

T.C.
İstanbul
YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI



**FARKLI YÖNTEMLER KULLANILARAK RUTİN
YÜKLÜ PLGA NANOPARTİKÜLLERİNİN SENTEZİ
VE KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tuğçe KIRIK

Tez Danışmanı
Dr. Öğr. Üyesi. Kadriye KIZILBEY

İSTANBUL
NİSAN 2018

ETİK BEYAN

İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
 - Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
 - Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
 - Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
 - Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,
- bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

...../...../20.....

Tuğçe KIRIK

T.C.
İstanbul
YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomedikal Mühendisliği Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 17/04/2018

Tez Danışmanı

Dr. Öğr. Üyesi. Kadriye KIZILBEY

İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Dr. Öğr. Üyesi. Kadriye KIZILBEY

İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi. Sezen CANIM ATEŞ

İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi

Doç. Dr. Serap DERMAN

Yıldız Teknik Üniversitesi

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde değerli bilgi birikimlerini, deneyimlerini paylaşan ve her aşamasında desteğini eksik etmeyen kıymetli danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi. Kadriye KIZILBEY'e,

Çalışmam süresince yardımlarını eksik etmeyen Sayın Doç. Dr. Serap DERMAN'a ve Tayfun ACAR'a,

Eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen kıymetli babam Sayın İbrahim AKBULUT'a ve kıymetli annem Sayın Henise AKBULUT'a,

Yüksek Lisans eğitimim sürecinde desteğini eksik etmeyen sevgili eşim Av. Mehmet Emin KİRİK'e

Ve bu tezde emeği geçen herkese teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	i
ÖNSÖZ	iii
ŞEKİL LİSTESİ	vi
TABLO LİSTESİ	viii
SEMBOLLER VE KISALTMALAR LİSTESİ	ix
ÖZET	xi
ABSTRACT	xii
1. GİRİŞ	1
2. RUTİN.....	3
2.1. Rutin Molekülünün Biyolojik Aktiviteleri	4
2.1.1. Antidepresan Etkileri.....	4
2.1.2. Sensorimotor Kaybının (Felç-İnme) İyileşmesi	4
2.1.3. Anti-diyabetik Etkileri.....	5
2.1.4. Antioksidan Etkileri	5
2.1.5. Antikanserojen Etkileri	6
2.1.6. Gastrik Ülser Koruması.....	6
3. NANOPARTİKÜLER İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLER.....	7
3.1. Polimerik Nanopartiküler Sistemde Kontrollü İlaç Salımı	9
3.2. Nanopartikül Sentezinde Kullanılan Polimerler.....	10
3.2.1. Doğal Polimerler	11
3.2.1.1. Kitin ve Kitosan	11
3.2.1.2. Selüloz.....	11
3.2.2. Sentetik Polimerler	12
3.2.2.1. Poli-ε-Kaprolakton (PCL).....	12
3.2.2.2. Poliglikolik Asit (PGA).....	12
3.2.2.3. Poli (D,L-laktik-ko-glikolik asit) PLGA	12
3.3. Nanopartikül Sentezinde Kullanılan Yüzey Aktif Maddelerin İşlevi	13
3.2.1. Polivinil Alkol (PVA)	14
4. MATERYAL VE METOD.....	15
4.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar.....	15
4.2. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasallar.....	15
4.3. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler	16

4.4. Farklı Formülasyon Parametrelerine Sahip Rutin Yüklü PLGA Nanopartiküllerinin Sentezi	17
4.4.1. Tekli Emülsiyon-Çözücü Buharlaştırma Yöntemi	17
4.4.2. Nano-Çöktürme Yöntemi	17
4.4.3. Nano-Çöktürme Yöntemi (Sonikatör ile).....	18
4.4.4. Salting-Out Yöntemi	18
4.4.5. Salting-Out Yöntemi (Sonikatör ile)	18
4.5. Farklı Sentez Yöntemleri İle Rutin Yüklü PLGA Nanopartiküllerin Karakterizasyonu ..	19
4.5.1. Reaksiyon Veriminin Hesaplanması (RY%).....	19
4.5.2. Enkapsülasyon Etkinliğinin Hesaplanması (EE%)	20
4.5.3. Etken Yükleme Veriminin Hesaplanması	20
4.5.4. Zeta Sizer Analizi (Parçacık Boyut Analizi).....	20
4.5.5. UV-Vis Spektroskopisi	21
4.5.6. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM)	22
4.5.7. FTIR	22
4.5.8. In-vitro Rutin Salımı	23
5. SONUÇLAR	24
5.1. Rutin Uv-Vis Spektrofotometre Kalibrasyon Eğrisi	25
5.2. Farklı Yöntemlerle Sentezlenmiş Rutin Yüklü PLGA Nanopartiküllerin Enkapsülasyon Etkinliği ve Reaksiyon Verimi Sonuçları.....	27
5.3. Farklı Yöntemlerle Sentezlenmiş Rutin Yüklü PLGA Nanopartiküllerin Etken Yükleme Verimi Sonuçları	27
5.4. Farklı Yöntemlerle Sentezlenmiş Rutin Yüklü PLGA Nanopartiküllerin Boyut (nm), PDI ve Zeta Potansiyel Sonuçları	29
5.5. Farklı Yöntemlerle Sentezlenmiş Rutin Yüklü PLGA Nanopartiküllerinin FT-IR Sonuçları.....	34
5.6. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi	39
5.7. Rutin Yüklü Nanopartiküllerin in vitro Salımının İncelenmesi	40
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	42
KAYNAKLAR.....	45
ÖZGEÇMİŞ.....	53

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. Rutin' nin kimyasal yapısı.....	4
Şekil 3.2. Poli (D,L-laktik-ko-glikolik asit) PLGA'nın kimyasal yapısı.....	13
Şekil 4.1. Uv- Vis bölge.....	21
Şekil 5.1. Rutin'in suya karşı hazırlanmış kalibrasyon eğrisi.....	26
Şekil 5.2. Tekli emülsiyon-çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanan RT1 nanopartikülüne ait nanopartikül boyut analiz dağılımı.....	29
Şekil 5.3. Nano-çöktürme yöntemi ile hazırlanan RT2 nanopartikülüne ait nanopartikül boyut analiz dağılımı.....	29
Şekil 5.4. Nano-çöktürme yöntemi (sonikatörlü) ile hazırlanan RT3 nanopartikülüne ait nanopartikül boyut analiz dağılımı.....	30
Şekil 5.5. Salting-out yöntemi ile hazırlanan RT4 nanopartikülüne ait nanopartikül boyut analiz dağılımı.....	30
Şekil 5.6. Salting-out yöntemi (sonikatörlü) ile hazırlanan RT5 nanopartikülüne ait nanopartikül boyut analiz dağılımı.....	31
Şekil 5.7. Tekli emülsiyon (boş nanopartikül) sentez yöntemi ile hazırlanan RT6 nanopartikülüne ait nanopartikül boyut analiz dağılımı.....	31
Şekil 5.8. Nanopartiküllerin boyut analizleri.....	32
Şekil 5.9. Nanopartiküllerin (RT1-RT6) göre PDI değeri.....	32
Şekil 5.10. Nanopartiküllere göre zeta potansiyel değerleri	33
Şekil 5.11. Serbest Rutin'e ait FTIR spektrumu.....	34
Şekil 5.12. RT1 nanopartikülüne ait FT-IR spektrumu	35
Şekil 5.13. RT2 nanopartikülüne ait FT-IR spektrumu.....	36
Şekil 5.14. RT3 nanopartikülüne ait FT-IR spektrumu.....	37
Şekil 5.15. RT4 nanopartikülüne ait FT-IR spektrumu.....	38
Şekil 5.16. RT5 nanopartikülüne ait FT-IR spektrumu.....	39

Şekil 5.17. RT6 nanopartikülüne ait FT-IR spektrum analizi.....	40
Şekil 5.18. Rutin, rutin yüklü nanopartiküller ve PLGA'ya ait FT-IR spektrumu.....	41
Şekil 5.19. RT3'ün 20000 kat büyütülmüş SEM görüntüsü.....	42
Şekil 5.20. RT5'in 10000 kat büyütülmüş SEM görüntüsü.....	42
Şekil 5.21. RT3 ve RT5'in % <i>in vitro</i> salım grafiği.....	44



TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. Bazı flavonoidlerin buldukları besin kaynakları.....	3
Tablo 4.1. Nanopartikül hazırlama yöntemlerine ait veriler.....	18
Tablo 5.1. Rutin nanopartiküllerine ait veriler.....	24
Tablo5.2. Rutin' in farklı konsantrasyonlardaki çözeltilerinin 354 nm' deki absorbanş değeri.....	25
Tablo 5.3. Rutin nanopartikülüne ait hesaplama verileri.....	27
Tablo 5.4. Rutin yüklü PLGA nanopartikülüne ait ölçüm verileri.....	28
Tablo 5.5. Nanopartiküllerin zamana göre salım miktarları	43

SEMBOLLER VE KISALTMALAR LİSTESİ

%	Yüzde
~	Yaklaşık
µm	Mikrometre
ALT	Alanin Aminotransferaz
AST	Aminotransferaz
BRCA2	Tümör Baskılayıcı Gen
°C	Santigrat Derece
DCM	Dichlorometan
DL	Etken Yüklenme Kapasitesi
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EE	Enkapsülasyon Etkinliği
FTIR	Fourer Dönüşümlü Kızılötesi Spektrofotometre
GLUT4	Glukoz Taşıyıcı Tip 4
GSH	Glutasyon
IR	Infrared
LDH	Laktat Dehidrogenaz
mg	Mili Gram
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
ml	Mili Litre
mV	Mili Volt
NAD	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NADP	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
nm	Nanometre
PCL	Poli-ε-Kaprolakton
PDI	Çoklu Dağılım İndeksi
PDLA	Poli D-Laktik Asit
PGA	Poliglikolik Asit
PLGA	Poli (D, L-Laktik-ko-Glikolik Asit)
PLLA	Poli L-Laktik Asit
Q3G	Quercetin-3-Glukozid
RNA	Ribo Nükleik Asit
ROS	Reaktif Oksiyen Türleri

rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
RT	Rutin Yüklü Nanopartikül
RY	Reaksiyon Verimi
s	Saniye
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
UV	Ultra Violet
W	Watt



ÖZET

FARKLI YÖNTEMLER KULLANILARAK RUTİN YÜKLÜ PLGA NANOPARTİKÜLLERİNİN SENTEZİ VE KARAKTERİZASYONU

Tuğçe KIRIK

İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü

Yüksek Lisans Tezi, Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi. Kadriye KIZILBEY

Nisan 2018, 53 sayfa

Flavanoidler, bitkilerde yaygın olarak bulunan en büyük polifenol grubudur. Flavanoidler üzerine yapılan araştırmalar, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar da dahil olmak üzere pek çok hastalığın önlenmesinde flavanoidlerin sağladığı yararları göstermektedir. Bir flavanol olan Rutin (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone-3-rutinoside) düşük çözünürlüğe, emilime, geçirgenliğe ve biyoyararlanıma sahiptir. Bu gibi olumsuz karakteristik özellikleri Rutin molekülünün uygulama alanlarını sınırlandırmasına rağmen kullanımında artış gözlenmiştir. Sunulan tez çalışmasının amacı biyoyararlanımı düşük olan Rutin'i bir polimer nanopartikül sistemi içerisine enkapsüle ederek biyoyararlanımını arttırmaktır. Bu kapsamda farklı formülasyon parametelerine göre parçacık boyutu 10-1000 nm aralığında olan Rutin yüklü polimerik nanopartiküller sentezlenmiştir. Rutin molekülünü enkapsüle etmek için bir polimer olan PLGA (Poli (D,L-laktik-ko-glikolik asit)) seçilmiştir. Nanopartikül hazırlama aşamasında üç farklı yöntem kullanılmıştır. Bunlar tekli emülsiyon, nanoçöktürme ve salting-out yöntemleridir. Farklı formülasyon parametrelerine göre üretilen Rutin nanopartiküllerinin karakterizasyonu Zeta-Sizer, UV-Vis Spektroskopisi, FTIR ve Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) cihazları kullanılarak yapılmıştır. Nanopartiküllerin parçacık büyüklüğü ve dağılımı, yüzey morfolojisi, enkapsülasyon etkinliği ve *in-vitro* ortamda salım özellikleri incelenmiştir. Karakterizasyon aşamasında, FTIR ve SEM analizleri yapıldıktan sonra RT3 ve RT5 kodlu nanopartiküllerin *in vitro* ortamda Rutin salımı incelenmiştir. RT5'in % Rutin salımı 48 saatte 41% oranına ulaşmıştır. Yapılan bu çalışmanın sonucunda, sentezlenen Rutin-yüklü nanopartiküllerin, ileride nano-tıp alanında gelişmiş ve çok yönlü çalışmalar için uygun bir aday olmasını sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Rutin, PLGA, Nanopartikül, Kontrollü İlaç Salımı, Tekli Emülsiyon-Çözücü Buharlaştırma, Nanoçöktürme, Salting-out.

ABSTRACT

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF RUTIN LOADED PLGA NANOPARTICLES USING DIFFERENT METHODS

Tuğçe KIRIK

İstanbul Yeni Yüzyıl University, Science and Engineering Institute

Master Thesis, Biomedical Engineering Department

Supervisor: Dr. Kadriye KIZILBEY

April 2018, 53 pages

Flavanoids are the biggest polyphenol group commonly found in plants. Findings from researches prove the benefits of preventing many diseases, including cardiovascular and neurodegenerative diseases. As a flavanol, Rutin (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone-3-rutinoside), has low solubility, absorption, permeability and bioavailability. Even though such poor characteristics limit routine molecule's application areas, there has been an increase in its use. The aim of the presented thesis is to increase bioavailability by encapsulating Rutin, which has low bioavailability, into a polymeric nanoparticle system. In this context, Rutin loaded polymeric nanoparticles which particle size of 10-1000 nm were synthesized according to different formulation parameters. PLGA (Poly (D, L-lactic-co-glycolic acid)), which is a polymer, has been chosen to encapsulate the rutin molecule. Three different methods were used to prepare the nanoparticle. These are single emulsion, nanoprecipitation and salting-out methods. The Rutin nanoparticles which produced according to different formulation parameters were characterized using Zeta-Sizer, UV-Vis Spectroscopy, FTIR and Scanning Electron Microscope (SEM) devices. Particle size and distribution of nanoparticles, surface morphology, encapsulation efficiency and *in vitro* release characteristics were investigated. Rutin release of RT3 and RT5-encoded nanoparticles *in vitro* was investigated after FTIR and SEM analysis in the characterization phase. Rutin release of RT5 reached 41% in 48 hours. As a result of this research, it is thought that the synthesized Rutin loaded nanoparticles will become a suitable candidate for future multi-dimensional studies in the field of nano medicine.

Key Words: Rutin, PLGA, Nanoparticle, Controlled Drug Release, Single Emulsion-Solvent Evaporation, Nanoprecipitation, Salting-out.

1. GİRİŞ

Son yıllarda araştırmalara çok fazla konu olan flavonoidler sarı renkli olduklarından dolayı sarı anlamına gelen flavus kelimesinden türetilmiştir. Bitkilerin dokularında hücre içinde ya da bitkisel organların yüzeylerinde bulunurlar. Genellikle antioksidan, antiinflamatuvar, antiviral, antialerjik, antitrombik ve diğer önemli özellikleri ile araştırmalara konu olmuştur [1]. Bitkilerde yaklaşık 4000 farklı flavonoid bulunduğu bilinmektedir. Çay, domates, baklagil, soğan gibi ürünlerde flavonoid bulunur [2-4]. Birçok çiçeğin ve meyvenin renginin oluşmasında, bitkiyi UV-A ve UV-B ışınımından korumada (kempferol), enzim inhibitörü, antioksidan vb. olaylarda rol alırlar [5]. Yaralanma, kuraklık, metal ve açlık stresinde sentezlenirler. En bilinen flavonoidler olan fitoöstrojenler memelilerdeki 17 β -estradiol (E2)'e yapısal benzerlik göstermektedir (örneğin; genistein, kempferol, daidzein). Bitkilerde enerjinin dönüşümüne ve büyüme hormonlarına etki etmektedirler. Antioksidan kapasite derecesi ve UV ışınlarını emme yeteneği flavonoidlerin farklı halka yapısına sahip olmalarına bağlıdır. Dihidroksi B halkasına sahip flavonoidler daha büyük bir antioksidan kapasitesine sahipken, monohidroksi B halkasına sahip flavonoidler UV ışınlarını daha iyi absorbe eder. Fabaceae (baklagiller) familyası fitoöstrojenler yönünden zengindir. Genelde flavonoidler vakuollerde bulunurlar ve hücre içerisindeki taşınımlarını endoplazmik retikulum sağlamaktadır.

Flavonoidler uzun yıllardır çalışılmasına rağmen biyolojik aktivitelerindeki hücresel mekanizmalar hala çoğunlukla bilinmemektedir. Bunun yanında serbest radikal uzaklaştırıcı (antioksidan), kardiyovasküler, karaciğer koruyucu, antiviral ve son zamanlarda da antikanserojen aktiviteleri üzerinde çalışmalar devam etmektedir [6].

Bazı flavanoidler, düşük çözünürlüğe, zayıf emilime ve hızlı atılıma sahip olması nedeniyle canlı sistemlerdeki biyoyararlanımları oldukça düşük olmaktadır. Günümüzde, flavanoidler gibi birçok yarara sahip moleküllerin düşük çözünürlüklerini ve emilimlerini düzenleyerek biyoyararlanımlarını arttırmak için nanoboyutlu ilaç taşıyıcı sistemlerin kullanımı da artmıştır [7].

Nanoteknoloji çok hızlı bir şekilde gelişmekte olan araştırma alanlarının başında gelmektedir. Nanoteknoloji, var olan teknolojilerin daha da küçültülerek ileri düzeyde duyarlı sistemlerin oluşmasını sağlar. Bu sayede, daha uzun süre dayanan, daha temiz, güvenli ve akıllı ürünleri evde, iletişimde, ulaşımda, tarım, tıp, kimya, fizik, biyoteknoloji ve endüstrinin her alanında kullanmak mümkün olmaktadır. Nanomalzemelerin yükselişi disiplinler arası çalışmaların

sonucudur. Özellikle tıp ve biyoteknolojik alanlarda kullanılmak üzere çeşitli özelliklerde nanoboyutlarda nanomalzemeler sentezlenmeye başlanmıştır [7].

Nanopartikül sentezi bu yapıların sergiledikleri olağandışı özellikler sebebiyle yüksek aktiviteli katalizörler, optik uygulamalar için özel teknolojik malzemeler ile birlikte süperiletkenler, aşınmaya karşı katkılar, yüzey aktif maddeler, ilaç taşıyıcılar ve özel teşhis aletleri gibi birçok teknolojik ve farmakolojik ürünlerin hazırlanmasının yolunu açmıştır. Bunların yanı sıra, malzemelerin nanoboyutları seviyesinde kontrolü nanotaşıyıcılar, sensörler, nanomakinalar ve yüksek yoğunluklu veri depolama hücreleri gibi kendine özgü işlevselliğe sahip minyatürleştirilmiş aygıtların gerçekleştirilmesine izin vermektedir [8-9]. Açıkça görülmektedir ki, nanoyapılı malzemelerin ve cihazların tasarlanmasını, üretimini ve işlevsel olarak kullanımını kapsayan nanoteknoloji alanındaki yeni gelişmeler için ilk adım nanopartiküllerin üretimidir. Nanoteknolojik malzemelerin çıkış noktasını oluşturan nanopartiküller geniş bir kimyasal özellik aralığında ve morfolojide üretilebilirler. Günümüzde çekirdek-kabuk, katkılı, sandviç, boşluklu, küresel, çubuk benzeri ve çok yüzü gibi farklı morfolojilere sahip metal, metal alaşımı, seramik ve polimer esaslı veya bunların karışımından istenilen özelliklere sahip nanopartiküller hazırlanabilir [9].

