

**VASKÜLER OKSİDATİF STRESE KARŞI ICAM-1'E
YÖNLENDİRİLMİŞ KATALAZ YÜKLÜ POLİMERİK
NANOPARTİKÜLLERİN GELİŞTİRİLMESİ**

**DEVELOPMENT OF ICAM-1 DIRECTED CATALASE
LOADED POLYMERIC NANOPARTICLES AGAINST
VASCULAR OXIDATIVE STRESS**

ECE SARI

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

NANOTEKNOLOJİ VE NANOTIP Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2011

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından **NANOTEKNOLOJİ VE NANOTIP ANABİLİM DALI'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan

.....
Prof. Dr. Gülberk Uçar

Üye (Danışman)

.....
Prof. Dr. Kezban Ulubayram

Üye

.....
Doç .Dr. Eylem Güven

Üye

.....
Yrd. Doç. Dr. Mustafa Türk

Üye

.....
Dr. Yeliz Tunç

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından / / tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunca / / tarihinde kabul edilmiştir.

Prof.Dr.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

annem, babam ve Özge'me

VASKÜLER OKSİDATİF STRESE KARŞI ICAM-1'E YÖNLENDİRİLMİŞ KATALAZ YÜKLÜ POLİMERİK NANOPARTİKÜLLERİN GELİŞTİRİLMESİ

Ece SARI

ÖZ

Süperoksit anyonu (O_2^-) ve H_2O_2 gibi reaktif oksijen türleri, endotel hücrelerde birçok kardiyovasküler ve pulmoner hastalıkların patogeneğinde rol oynayan oksidatif strese sebep olurlar. Antioksidan bir enzim olan katalaz (H_2O_2 'i suya dönüştüren), endoteldeki antioksidan savunmayı artıran aday bir ilaçtır. Katalazın kan dolaşımından hızla elimine olması sebebiyle, hücreleri oksidatif strese karşı korumak için temel strateji, bu enzimin polimerik nanotaşıyıcılar içine enkapsüle edilerek endotele hedeflendirilmesidir. Bu amaca yönelik olarak, katalaz yüklü PLGA-b-PEG polimerik nanotaşıyıcılar çift emülsiyon tekniği ile geliştirilmiş ve bu taşıyıcı sisteme, endotele hedefleme molekülü (anti-ICAM-1) konjuge edilmiştir. Böylece, katalazın hem proteolitik inaktivasyona karşı korunacağı, hem de vasküler oksidatif streste anahtar bir rol oynayan endotel hücrelere hedefleneceği hipotezlerini öne sürdük. Bu hipotezleri test etmek amacıyla çeşitli nanopartikül formülasyonları hazırlanmış ve karakterize edilmiştir. Katalazın vasküler endotele anti-ICAM-1 konjugasyonu yoluyla hedeflendirilmesi in-vitro'da incelenmiştir. Serbest katalaz aktivitesi proteolitik ortamda 5 saat sonunda % 5'in altında iken nanopartikül içine enkapsüle edilen katalazın aynı şartlarda enzim aktivitesinin % 39'unu koruduğu görülmüştür. Ayrıca, anti-ICAM-1 bağlı katalaz nanopartikülleri (anti-ICAM-1/KatNP) kültür edilen endotel hücrelerce hızlıca alınmıştır. Nanopartikül alımını takiben 6 ve 24 saat boyunca endotel hücreler H_2O_2 'in yarattığı oksidatif hasara karşı dirençli bulunmuştur. Hazırlanan anti-ICAM-1/KatNP'lerin oksidatif damar hasarı için antioksidan enzim taşıyıcı sistemler olarak umut vadettiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: oksidatif stres, terapötik nanosistemler, ICAM-1, antioksidan enzimler, katalaz, polimerik nanopartikül

Danışman: Prof. Dr. Kezban ULUBAYRAM, Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Eczacılık Temel Bilimleri Anabilim Dalı, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı

DEVELOPMENT OF ICAM-1 DIRECTED CATALASE LOADED POLYMERIC NANOPARTICLES AGAINST VASCULAR OXIDATIVE STRESS

Ece SARI

ABSTRACT

Reactive oxygen species, such as superoxide anion (O_2^-) and H_2O_2 , cause oxidative stress, a condition implicated in the pathogenesis of many cardiovascular and pulmonary diseases, in endothelial cells. An antioxidant enzyme, catalase, converting H_2O_2 into water, is a candidate drug for augmentation antioxidant defenses in endothelium. Due to fast elimination of catalase from the bloodstream, its encapsulation by polymeric nanocarriers and target to endothelium is the main strategy to protect the cells against oxidative stress. For this purpose, catalase loaded PLGA-b-PEG polymeric nanocarriers were developed by double emulsion technique and an endothelial target molecule (anti-ICAM) was conjugated to this carrier system. Thus we hypothesized that catalase can be protected from proteolytic inactivation and ICAM directed catalase loaded nanoparticles (Anti-ICAM-1/CatNP) will be targeted to the endothelial cells which are known to play a key role in vascular oxidative stress. In order to test these hypotheses several nanoparticle formulations were prepared and characterized. Targeting of catalase to vascular endothelium by conjugation of anti-ICAM-1 was evaluated in-vitro. Catalase in NP retained 39 % of its enzyme activity after 5 h in proteolytic environment while free catalase retained less than 5 % activity. Furthermore, anti-ICAM-1/CatNPs were rapidly taken up by cultured endothelial cells. Following nanoparticle uptake, endothelial cells were resistant to H_2O_2 induced oxidative injury for 6 and 24 hours. It was concluded that prepared anti-ICAM-1/CatNPs are promising antioxidant enzyme carrier systems for oxidative vascular injury.

Key words: oxidative stress, therapeutic nanosystems, ICAM-1, antioxidant enzymes, catalase, polymeric nanoparticle

Advisor: Prof. Dr. Kezban ULUBAYRAM, Hacettepe University, Faculty of Pharmacy, Department of Basic Pharmaceutical Sciences and Department of Nanotechnology and Nanomedicine

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimime başlamamda büyük katkısı olan, tez çalışmam süresince tüm imkânlarını bana cömertçe sunan, bilimsel katkılarını, içten desteğini ve güler yüzünü benden esirgemeyen, bilimsel çalışma kültürünü bana aşıl原因an saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Kezban ULUBAYRAM'a,

Tez çalışmam boyunca her türlü sıkıntıda yanımda olan, bilgisi, önerileri, yardımları ve özverisiyle tezimin her aşamasında katkısı bulunan, candan desteği ile benim için bir hocadan çok daha fazlası olan, sevgili hocam Dr. Yeliz TUNÇ'a,

Akademik ve sosyal yaşantımın her anında bir "ağabey" olarak yanımda bulunan, bilgisini ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili hocam Yrd. Doç. Dr. Hakan EROĞLU'na,

Laboratuvarını bana sınırsızca açan, biyokimyasal çalışmalarım başta olmak üzere her türlü konudaki bilgi ve desteğini cömertçe sunan, saygıdeğer hocam Prof. Dr. Gülberk UÇAR'a,

Yüksek lisans eğitimim süresince tüm desteğini hissettiğim Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ'a ve tüm Nanoteknoloji ve Nanotıp ailesine,

Desteği ve güler yüzü için saygıdeğer hocam Doç. Dr. Nezire SAYGILI'ya,

Hücre kültürü çalışmalarına özveriyle yardım eden, laboratuvar yaşantımı taklitleriyle renklendiren sevgili arkadaşım Hülya MUTLU'ya,

Konfokal çalışmalarındaki yardım ve katkıları için saygıdeğer hocam Yrd.Doç.Dr.Can ÖZEN, Rengin ERDEM ve Esen SAYIN'a,

Bilimsel ve deneysel her türlü desteğinin yanında, güler yüzü, sohbeti ve dostluğu için sevgili hocam Can SARISÖZEN'e,

Biyokimyasal ve istatistiksel çalışmalardaki yardımları için sevgili arkadaşlarım Açelya YALOVAÇ ve İpek BAYSAL'a,

AFM analizlerindeki destek ve özverileri için arkadaşlarım Tayfun VURAL ve Tamer ÇIRAK'a,

Laboratuvar çalışmalarımdayardımlarını esirgemeyen arkadaşım Semih ÇALAMAK'a,

Yüksek lisansımın bana kazandırdığı çok değerli iki dost olan, Cem BAYRAM ve Merve GÜLTEKİNOĞLU'na,

Ankara'da yalnız olmadığımı hissettiren canım kuzenim Ramazan UÇAK başta olmak üzere, teyzoşum, eniştem, kuzenlerim ve geniş ailemin tüm üyelerine,

Dostluklarıyla hayatıma anlam katan, tez dönemimi güzel anılarla süsleyen İnci, Arif, Ayşen, Esra, Gözde, Memoş, Emre, Nuray, Semra, İlker, Tuna, Deniz, İlke, Ozan, Burhan, Gökhan ve Uğur'a,

İlgi, özveri ve hepsinden önemlisi sevgisiyle her an yanımda olan, tezimin deneysel ve yazım aşamalarında yardımlarını asla esirgemeyen, hayatıma anlam ve neşe katan, sıkıntı ve kaprislerime sabırla dayanan biricik Soner'im,

Beni hiçbir anımda yalnız bırakmayan, bana hayata şanslı olarak başladığımı hissettiren, sonsuz sevgileriyle beni hep mutlu eden, hayattaki en değerli varlıklarım annem, babam ve Özge'me

Teşekkürü bir borç bilirim...

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZ	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	iv
ŞİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Terapötik Nanosistemler	5
2.1.1. Lipozomlar	6
2.1.2. Nanokristaller ve Nanosüspansiyonlar.....	8
2.1.3. Dendrimerler	9
2.1.4. Fullerenler.....	10
2.1.5. Karbon Nanotüpler	11
2.1.6. Polimerik Nanopartiküller	13
2.1.6.1. PLGA-b-PEG kopolimerler	16
2.2. Terapötik Sistemlerde Hedeflendirme Yaklaşımları	18
2.2.1. Pasif Hedeflendirme	18
2.2.2. Aktif Hedeflendirme	19
2.3. Polimerik Nanopartikül Hazırlama Yöntemleri	20
2.3.1. Emülsifikasyon / Çözücü Uçurma	20
2.3.2. Çözücü Yer Değiştirme (Nanopresipitasyon) ve Yüzeylearası Depozisyon	21
2.3.3. Emülsifikasyon / Çözücü Difüzyon	22
2.3.4. Tuzla Çöktürme (Salting Out)	23
2.3.5. Çift (Çoklu) Emülsiyon Yöntemi	24
2.4. Oksidatif Stres	27
2.4.1. Antioksidanlar	29
2.4.2. Katalaz	32
3. GEREÇ VE YÖNTEM	35
3.1. Gereçler	35
3.1.1. Kullanılan Kimyasallar	35
3.1.2. Cihaz ve Aletler	36
3.2. Yöntem	37
3.2.1. PLGA-b-PEG Kopolimer Sentezi	37
3.2.2. PLGA-b-PEG Kopolimer Karakterizasyonu	38
3.2.2.1. ¹ H-NMR analizi	38
3.2.2.2. FT-IR analizi	38
3.2.3. Çift Emülsiyon Yöntemi ile Nanopartiküllerin Hazırlanması	38
3.2.3.1. Katalaz yüklü PLGA-b-PEG nanopartiküllerin hazırlanması	38
3.2.4. Nanopartiküllere Antikor Bağlama	39
3.2.5. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	42
3.2.5.1. Partikül boyutu ve zeta potansiyel	42
3.2.5.2. Morfolojik analiz	42
3.2.6. Katalaz Aktivitesinin Ölçümü	43

İÇİNDEKİLER DİZİNİ (devam ediyor)

Sayfa

3.2.7. Katalazın Proteolitik Enzimlerden Korunum Tayini	43
3.2.8. Hücre Kültürü Çalışmaları	44
3.2.8.1. Endotel hücrelerinin izolasyonu ve kültürü	44
3.2.8.2. Nanopartiküllerin sitotoksitesinin belirlenmesi	44
3.2.8.3. Nanopartiküllerin hücre alım çalışmaları	45
3.2.9. H ₂ O ₂ Kaynaklı Oksidatif Stres Oluşturulması	45
3.2.9.1. H ₂ O ₂ derişiminin hücre canlılığı üzerine etkisi ve LC ₅₀ 'nin belirlenmesi	46
3.2.10. Nanopartikül Formülasyonlarının H ₂ O ₂ Kaynaklı Oksidatif Strese Karşı Cevabının İncelenmesi	47
3.2.10.1. LDH tayin yöntemi	48
3.2.10.2. Lipid peroksidasyonunun tayin yöntemi	48
3.2.10.3. İstatistiksel analiz	49
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	50
4.1. PLGA-b-PEG Kopolimerleri	50
4.1.1. PLGA-b-PEG-COOH Kopolimerinin ¹ H-NMR Analizi	50
4.1.2. PLGA-b-PEG-COOH Kopolimerinin FT-IR Analizi	50
4.2. Katalaz Yüklü PLGA-b-PEG Nanopartiküller	52
4.2.1. Nanopartiküllerin Boyut Analizi ve Zeta Potansiyeli	54
4.2.2. Nanopartiküllerin Morfolojisi	57
4.3. Nanopartiküllerde Katalaz Aktivitesi	59
4.4. Proteolitik Enzim Ortamında Nanopartiküllerde Katalaz Aktivitesi	60
4.5. Nanopartiküllerin Sitotoksitesisi	64
4.6. ICAM-1'e Yönlendirilmiş Katalaz Yüklü Nanopartiküllerin Hücre Alımı	66
4.7. In-Vitro Oksidatif Stres Oluşumu ve H ₂ O ₂ Derişiminin Etkisi	72
4.8. Nanopartikül Formülasyonlarının Oksidatif Strese Karşı Koruyucu Etkisinin Değerlendirilmesi	78
4.8.1. Katalaz ve Nanopartikül Formülasyonlarının Hücre Hasarına Etkisi	79
4.8.2. Katalaz ve Nanopartikül Formülasyonlarının H ₂ O ₂ Kaynaklı Hücre Hasarına Koruyucu Etkisi.....	79
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	86
KAYNAKLAR	88
ÖZGEÇMİŞ	95

