

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**KARA HAVUÇ EKSTRESİNİN FARKLI
TEKNİKLERLE ENKAPSÜLASYONU VE İN VİTRO
SALIM KİNETİĞİNİN BELİRLENMESİ**

Melike Nur Hilal FİDAN

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Gaye ÖNGEN

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu: 612.01.01

Sunuş Tarihi: 24.09.2014

Bornova-İZMİR

2014

Melike Nur Hilal FİDAN tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “**Kara Havuç Ekstresinin Farklı Tekniklerle Enkapsülasyonu ve *in vitro* Salım Kinetiğinin Belirlenmesi**” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 24.09.2014 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Doç. Dr. Gaye ÖNGEN

.....

Raportör Üye: Doç. Dr. Özlem Yeşil ÇELİKTAŞ

.....

Üye : Yrd. Doç. Dr. M. Zeki HAZNEDAROĞLU

.....

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum ‘‘**Kara Havuç Ekstresinin Farklı Tekniklerle Enkapsülasyonu ve *in vitro* Salım Kinetiğinin Belirlenmesi**’’ başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

.... / / 20..

Melike Nur Hilal FİDAN

ÖZET**KARA HAVUÇ EKSTRESİNİN FARKLI TEKNİKLERLE
ENKAPSÜLASYONU VE İN VİTRO SALIM KİNETİĞİNİN
BELİRLENMESİ**

FİDAN, Melike Nur Hilal

Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Gaye Öngen

Eylül 2014, 102 sayfa

Antosiyaninler bitkilere mor, mavi, pembe rengini veren yüksek antioksidan özelliğe sahip flavanoidlerdir. Kara havuç bitkisine özgü koyu mor regi veren maddeler de yine antosiyaninlerdir. Antosiyaninlerin şimdiye kadar tanımlanmış birçok sağlığa faydalı biyolojik etkileri vardır. Ancak bu maddelerin ısı, ışık, metal iyonları, pH, ortamda şeker ve askorbik asit bulunması gibi çeşitli faktörlere duyarlı olmaları sebebiyle kullanımı çok kısıtlıdır. Ayrıca bu bileşiklerin biyoyararlanımı, vücuttaki düşük absorpsiyonları ve hızlı metabolizasyonu nedeniyle oldukça düşüktür.

Bu çalışma kapsamında kara havuç antosiyaninlerin stabilitesinin ve biyoyararlanımının enkapsülasyon teknikleri ile iyileştirilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca enkapsüle edilen kara havuç antosiyaninlerinin beyin tümörlerine karşı kullanım potansiyeli olduğundan teorik olarak kan beyin bariyerini geçebilmesi için ortalama 100 nm partikül boyutu hedeflenmiştir. Bu amaç doğrultusunda öncelikle kara havuçtan antosiyanin ekstraksiyonu gerçekleştirilmiş ve enkapsülasyon çalışmalarında bu ekstre model olarak kullanılmıştır. Enkapsülasyon için çift emülsiyon çözücü buharlaştırma ve niozom yöntemleri kullanılmış, en düşük partikül boyutlarının elde edildiği niozom yöntemi uygun bulunmuştur. Niozom yöntemi için 3 farklı parametre Merkezi Tümleşik Tasarım

(CCD) deney tasarımı ile optimize edilmiş ve yaklaşık 130 nm partikül boyutuna sahip sonuç formülasyon belirlenmiştir.

Seçilen niozom formülasyonunun karakterizasyonu yapılmış ve yaklaşık % 30 yükleme verimine sahip partiküllerin *in vitro* salım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Son olarak sonuç formülasyonunun hücre kültüründe 7 farklı hücre hattında sitotoksik aktivitesi incelenmiş ve Neuro-2A beyin tümör hücre hattında sitotoksik aktivitesinin olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışma kara havuç antosiyaninlerinin nanopartikül seviyesinde enkapsülasyonunun yapıldığı, enkapsülasyon yönteminin optimize edildiği ve elde edilen nanopartiküllerin beyin kanser hücre hattında incelendiği ilk çalışmadır.

Anahtar sözcükler: Kara havuç, antosiyanin, enkapsülasyon, niozom, çift emülsiyon, neuro 2A, sitotoksik aktivite

ABSTRACT**ENCAPSULATION OF BLACK CARROT EXTRACT WITH
DIFFERENT TECHNIQUES AND DETERMINATION OF IN
VITRO RELEASE KINETIC**

FİDAN, Melike Nur Hilal

MSc in Bioengineering.

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Gaye Öngen

September 2014, 102 pages

Anthocyanins, that belong to the family of compounds known as flavonoids, are responsible for most of the red, blue, purple colors of plants and they have high antioxidant activities. The specific dark purple color of black carrot plant is also originating from anthocyanins. Anthocyanins have many identified health beneficial biological effects but they are sensitive to various factors such as heat, light, metal ions, pH, glucose and ascorbic acid present in the environment. In addition due to low absorption and fast metabolization in the body, bioavailability of these compounds are very low.

In this thesis, stability and bioavailability of black carrot anthocyanins are intended to be improved via encapsulation techniques. Black carrot anthocyanins have a potential use in brain tumors. Therefore, the particle size of the encapsulated black carrot anthocyanins is targeted to 100 nm so that they can pass the blood brain barrier. For this purpose, firstly the extraction of the black carrot anthocyanins were carried out and the extract obtained was used in encapsulation studies. Double emulsion solvent evaporation and niosomes methods were used for encapsulation and the lowest particle sizes were obtained with niosomes.

Three different parameters for niosome method were optimized with Central Composite Design (CCD) and the partial size of the final formulation obtained was about 130 nm. Selected niosome formulation was characterized and *in vitro*

release studies were carried out with the particles having 30% loading efficiency. Finally, cytotoxic activities of the result formulations were determined in 7 different cell lines and it was found that on brain cancer cell line, Neuro-2A, particles showed high cytotoxic activity.

This study is also the first detailed work for the encapsulation of black carrot anthocyanins at nanoparticle level, the optimization of the encapsulation method and the examination of the resulting nanoparticles on brain cancer cell line.

Keywords: Black carrot, anthocyanin, encapsulation, niosome, double emulsion, neuro 2A, cytotoxic activity

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca sahip olduğu deneyim ve birikimlerini benimle paylaşan sevgili hocam Doç. Dr. Gaye Öngen' e

Çalışmalarım sırasında hiçbir zaman sorularımı yanıtsız bırakmayan, değerli fikirleriyle bana yol göstererek ilerlememe katkıda bulunan ve zamanını bana ayıran sevgili hocam Doç. Dr. Özlem Yeşil Çelikleş' a

Bu çalışmanın her aşamasında bilgi, görüş ve tavsiyelerini benden esirgemeyen hocam Doç. Dr. Emel Öykü Çetin Uyanıkgil' e,

Tez çalışması kapsamındaki sitotoksosite çalışmalarını gerçekleştiren Doç. Dr. Canan Sevimli Gür' e,

Partikül boyutu ölçümlerinin yapılması için Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Radyokromatografi laboratuvarında bulunan Zetasizer cihazını kullanmamıza izin veren Doç. Dr. Serap TEKSÖZ' e,

Çalışmalarımı gerçekleştirdiğim Öncül Akışkan Teknolojileri ve Uygulamaları Laboratuvarı ve Biyoproses Laboratuvarı çalışanlarına,

Aynı çalışma ortamını paylaşmaktan keyif aldığım, zor anlarımda beni yalnız bırakmayan ve yardımcı olan sevgili arkadaşlarım Aslıhan Kazan ve Dilan Karabulut' a

Tez çalışmam boyunca bana yardımcı olan ve teknik destek sağlayan Arş. Gör. Şeref AKAY' a

Yüksek lisans eğitimim boyunca beni başarmam için yüreklendiren ve her zaman yanımda olan sevgili Mehmet Murat Yardımcı' ya,

Benden maddi manevi desteklerini esirgemeyen her zaman yanımda olan canım ailem Abdullah Fidan, Nuray Fidan ve Mustafa Fidan' a en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xviii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxi
KISALTMALAR DİZİNİ	xxiii
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	2
2.1. Antosiyaninlerin Tanımı	2
2.1.1. Antosiyaninlerin kimyasal özellikleri	2
2.1.2. Antosiyaninlerin biyolojik özellikleri	4
2.1.3. Antosiyaninlerin stabilitesini etkileyen faktörler	6
2.1.4. Antosiyaninlerin stabilite sorunu	7
2.1.5. Antosiyaninlerin biyoyararlanımı	8
2.2. Siyanidin-3-glikozit	11
2.2.1. Siyanidin-3-glikozit' in biyolojik aktiviteleri	12
2.3. Enkapsülasyon Teknolojisi ve Yöntemleri	14

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.3.1. Enkapsüle edilen etken maddeler	15
2.3.2. Enkapsülasyon formülasyonlarında kullanılan polimerler	15
2.4. Nanopartiküller	17
2.5. Nanopartikül Üretiminde Kullanılan Teknikler	17
2.5.1. Emülsiyon oluşturma	17
2.5.1. Lipid-Esaslı nanopartiküller	22
2.6. Kan Beyin Bariyeri	29
2.6.1. Kan beyin bariyeri ve nanopartiküller	31
2.7. Beyin Tümörleri	32
2.7.1. Nöroblastoma	32
2.8. Cevap Yüzey Yöntemi (CYY)	33
2.8.1. Merkezi tümleşik tasarım (<i>Central composite design</i>)	34
2.9. Taguchi Metodu	34
3. MATERYAL VE METOT	36
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	36
3.1.1. Nanopartiküler sistemlerin hazırlanmasında kullanılan yüzey aktif maddeler	36

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.2. Kullanılan Ekipmanlar ve Malzemeler	38
3.3. Kara Havuç Antosiyaninlerinin Ekstraksiyonu	38
3.3.1. Toplam antosiyanin miktarının pH diferansiyel yöntem ile belirlenmesi	39
3.3.2. Antosiyaninlerin ultra-yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (UPLC) ile belirlenmesi	40
3.4. Çift Emülsiyon Çözücü Buharlaştırma Yöntemi ile Enkapsülasyon....	42
3.4.1. Ön formülasyon çalışmaları	42
3.4.2. Çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile partiküllerin hazırlanması	43
3.5 Niozom Yöntemi ile Enkapsülasyon	45
3.5.1. Ön formülasyon çalışmaları	45
3.5.2. Niozom yöntemi ile partiküllerin hazırlanması	46
3.6. Partiküllerin Karakterizasyonu	48
3.6.1. Partikül büyüklükleri ve dağılımlarının incelenmesi	48
3.6.2. Partiküllerin görüntülenmesi	48
3.6.3. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) analizi.....	48
3.6.4. Partiküllerin yükleme veriminin belirlenmesi	49

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.6.5. <i>In vitro</i> salım çalışmaları	50
3.7. <i>In vitro</i> Sitotoksisite Çalışmaları	50
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	52
4.1. Kara Havuç Antosiyaninlerinin Ekstraksiyonu	52
4.2 Çift Emülsiyon Çözücü Buharlaştırma Yöntemi ile Enkapsülasyon	53
4.2.1. Ön Formülasyon Çalışmaları	53
4.2.2. Çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile partiküllerin hazırlanması.....	55
4.3. Niozom Yöntemi ile Enkapsülasyon.....	60
4.3.1. Ön formülasyon çalışmaları.....	60
4.3.2. Niozom yöntemi ile partiküllerin hazırlanması	60
4.4. Partiküllerin Karakterizasyonu	69
4.4.1. Partiküllerin Görüntülenmesi.....	69
4.4.2. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) analizi	73
4.4.3. Partiküllerin Yükleme Veriminin Belirlenmesi	76
4.5. <i>İn vitro</i> Salım Çalışmaları.....	78
4.6. <i>In vitro</i> Sitotoksisite Çalışmaları.....	82

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
5. SONUÇ	85
KAYNAKLAR DİZİNİ	87
ÖZGEÇMİŞ	101

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Antosiyanidinlere şeker grubunun bağlanması (Clifford, 2000).....	4
2.2. Siyanidin-3-glikozit' in molekül yapısı.....	12
2.3. Tek emülsiyon yöntemi ile hazırlanan partiküllerin yapısı (Guy, 2007).....	19
2.4. Çift emülsiyon yönteminin basamakları.....	21
2.5. Lipozomun yapısı (Bulut, 2012).....	23
2.6. Niozomun yapısı.....	24
2.7. Literatürde bulunan çalışmalarda niozomların kontrollü salım için kullanıldığı yollar (Dahiya et al., 2011).....	25
2.8. Kan-beyin bariyerindeki transport mekanizmaları. (1: Pasif difüzyon, 2: Sıkı bağlantılar üzerinden pasif difüzyon, 3: Endositoz, 4: Taşıyıcı aracılı transport, 5: Aktif efluks transport (Kemper et al., 2004).....	31
3.1. Tween 20' nin moleküler yapısı.....	37
3.2. Tween 80' nin moleküler yapısı.....	37
3.3. PVA' nın moleküler yapısı.....	37
3.4. Karboksimetil selüloz' un moleküler yapısı.....	38
3.5. UPLC Kalibrasyon eğrisi.....	41
4.2. Karıştırma hızı ve besleme süresinin partikül boyutu üzerindeki etkisi.....	58

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.3. 1 numaralı formülasyonun yoğunluğa göre boyut dağılım grafiği.....	59
4.4.5 numaralı niozom formülasyonunun zeta potansiyeli.....	63
4.5. Tween 20 ve kolesterol miktarının partikül boyutu üzerindeki etkisi..	66
4.6. Tween 20 ve kolesterol miktarının partikül boyutu üzerindeki etkisi (contour).....	66
4.7. Besleme süresi ve kolesterol miktarının partikül boyutu üzerindeki etkisi	67
4.8. 13 numaralı formülasyonun yoğunluğa göre boyut grafiği (PDI:0,179).....	68
4.9. F2 no' lu formülasyonun yoğunluk-boyut grafiği.....	69
4.10. Boş niozom partiküllerinin taramalı elektron mikroskobu görüntüsü (5000X).....	70
4.11. Boş niozom partiküllerinin taramalı elektron mikroskobu görüntüsü (10 000X).....	70
4.12. Boş niozom partiküllerinin taramalı elektron mikroskobu görüntüsü (20 000 X).....	71
4.15. Yüklü niozom partiküllerinin taramalı elektron mikroskobu görüntüsü (20 000 X).....	73
4.16. Kara havuç ekstresine ait DSC diyagramı.....	74
4.17. Boş niozom formülasyonuna ait DSC diyagramı.....	74

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.20. Kara havuç (su) ekstresinin antosiyanin profili.....	79
4.21. Zamana karşı kümülatif salım profili.....	80
4.22. Kolesterolün enkapsülasyona ve salım hızına olan etkisi.....	81
4.23. Kara havuç ekstresinin farklı hücre hatlarındaki sitotoksik aktivitesi (NK: negatif kontrol, PK: pozitif kontrol).....	82
4.24. Yüklü niozom partiküllerinin farklı hücre hatlarındaki sitotoksik aktivitesi.....	83
4.25. Serbest ve enkapsüle kara havuç ekstresinin Neuro-2A hücre hattındaki sitotoksik aktivitesi.....	84

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Doğada en yaygın bulunan antosiyanidinlerin kimyasal yapıları ve yapıya bağlanan gruplar (Castaneda-Ovando et al., 2009; Damar, 2010)....	3
2.2. 15 gün boyunca böğürtlen antosiyaninlerince zengin diyet uygulanan farelerin dokularının antosiyanin içerikleri (Talavera et al., 2005).....	10
2.3. Siyanidin-3-glikozit' in çeşitli biyolojik aktiviteleri.....	12
2.4. Biyobozunur polimerler.....	16
3.1. UPLC Metodu.....	41
3.2. Çift emülsiyon yöntemi ön formülasyon çalışmaları.....	42
3.3. Deneysel tasarımda kullanılan enkapsülasyon parametrelerinin (bağımsız değişkenlerin) seviyesi.....	43
3.4. Çift emülsiyon yöntemi için oluşturulan deney tasarımı.....	44
3.5. Niozom ön formülasyon denemeleri.....	46
3.6. Deneysel tasarımda kullanılan enkapsülasyon parametrelerinin (bağımsız değişkenlerin) seviyesi.....	46
3.7. Niozom yöntemi için oluşturulan taguchi deney tasarımı.....	47
4.1. Çift emülsiyon yönteminde kullanılan surfaktanların oranları ve oluşan partiküllerin boyutları.....	54
4.2. Çift emülsiyon için oluşturulan deney tasarımı.....	55

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.3. Deney tasarımı sonucu elde edilen çift emülsiyon partiküllerinin ortalama büyüklüğü ve polidispersite indisi.....	55
4.4. Çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile enkapsülasyonun varyans analizi (ANOVA).....	56
4.5. Farklı karıştırma hızlarını ile elde edilen partiküller ve boyutları.....	60
4.6. Niozom yöntemi için oluşturulan taguchi deney tasarımı.....	61
4.7. Deney tasarımı sonucu elde edilen niozom partiküllerinin ortalama büyüklüğü ve polidispersite indisi.....	61
4.8. Niozom yöntemi ile enkapsülasyonun varyans analizi (ANOVA).....	62
4.9. Niozom yöntemi için oluşturulan CCD deney tasarımı ve sonuçları....	63
4.10. Niozom yöntemi için yapılan merkez-tümleşik tasarımın varyans analizi (ANOVA).....	65
4.11. Tween 20 konsantrasyonunun partikül boyutuna etkisi.....	69
4.12. Yükleme verimi çalışmaları.....	77

KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
PBS	Fosfat tamponu (pH 7.4)
PCL	Polikaprolakton
PDI	Polidispersite indisi
DCM	Diklorometan
rpm	1 dakikadaki devir sayısı
nm	nanometre

1. GİRİŞ

Günümüzde her türlü bilgiye ulaşım kolaylığı, özellikle sağlıkla ilgili konularda insanlar bilgilenme ve bilinçlenmeyi arttırmıştır. Her kesimden ve her yaştan insanın sağlıkla ilgili endişeleri bulunmakta ve bu endişeler artık doğal ürünlerin kullanımı ile giderilmek istenmektedir. Bitkisel kaynakların hastalıklardan korunmada ve hastalıkların tedavisinde kullanımı milattan önceki yıllara dayanıyor olsada bilimsel gelişmeler ile etkileri ortaya konulan ‘doğal ürünler’ oldukça popüler bir konu haline gelmiştir.

Bitkilerde bulunan çeşitli etkin maddelerin saflaştırılması ve biyolojik aktivitelerinin incelenmesi konusunda literatürde fazla sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu etkin maddelerden biri de antosiyaninlerdir. Antosiyaninler bitkilerde, özellikle meyvelerde ve çiçeklerde bulunan kırmızı-mavi-mor renk pigmentleri olan yüksek antioksidan aktiviteye sahip fenolik bileşenlerdir.

Ahududu, böğürtlen, karadut, yaban mersini, kızılıçık, vişne,, frenk üzümü gibi üzüksü meyvelerde ve kara havuç, patlıcan, kara lahana, mor patates gibi mor-mavi sebzelerde oldukça yüksek miktarlarda antosiyanin bulunmaktadır. Antosiyaninleri bu kadar önemli ve çalışılmaya değer kılan ise oldukça fazla biyolojik aktiviteye sahip olmalarıdır. Antikanser, antikarsinojenik, vazoprotektif, anti-obezite, anti-diyabet, antienflamatuvar, antinörodejeneratif ve gastroprotektif etki bunlardan bazılarıdır (Galvano et al., 2007).

Bununla birlikte antosiyaninlerin stabilite ve renginin, pH, sıcaklık, ışık, kopigmentler, metalik iyonlar gibi çevresel koşullardan etkilendiği bilinmektedir (Sari et al., 2012). Ayrıca yapılan metabolizma çalışmalarında antosiyaninlerin biyoyararlanımlarının düşük olduğu saptanmıştır (Marczyloet al., 2009). Belirlenen bu problemlere çözüm yaratmak amacıyla, literatür çalışmaları göz önüne alınarak bu tez çalışmasının kapsamı belirlenmiştir. Kara havuç bitkisinden elde edilen antosiyaninler farklı tekniklerle enkapsüle edilmiş, oluşan nanopartiküllerin karakterizasyon çalışmaları yapılmış, ekstre ve partiküllerin beyin tümör hücrelerine (Neuro 2A) karşı sitotoksik aktivitesi incelenmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Antosiyaninlerin Tanımı

Antosiyaninler flavonoidler olarak adlandırılan, bitki aleminde geniş ve yaygın olarak bulunan suda çözünür fitokimyasallar grubunun bir parçasıdır. Antosiyanin kelimesi, Yunanca anthos (çiçek) ve kyanos (mavi) kelimelerinden türemiştir. Bunlar esas olarak; bitkilerin meyve, çiçek, yaprak, kök gibi organlarında bulunan, bitkiye özgü pembe, kırmızı, mor, mavi gibi geniş aralıktaki renkleri veren doğal renk maddeleridir (Wang et al., 2008).

Antosiyaninler grubu, birçok sebze ve meyvenin renkli olmasını sağlarlar ve 500' den fazla sayıda bileşik içermektedirler (McGhie and Walton, 2007). Antosiyaninlerin renkleri yapıya ve meyvenin asitliğine de bağlıdır. Çoğu antosiyanin asidik koşulda kırmızı, düşük asitli koşulda ise maviye döner. Bu özelliklerinden dolayı antosiyaninler, asit-baz indikatörü olarak da kullanılabilir (Vando et al., 2009).

Elma, şeftali, böğürtlen, yabanmersini, vişne, kan portakalı, kırmızı üzüm, ahududu, çilek, karpuz ve benzeri meyvelerde, kırmızı fasulye, havuç, lahana, biber, domates, mor soğan ve benzeri renkli sebzelerde antosiyanin varlığı tespit edilmiştir (Lila et al., 2004).

2.1.1. Antosiyaninlerin kimyasal özellikleri

Antosiyaninler; flavilyum ya da 2-fenil benzopirilyum tuzlarının glikozile polihidroksi ve polimetoksi türevleri olan polifenolik bileşiklerdir. Kimyasal olarak glikozit yapıdadırlar ve glikozidin aglikon kısmına genel olarak 'antosiyanidin' denilmektedir. Genellikle antosiyanidinler, bitkilerde serbest formda değil şekerler ile oluşturduğu glikozit ya da antosiyanin formunda bulunurlar. Aglikonlar nadiren taze bitkilerde bulunmaktadır. Her aglikonun farklı şeker gruplarıyla glikozidik yapı oluşturabildiği, alifatik asitler veya aromatik asitlerle açillendiği düşünüldüğünde bu şekilde oluşabilecek çok sayıda kombinasyon vardır. Buna dayanarak, doğada sadece 23 adet antosiyanidin

bulunmasına rağmen; moleküldeki hidroksil grubu sayısına, hidroksil gruplarının metilasyon derecesine, moleküle bağlanan şeker sayısına ve şekerin bağlanma pozisyonuna, ayrıca moleküldeki şekere bağlanan alifatik ve aromatik asitlerin yapısına ve sayısına bağlı olarak birbirinden farklı 500' den fazla antosiyanin oluşmaktadır (Wu et al., 2006; Galvanoa et al., 2004; Castaneda-Ovando et al., 2009).

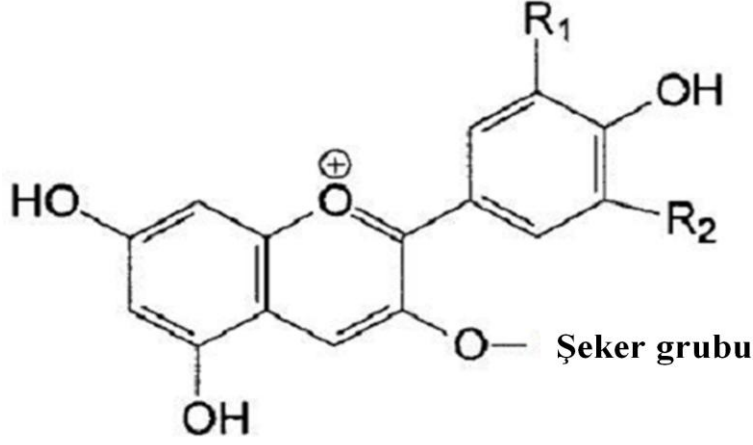
Bitkilerde yaygın olarak bulunan antosiyanidinler ise 6 adettir. Bunlar; siyanidin (Cy), delfinidin (Dp), petunidin (Pt), peonidin (Pn), pelargonidin (Pg), ve malvidin (Mv)' dir ve ortak olarak hepsi C6-C3-C6 karbon iskeletine sahiptirler (Giusti and Wrolstad, 2003).

Bitkilerde en sık rastlanan antosiyanidinlerin kimyasal yapısı ve yapıya bağlı yan gruplar Çizelge 2.1' de sunulmuştur.

Çizelge 2.1. Doğada en yaygın bulunan antosiyanidinlerin kimyasal yapıları ve yapıya bağlanan gruplar (Castaneda-Ovando et al., 2009; Damar, 2010)

Antosiyanidin	Bağlı Gruplar							Renk
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	
Siyanidin	OH	OH	H	OH	OH	OH	H	Turuncu-kırmızı
Delfinidin	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH	Mavi-kırmızı
Malvidin	OH	OH	H	OH	OCH ₃	OH	OCH ₃	Mavi-kırmızı
Pelargonidin	OH	OH	H	OH	H	OH	H	Turuncu-somon
Peonidin	OH	OH	H	OH	OCH ₃	OH	H	Turuncu-kırmızı
Petunidin	OH	OH	H	OH	OCH ₃	OH	OH	Mavi-kırmızı

Antosiyanidinlere bağlanan şekerler glikoz, galaktoz, ramnoz, arabinoz gibi monosakkarit, rutinoz, gentibioz gibi disakkarit ve ya trisakkarit yapıda olabilmektedir. Bu şeker grupları genellikle 3-hidroksil veya 3,5-hidroksil pozisyonunda bağlanmakta, bazen de 7-hidroksil pozisyonunda yer almaktadır (Bagchi et al., 2004). Clifford' a göre (2000) şeker gruplarının antosiyanidinlere genel olarak bağlanma şekli Şekil 2.1' de gösterilmektedir.



Şekil 2.1. Antosiyanidinlere şeker grubunun bağlanması (Clifford, 2000)

Örneğin doğada en yaygın bulunan antosiyanin olan siyanidin 3-glikozit, siyanidinin 3. pozisyonuna bir glikozun bağlanmasıyla oluşmaktadır. Antosiyaninlerin temel yapısını oluşturan antosiyanidinler ve buna bağlı şeker grupları dışında bazen üçüncü bir bileşen olan açil asit grupları da bulunabilmektedir. Aromatik asitlerden yaygın olarak p-kumarik, ferulik, kafeik, sinapik ve gallik asit bulunurken alifatik asitlerden ise malonik, asetik, malik, suksinik ve okzalik asit bulunabilmektedir (Timberlake and Bridle, 1980; Mazza, 2007).

Tüm bu değişkenler antosiyanin grubuna ait bileşiklerin sayıca çok olmasını açıklamakla birlikte araştırmacılara birçok farklı bitkinin antosiyanin kompozisyonu ile ilgili çalışma yapma fırsatı yaratmaktadır.

2.1.2. Antosiyaninlerin biyolojik özellikleri

Renk niteliklerinin ve güçlü antioksidan özelliklerinin yanında insanlar üzerindeki biyolojik etkileri antosiyaninlere olan ilgiyi arttırmıştır. Antosiyaninlerin çeşitli hastalıkların tedavisinde olumlu etkilere sahip olduğu rapor edilmiş ve biyolojik özelliklerinin kendilerine özgü kimyasal yapılarına bağlı olduğu belirtilmiştir (Kong et al., 2003).

Genel olarak antosiyanin ekstraktlarının sağlık üzerindeki olumlu etkileri; görme keskinliğinin arttırılması, kardiyovasküler hastalıklardan koruma, kalp sağlığını koruma, göz fonksiyonlarını koruma, antikanserojenik, antioksidan, antibakteriyal, antiinflamatuvar, antiülser, antidiyabetik aktivite olarak bildirilmiştir (Wallace, 2011; Mazza, 2007; Ghosh and Konishi, 2007).

Antosiyanin ekstraktlarının en önemli özelliği ise antioksidan aktiviteye sahip olmalarıdır. Yapılan çalışmaların büyük bir kısmı farklı sebze ve meyvelerden elde edilen antosiyanin ekstrelerinin antioksidan özelliğinin belirlenmesi üzerinedir (Bagchi et al., 2004). Antosiyaninler elektron eksikliği sebebiyle reaktif oksijen türlerine (ROS) karşı oldukça fazla reaktifirler. Antosiyaninlerin doğal elektron eksikliği bu bileşikleri reaktif hale getirmekle birlikte pH ve sıcaklık değişikliklerine karşı çok duyarlı hale getirmektedir. Fizyolojik pH' daki kararsızlığı ile ilgili bazı endişeler olmasına rağmen antosiyaninler doğal bileşikler listesinde güçlü antioksidanlar olarak yer almaktadırlar. Bu maddelerin antioksidan etkilerinin farklı kimyasal yapıları tarafından modüle edildiği söylenmektedir (Galvanoa et al., 2004).

Antosiyaninlerin bahsedilen çeşitli biyolojik aktivitelerinden biri olan anti-di-yabetik özelliği üzerine bir çalışmayı Jayaprakasam et al. (2005) gerçekleştirmiştir. Yaptıkları çalışmada meyve ve sebzelerden izole ettikleri ve saflaştırdıkları antosiyaninleri tip-2 diyabet (insülinden bağımsız diyabet) tedavisinde kullanılabileceği ortaya konulmuştur.

Yıllardır kırmızı şarabın kalp hastalıklarına karşı koruyucu etkisi üzerine çalışmalar sürdürülmektedir ve son yıllarda bu etkinin şarap içerisindeki antosiyaninlerden kaynaklandığına dair veriler g kazanmaktadır (Bakowska-Barczak, 2005).

Antosiyaninlerin oldukça farklı ve çok sayıda biyolojik aktiviteye sahip olmaları bu doğal bileşiklerin biyoyararlanım (absorbsiyon, metabolik yol ve boşaltım) mekanizmaları ve biyoaktivitesi üzerine yapılan çalışmalara oldukça hız kazandırmıştır (Bitsch et al., 2004).

2.1.3. Antosiyaninlerin stabilitesini etkileyen faktörler

Antosiyaninlerin stabilitesi, pigment konsantrasyonu ve yapısı, pH, sıcaklık, ışık, kopolimerler, enzimler, metalik iyonlar, askorbik asit, şekerler ve bunların bozunma ürünleri gibi birçok faktör tarafından belirlenmektedir. Antosiyanin pigmentlerinin kaybı özellikle oksijen varlığında, çeşitli enzimlerin varlığında ve yüksek sıcaklık içeren işlemler sonucu gerçekleşebilmektedir (Brouillard, 1982; Mazza and Brouillard, 1990).

Antosiyaninler reaktif bileşiklerdir, kolaylıkla bozunabilirler, diğer bileşiklerle reaksiyona girebilirler, bunun sonucunda renksiz ve ya kahverengi bileşiklere dönüşebilirler. Bu nedenle koruyucu önlemler alınmadığı sürece antosiyaninlerin bitki hücrelerinden izole edildiği haliyle stabilitesini koruması mümkün değildir (Frank et al., 2012).

Antosiyaninler flavanoid olmasına rağmen biyokimyasal yapıları diğer flavanoid bileşiklerine göre daha kompleksdir. Molekül yapısına bağlı olarak, bazı antosiyaninler diğerlerine göre daha stabildir. Aglikona bağlanan glikozil grubu ve açıl grupları ile bağlanma bölgeleri antosiyanin molekülünün stabilitesini ve aktivitesini önemli ölçüde etkilemektedir (Mcghie and Walton, 2008; Jackman et al., 1987).

Yapılan araştırmalarda glikozilasyon ve açillenme durumunun moleküle stabilize kazandırdığı belirtilmiştir (Malien-Aubert et al., 2011). Ayrıca aglikondaki hidroksil ve metoksil gruplarının sayısı ve konumu ile hidroksilasyon derecesi de bu pigmentlerin kimyasal yapısını ve stabilitesini etkilemektedir. Genellikle antosiyaninlerin stabilitesi B halkasındaki metoksil sayısı arttıkça artarken, hidroksil sayısı arttıkça azalmaktadır. Dolayısıyla yüksek metoksilasyona sahip olan malvinidin antosiyaninler arasında en stabil tür olduğu belirtilirken, malvidini sırasıyla peonidin, petunidin, siyanidin ve delfinidin takip etmektedir (Cavalcanti et al., 2011; Malien-Aubert et al., 2011).