Nanopartiküller klinik çalışmaları sonucunda ulaşılan verilere göre ilaç sektöründe çok önemli bir yer almıştır. Hapsetme, doğrudan etken maddeye bağlanma ve hedeflenme gibi özelliklerinden dolayı pratik olarak kullanılabilen nanopartiküller ilaç salım sistemlerinde tercih edilmeye başlanmıştır. Nanoteknoloji, biyolojik zarların incelenmesinde kullanılan iki tabakalı lipidlerin yapay olarak oluşturduğu küresel yapılar ve nano taşıyıcıların (nanopartiküller, nanokapsüller, miseller, dendrimerler) içinde bulunan terapötik ajanların sergilediği davranışları ele alarak yeni yöntemler geliştirir [10]. Araştırmalar sonucunda, nano taşıyıcılar hastalıklı yapıya hedeflendirilen ilaçların taşınmasını sağlar.

Polimerik nanopartiküler sistemlerdeki gelişmeler gelecek için umut vaat etmektedir. Nanoparçacıkların hazırlanmasında polimerlerin önemli bir yeri vardır. Bu çalışmada, bir flavanoid olan rutin ve PLGA (Poly-D,L-laktik-ko-glikolik asit) polimeri kullanılarak farklı sentez yöntemleri ile rutin yüklü PLGA nanopartikülleri sentezlenmiş ve karakterizasyonu yapılmıştır.

2. RUTİN

İki fenil halkasının propan zinciri ile birleşmesi sonucu, flavonoidlerin karbon iskeleti oluşmaktadır. 15 karbon atomu içeren flavonoid iskeleti C6–C3–C6 konfigürasyonunda düzenlenmiştir. Üç karbonlu propan zincirinin üçüncü bir halka oluşturması, farklı şekiller alması veya fenil gruplarının farklı pozisyonlarda bağlanması sonucu flavonoidlerin farklı sınıfları oluşmaktadır [11].

Fenilalanin, fenilpropanoid metabolik sentez yolunda önce 4-kumaril-CoA'ya dönüştürülür. Bu bileşik, ligninler, kumarinler ve stilbenlerin üretiminde kullanılabilir. 4-kumaril-CoA'nın bir dizi üretimi sonucu en yaygın kullanılan auronlar, flavonlar, flavonoller, izoflavonoidler, proantosiyandinler ve antosiyandinler flavonoid bileşikleri oluşmaktadır [12].

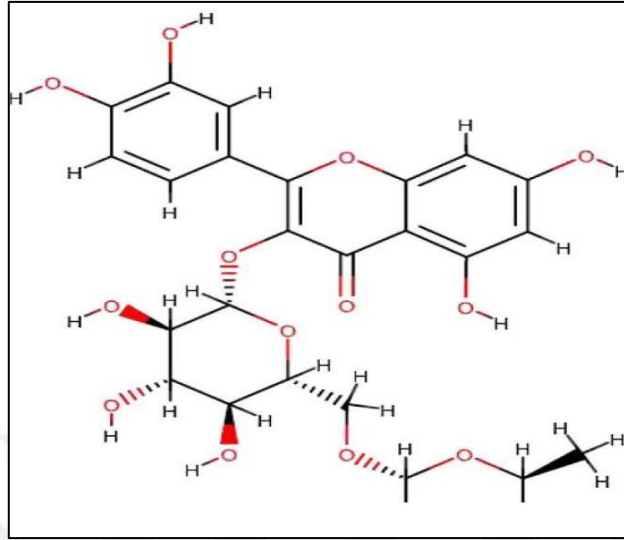
Tablo 2.1. Bazı flavonoidlerin buldukları besin kaynakları [13]

Sınıf	Flavonoid	Besin Kaynağı
Flavanol	(+)-Kateşin, (-)-Epikateşin, Epigallokateşin	Çay
Flavone	Sirisin, apigenin, rutin, luteolin ve luteolin glukositleri	Meyve kabuğu, kara buğday, kırmızı şarap, zeytinyağı, çilek ve greyluft
Flavonol	Kempferol, kuersetin, mirisetin ve tamariksetin	Soğan, kırmızı şarap, zeytinyağı, çilek ve greyluft
Flavonone	Naringin, naringenin, taksifolin ve hesperidin	Turunçgiller, greyluft, limon ve portakal
İzoflavone	Genistin, daidzin	Soya fasulyesi
Antosiyandin	Apigenin, siyanidin	Kiraz, ahududu ve çilek

Tıbbi bitkiler, eski çağlardan beri geleneksel tıbbın ayrılmaz bir parçasıdır. Bitkilerde yaklaşık 4000 flavonoid türü olduğu bilinmektedir. Rutin, (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone-3-rutinoside), karabuğday, çay ve elma gibi bitkilerde bol miktarda bulunan bir flavonoldür. Gıda malzemelerinin avital beslenme bileşenidir [14].

Rutin, aynı zamanda 'rutosid' olarak da bilinir, quarcetin-3-rutinoside ve sophorin karabuğdayda bulunan bir narenciye flavonoid glikozitidir. Rutin ismi de rutin içeren bitki

ruta gravedenlerinden gelmektedir. Kimyasal olarak, disakkarit rutinoz ile birlikte flavonolik aglycone quercetin içeren bir glikozittir [15].



Şekil 2.1. Rutin' nin kimyasal yapısı [16]

2.1. Rutin Molekülünün Biyolojik Aktiviteleri

2.1.1. Antidepresan Etkileri

Farelerde yüzme testi ve kuyruk süspansiyon testi, Schinus molle'den izole edilen rutinin antidepresan benzeri etkilerini analiz etmek için kullanılmıştır. Kuyruk süspansiyon testinde hareketsizlik süresinde bir azalma olmuş, fakat lokomotor aktivitede herhangi bir değişiklik olmamıştır. Araştırmalar sinaptik yarıta serotonin ve noradrenalin kullanımının artırılması nedeniyle rutinin aracılık ettiği antidepresan benzeri etkiyi ortaya koymuştur [17].

2.1.2. Sensorimotor Kaybının (Felç-İnme) İyileşmesi

İnme, dünyadaki yetişkinlerde ölüm ve sakatlığın önemli bir nedeni gibi görünen belirleyici bir halk sağlığı sorunu olarak görülebilir. Oksidatif stres ve inflamasyon, beyindeki iskemik hasardan sonra gözlemlenen patolojik olaylardan ikisidir [18]. Motor (M1) ve somatosensoriyal (S1) primer kortekslerin yüzeysel kan damarlarının tek taraflı termokoagülasyonu ile indüklenen kortikal iskeminin hayvan modelinde rutinin koruyucu etkisi araştırılmıştır. Rutin uygulamasının, kortikal yaralanmanın çevresindeki

nörodejenerasyonun azalması nedeniyle gözlenen sensorimotor kaybının iyileşmesini önemli ölçüde arttırdığı gözlenmiştir [19].

2.1.3. Anti-diyabetik Etkileri

Streptozotosin, pankreas adacıklarını yok ederek insülin seviyelerini azalttığı bilinen toksik bir kimyasaldır. Streptozotosin, oksijen ve azot monoksit serbest radikalleri üretmekle birlikte NAD ve NADP seviyelerini düşürerek pankreatik b hücrelerine seçici olarak saldırır. Aşırı glikoz üretimi ve dokular tarafından azaltılmış kullanım hipergliseminin temel üsleri olarak kullanılmaktadır [20]. Yapılan bir çalışmada, streptozotosin ile indüklenen diyabetik sıçanlarda rutin kullanımı, plazma glukozunda bir düşüşe, insülin seviyelerinde yükselmeye, glikojen içeriği ve glikolitik enzimlerin geri kazanılmasına neden olmuştur. Rutin ile tedavi edilen diyabetik sıçanlarda yağ asitliğinin azalması ile birlikte pankreatik adacıkların gençleşmesi gözlenmiştir [21]. Rutin ile tedavi edilen streptozotosin diyabetik sıçanlarda açlık plazma glikozu, glikozile hemoglobin, C-peptid ve malondialdehit düzeylerinin azalması gözlenmiştir. ALT, AST ve LDH, serum, karaciğer ve kalpte streptozotosin nedeniyle hepatik ve kardiyak toksisite üzerine koruyucu bir etki göstermektedir. Matris metalloproteinaz aktivitesindeki değişiklikler ve streptozotosin kaynaklı hasara karşı böbreklerde de korunma gözlenmiştir [22].

2.1.4. Antioksidan Etkileri

Rutin güçlü bir antioksidandır, oksidatif stresi azaltmakta ve böylece hücrelerin yapısal ve fonksiyonel bütünlüğünü korumaktadır. Hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmalarda Rutin ile ilgili en az üç mekanizma bulunmuş ve aydınlatılmıştır. İlk olarak, kimyasal yapısı nedeniyle rutin reaktif oksijen türlerini (ROS) doğrudan bozabilmekte ve bozulan zincir reaksiyonunun ilerlemesini durdurabilmektedir [23]. İkincisi, süperoksit dismutaz (SOD) veya katalaz gibi birçok antioksidan enzimin ekspresyonunu ve aktivitesini artırarak hücrel oksidatif savunma sistemlerini düzenleyerek vücudun başlıca antioksidanı olan glutatyonun (GSH) üretimini arttırmaktadır [24-26]. Ayrıca rutin, ROS'nin üretilmesinde rol oynayan bir ksantin oksidaz enzimi inhibitörü olduğu bulunmuştur [27].

Bu nedenle, oksidatif stresin, diyabet ve kardiyovasküler veya nörodejeneratif hastalıklar gibi alta yatan bir neden olduğu birçok sağlık koşullarında Rutin'in terapötik potansiyelini

gösteren artan bir kanıt alanı olması şaşırtıcı değildir [24, 28-30]. Ayrıca, rutinin radyasyon ve kemoterapi sırasında oksidatif hasara maruz kalan vücut ve organları (kalp, böbrek ve karaciğer) koruyabildiği ve bu medikal tedavilerle ilişkili birçok yan etkiyi iyileştirebildiği gözlenmiştir [25, 31-33].

2.1.5. Antikanserojen Etkileri

Deneyler, rutinin kanser hücrelerinin ölümünü tetiklediği çeşitli hücresel yolları ve mekanizmaları ortaya çıkarmış ve doğrulamıştır [34]. Hem in vitro hem de in vivo çalışmalarda Rutin'in lösemi ve kolon kanserine karşı etkinliği gösterilmiştir [27-31]. İlginç bir şekilde, basit enzimatik modifikasyondan sonra, yani rutinin quercetin-3-glukozid'e (Q3G) deglikosilasyonundan sonra, elde edilen türevi (Q3G), beyin, meme, prostat, böbrek, akciğer, kolon ve yumurtalık dahil olmak üzere birçok insan tümör hücre hattına karşı anti-proliferatif etki göstermiştir [40-42]. Bir başka çalışmada, BRCA2 mutasyonunun varlığı [42] daha çok meme ve yumurtalık kanseri riski ile bağlantılı olduğu görülmüştür. İlginç bir şekilde, araştırmacılar, quercetin ve rutinin meme ve yumurtalık kanseri riskini azaltabildiğini ve önemli bir koruma sağladığını keşfetmişlerdir. Bu, mutasyona sahip hastalarda kanseri önleme yaklaşımının yanı sıra klinik tedavinin bir parçası olarak dikkate alınmıştır [42].

2.1.6. Gastrik Ülser Koruması

Bir araştırma Rutin' in umut verici bir anti-ülser etkisi olduğunu göstermektedir [35]. Hayvan çalışmaları, çeşitli fiziksel ve kimyasal ajanların neden olduğu mide ülserlerinin oluşumunun Rutin tarafından önemli ölçüde önlenebildiğini göstermiştir [35]. Bu sonuçlar, mide ülseri modeline (indüksiyon faktörü) bağlı olarak % 22 ile % 78 arasında değişen dozda anti ülser koruması göstermiştir.

Bir flavanol olan Rutin molekülünün, düşük çözünürlüğe, zayıf emilime, yüksek metabolizma ve hızlı atılıma sahip olması nedeniyle canlı sistemlerde biyoyararlanımı oldukça düşüktür. Bu nedenle, bu çalışmada Rutin molekülünün biyoyararlanımının arttırılabilmesi için polimerik yapılı nano boyutlu ilaç taşıyıcı sistemler kullanılmıştır.

3. NANOPARTİKÜLER İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLER

Nanoboyutlu malzemeler üzerine gerçekleştirilen çalışmalar son yıllarda tek başına önemli bir alan olma doğrultusunda büyük bir gelişme göstermektedir. Nanoboyutlu malzeme olarak tanımlanan yapılar; nanokristaller, nanopartiküller, nanotüpler, nanoteller, nanoçubuklar ve nano ince filmler gibi farklı sınıflara ayrılmaktadır. Temel olarak bu malzemelerin tümüne nanopartiküler sistemler denilmektedir [44].

Nanopartiküller sentetik veya doğal kaynaklı bir makromolekülden meydana gelirler. Nanopartikül ve nanokristal malzemelerin sahip oldukları değişik özelliklerden dolayı yaygın kullanım alanına sahiptirler ve çeşitli fonksiyonlar kazandırılabilmesi de bir başka özellikleri olarak kabul edilmektedir. Üretimlerinde genellikle polimerik yapılar kullanılmaktadır. Üretimde esas istenilen çok hafif, akıllı, ucuz ve temiz malzemeler elde etmektir. Her polimerin kendine has özelliği ile nanopartiküller biyobozunurluk, biyoyoumluluk ve termal özellikler gibi çeşitli özellikler kazanmaktadırlar [45].

Nanopartiküllerin ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanılmasının amacı, maddenin hedefe özel etkisini elde etmek için partikül büyüklüğünü, yüzey özelliklerini ve farmakolojik aktif maddenin salımını terapötik olarak optimal oran ve doz ayarlaması ile kontrol etmektir.

Nanopartiküller boyutları 10-1000 nm arasında değişen parçacıkları içeren bir kolloidal etken madde taşıyıcı sistemlerdir. Nanopartiküller sisteme etken madde yüklenirken önce etken madde çözünür daha sonra nanopartikül matriksi içerisine enkapsüle edilir veya yüzeye bağlanır. Biyobozunabilir polimerik nanopartiküller, potansiyel ilaç dağıtım araçları olarak literatürde birçok çalışmada kullanılmıştır [46-47].

Yapılan klinik çalışmalar sonucunda hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilmiştir [48]. Bu prensibe göre biyoaktif ajanlar, kimyasal reaksiyonlarla belirli bir hızda ve belirli bir yapıya spesifik olacak şekilde salınmaktadır. Hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı sistemler, ilaçları daha etkili ve günümüzdeki ilaçlara göre daha pratik hedefe iletilmesini sağlamaktadır.

İlaçların çoğu hedef hücrelere ulaşma aşamasında hidrofobik alanlarda etkilerini istenilen şekilde gösteremezler. İlacın etkisini belirlenen süre içerisinde gösterememesi ve hedef doku dışında tüm vücutta etkisini göstermesi olumsuz bir sonuçtur. Etken maddenin vücuttaki bariyerleri aşarak hedef alana iletilmemesi ise bir diğer olumsuz sonuçtur. Etken madde kullanımında ortaya çıkan bu sorunların çözümünde nanoteknoloji bazı yöntemler sunmaktadır. Nano taşıyıcıların geliştirilmesi sayesinde kan-beyin bariyeri, solunum

sistemindeki bronşiyoller ve gibi çeşitli anatomik ve biyolojik yapıları aşarak ilaçların hedef dokuya ulaştırılması sağlanır [49]. Vücuttaki dar alanlarda daha iyi dağılım sergileyen nano taşıyıcılar düşük çözünürlüğe sahip ilaçların çözünmesini kolaylaştırmaktadır. Yeni özellikler kazandırılan nano taşıyıcı sistemler ilaç toksisitesini azaltmakta ve daha verimli ilaç dağılımını sağlamaktadırlar. Doğal veya sentetik polimerlerin kullanılması sonucu elde edilen ilaçların nanotaşıyıcı sistem yüzeyine hareketsiz hale getirilmektedir. Böylece vücuttaki nanotaşıyıcının yüzey özellikleri bağışıklık sistemi tarafından tanınır ve hedeflenen bölgede, yabancı cisim olarak algılanması engellenmiş olunur [50]. Ayarlama işlemleri sonucunda ilacın sadece hastalıklı bölgeye etki etmesiyle ve tek uygulamada ilacın kanda etkin bir şekilde uzun süre kalmasıyla, ilacın belirli bir hızda ve yeterli miktarda salım işlevi gerçekleşebilmektedir.

Nanopartiküller klinik çalışmaları sonucunda ulaşılan verilere göre ilaç sektöründe çok önemli bir yer almıştır. Hapsetme, doğrudan etken maddeye bağlanma ve hedeflenme gibi özelliklerinden dolayı pratik olarak kullanılabilen nanopartiküller ilaç salınım sistemlerinde tercih edilmeye başlanmıştır. Araştırmalar sonucunda, nano taşıyıcılar hastalıklı yapıya hedeflendirilen ilaçların taşınmasını sağlamaktadır.

Gelişen nanoteknolojik uygulamalar sayesinde yeni ilaçlar geleneksel ilaçların yerini almıştır. Nanoteknoloji ve biyoteknoloji alanında elde edilen gelişmeler, farmasötik teknoloji uygulamaları sayesinde yeni ilaç üretimi gerçekleştirilir. İlaç taşıyıcı sistemlerle taşınan etken maddelerin parçalanması ve kaybı en aza indirilebilmektedir [51]. Ayrıca zararlı yan etkileri önleme ve biyoyararlanım ve etki oranını artırma çalışmaları yürütülebilmektedir. Yapılan bu çalışmalar sonucunda lipozomlar, nanopartiküller, etken madde polimer konjugatları ve polimerik miseller gibi çeşitli etken madde salım sistemleri ve hedefleme sistemleri geliştirilmiştir [52].

3.1. Polimerik Nanopartiküler Sistemde Kontrollü İlaç Salımı

Doğal ya da sentetik polimerler kullanılarak boyutları 10- 1000 nm aralığında değişen, hazırlama yöntemine göre nanoküre veya nanokapsül olarak adlandırılan, etken maddelerin partikül içinde çözündüğü, hapsedildiği ve/veya yüzeye adsorbe edildiği yada bağlandığı matriks sistemler hazırlanabilmektedir. İlgili dokuya hedeflendirilmesi esnasında kullanılan nanopartiküllerin iki temel avantajı söz konusudur. Bunlardan birincisi, küçük partikül boyutlarına sahip olunmasıdır. Böylece etken maddenin hedef bölgede birikmesini sağlanmaktadır. İkincisi ise, küçük partiküllerin hazırlanmasında biyobozunur materyallerin kullanılmasıdır. Biyobozunur materyaller sayesinde uzun süre kontrollü etken madde salınımı sağlanmaktadır. Ayrıca nanopartiküller ilaçların/proteinlerin veya peptidlerin stabilitesinin artmasını sağlamaktadır. Kolaylıkla sterilize edilebildiği gibi etken madde yükleme kapasiteleri de yüksektir. Bu sayede oral yolla ilaç uygulamalarında nanopartikül şeklinde verilen ilacın salım ve biyoyararlanımı artmaktadır [53].

Polimer nanoteknolojileri, ilaç dağıtım zorluklarını aşmak için gelecekte daha umut vaat eden çalışmaların önemli bir parçasıdır. Aynı zamanda doğru ilaç iletimini ve hedeflemesini sağlamak için uygun özelliklere sahip polimer nanopartiküller yapılmasını mümkün kılmaktadırlar. Polimer kimyasında ve polimer kolloid fiziko-kimyasında gözlenen gelişmeler sayesinde polimerik nanopartikülleri kontrollü koşullar altında geniş bir yelpazede hazırlamak mümkündür [54-55].

