiği, A549 hücreleri veya endotel hücreleri ile birlikte kültürlendikten sonra ise mikro çubukların biyouyumluluğa sahip olduğu saptanmıştır. İlaç doksorubisin daldırma yöntemiyle yüklendiğinde ise bu mikro çubukların, mikrokürelere kıyasla daha yüksek bir ilaç tutma etkinliği ve ilaç yükleme kapasitesine sahip olduğu ve ağırlık olarak aynı ilaçla yüklenen mikro çubuklar, A549 hücreleri ile iki günlük ortak kültürden sonra daha güçlü sitostatik etkiler gösterdiği tespit edilmiştir[24].

Düşük viskoziteli, esas olarak düşük konsantrasyonlu ve düşük moleküler ağırlıklı poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) çözeltileri kullanılarak tek adımlı elektrosprey ile homojen boyutta mikro çubuklar üretmeyi amaçlayan bir başka çalışma, polimer boncukların genellikle düşük konsantrasyonlu öncü çözeltilerle elde edildiği önceki sonuçların aksine, çözelti konsantrasyonu ve polimerin moleküler ağırlığı daha da azaltıldığı koşullarda 0,5–2,0 μm çapında ve 4–20 μm uzunluğunda mikro çubuklar hazırlanmış, mikro çubukların boy/en oranı; yükleme voltajının yeniden düzenlenmesi, tuz eklenmesi ve yüksek geçirgenliğe sahip çözücü kullanılarak farklı boy/en oranına sahip mikro çubukların oluşumu sağlanmış ve doksorubisin(DOX)@PLGA mikro çubukları, DOX@PLGA mikrokürelere kıyasla bir ilaç dağıtım sistemi olarak daha yüksek yakalama verimliliği ve ilaç yükleme kapasitesi gösterdiği tespit edilmiştir[25].

Daha önce tümör nekroz faktörü alfa (TNF-a) salgısından kaynaklanan inflamatuvar sinyalleri azaltmak için inhalasyon yoluyla başarıyla iletilen siRNA'nın etkisini arttırmak için başka bir anti-inflamatuvar bileşenin birlikte taşınması uygulandığı bir çalışmada, Kurkumin yüklü mezo gözenekli silika nanopartiküllerin, TNF-a'ya karşı polianyonik siRNA kullanılarak katman-tabaka tekniği ile stabilize edilmiş nanoyapılı silindirik mikropartiküllerde birleştirilmiş ve bu sistem, akciğerde birikim için uygun aerodinamik özellikler gösterdiği ve bu solunabilir taşıyıcıların, hem alveolar epitel hücrelerinde hem de makrofajlarda

48 saate kadar inkübasyonda test edilen hiçbir akut in vitro toksisiteye neden olmadığı saptanmıştır[26].

Ayrıca, benzer şekilde partikül şeklinin ilaç dağıtımında etkisine bazı örnekler Tablo 1.1 de özetlenmiştir.

Tablo 1.1 Farklı dağıtım prosesleri süresince biyodavranışlarda şekil etkisi[27]

Avantaj	Partikül Şekli	Yorum	Kaynak
Hücre Sorunlar	Küresel, çubuk and disk	Hücre içi alım: çubuk > disk > küresel	[28]
	Küresel ve çubuk	AR=2 olan çubuklar diğer AR lu çubuklara göre daha fazla alım	[29, 30]
	Küresel ve çubuk	Uzun çubuklar(AR=4), diğer küresel ve kısa çubuklara göre daha hızlı internalizasyon ve daha fazla alım	[31, 32]
	Küresel ve çubuk	Çubuklar, dolaşımdaki tümör hücrelerinde daha yüksek bir zenginleşmeye ve tespit etkinliğine sahiptir.	[33]
Penetrasyon	Küresel ve çubuk	Nanorodlar daha uzun bağırsak tutulumu gösterebilir ve lenf tarafından daha yüksek oranda taşınır.	[34]
	Küresel ve çubuk	Deneysel ve teorik çalışmalar, rotasyon ve sekme etkisi mekanizmasına dayalı olarak çubukların küreler üzerindeki üstün difüzyonunu destekler; optimize edilmiş bir AR'ye sahip çubuklarla yayılma çok daha yüksek olabilir.	[35, 36]
Uzun sirkülasyon ve biyodağılım	Küresel ve çubuk	Farklı endositik yollar, makrofajlar tarafından daha yüksek küresel tanecik alımına yol açar.	[37]
	Yüksek AR li çubuk	Daha yüksek kan damarı marjı, trombolitik bölgelere gelişmiş iletim ile sonuçlanır.	[38]
	Farklı AR ye sahip çubuklar	Kısa çubukların karaciğerde birikme olasılığı daha yüksektir, uzun çubuklar dalakta kolayca tutulur.	[39]
	Küresel ve çubuk	Uzatılmış miseller karaciğer tarafından klerensi geciktirmiştir; sert çekirdek, uzun misellerin kısa dolaşımına neden olur.	[40]
Diğer	Küresel, çubuk ve disk	Çubuklar, meme kanseri hücreleri için en yüksek alım verimini sağlar.	[41]

1.2 Tezin Amacı

Bu projede; kanser, KOAH, Astım, kolesterol, diyabet vb. pekçok hastalığın tedavisinde kullanılabilen Hesperetinin, son yıllarda yapılan çalışmalara göre ilaç dağılımı ve salınımı için en avantajlı şekil olan silindirik mikroçubuklar halinde elde edilerek pulmoner yolla alımının kolay ve verimli hale getirilmesi amaçlanmıştır. Mikroçubukların in vivo ortamdaki kararlılıkları hakkında bilgi vermesi için, partikül boyutu ve zeta potansiyeli gibi özelliklerinin belirlenmesi ve aktivite değişimlerinin incelenmesi için UV/VİS ölçümlerinin alınması amaçlanmıştır.

Çalışma ile elde edeceğimiz sonuçların, anti-inflamatuar ve anti-oksidan aktivite gösteren Hesperetinin in vivo ortamında yapılacak başta kronik akciğer rahatsızlıkları, kanser olmak üzere pekçok hastalığın tedavi çalışmaları için yol gösterici olması hedeflenmiştir.

1.3 Hipotez

Hesperetin antioksidan, antiinflammatuar ve antikanserojen etkisi nedeniyle solunum yolu hastalıklarında tedavi edici olarak kullanılabilir. Hesperetinin pulmoner yolla alınması hedefe direkt ulaşımı sağlaması, sindirim etkisinden kaçınılması vs. gibi avantajlar sağlamaktadır. Bununla beraber, elonge şekle sahip olan ilaç etken maddelerinin hücre içi alımı küresel muadillerine göre daha verimli ve daha kolaydır.

Template-assisted tekniğin infiltrasyon yaklaşımı kullanılarak pulmoner yolla alıma uygun, Hesperetin mikroçubuklar elde edilebilir.

Mikroçubukların stabilizasyonunu sağlamak için doğal biyomalzeme olan agaroz ve D-mannitol kullanılabilir.

Elde edilen mikroçubukların pH değişimine ve vücut sıvısı içinde zamana karşı kararlılık ve aktivitelerindeki değişim, zetasizer ve UV/VİS spektrometre ölçümleri ile belirlenebilir.

2.1 İlaç

İlaç, fiziksel ve/veya zihinsel sağlığı geliştirmek için yada hastalıkların önlenmesinde, teşhisinde, tedavisinde, iyileştirilmesinde kullanılan kimyasal maddedir.

2.2 Kontrollü İlaç Salım Sistemleri

İdeal bir ilaç salım sistemi, ilacı yalnızca gerektiği zaman ve yerde ve istenen terapötik etkileri ortaya çıkarmak için gereken minimum doz düzeyinde sağlayan sistemdir. Pratikte, böyle bir sistem, optimum terapötik tepkiler üreten programlanabilir bir konsantrasyon-zaman profili sağlamalıdır. Bu amaca, geleneksel dozaj formları ile yalnızca sınırlı ölçüde ulaşılabilmektedir. Etkin maddenin hızlı emilimini sağlamak için hızlı salınım amaçlı tasarlanmış konvansiyonel dozaj şekilleri uygulanması, sık sık tekrarlanan dozların verilmesi, etkin maddenin konsantrasyonunun etkili düzeyin altına düşerken yan etki ve şiddetinin artması gibi dezavantajlara sahiptir. Bu olumsuzlukların önüne geçmek amacıyla etken maddenin salımının daha uzun olduğu kontrollü salım sistemleri geliştirilmiştir.

Kontrollü salım sistemleri, salım hızları önceden planlanabilen sistemlerdir ve bu sistemler; belirlenmiş hızda ve sürede salım yaparak etkin madde düzeyinin sabit tutulması yoluyla ilaç etkisinin sürekli olmasını sağlamalı, lokal etkinin sağlanabilmesi için hastalıklı bölgeye hedeflendirilebilmeli ve etkin maddenin hedefe ulaşması için uygun taşıyıcıların kullanılarak oluşturulmalıdır[42].

Kontrollü ilaç sistemleri etken madde düzeyi sabit tutarak düzenli bir farmakolojik etki oluştururken yan etkileri azaltır ve kısa süre etkili ilaçların uzun aralıklarla verilmesini sağlar. Bunun yanı sıra ihtiyaç olduğunda ikinci doza kadar tedaviyi kesmek mümkün değildir. Ayrıca taşıyıcı sistemin kendisi ve/veya parçalanma ürünü toksik etki gösterebilir.

2.2.1 Kontrollü İlaç Salım Sistemlerin Sınıflandırılması

Kontrollü salım sistemleri ilacın veriliş yoluna ve ilacın salım şekline göre olmak üzere iki farklı şekilde sınıflandırılabilir.

İlacın salım şekline göre; difüzyon kontrollü sistemler, çözücünün harekete geçirdiği sistemler, kimyasal kontrollü sistemler ve magnetik kontrollü sistemler olarak sınıflandırılır[43].

Difüzyon kontrollü sistemler, depo ve matrik sistem olmak üzere ikiye ayrılırlar. Depo sistemler, molekül ağırlığı 1000 Da dan küçük yapılar için uygun olup etken maddenin %60 ı salınana kadar sıfır dereceden salım söz konusudur. Maliyetleri pahalı ve kırılmaması gereken sistemlerdir. Matris sistemler ise bölünerek kullanılabilen ve ucuz maliyetli sistemlerdir.

Çözücülerin harekete geçirdiği sistemler ise şişme kontrollü ve osmotik kontrollü sistemler olarak ikiye ayrılır. Şişme kontrollü sistemde polimerin camsı durumdan kauçuğumsu duruma geçişi sırasındaki gevşemesiyle salım gerçekleşir. Osmotik kontrollü sistemlerde yarı geçirgen membranlardaki ilacın osmotik basınç yoluyla salımı söz konusudur.

Kimyasal kontrollü sistemler, biyorozyona uğrayan sistemler ve polimer zincirine bağlı sistemler olmak üzere ikiye ayrılırlar. Zincire bağlı sistemlerde ilaç etken maddesinin salımı polimerle etken madde arasındaki bağ ve etkileşimlerin kopmasına dayanırken, biyorozyona uğrayan sistemlerde ilaç salım hızı polimerin bozulma hızı ile kontrol edilir.

Manyetik kontrollü sistemler; etken madde, polimer ve manyetik materyalin karıştırılmasıyla oluşturulan bu sistemler molekül büyüklüğü yüksek olan etken maddelerin salımına olanak sağlar.

İlacın vücuda alınış şekline göre ise parenteral, nazal, oküler, oral, transdermal, vajinal ve rektal olarak sınıflandırılır.

Parenteral preparatlar hastaya enjeksiyon yoluyla verilir. İlaç, sistemik bir etki sağlamak için damar sistemine, kas veya yumuşak dokuya veya lokal bir etki sağlamak için anatomik bir boşluğa (eklem gibi) veya belirli bir organa enjekte edilebilir. İlaçlar enjeksiyon yoluyla uygulanır Etkin maddenin ağızdan

alınmadığı, hızlı etki gerektiren acil durumlarda veya hastanın bilinçsiz olduğu durumlarda ilaç enjeksiyon ile uygulanır. İlacın enjeksiyon bölgesinden emilim hızını, parenteral preparatın formülasyonu etkileyebilir. Preparatın pH ve tonisitesini insan plazma değerlerini taklit edecek şekilde ayarlamak için, ilacın stabilitesini ve çözünürlüğünü arttırmak amacıyla parenteral preparasyonlara yardımcı maddeler eklenebilir. Tüm parenteral ürünler steril olmalıdır. Çoklu kullanım amaçlı parenteral preparatlar antimikrobiyal koruyucu içermelidir. Parenteral preparatlar için kaplar, mümkünse cam veya plastik gibi şeffaf, inert malzemelerden yapılmalıdır. Kullanmadan önce preparasyonun sterilliğini korumak için hava geçirmez olmalıdırlar[44].

Nazal yolla ilaç alımı, lokalize etki, sistemik etki, aşı uygulaması ve olası doğrudan burun-beyin dağıtımı için burun boşluğuna uygulanmasıyla gerçekleşir. Kortikosteroidler, antihistaminikler ve antibakteriyeller (lokalize dağıtım), polipeptit hormonları, 5-HT₁ agonistleri ve alkaloidler (sistemik dağıtım) ve grip aşısı burun yoluyla verilebilen ilaçlardandır. Burun boşluğu siliyalar tarafından nazofarenkse doğru itilen mukus içerir. Mukosiliyer temizleme adı verilen bu mekanizma, ilaçları burun boşluğundan uzaklaştırır. Nazal kavite, hem düşük moleküler ağırlıklı ilaçların hem de peptitlerin absorpsiyonuna metabolik bir bariyer sağlayabilen ve lokal olarak etkili ilaçları inaktive edebilen çok çeşitli enzimler içerir. Sistemik dolaşıma absorpsiyonun iyileştirilmesine yönelik formülasyon stratejileri şunları içerir: Suda çözünürlüğün arttırılması (örneğin yardımcı çözücüler ve siklodekstrinler), enzimatik bozunmanın azaltılması (örneğin kapsülleme, ön ilaçların kullanımı ve enzim inhibitörlerinin dahil edilmesi), mukozal temas süresinin artması (örn. mukoadheziflerin dahil edilmesi) ve membranlardan geçirgenliğin desteklenmesi (örn. çözünürlüğün arttırılması veya geçirgenlik arttırıcıların kullanılması) gibi yollarla sistemik dolaşımda absorpsiyonun optimizasyonu sağlanabilir. Burun damlaları ve spreyler geleneksel uygulama biçimleridir bununla beraber nefes çalıştırma, elektronik atomizasyon ve basınçlı ölçülü dozlama kullanan cihazlar geliştirilmektedir[45].

Oral yolla uygulama en yaygın kullanılan yöntemdir. Oral yolla alınan ilaçların salınımı gastrointestinal kanaldan(ağız, mide, ince ve kalın bağırsak) geçişi sırasında gerçekleşir. Ardından karaciğerde ilk geçiş metabolizmasında ilaçların

kimyasal parçalanması gerçekleşir. Karaciğerdeki ilk geçiş etkisi, mide asiditesi, bağırsak motilitesi oral yolla ilaç kullanımının dezavantajlarıdır. Ayrıca, şuur kaybı, bulantı-kusma gibi durumlarda uygulanamaz. Oral yolla uygulama için hazırlanmış ilaç yutulabilir, çiğnenebilir veya dil altı bekletme şeklinde olabilir[46].

Oküler koşulların tedavisi için mevcut ilaç verme yolları topikal, sistemik (oral veya enjeksiyon), intraoküler ve perioküler (enjeksiyon veya implant) yollardır. Topikal oftalmik preparatlar solüsyonlar, süspansiyonlar, merhemler, jeller ve mikron altı emülsiyonlar olarak sınıflandırılabilir. Oküler ilaç taşıyıcı formülasyonlar tasarlamak, gözün nelere tahammül edebileceğinin anlaşılmasını gerektirir. Topikal oftalmik preparatların tasarımında önemli hususlar hacim, ozmolalite, pH, yüzey gerilimi ve viskoziteyi içerir. Gözün ön kısmı sıklıkla topikal oftalmik preparatlarla etkili bir şekilde tedavi edilebilir. Bununla birlikte, topikal yolun ana eksikliği, verimsizliğidir, bu yolla sadece aşılana dozun %1-5'i göz sıvısına ulaşır. Yüksek verimli lakrimal drenaj sistemi, konjonktiva kan damarları tarafından hızlı emilim ve ilaç geçişine karşı kornea bariyeri, topikal yolla düşük oküler ilaç biyoyararlanımından başlıca sorumlu mekanizmalardır. Orta düzeyde lipofilikliğe ve düşük moleküler ağırlığa sahip oftalmik ilaçlar, hidrofilik, iyonize ilaçlara göre kornea yoluyla daha verimli bir şekilde emilir. Gözün arkasını etkileyen hastalıkları tedavi etmek için sürekli salımlı intraoküler implantlar geliştirilmektedir. İmplantlar, ilacın sabit konsantrasyonlarının elde edilmesine yardımcı olur ve göze çok sık tekrarlanan enjeksiyon ihtiyacını ortadan kaldırır. Göz içi implantlar, implant bölgesinde biyouyumlu ve stabil olmalıdır. Göz içi implantlar biyolojik olarak aşınabilir veya biyolojik olarak aşındırılmaz olabilir. Göz temizliği de dahil olmak üzere oftalmik kullanıma yönelik müstahzarların steril olması düzenleyici bir gerekliliktir. Antimikrobiyal koruyucular dokuyu tahriş edebilir ve dokuya zarar verebilir, bazı formülasyonlar ise koruyucu içermez[47].

Topikal ve transdermal yolla (deri yoluyla) ilaç alımı, insan derisinin zorlu bir bariyer olmasına rağmen ilk geçiş metabolizmasından kaçınmak için tercih edilebilir. Topikal ilaç verme, uygulama yerinde veya yakınında bir bozukluğu tedavi eder ve aktif farmasötik bileşeni deriye veya alttaki dokuya vermeyi amaçlar. Transdermal ilaç dağıtımı, ilacı deri yoluyla sistemik dolaşıma iletir. Deri

karmaşık, çok katmanlı bir zardır, ancak en dıştaki katman olan stratum corneum, ilaç dağıtımının önündeki başlıca engeldir. Transdermal ve topikal ilaç dağıtımı için uygun ilaçlar tipik olarak 500'den az bir moleküler ağırlığa sahiptir, Deri yoluyla ilaç taşınması büyük ölçüde pasif difüzyonla olur ve Fickian difüzyon yasalarıyla modellenenebilir. En yaygınları kremler, jeller, losyonlar, spreyler ve merhemler olan topikal ilaç dağıtımı için çok sayıda formülasyon seçeneği mevcuttur. Değişken karmaşıklıkta yamalar, en yaygın transdermal ilaç dağıtım sistemleridir. Transdermal ve topikal ilaç dağıtımı, penetrasyon artırıcılar veya aşırı doymuş sistemler gibi bazı formülasyon stratejileri ile artırılabilir. Ayrıca, tırnak sert keratinize bir yapı olduğundan, tırnak yoluyla ilaç verilmesi, sağlam deri yoluyla ilaç verilmesinden bile daha zordur[48].

Rektal ve vajinal yolla ilaç alımı, hem lokal hem de sistemik ilaç dağıtımı sağlar. Bu yollar ilaç vermenin transmukozal yollarıdır ve bu nedenle ilk geçiş (sistem öncesi) metabolizmayı atlama avantajı sunar. Rektal dozaj formları, kabızlık ve hemoroid tedavisi gibi lokal etki için kullanılır. Rektal yol, bilinci kapalı, ameliyat öncesi ve sonrası hastalar, pediatrik ve geriatric gruplar gibi belirli hastalık ve hasta gruplarında sistemik ilaç verilmesi için ideal olabilir. Alt ve orta rektal damarlar tarafından emilen ilaç, karaciğeri atlayarak doğrudan sistemik dolaşıma girer. Vajinal yol esas olarak doğum kontrolü, doğum indüksiyonu, vajinal enfeksiyonların tedavisi ve lokal menopoz semptomlarının yönetimi için kullanılır; bununla birlikte bu yol, aşı verme, kemoterapi ve cinsel yolla bulaşan hastalıklara karşı profilaksi dahil olmak üzere çeşitli terapötik uygulamalar için kullanılabilir[49].

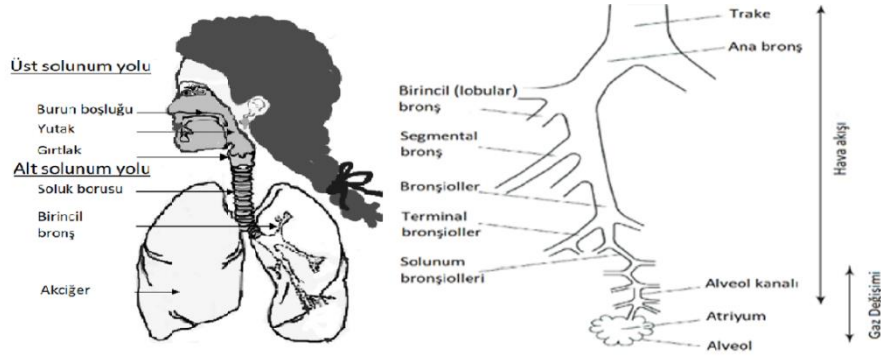
2.2.2 Pulmoner İlaç Salımı

Astım, kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) ve kistik fibroz gibi solunum yolu hastalıklarının tedavisi veya profilaksisi için terapötik maddeler genellikle doğrudan solunum yoluna verilir. Bir ilacın etki yerinde uygulanması, örneğin astım tedavisi için bronkodilatör ilaçlar verildiğinde oldukça arzu edilen hızlı bir aktivite başlangıcı ile sonuçlanabilir. Ek olarak, oral veya parenteral yollardan uygulamaya kıyasla lokal olarak daha küçük dozlar uygulanabilir, böylece potansiyel advers sistemik etkilerin insidansını azaltır ve ilaç maliyetlerini

düşürür. Pulmoner yol, bir ilacın oral yoldan zayıf bir şekilde emildiği (örn. sodyum kromoglikat) veya oral yoldan hızla metabolize olduğu (örn. izoprenalin) durumlarda da yararlıdır[50]. Akciğerin kendisinin bir miktar metabolik kapasitesi olmasına rağmen, karaciğerdeki ilk geçiş (sistem öncesi) metabolizması düşünüldüğünde daha avantajlı olduğu anlaşılmaktadır.

Bununla beraber, akciğer, geniş yüzey alanı, kılcal damarların bolluğu ve havakan bariyerinin inceliği nedeniyle sistemik aktiviteye sahip ilaçların verilmesi için de bir yol olarak kullanılabilir. Örneğin; migrenin ergotaminle ve diyabetin ise insülinle tedavisinde kullanılmıştır[50] .

Akciğer, oksijen ve karbondioksitin kan ve solunan hava arasında değiş tokuş edildiği dış solunum organı olup hava yollarının yapısı ayrıca girişi etkin bir şekilde önler ve mikroorganizmalar dahil olmak üzere havadaki yabancı partiküllerin atılmasına yardım eder. Solunum yolu (Şekil 2.1), aralarında net bir sınır olmamakla birlikte, iletken (merkezi) bölgeler (trakea, bronşlar, bronşiyoller, terminal ve solunum bronşiyolları) ve solunum (periferik) bölgelerden (solunum bronşiyolları ve alveolar bölgeler) içermektedir. Üst solunum yolu, burun, boğaz, farinks ve gırtlak; alt solunum yolu trakea, bronşlar, bronşiyoller ve alveolar bölgelerden oluşur. Trakea iki ana bronşa ayrılır, bunlardan sağ bronş daha geniştir ve trakeayı sol bronştan daha küçük bir açıyla terk eder ve bu nedenle inhalasyon materyalini alma olasılığı daha yüksektir. Hava yollarının daha fazla dallanması, nihayetinde terminal bronşiyollerle sonuçlanır. Bunlar alveolar keselere giden alveolar kanallara bağlanan solunum bronşiyollarını üretmek için bölünürler. İletken hava yolları siliyer epitel hücreleri ile kaplıdır. Bu bölgedeki hava yollarının duvarlarında biriken çözünmeyen partiküller, mukus tarafından tutulur, siliyalar tarafından akciğerlerden yukarıya doğru süpürülür ve yutulur.



Şekil 2.1 İnsan solunum yolu[51] ve alt solunum yolu[50]

Bir ilaç/aerosolün hava yollarında birikmesi dört faktöre bağlıdır: İlacın fizikokimyasal özellikleri, formülasyon, solunum cihazı ve hasta (solunum davranışları ve klinik durum).

Solunan ilaçlar veya ilaç taşıyıcıları genellikle akciğer dokusundan hızla temizlenir. Partikül boyutunun akciğerdeki partikül stabilitesinde ve ayrıca hedefleme potansiyelinde önemli bir rol oynadığı göz önünde bulundurularak ilaç taşıyıcıları tasarlamak bu dokuda daha uzun tutulmasına yardımcı olabilir.

Akciğerde partikül birikiminden, partikül boyutuna bağlı olarak, sedimentasyon, çarpma(impaksiyon) ve difüzyon; partikül şekli ve boyutuna bağlı olarak ise kesişme mekanizmaları sorumludur.

Çarpma (impaksiyon) ile birikmede, hava akımı, boğazda veya solunum yollarında çatallanma meydana geldiğinde yön değiştirir. Hava akımı içindeki yeterince yüksek momentuma sahip parçacıklar, değişen hava akımını takip etmek yerine hava yollarının duvarlarını etkileyecektir. Bu birikme mekanizması, çapı 5 μm 'den büyük ve özellikle 10 μm 'den büyük olan büyük partiküller için özellikle önemlidir ve üst solunum yollarında yaygın olup, burun, ağız, farenks, gırtlak birikme için ana mekanizmadır. İletken hava yollarının sürekli dallanmasıyla, hava akımının hızı azalır ve çarpma, biriktirme için daha az önemli bir mekanizma haline gelir.

Sedimentasyon ile birikmede, solunan bir parçacığın yerçekimi ile çökertilmesi, hava yollarında kalma süresine ek olarak boyutuna ve yoğunluğuna bağlıdır. Sedimentasyon, küçük hava yollarında ve alveollerde 0,5 μm ila 3 μm arasındaki boyut aralığındaki partiküller ve çarpma yoluyla çökeltmeden kurtulan partiküller için önemli bir çökeltme mekanizmasıdır.

Difüzyon ile birikmede küçük parçacıkların solunum yolundaki moleküller tarafından çarpışması ve bombardımanı Brownian hareketine yol açar. Partiküllerin yüksek konsantrasyonlardan düşük konsantrasyonlara doğru hareketi, onların aerosol bulutundan hava yollarının duvarlarına hareket etmelerine neden olur. Difüzyon partikül boyutu ile ters orantılıdır. Daha küçük parçacıklar için baskın mekanizmadır[52].

Kesişme ile birikmede ise, bir partikül, fiziksel boyutu veya şekli nedeniyle bir hava yolu yüzeyi ile temas ettiğinde bir diğer birikme şekli olan kesişme meydana gelir. Çarpmanın aksine, kesişmeyle ile biriken parçacıklar hava akış hatlarından sapmazlar. Kesişme, büyük olasılıkla küçük hava yollarında veya hava akımı bir hava yolu duvarına yakın olduğunda meydana gelir. Hava yolu yüzeylerine kolayca temas edebilen lifler, uzunluklarını aşmayacak şekilde en önemli olanıdır. Ayrıca, liflerin boyutlarına göre küçük aerodinamik çapları vardır, bu nedenle genellikle en küçük hava yollarına ulaşabilirler .

Akciğere ilaç hedeflendirmede parçacığın boyutu kadar şekli de önemli rol oynamaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, çeşitli şekillerin küresel muadillerine kıyasla farklı biyolojik etkileşimlere sahip olduğunu göstermiştir. Şekil; biyolojik dağılımı ve hedeflemeyi, bağışıklık tepkisini ve toksisiteyi ve bir partikül sisteminin dolaşım süresini veya kalma süresinin kontrolünü etkiler. Ayrıca, şeklin hücrelerin içselleştirme süreçleri üzerinde önemli bir etkisi vardır: Adezyon, hız ve içselleştirme derecesi için önemli farklılıklar keşfedilmiştir. Bu nedenle şekil, daha etkili terapötikler sunarak gelişmiş ilaç dağıtım sistemleri için temel bir tasarım parametresi haline gelebilir. Özellikle pulmoner ilaç dağıtımı için, uzun partiküller, partiküler sistemlerin pulmoner uygulamasını geliştirmek için kullanılabilen avantajlı özelliklere sahiptir[53]. Aynı aerodinamik çaplı küresel partiküller ile lif ve silindirik partiküller kıyaslandığında, liflerin ve silindirik partiküllerin periferik akciğerde birikme olasılığının daha yüksek olduğu, buna karşın eşit aerodinamik çaplara sahip küresel partiküllerin oral ve nazal bölgede tutulduğu literatürde gösterilmiştir[54].

Uzun partiküllerin farklı boy/en oranı gözönünde bulundurularak aerodinamik davranışları üzerinde yapılan çalışmaların matematiksel ifadesi eşitlik (2.1) deki gibidir.

$$AR = l/d \quad (2.1)$$

Boy(uzunluk,l) un, en (çap,d)e oranı boy/en oranını (AR: aspect ratio) ifade etmekte olup, önemli bir parametredir ve birikme davranışını etkiler. Solunan partiküllerin en boy oranını ayarlayarak akciğere bölgeye özgü taşıma sağlanabilir. Aynı çapa sahip silindirik ve küresel partikülller kıyaslandığı bir çalışmada boy/en oranının yaklaşık 3 olduğu mikroçubuklarda internalizasyonun daha yüksek olduğu belirlenmiştir [41]. Yine benzer başka bir çalışma ise aynı miktarda materyal taşıyan mikrokürelere (AR=1) göre mikroçubukların(AR>1) internalizasyonun daha fazla olduğu saptanmıştır[55]. Endotelial hücrelerle yapılan bir in vitro çalışma da, boy/en oranı 2.1 olan uzun nanopartiküllerin, küresel olanlara kıyasla yaklaşık 2 kat daha yüksek yapışma verimliliği sergilediğini gösterilmiştir[56]; dahası, farelerle yapılan in vivo dağılım çalışmasında, anti-hücre içi yapışma molekülü antikoru (anti-ICAM-mAb) ile kaplanmış nanoçubukların akciğer ve karaciğerde birikiminin, nanokürelerin yaklaşık 2 katı olduğunu gösterilmiştir[57].

Ayrıca, küresel olmayan parçacıklar kesişme yoluyla akciğerde birikebilir. Bu birikme mekanizması, partikülün kütle merkezi hava akımında hareket ederken, bir ucu epitele dokunduğunda gerçekleşir. Bu sayede parçacık akış çizgilerinin dışına itilir ve bölgede birikir. Daha küçük çaptan dolayı epitele dokunma olasılığı burada çok daha yüksek olduğundan, kesişme (interception) genellikle daha küçük hava yollarında meydana gelir.

Asferik parçacıkların bir başka yararı, hücrelerle, özellikle fagositoz yapan bağışıklık hücreleriyle farklı etkileşim davranışlarıdır. Partikül geometrisi, fagositoz alımını azaltmak için tasarlanabilir. Örneğin, literatürdeki bir çalışmada, uygun malzemeler kullanılarak partiküllerin hücre zarı üzerinde immobilizasyonu sağlanmış ve diagnostik veya terapötik ajanlar için bir taşıyıcı sistem olarak, çubuk benzeri partiküllerin, makrofajların proliferasyonunu veya canlılığını etkilemeden hedefe yönelik teslimat için uygun olduğu gösterilmiştir[58].

Ayrıca, çubuk, solucan benzeri ve elipsoid şekilli nanoparçacıkları parçacıklar arasındaki eğrilik farkı nedeniyle küresel olanlardan daha verimli bir şekilde hücre içine alındığından, uzun parçacıklar hücre içi ilaç iletimi için avantajlıdır . Bu küresel olmayan partiküller, artan ilaç yükleme verimliliği, bir vasküler duvara daha iyi bağlanma (hedef hücre ve dokularına daha büyük bir bağlanma afinitesi) ve ayrıca daha iyi hücre alım verimliliği nedeniyle küresel olanlara kıyasla ilaç verme etkinliğini geliştirmek için avantajlıdır. Genel olarak, küresel olmayan partiküller, mevcut ilaç dağıtım stratejilerinin küresel ilaç taşıyıcılarının kullanımıyla karşılaştığı engelleri aşmak için büyük bir potansiyel sunmaktadır[59] .

Piyasadaki pulmoner yolla alınan ilaçlara; Bevespi Aerosphere (Aklidinyum), Salres (Albuterol), Ventolin (Albuterol), Ventoza (Albuterol), Ipranex-S (Albuterol and ipratropiyum), Afrezza (human insulin) örnek olarak verilebilir[60].

2.3 İlaç Taşıyıcı Sistemler

İlaçların doğası gereği hidrofobik olması hastalığın kontrolü için zayıf biyoayarlanıma neden olmaktadır. Bu nedenle ilacın kanda tutulma süresinin artması ile birlikte belirli bölgelere taşınabilmesi ve böbrekten hızlı atılımının engellenmesi için uygun materyallere ihtiyaç duyulmaktadır[61]. İster organik ister anorganik olsun ilaç taşıma sistemlerinin; vücutta spesifik olmayan etkileşimlerden kaçınması, hedef bölgeye taşıma sürecinin kolay ve güvenli olması, taşıyıcı sistemin işlevi sona erdikten sonra tüm bileşenlerinin ortadan kaldırılabilmesi gerekmektedir[62].İlaç taşıma sistemleri, çeşitli materyaller; polimerler, lipidler, viral nanopartiküller ve hatta organometalik bileşikler vs. kullanılarak hazırlanabilmektedirler[63].

2.3.1 Polimer Bazlı İlaç Taşıyıcı Sistemler

İlacın fiziksel olarak tutulmasıyla yada polimer matriksine kovalent bağlanarak oluşan partiküllerdir.

2.3.1.1 Polimerik Nanopartiküller

Albumin, kitosan, heparin, aljinat gibi doğal polimerler yada polistren-maleik anhidrid kopolimeri, polietilen glikol (PEG), poly-L-glutamik asit (PGA) gibi sentetik polimerler kullanılarak hazırlanan partiküllerdir (Şekil 2.2).

Polimerik nanopartiküller, kolay sterilizasyon, fizyolojik ortamda kolaylıkla toksik olmayan ürünlere parçalanabilme, yüksek etkin madde yükleme kapasiteleri ile etkin maddenin hücre içerisindeki dağılımını artırma, oral yolla alındığında ilacın salınımı ve biyoayarlanımı artırma, uzun süreli kontrollü salınım sağlama, biyolojik sıvı içerisinde diğer taşıyıcı sistemlere göre daha yüksek stabiliteye sahip olma, küçük partikül boyutlarına sahip olması nedeniyle kolay hücresel tutulum, hedeflendirilme kabiliyetlerinin yüksek olması sonucu diğer doku ve organlarda toksik etkiye neden olmama, başka çözücüler gerektirmeden damar yoluyla alınabilme, kolay üretilibilme ve uzun süreli saklanabilme gibi avantajlara sahiptir[64, 65].

2.3.1.2 Polimerik Miseller

Miseller küresel bir çekirdek ve kabuktan oluşmaktadırlar(Şekil 2.2). Misellerin fonksiyonellik özellikleri, suda çekirdek/kabuk yapısı oluşturmak için biraraya gelen amfilik blok kopolimerlerden kaynaklanmaktadır. Hidrofobik çekirdek kısım hidrofobik ilaçlar için bir depo görevi görmekteyken, hidrofilik kabuk kısmı çekirdek kısmı stabilize ederek polimerleri suda çözünür hale getirmektedir. Böylelikle çözünürüğü az olan etken maddelerin emilimi kolaylaşmaktadır. Ayrıca, misellerin kolay elde edilebilmesi ve radyoaktif olarak işaretlenebilmeleri de ilaç taşımada tercih edilmelerinin diğer nedenleridir[66].

Polimerlerik misellerin dezavantajı ise, yük, büyüklük ve yapılarına bağlı olarak toksisiteye neden olabilmeleridir[65].

İlacın miselle yüklenmesi fiziksel enkapsülasyon yada kimyasal kovalent bağlanma ile gerçekleşmektedir[67, 68].

2.3.1.3 Dendrimerler

Dendrimerler homopolimerlerin dallanarak ağaç yapısı oluşturduğu üç boyutlu yapılardır ve başlatıcı bir çekirdek, iç katman veya çekirdeğe bağlı tekrarlanan

birimler, terminal yüzey grupları ve ilacın hapsolabileceği boşluklardan oluşmaktadırlar (Şekil 2.2)[69]. Dendrimerler, yapıları, boyutları, şekilleri, dallanma uzunlukları, dallanma yoğunlukları ve yüzey işlevselliklerinin oldukça iyi bir şekilde kontrol edilebilmesinden dolayı ilaç dağıtımı, gen transfeksiyonu ve görüntüleme gibi biyomedikal uygulamalarda ideal taşıyıcılardır. Biyoaktif ajanlar, etken maddenin spesifik gereklilikleri ve terapötik uygulamaların gereklilikleri göz önünde bulundurularak, etken maddenin dendrimerlerin içine enkapsüle edilmesiyle, dendrimer yüzeyine fiziksel olarak absorbe edilmesiyle yada kimyasal bağlanmasıyla elde edilebilir. Bununla beraber, yüzey gruplarının yüksek yoğunluğu, dendrimerlerin çözelti davranışını ve toksisitesini değiştiren grupların yanısıra hedef grupların eklenmesine olanak sağlar[70].

2.3.1.4 Hidrojel İlaç Taşıyıcı Sistemler

Hidrojeller, kolesteroil pullulan, kolesteroil dekstran, fibrin, aljinat ve agaroz gibi hidrofobik polisakkaritler olan polimer amfifillerin kendi kendine toplanmasını ve kendi kendine kümelenmesini içeren bir sistem olup çapraz bağlayıcılarla bir polimer zinciri oluşturmak üzere bağlanan üç boyutlu polimerlerdir[71].

Hidrojeller polimer/monomer kaynağına göre doğal, sentetik yada hibrit ; yapılarındaki bağlara göre ise kimyasal veya fiziksel olarak sınıflandırılabilir.

Hidrojeller, yapılarında su bulundurmalarından dolayı esneklik kabiliyetine sahiptirler. Yüksek kapasiteli taşıma özellikleri kolaylıkla modifiye edilebilir. Ayrıca dış etkenlerin (pH, sıcaklık, ışık, manyetik alan, elektiriksel alan vs) değişimine cevap verme yeteneğine sahiptir (Şekil 2.2) .

Adsorpsiyon yapabilme, şişme-daralama performansına sahip olma ve biyouyumluluk hidrojellerin avantajları iken, düşük mekanik mukavemet gösterme, düzenleme zorlukları ve pahalı olma dezavantajlarıdır.

2.3.2 Lipid Bazlı İlaç Taşıyıcı Sistemler

2.3.2.1 Lipozomlar

Lipozomlar, Lipozomlar, sulu bir hacmin tamamen, esas olarak doğal veya sentetik fosfolipidlerden oluşan bir membranöz lipid çift tabakası ile çevrelediği, eş merkezli çift katmanlı veziküllerdir (Şekil 2.2). Lipozomlar, ince lipid filmler veya

lipid kekleri hidratlandığında ve sıvı kristalin çift tabaka yığınları sıvılaşır ve şiştiğinde oluşur. Çalkalama sırasında hidratlı lipid tabakaları ayrılır ve kendi kendine birleşerek suyun kenarlarında bulunan çift tabakanın hidrokarbon çekirdeği ile etkileşimini engelleyen veziküller oluşturur[72].

Lipozomların, biyobozunur, biyouyumlu ve esnek olma, iyonik olmama, hem suda çözünen ilaçları hem de yağda çözünen ilaçları taşıyabilme, etkinliliği ve enkapsülasyon yoluyla stabilizasyonu artırma, enkapsülasyon ajanlarının toksisitesini azaltma gibi avantajlara sahip olmakla beraber üretimlerinin pahalı olması ve kapsüllenmiş ilacın sızması ve füzyonu gibi dezavantajları da vardır[73].

2.3.2.2 Katı Lipit Nanopartiküller

Katı lipit nanopartiküller, fizyolojik lipidlerden katı çözelti modeli, ilacın çekirdeğe tutturulduğu çekirdek-kabuk modeli veya ilacın kabuğa tutturulduğu çekirdek-kabuk modeli ile hazırlanmış nano boyutlu süspansiyonlardır[74]. Katı lipit partiküller, oda ve vücut sıcaklığında katı olan lipidlerden yapılmış olup, bir sürfaktan tarafından dispers edilmiş etken maddeyi içeren katı lipit çekirdeklerden oluşmaktadır(Şekil 2.2)[74].

Bu lipit taşıyıcıların en önemli avantajları, biyouyumluluk, biyolojik olarak parçalanabilme, boyutlarının çeşitlendirilmesinin kolay olması, salınım mekanizmalarının kontrol ve modifiye edilebilmesi, hidofilik ve lipofilik ilaçların taşınmasına uygun olmasıdır[75].

2.3.3 Viral Partiküller

Boyut aralığı(yaklaşık 10 nanometreden bir mikrondan daha büyük değerlere kadar) atomik çözünürlükte karakterize edilen organik yapılar için benzersizdir. Virüsler çoğunlukla boyut ve bileşim açısından monodispersdirler. İkosahedronlar, küreler, tüpler ve sarmallar olmak üzere çeşitli şekillerde ve çeşitli pH, tuz konsantrasyonu ve sıcaklıklarda bulunabilirler. Küçük moleküllerin erişimine izin veren ancak çoğu zaman büyük molekülleri geçirimsiz olan kısıtlı iç bölgesi, taşınacak maddenin tutunması ve paketlenmesine olanak sağlamaktadır. Viral genomun manipülasyonu ile bileşimleri kontrol edilebilir.

Kendiliğinden oluşmanın ve çok değerliliğin nihai örnekleridirler. Sadece birkaç saatlik efor gerektiren tipik preparasyonlarla, konakçı hücrelerden (bitkiler,kültürlenmiş böcek hücreleri,kültürlenmiş bakteri hücreleri) önemli miktarda kapsit elde edilebilir. Benzersiz yoğunluklar sergileyerek, saflaştırma tekniklerini çoğu protein için gerekli olandan daha basit ve hızlı hale getirebilirler. Standart proteinlerle kıyaslandığında pH,sıcaklık ve çözücü değişimlerine karşı daha kararlıdır. Aynı molekülün birçok kopyasının veya birçok farklı molekülün sterik yoğunluk endişesi olmadan görüntülenmesine olanak sağlayan geniş yüzey alanına sahiptirler[76].

2.3.4 Karbon Nanotüpler

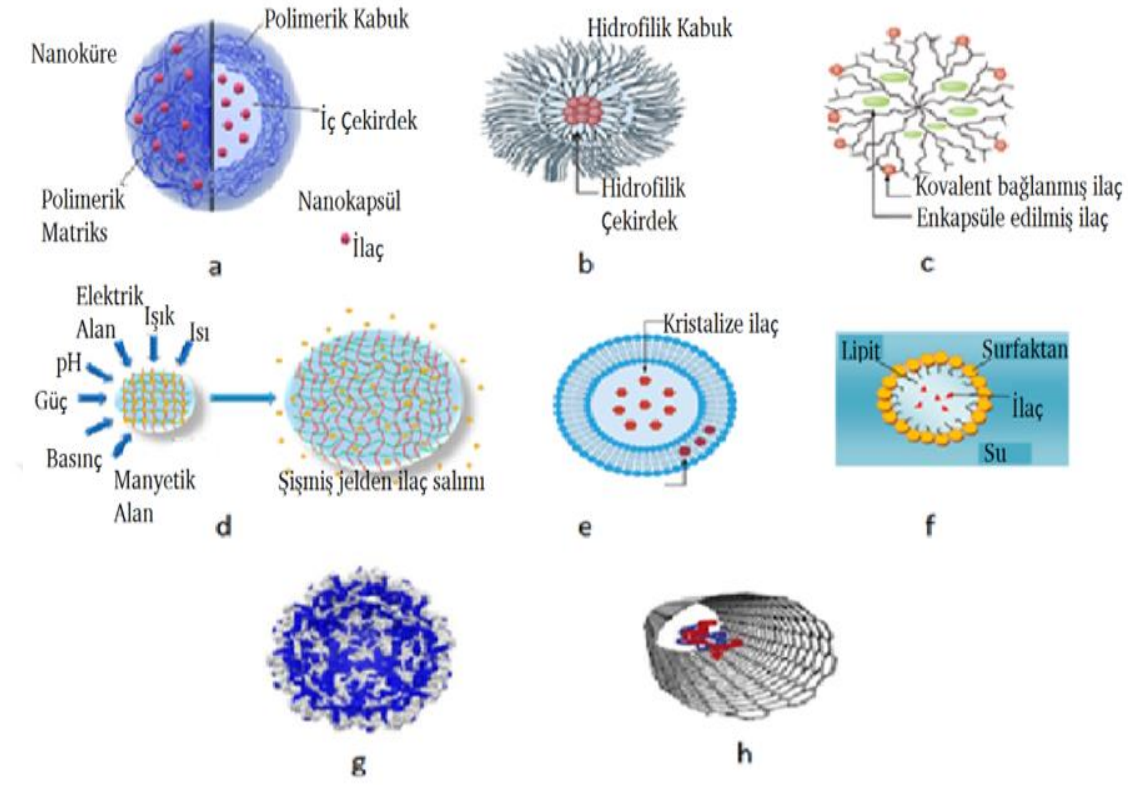
Karbon nanotüpler (CNT) (Şekil 2.2), yüksek boy/en oranı, geniş yüzey alanı, ultra hafiflik gibi bir dizi özelliğe sahip iyi sıralanmış, içi boş karbon grafit nanomateriyallerdir. CNT tek duvarlı ve çok duvarlı olmak üzere iki farklı türde olabilirler[77].

Fonksiyonlandırılmış CNT ler proteinler, nükleik asitler, ilaçlar, antibiyotikler ve diğer tedavi edicilerin taşınmasında kullanılmıştır. CNT ler, biyopolimerlerle kapsülleme yoluyla veya çözünürleştirici grupların dış duvarlara ve uçlara kovalent olarak bağlanmasıyla kolayca manipüle edilebilmeleri ve modifiye edilebilmeleri sayesinde ilaç taşımada oldukça önemli gelişmeler göstermiştir[78].

İlaç dağıtımında CNT'ler ve farmasötik olarak aktif bileşenler arasında üç etkileşim yöntemi mümkündür. İlk etkileşim yöntemi, aktif bileşenleri bir CNT ağı veya CNT demeti içinde tutmak için gözenekli bir absorbandır. İkincisi, bileşiğin CNT'lerin dış duvarlarına işlevsel olarak bağlanmasıdır. Üçüncü yaklaşım, CNT kanallarının nanokateter olarak kullanılmasını içerir[79].

CNT'ler, tüm çözücülerde tamamen çözünmeyip, bazı sağlık sorunlarına ve toksisiteye neden olabilmektedirler. CNT'lerin toksisiteleri, yapısı (tek duvarlı yada çok duvarlı olmalarına), yüzey alanı, oksidasyon derecesi, agregasyon miktarı, yüzey topolojisi, uzunluk ve boy/en oranı, konsantrasyon ve doz miktarına bağlıdır. Bununla birlikte, karbon nanotüplerin kimyasal modifikasyonu, onları suda çözünür hale getirebilir, toksik etkiyi azaltırken, peptitler, proteinler, nükleik

asitler ve terapötik ajanlar gibi çok çeşitli aktif moleküllere bağlanabilmeleri için işlevsel hale getirebilir[63, 79].