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ADE	Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim
AFM	Atomik Kuvvet Mikroskobu
BSA	Sığır serum albümini
CA(PEG) ₂₄	Karboksi-PEG ₂₄ -Amin
CDCl ₃	Dötoro kloroform
DCM	Diklorometan
DMEM	Dulbecco'nun minimum esansiyel ortamı
DMF	Dimetilformamid
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EDC	1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid
EC	Endotel Hücre
EPR	Gelişmiş geçirgenlik ve tutulma etkisi
FBS	Fetal Sığır Serum
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FITC	Fluoressein-izotiyosiyanat
FTIR	Fourier Transform Infrared Spektroskopi
HCl	Hidroklorik asit
HUVEC	İnsan umbilikal kordon damar endotel hücrelerine
ICAM	İntraselüler adhezyon molekülü
KCl	Potasyum klorür
KH ₂ PO ₄	Potasyum dihidrojenfosfat
LC ₅₀	Letal derişim
LDH	Laktat dehidrogenaz
MDA	Malondialdehit
MTT	3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromit
NaCl	Sodyum klorür
NADP	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NaF	Sodyum florür
NaOH	Sodyum hidroksit
Na ₂ HPO ₄	Disodyum hidrojenfosfat
NHS	N-Hidroksisüksinimid
NO	Nitrik oksit

PAMAM	Poli(aminoamin)
PBS	Fosfat Tamponu
PCL	Poli (kaprolakton)
PEG	Poli (etilen glikol)
PGA	Poli (glikolik asit)
PLA	Poli (laktik asit)
PLGA	Poli (laktik-ko-glikolik asit)
PLGA-b-PEG	Poli (laktik-ko-glikolik asit)-poli (etilen glikol) blok kopolimeri
PVA	Poli (vinil alkol)
PVP	Poli(vinilpirolidon)
RES	Retikülo Endotelyal Sistem
SDS	Sodyumdodesilsülfat
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopu
SMC	Düz Kas Hücresi
TBA	Tiyobarbitürik asit
U	Ünite
nm	Nanometre
µm	Mikrometre
O ₂ ^{·-}	Süperoksit radikali
·OH	Hidroksil radikali
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. Katalaz yüklü nanopartiküllerin endotel hücrelere taşınımı (A) ve lizozomda aktivitesini göstermesi (B)	3
Şekil 2.1. Nanotaşıyıcı sistemlere örnekler	5
Şekil 2.2. PLGA-b-PEG kopolimer yapıları	16
Şekil 2.3. Emülsifikasyon/Çözücü uçurma tekniğinin şematik gösterimi	20
Şekil 2.4. Çözücü yer değiştirme tekniğinin şematik gösterimi	22
Şekil 2.5. Emülsifikasyon/Çözücü difüzyon tekniğinin şematik gösterimi	23
Şekil 2.6. Tuzla çöktürme tekniğinin şematik gösterimi	24
Şekil 2.7. Çift (çoklu) emülsiyon yönteminin şematik gösterimi	25
Şekil 2.8. Polimerik nanopartiküllerin hazırlama yöntemleri	26
Şekil 2.9. Katalazın H ₂ O ₂ 'yi suya ve oksijene parçalama reaksiyonunun şematik gösterimi	32
Şekil 2.10. Katalazın tetramerik yapısı	33
Şekil 3.1. PLGA-b-PEG-COOH sentezi ve katalaz yüklü nanopartiküllerin oluşumunun şematik gösterimi	40
Şekil 3.2. BSA kalibrasyon eğrisi	41
Şekil 3.3. H ₂ O ₂ derişiminin hücre canlılığına etkisi	47
Şekil 3.4. MDA-TBA kompleksinin oluşumu	48
Şekil 4.1. PLGA-b-PEG-COOH kopolimerine ait ¹ H-NMR spektrumu	51
Şekil 4.2. PLGA-b-PEG-COOH kopolimerine ait FT-IR spektrumu.	53
Şekil 4.3. Nanopartiküllerin boyut analizi	55
Şekil 4.4. Nanopartiküllerin SEM görüntüleri	57
Şekil 4.5. Nanopartiküllerin AFM görüntüsü ve boyut dağılımı	58
Şekil 4.6. Serbest katalaz ve KatNP-1 partikülleri içine hapsedilmiş katalazın pronaz enzimi ile muamelesi sonucu gözlenen zamana bağlı % aktivite kaybı	62
Şekil 4.7. Serbest katalaz ve KatNP-2 partikülleri içine hapsedilmiş katalazın pronaz enzimi ile muamelesi sonucu gözlenen zamana bağlı % aktivite kaybı	62

Şekil 4.8. Serbest katalaz ve KatNP-3 partikülleri içine hapsedilmiş katalazın pronaz enzimi ile muamelesi sonucu gözlenen zamana bağlı % aktivite kaybı	63
Şekil 4.9. Serbest katalaz ve KatNP-4 partikülleri içine hapsedilmiş katalazın pronaz enzimi ile muamelesi sonucu gözlenen zamana bağlı % aktivite kaybı	63
Şekil 4.10. Nanopartikül derişimlerinin 24 saat sonraki hücre canlılığı üzerine etkisi	65
Şekil 4.11. Nanopartikül derişimlerinin 48 saat sonraki hücre canlılığı üzerine etkisi	65
Şekil 4.12. Katalaz derişimlerinin 24 saat sonraki hücre canlılığı üzerine etkisi ...	66
Şekil 4.13. Endotel hücrelerin Konfokal görüntüsü ve Epi-floresan görüntüsü	68
Şekil 4.14. NP'lerin endotel hücrelerle 2 saat inkübasyon sonrası Konfokal görüntüsü ve Epi-floresan görüntüsü	69
Şekil 4.15. Anti-ICAM-1/NP'lerin endotel hücrelerle 30 dakika inkübasyon sonrası Epi-floresan görüntüsü ve Floresan görüntüsü	70
Şekil 4.16. Anti-ICAM-1/NP'lerin endotel hücrelerle 2 saat inkübasyon sonrası Epi-floresan görüntüsü ve Floresan görüntüsü	71
Şekil 4.17. H ₂ O ₂ 'in endotel hücre canlılığına etkisi	73
Şekil 4.18. Kontrol grubu endotel hücreler (x20) ve Kontrol grubu endotel hücreler (x40)	74
Şekil 4.19. 1.1 mM H ₂ O ₂ ile 1 saat boyunca muamele edilmiş endotel hücreler ve 1.2 mM H ₂ O ₂ ile 1 saat boyunca muamele edilmiş endotel hücreler.....	75
Şekil 4.20. 1.1 mM H ₂ O ₂ ile 6 saat boyunca muamele edilmiş endotel hücreler ve 1.2 mM H ₂ O ₂ ile 6 saat boyunca muamele edilmiş endotel hücreler.....	76
Şekil 4.21. 1.1 mM H ₂ O ₂ ile 24 saat boyunca muamele edilmiş endotel hücreler ve 1.2 mM H ₂ O ₂ ile 24 saat boyunca muamele edilmiş endotel hücreler.....	77
Şekil 4.22. Katalaz ve nanopartikül formülasyonlarının H ₂ O ₂ ile indüklenmiş oksidatif stres sonrası LDH aktivite düzeyleri	85
Şekil 4.23. Katalaz ve nanopartikül formülasyonlarının H ₂ O ₂ ile indüklenmiş oksidatif stres sonrası MDA düzeyleri	85

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 3.1. Hazırlanan nanopartikül (NP) formülasyonları	39
Çizelge 4.1. Hazırlanan NP formülasyonlarının ortalama boyutları, polidispersite indeksleri ve zeta potansiyelleri	54
Çizelge 4.2. Hazırlanan NP formülasyonlarındaki katalaz aktivitesi	60
Çizelge 4.3. Katalaz ve nanopartikül formülasyonlarının hücre hasarına etkisi: LDH ve MDA değerleri	82
Çizelge 4.4. Hücrelerden salınan LDH aktivitesi.....	83
Çizelge 4.5. Hücrelerdeki MDA düzeyi	84

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Reaktif oksijen türlerinin ($\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2^{\cdot-}$, NO , H_2O_2 , vb.) aşırı üretimi ile oluşan oksidatif stresin hipertansiyon ve ateroskleroz gibi kardiyovasküler hastalıkların gelişiminde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir [1]. Normal fizyolojik koşullarda reaktif oksijen türleri vasküler fonksiyonlar için önemlidir. Bu moleküller, vasküler kas hücrelerinin proliferasyonu ve tonusu gibi vasküler fonksiyonlar üzerine etki eden önemli hücre sinyal molekülleri olarak görev alırlar [2]. Ancak hücrenin ihtiyaçlarının ötesinde akümüle olmaları potansiyel olarak farklı yollarla (lipitlere, proteinlere ve nükleik asitlere zarar vererek) oksidatif strese yol açarak [3] hipertansiyon ve ateroskleroz gibi çeşitli damar hastalıklarının oluşmasında rol oynar [4]. Reaktif oksijen türlerinin; endotel ve vasküler düz kas hücrelerinin apoptozuna [5], inflamasyon adhezyon moleküllerinin artışına [6], vasküler düz kas hücrelerinin hipertrofisine ve hiperplazisine [7] sebep olmak gibi vasküler duvar üzerine zararlı etkileri vardır.

Oksidatif stresin vasküler etkilerini gösteren deneysel sonuçlar temel alınarak kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde reaktif oksijen türlerini hedef alan çeşitli stratejiler geliştirilmektedir. Bu stratejiler arasında reaktif oksijen moleküllerinin bozunmasına yönelik, enzimatik olan endojen antioksidanlar (örn; süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, glutatyon s-transferaz, katalaz, mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi, hidroperoksidaz) aday ilaçlar olarak kabul edilmektedirler [8]. Çünkü, oksidatif stres durumunda, hücresel antioksidan savunma sistemleri, reaktif oksijen türlerinin seviyelerini toksisite eşiğinin altında tutmaya yeterli olamazlar [1, 9].

Enzimatik antioksidanlar arasında bulunan katalaz, son yıllarda antioksidatif tedavilerdeki potansiyel etkisi göz önünde bulundurularak üzerinde yoğun çalışılan bir enzimdir. Fakat, kan dolaşımında hızlı bir şekilde eliminasyona uğraması ve hücre içine taşınımının zayıf olması gibi dezavantajları vardır [10]. Tüm peptit ve protein yapıların terapötik amaçla kullanılmasında; (i) gastrointestinal sistemdeki proteolitik enzimlerce hızla bozulmaları, (ii) biyolojik yarı ömürlerinin kısa olması, dağılım katsayılarının düşük ve difüzyon güçlerinin zayıf olması, (ii) biyolojik bariyerlerden geçişlerinin zor olması gibi nedenlerden dolayı sınırlayıcı bazı özellikleri vardır. Bu nedenle bu yapıların terapötik etkileri açısından rasyonel bir yaklaşımla hedef bölgeye taşınması otoriteler tarafından öngörülmektedir [11].

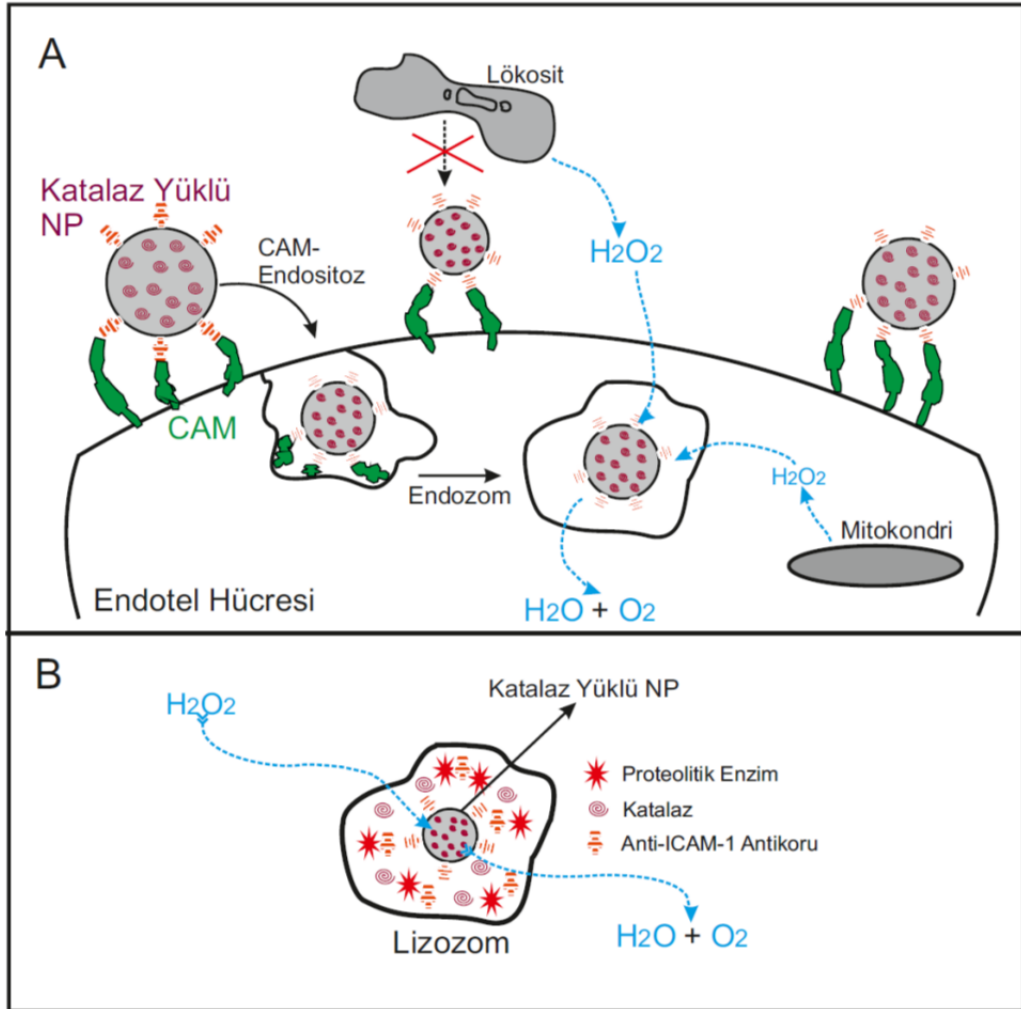
Yukarıdaki bilgiler ışığında bu çalışmanın amacı vasküler oksidatif strese karşı ICAM-1 ile endotele yönlendirilmiş katalaz yüklü polimerik nanopartiküllerin geliştirilmesidir. Bu amaca yönelik olarak PLGA ve PEG polimerlerinden PLGA-b-PEG kopolimerinin sentezlenmesi ve bu polimerin çift emülsiyon yöntemi ile katalaz taşıyıcı bir sistem olarak kullanılması planlanmıştır. Hidrojen peroksitin taşıyıcı duvarından difüze olmasıyla planlanan sistem terapötik aktivitesini gösterecektir. Bu sayede katalazın hedefte parçalanması ve aktivite kaybı önlenmiş olacaktır. Enkapsülasyonun enzim gibi büyük moleküller için iyi bir yöntem olduğu bilinmektedir [11]. Ayrıca bu nanopartikülleri oluşturan bileşenlerin biyobozunur, biyouyumlu ve FDA tarafından onaylanmış olması bu nanopartikül sistemlerinin klinikteki pratik uygulamalara geçişini kolaylaştıracaktır.