Literatür incelendiğinde nanoparçacıkların bileşeni olarak kullanılabilir polimerler çok azdır [56]. Kullanılacak polimerin aşağıda belirtilen bazı şartları sağlaması gerekmektedir:

- Biyobozunur olmalı ve birikim riski olmadan gereken sürede vücuttan atılmalı,
- Toksik ve immünojenik olmamalı, aynı şekilde parçalanma ürünleri varsa toksik olmamalı ve immünojenik olmamalıdır,
- Nanoparçacıkların tasarlandığı ilaç dağıtım hedefiyle ilgili uygun özelliklere sahip polimer nanopartikül formunda formüle edilmelidir.

Genellikle başarılı bir nanopartikül sistem oluşturabilmek için etken madde salımı ve polimer biyodegradasyonu önemlidir. Etken madde salımı aşağıda belirtilen faktörlere bağlıdır:

- Yüzeğe bağlı ilacın desorpsiyonu,
- Etken madde çözünürlüğü,
- Nanopartikül matrisi boyunca etken madde Nanopartikül matrisi erozyonu,
- Erozyon/difüzyon süreci,
- Polimerin özellikleri (mw, kristallinite, hidrofilik özellikleri vb.).

3.2. Nanopartikül Sentezinde Kullanılan Polimerler

Polimerik nanopartiküller çapları 10-1000 nm arasında olan yapılardır. Polimerik nanopartiküller poli-kaprolaktan, poliakrilamid [57], poliakrilat [58] veya doğal polimerler olan albümin [59], DNA [60], kitosan [61-62], jelatin [63] gibi polimerlerden elde edilmektedir [64]. Polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan polimerlerin bazıları (Polilaktik asit (PLA) [65] ve poliglikolik asit (PGA) [66]) biyolojik olarak bozunabilirken, bazıları ise (poliüretan [67]) biyolojik olarak parçalanmazlar.

Polimerik nanopartiküller, nanopartiküllerin yüzeyindeki kimyasal gruplar arasındaki etkileşimlerin yanı sıra immünolojik etkileşimi azaltmak için noniyonik surfaktanlarla kaplanmaktadır [68]. Polimerik nanopartiküllere ilaçlar yüzeyine immobilize edilerek tutturulabildiği gibi [69], sıklıkla nanopartikül oluşumu sırasında nanopartiküllerin içlerine enkapsüle edilirler.

Nanoilaçların geliştirilmesi için biyolojik olarak bozunabilir nanosistemlerin uygulanması en başarılı fikirlerden biridir. Biyobozunur polimerlerden oluşan nanopartiküller, vücutta hidroliz işlemine girerek, laktik asit ve glikolik asit gibi biyolojik olarak parçalanabilen metabolit parçacıklar üretilmektedir.

Nanopartikül sentezinde kullanılan polimerler doğal polimerler ve sentetik polimerler olarak iki gruba ayrılırlar.

3.2.1. Doğal Polimerler

Biyolojik olarak üretilen ve benzersiz işlevlere sahip polimerlerdir. Proteinler (kollojen, jelatin, elastin, aktin vb.), polisakkaritler (selüloz, nişasta, dekstran, kitin vb.) ve polinükleotidler (DNA, RNA) başlıca doğal polimerlerdir. Doğal polimerler sahip oldukları işlevsel özelliklerinden dolayı farklı kullanım alanlarına sahiptir. Biyomalzeme olarak kullanılabilirler. Makromoleküllere benzerliklerinden dolayı vücutta toksik etki göstermez, istenmeyen reaksiyonlara yol açmazlar [28].

3.2.1.1. Kitin ve Kitosan

Kitin, kabuklu deniz hayvanlarının kabuklarında çok miktarda bulunan ve yeryüzünde selülozdan sonra en fazla bulunan doğal bir biyopolimerdir. Kitosan ise, kitinin deasetilasyonu ile elde edilen lineer bir aminopolisakkarittir. Kitin, bir N-asetil-D-glukozamin polimeri, kitosan ise bir D-glukozamin ve N-asetil-D-glukozamin kopolimeridir. Deasetile edilmiş kitin, kitosan olarak adlandırılır. Deasetilasyon işlemi, kitinin üzerindeki asetilamino (-NH-CO-CH₃) gruplarının amino (-NH₂) gruplarına dönüştürülmesi işlemidir. Bu deasetilasyon sonunda N-asetil-D-glukozamin grupları tamamen dönüştürülemez ancak sayıları D-glukozamin gruplarına göre azalır. Deasetilasyon derecesi, amino gruplarının sayısının, asetilamino gruplarının sayısına oranı olarak tanımlanır. Deasetilasyon işlemi sonunda kitin, kitosana %80-90 deasetilasyon derecesine kadar yaklaşabilir [70].

Kitosan çok etkili bir adsorbent olduğu için kullanım alanları genelde bu amaca yöneliktir. Endüstriyel atık sularda bulunabilen ve çöktürülerek uzaklaştırılması zahmetli olan Cr⁺⁶ gibi ağır metallerin kitosanla adsorplanarak uzaklaştırılması mümkündür. Ayrıca toksik olmaması ve biyoaktif özelliklerinin de bulunmasından dolayı kitosan, ilaç sanayi ve medikal uygulamalarda da sıkça kullanıldığı bilinmektedir.

3.2.1.2. Selüloz

Odun, keten, bambu gibi bitkilerin hücre çeperinin temelini oluşturmaktadır. Lineer bir polimer ve zincir şeklinde moleküllerden oluşmaktadır. Yapı taşı glikoz anhidritlerdir. Birbirleri arasında glikozidik bağ bulunur [71]. İlaç sektöründe geniş bir kullanım alanı vardır. Polimer veya yardımcı madde olarak ilaç salımında kullanılabilirler, ilaç taşıyıcı olarak doku mühendisliğinde kullanılabilirler.

3.2.2. Sentetik Polimerler

3.2.2.1. Poli-ε-Kaprolakton (PCL)

100 nm'den 500 µm'ye kadar çok sayıda boyuta sahip poli-ε-kaprolakton nanapartiküller için boyut bakımından geniş bir seçim yapılabilmesini sağlamaktadır. PCL, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi onaylı biyolojik olarak parçalanabilir bir polimerdir. Bozunma hızı çok yavaştır, bu sebeple uzun süreli cihazlar için implante edilebilir biyomateryal olarak kullanılmaktadır. Parçacıkların boyutları foton korelasyon spektroskopisi, taramalı elektron mikroskobu veya lazer kırınımı ile belirlenmektedir. PCL parçacıkları küresel, optik olarak berraktır ve kontrollü ilaç salımı, kaplama malzemeleri, biyoyararlanımı artırma ve biyomedikal cihazlar için kullanılmaktadır.

3.2.2.2. Poliglikolik Asit (PGA)

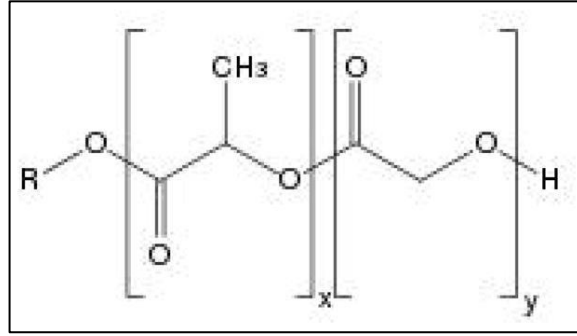
Poliglikolit veya poli (glikolik asit) (PGA), biyobozunur, termoplastik polimer ve en basit doğrusal alifatik poli esterdir. Polikondensasyon veya halka açma polimerizasyonu ile glikolik asitten başlayarak hazırlanabilir. PGA 1954'ten beri sert elyaf oluşturucu bir polimer olarak bilinmektedir [72]. Halen, poliglikolit ve bunun kopolimerleri (laktik asitli poli (laktik-ko-glisiklik asit), ε-kaprolaktonlu poli (glikolid-kap-kaprolakton) ve trimetilen karbonatlı poli (glikolid-ko-trimetilen karbonat), emilebilir dikişlerin sentezi için malzeme ve biyomedikal alanda değerlendirilmektedir [73].

3.2.2.3. Poli (D,L-laktik-ko-glikolik asit) PLGA

Poliester PLGA, polilaktik asit (PLA) ve poliglikolik asitin (PGA) bir kopolimeridir. Tasarım ve performans bakımından ilaç dağıtımında kullanılabilen en iyi tanımlanmış polimerdir. Polilaktik asit tipik olarak sırasıyla klasik stereokimyasal terimlerle ve bazen sırasıyla R ve S formunda D veya L formunda tanımlanan bir asimetric karbon içerir. PLA'nın enantiyomerik formları, poli D-laktik asit (PDLA) ve poli L-laktik asittir (PLLA). PLGA, D- ve L-laktik asit formlarının eşit oranda bulunduğu poli D, L-laktik-ko-glikolik asidin kısaltmasıdır.

Suda PLGA, yapısındaki ester bağlarının hidrolizi ile biyolojik olarak bozularak glikolik ve laktik asit son ürünlerini meydana getirmektedir. PLA'nın yapısında bulunan metil yan

grupları sayesinde PGA' ya göre daha hidrofobiktir. Böylece laktik asitçe zengin PLGA kopolimerleri daha az hidrofiliktir, daha az su emer ve daha yavaş bozunur.



Şekil 3.2. Poli (D,L-laktik-ko-glikolik asit) PLGA' nın kimyasal yapısı

3.3. Nanopartikül Sentezinde Kullanılan Yüzey Aktif Maddelerin İşlevi

Yüzey aktif maddeler (surfactants), iki sıvı arasındaki, bir gaz ile bir sıvı arasındaki veya bir sıvı ile bir katı arasındaki yüzey gerilimini (veya ara yüzey gerilimini) düşüren bileşiklerdir. Yüzey aktif maddeler deterjanlar, ıslatma maddeleri, emülgatörler, köpükleştirici maddeler ve dispersanlar olarak işlev görebilirler.

Yüzey aktif maddeler, nanopartikül sentezinde emülgatör olarak kullanılmaktadır. Sentezde polimer içeren yağ fazı, su fazından emülgatör sayesinde ayrılmaktadır. Oluşan emülsiyon sabit kalmakta, partikül agregasyonunu azaltmakta, nanopartiküllerin parçacık dağılımını, boyutunu, enkapsülasyon verimini, ilaç salımını ve morfolojik özelliklerini etkilemektedir.

Yüzey aktif maddeler genellikle amfifilik olan organik bileşiklerdir, yani hem hidrofobik grupları (kuyrukları) hem de hidrofilik grupları (kafaları) bulunmaktadır [74]. Dolayısıyla, bir yüzey aktif madde, bir suda çözünmeyen (veya yağda çözünen) bir de suda çözünür bileşen içermektedir. Yüzey aktif maddeler, suyun yağ ile karıştığı durumda suda yayılmaktadır ve hava ile su arasındaki ara yüzlerde ya da yağ ile su arasındaki ara yüze adsorbe olmaktadır. Lipofilik grup hava veya yağ fazı ile etkileşime girebilir. Bu yüzden emülgatörler yüzeyi stabilize edebilirler. PLGA nanopartikül sentezinde en çok poli(vinil alkol) (PVA) emülgatör olarak kullanılmaktadır [74].

3.2.1. Polivinil Alkol (PVA)

Poli (vinil alkol) (PVA), suda çözünür bir sentetik polimerdir. İdealleştirilmiş formül $[CH_2CH(OH)]_n$ 'dir. Toksik değildir, biyouyumlu ve biyobozunur bir maddedir. Kağıt yapımında, tekstillerde ve çeşitli kaplamalarda kullanılmaktadır. Beyaz (renksiz) ve kokusuzdur. Bazen boncuk ya da suda çözeltiler halinde bulunabilir [75]. Polivinil alkol dispersiyonu yapmak için polivinil alkol koruyucu kolloid olarak emülsiyon polimerizasyon yardımcısı olarak kullanılmaktadır. Kontak lenslerde, yapay organlarda, ilaç salım sistemlerinde, yara sargısı gibi sistemlerde kullanılmaktadır [75].



4. MATERYAL VE METOD

4.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar

- Sonikatör (Bandelin Sonorex)
- Manyetik Karıştırıcı (2Mag Mix 15 ecc/ Heidolph MR 3001)
- Hassas Terazî (Precisa XB 220A)
- Zeta Potansiyel ve Parçacık Ölçüm Cihazı (Nano ZS, Malvern)
- SEM (ZEISS EVO LS10)
- FTIR (IR Prestige21 SHIMADZU CORPORATION)
- Vortex (Heidolph Reax Top)
- Sentrifüj (Allegra X-30R Centrifuge Beckman Coulter)
- UV-Vis Spektroskopî (UV-1800 SHIMADZU)
- Çalkalamalı İnkübatör- Biosan Environmental Shaker-Incubator ES-20

4.2. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasallar

- Rutin Hidrat- Sigma
- MgCl₂-Sigma Aldrich
- Poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA)- Sigma Aldrich 719900
- Diklorometan DCM- Sigma Aldrich 24233-2
- Etanol- Sigma
- Polivinilalkol (PVA)- Sigma Aldrich
- Aseton- Sigma Aldrich
- Su

4.3. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler

- 3%’ lük polivinil alkol çözeltisi elde etmek için ;

30 g polivinil alkol tartıldı ve 1000 ml distile su eklenip manyetik karıştırıcıda 60-70°C’ de partiküllü yapı tamamen çözünene kadar karıştırıldı.

- 2%’ lik polivinil alkol alkol çözeltisi elde etmek için;

20 g polivinil alkol tartıldı ve 1000 ml distile su eklenip manyetik karıştırıcıda 60-70°C’ de partiküllü yapı tamamen çözünene kadar karıştırıldı.

- 1%’ lik polivinil alkol alkol çözeltisi elde etmek için;

10 g polivinil alkol tartıldı ve 1000 ml distile su eklenip manyetik karıştırıcıda 60-70°C’ de partiküllü yapı tamamen çözünene kadar karıştırıldı.

- 0,1’ lik polivinil alkol çözeltisi elde etmek için;

1 g polivinil alkol tartıldı ve 1000 ml distile su eklenip manyetik karıştırıcıda 60-70°C’ de partiküllü yapı tamamen çözünene kadar karıştırıldı.

4.4. Farklı Formülasyon Parametrelerine Sahip Rutin Yüklü PLGA Nanopartiküllerinin Sentezi

Rutin maddesinin nanopartikül üretiminden önce kimyasal özellikleri ve bu molekül için uygun nanopartikül hazırlama yöntemleri araştırılmıştır. Verilere göre değerlendirme yapılarak aşağıda maddeler halinde belirtilen yöntemler ile sentezler yapılmıştır.

4.4.1. Tekli Emülsiyon-Çözücü Buharlaştırma Yöntemi

5 mg rutin ve 25 mg PLGA tartılmıştır. 5mg rutin 1ml etanolün içerisinde, 25 mg PLGA ise 2 ml dikloro metanın içerisinde çözülmüştür. Elde edilen karışım 3%'lük 4 ml PVA içerisine eklenerek daha sonra 1,5 dakika 80% güç ile sonikasyon yapılmıştır. Karışım manyetik karıştırıcı yardımı ile yavaş yavaş 35 ml 0,1%' lik PVA' nın içerisine eklenmiştir. Tüm işlemler 4 defa yapılarak elde edilen karışımlar birleştirilmiştir. Oluşan nanopartiküller organik çözücünün buharlaştırılması amacı ile 24 saat manyetik karıştırıcı üzerinde karışmaya bırakılmıştır. 24 saat sonra sentrifüj işlemi yapılarak nanopartikül çöktürülmüştür. Bu işlem 9000 rpm'de 4 °C'de 40 dakika yapılmıştır. PVA ve enkapsüle olmamış Rutin'in uzaklaştırılması için üzerine 35 ml su eklenerek aynı şartlar altında sentrifüj işlemi 2 defa daha 30'ar dakika olacak şekilde tekrar edilmiştir. Üretilen nanopartiküller liyofilizatörde kurutulmuştur [76-77].

4.4.2. Nano-Çöktürme Yöntemi

20 mg rutin ve 100 mg PLGA tartılarak 8 ml asetonun içerisinde çözülmüştür. Karışım manyetik karıştırıcı yardımı ile 1%' lik 80 ml PVA ile yavaş yavaş karıştırılmıştır. Oluşan nanopartiküller organik çözücünün buharlaştırılması amacı ile 24 saat manyetik karıştırıcı üzerine koyulmuştur. 24 saat sonra sentrifüj işlemi yapılarak nanopartikül çöktürülmüştür. Bu işlem 9000 rpm 4°C' de 40 dakika yapılmıştır. PVA ve enkapsüle olmamış Rutin'in uzaklaştırılması için üzerine 35 ml su eklenerek aynı şartlar altında sentrifüj işlemi 2 defa daha 30'ar dakika olacak şekilde tekrar edilmiştir. Üretilen nanopartiküller liyofilizatörde kurutulmuştur [78].

4.4.3. Nano-Çöktürme Yöntemi (Sonikatör ile)

20 mg rutin ve 100 mg PLGA tartılmış ve 8 ml asetonun içerisinde çözünmüştür. Karışım manyetik karıştırıcı yardımı ile 1%' lik 80 ml PVA ile yavaş yavaş karıştırılmış ve 1,5 dakika 80% güç ile sonikasyon yapılmıştır. Oluşan nanopartiküller organik çözücünün buharlaştırılması amacı ile 24 saat manyetik karıştırıcı üzerine koyulmuştur. 24 saat sonra sentrifüj işlemi yapılarak nanopartikül çöktürülmüştür. Bu işlem 9000 rpm 4°C' de 40 dakika yapılmıştır. PVA ve enkapsüle olmamış Rutin'in uzaklaştırılması için üzerine 35 ml su eklenerek aynı şartlar altında sentrifüj işlemi 2 defa daha 30'ar dakika yapılmıştır. Kalıntılardan uzaklaştırılan nanopartiküller liyofilizatörde kurutulmuştur [78].

4.4.4. Salting-Out Yöntemi

20 mg rutin ve 100 mg PLGA tartılarak 8 ml asetonun içerisinde çözünmüştür. 24 ml 2%' lik PVA (60%' lık $MgCl_2$ içeren) manyetik karıştırıcı yardımı ile yavaş yavaş eklenmiştir. Oluşan nanopartiküller organik çözücünün buharlaştırılması amacı ile 24 saat manyetik karıştırıcı üzerine koyulmuştur. 24 saat sonra sentrifüj işlemi yapılarak nanopartikül çöktürülmüştür. Bu işlem 9000 rpm 4°C' de 40 dakika yapılmıştır. PVA ve enkapsüle olmamış Rutin'in uzaklaştırılması için üzerine 35 ml su eklenerek aynı şartlar altında sentrifüj işlemi 2 defa daha 30'ar dakika olacak şekilde tekrar edilmiştir. Üretilen nanopartiküller liyofilizatörde kurutulmuştur [76-77].

4.4.5. Salting-Out Yöntemi (Sonikatör ile)

20 mg rutin ve 100 mg PLGA tartılarak 8 ml asetonun içerisinde çözünmüştür. 24 ml 2%' lik PVA (60%' lık $MgCl_2$ içeren) manyetik karıştırıcı yardımı ile yavaş yavaş eklenmiş ve 1,5 dakika 80% güç ile sonikasyon yapılmıştır. Oluşan nanopartiküller organik çözücünün buharlaştırılması amacı ile 24 saat manyetik karıştırıcı üzerine koyulmuştur. 24 saat sonra sentrifüj işlemi yapılarak nanopartikül çöktürülmüştür. Bu işlem 9000 rpm 4°C' de 40 dakika yapılmıştır. PVA ve enkapsüle olmamış Rutin'in uzaklaştırılması için üzerine 35 ml su eklenerek aynı şartlar altında sentrifüj işlemi 2 defa daha 30'ar dakika daha yapılmıştır. Üretilen nanopartiküller liyofilizatörde kurutulmuştur [76-77].