2.1.4. Antosiyaninlerin stabilite sorunu

Antosiyaninlerin stabilitesinin birçok çevresel faktörden etkilendiği Bölüm 2.1.3' de açıklanmıştır. Bununla birlikte çok çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olmaları ve kolay ulaşılabilir olmaları antosiyaninleri oldukça önemli kılmaktadır. Bu nedenle literatürde, antosiyaninleri çevresel etkilerden koruyacak ve stabilitesini arttıracak çalışmalara sıkça rastlanmaktadır (Betz and Kulozik, 2011, Jeong and Na, 2012; Akhtar et al., 2014).

Antosiyaninlerin stabilizasyon mekanizması iki şekilde gerçekleştirilmektedir. Bunlar; birleşme tepkimeleri (association reactions) ve enkapsülasyondur. Birleşme tepkimeleri kısaca başka antosiyaninlerle tepkime ile, kopigmentasyon ile veya metallerle kompleks oluşturularak antosiyaninlerin stabilitesinin artırılması ve renk kayıplarının önlenmesini içermektedir (Cavalcanti et al., 2011). Birleşme tepkimeleri daha çok gıda sanayinde renk kayıplarının önlenmesi için kullanılmaktadır. Örneğin şarapların daha uzun süre renklerinin korunması ve raf ömrünün uzatılması için birleşme tepkimeleri kullanılarak stabilizasyon sağlanmaktadır. Fakat bu tepkimeler antosiyaninlerin biyolojik aktivitelerini de etkilemektedir (He et al., 2012). Bu nedenle son yıllarda biyoteknolojik gelişmelerle paralel olarak stabilizasyon çalışmalarında enkapsülasyon teknolojisi sıkça kullanılmaktadır. Antosiyaninler ile yapılan enkapsülasyon çalışmaları kısaca aşağıda açıklanmıştır.

- Yaban mersini antosiyaninlerinin peynir altı suyu proteini ile mikroenkapsülasyonu (Betz and Kulozik, 2011),
- Siyah frenk üzümü antosiyaninlerinin püskürtmeli kurutucu ile mikroenkapsülasyonu (Bakowska-Barczak and Kolodziejczyk, 2011)
- Nar antosiyaninlerin püskürtmeli kurutucu ile mikroenkapsülasyonu ve mikrokapsüllerin yoğurttaki kullanımı (Robert et al., 2010)
- Siyah soya fasulyesi antosiyaninlerinin kondroitin sülfat ile nanokompleks oluşturulması ve sitotoksik aktivitesinin incelenmesi (Jeong and Na, 2012)

- *H. Sabdariffa* (kerkede) bitkisinin antosiyaninlerinin döner diskli reaktör teknolojisi kullanılarak çoklu emülsiyon enkapsülasyonu (Akhtar et al., 2014)
- Jaboticaba meyvesinin antosiyaninlerinin süperkritik CO₂ teknolojisi kullanılarak enkapsülasyonu (Santos et al., 2013)
- Böğürtlen antosiyaninlerinin termal jelasyon ile enkapsülasyonu (Ferreira et al, 2009)

Bitkisel kaynaklardan elde edilen antosiyaninlerin enkapsülasyonu 1990' lı yıllardan bu yana çalışılmaktadır (Mazza and Brouillard, 1990). Farklı tekniklerle ve farklı kaplama materyalleriyle yapılan bu enkapsülasyon çalışmalarının amacı antosiyaninleri gıda sanayinde renklendirici olarak kullanmak ve antioksidan aktivitelerinden yararlanmaktır.

Antosiyaninlerin enkapsüle edilerek biyolojik aktivitesinin incelenmesi Zhang et al. (2014)' ın yaptığı çalışma ile başlatılmıştır. Zhang et al. (2014) gerçekleştirdiği çalışmada siyanidin-3-glikoziti ferritin proteini ile kaplayarak termal ve ışık kaynaklı bozunmaları engelleyebileceğini ayrıca bu kaplama işleminin siyanidin-3-glikozitin hücre alımını engellemeyeceğini belirtmiştir.

2.1.5. Antosiyaninlerin biyoyararlanımı

Antosiyaninler bitkilerde sekonder metabolit olarak üretilen ve günlük diyetin içerisinde alınan polifenolik bileşiklerdir. Bu metabolitlerin sağlığa faydaları keşfedildikçe biyolojik aktivitelerine olan ilgi de artmaktadır. Bununla birlikte yararlı etkileri keşfedebilmek ve maksimize edebilmek için biyoyararlanımın (absorbsiyon, metabolizma ve boşaltım) anlaşılması gerekmektedir (Matuschek et al., 2006).

Biyoyararlanım farklı yollarla tanımlanabilmektedir, yaygın olarak kabul edilen tanımı ile biyoyararlanım absorbe edilen, metabolik yollarla sindirilen ve metabolize edilen etkin madde miktarıdır. Bu sebeple besin veya gıda takviyelerindeki besin miktarını bilmek değil, bunun ne kadarının biyoyararlanım gösterdiğini bilmek önemlidir (Sirinivasan, 2001).

Bitkilerde en yaygın olan antosiyaninler, insanlarda emilmediği düşünülen,3-glikozit veya 3,5-di-glikozit formunda bulunmaktadırlar. 90'lı yıllardakibu düşünce nedeniyle, insanlarda besinsel antosiyaninlerin farmakokinetik çalışmaları göz ardı edilmiştir. Fakat HPLC metodolojilerinin gelişmeleri ile plazmada antosiyaninlerin analizi yapılmış böylece insanlarda absorpsiyon ve biyoyararlanımın olduğu kanıtlanmıştır (Cao and Prior, 1999; Milbury et al., 2002).

Antosiyaninlerin biyoyararlanımı flavonoller (quercetin glikozitleri) gibi diğer flavonoidlere göre bazı önemli yönleri ile farklılık göstermektedir. McGhie and Walton(2007) araştırma grubu ilk olarak görünen biyoyararlanımın düşük olduğunu ve bazen enjekte edilen dozun sadece %0.1 'e idrarda rastlandığını çalışmalarında belirtmiştir. Aynı grup biyoabsorpsiyonun hızlıca gerçekleştiğini, plazmadaki tmax' ın 15-60 dakika ve boşaltımın 6-8 saat içerisinde tamamlandığını da ortaya koymuştur. . Bu veriler antosiyaninlerin midede emildiği görüşünü ortaya çıkarmıştır. Bir diğer elde edilen sonuç ise, bozulmamış antosiyanin glikozitlerinin absorbe edildiği, dolaşım sistemi ile dağıldığı ve idrar ile atıldığıdır. Antosiyaninlerin biyoaktivitesi için öncelikle ele alınması gereken konunun düşük biyoyararlanım sorununun çözümü ile ilgili olması gerektiğine dair görüşler günümüzde önem kazanmaktadır.(McGhie and Walton, 2007).

Hayvanlar üzerinde yapılan birçok çalışma antosiyaninlerin daha çok bozulmamış glikozidik formuyla absorbe edildiğini ve 0.25-2 saat içerisinde hızlıca dolaşım sistemine ulaştığını ortaya koymuştur. Örneğin, farelerde, *Vaccinium myrtillus*' dan elde edilen antosiyaninlerin tek bir oral uygulaması sonrası (400mg/kg vücut ağırlığı) sadece 15 dakika sonra plazma konsantrasyonu maksimum seviyesine ulaşmış (2–3 µg/mL) ve sonrasında 2 saat içerisinde hızlıca azalmıştır (Morazzoni et al., 1991).

Miyazawa et al. (1999) yaptıkları çalışmada farelere kırmızı meyve antosiyanininin ağızdan uygulanması ile (320mg siyanidin-3-glikozit/kg BW) bozulmamış (intact) antosiyaninlerin plazmadaki hızlı görünümü (appearance) (Cmax:1.8µg/ml @ 15 dakika) mide entübasyonu yoluyla doğrulanmıştır.

Bu sonuçlar Tsuda et al. (1999) bir çalışması ile kanıtlanmaktadır. Farelere ağızdan siyanidin-3-glikozit (400mg/kg BW) uygulanması sonrası, bozulmamış form hızlıca plazmada saptanmış (Cmax:0.14 µg/ml @ 30 dakika), aglikon siyanidin jejunumda (bağırsakta) saptanmasına rağmen plazmada tespit edilmemiştir. Plazmada rastlanmamasına rağmen bağırsakta aglikon siyanidinlerin tespit edilmesi, siyanidin-3-glikozitin ince bağırsakta β-glikozidazlar tarafından hidrolize edildiği görüşü ile açıklanmıştır (Tsuda et al., 1999). Buna ek olarak plazmada siyanidin-3-glikozit miktarından 8 kat daha yüksek konsantrasyonda protokateşik asit (protocatechuic acid) bulunmuş ve araştırmacılar tarafından bunun siyanidin'inin degradasyonu sonucu oluştuğu düşünülmüştür.

Matuschek et al. (2006) farelerde yaptıkları çalışmada siyanidin-3-glikozit' in bağırsaklarda emildiğini gösterilmiştir. C3G için esas emiliminin jejunum (ince bağırsağın üst kısmı) da gerçekleştiğini belirtmişlerdir. Çizelge 2.2 'de 15 gün boyunca böğürtlen antosiyaninlerince zengin diyet uygulanan farelerin dokularının antosiyanin içerikleri sunulmuştur.

Çizelge 2.2. 15 gün boyunca böğürtlen antosiyaninlerince zengin diyet uygulanan farelerin dokularının antosiyanin içerikleri (Talavera et al., 2005)

Doku	Siyanidin-3-glikozit kons.	Toplam antosiyanin kons.
	nmol C3G/ g doku	nmol C3G eşleniği/ g doku
mide	62.9	68.6
ince bağırsak (jejunum)	484	605
böbrek	2.16	3.27
karaciğer	0.05	0.38
beyin	0.21	0.25
	nmol C3G/ ml plazma	nmol C3G eşleniği/ ml plazma
plazma	0.15	0.36

Talavera et al. (2005) farelerde yaptıkları çalışmada antosiyaninlerin böbrek, karaciğer ve beyine ulaşan miktarların çok az oranlarda olduğunu ortaya

koymuştur (Çizelge 2.2). Antosiyaninlerin midede ve yaklaşık % 80' lık bir kısmının da ince bağırsakta emildiği sonucuna varılmıştır.

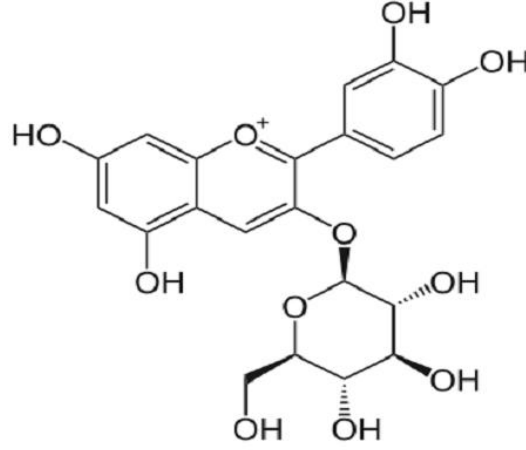
Üriner boşaltım ölçümleri de biyoyararlanımın belirlenmesinde kullanılabilir. Örneğin frenküzümünden saflaştırılmış 3 farklı antosiyanin (delphinidin-3-O-b-rutinoside, cyanidin-3-O-b-rutinoside, cyanidin-3-O-b-glucoside) farelere ağızdan uygulandıktan sonra direk kana absorbe edilmiş (tmax @ 0.5-2 s) ve yine glikozile formda idrar ile atılmıştır. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde yapılan analizler sonucu kromatogramlarda başka bir pik veya olası metabolit tespit edilmemiştir (Matsumoto et al., 2001). Aynı çalışmada antosiyanin ve diğer metabolitlerine uygulamadan 20 dakika sonra safrada rastlanmıştır bu da antosiyaninlerin hızlı bir şekilde emildiği ve metabolize edildiği sonucunu destekler niteliktedir. Ancak bütün bunlarla birlikte düşük biyoyararlanım ve pH' a bağlı bozunmalar nedeniyle ağız yolu ile tüketim sonrası yeterli konsantrasyonda biyoaktif antosiyanin hedef bölgeye ulaşamamaktadır. Antosiyaninlerin belirgin bir biçimde farmakolojik etkilerini gösterebilmeleri için diyet içerisinde yeterince zengin olmaları gerekmektedir.

Hayvanlar ve insanlar üzerinde yapılan çoğu çalışma göstermiştir ki mideye gelen antosiyaninlerin emilimi yetersiz kalmakta ve çoğu tüketimden birkaç saat sonra gastrointestinal sistemde yok olmaktadır (Wang et al., 2013). Bu maddelerin enkapsülasyonu ile hedef bölgelerde biyoaktif antosiyaninlerin stabilitesinin daha uzun süre korunması ve tümör hücrelerinin büyümesinin inhibisyonu gibi yararlı etkilerinin daha fazla gösterilmesi sağlanabilir (Oidtmann et al., 2012).

2.2. Siyanidin-3-glikozit

Krizantemin, glikosiyanidin, asterin, siyanidol-3-glikozit, siyanidin-3-monoglikozit gibi farklı isimlerle de anılan siyanidin-3-glikozit, en çok bilinen ve en çok araştırılan antosiyanindir (Scordino et al., 2004). Moleküler yapısı şekil 2.2.' deki gibi olan siyanidin-3-glikozit' in, moleküler formülü $C_{21}H_{21}O_{11}$ şeklinde olup moleküler ağırlığı 449.4 g/mol ' dır (PubChem Compound, 2014).

Siyanidin-3. pozisyonuna glikoz molekülünün bağlanması ile siyanidin-3-glikozit antosiyanin oluşmaktadır. İnsan sağlığı için potansiyel yararları nedeniyle birçok çalışma C3G' in biyolojik aktivite ve etkileri üzerinde yoğunlaşmıştır (Wang et al., 2008; Munoz-Espada and Watkins, 2006).



Şekil 2.2. Siyanidin-3-glikozit' in molekül yapısı

2.2.1. Siyanidin-3-glikozit' in biyolojik aktiviteleri

Siyanidin-3-glikozit' in çok çeşitli biyolojik aktiviteleri yapılan bilimsel çalışmalar ile kanıtlanmıştır. Bunlardan bazıları Çizelge 2.3' de kısaca belirtilmiştir.

Çizelge 2.3. Siyanidin-3-glikozit' in çeşitli biyolojik aktiviteleri

Biyolojik aktivite	Kaynak
İnsan adenokarsinoma (MDA-MB-231) hücrelerini akrilamid kaynaklı oksidatif strese karşı koruma	Song et al, 2013
İnsan gastrik kanser hücre hattında (SGC7901) anti-tümör aktivite	Sun et al, 2012
İnsan fibroblastlarında mikotoksin (Ochratoxin A) kaynaklı DNA hasarına karşı koruyucu etki	Russo et al, 2005
Meme kanseri hücrelerinin (MCF7) alkol sebepli yayılım ve çoğalımının inhibisyonu	Xu et al, 2010
İnsan bağırsak hücrelerinde (HT-29) sitokin tetikli enflamasyon	Serra et

cevabının baskılanması	al., 2013
İnsan akciğer kanser hücre hattında (A549) göçün (migrasyon) ve yayılımının inhibisyonu	Chen et al., 2006
İskemik/reperfüzyon beyin hasarı olan farelerde postiskemik hasarın engellenmesi	Giacomo et al, 2012
Gastrik epitelyum hücrelerinde (KATO III) <i>Helicobacter pylori</i> kaynaklı hücre ölümlerinin azaltılması	Kim et al., 2014
Oksijen-glikoz eksikliğine karşı nöroprotektif etki (sinir hücrelerini koruyucu etki)	Bhuiyan et al., 2011
Farelerde obezitenin engelleme ve hiperglisemiyi iyileştirici etki	Tsuda et al, 2003
İnsan akciğer karsinoma hücrelerinde (A549), deri tümörlerinde kemopreventif ve kemoterapötik etki	Ding et al, 2006
İnsan yumurtalık kanser hücre hattında (HO-8910PM) anti-tümör aktivite	Zeng et al, 2012

Çizelge 2.3' de görüldüğü üzere yapılan çalışmalar daha çok antikanser etki üzerine yoğunlaşmıştır. Bununla birlikte siyanidin-3-glikozitin sadece antikanser etki değil birçok farklı biyolojik etkileri de çalışılmaktadır. Bunlardan biri, hücrelerin neoplastik hücre transformasyonu ve moleküler mekanizmasına karşı koruyucu etkisi üzerinedir. Song et al. (2012) siyanidin-3-glikozit ve siyanidinin antikarsinojenik (normal hücrelerin kanser hücrelerine dönüşmesi) etkisini araştırmıştır. Araştırma sonucunda özellikle siyanidinin fosfatidil 3-kinaz (PI3K) aktivitesini baskılayarak hücresel dönüşümü ve tümör gelişimini inhibe ettiği sonucuna ulaşmıştır (Song et al., 2012).

Bir diğer farklı çalışmada kiraz meyvesinden ekstrakte edilen siyanidin-3-glikozit'in fokal serebral iskekiye sahip farelerde nöroprotektif etkileri incelenmiştir (Min et al., 2011). Serebral iskekiye beyne giden damarlardaki kan akışının birden azalması veya kesilmesi olayına verilen addır ve serebral iskekiye sırasında beyne yeterli oksijen ve glikoz gitmediği için halk arasında felç olarak adlandırılan hastalık ile sonuçlanabilmektedir. Bu çalışmada öncelikle kobay farelerin beyinlerinde sürekli orta serebral arter tıkanıklığı oluşturulmuş ve

ardından ağız yoluyla siyanidin-3-glikozit (2mg/kg C3G) verilmiştir. 24 saatin sonunda ölü dokunun miktarının ve süperoksit düzeylerinin belirlenebilmesi için beyin kesip çıkarılmıştır. Dışarıdan müdahale ile tedavi edilen ve sadece siyanidin-3-glikozit verilen farelerin beyin dokuları incelendiğinde siyanidin-3-glikozit ile tedavi edilenlerde ölü dokunun %27 daha az olduğu ve süperoksit seviyesinin daha düşük olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak veriler, siyanidin-3-glikozit'in farelerde fokal serebral iskemiye karşı beyni koruduğunu ve bu etkinin iskemi sonrası süperoksit seviyesinin azaltılması aracılığı ile olabileceğini gösterilmiştir (Min et al., 2011).

Son zamanlarda siyanidin-3-glikozit ile yapılan farklı bir uygulama da Lee ve ark. (2014) tarafından gerçekleştirilmiştir. Dut meyvesinden elde edilen siyanidin-3-glikozit sıçanlarda N-metil-N-nitrosurea kaynaklı retina bozulmasını azaltmak için kullanılmıştır. Deneysel retina bozunumu için N-metil-N-nitrosurea (MNU) (50 mg/kg) intraperitoneal enjeksiyon ile farelere uygulanmış ve ardından duttan elde edilen C3G (50 mg/kg) ağız yoluyla uygulanmıştır. C3G 'nin retinal dejenerasyona olan etkisi hematoksilin boyama, eozin boyama ve elektroretinografi ile histolojik ve fonksiyonel olarak incelenmiştir. Sadece MNU enjeksiyonu yapılan farelerde, dış nükleer tabakada belirgin fotoreseptör azalışları gözlenirken C3G uygulananlarda bu tabakanın oldukça iyi bir şekilde korunduğu belirlenmiştir. İmmünohistokimyasal testler sonucunda da C3G verilen farelerin retinalarındaki hasarın en aza indirildiği tespit edilmiştir (Lee et al., 2014).

2.3. Enkapsülasyon Teknolojisi ve Yöntemleri

Enkapsülasyon katı, sıvı ve ya gaz halindeki maddelerin kaplanarak kapsüller içinde tutulması ile belirli koşullarda ve belirli hızlarda bunların salınmasını sağlayan teknolojidir. Kaplanan madde “aktif” veya “öz”, kaplamada kullanılan malzeme ise “kabuk”, “taşıyıcı” veya “enkapsülant” olarak adlandırılmaktadır (Wang et al., 2009; Nedovic et al., 2011).

Enkapsülasyon ile depolama veya işleme sırasında meydana gelen aktivite kayıpları, kötü aroma, koku oluşumu, yapı bozulması, enzim aktivitesi kaybı azaltılabilir veya engellenebilirken, nem kontrolü, oksidasyona karşı koruma,

çoklu aktif içeriklerin kontrollü salımı gerçekleştirilebilir ve biyoyararlanım arttırılabilmektedir. (Carvajal et al., 2010; Nedovic et al., 2011).

Enkapsülasyon teknolojisinin gıda, kimya, ziraat, yem, tıp, eczacılık, veterinerlik, biyoteknoloji gibi birçok uygulama alanı bulunmaktadır (Narang et al., 2007; Nedovic et al., 2011, Çoruhli, 2013). King (1995) ' e göre genel olarak bir sınıflandırma yapıldığında enkapsülasyon çeşitleri:

- Nanoenkapsülasyon (10-1000 nm)
- Mikroenkapsülasyon (0.1-5,000 μm)
- Makroenkapsülasyon (5,000 μm 'den büyük)' dur.

Mikroenkapsülasyon ve makroenkapsülasyon genel olarak gıdaların farklı karbonhidrat ve yağlar ile kaplanmasında, raf ömrünü arttırmak, besin değerini yükseltmek, sindirilebilirliği sağlamak, olgunlaşma süresini kısaltmak gibi birçok amaçlarla uygulanmaktadır. Tıp, eczacılık ve biyoteknoloji alanlarında ise kontrollü salım sistemleri, organ-doku hedefli ilaç tasarımı ve benzeri çalışmalarda nanoenkapsülasyon teknolojisi kullanılmaktadır (Gökmen ve ark., 2012; Danhier et al., 2012).

2.3.1. Enkapsüle edilen etken maddeler

Enkapsülasyon teknolojisinde belirlenen amaç doğrultusunda pek çok aktif madde enkapsüle edilerek korunabilmektedir. Enkapsülasyon uygulamalarında en çok kullanılan aktif bileşenler; vitaminler, mineraller, enzimler, proteinler, organik asitler, probiyotikler, prebiyotikler, esansiyel yağlar, tatlandırıcılar, koruyucular, renklendiriciler, aromalar, yağ asitleri (ω -3, konjuge linoleik asit), karotenoidler (β -karoten, likopen), antioksidanlar (tokoferol, flavonoidler, polifenoller) ve ilaç etken maddeleridir (Nedovic et al., 2011, Narang et al., 2007, Danhier et al., 2012).

2.3.2. Enkapsülasyon formülasyonlarında kullanılan polimerler

Enkapsülasyon formülasyonlarında yararlanılan polimerler, biyobozunur veya biyobozunmaz özelliklerine göre sınıflandırılmaktadırlar (Çizelge 2.4).

Biyobozunur polimerler, enzimatik veya farklı bozunma yolları ile vücutta hedeflenen etki bölgesinde etkin madde salımını istenen sürede gerçekleştirdikten sonra parçalanarak biyouyumlu ve toksik olmayan metabolitlere dönüşürler. Bu bozunma sonrası açığa çıkan metabolitler, normal fizyolojik yollarla kolayca vücuttan atılırlar. Biyobozunur polimerlerin daha çok tercih edilmesinin diğer nedenleri ise; yüzey modifikasyonlarının kolay olması, termoplastik özellikte olmaları, kontrollü bozunma hızı ve hidrofilik özelliğe sahip olmalarıdır. Bu sebeple kontrollü salım sistemlerinde ve hedeflendirilmiş etken madde taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında biyobozunur polimerler kullanılmaktadır (Erdoğan, 2008).

Çizelge 2.4. Biyobozunur polimerler

Sentetik Biyobozunur Polimerler	<ul style="list-style-type: none"> • Poliortoesterler • Polianhidridler • Poliamidler • Polialkilsiyanoakrilatlar • Poliesterler: <ul style="list-style-type: none"> Laktid/glikolidler Polikaprolaktonlar • Polifosfosfazenler • Psödopoliaminoasitler
Doğal Biyobozunur Polimerler	<ul style="list-style-type: none"> • Proteinler: <ol style="list-style-type: none"> a. Albumin, b. Globulin, c. Jelatin, d. Kollajen, e. Kazein • Polisakkaritler: <ol style="list-style-type: none"> a. Nişasta b. Selüloz c. Kitosan d. Dekstran e. Aljinik asit

Biyobozunmaz polimerler, etken maddenin salımı gerçekleştikten sonra uygulama bölgesinden uzaklaştırılmalarının zor oluşu, toksik olmaları ve sabit salım hızının elde edilemeyişi gibi sorunlardan dolayı daha az tercih edilmektedirler (Jalil and Nixon, 1990; Danhier et al., 2012).

2.4. Nanopartiküller

Nanopartiküller, boyutları 10-1000 nm (1 μ m) aralığında değişen, doğal ya da sentetik yapıdaki polimerlerle hazırlanan partiküler sistemlerdir. Nanopartiküller, ilaç etken maddeleri, vitaminleri, yağları, proteinleri ve enzimleri içeren çok çeşitli formülasyonların hazırlanmasında kullanılabilir. Nanopartikül çeşidine göre ilacı ya da biyolojik olarak etkin olan bir maddeyi; içinde çözünmüş şekilde, polimerik matriks içinde hapsederek, aktif kısmı adsorbe ettirerek ya da yüzeye konjugasyon yoluyla taşıyabilmektedirler (Yücel, 2010; Mohanraj and Chen, 2006).

Nanopartiküller, biyobozunur, biyoyumlu, nontoksik gibi avantajlı biyolojik özelliklere sahiptirler. Hem hidrofilik hem de hidrofobik maddelerin enkapsülasyonuna olanak sağlarlar. Nanopartiküller küçük boyutları sayesinde retikuloendotel sistem (RES) hücreleri tarafından tanınmadıkları için kanda kalış süreleri uzun olmakta ve ince kapillere kadar derin dokulara nüfuz edebilmektedirler. Nanopartiküller vücutta çeşitli hücreler tarafından alınabilir ve bağ dokuya kadar penetre olabilirler. Böylece, vücutta birçok organa (örneğin; karaciğer, dalak, akciğer, lenf, beyin vb.) hedeflemeye olanak sağlarlar. Ayrıca partikül yüzeyinin modifikasyonu ile biyospesifik liganglara konjuge olarak hedef doku veya organa yönlendirme yapılabilir (Kaur et al., 2008; Shivashankara et al., 2012; Mohanraj and Chen, 2006).

2.5. Nanopartikül Üretiminde Kullanılan Teknikler

2.5.1. Emülsiyon oluşturma

Emülsiyonlar, en basit anlamda birbiri ile karışmayan en az iki sıvının, birbiri içerisinde damlacıklar halinde dağıldığı heterojen sistemlerdir. Farmasötik

ve kozmetik alanda, birbiri ile geçimsiz iki maddeyi tek bir formülasyonda bulundurmak ve çevresel etkenlerden maddeleri korumak fikri ile ortaya çıkan emülsiyonlar, günümüzde, diğer taşıyıcı sistemlere olan üstünlüğünü korumaktadır. Emülsiyon sistemlerde en az iki faz bulunur, bunlar; yağ fazı ve su fazıdır. Emülsiyon oluşturma ile enkapsülasyon teknikleri, emülsiyon sayısına göre, emülsiyonların içeriğine ve sıralamasına göre farklı isimlendirilmektedir (Narang et al., 2007). Emülsiyon oluşturma yöntemi ile partikül üretimini etkileyen faktörler aşağıda sunulmuştur (Jain, 2000; Şimşek, 2010):

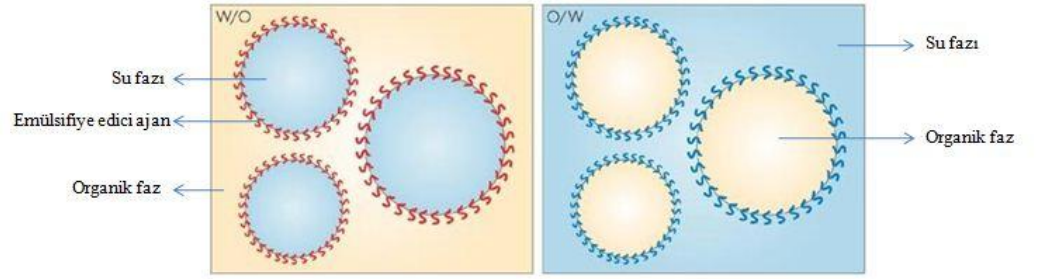
- Enkapsüle edilecek etkin maddenin fizikokimyasal yapısı ve çözünürlük özellikleri,
- Polimer derişimi, bileşimi ve moleküler ağırlığı,
- Etkin madde/polimer oranı,
- Kullanılan organik çözücü, emülsifiye edici ajanın yapısı ve derişimi,
- Sıcaklık,
- Karıştırma hızı ve süresi,
- Fazların hacimsel oranları

2.5.1.1. Tek emülsiyon yöntemi

Tek emülsiyon yönteminde polimer, su ile karışmayan ve uçucu olan organik bir çözücü içerisinde çözdürülmektedir. Ardından etken madde bu çözeltiliye eklenerek bir karışım oluşturulmaktadır. İçerisinde uygun miktarda emülsifiye edici ajan bulunan su fazı ile etkin madde-polimer-çözücü karışımı (organik-yağ fazı) sabit karıştırma hızı ve uygun sıcaklık koşullarında karıştırılmaktadır. Su fazı, organik faz içerisine eklendiğinde yağ içinde su (Y/S), organik faz su fazı içerisine eklendiğinde ise su içinde yağ (S/Y) tipi emülsiyonlar oluşmaktadır (Şekil 2.3) (Guy, 2007; Erdoğan, 2008; Narang et al., 2007).

Partikülleri elde etmek üzere çözücü, buharlaştırma (evaporasyon) ya da ekstraksiyon yöntemlerinden biri ile uzaklaştırılmaktadır. Oluşan nanopartiküller santrifüjle veya filtrasyonla elde edilebilmektedir

Bu yöntem suda çözünmeyen etken maddelerin kapsülasyonunda başarı ile kullanılmaktadır. Fakat sulu çözeltilerde partiküller çabuk çözüldükleri ve salım hızlı bir şekilde gerçekleştiği için hidrofilik maddelerin enkapsülasyonunda bu yöntem etkili bulunmamıştır. Bu nedenle hidrofilik ilaçların etkili kapsülasyonu için çift emülsiyon yöntemi daha çok tercih edilmektedir (Tiwari and Verma, 2011).



Şekil 2.3. Tek emülsiyon yöntemi ile hazırlanan partiküllerin yapısı (Guy, 2007)

2.5.1.2. Çift emülsiyon yöntemi

Çoklu emülsiyon grubuna ait olan çift emülsiyonlar ayrıca emülsiyonların emülsiyonları olarak da adlandırılmaktadırlar. Çift emülsiyonlar su-yağ (organik faz) -su (S/Y/S) veya yağ -su-yağ (Y/S/Y) olarak 3 faz içeren çift emülsiyonlardır. İki sistemde de emülsiyon içerisinde dağılmış damlacıklar, farklı fazın küçük damlacıklarını içermektedir (Aserin, 2008; Mine et al., 1996). Çoklu emülsiyonların yapısal özellikleri, bileşenin iç fazdan dış faza kontrollü salımına olanak vermektedir. Bu da tıp, farmasötik, kozmetik ve ayırma süreçleri alanında potansiyel kullanımını yaygınlaştırmaktadır. (Matos et al., 2013).

Bu yöntem; protein, peptid ve aşılarda gibi hidrofilik özellikteki etkin maddelerin enkapsülasyonu için kullanılmaktadır. Ayırma teknolojileri, hassas moleküllerin enkapsülasyonu, kozmetik, farmasötik ve fonksiyonel gıda

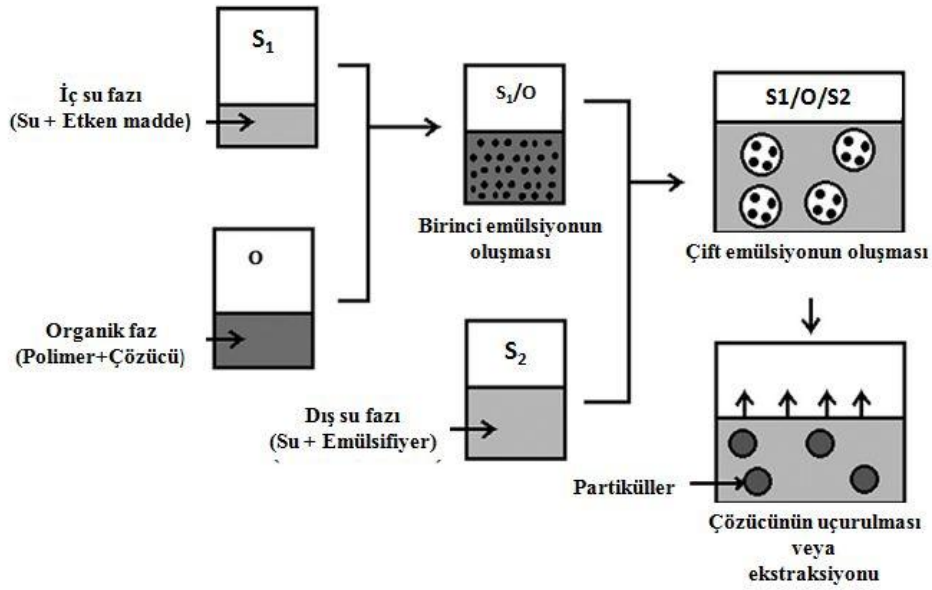
ürünlerinin üretimi gibi farklı uygulamalar için S/Y/S emülsiyonlara olan ilgi oldukça fazladır. Basit anlamda tek emülsiyonlarında (S/Y) yağ damlacıklarının agregasyonu, birleşmesi ve kremleşmesi gözlenebilmektedir. Ancak çift emülsiyonlar daha karmaşık sistemlerdir bu sebeple partiküller daha kararlı ve daha stabil olmaktadır. (Aserin, 2008). Partiküller proses sırasında; karıştırma kaynaklı kayma gerilimi, emülsifiye edici ajanın niteliği, karıştırma hızı, emülsiyonların birbiri içerisine aktarılma hızı, kullanılan fazların nitelikleri ve oranları gibi birçok parametreden etkilenmektedirler. Bunun yanında iç su fazının yüksek verim ile enkapsülasyonunu gerçekleştirebilmek için bahsedilen işlemler oldukça hassas bir şekilde gerçekleştirilmelidir (Schuch et al., 2013; Tiwari and Verma, 2011).