Nanotaşıyıcıların endotel hücrelere hedeflendirilmesinin önemi düşünülerek, partiküllerin hazırlanmasında kullanılan PLGA-b-PEG kopolimeri (AB diblok), PLGA ve PEG polimerlerinin konjugasyonu ile sentezlenmiş ve bağlantı uçları fonksiyonlandırılmıştır. Fonksiyonlandırılmış katalaz yüklü sisteme, endotele hedefleme molekülünün (anti-ICAM-1) konjuge edilmesi planlanmıştır.

ICAM-1 (CD54, hücre içi adhezyon molekülü-1) temel olarak endotel hücrelerin lüminal yüzeyinde yer alan Ig süper ailesine mensup bir transmembran glikoproteindir. ICAM-1; vasküler enflamasyonda, oksidan strese ve tromboziste fonksiyon gösterdiği ve up-regüle olduğu (reseptörü daha fazla sentezlendiği) için endotel hücrelere ilaç taşınımında çekici bir hedef durumundadır [12]. ICAM-1 karşıtı antikolar (anti-ICAM-1), hücre kültüründe, hayvan modellerinde ve erken klinik çalışmalarda terapötik ve afinite taşıyıcıları olarak önem kazanmıştır. Taşıyıcı araçlar olmalarına ek olarak; ICAM-1'in antikor blokasyonunun, endotel hücrelere lökosit adhezyonunu baskıladığı ve ilaçların etkilerine anti-enflamatuvar bir yarar oluşturduğu bildirilmiştir [13]. Nanotaşıyıcıların endotel hücrelere hedeflendirilmesi; kanın ilaçlardan temizlenmesini azaltıp, bölgeye özgü taşınımına izin vermekle birlikte; terapötik kapasiteyi artırmakta ve yan etkileri azaltmaktadır. İnternalizasyon (ilacın hücre içine alınması) ve hücrealtı işlemler de ilaç taşıyıcı sistemlerin akılcı tasarımında kritik değer taşımaktadır. Örneğin, antioksidanların endotel hücrelere hücre içi hedeflendirilmesi; hücre gövdesi

içinde üretilen oksidanların detoksifiye edilmesine ve ilaçların endotel hücre yüzeyinden akarak elimine olmasının azalmasına yardım edebilir.

Sonuç olarak Anti-ICAM-1 bağlı katalaz nanopartiküllerinin Şekil 1.1'de şematik olarak gösterilen mekanizma ile endotel hücrelere taşınması ve aktivite göstermesi öngörülmektedir. Bu sistemde anti-ICAM-1 bağlı katalaz yüklü nanopartiküller (200 nm) endotel hücre adhezyon molekülüne (CAM) bağlanır, CAM-aracılı endositoz ile hücre içine alınır. Katalaz, burada aktif kalarak hücreleri hem endotel hücrelerde (mitokondrilerinde) oluşan, hem de aktifleşmiş lökositlerden salınıp endotele difüze olan H_2O_2 'nin zararlı etkilerinden korur. Katalaz yüklü biyoparçalanır ve geçirgen olan nanopartiküller (CAM-aracılı endositoza izin veren) lizozomal proteolize karşı korunmaya devam eder ve H_2O_2 'i parçalar.



2. GENEL BİLGİLER

Nanoteknolojinin temelinde yatan atomik veya moleküler düzeydeki yapıların hassas kontrol yeteneği; fizik, kimya, biyoloji, mühendislik ve malzeme bilimi gibi birçok araştırma ve uygulama alanında yarar sağlamak için büyük bir potansiyel sunmaktadır [14]. Nanoteknoloji günlük hayatımızda etkilerini hissettirirken, nanotıp alanındaki çalışmalar ise klinik uygulamalara elverişli yeni ürünler geliştirmeyi hedeflemektedir. Nanoteknolojinin sağlık uygulamalarını içeren nanotıp alanındaki ilk çalışmalar; terapötik ve diyagnostiklerin akılcı taşınimleri ve hedeflemelerinde kullanılacak yeni modellerin geliştirilmesi üzerine yoğunlaşmıştır [15]. Bu yeni nanosistemlerin yakın gelecekte hastalıkların teşhis, tedavi ve izlenmesinde köklü çözümler ortaya koyacağı farklı otoriteler tarafından kabul edilmektedir [16-19].

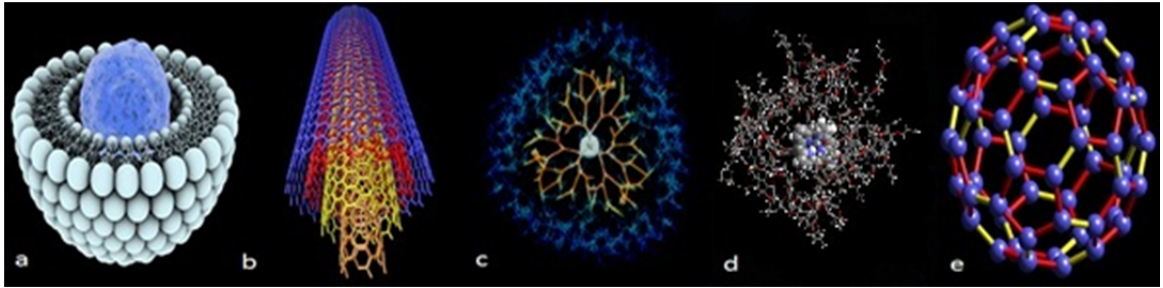
Nanotıp; biyolojik taklitçi gibi davranan nanopartiküller, fonksiyonlandırılmış karbon nanotüpler, nanofiberler, biyomalzeme olarak kullanılan polimerik nano yapılar, doku mühendisliğinde kullanılan nanoporöz membranlar, nanosensörler ve in-vivo ve in-vitro diyagnostikler gibi çok geniş bir konu yelpazesine sahiptir. Ayrıca ilaçları, genetik materyalleri ve diyagnostik ajanları vücuttaki farklı hücrelere ve hücre dışı yapılara taşıyacak şekilde hedeflendirilebilen çok çeşitli nano ölçekte partiküler sistemler mevcuttur.

Biyoloji ve tıpta diyagnostik uygulamalarda kullanılan ve 1-20 nm boyutlarında olan nanopartiküllere örnek olarak demiroksit kristalleri, koloidal altın ve kuantum noktaları verilebilir. Süperparamanyetik özellikleri olan demiroksit kristalleri, manyetik rezonans görüntüleme kontrast ajanı olarak kullanılır. Kuantum noktaları; biyolojik sistemlerde optik ve elektriksel olarak teşhis amaçlı, genellikle in-vitro bazen de in-vivo olarak kullanılır. Kuantum noktalarının floresan emisyon dalga boyu (UV - Yakın IR arası) partikül boyutları değiştirilerek ayarlanabilir; dolayısıyla bu nanosistemler hücre, reseptör, antijen ve enzim görüntüleme bir devrim niteliğinde değerlendirilmektedir. Çok küçük olan bu partiküllerin hacimlerine göre çok geniş olan yüzey alanları, multifonksiyonel nanosistemler geliştirilmesine fırsat sunmaktadır [20].

Nanosistemlerin sağlık alanındaki uygulamalarından bu gelişmelerle birlikte, şunlar beklenmektedir:

- Hastalık patogenezindeki moleküler değişikliklerin algılanması,
- Hastalığın diyagnozu ve görüntülenmesi,
- İlaç taşıyımı ve tedavisi,
- Kombine terapötik ve diyagnostik uygulamalar için multifonksiyonel sistemlerin geliştirilmesi,
- Terapötik ajanın in-vivo etkinliğinin gözlemlenebilmesi,
- Bilimsel keşif ve temel araştırmaları hızlandıracak nano ölçekli teknolojilerin geliştirilmesi [15].

Tüm bu beklentileri karşılamak üzere çeşitli nanotaşıyıcı sistemler (şekil 2.1.) geliştirilmiş olup, aşağıda bu sistemlere değinilecektir.



şekil 2.1. Nanotaşıyıcı sistemlere örnekler: a) Lipozom, b) Karbon nanotüp, c) Dendrimer, d) Polimerik nanopartikül, e) Fulleren

2.1. Terapötik Nanosistemler

İlaç tedavilerinde son yıllarda ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi, etkin maddenin seçici olarak kendi etki bölgesine ulaştırılması ve burada etki göstererek hastalığın tedavi edilmesi amaçlanmaktadır [21]. İlaç taşıyıcı sistem olarak kullanılan nanopartiküller; doğal veya sentetik bazlı polimerlerden, lipidlerden veya metallerden meydana gelebilir ve biyoparçalanabilir özellik gösterirler. Nanopartiküller hücreler tarafından mikrosistemlere göre daha etkili bir biçimde alınırlar, bu nedenle ilaç taşıyıcı sistem olarak önem arz etmektedirler. Terapötik uygulamalar için, ilaçlar partikül matriksinin içine yüklenebileceği gibi, partikül yüzeyine de tutturulabilirler. İlaç taşıyıcı bir sistem, ilacın biyolojik yapıya girişini ve buradaki yolunu kontrol edebiliyor olmalıdır. Çeşitli bileşimlerdeki ve farklı biyolojik

özelliklerdeki nanosistemler, özellikle ilaç ve gen taşıma uygulamaları için araştırılmaktadır. Etkili bir ilaç taşıyıcı nanosistem geliştirebilmek için [22]:

- Sistemin; biyolojik çevre, hedef hücre popülasyonu ve hedef hücre yüzey reseptörleri ile etkileşiminin anlaşılması,
- Hücre reseptörlerinde hastalığın ilerlemesi ile meydana gelen değişikliklerin gözlenmesi,
- Sistemin mekanizması ve ilaç etki bölgesinin, çoklu ilaç uygulamalarının, moleküler mekanizmaların ve hastalığın gözetim altındaki patobiyolojisinin çok iyi bilinmesi gereklidir.

Lipozomlar ve polimerik nanopartiküller, kontrollü ve hedeflendirilmiş ilaç taşınımı için üzerinde en çok araştırma yapılan sistemlerdir. Polimerik nanopartiküller lipozomlara göre hem saklama koşullarında hem de in-vivo kullanımda stabilite açısından üstündür. Bunun yanında, polimer biyodağılımının kontrolü ile ilaç salım profillerinin ayarlanabilmesi gibi bir avantaj da sağlarlar. Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin formülasyonlarında çeşitli polimerler kullanılmaktadır, ancak bunların içinde çalışmalarda üzerinde en çok yoğunlaşılan biyoyumlu ve biyobozunur özellikte olan poli(laktik asit) (PLA) ve poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA)'dır [23].

Nanoboyutlu ilaç taşıyıcı sistemlerin partikül boyutları, kan damarlarını tıkama riski olmadan direkt olarak sistemik dolaşıma verilebilmelerine olanak sağlamaktadır [24, 25]. Partiküllerin, organizmadaki davranışlarındaki en büyük etkenin boyutları olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalar, nanopartiküllerin opsonizasyon ve buna bağlı olarak makrofajlar tarafından tanınma ve fagosite edilmelerinin boyuta bağlı olduğunu göstermektedir [26, 27]. 200 nm'den küçük boyuta sahip partiküllerin sistemik dolaşımdan uzaklaştırılma oranlarının büyük partiküllere kıyasla daha düşük olduğu, dolayısıyla kanda dolaşım sürelerinin de daha uzun olduğu gösterilmiştir [28].

2.1.1. Lipozomlar

Lipozomlar, aralarında sulu faz bulunan bir veya daha çok sayıda biyolojik membrana benzer yapıdaki lipid tabakalarının oluşturduğu küresel yapılardır. Boyutları 30 nm ile 10 µm arasında değişir [29, 30]. Lipozomlar ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanılıyor olmakla birlikte gen tedavisinde kullanımları da son

zamanlarda en çok araştırılan konulardan biridir [31]. Lipozomlar çeşitli şekillerde geliştirilebilirler:

- Çok tabakalı lipozomlar: Boyutları 500-5000 nm arasında olan, birkaç eşmerkezli çift tabakadan oluşan lipozomlardır.
- Küçük tek tabakalı lipozomlar: Tek bir çift tabakadan oluşan, boyutları 100 nm civarında olan lipozomlardır.
- Büyük tek tabakalı lipozomlar: Boyutları 200-800 nm arasındadır.
- Uzun süre dolaşımda kalan lipozomlar: Yüzeyi çeşitli polimerlerle işlenmiş olan lipozomlardır ve işlenmemiş lipozomlara göre kan dolaşımında daha uzun süre kalabilirler.
- İmmünolipozomlar: Yüzeyine antikor bağlanmış ve vücuttaki antijen bölgesini tanıyan lipozomlardır.

Lipozomların uygun birer taşıyıcı olmalarını sağlayan özellikleri şu şekilde sıralanabilir:

- Biyouyumludurlar.
- Hidrofilik ilaçları çift tabakanın içindeki sulu fazda, hidrofobik ilaçları ise membranda hapsedebilmeleri açısından her iki tipte ilacı da taşıyabilmektedirler.
- Lipozomlar, farmasötikleri hücre içine ve hücre içi kompartmanlara ulaştırma fırsatı sunarlar.
- Boyut, yük ve yüzey özellikleri, hazırlama sırasında lipit karışıma farklı maddeler eklenerek kolaylıkla değiştirilebilir.
- Lipozom içine hapsedilmiş farmasötikler, dış etkenlerden korunarak inaktive olmaları engellenebilir [30].