Şekil 2.2 İlaç taşıma sistemleri a) polimerik nanopartikül[80], b) polimerik misel[81], c) dendrimer[81], d) hidrojel, e) lipozom[81], f) katı lipid nanopartiküller [83], g) viral nanopartikül[84], h) karbon nanotüp ilaç taşıma sistemleri[79]

İlaç taşıma sistemleri ve piyasadaki örnekleri Tablo 2.1 özetlenmiş ve örneklendirilmiştir.

Tablo 2.1 İlaç taşıma sistemleri ve piyasadaki örnekleri[63, 72]

Sistem	Yapı	Karakteristik Özellikler	Bileşen örnekleri	Kaynak
Polimerik nanopartiküller	ilaç doğrusal polimerin	suda çözünür, toksik olmyan, biyobozunur	Albumin-Taxol(Abraxane)	[85]
	yan zincirine bağlayıcılarla	Yüzey modifikasyonnu	PGA-Taxol (Xyotax)	[86]
	konjuge olmuştur (bölünebilir bağ)	Seçici birikim hedefe tutunma	PGA-camptothecin(CT-2106)	[87]
		Normal hücreleri korurken kanser hücrelerini hedefleme (reseptör hedef alma)	HPMA-DOX (PK1)	[88]
			HPMA-DOX-galactosamine (PK2)	[89]

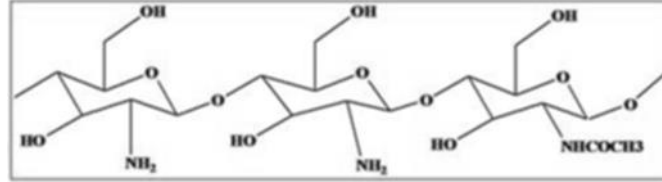
Tablo 2.1 İlaç taşıma sistemleri ve piyasadaki örnekleri (devamı) [63, 72]

Sistem	Yapı	Karakteristik Özellikler	Bileşen örnekleri	Kaynak
Polimerik miseller	Amfilik blok kopolimerler, hidrofobik çekirdek ve hidrofilik kabuk le bir araya gelerek misel oluşturmaktadırlar.	a) Suda çözünmeyen ilaçlar için bir taşıyıcıdır.	PEG-Pluronic-DOX	[67]
		b) Biyouyumluluk, kendiliğinden oluşma, biyobozunurluk	PEG-PAA-DOX (NK911)	[68]
		c) Kolay fonksiyonel modifikasyon	PEG-PAA-DOX (Genexol-PM)	[90]
		d) Hedefleme potansiyeli		
Dendrimerler	Düzenli biçim ve tekrarlanan birimler ile radyal olarak ortaya çıkan hiperdallı sentetik polimer	a) Biyolojik dağılım ve PK ayarlanabilir.	PAMAM-MTX	[91]
		b) Yüksek yapısal ve kimyasal homojenlik	PAMAM-Platinate	[92]
		c) Kolay fonksiyonlandırma ve yüksek ligand yoğunluğu		
		d) Kontrollü degradasyon		
Lipozomlar	Lipit çift katmanlardan oluşan kendi kendine birleşen kapalı kolloidal yapılar	e) Çok fonksiyonellik		
		a) Amfilik, biyouyumluluk	PEG lenmiş Lipozomal DOX (Doxil)	[93]
		b) Kolay modifikasyon	PEG lenmemiş Lipozomal DOX (Mayocet)	[94]
		c) hedefleme potansiyeli	Lipozomal Daunorubicin (DaunoXome)	[95]
Viral nanopartiküller	Çok değerlikli, kendiliğinden oluşan protein kafesi	a) Mutajenez ve biyokonjugasyon yoluyla modifikasyon, çok değerlilik	HSP-DOX	[96, 97]
		b) Spesifik hedef belirleme, çok fonksiyonellik	CPMV-DOX	[98]
		c) Tanımlanmış geometri ve olağan üstü tekdüzelik		
		d) Biyolojik uyumluluk ve inert olma		
Hidrojeller	Benzen halkalarından oluşan karbon silindirler	a) Kimyasal madifikasyon yoluyla suda çözünürlük ve biyouyumluluk	CNT-MTX	[99]
		b) Çok fonksiyonluluk	CNT-Amfotericin B	[100]
		a) Etkili gen taşıma		
		b) iyi kabul edilebilirlik	pBUD LacZ plazmid antisense	[101]

2.4 İlaç Taşımada Kullanılan Bazı Biyomalzemeler

2.4.1 Kitosan

Kitosan, biyouyumluluk, biyolojik bozunma ve hidrofobik ilaçları kapsülleme potansiyeli gibi benzersiz özelliklere sahip lineer bir polikasyonik polisakarittir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 Kitosanın kimyasal yapısı[102]

Kitinin ilk ayrıntılı keşfi, 1811'de Prof. Henri Braconnot tarafından *Hydnum hybridum* ve *Agaricus violaceus*'tan izole edilen mantar olarak gerçekleşmiştir. Kitosanın keşfi, Charles Rouget tarafından kitinin potasyum hidroksit (KOH) içinde kaynatılarak, organik asitlerde çözünen kitosan oluşumuyla sonuçlanan 1859 yılına kadar uzanır[102, 103]. Kitosan esas olarak kitinin deasetillenmiş türevidir ve doğal olarak *Mucor*, *Rhizopus* ve *Absidia* gibi bazı mantarlarda bulunur. Chitosan esas olarak kimyasal ve enzimatik yöntemler yardımıyla ekstrakte edilmektedir[104, 105]. Kitosanın polimerde bulunan şeker birimleri sayısı göz önüne alınarak karakterize edildiğinde moleküler ağırlığı yaklaşık 50.000 ile 800.000 Dalton (Da) arasında olup lineer bir polisakarit olarak sınıflandırılır ve rastgele dağılmış d-glukozamin ve N-asetil-d glukozamin birimlerinden oluşur. Kitosanın yapısı, farklı şeker moleküllerinin dizilişini ortaya koymaktadır.

Kitosanın $-NH_2$ ve $-OH$ içeren omurgası, poli(etilen glikol), β -siklodekstrin, poli(kaprolakton), poli(N izopropilakrilamid) gibi diğer moleküllerle kovalent bağ yaparak kimyasal modifikasyon fırsatı sunar. Kitosanın fizikokimyasal özellikleri, kristallik, moleküler ağırlık, deasetilasyon derecesi vb. gibi çeşitli parametrelerden önemli ölçüde etkilenir. Suda ve alkali koşullarda çözünmez, ancak zayıf asitlerde çözünür.

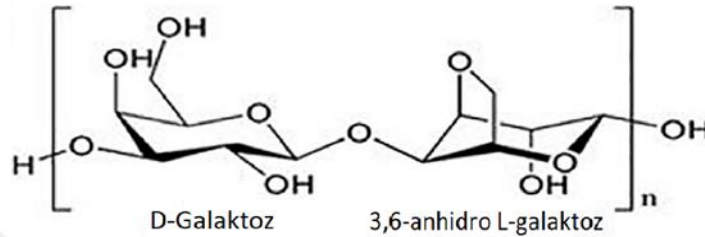
Kitosanın degradasyonuna kitotriodidaz, lizozimler, N-asetil- β -d-glukozaminidaz gibi enzimler rol oynamaktadır.

Kitosan bazlı biyomalzemelerin analjezik, antibakteriyel, antifungal ve mukoadhezif özelliklere sahip olduğu kanıtlanmış olup bu özellikler ilaç dağıtımı ve doku mühendisliği uygulamalarında kitosanın tercih edilme nedenidir. Ayrıca biyouyumluluk, biyobozunurluk ve toksik olmama gibi ayırt edici özellikleri sayesinde kitosan biyomedikal uygulamalarda büyük önem kazanmıştır. Bununla beraber kitosana ilişkili çözünürlük sorunu, biyomedikal uygulamalarda uygulanabilirliği açısından büyük bir dezavantaj olmuştur. Kitosan, nötr durumda ve çoğu organik çözücünde çözünmezken, amino gruplarının varlığı ve yüksek kristalliliği sayesinde asidik ortamlarda çözünür. Bu nedenle, literatürdeki birçok çalışma, çözünürlüğün ve işlemenin iyileştirilmesi için kitosan türevleri geliştirmiştir.

İlaç dağıtımında kitosan, toksik olmayan ve biyolojik olarak emilebilir doğası nedeniyle bir ilaç kontrol salma taşıyıcı adaydır[106]. Kitosan, birçok bileşen için bir hidrojel sistemi, ilaç konjugatı, biyolojik olarak parçalanabilen salım sistemi ve polielektrolit kompleksi olarak ilaç dağıtımında etkin bir şekilde kullanılmıştır[107]. Kitosan bazlı sistemler, proteinlerin/peptidlerin, büyüme faktörlerinin, antiinflatuar ilaçların, antibiyotiklerin, aşıların verilmesi yanı sıra gen terapisi ve biyogörüntüleme uygulamalarında için kullanılır. İlaç verme uygulamaları, ilaç hedefleme sistemleri için oral, nazal, oküler ve transdermal yolları içerir[108-111]. Sürekli ilaç salma araçları arasında mikro küreler, boncuklar, sıkıştırılmış tabletler, nanopartiküller, jeller ve filmler bulunur[106, 112, 113]. Kitosan, polimer üzerindeki pozitif yüklü birincil amino grupları ile mukusun negatif yüklü sialik asit ve sülfonik asit alt yapıları arasındaki iyonik etkileşimler nedeniyle mukoadhezif özellikler sunar[114-116]. Kitosan, mukoadheziv ve penetrasyon artırıcı özelliklerinden dolayı nazal formülasyonlar için en çok kullanılan eksipiyanlardan biridir. İlaçların (çözeltiler, süspansiyon, jeller, mikroemülsiyon ve tozlar) burundan beyne verilmesi için birkaç kitosan formülasyonu önerilmiştir[117]. Sadece kitosan değil, türevlerinin de ilaçların taşınmasında etkili olduğu gösterilmiştir[118-121].

2.4.2 Agaroz

Agaroz, agarobiyozun tekrarlarını (D-galaktoz disakkariti ve 3,6-anhidro-L-galaktopiranoz) içeren deniz kırmızı alglerinden ekstrakte edilen termal olarak geri çevrilebilir bir jel olarak hazırlanabilen biyoyumlu bir doğrusal polisakkarittir (Şekil 2.4). Agaroz, agardan agaropektinin ekstraksiyonu ile elde edilen agarın ana bileşenidir[122, 123].



Şekil 2.4 Agarozun kimyasal formülü[124]

Agarozun jelleşme ve erime noktaları, moleküler ağırlığına, yan gruplarının konsantrasyonuna ve sayısına bağlı olarak sırasıyla 30-40 °C ila 80-90 °C arasında değişir. Ayrıca sıcak su, dimetil sülfoksit (DMSO), dimetilformamid (DMF), formamid (FA), N-metilformamid (MFA) ve 1-Butil-3-metilimidazolyum klorür(BmimCl) içerisinde kolaylıkla çözünebilir[125, 126]. Bununla beraber, bu doğal karbonhidrat polimerinin yan gruplarında oksijen ve hidrojenin bulunması, kendi kendine jelleşme özelliğini desteklemektedir. Agaroz jelleşme süreci, hidrojen bağı ve elektrostatik çekimin agaroz molekülünün sarmal yapısıyla sonuçlandığı ve daha sonra jel oluşturduğu indüksiyon, jelleşme ve psödodenge olmak üzere üç aşamada gerçekleşir[127, 128]. Hidrojen bağının bir sonucu olarak, genipin gibi toksik çapraz bağlama ajanlarına ihtiyaç duymadan agaroz hidrojenleri oluşturulabilir[129] bu da onu biyoyumlu bir polimer yapmaktadır[130].

Minimum izole açıklık ve kanallar ile birbirine bağlı gözeneklerle dolu bir yapıya sahip olan agaroz , besinlerin, ilaçların, oksijenin ve hücrelerin ortamın merkezinden agaroz yüzeyine geçişini sağlar[131, 132]. Etkili gözeneklilik (yani, birbirine bağlı gözenekler ve kanallar), taşıyıcının gözenekli ortamındaki taşıma sürecinde çok önemli bir rol oynar[133-135]. Tek tek birbirine bağlı kanallar malzemenin taşınmasını kolaylaştırır da, nihai amaç, birbirine bağlı kanalların

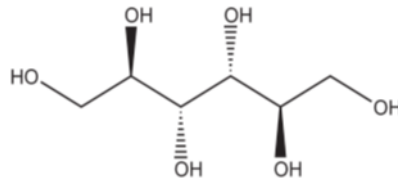
yaygın, mikrovasküler şekilli bir ağına sahip gözenekli bir ortam elde etmektir. Ayrıca, gözenekli mimarının dokular/organlar ile uyumluluğu ile bağlantılı olarak tek tip gözenek boyutu dağılımı, kullanıcıya yüksek kontrollü ilaç salımı yeteneği sağlar[135-137]. Agaroz jellerin moleküler biyolojide DNA ve yüksek moleküler ağırlıklı molekülleri elektroforez yöntemiyle ayırmak için kullanılması gelenekseldir[138].

Düşük biyobozunum, ilaç taşıyıcı olarak agaroz ile çalışmanın en büyük dezavantajıdır. Ayrıca, hidrofobik ilaçlarla etkileşimi az ve bazı ilaçlar için ise adsorpsiyon/desorpsiyon hızı düşüktür[139]. Ancak agarozun modifikasyonu ile bu sorunlar aşılabılır[124] .

Literatürde Agarozun, DNA'nın hareketliliğini, protein ekstraksiyonunu[140] destekleyen piruvat ve sülfat gruplarının negatif yükü nedeniyle elektroforezde[141] , altın ayırma[142], mikroakışkanlar[143], mikro modelleme[144], biyosensörler[145], hücre kapsülleme[146], nano/mikro ilaç taşıyıcıları[147], yapı iskeleleri[148] ve sinirbilim ve radyoterapi için in vitro modeller[149] kullanışlı olduğunu gösteren bazı çalışmalar da vardır.

2.4.3 D-Mannitol

D-mannitol, altı karbon atomu içeren nadir bir şeker alkolüdür (Şekil 2.5). Mayalar, mantarlar, algler, likenler ve balkabağı, kereviz, soğan, çimen, zeytin ve ökse otu gibi çeşitli bitkilerde bulunan doğada en bol bulunan polioldür. D-mannitol, ekstraksiyon, kimyasal sentez veya fermantasyon yoluyla üretilir. son zamanlarda, bazı çalışmalar D- mannitolün D-fruktozdan biyosentetik geri dönüşünün %100'e ulaşabileceğini göstermiştir[150].



Şekil 2.5 D-mannitolün kimyasal yapısı

Ayrıca D-mannitol, gıda, ilaç ve kimya endüstrilerinde kullanılan güvenli bir kimyasal katkı maddesidir. Genel olarak polioller kanserojen değildir ve düşük

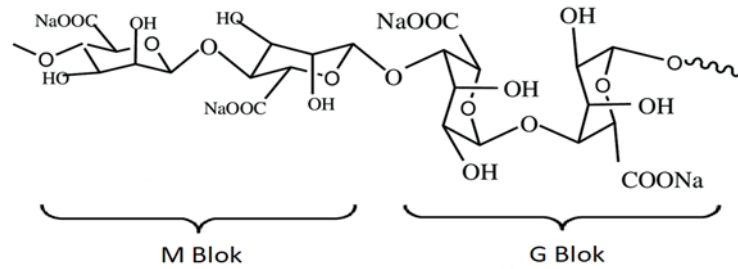
glisemik indeks yanıtına sahiptirler. Bu nedenle polioller, diyabetik ve hiperkalorik hastalar gibi kontrollü kalori alımına ihtiyaç duyan belirli sağlık sorunlarının tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Mannitol, suda çözünür özelliği ve mukotik etki etme kabiliyetinden dolayı pulmoner ilaç taşıma sistemlerinde yardımcı madde olarak dikkat çekmektedir. Hava yolu lümenine su akışını kolaylaştıran ozmotik bir gradyan oluşturarak, hava yolunda bulunan mukus ile ilişkili viskoelastik özellikler üzerinde değiştirici bir etkiye sahip olması pulmoner açıdan kullanışlı olmasını sağlamaktadır[151, 152].

Örneğin, inhalasyon için Bronchitol [inhale kuru toz mannitol] ismiyle piyasada olan mannitol kuru toz, kistik fibrozlu hastalarda akciğerlerin hava yolu yüzeyini nemlendirmek ve mukus klirensini iyileştirmek için geliştirilmiştir.

2.4.4 Aljinat

Doğal polisakkarit aljinattan yapılan hidrojeller, benzersiz biyolojik ve fizikokimyasal özelliklerinden dolayı rejeneratif tıbbın birçok yaklaşımında ve immobilizasyon matrisi olarak kullanılmaktadır[153, 154]. Aljinat, hücre duvarının yapısal bir elemanı olarak kahverengi alglerde ve ayrıca birkaç biyofilm üreten bakteride sentezlenir[155, 156]. Makromolekül, α -L-guluronik (G) ve β -L-mannuronik asit (M) bloklarından oluşur (Şekil 2.6).



Şekil 2.6 Sodyum Aljinatın kimyasal yapısı[157]

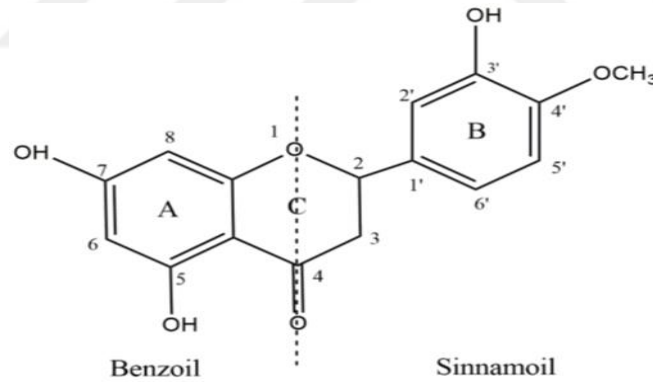
Dallanmamış polisakarit, çok değerlikli katyonların eklenmesi üzerine bir jel oluşturur, çünkü esas olarak bitişik guluronik asit kısımlarının karboksilik grupları, tercihen iki değerlikli katyonlarla bir kompleks oluşturur[158]. Daha ileri çalışmalar ayrıca heterojen değişen MG parçalarının da aljinatların jelleşmesinde rol oynadığını ortaya koymuştur[159]. Aljinatın jelleşmesi, hafif fizyolojik koşullar altında gerçekleştirilebilir, bu da aljinatı kırılabilir kargolarla biyomedikal

uygulamalar için ideal bir aday haline getirir. En umut verici çapraz bağlayıcılar, Ba^{2+} için daha yüksek olan jelin uzun vadeli stabilitesinde farklılık gösteren Ca^{2+} ve Ba^{2+} 'dır[160]. In vitro ve in vivo uygulamalara uygun bir hidrojel sağlamak için, ultra saf ve ultra yüksek viskoziteli bir biyomateryal elde etmek için hammaddelerin özel bir şekilde işlenmesi gerekir[161].

2.5 Hesperetin

Hesperidin (hesperetin-7-rutinoside) in aglikon formu olan hesperetin (3',5',7-trihidroksil-4'metoksil flavanon) limon, portakal, greyfurt gibi turuncgillerde en bol bulunan flavonoiddir[162]. Ayrıca, hesperidin bağırsaklarda bulunan bakterilerin ürettikleri alfa rhamnozidaz ve beta glikozidaz enzimleri yardımıyla hesperetine dönüşür[163].

Hesperetin yapısında benzoil ve sinnamoil kısımları bulunduran bir bioflavanoiddir (Şekil 2.7). Bioflavanoidler yapılarındaki sinnamoil den kaynaklı bant I (300-400nm) ve benzoilden kaynaklı bant II (240-300nm) de absorban yapmaktadır[164-166].



Şekil 2.7 Hesperetin kimyasal yapısı

Hesperetin, antioksidan, anti-inflamatuar, anti-karsinogenik, anti-hipertansif, anti-aterojenik, nöroprotektif, antidiabetik, antihiperlipidemik gibi farmakolojik özellikler gösterdiği için literatür ve ilaç sanayinde ilgi çekmektedir[167-171]. Bununla beraber, hesperetin biyolojik sistemlerdeki biyoyararlanımı ve dağılımı, polimerik nanopartiküller kullanılarak[172] ve/veya yapısal modifikasyonla[173] daha da geliştirilebilir olması hesperetin'i umut verici bir terapötik molekül yapmaktadır.

Hesperetin, antioksidan özelliklerini doğrudan radikal temizleme ve hücresel antioksidan savunmayı artırma olmak üzere iki yolla gösterir. Hesperetinin doğrudan radikal süpürücü aktivitesi, DNA'nın, proteinlerin ve dokuların içsel (onkogenler gibi) ve dışsal (radyasyon, iltihaplanma ve toksinler gibi) faktörlerin neden olduğu hasara karşı korunmasında önemli bir rol oynar.

Hesperetin için radikal süpürme çoğunlukla yapısındaki -OH gruplarından ve guayasil kısmında ki protonları seri şekilde vermesiyle gerçekleşir. İlk proton kaybı benzoil kısmındaki 7-OH grubundan başlar. İkinci proton verme reaksiyonunda ise, negatif yükün tüm iskelet üzerinde konjugasyon yoluyla daha iyi delokalizasyonu nedeniyle B halkası üzerindeki -OH gruplarında gerçekleştirilmeyi tercih eder. Hesperetin için proton verme reaksiyon sıralaması $7\text{-OH} \rightarrow 3'\text{-OH} \rightarrow 5\text{-OH} \rightarrow 4'\text{-CH}$ şeklindedir. Hesperetinin oluşan polianyonu serbest radikalleri ardışık elektron transfer reaksiyonları ile etkisiz hale getirir[174].

Literatürdeki bazı çalışmalar hesperetinin, NO üretimi üzerinde hafif bir inhibitör etki, COX-1 aktivitesi üzerinde hafif bir baskılama ama COX-2 üzerinde oldukça iyi bir inhibitör etki etme yoluyla antiinflamatuvar özeliğe sahip olduğunu göstermiştir[175, 176].

Hesperetinin cisplatin bazlı kemoterapinin neden olduğu nörotoksiteye karşı koruduğu, nöroprotektif özellik gösterdiği belirlenmiştir[177].

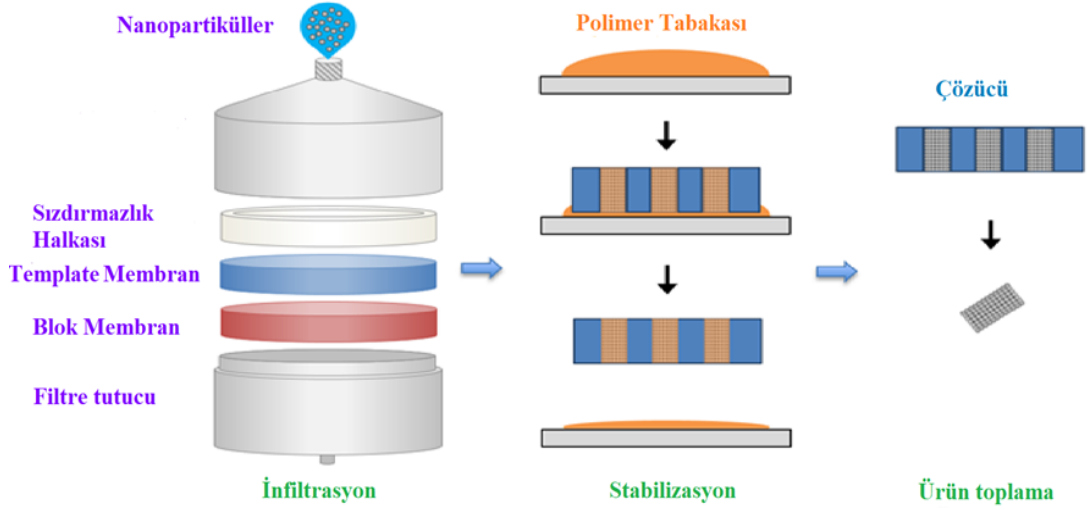
2.6 Template-Assisted Tekniğin Partikül İnfiltrasyon Yaklaşımı

Template-assited tekniği partikül infiltrasyonu, pulmoner ilaç dağıtımı için küresel olmayan ve nano yapıllı ilaç taşıyıcılarının üretimi için en gelişmiş yöntem olup ilgilenilen materyalin tek moleküller yerine partiküler sistem şeklinde infiltrasyonuna dayanır. Martin ve ark. nın öncülük ettiği bu metotta[178], malzemenin infiltrasyonu için, yüksek homojenliğe sahip çubuklar, lifler, altıgenler, halkalar veya piramitler oluşturarak tasarlanmış kalıplara veya sürekli gözeneklere sahip membranlara sahip şablonlar kullanılabilir. İnfiltrate edilen malzeme, yığın veya partikül sistemi olarak kalıp veya gözenek içine monte edildiğinde, şablonun gözenekli geometrisi, ortaya çıkan parçacık morfolojisini belirler. Şablonun kalınlığı ile sınırlı olan parçacık boyutu, mikro veya yüksek

nanometre aralığında olabilir. Genellikle, polimerik track-etched membranlar veya alümina veya silikondan yapılmış inorganik membranlar kullanılır. Gözenekli yapının homojenliği nedeniyle, farklı boy/en oranlarına sahip parçacıklar yüksek hassasiyetle üretilir. İlaç yüklemesi, aktif ajanın malzeme ile birlikte yüklenmesi veya oluşumdan sonra partikül yüzeyinin kaplanmasıyla yapılabilir[53].

Nanoparçacıklar veya nanokristaller gibi nanoboyutlu sistemler, mikron boyutundaki gözeneklere infiltre edilmek için uygun olduğundan yoğun paketlenme ve dolayısıyla oluşan mikroçubuk için yüksek stabiliteye olanak sağlarlar. Çalışılan membrana “template (şablon) membran” denir. Parçacıkların şablonun gözeneklerinden sızmasını önlemek için şablon zarının altına ikinci bir membran olan blok membran yerleştirilir. Blok membranın gözenek boyutu, infiltre edilecek partiküllerden daha küçük olmalıdır. Proteinler gibi daha küçük nesneler için gözenek boyutu daha da azaltılabilir. Bununla birlikte, gözenek boyutundaki bir azalma, membran direncini ve dolayısıyla infiltrasyon basıncını artıracak ve işlemi karmaşıklatacaktır. Şekil 2.8 'da gösterildiği gibi, şablon ve blok membranı bir filtre tutucu sistem içinde birleştirilir. Nanosüspansiyon, bir şırınga pompası kullanılarak bir şırınga ile infiltre edilir. Kontrollü akış hızı sayesinde, sızıntıyı önlemek için kullanılan malzeme ve blok membranının boyutu dikkate alınarak infiltrasyon hızı ayarlanabilir. İnfiltrasyondan sonra, silindirik olarak düzenlenmiş nanopartiküller, şablon gözenek içinde bağlanmalıdır. Bu amaçla, bir matriste fiziksel sıkışma veya elektrostatik çekim gibi farklı yaklaşımlar mümkündür. Gözeneklere yerleşmiş materyali kaplayıp, stabilize etmek için uygun bir polimer çözeltisi, sıvı bir film olarak nanoparçacıkları tamamen kaplar. Ardından film kurutulur ve nanoparçacıkların silindirik düzeni stabilize edilir. Bir matris olarak, agaroz gibi hidrojel ve mannitol gibi şekerlerin polimer çözeltileri kullanılabilir[179, 180] .

Şablondan nano yapılı mikro çubukların toplanması için iki yöntem kullanılabilir. Membran, bir organik çözücü yardımıyla çözünüp ortamdan uzaklaştırılabilir veya mikroçubuklar, yapışan bir tabaka ile zardan dışarı çekilerek tahribatsız bir şekilde serbest bırakılabilir[53].

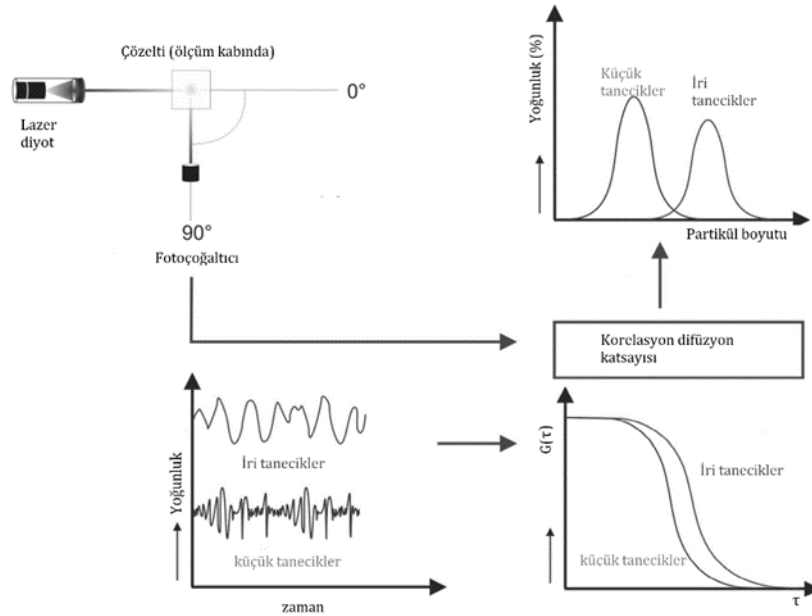


Şekil 2.8 Template-assisted tekniği infiltrasyon yaklaşımı ile mikroçubuk eldesi prosesinin şematik gösterimi

2.7 Zeta-sizer Ölçümleri

2.7.1 Partikül Boyutu ve Polidispersite

Zetasizer Dinamik ışık saçılımını temel alarak partikül boyutunu ölçer (Şekil 2.9).



Şekil 2.9 Dinamik ışık saçılması ölçümü[181]

Dinamik ışık saçılımı (DLS) kullanan parçacık boyutu ölçümlerinde, bir lazer ışını, yüksek oranda seyreltilmiş bir sıvı dispersiyon içindeki dağılmış parçacıklar

üzerine saçılır. Her parçacığın saçılan ışığı birbiriyle etkileşir. Brown hareketi nedeniyle parçacıklar sürekli olarak konum değiştirdiğinden, saçılma merkezlerinin konumu birbirine göre değişir ve müdahaleler nedeniyle saçılma yoğunluğunda küçük dalgalanmalar gerçekleşir. Saçılan ışık yoğunluğunun değişimi, ışının geliş yönüne belirli bir sabit açıda zamana bağlı olarak ölçülür. Böylelikle, dispersiyondaki partiküllerin hızı saptanır. Difüzyon katsayısı bu verilerin korelasyonu ile belirlenir. Partikül boyutu Stokes-Einstein eşitliği (eşitlik 2.2) kullanılarak hesaplanır.

$$D_{\tau} = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h} \quad (2.2)$$

k_B Boltzmann sabiti ($1,38064852 \cdot 10^{-23} \text{ J/K}$), T sıcaklık, η mutlak viskozite ($\text{kg} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-1}$), R_h hidrodinamik yarıçap (m), D_{τ} difüzyon katsayısı ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) dır.

Polidispersite, parçacık boyut dağılımını ifade etmek için kullanılır. Polidispersite arttıkça boyut dağılımı genişlemektedir.

2.7.2 Mobilite

Çözücü içinde süspansiyon halinde bulunan yüklü parçacıkların bir dış elektrik alan etkisiyle hareket ettirilmesine elektroforez, bu harekete de elektroforetik mobilite denir. Çözücünün viskozitesi, süspanse edilmiş moleküllerin şekli gibi etkenlerden ileri gelen elektroforetik kuvvete zıt yönde bir kuvvet bulunur. Elektroforetik mobilite aşağıdaki eşitlik ile hesaplanır (Eşitlik 2.3).

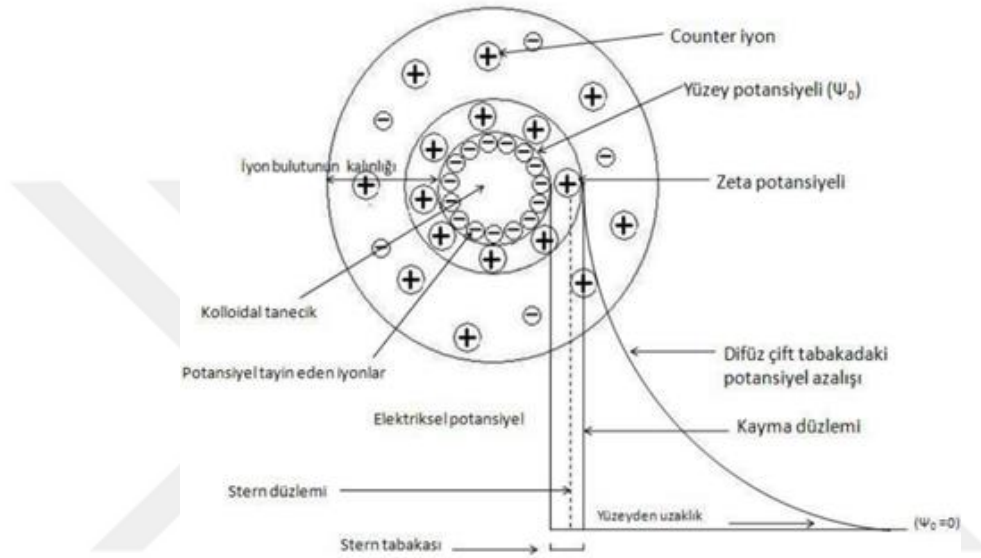
$$\mu_e = v/E \quad (2.3)$$

Eşitlik te, μ_e elektroforetik mobilite ($\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), v kayma hızı ($\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$) ve E :elektrik alan şiddeti ($\text{V} \cdot \text{m}^{-1}$) dir.

2.7.3 Zeta Potansiyel

Zeta potansiyel ölçümleri sıvılarda dağılma sistemlerinin davranışlarını anlayabilmek için kullanımı oldukça yaygındır. Zeta poltansiyel, direkt ölçümü mümkün olmadığından elektroforez, elektroozmoz, akış potansiyeli ve sedimentasyon gibi metotlar kullanılarak belirlenir.

Elektrokinetik potansiyel olarak da adlandırılan zeta potansiyel, elektrik alanı altında hareket eden bir kolloid parçacığın kayma/kesme düzlemindeki potansiyeldir. Bir yüzeyin elektrik potansiyeli, sonsuzdan bir birim pozitif yükü herhangi bir ivme olmadan yüzeye getirmek için yapılması gereken iş miktarıdır. Zeta potansiyel, elektroforetik olarak hareketli parçacıkların elektrikli çift katmanını ile kayma düzleminde etraflarındaki dağıtıcı katman arasındaki potansiyel farkı yansıtır[182].



Şekil 2.10 Zeta potansiyelin şemasal ifadesi [183]

Yüklü bir parçacık dağıldığında, yüzeyinde genellikle elektriksel çift tabaka olarak adlandırılan adsorbe edilmiş bir çift katman gelişir (Şekil 2.10). İç katman ağırlıklı olarak partikülüne zıt yüke sahip iyonlardan/moleküllerden oluşur (Stern katmanı). Stern tabakasının ötesinde, parçacıklar üzerindeki yüzey yükünden kaynaklanan elektrostatik etkiler, her Debye uzunluğunun mesafesiyle alanın $1/e$ faktörü kadar azaldığını belirten Debye yasasına göre azalır[184].

Matematiksel olarak bu elektrostatik etki sonsuza kadar uzanmasına rağmen, deneysel olarak parçacık yüzeyinden sadece birkaç nm'ye kadar mevcuttur. Yüklü nanopartiküllerin elektrostatik alanı nedeniyle, hem aynı hem de zıt yüklü iyonlardan/moleküllerden oluşan dağınık bir katman, Stern katmanının ötesinde büyür ve Stern katmanı ile birlikte elektriksel çift tabakayı oluşturur. Bu dağınık tabakanın bileşimi dinamiktir ve pH, iyonik kuvvet, konsantrasyon vb. gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak değişir. Böyle bir dağılıma bir elektrik alanı

uygulandığında, yüklü parçacıklar karşı elektrota doğru hareket eder (elektroforez). Bunun içinde. dağınık katman, elektroforez sırasında hareket eden parçacıklar ile etrafındaki dağıtıcı katman arasında arayüz görevi gören varsayımsal bir düzlem vardır.

Bu düzlem, karakteristik kayma/kesme düzlemidir ve zeta potansiyel, bu parçacık-akışkan ara yüzeyindeki potansiyeldir. Yunanca ζ (zeta) harfi, başlangıçta matematiksel denklemlerde onu tanımlarken kullanılmış ve dolayısıyla zeta potansiyeli adı verilmiştir. Parçacık yüzeyindeki potansiyel, Nernst potansiyeli (Ψ_0)[185] olarak bilinir ve ölçülemez. Elektrostatik alan, Eşitlik 2.4 'ye göre parçacık yüzeyinden uzaklaştıkça dağılımda azalır.

$$\Psi = \Psi_d e^{-\kappa x} \quad (2.4)$$

Eşitlikte Ψ , stern tabakasından x kadar uzakta olan yüzeyin potansiyelini, Ψ_d stern tabakasının potansiyelini, κ Debye-Hückel sabitini, x uzaklığı ifade eder. Kayma düzlemi stern tabakasına yakın olduğu durumda eşitlik şu şekilde düzenlenebilir:

$$\Psi = \zeta e^{-\kappa x} \quad (2.5)$$

Zeta potansiyel doğrudan ölçülemediğinden uygulanan bir elektrik alanı altında yüklü parçacıkların elektroforetik hareketliliğinden hesaplanır. Parçacıkların elektroforetik hareketliliği (μ_e), V parçacığın hızı, E elektrik alan şiddetiolmak üzere, ilk olarak şu şekilde hesaplanır:

$$\mu_e = V/E \quad (2.6)$$

Zeta potansiyel μ_e kullanılarak Henry eşitliğinden hesaplanır.

$$\mu_e = \frac{2\varepsilon_r\varepsilon_0\zeta f(K_a)}{3\eta} \quad (2.7)$$

Burada ε_r bağıl geçirgenlik/dielektrik sabiti, ε_0 vakum geçirgenliği, ζ zeta potansiyeli $f(K_a)$ Henry fonksiyonunu, η ise vizkoziteyi göstermektedir.

EDL'nin kalınlığı partikül yarıçapına kıyasla çok daha küçük olduğunda ki bu, yüksek tuz konsantrasyonunun ($10^{-2}M$) sulu çözeltileri içindeki daha büyük partiküllerden ($1 \mu m$ 'ye kadar) kaynaklanabilir. $f(K_a)$ değeri 1.5 olarak alınır ve Henry eşitliği daha sonra Helmholtz-Smoluchowski (HS) eşitliğine dönüşür (Eşitlik 2.8):

$$\mu_e = \frac{\epsilon_r \epsilon_0 \zeta}{\eta} \quad (2.8)$$

HS denklemi farmasötik preparatların çoğu için geçerlidir ve bu nedenle nano ilaç taşıyıcı geliştirmek için çok önemlidir[186].

Aksine, düşük tuz konsantrasyonunda (10^{-5} M) dağılmış daha küçük (≤ 100 nm) partiküller nedeniyle elektriksel çift tabakanın kalınlığı partikülün kendisinden çok daha büyük olduğunda, $f(Ka)$ değeri 1 olarak alınır ve Henry eşitliği Hückel eşitliği (eşitlik 2.9) olarak değiştirilebilir:

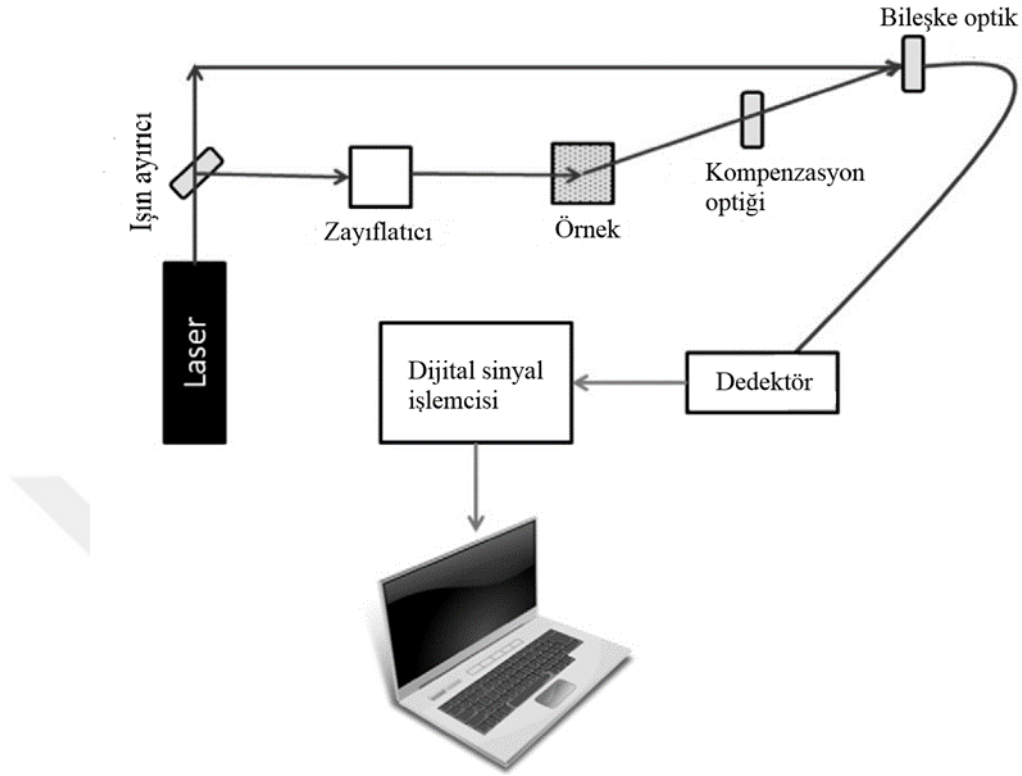
$$\mu_e = \frac{2\epsilon_r \epsilon_0 \zeta}{3\eta} \quad (2.9)$$

Huckel denklemi, seramik endüstrisinde popüler olmasına rağmen sulu dispersiyonlar için geçerli olmadığı için genellikle farmasötik preparasyonlarla ilgili değildir.

Partiküllerin elektrik alan uygulandığında mobilitelerinin ölçümü iki şekilde yapılmaktadır: Elektroforetik ışık saçılması ve elektroakustik fenomen.

Elektroforetik ışık saçılması; Elektroforez sırasında hareketli parçacıklar, bir gelen lazeri saçar. Parçacıklar hareketli olduğu için saçılan ışık orijinal lazerden farklı frekansa sahiptir ve frekans kayması parçacıkların hızıyla orantılıdır (Doppler kayması). Bu teknik için kullanılan enstrümantasyon Şekil 2.11 de gösterilmiştir. Kısacası lazer ışını ikiye ayrılır ve bir ışın numuneye doğru yönlendirilirken diğeri referans ışın olarak kullanılır. Örnekten saçılan ışık, Doppler kaymasını belirlemek için referans ışını ile birleştirilir veya optik olarak karıştırılır. Parçacık hızının büyüklüğü (V), Doppler kaymasından çıkarılır ve ardından zeta potansiyel, denklemler olarak listelenen matematiksel denklemler dizisi aracılığıyla ölçülür. Bu teknik genellikle dinamik ışık saçılımı(DLS) ile birlikte kullanılır ve hem DLS hem de zeta potansiyel için entegre ölçüm paketi sağlayan bir dizi araç ortaya çıkmıştır. Zetasizer serisi cihazlar, bu tür uygulamalar için sofistike lazer interferometrik PALS (faz analizi ışık saçılımı) tekniğini kullanır[187]. Tek seferde hem DLS hem de zeta potansiyel ölçümleri yapmak için dahili altın kaplamalı bakır elektrotlara ve bükülü kılcal boruya sahip tek kullanımlık plastik (polikarbonat) küvetler mevcuttur. DLS gibi, Zetasizer yazılım arayüzü de kullanıcının

özelleştirilmiş standart işletim protokoller geliştirmesine ve ilgili bilgileri girmesine olanak tanır.



Şekil 2.11 Elektroforetik ışık saçılımı ile Zeta potansiyel ölçümünün enstrümantasyonunu gösteren şema[182]

Elektroakustik fenomen; Bu teknikte, numunedeki parçacıkların salınım yapmasına neden olan yüksek frekanslı bir elektrik alanı uygulanır, salınım ise boyutlarına ve zeta potansiyele bağlıdır. Salınım, hem parçacık boyutunu hem de zeta potansiyeli belirlemek için büyüklük ve faz açısı üzerinde analiz edilir[188]. Bu teknik, ilaç dağıtım araştırmalarında daha az popülerdir.

Zeta potansiyel verilerinin en popüler kullanımlarından biri, onu kolloid stabilitesi ile ilişkilendirmektir. İlaç dağıtım literatüründe, zeta potansiyel değerlerine göre nanopartikül dispersiyonlarının kararlılıkları hakkında fikir yürütülebilir[189].

Zeta potansiyel değerleri çözeltilerin özellikle kolloidal veya süspansiyon sistemlerinin kararlılığı hakkında bilgi verir. Genel olarak ilaç salınım sistemlerinde zeta potansiyel değerleri $\pm 0-10\text{mV}$, $\pm 10-20\text{mV}$, $\pm 20-30\text{mV}$ ve $> \pm 30\text{mV}$ sırasıyla oldukça kararsız, nispeten kararlı, orta derecede kararlı ve yüksek düzeyde kararlı olarak sınıflandırılmaktadır[189].

3.1 Kullanılan Malzeme ve Cihazlar

İnfiltrasyon aşaması için %5 Hesperetin- %1 Plantacare 2000 (~180nm) - %94 su nanosüspansiyonu, %5 Hesperetin- %1 Plantacare2000 (~400nm) - %94 su nanosüspansiyonu, %5 Hesperetin- %1 PVA (~200nm) - %94 su nanosüspansiyonu, %5 Hesperetin- %1 PVA (~400nm) ve %94 su nanosüspansiyonu Phillips-Marburg Üniversitesi Farmasötik Teknoloji ve Biyofarmasötik Enstitüsünden temin edildi. Merk malı HCl, NaOH, metanol ve aseton kullanıldı.

Çalışma membranı olarak gözenek ölçüsü 5 μ m olan 25 mm lik polikarbonat Nuclepore Track-Etched Membran (Whatman, Dassel, Germany) ; blok membran olarak ise 0.1; 0.5; 0.6 ve 1 μ m gözenek ölçülü 25 mm lik polikarbonat Nuclepore Track-Etched Membranlar (Whatman, Dassel, Germany) kullanıldı.

İnfiltrasyon Kdscientific marka şırınga pompası ile gerçekleştirildi.

Stabilizasyon aşaması için Sigma Aldrich malı agaroz, D-mannitol, L-leucine, ürün toplama aşaması için Sigma Aldrich malı, kloroform, benzileter, toluen, %2.5 PVA (4-88) ve şırınga filtresi (Whatman GD/XP Syringe 25mm 0.2 μ m) kullanıldı.

Partiküllerin karakterizasyonu için Zeiss marka SEM (taramalı elektron mikroskop) kullanıldı.