Nanopartikül elde edebilmek için çift emülsiyonların kullanımında emülsifiye edici ajanın seçimi, üretim faktörleri ve çevresel faktörler partikülün yapısını, enkapsülasyon verimini, stabilitesini belirlemekte ve optimize edilecek parametreler olarak gösterilmektedir (Frank et al., 2011).

2.5.1.3. Çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi

Çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yönteminde, etkin maddenin su içerisindeki çözeltisi (iç su fazı, S1), organik çözücü içindeki polimer çözeltisi içerisine karıştırma yardımıyla emülsifiye edilir. Daha sonra elde edilen birincil emülsiyon, çift emülsiyonu oluşturmak üzere uygun emülsifiye edici ajan içeren daha yüksek hacimdeki ikinci su fazı (dış su fazı, S2) içerisinde yine karıştırma yardımıyla dağıtılmaktadır (Şekil 2.4). Sonuç olarak uçucu organik çözücünün uzaklaştırılması ile katı partiküller elde edilmektedir (Matos et al., 2013; Schuch et al., 2013).

Çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile partikül hazırlanmasında seçilen uçucu organik çözücü, kalıntı çözücünün uzaklaştırılmasını kolaylaştırmak için düşük kaynama noktasına sahip olmalıdır. Bu sebeple asetonitril, etilasetat, kloroform, benzen, diklorometan ve ya metilen klorür gibi kolay buharlaşan çözücüler partikül hazırlamada kullanılmaktadır. (Giri et al., 2012; Matos et al., 2013).



Şekil 2.4. Çift emülsiyon yönteminin basamakları

Biyoyararlanımı düşük olan etkin maddelerini enkapsülasyonunda çift emülsiyon yönteminden oldukça fazla yararlanılmaktadır (Kalaria et al., 2009). Biyoyararlanımın artırılması amacı ile yapılan bir çalışmada, antikanser ilacı olan doksorubisin çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile PLGA (*poly(laktik-ko-glikolik asit)*) kaplanmış ve partiküllerin *in vivo* sitotoksitesite denemeleri yapılmıştır. Doksorubisin yüklü nanopartiküllerin biyoyararlanımlarının artması ve toksitesinin azalması ile *in vivo* performansının arttığı Kalaria et al. (2009) tarafından belirlenmiştir.

Bunun yanı sıra Ahmed et al (2012) tarafından yapılan çalışmada çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile teşhis ve tedavi amaçlı kullanım için manyetik nanopartiküller hazırlanmıştır. Partiküllerin üretiminde karıştırma hızı, emülsifiye edici ajan konsantrasyonu, polimer miktarı, demir oksit miktarı parametre olarak belirlenmiş ve optimizasyonu gerçekleştirilmiştir.

2.5.1.4. Çift emülsiyon çözücü ekstraksiyon yöntemi

Emülsiyonları oluşturma basamakları çözücü buharlaştırma tekniği ile aynı şekilde gerçekleştirilmektedir. Çözücünün ekstraksiyon metodu ile

uzaklaştırılmasında, çözücü henüz buharlaşmadan başka bir sulu faza difüzenmesi sağlanmaktadır. Burada çözücünün uzaklaştırılmasının hızı, çözücü/ekstraksiyon ortamı oranına, bunların sıcaklığına ve çözünürlük özelliklerine göre değişmektedir. Partikül karakteristikleri, çözücünün uzaklaştırılma hızına bağlı olarak değişmektedir. Çözücünün çok hızlı uzaklaştırılması bölgesel patlamalara ve poröz yapılı nanopartiküllerin oluşumuna neden olabilmektedir (Jain, 2000; Tiwari and Verma, 2011).

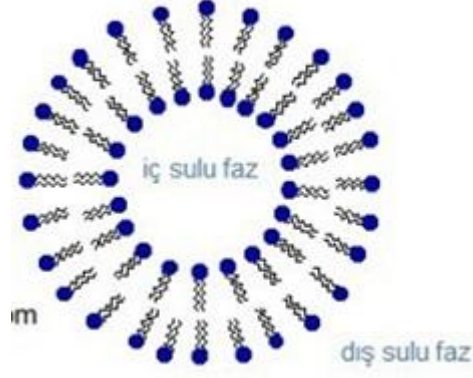
2.5.1. Lipid-Esash nanopartiküller

2.5.1.1. Lipozomlar

Lipozomlar ilk jenerasyon nanopartiküller ilaç taşıyıcı sistemlerdir. Yapı ve içerik bakımından hücre zarı ile benzerlik gösteren, amfifilik lipidlerin bir veya daha fazla tabaka oluşturmasıyla oluşan, fosfolipit yapıda partiküllerdir. Lipozomal yapı ilk defa 1965 yılında Bangham ve arkadaşları tarafından hücre membranına model oluşturmak üzere hazırlanmıştır (Micol ve et al., 2010; Masserini, 2013, Gezgin, 2013).

Lipozomlar genellikle biyolojik membranlarda mevcut olan biyoyumlu ve biyozunur lipidlerden oluşmaktadır. Yaygın olarak kullanılan lipozom bileşenleri ise; sfingomiyelin, fosfatidilkolin ve gliserofosfolipitlerdir. Kolesterol, hücre zarının önemli bir bileşenidir, lipozomların in vivo stabilitesini arttırdığı ve çift katmanlar arası geçirgenliği azalttığı için çoğunlukla lipozom formülasyonlarında tercih edilmektedir (Akman vd., 2011). Lipozomdaki yapılar, non-kovalent bağlarla bir arada tutulurlar ve yapıları içerdiği lipidin kompozisyonu, boyutu, yüzey yükü ve hazırlanış metoduna göre değişmektedir (Masserini, 2013).

Şekil 2.5' de görüldüğü üzere lipozomlar, biyolojik hücrelere benzer şekilde iç kısımlarında suda eriyen aktif maddeleri, membranlarında da lipofilik ve amfifilik maddeleri içermektedirler (Yücel, 2010).



Şekil 2.5. Lipozomun yapısı (Bulut, 2012)

Lipozomlar katman sayılarına ve boyutlarına göre aşağıdaki gibi sınıflandırılmaktadırlar (Akman vd., 2011).

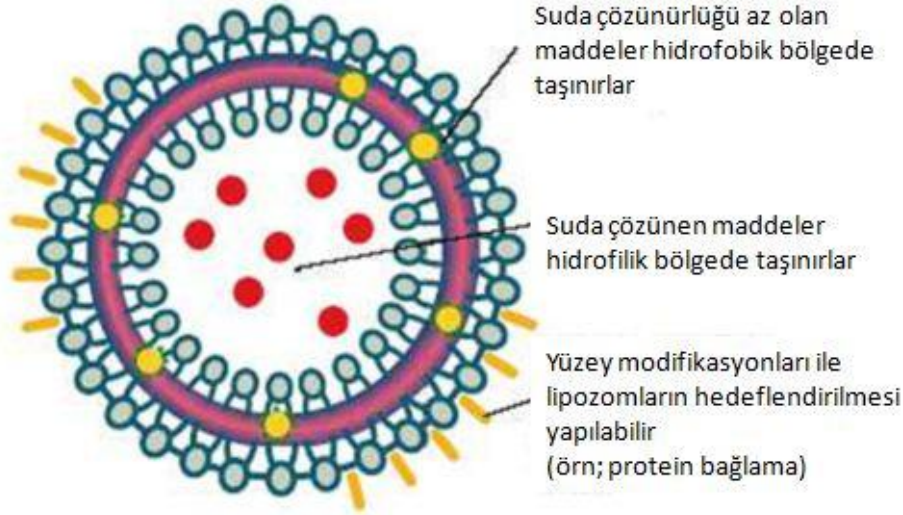
- Küçük tek tabakalı lipozomlar (SUV) 25-50 nm
- Çok tabakalı lipozomlar (MLV) 50-100 nm
- Büyük tek tabakalı lipozomlar > 100nm

2.5.1.2. Niozomlar

Niozomlar, kontrollü salım sistemlerinde kullanılan, non-iyonik yüzey aktif madde bazlı partiküllerdir. Lipozomların sterilizasyon, büyük-ölçekli üretim ve stabilite kaynaklı sorunlarını aşmak amacıyla alternatif olarak niozomlar ortaya çıkmıştır. İlk niozom formülasyonu 1975 yılında L'Oreal tarafından noniyonik yüzey aktif maddelerin farmasötik amaçla kullanım potansiyellerinin araştırılması ile ortaya çıkmış, geliştirilmiş ve patenti alınmıştır (Şahin, 2007). Kozmetik amaçlı yapılan bu çalışmalardan hemen sonra niozomların yine farmasötik alanda taşıyıcı sistemler olarak kullanımını gündeme gelmiştir. Bu amaçla ilk defa niozomlara yüklenen etkin madde Azmin ve ark'nın (1985) yapmış olduğu çalışma ile kanser ilaçlarında kullanılan metotreksat olmuştur (Mahale et al., 2012).

Teorik olarak niozom oluşturmak için non-iyonik bir yüzey aktif madde ve çözücü olarak bir su fazı gerekmektedir. Niozomların hazırlanmasında esas bileşen olarak sulu ortamda non-iyonik yüzey aktif madde ve stabilizasyon için

genellikle kolesterol ve ya türevleri kullanılmaktadır (Moghassemi and Hadjizadeh, 2014). Niozom partikülünün yapısı Şekil 2.6' da sunulmuştur.



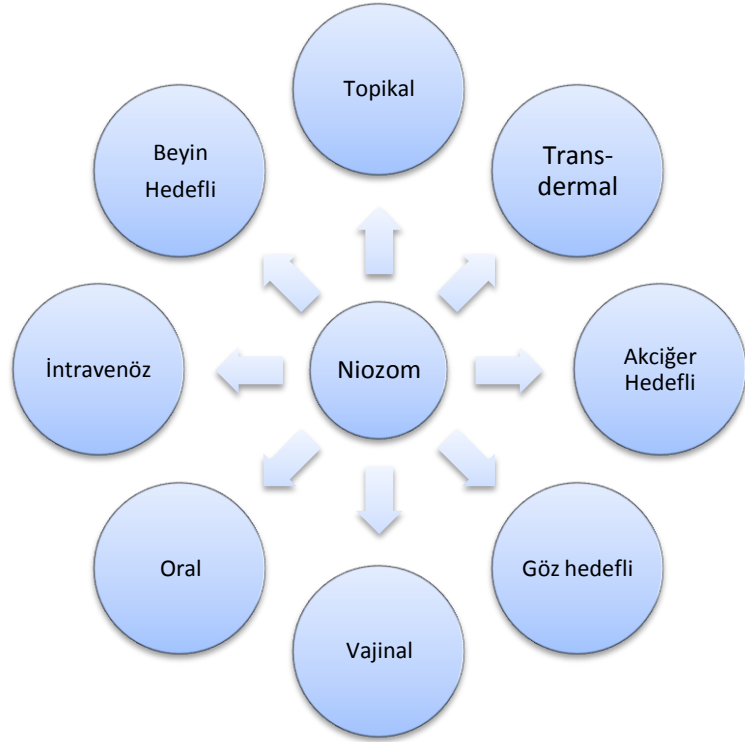
Şekil 2.6. Niozomun yapısı.

Mavi halkalar polar baş grupları ve çizgiler surfaktant molekülünün apolar kuyruğunu temsil etmektedir (Şahin, 2007). Niozomlarda kapalı çift tabakaların oluşma işlemi nadiren kendiliğinden gelişiyor olmasına rağmen genellikle sisteme fiziksel uygulama veya sıcaklık uygulaması gerekmektedir. Sonuç olarak, oluşan yapıda molekülün hidrofobik kısımları sulu çözücüden korunur ve hidrofilik uçlar ise sulu ortamla temas halindedir (Mahale et al., 2012).

Bu yapıları sayesinde hem hidrofilik hemde lipofilik maddelerin enkapsülasyonunu gerçekleştirebilmektedir. Hidrofilik maddeler sulu iç kısımda veya iki tabakalı sistemlerde yüzeye adsorbe edilerek tutulurken, lipofilik maddeler iki tabakanın arasında vezikülün lipofilik bölgesinde enkapsüle edilmektedir (Ashutosh et al., 2012).

Son yıllarda niozomların farklı bölgelere hedefleme ve salım sistemlerinde kullanımı üzerine çalışmalar yoğunlaşmıştır (Ashutosh et al., 2012). Niozomların diğer sistemlerde ortaya çıkan dezavantajlara sahip olmaması, farklı

uygulamalarda kullanılabilir bir ilaç taşıyıcı sistemi olmasından kaynaklanmaktadır. Niozomlar çeşitli tipte ilaç etkin maddelerini, proteinleri, genleri ve aşıları tutuklama kabiliyetine sahiptir (Moghassemi and Hadjizadeh, 2014). Şekil 2.7' de literatürde bulunan çalışmalarda niozomların kontrollü salım için kullanıldığı alanlara yer verilmiştir.



Şekil 2.7. Literatürde bulunan çalışmalarda niozomların kontrollü salım için kullanıldığı yollar (Dahiya et al., 2011)

Niozomların avantajları;

- Lipozom formülasyonlarında kullanılan fosfolipid moleküllerine kıyasla niozom oluşturmada kullanılan yüzey aktif maddeler daha stabildir. Böylece lipozomlara kıyasla daha uzun süre stabil olarak depolanabilirler.
- Basit yöntemler ile büyük ölçekte üretimi kolayca gerçekleştirilebilir.
- Non-iyonik olmaları sayesinde biyolojik sistemlerle yüksek uyumlulukları vardır ve düşük toksisiteye sahiptirler. Ayrıca biyobozunur ve non-immünojeniktirler.

- İçerdikleri etkin maddelerin stabilitesini artırırklar. Taşıdııkları ilaç moleküllerinin hücre membranından absorpsiyonunu arttırabilirler
- Hidrofilik ve hidrofobik üniteler içerdğinden farklı çözünlüklerdeki etkin maddelerle yüklenebilirler ve çözünlüğü düşük etkin maddelerin çözünlüklerini arttırabilirler.
- Yüzey oluşumu ve modifikasyonu, fonksiyonel hidrofilik yapı sayesinde oldukça kolaydır, istenilen amaca yönelik tasarlanabilirler.
- *İn vivo* ortamda etkin maddenin daha uzun süre kontrollü salımını sağlayabilirler
- Etkin maddelerin kan dolaşımından atılımını geciktirir, biyolojik ortamdan korur ve hedef hücreye bağlanarak etkinliğı artırırklar (Dahiya et al., 2011; Moghassemi and Hadjizadeh, 2014; Şahin, 2007; Ashutosh et al., 2012).

Niozomların karakterini belirleyen değışkenler kontrol edilebilmektedir. Örneğın niozomun boyutu, yükleme verimi ve stabilitesi; hazırlama metodu, surfaktant çeşidi, kolesterol içeriğı, yüzey yükü gibi parametreler ile kontrol edilebilmektedir.

2.5.1.2. Niozom hazırlama yöntemleri

Eter enjeksiyon yöntemi

Eter enjeksiyon yönteminde; yüzey aktif madde / kolesterol karışımı dietil eterde çözümler ve yaklaşık 60°C' deki etkin maddeyi içeren sulu faza iğne yardımı ile yavaşça enjekte edilir. Eter buharlaşırken tek tabakalı veziküller oluşur. Çözümler enjeksiyon tekniğı ile hapsedilen su fazının hacmine göre SUV (küçük tek tabakalı) ve LUV (büyük çok tabakalı) partiküller elde edilebilmektedir. Enjeksiyon ve karıştırma hızını değıştirerek farklı büyüklük ve homojenliğe sahip niozomlar elde edilebilir. Koşullara bağılı olarak veziküllerin çapı 50-1000nm arasında değışebilmektedir. Bu metotta eter yerine petrol eteri, etilmetil eter, diklorometan, kloroform kullanılabilir. Bu yöntem ile elde edilen partiküller yüksek yükleme etkinliğine sahiptirler. Yöntemin dezavantajı eterin genellikle tam olarak ortamdan uzaklaştırılamamasıdır. Bunun neticesinde proteinler gibi partikülün yapısına yüklenen maddelerde bozulmalar meydana

gelebilmektedir (Moghassemi and Hadjizadeh, 2014; Bayındır-Sezgin, 2010; Ashutosh et al., 2012).

İnce Film Hidratasyon Yöntemi (TFH)

İnce film hidrasyon yöntemi (TFH) basit bir niozom hazırlama yöntemidir ve yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemde, yüzey aktif madde ve kolesterol yuvarlak tabanlı bir balon içerisine alınır ve organik çözücü içinde çözülür. Ardından organik çözücünün evaporatörde uçurulması ile ince film oluşur. Kapsüle edilecek etkin maddeyi de içeren sulu faz (su veya PBS) kuru film üzerine eklenir ve yüzey aktif maddenin geçiş sıcaklığının (T_c) üzerinde hidrate edilir. Hidratasyon sırasında sıcaklık yardımıyla lipitler şişer ve yuvarlak balonun duvarından sıyrılır. Bu sırada sabit bir karıştırma gerekmektedir. Bu karıştırma evaporatör ve ya elle çalkalama ile (hand shaking method) gerçekleştirilebilmektedir. Hidratasyon sonunda çok tabakalı partiküller (MLV) elde edilir. Hazırlanan partiküllerin çapı büyük olup, etkin maddeleri yükleme kapasiteleri düşüktür (Moghassemi and Hadjizadeh, 2014; Dahiya et al., 2011).

Ters faz buharlaştırma yöntemi

Büyük çok tabakalı partiküller ters faz buharlaştırma yöntemi ile hazırlanmaktadır. Yöntemde ilk olarak yüzey aktif madde ve kolesterol organik çözücü içinde çözülür. Etkin maddeyi içeren su fazı, organik çözücü fazı içerisine eklenir ve sonikasyon ile karıştırma sağlanır. Ardından oluşan emülsiyondan organik faz $40-60^{\circ}\text{C}$ ' de sıcaklık aralığında, rotary evaporatörde buharlaştırılır. Uçurma işlemi hidratasyon tamamlanana kadar devam eder ve bu işlem sırasında çok tabaklı partiküller elde edilir (Moghassemi and Hadjizadeh, 2014; Ashutosh et al., 2012).

Sonikasyon

Bu yöntemde buffer içindeki etkin madde, yüzey aktif madde/kolesterol karışımına eklenir. Ve karışım 60°C ' de belli bir süre boyunca prob sonikatör ile

homojenize edilir. Elde edilen partiküller küçük ve tek tabakalıdır (SUV). Eter enjeksiyon yöntemine göre yükleme etkinliği daha düşüktür.

Mikroakışkanlaştırma Yöntemi

Mikro akışkan tekniği kullanılarak uniform, küçük boyutlu, çok katmanlı niozomlar daha iyi tekrarlanabilirlik ile elde edilir. Bu yöntemde iki akışkan yüksek hızlarda belirli mikro kanallardan geçerek birbiriyle temas ederler. İnce sıvı tabakalar ortak cephe boyunca ilerledikten sonra sisteme verilen enerji ile bu iki fazın çarpışması sonucu niozomlar oluşur (Moghassemi and Hadjizadeh, 2014).

Kabarcık Yöntemi

Kabarcık yöntemi organik çözücü kullanmadan lipozom ve niozom hazırlama yöntemidir. Bu yöntemde yüzey aktif madde, PBS ve diğer bileşenler 3 boyunlu yuvarlak tabanlı cam reaktör içerisine alınır. Reaktör sıcaklığı kontrol edilebilen su banyosuna oturtulur. Reaktörün ortasındaki boynuna suyla soğutulan akış kolonu yerleştirilir. Bir diğer boyuna ise termometre yerleştirilerek sıcaklık kontrolü sağlanır, 3. girişten ise azot gazı verilmektedir. Bu hazırlama tekniği ile lipozomlar/niozomlar tek basamakta ve sadece bir taşıyıcı kap kullanarak üretilebilmektedir. Oluşan partiküllerin boyutları yaklaşık olarak 0,2-0,5µm arasındadır (Moghassemi and Hadjizadeh, 2014; Bayındır-Sezgin, 2010).

Proniozomlardan Niozom Oluşturma Yöntemi

Bir başka niozom hazırlama yöntemi ise sorbitol gibi suda çözünebilen bir taşıyıcının non-iyonik yüzey aktif madde ile kaplanması ile gerçekleştirilir. Kaplama işlemi sonucunda kuru formülasyon içerisinde, suda çözünebilen partiküller ince yüzey aktif madde filmi ile kaplanır. Bu formülasyonlar 'proniozomlar' olarak adlandırılmaktadır. Proniozomlara ortalama faz geçiş sıcaklığının üzerinde sulu fazın ilave edilmesi ve karıştırılmasıyla niozomlar elde edilir (Dahiya et al., 2011).

2.5.1.3. Katı Lipid Nanopartiküller

Katı lipid nanopartiküller (SLN), oda ve vücut sıcaklığında katı olan lipidlerin taşıyıcı materyal olarak kullanıldığı ve çeşitli emülsifiye edici ajanlar ile stabilize edildiği, nanometre boyutundaki partiküler sistemlerdir. SLN'ler genel olarak katı lipidler, emülsifiyerler ve sudan oluşmaktadır. Bu teknikte kullanılan lipid grupları; trigliseridler, gliseridler, yağ asitleri, steroidler (kolesterol vb.) ve mumları içermektedir. Lipid dispersiyonunun stabilizasyonu için, yüklerine ve molekül ağırlıklarına bağlı olarak genellikle %1-5 oranında bütün emülsifiyer tipleri kullanılabilir. Katı lipid nanopartikül üretimi için kullanılan yöntemler ise şu şekildedir:

- Yüksek Basıncılı Homojenizasyon
- Sıcak Homojenizasyon
- Soğuk Homojenizasyon
- Mikroemülsiyon Yöntemi
- Çözücü Emülsifikasyon-Evaporasyon veya Çözücü Difüzyon Yöntemi
- Yüksek Hızda Karıştırma ve / veya Ultrasonikasyon Yöntemi

Katı lipid partiküller; emülsiyonların, lipozomların ve katı polimerik partiküllerin sağladığı avantajların kombinasyonunu içermektedirler. Düşük sitotoksisiteye sahip olmaları, organik çözücü kalıntısı içermemeleri, büyük ölçekte üretimlerinin mümkün olması gibi yağ emülsiyonlarının, dokulara etkin madde hedeflenebilmesi gibi lipozomların avantajlarını taşıırken; katı lipid yapıları sayesinde kontrollü etkin madde salımı ve kimyasal bozunmaya karşı etkin maddelerin korunması gibi katı polimerik nanopartiküllerin avantajlarına da sahiptirler (Numanoğlu ve Tarımcı, 2006; Shivashankara et al., 2012).

2.6. Kan Beyin Bariyeri

Kan beyin bariyeri (KBB) kavramı ilk defa 1902 yılında P. Ehrlich tarafından yapılan çalışmalar ile ortaya çıkmıştır. Ehrlich vücuda mavi bir boya (Evans blue) vermiş ve boyanın sistemik dağılımdan sonra yaptığı görüntülemelerde beyinin boyanmadığını gözlemlemiştir. Böylece beyin

dokusuna boya maddesinin geçişine izin vermeyen bir yapının olduğu belirlenmiştir (Kemper et al., 2004).

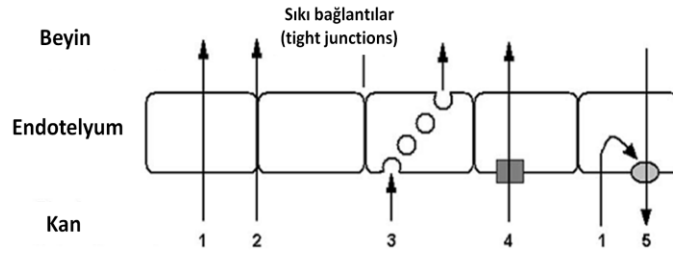
Kan beyin bariyeri, merkezi sinir sisteminin normal fonksiyonunun devamını sağlayan ve seçici geçirgen özelliğe sahip temel difüzyon bariyeridir. İnsan vücudunda kan ile organ arasında yer alan en sıkı bariyer olan kan-beyin bariyeri (KBB), sıkı bağlantılarla birbirine bağlanmış endotel hücreleri, bazal membran hücreleri, perisitler ve astrositler tarafından oluşturulmuştur. KBB' nin birçok önemli işlevi vardır. Bunlar;

- Beyni, kanda bulunan ve beyine zararlı olabilecek 'yabancı maddeler' den korur
- Beyni, vücutta arda kalan hormon ve nörotransmitterlerden korur
- Beyin için stabil bir ortam sağlar (Lammers, 2003)

Nörolojik hastalıkların tedavisinde en önemli zorluk etkin maddelerin beyine ulaşması, özellikle belirli bir bölgeye ulaşım kontrollü veya sabit bir hızda salınmasıdır. Kan beyin bariyeri bu sorunun ortaya çıkmasında ve çoğu maddenin geçişinin engellenmesinde en önemli faktördür (Çetin ve Çapan, 2004).

Kan beyin bariyeri özellikle plazma komponentlerinin, kırmızı kan hücrelerinin ve lökositlerin beyne girişini engelleyen bir yapıdır. Ayrıca KBB merkezi sinir sistemi bozuklukları için kullanılan ilaçlar için de büyük bir engel oluşturmaktadır. Rekombinant peptidler, proteinler, genetik vektörler gibi büyük moleküllü ilaçların hiçbiri ve küçük moleküllü ilaçların da yaklaşık % 98'i bariyeri geçememekte ve bu durum tedavi süreçlerinde başarısızlıklara neden olmaktadır. İstisnai olarak 400 daltondan küçük lipofilik maddeler, bu bariyerden lipid aracılı difüzyon ile geçebilmektedir (Şimşek, 2010).

KBB, beyin hücrelerine madde geçişi, fiziksel olarak endotelial hücreleri arasındaki sıkı bağlantı (tight junction) ile ve metabolik (enzim) bariyer sayesinde kontrol edilmektedir. Ayrıca madde geçişinde maddenin lipitte çözünürlüğü, difüzyon yeteneği, moleküler ağırlığı ve elektrik yükü önemlidir. Kan beyin bariyerindeki transport mekanizmaları Şekil 2.8' de gösterilmiştir.



Şekil 2.8. Kan-beyin bariyerindeki transport mekanizmaları. (1: Pasif difüzyon, 2: Sıkı bağlantılar üzerinden pasif difüzyon, 3: Endositoz, 4: Taşıyıcı aracılı transport, 5: Aktif eflüks transport (Kemper et al., 2004)

Sonuç olarak; KBB, beynin oldukça hassas olan beyin hücrelerinin bütünlüğünü korumaktadır. Dolayısıyla bu bariyer beynin fonksiyonlarını yerine getirebilmesi için oldukça önemlidir (Yücel, 2010).

2.6.1. Kan beyin bariyeri ve nanopartiküller

Günümüzde kan beyin bariyerini aşabilmek için etkin madde taşıyıcı olarak nanopartiküler sistemler sıkça kullanılmaktadır. Kullanılan nanopartiküllerin çapları ise yaklaşık olarak 100-300 nm aralığında değişmektedir. Etkin madde polimer içerisine hapsedilmekte veya yüzeye adsorbe edilmektedir. Ek olarak nanopartikül/etkin madde formülasyonu bir surfaktant ile kaplanmakta veya formülasyon içerisinde kullanılmaktadır (Alyautdin, 1999; Çetin ve Çapan, 2004).

Etkin madde yüklü nanopartiküllerin beyne ulaşarak kan beyin bariyerini geçtiği birçok çalışma ile kanıtlanmıştır. Fakat 40-80 nm partikül büyüklüğüne sahip lipozomlar KBB'yi geçemezken daha büyük nanopartiküller KBB'yi geçebilmektedir. Nanopartiküllerin farmakolojik etkisi bu yapıların formülasyonu ile ilgilidir. Bu yapıları stabilize etmek için polisorbitat 80 gibi yüzey aktif maddeler (surfaktantlar) kullanılmaktadır. Bilindiği gibi bu yüzey aktif maddeler, KBB'nin açılmasına neden olmaktadır (Masserini, 2013). Olivier et al. (1999), tarafından nanopartikül (etkin madde/polisorbitat 80) kompleksinin KBB'yi geçmesinden, formülasyondaki yüzey etkin maddenin sorumlu olduğu

gösterilmiştir. Genel anlamda nanopartiküllerin KBB'yi geçmesinde etkili olduğu düşünülen diğer mekanizmalar ise aşağıdaki şekilde özetlenebilir:

- Nanopartiküllerin kapiler duvarına adsorbe olması ve artan konsantrasyondan dolayı KBE'yi geçmesi
- Nanopartiküllerin sıkılaştırılmış kavşakların açılmasına neden olması
- Nanopartiküllerin endotel hücreler tarafından endositoz yolu ile alınması (Masserini, 2013)

2.7. Beyin Tümörleri

Beyin tümörleri terimi, merkezi sinir sistemi ve beyinde büyüyen oldukça geniş aralıktaki tümörleri kapsamaktadır. Genel olarak beyin tümörleri; glial tümörler ve medulloblastoma gibi beyinde oluşan birincil tümörler ve beyin dışında oluşup metastaz ile beyine taşınan ikincil tümörler olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Ayrıca beyin ve omuriliği kaplayan meninjiyal tabakada oluşan meninjiyomalar da beyin tümörü olarak sınıflandırılırlar. Birincil beyin tümörlerinden kötü huylu glial tümörler veya gliomalar tüm kanser ölümlerinin yarısından fazlasından sorumludur (Kemper et al., 2004).

Beyin tümörlerine cerrahi müdahalenin oldukça riskli olduğu, kemoterapinin kullanılmadığı ve ya yetersiz kaldığı durumlar oluşmaktadır. Bu nedenle beyin tümörlerine yönelik nanopartikül çalışmaları önem kazanmaktadır. Bu tez çalışması kapsamında yapılan partiküllerin teorik olarak kan beyin bariyerinden geçmesi hedeflenmiştir.

2.7.1. Nöroblastoma

Nöroblastomlar, sinir hücrelerinde oluşan kötü huylu solid tümörlerdir. Bunlar sempatik sinir sistemi tümörleridir. Genellikle erken yaşta görülen bu tümör; çocukluk döneminde ikinci en sık rastlanan malign tümör ve bebeklik döneminde en yaygın görülen solid tümördür (Aydın et al., 2013).

Nöroblastomlar, merkezi sinir sistemi (MSS tümörleri, beyin tümörleri) tümörlerinden sonra en sık rastlanan solid tümörlerdir. Mainz Alman Çocuk Kanserleri Veri Bankasının açıklamalarına göre Almanya’da her sene 14 yaş altındaki çocukların içinden yaklaşık 140 tanesi çocuk ve genç nöroblastomuna yakalanmaktadır. Dolayısıyla her sene 15 yaş altı 100.000 çocuktan yaklaşık birinde bu hastalık görülmektedir (Yiallourous, 2003; Aksoylar, 2010).

Bu tez çalışması kapsamında kullanılan Neuro 2A hücre hattı, beyinde oluşan nöroblastoma tümörlerinden (farelerden) izole edilmiş bir nöroblast hücre hattıdır. Çalışmada teorik olarak kan-beyin bariyerini geçmesi beklenen yaklaşık 100nm boyuttaki antosiyanin yüklü nanopartiküllerin beyin tümörlerine karşı sitotoksik aktivitesi incelenmiştir.