Buna rağmen lipozomların geliştirilmesi çalışmalarını kısıtlayan bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Düşük enkapsülasyon verimi, kan bileşenlerinin olduğu ortamlarda hidrofilik etkin maddenin lipozomdan dışarıya hızlı bir şekilde sızması ve saklama koşullarındaki zayıf stabilitesi bu dezavantajlar arasında sayılabilir [11].

Yang ve ark.'nın [32] yaptığı çalışmada, bir antitümör bileşiği olan Oksaliplatin, PEGile edilmiş lipozomlara yüklenmiştir. Kolon karsinoması için geliştirilen formülasyon, Oksaliplatin'in serbest halde vücuda verilmesine kıyasla apoptotik cevabı önemli derecede artırmıştır. Floresan mikroskopla yaptıkları in-vivo görüntüleme, tümör dokusuna hedeflendirmenin başarılı olduğunu gözlemişlerdir.

2.1.2. Nanokristaller ve Nanosüspansiyonlar

Nanokristaller, binlerce molekülün kristal formda oluşturduğu agregatlarıdır. Bileşenleri saf ilaç ve üzerine ince bir tabaka halinde kaplanmış bir yüzey aktif madde veya kombine yüzey aktif maddelerdir. Nanosüspansiyonların üretimi için, toz halindeki ilaç sulu yüzey aktif madde çözeltisinde çok hızlı karıştırma altında disperse edilir. Oluşan makrosüspansiyon; yüksek basınçlı homojenizasyon, püskürterek kurutma, aşırı doymuş çözeltinin nanokristalizasyonu ve yaş öğütme gibi yöntemlerle nanoboyuta getirilir. Zayıf çözünürlükteki ilaçların biyoyararlanımlarının artırılması ve parenteral dozaj formlarının hazırlanabilmesi için nanokristaller bir çözüm yolu sunmaktadır. Ayrıca nanokristallerin boyutu sayesinde, kapillerlerden güvenli ve etkili bir geçiş sağlanır. Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi'nden (FDA) onay almış nanokristallere örnek olarak Sirolimus etkin maddesini içeren Rapamune® ve Aprepitant etkin maddesini içeren Emend® verilebilir [33].

İlaç etkin maddelerinin büyük çoğunluğunun hidrofobik özellikte olması, vücut sıvılarında çözünabilirliklerini ve dolayısıyla uygulanabilirliklerini kısıtlamaktadır. Bu açıdan bakıldığında, bu tip etkin maddelerin çeşitli yöntemlerle nanokristaller şeklinde yeniden hazırlanması, hiçbir yüzey aktif madde veya taşıyıcı sistem kullanımına gerek kalmadan vücut sıvılarında çözünmelerini mümkün kılar. Baba ve ark. [34] yaptıkları bir çalışmada, hidrofobik özellikte antikanser bir ilaç olan 2-devinil-2-(1-heksiloksietil)pirofeoforbid'in nanokristal halini hazırlamışlar ve in-vitro ve in-vivo modellerde saf ilaç etkin maddesi ile karşılaştırmışlardır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, ilacın çözünürlüğünün ve hücresel alımının sürfaktan bazlı konvansiyonel ilaç sistemine göre yüksek olduğu gözlenmiştir.

2.1.3. Dendrimerler

Dendrimerler genellikle 1-10 nm boyutunda dallanmış polimerik yapılardır. Dendrimer kelimesi, “dendri” ve “meros” kelimelerinden türemiştir. Yunanca’da “dendri” ağaçlar, “meros” ise kısım anlamına gelmektedir. Dendrimerler kolay fonksiyonlandırılabilen ve manipüle edilebilen basit dallı monomer birimlerinden adım adım oluşturulan üç boyutlu sentetik moleküllerdir. Dendrimerler, “dendritik moleküller” ve “kaskat polimerler” olarak da isimlendirilirler. Bir çekirdek ve dendron olarak adlandırılan dalsı yapılardan oluşurlar [35].

Literatürde, Majoros ve ark.'nın [36] yaptığı bir çalışmada poli(aminoamin) (PAMAM) dendrimerleri hazırlanmış ve multifonksiyonel bir şekilde hedeflendirilmiş ilaç taşınımı yapabilmeleri amacıyla modifiye edilmiştir. Hazırlanan bu dendrimerik sistemlere, kanser kemoterapisinde kullanılmak üzere Metotreksat adlı ilaç ve görüntüleme ajanı olarak fluissein-izotiyosiyanat (FITC), spesifik tümör hedeflendirme için kanser hücrelerinde aşırı salgılanan folat reseptörlerine yönlendirme yapan folik asit ile birlikte yüklenmiştir. Non-spesifik hedeflendirmeye neden olabilecek konjugasyonları engellemek amacıyla da primer amino gruplarını nötrlemek için asetilasyon uygulanmıştır. Gerekli karakterizasyonları da yapılan bu sistemin belli kanser türlerine hedeflendirme amacıyla kullanılabilceği düşünülmektedir. Bir başka çalışmada da Khandare ve ark. [37] tarafından yine PAMAM dendrimerlerine bir kortikosteroid olan Metil-Prednizolon yüklenmiş ve dendrimerlerin hücresel alımlarının incelenmesi amacıyla da FITC ile işaretlenmiştir. İnsan akciğer epiteli karsinoma hücreleri ile yapılan bu çalışmada, dendrimer sistemlerinin hücrelere hızlıca alındığı ve yüksek oranda sitozolde toplandığı gösterilmiştir. Bunun yanısıra, serbest Metil-Prednizolon ile yapılan karşılaştırmada, kortikosteroid aktivitesinin de karşılaştırılabilir olduğu ve daha kısa zamanlarda elde edilebildiği belirtilmiştir. Bu sistemlerin ilaç stabilitesinin dendrimer yapı içinde korunması ve ilacın farmakolojik etki yerinde birikim göstermesinin sağlanması yönünden avantajlı sistemler olduğu dikkat çekmektedir. Ayrıca bu sistemler, çok düşük polidispersiteye sahip olmaları, düzenli ve yüksek derecede dallanma özelliğinde olabilmeleri ve iyi tanımlanabilen molekül ağırlıklarının olması gibi birçok özelliğe sahiptirler [35, 38-43].

İlaç taşıyıcı sistemlerde kullanılan düz yapılı polimerlere kıyasla dendrimelerin bazı avantajları bulunmaktadır. Bunlar:

- Dendrimerlerin yüzeyinde yüksek yoğunlukta bulunan reaktif grupların varlığı sayesinde, biyoaktif moleküllerin yüzeyde kullanılabilmelerine olanak sağlamaları; yani kolayca modifiye edilebilmeleri [42-44]
- İyi tanımlanabilen küresel yapıları, kestirilebilen molekül ağırlıkları ve monodispersite özellikleri sayesinde tekrarlanabilir farmakokinetik özelliklerinin olması [40, 41]
- Farklı biyomedikal amaçlara yönelik olarak kullanılabilir olan kontrol edilebilir büyüklüklerinin olması; yani dallandırılabilir yapının tekrar (jenerasyon) sayısının ve tekrarlanan birimin kendi boyutunun belirlenebilmesi [38, 39, 43]
- Hücre membranından yüksek derecede geçebilmeleri sayesinde, konjuge edilen ya da kompleksleştirilen ilaç molekülünün de hücre alımının yüksek olması [42]
- İmmünojenik özelliklerinin olmamasından dolayı, sentezlenen peptit taşıyıcılar ya da doğal protein yapıları taşıyıcılardan daha güvenilir olmaları [45]
- Arttırılmış penetrasyon ve kalış özelliklerinin bulunması sayesinde kanser hücreleri tarafından alımlarının yüksek seviyelerde olması [46]
- Kendilerinden ilaç ya da biyolojik aktif madde salımının tam olarak programlanabilmesi sayesinde; düşük toksisite, arttırılmış biyoyararlanım ve dozlamının kolaylaştırılmasının sağlanabilmesi [47-49].

Dendrimer kaynaklı Polyfect® ve Superfect® halen ilaç piyasasında ticari olarak bulunmaktadır [45].

2.1.4. Fullerenler

Fullerenler, 1985 yılında H. W. Kroto, B. Curl ve R. Smalley tarafından keşfedilen bir karbon allotrop ailesidir. C₆₀ yani 60 atomlu, futbol topu şeklindeki fullerenlerin en stabil olduğu görülmüş ve bunlara “buckminsterfulleren (buckyball)” adı verilmiştir. Bu isim Amerikalı bir mimar olan Buckminster Fuller’in mimari tasarımlarına benzeyen yapılarından ötürü verilmiştir [50, 51]. Çalışma grubu, bu buluşları sayesinde 1996 yılında Kimya Nobel ödülünü almışlardır [52]. “Buckyball“

yapısında her bir karbon atomu grafitteki gibi diğer üç karbon atomuna bağlanır ve küresel bir yapı oluşturur [51].

Fullerenler nanoboyutta olmalarına karşın geniş bir iç hacme sahiptirler. Bu nedenle terapötik amaçla hücre ya da dokuya gönderilecek olan ilaç molekülleri, proteinler, peptidler, nükleik asitler bu taşıyıcılara yüksek oranda yüklenebilirler.

Zakharian ve ark. [53] aerosol uygulamasını takiben akciğerlerden ilacın hızla uzaklaştırılmasına karşı bir sistem geliştirmiştir. Bu sistemde antikanser bir ilaç olan Paklitaksel, fullerenler ile konjuge edilmiş ve daha sonra lipozomal bazlı aerosol sistemlerle akciğere ilaç taşınımı tasarlanmıştır. Doku kültürü çalışmaları ile ilacın ciddi antikanser etkinlik gösterdiği ve kontrollü ilaç salımının sağlandığı gösterilmiştir. Diğer taraftan fullerenlerin suda çözünürlüklerinin çok zayıf olması, biyolojik materyallerle etkileşimlerini oldukça zorlaştırır. Hidrofilik bileşenlerin kovalent bağlanmaları ve bu yolla biyolojik ortamlarda çözünürlüklerinin önemli miktarda artması oldukça hidrofobik olan C60'ın organik işlevselliğinin artmasını sağlamıştır. Özgün yapısal özelliklerinin yanısıra uygun şekilde çözündüklerinde çok çeşitli uygulamalarda aktif olarak rol almışlardır.

Friedman ve çalışma arkadaşları [54] fullerenlerin diamin diasit türevlerinin HIV spesifik proteaz enzimi için etkin bir inhibitör olduğunu ispatlamışlardır. Çalışmada fulleren türevleri ve enzim arasındaki güçlü hidrofobik etkileşimin virüsün inhibisyonuna yol açtığı sonucuna varılmıştır.

Gonzalez ve ark. [55] yaptığı bir başka çalışmada ise bis-fosfat ile fonksiyonlandırılmış fullerenlerin spesifik kemik dokusuna hedeflendirmede başarılı bir şekilde kullanılabileceği ispatlanmıştır.

Dugan ve ark. [56] tarafından yapılan bir diğer araştırmada ise, suda çözünebilir karboksilik asit ile her molekül için üç malonik asit grubu içeren fonksiyonelleştirilmiş fulleren türevleri sentezlenmiş ve serbest radikal temizleyici olarak yüksek verim sağlanmıştır.

2.1.5. Karbon Nanotüpler

1991 yılında Sumio Iijima tarafından keşfedilmişlerdir. Fulleren yapısındaki gibi her bir karbon atomu diğer 3 karbon atomuyla bağ yapmıştır ve bu yapılar silindirik

şekildedir. Karbon nanotüpler tek tabakalı (SWTs) ve çok tabakalı (MWTs) olabilirler. Çok tabakalı karbon nanotüpler, tek tabakalı karbon nanotüplerden daha önce bulunmuş olup, iç içe geçmiş silindirik yapılar görünümünde, 1 nm çapında ve birkaç yüz nm uzunluğundadırlar [51]. Karbon nanotüpler çok farklı mekanik ve elektronik özellikler sergilemektedir. Çok esnek ve çok sağlamdırlar, eksenleri yönünde çekilmeye karşı mukavemetleri çok kuvvetlidir. Ark, laser ve kimyasal buharlaştırma yöntemleriyle üretilebilirler [52].

Karbon nanotüpler; biyomedikal alanda (örneğin; ilaç, nükleik asit, peptid ve protein taşıyıcı sistemler, gen terapisi, doku mühendisliği ve nanosensörler vb.) kullanılmaktadır. Ancak biyouyumlulukları, çözünürlükleri ve ilaç yükleme kapasitelerini artırmak için, türevlendirilmeleri ve/veya yüzey modifikasyonu gerekmektedir. Bu amaçla karbon nanotüpler; polisakkaritler, aminoasitler ve nükleik asitler ile foksionlandırılmıştır. Karbon nanotüplerin yüzey modifikasyonu ile birlikte sulu ortamlarda çözünürlüklerinin ve ilaç yükleme kapasitelerinin arttığı yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur.

Cai ve ark. [57] ekzojen DNA kaynaklarının memeli hücrelerine transdüksiyonu üzerine yaptıkları bir çalışmada karbon nanotüplerden yararlanmışlardır. DNA transdüksiyonunda karşılaşılan düşük transdüksiyon etkinliği ve transdüksiyon sonrası düşük hücre yaşayabilirliği gibi olumsuzlukların önüne karbon nanotüp yapılar kullanılarak geçilmiştir. Nikel ile modifiye edilmiş nanotüpler, manyetik alan yönlendirmesi ile hücrelere hedefleme yapılarak yüklenen plazmid DNA'lar istenen hücrelere aktarılmış ve transdüksiyon başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

Bhirde ve ark. [58] yaptığı bir çalışmada da antikanser bir ajan olan Cisplatin, kanser hücrelerine hedefleme sağlamak amacıyla kullanılan epidermal büyüme faktörü ile birlikte tek duvarlı karbon nanotüp yapılarına yüklenmiştir. Yapılan in-vitro deneyler, bu yapıların hızlıca kanser hücrelerine alındığını göstermiştir. Bu sistemin canlı farelere uygulanması ile hedef kanser hücrelerine büyük oranda ilaç taşınımının başarılı olduğu ve kanser hücrelerinin etkili bir şekilde yok edildiği bildirilmiştir. Buna karşın büyüme faktörü ile hedeflendirilmeyen alternatif formülasyonun 20 dakika içerisinde tümör bölgesinden uzaklaştırıldığı belirlenmiştir. Buna göre karbon nanotüplerin multifonksiyonel özellikte olmaları

sayesinde kanser tedavisinde büyük önem taşıdıkları ve etkili oldukları sonucuna varılmaktadır.