Membranların dolu ve boş gözeneklerinin sayımı ve mikroçubukların boy/en oranını belirlemek için Imagej-Win64 programı kullanıldı.

Mikroçubukların sayımı için Yıldız Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Laboratuvarı'ndan destek alınmış olup, Zeiss Axio Floresan mikroskobu ve Fusch-Roshental lamı kullanıldı.

Ultraviyole Görünür (UV/VIS) spektrum ölçümleri Shimadzu marka UVmini-1240 model UV/VIS spektrofotometre ile yapıldı.

Zeta potansiyeli ve partikül boyutu ölçümleri için Brookhaven Instruments Corporation marka 90Plus model Zetasizer Cihazı kullanıldı.

3.1.1 Track-Etched Polikarbonat Membranlar

Template-assisted teknik infiltrasyon yaklaşımıyla mikroçubuk eldesinde, silindirik nesnelerin oluşumu için düzgün ve standardize edilmiş gözeneklere sahip membranlar kullanılmaktadır. Alümina gözenekli membranlar ve track-etched membranlar en yaygın kullanılanlarıdır. Fizikokimyasal özellikleri ve hem inorganik oksit hem de organik polimer olmaları nedeniyle infiltire edilecek materyali çözmeyen uygun bir membran çözücüsü bulmak mümkündür. Her iki membran çeşidi de paralel, düz ve eşit ölçekli gözeneklere sahiptir. Tablo 3.1 de $5,0\mu\text{m}$ lik gözenek boyutuna sahip track-etched polikarbonat membranın üretici tarafından lanse edilmiş gözenek ölçüleri verilmiştir[190].

Tablo 3.1 $5,0\mu\text{m}$ lik gözenek boyutuna sahip track-etched polikarbonat membranın gözenek özellikleri

Template Membranın Özellikleri	
Gözenek Ölçüsü	$5,0\mu\text{m}$
Membranın Kalınlığı	$10\pm 1\mu\text{m}$
Gözenek Yoğunluğu/ $100\mu\text{m}^2$	0,38

Gözenek boyutu $5\mu\text{m}$ olan bir membranın gözenek sayısı N_1 aşağıdaki eşitliklerle, aşağıdaki şekilde hesaplanır.

$$A_{\text{template}} = \pi r^2 = \pi 12,5^2 = 491\text{mm}^2 = 4,91 \times 10^8 \mu\text{m}^2 \quad (3.1)$$

$$N \left[\text{Gözenek} / \mu\text{m}^2 \right] = 0,0038$$

$$N_1 \left[\text{Gözenek} / \text{Template, hesaplanan} \right] = A \times N \quad (3.2)$$

$$\begin{aligned} N_1 \left[\text{Gözenek} / \text{Template, hesaplanan} \right] &= 4,91 \times 10^8 \mu\text{m}^2 \times 0,0038 \text{ } 1/\mu\text{m}^2 \\ &= 1,87 \times 10^6 \text{ dır.} \end{aligned}$$

Verilen eşitlikte A_{template} membranın yüzey alanını, N_1 ise $1\mu\text{m}^2$ deki gözenek sayısını ifade etmektedir.

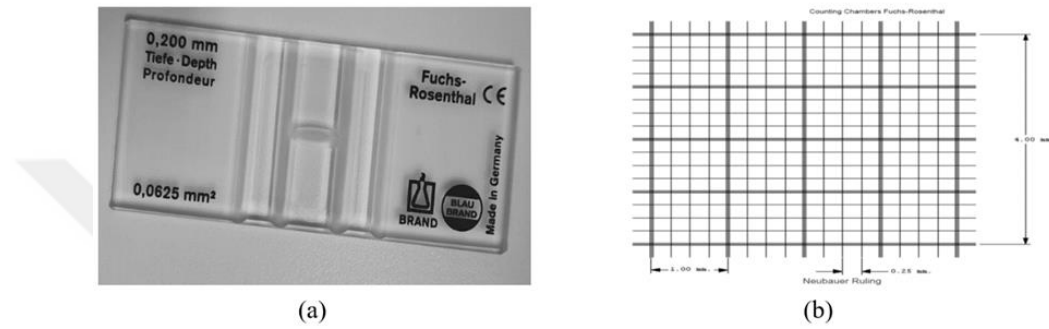
Mikroçubuk eldesinin verimi ise eşitlik 3.3 ile elde edilir.

$$Verim[\%] = \frac{N_2}{N_1} \times 100 \quad (3.3)$$

N_2 sayım sonucu elde edilen mikroçubuk sayısını ifade etmektedir.

3.1.2 Fuchs-Rosenthal Lamı

Birbirine eş 16 kareden oluşan sayım alanının kenarları 4 mm ve derinliği 0.2 mm olup alanı 16 mm^2 , hacmi ise 3.2 mm^3 olan sayma lamıdır (Şekil 3.1 a ve b)



Şekil 3.1 a) Fuchs-Roenthal lamı b) Sayma alanı

Sayım sonucunu hesaplamak için çeşitli yöntemler vardır. Bir büyük kare sayımı yapma, dört farklı küçük kare sayımı yapıp ortalama alma vs. Temelde Eşitlik 3.4 de verildiği gibi birim hacimdeki sayı bulunup örneğin hacmi ile ilişkilendirmeye dayanır.

$$V = A \times h = 16 \text{ mm}^2 \times 0.2 \text{ mm} = 3.2 \text{ mm}^3 = 3.2 \times 10^{-3} \text{ mL} \quad (3.4)$$

Verilen eşitlikte V sayım alanının hacmini, A bir sayım alanının alanını h ise yüksekliği ifade etmektedir.

N_2 bir membrandan elde edilen mikroçubuk sayısını göstermekte olup, eşitlik 3.5 ile hesaplanır.

$$N_2 = \frac{\text{Sayılan tanecik sayısı} \times 1 \text{ mL}}{3.2 \times 10^{-3}} \quad (3.5)$$

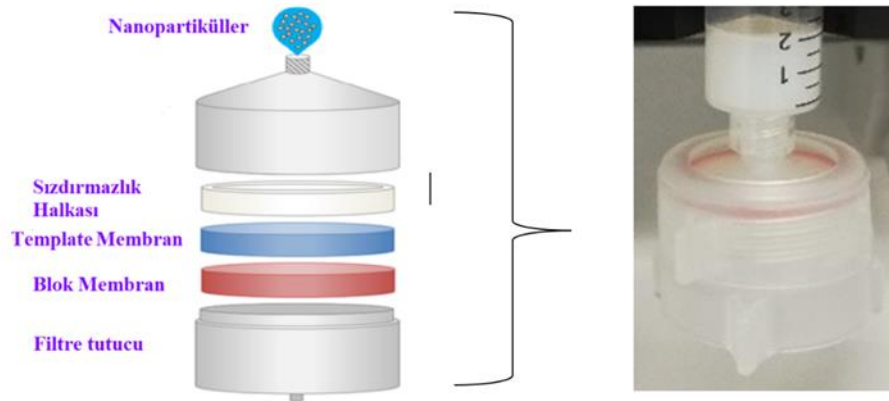
3.2 Hesperetin-Plantacare(2000) Nanosüspansiyonundan Template-assisted Teknik ile Hesperetin Mikroçubuk eldesi

Plantacare2000, alkilpoliglikozit, %100 yenilenebilir, bitki kaynaklı hammaddelerden yapılmış iyonik olmayan bir yüzey aktif maddedir. Birinci sınıf çevre ve cilt uyumluluğu profillerine sahiptir.

3.2.1 Hesperetin-PC(2000) Nanosüspansiyonunun İnfiltrasyonu için Optimum Konsantrasyonun Belirlenmesi

En uygun ve en verimli infiltrasyon koşullarını belirlemek amacıyla %5 Hesperetin- %1 Plantacare2000- %94 su nanosüspansiyonundan alınıp infiltrasyon için 0.01mg/mL ; 0.05 mg/mL ; 0.1 mg/mL ; 0.2 mg/mL ve 0.3 mg/mL olmak üzere farklı konsantrasyonlarda nanosüspansiyonlar hazırlandı.

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan nanosüspansiyonlar sırasıyla programlanabilir pompanın şırıngasına 3 mL olarak konuldu. Ucuna holder (tutucu) takılı şırınga (Şekil 3.2) pompaya yerleştirildi. nanosüspansiyona 2*3mL programı (iki kere 3 er mL nanosüspansiyon şırınga edilmesi) uygulanarak membranlara infiltre edildi. Program dört aşamalı olup ilk adımda 1mL/min hızla infiltrasyon ikinci adımda 15 dakika bekleme, üçüncü adımda 0.1mL/min hızla infiltrasyon ve son adımda 10 dakika bekleme şeklindedir. İnfiltrate edilmiş membranlar suyla nemlendirilmiş mendille temizlendi ve SEM için örnek alındı.



Şekil 3.2 İnfiltrasyonun şematik gösterimi

3.2.2 Hesperetin-PC(2000) Nanosüspansiyonunun İnfiltrasyonu Sonrası Membranlardaki Safsızlıkların Giderilmesi için Uygulanan Yöntemler

Nanopartiküllerin infiltrasyonu sonrası membrandaki safsızlıkların giderilmesi için aşağıda sıralanan farklı yöntemler uygulandı:

- Suya batırarak yıkama tekniği ile temizleme
- Çeşitli hız ve zaman ile infiltrasyon
- Farklı konsantrasyonlardaki farklı çözeltiler ile temizleme

- Farklı sıcaklıklarda su ile temizleme
- Farklı gözenek boyutlarına sahip blok membran kullanımı
- Farklı boyutta nanopartikül içeren başlangıç nanosüspansiyonları ile çalışma

3.2.2.1 Suya Batırarak Yıkama Tekniği ile Membranların Temizlenmesi

Optimizasyon sonucu en verimli konsantrasyonu belirlenmiş Hesperetin-PC 2000(~180nm) nanosüspansiyon içeren membranlar, infiltrasyondan sonra 4 kere 10 mL su içerisinde birkaç saniye bekletilerek yıkandı.

3.2.2.2 İnfiltrasyonun Farklı Sayı ve Sürede Yapılması

Optimizasyon sonucu en verimli konsantrasyonu belirlenmiş Hesperetin-PC 2000(~180nm) nanosüspansiyonu 0.1mL/min sabit hızla 1*3mL programı (1 kere 3mL nanosüspansiyon infiltrasyonu), 1*6 mL program (1 kere 6mL nanosüspansiyon infiltrasyonu) ve 2*3 mL programı (2 kere 3mL nanosüspansiyon infiltrasyonu) olarak 3 farklı infiltrasyon programı uygulandı.

3.2.2.3 Farklı Sıcaklıklardaki Su ile Temizleme

Bu yöntemde hem temizleme mendilini nemlendirmek hem de yıkama yapmak için 37.5°C; 47.5°C; 57.5 °C; 67.5 °C; 77.5 °C sıcaklıklardaki Milli-Q su kullanıldı. Membranlar, yıkama işlemi için her infiltrasyondan sonra ilgili sıcaklıktaki 10 mL suda birkaç saniye bekletildi.

3.2.2.4 Farklı Konsantrasyonlardaki Çeşitli Çözeltiler ile Temizleme

Membranları temizlemek için su yerine 0.01M, 0.1M, 1M HCl ; 0.01M, 0.1M, 1M NaOH ,Metanol ve Aseton olmak üzere çeşitli konsantrasyonlarda çeşitli çözücüler kullanıldı. Bu çözücüler hem temizleme mendilini nemlendirmek hem de yıkama işlemi için kullanıldı. Yıkama işleminde, membran için her infiltrasyondan sonra ilgili konsantrasyon ve çözücünün 10 mL sinde birkaç saniye bekletildi.

3.2.2.5 Farklı Gözenek Boyutlarına Sahip Blok Membran Kullanımı

Daha büyük gözeneklere sahip blok membranlar kullanılırsa fazla çözeltinin ortamdan kolaylıkla uzaklaştırılacağı böylece iki membran arasında sıkışıp kalan Hesperetin-PC2000(~180nm) miktarının büyük ölçüde azalarak kirliliğin

giderilebileceği düşünöldü. Bunun için 0.5, 0.6 ve 1.0µm lik blok membranlar kullanarak infiltrasyon işlemi gerçekleştirildi.

3.2.2.6 Farklı Boyutta Nanopartiköl İçeren Başlangıç Nanosüspansiyonu ile Çalışma

Bu yöntem için %5 lik Hesperetin-PC2000(~400nm) nanosüspansiyonu kullanıldı. İnfiltrate edilen membranları MilliQ su ile nemlendirilmiş mendil ile silerek ve Milli-Q su ile yıkama yöntemlerini uygulayarak temizleme işlemleri yapıldı.

3.2.3 Hesperetin Mikroçubukların Agaroz ve D-Mannitol ile Stabilizasyonu

3.2.3.1 Hesperetin Mikroçubuklarının Agaroz İle Stabilizasyonu

1.5 g Agaroz saf su içinde konularak, yaklaşık 80°C de ısıtılıp karıştırılarak % 1,5 (m/V) Agaroz çözeltisi hazırlandı.

% 1,5 (m/V) Agaroz çözeltisi ile Hesperitin partiküllerinin stabilizasyonu için; 0.3 mL %1,5 (m/V) luk Agaroz çözeltisi cam lamel üzerine konuldu. Hesperetin infiltrate edilmiş membran, parlak yüzeyi çözeltiye temas edecek şekilde lamelin üzerine yerleştirilerek kuruması için 1 gün beklendi.



Şekil 3.3 Agaroz ile stabilize edilmiş membranın lamel üzerindeki görüntüsü

3.2.3.2 Hesperetin Mikroçubuklarının D-Mannitol ile Stabilizasyonu

%20 (m/V) D-mannitol Çözeltisi; 20 g D-mannitol, 0.1g L-Lösin saf su içinde, 50-60 °C de karıştırılarak hazırlandı.

%20 (m/V) D-mannitol çözeltisi ile Hesperitin mikroçubuklarının stabilizasyonu için 0.3 mL %20 (m/V) lik Mannitol çözeltisi cam lamel üzerine konuldu. Hesperetin infiltrate edilmiş membran, parlak yüzeyi çözeltiye temas edecek şekilde lamelin üzerine yerleştirildi (Şekil 3.4). Kuruması için 1 gün beklendi.

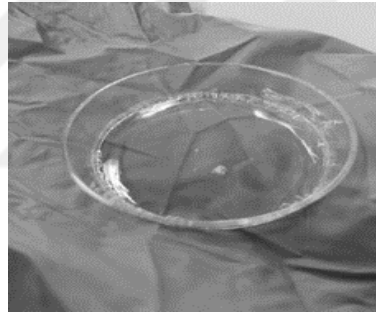


Şekil 3.4 D-Mannitol ile stabilize edilmiş membranın lamel üzerindeki görüntüsü

3.2.4 Hesperetin Mikroçubuklarını Toplama

3.2.4.1 Agaroz ile Stabilize Edilmiş Hesperetin Mikroçubuklarını Toplama

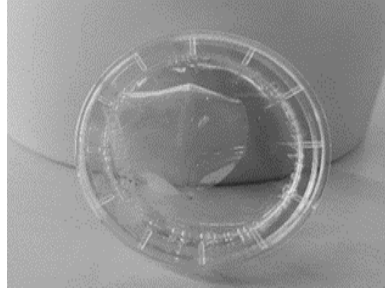
Agaroz İle Stabilize Edilmiş Hesperetin mikroçubukları PVA (4-88) membran kullanarak sıyırma yöntemi ile toplama için, plastik Petri kabına % 2.5 luk PVA (4-88) çözeltisinden 4 mL konuldu. 80-90°C ye ısıtılarak çözeltideki suyun buharlaşması yoluyla Petri kabın tabanının PVA ile kaplanması sağlanarak (Şekil 3.5) PVA membran oluşumu sağlandı.



Şekil 3.5 PVA (4-88) ile kaplanmış petri kabı

Agarozla stabilize edilmiş membran kuruduktan sonra lamel üzerinden sıyrılarak alındı.

Tabanı PVA (4-88) kaplı petri kabına 0.1 mL PVA 4-88 eklendi. Membranın parlak yüzeyi petri kabınının tabanına yapıştırılarak PVA çözeltisi ile teması sağlandı. Kuruması için 1 gün beklendi (Şekil 3.6).



Şekil 3.6 PVA(4-88) Tabakasına yapıştırılmış membran görüntüsü

Pens yardımıyla membran PVA tabakasından ayrıldı. Bıçakla PVA tabakası petri kabından ayrılarak eppendorf tübüne alındı. 1.5 mL MilliQ su eklenerek çözünmesi sağlandı.

20 °C 2500 rpm de 20 dakika boyunca santrifüj uygulandı. PVA ve su dan oluşan sıvı kısım atılarak katı kısım tekrar 1.5 mL su ilavesiyle karıştırılarak santrifüj uygulandı. Aynı koşullarla toplam üç kere santrifüj işlemi uygulandı.

Agaroz ile stabilize edilmiş hesperetin mikroçubukları santrifüj uygulama ile toplama, santrifüj yoluyla Hesperetin mikroçubukların toplanması amacıyla, lamelden alınan Agaroz ile stabilize edilmiş membran 2 mL lik eppendorf tübe alınarak çözülmesi sağlandı. Çözücü olarak Kloroform (CHCl_3), benzileter ($\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}$), Kloroform-Benzileter Karışımı (1:3) ve Kloroform+ Toluen Karışımı (1:2) olmak üzere farklı çözücüler kullanıldı. CHCl_3 ile çözme işlemi uygulanan karışımdan mikroçubukları ayırmak için; 2500 rpm 30 dk 20 °C ,5000 rpm 20 dk 20°C, 10000 rpm 20 dk 20°C ve 5000 rpm 20 dk 10°C olmak üzere farklı sıcaklık, süre ve hız ayarlarıyla uygun santrifüj koşulları araştırıldı.

Diğer çözücüler için 2500 rpm, 20 dk. 20°C ayarlarıyla her defasında 2 mL çözücü kullanılarak üç kez santrifüj uygulandı.

Agaroz ile stabilize edilmiş Hesperetin mikroçubukları süzme yöntemi ile toplamak için ise, Süzme yöntemi uygulanarak Hesperetin mikroçubukları toplamak için, Agarozla stabilize edilmiş membran 6 mL CHCl_3 ile çözüldü. Şırınga filtresi (Whatman GD/XP Syringe 25mm 0.2 μm) ile süzülerek mikroçubukların toplanması sağlandı.

3.2.4.2 D-Mannitol ile Stabilize Edilmiş Hesperetin Mikroçubuklarını Toplama

D-mannitol ile stabilize edilmiş hesperetin mikroçubukları santrifüj uygulama ile toplamada, santrifüj yoluyla Hesperetin mikroçubukların toplanması amacıyla, lamelden alınan D-mannitol ile stabilize edilmiş membran 2 mL lik eppendorf tübe alınarak çözülmesi sağlandı. Çözücü olarak Kloroform (CHCl_3), benzileter ($\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}$), Kloroform-Benzileter Karışımı (1:3) ve Kloroform+ Toluen Karışımı (1:2) olmak üzere farklı çözücüler kullanıldı. Ve çalkanarak membranın çözünmesi sağlandı.

CHCl_3 ile çözme işlemi uygulanan karışımdan mikroçubukları ayırmak için; 2500 rpm 30 dk 20 °C ,5000 rpm 20 dk 20°C, 10000 rpm 20 dk 20°C ve 5000 rpm 20 dk 10 °C olmak üzere farklı sıcaklık süre ve hız ayarlarıyla uygun santrifüj koşulları araştırıldı.

Diğer çözücüler için 2500 rpm 20 dk 20°C ayarlarıyla her defasında 2mL çözücü kullanılarak üç kez santrifüj uygulandı.

D-mannitol ile stabilize edilmiş hesperetin mikroçubukları süzme yöntemi ile toplamada, süzme yöntemi uygulanarak Hesperetin mikroçubukları toplamak için D-mannitol ile stabilize edilmiş membran 6 mL CHCl_3 ile çözüldü. Şırınga filtresi (Whatman GD/XP Syringe 25mm 0.2 μm) ile filtrasyon uygulanarak mikroçubukların toplanması sağlandı.

3.3 Hesperetin-PVA Nanosüspansiyonundan Template-Assisted Tekniği ile Hesperetin Mikroçubuk Eldesi

Polivinilalkol, PVA, polivinil asetatın kısmen yada tamamen hidroksilasyonu ile elde edilen hidrofilik, lineer bir polimerdir. Biyouyumluluğu toksik ve kanserojen olmaması, biyoyapışkan karakteri ve şişme özelliği nedeniyle biyomalzeme olarak kullanımı yaygındır[191].

3.3.1 Hesperetin-PVA Nanosüspansiyonun İnfiltrasyonu için Optimum Şartların Belirlenmesi

En uygun ve en verimli infiltrasyon koşullarını belirlemek amacıyla %5 Hesperetin- %1 PVA(~200nm) ve %5 Hesperetin- %1 PVA(~400nm) su

nanosüspansiyonundan alınıp infiltrasyon için 0.1 mg/mL ; 0.2 mg/mL ve 0.3 mg/mL olmak üzere farklı konsantrasyonlarda nanosüspansiyonlar hazırlandı.

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan nanosüspansiyonlar sırasıyla programlanabilir pompanın şırıngasına 3 mL olarak konuldu. Ucuna holder (tutucu) takılı şırınga pompaya yerleştirildi. Nanosüspansiyona 2*3mL programı (iki kere 3 er mL nanosüspansiyon şırınga edilmesi) uygulandı.

0.2 mg/mL Hesperetin-PVA (~200nm), 0.2 mg/mL Hesperetin-PVA (~400nm) 0.3 mg/mL Hesperetin-PVA (~200nm) ve 0.3 mg/mL Hesperetin-PVA (~400nm) nanosüspansiyonlar 3*3mL programı (üç kere 3 er mL nanosüspansiyon şırınga edilmesi) ve 4*3mL (dört kere 3 er mL nanosüspansiyon şırınga edilmesi) programı uygulanarak membranlara infiltre edildi.

Uygulanan program dört aşamalı olup ilk adımda 1mL/dk hızla infiltrasyon ikinci adımda 15 dk bekleme, üçüncü adımda 0.1 mL/dk hızla infiltrasyon ve son adımda 10 dk bekleme şeklindedir. İnfiltrate edilmiş membranlar MilliQ suyla nemlendirilmiş mendille temizlendi ve SEM için örnek alındı.

3.3.2 Hesperetin Mikroçubukların Agaroz ve D-Mannitol ile Stabilizasyonu

3.3.2.1 Hesperetin Mikroçubuklarının Agaroz ile Stabilizasyonu

1.5 g Agaroz saf su içerisinde, yaklaşık 80°C de ısıtılıp karıştırılarak % 1.5 (m/V) Agaroz çözeltisi hazırlandı.

% 1.5 (m/V) Agaroz çözeltisi ile Hesperitin partiküllerinin stabilizasyonu için; 0.3 mL %1.5 (m/V) luk Agaroz çözeltisi cam lamel üzerine konuldu. Hesperetin infiltre edilmiş membran, parlak yüzeyi çözeltiye temas edecek şekilde lamelin üzerine yerleştirildi. Kuruması için 1 gün beklendi.

3.3.2.2 Hesperetin Mikroçubuklarının D-Mannitol ile Stabilizasyonu

%20 (m/V) D-mannitol Çözeltisi; 20 g D-mannitol, 0,1 g L-Lösin saf suda, 50-60 °C de karıştırılarak hazırlandı.

%20 (m/V) lik D-mannitol çözeltisi ile Hesperitin mikroçubuklarının stabilizasyonu için 0.3 mL %20 (m/V) lik D-mannitol çözeltisi cam lamel üzerine

konuldu. Hesperetin infiltre edilmiş membran, parlak yüzeyi çözeltiye temas edecek şekilde lamelin üzerine yerleştirildi. Kuruması için bir gün beklendi.

3.3.3 Hesperetin Mikroçubuklarını Toplama

3.3.3.1 Hesperetin-PVA(~200nm)/Agaroz Mikroçubukları Toplama

Santrifüj yoluyla Hesperetin mikroçubukların toplanması amacıyla, lamelden alınan Agaroz ile stabile edilmiş membran 2 mL Kloroform+ Toluen Karışımı (1:2) kullanılarak çözülmesi sağlandı. 2500 rpm 20 dk 20°C ayarlarıyla üç kez santrifüj uygulandı.

3.3.3.2 Hesperetin-PVA(200nm)/D-Mannitol Mikroçubukları Toplama

Santrifüj yoluyla Hesperetin mikroçubukların toplanması amacıyla, lamelden alınan D-mannitol ile stabile edilmiş membran 2 mL Kloroform+ Toluen Karışımı (1:2) kullanılarak çözülmesi sağlandı. 2500 rpm 20 dk 20°C ayarlarıyla üç kez santrifüj uygulandı.

2500 rpm 20 dk. 20°C ayarlarıyla her defasında 2mL çözücü kullanılarak üç kez santrifüj uygulandı.

3.4 Hesperetin-PC(2000) ve Hesperetin-PVA

Nanosüspansiyonlarından Elde Edilen Mikroçubukların

Karakterizasyonu

3.4.1 Hesperetin Mikroçubukların Sayımı

Agaroz ve D-mannitol ile satabilize edilmiş membrandan alınan mikroçubuklar suda dispers edilerek Fusch-Roshental lama konuldu. Mikroskopta 4 tane 16 kare sayma yöntemi ile sayım yapıldı. Alınan ölçümlerin ortalaması alınarak toplam kare sayısı olan 16 ile çarpıldı. Eşitlik 3.5 kullanılarak mikroçubukların sayısı eşitlik 3.3 ile ise verim hesaplandı.

3.4.2 Hesperetin Mikroçubukların Uzunluk ve Çaplarının Belirlenmesi

Agaroz ve D-mannitol ile stabilize edilmiş membrandan alınan mikroçubukların uzunluk ve çapları SEM görüntüleri üzerinde ImageJ-win 64 programı kullanılarak ölçüldü.

3.4.3 Hesperetin Mikroçubukların Farklı Ph lardaki Kararlılığı ve Aktivitesi

Agaroz ile stabilize edilmiş mikroçubuklar 37°C de 20 mL suda dispers edilerek 0.1 mg/mL nanosüspansiyon hazırlandı. NaOH ve HCl ile farklı pH değerlerine ayarlanmak suretiyle UV/VIS spektrofotometreyle aktivitesi belirlendi ve Smoluchowski yöntemi ile Zeta potansiyeli ve mobilite ölçümleri yapıldı. Partikül boyutu ve dispersiteleri belirlendi.

D-mannitol ile stabilize edilmiş mikroçubuklar 37°C de 20 mL suda dispers edilerek 0.1 mg/mL nanosüspansiyon hazırlandı. NaOH ve HCl ile farklı pH değerlerine ayarlanmak suretiyle UV/VIS spektrofotometreyle aktivitesi belirlendi ve Smoluchowski yöntemi ile Zeta potansiyeli ve mobilite ölçümleri yapıldı. Partikül boyutu ve dispersiteleri belirlendi.

3.4.4 Hesperetin Mikroçubuklarının PBS Çözeltisi İçindeki Kararlılığı ve Aktivitesinin Zamana Bağlı Değişimi

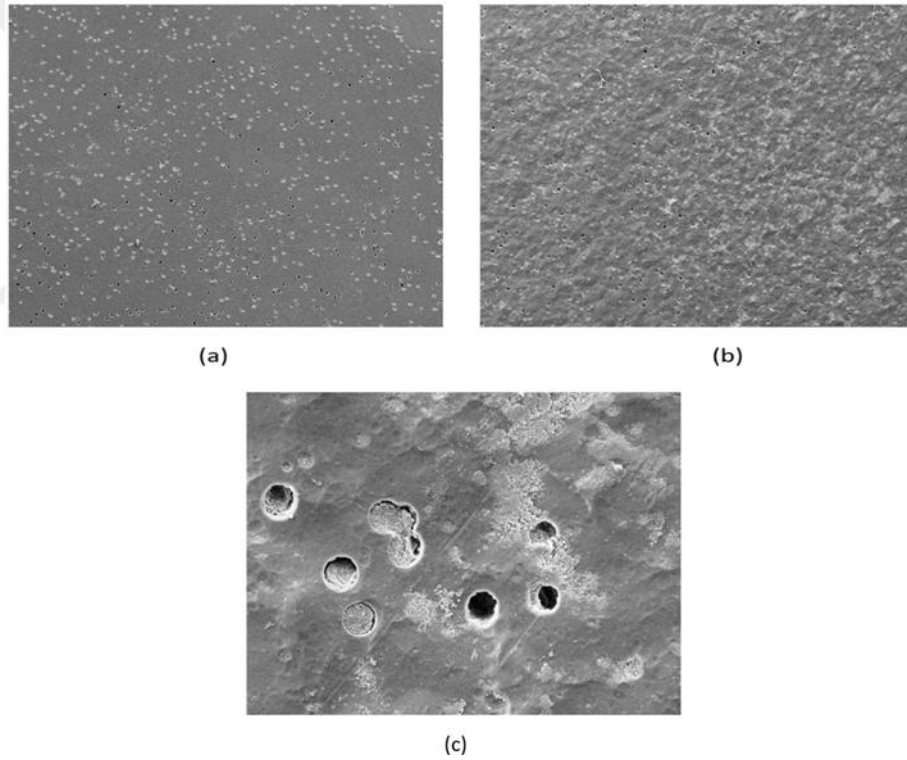
Agaroz ile stabilize edilmiş mikroçubuklar 37 °C deki 20 mL PBS (pH=7,4±0,1) tampon çözeltisi içinde dispers edildi. Sıcaklığı 37 °C de sabit tutarak UV/VIS spektrofotometreyle aktivitesi belirlendi ve Smoluchowski yöntemi ile Zeta potansiyeli ve mobilite ölçümleri yapıldı. Partikül boyutu ve dispersiteleri belirlendi.

D-mannitol ile stabilize edilmiş mikroçubuklar 37 °C deki 20 mL PBS (pH=7,4±0,1) tampon çözeltisi içinde dispers edildi. Sıcaklığı 37 °C de sabit tutarak UV/VIS spektrofotometreyle aktivitesi belirlendi ve Smoluchowski yöntemi ile Zeta potansiyeli ve mobilite ölçümleri yapıldı. Partikül boyutu ve dispersiteleri belirlendi.

4.1 Hesperetin-PC(2000) Nanoüspansiyonundan Template-Assisted Teknik ile Hesperetin Mikroçubuk eldesi

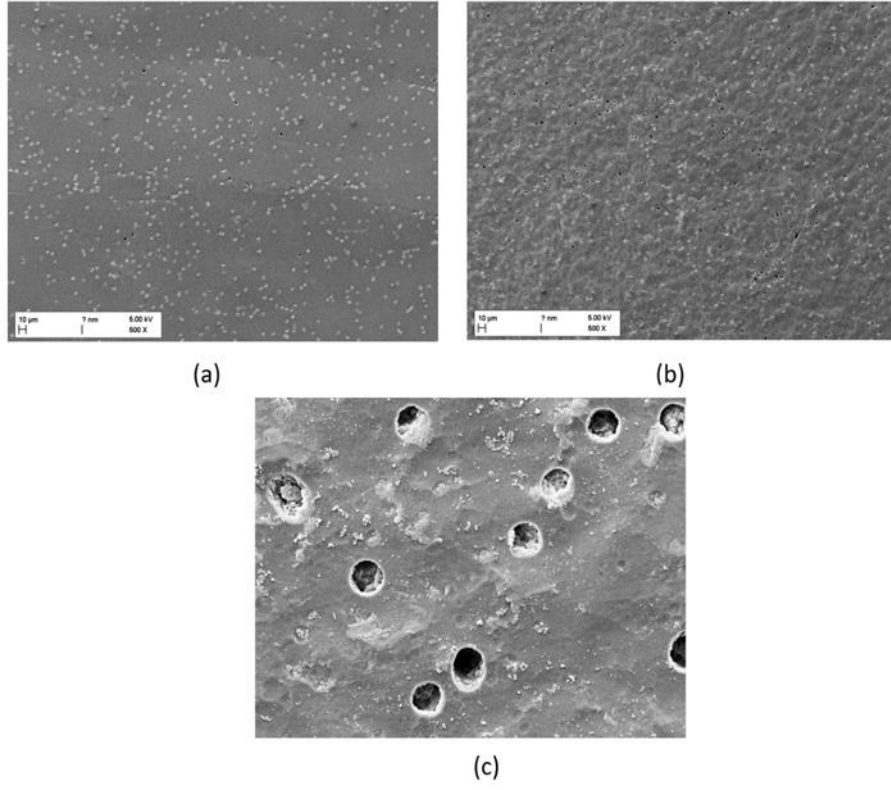
4.1.1 Hesperetin-PC(2000) Nanosüspansiyonunun İnfiltrasyonu için Optimum Konsantrasyonun Belirlenmesi

Farklı konsantrasyonlardaki Hesperetin-PC2000 (~180nm) nanosüspansiyon infiltrate edilmiş membranların SEM görüntüleri Şekil 4.1-5’de verilmiştir.



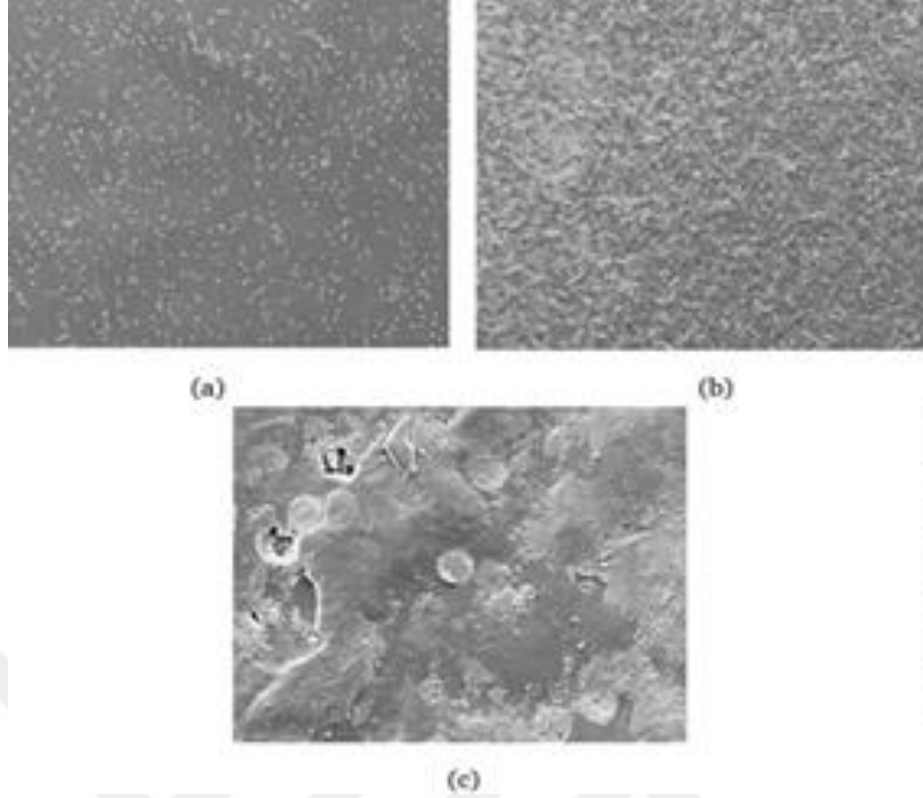
Şekil 4.1 0.01 mg/mL Hesperetin-PC2000(~180nm) nanosüspansiyonu infiltrate edilmiş örneklerin SEM görüntüleri: (a) membranın parlak yüzeyi (b) membranın parlak olmayan yüzeyi (c) dolu ve boş gözeneklerin yakından görünümü

Şekil 4.1’e göre membran gözeneklerinde var olan boşluklar membranın tamamen dolmadığı görülmüştür.



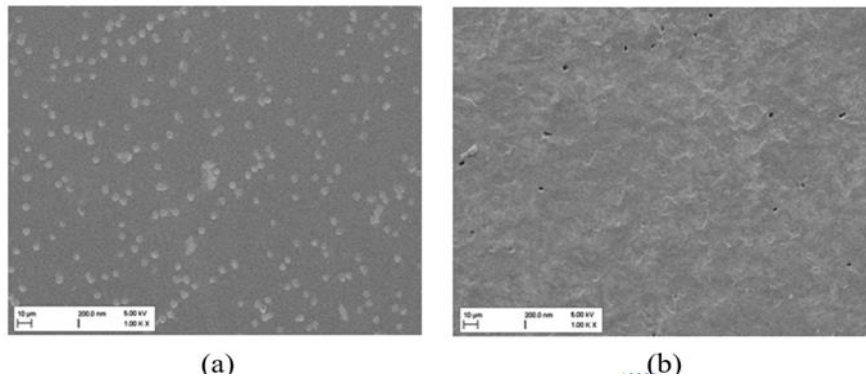
Şekil 4.2 0.05 mg/mL Hesperetin-PC2000(~180nm) nanosüspansiyonu infiltire edilemiş örneklerin SEM görüntüleri (a) membranın parlak yüzeyi (b) membranın parlak olmayan yüzeyi (c) gözeneklerin daha yakından görünümü

Şekil 4.2'ye göre, 0.05 mg/mL Hesperetin-PC2000(~180nm) nanosüspansiyonunun infiltrasyonu sonucu membranın, 0.01 mg/mL Hesperetin-PC2000(~180nm) nanosüspansiyonun infiltrasyonu sonucuna göre daha az sayıda boş gözeneklere sahip olduğu görülmüştür.



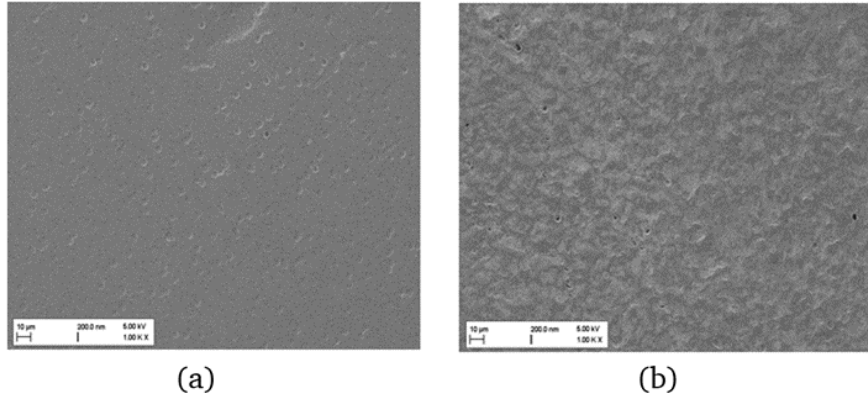
Şekil 4.3 0.1 mg/mL Hesperetin-PC2000($\sim 180\text{nm}$) nanosüspansiyon infiltire edilmiş örneklerin SEM görüntüleri (a) membranın parlak yüzeyi (b) membranın parlak olmayan yüzeyi (c) infiltire edilmiş porlar ve parlak olmayan yüzeye tutunmuş hesperetin-PC 2000 katısı

Şekil 4.3'e göre, 0.1 mg/mL Hesperetin-PC2000($\sim 180\text{nm}$) nanosüspansiyonunun infiltrasyonunda membrandaki gözenekler neredeyse tamamen dolu olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.4 0.2 mg/mL Hesperetin-PC2000($\sim 180\text{nm}$) nanosüspansiyonu infiltire edilmiş örneklerin SEM görüntüleri (a) membranın parlak yüzeyi (b) membranın parlak olmayan yüzeyi

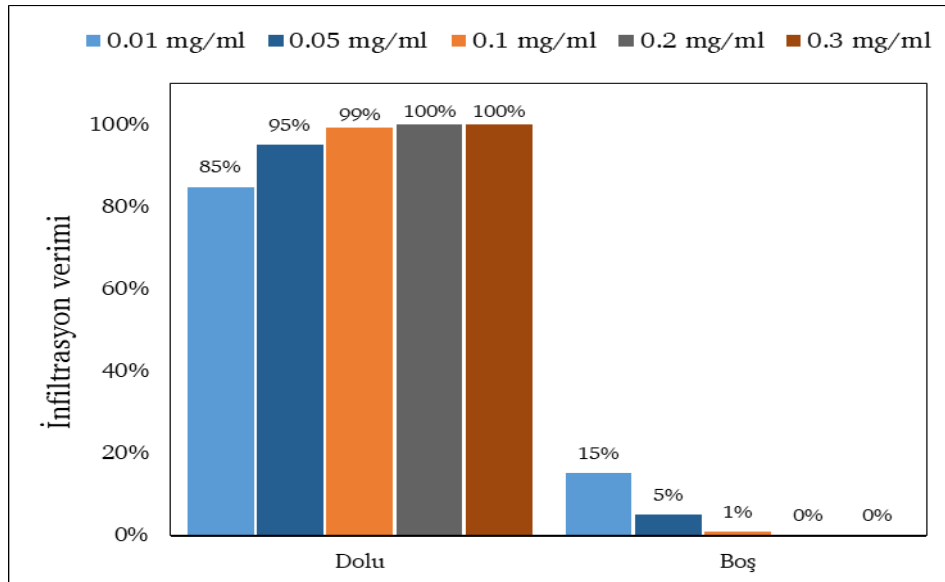
Şekil 4.4'e göre, 0.2 mg/mL Hesperetin-PC2000(~180nm) nanosüspansiyonunun infiltrasyonunda, membrandaki gözenekler neredeyse tamamen doludur.



Şekil 4.5 0.3 mg/mL Hesperetin-PC2000(~180nm) nanosüspansiyonu infiltire edilmiş örneklerin SEM görüntüleri (a) membranın parlak yüzeyi (b) membranın parlak olmayan yüzeyi

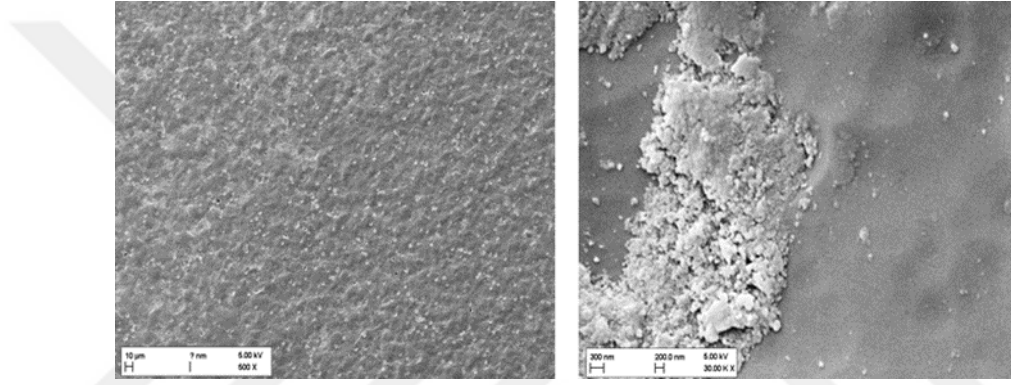
Şekil 4.5'e göre, 0.3 mg/mL Hesperetin-PC2000(~180nm) nanosüspansiyonunun infiltrasyonunda membrandaki gözenekler neredeyse tamamen doludur.

Farklı konsantrasyonlardaki Hesperetin-PC2000(~180nm) nanosüspansiyonu infiltire edilmiş örneklerin infiltrasyon verimi Şekil 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4.6 0.01; 0.05; 0.1; 0.2 ve 0.3 mg/mL Hesperetin-PC 2000(~180nm) nanosüspansiyonlarının infiltrasyon verimi

SEM görüntülerine göre 0.01 mg/mL ve 0.05 mg/mL Hesperetin-PC2000(~180nm) nanosüspansiyonlarının infiltrasyonunda boş gözenekler mevcut olup 0.1 mg/mL, 0.2 mg/mL, 0.3 mg/mL Hesperetin-PC2000(~180nm) nanosüspansiyonlarının infiltrasyonunda gözeneklerin neredeyse tamamı doludur. Ancak membranın parlak olmayan, blok membrana temas eden yüzeyinde Hesperetin nanosüspansiyonlarının fazlasının toplandığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.1-5). Bu durumun tekniğin sonraki aşamalarını olumsuz etkilemesi ihtimaline karşın yüksek infiltrasyon verimine sahip en düşük konsantrasyonla, %99 infiltrasyon verimine sahip olan 0.1 mg/mL Hesperetin-PC2000 (~180nm) nanosüspansiyonu ile çalışmaya devam edilmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.7 Hesperetin-PC2000 (~180nm) infiltre edilmiş membranın yüzeyinin SEM görüntüsü

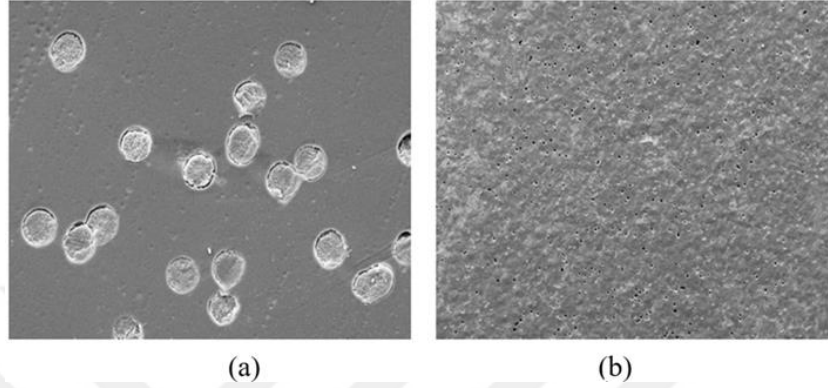
Şekil 4.7'e göre, infiltre edilmiş membranın parlak olmayan yüzeylerinde fazla gelen Hesperetin-Plantacare2000(~180nm) in toplandığı görülmüştür. Bu durumun stabilizasyon aşamasını olumsuz etkilememesi için membranlara çeşitli temizleme yöntemleri uygulanmıştır.

4.1.2 0.1 mg/mL Hesperetin-Plantacare 2000 (~180nm) Nanosüspansiyonunun İnfiltrasyonu Sonrası Membranlardaki Safsızlıkların Giderilmesi İçin Uygulanan Yöntemlerden Elde Edilen Membranların Karakterizasyonu

En uygun konsantrasyon olarak belirlenen 0.1 mg/mL Hesperetin-PC 2000 (~180nm) nanosüspansiyonu, infiltre edildikten sonra membranların temizlenmesi için uygulanan yöntemlerden elde edilen örneklerin SEM karakterizasyonları yapılmıştır.

4.1.2.1 Suya Batırarak Yıkama Tekniği Uygulanarak Temizlenen Membranların SEM Görüntüleri

Her 0.1 mg/mL Hesperetin-PC 2000(~180nm) nanosüspansiyonunun infiltrasyondan sonra dört kez Milli-Q saf su ile yıkanan membranların SEM görüntüleri Şekil 4.8’de verilmiştir.