2.8. Cevap Yüzey Yöntemi (CYY)

Cevap yüzey yöntemi, CYY (*Response Surface Methodology, RSM*), “Denemelerin Optimum Koşullara Ulaşması” adı ile 1951 yılında Box ve Wilson tarafından tasarlanmış, geliştirilmiş ve ilk olarak kimya endüstrisine uygulanmıştır (Koç ve Kaymak-Ertekin, 2009).

Cevap yüzey yöntemi, birden fazla etken değerinin, cevap değişkeni üzerindeki etkisini ortaya koymak ve etken değerlerinin kombinasyonları arasında cevap değişkenini maksimum (ya da minimum) yapan değeri (değerleri) bulmak amacıyla kullanılmaktadır. Bir prosesi etkileyen parametrelere, bağımsız değişken ve bu bağımsız değişkenlere bağlı tanımlanan fonksiyona ise bağımlı değişken ya da cevap (yanıt) adı verilmektedir (Baş, 2010).

Bu yöntem cevap ve bağımsız değişkenler arasındaki ilişkinin tanımlanması için kullanılan bir dizi matematiksel ve istatistiksel teknikten oluşmaktadır. Bu teknikler işlemdeki bağımsız değişkenleri tek başına ya da kombinasyonlu olarak cevap üzerindeki etkilerini araştırmaktadır. Cevap yüzeyi yönteminde ilk adım cevap değişkeni üzerinde etkisi olduğu düşünülen etkenleri yani bağımsız değişkenleri belirlemektir (Baş and Boyacı, 2007). CYY’ nin uygulanması için araştırmacı süreç hakkında genel bir bilgiye sahip olmalı, süreci etkileyen

bağımsız değişkenler için bir işletme bölgesi ve bir deneme bölgesi belirlemelidir (Ürküt, 2007). Bu adımdan sonra, cevap yüzeyi yönteminde deney tasarımı, regresyon modelleme ve optimizasyon teknikleri iç içe kullanılır (Baş and Boyacı, 2007).

Bağımsız değişkenler ile yanıt arasındaki matematiksel ilişkiyi modellemek ve bu modeller için maksimizasyon ya da minimizasyon (kısaca optimizasyon) yapmak kompleks ve tekrar eden hesaplamaları içerdiğinden CYY, bilgisayar programları ile kolayca ve çok kısa bir sürede yapılabilmektedir.

2.8.1. Merkezi tümleşik tasarım (*Central composite design*)

Prosesler birçok faktör tarafından etkilenen karmaşık sistemlerdir. Cevap almak için tasarlanan deneysel tasarımlar ile sistemin fonksiyonlarla ifade edilmesi ve bağımsız değişkenler arasındaki ilişkinin hangi aralıklar arasında değişeceği belirlenir (Oba, 2012).

Merkezi tümleşik tasarım (*Central Composite Design, CCD*) en sık kullanılan tasarımı yöntemlerinden biri olup, ana noktalar dışında deneysel çalışma ve tekrar imkânı sağlamaktadır. Bu ikinci dereceden deneysel tasarımın amacı optimum koşulların belirlenmesi ve optimum koşulların sağlandığı bağımsız değişkenlerin etki alanının belirlenmesidir.

2.9. Taguchi Metodu

Klasik deney tasarımı çalışmalarının yüksek maliyetli olması, uzun zaman gerektirmesi ve uygulamada ki zorlukları nedeniyle, 1986 tarihinde Genichi Taguchi kendi adıyla anılan Taguchi Metodu yaklaşımını ortaya atmıştır. Taguchi yöntemi, parametre tasarımı, sistem tasarımı ve tolerans tasarımı üzerine kurulmuş bir deney tasarım ve optimizasyon yöntemidir. En yaygın olarak, kalite güvence sistemleri kapsamında toplanan verilerin, istatistiksel analizinde kullanılmaktadır (Salkım, 2012).

Taguchi Metodu ile deney öncesinde yapılan ayrıntılı analiz ve değerlendirmelerle gereken deney sayısını önemli şekilde düşmüş bu da zaman ve maliyet kaybının artmasını engellemiştir.

Taguchi'nin deney tasarım yöntemi, farklı parametrelerin, farklı seviyeleri arasından optimum kombinasyonu saptamak amaçlı kullanılan oldukça yararlı bir faktöriyal dizayn yöntemidir (Güral, 2003). Her bir parametrenin, her bir seviyesini içeren tüm kombinasyonlar için oldukça fazla deneysel çalışma yapılması gereken durumlarda, Taguchi yöntemi kullanılarak, çok daha az sayıda deneysel çalışma ile sonuca ulaşmak mümkün olmaktadır.

Bu yöntemde her bir bağımsız değişken iki düzeye sahiptir ve en az deney sayısı ile en fazla çıktının alınması amaçlanmaktadır. Başlangıcında çok fazla bilgi sahibi olunmayan prosesler için etkili olan faktörlerin belirlenmesinde ve diğer metotların yönlendirilmesinde kullanılabilir (Çelik, 2011).

3. MATERYAL VE METOT

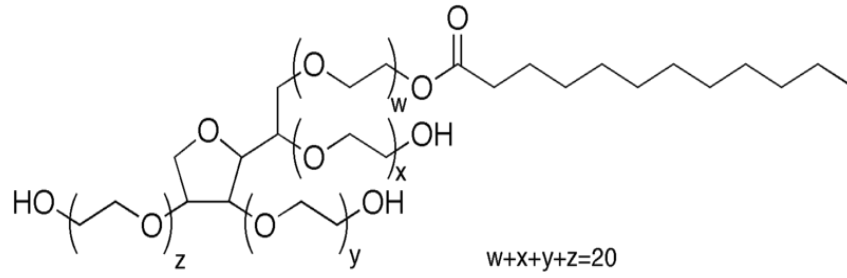
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Siyanidin-3-glikozit	Phytolab, Almanya
Polikaprolakton (PCL)	Sigma Chem. Co., ABD
Diklorometan (DCM)	Merck, Almanya
Tween 20	Merck, Almanya
Tween 80	Merck, Almanya
Polivinilalkol (PVA)	Sigma Chem. Co., ABD
Sodyum karboksimetilselüloz (NaCMC)	Sigma Chem. Co., ABD
Kolesterol	Panreac AppliChem., Almanya
Dietileter	Merck-Almanya
Disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4)	Merck-Almanya
Potasyum klorür (KCl)	Merck-Almanya
Sodyum klorür (NaCl)	Merck-Almanya
Sodyum asetat (CH_3COONa)	Merck-Almanya

3.1.1. Nanopartiküler sistemlerin hazırlanmasında kullanılan yüzey aktif maddeler

Tween 20

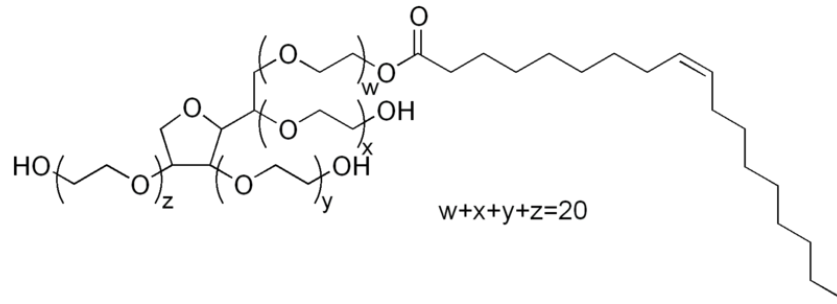
Tween 20, IUPAC adlandırmasıyla Polioksietilen sorbitan monolaurat, stabilitesi ve toksik olmaması sebebiyle çeşitli bilimsel ve farmakolojik çalışmalarda emülsifiyer olarak kullanılan non-iyonik bir yüzey aktif maddedir. Molekül ağırlığı yaklaşık 1227 g/mol' dür ve kimyasal yapısı Şekil 3.1' de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Tween 20' nin moleküler yapısı

Tween 80

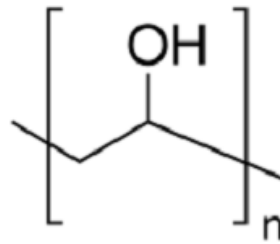
Tween 80, IUPAC adlandırmasıyla Polioksietilen sorbitan monooleat, stabilitesi ve toksik olmaması sebebiyle çeşitli bilimsel ve farmakolojik çalışmalarda emülsifiyer olarak kullanılan non-iyonik bir yüzey aktif maddedir. Molekül ağırlığı yaklaşık 1310 g/mol' dür ve kimyasal yapısı Şekil 3.2' de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Tween 80' nin moleküler yapısı

Poli(vinilalkol) (PVA)

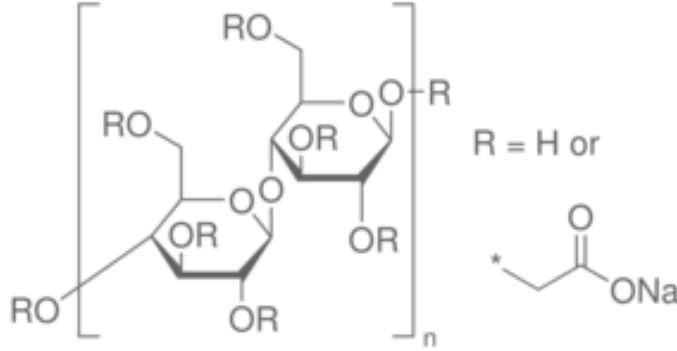
Suda çözünebilir sentetik bir polimer ve emülsifiye edici ajan olan PVA'nın molekül ağırlığı 13,000-23,000 arasındadır ve kimyasal yapısı Şekil 3.3 'de gösterilmiştir.



Şekil 3.3. PVA' nın moleküler yapısı

Sodyum Karboksimetilselüloz (NaCMC)

Sodyum Karboksimetil Selüloz (NaCMC); doğal selülozun, selüloz halkasındaki hidroksil gruplarının, karboksil gruplarıyla yer değiştirilip eterleştirilmesiyle üretilen, suda çözünebilir anyonik polimerin sodyum tuzu olarak tanımlanmaktadır. Molekül ağırlığı yaklaşık 262g/mol' dür ve kimyasal yapısı Şekil 3.4' de gösterilmiştir



Şekil 3.4. Karboksimetil selüloz' un moleküler yapısı

3.2. Kullanılan Ekipmanlar ve Malzemeler

Manyetik karıştırıcı	IKA C-Mag HS-7
Hassas terazi	Precisa XB 220 A
Homojenizatör	IKA T25 Ultra turrax
Homojenizatör	Yellowline, D125
Partikül büyüklüğü ölçüm cihazı	Zetasizer-NanoZS Malvern
pH metre	Mettler Toledo
Ultrasonik banyo	Everest CLEANEX-401
Çalkalayıcı	Sartorius, Certomat
Ultrasantrifüj	Sigma 3K30
Vorteks	Heidolph, REAX
Otomatik Mikropipetler	Eppendorf
Plastik enjektör	Ayset (Türkiye)
UPLC (Ultra yüksek basınçlı sıvı kromatografisi)	Thermo Scientific, USA

DSC (Diferansiyel Taramalı Kalorimetre) T.A. Instrument Q10, USA
SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) FEI Quanta 250 FEG, USA

3.3. Kara Havuç Antosiyaninlerinin Ekstraksiyonu

Deneysel çalışmalarda kullanılan kara havuç (*Daucus carota* L. ssp.) Bornova-İzmir semt pazarından alınmış ve bir takım ön işlemlere tabi tutulmuştur. Öncelikle yıkanan havuçlar küçük parçalara ayrılmış ve daha sonra oda sıcaklığında kurutulmaya bırakılmıştır. Kuruyan kara havuçlar blendırda homojen hale gelene dek parçalanmıştır. Elde edilen kara havuç tozu + 4°C’ de karanlık ortamda ve nem almayacak şekilde muhafaza edilmiş ve stok olarak kullanılmıştır.

Kurutulmuş ve öğütülmüş kara havuç örneklerinden antosiyaninlerin ekstraksiyonu iki farklı teknik ile gerçekleştirilmiştir. Bunlar;

- Tekrarlı ultrasonik ekstraksiyon: 1 g kara havuç üzerine 10 ml distile su eklenmiş ve ultrasonik banyoda 1 saat boyunca 50°C, 70Mhz ‘ de ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Ardından ekstre filtre kağıdı ile süzölmüş ve ortamdaki ayrılmıştır. Katı kısım üzerine tekrar 10 ml distile su eklenerek aynı koşullarda ekstraksiyona devam edilmiştir. Bu işleme kara havuçtan renk elde edilemeye dek devam edilmiştir. İşlem sonunda toplanan ekstre analizler yapılmaya kadar ışık almayacak şekilde 4°C’ de saklanmıştır.
- Aseton ekstraksiyonu: 1g kara havuç üzerine %70 aseton içeren 10ml distile su eklenmiş ve 24 saat boyunca manyetik karıştırıcıda, oda sıcaklığında ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Süre sonunda karışım filtre edilmiş ve ekstrakt analizler yapılmaya kadar ışık almayacak şekilde 4°C’ de saklanmıştır.

3.3.1. Toplam antosiyanin miktarının pH diferansiyel yöntem ile belirlenmesi

Kara havuç ekstraktlarının toplam antosiyanin miktarının belirlenmesi için Fuleki and Francis (1968) tarafından önerilen ve Giusti and Wrolstad (2001)

tarafından geliştirilen pH diferansiyel yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntemin çıkış noktası, antosiyaninlerin pH 1.0' de renkli oksonium formunun, pH 4.5'de ise, renksiz hemiketal formunun egemen olmasına dayanmaktadır. Buna göre, ortam pH 1.0 ve 4.5 olduğu zaman ölçülen absorbans değerlerinin farkı, doğrudan antosiyanin konsantrasyonu ile orantılı bulunmaktadır.

Bu amaçla 0,025 M potasyum klorür ve 0,4 M sodyum asetat tampon çözeltileri hazırlanarak örnekler bu tamponlar ile seyreltilmiştir. KCl tamponu pH 1 ve CH₃COONa*3.H₂O tamponu pH 4,5 olarak %30'luk HCl ile ayarlanmıştır. Seyreltilen numuneler karanlık ortamda 15 dk bekletildikten sonra absorbansları 520 nm ve 700 nm'de UV spektrofotometre ile belirlenmiştir. Sonuçlar mg siyanidin-3-glukozit eş değeri cinsinden aşağıdaki denklem kullanılarak ifade edilmiştir.

$$(A) (MW) (SF) 1000$$

$$\text{Toplam antosiyanin miktarı (mg/L)} = \frac{\text{---}}{(\epsilon) (L)}$$

$$A = ((A_{510} - A_{700})_{\text{pH 1}} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH 4.5}})$$

MW: 484,84 g/mol (Cy-3-gly)

SF: Seyreltme faktörü

ϵ : Molar absorpsiyon katsayısı, (26900)

L: Absorbans ölçüm küvetinin tabaka kalınlığı, (1 cm)

3.3.2. Antosiyaninlerin ultra-yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (UPLC) ile belirlenmesi

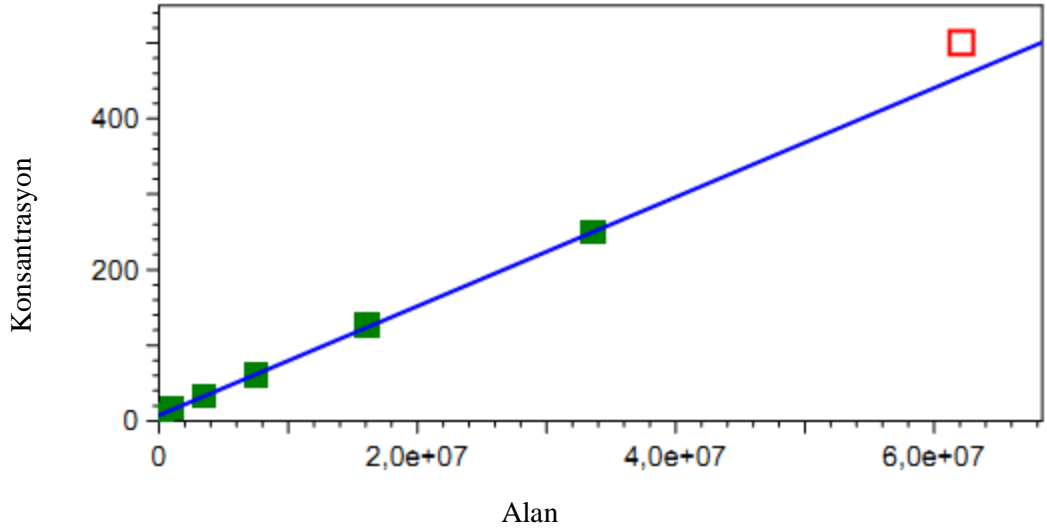
Çalışmalar sonucu elde edilen örneklerin kromatografik analizleri Ace C-18 150 mm × 4.0 mm × 5 µm column (Advanced Chromatography Technologies Ltd, Aberdeen, Scotland) kolonu kullanılarak, PDA dedektörlü Accela UPLC (Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA) cihazında gerçekleştirilmiştir. Kromatografide mobil faz olarak %0.01 TFA içeren Su (A) ve Asetonitril (B) kompozisyonu kullanılmıştır. UPLC metodu Çizelge 3.1' de sunulmuştur. Analiz

boyunca akış hızı 500 µl /dak olarak ayarlanmış, 10 µl enjeksiyon hacmi ile çalışılmış ve analizler 520 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.1. UPLC Metodu

Zaman dak.	A%	B%	Akış µl/dak
0	85	15	500
4	85	15	500
7	81	19	500
18	76	24	500
20.01	5	95	500
22.00	5	95	500
22.01	85	15	500
25.00	85	15	500

Antosiyaninlerin UPLC ile analizi için standart olarak siyanidin-3-glikozit kullanılmıştır. Kalibrasyon eğrisi için siyanidin-3-glikozit' in su içerisinde 5 farklı konsantrasyonu (500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 61,25 µg/ml, 31,125 µg/ml) hazırlanmış ve analiz edilmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. UPLC Kalibrasyon eğrisi

Kalibrasyon eğrisinin denklemi; $y = 7,22697e-006x + 7,00702$ (y =alan, x =konsantrasyon), R^2 değeri; 0,999836 (RF Stdev: 1,03993e-005) olarak belirlenmiştir.

3.4. Çift Emülsiyon Çözücü Buharlaştırma Yöntemi ile Enkapsülasyon

3.4.1. Ön formülasyon çalışmaları

Çalışma için uygun olan enkapsülasyon yöntemini belirlemek için ekstre yükleme aşamasına geçmeden önce vezikül oluşumunu gözlemek ve formülasyon hazırlamada kullanılacak uygun parametreleri seçmek amacıyla boş partiküller hazırlanmıştır.

Çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile ön formülasyonlar farklı yüzey aktif maddeleri kullanılarak hazırlanmıştır. Bu amaçla ilk faz için distile su, ikinci faz için farklı oranlarda diklorometan (DCM) içerisinde polikaprolakton (PCL) çözeltisi ve üçüncü faz olarak da yüzey aktif madde olarak polivinilalkol (PVA), tween 20 veya sodyum karboksi metilselüloz (NaCMC) 'nin su içerisindeki çözeltisi Çizelge 3.2' de verilen değerlerde kullanılmıştır. Formülasyon için en uygun yüzey aktif maddenin seçimi ve kullanılacak miktarı bu çalışmalar sonucunda belirlenmiştir.

Çizelge 3.2. Çift emülsiyon yöntemi ön formülasyon çalışmaları

Yüzey aktif madde	PVA	NaCMC	Tween 20
YAM oranları (w/v)	%0.2	%0.2	%0.2
	%0.4	%0.4	%0.4
	%0.6	%0.6	%0.6
	%0.8	%0.8	%0.8
	%1	%1	%1

Uygulama basamakları ise şu şekildedir; distile sudan oluşan birinci faz 8000 rpm hızda karıştırma sırasında yavaş yavaş ikinci faza eklenmiştir. Elde edilen emülsiyon yine 8000 rpm karıştırma hızında üçüncü faza eklenmiş ve eklemenin ardından karıştırmaya 1 dakika daha devam edilmiştir. Oluşan karışım çözücünün (DCM) tamamı buharlaşana kadar oda sıcaklığında 600 rpm' de manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır.

Emülsiyonu oluşturan ilk su fazı için bütün çalışmalarda sabit olarak 3ml distile su ve organik faz için 7 ml DCM (diklorometan) içerisinde 30mg PCL (polikaprolakton) çözeltisi kullanılmıştır. İkinci su fazı olarak ise toplam hacmi 20 ml olan, farklı oranlarda yüzey aktif madde içeren distile su kullanılmıştır. Elde edilen partikül çözeltileri ölçümler yapılmaya kadar +4°C’ de saklanmıştır.

3.4.2. Çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile partiküllerin hazırlanması

Çift emülsiyon oluştururken süreç üzerinde etkili olabileceği düşünülen ve optimizasyon çalışmasında kullanılan parametreler ve bu parametrelerin seviyeleri Çizelge 3.3’ de belirtilmiştir.

Çizelge 3.3. Deneysel tasarımda kullanılan enkapsülasyon parametrelerinin (bağımsız değişkenlerin) seviyesi

Faktör	Parametre	Seviye	
		-1	+1
X1	Besleme süresi (dak)	0.5	5
X2	Karıştırma süresi (dak)	1.5	5
X3	Sıcaklık (°C)	4	25
X4	Karıştırma hızı (rpm)	8000	24000
X5	PCL: DCM oranı	1	2
X6	Yükleme miktarı (µg/ml)	6	18
X7	Tween 20 konsantrasyonu (%)	0.5	5

Design Expert programı kullanılarak ilgili parametreler için deneme deseni oluşturulmuş ve deney tasarımı ‘Taguchi Metodu’ olarak seçilmiştir. Taguchi metodunun seçilme amacı ise çalışma üzerinde etkili olan faktörlerin daha kısa zamanda ve daha az deneme sayısı ile belirlenebilmesini sağlayabilmesidir. Her bir parametre için 2 seviyede toplamda 7 faktör ile 8 deneme yapılmıştır (Çizelge 3.4).

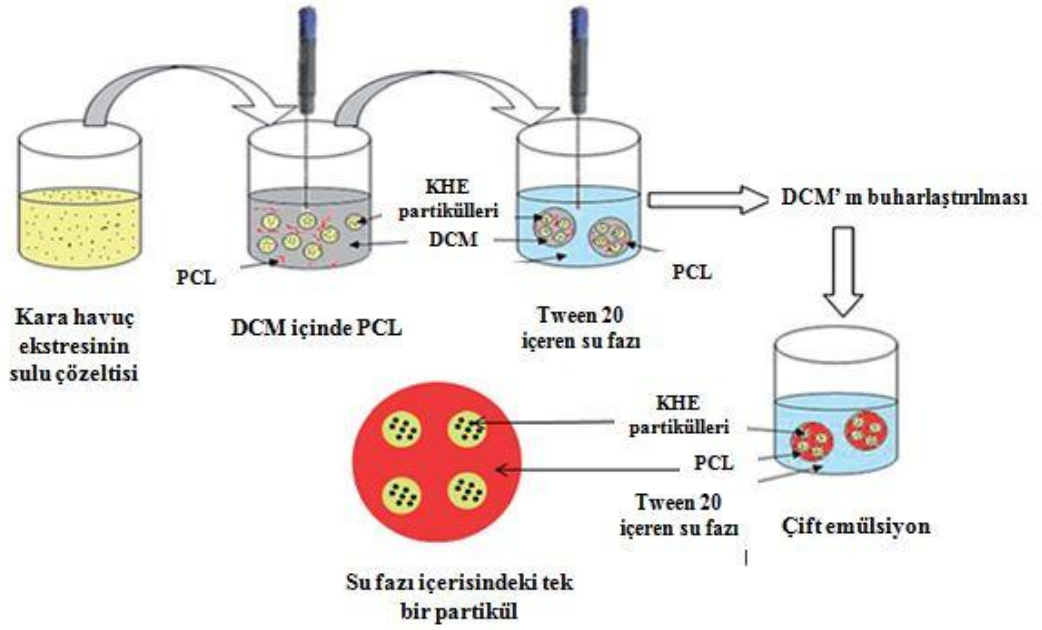
Çizelge 3.4. Çift emülsiyon yöntemi için oluşturulan deney tasarımı

Deneme	Besleme süresi (dak)	Karıştırma süresi (dak)	Karıştırma hızı (rpm)	PCL: DCM oranı	Yükleme miktarı ($\mu\text{g/ml}$)	Tween 20 Kons. (%)	Sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$)
1	0.5	5	24 000	1	6	5	4
2	5	5	24 000	2	6	0.5	25
3	5	1.5	24 000	2	18	5	4
4	0.5	1.5	8 000	2	6	5	25
5	0.5	1.5	24 000	1	18	0.5	25
6	5	1.5	8 000	1	6	0.5	4
7	0.5	5	8 000	2	18	0.5	4
8	5	5	8 000	1	18	5	25

Çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi uygulaması 3 ayrı faz içermekte ve 2 basamaktan oluşmaktadır. Fazların isimleri ve içerikleri şu şekildedir;

- S_1 faz: Toplam hacmi 3ml olan birinci su fazı, 6 ve 18 $\mu\text{g/ml}$ (kara havuç antosiyaninleri) oranlarında ekstre içermektedir.
- Organik faz: Toplam hacmi 7 ml (DCM) olan organik faz, 30 mg ve 60 mg olmak üzere iki farklı miktarda PCL içermektedir.
- S_2 faz: Toplam hacmi 20 ml olan ikinci su fazı yüzey aktif madde olarak %5 ve %0.5 oranlarında tween 20 içermektedir.

Şekil 3.6' da kullanılan çift emülsiyon yönteminin basamakları ve her basamakta kullanılan fazların gösterimi yapılmıştır (Ahmed et al., 2012).



Şekil 3.6. Kara havuç ekstralarının çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile enkapsülasyonu

Uygulama basamakları ön formülasyon çalışmalarında olduğu gibi uygulanmıştır. İlk basamakta ekstreyi içeren S1 fazı, Ultraturrax homojenizatör ile farklı karıştırma hızlarında (8000-17000 rpm) organik faza eklenmiştir (Şekil 3.6). Bu işlem sırasında organik faz, su banyosu içerisinde farklı sıcaklıklarda (4-25°C) tutulmuştur. Birinci su fazı ve organik fazdan oluşan bu emülsiyon, farklı besleme sürelerinde yine bir önceki basamakta olduğu gibi karıştırma altında farklı oranlarda (%0.5-5) tween 20 içeren S2 faz içerisine eklenmiş ve yaklaşık 5 dakika karıştırmaya devam edilmiştir. Emülsiyonlar oluşturulduktan sonra örnekler, organik çözücünün tamamı uçana dek oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Elde edilen partikül çözeltileri ölçümler yapılana kadar +4°C' de saklanmıştır.

3.5 Niozom Yöntemi ile Enkapsülasyon

3.5.1. Ön formülasyon çalışmaları

Niozom partiküllerini hazırlamak için eter enjeksiyon yöntemi kullanılmış ve ön formülasyon denemeleri yapılmıştır. Ön formülasyon denemelerinde

niozomlar ekstre kullanılmadan boş olarak hazırlanmıştır. Niozom için yapılan ön formülasyon denemeleri Çizelge 3.5’ de verilmiştir.

Çizelge 3.5. Niozom ön formülasyon denemeleri

Karıştırıcı tipi	Hız (rpm)
Manyetik karıştırıcı	900
	1100
	1400
Homojenizatör	8000
	9500
	13500

Uygulama basamakları şu şekildedir; kolesterol ve noniyonik yüzey aktif madde çeker ocak içerisinde dietil eterde çözdürülmüştür. Diğer yandan pH 7.4 olan PBS (phosphate buffer saline) manyetik karıştırıcı üzerinde sıcaklığı $\sim 60^{\circ}\text{C}$ ‘ ye ayarlanmıştır. Ardından eter çözeltisi şırıngaya çekilerek karıştırma esnasında damla damla PBS çözeltisi içerisine eklenmiştir. Enjeksiyon işlemi bittikten sonra dietiler tamamen uçana kadar manyetik karıştırıcıda karıştırma devam etmiştir. Dietil eter tamamen buharlaştıktan sonra elde edilen partikül çözeltileri ölçümler yapılana kadar $+4^{\circ}\text{C}$ ’ de saklanmıştır.

3.5.2. Niozom yöntemi ile partiküllerin hazırlanması

Optimizasyon için yapılan denemelerde kullanılan parametreler ve bu parametrelerin seviyeleri Çizelge 3.6’ da belirtilmiştir.

Çizelge 3.6. Deneysel tasarımda kullanılan enkapsülasyon parametrelerinin (bağımsız değişkenlerin) seviyesi

Faktör	Parametre	Seviye	
		-1	+1
X1	Kolesterol miktarı (mg)	30	50
X2	Tween 20 miktarı (mg)	200	400

X3	Yükleme miktarı ($\mu\text{g/ml}$)	6	18
X4	Besleme süresi (dak)	1	3
X5	Sonikasyon süresi (dak)	30	45
X6	Ultrasonik prob kullanımı	yok	var
X7	Sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$)	40	60

Design Expert programı kullanılarak ilgili parametreler için deneme deseni oluşturulmuş ve deney tasarımı 'Taguchi Metodu' olarak seçilmiştir. Her bir parametre için 2 seviyede toplamda 7 faktör ile 8 deneme yapılmıştır. Oluşturulan deney tasarımı Çizelge 3.7' de verilmiştir.

Çizelge 3.7. Niozom yöntemi için oluşturulan taguchi deney tasarımı

Deneme	Kolesterol miktarı (mg)	Tween 20 miktarı (mg)	Etken madde kons. ($\mu\text{g/ml}$)	Besleme süresi (dak)	Sonik banyo* (dak)	Ultrasonik prob*	Sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$)*
1	50	200	18	3	30	-	40
2	50	400	6	3	30	+	60
3	50	200	18	1	45	+	60
4	30	200	6	1	30	+	40
5	30	200	6	3	45	-	60
6	30	400	18	1	30	-	60
7	30	400	18	3	45	+	40
8	50	400	6	1	45	-	40

*Ultrasonik banyo uygulaması formülasyon hazırlandıktan sonra ve dietiler uçurulduktan sonra uygulanmıştır. * (-) Ultrasonik prob kullanılmamış, (+) amplitud 60, cycle 1 olacak şekilde 1 dakika kullanılmıştır. * PBS çözeltisinin sıcaklığıdır.

Bu çalışmada öncelikle model etkin madde olarak kullandığımız kara havuç su ekstresinin farklı konstanrasyonlarından (Çizelge 3.7) 1ml alınarak 9 ml PBS (phosphate buffer saline) (pH 7.4) çözeltisi içerisine eklenmiştir. Ardından dietiler içerisinde çözünmüş kolesterol ve tween 20 karışımı şırınga yardımı ile damla damla PBS çözeltisine eklenmiştir. Bu ekleme sırasında sıcaklık farkının yardımıyla eter buharlaşmış ve partiküller elde edilmiştir. Uygulama sonrası manyetik karıştırıcıda eterin tamamının uçması beklenmiştir. Dietil eter tamamen

buharlaştıktan sonra elde edilen partikül çözeltileri ölçümler yapılmaya kadar +4°C’de saklanmıştır.

3.6. Partiküllerin Karakterizasyonu

3.6.1. Partikül büyüklükleri ve dağılımlarının incelenmesi

Çift emülsiyon ve niozom teknikleri ile hazırlanan partiküllerinin boyut ve polidispersite indeksi tayinleri, dinamik ışık saçılımı (DLS) prensibi ile ölçüm yapan Zeta-Sizer (Malvern, İngiltere) cihazı kullanılarak yapılmıştır. Analizler 25°C’de, 175°’lik saçılım açısı kullanılarak yapılmıştır. Örneklerden 400µl alınarak ultra saf su ile yarı yarıya seyreltilmiş ve polisitren küvet içerisine konularak gerekli ölçümler gerçekleştirilmiştir. Partikül boyutu ölçümü her bir numune için 3 kez tekrarlanmıştır.

3.6.2. Partiküllerin görüntülenmesi

Belirlenen sonuç formülasyonu ile elde edilen boş ve ekstre yüklü niozom partiküllerinin morfolojik incelemeleri FEI Quanta 250 FEG marka Taramalı Elektron Mikroskopunda (SEM) gerçekleştirilmiştir. Bütün örnekler liyofilize edildikten sonra analizler yapılmıştır. Toz halindeki partiküller örnek haznesine yerleştirildikten sonra vakum altında, Emitech K550X sputter coater ile yaklaşık 100 Å kalınlığında altın tabakası ile kaplanmıştır. Daha sonra taramalı elektron mikroskobu ile görüntüleri alınmıştır.

Tez çalışmasında elde edilen boş ve yüklü formülasyonların SEM görüntülemesi, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Malzeme Araştırma Merkezi’nde yapılmıştır.