2.1.6. Polimerik Nanopartiküller

Nanopartiküller, boyutları 10 ile 1000 nm arasında değişen koloidal sistemlerdir. Etkin madde, hazırlama metoduna bağlı olarak nanopartikül içerisinde hapsedilmiş, çözündürülmüş, enkapsüle edilmiş ve/veya nanopartikül yüzeyine adsorbe ettirilmiş nitelikte olabilir. Polimerik nanopartiküller, genellikle nanoküre ve nanokapsül şeklinde üretilirler. Nanokapsüller, ilacın polimerik membran içerisinde bulunan kaviteye yerleştirildiği veziküler sistemlerdir. Nanoküreler ise ilacın içerlerinde disperse edildiği matriks sistemlerdir. Biyoparçalanabilir polimerik nanopartiküller;

- İlaçların kontrollü salım uygulamalarındaki kullanımları,
- Organ ve dokulara hedeflendirilebilmeleri,
- Gen tedavisinde DNA taşıyıcısı olarak kullanılmaları,
- Protein, peptit ve genlerin oral olarak verilmesinde taşıyıcı olmaları gibi özellikleri ile çarpıcı bir araştırma konusu haline gelmişlerdir.

Bunların yanında, lipozomlara tercih edilmelerini sağlayan, ilaç ve protein gibi maddelerin stabilitesinin artırılmasına yardımcı olmak, yararlı kontrollü salım özellikleri sunmak gibi avantajları da vardır. Polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında poli(D,L-laktid), poli(laktik asit) PLA, poli(D,L-glikolid) PLG, poli(laktik-ko-glikolik asit) PLGA, poli(siyanoakrilat) PCA, jelatin, kitosan, sodyum aljinat gibi çeşitli biyoparçalanır polimerlerin kullanımı yaygındır [11]. Biyobozunur polimerik malzemeler kimyasal kökenleri baz alındığında sekiz ana grupta incelenirler [59]:

1. Biyobozunur doğrusal alifatik poliesterler (poliglikolit ve polilaktit gibi) ve kopolimerleri,
2. Doğrusal alifatik poliesterlerin kendileri dışında monomerle oluşturdukları kopolimerler (poly-L-laktikasit-ko-L-lisin),
3. Polianhidritler,
4. Poliortoesterler,
5. Poliester-eterler,

6. Biyobozunur polisakkaritler (kitin ve kitosan gibi),
7. Poliaminoasitler (poli-L-lisin),
8. Biyobozunur inorganik polimerler.

Bu sınıflandırmadaki en başarılı ve yaygın kullanılan polimer grubu doğrusal alifatik poliesterlerdir. Bu polimer ailesi kontrol edilebilir biyobozunurluk ve yüksek biyouyumluluk özellikleri sayesinde en önemli sentetik polimerlerdendir. Poli(laktik asit) (PLA), poli(glikolik asit) (PGA) ve bunların kopolimeri olan poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) en yaygın kullanılan biyobozunur polimerlerdir. PGA 1970'lerde biyobozunur cerrahi iplik olarak kullanılmış ve üretimi PLA ve PLGA ile birleştiğinde biyomedikal pazarda en büyük üretim hacmine öncülük etmiştir [60]. Söz konusu polimerler o zamandan beri çok çeşitli biyomedikal ve farmasötik uygulamalarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Özellikle amorf yapıları PLGA kopolimerleri;

- Yapılarındaki PLA ve PGA oranının değiştirilmesi ile spesifik uygulamalara özel bozunum kinetikleri sağlayabilmesi,
- Hidroliz ve enzimatik yollarla insan vücudunda bozunabilmeleri ve bozunma ürünlerinin üre olarak atılabilmesi ya da trikarboksilik asit döngüsüne katılabilmesi,
- Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi'nden (FDA) klinik uygulamalar için onay almış olması sayesinde farmasötik ve biyomedikal alanda oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

Semete ve ark. [61] tarafından yapılan bir çalışmaya göre PLGA kullanılarak çift emülsiyon yöntemi ile 200-350 nm boyutunda nanopartikül formülasyonları hazırlanmıştır. Bu çalışmada hazırlanan nanopartiküllerin olası toksik etkileri değerlendirilmiştir. PLGA nanopartiküllerinin etkileri benzer boyuttaki çinko oksit, demir oksit ve silika gibi çeşitli endüstriyel nanopartiküllerin etkileri ile in-vitro ve in-vivo olarak kıyaslanmıştır. Hücre canlılığını değerlendirmek amacıyla in-vitro sitotoksikite çalışması yapılmıştır. Hücre canlılığı PLGA için % 75'in üzerinde bulunmuştur. İn-vivo toksisite testleri ve histopatolojik değerlendirme sonucunda spesifik anatomik, patolojik değişiklikler veya doku hasarı gözlenmemiştir. PLGA nanopartiküllerinin oral yolla verildikten sonra doku dağılımı ve dokuda kalışı 7 gün süresince analiz edilmiştir. 7 gün sonra partiküller; beyin, kalp, böbrek, karaciğer,

akciğer ve dalakta izlenmiştir. Partiküllerin % 40.04'ü karaciğer, % 25.97'si böbrek ve % 12.86'sı beyinde lokalize olmuştur. En düşük lokalizasyon dalakta gözlenmiştir. Bu testlere dayanarak, çeşitli endüstriyel nanopartiküllerde görülen toksik etkilerin PLGA gibi sentetik polimerlerde gözlenmediği ortaya koyulmuştur. Pamujula ve ark. [62] tarafından yapılan çalışmada, Amifostin'in aktif metaboliti olan WR1065'in PLGA nanopartikül formülasyonları hazırlanmış ve fareler üzerindeki radyoprotektif etkileri gözlenmiştir. WR1065'in oral uygulamadaki zayıf absorpsiyonu bu tür bir çalışmayı gerektirmiştir. Nanopartikülleri hazırlamak için püskürterek kurutma yöntemi kullanılmıştır. Partiküllerin % 90'ı, 154-483 nm aralığındadır ve WR-1065 yüklemesi % 21.7'dir. Formülasyonun radyoprotektif etkinliği; farelerin 30 günlük yaşam süresinde azalma, kemik iliği baskılanmasında azalma ve intestinal hasardaki azalma ölçülerek hesaplanmıştır. Çalışma sonucunda WR-1065/PLGA nanopartikülleri ile oral tedavide radyasyonla indüklenen kemik iliği baskılanmasının tersine döndüğü görülmüştür.

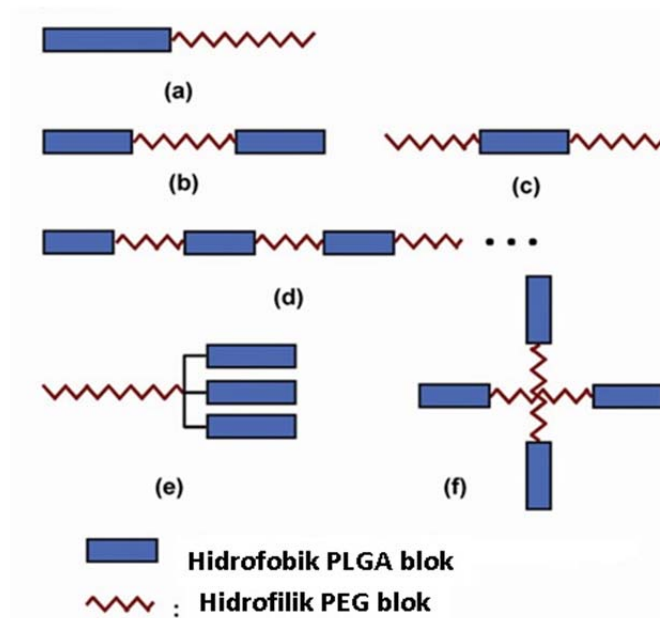
Ancak bütün bu popülerliğine rağmen, PLGA kopolimerlerinin diğer biyobozunur poliesterler gibi sahip olduğu güçlü hidrofobik özellikleri pratik uygulamalarda bazı sınırlamalara yol açmaktadır. Ayrıca, etkin farmasötik uygulamalar da bu polimerlerle hazırlanmış partiküler yapıların biyolojik ortamla uyumlarını sağlamak için yüzey özelliklerinin uygun hale getirilmesini gerektirmektedir. Polimer yapısına PEG gibi biyouyumlu ve hidrofilik bir polimerin eklenmesi, sonuç malzemeye hidrofilik karakter ve malzemenin spesifik uygulamalarına yönelik farklı fiziko-kimyasal özellikler kazandırılmasını sağlamaktadır. Bunlara ek olarak, yüksek orandaki polimer zinciri esnekliği sayesinde, PEG polimer birimleri serbest dönme hareketleri ve yüksek hidrofilik karakterleriyle, hidrofobik polimer yapısını perdeleyerek retiküloendotelial sistem (RES) tarafından tanınmayı geciktirici bir hidrofilik sterik bariyer yaratırlar. Ayrıca, malzeme yüzeyinde bulunan PEG zincirleri malzeme yüzeyine antikorlar gibi hedefleme moleküllerinin takılabilmesini sağlamaktadır, bu da malzemenin istenilen dokuya yönlendirilmesine izin vermektedir. Hidrofilik PEG segmentinin eklenmesiyle oluşan PLGA-b-PEG kopolimerleri, yapısını oluşturan PLGA ve PEG polimerlerinden farklı kristallik, çözünürlük ve biyobozunum özellikleri ve ayrıca yukarıda bahsi geçen avantajları sebebiyle medikal alanda kullanılabilen yeni bir malzeme sınıfı olarak kabul edilebilirler [63].

Bu bilgiler ışığında, PLGA-b-PEG kopolimerlerine farmasötik ve biyomedikal alanda olan mevcut ve potansiyel talep açıktır.

2.1.6.1. PLGA-b-PEG kopolimerler

Malzeme bilimi ve nanokimya gibi alanlarda ilgi çekici konulardan birisi, şekil ve işlevleri iyi tanımlanmış supramoleküler (molekül ötesi) yapılar oluşturmaktır. Blok kopolimerler; hidrofobik ve hidrofilik etkiler, elektrostatik etkileşimler, hidrojen bağları ve metal komplikasyonu gibi kovalent olmayan kuvvetler üzerinden kendi kendine oluşan (self-assemble) yapılar olmaları sebebi ile supramoleküler yapıların oluşturulmasında yüksek potansiyele sahiptirler. Özellikle PEG içeren blok kopolimerlerin sulu ortamda kendi kendine oluşturdukları polimerik miseller; mükemmel biyoyumlulukları, kan dolaşımında uzun süre kalmaları ve toksik olmamalarından ötürü ilaç ve gen taşıyıcı sistemler olarak büyük ilgi görmektedir.

Günümüze kadar, AB diblok [64], ABA ve BAB triblok [65, 66], çoklu blok [67], dallı blok ve yıldız şekilli blok [68] gibi çeşitli blok kopolimer yapıları sentezlenmiştir. A'nın PLGA bloğunu ve B'nin PEG bloğunu temsil ettiği bu polimer yapıları Şekil 2.2'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. PLGA-b-PEG kopolimer yapıları: (a) AB diblok, (b) ABA triblok, (c) BAB triblok, (d) çoklu blok, (e) dallı blok ve (f) yıldız şekilli blok.

Blok kopolimerin çözünürlüğünü ve bozunma kinetiğini polimerlerin molekül ağırlıkları ve kimyasal kompozisyonu belirler. Düşük molekül ağırlıklı ve kısa hidrofobik bloğa sahip polimerler yüksek hidrofilitate gösterirken, yüksek molekül ağırlıklı ve uzun hidrofobik bloğa sahip polimerler düşük hidrofilitate gösterirler. Bu bağlamda, düşük molekül ağırlığına ve uzun hidrofilitate bloğa, amorf bir yapıya ve daha fazla glikolit miktarına sahip polimerler daha hızlı bir bozunma sergilerler.

Diğer taraftan PEG'lenmiş polimerik misellerin PEG kabukları, RES organları olan karaciğer, dalak ve kemik iliği hücreleri tarafından tanınmalarını önler. Bu tanıma opsonizasyon olarak da bilinmektedir. PEG kabukları sayesinde kanda bulunan opsonik proteinler partikül yüzeyine adsorbe olamamakta ve RES organları aldatılarak kanda kalış süresi uzatılmaktadır. Bu modifikasyonun uygulandığı sistemler, "görünmez partiküller" olarak da tanımlanmaktadır. PEG, düşük toksisite ve immunojenisite özellikleri ve FDA tarafından çeşitli farmasötik formülasyonlarda kullanımına izin verilmiş olması yönünden görünmez partiküller elde edilmesinde biçilmiş kaftan olarak görülmektedir [69]. Buna ek olarak, blok kopolimerin kendi kendine oluşumu ile artan moleküler kütle, renal klerensi düşürerek, misellerin kan dolaşımında daha uzun süre kalmasını sağlar. Nitekim antikanser ilaçların uygun konsantrasyonlarını, tümör dokusuna hassas ve güvenli bir şekilde iletmek için, nano boyuttaki çeşitli PEGlenmiş polimerik miseller geliştirilmiştir. Bu taşıyıcıların bazıları, tümörlü dokularda birikmelerini sağlayan gelişmiş geçirgenlik ve tutulma etkileri (EPR) sebebiyle klinik kullanım için onaylanmıştır. Ayrıca, PEGlenmiş polimerik misellerin yüzeyine spesifik ligand moleküllerinin takılması, hedef dokudaki spesifik ve gelişmiş hücresel alımı artırarak, gerekli etkin dozun ve yan etkilerin azaltılmasını sağlar. Ligand yüklenmiş ve PEG'lenmiş polimerik misellerin, hedeflenebilir ilaç ve gen taşıyıcıları olarak kullanılması umut vericidir. Bununla birlikte, PEG bazlı blok kopolimerlerin sonlandığı grup (genellikle metoksi grubu) inert olmalıdır. PEG'in son grup olarak kullanılması ligand vb. grupların bağlanması için uygun değildir. Hedeflenebilir ilaç ve gen taşıyıcılarının başarılı olarak geliştirilebilmesi için PEG bazlı blok kopolimerin son ucunun fonksiyonlandırılabilir olması ve PEG zincirinin sonundaki reaktif gruba ligand bağlanmasının kolay olması gerekmektedir [70].