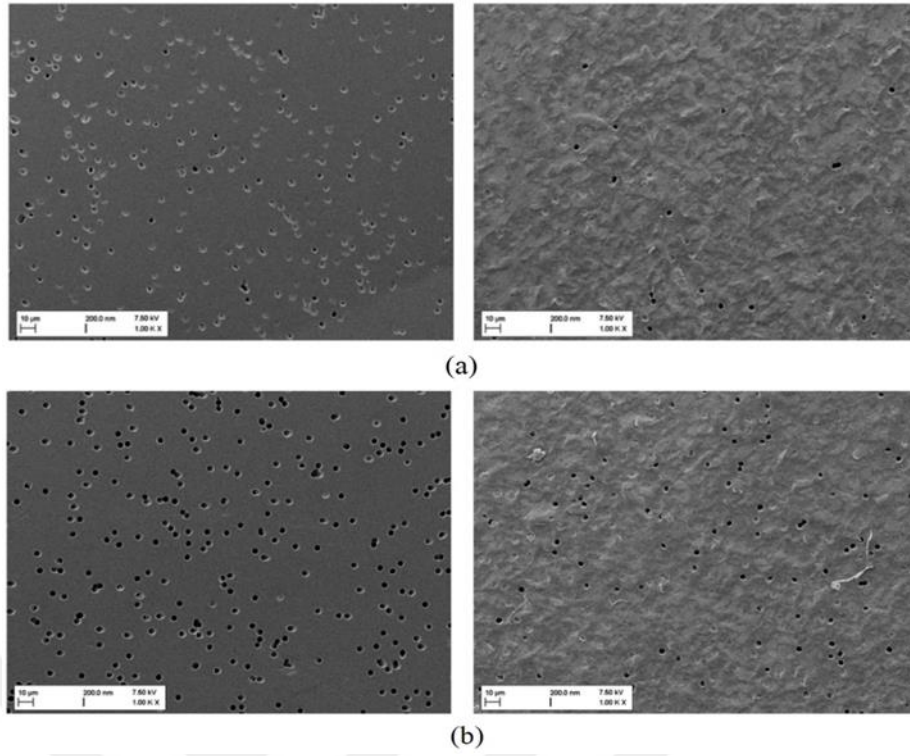


Şekil 4.8 Yıkama tekniği ile temizlenmiş membranın a) parlak yüzeyinin b) parlak olmayan yüzeyinin SEM görüntüleri

Şekil 4.8 b’de membranın parlak olmayan yüzeyinde var olan safsızlıklar nedeniyle bu tekniğin temizleme için tek başına yeterli olmadığına karar verilmiştir. Ancak diğer yöntemlere ek ön temizlik işlemi olarak uygulanmıştır.

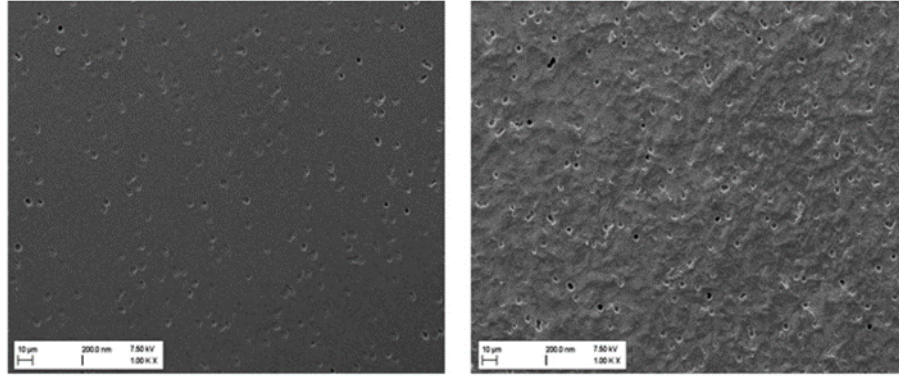
4.1.2.2 İnfiltrasyonun Farklı Sayı ve Sürede Yapılması Sonucu Elde Edilen Membranların SEM Görüntüleri

0.1 mg/mL konsantrasyonlu Hesperetin-PC 2000(~180nm) nanosüspansiyonunu içeren membranların sabit hızda üç farklı programla infiltrasyonu sonucu elde edilen membranların SEM görüntüleri Şekil 4.9-11’de sırası ile verilmiştir.

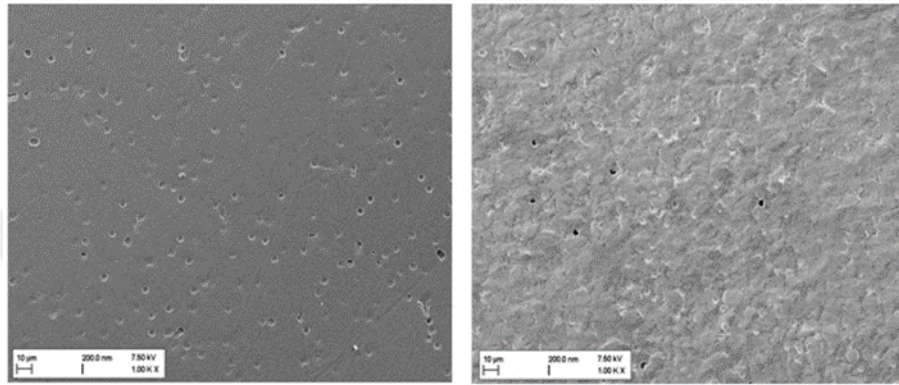


Şekil 4.9 0.1 mL/dk hızla 1*3mL programı ile infiltre edilmiş ve (a) MilliQ su ile nemlendirilmiş mendille temizlenmiş (b) MilliQ su ile yıkanmış ve mendille silinmiş membranların SEM görüntüsü

Şekil 4.9'a göre 0.1mL/dk hızla 1*3mL programı ile infiltrasyon uygulandıktan sonra sadece mendille silinen membranın yüzeyinin kirli, dolu gözeneklerinin sayısında da azalma olduğu; yıkama işlemi uygulanmış membranın ise hem kirli hemde dolu gözeneklerindeki azalmanın daha fazla olduğu belirlenmiştir.



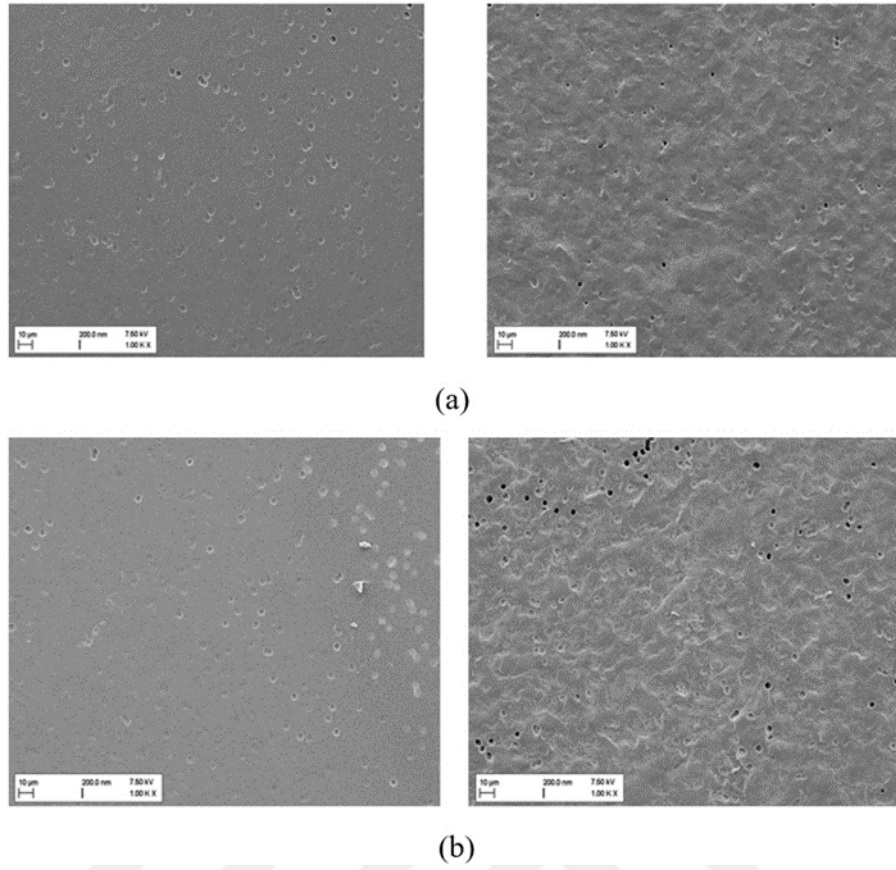
(a)



(b)

Şekil 4.10 1*6mL 0.1 mL/dk programla infiltre edilmiş ve (a) MilliQ su ile nemlendirilmiş mendille temizlenmiş (b) yıkama tekniği uygulanmış membranın SEM görüntüsü

Şekil 4.10'a göre 0.1 mL/dk hızla 1*6 mL programı ile infiltrasyon uygulandıktan sonra sadece mendille silinen membranın yüzeyinin kirli, dolu gözeneklerinin sayısında da azalma olduğu; yıkama işlemi uygulanmış membranın ise hem kirli, hem de dolu gözeneklerindeki azalmanın daha fazla olduğu belirlenmiştir.



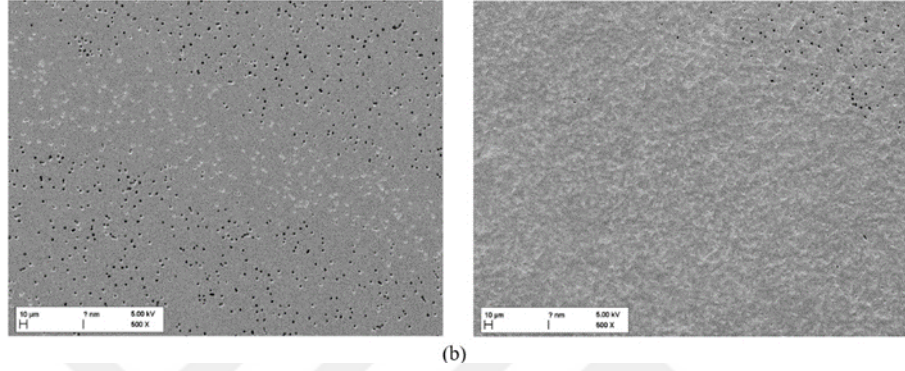
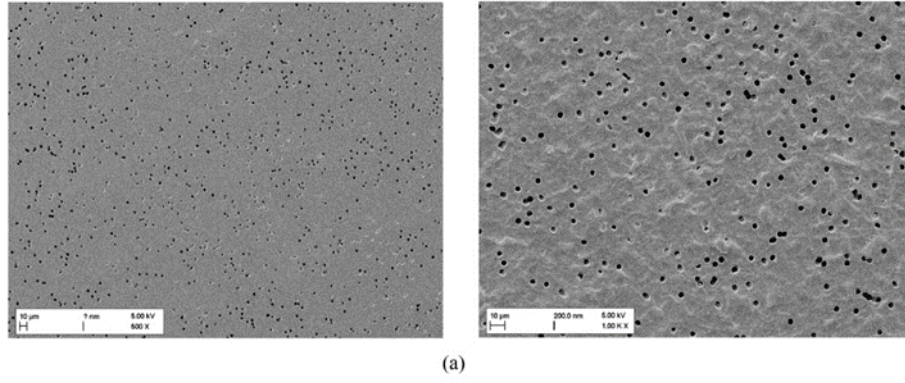
Şekil 4.11 2*3mL 0.1 mL/dk programla infiltre edilmiş ve (a) MilliQ su ile nemlendirilmiş mendille temizlenmiş (b) yıkama tekniği uygulanmış membranın SEM görüntüsü

Şekil 4.11'e göre 0.1 mL/dk hızla 2*3mL programı ile infiltrasyon uygulandıktan sonra sadece mendille silinen membranın yüzeyinin kirli, dolu gözeneklerinin sayısında da azalma olduğu; yıkama işlemi uygulanmış membranın ise hem kirli hem de dolu gözeneklerindeki azalmanın daha fazla olduğu belirlenmiştir.

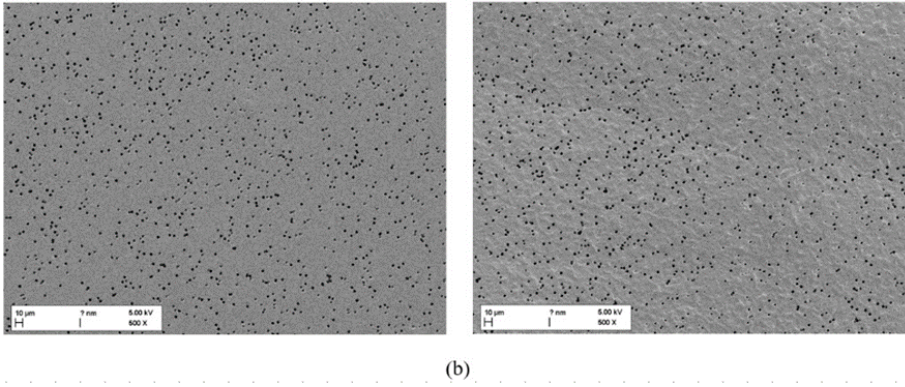
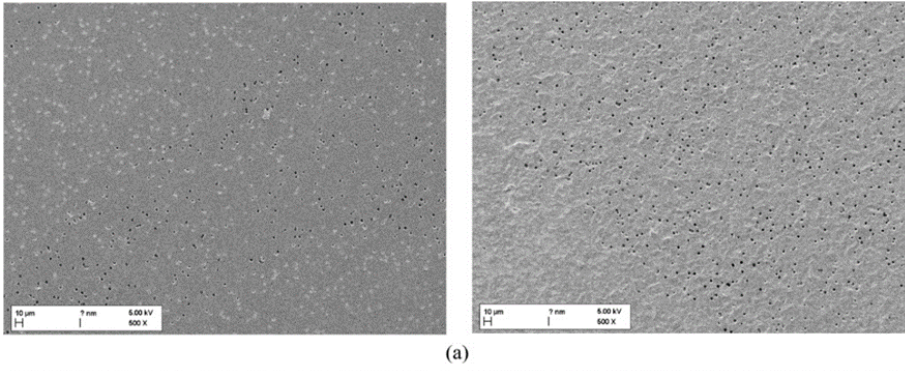
Sonuç olarak infiltrasyon hızının veya sayısının azaltılmasının membranın temizliğinde etkili olmadığı ve dolu gözeneklerin sayısı azalarak infiltrasyon veriminin düşürdüğü belirlenmiştir.

4.1.2.3 Farklı Sıcaklıklardaki MilliQ Su ile Temizlenen Membranların SEM Görüntüleri

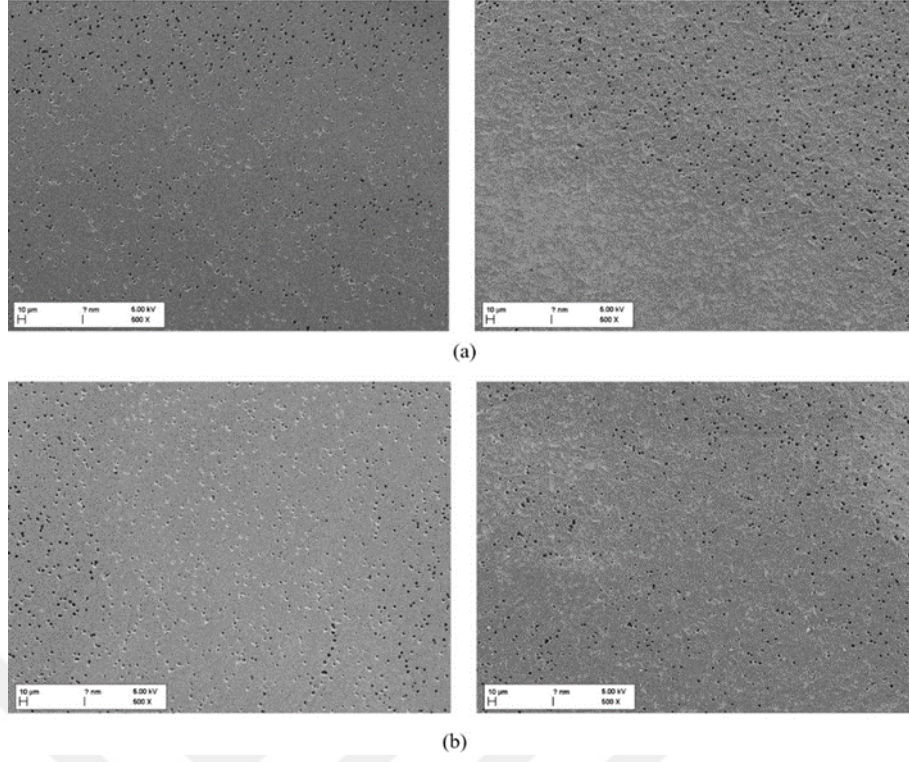
Farklı sıcaklıklardaki MilliQ su ile temizlenen membranların SEM görüntüleri Şekil 4.12-16' da verilmiştir.



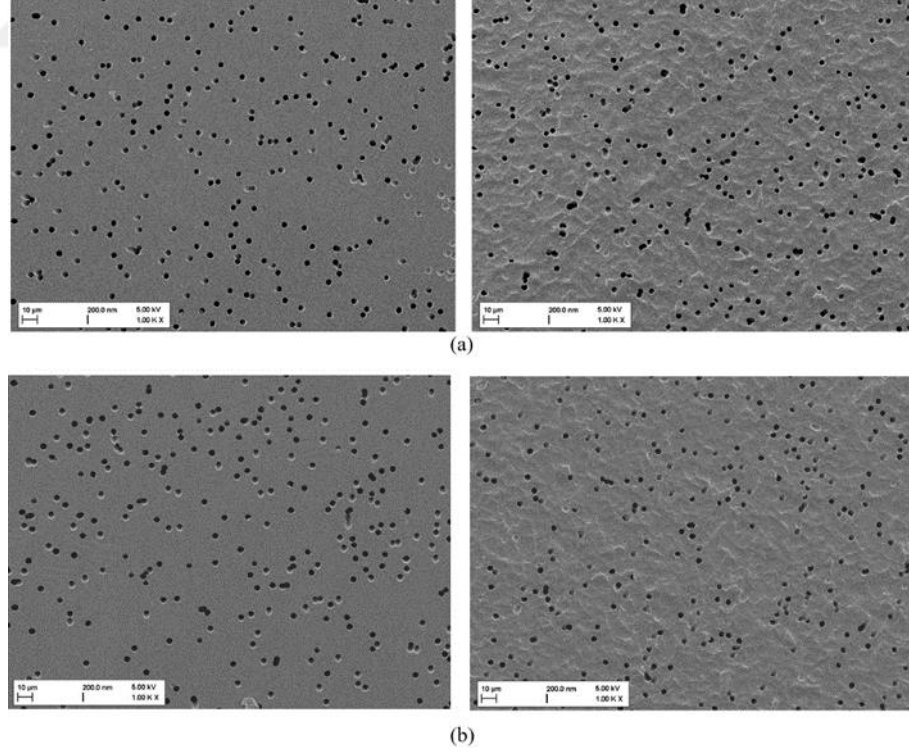
Şekil 4.12 37.5 °C de MilliQ su kullanılarak (a) nemlendirilmiş mendille temizlenmiş (b) yıkama tekniği uygulanmış membranın SEM görüntüsü



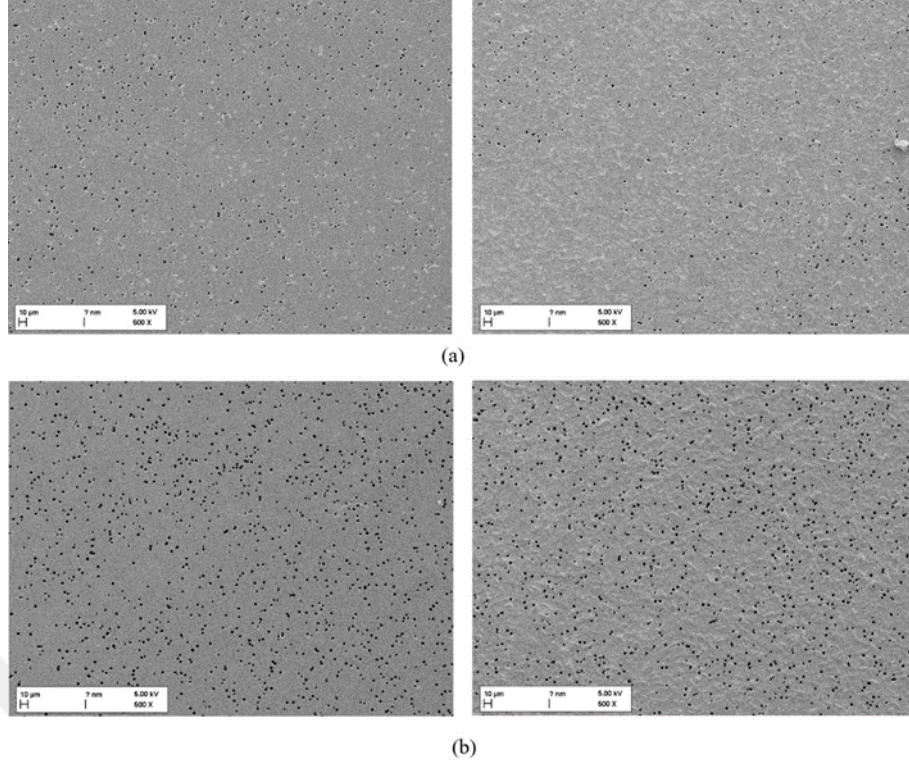
Şekil 4.13 47.5 °C de MilliQ su kullanılarak (a) nemlendirilmiş mendille temizlenmiş (b) yıkama tekniği uygulanmış membranın SEM görüntüsü



Şekil 4.14 57.5 °C de MilliQ su kullanılarak (a) nemlendirilmiş mendille temizlenmiş (b) yıkama tekniği uygulanmış membranın SEM görüntüsü



Şekil 4.15 67.5 °C de MilliQ su kullanılarak (a) nemlendirilmiş mendille temizlenmiş (b) yıkama tekniği uygulanmış membranın SEM görüntüsü



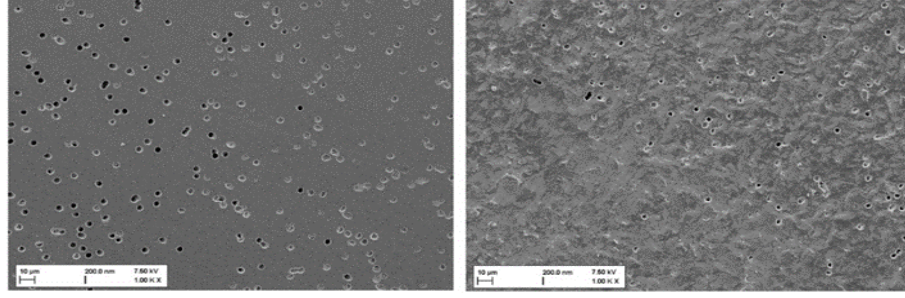
Şekil 4.16 77.5 °C de MilliQ su kullanılarak (a) nemlendirilmiş mendille temizlenmiş (b) yıkama tekniği uygulanmış membranın SEM görüntüsü

SEM görüntülerine göre, genel olarak çalışılan tüm sıcaklıklarda nemlendirilmiş mendil ile temizlenmiş membranların, parlak olmayan yüzeylerinde gözlenen yer yer safsızlıklardan dolayı, sıcaklık değişimi, membranın temizliğinde başarılı olamadığı gibi, dolu gözenek sayısının azalmasına neden olduğu tespit edilmiştir. Genel olarak yıkama işlemi uygulanmış membranlarda ise, boş gözenek sayısının arttığı ve daha çok madde kaybı olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.12-16).

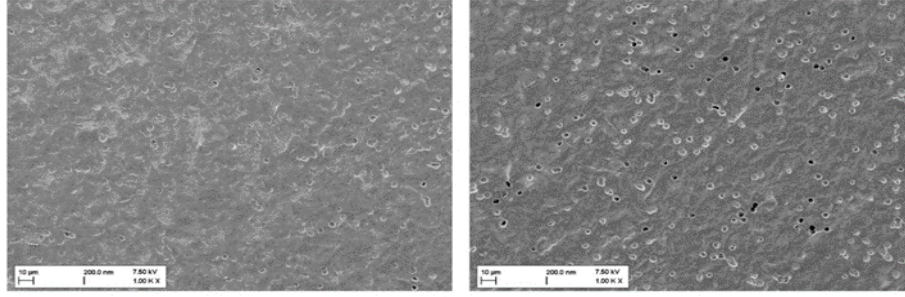
Ayrıca 67,5 °C ve 77,5 °C deki MilliQ su ile temizleme sırasında polikarbonat yapıdaki membranın deforme olduğu, silinirken sündüğü gözlemlenmiştir.

4.1.2.4 Farklı Konsantrasyonlardaki Çeşitli Çözeltiler ile Temizlenen Membranların SEM Görüntüleri

Membranları temizlemek için MilliQ su yerine: 0.01M, 0.1M, 1M HCl ;0.01M, 0.1M, 1M NaOH ; Metanol ve Aseton kullanılmış membranların SEM görüntüleri Şekil 4.17-25'te verilmiştir.



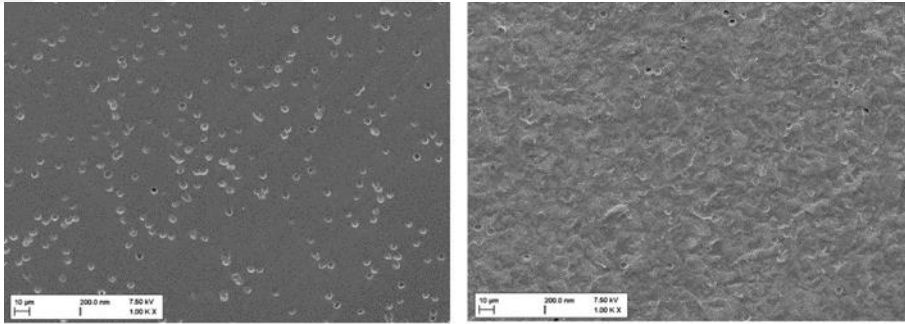
(a)



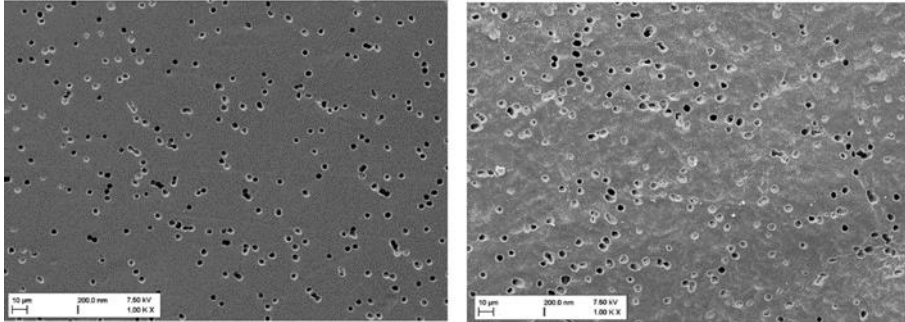
(b)

Şekil 4.17 0.001M HCl ile (a) nemlendirilmiş mendille temizlenmiş (b) yıkama tekniği uygulanmış membranın SEM görüntüsü

0.001M HCl ile temizlenmiş membranlarda yüzeyin temizlenmediği ve dolu gözenek sayısının azaldığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.17).



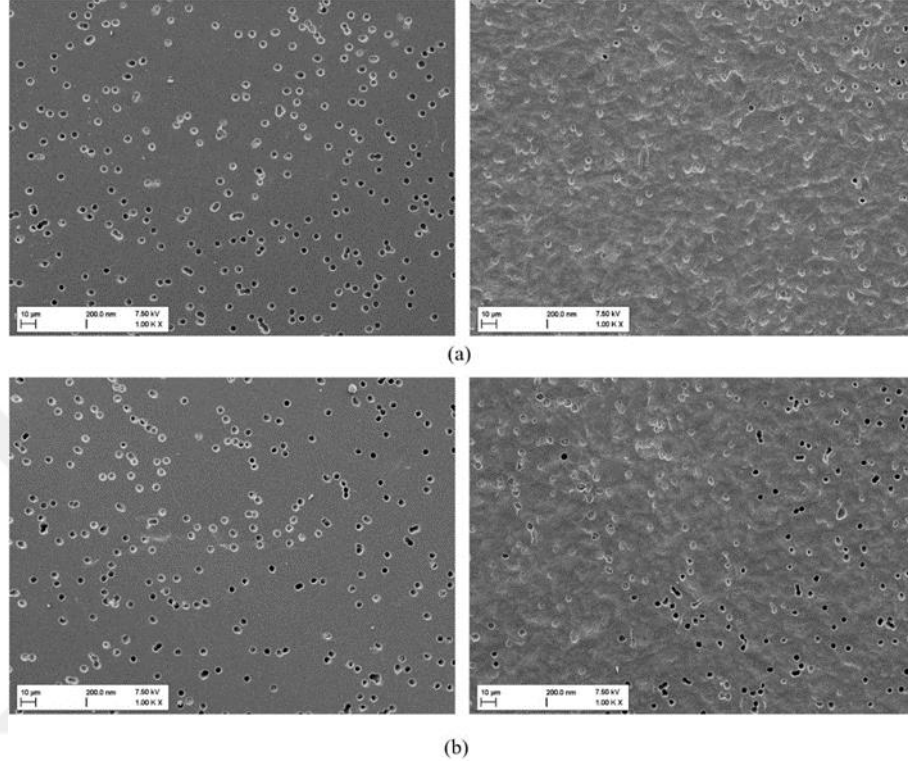
(a)



(b)

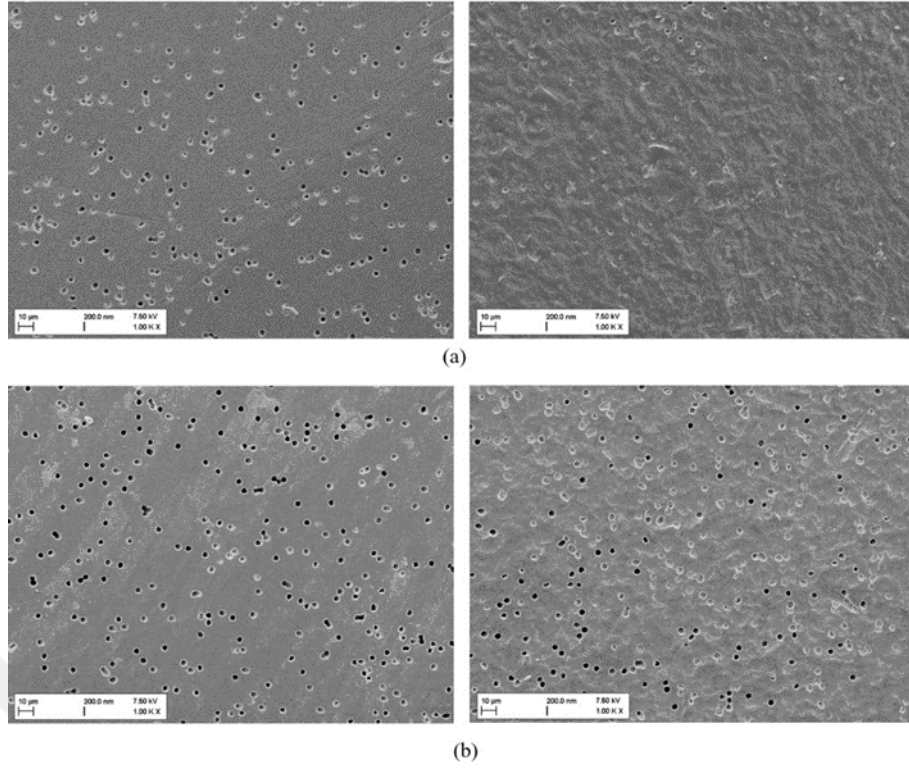
Şekil 4.18 0.01M HCl ile (a) nemlendirilmiş mendille temizlenmiş (b) yıkama tekniği uygulanmış membranın SEM görüntüsü

0.01M HCl ile nemlendirilmiş mendille temizlenmiş membranda yüzeyin temizlenmediği ve dolu gözenek sayısının azaldığı; yıkama işlemi uygulanan membranda ise gözeneklerin neredeyse tamamının boş olduğu görülmüştür (Şekil 4.18).



Şekil 4.19 0.1M HCl ile (a) nemlendirilmiş mendille temizlenmiş (b) yıkama tekniği uygulanmış membranın SEM görüntüsü

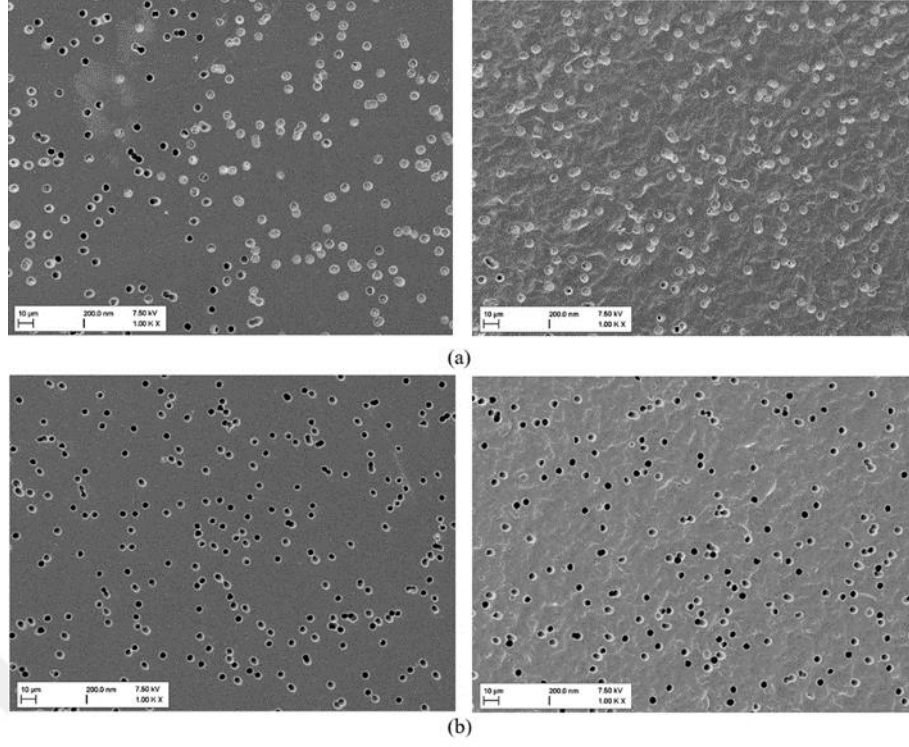
0.1M HCl ile nemlendirilmiş mendille silinen membranlarda yüzeyin tam olarak temizlenmediği ve dolu gözenek sayısında anlamlı bir düşüş olduğu; yıkama işlemi uygulanan membranda ise nispeten temizlenme olduğu ancak gözeneklerin büyük çoğunluğunun boş olduğu görülmüştür (Şekil 4.19).



Şekil 4.20 1M HCl ile (a) nemlendirilmiş mendille temizlenmiş (b) yıkama tekniği uygulanmış membranın SEM görüntüsü

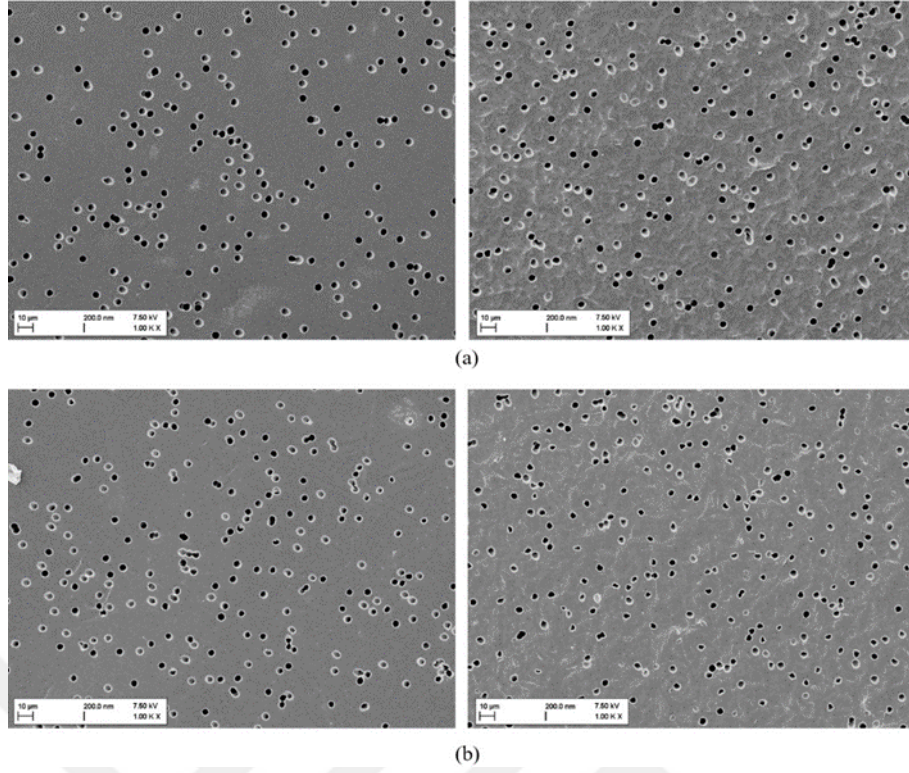
1M HCl ile nemlendirilmiş mendille silinen membranlarda yüzeyin temizlenmediği ve dolu gözenek sayısında anlamlı bir düşüş olduğu; yıkama işlemi uygulanan membranda ise nispeten gözeneklerin görülebileceği kadar temizlendiği ancak gözeneklerin büyük çoğunluğunun boş olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak HCl ile temizleme yöntemi infiltrasyonu olumsuz etkilemiş, gözeneklerin boşalmasına neden olarak dolu gözeneklerin sayısını dolayısıyla infiltrasyon verimini oldukça düşürdüğü tespit edilmiştir.



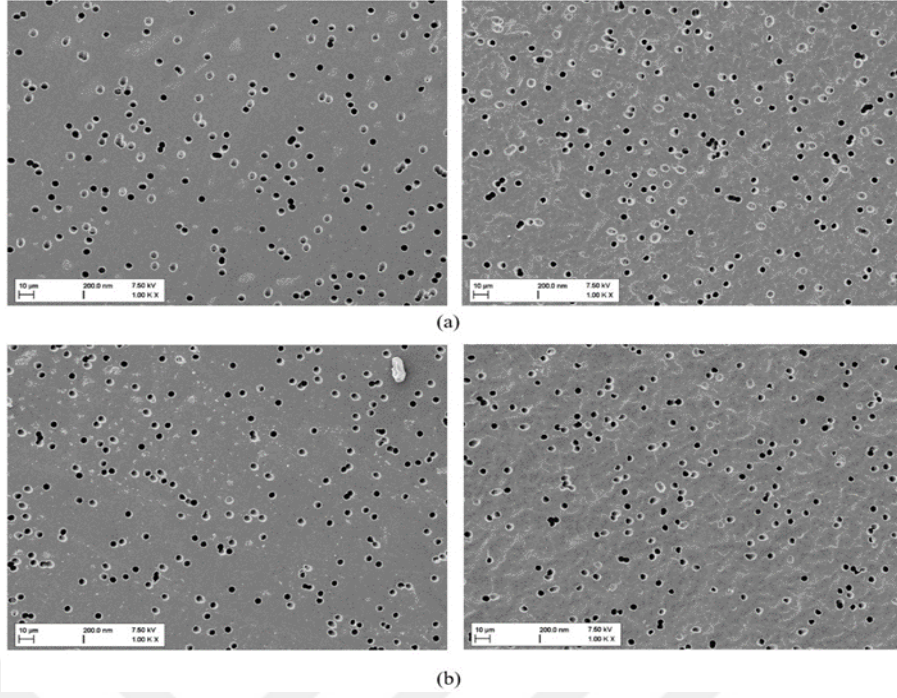
Şekil 4.21 0.01M NaOH ile (a) nemlendirilmiş mendille temizlenmiş (b) yıkama tekniği uygulanmış membranın SEM görüntüsü

0.01M NaOH ile temizlenmiş membranlarda nemli mendille temizlenmiş membranın parlak olmayan yüzeyinin nispeten temizlendiği ancak dolu gözenek sayısının bir miktar azaldığı belirlenmiştir. Yıkanmış membranlarda ise gözeneklerin neredeyse tamamının boş olduğu gözlemlenmiştir. Bu durumda 0.01M NaOH ile nemlendirilmiş mendille mekanik temizleme uygun bir yöntem olarak kabul edilebilir bulunmuştur (Şekil 4.21).



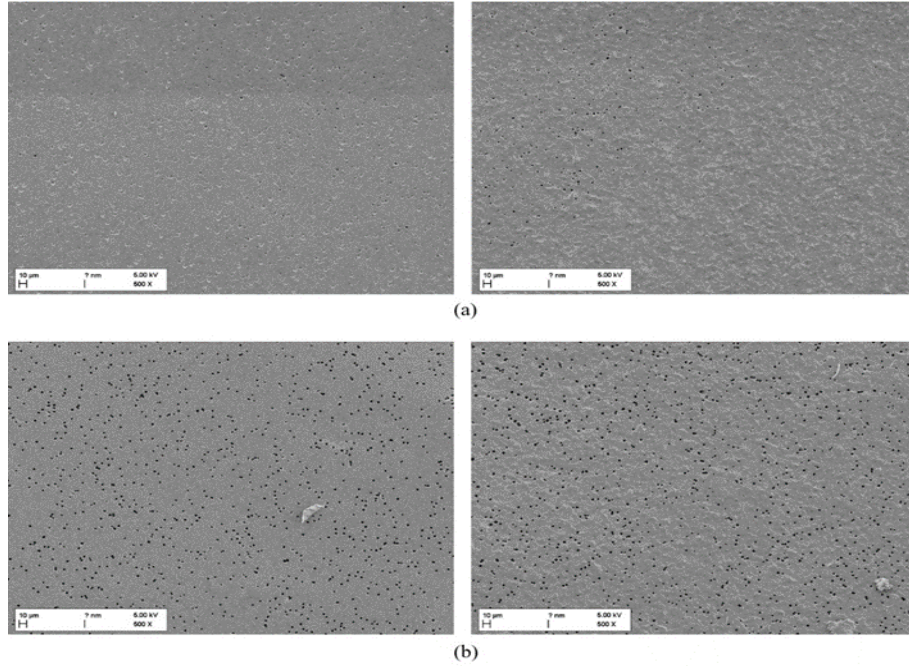
Şekil 4.22 0.1M NaOH ile (a) nemlendirilmiş mendille temizlenmiş (b) yıkama tekniği uygulanmış membranın SEM görüntüsü

0,1M NaOH ile temizlenmiş membranlarda membranın parlak olmayan yüzeyinin nispeten temizlendiği ancak gözeneklerinin neredeyse tamamının boş olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.22).



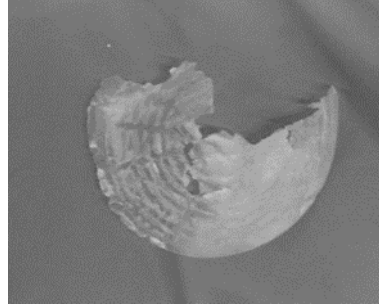
Şekil 4.23 1M NaOH ile (a) nemlendirilmiş mendille temizlenmiş (b) yıkama tekniği uygulanmış membranın SEM görüntüsü

1M NaOH ile temizlenmiş membranlarda membranın parlak olmayan yüzeyinin nispeten temizlendiği ancak dolu gözeneklerinin neredeyse tamamının boş olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.23).



Şekil 4.24 Metanol ile (a) nemlendirilmiş mendille temizlenmiş (b) yıkama tekniği uygulanmış membranın SEM görüntüsü

Metanol ile nemlendirilmiş mendille temizlenen membranlarda yüzey temizliğinin tam olarak sağlanmadığı ayrıca dolu gözenek sayısının azaldığı, metanol ile yıkanmış membranlarda ise gözeneklerin boş olduğu saptanmıştır (Şekil 4.24).

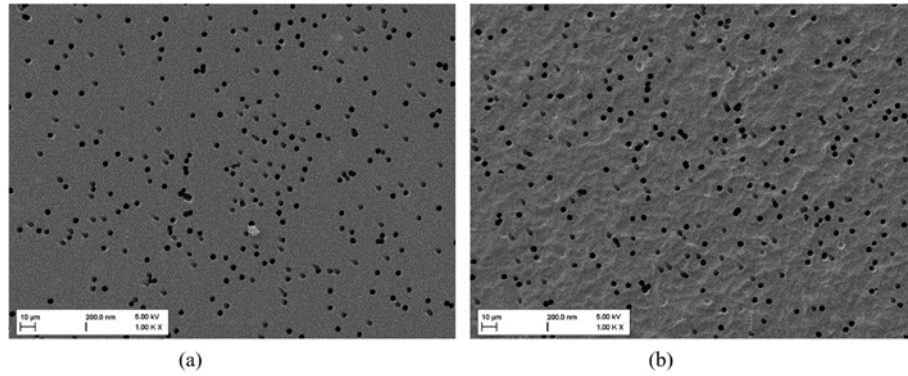


Şekil 4.25 Asetona maruz kalan membranın görüntüsü

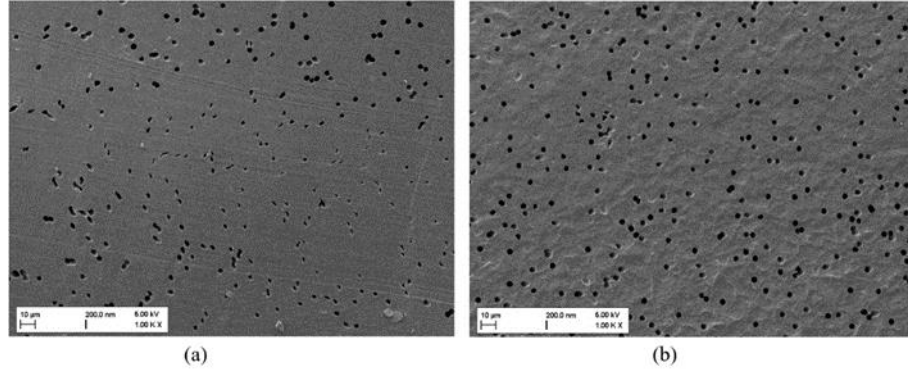
Temizleme amacıyla aseton müdahalesinin polikarbonat membranı parçaladığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.25).

4.1.2.5 Farklı Gözenek Boyutlarına Sahip Blok Membran Kullanımı Sonucu Membranların SEM Görüntüleri

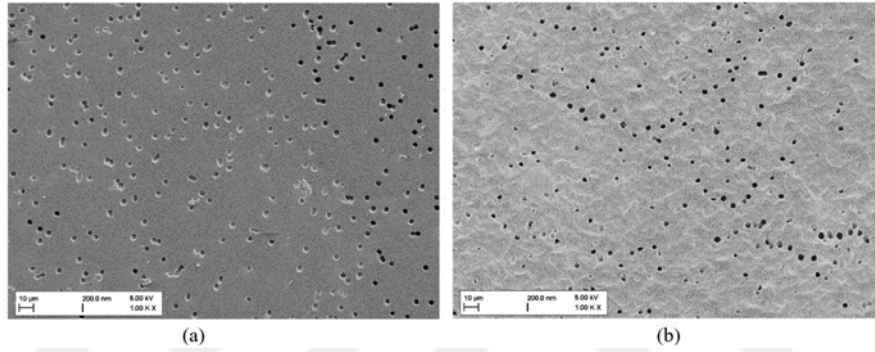
Farklı gözenek boyutlarına sahip blok membran kullanımı sonucu membranların SEM görüntüleri Şekil 4.26-28 'da verilmiştir.