3.6.3. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) analizi

DSC, kimyasalların termal analizinde kullanılan termoanalitik bir yöntemdir. Termal analiz, incelenen numuneye ait bir fiziksel özelliğin sıcaklığın fonksiyonu olarak ölçüldüğü veya bir tepkimede soğurulan ya da açığa çıkan

ısının izlendiği yöntemleri içeren bir analiz tekniğidir. Çalışmada kullanılan kara havuç ekstresi, belirlenen sonuç formülasyonu ile elde edilen boş niozom ve ekstre yüklü niozom partiküllerine ait DSC diyagramları T.A. Instrument Q10 marka diferansiyel taramalı kalorimetre kullanılarak elde edilmiştir. Bütün örnekler liyofilize edildikten sonra analizler gerçekleştirilmiştir. DSC deneylerinin tümü azot atmosferinde gerçekleştirilmiş ve gaz akış hızı 50 mL/dakika olarak ayarlanmıştır. Tüm DSC ölçümleri için 20-200°C sıcaklık aralığında ve 10°C/dakika ısıtma hızında çalışılmıştır. Örnekler özel olarak DSC analizi için kullanılan alumina pan kaplarının içerisine yerleştirilmiş ve referans olarak da alumina standardı kullanılmıştır.

Tez çalışmasında elde edilen formülasyonların DSC analizi, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Jeotermal Enerji Araştırma ve Uygulama Merkezi' nde yapılmıştır.

3.6.4. Partiküllerin yükleme veriminin belirlenmesi

Bölüm 3.5.2' de yapılan optimizasyon çalışmaları sonucu elde edilen optimum partikül büyüklüğü ve dağılıma sahip formülasyonun yükleme verimi belirlenmiştir. Etkin madde yükleme veriminin belirlenmesine yönelik olarak nanopartikül formülasyonunun hazırlanması sırasında dış sulu fazda serbest halde kalan etkin madde miktarı belirlenmiş ve dolaylı yoldan, nanopartikül içerisine hapsedilen madde miktarı hesaplanmıştır.

Bu amaçla, seçilen formülasyon ile hazırlanan partiküller 20 000 rpm' de 30 dakika santrifüj edilerek ortamdan ayrılmıştır. Santrifüj sonrası kalan süpernatantın (üst faz) hacmi belirlenmiş ve içeriğindeki antosiyanin miktarı pH diferansiyel yöntemi ile analiz edilmiştir. Aynı zamanda formülasyonda kullanılan ekstre de pH diferansiyel yöntemi ile analiz edilmiş ve elde edilen sonuçlar Bölüm 3.3.1' de belirtilen formülde yerine konularak miktarlar belirlenmiştir. Yükleme verimi hesaplaması için kullanılan formül ise aşağıdaki gibidir;

$$\text{Etkin madde yükleme verimi (\%)} = \{(K1 - K2)/K1\} \times 100$$

- K1: Nanopartikül formülasyonu hazırlanmasında kullanılan antosiyanin miktarı
- K2: Su fazında (süpernatant) serbest halde nanopartiküllere yüklenmeden kalan antosiyanin miktarı

3.6.5. *In vitro* salım çalışmaları

Niozom partiküllerinden *in vitro* antosiyanin salımı pH 7,4 PBS ortamında UPLC sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Salım kinetiği için öncelikle hazırlanan partikül formülasyonu 20 000 rpm ' de 30 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant yükleme verimi analizi için ayrılmıştır. Çöken pellet 1 kez distile su ile yıkanmış ve ardından salım çalışmaları için yine 1 ml distile su içerisinde homojenize edilmiştir. Diyaliz torbasının içerisine formülasyon eklendikten sonra iki ucu da bağlanmış ve 100 ml-50 ml PBS (pH 7.4) içeren beher içerisine konulmuştur. Yatay çalkalayıcı da $37 \pm 0,5$ °C sıcaklıkta, 100 rpm (devir/dk) hızda deney gerçekleştirilmiştir. Bu ortamdan 0., 15., 30., 45., 60., 90., 120., 180., 240. dakikalarda ve sonrasında analiz sonuçlarına bağlı olarak farklı zaman aralıklarında 1ml örnek alınmıştır. Örnek alımlarından sonra alınan miktar kadar PBS ortama eklenmiştir. Salımı etkilememesi için sonradan eklenen PBS çözeltisi de yine 37°C ' de ki ortamda muhafaza edilmiştir.

3.7. *In vitro* Sitotoksisite Çalışmaları

Kara havuç ekstresinin ve yüklü niozomların *in vitro* sitotoksik özellikleri MCF7 (insan meme kanseri), Saos-2 (osteojenik sarkoma), A549 (akciğer kanseri), MDA-MB (insan meme adenokarsinoma), Neuro2A (beyin tümör), NA2A kanser hücre hatlarında ve Vero normal hücre hattında incelenmiştir. Hücre hatları % 10 fetal bovin serum (FBS), L-glutamin (2 mmol/L), penisilin (100 U/ml) içeren DMEM besi ortamlarında 37°C' de % 5 CO₂ içeren atmosfer ortamında 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

Hücreler 24 saatlik kültüvasyon sonrası % 10 FBS içeren DMEM besiyerinde süspansiyon haline getirilmiş ve mikroskop ile hücre sayımı yapılmıştır. Hücre süspansiyonu 96 kuyucuklu hücre kültür plakalarının her kuyucuğuna 6000 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiştir. Kara havuç ekstresi ve ekstre yüklü niozom partikülleri DMSO içerisinde, 100-6.25 µg/ml seyreltmelerde hazırlanmış ve hücre hatları üzerine eklenmiştir. Negatif kontrol olarak DMSO kullanılırken, pozitif kontrol olarak doksorubisin kullanılmış ve bütün denemeler 2 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş ve hücre kültür plakaları 37°C'de % 5 CO₂ içeren atmosfer ortamında 72 saat inkübasyona bırakılmıştır.

72 saatlik inkübasyon süresi sonunda her bir kuyucuğa 25 µL (5 mg/mL) MTT boyası eklenmiş ve MTT boyasının canlı hücreler tarafından formazan tuzu haline dönüştürülebilmesi için 37°C de 4 saat inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda formülasyon MTT kuyucuklardan uzaklaştırılmış ve her bir kuyucuğa 150 µL DMSO eklenerek plaka okuyucuda (ELISA) 570 nm-690 nm dalga boyunda renk değişimi belirlenmiştir.

Tez çalışması kapsamında yapılan tüm sitotoksisite çalışmaları Doç. Dr. Canan Sevimli Gür tarafından gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Kara Havuç Antosiyaninlerinin Ekstraksiyonu

Kara havuç antosiyaninlerinin, tekrarlı ultrasonik ekstraksiyon ve aseton ekstraksiyonu Bölüm 3.3' de bahsedildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Antosiyaninler polar yapıda bileşikler olduğundan çözücü olarak su kullanılacağı daha önceki denemeler ile belirlenmiştir. Ayrıca etanol, metanol gibi çözücülere göre ucuz olması ve sitotoksik etkisinin olmaması da suyun bu ekstraksiyon çalışması için seçilmesinde etkili olmuştur.

Ekstraksiyon sonrası biyokütle süzöldükten sonra elde edilen ekstratların toplam antosiyanin içerikleri Bölüm 3.3.1' de açıklanan pH diferansiyel yöntemi ile belirlenmiştir. Ultrasonik ekstraksiyon sonucu elde edilen ekstratın toplamda 2.378 mg antosiyanin (siyanidin-3-glikozit eşleniği) içerirken, aseton ekstraksiyonu sonucu elde edilen ekstratın toplamda 1.392 mg antosiyanin içerdiği belirlenmiştir. 1 g kuru kara havuçtan elde edilen toplam antosiyanin miktarlarına bakıldığında tekrarlı ultrasonik ekstraksiyonunun veriminin yaklaşık 2 kat fazla olduğu hesaplanmıştır. Bu da ekstraksiyon sırasında tekrarlı basamakların birim kuru maddeden toplam antosiyaninlerin eldesinde başarılı olduğunu göstermektedir.

Literatür ile karşılaştırıldığında 1 g kuru maddeden elde edilen miktarların her iki ekstraksiyon yöntemi için de oldukça iyi olduğu belirlenmiştir. Algarra et. al. (2014) yaptıkları çalışmada 100 g taze kara havuçtan etanol:su (1:1) ekstraksiyonu ile toplamda 93.8 ve 126.4 mg antosiyanin elde etmişlerdir. Bu miktarlar 1 g için düşünüldüğünde (0.938 ve 1.264 mg/g) çalışmamızda elde edilen miktarlar (1.392 ve 2.378 mg/g) her iki yöntem için de bu değerlerden daha yüksek konsantrasyona sahiptir. Burada suyun kara havuçtan antosiyanin ekstraksiyonunda diğer çözücülere göre daha etkili olduğu ve tekrarlı basamakların ekstraksiyon verimini arttırdığı sonucuna ulaşılmıştır.

4.2 Çift Emülsiyon Çözücü Buharlaştırma Yöntemi ile Enkapsülasyon

4.2.1. Ön Formülasyon Çalışmaları

Ön formülasyon çalışmalarında çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile çeşitli yüzey aktif maddelerin farklı oranlarının (% 0.2-1) partikül boyutuna olan etkisi incelenmiştir. Bunun için Polivinil alkol (PVA), NaCMC (Sodyum karboksimetil selüloz) ve tween 20 Çizelge 4.1’deki oranlarında kullanılmıştır. Emülsiyon oluşturma basamaklarında 8000 rpm hızda yüksek devirli homojenizatör 1,5 dakika süre ile kullanılmıştır.

Hedeflenen boyutlarda nanopartiküller elde edebilmek için farklı surfaktantlar kullanılarak yapılan denemelerin sonuçları aşağıda tablo halinde gösterilmiştir (Çizelge 4.1).

NaCMC ve PVA’ın kullanıldığı denemelerde yüzey aktif madde oranlarının artması ile genel olarak partikül boyutunun arttığı saptanmıştır. Özellikle NaCMC ile hazırlanan çift emülsiyon partiküllerin stabilitesi yüksek olmasına karşın boyut açısından çalışmamızın amacına uygun düşmemektedir (Çizelge 4.1.).

Yüzey aktif madde olarak PVA ‘ün kullanıldığı denemelerde ise bir gece +4°C’de bekleme sonucu partiküllerin agrege olduğu ve çöktüğü gözlenmiştir. Bu çökme sonrasında partikül çözeltisini tekrar homojen hale getirmek amacıyla çalkalama uygulandığında ise önce bulanık bir görüntü oluşmakta ve ardından yine partiküllerin çöktüğü gözlenmektedir. Rosca et al. (2004) yaptıkları çalışmada yüzey aktif madde olarak PVA ve polimer olarak PLGA kullanarak çift emülsiyon çözücü buharlaştırma ile partiküller oluşturmuşlar ve herhangi stabilite sorununa ile karşılaşmamışlardır. Bu bilgiye dayanarak stabilite sorununun PVA’nın çalışmada kullanılan PCL polimeri ile uyum göstermediği ve kullanılan teknik için uygun bir yüzey aktif madde olmadığı sonucuna varılmıştır.

Tween 20’ nin kullanıldığı denemeler sonucunda ise farklı olarak yüzey aktif madde konsantrasyonunun artışı ile partikül boyutunun küçüldüğü belirlenmiş ve en düşük partikül boyutuna (202 nm) tween 20 ile ulaşılmıştır. Partikül boyutlarının tween 20 miktarı ile ters orantılı olarak azalması ise tween

20 oranının artması ile stabilitenin artması, partiküllerin daha iyi dağılması ve agrege olmadan askıda kalması ile açıklanmaktadır.

Çizelge 4.1. Çift emülsiyon yönteminde kullanılan surfaktanların oranları ve oluşan partiküllerin boyutları

Yüzey aktif madde	YAM Oranı (w/v)	Ortalama Partikül Boyutu (nm)
PVA	% 0.2	1461
	% 0.4	1340
	% 0.6	6801
	% 0.8	14836
	% 1	11539
Tween 20	% 0.2	5998
	% 0.4	7180
	% 0.6	7042
	% 0.8	1237
	% 1	202
NaCMC	% 0.2	21966
	% 0.4	25286
	% 0.6	16553
	% 0.8	27226
	% 1	33926

Çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi için yapılan ön formülasyon çalışmaları sonucu bu yöntem için en uygun yüzey aktif maddenin tween 20 olacağına karar verilmiş ve çalışmalara bu seçim ile devam edilmiştir.

4.2.2. Çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile partiküllerin hazırlanması

Yapılan ön denemeler sonunda araştırmaya çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yönteminin optimizasyon çalışmaları ile devam edilmiştir. Deney tasarımı ile oluşturulan denemeler (Çizelge 4.2) Bölüm 3.4.2 de belirtilen şekilde gerçekleştirilmiş ve elde edilen partikül boyutları Çizelge 4.3' de sunulmuştur.

Çizelge 4.2. Çift emülsiyon için oluşturulan deney tasarımı

Deneme	Besleme süresi (dak)	Karıştırma süresi (dak)	Karıştırma hızı (rpm)	PCL Miktarı	Etken madde kons. (µg/ml)	Tween 20 Kons. (%)	Sıcaklık (°C)
1	30	5	17 000	30	6	5	4
2	5	5	17 000	60	6	0.5	25
3	5	1.5	17 000	60	18	5	4
4	30	1.5	8 000	60	6	5	25
5	30	1.5	17 000	30	18	0.5	25
6	5	1.5	8 000	30	6	0.5	4
7	30	5	8 000	60	18	0.5	4
8	5	5	8 000	30	18	5	25

Çizelge 4.3. Deney tasarımı sonucu elde edilen çift emülsiyon partiküllerinin ortalama büyüklüğü ve polidispersite indisi

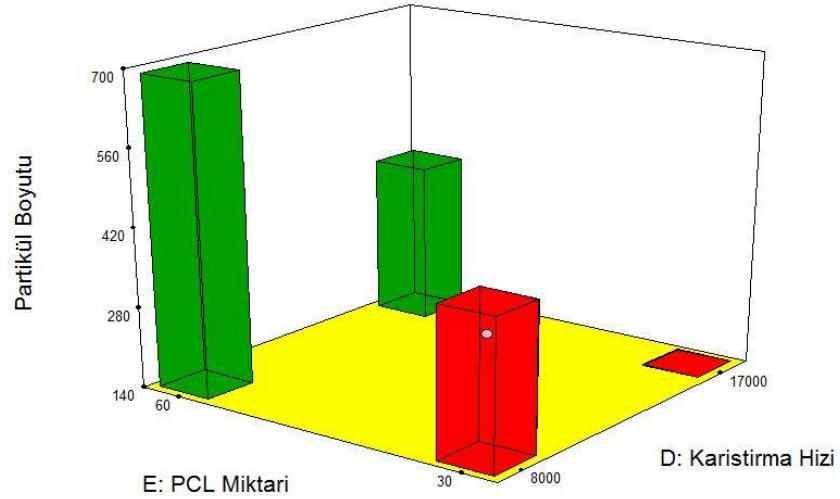
Deneme	Ortalama Partikül Boyutu (nm)	PDI
1	252.4	0.207
2	523.8	0.268
3	331.9	0.256
4	772.1	0.686
5	420.3	0.405
6	351.2	0.679
7	1003	0.990
8	462.1	0.683

ANOVA analizi (Çizelge 4.4) sonucunda elde edilen modelin F değerinin (0,0383) 0,05' den küçük olması modelin anlamlı olduğunu göstermektedir. Çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yönteminde 'besleme süresi, karıştırma hızı ve PCL miktarı' faktörleri partikül boyutu üzerinde etkili bulunurken, 'sıcaklık, etken madde konsantrasyonu, karıştırma süresi, tween 20 konsantrasyonu' faktörlerinin partikül boyutu üzerinde etkili olmadığı sonucu elde edilmiştir.

Çizelge 4.4. Çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile enkapsülasyonun varyans analizi (ANOVA)

Kaynak	Kareler Toplamı	d.f.*	Ortalama Kareleri	F-Değeri	p Değeri (P) > F
Model	380622.5	3	1269.00	7.76	0.0383
A-Besleme süresi	76050.00	1	76050.00	4.65	0.0972
D-Karıştırma hızı	1140980.5	1	1410.00	8.62	0.0425
E-PCL miktarı	163592	1	1636.00	10.01	0.0341
Artık değer	65385.00	4	16346.25		
Genel toplam	4460.05	7			
R²	0.8534				
R² adj	0.7434				
R² Pred	0.4136				

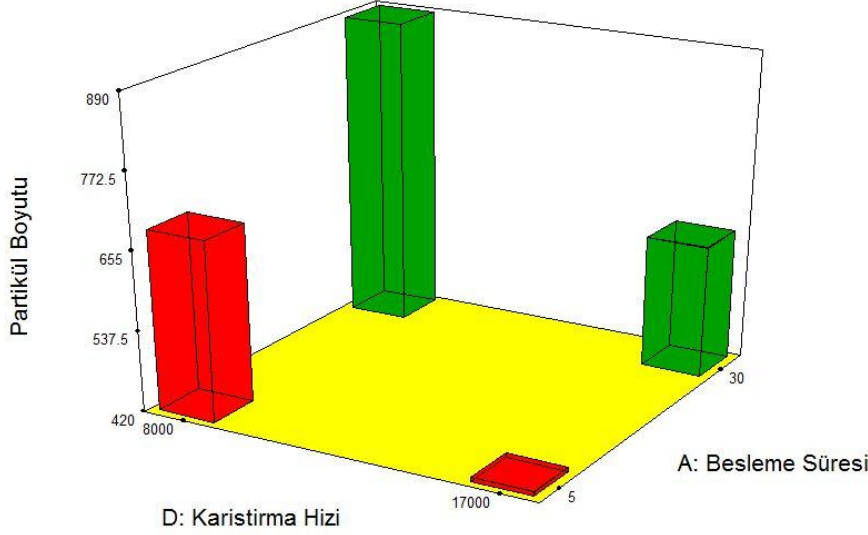
Polikaprolakton miktarı en etkili parametre olarak belirlenirken onu sırasıyla karıştırma süresi ve besleme süresi takip etmiştir. Optimum (minimum) partikül boyutu elde edilen koşul; besleme hızı 30 sn., karıştırma süresi 5 dak., sıcaklık 4°C, karıştırma hızı 17000 rpm, PCL:DCM oranı (30mg/7ml) 1, etken madde kons. 6µl/ml, tween 20 konsantrasyonu %5 olarak belirlenmiş ve bu koşullarda 252 nm boyutunda partiküller elde edilmiştir (Çizelge 4.3).



Şekil 4.1. PCL miktarı ve karıştırma hızının partikül boyutu üzerindeki etkisi

Şekil 4.1’ de gösterildiği üzere partikül boyutu polikaprolakton miktarı arttıkça artmış ve karıştırma hızı arttıkça azalmıştır. Çift emülsiyon çalışmalarında karıştırma hızı arttıkça partikül boyutunun küçüldüğü belirtilmektedir (Rosca et al., 2004). Yüksek karıştırma hızı ile emülsiyonların birbirleri içerisinde daha iyi karışması ve karıştırma şiddetiyle daha küçük dağılımı sağlanabilmektedir. Ayrıca karıştırma süresinin uzatılması ile de partikül boyutu küçültülebilmektedir (Mukerjee et al., 2007). Denemeler oluşturulurken karıştırma süresi kısa, karıştırma hızı yüksek tutulmuştur.

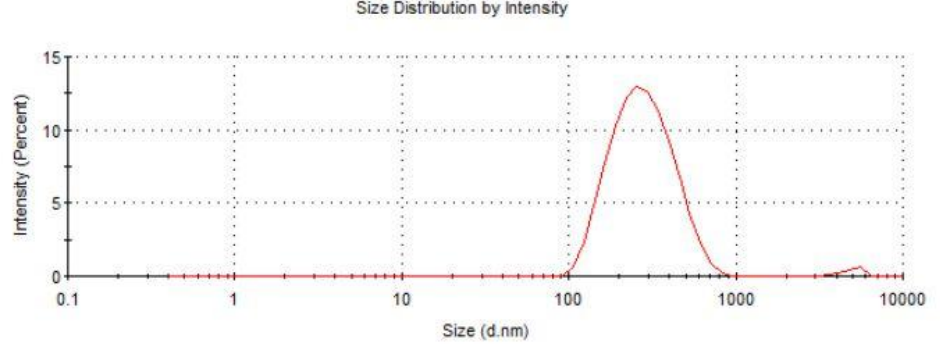
Çalışmada kullanılan emülsiyonların hacimsel oranları düşük tutulduğundan, polikaprolakton miktarı arttığında formülasyon için polimer miktarı fazla gelmekte ve bu nedenle partiküllerinin daha büyük olduğu düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda da polimer oranının artması ile partikül boyutunun büyüdüğü söylenmektedir (Hussein et al., 2013). Ayrıca oluşturulan emülsiyondan diklorometan buharlaştırıldığında, polikaprolakton polimerinin yapışkanlığı artmakta ve partiküller agrege olarak bütünleşmektedir. Bu istenmeyen durumun da partikül boyutlarını büyüttüğü ihtimali üzerinde durulmaktadır.



Şekil 4.2. Karıştırma hızı ve besleme süresinin partikül boyutu üzerindeki etkisi

Birinci faz oluşturulduktan sonra bu ilk emülsiyonun ikinci faza eklenmesi ne kadar yavaş olursa, bu bekleme süresinde emülsiyon durumunun bozulduğu, partiküllerin birbirleri ile birleştiği ve partikül boyutunun büyüdüğü düşünülmektedir. Bu nedenle yüksek karıştırma hızı ile elde edilen homojen emülsiyon hızlıca ikinci faz içerisine enjekte edilmelidir. İbraheem et al (2014) yaptıkları çift emülsiyon yöntemi ile polikaprolakton mikropartikülleri hazırlamışlar ve optimizasyon çalışmaları sonunda birinci emülsiyonu oluştururken uygulanan karıştırma hızının partikül boyutuna etkisinin olmadığı ve emülsiyonların oluşturulma sürecinin kısa tutulması gerektiği sonucuna ulaşmışlardır.

Zetasizer cihazı ile ölçümler sonucunda partiküllerin genellikle yüksek PDI değerlerine sahip olduğu gözlenmiştir. PDI, partikül dağılımının genişliğini ve boyutların homojenliğini gösteren bir parametredir. PDI değerinin 0.7' nin üzerinde oluşu numunenin partikül büyüklüğü dağılımının çok geniş olduğunu ve DLS ile ölçüm yapmaya uygun olmadığını göstermektedir (Pathak and Thassu, 2009).



Şekil 4.3. 1 numaralı formülasyonun yoğunluğa göre boyut dağılım grafiği

Yoğunluğa göre boyut dağılımı, emülsiyon içerisindeki farklı büyüklükteki partiküllerin dağılımını göstermektedir. Şekil 4.3' de görüldüğü üzere 1 numaralı örneğin dağılımı diğer ölçümlere göre daha (0.400-0.900) homojendir. Bu homojenlik başarılı partikül üretimi için istenilen bir koşul olmasına karşın partikül boyutları geniş bir aralıkta (100-1000 nm) değişmektedir. Yapılan diğer denemelerde bu alanın daraltılması ve partiküllerin küçük bir aralık içerisinde dağılımı amaçlanmıştır.

Taguchi deney tasarımı ile optimizasyon sonrası enkapsülasyon denemelerine çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile devam edilmemiştir. Bunun nedeni partiküllerin oluşmasına rağmen boyutlarının ve PDI değerlerinin çalışmanın amacına uygun olmamasıdır. UltraTurrax homojenizatör ile maksimum hızda (17 000 rpm) çalışıldığında minimum 252 nm boyutta partiküller elde edilebilmiş, ayrıca oluşan partiküllerin uzun süre askıda kalmayarak +4°C' de 1 gece sonunda agrege olup birbirlerine yapışmakta oldukları gözlenmiştir. Bu durumun ileride yapılacak yükleme verimi ve salım kinetiği çalışmalarında sorun oluşturacağı düşünüldüğünden çalışmalara daha stabil ve daha küçük boyutta partiküllerin elde edilebileceği niozom yöntemi ile devam edilmiştir.

4.3. Niozom Yöntemi ile Enkapsülasyon

4.3.1. Ön formülasyon çalışmaları

Niozom yöntemi ön formülasyon çalışmaları sonucu elde edilen partikül boyutları Çizelge 4.5' de sunulmuştur.

Çizelge 4.5. Farklı karıştırma hızlarını ile elde edilen partiküller ve boyutları

Karıştırıcı tipi	Hız (rpm)	Partikül boyutu (nm)
Manyetik karıştırıcı	900	194,5
	1100	356,8
	1400	655,4
Homojenizatör	8000	2177
	9500	2371
	13500	2857

Karıştırma hızının partikül boyutuna etkisinin incelendiği ön formülasyon çalışmalarında, karıştırma hızı arttıkça partikül boyutu da artmıştır. Bunun nedeninin yüksek hızda karıştırma sırasında eterin çok hızlı bir şekilde buharlaşması ve partiküllerin oluşmaması olarak yorumlanmıştır. Eterin hızla uçması sonucu kolesterol ve tween 20 birbiri ile agrege olarak mikropartiküller oluşturduğu düşünülmektedir. Bu sebeple eterin ani uçmasını engellemek için fazların karıştırılması sırasında 900 rpm ' den yüksek hızlarda çalışılmamıştır. Niozom partiküllerinin boyutunun küçültülmesi için prob sonikasyon uygulaması, membran filtreden ekstruzyon, yüksek basınçlı homojenizatör uygulaması, ultrasonik uygulaması önerilmektedir (Uchegbu and Vyas, 1998).

4.3.2. Niozom yöntemi ile partiküllerin hazırlanması

Ön formülasyon çalışmaları sonucu karıştırma hızının 900 rpm' den daha düşük hızlarda olması gerektiği sonucuna varılmış ve optimizasyon çalışmalarına bu sonuç ile devam edilmiştir. Niozom partiküllerinin oluşumuna ve boyutuna

etkili olduğu düşünölen parametreler ile oluşturulan deney tasarımı (Çizelge 4.6) ve elde edilen sonuçlar (Çizelge 4.7) aşağıda verilmiştir.

Çizelge 4.6. Niozom yöntemi için oluşturulan taguchi deney tasarımı

Deneme	Kolesterol miktarı (mg)	Tween 20 miktarı (mg)	Etken madde kons. ($\mu\text{g/ml}$)	Besleme süresi (dak)	Sonik banyo* (dak)	Ultrasonik prob* (dak)	Sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$)*
1	50	200	18	3	30	-	40
2	50	400	6	3	30	+	60
3	50	200	18	1	45	+	60
4	30	200	6	1	30	+	40
5	30	200	6	3	45	-	60
6	30	400	18	1	30	-	60
7	30	400	18	3	45	+	40
8	50	400	6	1	45	-	40

Çizelge 4.7. Deney tasarımı sonucu elde edilen niozom partiküllerinin ortalama büyüklüğü ve polidispersite indisi

Deneme	Ortalama Partikül Boyutu (nm)	PDI
1	143.4	0.370
2	174	0.277
3	151.1	0.196
4	164.8	0.137
5	145.7	0.195
6	216.6	0.280
7	191.3	0.204
8	178.6	0.131

ANOVA analizi (Çizelge 4.8) sonucunda elde edilen modelin F değeri (0.0028) 0.05' den küçük olması modelin anlamlı olduğunu göstermektedir. Niozom hazırlama yönteminde 'kolesterol miktarı, tween 20 miktarı ve besleme süresi' faktörleri partikül boyutu üzerinde etkili iken, 'sıcaklık, etken madde

kons., (su banyosunda) sonikasyon süresi, ultrasonik prob kullanımı' faktörlerinin partikül boyutu üzerinde etkili olmadığı sonucu elde edilmiştir.

Tween 20 miktarı en etkili parametre olarak belirlenirken onu sırasıyla kolesterol miktarı ve besleme süresi takip etmiştir. Birçok faktör arasından prosesi en çok etkileyen parametreler taguchi metodu ile belirlenmiş ve optimizasyon çalışmalarına bu veriler ele alınarak devam edilmiştir.

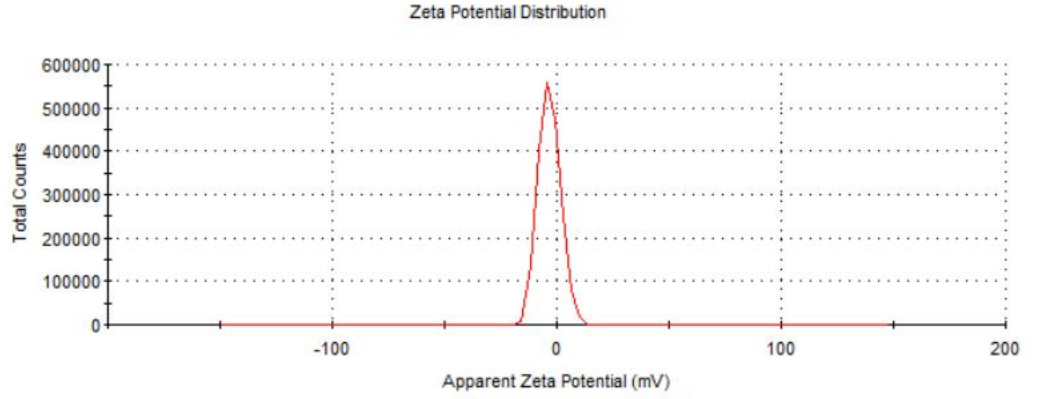
Çizelge 4.8. Niozom yöntemi ile enkapsülasyonun varyans analizi (ANOVA)

Kaynak	Kareler Toplamı	d.f.*	Ortalama Kareleri	F- Değeri	p Değeri (P) > F
Model	2719.00	3	906.33	32.66	0.0028
A-Kolesterol miktarı	312.50	1	312.50	11.26	0.0284
B-Tween 20 miktarı	2244.50	1	2244.50	80.88	0.0008
D-Besleme süresi	162.00	1	162.00	5.84	0.0731
Genel toplam	2830.00	7			
R²	0.9608				
R² adj	0.9314				
R² pred	0.8431				

Niozom partiküllerinin boyutları 100-200 nm aralığında değişmesi ile birlikte istenen nanopartikül boyutlarına (yaklaşık 100 nm) yaklaşmıştır. Ayrıca Çizelge 4.7' de verildiği üzere niozom partiküllerinin PDI değerleri 0.2-0.3 aralığındadır. Bu da elde edilen partiküllerin homojen büyüklüklere ve dağılıma sahip olduğunu göstermektedir. Nanopartikül üretiminde PDI değerinin düşük olması istenen bir durumdur ve hazırlanan niozomlar ile iyi değerler elde edilmiştir.

Ek olarak sonuçlara göre en iyi dağılıma sahip olan 5 numaralı örneğin zeta potansiyeli yine Zeta-Sizer (Malvern, İngiltere) cihazı ile zeta meter cell kuvvet (voltaj; 50v) kullanılarak yapılmıştır. Ölçüm sonucu ortalama zeta potansiyeli -

3.31 mV olarak belirlenmiştir (Şekil 4.4). Niozomlar noniyonik yüzey aktif maddeleri ile hazırlandığı için yükleri nötr duruma yakın, düşük değerlerde olmaktadır. Ayrıca formülasyona yük indükleyici madde eklenerek (disetilfosfat vb.) partiküllerin yük aralığı değiştirilebilmektedir (Priya et al., 2013). Elde ettiğimiz formülasyonlar uzun süreler agregre olmadan +4°C’ de saklanabildiği için ek olarak stabilite çalışmalarına gerek duyulmamıştır.



Şekil 4.4. 5 numaralı niozom formülasyonunun zeta potansiyeli

4.3.2.1. Niozom yönteminin cevap yüzey yöntemi kullanılarak optimizasyonu

Prosesi etkileyen parametreler Taguchi metoduyla belirlendikten sonra optimizasyona devam edilmiştir. Taguchi metoduna göre proses üzerinde etkili olan ‘tween 20 konsantrasyonu, kolesterol miktarı, besleme süresi’ parametreleri cevap yüzey yöntemlerinden biri olan merkez-tümleşik tasarım (*CCD, Central Composite Design*) seçilmiş ve sonuçlara Çizelge 4.9’ da yer verilmiştir.