Tablo 4.1. Nanopartikül hazırlama yöntemlerine ait veriler

<i>NP Adı</i>	<i>Yöntem</i>	<i>Zaman (s)</i>	<i>Sonikasyon gücü (W)</i>	<i>Homojenizasyon hızı (rpm)</i>	<i>Çözücü</i>
RT1	Tekli emülsiyon	90	80	9000	Etanol
RT2	Nano çöktürme	2400	-	9000	Aseton
RT3	Nano çöktürme sonikatörlü	90	80	9000	Aseton
RT4	Salting-out	2400	-	9000	Aseton
RT5	Salting-out sonikatörlü	90	80	9000	Aseton
RT6	Tekli emülsiyon (boş)	2400	-	9000	-

4.5. Farklı Sentez Yöntemleri İle Rutin Yüklü PLGA Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

4.5.1. Reaksiyon Veriminin Hesaplanması (RY%)

Reaksiyon verimi formül 1’de gösterildiği gibi kurutulmuş (üretilemiş) rutin yüklü nanopartiküllerinin, kullanılan PLGA ve rutin miktarlarının toplamına oranı ile tayin edilmiştir.

$$RY\% = \frac{\text{Üretilen Nanopartikül Miktarı (mg)}}{\text{PLGA miktarı (mg) + Rutin miktarı (mg)}} \times 100\% \quad (1)$$

4.5.2. Enkapsülasyon Etkinliğinin Hesaplanması (EE%)

Enkapsüle edilen rutinün tayini için, sentezlenen nanopartiküllerin katı fazda elde edilmesi için yapılan sentrifüj işleminden ve sonrasında 3' er defa yapılan yıkama işlemlerinden sonra elde edilen üst fazların 354 nm' de UV-Vis spektroskopi kullanılarak absorbanans değeri ölçülmüştür.

$$EE\% = \frac{\text{Nanopartikül İçinde Bulunan Etken Madde Miktarı (mg)}}{\text{Kullanılan Toplam Madde Miktarı (mg)}} \times 100\% \quad (2)$$

4.5.3. Etken Yükleme Veriminin Hesaplanması

Rutin yükleme nanopartiküllerin etken yükleme kapasitesi UV-Vis spektroskopi kullanılarak tayin edilmiştir. Sentezde kullanılan etken madde miktarının kurutularak elde edilen nanopartikül miktarına oranı ile etken yükleme verimi tayin edilmiştir.

$$DL\% = \frac{\text{Enkapsüle Olan Madde Miktarı (mg)}}{\text{Elde Edilen Kuru Nanopartikül Miktarı}} \times 100\% \quad (3)$$

4.5.4. Zeta Sizer Analizi (Parçacık Boyut Analizi)

Zeta-sizer cihazı, koloidal çözeltilerde partiküllerin boyutunu, zeta potansiyelini ve çoklu dağılım indisini bulmak için kullanılan cihazlardır. Bu cihaz belirli bir potansiyel altında hareketi sağlanan tanelerin hızını belirler ve potansiyellerini hesaplar.

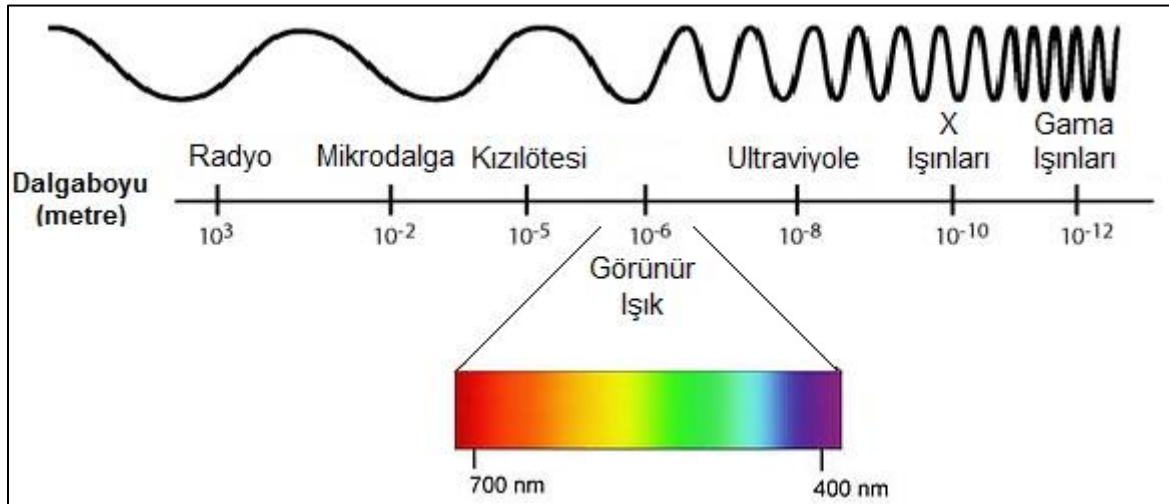
Zeta potansiyel partiküllerin yüzey yüklerinin oluşturduğu potansiyelin dolaylı olarak ölçümüdür. Başka bir ifade ile partiküller arasındaki itme veya çekme değeri ölçümüdür [79]. En az bir boyutu 1 nm–1 µm arasında olan peptid, protein gibi katı bir maddenin sıvı bir çözücü içinde çözünmesiyle oluşan koloidal sisteme koloidal süspansiyon denir. Koloidal sistemlerin doğalarını gösteren en önemli özelliklerden ikisi, partikül boyutu ve yüzey özellikleridir [80].

Nanopartiküllerin ortalama parçacık boyutu (Z-Ave), zeta potansiyel ve çoklu dağılım indisi (PDI) değerleri dinamik ışık saçma yöntemi ile tayin edilmiştir. Zeta sizer Nano ZS, Malvern cihazı kullanılmıştır. Ölçümler çözeltiler için 0,8872 cP viskoziteli ve 1.330 kırılma indeksi değerleri kullanılarak 25 ± 0.1 °C' de üçer defa gerçekleştirilmiştir.

4.5.5. UV-Vis Spektroskopisi

Işık merkezi olarak, yüksek baskı altındaki hidrojen deşarj lambası (200-375 nm aralığında ışın verir) kullanılmaktadır. Ultraviyole spektrofotometrenin, kimyasal maddelerin UV (200 - 380 nm) arasındaki spektrum analizleri için kullanılması tavsiye edilmektedir.

Bu çeşit spektrofotometreler dalga boyları 100 ile 800 nm arasında değişen ışın ile tarayarak çalışmaktadır. Ayrıca UV-Visible spektrofotometrelerde ışık kaynağından çıkan ışık önce slitten geçerek ışık bölücüye ulaşmaktadır. Bu esnada ışık iki kesite ayrılarak uygun optik sistem yardımıyla referans ve örnek küvetine farklı zamanlarda gönderimi sağlanır. Küvetten çıkan ışık hüzmesi dedektöre ulaşır ve bu ışık şiddetleri ölçülerek kaydedilir. Sonraki süreçte elde edilen veriler absorbansa karşı dalga boyu grafiğine aktarılır ve hesaplamalar grafik yardımıyla yapılır.



Şekil 4.1. UV- Vis bölge

4.5.6. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Taramalı elektron mikroskobu veya SEM (scanning electron microscope), odaklanmış bir elektron demeti ile numune yüzeyini tarayarak görüntü elde eden bir elektron mikroskobu türüdür. Elektronlar numunedeki atomlarla etkileşerek numune yüzeyindeki topografi ve kompozisyon hakkında bilgiler içeren farklı sinyaller üretmektedir. Elektron demeti raster tarama düzeni ile yüzeyi tarar ve demetin konumu, algılanan sinyalle eşleştirilerek görüntü oluşturulur. SEM ile 1 nanometreden daha yüksek çözünürlüğe ulaşılabilir. Standart SEM cihazları yüksek vakumda, kuru ve iletken yüzeyleri incelemek için uygundur. Ancak düşük vakumda, nemli koşullarda (çevresel taramalı elektron mikroskobu), çok düşük sıcaklıklardan yüksek sıcaklıklara değişen koşullarda çalışabilen özelleşmiş cihazlar da mevcuttur [81].

Rutin yüklü nanopartiküllerin yüzey morfolojisi ve şekilleri taramalı elektron mikroskobu ile incelenmiştir. Kurutulan nanopartiküller vakum altında 20-30 nm kalınlığında altın-paladyum üzerine kaplanarak ölçüm gerçekleştirilmiştir. Ölçümde ZEISS EVO LS10 kullanılmıştır.

4.5.7. FOURIER DÖNÜŞÜMLÜ KIZILÖTESİ SPEKTROSKOPİ (FTIR)

FTIR Spektrofotometresi organik bileşiklerin tanımlanmasında kullanılmaktadır. Optik izomerler dışında bütün bileşiklerin IR spektrumu birbirinden farklıdır. IR bölgesi elektromanyetik spektrumun görünür bölgesi ile mikro dalga bölgesi arasında yer almaktadır. Bu bölge 4000-450 cm^{-1} dalga boyu arasındadır. IR spektrumu organik maddenin yapısı ile ilgili direkt bilgiler sağlamaktadır. FTIR spektroskopisi katı, sıvı ve gaz örneklerin analizinde kullanılmaktadır.

IR spektrumlarının kullanım alanları çok yönlüdür;

- Bir reaksiyonun yürümesi veya bir kromatografi ayrılma gidişi belirli zaman aralıklarında yapılan deneylerle ve IR spektrumu alınmasıyla takip edilebilir.
- IR spektrumu kullanımı bağların ispatı için önem taşımaktadır. Çünkü bir reaksiyonda istenen maddenin oluşup oluşmadığını, yan ürünlerin çıkıp çıkmadığını ve oluşan ürünlerin neler olduğunu tayin etmektedir.
- Çözücü etkileri hakkında yararlı bilgiler vermektedir.

RT1, RT2, RT3, RT4, RT5, RT6 (boş NP yani PLGA) nanopartikülleri ile Rutin'in FT-IR kullanılarak infrared spektrumları alınmıştır.

4.5.8. *In vitro* Rutin Salımı

Liyofilize edilen nanopartiküllerden RT3 ve RT5 *in vitro* salım için seçilmiştir. 2.5 mg RT3 ve 5mg RT5 nanopartiküllerinin üzerlerine 5'er ml PBS eklenerek 37 °C'de çalkalamalı inkübatöre (60rpm) yerleştirilmiştir. Daha sonra belirlenen aralıklar ile (1, 2, 3, 12, 24, 48, 96, 120, 144, 168, 192 saat) 354 nm'de UV-Vis spektroskopi ile ölçümler yapılmıştır.

Her seferinde çalkalamalı inkübatörden ölçüm için alınan nanopartikül süspansiyonu 20 dakika 9000 rpm'de sentrifüj cihazına koyulmuştur. Daha sonra üst fazları mikropipet yardımıyla ayrılıp quartz küvete aktarılmış ve Uv-Vis spektrometreye yerleştirilerek absorbanslar okunmuştur. Bu işlem her bir nanopartikül için yapılmıştır. Ölçümü yapılan nanopartiküllerin üst fazları üzerlerine eklenerek tekrar 37 °C'de çalkalamalı inkübatöre (60rpm) yerleştirilmiştir.



5. DENEYSEL SONUÇLAR

Bu tez kapsamında gerçekleştirilen deneysel çalışmalarda kullanılan nanopartikül üretim yöntemleri ve karakterizasyon çalışmalarında elde edilen sonuçlar Tablo 5.1'deki gibidir:

Tablo 5.1. Rutin nanopartiküllerine ait veriler

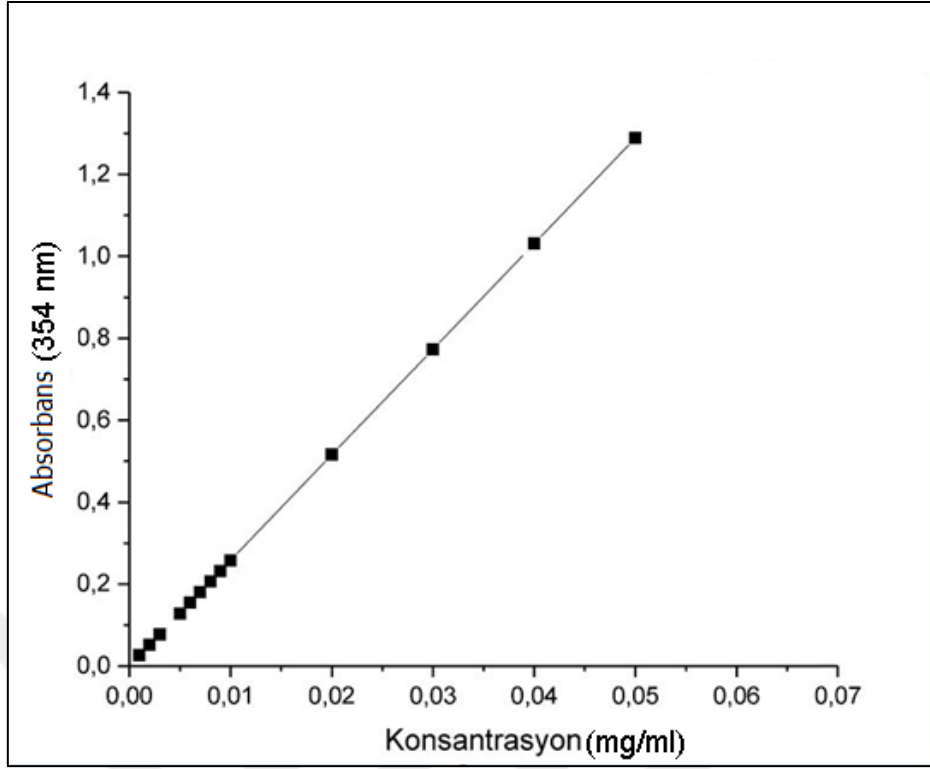
<i>NP Adı</i>	<i>Yöntem</i>	<i>Time (s)</i>	<i>Sonikasyon gücü (W)</i>	<i>Homojenizasyon hızı (rpm)</i>	<i>Çözücü</i>	<i>EE%</i>	<i>RY%</i>	<i>DL%</i>	<i>Z-Ave (nm)</i>	<i>PDI</i>	<i>Zeta Pot. (mV)</i>
<i>RT1</i>	Tekli emülsiyon	90	80	9000	Etanol	28,32	40,89	11,54	195,9	0,181	-22,7
<i>RT2</i>	Nano çöktürme	2400	-	9000	Aseton	7,89	12,72	10,33	211,1	0,263	-21,8
<i>RT3</i>	Nano çöktürme (Sonikatörlü)	90	80	9000	Aseton	6,13	6,43	15,88	173,7	0,322	-20,8
<i>RT4</i>	Salting-out	2400	-	9000	Aseton	30,28	17,78	28,36	637,4	0,566	-1,33
<i>RT5</i>	Salting*out (Sonikatörlü)	90	80	9000	Aseton	26,73	11,52	38,68	548,2	0,454	-1,30
<i>RT6</i>	Tekli emülsiyon (boş)	2400	-	9000	-	0	56,01	0	288,3	0,259	-7,12

5.1. Rutin Uv-Vis Spektrofotometre Kalibrasyon Eğrisi

Rutin maddesinin absorbans piki dalga boyunun belirlenebilmesi amacıyla 1 mg Rutin 1 ml etil alkol içerisinde çözülmüş ve UV-Vis spektroskopisi cihazında spektrum alınmış ve 354 nm’ de maximum absorpsiyon yaptığı dalga boyu 354 nm olarak saptanmıştır. Kalibrasyon eğrisinin hazırlanabilmesi için ise 10 mg Rutin 10 ml etil alkol içinde çözünerek 1 mg/ml’ lik ana stok çözeltisi elde edilmiştir. Stok çözeltinin (0.001-0.05) mg/ml konsantrasyon aralığında seyreltilmesi ile 13 adet farklı konsantrasyonda çözelti hazırlanmıştır. 354 nm’ de ölçüm yapılarak alınan absorbans değerleri ile Rutin molekülüne ait bir kalibrasyon eğrisi (Şekil 5.1) hazırlanmıştır.

Tablo5.2. Rutin’in farklı konsantrasyonlardaki çözeltilerinin 354 nm’deki absorbans değerleri

KONSANTRASYON	ABSORBANS (354 nm)
0,001	0,026
0,002	0,052
0,003	0,077
0,005	0,128
0,006	0,155
0,007	0,180
0,008	0,206
0,009	0,232
0,01	0,258
0,02	0,516
0,03	0,773
0,04	1,031
0,05	1,289



Şekil 5.1. Rutin' in kalibrasyon eğrisi

5.2. Farklı Yöntemlerle Sentezlenmiş Rutin Yüklü PLGA Nanopartiküllerin Enkapsülasyon Etkinliği ve Reaksiyon Verimi Sonuçları

Farklı formülasyon parametrelerine sahip rutin yüklü PLGA nanopartiküllerinin RT1, RT2, RT3, RT4, RT5 ve RT6 olmak üzere 6 farklı sentezi yapılmıştır. Enkapsülasyon etkinliği değerleri incelendiğinde, en yüksek değere sahip olan nanopartikülün salting-out yöntemi ile sentezlenen RT4 olduğu gözlenmiştir. Enkapsülasyon etkinliği değeri $EE\%=30,28\%$ 'dir. En düşük enkapsülasyon etkinliği değeri sonikatörlü nanoçöktürme yöntemi ile sentezlenen RT3 nanopartikülüne aittir, değeri $6,13\%$ 'tür. Reaksiyon verimi değerleri incelendiğinde, en yüksek değer tekli-emülsiyon yöntemi kullanılarak sentezlenen RT1 nanopartikülüne aittir. Değeri; $RY\% (40,89\%)$ ' dir. Reaksiyon verimi en düşük değere sahip olan nanopartikül, sonikatörlü nanoçöktürme yöntemi ile sentezlenen RT4 nanopartikülüne aittir ve değeri $6,43\%$ 'tür. Nanopartikül sentez yöntemlerinin enkapsülasyon etkinliği ve reaksiyon verimi değerlerini etkilediği gözlenmiştir.

5.3. Farklı Yöntemlerle Sentezlenmiş Rutin Yüklü PLGA Nanopartiküllerin Etken Yüklenme Verimi Sonuçları

Etken yüklenme verimi (DL%), enkapsüle olan etken madde miktarının üretilen kuru nanopartikül miktarına oranıdır. Nanopartikül sentez yöntemlerinin etken yüklenme verimi üzerine etkili olduğu gözlenmiştir. Etken yüklenme verimi en yüksek olan salting-out yöntemi kullanılarak sentezlenen RT5 nanopartikülüdür.