Şekil 4.26 0.5 μm lik blok membran kullanılarak infiltre edilmiş membranın a) parlak yüzeyinin b) parlak olmayan yüzeyinin SEM görüntüsü



Şekil 4.27 0.6 μm lik blok membran kullanılarak infiltre edilmiş membranın a) parlak yüzeyinin b)parlak olmayan yüzeyinin SEM görüntüsü

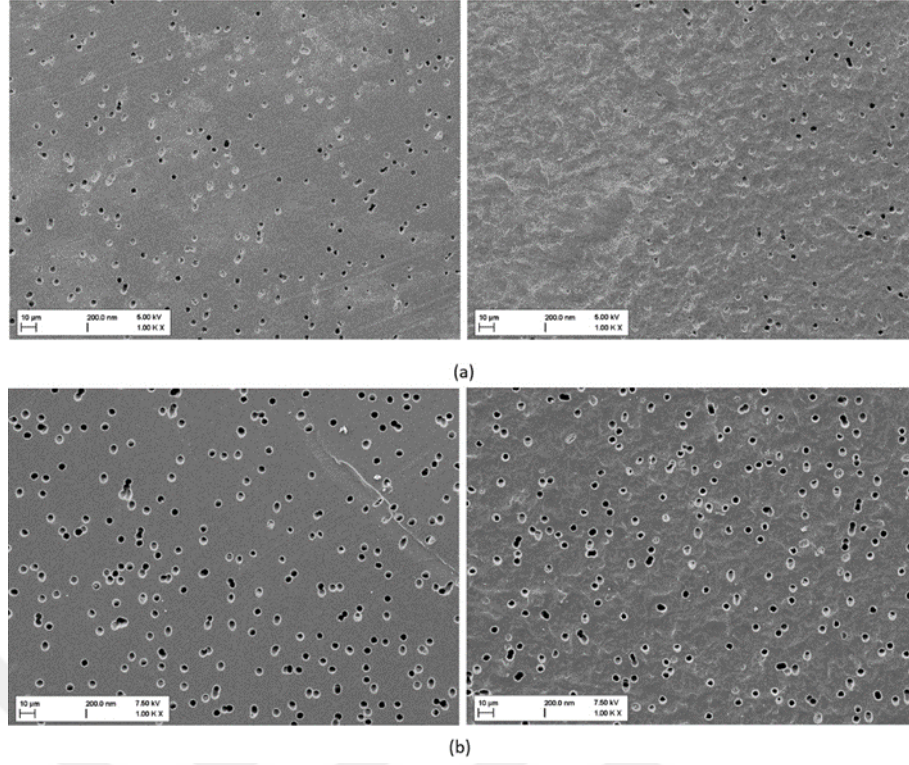


Şekil 4.28 1 μm lik blok membran kullanılarak infiltre edilmiş membranın a) parlak yüzeyinin b)parlak olmayan yüzeyinin SEM görüntüsü

0,5 μm , 0,6 μm ve 1,0 μm lik blok membranların kullanılmasıyla membranlardaki gözeneklerin dolmadığı saptanmıştır. İnfiltrasyon sırasında nanosüspansiyonunun membranlardan geçerek atık haline geldiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.26-28).

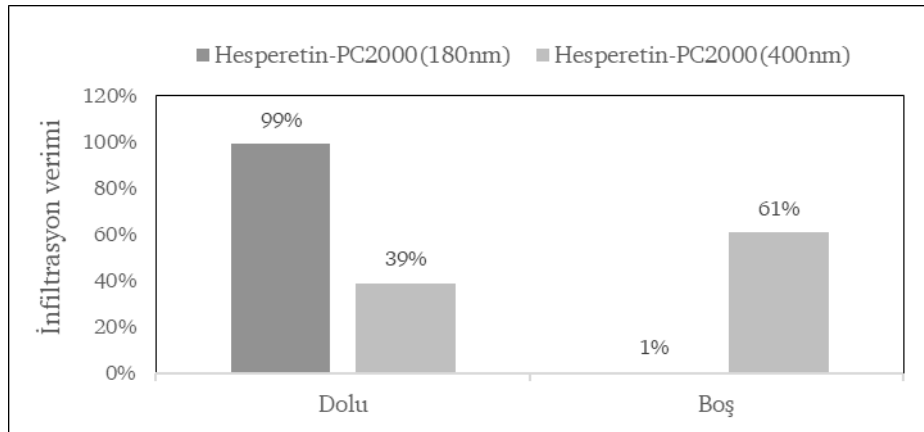
4.1.2.6 Farklı Boyutta Nanopartikül İçeren Başlangıç Nanosüspansiyonu ile Çalışma Sonucu Membranın SEM Görüntüsü

0.1 mg/mL Hesperetin-PC2000($\sim 400\text{nm}$) nanosüspansiyonu infiltre edilip Milli-Q su ile nemlendirilmiş mendille mekanik temizlenen membranın ve Milli-Q su ile yıkanan membranın SEM görüntüleri Şekil 4.29'da verilmiştir.



Şekil 4.29 %5 lik Hesperetin-PC2000(~400nm) sulu nanosüspansiyonu infiltre edilip (a) MilliQ suyla nemlendirilmiş mendille mekanik temizlenen (b) su ile yıkanan membranın SEM görüntüleri

%5 lik Hesperetin-PC2000(~180nm) ve Hesperetin-PC2000(~400nm) sulu nanosüspansiyonu infiltre edilip MilliQ su ile nemlendirilmiş mendil ile mekanik temizlenen membranların infiltrasyon verimlilikleri Şekil 4.30 'da verilmiştir.



Şekil 4.30 0.1 mg/mL Hesperetin-PC2000(~180nm) ve Hesperetin-PC2000(~400nm) nanosüspansiyonlarının Milli-Q suyla nemlendirilmiş mendil ile temizlenmiş membranların infiltrasyon verimliliği

0.1 mg/mL Hesperetin-PC2000(~400nm) ile infiltre edilip mendille temizlenen membranın parlak olmayan yüzeyinin nanopartikül kaplı olduğu (Şekil 32) ve gözeneklerinin doluluk oranının 0.1 mg/mL lik Hesperetin-PC2000(~180nm) e göre oldukça düşük olduğu belirlenmiştir. 0.1 mg/mL lik Hesperetin-PC2000(~400nm) ile infiltre edilip membrana yıkama işlemi uygulandığında ise gözeneklerin neredeyse tamamının boş olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.30).

Partikül boyutunun artması, partiküllerarası boşluğu arttırdığından temas yüzeyini küçülterek taneciklerin etkileşiminin azalmasına, dolayısıyla bu taneciklerin birbirlerine tutunup gözenekler içinde yerleşmesine engel olduğu düşünülmüştür. Bu nedenle daha küçük partikül boyutlu olan Hesperetin-Plantacare2000(~180nm) ile çalışmaya devam edilmiştir.

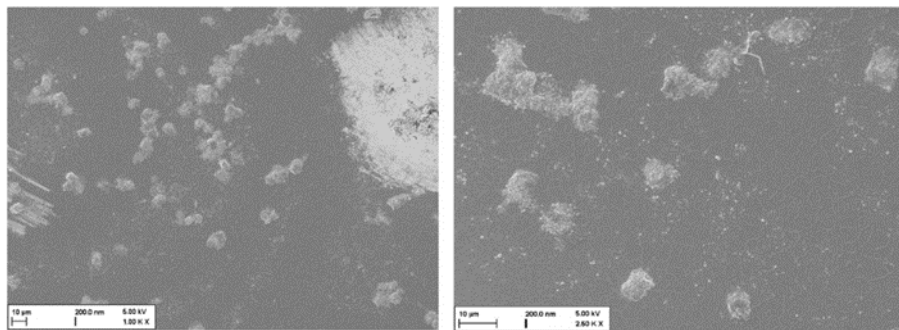
Uygulanan temizleme yöntemleri içinde madde kaybı ve temiz yüzey göz önünde bulundurularak, 0.01M NaOH ile nemlendirilmiş mendille temizleme yapılmasına karar verilmiştir.

Sonuç olarak, 0.1 mg/mL Hesperetin-PC2000(~180nm) nanosüspansiyonu infiltre edilip, 0.01 M NaOH nemlendirilmiş mendille temizlenmiş membranların, çeşitli doğal polimerler ile stabilizasyonun yapılarak çalışmaya devam edilmiştir.

4.1.3 Hesperetin Mikroçubukları Toplama

4.1.3.1 Hesperetin-PC2000(~180nm)/Agaroz Mikroçubukları Toplama

Hesperetin-PC2000(~180nm)/Agaroz mikroçubukları pva(4-88) membran kullanarak sıyırma yöntemi ile toplama için Agaroz ile stabilize edilmiş membranın PVA(4-88)'e aktarılması ve Milli-Q suda çözülerek ayrılması yoluyla elde edilen örneklerin SEM görüntüsü alınmıştır (Şekil 4.31).



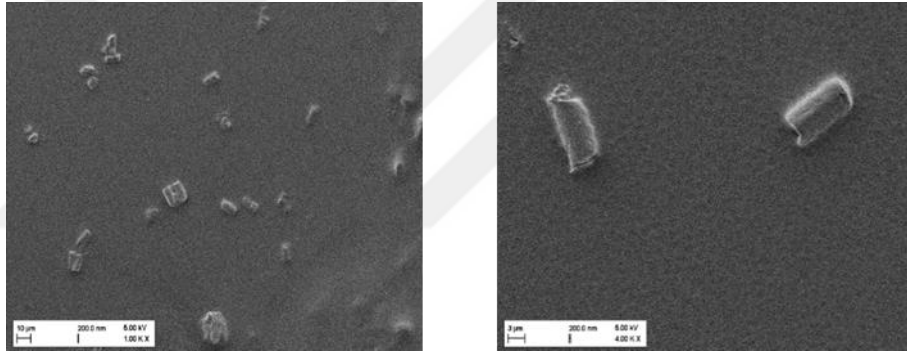
Şekil 4.31 PVA (4-88) membrana aktarılma yoluyla alınan örneklerin görüntüsü

SEM görüntülerinde, uygulanan bu yöntemin mikroçubukların zarar görmesine ve silindirik yapının kaybolmasına neden olduğu görülmüştür(Şekil 4.31).

Hesperetin-PC2000(~180nm)/Agaroz Mikroçubukları Santrifüj Ve Süzme Yöntemi Uygulama İle Toplamada, Hesperetin-PC2000(~180nm)/Agaroz mikroçubukların santrifüj yoluyla toplanması için çeşitli çözücüler denenmiştir.

Çözücü olarak sadece Kloroform (CHCl_3) kullanıldığında santrifüj işleminde mikrorodların çökmediği gözlemlendi. Bu nedenle 2500 rpm 30 dk 20°C ,5000 rpm 20 dk 20°C , 10000 rpm 20 dk 20°C ve 5000 rpm 20 dk 10°C olmak üzere farklı hız, süre ve sıcaklık ayarları denenmiştir.

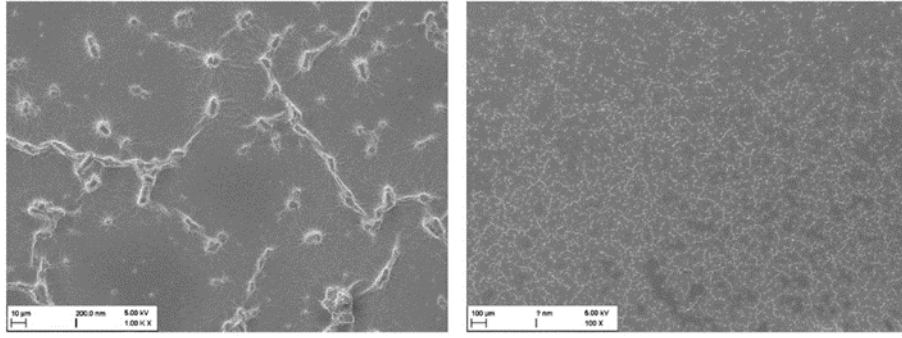
10000rpm 20 dak 20°C ayarlarıyla yapılan santrifüj sonrası çökelti gözlemlenmiş, 3 kere uygulanan santrifüj sonrası elde edilen örneklerin SEM görüntüleri alınmıştır (Şekil 4.32).



Şekil 4.32 10000 rpm 20 dk 20°C ayarlarıyla CHCl_3 kullanılarak elde edilmiş mikroçubukların SEM görüntüleri

Çözücü olarak kloroform kullanıldığında santrifüj işleminde çökme olmamasının kloroformun özkütlesinin Hesperetinin özkütlesinden büyük olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür.

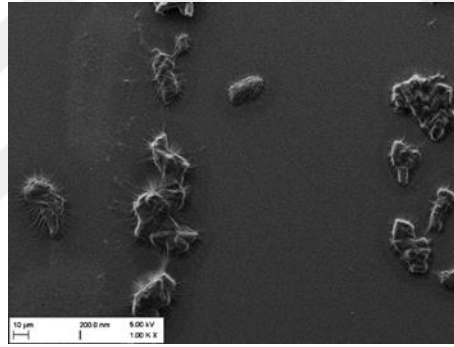
Benzileter($\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}$) kullanılarak membrandan toplanan mikroçubukların SEM görüntüleri alınmıştır (Şekil 4.33).



Şekil 4.33 Benzileter ile muamele edilen membrandan toplanan mikroçubuklar

SEM görüntülerine göre Benzileter çözücü olarak membran toplama işleminde kullanılabileceği düşünülmüştür.

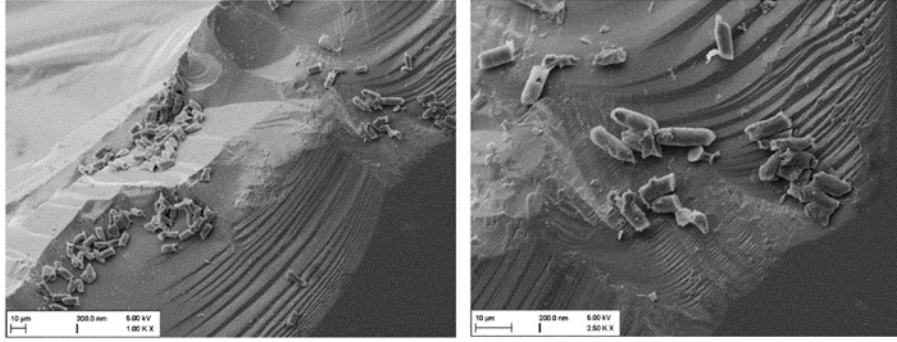
Kloroform- Benzileter (1:3) kullanılarak membrandan toplanan mikroçubukların SEM görüntüsü alınmıştır (Şekil 4.34).



Şekil 4.34 Kloroform-Benzileter karışımı ile muamele edilen membrandan toplanan mikroçubuklar

SEM görüntülerine göre Kloroform+Benzileter (1:3) çözücü olarak membran toplama işleminde kullanılabileceği düşünülmüştür.

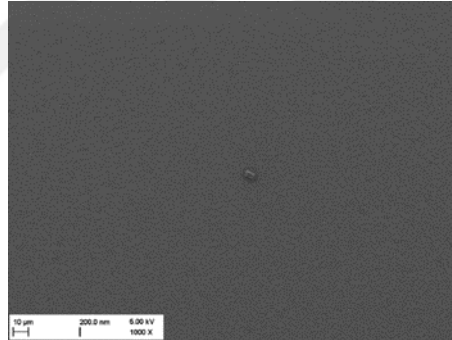
Kloroform- Toluen (1:2) kullanılarak membrandan toplanan mikroçubukların SEM görüntüsü alınmıştır (Şekil 4.35).



Şekil 4.35 Kloroform-Toluen karışımı ile muamele edilen membrandan toplanan mikroçubuklar

SEM görüntülerine göre Kloroform+ Toluen (1:2) çözücü olarak membran toplama işleminde kullanılabileceği düşünülmüştür.

Süzme yöntemi uygulanarak Hesperetin mikroçubukları toplamak için, Şırınga filtresi kullanılarak yapılan süzme işlemi sonrası alınan örneğin SEM görüntüsü Şekil 4.36' da verilmiştir.



Şekil 4.36 Süzme yoluyla elde edilen mikroçubukların SEM görüntüsü

SEM görüntüsüne göre şırınga filtresi kullanılarak süzme işlemi uygulandığında mikroçubukların geri çekilmesi sağlanamamış ve bu yöntemin mikroçubukların toplanmasına uygun olmadığına karar verilmiştir.

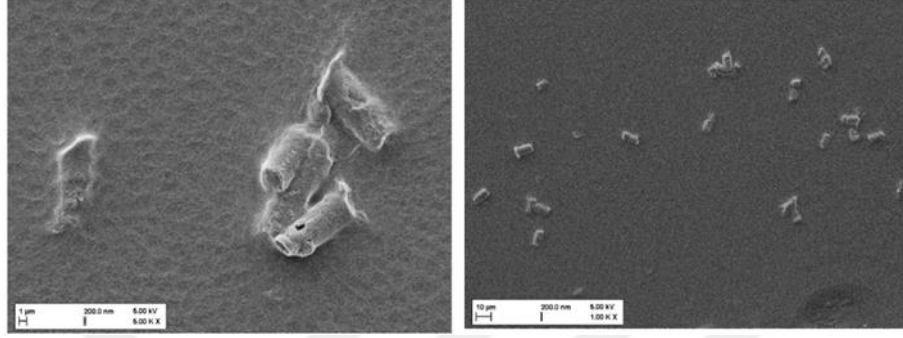
4.1.3.2 Hesperetin-PC2000(~180nm)/D-Mannitol Mikroçubukları Santrifüj ve Süzme yöntemi Uygulama ile Toplama

Hesperetin-PC2000(~180nm)/D-mannitol mikroçubukların santrifüj yoluyla toplanması için çeşitli çözücüler denenmiştir.

Çözücü olarak sadece Kloroform (CHCl_3) kullanıldığında santrifüj işleminde mikroçubukların çökmediği gözlemlenmiştir. Bu nedenle 2500 rpm 30 dk 20°C ,

5000 rpm 20 dk 20°C, 10000 rpm 20 dk 20°C ve 5000 rpm 20 dk 10°C olmak üzere farklı hız,süre ve sıcaklık ayarları denenmiştir.

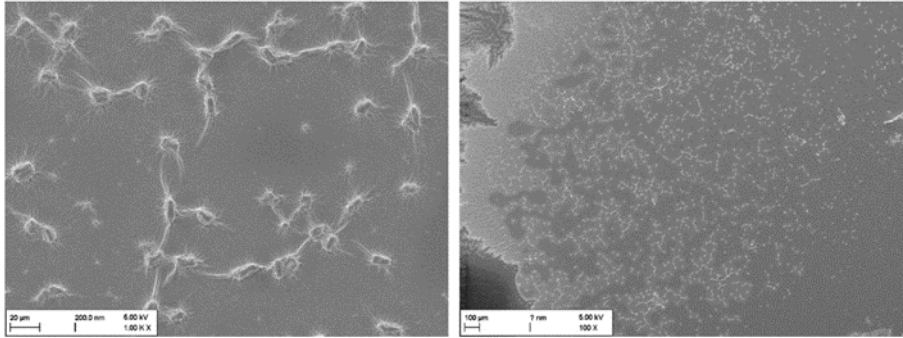
10000 rpm 20 dk 20°C ayarlarıyla yapılan santrifüj sonrası çökelti gözlemlendi. 3 kere uygulanan santrifüj sonrası elde edilen örneklerin SEM görüntüleri alınmıştır (Şekil 4.37).



Şekil 4.37 10000 rpm 20 dk 20 0C ayarlarıyla CHCl₃ kullanılarak elde edilmiş mikroçubukların SEM görüntüleri

Çözücü olarak kloroform kullanıldığında santrifüj işleminde çökelme olmamasının kloroformun özkütlesinin Hesperetinin özkütlesinden büyük olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür.

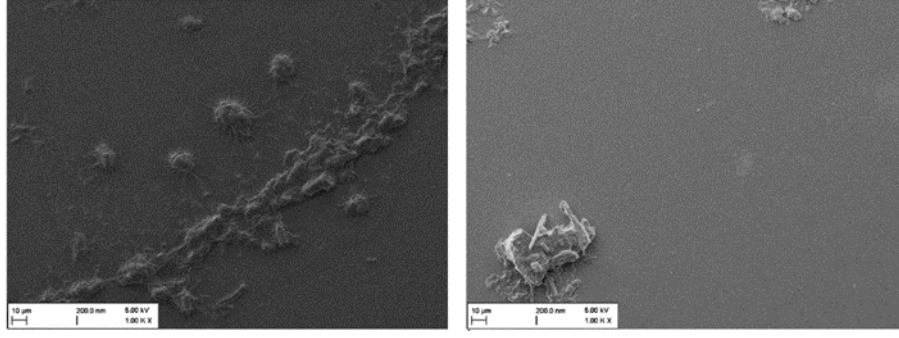
Benzileter (C₁₄H₁₄O) kullanılarak membrandan toplanan mikroçubukların SEM görüntüleri alınmıştır (Şekil 4.38).



Şekil 4.38 Benzileter ile muamele edilen memrandan toplanan mikroçubuklar

SEM görüntülerine göre Benzileter çözücü olarak mikroçubuk toplama işleminde kullanılabileceği düşünülmüştür.

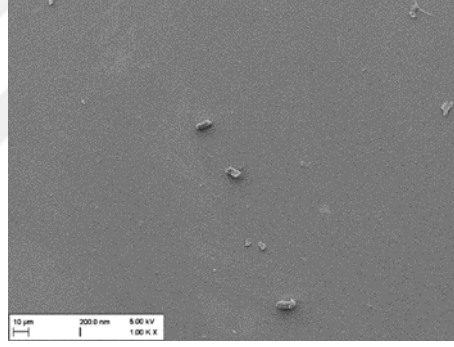
Kloroform- Benzileter (1:3) kullanılarak membrandan toplanan mikroçubukların SEM görüntüsü alınmıştır (Şekil 4.39).



Şekil 4.39 Kloroform-Benzileter karışımı ile muamele edilen membrandan toplanan mikroçubuklar

SEM görüntülerine göre Kloroform+ Benzileter (1:3) çözücü olarak membran toplama işleminde kullanılabileceği düşünülmüştür.

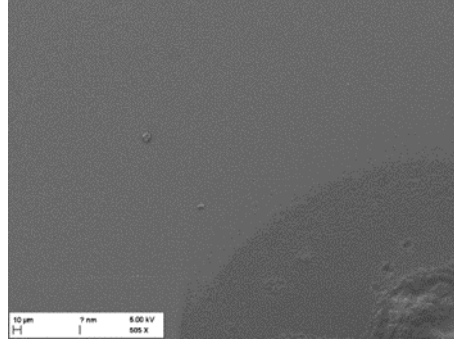
Kloroform-Toluen (1:2) kullanılarak membrandan toplanan mikroçubukların SEM görüntüsü alınmıştır (Şekil 4.40).



Şekil 4.40 Kloroform-Toluen karışımı ile muamele edilen membrandan toplanan mikroçubuklar

SEM görüntülerine göre Kloroform+ Toluen (1:2) çözücü olarak membran toplama işleminde kullanılabileceği düşünülmüştür.

Süzme yöntemi uygulanarak Hesperetin mikroçubukları toplamak için, Şırınga filtresi kullanılarak yapılan süzme işlemi sonrası alınan örneğin SEM görüntüsü Şekil 4.41’da verilmiştir.



Şekil 4.41 Süzme yoluyla elde edilen mikroçubukların SEM görüntüsü

SEM görüntüsüne göre şırınga filtresi kullanılarak süzme işlemi uygulandığında mikroçubukların geri çekilmesinin sağlanamadığı düşünüldü. Bu yöntemin mikroçubukların toplanmasına uygun olmadığına karar verilmiştir.

Alınan tüm bu sonuçlar ışığında; Template-assisted yöntemiyle Hesperetin-Plantacare 2000(~180nm) nanosüspansiyonundan mikroçubuk eldesinde; mikroçubukları membrandan toplamak için kullanılabilecek en iyi çözücünün daha düşük hızda santrifüjle en temiz sonucu veren Kloroform (CHCl_3) + Toluen (C_7H_8) (1:2) karışımı olduğuna karar verilmiştir.

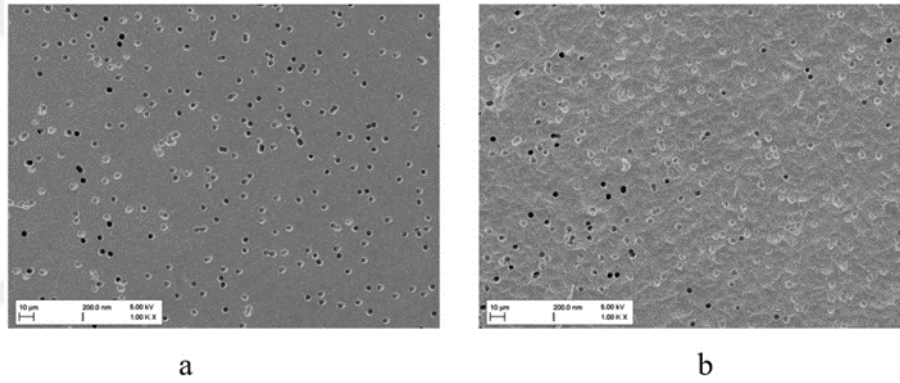
Sonuç olarak ; 0.1mg/mL Hesperetin-Plantacare2000 (~180nm) nanosüspansiyonunun 2*3mL programı (Program dört aşamalı olup ilk adımda 1mL/dk hızla infiltrasyon ikinci adımda 15 dk bekleme, üçüncü adımda 0.1mL/dk hızla infiltrasyon ve son adımda 10 dk bekleme şeklindedir) ile infiltrasyonu ; %1,5 (m/V) lik Agaroz ve %20lik D-mannitol ile stabilize edilmesi ve Kloroform (CHCl_3) + Toluen (C_7H_8) (1:2) karışımı içerisinde membrandan ayrılması ile Hesperetin mikroçubuklar elde edilmiştir.

4.2 Hesperetin-PVA Nanosüspansiyonundan Template-Assisted Teknik ile Hesperetin Mikroçubuk eldesi

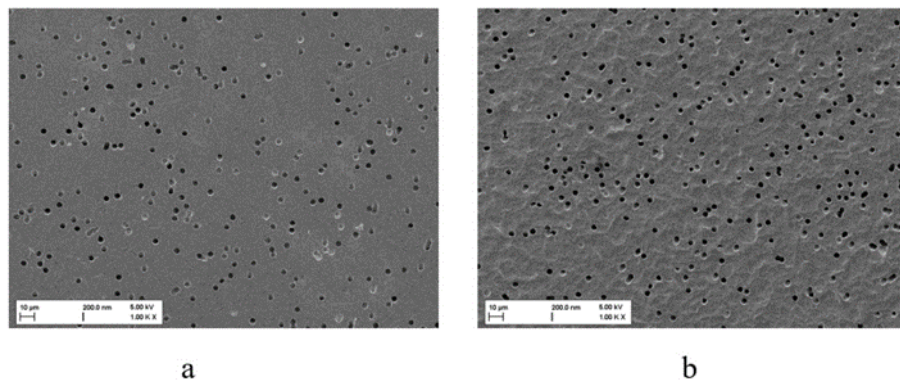
4.2.1 Hesperetin-PVA Nanosüspansiyonun İnfiltrasyonu için Optimum Şartların Belirlenmesi

4.2.1.1 Farklı Konsantrasyonlardaki Hesperetin-PVA (~200nm) ve Hesperetin-PVA (~400nm) Nanosüspansiyonları İnfiltrate Edilmiş Membranların SEM Görüntüleri

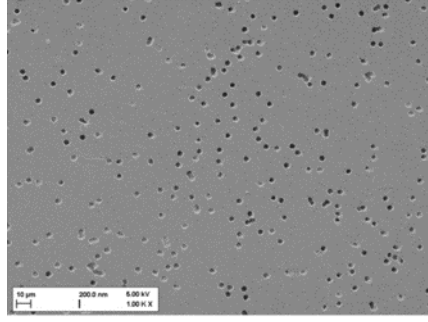
Farklı konsantrasyonlardaki Hesperetin-PVA(~200nm) ve Hesperetin-PVA(~400nm) nanosüspansiyonlarının 2*3 mL programı ile infiltrate edilmiş membranların SEM görüntüleri Şekil 3. 42-47’de verilmiştir.



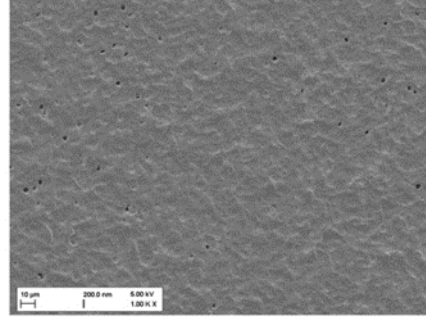
Şekil 4.42 0.1 mg/mL Hesperetin-PVA(~200nm) nanosüspansiyonu infiltrate edilmiş örneklerin SEM görüntüleri: (a) membranın parlak yüzeyi (b) membranın parlak olmayan yüzeyi



Şekil 4.43 0.1 mg/mL Hesperetin-PVA(~400nm) nanosüspansiyonu infiltrate edilmiş örneklerin SEM görüntüleri: (a) membranın parlak yüzeyi (b) membranın parlak olmayan yüzeyi

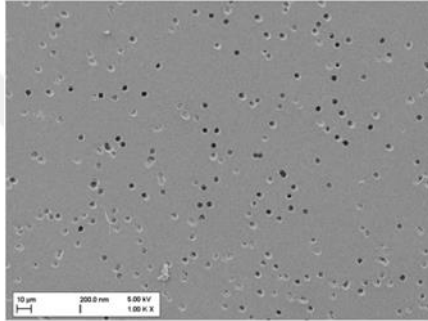


a

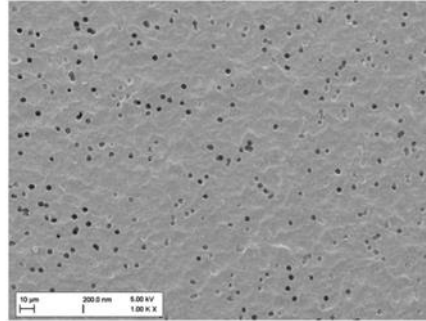


b

Şekil 4.44 0.2 mg/mL Hesperetin-PVA(~200nm) nanosüspansiyonu infiltire edilmiş örneklerin SEM görüntüleri: (a) membranın parlak yüzeyi (b) membranın parlak olmayan yüzeyi

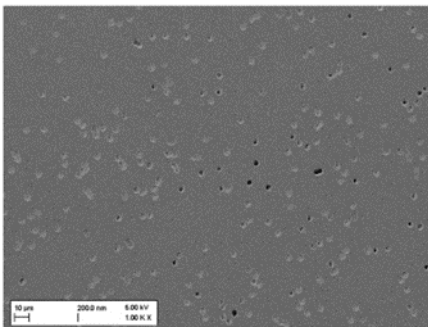


a

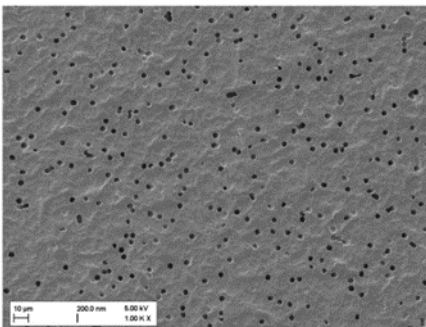


b

Şekil 4.45 0.2 mg/mL Hesperetin-PVA(~400nm) nanosüspansiyonu infiltire edilmiş örneklerin SEM görüntüleri: (a) membranın parlak yüzeyi (b) membranın parlak olmayan yüzeyi

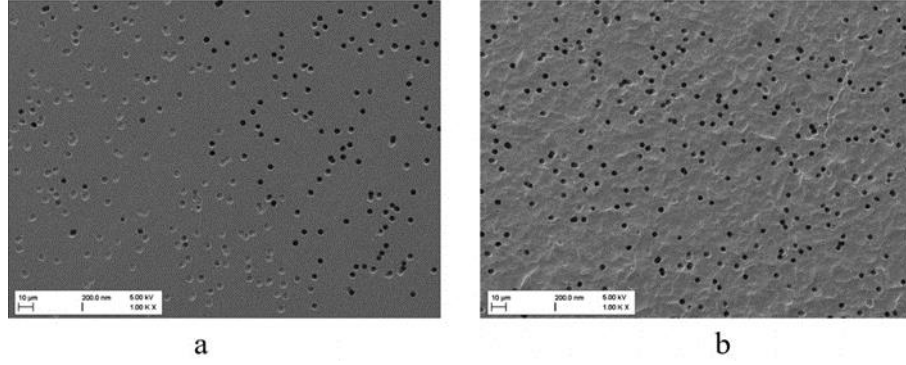


a



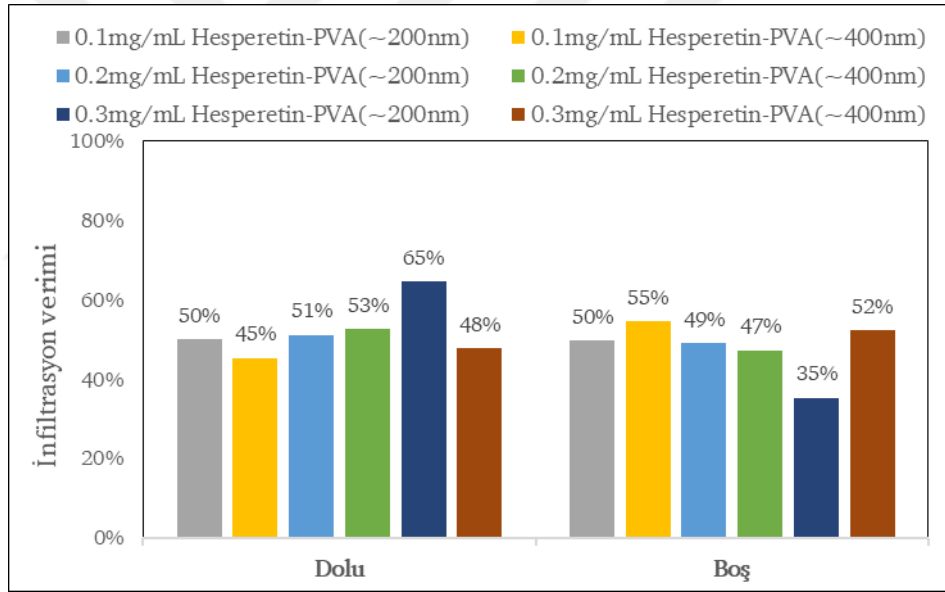
b

Şekil 4.46 0.3 mg/mL Hesperetin-PVA(~200nm) nanosüspansiyonu ile infiltire edilmiş örneklerin SEM görüntüleri: (a) membranın parlak yüzeyi (b) membranın parlak olmayan yüzeyi



Şekil 4.47 0.3 mg/mL Hesperetin-PVA(~400nm) nanosüspansiyonu ile infiltire edilmiş örneklerin SEM görüntüleri: (a) membranın parlak yüzeyi (b) membranın parlak olmayan yüzeyi

Ayrıca Şekil 4.48’de farklı konsantrasyonlardaki Hesperetin-PVA(~200nm) ve Hesperetin-PVA(~400nm) infiltrasyon verimi grafikte özetlenmiştir.



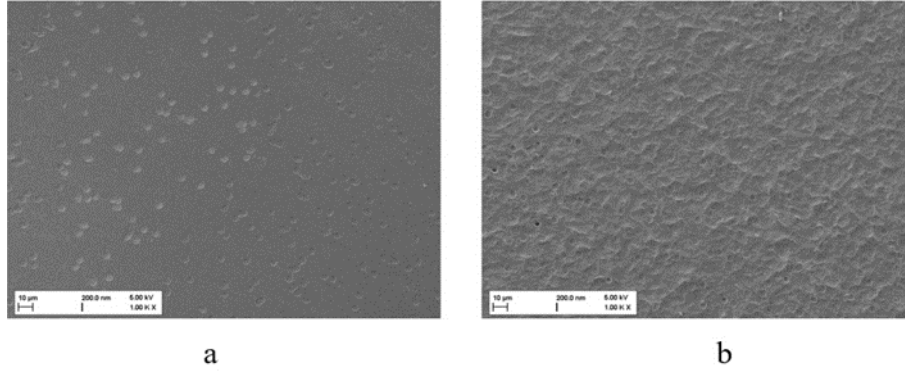
Şekil 4.48 0.1; 0.2 ve 0.3 mg/mL Hesperetin-PVA (~200nm) ve Hesperetin-PVA (~400nm) nanosüspansiyonlarının infiltrasyon verimi

Genel olarak tüm konsantrasyonlar için infiltrasyon verimi oldukça düşük olmakla beraber 0.3 mg/mL Hesperetin-PVA(~200nm) %65 ile en yüksek verime sahiptir (Şekil 4.48).

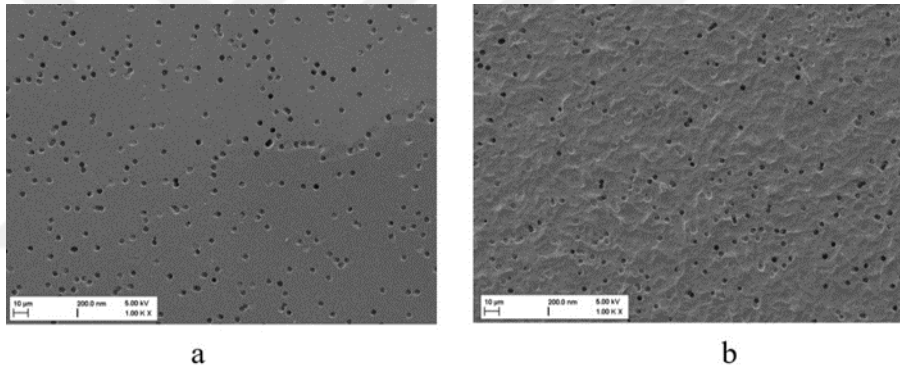
4.2.1.2 Farklı infiltrasyon sayısı ile infiltire edilmiş membranların SEM sonuçları

0,2 mg/mL Hesperetin-PVA(~200nm) ve 0,2 mg/mL Hesperetin-PVA(~400nm) nanosüspansiyonlarının 3*3 mL (üç kere 3'er mL) ve 4*3 mL(4 kere 3'er mL)

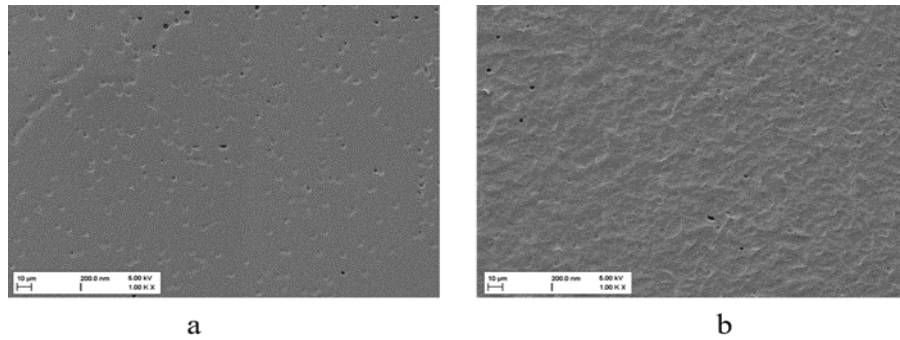
programları ile infiltire edilmiş membranların SEM görüntüleri Şekil 4.49-52’de verilmiştir.



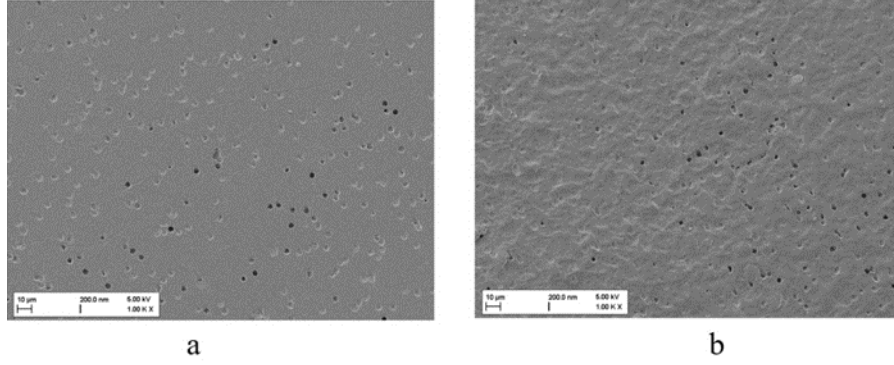
Şekil 4.49 0.2 mg/mL Hesperetin-PVA(~200nm) nanosüspansiyonu 3*3 mL programı ile infiltire edilmiş örneklerin SEM görüntüleri: (a) membranın parlak yüzeyi (b) membranın parlak olmayan yüzeyi



Şekil 4.50 0.2 mg/mL Hesperetin-PVA(~400nm) nanosüspansiyonu 3*3 mL programı ile infiltire edilmiş örneklerin SEM görüntüleri: (a) membranın parlak yüzeyi (b) membranın parlak olmayan yüzeyi



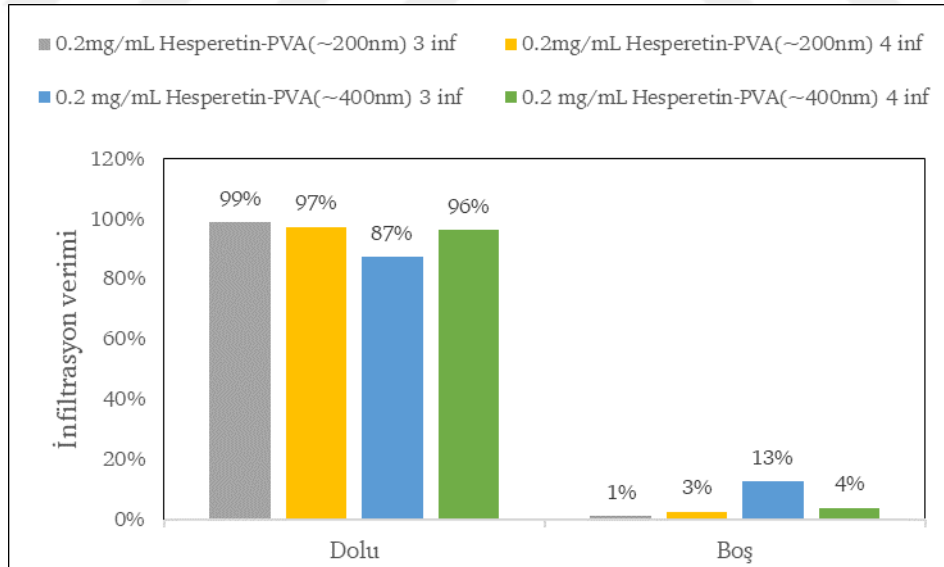
Şekil 4.51 0.2 mg/mL Hesperetin-PVA(~200nm) nanosüspansiyonu 4*3 mL programı ile infiltire edilmiş örneklerin SEM görüntüleri: (a) membranın parlak yüzeyi (b) membranın parlak olmayan yüzeyi



Şekil 4.52 0.2 mg/mL Hesperetin-PVA(~400nm) nanosüspansiyonu 4*3 mL programı ile infiltire edilmiş örneklerin SEM görüntüleri: (a) membranın parlak yüzeyi (b) membranın parlak olmayan yüzeyi

SEM görüntülerine göre, dolu gözenek sayısının en fazla olduğu membranın 0,2 mg/mL Hesperetin-PVA(~200nm) nanosüspansiyonunun 3*3 mL programıyla infiltre edilerek elde edilen örnek olduğu belirlenmiştir.

Hesperetin-PVA (~200nm) ve Hesperetin-PVA(~400nm) in 3*3 mL ve 4*3 mL programları ile infiltrasyonları sonucu elde edilen verim grafiği Şekil 4.53 de verilmiştir.



Şekil 4.53 0.2 mg/mL Hesperetin-PVA(~200nm) ve 0.2 mg/mL Hesperetin-PVA(~400nm) nanosüspansiyonlarının 3*3 mL ve 4*3 mL programlarıyla infiltrasyonun verimi

Şekil 4.53'e göre 0.2 mg/mL Hesperetin-PVA(~200nm) ın 3*3 mL programıyla infiltrasyonu yaklaşık %99 ile en yüksek infiltrasyon verimi sağlanmıştır.

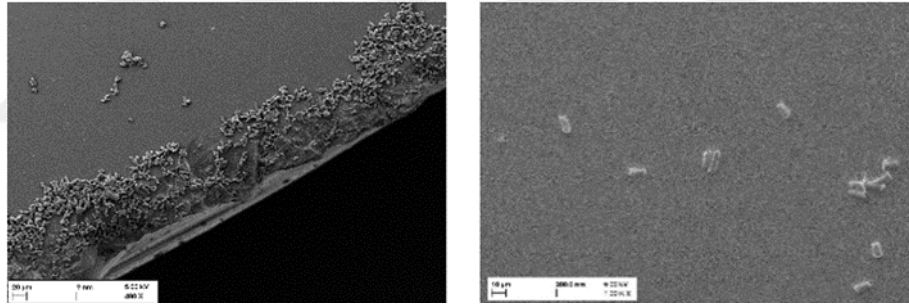
0.3 mg/mL Hesperetin-PVA(~200nm) ve 0.3 mg/mL Hesperetin-PVA(~400nm) nanosüspansiyonlarının 3*3 mL (üç kere 3'er mL) ve 4*3 mL(4 kere 3'er mL) programları ile infiltrasyonu denendi ancak üçüncü infiltrasyon sırasında süspansiyonun membrana infiltre edilemediği holderdan taşıdığı gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak; Dolu gözenek sayısı en fazla olan ve infiltrasyon verimliliği en yüksek olan 0.2 mg/mL Hesperetin-PVA(~200nm) ile 3*3 mL programı kullanılarak çalışmaya devam edilmiştir.

4.2.2 Hesperetin Mikroçubukların Toplanması

4.2.2.1 Hesperetin-PVA(~200nm)/Agaroz Mikroçubukları Santrifüj ile Toplama

Agaroz ile stabilize edilip Kloroform+ Toluen (1:2) karışımı ile santrifüjlenen mikroçubukların SEM görüntüleri Şekil 4.54' te verilmiştir.

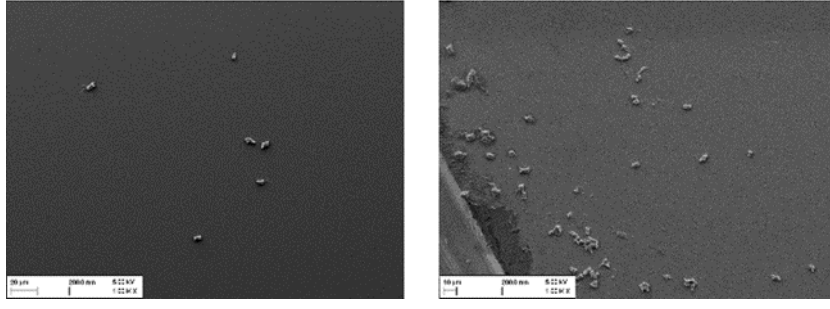


Şekil 4.54 Hesperetin-PVA(~200nm)/Agaroz mikroçubukları

SEM görüntülerine göre, Agaroz ile stabilizasyon ve ardından kloroform –toluen (1:2) karışımı kullanılarak santrifüjleme yoluyla Hesperetin mikroçubukların elde edilebildiği saptanmıştır.