Çizelge 4.9. Niozom yöntemi için oluşturulan CCD deney tasarımı ve sonuçları

Deneme	Kolesterol miktarı (mg)	Tween 20 miktarı (mg)	Besleme süresi (dak)	Ortalama partikül boyutu (nm)
1	30	400	3	162.3
2	40	300	2	260.9

3	50	200	3	143.3
4	50	200	1	210.8
5	40	300	0.32	201.4
6	30	400	1	187
7	40	300	3.68	233.6
8	50	400	3	295.1
9	23.18	300	2	166.3
10	40	300	2	333.5
11	40	468.18	2	154.4
12	40	300	2	245.4
13	40	131.82	2	130.4
14	50	400	1	216.1
15	56.82	300	2	277.6
16	30	200	1	130
17	30	200	3	163.9

ANOVA analizi (Çizelge 4.10) sonucunda elde edilen modelin F değerinin (0,0089) 0.05' den küçük olması modelin anlamlı olduğunu göstermektedir. Niozom yöntemi için sırasıyla kolesterol miktarı ve tween 20 miktarı etkili parametreler olarak belirlenmiş bunun yanı sıra besleme süresinin etkili bir parametre olmadığı sonucuna ulaşılmıştır. Tween 20 miktarı ve kolesterol miktarının partikül boyutu üzerinde etkili olması beklenen bir sonuçtur. Bunun nedeni niozomları oluşturan tween 20 ve kolesterol bir araya gelmesiyle oluşan hücre zarı benzeri yapıdır. Yüzey aktif madde ve stabilize edici ajan miktarı arttıkça hücre zarı benzeri bu yapı da büyümekte ve partiküllerin boyutları da artmaktadır (Kumar and Rajeshwarrao, 2011).

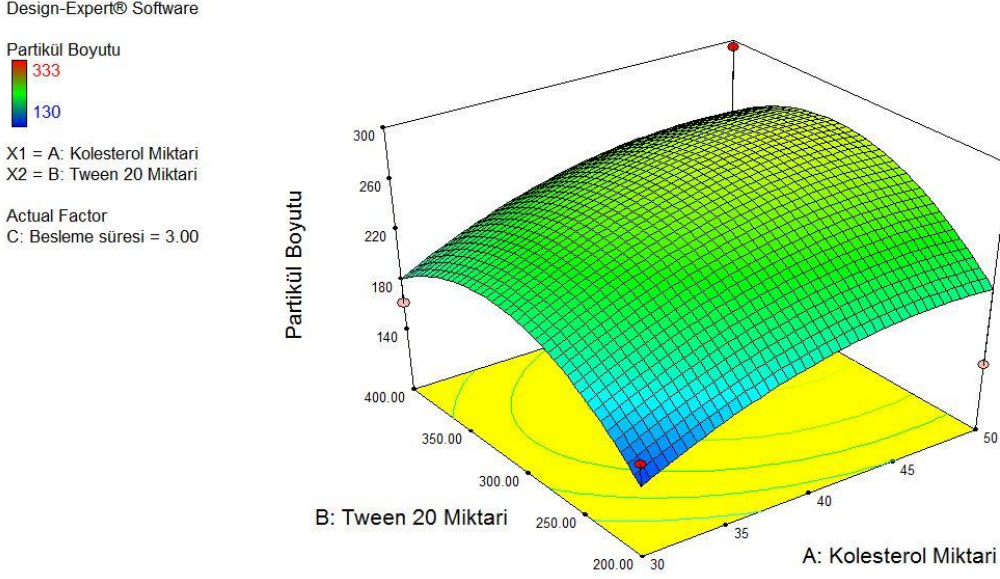
Optimum (minimum) partikül boyutunun elde edildiği formülasyonlar; 40 mg kolesterol, 131.82 tween 20, 2 dakika besleme süresi ve 30 mg kolesterol, 200 mg tween 20, 1 dakika besleme süresidir. Bu iki formülasyonda da sonuç olarak 130 nm boyutunda partiküller elde edilmiştir.

Çizelge 4.10. Niozom yöntemi için yapılan merkez-tümleşik tasarımın varyans analizi (ANOVA)

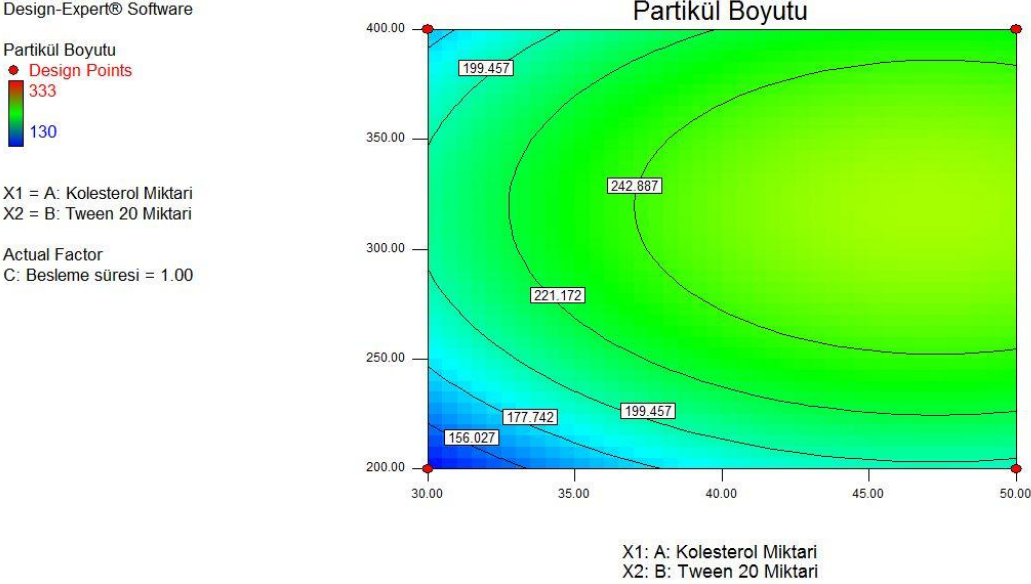
Kaynak	Kareler Toplamı	d.f.*	Ortalama Kareleri	F- Değeri	p Değeri (P) > F
Model	44934.03	6	7489.00	5.57	0.0089
A- Kolesterol miktarı	12229.65	1	12229.65	9.10	0.0130
B-Tween 20 miktarı	4737.59	1	4737.59	3.53	0.0898
C- Besleme süresi	398.99	1	398.99	0.30	0.5977
A²	4717.70	1	4717.70	3.51	0.0904
B²	26588.23	1	26588.23	19.79	0.0012
C²	5480.06	1	5480.06	4.08	0.0710
Artık değer	13434.44	10	1343.44		
Uygunsuzluk	9001.78	8	1125.22	0.51	
Saf hata	4432.67	2	2216.33		
Genel toplam	58368.47	16			
R²	0.7698				
R² adj	0.6314				
R² Pred	0.4509				

Tween 20 ve kolesterol miktarının partikül boyutu üzerindeki incelendiğinde (Şekil 4.5) yüzey aktif madde miktarı arttıkça partikül boyutunda bir artış gözlenmiş ardından maksimum konsantrasyonda tekrar bir düşüş gözlenmiştir. Fakat minimum boyutlarda partiküller (130 nm) düşük tween 20 miktarlarında (131.82 -200 mg) elde edilmiştir. Bütün denemelerde su fazı sabit hacimde tutulup yüzey aktif madde miktarı arttırıldığından yüksek miktarlardaki tween 20 yeterli oranda dağılmadığından birleşip büyük veziküller oluşturduğu

düşünülmektedir. Tween 20 ve kolesterol miktarının minimum olduğu koşullarda daha küçük partiküller (130-160 nm) elde edilmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Tween 20 ve kolesterol miktarının partikül boyutu üzerindeki etkisi



Şekil 4.6. Tween 20 ve kolesterol miktarının partikül boyutu üzerindeki etkisi (contour)

Genel olarak deney tasarımının partikül boyutu sonuçları incelendiğinde boyutlar arasında çok büyük farklılıkların olmadığı gözlenmektedir (Şekil 4.6). Partikül boyutları genellikle 150-300 nm aralığında değişmekte (yeşil alan), ve bu

sonucun tween 20/ kolesterol miktarı için seçilen aralıkların çok geniş olmaması ve birbirine yakın formülasyonların yapılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Design-Expert® Software

Partikül Boyutu

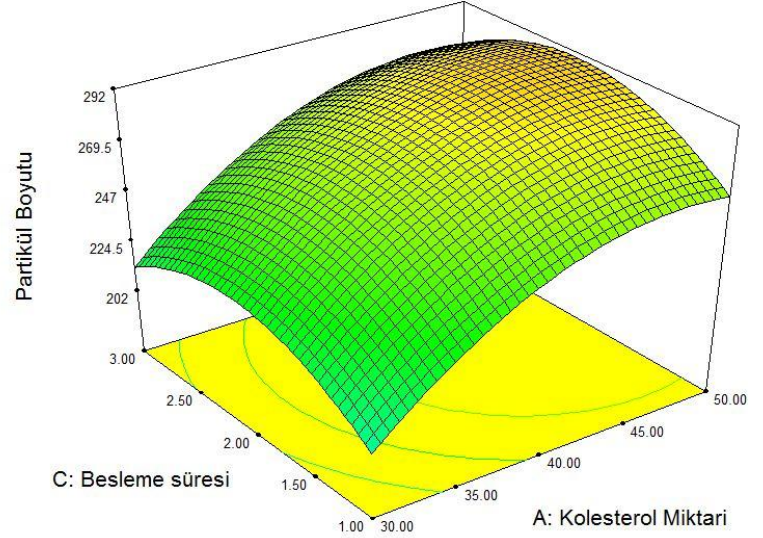


X1 = A: Kolesterol Miktarı

X2 = C: Besleme süresi

Actual Factor

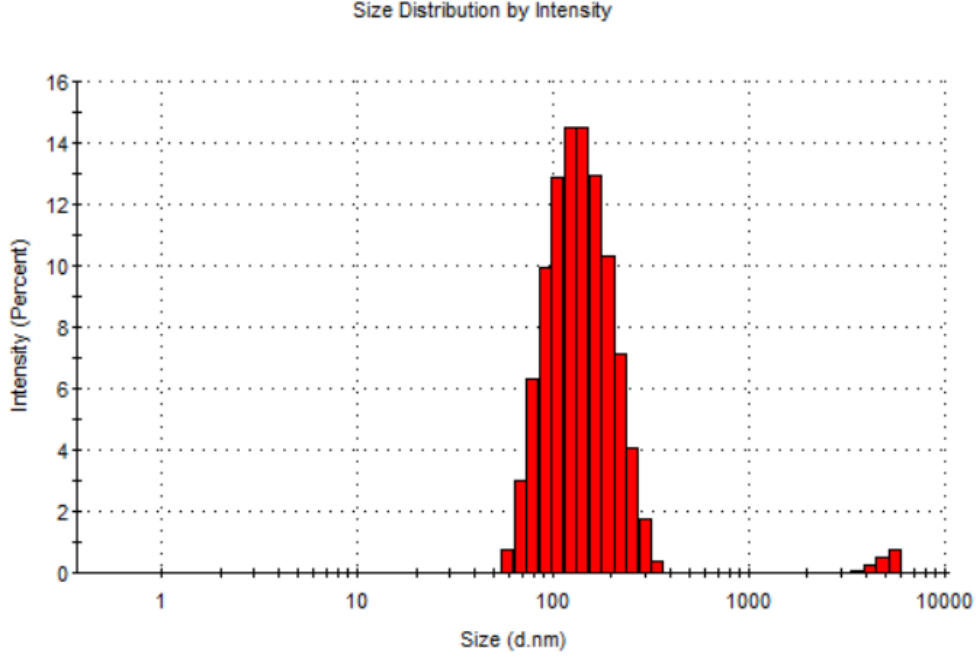
B: Tween 20 Miktarı = 305.13



Şekil 4.7. Besleme süresi ve kolesterol miktarının partikül boyutu üzerindeki etkisi

Besleme süresi ve kolesterol miktarının partikül boyutuna etkisi (Şekil 4.7) incelendiğinde; besleme süresinin boyut üzerinde çok fazla bir etkisinin olmadığı fakat sürenin 1 dakika olduğu durumda minimum boyutlarda partikül elde edildiği söylenebilmektedir. Besleme süresinin partikül boyutu üzerinde etkili olmadığı belirlenmiş olsa da eter enjeksiyon metodunun mantığına dayanarak diğer denemelerde çözücü, PBS içerisine yavaş yavaş eklenmiştir. Bunun nedeni yükleme sırasında partiküllerin oluşması için bu işlemin damla damla ve yavaş yapılması gerektiğinin vurgulanmış olmasıdır (Aggarwal et al., 2004; Sharma et al., 2009).

Nanopartikül üretiminde önemli bir diğer faktör olan PDI değerinin 0.1-0.7 aralığında olması başarı kistası olarak görülmektedir. Yapılan ölçümlerde niozom partiküllerin PDI değerleri 0.200-0.350 aralığında değiştiği belirlenmiştir. Şekil 4.8' de en iyi PDI değerine sahip örneğin yoğunluğa göre boyut grafiği sunulmuştur.



Şekil 4.8. 13 numaralı formülasyonun yoğunluğa göre boyut grafiği (PDI:0.179)

Deneme 13 ‘ ün yoğunluğa göre boyut grafiği incelendiğinde partikül boyutunun yaklaşık 100 nm’ de pik verdiği ve dar bir aralıkta değişen boyutlarda partiküller içerdiği söylenebilmektedir (Şekil 4.8).

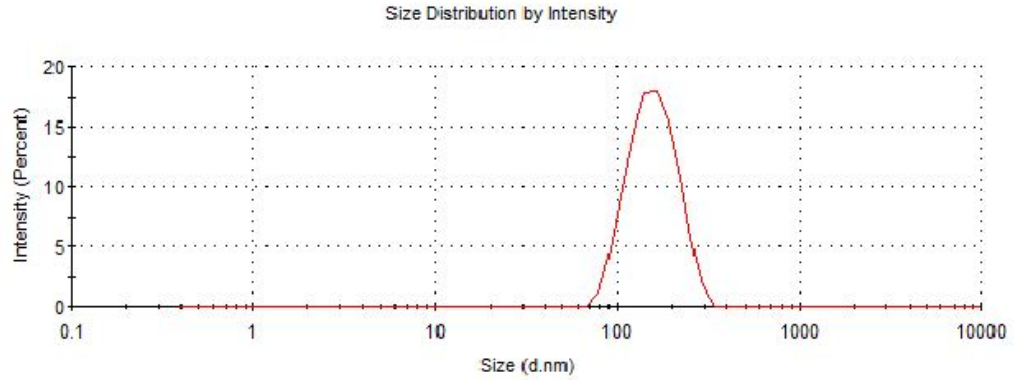
4.3.2.2. Niozom çalışmalarının devamı

Niozom yöntemi optimizasyonu için yapılan Taguchi ve Central Composite Design, CCD, deney tasarımı sonucu 2 farklı optimum koşul belirlenmiştir. Bunlar; 40 mg kolesterol, 131.82 tween 20, 2 dakika besleme süresi ve 30 mg kolesterol, 200 mg tween 20, 1 dakika besleme süresidir. Anova analizi sonucu besleme süresi anlamlı parametre olarak belirlenmediği denemelere bu parametre dahil edilmeden devam edilmiştir (Çizelge 4.10). Fakat tween 20 ve kolesterol miktarı için 2 farklı formülasyon ile optimum partikül boyutu elde edilmiş, bu nedenle tek bir formülasyon elde edilebilmesi için denemelere devam edilmiştir. Tween 20 miktarının etkisi ayrı deney setleriyle incelenmiştir. Denemelerde kolesterol miktarı sabit 30 mg kullanılmıştır (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.11. Tween 20 konsantrasyonunun partikül boyutuna etkisi

Formülasyon no	Kolesterol miktarı (mg)	Tween 20 miktarı (mg)	Ortalama partikül boyutu (nm)
F1	30	200	260
F2	30	150	135
F3	30	100	147
F4	30	50	183

Çizelge 4.11’ de verildiği üzere en iyi partikül boyutu F2 formülasyonunda elde edilmiştir. Ayrıca en iyi PDI değeri (0.133) 150 mg tween 20 ‘ nin kullanıldığı formülasyonda elde edilmiş, bu nedenler göz önüne alınarak çalışmalara F2 formülasyonu ile devam edilmiştir (Şekil 4.9).



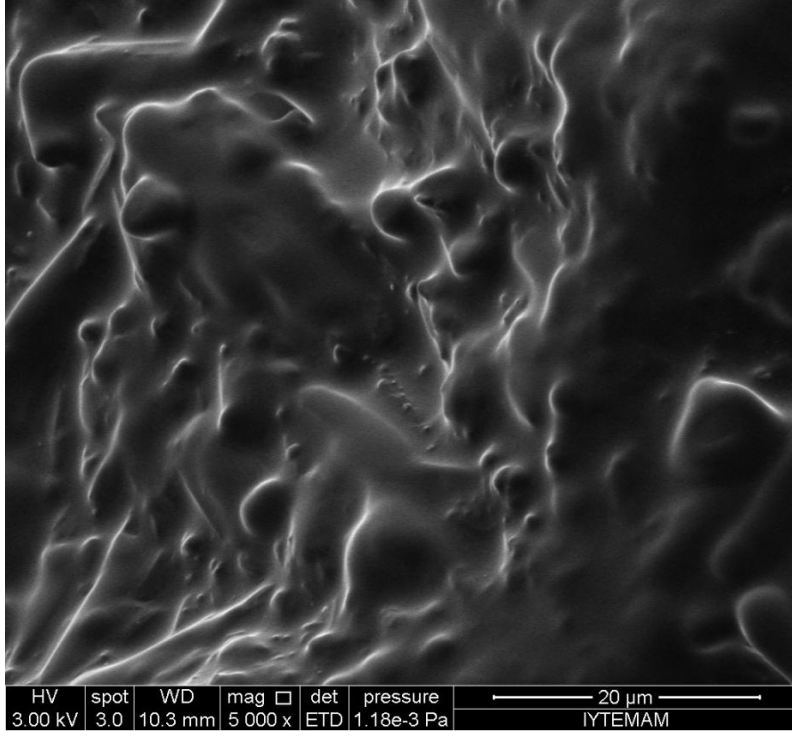
Şekil 4.9. F2 no’ lu formülasyonun yoğunluk-boyut grafiği

4.4. Partiküllerin Karakterizasyonu

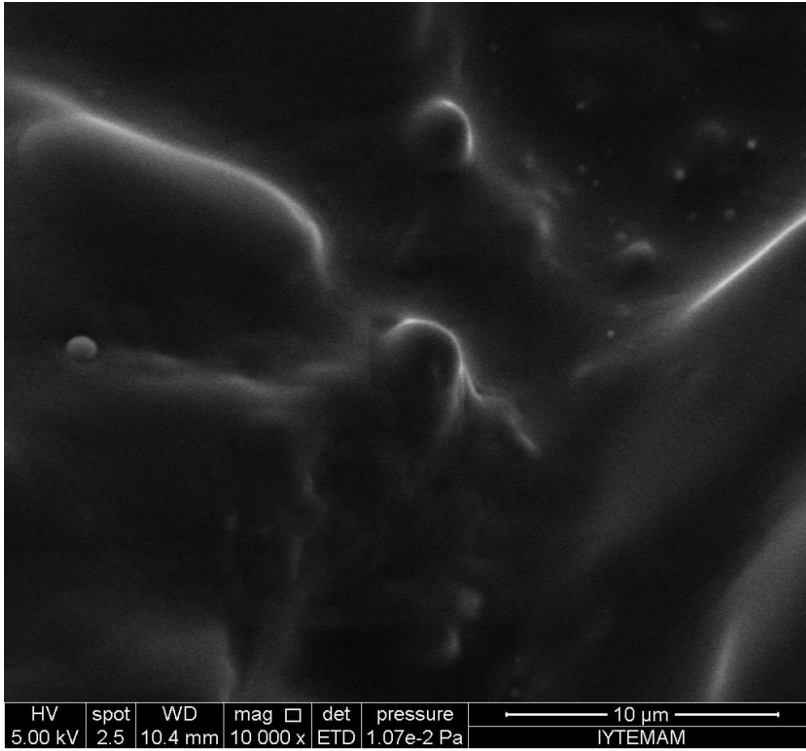
4.4.1. Partiküllerin Görüntülenmesi

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) kullanılarak boş ve kara havuç ekstresi yüklü niozom nanopartiküllerin morfolojik değerlendirmeleri yapılmıştır. Ekstre yüklemesi gerçekleştirilmemiş boş niozom partiküllerinin farklı büyütmedeki SEM görüntüleri, Şekil 4.10., Şekil 4.11., Şekil 4.12.’ de verilmiştir.

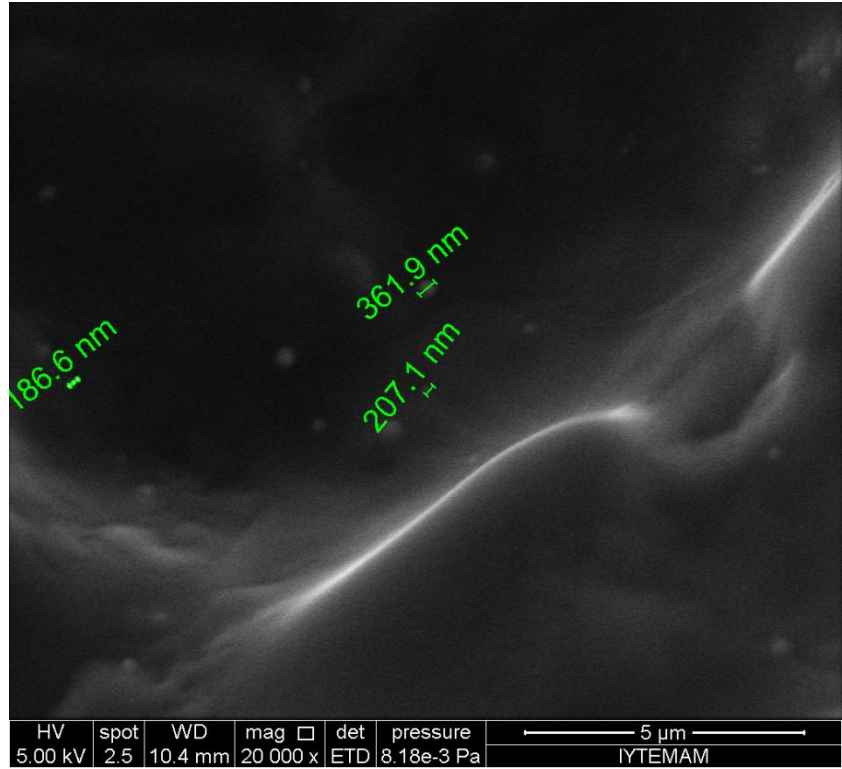
Boş niozom partiküllerinin yaklaşık 200-400 nm boyutlarına sahip küresel yapıda oldukları belirlenmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.10. Boş niozom partiküllerinin taramalı elektron mikroskobu görüntüsü (5000X)



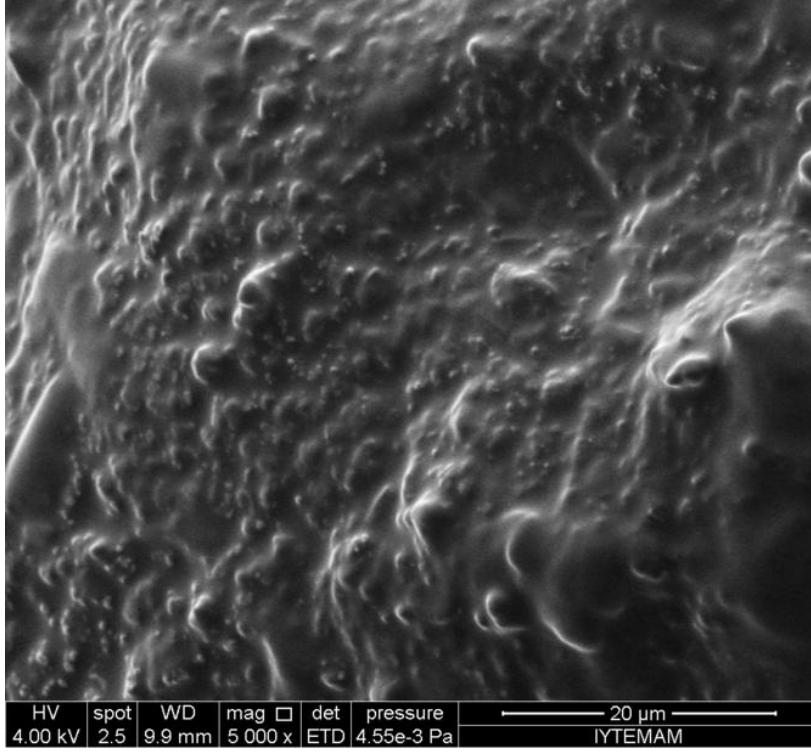
Şekil 4.11. Boş niozom partiküllerinin taramalı elektron mikroskobu görüntüsü (10 000X)



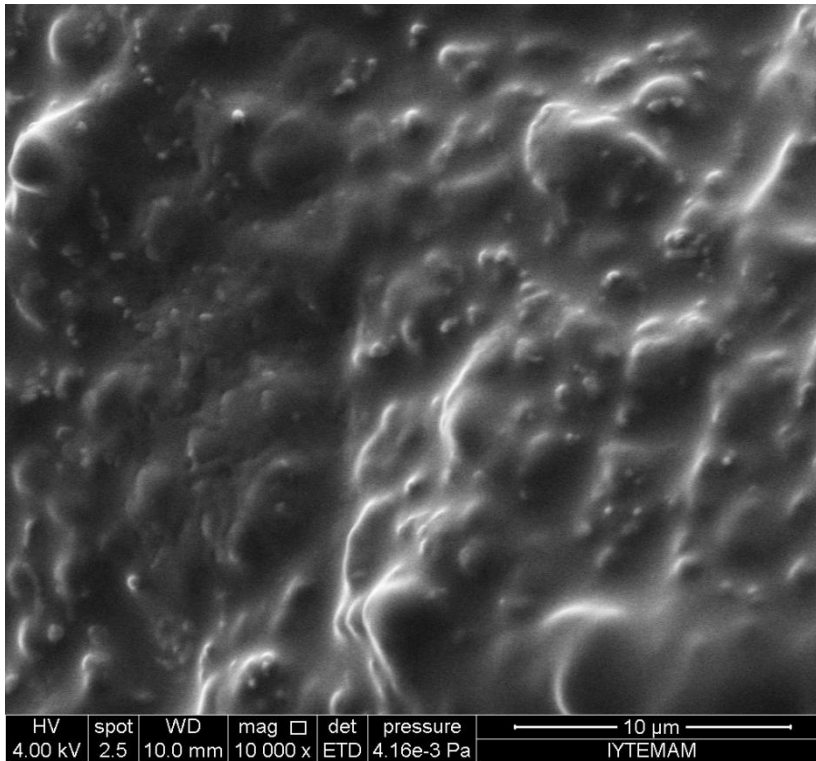
Şekil 4.12. Boş niozom partiküllerinin taramalı elektron mikroskobu görüntüsü (20 000 X)

Şekil 4.10 ' da görülen engebeli yüzeyin, partiküllerin liyofilizasyonu sırasında birbirine yapışmaları nedeniyle gerçekleştiği düşünülmektedir. Engebeli yüzey üzerindeki kabartılar partiküller olmakla birlikte agregre olarak bu görüntüye ulaşmışlardır. Ayrıca yapıların çok küçük olmasına bağlı olarak, altın ile kaplanmaları ve analiz sırasında artan sıcaklık nedeniyle erimeleri sonucunda, partiküller çok net görülemedi. Boş niozom partikülleri yaklaşık 200 nm boyutlarında iken dolu partiküllerin boyutları yaklaşık 240 nm olarak belirlenmiştir. Bunun sebebi ise yükleme sonrası partiküllerin az da olsa boyutlarının büyümesi olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.15).

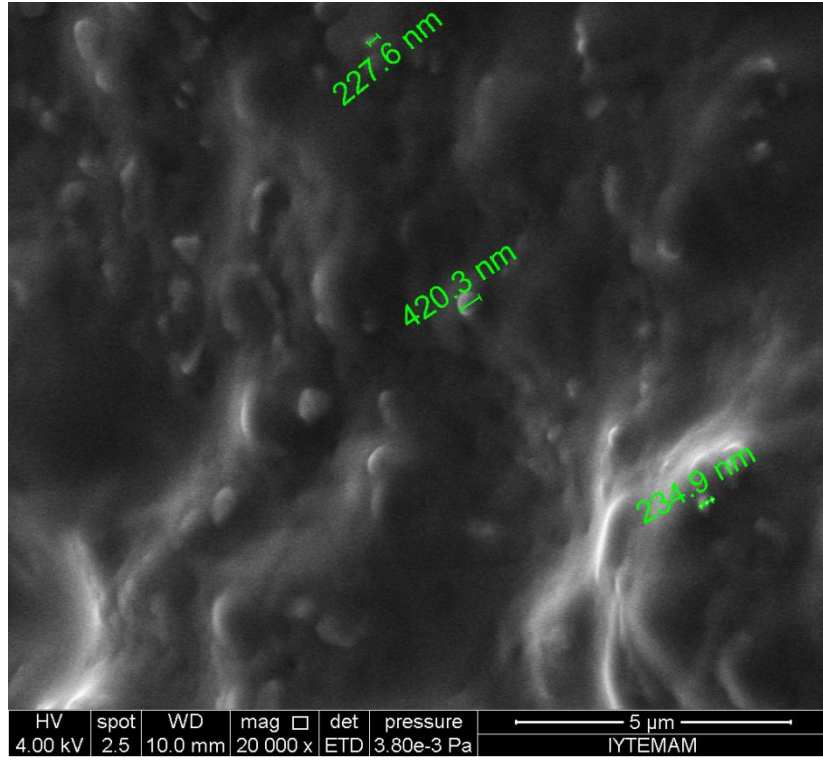
Kara havuç ekstresi ile hazırlanan dolu niozom partiküllerinin farklı büyütmedeki SEM görüntüleri, Şekil 4.13, Şekil 4.14., Şekil 4.15' de verilmiştir.



Şekil 4.13. Yüklü niozom partiküllerinin taramalı elektron mikroskobu görüntüsü (5000X)



Şekil 4.14. Yüklü niozom partiküllerinin taramalı elektron mikroskobu görüntüsü (10 000X)

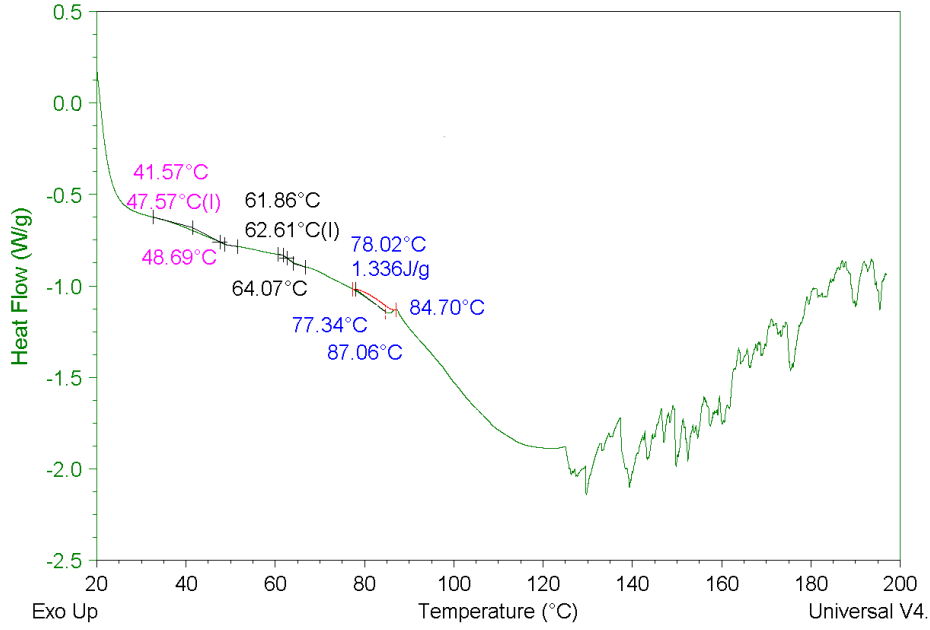


Şekil 4.15. Yüklü niozom partiküllerinin taramalı elektron mikroskobu görüntüsü

(20 000 X)

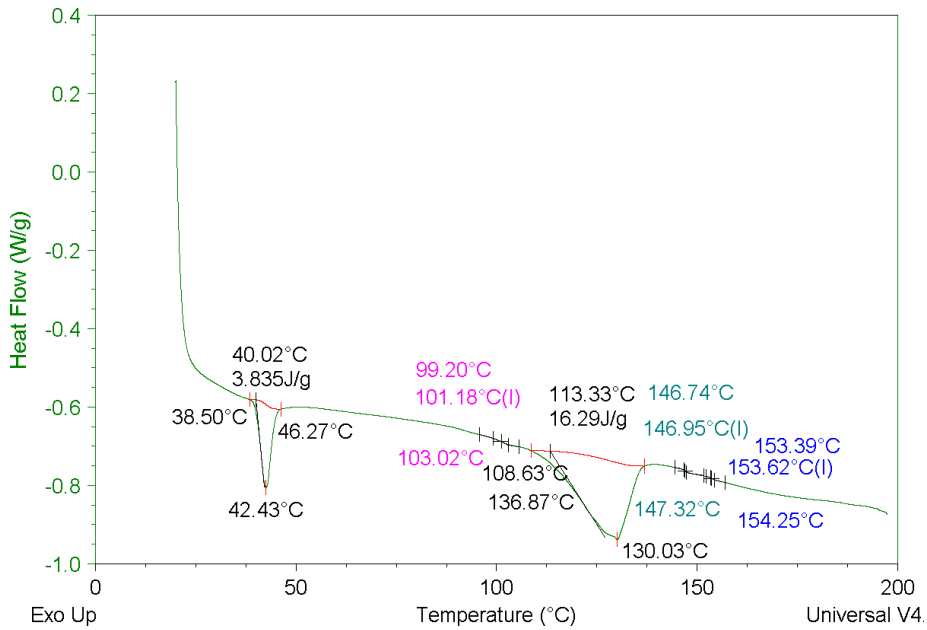
4.4.2. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) analizi

DSC cihazı kullanılarak hazırlanan etkin madde yüklü formülasyonun, bu formülasyonun hazırlanması sırasında kullanılan etkin maddenin ve boş formülasyonun termogramları alınmış ve bunlar Şekil 4.16, Şekil 4.17, Şekil 4.18 ve Şekil 4.19' da gösterilmiştir.