Tablo 5.3. Rutin yüklü PLGA nanopartiküllerine ait hesaplama verileri

<i>NP Adı</i>	<i>Yöntem</i>	<i>EE%</i>	<i>RY%</i>	<i>DL%</i>
<i>RT1</i>	Tekli emülsiyon	28,32	40,89	11,54
<i>RT2</i>	Nano çöktürme	7,89	12,72	10,33
<i>RT3</i>	Nano çöktürme sonikatörlü	6,13	6,43	15,88
<i>RT4</i>	Saltingout	30,28	17,78	28,36
<i>RT5</i>	Saltingout Sonikatörlü	26,73	11,52	38,68
<i>RT6</i>	Tekli emülsiyon (boş)	0	56,01	0

5.4. Farklı Yöntemlerle Sentezlenmiş Rutin Yüklü PLGA Nanopartiküllerin Boyut (nm), PDI ve Zeta Potansiyel Sonuçları

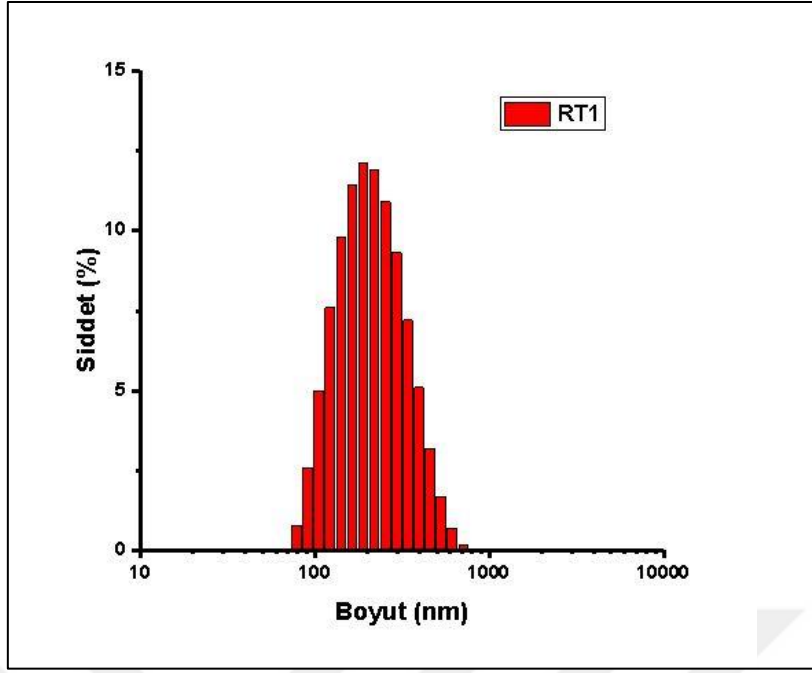
Yapılan çalışma sonucu elde edilen veriler Tablo5.4'te belirtilmiştir ve bu değerler, enkapsüle edilmiş rutin nanopartiküllerinin sentezi için yapılan üç yöntemin sonuçlarıdır. En küçük nanopartikülün boyutu 173,7 nm ile nano-çöktürme (sonikatörlü) sisteminden elde edilmiştir (RT3).

Yapılan zeta potansiyel ölçümüne göre en iyi RY% ve EE' ye sahip RT1' in zeta potansiyel değeri -22,7 mV, nanopartikül boyutu 195,9 nm ve PDI değeri 0,181' dir.

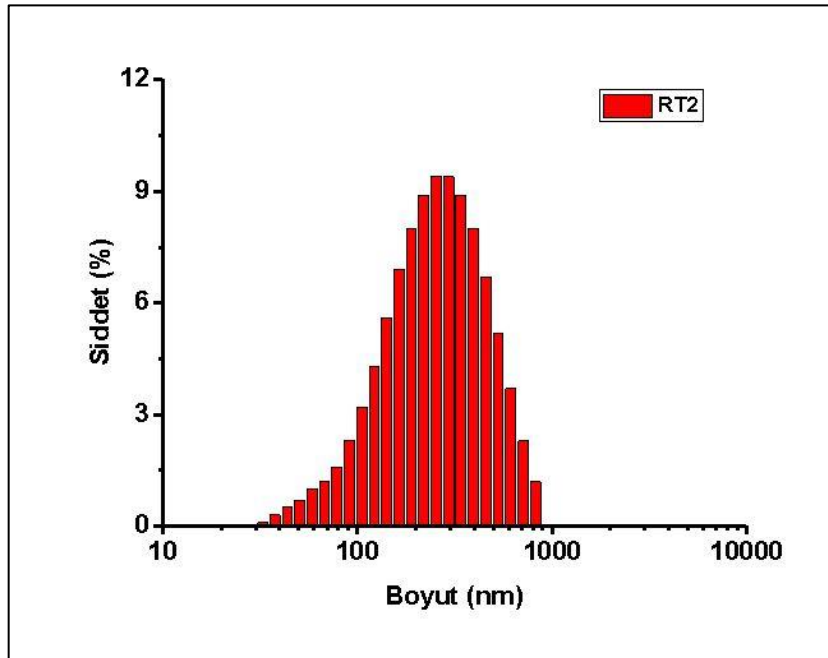
Yöntemler kendi içerisinde kıyaslandığında en düşük boyutlu olan RT3 ve RT5'in PDI ve Zeta potansiyel değerleri sırasıyla 173,7nm, 0,322, -20,8mV, 548,2nm, 0,454, -1,30' dur.

Tablo 5.4. Rutin yüklü PLGA nanopartiküllerine ait ölçüm verileri

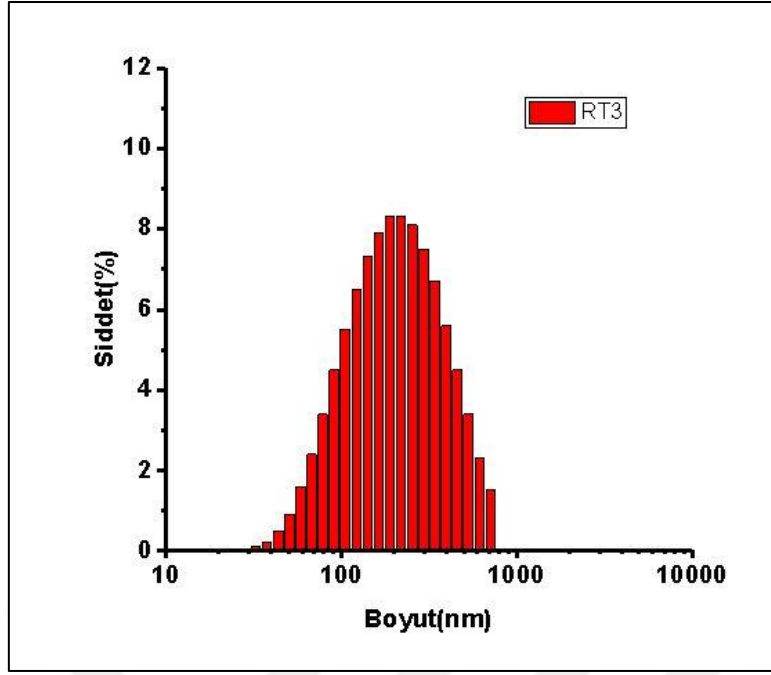
<i>NP Adı</i>	<i>Yöntem</i>	<i>Z-Ave (nm)</i>	<i>PDI</i>	<i>Zeta Pot. (mV)</i>
<i>RT1</i>	Tekli emülsiyon	195,9	0,181	-22,7
<i>RT2</i>	Nano çöktürme	211,1	0,263	-21,8
<i>RT3</i>	Nano çöktürme sonikatörlü	173,7	0,322	-20,8
<i>RT4</i>	Saltingout	637,4	0,566	-1,33
<i>RT5</i>	Saltingout sonikatörlü	548,2	0,454	-1,30
<i>RT6</i>	Tekli emülsiyon (boş)	288,3	0,259	-7,12



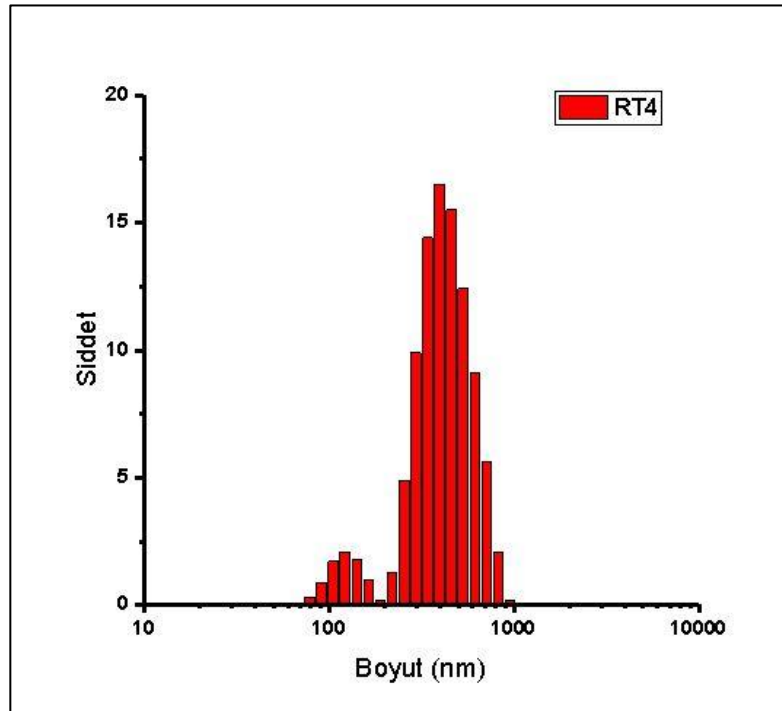
Şekil 5.2. Tekli emülsiyon-çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanan RT1 nanopartikülüne ait nanopartikül boyut-şiddet dağılımı



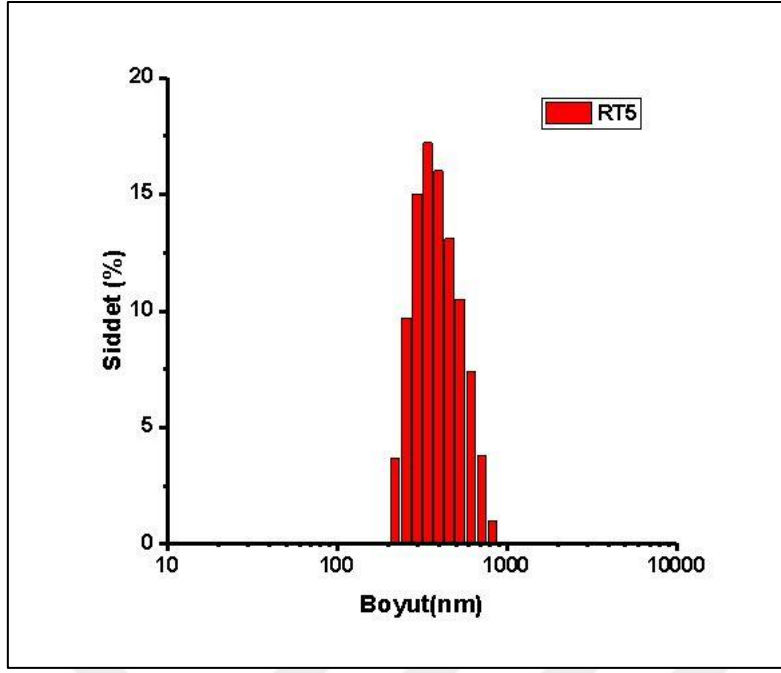
Şekil 5.3. Nano-Çöktürme yöntemi ile hazırlanan RT2 nanopartikülüne ait nanopartikül boyut-şiddet dağılımı



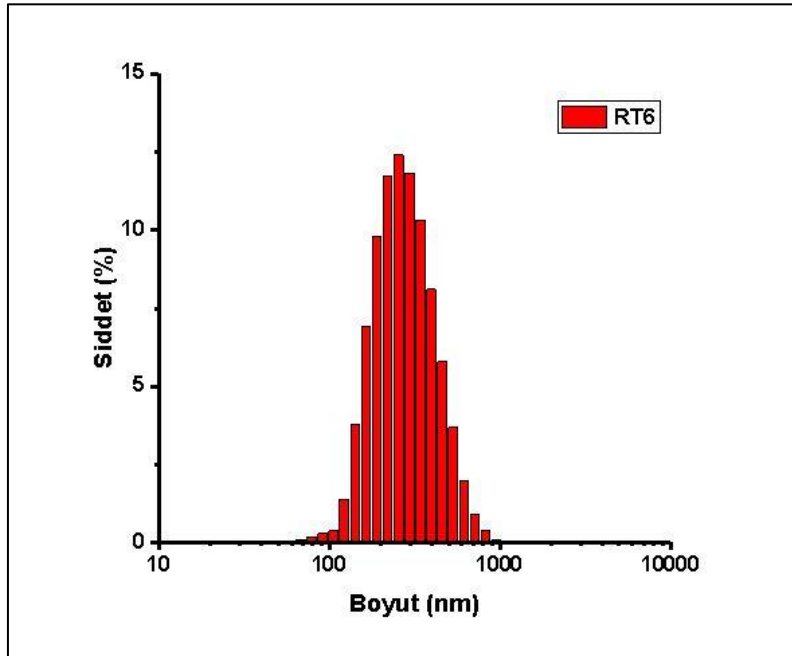
Şekil 5.4. Nano-Çöktürme yöntemi (sonikatörlü) ile hazırlanan RT3 nanopartikülüne ait nanopartikül boyut-şiddet dağılımı



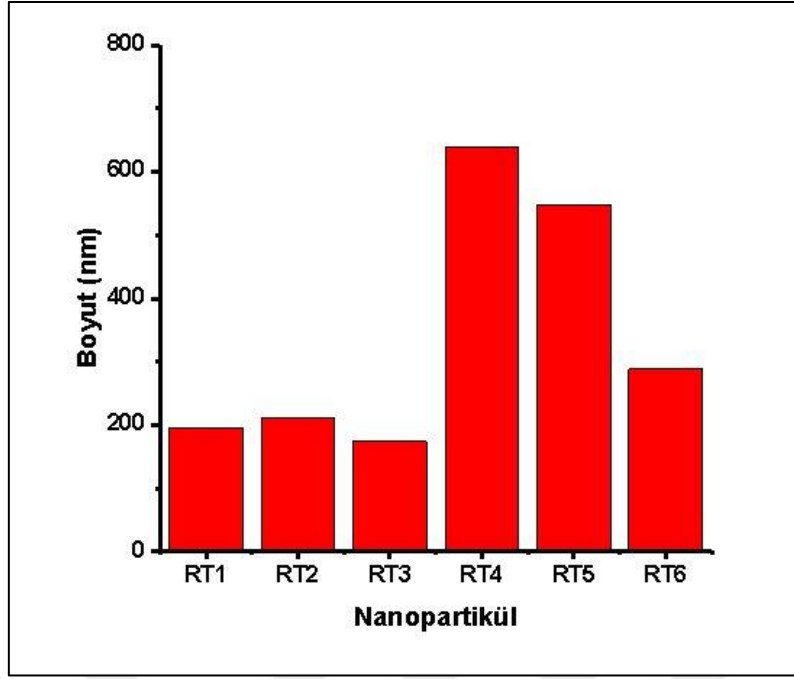
Şekil 5.5. Salting-Out yöntemi ile hazırlanan RT4 nanopartikülüne ait nanopartikül boyut-şiddet dağılımı



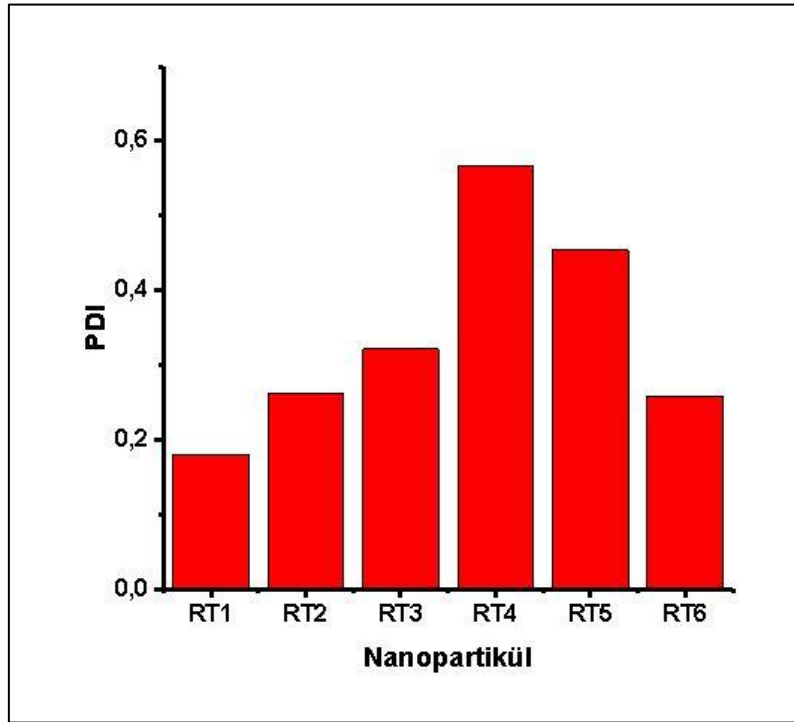
Şekil 5.6. Salting-out yöntemi (sonikatörlü) ile hazırlanan RT5 nanopartikülüne ait nanopartikül boyut-şiddet dağılımı



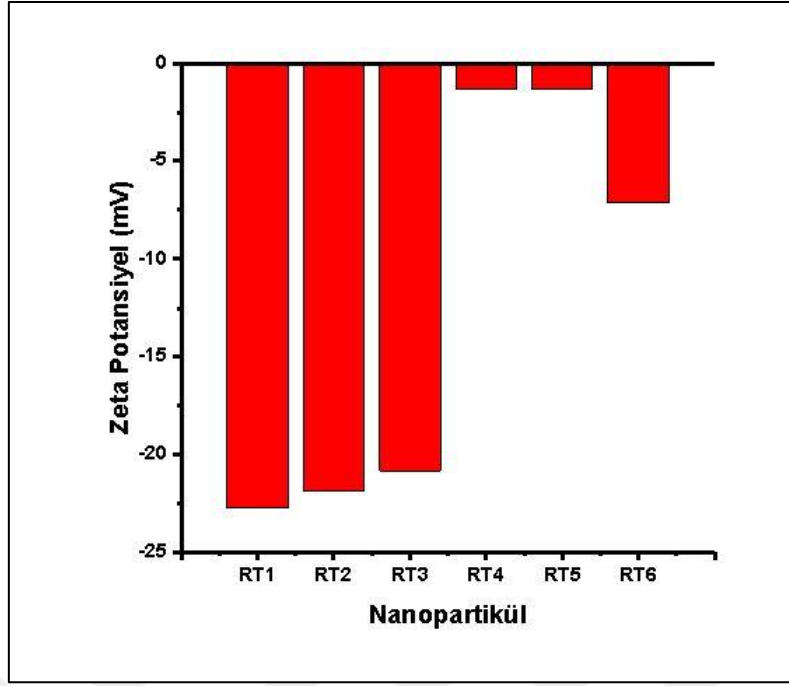
Şekil 5.7. Tekli emülsiyon (boş nanopartikül) yöntemi ile hazırlanan RT6 nanopartikülüne ait nanopartikül boyut analiz dağılımı