4.2.2.1 Hesperetin-PVA(~200nm)/D-Mannitol Mikroçubukları Santrifüj ile Toplama

D-mannitol ile stabilize edilip Kloroform+ Toluen (1:2) karışımı ile santrifüjlenen mikroçubukların SEM görüntüleri Şekil 4.55' te verilmiştir.



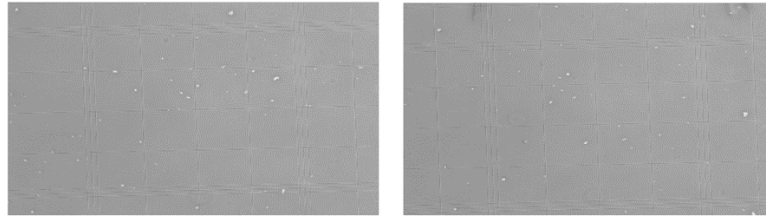
Şekil 4.55 Hesperetin-PVA(~200nm)/D-mannitol mikroçubukları

SEM görüntülerine göre, D-mannitol ile stabilizasyon ve ardından kloroform – toluen (1:2) karışımı kullanılarak santrifüjleme yoluyla Hesperetin mikroçubukların elde edilebildiği saptanmıştır.

4.3 Hesperetin-PC(2000) ve Hesperetin-PVA Süspansiyonlarından Elde Edilen Mikroçubukların Karakterizasyonu

4.3.1 Hesperetin Mikroçubuklarının Sayımı

Hesperetin-PC2000 ve Hesperetin-PVA süspansiyonundan elde edilmiş, Agaroza ve D-mannitol ile stabilize edilmiş mikroçubuklar Fusch-Roshental lamı kullanılarak sayıldı. Şekil 4.56’de sayım için rastgele seçilmiş karelerden ikisinin mikroskop görüntüsü verilmiştir.



Şekil 4.56 Mikroçubuk sayımı için seçilen karelerden iki tanesinin mikroskop görüntüsü

Eşitlik 3.2 kullanılarak, verim değerleri Hesperetin-PC2000(~180nm)/Agaroz mikroçubuklar için %66, Hesperetin-PC2000(~180nm)/-Mannitol mikroçubuklar için %52; Hesperetin-PVA(~200nm)/Agaroz mikroçubuklar için %74, Hesperetin-PVA(~200nm)/D-Mannitol mikroçubuklar için %62 olarak hesaplanmıştır.

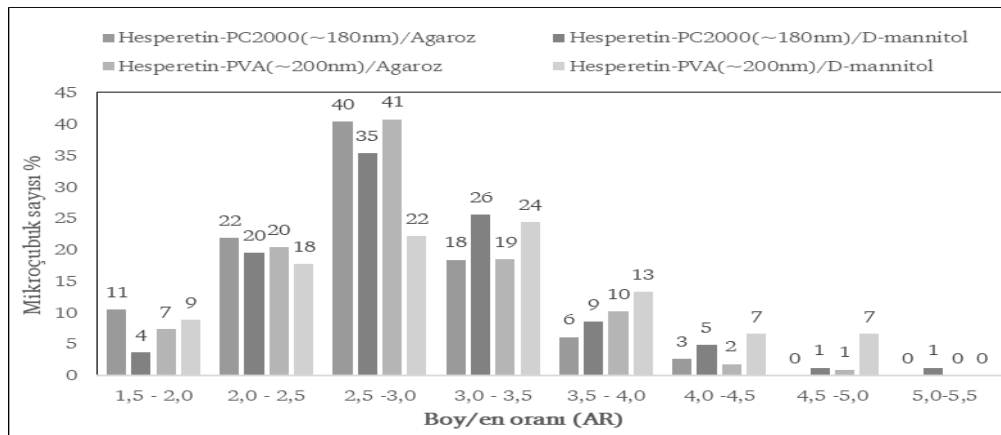
4.3.2 Hesperetin Mikroçubukların Uzunluk ve Çaplarının Belirlenmesi

Hesperetin Mikroçubuklarının SEM görüntülerinden, uzunluk ve çap ölçümleri ImageJ-win 64 programıyla yapıldı ve sonuçlar Tablo 4.1 de verilmiştir. Ölçümü yapılan her bir mikroçubuğun boy/en oranları tek tek hesaplanmış ve mikroçubuk sayısı göz önünde bulundurularak aritmetik ortalama alınıp ortalama boy/en oranı (AR) belirlenmiştir.

Tablo 4.1 Elde edilen Hesperetin mikroçubuklarının ortalama boy, en ve boy/en oranları

Nanosüspansiyon	Stabilizatör	Boy (μm)	En (μm)	AR (boy/en)
Hesperetin-PC2000	Agaroz	9.9	3.7	2.7
	D-Mannitol	9.5	3.3	2.9
Hesperetin-PVA	Agaroz	9.2	3.3	2.8
	D-Mannitol	7.7	2.6	3.1

Ölçüm sonuçlarına göre boy/en oranına göre mikroçubuk yüzdeleri her bir süspansiyon için Şekil 4.57’te özetlenmiştir.



Şekil 4.57 Boyut ölçümü yapılan mikroçubukların boy/en oranlarına (AR) göre dağılımı

Elde edilen mikroçubukların boy/en oranlarının 2.0 ile 3.5 arasında yoğunlaştığı, genel olarak 1.5 ile 5.5 arasında olduğu saptandı. Özellikle Hesperetin-PC2000(~180nm)/Agaroz ve Hesperetin-PVA(~200nm)/Agaroz mikroçubukların büyük çoğunluğunun, sırasıyla %40 ve %41, boy/en oranı 2,5-3,0 aralığında olduğu belirlenmiştir.

4.3.3 Hesperetin Mikroçubukların Farklı Ph lardaki Kararlılığı ve Aktivitesinin İncelenmesi

4.3.3.1 Hesperetin-PC2000 (~180nm) /Agaroz Mikroçubukların farklı pH lardaki Kararlılığı ve aktivitesi

Hesperetin-PC2000(~180nm)/Agaroz, Hesperetin-PC2000(~180nm)/D-Mannitol, Hesperetin-PVA(~200nm)/Agaroz ve Hesperetin-PVA(~200nm)/D-Mannitol mikroçubuklarının polidispersitesi, partikül boyutu, mobilite değeri ve zeta potansiyeli farklı pH değerlerinde incelenmiştir. Farklı pH değerlerine ulaşmak için farklı molarite derişimlerinde asit (HCl) ve baz (NaOH) çözeltileri kullanılmış ve ölçümler Zetasizer cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

Hesperetin mikroçubuklar için zetasizer ölçüm sonuçları Tablo 4.2' de verilmiştir.

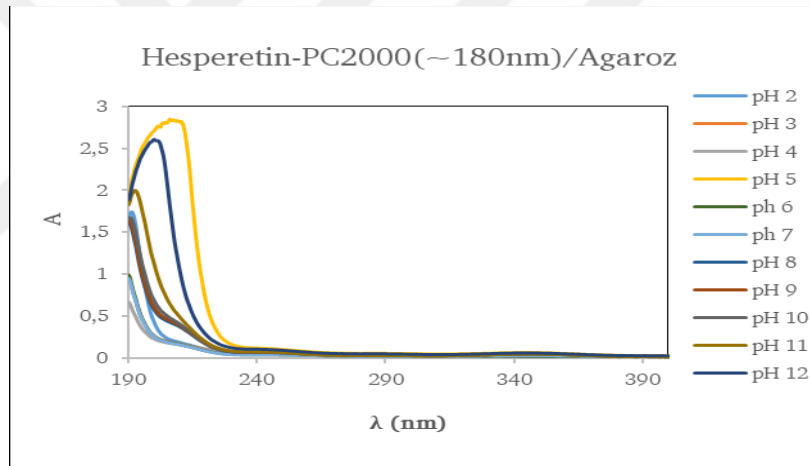
Tablo 4.2 Hesperetin-PC2000(~180nm)/Agaroz mikroçubuklarının farklı pH lardaki zetasizer ölçüm sonuçları

HESPERETİN-PC2000(~180nm)/ AGARÖZ				
pH	PDI	Partikül Boyutu (nm)	Mobilite	Zeta Potansiyeli (mV)
2	0.48	1160	-0.91	-12.87
3	0.46	1130	-0.78	-10.95
4	0.48	980	-1.96	-27.60
5	0.53	1300	-2.86	-40.26
6	0.53	950	-3.84	-54.02
7	0.50	900	-3.31	-46.59
8	0.37	970	-2.97	-41.89
9	0.74	1020	-4.23	-57.39
10	0.94	790	-2.85	-40.08
11	0.66	650	-3.51	-49.40
12	0.78	1030	-3.38	-47.64

Tablo 4.2 de verildiği üzere Hesperetin-PC2000(~180nm)/Agaroz mikroçubuklarının zeta potansiyel değeri pH=2 için -12.87 pH =12 için ise -47.64 olarak ölçülmüş ve pH değerinin artmasıyla Hesperetin mikroçubukların zeta potansiyel değerlerinin negatif yönde arttığı gözlemlendi. Maksimum zeta potansiyel değeri pH= 9 da -57.39mV olarak ölçülmüştür.

Tablo 4.2 de görüldüğü gibi Hesperetin-PC2000(~180nm)/Agaroz mikroçubukların polydispersite değerleri 0.37 ile 0.94 aralığında olup, Hesperetin mikroçubukların çalışılan pH aralığında suda monodispers dağılım gösterdiği ve partikül boyutunun ortalama 990 nm olarak belirlenmiştir.

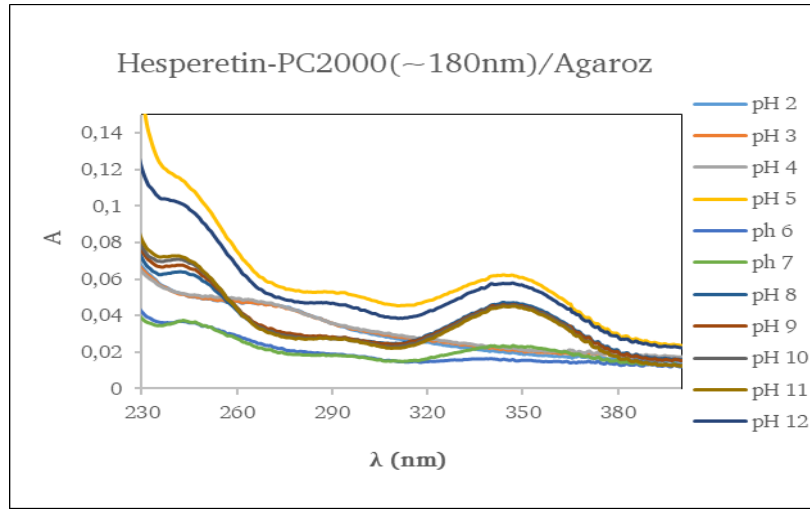
Hesperetin-PC2000(~180nm)/Agaroz mikroçubuklarının farklı pH lardaki aktivitesi UV/VIS spektrofotometre cihazı ile ölçülmüş ve sonuçlar Şekil 4.56 da verilmiştir.



Şekil 4. 58 Hesperetin-PC2000 (~180nm)/Agaroz mikroçubuklarının farklı pH lardaki aktivitesi

Şekil 4.58 da görüldüğü üzere Agarozun aktivitesi pH 5 te yaklaşık 210 nm dalga boyunda maksimum olup pH 4 te ise minimumdur.

Hesperetin mikroçubuklarının pH ile aktivite değişimi daha detaylı olarak Şekil 4.59 ile gösterilmiştir.



Şekil 4.59 Hesperetin mikroçubukların pH değişimi ile aktivitesi

pH değişiminin Hesperetin-PC2000(~180nm)/Agaroz mikroçubuklarının yapısındaki sinnamoil den kaynaklı bant I (300-400nm) benzoilden kaynaklı bant II (240-300nm) e ait pikler Tablo 4.3 te özetlenmiştir. Tabloda “+” ilgili pikin absorpsiyon spektrumunda görülebildiğini, “-” ise görülemediğini ifade etmektedir.

Tablo 4.3 Hesperetin-PC2000(~180nm)/Agaroz mikroçubukların UV/VIS piklerinin pH değişimi ile durumu

HESPERETIN-PC2000(~180nm) /AGARÖZ		
pH	Bant II (240-300nm)	Bant I (300-400nm)
2	+(270nm)	-
3	+(270nm)	-
4	+(270nm)	-
5	+(245nm,290nm)	+(345nm)
6	+(245nm)	-
7	+(245nm,290nm)	+(345nm)
8	+(245nm,290nm)	+(345nm)
9	+(245nm,290nm)	+(345nm)
10	+(245nm,290nm)	+(345nm)
11	+(245nm,290nm)	+(345nm)
12	+(245nm,290nm)	+(345nm)

Hesperetin-PC2000(~180nm)/Agaroz mikroçubukların farklı pH'larda aktivite değişim sırası pH 5>12>11>10>9>8>4=3=2>7=6 şeklindedir. Sadece bant II pikleri göz önünde bulundurularak sıralama yapılmıştır.

Hesperetin-PC2000(~180nm)/Agaroz mikroçubukların aktivitesi her iki bant aralığı için pH 5 de maksimumdur.

Hesperetin mikroçubukları benzoil kısmından kaynaklanan bant II aralığında; pH 2,3 ve 4 te yaklaşık 270 nm de tek bir absorbans yapmıştır. Bu pikler batokromik kayma(kırmızıya kayma) ve hipsokromik kayma yaparak pH 5,7,8,9,10,11 ve 12 de 250 nm ve 290 nm dalgaboylarında iki ayrı absorbans vermiştir. pH 6 da ise sadece 245 nm dalga boyunda absorbans vermiştir. Buna göre Hesperetin mikroçubukları maksimum aktiviteyi pH 5 te minimum aktiviteyi ise pH 6 ve 7 de göstermiştir.

Hesperetin mikroçubukların sinnemoil kısmından kaynaklanan bant I aralığında ise;pH 2,3,4,6 da herhangi bir pik gözlenmemiş, pH 5,7,8,9,10,11 ve 12 de yaklaşık 345 nm de absorbans gözlenmiştir. Absorbans değerleri gözönüne alındığında, Hesperetin mikroçubukların aktivitesi pH 5 te maksimumdur.

Hesperetin-PC2000(~180nm)/Agaroz mikroçubukların çalışılan tüm pH aralığında bant II de absorbans yapması, A halkasındaki -OH yapıların aktif olduğunu göstermektedir. Bununla beraber, pH 5 den itibaren (pH 6 hariç) ise B halkasındaki gruplar aktiviteye katkıda bulunmuştur.

Bant I ve Bant II aralığı birlikte düşünüldüğünde, Hesperetin mikroçubuklarının aktivitelerinin her iki aralık için paralellik gösterdiği belirlenmiştir.

4.3.3.2 Hesperetin-PC2000 (~180nm) /D-Mannitol Mikroçubukların farklı pH lardaki Kararlılığı ve aktivitesi

Suda dispers edilmiş Hesperetin-PC2000 (~180nm)/D-Mannitol mikroçubukların farklı pH değerlerindeki Partikül boyutu, mobilitesi, zeta potansiyel ve polydispersite değerleri Tablo 4.4 te verilmiştir.

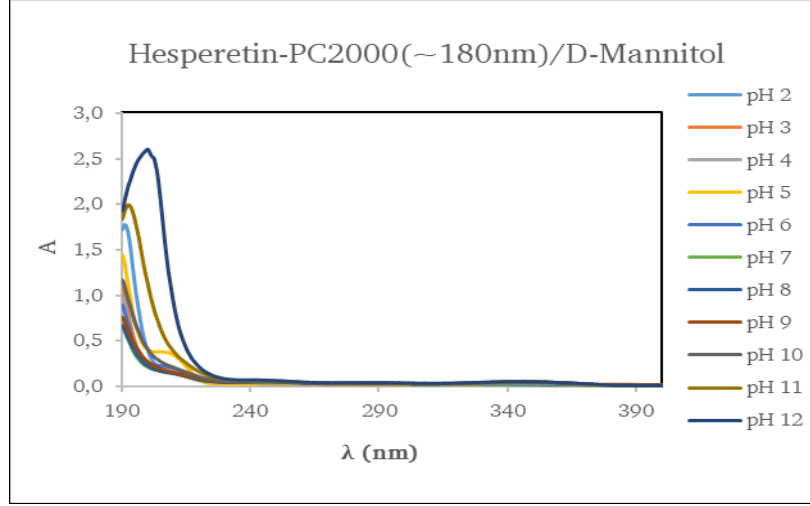
Tablo 4.4 Hesperetin-PC2000(~180nm)/D-Mannitol mikroçubukların farklı pH lardaki zetasizer ölçüm sonuçları

HESPERETİN-PC2000(~180nm)/ D-MANNİTOL				
pH	PDI	Partikül Boyutu (nm)	Mobilite	Zeta Potansiyeli (mV)
2	0.37	340	0.25	3.45
3	0.44	830	-0.26	-3.68
4	0.40	930	-0.96	-13.48
5	0.42	950	-1.58	-22.29
6	0.25	980	-1.41	-19.80
7	0.31	850	-2.87	-40.38
8	0.42	800	-2.31	-32.54
9	0.41	550	-3.03	-42.60
10	0.38	390	-3.05	-42.88
11	0.36	380	-3.76	-52.92
12	0.31	340	-2.65	-37.35

Tablo 4.4 te verildiği üzere Hesperetin-PC2000 (~180nm)/D-Mannitol mikroçubuklarının zeta potansiyel değeri pH=2 için 3.45 pH =12 için ise -37.35 olmak üzere pH=2 için zeta potansiyel değer pozitif iken $pH \geq 3$ için negatif olduğu saptanmıştır. pH =7 ile pH=12 arasında Hesperetin-PC2000(~180nm)/D-Mannitol çubuklarının iyi kararlılığa sahip olduğu belirlenmiştir. Maksimum zeta potansiyel değeri pH=11 de -52.92 mV olarak tespit edilmiştir.

Hesperetin-PC2000(~180nm)/D-Mannitol mikroçubukların polydispersite değerleri 0.25 ile 0.44 aralığında olup, Hesperetin mikroçubukları çalışılan pH aralığında suda monodispers dağılım göstermiştir ve partikül boyutu ortalama 667 nm olarak belirlenmiştir(Tablo 4.4).

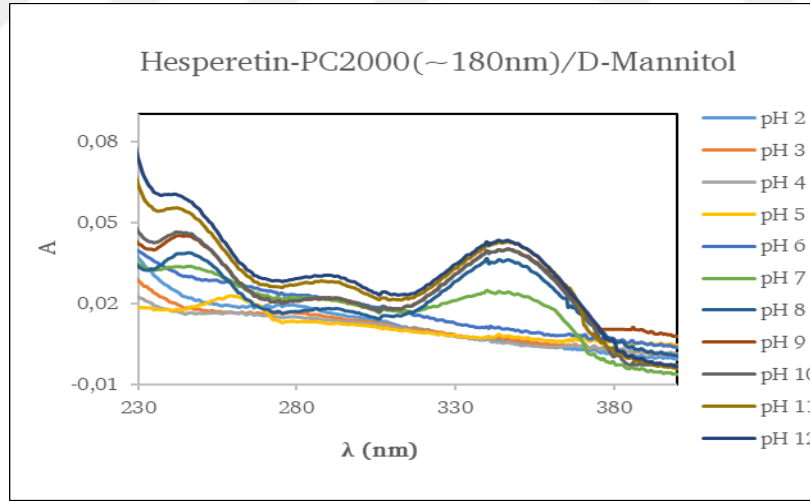
Hesperetin-PC2000(~180nm)/D-Mannitol mikroçubuklarının farklı pH lardaki aktivitesi UV/VIS spektrofotometre cihazı ile ölçülmüş ve sonuçlar Şekil 4.60' de verilmiştir.



Şekil 4.60 Hesperetin-PC2000 (~180nm)/D-Mannitol mikroçubuklarının farklı pH lardaki aktivitesi

Şekil 4.61 e göre D-mannitol yaklaşık 200 nm de pH 12 de maksimum aktiviteye sahiptir.

Hesperetin mikroçubuklarının pH ile aktivite değişimi daha belirgin olarak Şekil 4.59 ile gösterilmiştir.



Şekil 4.61 Hesperetin mikroçubuklarının farklı pH lardaki aktivitesi

pH değişiminin Hesperetin-PC2000(~180nm)/D-Mannitol mikroçubuklarının yapısındaki sinnamoil den kaynaklı bant I (300-400nm) benzoilden kaynaklı bant II (240-300nm) e ait pikler Tablo 4.5 te özetlenmiştir. Tabloda “+” ilgili pikin absorpsiyon spektrumunda görülebildiğini, “-” ise görülemediğini ifade etmektedir.

Tablo 4.5 Hesperetin-PC2000(~180nm)/D-Mannitol mikroçubukların UV/VIS piklerinin pH değişimi ile durumu

HESPERETİN-PC2000(~180nm)/D-MANNİTOL		
pH	Bant II (240-300nm)	Bant I (300-400nm)
2	+(280nm)	-
3	+(280nm)	-
4	+(260nm)	-
5	+(260nm)	-
6	-	-
7	+(245nm,290nm)	+(345nm)
8	+(245nm,290nm)	+(345nm)
9	+(245nm,290nm)	+(345nm)
10	+(245nm,290nm)	+(345nm)
11	+(245nm,290nm)	+(345nm)
12	+(245nm,290nm)	+(345nm)

Hesperetin-PC2000(~180nm)/D-Mannitol mikroçubuklarının farklı pH larda aktivitelerinin sıralaması $pH=12>11>10>9>8>7>5>2>3>4$ şeklindedir. Sadece Bant II pikleri göz ününde bulundurulularak sıralama yapılmıştır.

Hesperetin-PC2000(~180nm)/D-Mannitol mikroçubukların aktivitesi her iki bant aralığı için pH 12 de maksimumdur.

Hesperetinin benzoil yapısından kaynaklanan bant II aralığında;

pH 2,3 ve 4 te sadece 280nm de geniş ve absorbansı düşük bir pik vermiştir. pH 5 te ise bu pik hipsokromik kayma yaparak 260 nm de belirgin bir pik oluşmuştur. pH 6 ise hiç pik gözlenmediği için hesperetin mikroçubukların bu pH ta aktif olmadığı düşünüldü. pH 7 de ise 245 nm de belirgin bir pik gözlenmiştir. pH 8,9,10 ,11 ve 12 için ise 245 nm de ve 290 nm de belirgin pikler gözlenmiş olup Hesperetinin aktivitesi özellikle pH 7 den itibaren pH ile doğru orantılı olarak artmış ve pH 12 de maksimuma ulaşmıştır.

Hesperetinin sinnamoil yapısından kaynaklı bant I aralığında;pH 2,3,4,5, ve 6 da herhangi bir aktiviteye rastlanmamış ancak pH 7,8,9,10,11,ve 12 de yaklaşık 345

nm de absorbans değerleri birbirine oldukça yakın olan pikler gözlenmiştir. Maksimum aktivitenin ise pH 11 ve 12 de olduğu belirlenmiştir.

Bant I ve bant II deki aktivitelerin pH 7 den itibaren paralellik gösterdiği saptanmıştır.

Hesperetin-PC2000(~180nm)/D-Mannitol mikroçubukların çalışılan pH 6 hariç tüm pH aralığında bant II de absorbans yapması, bu pH larda A halkasındaki –OH yapıların aktif olduğunu göstermektedir. Bununla beraber, pH 7 ile pH 12 arasında ise A halkasındaki grupların yanında ,B halkasındaki gruplar da aktiveteye katkıda bulunmuştur.

4.3.3.3 Hesperetin-PVA(~200nm)/Agaroz Mikroçubukların farklı pH lardaki Kararlılığı ve Aktivitesi

Hesperetin-PVA(~200nm)/Agaroz mikroçubuklarının polidispersite, partikül boyutu, mobilite ve zeta potansiyel değerleri farklı pH değerlerinde incelenmiş, ölçümler Zetasizer cihazı ile gerçekleştirildi. Sonuçlar Tablo 4.6’da verilmiştir.

Tablo 4.6 Hesperetin-PVA(~200nm)/Agaroz mikroçubukların farklı pH lardaki zetasizer ölçüm sonuçları

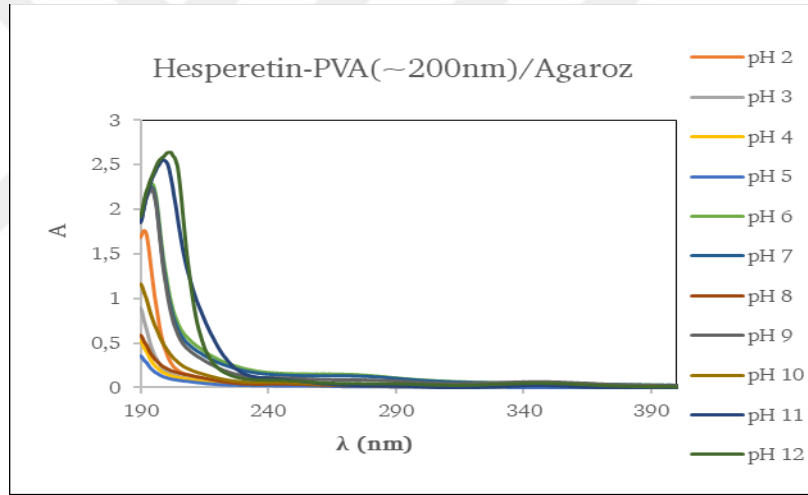
HESPERETİN-PVA(~200nm)/ AGARÖZ				
pH	PDI	Partikül Boyutu (nm)	Mobilite	Zeta Potansiyeli (mV)
2	0.39	980	-0.15	-2.11
3	0.37	610	-0.36	-5.01
4	0.36	480	-1.11	-15.63
5	0.37	410	-0.88	-12.43
6	0.46	930	-2.66	-37.39
7	0.15	610	-3.59	-50.61
8	0.46	360	-3.52	-49.56
9	0.39	620	-4.71	-66.27
10	0.35	280	-4.27	-60.13
11	0.36	440	-4.08	-57.41
12	0.44	780	-1.67	-23.53

Tablo 4.6’da verildiği üzere Hesperetin-PVA(200~nm)/Agaroz mikroçubuklarının zeta potansiyel değeri pH 2 için -2.11 mV iken artan pH ile artmış, maximum

kararlılığa sahip olduğu pH 9 dan itibaren düşüşe geçmiş, özellikle pH 12 de anlamlı bir düşüş göstermiştir. Hesperetin-PVA(~ 200 nm)/Agaroz mikroçubukları çalışılan pH aralığında negatif yüklendiği saptandı. Hesperetin-PVA(~ 200 nm)/Agaroz mikroçubuklarının pH 6, pH 7 ve bazik ortamda oldukça kararlı olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4.6’da görüldüğü gibi Hesperetin-PVA(~ 200 nm)/Agaroz mikroçubukların polidispersite değerleri 0.15 ile 0.46 aralığında olup, Hesperetin-PVA(~ 200 nm)/Agaroz mikroçubukları çalışılan pH aralığında monodispers dağılım gösterdiği ve ortalama 590 nm lik partikül boyutuna sahip olduğu belirlenmiştir.

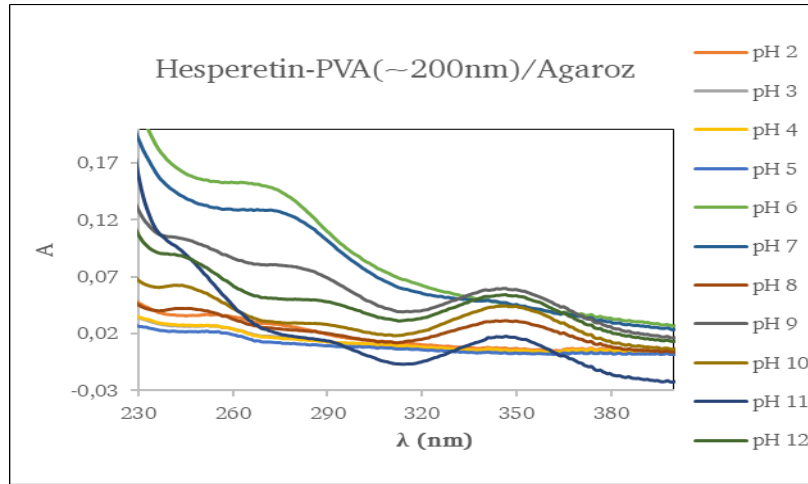
Hesperetin-PVA(~ 200 nm)/Agaroz mikroçubuklarının farklı pH lardaki aktivitesi UV/VIS spektrofotometre cihazı ile ölçülmüş ve sonuçlar Şekil 4.62’de verilmiştir.



Şekil 4.62 Hesperetin-PVA(~ 200 nm)/Agaroz mikroçubuklarının farklı pH lardaki aktivitesi

Şekil 4.60’ a göre Agarozun 200 nm’deki aktivitesi artan pH ile artmaktadır ve pH 12 maksimum absorbands göstererek bazik ortamda aktivitesinin artması bazik ortamda agarozun tamamen çözündüğü düşünüldü.

Hesperetin-PVA(~ 200 nm)/Agaroz mikroçubuklarının aktivite ve kararlılığı değişen pH ile daha detaylı olarak Şekil 4.63 ile gösterilmiştir.



Şekil 4.63 Hesperetin mikroçubukların pH değişimi ile aktivitesi

pH değişiminin Hesperetin-PVA(~200nm)/Agarose mikroçubuklarının yapısındaki sinnamoil den kaynaklı bant I (300-400nm) benzoilden kaynaklı bant II (240-300nm) e ait pikler Tablo 4.7 de özetlenmiştir. Tabloda “+” ilgili pikin absorpsiyon spektrumunda görülebildiğini, “-” ise görülemediğini ifade etmektedir.

Tablo 4.7 Hesperetin-PVA(~200 nm)/Agarose mikroçubukların UV/VIS piklerinin pH değişimi ile durumu

HESPERETİN-PVA(200nm)/AGAROS		
pH	Bant II (240-300nm)	Bant I (300-400nm)
2	+ (260 nm)	-
3	+ (255 nm)	-
4	+ (255 nm)	-
5	+ (255 nm)	-
6	+ (270 nm)	-
7	+ (270 nm)	+ (350 nm)
8	+ (245 nm)	+ (350 nm)
9	+ (245 nm, 290 nm)	+ (350 nm)
10	+ (245 nm, 290 nm)	+ (350 nm)
11	+ (245 nm, 290 nm)	+ (350 nm)
12	+ (245 nm, 290 nm)	+ (350 nm)

Hesperetin-PVA(~200 nm)/Agaroz mikroçubukların farklı pH'larda aktivite değişim sırası pH 6>7>9>12>10>8>2>11>3>4>5 şeklindedir. Sadece bant II pikleri göz önünde bulundurularak sıralama yapılmıştır.

Hesperetin-PVA(~200 nm)/Agaroz mikroçubuklarının benzoil gruplarına ait bant II pikleri pH 2-5 aralığında 255 nm de görülürken, pH 6 ve 7 de batokromik kayma yaparak daha yüksek dalga boyunda, 270 nm de görüldü ve ayrıca pH 6 da maksimum aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

pH 7-12 aralığında sinnamoil grubuna ait karakteristik pik 350 nm de görülmüştür. Benzoil grubuna ait karakteristik pikler pH 8-12 aralığında 245 nm ve 290 nm görülmekte olup benzoil grubunun aktivitesi azalırken sinnamoil grubunun aktivitesi artmış ve maksimum aktiviteyi pH 9 da göstermiştir.

Hesperetin-PVA(~200 nm)/Agaroz mikroçubukların çalışılan tüm pH aralığında bant II de absorbans yapması, A halkasındaki -OH yapıların aktif olduğunu göstermekte olup maksimum aktivitenin pH 6 da olduğu belirlendi. A halkasındaki iki -OH grubu nedeniyle pH 9 dan itibaren bant II aralığında iki farklı absorbans ölçülmüştür. pH 8 den itibaren bant I e denk gelen sinnamoil grubunun aktivitesinin başladığı ve maksimum aktiviteye pH 9 da ulaştığı belirlenmiştir.

Hesperetin-PVA(~200nm)/Agaroz mikroçubuklarının çalışılan pH aralığında zeta potansiyel değerleri ile aktivitesinin lineer korelasyon içinde olduğu belirlendi. pH 5 e kadar düşük zeta potansiyel ve düşük absorbans değerleri gözlenirken, pH 6 ve pH 7 de kararlılığın bant II etkisiyle, pH 8 ve daha üstü için bant I aktivitesi ile eşleştiği görüldü. Nitekim pH 9 da bant I maksimum absorbans verirken en büyük zeta potansiyel değeri ile de maksimum kararlılık söz konusudur.

4.3.3.4 Hesperetin-PVA(~200nm)/D-Mannitol Mikroçubukların farklı pH lardaki Kararlılığı ve Aktivitesi

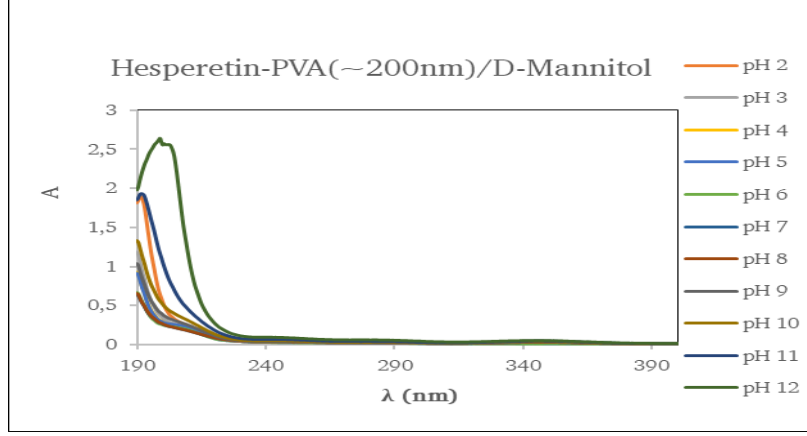
Hesperetin-PVA(~200nm)/D- Mannitol mikroçubuklarının polidispersite, partikül boyutu, mobilite ve zeta potansiyel değerleri farklı pH değerlerinde incelenmiş, Ölçümler Zetasizer cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar Tablo 4.8'de verilmiştir.

Tablo 4.8 Hesperetin-PVA (~200nm)/D-Mannitol mikroçubukların farklı pH lardaki Zetasizer ölçüm sonuçları

HESPERETİN-PVA(~200nm)/D-MANNİTOL				
pH	PDI	Partikül Boyutu (nm)	Mobilite	Zeta Potansiyeli (mV)
2	0.35	940	-0.13	-1.86
3	0.62	720	-0.21	-2.94
4	0.64	720	-0.87	-12.31
5	0.69	810	-1.44	-20.28
6	0.58	820	-2.38	-33.53
7	0.35	710	-3.68	-51.67
8	0.43	820	-2.89	-40.69
9	0.46	900	-2.39	-33.62
10	0.36	760	-2.36	-33.22
11	0.49	750	-1.16	-16.31
12	0.44	620	-1.30	-18.26

Tablo 4.8’de verildiği üzere Hesperetin-PVA(~200nm)/D-Mannitol mikroçubuklarının zeta potansiyel değeri pH 2 için -1.86 mV iken pH 7 ye kadar pH ile artmış, pH 7 den sonra pH artışıyla azalırken, maksimum kararlılığı pH 7 de göstermiştir. pH 4 dan itibaren kararlılığa sahip olan Hesperetin-PVA(~200nm)/D- Mannitol çubuklarının pH 11 den itibaren zeta potansiyel değerlerinde anlamlı bir düşüş gözlemlendi. Hesperetin-PVA (200nm)/D- Mannitol mikroçubukları çalışılan pH aralığında negatif yüklendiği belirlenmiştir.

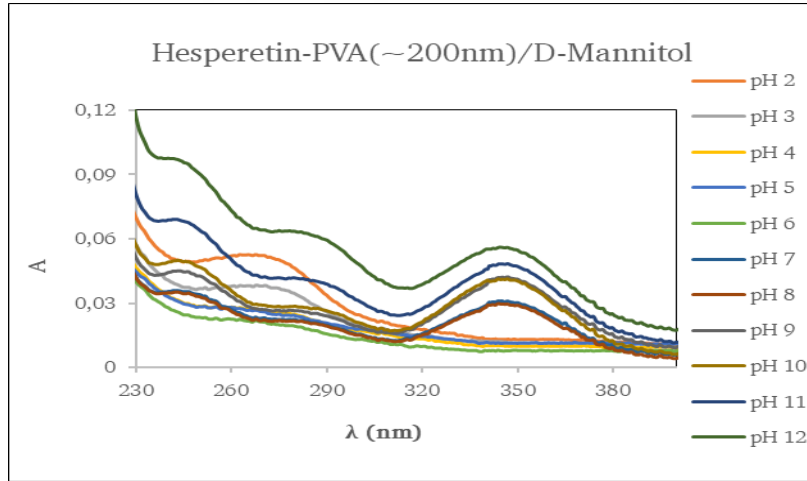
Tablo 4.8’de görüldüğü gibi Hesperetin-PVA(200nm)/D-Mannitol mikroçubukların polydispersite değerleri 0.35 ile 0.69 aralığında olup, Hesperetin-PVA (~200nm)/D-Mannitol mikroçubukları çalışılan pH aralığında suda monodispers dağılım gösterdiği ve partikül boyutunun ortalama 780 nm olduğu tespit edilmiştir. Hesperetin-PVA(~200nm)/D-Mannitol mikroçubuklarının farklı pH lardaki aktivitesi UV/VIS spektrofotometre cihazı ile ölçüldü ve sonuçlar Şekil 4.64’de verilmiştir.



Şekil 4.64 Hesperetin-PVA(~200nm)/D-Mannitol mikroçubuklarının farklı pH lardaki aktivitesi

Şekil 4.62' ye göre D-Mannitol ün yaklaşık 200 nm'deki aktivitesi artan pH ile artmaktadır ve pH 12 maksimum absorbands göstererek bazik ortamda aktivitesinin artması bazik ortamda D-Mannitolün tamamen çözündüğünü göstermektedir.

Hesperetin-PVA(~200nm)/D-Mannitol mikroçubuklarının aktivite ve kararlılığı değişen pH ile daha detaylı olarak Şekil 4.65 ile gösterilmiştir.



Şekil 4.65 Hesperetin mikroçubukların aktivitesinin pH ile değişimi

pH değişiminin Hesperetin-PVA(~200nm)/D-Mannitol mikroçubuklarının yapısındaki sinnamoil den kaynaklı bant I (300-400nm) ve benzoilden kaynaklı bant II (240-300nm) e ait pikler Tablo 4.9 da özetlendi. Tabloda “+” ilgili pikin absorpsiyon spektrumunda görülebildiğini, “-” ise görülemediğini ifade etmektedir.

Tablo 4.9 Hesperetin-PVA($\sim 200\text{nm}$)/D-Mannitol mikroçubukların UV/VIS piklerinin pH değişimi ile durumu

HESPERETİN-PVA($\sim 200\text{nm}$)/D-MANNİTOL		
pH	Bant II (240-300nm)	Bant I (300-400nm)
2	+ (270 nm)	-
3	+ (270 nm)	-
4	+ (270 nm)	-
5	+ (270 nm)	-
6	+ (270 nm)	-
7	+ (245 nm, 280 nm)	+ (345 nm)
8	+ (245 nm, 280 nm)	+ (345 nm)
9	+ (245 nm, 280 nm)	+ (345 nm)
10	+ (245 nm, 280 nm)	+ (345 nm)
11	+ (245 nm, 280 nm)	+ (345 nm)
12	+ (245 nm, 280 nm)	+ (345 nm)

Hesperetin-PVA($\sim 200\text{nm}$)/D-Mannitol mikroçubuklarının farklı pH larda aktivitelerinin sıralaması $\text{pH}=12>11>2>10>9>3>8>7>5>4>6$ şeklindedir. Sadece bant II pikleri göz ününde bulundurularak sıralama yapılmıştır.

Hesperetin-PVA($\sim 200\text{nm}$)/D-Mannitol mikroçubuklarının aktivitesi her iki bant aralığı için pH 12 de maksimumdur.

Hesperetin-PVA($\sim 200\text{nm}$)/D-Mannitol mikroçubuklarının benzoil gruplarına ait Band II pikleri pH 2-6 aralığında 270 nm de görülmüştür. Bu aralıkta pH arttıkça absorbans değeri düşmüş, aktivitesi azalmıştır. Bu pikin, pH 7 -12 de hem batokromik kayma yaparak daha yüksek dalga boyunda, 280 nm de, hem de hipsokromik kayma yaparak daha düşük dalga boyunda, 245nm de, görüldüğü ve aktivitesi arttığı saptanmıştır. pH 7-12 aralığında sinnamoil grubuna ait karakteristik pik 345 nm de görüldü ve maksimum aktivitenin pH 12 de olduğu belirlenmiştir.

Hesperetin-PVA($\sim 200\text{nm}$)/D-Mannitol mikroçubukların çalışılan tüm pH aralığında bant II de absorbans yapması, A halkasındaki $-\text{OH}$ yapıların aktif olduğunu göstermektedir. Asidik ortamda pH arttıkça aktivitesinin azaldığı, ancak pH 7 den itibaren benzoil grubundaki iki $-\text{OH}$ grubu nedeniyle iki ayrı absorbans

elde edilmiş ve bazik ortamda pH artışına bağlı olarak aktivitenin arttığı, maksimuma pH 12 de ulaştığı belirlenmiştir.

Çalışılan pH aralığında pH 6 ile pH 10 aralığında yüksek zeta potansiyel değerleri ile kararlılığa sahip olan Hesperetin mikroçubukların aktivitesi pH 6 için bant II den pH 7 ve pH 10 aralığında ise bant I ve bant II den kaynaklanmakta olduğu saptanmıştır.

4.3.4 Hesperetin Mikroçubuklarının PBS Çözeltisi İçindeki Kararlılığı ve Aktivitesinin Zamana Bağlı Değişimi

4.3.4.1 Hesperetin-PC2000 (~180nm) /Agaroz Mikroçubukların PBS içerisindeki Kararlılığı ve Aktivitesi

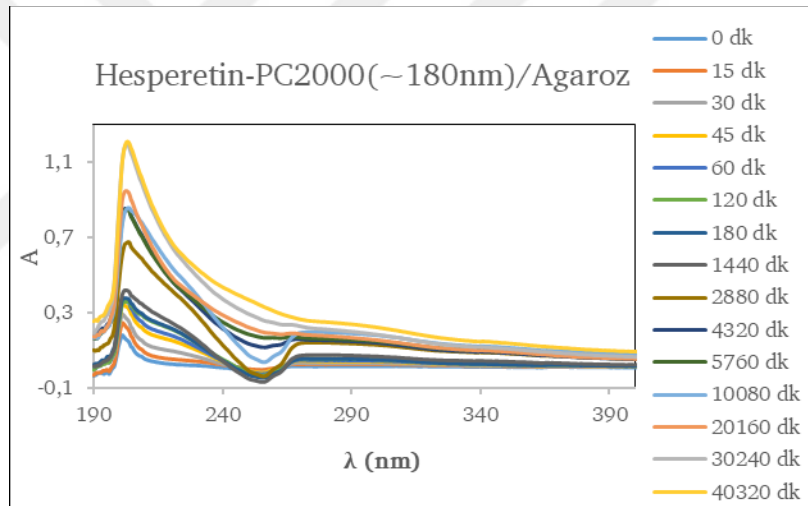
Hesperetin-PC2000(~180nm) /Agaroz mikroçubuklarının 37°C deki PBS çözeltisi içindeki polidispersitesi, partikül boyutu, mobilitesi ve zeta potansiyelinin zamana göre değişimi ölçülmüş ve sonuçlar Tablo 4.10 da verilmiştir.

Tablo 4.10 Hesperetin-PC2000(~180nm)/Agaroz mikroçubukların 37 °C deki PBS çözeltisi içerisindeki zetasizer ölçüm sonuçları

HESPERETİN-PC2000(~200nm)/AGARÖZ				
Zaman (dk)	PDI	Partikül Boyutu (nm)	Mobilite	Zeta Potansiyeli (mV)
0	0.30	350	-1.83	-19.24
15	0.34	370	-2.90	-30.53
30	0.41	590	-3.10	-32.61
45	0.40	600	-3.31	-34.86
60	0.35	660	-2.67	-27.26
120	0.37	360	-1.47	-15.50
180	0.38	380	-1.42	-14.91
1440	0.49	760	-1.81	-19.05
2880	0.74	370	-1.99	-20.96
4320	0.75	380	-2.26	-23.44
5760	0.58	610	-2.02	-20.92
10080(7.gün)	0.99	880	-1.51	-15.67
20160(14.gün)	0.37	1720	-1.89	-19.60
30240(21.gün)	0.39	3440	-2.02	-20.92
40320(28.gün)	0.40	1500	-2.30	-23.86

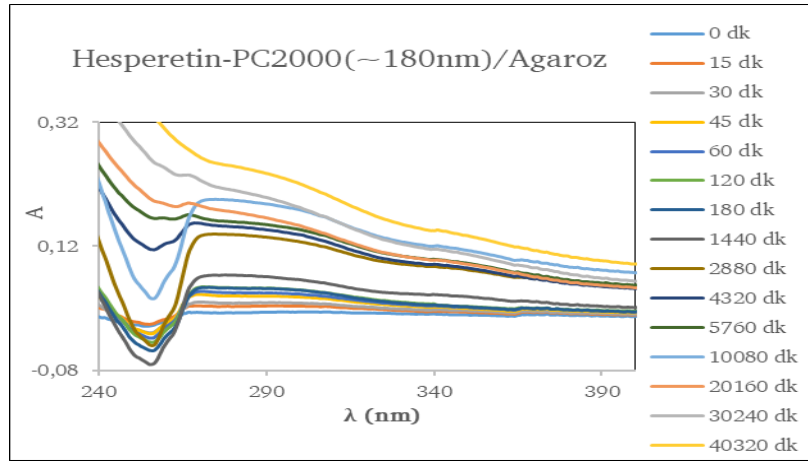
Tablo 4.10 da verildiği üzere Hesperetin-PC2000(~180nm)/Agaroz mikroçubukların 37 °C deki PBS çözeltisi içindeki zeta potansiyel değeri -14.91 ile -34.86 mV aralığında olduğu saptanmıştır. Hesperetin-PC2000(~180nm)/Agaroz mikroçubukların polidispersite değerleri 0.30 ile 0.99 aralığında olup, Hesperetin mikroçubukları 37 °C deki PBS çözeltisi içinde monodispers dağılım gösterdiği belirlenmiştir. Partikül boyutu 350 ile 3440 nm arasında değişmekte olup ortalama 860 nm partikül boyutuna sahip Hesperetin-PC2000(~180nm)/Agaroz mikroçubukların 37°C deki PBS çözeltisi içinde çalışılan zaman aralığında negatif yüklendiği tespit edilmiştir.

Agaroz ile stabilize edilmiş Hesperetin mikroçubuklarının 37°C deki PBS çözeltisi içindeki aktivitesi UV/VIS spektrofotometre cihazı ile ölçüldü ve sonuçlar Şekil 4.66'te verilmiştir.



Şekil 4.66 Hesperetin-PC2000(~180nm)/Agaroz mikroçubukların 37°C de PBS içindeki aktivitesinin zamana bağlı değişimi

Hesperetin mikroçubuklarının 37°C deki PBS içinde zamana bağlı değişimi daha belirgin olarak Şekil 4.67 ile gösterilmiştir.