Sheng ve ark. [71] ürettikleri PLA nanopartiküllerinin yüzeyine PEG moleküllerini kovalent olarak bağladıktan sonra hidrofilik kitosanı da fiziksel olarak yüzeye adsorbe ettirmek yoluyla kombine bir modifikasyon gerçekleştirmiştir. Bu çalışmada fare peritoneal makrofaj hücreleri ile yapılan in-vitro çalışmalar ve farelerde enjeksiyon yoluyla yapılan in-vivo klerens çalışmaları sonucunda PEG ile yapılan modifikasyonun opsonizasyonu engellemiş olduğu, ancak kitosan kaplamanın da yapıldığı kombine yaklaşımda nanopartiküllerin kan dolaşımında çok daha uzun süreler kalabildiği (yarılanma ömrü sadece PEG ile modifiye edilenlerin yaklaşık 60 katı) kanıtlanmıştır. Yüzey hidrofilitésinin optimizasyonu ile daha uzun süre etki gösterebilecek sistemlerin hazırlanabilmesi açısından bu çalışma önem arz etmektedir. Poli(vinilpirolidon) (PVP) kaplı nanopartiküller de bu etkinin sağlanabilmesi açısından PEG kaplama ile karşılaştırılmış ve PEG kaplamanın üstünlüğü göze çarpmıştır [72].

Sonuç olarak PLGA-b-PEG kopolimerler yukarıda bahsi geçen özellikleri nedeniyle ilaç taşınımında ve hedeflendirmede araştırmacıların üzerinde en çok çalışmakta olduğu polimer grubudur.

2.2. Terapötik Sistemlerde Hedeflendirme Yaklaşımları

2.2.1. Pasif Hedeflendirme

Belli durumlar altında, kan damarlarının duvarları sızdırır hale gelebilmektedir. Tümör hücreleri çok hızlı geliştikleri için besin ve oksijen ihtiyaçları da çok fazladır. Bu yüzden hızlı damarlaşma göstermektedirler ve bu durum hasarlı bir damar yapısının oluşmasına sebep olur. Makromoleküller veya lökositler, bu sızdırır damar yapısından süzülerek o bölgede tutulmaktadır. Bu duruma gelişmiş geçirgenlik ve tutulma etkisi (EPR etkisi) denir. Tümörlü dokuların vasküler geçirgenliği kinin ve büyüme faktörleri gibi maddelerin salgılanması ile de artabilmektedir. Artmış vasküler geçirgenliğin bir sonucu olarak, 10-500 nm boyut aralığındaki misel, lipozom ve polimerik partiküller seçici olarak tümörlü dokuya ulaşmaktadırlar [73]. Boghaert ve ark. [74] tarafından yapılan çalışmada, dar terapötik aralıklı ilaçlardan olan antineoplastik etkili Kalişeamisin'in akut myeloid lösemide kullanımında antikor konjugasyonu yoluyla yapılan aktif hedeflendirmenin tümör hücrelerinin spesifik olarak ürettiği antijene bağımlı olduğu

için sınırlı kalması sebebi ile pasif hedeflendirmenin katkısı da önemli görülmüştür. Makrofajlara yapılan hedeflendirmenin otoimmün kan rahatsızlıkları, diyabet ve romatoid artrit gibi hastalıkların tedavisinde kullanılan etkin bir yaklaşım olması sebebiyle, Ye ve ark. [75] nanopartiküllerin RES organlarında (dalak, karaciğer gibi) birikme eğilimlerini göz önünde bulundurarak romatoid artrit tedavisinde bu yaklaşımdan faydalanabileceklerini öngörmüşlerdir. Yaptıkları çalışmada antiromatizmal bir ilaç olan Aktarit, katı lipid nanopartiküllere yüklenmiş ve dalakta (makrofajların üretildiği en büyük organ) akümüle olması sağlanmıştır. Bu sayede Aktarit'in oral kullanımındaki nefrotoksisite ve gastrointestinal yan etkileri elimine edilirken, ilaç etkinliği artırılmıştır.

2.2.2. Aktif Hedeflendirme

Etkin bir hedefleme stratejisi tedavinin etkinliğini artırmakta ve ilaçlara bağlı yan etkileri azaltmaktadır. İlacın belirli bir hedef bölgeye ulaşması için lipozom, misel ve partikül gibi taşıyıcılara ligand konjuge etmek gerekmektedir. Bu ligandlar; antikör, karbonhidrat, aptamer veya küçük moleküller olabilmektedir. 1975 yılında monoklonal antikörlerin keşfi ile birlikte çoğu araştırmacı ilaç ve ilaç taşıyıcılarına monoklonal antikörleri konjuge etmiştir [73]. Kabanov ve ark. [76] ilk kez bir misel yapısına ligand konjuge etmiştir. Beyne özgün bir antikoru, Haloperidol içeren misellere konjuge ederek, bunların hedeflenmemiş misellere ve serbest ilaca göre 5-20 kez daha fazla nöroleptik etkilerinin olduğunu göstermişlerdir. Zhang ve ark. [77] yaptıkları çalışmada, PLGA-b-PEG nanopartiküllerini, intraselüler adhezyon molekülü (ICAM-1) ekspresyonu artırılmış insan umbilikal kordon damar endotel hücrelerine (HUVEC) hedeflendirmek için peptid yapılı bir ligand kullanmışlardır. Hedeflendirilmiş partiküller, hedeflendirilmemiş olanlara göre hücre içine daha hızlı alınmıştır. Yapılan bir diğer çalışmada ise, antioksidan enzimlerden katalaz ve süperoksit dismutazın tek başlarına akciğere yönelik hiçbir afinite göstermemeleri sebebiyle hedeflendirme yapılması düşünülmüştür. Daha önce yapılan çalışmalardan anjiyotensin dönüştürücü enzim (ADE) antikörlerinin akciğere bir hedeflendirme sağladıkları bilinmektedir. Bir ADE antikoru olan mAb 9B9 ile konjuge edilen bu enzimlerin sıçanlara sistemik enjeksiyonunu takiben akciğerlerde ve pulmoner endotelyumda birikimleri gözlenmiştir. Pulmoner

endoteliumdaki oksidatif strese karşı bir koruma sağlamak için aktif hedeflendirmenin etkisi bu çalışmada göze çarpmaktadır [78].

2.3. Polimerik Nanopartikül Hazırlama Yöntemleri

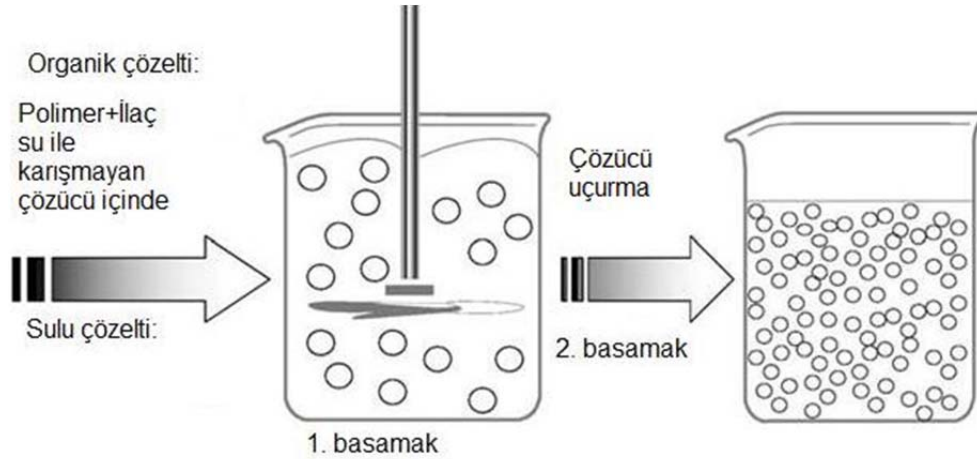
Nanopartikül hazırlama yöntemleri konvansiyonel olarak 2 yöneme ayrılır [11]:

1. Önceden hazırlanmış polimerin dispersiyonu
2. Monomerlerin polimerizasyonu.

Önceden hazırlanmış polimerlerin dispersiyonu yönteminin alt başlıkları aşağıda sıralanmıştır.

2.3.1. Emülsifikasyon / Çözücü Uçurma

Bu yöntem iki basamaktan oluşmaktadır (Şekil 2.3.). İlk basamakta polimer çözeltisi sulu bir faz içerisinde emülsiyon oluşturacak şekilde dağıtılmaktadır. İkinci basamakta ise polimer çözücüsü uçurularak uzaklaştırılmakta ve polimer, nanopartikülleri oluşturacak şekilde çökmektedir.



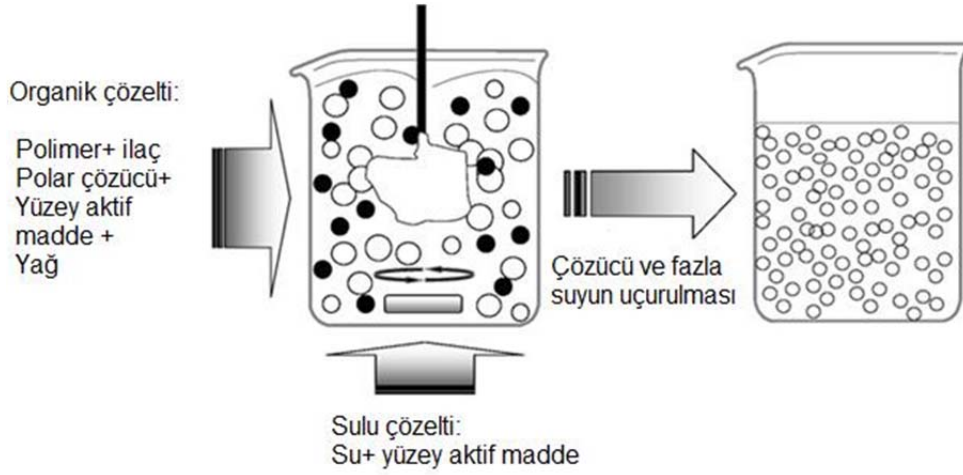
Şekil 2.3. Emülsifikasyon/Çözücü uçurma tekniğinin şematik gösterimi

Polimerin organik çözücü içindeki çözeltisi içinde ilaç da çözüldürüldükten sonra dispersiyon ajanı ve yüksek enerjili homojenizatör kullanılarak su fazı içinde bir emülsiyon oluşturulmaktadır. Bu emülsiyondaki nanodamlacıklar içindeki polimer ve polimer makriks ağında homojen olarak dağılan ilaç molekülleri, çözücünün

uzaklaştırılması ile nanodamlacıklar şeklinde nanopartiküller oluşturacak biçimde çökmektedir. Çözücünün uzaklaştırılması manyetik karıştırma ortamında veya düşük basınçta gerçekleştirilebilmektedir. Bu yöntemle üretilen partiküllerin boyutları; karıştırma hızı, dispersiyon ajanının tipi ve miktarı, organik ve sulu fazların viskoziteleri ve ortam sıcaklığı değiştirilerek ayarlanabilmektedir. Bu yöntem için farklı tipte emülsiyonlar oluşturulabilmesine karşın en fazla, dispersiyon ortamı olarak su kullanılan emülsiyonlardan olan yağ/su tipi emülsiyon sistemi oluşturulmaktadır. Emülsiyon sistemlerinde su kullanılması ile üretim işleminin basitleştirilmesi ve ekonomik açıdan iyileştirilmesi sağlanmaktadır, zira bu yolla aglomerasyonlar minimize edilmekte ve yıkama basamağı kolaylaştırılmaktadır. Ancak bu yöntem sadece lipofilik ilaçlar için uygulanabilmekte ve homojenizasyon basamağında ihtiyaç duyulan yüksek enerji nedeniyle ölçek büyütmede kısıtlamalarla karşılaşmaktadır. Bu yöntem için sıklıkla kullanılan polimerler; PLA, PLGA, etil selüloz, selüloz asetat ftalat, polikaprolakton (PCL), poli(hidroksibutirat)'tır [79].

2.3.2. Çözücü Yer Değiştirme (Nanopresipitasyon) ve Yüzeyle Arası Depozisyon

Bu iki yöntem de benzer şekilde, çözülmüş polimeri içeren organik fazın sulu dış faza spontan bir şekilde emülsifiye olması temeline dayanmaktadır (Şekil 2.4.). Bu yöntemlerin farkı; çözücü yer değiştirme tekniği ile hem nanokapsül hem de nanokürelerin üretilebilmesiyle, yüzeyle arası depozisyon ile sadece nanokapsüllerin üretilebilmesidir. Çözücü yer değiştirme tekniğinde, yüzey aktif madde olsun ya da olmasın, polimer çözeltisini oluşturan çözücü sulu faza difüze olurken polimer de çökmektedir. Yöntemde kullanılan organik çözücünün su ile karışabilir olması yöntemin zorunluluğudur. Bu tip bir çözücü içinde polimer çözdürüldükten sonra, karıştırma ortamında olan ve genellikle bir yüzey aktif madde içeren sulu faza eklenmektedir. Çözücünün sulu faza hızla difüze olması nedeniyle oluşan su ve çözücü arasındaki yüzeyle arası polimer depozisyonu sonucu kolloidal bir süspansiyon oluşmaktadır.