Şekil 5.8. Nanopartiküllerin (RT1-RT6) boyut (nm) dağılımları



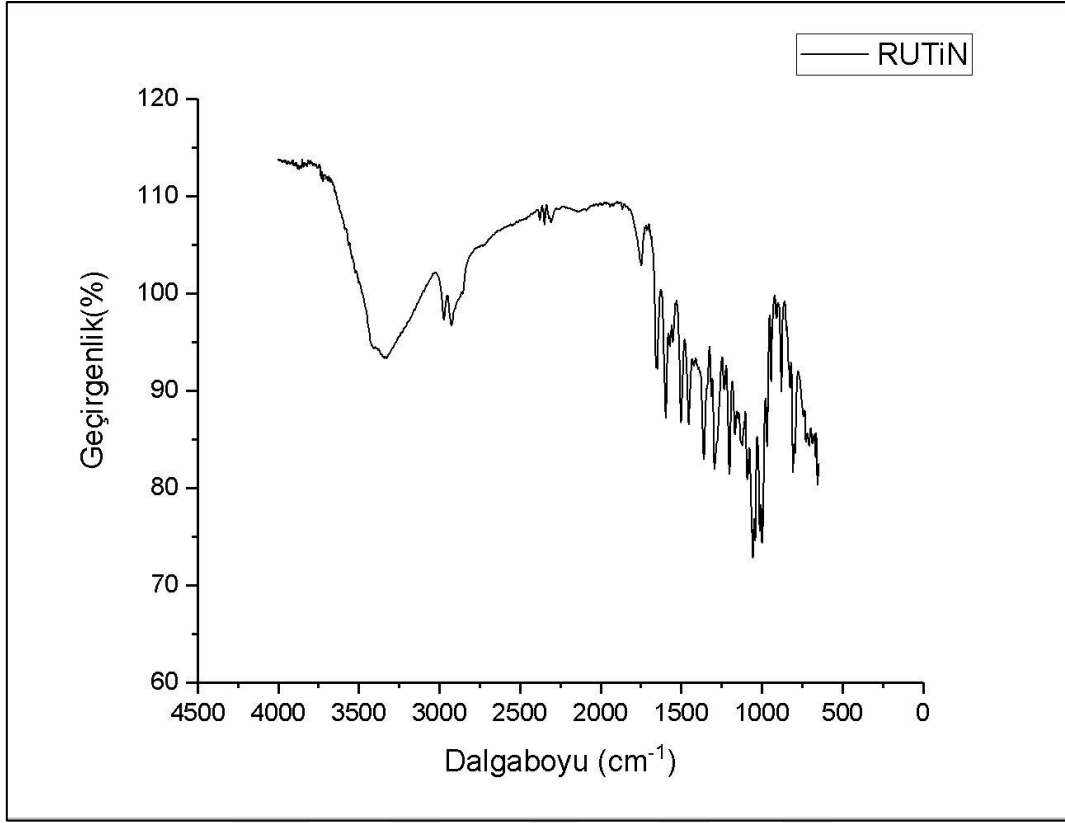
Şekil 5.9. Nanopartiküllerin (RT1-RT6) PDI değerleri



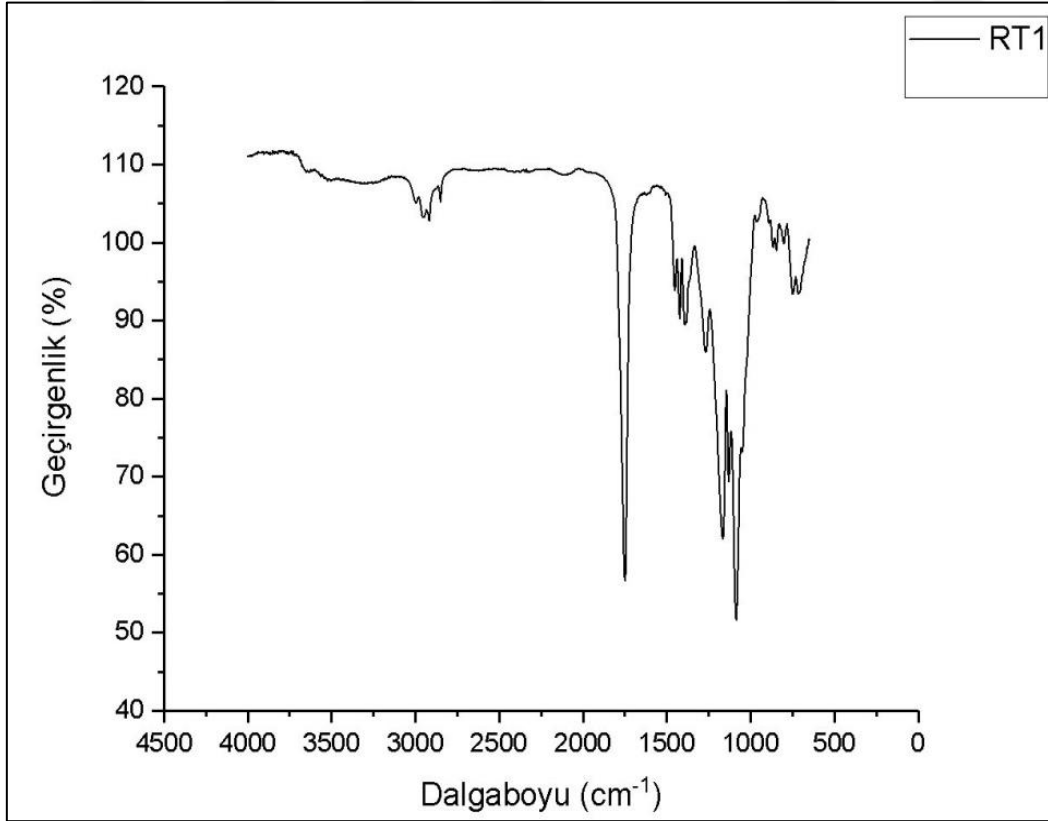
Şekil 5.10. Nanopartiküllerin (RT1-RT6) Zeta Potansiyel değerleri

5.5. Farklı Yöntemlerle Sentezlenmiş Rutin Yüklü PLGA Nanopartiküllerinin FT-IR Sonuçları

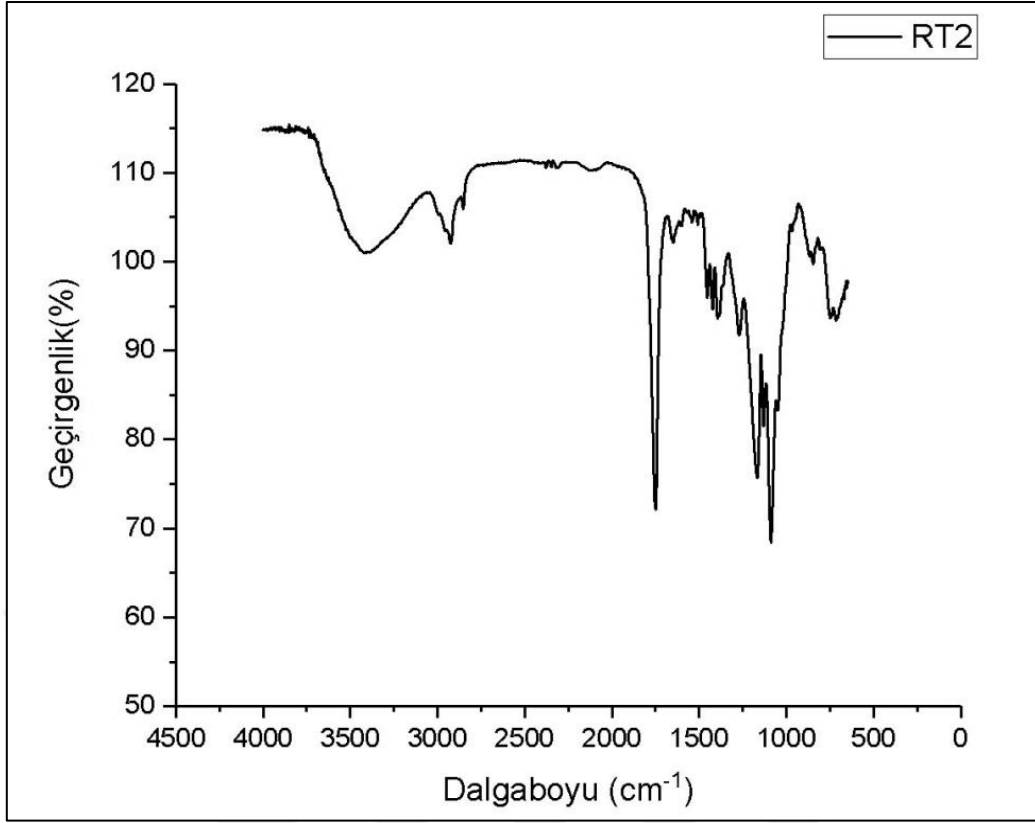
Serbest rutin molekülü, PLGA molekülü ve sentezlenen nanopartiküllerde bulunan fonksiyonel grupların analizleri FT-IR spektrofotometre cihazı kullanılarak incelenmiştir. Rutin yüklü PLGA nanopartiküllerinin, boş PLGA nanopartikülünün ve Rutin'in FTIR spektrumları aşağıdaki Şekil 5.11, 5.12, 5.13, 5.14, 5.15, 5.16, 5.17, 5.18 numaralı grafiklerde gösterilmiştir. PLGA' nın FT-IR spektrumunda tipik ester bağları olan C=O ve C-O bandlarının görülmesi beklenilmiştir. Sonuçlara bakıldığında üretilen nanopartiküllerin bir kısmının yüzeyinde bulunan fonksiyonel grupların PLGA polimeri ile uyumlu pikler verdiği gözlenmiştir. Rutin molekülüne özgü bandlar nanopartiküllere ait spektrumda belirgin şekilde görülmemiştir. Bu da molekülün polimer yüzeyine değil de içerisine kapsüllendiğinin bir göstergesidir. Rutin yüklü nanopartiküllerin yüzey özelliklerinin PLGA karakteristiğinde olduğu gözlenmiştir.



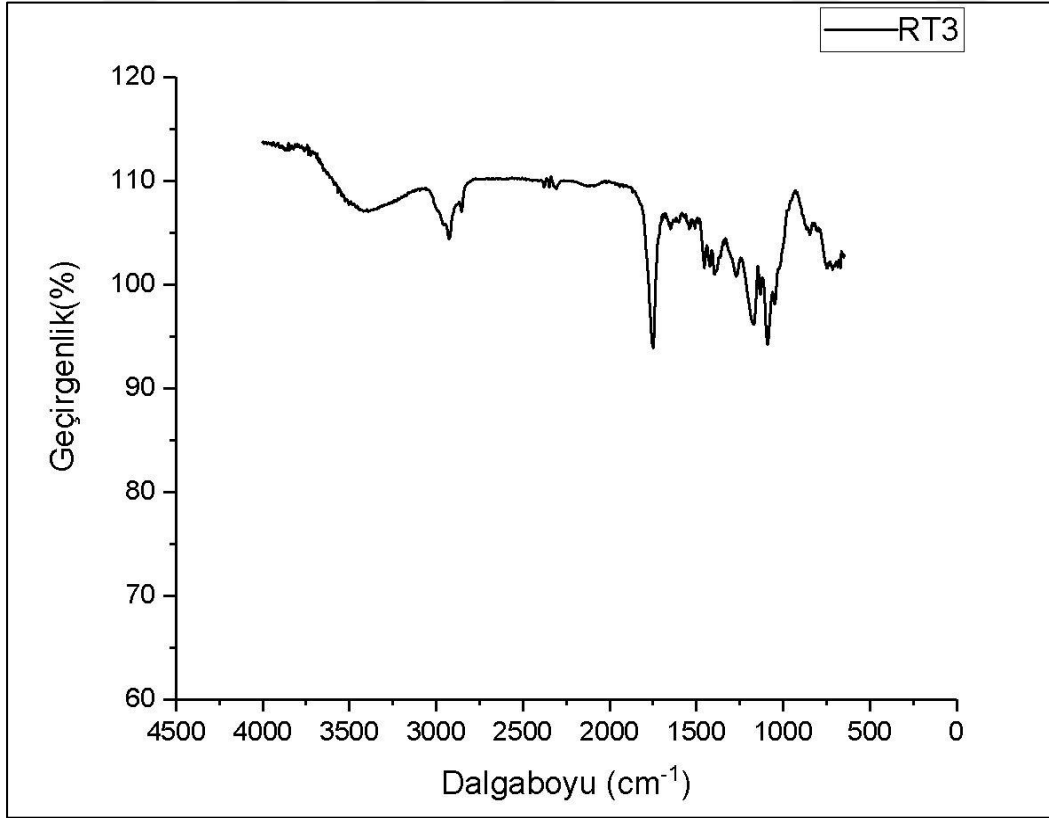
Şekil 5.11. Serbest Rutin molekülüne ait FT-IR spektrumu



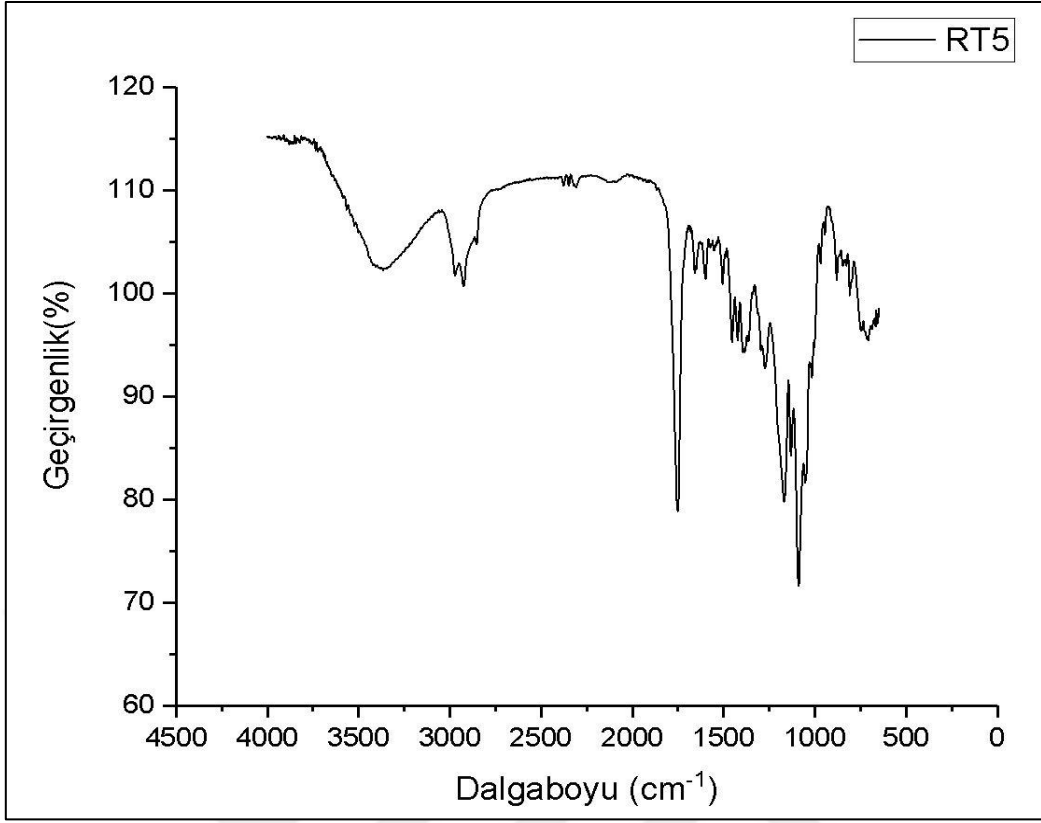
Şekil 5.12. RT1 nanopartikülüne ait FT-IR spektrumu



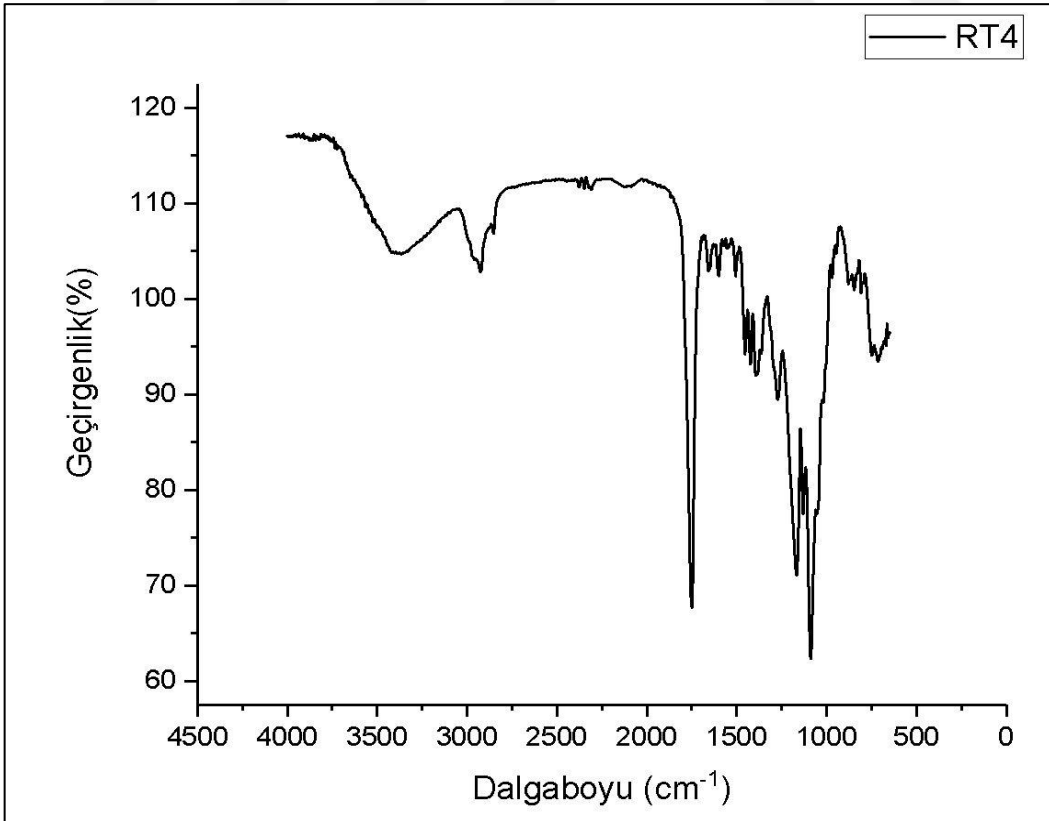
Şekil 5.13. RT2 nanopartikülüne ait FT-IR spektrumu



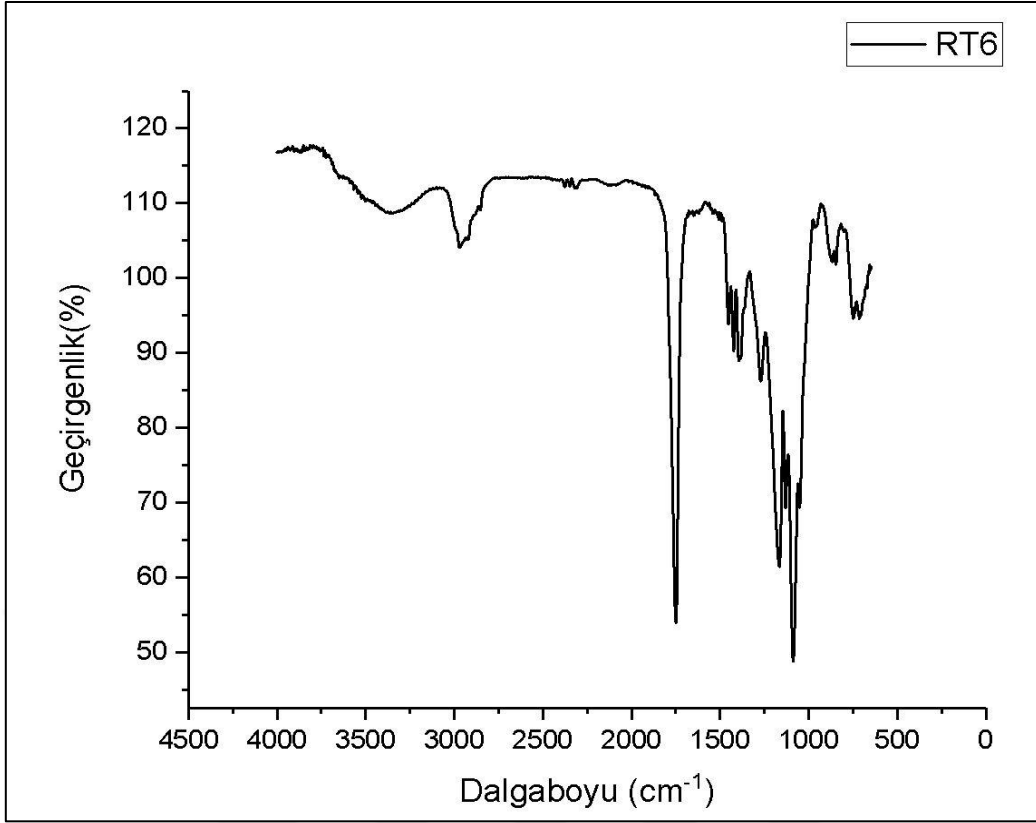
Şekil 5.14. RT3 nanopartikülüne ait FT-IR spektrumu