Şekil 4.67 Hesperetin mikroçubuklarının 37 °C de PBS içindeki aktivitesinin zaman ile değişimi

37°C deki PBS içerisinde Hesperetin-PC2000(~180nm)/Agaroz mikroçubuklarının yapısındaki sinnamoil den kaynaklı bant I (300-400nm) benzoilden kaynaklı bant II (240-300 nm) e ait piklerin zamanla değişimi Tablo 4.11’te özetlenmiştir. Tabloda “+” ilgili pikin absorpsiyon spektrumunda görülebildiğini, “-” ise görülemediğini ifade etmektedir.

Tablo 4.11 Hesperetin-PC2000(~180nm)/Agaroz mikroçubukların 37°C de PBS içerisindeki UV/VIS piklerinin zamana göre durumu

HESPERETİN-PC2000(~180nm)/AGARÖZ		
Zaman (dk.)	Bant II (240-300nm)	Bant I (300-400nm)
0	-	-
15	+(270nm)	-
30	+(270nm)	-
45	+(270nm)	-
60	+(270nm)	-
120	+(270nm)	-
180	+(270nm)	-
1440	+(270nm)	-
2880	+(270nm)	-
4320	+(270nm)	-
5760	+(270nm)	-
10080(7.gün)	+(270nm)	-
20160(14.gün)	+(270nm)	-
30240(21.gün)	+(275nm)	-
40320(28.gün)	+(275nm)	-

Hesperetin-PC2000(~180nm)/Agaroz mikroçubukların zamana göre aktivite değişim sırası 40320 dk>30240 dk>10080 dk>20160 dk>5760 dk>4320 dk>2880 dk>1440 dk>120=180 dk>60 dk>45 dk>30 dk>15 dk>0 dk şeklindedir. Sadece bant II pikleri göz ününde bulundurularak sıralama yapılmıştır.

37°C deki PBS içerisinde Hesperetin-PC2000(~180nm)/Agaroz mikroçubuklarının, Hesperetinin benzoil kaynaklı yapısından meydana gelen aktivitesi 15.dk başlamış olup, izlenen tüm süreç boyunca devam etmiştir. İlk iki hafta 270 nm de pik verirken, son iki hafta boyunca batokromik kayma yaparak 275 nm de pik vermiştir.

Bant II aralığına ait pik 270 nm de 15. dk başlayıp süreç boyunca genel olarak absorbansı artarak devam etmiş, 30240. dk dan itibaren 275 nm ye batokromik kayma yapmış olduğu görüldü. Hesperetin-PC2000(~180nm)/Agaroz mikroçubuklarının aktivitesi izlenen süreç boyunca artış göstermiş ve maksimum aktiviteye 40320.dk da ulaşmıştır.

Çalışılan süre boyunca, sadece Bant II bölgesinde hiç absorbans yapmadığı, A halkasından dolayı aktif olduğu Hesperetinin sinnemoil yapısından kaynaklı Bant I bölgesinde ise absorbans yapmadığı, B halkasının aktif olmadığı belirlenmiştir.

Genel olarak, 37°C deki PBS içerisinde Hesperetin PC2000(~180nm)/Agaroz mikroçubukları kararlılıklarını çalışılan süre boyunca korurken, aktivitelerinin sadece A halkasından kaynaklandığı, 15. dk da başladığı ve 40320. dk ya kadar devam ettiği saptanmıştır.

4.3.4.2 Hesperetin-PC2000 (~180nm)/D-Mannitol Mikroçubukların PBS içerisindeki Kararlılığı ve Aktivitesi

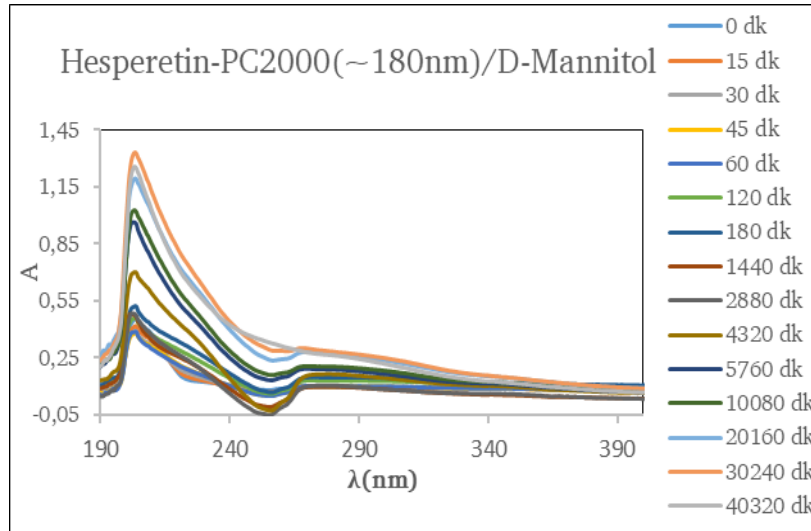
Hesperetin-PC2000(~180nm)/D-Mannitol mikroçubuklarının 37°C deki PBS çözeltisi içindeki polidispersitesi, partikül boyutu, mobilitesi ve zeta potansiyelinin zamana göre değişimi ölçüldü ve sonuçlar Tablo 4.12 da verilmiştir.

Tablo 4.12 Hesperetin-PC2000(~180nm)/D-Mannitol mikroçubukların 37 °C deki PBS çözeltisi içerisindeki zetasizer ölçüm sonuçları

HESPERETİN-PC2000(~180 nm)/ D-Mannitol				
Zaman (dk)	PDI	Partikül Boyutu (nm)	Mobilite	Zeta Potansiyeli (mV)
0	0.33	720	-2.96	-34.80
15	0.32	820	-3.42	-48.15
30	0.43	485	-2.37	-33.38
45	0.36	540	-2.34	-27.48
60	0.41	480	-1.57	-18.47
120	0.42	600	-2.24	-27.25
180	0.38	690	-2.75	-32.33
1440	0.36	750	-2.97	-31.19
2880	0.40	650	-2.77	-29.17
4320	0.44	760	-3.17	-33.31
5760	0.45	490	-2.80	-29.00
10080(7.gün)	0.41	670	-3.10	-31.03
20160(14.gün)	0.31	300	-2.24	-23.18
30240(21.gün)	0.70	880	-1.48	-15.29
40320(28.gün)	0.33	350	-2.95	-30.55

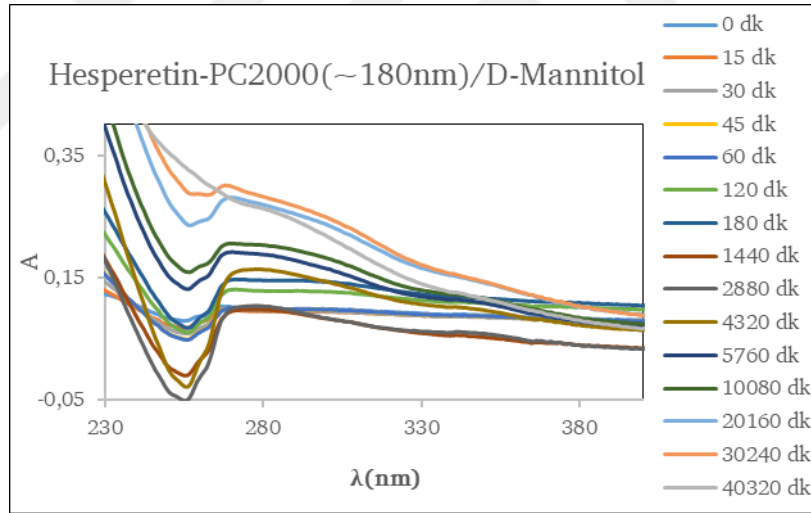
Tablo 4.12 de verildiği üzere Hesperetin-PC2000(~180nm)/D-Mannitol mikroçubuklarının 37 °C deki PBS çözeltisi içindeki zeta potansiyel değeri -15.29 ile -48.15 mV aralığındadır. Tablo 4.12’de görüldüğü gibi Hesperetin-PC2000(~180nm)/D-Mannitol mikroçubukların polidispersite değerleri 0.31 ile 0.70 aralığında olup, Hesperetin mikroçubukları 37 °C deki PBS çözeltisi içinde monodispers dağılım gösterdiği ve 300 ile 880 nm arasında değişen partikül boyutunun ortalama değerinin 610 nm olduğu belirlenmiştir. Çalışılan zaman aralığında Hesperetin-PC2000(~180nm)/D-Mannitol mikroçubukları 37 °C deki PBS çözeltisi içinde negatif yüklendiği sonucu elde edilmiştir.

Hesperetin-PC2000(~180nm)/D-Mannitol mikroçubuklarının 37 °C deki PBS çözeltisi içindeki aktivitesi UV/VIS spektrofotometre cihazı ile ölçüldü ve sonuçlar Şekil 4.68’da verilmiştir.



Şekil 4.68 Hesperetin-PC2000(~180nm)/D-Mannitol mikroçubukların 37 °C PBS içindeki aktivitesinin zamana bağlı değişimi

Hesperetin mikroçubuklarının 37 °C deki PBS içinde zamana bağlı değişimi daha belirgin olarak Şekil 4.69 ile gösterilmiştir.



Şekil 4.69 Hesperetin mikroçubukların 37°C PBS içindeki aktivitesinin zamana bağlı değişimi

37°C deki PBS içerisinde Hesperetin-PC2000(180nm)/D-Mannitol mikroçubuklarının yapısındaki sinnamoil den kaynaklı bant I (300-400nm) benzoilden kaynaklı bant II (240-300nm) e ait piklerin zamanla değişimi Tablo 4.13'te özetlenmiştir. Tabloda “+” ilgili pikin absorpsiyon spektrumunda görülebildiğini, “-” ise görülemediğini ifade etmektedir.

Tablo 4.13 Hesperetin-PC2000(~180nm)/D-Mannitol mikroçubukların 37°C de PBS içerisindeki UV/VIS piklerinin zamana göre durumu

HESPERETİN-PC2000(~180nm)/D-MANNİTOL		
Zaman (dk.)	Bant II (240-300nm)	Bant I (300-400nm)
0	+(270nm)	-
15	+(270nm)	-
30	+(270nm)	-
45	+(270nm)	-
60	+(270nm)	-
120	+(270nm)	-
180	+(270nm)	-
1440	+(270nm)	-
2880	+(270nm)	-
4320	+(270nm)	+(340nm)
5760	+(270nm)	+(340nm)
10080(7.gün)	+(270nm)	+(340nm)
20160(14.gün)	+(270nm)	+(340nm)
30240(21.gün)	+(270nm)	-
40320(28.gün)	+(270nm)	-

Hesperetin-PC2000(~180nm)/D-Mannitol mikroçubukların zamana göre aktivite değişim sırası 30240 dk>20160 dk>40320 dk>10080 dk>5760 dk>4320 dk>180 dk>120 dk>2880 dk>0 dk>45 dk=60 dk>30 dk>15 dk>1440 dk şeklindedir. Sadece bant II pikleri göz ününde bulundurulularak sıralama yapılmıştır.

37°C deki PBS içerisinde Hesperetinin aktivitesi 0 dk dan itibaren başlamış olup takip edilen süre boyunca devam etmiştir. 0. dk dan itibaren 270 nm de pik oluşturmuş ve 40320.dk ya kadar bu dalga boyunda aktivitesi artarak devam etmiştir. Maksimum aktiviteyi 30240.dk da göstermiştir.

Hesperetinin sinnemoil kısmından kaynaklanan aktivitesi ise 4320 dk ile 20160 dk arasında 340 nm deki pik ile gözlenmiştir.

Sonuç olarak ; 37°C deki PBS içerisinde Hesperetin PC2000(~180nm)/D-mannitol mikroçubukları çalışılan süre boyunca hem kararlılıklarını koruduğu hem de aktif oldukları saptanmıştır.

4.3.4.3 Hesperetin-PVA(~200nm) /Agaroz Mikroçubukların PBS içerisindeki Kararlılığı ve Aktivitesi

Hesperetin-PVA(~200nm)/Agaroz mikroçubuklarının 37 °C deki PBS çözeltisi içindeki polidispersitesi,partikül boyutu,mobilitesi ve zeta potansiyelinin zamana göre değişimi ölçülmüş ve sonuçlar Tablo 4.14'te verilmiştir.

Tablo 4.14 Hesperetin-PVA(~200 nm)/Agaroz mikroçubukların 37 °C deki PBS çözeltisi içerisindeki Zetasizer ölçüm sonuçları

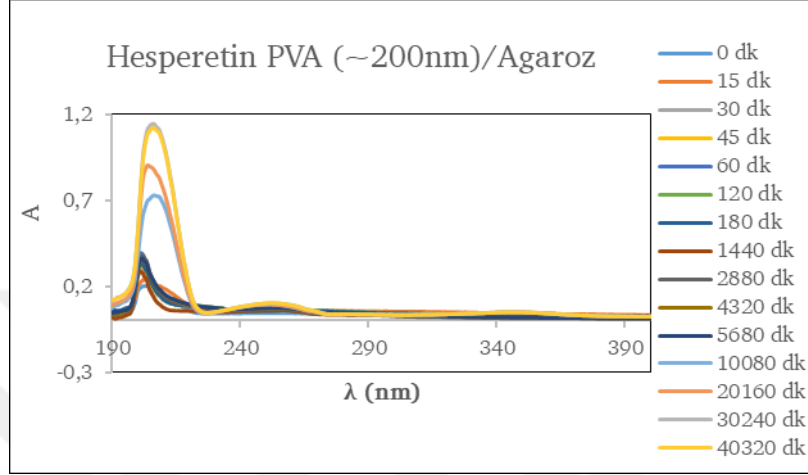
HESPERETİN-PVA (~200 nm)/ AGARÖZ				
Zaman (dk)	PDI	Partikül Boyutu (nm)	Mobilite	Zeta Potansiyeli (mV)
0	0.43	750	-3.49	-36.12
15	0.42	710	-2.99	-30.97
30	0.46	610	-3.86	-39.97
45	0.43	750	-2.93	-30.35
60	0.43	740	-3.75	-43.33
120	0.35	960	-3.08	-35.61
180	0.33	810	-2.40	-27.69
1440	0.36	810	-4.68	-48.49
2880	0.40	730	-3.64	-37.63
4320	0.34	560	-3.08	-31.84
5760	0.39	560	-4.14	-42.80
10080(7.gün)	0.42	430	-3.85	-39.40
20160(14.gün)	0.36	490	-2.61	-27.03
30240(21.gün)	0.51	550	-2.79	-28.93
40320(28.gün)	0.40	510	-2.62	-27.07

Tablo 4.14 de verildiği üzere Hesperetin-PVA(~200nm)/Agaroz mikroçubuklarının 37 °C deki PBS çözeltisi içindeki zeta potansiyel değeri -27.03 ile -48.49 mV aralığındadır. Hesperetin-PVA(200 nm)/Agaroz mikroçubukları çalışılan süre boyunca negatif yüklendiği ve maksimum kararlılığı 1440. dk da gösterdiği belirlenmiştir. Hesperetin-PVA(200 nm)/Agaroz 37°C deki PBS içerisinde 4 hafta boyunca kararlılığını koruduğu gözlenmiştir.

Hesperetin-PVA(200 nm)/Agaroz mikroçubukların polydispersite değerleri 0.33 ile 0.51 aralığında olup, Hesperetin-PVA(200 nm)/Agaroz mikroçubukları 37 °C deki PBS çözeltisi içinde monodispers dağılım gösterdiği ve partikül boyutunun

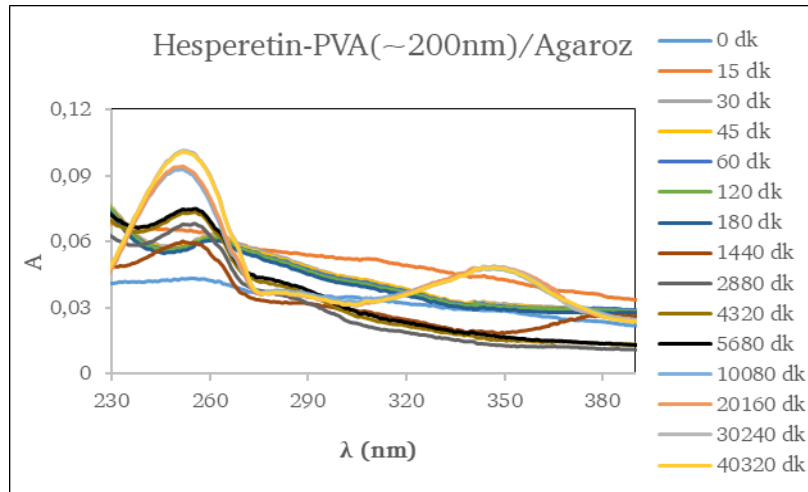
430 ile 960 nm arasında değişerek ortalama 670 nm olduğu saptanmıştır (Tablo 4.14).

Hesperetin-PVA(~200nm)/Agaroz mikroçubuklarının 37°C deki PBS çözeltisi içindeki aktivitesi UV/VIS spektrofotometre cihazı ile ölçölmüş ve sonuçlar Şekil 4.70’de verilmiştir.



Şekil 4.70 Hesperetin-PVA(~200nm)/Agaroz mikroçubukların 37 °C PBS içerisindeki aktivitesi

Şekil 4.70 e göre Agarozun yaklaşık 200 nm’deki aktivitesi zaman ile artmakta olduğu ve 30240. dk da maksimum absorbans göstererek 37°C deki PBS içerisinde tamamen çözöndüğü belirlenmiştir.Hesperetin mikroçubukların 37°C de PBS içindeki zamana bağlı aktivitesi Şekil 4.71 de daha belirgin bir şekilde verilmiştir.



Şekil 4.71 Hesperetin mikroçubukların 37 °C de PBS içindeki aktivitesinin zaman ile değişimi

Zamanın 37 °C deki PBS içerisindeki Hesperetin-PVA(200nm)/Agaroz mikroçubuklarının yapısındaki sinnamoilden kaynaklı bant I (300-400nm) benzoilden kaynaklı bant II (240-300nm) e ait piklere etkisi Tablo 4.15 te özetlenmiştir. Tabloda “+” ilgili pikin absorpsiyon spektrumunda görülebildiğini, “-“ ise görülemediğini ifade etmektedir.

Tablo 4.15 Hesperetin-PVA(~200nm)/Agaroz mikroçubukların 37°C de PBS içerisindeki UV/VIS piklerinin zamana göre durumu

HESPERETİN-PVA(~200nm)/AGARÖZ		
Zaman (dk.)	Bant II (240-300nm)	Bant I (300-400nm)
0	+ (255 nm)	-
15	+ (255 nm)	-
30	+ (260 nm)	-
45	+ (260 nm)	-
60	+ (260 nm)	-
120	+ (260 nm)	-
180	+ (260 nm)	-
1440	+ (255 nm)	+ (375 nm)
2880	+ (255 nm,275 nm)	-
4320	+ (255 nm,275 nm)	-
5760	+ (255 nm,275 nm)	+ (350 nm)
10080(7.gün)	+ (250 nm,290 nm)	+ (350 nm)
20160(14.gün)	+ (250 nm,290 nm)	+ (350 nm)
30240(21.gün)	+ (250 nm,290 nm)	+ (350 nm)
40320(28.gün)	+ (250 nm,290 nm)	+ (350 nm)

Hesperetin-PVA(~200 nm)/Agaroz mikroçubukların zamana göre aktivite değişim sırası 40320 dk =30240>20160 dk>10080 dk>5760 dk>4320 dk>2880 dk>30 dk>45 dk>120 dk=60 dk>180 dk=1440 dk>180 dk>15 dk>0 dk şeklindedir. Sadece bant II pikleri göz önünde bulundurularak sıralama yapılmıştır.

0 dk, 15 dk da bant II aralığında 255 nm de belli belirsiz bir pik gözlemlenmiştir. 30 dk, 45 dk, 60 dk, 120 dk ve 180 dk için Hesperetin-PVA(~200nm)/Agaroz mikroçubukları, benzoil kaynaklı bant II de UV dalga boyu yaklaşık 260 nm de

görülen pik. 1440. dk dan itibaren 255 nm ye hipsokromik kayma yaptığı saptanmıştır. 2880 dk, 4320 dk, 5760 dk. da ise aynı pik hem 255nm de hem de batokromik kayma yapmak suretiyle 275nm de iki ayrı pik olarak gözlemlenmiştir. Bu piklerin 10080 dk, 20160 dk, 30240 dk, ve 40320 dk ise 250 nm ye hipsokromik kayma ,290 nm ye batokromik kayma yaptığı belirlenmiştir. 250nm deki pik 30240 dk ve 40320 dk larda, maksimum aktiviteye ulaşırken 290nm dalgaboyundaki pik 30 dk da yakaladığı maksimum aktiviteyi ancak 180. dk ya kadar korumuştur.

Hesperetin-PVA(~200nm)/Agaroz mikroçubukları sinnamoil yapıdan kaynaklanan bant I aralığındaki pik ilk olarak 1440 dk da 375 nm de omuz olarak gözlenmiş ancak sonrasında sönümlenmiştir. 5760 dk da 350 nm de tekrar absorbansın başladığı, 40320 dk ya kadar devam ettiği ve maksimum aktiviteye 10080 dk ulaşır 40320 dk ya kadar koruduğu saptanmıştır.

Hesperetin-PVA(~200nm)/Agaroz mikroçubukların 37°C deki PBS içerisinde 0 dk. dan itibaren bant II den kaynaklı aktivitesi başlamış olup, artarak devam etmiştir. 5760. dk. dan itibaren bant I bölgesindeki aktivitesinin başlamasıyla beraber maksimum aktiviteyi üç ve dördüncü haftalarda göstermiştir. Çalışılan süre boyunca benzoil kısmı sürekli, sinnamoil kısım ise 1440 dk dan itibaren aktivite göstermiştir.

Hesperetin-PVA(~200nm)/Agaroz mikroçubukların bant II den kaynaklanan aktivitesi 5760. dakikaya kadar zamanla artarken bu zaman süresince zeta potansiyel değerleri birbirine çok yakın olup kararlı aralıktadır. Bant I de yaklaşık 375 nm de omuz oluşturduğu 1440. dk da maksimum zeta potansiyeli ile iyi kararlılığa sahiptir. 10080 dk dan itibaren bant I deki absorbans sabit kalırken bant II deki absorbans artmasına rağmen zeta potansiyel değerinin iyi kararlılık aralığında kalmak suretiyle azaldığı görülmüştür.

4.3.4.4 Hesperetin-PVA(~200nm)/D-Mannitol Mikroçubuklarının PBS Çözeltisi İçindeki Kararlılığı ve Aktivitesinin Zamana Bağlı Değişimi

Hesperetin-PVA(~200nm)/D-Mannitol mikroçubuklarının 37°C deki PBS çözeltisi içindeki polidispersitesi, partikül boyutu, mobilitesi ve zeta potansiyelinin zamana göre değişimi ölçülmüş ve sonuçlar Tablo 4.16'da verilmiştir.

Tablo 4.16 Hesperetin-PVA(~200nm)/D-Mannitol mikroçubukların 37 °C deki PBS çözeltisi içerisindeki Zetasizer ölçüm sonuçları

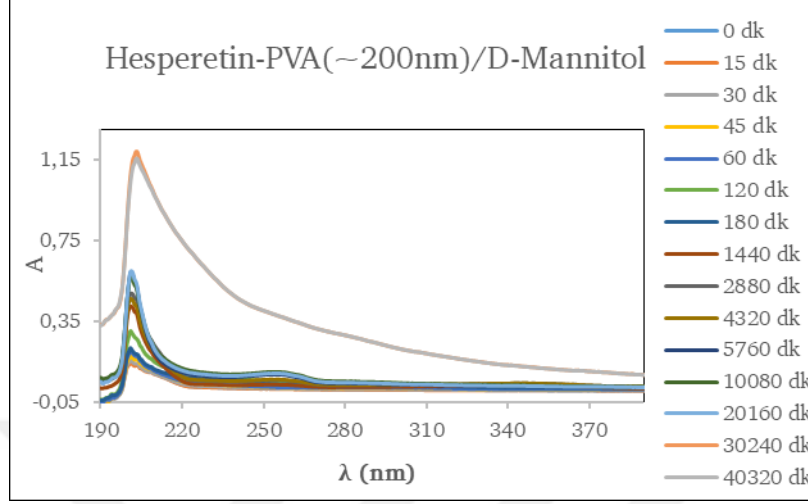
HESPERETİN-PVA(~200 nm)/ D-Mannitol PBS				
Zaman (dk)	PDI	Partikül Boyutu (nm)	Mobilite	Zeta Potansiyeli (mV)
0	0.31	970	-3.70	-38.31
15	0.44	960	-2.98	-30.84
30	0.41	830	-3.84	-39.73
45	0.40	910	-3.94	-40.79
60	0.45	700	-3.46	-35.82
120	0.47	630	-3.44	-35.60
180	0.54	850	-3.61	-37.32
1440	0.39	490	-2.22	-32.98
2880	0.37	430	-3.42	-35.39
4320	0.93	530	-4.11	-42.56
5760	0.39	550	-3.01	-31.20
10080(7.gün)	0.40	730	-3.23	-33.42
20160(14.gün)	0.34	660	-2.21	-22.88
30240(21.gün)	0.35	900	-2.87	-29.71
40320(28.gün)	0.36	990	-1.98	-20.52

Tablo 4.16 da verildiği üzere Hesperetin-PVA(~200nm)/D-Mannitol mikroçubuklarının 37 °C deki PBS çözeltisi içindeki zeta potansiyel değerleri -20.52mV ile -42.56 mV aralığında olup maksimum kararlılığa 4320. dk da ulaşmıştır.

Tablo 4.16 de görüldüğü gibi Hesperetin-PVA(~200nm)/D-Mannitol mikroçubukların polydispersite değerleri 0.31 ile 0.93 aralığında olup, 37 °C deki PBS çözeltisi içinde monodispers dağılım göstermiştir ve partikül boyutu 430 nm ile 990 nm arasında değişmekte olup ortalama 740 nm dir. Çalışılan zaman aralığında Hesperetin-PVA(~200nm)/D-Mannitol mikroçubukları 37 °C deki PBS çözeltisi içinde negatif yüklendiği belirlenmiştir.

Hesperetin-PVA(~200nm)/D-Mannitol mikroçubukları 37 °C deki PBS çözeltisi içinde 20160 dk ya kadar iyi kararlı olup 40320. dk ya kadar kararlılığını koruduğu saptanmıştır.

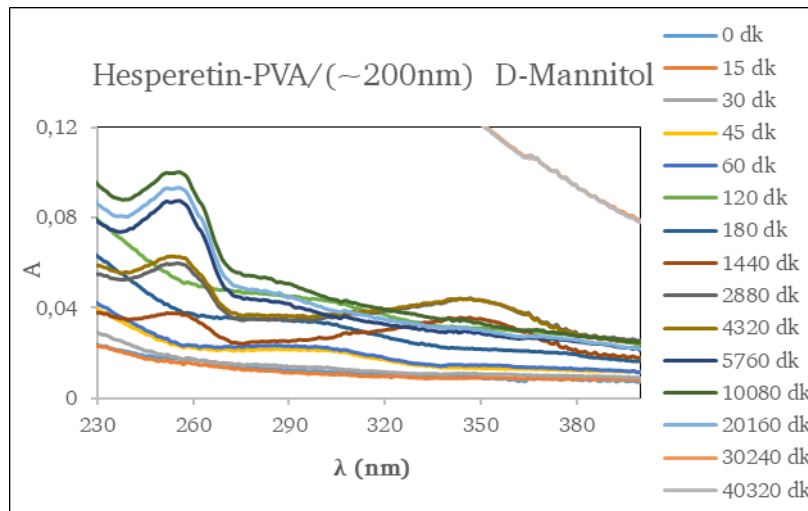
Hesperetin-PVA($\sim 200\text{nm}$)/D-Mannitol mikroçubuklarının 37°C deki PBS çözeltisi içindeki aktivitesi UV/VIS spektrofotometre cihazı ile ölçülmüş ve sonuçlar Şekil 4.72’de verilmiştir.



Şekil 4.72 Hesperetin-PVA($\sim 200\text{nm}$)/D-Mannitol mikroçubukların 37°C PBS içerisindeki aktivitesi

Şekil 4.70’e göre D-Mannitolun yaklaşık 200 nm ’deki aktivitesi zaman ile artmaktadır ve 30240. dk da maksimum absorbans göstererek 37°C deki PBS içerisinde tamamen çözündüğü belirlenmiştir.

Hesperetin-PVA($\sim 200\text{nm}$)/D-Mannitol mikroçubukların 37°C de PBS içindeki zamana bağlı aktivitesi Şekil 4.73 te daha belirgin bir şekilde verilmiştir.



Şekil 4.73 Hesperetin mikroçubukların 37°C de PBS içindeki aktivitesinin zaman ile değişimi

Zamanın 37 °C deki PBS içerisindeki Hesperetin-PVA(~200nm)/D-Mannitol mikroçubuklarının yapısındaki sinnamoil den kaynaklı bant I (300-400nm), benzoilden kaynaklı bant II (240-300nm) e ait piklere etkisi Tablo 4.17 te özetlenmiştir. Tabloda “+” ilgili pikin absorpsiyon spektrumunda görülebildiğini, “-“ ise görülemediğini ifade etmektedir.

Tablo 4.17 Hesperetin-PVA(~200nm)/D-Mannitol mikroçubukların 37°C de PBS içerisindeki UV/VIS piklerinin zamana göre durumu

HESPERETİN-PVA(~200nm)/D-MANNİTOL		
Zaman (dk.)	Bant II (240-300 nm)	Bant I (300-400nm)
0	-	-
15	-	-
30	-	-
45	+ (295 nm)	-
60	+ (295 nm)	-
120	+ (295 nm)	-
180	+ (295 nm)	-
1440	+ (255 nm)	+ (345 nm)
2880	+ (255 nm)	+ (345 nm)
4320	+ (255 nm)	+ (345 nm)
5760	+ (255 nm)	-
10080(7.gün)	+ (255 nm)	-
20160(14.gün)	+ (255 nm)	-
30240(21.gün)	-	-
40320(28.gün)	-	-

Hesperetin-PVA(~200nm)/D-Mannitol mikroçubukların zamana göre kararlılığının değişim sırası 10080 dk>20160 dk>5760 dk>4320 dk>2880 dk>120 dk>180 dk>1440 dk>60 dk>45 dk şeklindedir. Sadece bant II pikleri göz ününde bulundurularak sıralama yapılmıştır.

Hesperetin-PVA(~200nm)/D-Mannitol mikroçubukları için ilk 45 dk. herhangi bir aktivite gözlemlenmemiştir. 45. dk dan itibaren yaklaşık 295 nm de bant II bölgesinde aktivite başlamış ve absorbans değeri zamanla artmıştır. 1440. dk.

itibaren bant II bölgesindeki pik yaklaşık 255 nm dalga boyuna hipsokromik olarak kaymış ve en büyük absorbans değeri 10080. dk da alınmıştır.

Bant I bölgesindeki sinnamoil kaynaklı pik ilk olarak 1440. dk. da gözlemlenmiş olup, dalgaboyu yaklaşık 345 nm dir. Maksimum absorbansa 2340 ve 4320.dk. ulaşmıştır.

30240 ve 40320. dk. da her iki bantta da herhangi bir pik gözlenmemiştir.

Hesperetin-PVA(~200nm)/D-Mannitol mikroçubukların 37 °C deki PBS içerisinde 45 dk. dan itibaren bant II den kaynaklı aktivitesi başlamış olup 30240. dk. ya kadar artarak devam etmiştir. 1440 dk. da başlayan bant I bölgesindeki aktivite 5760. dk. da durmasıyla beraber bant II deki aktivite anlamlı bir artış göstermiştir. 30240. dk. dan itibaren her iki bant aralığında da pik gözlemlenmemiş ve Hesperetin-PVA(~200nm)/D-Mannitol mikroçubukların salınımı durmuştur.

Hesperetin-PVA(~200nm)/D-Mannitol mikroçubukları çalışılan aralıkta kararlı olup maksimum kararlılığı gösterdiği 4320. dk da bant I deki aktivitenin de maksimum olduğu gözlemlenmiştir.

Bununla beraber, Hesperetin-PVA(~200nm)/Agaroz mikroçubuklarının ve Hesperetin-PVA(~200nm)/D-Mannitol mikroçubuklarının maksimum zeta potansiyeli ile kararlılığa sahip olduğu durumlarda hem bant I hem de bant II de aktif oldukları saptanmıştır. Ancak Hesperetin PC2000(~180nm)/Agaroz ve Hesperetin PC2000(~180nm)/D-mannitol mikroçubukların pH değişimine karşı bant I ve bant II aktivitelerinin maksimum zeta potansiyel değerlerine karşılık gelirken, 37 °C deki PBS içerisindeki maksimum zeta potansiyel kararlılığı sadece Bant II deki aktivitelerinden kaynaklandığı tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, Hesperetinin benzoil kısmından kaynaklı bant II deki aktivitesi göz önüne alındığında; Hesperetin-PC2000(~180nm)/Agaroz mikroçubukların aktivitesinin pH 5 de maksimum pH 6 da ise minimum; Hesperetin-PC2000(~180nm)/D-Mannitol mikroçubukların aktivitesinin pH 12 de maksimum pH 7 de ise minimum, Hesperetin-PVA(~200nm)/Agaroz mikroçubukların aktivitesinin pH 6 da maksimum , pH 5 de minimum, Hesperetin-PVA(~200nm)/D-Mannitol mikroçubukların aktivitesinin pH 12 de maksimum, pH 6 da minimum iken; 37°C deki PBS içerisinde, Hesperetin-

PC2000($\sim 180\text{nm}$)/Agaroz mikroçubukların 0.dk da başlayan aktivitesinin 40320. dk da maksimum, Hesperetin-PC2000($\sim 180\text{nm}$)/D-Mannitol mikroçubukların 0.dk da başlayan aktivitesinin 30240.dk da maksimum, Hesperetin-PVA($\sim 200\text{nm}$)/Agaroz mikroçubukların 0. dk da başlayan aktivitesi 30240. dk ve 40320 da maksimum, Hesperetin-PVA($\sim 200\text{nm}$)/D-Mannitol mikroçubukların 45.dk da başlayan aktivitesinin ise 10080. dk da maksimum olduğu saptanmıştır. Ayrıca Hesperetin-PVA($\sim 200\text{nm}$)/D-Mannitol un ilk 30 dk aktivite göstermediği ve 30240. Dk da aktivitesini kaybettiği tespit edilmiştir.



Bu çalışmada, Hesperetin-PC2000 ve Hesperetin PVA olmak üzere iki farklı nanosüspansiyondan Template-assisted tekniğin infiltrasyon yaklaşımı ile iki farklı doğal biyomalzeme olan agaroz ve d-Mannitol ile stabilizasyonu yoluyla Hesperetin mikroçubukları elde edilmiş ve bu mikroçubukların karakterizasyonu yapılmıştır.

Hesperetin-PC2000(~180nm) nanosüspansiyonundan; 0.1 mg/mL Hesperetin-PC2000(~180nm) nanosüspansiyon hazırlanıp, 2 kere 3mL infiltrasyonu, agarozla ve d-mannitol ile stabilizasyonu ve her defasında 2mL kloroform+ toluen (1:2) karışımında çözülüp, 2500 rpm 20 dk 20 °C ayarları ile toplam 3 kere santrifüjlenmesiyle Hesperetin-PC2000(~180nm)/Agaroz ve Hesperetin-PC2000(~180nm)/D-Mannitol mikroçubukları elde edilmiştir.

Hesperetin-PVA(~200nm) nanosüspansiyonundan; 0.2 mg/mL Hesperetin-PVA(~200nm) nanosüspansiyon hazırlanıp, 3 kere 3mL infiltrasyonu, agarozla ve d-mannitol ile stabilizasyonu ve her defasında 2mL kloroform+ toluen (1:2) karışımında çözülüp, 2500 rpm 20 dk 20 °C ayarları ile toplam 3 kere santrifüjlenmesiyle Hesperetin-PVA(~200nm)/Agaroz ve Hesperetin-PVA(~200nm)/D-Mannitol mikroçubukları elde edilmiştir.

Sayım sonuçlarına göre, Hesperetin-PVA(~200nm)/Agaroz mikroçubukları %74 ile en büyük verime sahiptir. Bununla beraber Hesperetinin PVA ile çözünürlüğü sağlanmış nanosüspansiyonundan, PC2000 ile çözünürlüğü sağlanmış olan nanosüspansiyonunun yaklaşık üç katı kadar Hesperetin etken maddesi infiltre edilmiş olması, Hesperetin-PVA(~200nm)/Agaroz ve Hesperetin-PVA(~200nm)/D-mannitol mikroçubukların, Hesperetin-PC2000(~180nm)/Agaroz ve Hesperetin-PC2000(~180nm)/D-Mannitol mikroçubuklardan daha fazla miktarda Hesperetin etken maddesinden oluşmuş olduğunu göstermektedir. Buna bağlı olarak, Hesperetin-PVA(~200nm)/Agaroz

mikroçubuklar, hem sayıca en fazla hem de Hesperetin miktarı açısından en zengin mikroçubuklardır.

Mikroçubukların boy/en oranları genel olarak birbirine yakın olup ortalama olarak en yüksek boy/en oranına Hesperetin-PVA(~200nm)/D-mannitol mikroçubukları sahiptir. En/boy oranlarının 2.0 ile 3.5 arasında yoğunlaşmış olması literatürdeki çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda Hesperetin mikroçubukların, küresel muadillerine göre daha başarılı sonuçlar verebileceğini göstermektedir[56, 57, 192].

Hesperetin mikroçubukların değişen pH ile davranışları ele alındığında genel olarak, Hesperetin-PVA(~200nm)/Agaroz pH 4 ile pH 12 arasında, Hesperetin-PVA(~200nm)/D-mannitol pH 4 ile pH 12, Hesperetin-PC2000(~180nm)/Agaroz pH 2 ile pH 12 ve Hesperetin-PC2000(~180nm)/D-Mannitol pH 4 ile pH 12 arasında kararlıdır.

Pulmoner yolla ilaç alımı özelinde bakıldığında, pH 7 de[193] tüm Hesperetin mikroçubukların yüksek kararlılığa sahip ve aktif olduğu saptanmıştır. Yine pH 7'de tüm Hesperetin mikroçubuklardaki Hesperetin etken maddesinin hem benzoil hem de sinnemoil kısmı aktif olup, antioksidan etkisi yapısındaki tüm -OH lar ve -CH tan kaynaklanmaktadır.

Aynı pH ta Hesperetin etken maddesinin partikül boyutunun 1 μ m nin altında olması da elde edilen tüm Hesperetin mikroçubukların pulmoner yolla alımına uygun olduğunu göstermektedir.

37°C deki PBS içerisindeki davranışlarına göre; çalışılan süre boyunca, Hesperetin-PVA(~200nm) den elde edilen mikroçubukların zeta potansiyel değerleri daha yüksek olmakla beraber tüm Hesperetin mikroçubukların kararlı ve aktif oldukları belirlenmiştir. Hesperetin-PC2000(~180nm)/Agaroz mikroçubuklarda sadece Benzoil kısmındaki -OH, diğer tüm mikroçubuklarda hem sinnemoil hem de benzoil halkasındaki -OH ların aktif olduğu saptanmıştır. Hesperetin mikroçubukların aktivitesinin öncelikle benzoil kısmıyla başlamış olması, ilerleyen süreçte sinnemoil kısmının dahil olması, literatürdeki Hesperetin antioksidan etkisinin kaynağı olarak öncelikle 7-OH grubu olduğu ve B halkasının daha sonra devreye girdiği bilgisiyle paralellik göstermiştir[174].

Hesperetin-PC2000(~180nm)/Agaroz mikroçubuklarındaki Hesperetin etken maddesinin partikül boyutlarının ikinci haftadan itibaren iki katına çıkması muhtemel bir koagülasyonun başladığını düşündürse de, herhangi bir çökelmenin olmaması çalışılan süre aralığında nanosüspansiyonun kararlılığını koruduğunu göstermektedir. Diğer tüm Hesperetin mikroçubukların partikül boyutları çalışma süresi boyunca 1µm nin altındadır.

37°C pH 7.4±0.1 ortam koşullarında, Hesperetin mikroçubuklarından Hesperetin etken ilaç maddesinin salınımı; Hesperetin-PC2000(~180nm)/Agaroz mikroçubuklarından 15.dk da, Hesperetin-PC2000(~180nm)/D-mannitol ve Hesperetin-PVA(~200nm)/Agaroz mikroçubuklarından 0.dk da başlamış ve dört hafta boyunca devam etmiştir. Hesperetin-PVA(~200nm)/D-mannitol mikroçubuklarından ise 45.dk da başlamış, 30240.dk da sona ermiştir.

Plantacare2000, doğal ve biyobozunur olduğu için tercih edilmek istense bile, mikroçubukların içerdiği etken madde miktarı ve verim düşünüldüğünde, PVA ile stabilize edilmiş nanosüspansiyondan mikroçubuk eldesi daha mantıklıdır. Bununla beraber, mikroçubuk uzunluğu ve vücut sıvısındaki aktiviteleri düşünüldüğünde, her ne kadar D-Mannitol halihazırda burun tıkanıklığını giderici,ödem çözücü sprey olarak kullanılması onu cazip kılsa da, mikroçubuk uzunluğu ve aktivitesinin hemen başlayıp uzun sürmesi açısından, Hesperetin-PVA(~200nm)/Agaroz mikroçubukları tercih edilebilir. Ayrıca Hesperetin-PVA(~200nm)/Agaroz mikroçubuklarının, Hesperetin-PVA(~200nm)/D-Mannitol mikroçubuklarındakinden daha uzun olması avantajı da söz konusudur.

Tüm bu veriler ışığında, elde edilen tüm Hesperetin mikroçubukların, pulmoner yolla alıma uygun olup, akciğer koşullarında, yapılarındaki radikal süpürme yeteneğine sahip -OH ve -CH gruplarının aktif olmasıyla, akciğerde antioksidan, antiinflamatuvar ve antikanserojen etki göstereceği ve solunum yolu hastalıkları tedavisinde oldukça etkili olacağı düşünülmüştür.

Sonuç olarak, her iki nanosüspansiyondan da hem agaroz hem de d-mannitol kullanılarak; astım,KOAH, akciğer kanser tedavisi yanısıra pek çok metabolik hastalığın tedavisi amacıyla kullanılmak üzere, pulmoner yolla alıma uygun

antioksidan, antiinflamatuvar, antikanserojen vs gibi terapötik etkileri olan Hesperetin ilaç etken maddesi mikroçubuklar şeklinde başarıyla elde edilmiştir.



- [1] L. N. Bodduluru, E. R. Kasala, C. C. Barua, K. C. Karnam, V. Dahiya, and M. Ellutla, "Antiproliferative and antioxidant potential of hesperetin against benzo (a) pyrene-induced lung carcinogenesis in Swiss albino mice," *Chemico-biological interactions*, vol. 242, pp. 345-352, 2015.
- [2] F. Balkwill, "TNF- α in promotion and progression of cancer," *Cancer and Metastasis Reviews*, vol. 25, pp. 409-416, 2006.
- [3] H. Slika, H. Mansour, N. Wehbe, S. A. Nasser, R. Iratni, G. Nasrallah, *et al.*, "Therapeutic potential of flavonoids in cancer: ROS-mediated mechanisms," *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 146, p. 112442, 2022.
- [4] W. Kong, X. Ling, Y. Chen, X. Wu, Z. Zhao, W. Wang, *et al.*, "Hesperetin reverses P-glycoprotein-mediated cisplatin resistance in DDP-resistant human lung cancer cells via modulation of the nuclear factor- κ B signaling pathway," *International Journal of Molecular Medicine*, vol. 45, pp. 1213-1224, 2020.
- [5] J. Dong, H. Zhou, H. Zhao, Y. Zhao, and C. Chang, "Hesperetin ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via the miR-410/SOX18 axis," *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, vol. 34, p. e22588, 2020.
- [6] Y. Wang, S. Liu, W. Dong, X. Qu, C. Huang, T. Yan, *et al.*, "Combination of hesperetin and platinum enhances anticancer effect on lung adenocarcinoma," *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 113, p. 108779, 2019.
- [7] J. H. Park, H. J. Ku, and J.-W. Park, "Hesperetin mitigates acrolein-induced apoptosis in lung cells in vitro and in vivo," *Redox Report*, vol. 23, pp. 188-193, 2018.
- [8] L. Zhou, W. Gu, F. Kui, F. Gao, Y. Niu, W. Li, *et al.*, "The mechanism and candidate compounds of aged citrus peel (chenpi) preventing chronic obstructive pulmonary disease and its progression to lung cancer," *Food & Nutrition Research*, vol. 65, 2021.
- [9] C.-H. Shih, L.-H. Lin, H.-T. Hsu, K.-H. Wang, C.-Y. Lai, C.-M. Chen, *et al.*, "Hesperetin, a selective phosphodiesterase 4 inhibitor, effectively suppresses ovalbumin-induced airway hyperresponsiveness without influencing xylazine/ketamine-induced anesthesia," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2012, 2012.
- [10] R. Elango, J. Athinarayanan, V. P. Subbarayan, D. K. Lei, and A. A. Alshatwi, "Hesperetin induces an apoptosis-triggered extrinsic pathway and a p53-independent pathway in human lung cancer H522 cells," *Journal of Asian natural products research*, vol. 20, pp. 559-569, 2018.