Şekil 2.4. Çözücü yer değiştirme tekniğinin şematik gösterimi

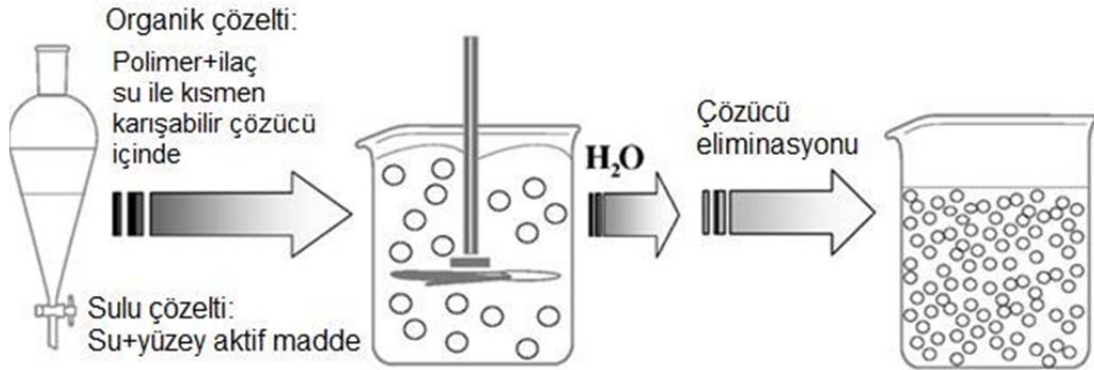
Çözücü yer değiştirme tekniğinde, toksik olmayan bir yağın organik faza az miktarda eklenmesi sonucu nanokapsüller üretilmektedir. Üretilen nanokapsüllere, yağ bazlı merkez kavimleri nedeniyle lipofilik ilaçlar yüksek derecede yüklenebilmektedir. Bu basit üretim tekniğinin kullanımını sınırlayan parametre ise spontan emülsifikasyonu sağlayacak hızda difüzyon hızının elde edilmesi amacıyla su ile karışabilir organik çözücü kullanılması gerekliliğidir. Yöntem, lipofilik ilaçlara uygulanabilir bir yöntem olarak bilinmektedir. Partiküllerin elde edilmesi ve ilacın etkin bir şekilde bu partiküllere yüklenmesi amacıyla uygun bir ilaç/polimer/solvan/non-solvan sistemi seçmek bir miktar zorlu bir görevdir. Çünkü solvan ve non-solvanın karışabilir olması gerekmektedir. Bu teknikte partiküllerin oluşumu, spontan emülsifikasyonu takiben çözücünün difüzyonu sırasında yüzeyler arası gerilimde oluşan bölgesel farklılıklara dayandırılmaktadır.

Yüzeylerarası depozisyonda kullanılan yağ, organik çözücüde çözünecek ancak karışımda çözünemeyecek şekilde seçilmelidir. Bu yöntemde yağ damlacıkları ile su fazına ait yüzeyler arasında polimerin depozisyonuna bağlı olarak nanokapsüller oluşmaktadır [79].

2.3.3. Emülsifikasyon / Çözücü Difüzyon

Bu yöntemde polimer, su ile kısmen karışabilir tipte bir organik çözücü (propilen karbonat gibi) içinde çözündürüldükten sonra su fazı ile karıştırılır. Çözücünün difüzyonunu ve dolayısıyla partiküllerin oluşumunu sağlamak amacıyla, su fazının

miktarı arttırılır ve su ile kısmen karışabilir olan çözücünün su fazına difüzyonu arttırılmış olur (Şekil 2.5.).

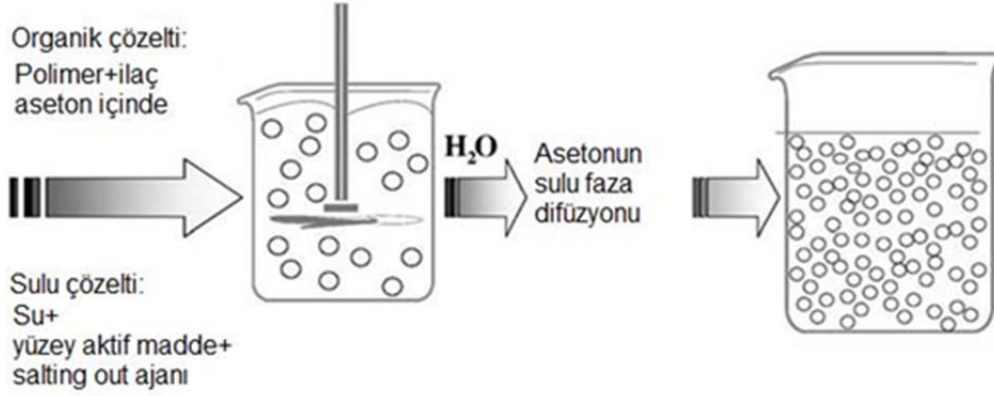


Şekil 2.5. Emülsifikasyon/Çözücü difüzyon tekniğinin şematik gösterimi.

Bu yöntem yüksek enkapsülasyon etkinliği sağlaması, homojenizasyon basamağına ihtiyaç duyulmaması, seriden seriye üretimin tekrarlanabilirliğinin yüksek olması, ölçek büyütmenin kolay olması, basitliği ve dar boyut dağılımı sonuçları vermesi gibi avantajlara sahiptir. Dezavantajları ise; yüksek miktarda suyun uzaklaştırılması gerekliliği ve hidrofilik ilaçların dış faza kaçma eğilimi göstermesi sonucu enkapsülasyon etkinliğinin azalması şeklinde sıralanabilir. Lipofilik ilaçlar için uygun bir üretim tekniğidir [79].

2.3.4. Tuzla Çöktürme (Salting Out)

Bu teknik, su ile karışabilir çözücünün su fazından bir “salting out” etkisi ile uzaklaştırılması temeline dayanmaktadır (Şekil 2.6.). Bu teknik aslında, Emülsifikasyon/Çözücü Difüzyon tekniğinin bir modifikasyonudur. Polimer ve ilaç, su ile karışabilir bir organik çözücüde (aseton gibi) çözüldükten sonra, “salting out” ajanı (magnezyum klorür, kalsiyum klorür, magnezyum asetat gibi elektrolitler ya da sükröz gibi non-elektrolitler) ve koloidal yüzey aktif maddeler (polivinilprolidon ve hidroksietilselüloz gibi) içeren sulu faz içine eklenmektedir. Bu yağ/su tipi emülsiyon üzerine su veya su fazından bir miktar daha eklenerek organik çözücünün su fazına kontrollü bir şekilde difüze olması sağlanmakta ve böylece nanoküreler oluşturulmaktadır.



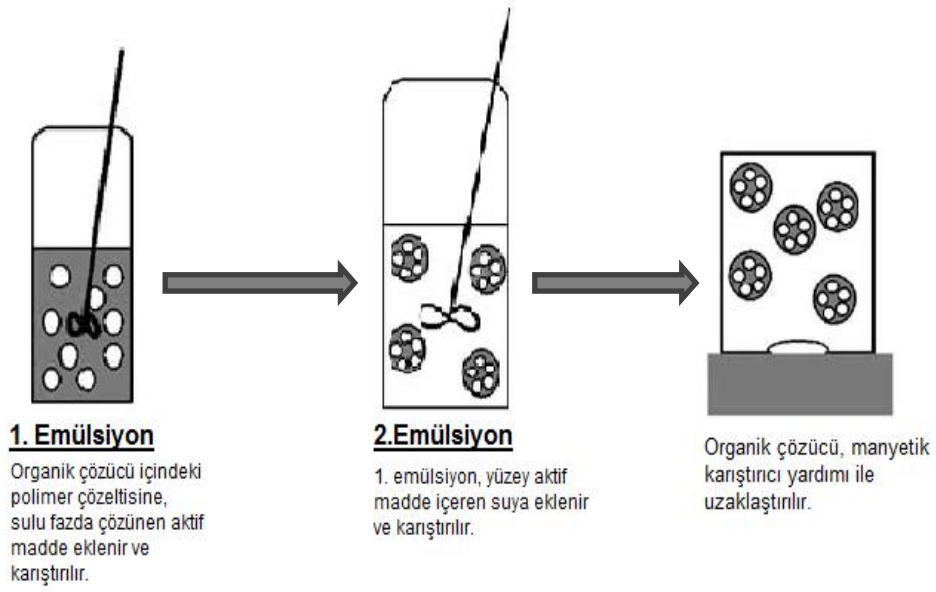
Şekil 2.6. Tuzla çöktürme (Salting out) tekniğinin şematik gösterimi.

“Salting out” ajanının seçimi burada önemli rol oynamaktadır çünkü ilaç yükleme etkinliği üzerinde bu ajanın etkisi büyüktür. Bu yöntemde çözücü ve “salting out” ajanının her ikisi de çapraz filtrasyon ile uzaklaştırılmaktadır. Bu yöntemin en büyük avantajı, enkapsüle edilecek protein yapısındaki moleküllere daha az stres uygulanmasıdır. Çözücünün uzaklaştırılması amacıyla sıcaklığın yükseltilmesine de gerek olmadığı için sıcaklığa hassasiyet gösteren malzemelerle de rahatlıkla çalışılabilmektedir. Dezavantajları ise lipofilik ilaçlara uygulanabilir özel bir yöntem olması ve yoğun bir nanopartikül yıkama basamağına ihtiyaç duyulmasıdır [79].

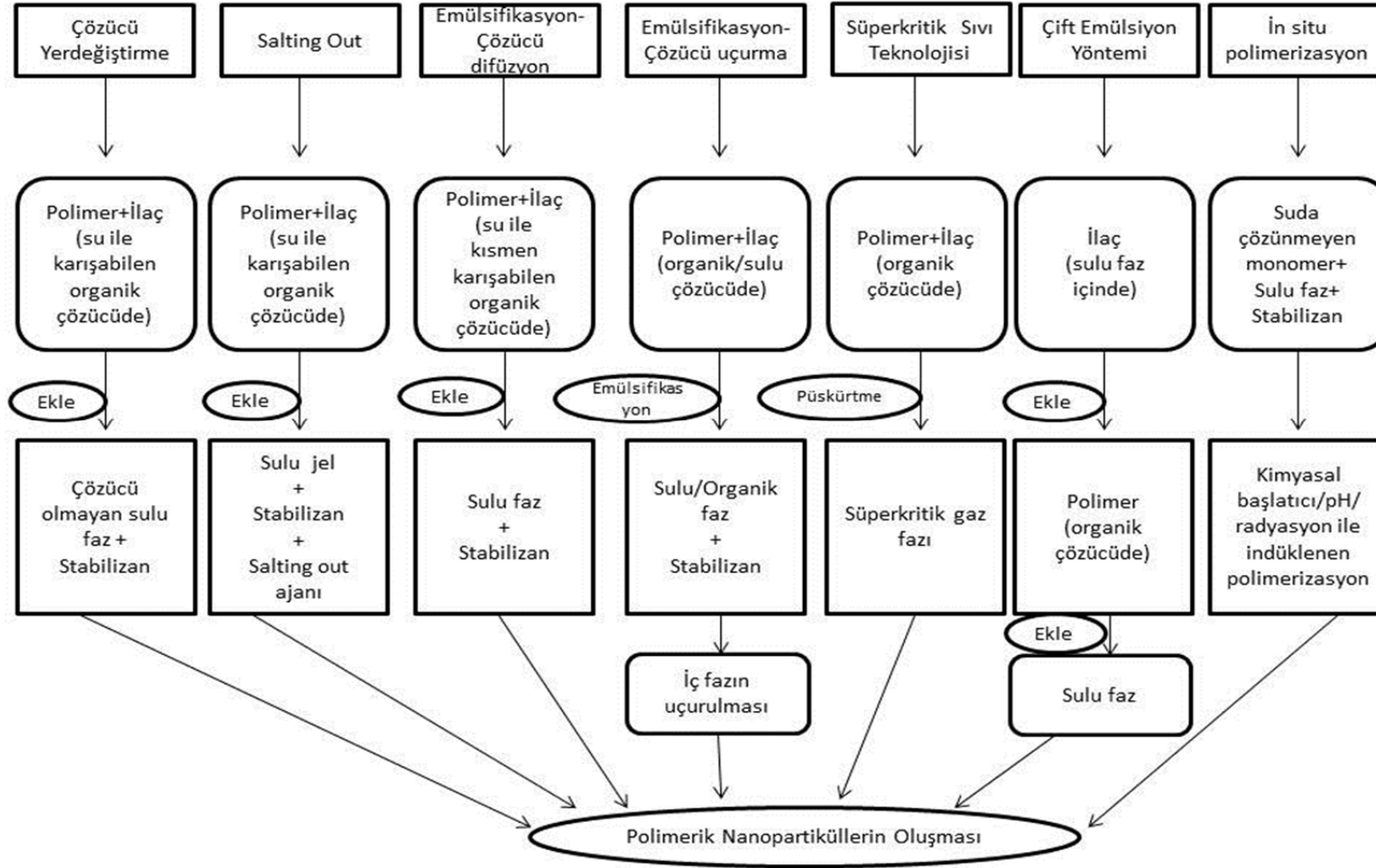
2.3.5. Çift (Çoklu) Emülsiyon Yöntemi

Bu yöntem; hidrofobik ilaçların enkapsülasyonu için uygun olan yağ/su (Y/S) tekli emülsiyon yönteminin aksine; daha çok peptidler, proteinler ve aşılardan gibi suda çözünür ilaçların enkapsülasyonu için uygun olan ve su/yağ/su (S/Y/S) tipi bir çift emülsiyon oluşturulmasına dayanan bir yöntemdir. Şekil 2.7’de gösterilen bu yöntemde; genellikle tamponlanmış bir su fazı içinde ilaç çözdürüldükten sonra bu faz, polimerin çözdürüldüğü bir organik faz içine kuvvetli karıştırma ortamında eklenmekte ve ilk emülsiyon olarak su/yağ (S/Y) tipi bir emülsiyon oluşturulmaktadır. Daha sonra bu emülsiyon bir yüzey aktif madde içeren daha büyük hacimdeki su fazı üzerine eklenmekte ve böylece S/Y/S tipi çoklu emülsiyon elde edilmektedir. Ardından organik çözücü, ekstraksiyon ya da uçurma

yollarından biri ile uzaklaştırılmaktadır. Bu şekilde oluşturulan nanopartiküller yıkandıktan sonra çöktürülerek toplanabilmektedir [80].



Şekil 2.7. Çift (çoklu) emülsiyon yönteminin şematik gösterimi.



Şekil 2.8. Polimerik nanopartiküllerin hazırlama yöntemleri [81].