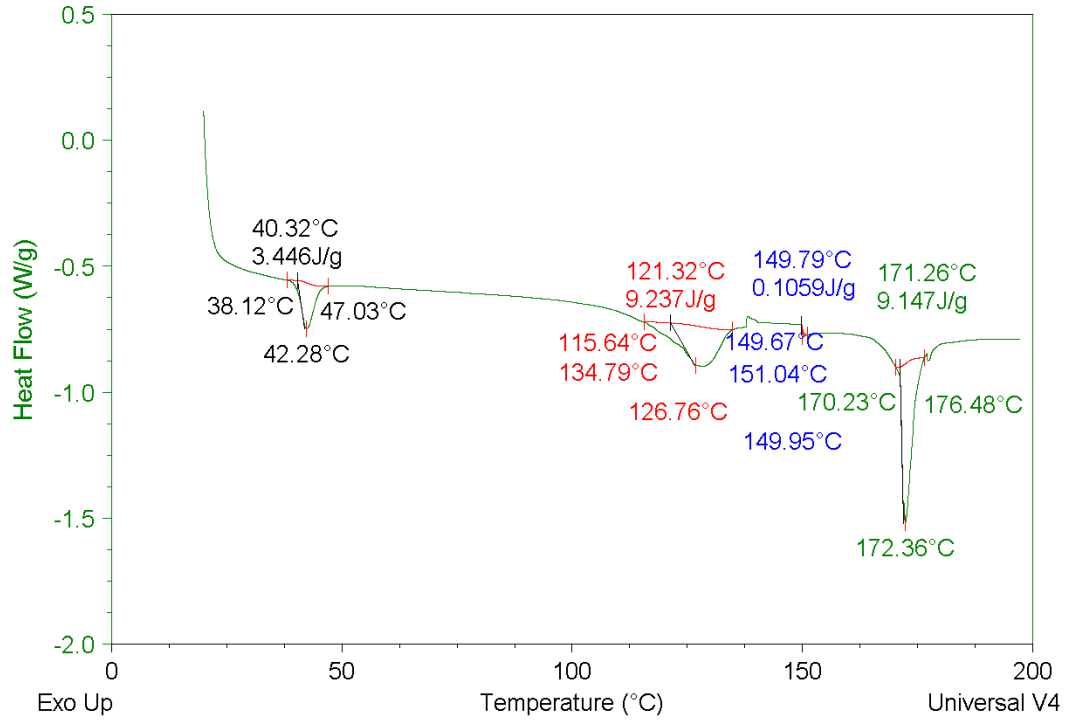


Şekil 4.16. Kara havuç ekstresine ait DSC diyagramı

Kara havuç ekstresinin 20-200°C aralığında yapılan termal analizine bakıldığında erime sıcaklığının (T_m) 62.1 °C ve geçiş sıcaklığının (T_g) 78.02 °C olduğu belirlenmiştir. Antosiyaninlerin ısıya duyarlı, stabilitesi düşük maddeler olduğu düşünüldüğünde, düşük erime ve geçiş sıcaklığına sahip olmaları beklenen bir sonuçtur. Şekil 4.16' da görüldüğü üzere 120°C' den sonraki pikler yorumlanamaz iken, bu dağınık pikler maddenin bozulduğunun göstergesidir.



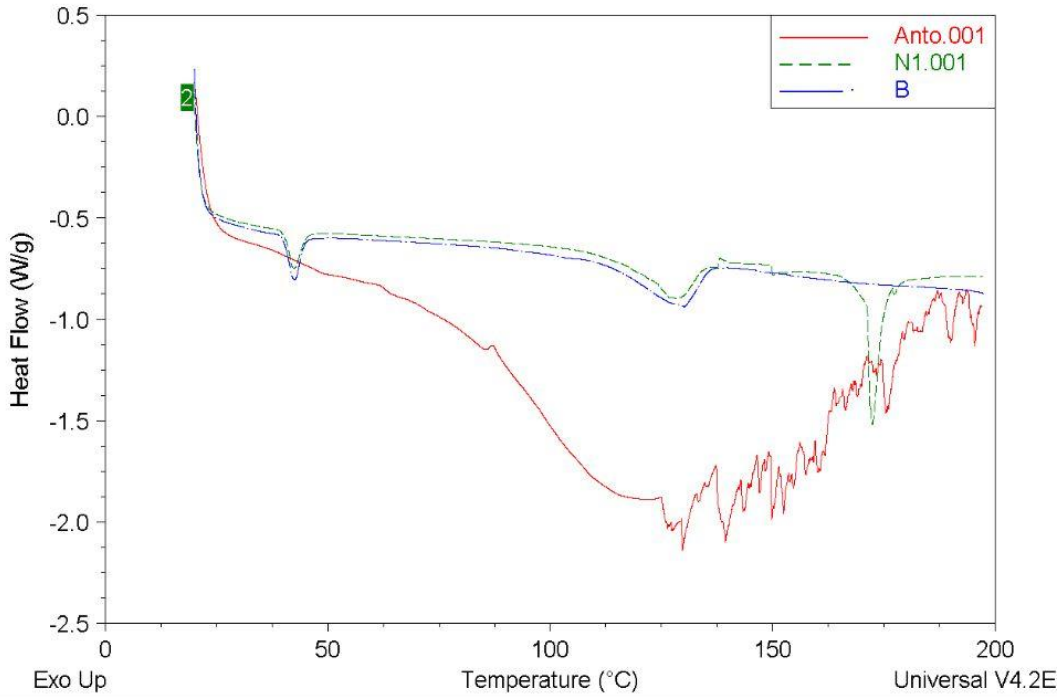
Şekil 4.17. Boş niozom formülasyonuna ait DSC diyagramı



Şekil 4.18. Yüklü niozom formülasyonuna ait DSC diyagramı

Şekil 4.17’ de görüldüğü üzere boş niozom formülasyonunun erime sıcaklığı (T_m) 130.03°C , geçiş sıcaklığı (T_g) 153.62°C olarak belirlenmiştir. Yüklü niozom formülasyonunun erime sıcaklığı (T_m) 172.36°C , geçiş sıcaklığı (T_g) 151.04°C olarak belirlenmiştir (Şekil 4.18).

Diyagram üzerinde yaklaşık 42°C ve 130°C ’ de olmak üzere 2 ayrı endotermik pik gözlenmiştir. Bu pikler hem boş hem de yüklü partiküllerde aynı sıcaklıklarda gözlendiği için bunun niozom yapısındaki tween 20-kolesterol bağıyla ilgili olduğu düşünülmüştür (Şekil 4.17, Şekil 4.18). Niozomlarla benzer yapıya sahip kolesterol içeren lipozom partiküllerinin DSC analizlerinde yaklaşık 45°C ’ de pik gözlenmiş ve bunun formülasyon kaynaklı olduğu belirtilmiştir (Wu et al., 2012). Ayrıca tween 20 ve kolesterolün düşük geçiş sıcaklığına sahip olduğu bilinmektedir. Bu da formülasyon kaynaklı bir yapıdan kaynaklandığını kanıtlar niteliktedir.



Şekil 4.19. Yüklü niozom formülasyonu (yeşil), boş niozom formülasyonu (mavi) ve kara havuç ekstresinin (kırmızı) toplu DSC diyagramı

Ekstre yüklü niozom, boş niozom ve ekstrenin üçlü diyagramı Şekil 4.19’ da gösterilmiştir. Boş ve yüklü partiküllerin 172°C’ deki pike kadar aynı noktalarda pik göstermesi nedeniyle bunların formülasyon kaynaklı termal pikler olduğu yorumu yapılmıştır. Literatürdeki bilgilere dayanarak 42°C’ deki pikin tween 20’ nin faz geçiş sıcaklığı olduğu düşünülmektedir.

Ekstrenin tek diyagramıyla karşılaştırıldığında 120°C’ de bozunma gözlenmemiş aksine ekstre yüklü partiküller 172°C’ ye kadar erime göstermemiştir. Burada ekstrenin yüksek sıcaklığa karşı korunduğu yorumu yapılmıştır.

4.4.3. Partiküllerin Yükleme Veriminin Belirlenmesi

Optimizasyon çalışmaları sonucu elde edilen formülasyonda niozom partikülleri ekstre ile hazırlanmış, yükleme verimleri pH diferansiyel metod ile belirlenmiş ve sonuçlar hesaplanmıştır (Çizelge 4.12).

Çizelge 4.12. Yükleme verimi çalışmaları

Formülasyon kodu	Kolesterol	Tween 20	Yükleme verimi
D1	30 mg	150 mg	% 20
	30 mg	150 mg	% 37
	30 mg	150 mg	% 45
	30 mg	150 mg	% 38
	30 mg	150 mg	% 17
	30 mg	150 mg	% 30
D2	30 mg	200 mg	% 10
D3	30 mg	100 mg	% 13
D4	50 mg	150 mg	% 29

Yükleme verimlerinin % 50' nin altında kalması nedeniyle formülasyonda değişiklikler yapılarak verimin artırılıp artırılamayacağı incelenmiştir (Çizelge 4.12). Fakat tween 20 miktarının artırıldığı ve azaltıldığı (100-200 mg) durumda da yükleme veriminin düştüğü gözlenmiştir. Kolesterol miktarının arttığı durumda ise büyük bir fark gözlenmemiş, partikül boyutunun büyümemesi için 30 mg kolesterol miktarı ile denemelere devam edilmiştir. Lingan et al. (2011) yaptıkları çalışmada artan kolesterol miktarı ile partiküllerin yükleme verimlerinin düştüğünü saptamıştır. Bu durumun yüksek miktardaki kolesterolün kapsüle edilecek alanda etkin madde ile rekabete girmesi ve ya limitlerin üzerindeki miktarda kolesterolün partikül membranındaki doğrusal yapıyı bozması nedeniyle olduğunu belirlemiştir. Bu nedenle partikül formülasyonlarında 30 mg kolesterol miktarı aşılmadan çalışmalara devam edilmiştir.

Yükleme verimi çalışmalarında aynı formülasyonun tekrarlanması sonucu farklı yükleme verimleri elde edilmiştir. Partikül boyutu çalışmalarında seçilen D1 formülasyonunun 6 tekrarında yükleme verimleri % 20-45 aralığında değişmiştir. Bunun nedeninin, niozomların hazırlanması sırasında çevresel birçok faktörün enkapsülasyonda etkili olduğu ve her denemede farklı verimlerin elde edildiği düşünülmüştür.

Hazırlanan niozom partiküllerinin oldukça küçük boyutlarda olmaları enkapsüle edebilecekleri madde miktarını kısıtlar iken bunun yanı sıra etkin

maddemizin (kara havuç ekstresi) oldukça polar yapıda olmasının yükleme veriminin düşük olmasına sebep olduğu yorumu yapılmıştır. Eter enjeksiyon yönteminin hidrofilik maddelerin enkapsülasyonunda düşük verime sahip olduğu daha önceki çalışmalarda belirtilmiştir (Aggarwal et al., 2004). Yapılan bir niozom çalışmasında (Aggarwal et al., 2004) acetazolamide adlı etken madde eter enjeksiyon yöntemi ile enkapsüle edilmiş ve yükleme verimi % 29, 39, 43 olarak 3 farklı değerde belirlenmiştir. Bunun yanı sıra niozomların eter enjeksiyon yöntemi hidrofobik maddeleri yüksek verimlerde (% 80-90) enkapsüle ettiği birçok çalışma ile gösterilmiştir (Sharma et al., 2009; Sundaresan et al., 2012; Yasin et al., 2012).

Niozom yapısında hidrofobik etkin maddelerin yüzey aktif madde (surfaktan)-kolesterol çemberinin içerisinde, hidrofilik etken maddelerin ise partikülün çekirdek (z) kısmında enkapsüle edildiği bilinmektedir. Kara havuç ekstresi de bu öz kısmında enkapsüle edilmekte fakat enkapsüle edilen miktar düşük olmaktadır. Bu durumun antosiyaninlerin oldukça polar yapıda olmaları ve suda çok znmelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Sonuç olarak çeşitli yükleme verimi denemeleri sonucunda (izelge 4.12) en uygun formülasyon partikül boyutu denemelerinde olduğu gibi D1 (30 mg kolesterol, 150 mg tween 20) formülasyonu olarak belirlenmiş ve salım kinetiği çalışmalarına bu formülasyon ile devam edilmiştir.

4.5. *In vitro* Salım alışmaları

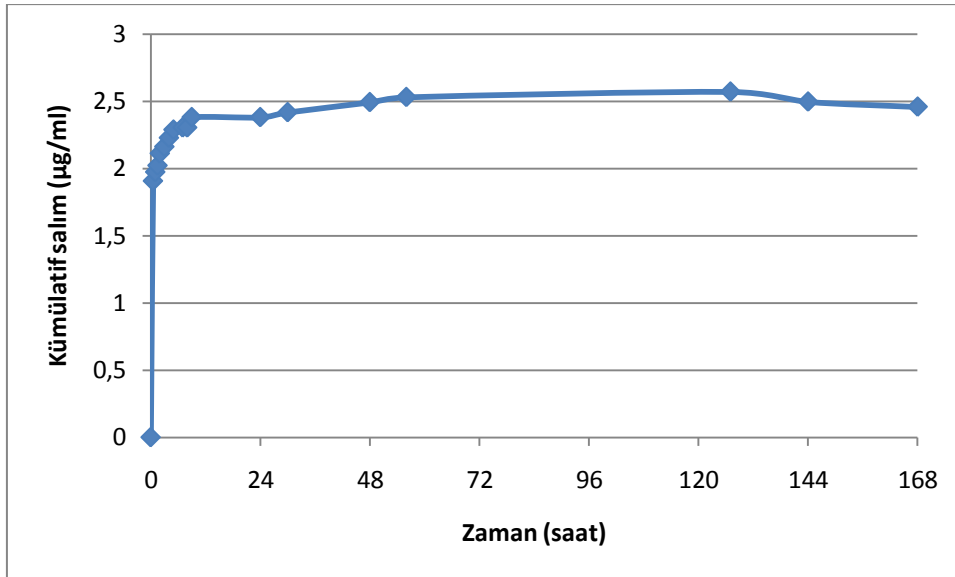
Niozom partiküllerinin *in vitro* salım alışmaları Bölüm 3.6.5' de açıklanan şekilde gerçekleştirilmiştir. Salım çalışmalarında partikül boyutu ve yükleme verimi çalışmaları sonucu belirlenen D1(30 mg kolesterol, 150 mg tween 20) formülasyonu kullanılmıştır.

Çalışmada model antosiyanin kaynağı olarak kullanılan kara havuç su ekstresinin farklı antosiyaninler içerdiği yapılan HPLC analizleri ile belirlenmiştir (şekil 4.20). Toplam antosiyanin içeriği siyanidin-3-glikozit (eşdeğeri) standardına göre hesaplanmış olmasına rağmen ekstre içerisinde siyanidin-3-

Bu sebeplerden dolayı sonuçların yanıltıcı olmaması için yükleme verimleri teorik olarak her 3 deneme için de % 30 alınmış, salım denemelerinde elde edilen piklerden konsantrasyon hesabı, tek bir pik gibi düşünülerek toplam alan üzerinden Bölüm 3.3.2' de verilen formül ile hesaplanmıştır.

Yapılan ilk denemede 15, 9 μg antosiyanin yüklü partiküller kullanılmış fakat 7 gün boyunca alınan örneklerin UPLC analizleri sonucu salıma ait herhangi bir pik gözlenememiştir. 7 günün sonunda alınan örnekte bir pik gözlenmiş fakat ardından alınan örneklerde yine bu pik gözlenememiştir. Yüklenen antosiyaninin konsantrasyonunun düşük olması ve salım ortamı (100ml) hacminin yüksek olması nedeniyle salınan antosiyaninlerin dedekte edilemediği ve çok seyreltik bir çözelti elde edildiği yorumu yapılmıştır. Antosiyaninlerin stabilitesi çevresel faktörlerden etkilendiği için salımın uzun sürmesi sonucu etkin maddenin kaybının da gerçekleşmiş olabileceği düşünülmüştür.

Yapılan diğer denemelerde yüklenen ekstre daha konsantre hale getirilmiş (53,71 $\mu\text{g}/\text{ml}$ -100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ve bu şekilde yükleme gerçekleştirilmiştir. Ayrıca PBS salım ortamı hacmi 100 ml' den 50 ml' ye düşürülerek kullanılmıştır. Üç tekrarlı yapılan salım çalışmaları sonucunda aşağıdaki (Şekil 4.21) salım profili elde edilmiştir.

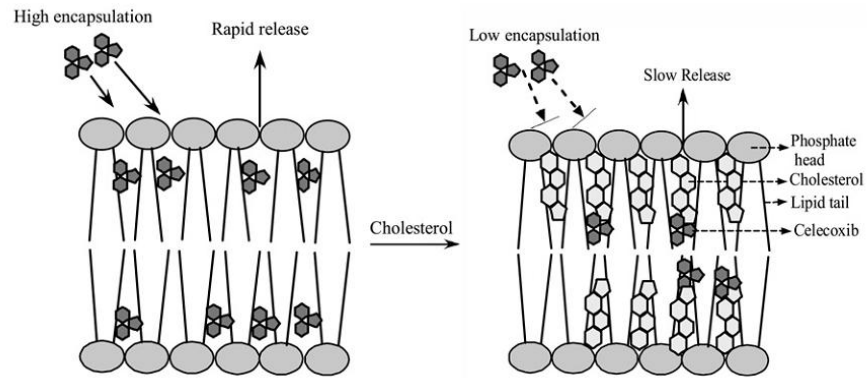


Şekil 4.21. Zamana karşı kümülatif salım profili

Niozom partiküllerinin ilk yarım saatteki patlama etkisinden sonra salımın yaklaşık %90' ının 10. saatte tamamlandığı belirlenmiştir. Daha sonra devam eden yavaş salım 120. saatte tamamlanmıştır. 120. saatten sonra ise ortamdaki antosiyaninlerin sıcaklığında etkisi ile bozunduğu saptanmıştır. Niozom ile yapılan çalışmalarda da salımların 24 saat (Parthibarajan et al., 2013), 12 saat (Yasin et al., 2012), 6 saat (Aggarwal et al., 2004) gibi kısa sürelerde tamamlandığı rapor edilmiştir.

Kara havuç niozomları ise ilk 30 dakikadaki ani patlama sonrası yavaş bir salım 5. güne kadar devam etmiştir. Bu durumun kara havuç ekstresinin suda çözünürlüğünün yüksek olması sebebiyle salım ortamına alındığında ani bir difüzyona uğraması, ardından kolesterol ve tween 20' nin ekstreyi daha yavaş salması sebebiyle gerçekleştiği düşünülmüştür.

Ekstrenin hidrofilik özelliğinin yanında partikül formülasyonunda kullanılan yüzey aktif madde (tween 20) ve stabilize edici (kolesterol) maddelerin de yükleme verimi ve salıma olan etkisi Şekil 4.22' de gösterilmiştir.



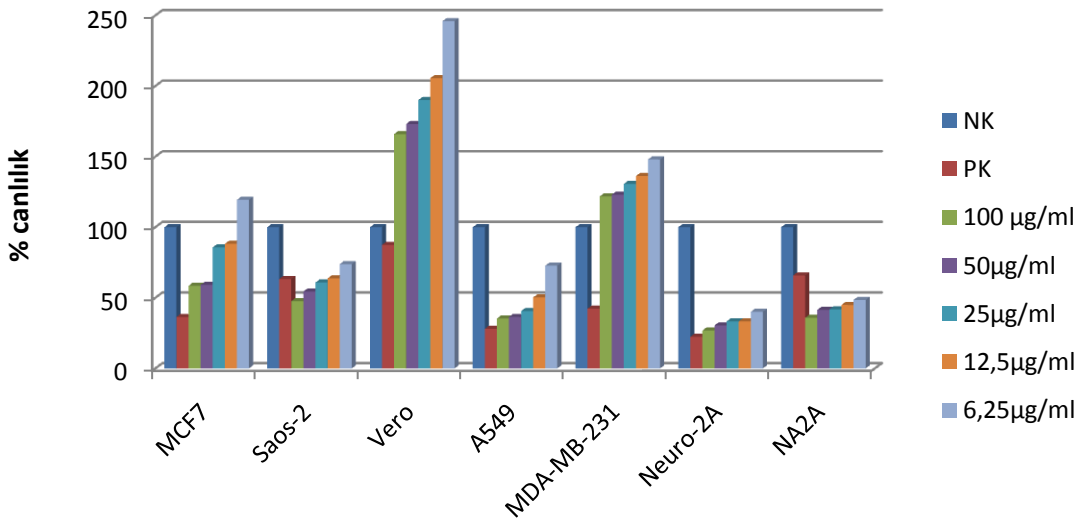
Şekil 4.22. Kolesterolün enkapsülasyona ve salım hızına olan etkisi

Deniz et al. (2010) lipozomlar ile yaptıkları çalışmada kolesterol kullanılmayan formülasyonunu yüksek yükleme verimine ve hızlı salıma sahip olduğunu, kolesterolün kullanıldığı formülasyonun ise düşük yükleme verimine ve yavaş salım hızına sahip olduğunu belirlemiştir (Şekil 4.22). Bu açıdan bakıldığında kara havuç yüklü niozom partiküllerinin formülasyonlarında kolesterol bulunduğundan dolayı yavaş salım hızına ve düşük yükleme verimine sahip olmaları açıklanabilmektedir.

Niozomlar yapısal açıdan incelendiklerinde moleküler etkileşimlere oldukça açık partiküllerdir. Enkapsüle edilen etkin maddenin partikülün membran yapısı ile etkileşimi yükleme verimi ve salım çalışmalarında oldukça önemlidir. Örneğin Hao et al. (2002) tarafından hazırlanan niozom partikülleri salım çalışması sonunda içerdiği etkin maddenin sadece %16' sını salarken, Mehta and Jindal (2013) yaptıkları çalışmada niozom partikülleri etkin maddenin yaklaşık % 85' ini salmıştır. Bu da yapılan her çalışmanın farklı ve özgün sonuçlar içerdiğini göstermekte ve yapılacak çalışmalara örnek olmaktadır.

4.6. *In vitro* Sitotoksikite Çalışmaları

Çalışma kapsamında kullanılan kara havuç su ekstresinin ve yüklü niozom partiküllerinin 7 farklı kanser hücre hattındaki sitotoksik aktivitesi incelenmiştir. Kara havuç ekstresinin 5 farklı konsantrasyonunun hücre kültürü sonuçları Şekil 4.23' de verilmiştir. Grafikte bulunan % canlılık ifadesi MTT sonucu okunan absorbanslar ile hesaplanan kültür ortamında canlı kalan hücre yüzdesini göstermektedir (Şekil 4.23).

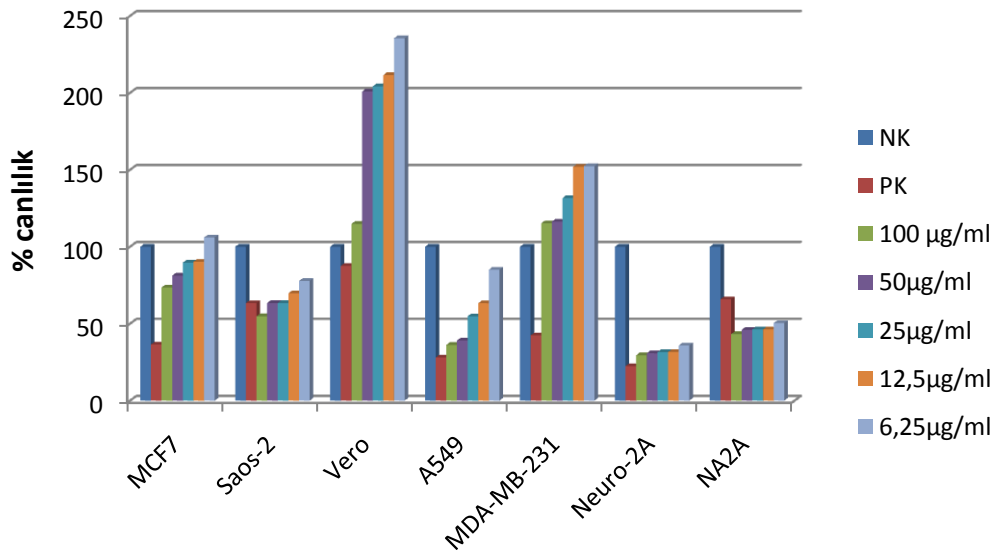


Şekil 4.23. Kara havuç ekstresinin farklı hücre hatlarındaki sitotoksik aktivitesi (NK: negatif kontrol, PK: pozitif kontrol)

Sevimli-Gür et al. (2013) yaptıkları çalışmada kara havuçtan kallus kültürü ile elde ettikleri kallilerin, ultrasonik yardımcı etanol ekstresinin Neuro-2A beyin

kanser hücrelerine karşı sitotoksik aktiviteye sahip olduğunu kanıtlamışlardır. Çalışma kapsamında yapılan hücre kültürü sonucunda da yine en yüksek sitotoksik aktivite Neuro-2A beyin kanser hücrelerine karşı belirlenirken, bunu A549 akciğer kanser hattı izlemiştir. Kara havuç ekstresinin konsantrasyonu arttıkça Neuro-2A hücre canlılığında azalma gözlenirken, en düşük % canlılık, 100µg/ml konsantrasyonda saptanmıştır. Ayrıca Vero normal hücre hattında sitotoksik aktiviteye sahip olmaması, ekstrenin kanser hücrelerinin yanında sağlıklı hücrelere karşı negatif etkisinin olmayacağını göstermiştir.

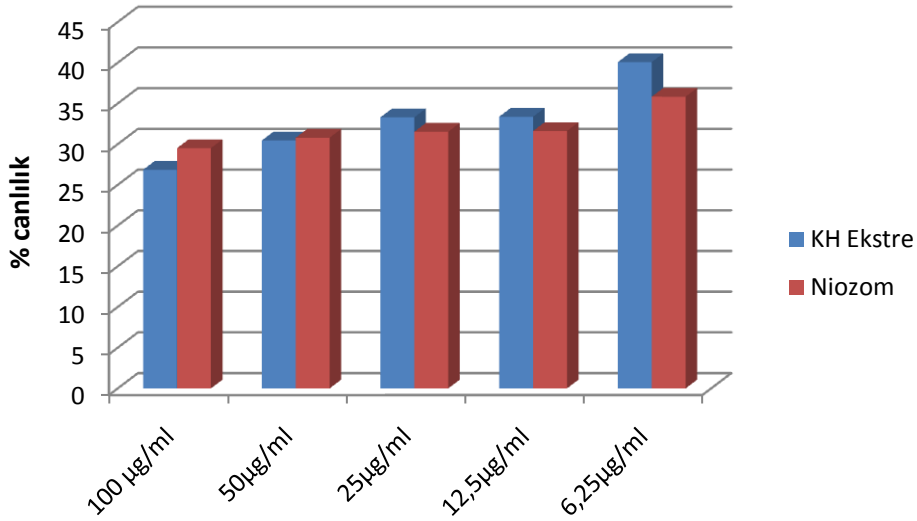
Kara havuç ekstresi ile yüklü niozom partiküllerinin 7 farklı kanser hücre hattındaki sitotoksik etkisi şekil 4.24' de verilmiştir.



Şekil 4.24. Yüklü niozom partiküllerinin farklı hücre hatlarındaki sitotoksik aktivitesi

Kapsüle edilmiş ekstre de serbest formdaki ekstre ile aynı şekilde en yüksek sitotoksikiteyi Neuro-2A beyin kanser hücre hattında göstermiştir. Buradan enkapsülasyon işlemi sırasında kullanılan tween 20 ve kolesterolün, ekstrenin aktivitesini etkilemediği sonucuna varılmıştır. Niozom partiküllerinin Neuro-2A hücrelerine karşı aktivitesi en yüksek 100 µg/ml konsantrasyonda gözlenirken azalan seyreltmelere rağmen canlılıkta çok büyük artışlar saptanmamıştır.

Enkapsüle edilmemiş ve niozom yöntemi ile enkapsüle edilmiş kara havuç ekstresinin karşılaştırmalı sitotoksik aktivitesi Şekil 4.25' de verilmiştir.



Şekil 4.25. Serbest ve enkapsüle kara havuç ekstresinin Neuro-2A hücre hattındaki sitotoksik aktivitesi

Her iki örnek için de canlılık oranı konsantrasyon azaldıkça artmış olmasına rağmen en düşük konsantrasyonda (6,25 µg/ml) niozom partiküllerinin aktivitesi ekstreye göre daha yüksek çıkmıştır. Niozom seyreltmeleri toplam kuru ağırlığa göre yapılmış olmasına rağmen yaklaşık olarak ekstre ile aynı aktiviteyi göstermiş ve hem ekstrenin hem de yüklü niozom partiküllerinin IC₅₀ değeri 6,25 µg/ml olarak saptanmıştır. Bu verilere dayanarak niozomların ekstreyi çevresel faktörlerden (ısı, ışık, pH değişimi) koruyarak aktivitesinin daha yüksek kalmasını sağladığı sonucuna varılmıştır.

5. SONUÇ

Bu tez çalışması kapsamında stabilitesi çevresel faktörlerden etkilenen ve in vivo biyoyararlanımı düşük olan antosiyaninlerin farklı tekniklerle enkapsülasyonu amaçlanmıştır.

Bu amaç doğrultusunda öncelikle, antosiyanin kaynağı olarak kara havuç bitkisi kullanılmış ve iki farklı teknik ile ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon için çözücü olarak su kullanılmış ve en yüksek antosiyanin verimine sahip olan yöntem, tekrarlı ultrasonik ekstraksiyon yöntemi olarak belirlenmiştir.

Çift emülsiyon çözücü buharlaştırma ve niozom yöntemi için, daha az sayıda deneme ile optimizasyonun gerçekleştirilebildiği Taguchi Metodu seçilmiş ve deney tasarımı hazırlanmıştır. Deney tasarımı sonucu çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile elde edilen partiküllerin boyutlarının çok yüksek olması (400-600 nm), stabilitelerinin düşük olması ve dağılımlarının kötü olması sebebiyle denemelere bu yöntem ile devam edilmemiştir.

Enkapsülasyon için kullanılacak diğer yöntem niozom olarak seçilmiş, optimizasyon çalışmaları Taguchi ve Merkezi Tümlleşik Tasarım (CCD) deney tasarımları ile gerçekleştirilmiş ve partikül boyutu üzerine en etkili parametre kolesterol miktarı olarak belirlenmiştir.

Çalışmanın amacı beyin tümör hücrelerine karşı sitotoksik etkiye sahip kara havuç ekstresinin teorik olarak kan beyin bariyerini geçebilecek nanopartiküller ile enkapsülasyonu olduğundan optimum formülasyon en düşük partikül boyutuna (ortalama 130 nm) ve düşük PDI değerine (ortalama 0.133) sahip olan kombinasyon seçilmiştir.

Belirlenen formülasyonun karakterizasyonu DSC, SEM analizleri ile gerçekleştirilmiş ve partiküllerin yükleme verimi belirlenmiştir. Kara havuç su ekstresinin enkapsülasyon denemeleri sonucunda formülasyonun yaklaşık % 30 yükleme verimine sahip olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Partiküllerin yükleme verimlerinin düşük olması literatür bilgilerine dayanarak, kullanılan yöntem, ekstrenin oldukça polar yapıda olmasına ve yüzey aktif maddenin kimyasal

özelliklerine bağlanmıştır. Ayrıca yapılan literatür araştırmalarında da hidrofilik maddelerin enkapsülasyonunda niozom partiküllerinin düşük yükleme verimine sahip olduğu saptanmıştır.