- [11] P. Ramteke and U. Yadav, "Hesperetin, a Citrus bioflavonoid, prevents IL-1 β -induced inflammation and cell proliferation in lung epithelial A549 cells," 2019.
- [12] M.-C. Lai, W.-Y. Liu, S.-S. Liou, and I.-M. Liu, "The Citrus Flavonoid Hesperetin Encounters Diabetes-Mediated Alzheimer-Type Neuropathologic Changes through Relieving Advanced Glycation End-Products Inducing Endoplasmic Reticulum Stress," *Nutrients*, vol. 14, p. 745, 2022.
- [13] H. M. Abdou and H.-T. A. E. Abd Elkader, "The potential therapeutic effects of Trifolium alexandrinum extract, hesperetin and quercetin against diabetic nephropathy via attenuation of oxidative stress, inflammation, GSK-3 β and apoptosis in male rats," *Chemico-biological interactions*, vol. 352, p. 109781, 2022.
- [14] L. T. Olumegbon, A. O. Lawal, D. M. Oluyede, M. O. Adebimpe, O. O. Elekofehinti, and H. I Umar, "Hesperetin protects against diesel exhaust particles-induced cardiovascular oxidative stress and inflammation in Wistar rats," *Environmental Science and Pollution Research*, pp. 1-16, 2022.
- [15] X. Zhu, Y.-M. Zhang, M.-Y. Zhang, Y.-J. Chen, and Y.-W. Liu, "Hesperetin ameliorates diabetes-associated anxiety and depression-like behaviors in rats via activating Nrf2/ARE pathway," *Metabolic Brain Disease*, vol. 36, pp. 1969-1983, 2021.
- [16] M. Janát-Amsbury, A. Ray, C. Peterson, and H. Ghandehari, "Geometry and surface characteristics of gold nanoparticles influence their biodistribution and uptake by macrophages," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 77, pp. 417-423, 2011.
- [17] S. K. Shukla, A. Sarode, D. D. Kanabar, A. Muth, N. K. Kunda, S. Mitragotri, *et al.*, "Bioinspired particle engineering for non-invasive inhaled drug delivery to the lungs," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 128, p. 112324, 2021.
- [18] K. C. Black, Y. Wang, H. P. Luehmann, X. Cai, W. Xing, B. Pang, *et al.*, "Radioactive ¹⁹⁸Au-doped nanostructures with different shapes for in vivo analyses of their biodistribution, tumor uptake, and intratumoral distribution," *ACS nano*, vol. 8, pp. 4385-4394, 2014.
- [19] S. E. Gratton, P. A. Ropp, P. D. Pohlhaus, J. C. Luft, V. J. Madden, M. E. Napier, *et al.*, "The effect of particle design on cellular internalization pathways," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 105, pp. 11613-11618, 2008.
- [20] M. Cooley, A. Sarode, M. Hoore, D. A. Fedosov, S. Mitragotri, and A. S. Gupta, "Influence of particle size and shape on their margination and wall-adhesion: implications in drug delivery vehicle design across nano-to-micro scale," *Nanoscale*, vol. 10, pp. 15350-15364, 2018.
- [21] A. Da Silva-Candal, T. Brown, V. Krishnan, I. Lopez-Loureiro, P. Ávila-Gómez, A. Pusuluri, *et al.*, "Shape effect in active targeting of nanoparticles

- to inflamed cerebral endothelium under static and flow conditions," *Journal of Controlled Release*, vol. 309, pp. 94-105, 2019.
- [22] K. Namdee, A. J. Thompson, A. Golinski, S. Mocherla, D. Bouis, and O. Eniola-Adefeso, "In vivo evaluation of vascular-targeted spheroidal microparticles for imaging and drug delivery application in atherosclerosis," *Atherosclerosis*, vol. 237, pp. 279-286, 2014.
- [23] M. Nikolaou, K. Avraam, A. Kolokithas-Ntoukas, A. Bakandritsos, F. Lizal, O. Misik, *et al.*, "Superparamagnetic electrospun microrods for magnetically-guided pulmonary drug delivery with magnetic heating," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 126, p. 112117, 2021.
- [24] J. Xu, P. Li, and Y. Fan, "Preparation of Magnetic-Fluorescent Bifunctional Microrods as a Drug Delivery System via One-Step Electrospraying," in *Multidisciplinary Digital Publishing Institute Proceedings*, 2020, p. 44.
- [25] J. Xu, K. Li, M. Liu, X. Gu, P. Li, and Y. Fan, "Studies on preparation and formation mechanism of poly (lactide-co-glycolide) microrods via one-step electrospray and an application for drug delivery system," *European Polymer Journal*, vol. 148, p. 110372, 2021.
- [26] T. Fischer, I. Winter, R. Drumm, and M. Schneider, "Cylindrical Microparticles Composed of Mesoporous Silica Nanoparticles for the Targeted Delivery of a Small Molecule and a Macromolecular Drug to the Lungs: Exemplified with Curcumin and siRNA," *Pharmaceutics*, vol. 13, p. 844, 2021.
- [27] Y. Yang, D. Nie, Y. Liu, M. Yu, and Y. Gan, "Advances in particle shape engineering for improved drug delivery," *Drug Discovery Today*, vol. 24, pp. 575-583, 2019.
- [28] A. Banerjee, J. Qi, R. Gogoi, J. Wong, and S. Mitragotri, "Role of nanoparticle size, shape and surface chemistry in oral drug delivery," *Journal of Controlled Release*, vol. 238, pp. 176-185, 2016.
- [29] H. Meng, S. Yang, Z. Li, T. Xia, J. Chen, Z. Ji, *et al.*, "Aspect ratio determines the quantity of mesoporous silica nanoparticle uptake by a small GTPase-dependent macropinocytosis mechanism," *ACS nano*, vol. 5, pp. 4434-4447, 2011.
- [30] H. Yang, Z. Chen, L. Zhang, W. Y. Yung, K. C. F. Leung, H. Y. E. Chan, *et al.*, "Mechanism for the cellular uptake of targeted gold nanorods of defined aspect ratios," *Small*, vol. 12, pp. 5178-5189, 2016.
- [31] X. Huang, X. Teng, D. Chen, F. Tang, and J. He, "The effect of the shape of mesoporous silica nanoparticles on cellular uptake and cell function," *Biomaterials*, vol. 31, pp. 438-448, 2010.
- [32] E. Hinde, K. Thammasiraphop, H. T. Duong, J. Yeow, B. Karagoz, C. Boyer, *et al.*, "Pair correlation microscopy reveals the role of nanoparticle shape in intracellular transport and site of drug release," *Nature nanotechnology*, vol. 12, pp. 81-89, 2017.

- [33] Z.-m. Chang, Z. Wang, D. Shao, J. Yue, H. Xing, L. Li, *et al.*, "Shape engineering boosts magnetic mesoporous silica nanoparticle-based isolation and detection of circulating tumor cells," *ACS applied materials & interfaces*, vol. 10, pp. 10656-10663, 2018.
- [34] D. Li, J. Zhuang, H. He, S. Jiang, A. Banerjee, Y. Lu, *et al.*, "Influence of particle geometry on gastrointestinal transit and absorption following oral administration," *ACS applied materials & interfaces*, vol. 9, pp. 42492-42502, 2017.
- [35] R. Toy, P. M. Peiris, K. B. Ghaghada, and E. Karathanasis, "Shaping cancer nanomedicine: the effect of particle shape on the in vivo journey of nanoparticles," *Nanomedicine*, vol. 9, pp. 121-134, 2014.
- [36] J. Wang, Y. Yang, M. Yu, G. Hu, Y. Gan, H. Gao, *et al.*, "Diffusion of rod-like nanoparticles in non-adhesive and adhesive porous polymeric gels," *Journal of the Mechanics and Physics of Solids*, vol. 112, pp. 431-457, 2018.
- [37] Z. Li, L. Sun, Y. Zhang, A. P. Dove, R. K. O'Reilly, and G. Chen, "Shape effect of glyco-nanoparticles on macrophage cellular uptake and immune response," *ACS macro letters*, vol. 5, pp. 1059-1064, 2016.
- [38] A. S. Pitek, Y. Wang, S. Gulati, H. Gao, P. L. Stewart, D. I. Simon, *et al.*, "Elongated plant virus-based nanoparticles for enhanced delivery of thrombolytic therapies," *Molecular pharmaceutics*, vol. 14, pp. 3815-3823, 2017.
- [39] X. Huang, L. Li, T. Liu, N. Hao, H. Liu, D. Chen, *et al.*, "The shape effect of mesoporous silica nanoparticles on biodistribution, clearance, and biocompatibility in vivo," *ACS nano*, vol. 5, pp. 5390-5399, 2011.
- [40] L. Jennings, O. Ivashchenko, I. J. Marsman, A. C. Laan, A. G. Denkova, G. Waton, *et al.*, "In vivo biodistribution of stable spherical and filamentous micelles probed by high-sensitivity SPECT," *Biomaterials science*, vol. 4, pp. 1202-1211, 2016.
- [41] S. Barua, J.-W. Yoo, P. Kolhar, A. Wakankar, Y. R. Gokarn, and S. Mitragotri, "Particle shape enhances specificity of antibody-displaying nanoparticles," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 110, pp. 3270-3275, 2013.
- [42] E. T. Koşka, "Bir Lokal Anestezik Madde Olan Lidokain'in (2-Diethylamino-N-(2, 6 Dimethylphenyl) Acetamıde) Etki Süresini Uzatmak için Poli Akrilat Bazlı Hidrojel Mikrokürelerin Kullanımı ve Denenmesi," 2013.
- [43] F. E. Demir, "Göğüs hastalıklarının tedavisinde nanobiyoteknolojik bir yaklaşım: polimerik nano-malzemelerin inhaler yolla kullanımının araştırılması," Doktora, Biyoteknoloji ana bilim dalı, Ege Üniversitesi, 2019.
- [44] R. Lowe, "Parenteral drug delivery," in *Aulton's Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines. 5th ed. Amsterdam: Elsevier*, ed, 2018, pp. 638-52.

- [45] A. Lansley and G. Martin, "Nasal drug delivery," in *Aulton's Pharmaceuticals: The Design and Manufacture of Medicines (International edition)*, ed: Elsevier Ltd, 2018, pp. 671-689.
- [46] W. B. Liechty, D. R. Kryscio, B. V. Slaughter, and N. A. Peppas, "Polymers for drug delivery systems," *Annual review of chemical and biomolecular engineering*, vol. 1, pp. 149-173, 2010.
- [47] H. Fadda, A. Khalili, P. Tee Khaw, and S. Brocchini, "Ocular drug delivery," in *Aulton's Pharmaceuticals: The Design and Manufacture of Medicines. 5th ed. Amsterdam: Elsevier*, ed, 2018, pp. 690-714.
- [48] A. C. Williams, "Topical and transdermal drug delivery," *Aulton's Pharmaceuticals: The Design and Manufacture of Medicines. 5th ed. Edinburgh: Elsevier*, pp. 715-725, 2018.
- [49] K. Dodou, "Rectal and vaginal drug delivery," *Any screen. Any time. Anywhere.*, p. 739.
- [50] K. Taylor, "Pulmonary drug delivery," *Any screen. Any time. Anywhere.*, p. 653, 2002.
- [51] M. Smola, T. Vandamme, and A. Sokolowski, "Nanocarriers as pulmonary drug delivery systems to treat and to diagnose respiratory and non respiratory diseases," *International journal of nanomedicine*, vol. 3, p. 1, 2008.
- [52] K. M. Taylor and M. E. Aulton, *Aulton's Pharmaceuticals E-Book: The Design and Manufacture of Medicines*: Elsevier Health Sciences, 2017.
- [53] A. Koenneke, M. Pourasghar, and M. Schneider, "Nano-structured microparticles for inhalation," in *Delivery of Drugs*, ed: Elsevier, 2020, pp. 119-160.
- [54] W.-C. Su and Y. S. Cheng, "Deposition of fiber in a human airway replica," *Journal of Aerosol Science*, vol. 37, pp. 1429-1441, 2006.
- [55] B. Parakhonskiy, M. V. Zyuzin, A. Yashchenok, S. Carregal-Romero, J. Rejman, H. Möhwald, *et al.*, "The influence of the size and aspect ratio of anisotropic, porous CaCO₃ particles on their uptake by cells," *Journal of nanobiotechnology*, vol. 13, pp. 1-13, 2015.
- [56] M. H. Lai, J. H. Jeong, R. J. DeVolder, C. Brockman, C. Schroeder, and H. Kong, "Ellipsoidal Polyaspartamide Polymersomes with Enhanced Cell-Targeting Ability," *Advanced functional materials*, vol. 22, pp. 3239-3246, 2012.
- [57] P. Kolhar, A. C. Anselmo, V. Gupta, K. Pant, B. Prabhakarandian, E. Ruoslahti, *et al.*, "Using shape effects to target antibody-coated nanoparticles to lung and brain endothelium," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 110, pp. 10753-10758, 2013.
- [58] M. Möhwald, S. R. Pinnapireddy, B. Wonnemberg, M. Pourasghar, M. Jurisic, A. Jung, *et al.*, "Aspherical, nanostructured microparticles for targeted gene delivery to alveolar macrophages," *Advanced Healthcare Materials*, vol. 6, p. 1700478, 2017.

- [59] J. Chen, N. E. Clay, N.-h. Park, and H. Kong, "Non-spherical particles for targeted drug delivery," *Chemical engineering science*, vol. 125, pp. 20-24, 2015.
- [60] O. S. Fenton, K. N. Olafson, P. S. Pillai, M. J. Mitchell, and R. Langer, "Advances in biomaterials for drug delivery," *Advanced Materials*, vol. 30, p. 1705328, 2018.
- [61] S. Senapati, A. K. Mahanta, S. Kumar, and P. Maiti, "Controlled drug delivery vehicles for cancer treatment and their performance," *Signal transduction and targeted therapy*, vol. 3, pp. 1-19, 2018.
- [62] A. Biswas, A. Shukla, and P. Maiti, "Biomaterials for interfacing cell imaging and drug delivery: An overview," *Langmuir*, vol. 35, pp. 12285-12305, 2019.
- [63] K. Cho, X. Wang, S. Nie, and D. M. Shin, "Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer," *Clinical cancer research*, vol. 14, pp. 1310-1316, 2008.
- [64] S. DERMAN, K. KIZILBEY, and Z. M. AKDESTE, "Polymeric nanoparticles," *Sigma Journal of Engineering and Natural Sciences*, vol. 31, pp. 107-120, 2013.
- [65] Ö. MARANGOZ and O. YAVUZ, "Nano-ilaç taşıma sistemleri ve toksikolojik değerlendirmeleri," *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, vol. 77, pp. 509-526, 2020.
- [66] M. L. Adams, A. Lavasanifar, and G. S. Kwon, "Amphiphilic block copolymers for drug delivery," *Journal of pharmaceutical sciences*, vol. 92, pp. 1343-1355, 2003.
- [67] E. Batrakova, T. Y. Dorodnych, E. Y. Klinskii, E. Kliushnenkova, O. Shemchukova, O. Goncharova, *et al.*, "Anthracycline antibiotics non-covalently incorporated into the block copolymer micelles: in vivo evaluation of anti-cancer activity," *British journal of cancer*, vol. 74, pp. 1545-1552, 1996.
- [68] T. Nakanishi, S. Fukushima, K. Okamoto, M. Suzuki, Y. Matsumura, M. Yokoyama, *et al.*, "Development of the polymer micelle carrier system for doxorubicin," *Journal of Controlled Release*, vol. 74, pp. 295-302, 2001.
- [69] C. Loira-Pastoriza, J. Todoroff, and R. Vanbever, "Delivery strategies for sustained drug release in the lungs," *Advanced drug delivery reviews*, vol. 75, pp. 81-91, 2014.
- [70] S. Svenson and D. A. Tomalia, "Dendrimers in biomedical applications—reflections on the field," *Advanced drug delivery reviews*, vol. 64, pp. 102-115, 2012.
- [71] M. Jawaid and F. Mohammad, *Nanocellulose and nanohydrogel matrices: biotechnological and biomedical applications*. John Wiley & Sons, 2017.
- [72] M. Rawat, D. Singh, S. Saraf, and S. Saraf, "Nanocarriers: promising vehicle for bioactive drugs," *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 29, pp. 1790-1798, 2006.

- [73] E. Bhargav, N. Madhuri, K. Ramesh, A. Manne, and V. Ravi, "Targeted drug delivery-a review," *World J Pharm Pharm Sci*, vol. 3, pp. 150-169, 2013.
- [74] N. Naseri, H. Valizadeh, and P. Zakeri-Milani, "Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: structure, preparation and application," *Advanced pharmaceutical bulletin*, vol. 5, p. 305, 2015.
- [75] P. Ghasemiyeh and S. Mohammadi-Samani, "Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers as novel drug delivery systems: applications, advantages and disadvantages," *Research in pharmaceutical sciences*, vol. 13, p. 288, 2018.
- [76] E. Strable and M. Finn, "Chemical modification of viruses and virus-like particles," *Viruses and Nanotechnology*, pp. 1-21, 2009.
- [77] S. Y. Madani, N. Naderi, O. Dissanayake, A. Tan, and A. M. Seifalian, "A new era of cancer treatment: carbon nanotubes as drug delivery tools," *International journal of nanomedicine*, vol. 6, p. 2963, 2011.
- [78] S. Drabu, S. Khatri, S. Babu, and R. K. Sahu, "Carbon nanotubes in pharmaceutical nanotechnology: An introduction to future drug delivery system," *J. Chem. Pharm. Res*, vol. 2, pp. 444-457, 2010.
- [79] M. Foldvari and M. Bagonluri, "Carbon nanotubes as functional excipients for nanomedicines: II. Drug delivery and biocompatibility issues," *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, vol. 4, pp. 183-200, 2008.
- [80] A. Gagliardi, E. Giuliano, E. Venkateswararao, M. Fresta, S. Bulotta, V. Awasthi, *et al.*, "Biodegradable polymeric nanoparticles for drug delivery to solid tumors," *Frontiers in pharmacology*, p. 17, 2021.
- [81] S. Bamrungsap, Z. Zhao, T. Chen, L. Wang, C. Li, T. Fu, *et al.*, "Nanotechnology in therapeutics: a focus on nanoparticles as a drug delivery system," *Nanomedicine*, vol. 7, pp. 1253-1271, 2012.
- [82] I. P. Harrison and F. Spada, "Hydrogels for atopic dermatitis and wound management: a superior drug delivery vehicle," *Pharmaceutics*, vol. 10, p. 71, 2018.
- [83] M. H. Kharaji, D. Doroud, T. Taheri, and S. Rafati, "Drug targeting to macrophages with solid lipid nanoparticles harboring paromomycin: an in vitro evaluation against *L. major* and *L. tropica*," *AAPS PharmSciTech*, vol. 17, pp. 1110-1119, 2016.
- [84] E. Alemzadeh, A. Dehshahri, K. Izadpanah, and F. Ahmadi, "Plant virus nanoparticles: Novel and robust nanocarriers for drug delivery and imaging," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 167, pp. 20-27, 2018.
- [85] W. J. Gradishar, S. Tjulandin, N. Davidson, H. Shaw, N. Desai, P. Bhar, *et al.*, "Phase III trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with breast cancer," *Journal of clinical oncology*, vol. 23, pp. 7794-7803, 2005.
- [86] P. Sabbatini, C. Aghajanian, D. Dizon, S. Anderson, J. Dupont, J. V. Brown, *et al.*, "Phase II study of CT-2103 in patients with recurrent epithelial

- ovarian, fallopian tube, or primary peritoneal carcinoma," *Journal of clinical oncology*, vol. 22, pp. 4523-4531, 2004.
- [87] R. Bhatt, P. de Vries, J. Tulinsky, G. Bellamy, B. Baker, J. W. Singer, *et al.*, "Synthesis and in vivo antitumor activity of poly (L-glutamic acid) conjugates of 20 (S)-camptothecin," *Journal of medicinal chemistry*, vol. 46, pp. 190-193, 2003.
- [88] P. A. Vasey, S. B. Kaye, R. Morrison, C. Twelves, P. Wilson, R. Duncan, *et al.*, "Phase I clinical and pharmacokinetic study of PK1 [N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide copolymer doxorubicin]: first member of a new class of chemotherapeutic agents—drug-polymer conjugates," *Clinical cancer research*, vol. 5, pp. 83-94, 1999.
- [89] L. W. Seymour, D. R. Ferry, D. Anderson, S. Hesslewood, P. J. Julyan, R. Poyner, *et al.*, "Hepatic drug targeting: phase I evaluation of polymer-bound doxorubicin," *Journal of clinical oncology*, vol. 20, pp. 1668-1676, 2002.
- [90] T.-Y. Kim, D.-W. Kim, J.-Y. Chung, S. G. Shin, S.-C. Kim, D. S. Heo, *et al.*, "Phase I and pharmacokinetic study of Genexol-PM, a cremophor-free, polymeric micelle-formulated paclitaxel, in patients with advanced malignancies," *Clinical cancer research*, vol. 10, pp. 3708-3716, 2004.
- [91] J. F. Kukowska-Latallo, K. A. Candido, Z. Cao, S. S. Nigavekar, I. J. Majoros, T. P. Thomas, *et al.*, "Nanoparticle targeting of anticancer drug improves therapeutic response in animal model of human epithelial cancer," *Cancer research*, vol. 65, pp. 5317-5324, 2005.
- [92] N. Malik, E. G. Evagorou, and R. Duncan, "Dendrimer-platinate: a novel approach to cancer chemotherapy," *Anti-cancer drugs*, vol. 10, pp. 767-776, 1999.
- [93] M. Markman, "Pegylated liposomal doxorubicin in the treatment of cancers of the breast and ovary," *Expert opinion on pharmacotherapy*, vol. 7, pp. 1469-1474, 2006.
- [94] E. Rivera, "Current status of liposomal anthracycline therapy in metastatic breast cancer," *Clinical breast cancer*, vol. 4, pp. S76-S83, 2003.
- [95] E. Rosenthal, I. Poizot-Martin, T. Saint-Marc, J.-P. Spano, P. Cacoub, and D. S. Group, "Phase IV study of liposomal daunorubicin (DaunoXome) in AIDS-related Kaposi sarcoma," *American journal of clinical oncology*, vol. 25, pp. 57-59, 2002.
- [96] M. L. Flenniken, L. O. Liepold, B. E. Crowley, D. A. Willits, M. J. Young, and T. Douglas, "Selective attachment and release of a chemotherapeutic agent from the interior of a protein cage architecture," *Chemical Communications*, pp. 447-449, 2005.
- [97] M. L. Flenniken, D. A. Willits, A. L. Harmsen, L. O. Liepold, A. G. Harmsen, M. J. Young, *et al.*, "Melanoma and lymphocyte cell-specific targeting incorporated into a heat shock protein cage architecture," *Chemistry & biology*, vol. 13, pp. 161-170, 2006.

- [98] M. Manchester and P. Singh, "Virus-based nanoparticles (VNPs): platform technologies for diagnostic imaging," *Advanced drug delivery reviews*, vol. 58, pp. 1505-1522, 2006.
- [99] G. Pastorin, W. Wu, S. Wieckowski, J.-P. Briand, K. Kostarelos, M. Prato, *et al.*, "Double functionalisation of carbon nanotubes for multimodal drug delivery," *Chemical communications*, pp. 1182-1184, 2006.
- [100] W. Wu, S. Wieckowski, G. Pastorin, M. Benincasa, C. Klumpp, J. P. Briand, *et al.*, "Targeted delivery of amphotericin B to cells by using functionalized carbon nanotubes," *Angewandte Chemie*, vol. 117, pp. 6516-6520, 2005.
- [101] M. Gupta and A. K. Gupta, "Hydrogel pullulan nanoparticles encapsulating pBUDLacZ plasmid as an efficient gene delivery carrier," *Journal of controlled release*, vol. 99, pp. 157-166, 2004.
- [102] P. S. Bakshi, D. Selvakumar, K. Kadirvelu, and N. Kumar, "Chitosan as an environment friendly biomaterial—a review on recent modifications and applications," *International journal of biological macromolecules*, vol. 150, pp. 1072-1083, 2020.
- [103] R. A. Muzzarelli, J. Boudrant, D. Meyer, N. Manno, M. DeMarchis, and M. G. Paoletti, "Current views on fungal chitin/chitosan, human chitinases, food preservation, glucans, pectins and inulin: A tribute to Henri Braconnot, precursor of the carbohydrate polymers science, on the chitin bicentennial," *Carbohydrate Polymers*, vol. 87, pp. 995-1012, 2012.
- [104] I. Tsigos, A. Martinou, D. Kafetzopoulos, and V. Bouriotis, "Chitin deacetylases: new, versatile tools in biotechnology," *Trends in biotechnology*, vol. 18, pp. 305-312, 2000.
- [105] I. Younes and M. Rinaudo, "Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications," *Marine drugs*, vol. 13, pp. 1133-1174, 2015.
- [106] Y. Habibi and L. A. Lucia, *Polysaccharide building blocks: a sustainable approach to the development of renewable biomaterials*. John Wiley & Sons, 2012.
- [107] A. A. Azeez, K. Y. Rhee, S. J. Park, and D. Hui, "Epoxy clay nanocomposites—processing, properties and applications: A review," *Composites Part B: Engineering*, vol. 45, pp. 308-320, 2013.
- [108] B. E. Benediktsdóttir, Ó. Baldursson, and M. Másson, "Challenges in evaluation of chitosan and trimethylated chitosan (TMC) as mucosal permeation enhancers: From synthesis to in vitro application," *Journal of Controlled Release*, vol. 173, pp. 18-31, 2014.
- [109] N. Hagenaars, R. J. Verheul, I. Mooren, P. H. de Jong, E. Mastrobattista, H. L. Glansbeek, *et al.*, "Relationship between structure and adjuvanticity of N, N, N-trimethyl chitosan (TMC) structural variants in a nasal influenza vaccine," *Journal of controlled Release*, vol. 140, pp. 126-133, 2009.

- [110] M. R. Kumar, R. A. Muzzarelli, C. Muzzarelli, H. Sashiwa, and A. Domb, "Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives," *Chemical reviews*, vol. 104, pp. 6017-6084, 2004.
- [111] R. Subbiah, P. Ramalingam, S. Ramasundaram, K. Park, M. K. Ramasamy, and K. J. Choi, "N, N, N-Trimethyl chitosan nanoparticles for controlled intranasal delivery of HBV surface antigen," *Carbohydrate polymers*, vol. 89, pp. 1289-1297, 2012.
- [112] M. Abd Elgadir, M. S. Uddin, S. Ferdosh, A. Adam, A. J. K. Chowdhury, and M. Z. I. Sarker, "Impact of chitosan composites and chitosan nanoparticle composites on various drug delivery systems: A review," *Journal of food and drug analysis*, vol. 23, pp. 619-629, 2015.
- [113] R. Jayakumar, D. Menon, K. Manzoor, S. V. Nair, and H. Tamura, "Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials—A short review," *Carbohydrate polymers*, vol. 82, pp. 227-232, 2010.
- [114] S.-K. Kim, *Chitin and chitosan derivatives: advances in drug discovery and developments*: CRC press, 2013.
- [115] C. V. Pardeshi and V. S. Belgamwar, "Controlled synthesis of N, N, N-trimethyl chitosan for modulated bioadhesion and nasal membrane permeability," *International journal of biological macromolecules*, vol. 82, pp. 933-944, 2016.
- [116] R. Ramya, J. Venkatesan, S. K. Kim, and P. Sudha, "Biomedical applications of chitosan: an overview," *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*, vol. 2, pp. 100-111, 2012.
- [117] G. Rassu, E. Soddu, M. Cossu, E. Gavini, P. Giunchedi, and A. Dalpiaz, "Particulate formulations based on chitosan for nose-to-brain delivery of drugs. A review," *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, vol. 32, pp. 77-87, 2016.
- [118] A. Anitha, N. Deepa, K. Chennazhi, S. Nair, H. Tamura, and R. Jayakumar, "Development of mucoadhesive thiolated chitosan nanoparticles for biomedical applications," *Carbohydrate Polymers*, vol. 83, pp. 66-73, 2011.
- [119] A. Anitha, V. Deepagan, V. D. Rani, D. Menon, S. Nair, and R. Jayakumar, "Preparation, characterization, in vitro drug release and biological studies of curcumin loaded dextran sulphate–chitosan nanoparticles," *Carbohydrate Polymers*, vol. 84, pp. 1158-1164, 2011.
- [120] A. Anitha, S. Maya, N. Deepa, K. Chennazhi, S. Nair, and R. Jayakumar, "Curcumin-loaded N, O-carboxymethyl chitosan nanoparticles for cancer drug delivery," *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, vol. 23, pp. 1381-1400, 2012.
- [121] K. Snima, R. Jayakumar, A. Unnikrishnan, S. V. Nair, and V.-K. Lakshmanan, "O-Carboxymethyl chitosan nanoparticles for metformin delivery to pancreatic cancer cells," *Carbohydrate polymers*, vol. 89, pp. 1003-1007, 2012.

- [122] G. Scionti, M. Moral, M. Toledano, R. Osorio, J. D. Duran, M. Alaminos, *et al.*, "Effect of the hydration on the biomechanical properties in a fibrin-agarose tissue-like model," *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 102, pp. 2573-2582, 2014.
- [123] M. H. Shin, D. Y. Lee, G. Wohlgemuth, I.-G. Choi, O. Fiehn, and K. H. Kim, "Global metabolite profiling of agarose degradation by *Saccharophagus degradans* 2-40," *New Biotechnology*, vol. 27, pp. 156-168, 2010.
- [124] M. K. Yazdi, A. Taghizadeh, M. Taghizadeh, F. J. Stadler, M. Farokhi, F. Mottaghitalab, *et al.*, "Agarose-based biomaterials for advanced drug delivery," *Journal of Controlled Release*, vol. 326, pp. 523-543, 2020.
- [125] J.-i. Horinaka, R. Yasuda, and T. Takigawa, "Entanglement network of agarose in various solvents," *Polymer journal*, vol. 43, pp. 1000-1002, 2011.
- [126] S. Wang, R. Zhang, Y. Yang, S. Wu, Y. Cao, A. Lu, *et al.*, "Strength enhanced hydrogels constructed from agarose in alkali/urea aqueous solution and their application," *Chemical Engineering Journal*, vol. 331, pp. 177-184, 2018.
- [127] J.-Y. Xiong, J. Narayanan, X.-Y. Liu, T. K. Chong, S. B. Chen, and T.-S. Chung, "Topology evolution and gelation mechanism of agarose gel," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 109, pp. 5638-5643, 2005.
- [128] P. Zarrintaj, B. Bakhshandeh, I. Rezaeian, B. Heshmatian, and M. R. Ganjali, "A novel electroactive agarose-aniline pentamer platform as a potential candidate for neural tissue engineering," *Scientific reports*, vol. 7, pp. 1-12, 2017.
- [129] F. Campos, A. B. Bonhome-Espinosa, G. Vizcaino, I. A. Rodriguez, D. Durand-Herrera, M. T. López-López, *et al.*, "Generation of genipin cross-linked fibrin-agarose hydrogel tissue-like models for tissue engineering applications," *Biomedical materials*, vol. 13, p. 025021, 2018.
- [130] A. Cecilia, A. Baecker, E. Hamann, A. Rack, T. van de Kamp, F. Gruhl, *et al.*, "Optimizing structural and mechanical properties of cryogel scaffolds for use in prostate cancer cell culturing," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 71, pp. 465-472, 2017.
- [131] G. Ahuja and K. Pathak, "Porous carriers for controlled/modulated drug delivery," *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 71, p. 599, 2009.
- [132] C. Kim, H. Kim, H. Park, and K. Y. Lee, "Controlling the porous structure of alginate ferrogel for anticancer drug delivery under magnetic stimulation," *Carbohydrate polymers*, vol. 223, p. 115045, 2019.
- [133] R. Boia, P. A. Dias, J. M. Martins, C. Galindo-Romero, I. D. Aires, M. Vidal-Sanz, *et al.*, "Porous poly (ϵ -caprolactone) implants: A novel strategy for efficient intraocular drug delivery," *Journal of Controlled Release*, vol. 316, pp. 331-348, 2019.
- [134] Y. H. Kim, J. Byun, B. Kim, K. Lee, J. S. Lee, and T. H. Kim, "One-Pot Synthesis of Highly Monodisperse Poly (lactic-co-glycolic Acid) Particles

- with Controlled Porosity as Efficient Drug Delivery Vehicles," *Bulletin of the Korean Chemical Society*, vol. 40, pp. 851-856, 2019.
- [135] R. H. Moghaddam, S. Dadfarnia, A. M. H. Shabani, Z. H. Moghaddam, and M. Tavakol, "Electron beam irradiation synthesis of porous and non-porous pectin based hydrogels for a tetracycline drug delivery system," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 102, pp. 391-404, 2019.
- [136] R. Sun, M. Åhlén, C.-W. Tai, É. G. Bajnóczi, F. de Kleijne, N. Ferraz, *et al.*, "Highly porous amorphous calcium phosphate for drug delivery and bio-medical applications," *Nanomaterials*, vol. 10, p. 20, 2020.
- [137] P. Zarrintaj, G. Mahmodi, S. Manouchehri, A. H. Mashhadzadeh, M. Khodadadi, M. Servatan, *et al.*, "Zeolite in tissue engineering: opportunities and challenges," *MedComm*, vol. 1, pp. 5-34, 2020.
- [138] P. Y. Lee, J. Costumbrado, C.-Y. Hsu, and Y. H. Kim, "Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments," *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, p. e3923, 2012.
- [139] A. M. El-Kady, A. Ali, and A. El-Fiqi, "Controlled delivery of therapeutic ions and antibiotic drug of novel alginate-agarose matrix incorporating selenium-modified borosilicate glass designed for chronic wound healing," *Journal of Non-Crystalline Solids*, vol. 534, p. 119889, 2020.
- [140] R. Zhong, M. Yuan, H. Gao, Z. Bai, J. Guo, X. Zhao, *et al.*, "A subtle calculation method for nanoparticle's molar extinction coefficient: The gift from discrete protein-nanoparticle system on agarose gel electrophoresis," *Functional Materials Letters*, vol. 9, p. 1650029, 2016.
- [141] C. Sitaras, M. Naghavi, and M. B. Herrington, "Sodium dodecyl sulfate–agarose gel electrophoresis for the detection and isolation of amyloid curli fibers," *Analytical biochemistry*, vol. 408, pp. 328-331, 2011.
- [142] Y. Zheng, Y. Hong, W. Wu, D. Sun, Y. Wang, J. Huang, *et al.*, "Separation of different shape biosynthesized gold nanoparticles via agarose gel electrophoresis," *Separation and Purification Technology*, vol. 151, pp. 332-337, 2015.
- [143] K. Kinoshita, M. Iwase, M. Yamada, Y. Yajima, and M. Seki, "Fabrication of multilayered vascular tissues using microfluidic agarose hydrogel platforms," *Biotechnology Journal*, vol. 11, pp. 1415-1423, 2016.
- [144] M. J. Jang and Y. Nam, "Agarose-Assisted Micro-Contact Printing for High-Quality Biomolecular Micro-Patterns," *Macromolecular Bioscience*, vol. 15, pp. 613-621, 2015.
- [145] M. Batumalay, S. Harun, F. Ahmad, R. Nor, N. Zulkepely, and H. Ahmad, "Study of a fiber optic humidity sensor based on agarose gel," *Journal of Modern Optics*, vol. 61, pp. 244-248, 2014.
- [146] P. R. Dumpala, R. W. Holdcraft, P. C. Martis, M. A. Laramore, T. S. Parker, D. M. Levine, *et al.*, "Retention of gene expression in porcine islets after agarose encapsulation and long-term culture," *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 476, pp. 580-585, 2016.

- [147] S. Kondaveeti, G. K. Mehta, and A. Siddhanta, "Modification of agarose: 6-Aminoagarose mediated syntheses of fluorogenic pyridine carboxylic acid amides," *Carbohydrate polymers*, vol. 106, pp. 365-373, 2014.
- [148] A. Bera, A. K. S. Chandel, C. U. Kumar, and S. K. Jewrajka, "Degradable/cytocompatible and pH responsive amphiphilic conetwork gels based on agarose-graft copolymers and polycaprolactone," *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 3, pp. 8548-8557, 2015.
- [149] E. J. Szili, J.-S. Oh, S.-H. Hong, A. Hatta, and R. D. Short, "Probing the transport of plasma-generated RONS in an agarose target as surrogate for real tissue: dependency on time, distance and material composition," *Journal of Physics D: Applied Physics*, vol. 48, p. 202001, 2015.
- [150] Y.-C. Park, E. J. Oh, J.-H. Jo, Y.-S. Jin, and J.-H. Seo, "Recent advances in biological production of sugar alcohols," *Current opinion in biotechnology*, vol. 37, pp. 105-113, 2016.
- [151] C. B. Burness and G. M. Keating, "Mannitol dry powder for inhalation," *Drugs*, vol. 72, pp. 1411-1421, 2012.
- [152] N. Barraud, A. Buson, W. Jarolimek, and S. A. Rice, "Mannitol enhances antibiotic sensitivity of persister bacteria in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms," *PloS one*, vol. 8, p. e84220, 2013.
- [153] J. A. Rowley, G. Madlambayan, and D. J. Mooney, "Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials," *Biomaterials*, vol. 20, pp. 45-53, 1999.
- [154] H. Zimmermann, S. G. Shirley, and U. Zimmermann, "Alginate-based encapsulation of cells: past, present, and future," *Current diabetes reports*, vol. 7, pp. 314-320, 2007.
- [155] P. Gacesa, "Alginates," *Carbohydrate polymers*, vol. 8, pp. 161-182, 1988.
- [156] N. Gunday Tureli, A. E. Tureli, and M. Schneider, "Inhalable antibiotic nanoformulations for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis—a review," *Drug Delivery Letters*, vol. 4, pp. 193-207, 2014.
- [157] A. Salisu, M. M. Sanagi, A. Abu Naim, W. A. Wan Ibrahim, and K. J. Abd Karim, "Removal of lead ions from aqueous solutions using sodium alginate-graft-poly (methyl methacrylate) beads," *Desalination and Water Treatment*, vol. 57, pp. 15353-15361, 2016.
- [158] A. D. Augst, H. J. Kong, and D. J. Mooney, "Alginate hydrogels as biomaterials," *Macromolecular bioscience*, vol. 6, pp. 623-633, 2006.
- [159] L. Li, Y. Fang, R. Vreeker, I. Appelqvist, and E. Mendes, "Reexamining the egg-box model in calcium– alginate gels with X-ray diffraction," *Biomacromolecules*, vol. 8, pp. 464-468, 2007.
- [160] O. Smidsrød, "Molecular basis for some physical properties of alginates in the gel state," *Faraday discussions of the Chemical Society*, vol. 57, pp. 263-274, 1974.

- [161] U. Zimmermann, F. Thürmer, A. Jork, M. Weber, S. Mimietz, M. Hillgärtner, *et al.*, "A novel class of amitogenic alginate microcapsules for long-term immunoisolated transplantation," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 944, pp. 199-215, 2001.
- [162] P. Mouly, E. M. Gaydou, and A. Auffray, "Simultaneous separation of flavanone glycosides and polymethoxylated flavones in citrus juices using liquid chromatography," *Journal of chromatography A*, vol. 800, pp. 171-179, 1998.
- [163] D.-H. Kim, E.-A. Jung, I.-S. Sohng, J.-A. Han, T.-H. Kim, and M. J. Han, "Intestinal bacterial metabolism of flavonoids and its relation to some biological activities," *Archives of pharmacal research*, vol. 21, pp. 17-23, 1998.
- [164] A. S. Roy, D. R. Tripathy, A. K. Ghosh, and S. Dasgupta, "An alternate mode of binding of the polyphenol quercetin with serum albumins when complexed with Cu (II)," *Journal of Luminescence*, vol. 132, pp. 2943-2951, 2012.
- [165] A. Singha Roy, A. Kumar Dinda, and S. Dasgupta, "Study of the interaction between fisetin and human serum albumin: a biophysical approach," *Protein and Peptide Letters*, vol. 19, pp. 604-615, 2012.
- [166] M.-X. Xie, X.-Y. Xu, and Y.-D. Wang, "Interaction between hesperetin and human serum albumin revealed by spectroscopic methods," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, vol. 1724, pp. 215-224, 2005.
- [167] Y. Cai, Q. Luo, M. Sun, and H. Corke, "Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer," *Life sciences*, vol. 74, pp. 2157-2184, 2004.
- [168] A. Garg, S. Garg, L. Zaneveld, and A. Singla, "Chemistry and pharmacology of the citrus bioflavonoid hesperidin," *Phytotherapy research*, vol. 15, pp. 655-669, 2001.
- [169] M. Ikram, T. Muhammad, S. U. Rehman, A. Khan, M. G. Jo, T. Ali, *et al.*, "Hesperetin confers neuroprotection by regulating Nrf2/TLR4/NF- κ B signaling in an A β mouse model," *Molecular Neurobiology*, vol. 56, pp. 6293-6309, 2019.
- [170] R. Jayaraman, S. Subramani, S. H. S. Abdullah, and M. Udaiyar, "Antihyperglycemic effect of hesperetin, a citrus flavonoid, extenuates hyperglycemia and exploring the potential role in antioxidant and antihyperlipidemic in streptozotocin-induced diabetic rats," *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 97, pp. 98-106, 2018.
- [171] H. M. Abdou, F. A. Hamaad, E. Y. Ali, and M. H. Ghoneum, "Antidiabetic efficacy of Trifolium alexandrinum extracts hesperetin and quercetin in ameliorating carbohydrate metabolism and activating IR and AMPK signaling in the pancreatic tissues of diabetic rats," *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 149, p. 112838, 2022.

- [172] M. Ersoz, A. Erdemir, D. Duranoglu, D. Uzunoglu, T. Arasoglu, S. Derman, *et al.*, "Comparative evaluation of hesperetin loaded nanoparticles for anticancer activity against C6 glioma cancer cells," *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, vol. 47, pp. 319-329, 2019.
- [173] G. Zhong, J. Shen, Z. Chen, Z. Lin, L. Long, J. Wu, *et al.*, "Antioxidant and Antitumor Activities of Newly Synthesized Hesperetin Derivatives," *Molecules*, vol. 27, p. 879, 2022.
- [174] Y.-Z. Zheng, G. Deng, and Y.-C. Zhang, "Multiple free radical scavenging reactions of flavonoids," *Dyes and Pigments*, vol. 198, p. 109877, 2022.
- [175] J. H. Lee and G. H. Kim, "Evaluation of antioxidant and inhibitory activities for different subclasses flavonoids on enzymes for rheumatoid arthritis," *Journal of Food Science*, vol. 75, pp. H212-H217, 2010.
- [176] H.-L. Yang, S.-C. Chen, K. Senthil Kumar, K.-N. Yu, P.-D. Lee Chao, S.-Y. Tsai, *et al.*, "Antioxidant and anti-inflammatory potential of hesperetin metabolites obtained from hesperetin-administered rat serum: an ex vivo approach," *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 60, pp. 522-532, 2012.
- [177] M. Kumar, V. Dahiya, E. R. Kasala, L. N. Bodduluru, and M. Lahkar, "The renoprotective activity of hesperetin in cisplatin induced nephrotoxicity in rats: Molecular and biochemical evidence," *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 89, pp. 1207-1215, 2017.
- [178] C. R. Martin, "Nanomaterials: a membrane-based synthetic approach," *Science*, vol. 266, pp. 1961-1966, 1994.
- [179] Y. Karahan, M. Pourasghar, M. Schneider, M. C. Keck, and S. D. Daşdan, "Stabilization and Harvesting of Hesperetin Microrods from the Hesperetin Stabilised Via Plantacare 2000 Solution by Using Template-Assisted Particle Infiltration Method," *Journal indian chemical society*, vol. 97, pp. 2125-2129, 2020.
- [180] A. Torge, G. Pavone, M. Jurisic, K. Lima-Engelmann, and M. Schneider, "A comparison of spherical and cylindrical microparticles composed of nanoparticles for pulmonary application," *Aerosol Science and Technology*, vol. 53, pp. 53-62, 2019.
- [181] (25.03.2022). *Dinamic Light Scattering*. Available: <https://www.3pinstruments.com/measurement-methods/dynamic-light-scattering/>
- [182] S. Bhattacharjee, "DLS and zeta potential–what they are and what they are not?," *Journal of controlled release*, vol. 235, pp. 337-351, 2016.
- [183] (24.03.2022). *Çimento, agrega, polikarboksilat ve kil yüzey-aktif içeren kolloidal sistemlerde zeta potansiyeli etkileşimi*. Available: <http://www.iksa.com.tr/pdf/zeta.pdf>
- [184] Z. Chen, Z. Wei, Y. Chen, and C. Dames, "Anisotropic Debye model for the thermal boundary conductance," *Physical Review B*, vol. 87, p. 125426, 2013.

- [185] F. J. Vidal-Iglesias, J. Solla-Gullón, A. Rodes, E. Herrero, and A. Aldaz, "Understanding the Nernst equation and other electrochemical concepts: an easy experimental approach for students," *Journal of Chemical Education*, vol. 89, pp. 936-939, 2012.
- [186] H. Thakkar, J. Nangesh, M. Parmar, and D. Patel, "Formulation and characterization of lipid-based drug delivery system of raloxifene-microemulsion and self-microemulsifying drug delivery system," *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, vol. 3, p. 442, 2011.
- [187] T. Ito, L. Sun, M. A. Bevan, and R. M. Crooks, "Comparison of nanoparticle size and electrophoretic mobility measurements using a carbon-nanotube-based coulter counter, dynamic light scattering, transmission electron microscopy, and phase analysis light scattering," *Langmuir*, vol. 20, pp. 6940-6945, 2004.
- [188] V. Shilov, Y. B. Borkovskaja, and A. Dukhin, "Electroacoustic theory for concentrated colloids with overlapped DLs at arbitrary ka : I. Application to nanocolloids and nonaqueous colloids," *Journal of colloid and interface science*, vol. 277, pp. 347-358, 2004.
- [189] V. R. Patel and Y. Agrawal, "Nanosuspension: An approach to enhance solubility of drugs," *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*, vol. 2, p. 81, 2011.
- [190] W. I. Ltd. (30.03.2022). *Whatman Nuclepore(R) Membranes - Microfiltration Membrane Characteristics*. Available: <https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/substance/whatmannucleporetrac ketchedmembranes1234598765>
- [191] C. M. Hassan and N. A. Peppas, "Structure and applications of poly (vinyl alcohol) hydrogels produced by conventional crosslinking or by freezing/thawing methods," *Biopolymers· PVA hydrogels, anionic polymerisation nanocomposites*, pp. 37-65, 2000.
- [192] J. Tan, S. Shah, A. Thomas, H. D. Ou-Yang, and Y. Liu, "The influence of size, shape and vessel geometry on nanoparticle distribution," *Microfluidics and nanofluidics*, vol. 14, pp. 77-87, 2013.
- [193] J. Gong, M. G. Tanner, S. Venkateswaran, J. M. Stone, Y. Zhang, and M. Bradley, "A hydrogel-based optical fibre fluorescent pH sensor for observing lung tumor tissue acidity," *Analytica Chimica Acta*, vol. 1134, pp. 136-143, 2020.

Bu çalışmanın bir kısmı, 2018-2019 Eđitim-Öđretim yılı Ekim 2018-Eylöl 2019 tarihleri arasında, ERASMUS+ program kapsamında Eczacılık bölümü, Biyofarmasötik ve Farmasötik Teknolojiler, Saarland Üniversitesi, Saarbrücken, Almanya’da tamamlanmıştır.



B

ERASMUS ÜLKE KODLARI

TR ISTANBU07	Yıldız Teknik Üniversitesi, Türkiye
D SAARBRU01	Universität des Saarlandes, Germany



1. 100/2000 YÖK Doktora Bursu, Öncelikli alanlar, Biyomalzeme ve Doku Mühendisliği
2. Gençlik ve Spor Bakanlığı, Kredi ve Yurtlar Genel Müdürlüğü, KYK bursu (Doktora)



TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. Y. Karahan, M. Poursaghar, M. Schneider, M. C. Keck, and S. D. Daşdan, "Hesperetin-Plantacare2000 Infiltrasyonunun Optimizasyon Koşullarının Belirlenmesi," *32.Ulusal kimya kongresi (uluslararası katılımlı)*, syf.80, 2020.
2. Y. Karahan, M. Poursaghar, M. Schneider, M. C. Keck, and S. D. Daşdan, "Stabilization and Harvesting of Hesperetin Microrods from the Hesperetin Stabilised Via Plantacare 2000 Solution by Using Template-Assisted Particle Infiltration Method," *6th ICNTC International conference on new trends in chemistry*, pp. 109, 2020.

Makaleler

1. Y. Karahan, M. Poursaghar, M. Schneider, M. C. Keck, and S. D. Daşdan, "Stabilization and Harvesting of Hesperetin Microrods from the Hesperetin Stabilised Via Plantacare 2000 Solution by Using Template-Assisted Particle Infiltration Method," *Journal indian chemical society*, vol. 97, pp. 2125-2129, 2020.

Projeler

1. Çeşitli Hesperetin Nanosüspansiyonlarından Farklı Biyomalzemeler ile Stabilize Edilmiş Hesperetin Mikroçubuklarının Elde Edilmesi ve Karakterizasyonu, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi, Proje no: FDK-2020-3853, (2020-2022).