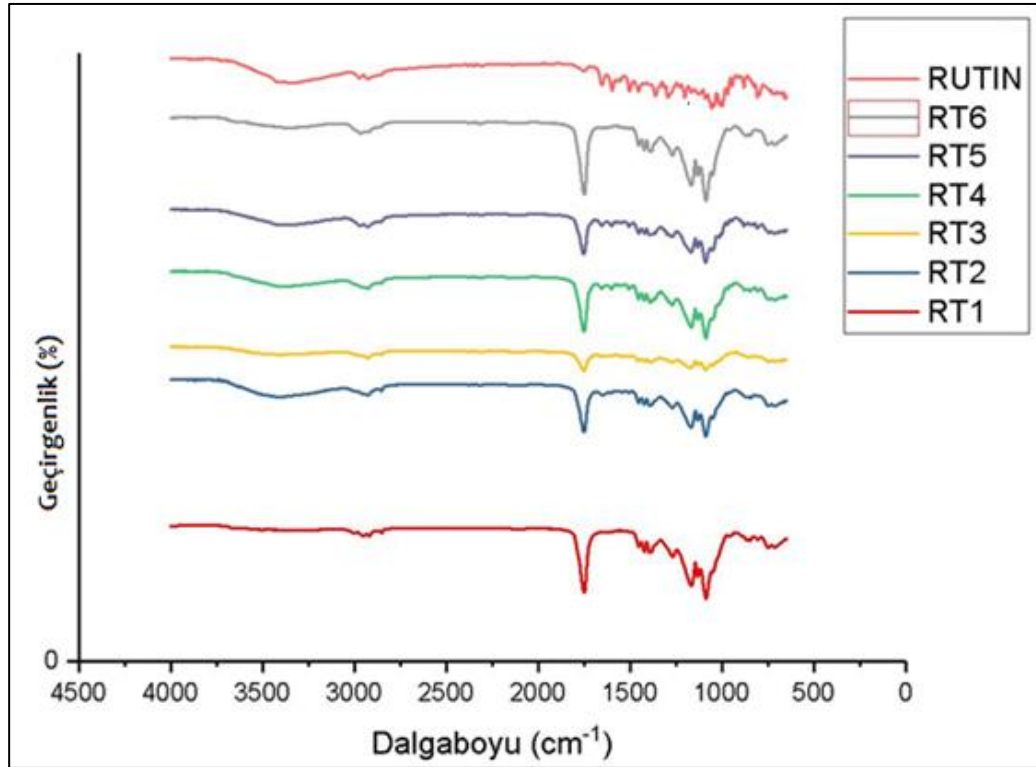
Şekil 5.15. RT4 nanopartikülüne ait FT-IR spektrumu



Şekil 5.16. RT5 nanopartikülüne ait FT-IR spektrumlar



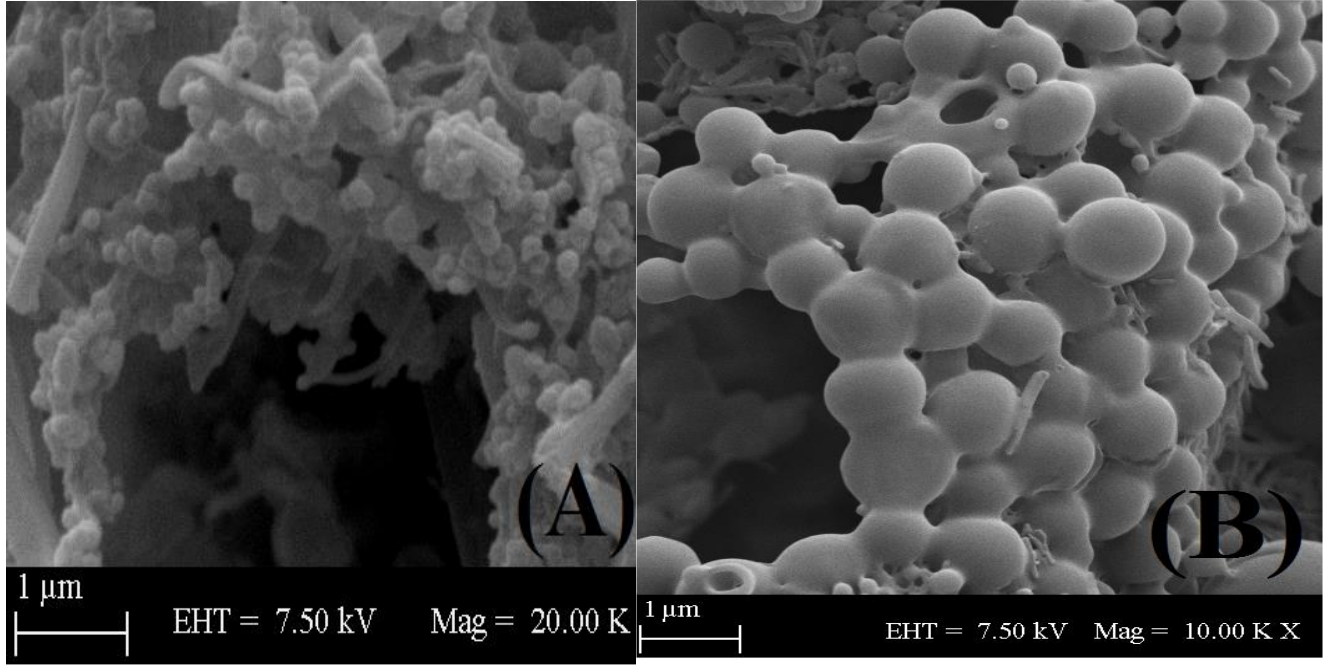
Şekil 5.17. RT6 nanopartikülüne ait FTIR spektrum analizi



Şekil 5.18. Rutin, Rutin yüklü nanopartiküller ve PLGA'ya ait FT-IR spektrumları

5.6. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Nanopartiküler sistemlerin yüzey özelliklerinin incelenmesi amacıyla RT3 ve RT5 için SEM görüntüleri alındı ve hazırlanan sistemlerin nano-boyutlu küresel yapılar olduğu görüldü.



Şekil 5.19. RT3'ün 20000 kat büyütülmüş (A) ve RT5' in 10000 kat büyütülmüş (B) SEM görüntüsü

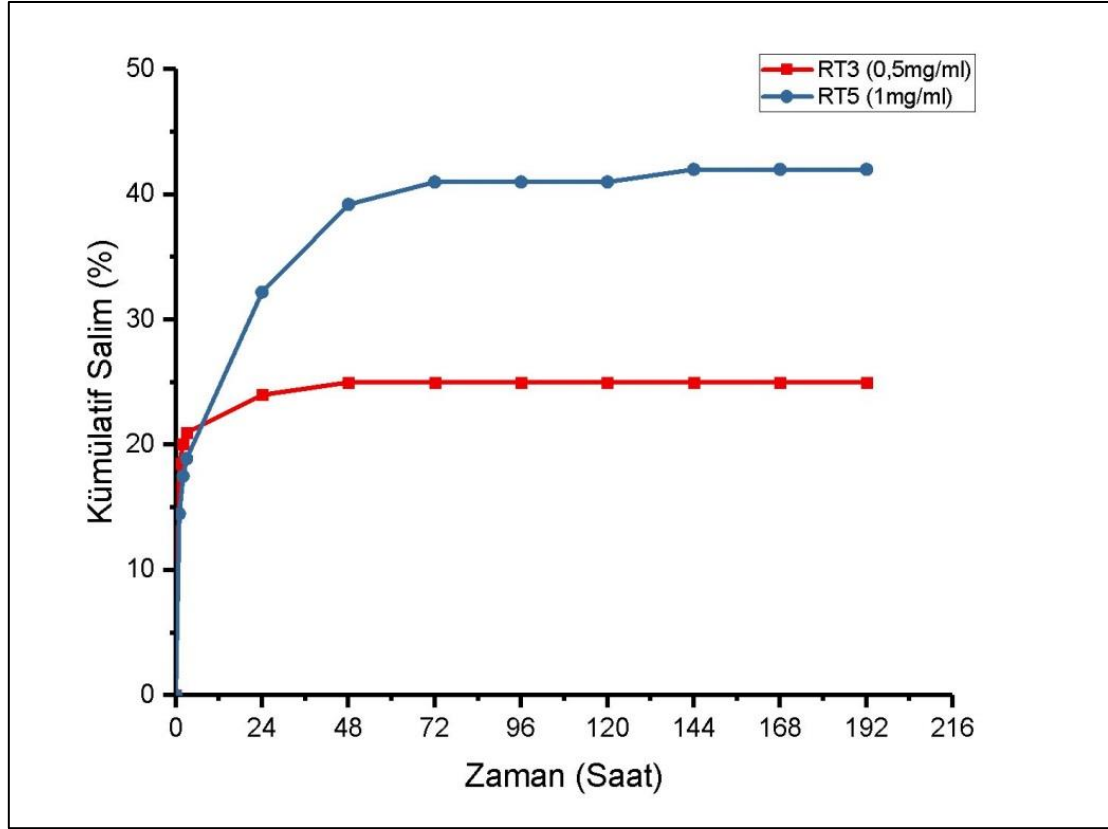
5.7. Rutin Yüklü Nanopartiküllerin *in vitro* Salımının İncelenmesi

Hesaplanan *in vitro* salım sonuçları belirli saat aralıklarına göre aşağıdaki gibidir.

Tablo 5.5. Nanopartiküllerin Zamana Göre Salım Miktarları

<i>Zaman(s)</i> <i>NP(%)</i>	<i>0</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>24</i>	<i>48</i>	<i>96</i>	<i>120</i>	<i>144</i>	<i>168</i>	<i>192</i>	<i>216</i>
<i>RT3</i>	0	18,5	20,1	21	24	25	25	25	25	25	25	25
<i>RT5</i>	0	14,5	17,5	18,9	32,2	39,2	41	41	41	42	42	42

in vitro salım çalışmaları gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlara göre çizilen salım grafiği Şekil 5.25'de verilmiştir. RT3'den enkapsüle olan Rutin'in ilk 24 saatte ~24%'ünün salındığı gözlenirken, RT5'den ise enkapsüle Rutin'in ~33%'ü salınmıştır. RT3'den enkapsüle Rutin'in salımı 48 saatte ~25% ulaşırken, RT5'den enkapsüle Rutin'in salımı ~41% olduğu gözlenmiştir.



Şekil 5.21. RT3 ve RT5'in % in-vitro salım grafiği

% Kümülatif Salım-Zaman grafiği incelendiğinde, yüksek konsantrasyona (1mg/ml) sahip RT5' in % salım oranının düşük konsantrasyona (0.5mg/ml) sahip RT3'den daha yüksek olduğu görülmektedir. Küçük boyutlara sahip nanopartiküllerin içerisine daha fazla yükleme yapılabileceğini savunan literatürün tersine bu çalışmada küçük boyutlara sahip RT3' ün enkapsülasyon etkinliği (EE%:6,08) boyutu büyük olan RT5' e göre (EE%:26,09) oldukça düşüktür. Sonuç olarak *in vitro* ortamda % rutin salımının düşük olması beklenen RT5 nanopartikülünün enkapsülasyon etkinliğine bağlı olarak ve konsantrasyon fazlalığının oluşturması beklenen negatif etkiye ters olarak % rutin salımı RT3' ün ilaç salımından yüksek çıkmıştır.

6. TARTIŞMA VE ÖNERİLER

Bu tez kapsamında literatürde ilk defa Rutin molekülünün biyoyararlanımını arttırmak amacıyla farklı formülasyon parametrelerine sahip Rutin yüklü PLGA nanopartikülleri hazırlanmış ve karakterizasyonları yapılmıştır.

Bir flavanol olarak Rutin molekülünün, düşük çözünürlüğü, emilimi, geçirgenliği ve düşük biyoyararlanımı gibi olumsuz karakteristik özellikleri uygulama alanlarını sınırlandırmasına rağmen bir çok hastalıkta tedavi edici özelliklerinin bulunmasından dolayı kullanımında artış gözlenmiştir. Yapılan literatür araştırmalarında daha önce Rutin molekülünün PLGA nanopartiküllerinin içerisine yüklenmediği görülmüştür. Bu nedenle, Rutin'in gelecekte başta nano tıp olmak üzere birçok alanda birçok araştırma için uygun olabileceği düşünülerek seçilmiştir.

Biyobozunur özellikli,enkapsülasyon etkinliği yüksek olan, etkin madde salımının kontrolüne imkân sağlayan, etken madde yan etkilerinin azaltılması gibi üstünlüklerinden dolayı polimerler nano boyutlu ilaç taşıyıcı sistemler oluşturmak üzere sıklıkla kullanılmaktadırlar. Etken maddelerin nanotaşıyıcılara hapsedilmesi, maddenin etkinliğini, istenen dokular ve hücre içerisine absorpsiyonunu iyileştirebilmektedir [82].

PLGA, nanopartiküler sistemlerin hazırlanmasında sıklıkla kullanılan sentetik bir polimerdir. PLGA'nın FDA tarafından onaylı (insan kullanımı için) biyoparçalanabilir ve biyoyumlu bir polimer olması, düşük toksisite göstermesi, uygun mekanik özelliklere ve öngürülebilir biyoparçalanma kinetiğine sahip olması önemli özellikleridir [82-83]. PLGA nanopartikülleri özellikle peptid/protein yapıdaki ilaçların, antijenlerin, genlerin, büyüme faktörlerinin, antikanser ve antihipertansif etkili etken maddelerin taşınması amacıyla ve farklı uygulama yollarına (pulmoner, nazal, oral, oftalmik vb.) yönelik çalışmalarda yoğun bir şekilde çalışılmıştır. Etken maddeler, nanopartiküllerin içine hapsedilmiş yada yüzeyine adsorbe olmuş halde bulunurlar [82,84-85]. PLGA nanopartikülleri çoğunlukla, emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi, emülsiyon-difüzyon yöntemi ve nanoçöktürme yöntemleri kullanılarak hazırlanmaktadır [82].

Bu çalışmada, PLGA nanopartiküllerinin hazırlanması için tekli emülsiyon-çözücü buharlaştırma, nanoçöktürme ve salting-out yöntemleri seçilmiştir. Nanoçöktürme ve salting-out yöntemleri sonikatörlü ve sonikatörsüz olmak üzere iki ayrı şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu sayede (sonikatör kullanılarak) nanopartiküllerin boyutu küçültürmüştür. Yapılan literatür

araştırmalarına göre tekli emülsiyon- çözücü buharlaştırma yönteminde çözücü olarak etil alkol, nanoçöktürme ve salting-out yöntemlerinde ise aseton kullanılmıştır. Bu çalışmada çözücüler literatüre göre seçilmiştir. Nanoçöktürme yönteminde, yüzey aktif madde kullanıldığında veya kullanılmadığında organik çözücünün sulu faza difüzyonu ve bunun sonucunda polimerin çökmesi gözlenebilir. Bu yöntem sulu faz ile çözücünün karışabilmesi sebebiyle lipofilik etken maddeler için daha kullanışlıdır. Ancak, çeşitli değişiklikler yapılarak suda çözünür etken maddeler için de kullanılabılır duruma getirilmiştir. Tekli emülsiyon-çözücü buharlaştırma yönteminde ise polimer çözeltisi uçucu çözücüde hazırlanır, sonra emülsiyon oluşturulur ve organik çözücünün uzaklaştırılmasıyla nanopartiküller hazırlanır [86]. Her iki yöntemde de organik faz ve sulu faz hazırlanmıştır. Organik faz hazırlanmasında nanoçöktürme yöntemi için renksiz, uçucu, kaynama noktası 56.2°C ve yoğunluğu 0.791 g/mL (25°C'de) olan su ile karışabilen aseton çözücü olarak seçilirken emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi için ise, kaynama noktası 78.4 °C ve yoğunluğu 0.789 g/cm³ (25°C'de) etil alkol ile kaynama noktası 39,6 °C ve yoğunluğu 1.33 g/cm³ (25°C'de) olan diklorometan seçilmiştir [87-88]. Bu yöntemlerle 195.9±5.776 nm, 0.182±0.011 çoklu dağılım indisine ve 28,31% enkapsülasyon etkinliğine sahip nanopartiküller hazırlanmıştır. Nanoçöktürme yöntemiyle hazırlanan RT2 ve RT3 nanopartiküllerinin parçacık boyutu değerlerine bakıldığında bu yöntemde sonikasyon uygulanmasının literatürle uyumlu olarak [89] parçacık boyutunu 211.0±0.322 nm'den 173.7±4.352 nm'ye düşürdüğü grlmştir.

Enkapsülasyon etkinliği çalışmaları sonucunda RT1' in (EE%=28,32) (RY%=40,89), RT3 n (EE%=6,13) (RY%=6,43) ve RT5' in (EE%=26,73) (RY%=11,52) olduğu belirlenmiştir. Nanoçöktürme ve salting-out yöntemlerinde kullanılan sonikasyonun enkapsülasyon verimini azaltıcı yönde düşük oranda bir etkisi olduğu gözlenmiştir [90].

Nanopartikül sentez yöntemlerinin oluşan nanopartiküllerin boyutlarını, çoklu dağılım indislerini (PDI) ve zeta potansiyel değerlerini etkilediği belirlenmiştir. Literatür partikül büyüklüğünün, taşıyıcı sistemin dolaşımda kalış süresini, hücrenel alımını, biyodağılımını, bunların yanı sıra etkin madde salım kinetiğini ve dolayısıyla taşıyıcı sistemin performansını etkileyen çok önemli bir faktör olduğunu vurgulamaktadır [91].

Enkapsülasyon etkinliği değerleri incelendiğinde, yöntemler kendi içinde kıyaslandığında enkapsülasyon etkinliği belirgin bir şekilde etkilenmediği söylenebilir.(Nanoçöktürme EE%=7,89%, sonikatörlü nanoçöktürme EE%=6,13%). Fakat yöntemler birbirleri ile

kıyaslandığında enkapsülasyon veriminde farklılıklar olduğu saptanmıştır. (Tekliemülsiyon-çözücü buharlaştırma EE%=28,32%, sonikatörlü nanoçöktürme EE%=6,13%)

Tekli emülsiyon-çözücü buharlaştırma, nanoçöktürme ve salting-out yöntemleri kullanılarak 6 adet nanopartikül hazırlanmıştır. Aynı yönteme ait nanopartiküllerin boyutlarından küçük olanlar seçilerek in-vitro ortamda salımları yapılmıştır. Seçilen nanopartiküller sırasıyla RT3 ve RT5' dir. RT3 nanopartikülünün *in vitro* ortamda % salım değeri en fazla 25%' e ulaşmıştır. Salım parametreleri göz önüne alındığında, nanoçöktürme yöntemine göre daha başarılı olduğu düşünülen salting out yöntemi ile elde edilen RT5 molekülünün *in vitro* ortamda % salım değeri 3. gün 41% olarak belirlenmiştir. Salting out yönteminde sonikasyon uygulanması ise parçacık boyutunu 637.4 ± 5.541 nm'den (RT4) 548.2 ± 69.94 nm' ye (RT5) indirmiştir. Bunun nedeni, güç veya sonikasyon uygulanması veya uygulanan gücün süresinin arttırılmasının, damlaların parçalanmasına neden olan enerjinin arttırılmasına neden olmasıdır. Bu durum, kesme gerilmesinin (shear stress) artması ve bunun sonucunda da parçacık boyutunun azalması şeklinde açıklanmaktadır [92].