İn vitro salım çalışmaları sonucunda kara havuç ekstresi yüklü partiküllerin ilk 30 dakika içerisinde patlama etkisine uğradığı belirlenmiş ve salımın yaklaşık %90' ının 10. saatte tamamlandığı saptanmıştır. Patlama ardından yavaş bir salım devam etmiş ve 5. günün sonunda salım sonlandırılmıştır. Patlama etkisinin, partikül içerisindeki hidrofilik maddenin konsanstrasyon farkı nedeniyle bir anda dışarı çıkması ile gerçekleştiği düşünölmüştür.

Ekstrenin serbest ve enkapsüle formunun Neuro-2A beyin kanser hücre hattında sitotoksik aktiviteye sahip olduğu yapılan hücre kültürü testleri ile belirlenmiştir. En düşük konsantrasyonda (6,25 µg/ml) partiküllerin sitotoksik aktivitesinin serbest ekstreye göre daha yüksek olduğu saptanmış ve bu sonuçlar ışığında enkapsülasyonun kara havuç ekstresini aktivite kayıplarına karşı koruduğu düşünölmüştür.

Sonuç olarak bu tez çalışması ile ulaşılması ve elde edilmesi oldukça kolay olan antosiyaninlerin stabilite sorunlarının enkapsülasyon yöntemleri yardımıyla aşılabileceği, oluşturulan nanopartiküllerin uzun süren salım profili ile biyoyararlanımın arttırılma potansiyelinin olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Buna ek olarak kan beyin bariyerinden geçebileceği düşünölen boyuttaki nanopartiküllerin Neuro-2A hücre hattı üzerindeki sitotoksik aktivitesinin yüksek olması sebebiyle bu formölasyonların gelecekte ilaç etkin maddesi olarak kullanımının önü açılmıştır. Ayrıca bu sonuçlar, antosiyaninlerin nano boyutta enkapsülasyonu, oluşturulan nanopartiküllerin biyolojik aktivitelerinin incelenmesi ve çeşitli doku-organlara hedeflendirilmesi yönünde yapılacak çalışmalara da ışık tutacaktır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Aggarwal, D., Garg, A. and Kaur P. I.,** 2004, Development of a topical niosomal preparation of acetazolamide: preparation and evaluation, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 56: 1509–1517 pp.
- Ahmed, N., Michelin-Jamois, M., Fessi, H. and Elaissari, A.,** 2012, Modified double emulsion process as a new route to prepare submicron biodegradable magnetic/polycaprolactone particles for in vivo theranostics, *Soft Matter*, 8: 2554–2564 pp.
- Akhtar, M., Murray, S. B., Afeisume, I. E. and Khew, H. S.,** 2014, Encapsulation of flavonoid in multiple emulsion using spinning disc reactor technology, *Food Hydrocolloids*, 34: 62-67 pp.
- Aksoylar, S.** ‘Nöroblastom’, *Klinik Gelişim*, <http://www.klinikgelisim.org.tr/eskisayi/cilt20sayi2/serapaksoylar.pdf> (2010) (Erişim tarihi: 15 Temmuz 2014)
- Algarra, M., Fernandes, A., Mateus, N., Freitas, V., Esteves da Silva, C. G. J. and Casado, J.,** 2014, Anthocyanin profile and antioxidant capacity of black carrots (*Daucus carota* L. ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) from Cuevas Bajas, Spain, *Journal of Food Composition and Analysis*, 33: 71–76 pp.
- Alyautdin, R., Gothier, D., Petrov, V., Kharkevich, D. and Kreuter, J.,** 1995, Analgesic activity of the hexapeptide dalargin adsorbed on the surface of polysorbate 80-coated poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 41: 44-48 pp.
- Aserin, A.,** 2008, *Multiple Emulsions: Technology and Applications*, Wiley Interscience, Hoboken, USA.
- Ashutosh, L., Suman, R., Sidhyartha, S., Altaf, S. and Vandana, M. Y.,** 2012, A novel drug delivery system: niosomes review, *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*, 5:129-135 pp.
- Aydın, E., Türkez, H. and Keleş, S. M.,** 2013, Potential anticancer activity of carvone in N2a neuroblastoma cell line, *Toxicology and Industrial Health*, 1-9 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Azmin, M., N., Florence, A., Handjani-Vila, T., Stuart, M., R., Vanlerberghe, J. F. and Whittaker, J. S.,** 1985, The effect of non-ionic surfactant vesicle (niosome) entrapment on the absorption and distribution of methotrexate in mice, *J Pharm Pharmacol.*, 37: 237-242 pp.
- Bagchi, D., Sen, K. C., Bagchi, M. and Atalay, M.,** 2004, Anti-angiogenic, antioxidant and anti-carcinogenic properties of a novel anthocyanin-rich berry extract formula, *Biochemistry (Moscow)*, 69: 76-80 pp.
- Bakowska-Barczak A.,** 2005, Acylated Anthocyanins as stables, natural food colorants-a review, *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 14 (55): 107–116 pp.
- Bakowska-Barczak and Kolodziejczyk,** 2010, Black currant polyphenols: Their storage stability and microencapsulation, *Industrial Crops and Products*, 34: 1301– 1309 pp.
- Baş, C.,** 2010, Cevap Yüzeyi Tasarımları ve Sinir Ağları Yaklaşımı, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 152s.
- Baş, D. and Boyacı, İ. H.,** 2007, Modelling and Optimization II: Comparison of Estimation Capabilities of response Surface Methodology with Artificial Neural Networks in a Biochemical Reaction, *Journal of Food Engineering*, 78: 846-854 pp.
- Bayındır-Sezgin, Z.,** 2010, Paklitaksel’ in Niozom Formülasyonlarının Hazırlanması, in vitro ve in vivo Olarak Değerlendirilmesi, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 220 s.
- Betz, M. and Kulozik, U.,** 2011, Microencapsulation of bioactive bilberry anthocyanins by means of whey protein gels, *Procedia Food Science*, 1: 2047 – 2056 pp.
- Brouillard, R.,** 1982, Chemical structure of anthocyanins in: *Anthocyanins as Food Color*, Academic Press, 1–40 pp.
- Bulut, D. İ.,** 2012, Gözün Ön Segmentine İlaç Taşınımı İçin Hazırlanan Biyopolimerik Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 82s.
- Cao, G. and Prior, R. L.,** 1999, Anthocyanins are detected in human plasma after oral administration of an elderberry extract, *Clin. Chem.* 45: 574–576 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Castaneda-Ovando, A., Pacheco-Hernandez, M. L., Pàez- Hernandez, M. E., Rodriguez, J. A. and Galan-Vidal, C. A.,** 2009, Chemical studies of anthocyanins: A review, *Food Chemistry*, 113: 859–871 pp.
- Cavalcanti, R. N., Santos, D. T. and Meireles, M. A. A.,** 2011, Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems- An overview, *Food Research International*, 44: 499–509 pp.
- Chen, P., Chu, S., Chiou, H., Kuo, W., Chiang, C. and Hsieh, Y.,** 2006, Mulberry anthocyanins, cyanidin 3-rutinoside and cyanidin 3-glucoside, exhibited an inhibitory effect on the migration and invasion of a human lung cancer cell line, *Cancer Letters*, 235: 248–259 pp.
- Çelik, B.,** 2011, Nanosaniye Lazer Kullanarak PVC Malzeme Üzerinde Mikro Ölçekli Deliklerin Optimum Parametrelerinin Taguchi Metodu ile Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 80s.
- Çetin, M. ve Çapan, Y.,** 2004, Beyne İlaç Hedeflendirilmesi, *Ankara Ecz. Fak. Derg.*, 33: 287–305 s.
- Dahiya, N., Rao, R. and Nanda, S.,** 2011, Preparation and Characterization Techniques in Niosomal Vesicular Systems- A review, *Journal of Pharm. and Biomed. Sciences*, 5: 20 p.
- Damar, İ.,** 2010, Vişne Suyunun Antosiyanin Profili ve Antioksidan Kapasitesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 81s.
- Danhier, F., Ansorena, E., Silva, M. J., Coco, R., Breton, A. and Preat, V.,** 2012, PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications, *Journal of Controlled Release*, 161: 505–522 pp.
- Deniz, A., Sade, A., Severcan, F., Keskin, D., Tezcaner, A. and Banerjee, S.,** 2010, Celecoxib-loaded liposomes: effect of cholesterol on encapsulation and in vitro release characteristics, *Biosci. Rep.*, 30: 365–373 pp.
- Ding, M., Feng, R., Wang, Y. S., Bowman, L., Lu, Y., Qian, Y., Castranova, V., Jiang, B. and Shi, X.,** 2006, Cyanidin-3-glucoside, a Natural Product Derived from Blackberry Exhibits Chemopreventive and Chemotherapeutic Activity, *J. Biol. Chem.*, 281: 17359-17368 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ferreira, S. D., Faria, F. A., Grosso, R. F. C. and Mercadante, Z. A.,** 2009, Encapsulation of Blackberry Anthocyanins by Thermal Gelation of Curdlan, *J. Braz. Chem. Soc.*, 20: 1908-1915 pp.
- Frank, K., Köhler, K. and Schuchmann, P. H.,** 2011, Formulation of Labile Hydrophilic Ingredients in Multiple Emulsions: Influence of the Formulation's Composition on the Emulsion's Stability and on the Stability of Entrapped Bioactives, *Journal of Dispersion Science and Technology*, 32: 1753–1758 pp.
- Frank, K., Walz, E., Graf, V., Greiner, R., Köhler, K. and Schuchmann, P. H.,** 2012, Stability of Anthocyanin-Rich W/O/W-Emulsions Designed for Intestinal Release in Gastrointestinal Environment, *Journal of Food Science*, 77: 50-57 pp.
- Galvano, F., Fauci, L., Lazzarino, G., Fogliano, V., Ritieni A., Ciappellano, S., Battistini, C., N., Barbara, T. and Galvano, G.,** 2004, Cyanidins: metabolism and biological properties, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 15: 2–11 pp.
- Galvano, F., Fauci, L., Vitaglione, P., Fogliano, V., Vanella, L. and Felgines, C.,** 2007, Bioavailability, antioxidant and biological properties of the natural free-radical scavengers cyanidin and related glycosides, *Ann Ist super Sanita*, 43(4): 382-393 pp.
- Gezgin, S.,** 2013, *Farmasötik Amaç İçin Kullanılacak Mikro- ve Nanopartiküllere Antikor Bağlama ve Etkinliklerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 166s.*
- Ghosh, D. and Konishi, T.,** 2007, Anthocyanins and anthocyanin-rich extracts: role in diabetes and eye function , *Asia Pac. J Clin. Nutr.*, 16: 200-208 pp.
- Giacomo, D. C., Acquaviva, R., Santangelo, R., Sorrenti, V., Vanella, L., Volti, L. G., D'Orazio, N., Vanella, A. and Galvano, F.,** 2012, Effect of Treatment with Cyanidin-3-O- β -D-Glucoside on Rat Ischemic/Reperfusion Brain Damage, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 28 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Giri, K., T., Choudhary, C., Ajazuddin, Alexander, A., Badwaik, H. and Tripathi, K., T.,** 2012, Prospects of pharmaceuticals and biopharmaceuticals loaded microparticles prepared by double emulsion technique for controlled delivery-review, *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21: 125–141 pp.
- Giusti, M. and Wrolstad, R.,** 2003, Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems, *Biochemical Engineering Journal* 14: 217-225 pp.
- Gökmen, S., Palamutoğlu, R. ve Sariçoban, C.,** 2012, Gıda Endüstrisinde Enkapsülasyon Uygulamaları, *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 7: 36-50 s.
- Guy, B.,** 2007, 'Emulsions', http://www.nature.com/nrmicro/journal/v5/n7/box/nrmicro1681_BX3.html (Erişim tarihi: 10 Ağustos 2014).
- Hao, Y., Zhao, F., Li, N., Yang, Y. and Li, K.,** 2002, Studies on a high encapsulation of colchicine by a niosome system, *International Journal of Pharmaceutics* 244: 73–80 pp.
- He, F., Liang, N., Mu, L., Pan, Q., Wang, J., Reeves, M. and Duan, C.,** 2012, Athocyanins and their variation in red wines I. monomeric anthocyanins and their color expression, *Molecules*, 17: 1571-1601 pp.
- Hussein, S. A., Abdullah, N. and Faku'ri-Razi, A.,** 2013, Optimizing the process parameters for encapsulation of linamarin into PLGA nanoparticles using double emulsion solvent evaporation technique, *Advances in Polymer Technology*, 32: 486–504 pp.
- Ibraheem, D., Igbal, M., Agusti, G., Fessi, H. and Elaissari, A.,** 2014, Effects of process parameters on the colloidal properties of polycaprolactone microparticles prepared by double emulsion like process, *Colloids and Surfaces, Physicochem. Eng. Aspects*, 445: 79–91 pp.
- Iosif Daniel Rosca, D. I., Watari, F. and Uo, M.,** 2004, Microparticle formation and its mechanism in single and double emulsion solvent evaporation, *Journal of Controlled Release* 99: 271–280 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Jackman, R. L., Yada, R. Y., Tung, M. A. and Speers, R. A.,** 1987, Anthocyanins as food colorants – A review, *J. Food Biochem.*, 11: 201–270 pp.
- Jain, R.,** 2000, The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly (lactide-co-glycolide)(PLGA) devices, *Biomaterials*, 21: 2475-2490 pp.
- Jalil, R. and Nixon, J. R.,** 1990, Biodegradable poly(lactic acid) and poly(lactide-co-glycolide) microcapsules: problems associated with preparative techniques and release properties, *J Microencapsul.*, 7: 297-325 pp.
- Jeong, D. and Na, K.,** 2012, Chondroitin sulfate based nanocomplex for enhancing the stability and activity of anthocyanin, *Carbohydrate Polymers*, 90: 507–515 pp.
- Kalaria, R. D., Sharma, G., Beniwal, V. and Ravi Kumar, N. V. M.,** 2009, Design of Biodegradable Nanoparticles for Oral Delivery of Doxorubicin: In vivo Pharmacokinetics and Toxicity Studies in Rats, *Pharmaceutical Research*, 26: 492-501 pp.
- Kaur, I., Bhandri, R., Bhandri, S. and Kakkar., V.,** 2008, Potential of solid lipid nanoparticles in brain targeting, *Journal of Contr. Rel.*, 127: 97-109 pp.
- Kemper, M., K., Boogerd, W., Thuis, I., Beijnen, H., J. and Telling, O.,** 2004, Modulation of the blood–brain barrier in oncology: therapeutic opportunities for the treatment of brain tumours?, *Cancer Treatment Reviews*, 30: 415–423 pp.
- Kim, S., Woo, H., Park, M., Rhee, K., Moon, C., Lee, D., Seo, D. W. and Kim B. J.,** 2014, Cyanidin 3-O-Glucoside Reduces Helicobacter pylori VacA-Induced Cell Death of Gastric KATO III Cells through Inhibition of the SecA Pathway, *Int. J. Med. Sci.*, 11: 742-747 pp.
- King, A. H.,** 1995, Encapsulation of Food Ingredients; A Review of Available Technology, Focusing on Hydrocolloids. In: *Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients*, American Chemical Society, 21 p.
- Koç, B. ve Kaymak-Ertekin, F.,** 2009, Yanıt Yüzey Yöntemi ve Gıda İşleme Uygulamaları-Derleme, *Gıda*, 2 s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kumar, P. G. and Rajeshwarrao, P.**, 2011, Nonionic surfactant vesicular systems for effective drug delivery—an overview, *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 1(4): 208–219 pp.
- Lai, F., Fadda, A. M. and Sinico, C.**, 2013, Liposomes for brain delivery, *Expert Opinonon Drug Delivery*.
- Lammers, J.**, 2003, Blood Brain Barrier, Course Presentation. <http://www.4medstudents.com/students/Blood%20Brain%20Barrier.ppt> (Erişim tarihi: 10 Mayıs 2014)
- Lee, H., S., Jeong, E., Paik, S., Jeon, H., J., Jung, W., S., Kim, H., Kim, M., Chun, M. and Kim, I.**, 2014, Cyanidin-3-glucoside Extracted from Mulberry Fruit Can Reduce N-methyl-N-nitrosourea-Induced Retinal Degeneration in Rats, *Current Eye Research*, 39: 79-87 pp.
- Lila, A. M.**, 2004, Anthocyanins and Human Health: An In Vitro Investigative Approach, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 5: 306–313 pp.
- Lingan, A. M., Sathali, H. A., Kumar, R. M. V. and Gokila A.**, 2011, Formulation and Evaluation of topical drug delivery system containin clobetasol propionate niosomes, *Sci. Revs. Chem. Commun.*, 1:7-17 pp.
- Lobato, K. B., Paese, K., Forgearini, C. J., Guterres, S. S., Jablonski, A. and Rios, A., O.**, 2013, Characterisation and stability evaluation of bixin nanocapsules, *Food Chemistry*, 141: 3906–3912 pp.
- Malien-Aubert, C., Dangles, O. and Amiot, M., J.**, 2001, Color stability of commercial anthocyanin-based extracts in relation to the phenolic composition. Protective effects by intra and intermolecular copigmentation, *J. Agric. Food Chem.*, 49: 170–176 pp.
- Marczylo, H. T., Cooke, D., Brown, K., Steward, P. W. and Gescher, J. A.**, 2009, Pharmacokinetics and metabolism of the putative cancer chemopreventive agent cyanidin-3-glucoside in mice, *Cancer Chemother Pharmacol*, 64: 1261–1268 pp.
- Masserini, M.**, 2013, Nanoparticles for Brain Drug Delivery, *ISRN Biochemistry*, 10: 1-18 pp.
- Matos, M., Gutiérrez, G., Coca, J. and Pazos, C.**, 2013, Preparation of water-in-oil-in-water (W1/O/W2) double emulsions containing trans-resveratrol, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 11 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Matsumoto, H., Inaba, H., Kishi, M. and Tominaga, S.,** 2001, Orally administered delphinidin 3-rutinoside and cyanidin 3-rutinoside are directly absorbed in rats and humans and appear in the blood as the intact forms, *J. Agric. Food Chem.*, 49: 1546 –1551 pp.
- Matuschek, C. M., Hendriks, H. W., McGhie, K. T. and Reynolds, W. G.,** 2006, The jejunum is the main site of absorption for anthocyanins in mice, *Journal of Nutritional Biochemistry* 17: 31–36 pp.
- Mazza, G. and Brouillard, R.,** 1990, The mechanism of co-pigmentation of anthocyanins in aqueous solutions, *Phytochemistry*, 29: 1097–1102 pp.
- Mazza, G.,** 2007, Anthocyanins and heart health, *Ann Ist super sanita*, 43 (4): 369-374 pp.
- Mehta, K. S. and Jindal N.,** 2013, Formulation of Tyloxapol niosomes for encapsulation, stabilization and dissolution of anti-tubercular drugs, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 101: 434–441 pp.
- McGhie, K., T. and Walton, C., M.,** 2007, The bioavailability and absorption of anthocyanins: Towards a better understanding, *Molecular Nutrition and Food Research*, 51: 702 – 713 pp.
- Milbury, E. P., Cao, G., Prior, L. R. and Blumberg, J.,** 2002, Bioavailability of elderberry anthocyanins, *Mechanisms of Ageing and Development*, 123: 997–1006 pp.
- Min, J., Yu, S., Baek, S., Nair, M., K., Bae, O., Bhatt, A., ,b, Kassab, M., Nair, G., M. and Majid, A.,** 2011, Neuroprotective effect of cyanidin-3-O-glucoside anthocyanin in mice with focal cerebral ischemia, *Neuroscience Letters*, 500: 157–161 pp.
- Mine, Y., Shimizu, M. and Nakashima, T.,** 1996, Preparation and stabilization of simple and multiple emulsions using a microporous glass membrane, *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 6: 261–268 pp.
- Miyazawa, T., Nakagawa, K., Kudo, M., Muraishi, K. and Someya, K.,** 1999, Direct intestinal absorption of red fruit anthocyanins, cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3,5-diglucoside into rats and humans, *J. Agric. Food Chem.*, 47: 1083 –1091 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Moghassemi, S. and Hadjizadeh,** 2014, Nano-niosomes as nanoscale drug delivery systems: An illustrated review, *Journal of Controlled Release*, 185: 22–36 pp.
- Morazzoni, P., Livio, S., Scilingo, A. and Malandrino, S.,** 1991, Vaccinium myrtillus anthocyanosides pharmacokinetics in rats, *Drug Res.*, 41: 128–131 pp.
- Mohanraj, V. J. and Chen, Y.,** 2006, Nanoparticles–A Review, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 5: 561-573 pp.
- Mukerjee, A., Sinha, V. R. and Pruthi, V.,** 2007, Preparation and Characterization of Poly-ε caprolactone Particles for Controlled Insulin Delivery, *Journal of Biomedical & Pharmaceutical Engineering*, 1:40-44 pp.
- Munoz-Espada, C. A. and Watkins, A. B.,** 2006, Cyanidin attenuates PGE2 production and cyclooxygenase-2 expression in LNCaP human prostate cancer cells, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 17: 589–596 pp.
- Narang, S. A., Delmarre, D. and Gao, D.,** 2007, Stable drug encapsulation in micelles and microemulsions, *International Journal of Pharmaceutics*, 345: 9–25 pp.
- Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S. and Bugarski, B.,** 2011, An overview of encapsulation technologies for food applications, *Procedia Food Science*, 1: 1806 – 1815 pp.
- Numanoğlu, U. ve Tarımcı, N.,** 2006, Katı Lipid Nanopartiküllerin Özellikleri, *Farmasötik ve Kozmetik Alandaki Uygulamaları*, *Ankara Ecz. Fak. Derg.*, 35: 211 – 235 s.
- Oba, Ş.,** 2012, Ekstraksiyon Koşulları Optimize Edilmiş Bazı Baharat Ekstraktlarının Köftenin Depolama Stabilitesi Üzerine Etkilerinin Cevap Yüzeysel Metodu Kullanılarak Belirlenmesi, *Yüksek Lisans Tezi*, Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Ens., 130s.
- Oidtmann, J., Schantz, M., Mader, K., Baum, M., Berg, S., Betz, M., Kulozik, U., Leick, S., Rehage, H., Schwarz, K. and Richling, E.,** 2012, Preparation and comparative release characteristics of three anthocyanin encapsulation systems, *J. Agric.Food Chem.*, 60: 844–851 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Olivier, J.C., Fenart, L., Chauvet, R., Pariat, C., Cecchelli, R. and Couet, W.,** 1999, Indirect evidence that drug brain targeting using polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles is related to toxicity, *Pharm. Res.*, 16: 1836-1842 pp.
- Öztopçu, P., Kabadere, S. ve Uyar, R.,** 2005, K-3 vitamininin sıçan glioma (C6) ve insan glioblastoma multiforme çoğalmasına in vitro etkileri, *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 6: 21 – 25 s.
- Pathak, Y. and Thassu, D.,** 2009, Drug delivery nanoparticles formulation and characterization, *Drugs and Pharmaceutical Sciences*, 191: 93 p.
- Priya, M. R., Natarajan, R. and Rajendran, N. N.,** 2013, Formulation and Evaluation of Zidovudine Loaded Niosomes, *Journal of Pharmaceutics and Nanotechnology*, 1: 12-18 pp.
- Pubchem Compound**, NCBI, ‘cyanidin 3-O-glucoside’,
<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=197081>,
 (Erişim tarihi: 3 Şubat 2014)
- Robert, P., Gorena, T., Romero, N., Sepulveda, E., Chavez, J. and Saenz, C.,** 2010, Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*Punica granatum*) by spray drying, *International Journal of Food Science and Technology*, 45: 1386–1394 pp.
- Salkım, İ.,** 2012, Taguchi Yönteminin Anten Tasarımı Problemlerine Uygulanması, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 117s.
- Santos, T. D., Albarelli, Q. J., Beppu, M. M. and Meireles, A. M. A.,** 2013, Stabilization of anthocyanin extract from jaboticaba skins by encapsulation using supercritical CO₂ as solvent, *Food Research International* 50: 617–624 pp.
- Sari, P., Wijaya, C. H., Sajuthi, D. and Supratman, U.,** 2012, Colour properties, stability, and free radical scavenging activity of jambolan (*Syzygium cumini*) fruit anthocyanins in a beverage model system: Natural and copigmented anthocyanins, *Food Chemistry*, 132: 1908–1914 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Schuch, A., Deiters, P., Henne, J., Köhler, K. and Schuchmann, P., H.,** 2013, Production of W/O/W (water-in-oil-in-water) multiple emulsions: droplet breakup and release of water, *Journal of Colloid and Interface Science*, 402: 157–164 pp.
- Serra, D., Paixa, J., Nunes, C., Dinis, C. P., T. and Almeida, M. L.,** 2013, Cyanidin-3-Glucoside Suppresses Cytokine-Induced Inflammatory Response in Human Intestinal Cells: Comparison with 5-Aminosalicylic Acid, *Plos One*, 8 p.
- Scordino, M., Mauro, A., Passerini, A. and Maccarone, E.,** 2004, Adsorption of flavonoids on resins: cyanidin 3-glucoside, *J. Agric. Food Chem.*, 52: 1965–1972 pp.
- Sevimli-Gür, C., Çetin, B., Akay, Ş., Gülce-İz, S. and Yeşil-Çelikleş, Ö.,** 2013, Extracts from black carrot tissue culture as potent anticancer agents, *Plant Foods Hum Nutr*, 68:293–298 pp.
- Sharma, K. S., Chauhan, M. and Anilkumar, N.,** 2009, Span-60 niosomal oral suspension of fluconazole formulation and in vitro evaluation, *JPRHC*, 1:142-156 pp.
- Shivashankara, V. S., Yogananda, R. and Bharathi, D. R.,** 2012, A review on nanoparticles applications in different drug delivery systems, *Am. J. PharmTech Res.*, 6: 163:176 pp.
- Song, R., N., Yang, H., Park, J., Kwon, J., Y., Kang, J., K., Heo, S., Y., Lee, W., K. and Hyong, J., L.,** 2012, Cyanidin suppresses neoplastic cell transformation by directly targeting phosphatidylinositol 3-kinase, *Food Chemistry*, 133: 658–664 pp.
- Song, J., Zhao, M., Liu, X., Zhu, Y., Hu, X., Chen, F.,** 2013, Protection of cyanidin-3-glucoside against oxidative stress induced by acrylamide in human MDA-MB-231 cells, *Food and Chemical Toxicology*, 58: 306–310 pp.
- Srinivasan, V. S.,** 2001, Bioavailability of nutrients: A practical approach to in vitro demonstration of the availability of nutrients in multivitamin-mineral combination products, *J.Nutr.*, 131: 1349–1350 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Stockert, J.C., Blázquez-Castro, A., Canete, M., Horobin, R.W. and Villanueva, A.,** 2012, MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets, *Acta Histochem.*
- Sundaresan, P., Sravanthi, C. and Gowtham, T.,** 2012, Evaluation of aceclofenac niosomes prepared by various techniques, *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, 16(1): 75-78 pp.
- Sun, C., Zheng, Y., Chen, Q., Tang, X., , Jiang, M., Zhang, J., Li, X. and Chen, K.,** 2012, Purification and anti-tumour activity of cyanidin-3-O-glucoside from Chinese bayberry fruit, *Food Chemistry*, 131: 1287–1294 pp.
- Şahin, Ö., N.,** 2007, Niosomes as Nanocarrier Systems, *Nanomaterials and Nanosystems for Biomedical Applications*, 4: 67–81 pp.
- Şimşek, S.,** 2010, Beyne Hedeflendirilmiş Polisorbat 80 Kaplı/Atorvastatin Yüklü Amfifilik PLGA-b-PEG Nanopartiküllerinin Hazırlanması ve in-vivo Değerlendirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 123s.
- Talavera, S., Felgines, C., Texier, O., Besson, C., Gil-Izquierdo, A., Lamaison, J. and Remesy, C.,** 2005, Anthocyanin metabolism in rats and their distribution to digestive area, kidney and brain, *J. Agric. Food Chem.*, 53: 3902–3908 pp.
- Timberlake, C. F. and Bridle, P.,** 1980, Anthocyanin-occurrence, Extraction and Chemistry, *Food Chem.*, 5: 69-80 pp.
- Tiwari, S. and Verma, P.,** 2011, Microencapsulation technique by solvent evaporation method (Study of effect of process variables), *Int. J. of Pharm. & Life Sci.*, 8(2): 998-1005 pp.
- Tsuda, T., Horio, F. and Osawa, T.,** 1990, Absorption and metabolism of cyanidin 3-O-B-D-glucoside in rats, *FEBS Lett.*, 449: 179–182 pp.
- Uchegbu, F. I. and Vyas, P. S.,** 1998, Non-ionic surfactant based vesicles (niosomes) in drug delivery, *International Journal of Pharmaceutics* ,172:33-70 pp.
- Ürküt, Z.,** 2007, Kalsiyum Aljinatta İmmobilize Edilmiş Aureobasidium pullulans P56 Hücreleri ile Pullulan Üretiminin Optimizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 125s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wallace, C. T.**, 2011, Anthocyanins in Cardiovascular Disease, American Society for Nutrition. *Adv. Nutr.*, 2: 1–7 pp.
- Wang, Z., Li, Y., Chen, L., Xin, X. and Yuan, Q.**, 2013, A study of controlled uptake and release of anthocyanins by oxidized starch microgels, *J. Agric. Food Chem.*, 61: 5880–5887 pp.
- Wang, Q., Xia, M., Liu, C., Guo, H., Ye, Q., Hu, Y., Zhang, Y., Hou, M., Zhu, H., Ma, J. and Ling, W.**, 2008, Cyanidin-3-O- β -glucoside inhibits iNOS and COX-2 expression by inducing liver X receptor alpha activation in THP-1 macrophages, *Life Sciences*, 83: 176–184 pp.
- Wu, X., Beecher, R., G., Holden, M., J., Haytowitz, B., D., Gebhardt, E., S. and Prior, L., R.**, 2006, Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 4069–4075 pp.
- Wu, R., Wang, Y., Wu, F., Zhou, H., Zhang, X. and Hou, J.**, 2012, A DSC study of paeonol-encapsulated liposomes, comparison the effect of cholesterol and stigmasterol on the thermotropic phase behavior of liposomes, *J Therm Anal Calorim*, 109:311–316 pp.
- Xu, M., Bower, A. K., Wang, S., Frank, A. J., Chen, G., Ding, M., Wang, S., Shi, X., Ke, Z. and Luo, J.**, 2010, Cyanidin-3-Glucoside inhibits ethanol-induced invasion of breast cancer cells overexpressing ErbB2, *Molecular Cancer*, 9:285.
- Vando, A., C., Hernazed, L., P., Hermanzed, E., P., Redrugez, J., A. and Vidal, C., A., G.**, 2009, Chemical studies of anthocyanins: a review, *Food Chemistry*, 113: 859-871 pp.
- Yasin, N. M., Hussain, S., Malik, F., Hameed, A., Sultan, T., Qureshi, F., Riaz, H., Perveen, G. and Wajid, A.**, 2012, Preparation and characterization of chloramphenicol niosomes and comparison with chloramphenicol eye drops (0.5%w/v) in experimental conjunctivitis in albino rabbits, *Pak. J. Pharm. Sci.*, 25: 117-121 pp.
- Yolles, S, Eldridge J. E. and Woodland J. H. R.**, 1971, Sustained delivery of drugs from polymer drug mixtures, *Polym News*, 1: 9-12 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yücel, Ç.**, 2010, Doksisisiklinin Lipozom ve Nanopartikül Formülasyonlarının Geliştirilmesi ve Hücre Kültüründen geçişlerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 197s.
- Yiallourous, M.** ‘*Nöroblastom (Kısa Bilgiler) (Neuroblastom)*’, http://www.kinderkrebsinfo.de/sites/kinderkrebsinfo/content/e9031/e10591/e77083/e63943/e126805/nroblastom_tur.pdf (2013) (Erişim tarihi: 15 Temmuz 2014).
- Zhang, T., Lv, C., Chen, L., Bai, G., Zhao, G. and Xu, C.**, 2014, Encapsulation of anthocyanin molecules within a ferritin nanocage increases their stability and cell uptake efficiency, *Food Research International*, 62: 183–192 pp.

ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında Bursa’ da doğan Melike Nur Hilal FİDAN ilk ve orta öğrenimini Bursa’da tamamlamıştır. 2008 yılında Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü’ nde başladığı lisans öğrenimini 2012 yılında tamamlamış ve aynı yıl Ege Ünivesitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik ABD’ nda yüksek lisans öğrenimine başlamıştır.

Görev Alınan Organizasyonlar:

Novel Fluidic Technologies And Applications With An Emphasis On Collaboration –Workshop, 21-22 April, 2014, Izmir.

Türkiye Biyomühendislik Zirvesi – 9. Biyomühendislik Günleri ve Mezunlar Buluşması, 20-21 Nisan 2012, İzmir-Türkiye.

Ege Üniversitesi 4. Geleneksel Kök Hücre Sempozyumu, 2012, İzmir-Türkiye.