RT3 ve RT5 nanopartikülleri için taramalı elektron mikroskobu ile yapılan ölçüm sonuçları incelendiğinde düzgün küresel yapılar gözlenmiştir.

Sonuç olarak, bütün analiz sonuçları değerlendirildiğinde uygulanan yöntemler içerisinde en verimli, küçük boyutlu ve sürekli salımlı yüksek kapsülleme verimliliği olan Rutin yüklü nanopartiküllerin tespiti, ilerideki gelişmiş ve çok yönlü çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Ayrıca, Rutin yüklü PLGA nanopartiküllerinin antioksidan ve antimikrobiyal aktivitesini test etmek için ileriki çalışmaların yapılması planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

- [1] Budhian A, Siegel SJ, Winey KI, Haloperidol-loaded PLGA nanoparticles: systematic study of particle size and drug contentç Int Jharm 336:367-375, 2007.
- [2] Stavric B. Role of chemopreventers in human diet. Clin. Biochem. 27(5):319-3 32, 1994.
- [3] Stavric B. Quercetin in our diet: from potent mutagen to probable anticarcinogen. Clin. Biochem , 27(4):245- 248, 1994.
- [4] Bors W, Heller W, Michel C, Saran M. Flavonoid as antioxidants: Determination of radical- scavenging efficiencies Methods in Enzimology, 186:343-355, 1990.
- [5] Kreft I. et al. Rutin in buckwheat-Protection of plants and its importance for the production of functional food. Fagopyrum, 2003.
- [6] Birman H. Bitkisel Flavonoid Bileşiklerinin Biyoaktiviteleri ve Muhtemel Etki Mekanizmaları. İst. Tıp Fak. Derg., 75: 3, 2012.
- [7] Değim İ. Farmasötik Nanoteknoloji. Mised; S: 8-13; S: 198–205, 2011.
- [8] Goldstain, A., Handbook of Nanophase Materials, Marcel Dekker Inc, New York, 1997.
- [9] Liveri, V. T. Controlled Synthesis of Nanoparticles in Microheterogeneous Systems, Springer Science+Business Media, Inc., New York, 2006.
- [10] Zhang L, Gu F.X, Chan J.M, Wang A.Z, Langer R.S, Farokhzad O.C. Nanoparticles in Medicine:Therapeutic Applications and Developments, Clinical Pharmacology and Therapeutics, 83, 761-769, 2008.
- [11] Kumar, S., Pandey, AK. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. Bio. of Plants, 6: 34, 2013.
- [12] Boss, PK., Davies, C., Robinson, SP. Expression of anthocyanin biosynthesis pathway genes in red and white grapes. Plant Mol. Bio., 32(3): 565-569, 1996.
- [13] Kumar, S., Pandey, AK.,Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. Bio. of Plants, 6: 34, 2013.
- [14] Guardia T., Rotelli A.E., Juarez A.O., Pelzer L.E. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. Farmaco. ;56(9):683–687, 2001.

- [15] Javed H., Khan M.M., Ahmad A., Vaibhav K., Ahmad M.E., Khan A., Ashafaq M., Islam F., Siddiqui M.S., Safhi M.M., Islam F. Rutin prevents cognitive impairments by ameliorating oxidative stress and neuroinflammation in rat model of sporadic dementia of Alzheimer type. *Neuroscience*;17:340–352, 2012.
- [16] Aditya Ganeshpurkar, Ajay K. Saluja: The pharmacological potential of rutin. *Saudi Pharmaceutical Journal* 25, 149-164, 2017.
- [17] Machado, D.G., Bettio, L.E., Cunha, M.P., Santos, A.R., Pizzolatti, M.G., Brighente, I.M., Rodrigues, A.L., Antidepressant-like effect of rutin isolated from the ethanolic extract from *Schinus molle* L. in mice: evidence for the involvement of the serotonergic and noradrenergic systems. *Eur. J. Pharmacol.* 587 (1–3), 163–168, 2008.
- [18] Deb P., Sharma S., Hassan K.M. Pathophysiologic mechanisms of acute ischemic stroke: an overview with emphasis on therapeutic significance beyond thrombolysis. *Pathophysiology.* ;17:197–218, 2010.
- [19] Deb P., Sharma S., Hassan K.M. Pathophysiologic mechanisms of acute ischemic stroke: an overview with emphasis on therapeutic significance beyond thrombolysis. *Pathophysiology.* ;17:197–218, 2010.
- [20] Chattopadhyay, R., Hypoglycemic effect of *Ocimum sanctum* leaf in normal and streptozotocin diabetic rats. *Indian J. Exp. Biol.* 31, 891–893, 1993.
- [21] P. Stanley Mainzen Prince, N. Kamalakkannan, Rutin improves glucose homeostasis in streptozotocin diabetic tissues by altering glycolytic and gluconeogenic enzymes *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, 20 (2), pp. 96-102, 2006.
- [22] Kamalakkannan, N., Stanely Mainzen Prince, P. The influence of rutin on the extracellular matrix in streptozotocin-induced diabetic rat kidney. *J. Pharm. Pharmacol.* 58 (8), 1091–1098, 2006.
- [23] Hanasaki Y. et al. The correlation between active oxygen scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic Biol Med.* 1994.
- [24] Al-Enazi, MM. Protective Effects of Combined Therapy of Rutin with Silymarin on Experimentally-Induced Diabetic Neuropathy in Rats. *Pharmacology & Pharmacy* 2014.
- [25] Kandemir FM et al. Rutin attenuates gentamicin-induced renal damage by reducing oxidative stress, inflammation, apoptosis, and autophagy in rats. *Ren Fail*, 2015.

- [26] Mahgoub MA and Zaki NI Assessment effect of pomegranate and rutin on chlorpyrifos-ethyl-induced oxidative stress in rats. *Nature and Science*, 2009.
- [27] Kostic D.A. et al. Xanthine oxidase: Isolation, assays of activity, and inhibition. *Journal of Chemistry*, 2015.
- [28] Magalingam KB et al. Rutin, a bioflavonoid antioxidant protects rat pheochromocytoma (PC-12) cells against 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-induced neurotoxicity. *Int J Mol Med*.2013.
- [29] Park SE et al. Rutin from *Dendropanax morbifera* Leveille protects human dopaminergic cells against rotenone induced cell injury through inhibiting JNK and p38 MAPK signaling. *Neurochem Res*. 2014.
- [30] Wang YB et al. Rutin alleviates diabetic cardiomyopathy in a rat model of type 2 diabetes. *Exp Ther Med*. 2015.
- [31] Nafees S et al. Rutin ameliorates cyclophosphamide induced oxidative stress and inflammation in Wistar rats: role of NF κ B/MAPK pathway. *Chem Biol Interact*. 2015.
- [32] Patil SL et al. Radiomodulatory role of Rutin and Quercetin in Swiss Albino mice exposed to the whole body gamma radiation. *Indian J Nucl Med*. 2012.
- [33] Umarani V et al. Rutin potentially attenuates fluoride-induced oxidative stress-mediated cardiotoxicity, blood toxicity and dyslipidemia in rats. *Toxicol Mech Methods*. 2015
- [34] Patil SL et al. Radiomodulatory role of Rutin and Quercetin in Swiss Albino mice exposed to the whole body gamma radiation. *Indian J Nucl Med*. 2012
- [35] Jiang Y et al. Wolfberry Water Soluble Phytochemicals Down-Regulate ER Stress Biomarkers and Modulate Multiple Signaling Pathways Leading To Inhibition of Proliferation and Induction of Apoptosis in Jurkat Cells. *J Nutr Food Sci*. 2011.
- [36] Lin JP et al. Rutin inhibits human leukemia tumor growth in a murine xenograft model in vivo. *Environ Toxicol*. 2012.
- [37] Ravi A et al. Anticancer activity of *Pupalia lappacea* on chronic myeloid leukemia K562 cells. *Daru*. 2012.
- [38] Alonso-Castro AJ et al. Rutin exerts antitumor effects on nude mice bearing SW480 tumor. *Arch Med Res*. 2013.

- [39] Vinothkumar R et al. Oral supplementation with troxerutin (trihydroxyethylrutin), modulates lipid peroxidation and antioxidant status in 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2014.
- [40] De Araujo ME et al. Enzymatic de-glycosylation of rutin improves its antioxidant and antiproliferative activities. *Food Chem*. 2013.
- [41] You HJ et al. Transformation of rutin to antiproliferative quercetin-3-glucoside by *Aspergillus niger*. *J Agric Food Chem*. 2010.
- [42] Maeda J et al. Natural and glucosyl flavonoids inhibit poly(ADP-ribose) polymerase activity and induce synthetic lethality in BRCA mutant cells. *Oncol Rep*. 2014.
- [43] Hussain T. et al Rutin, a natural flavonoid, protects against gastric mucosal damage in experimental animals. *Asian Journal of Traditional Medicine* 2009.
- [44] Pekdemir S, Nanopartikül Üretimi Föyü, Mühendislik Fakültesi, Erciyes Üniversitesi, Kayseri, 2010.
- [45] Goldstain, A., Handbook of Nanophase Materials, Marcel Dekker Inc, New York, 1997.
- [46] Sivasankar, M. ve Kumar, B.P. "Role of nanoparticles in drug delivery system", *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 1: 41-46, 2010.
- [47] Wehrle, P. Magenheim, Bi ve Benita, S. "The influence of process parameters on the PLA nanoparticle size distribution, evaluated by means of factorial design", *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 41:19-26, 1995.
- [48] Tüylek Z. İlaç Taşıyıcı Sistemler ve Nanoteknolojik Etkileşim. *Bozok Tıp Derg.*;7(3):89-98, 2017.
- [49] Wickham T J. Ligand-directed targeting of genes to the site of disease. 9(1) 135-139, 2003.
- [50] Singh R. Lillard J.W. Nanoparticle-based targeted drug delivery, *Experimental and Molecular Pathology*; 86, 215-223, 2009.
- [51] Şakalar Ç, İzgi K, Canatan H. Kanser İmmün Terapi ve Monoklonal Antikorlar. *F.Ü.Sağ.Bil.Tıp Derg.* 27 (2): 105-111, 2013.

- [52] Parveen S, Misra R, Saho S. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 8; S:147–166, 2012.
- [53] Derman S, Kızılbey K, Akdeste Z. Polymeric Nanoparticles. *Journal of Engineering and Natural Sciences Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi Sigma* 2013; 31, 109- 122., 2013.
- [54] C. Pichot, and J. C. Daniel (eds.), *Latex Synthétiques : Elaboration-Propriétés-Applications*, Lavoisier, Paris, France, 2006.
- [55] W. A. Braunecker, and K. Matyjaszewski. Controlled/living radical polymerization: features, developments and perspectives. *Prog. Polymer. Sci.* 33:93–146, 2007.
- [56] A. Kumari, S.K. Yadav, S. C. Yadav Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems *Colloids Surf B Biointerfaces*, 75, pp. 1-18, 2010.
- [57] Bai J, Li Y, Du J, Wang S, Zheng J, Yang O, Chen X: One-pot synthesis of polyacrylamide-gold nanocomposite. *Mater Chem Phys*, 106,412-415, 2007.
- [58] Turos E, Shim JY, Wang Y, Greenhalgh K, Reddy GS, Dickey S, Lim DV: Antibiotic-conjugated polyacrylate nanoparticles: New opportunities for development of anti- MRSA agents. *Bioorg Med Chem Lett*, 17, 53-56, 2007.
- [59] Martinem A, Iglesias I, Lozano R, Teijon JM, Blanco MD: Synthesis and characterization of thiolated alginate-albumin nanoparticles stabilized by disulfide bonds. Evaluation as drug delivery systems. *Carbohydr Polym*, 83, 1311–1321, 2011.
- [60] Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A: Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int J Pharm*, 385, 113–142, 2010.
- [61] Mao HQ, Roy K, Troung-Le VL, Janes KA, Lin KY, Wang J, August JT, Leong KW: Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency. *J Control Release*, 70, 399–421, 2001.
- [62] Rejinold NS, Chennazhi KP, Nair SV, Tamura H, Jayakumar R: Biodegradable and thermo-sensitive chitosan-g-poly(N-vinylcaprolactam) nanoparticles as a 5-fluorouracil carrier. *Carbohydr Polym*, 83, 776–786, 2011.
- [63] Saraog GK, Gupta P, Gupta UD, Jain NK, Agrawal GP: Gelatin nanocarriers as potential vectors for effective management of tuberculosis. *Int J Pharm*, 385, 143–149, 2010.

- [64] Bilensoy E, Sarisozen C, Esendagl G, Doogan LA, Aktas Y, Sen M, Mangan AN: Intravesical cationic nanoparticles of chitosan and polycaprolactone for the delivery of Mitomycin C to bladder tumors. *Int J Pharm*, 3, 307-316, 2009.
- [65] Mainardes RM, Khalil NM, Gremião MPD: Intranasal delivery of zidovudine by PLA and PLA-PEG blend nanoparticles. *Int J Pharm*, 395, 266-271, 2010.
- [66] Park J, Fong PM, Lu J, Russell KS, Booth KJ, Saltzman WM, Fahmy TM: PEGylated PLGA nanoparticles for the improved delivery of doxorubicin. *Nanomedicine*, 5, 410-418, 2009.
- [67] Fritzen-Garcia MB, Zanetti-Ramos BG, Schweitzer de Oliveira C, Soldi V, Pasa AA, Creczynski-Pasa TB: Atomic force microscopy imaging of polyurethane nanoparticles onto different solid. *Mater Sci Eng C*, 29, 405-409, 2009.
- [68] V. Torchilin *Multifunctional Pharmaceutical Nanocarriers* Springer Science + Business Media, LLC, NY, 2008.
- [69] G. Luo, X. Yu, C. Jin, F. Yang, D. Fu, J. Long, J. Xu, et al. LyP-1-conjugated nanoparticles for targeting drug delivery to lymphatic metastatic tumors *Int J Pharm*, 385, pp. 150-156, 2010.
- [70] Molecular modeling and simulation of ion-conductivity in chitosan membranes Ernesto Lopez-Chavez*, Jose Manuel Martinez-Magadan, Raul Oviedo-Roa, Javier Guzman, Joel Ramirez-Salgado, Jesus Marin-Cruz Programa de Ingenieria Molecular, Instituto Mexicano del Petroleo, Meksiko, Received 19 October 2004; received in revised form 25 April 2005; accepted 30 April 2005 Available online 1 July 2005 *Polymer* 46 (2005) 7519-7527
- [71] İbrahim, Bilici. *Selüloz*. 2016.
- [72] Gilding, D. K.; A. M. Reed (December 1979). "Biodegradable polymers for use in surgery - polyglycolic/poly (lactic acid) homo- and copolymers: 1". *Polymer*. 20 (12): 1459-1464.
- [73] Middleton, J.; A. Tipton (March 1998). "Synthetic biodegradable polymers as medical devices". *Medical Plastics and Biomaterials Magazine*. Retrieved 2006-07-04.[^] Schmitt, E.: "Polyglycolic acid in solutions", U.S. Pat 3 737 440, 1973.
- [74] Bubbles, Bubbles, Everywhere, But Not a Drop to Drink". *The Lipid Chronicles*. Archived from the original on 26 April 2012. Retrieved 1 August 2012.

- [75] Manfred L. Hallensleben "Polyvinyl Compounds, Others" in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley-VCH, Weinheim, 2000.
- [76] Song, X., et al., Dual agents loaded PLGA nanoparticles: systematic study of particle size and drug entrapment efficiency. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 69(2): p. 445-453, 2008.
- [77] Sah, E. and H. Sah, Recent trends in preparation of poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles by mixing polymeric organic solution with antisolvent. *Journal of Nanomaterials*, 16(1): p. 61, 2015.
- [78] Budhian A, Siegel SJ, Winey KI Haloperidol-loaded PLGA nanoparticles; systematic study of particle size and drug content. *Int.J Pharm* 336(2):367-375, 2007.
- [79] Dizer, K.Ö. Kraft Kağıt Üretiminde Zeta Potansiyelin Kağıt Kalitesine Etkisi, Çevre Teknolojileri Anabilim Dalında, Zonguldak Karaelmas Üniversitesi: 5. 80, 2010.
- [80] Mansuroğlu, B., Biyohibrid Yapılı ve Biyotaklitçi Polimer-Peptid Konjugatlarının Geliştirilmesi, Doktora Tezi, FBE Kimya Anabilim Dalı, Yıldız Teknik Üniversitesi: İstanbul: 66, 2007.
- [81] Patil, A.G., Studies on the use of consortia of plants extracts on pathogenic bacteria in dental lesion for preparation of sustainable cost effective product. 2014.
- [82] Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 75: 1-18, 2010.
- [83] Muthu MS, Rawat MK, Mishra A, Singh S. PLGA nanoparticle formulations of risperidone: preparation and neuropharmacological evaluation. *Nanomedicine*, 5: 323-333, 2009.
- [84] Bala I, Hariharan S, Kumar MNVR. PLGA nanoparticles in drug delivery: the state of the art. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 21: 387- 422, 2004.
- [85] Bejjani RA, BenEzra D, Cohen H, Rieger J, Andrieu C, Jeanny JC, Gollomb G, Behar-Cohen FF. Nanoparticles for gene delivery to retinal pigment epithelial cells. *The Molecular Vision*, 11: 124-132, 2005.

- [86] Nagavarma BVN, Hemant KSY, Ayaz A, Vasudha LS, Shivakumar HG. Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles-a review. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 5(3): 16-23, 2012.
- [87] Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 6. Baskı. Grayslake, Pharmaceutical Press, 2009.
- [88]Sigma-Aldrich. DCM - Material Safety Data Sheet. <http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/PleaseWaitMSDSPage.do?language=&country=TR&brand=SIAL&productNumber=650463&PageToGoToURL=http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/650463?lang=en®ion=TR>. 25 Kasım 2014.
- [89] Budhian, A., S.J. Siegel, and K.I. Winey, Haloperidol-loaded PLGA nanoparticles: systematic study of particle size and drug content. *International journal of pharmaceutics*, 336(2): p. 367-375, 2007.
- [90] Song, X., et al., PLGA nanoparticles simultaneously loaded with vincristine sulfate and verapamil hydrochloride: systematic study of particle size and drug entrapment efficiency. *International journal of pharmaceutics*, 350(1-2): p. 320-329, 2008.
- [91] Xie H, Smith JW. Fabrication of PLGA nanoparticles with a fluidic nanoprecipitation system. *Journal of Nanobiotechnology*, 8: 1-7, 2010.
- [92] Mainardes, R.M. and R.C. Evangelista, PLGA nanoparticles containing praziquantel: effect of formulation variables on size distribution. *International journal of pharmaceutics*, 290(1-2): p. 137-144, 2005.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Tuğçe KİRİK
Doğum Yeri : ŞİŞLİ
Doğum Tarihi : 12.01.1991
e-posta adresi : aktugce4@gmail.com
Adresi : Başakşehir Mah. Erciyes Sok. D35 Blok Daire:42 2. Etap
Başakşehir/İstanbul

Eğitim Bilgileri

Lise : Bingül Erdem Lisesi
Lisans : Abant İzzet Baysal Üniversitesi

Yabancı Dil ve Düzeyi : İngilizce (Intermediate)

İş Deneyimi : Fatih Sultan Mehmet Vakıf Üniversitesi

Tezden Üretilmiş Yayın ve Bildiriler : Kirik Tuğçe, Kızılbey Kadriye, “Loading pharmaceutically active agent Rutin into PLGA nanoparticles by different methods”, 4th International Congress on Applied Biological Sciences, Sözlü Sunum, 3-5 Mayıs 2018, Eskişehir/Türkiye.