2.4. Oksidatif Stres

Serbest radikaller; bir veya daha fazla eşleşmemiş elektronu olan atom, molekül veya iyonlardır. Eşleşmemiş elektronlar diğer moleküllerden elektron alarak onların oksidasyonuna sebep olmaktadır. Hücreler tarafından oksijenin metabolize edilmesi potansiyel olarak zararlı olan reaktif oksijen türlerini oluşturmaktadır. Serbest radikaller ve ilgili moleküller, reaktif oksijen türleri olarak sınıflandırılırlar. En yaygın serbest radikaller; hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$), süperoksit radikali ($\text{O}_2^{\cdot-}$) ve nitrik oksit (NO) şeklinde sıralanabilir. Normal fizyolojik koşullarda vasküler hücrelerde reaktif oksijen türleri üreten enzimlerin olması gerçeği reaktif oksijen moleküllerinin normal vasküler fonksiyonları için önemini açıkça sergilemektedir. Bu moleküller vasküler kas hücrelerinin proliferasyonu ve tonusu gibi vasküler fonksiyonlar üzerinde etki eden önemli hücre sinyal molekülleri olarak görev almaktadır [2]. Ancak hücrenin ihtiyaçlarının ötesinde akümüle olmaları potansiyel olarak lipitlere, proteinlere ve nükleik asitlere zarar verebilmektedir. Diğer taraftan, reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimi ile oluşan oksidatif stresin hipertansiyon ve ateroskleroz gibi kardiyovasküler hastalıkların gelişiminde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir [1]. Delbosc ve ark. [82] tarafından yapılan çalışmada, yoğun fruktoz diyeti ile beslenen sıçanlarda insülin direnci ve yüksek kan basıncı oluşturulmuştur. Bu durumla ilişkili gelişen kardiyovasküler sistem rahatsızlıkları ve kalp ve damarlardaki hipertrofi ile birlikte reaktif oksijen türlerinde de artış gözlenmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre insülin direnci ile gelişen kardiyovasküler sistem rahatsızlıklarında oksidatif stresin anahtar bir rol oynadığı görülmüştür.

Serbest radikaller farklı yollarla oksidatif stres oluşmasına yol açabilmektedir. Bu yollar [3]:

- Hücre membranındaki proteinleri yıkarak hücrenin ölümüne sebep olmak,
- Hücre membranındaki lipid ve proteinleri yıkarak hücre membranının sertleşmesine sebep olmak ve hücre fonksiyonunu engellemek,
- Hücre çekirdeğinin membran yapısını bozup, çekirdekteki genetik materyale etki etmek ve DNA'yı mutasyona uğrayabilecek hale getirmek,
- İmmün sistemdeki hücreleri yok edip sistemi bozmak olarak sıralanabilir.

Temel reaktif oksijen molekülü olan süperoksitin ana kaynağı nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) oksidazdır. Oksijen molekülü enzimatik olmayan yollarla da örneğin mitokondrial elektron transfer zincirindeki Ubikinon gibi redoks aktif bileşiklerle tepkime vererek süperoksite dönüşebilmektedir. Süperoksit anyonu süperoksit dismutaz ile hidrojen peroksite (H_2O_2) enzimatik olarak dönüştürülebildiği gibi biyolojik dokularda enzimatik olmayan yollarla da H_2O_2 'ye ve oksijenin reaktif formu tekli oksijene (1O_2) dönüşebilir. H_2O_2 diğer enzimatik olmayan, metal katalizli Fenton tepkimesi ile yüksek oranda reaktif hidroksi radikallerini ($^{\bullet}OH$) oluşturabilmektedir. Fizyolojik koşullarda, söz konusu reaktif oksijen türlerinin üretimi ve ortadan kaldırılması antioksidan sistemler tarafından kontrol edilir ve yukarıda da belirtildiği gibi normal damar fonksiyonları için önemli moleküllerdir. Ancak, $O_2^{\bullet-}$ ve H_2O_2 'nin aşırı üretimi ve diğer oksidan yapılara dönüşümü oksidatif strese sebep olmaktadır. Bu moleküllerin aşırı üretilmesi, hipertansiyon ve ateroskleroz gibi çeşitli damar hastalıklarında damar çeperinde oluşan fonksiyonel ve yapısal değişimlerin oluşmasında rol oynadıkları açıkça bilinmektedir [4].

Oyama ve ark. [83] tarafından yapılan çalışmada, H_2O_2 ile indüklenmiş oksidatif stres üzerine Ginkgo biloba ekstraktının etkisi akış sitometresi ve etidyum bromür kullanılarak incelenmiştir. Sıçan beyin nöronlarına 3 mM H_2O_2 uygulanmış ve ölü nöron sayısındaki artış etidyum bromür boyaması ile tespit edilmiştir. Ginkgo biloba ekstraktı ile önceden muamele edilmiş nöronlarda ölümlerin azaldığı ve daha geç gerçekleştiği gözlenmiştir. Bunun yanında oksidatif stres oluşumu ile aynı anda veya 1 saat sonrasında Ginkgo biloba verilmesinin daha az etkili olduğu gösterilmiştir. Çalışmada, Ginkgo biloba'nın H_2O_2 ile indüklenmiş oksidatif strese karşı potansiyel bir ajan olduğu sonucuna varılmıştır.

Normal koşullar altında oksidan oluşumu ve oksidan eliminasyonu bir denge halindedir. Fakat, prooksidan ve antioksidan üretimi arasındaki bir dengesizlik oksidatif stres denilen bu patolojik durumu ortaya çıkarmaktadır. Bu yüzden hücreler reaktif oksijen türlerinin aşırı akümüle olmasına karşı antioksidan bileşikleri (kreatin, glutatyon, arjinin, selenyum, E vitamini, C vitamini, A vitamini gibi) ve antioksidan enzimleri (süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon redüktaz, glutatyon peroksidaz gibi) içeren karmaşık bir savunma mekanizması geliştirmiştir.

Böylelikle fizyolojik koşullarda reaktif oksijen türlerinin etkilerini nötralize edebilmektedirler. Oksidatif stres durumunda, hücrel antioksidan savunma sistemleri, reaktif oksijen türlerinin seviyelerini toksisite eşiğinin altında tutmaya yeterli olamamaktadır [1, 9].

Oksidatif stresin damar yapısındaki en temel etkilerinden biri $O_2^{\cdot-}$ 'nin endotel kökenli NO ile tepkime vermesidir. Vasküler koruma özellikli NO'nun biyoyararlanımındaki düşüşün vasküler hastalıklardaki endotel fonksiyon bozukluğunda rol oynadığına inanılmaktadır [4]. Bunlara ek olarak, reaktif oksijen türlerinin endotel ve vasküler düz kas hücrelerinin apoptozuna [5], inflamasyon adhezyon moleküllerinin artışına [6] ve vasküler düz kas hücrelerinin hipertrofisine ve hiperplazisine [7] sebep olmak gibi vasküler duvar üzerine zararlı etkileri vardır.

Oksidatif stresin vasküler etkilerini gösteren deneysel sonuçlar temel alınarak kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde reaktif oksijen türlerini hedef alan çeşitli stratejiler geliştirilmektedir. Bu stratejilerde, reaktif oksijen moleküllerinin bozunmasının sağlanması önemli bir terapötik amaç olarak görülmekte ve antioksidanlar bu amaca hizmet edebilecek aday ilaçlar olarak kabul edilmektedirler [8].

2.4.1. Antioksidanlar

Organizmanın sağlıklı bir yaşam sürdürebilmesi için prooksidan/antioksidan dengesi çok önemlidir. Vücutta, reaktif oksijen türlerinin oluşumları ve vücuda verecekleri zararlara karşı belli savunma mekanizmaları vardır. Bunlar "antioksidan savunma sistemleri" yani kısaca "antioksidanlar"dır. Antioksidanların dört farklı mekanizması vardır:

1. Toplayıcı etki: Serbest oksijen radikallerini etkileyip tutma veya onları daha zararsız yeni moleküllere çevirme (Ör: Antioksidan enzimler)
2. Bastırıcı (inaktif şekle dönüştürücü) etki: Serbest oksijen radikallerine bir hidrojen verip, aktivitelerini azaltma ya da tamamen yok etme (Ör: Vitaminler, flavanoidler)
3. Zincir kırıcı etki: Serbest oksijen radikallerini bağlayıp, zincirlerini kırma ve fonksiyonlarını engelleme (Ör: Hemoglobin, mineraller)

4. Onarıcı etki: Serbest oksijen radikalleri tarafından meydana gelen zararı onarma.

Antioksidan ilaçlar şu gruplara ayrılabilirler [84, 85]:

1) Endojen antioksidanlar

A) Enzimatik olan endojen antioksidanlar

1. Süperoksit dismutaz
2. Glutasyon peroksidaz ve glutasyon redüktaz
3. Glutasyon s-transferaz
4. Katalaz
5. Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi
6. Hidroperoksidaz

B) Enzimatik olmayan endojen antioksidanlar

1. Melatonin
2. Seruloplazmin
3. Transferin
4. Miyogloblin
5. Hemogloblin
6. Ferritin
7. Bilirubin
8. Glutasyon
9. Sistein
10. Metiyonin
11. Ürat
12. Laktoferrin
13. Albümin

2) Eksojen antioksidanlar

A) Vitamin eksojen antioksidanlar

1. α -Tokoferol (Vitamin E)
2. β -karoten
3. Askorbik asit (Vitamin C)
4. Folik asit (folat)

B) İlaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar

1. Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol, pterin aldehit, tungsten)
2. NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestezipler, kalsiyum kanal blokörleri, nonsteroid antiinflatuar ilaçlar)
3. Rekombinant süperoksit dismutaz
4. Trolox-C (vitamin E analogu)
5. Endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (GSH-Px aktivitesini artıran ebselen ve asetilsistein)
6. Nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albumin)
7. Demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferroksamin)
8. Nötrofil adezyon inhibitörleri
9. Sitokinler (TNF ve IL-1)
10. Barbitüratlar
11. Demir şelatörleri.

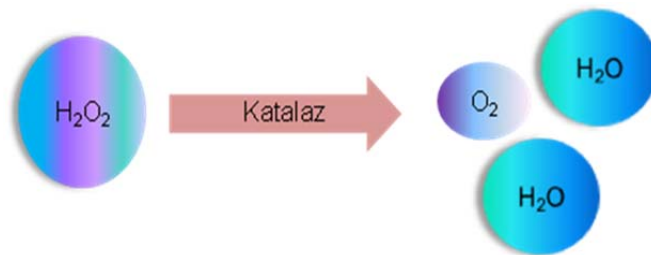
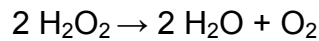
Enzimatik olmayan antioksidanlar (örneğin E vitamini) kronik oksidatif stres tedavisinde kullanılabilir olmalarına rağmen etkin bir tedavi için yüksek derişim gerektirme dezavantajına sahiptirler. Öte taraftan, antioksidan enzimler (örneğin katalaz) reaktif oksijen moleküllerine karşı daha yüksek bir afiniteye ve tepkime hızına sahip olduklarından oksidatif strese karşı daha etkin bir koruma potansiyeline sahiptirler [86]. Ancak, enzimlerin inhibitörler ve proteaz tarafından indirgenmesi sebebiyle yetersiz taşınması teröpatik enzimlerin kullanımını ve etkinliğini sınırlandırmaktadır. Teröpatik enzimlerin proteolitik bozunmaya karşı korunarak taşınması polimerik taşıyıcı sistemler içine enkapsüle edilmesi ile mümkündür [87]. Literatürde katalaz, peroksidaz ve ksantin oksidaz enzimlerinin substrata geçirgen yapıda olan PLGA-b-PEG kopolimeri ile enkapsüle edilerek endotele korunarak iletildiğini gösteren bir çalışma Dziubla ve ark. [88] tarafından yapılmıştır. Bunun yanında polimerik olmayan 300-400 nm boyutlarındaki manyetik nanopartiküller ile de katalaz ve süperoksit dismutaz enzimlerinin proteolitik inaktivasyondan enkapsülasyon ile korunduğu ve manyetik olarak endotel hücrelere yönlendirilerek oksidatif strese karşı hücrel direncin arttırıldığı Chorny ve ark. [89] tarafından gösterilmiştir.

Sunuç olarak oksidatif strese karşı korunmada yukarıda da belirtildiği üzere birçok antioksidan etkilidir. Ancak bu çalışmada, enzimatik bir antioksidan olarak katalaz kullanıldığı için aşağıda katalaz ile ilgili bilgiler detaylandırılmıştır.

2.4.2. Katalaz

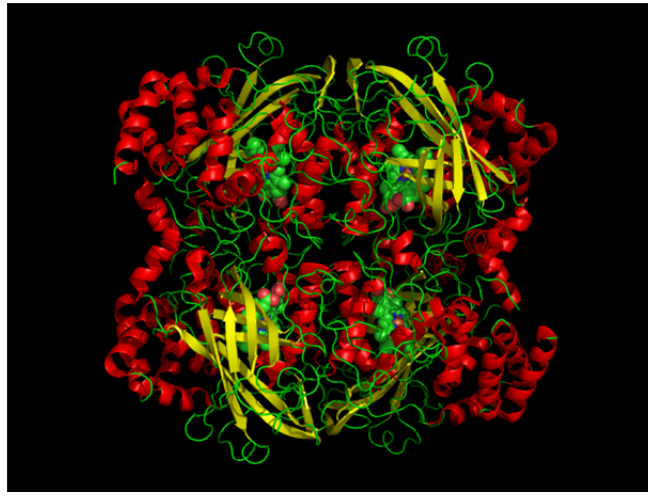
Katalazın tarihine bakıldığında, 1811'de H₂O₂'nin kâşifi olan Thenard, H₂O₂ degradasyonunun canlı dokularda özel bir madde tarafından yapıldığını söylemiştir. Schönbein ise 1863'te bu maddenin bir enzim olduğundan bahsetmiştir [90]. Katalaz kelimesi ilk kez 1900 yılında Loew tarafından kullanılmıştır. Loew, H₂O₂ üzerindeki katalitik aktivitesini göz önünde bulundurarak bu ismi enzime vermiş ve bu enzimin bulunmadığı hiçbir bitki ve hayvan olmadığını belirtmiştir [10]. 1923 yılında katalazın siyanür ile inhibisyonu sonucunda Warburg katalazın aktif merkezinin demir içerdiği kanısına varmıştır. 1937'de ise Sumner ve Dounce sığır karaciğerinden katalazı kristalize etmişlerdir [90]. Katalaz, son yıllarda, antioksidatif tedavilerdeki potansiyel etkisi göz önünde bulundurularak yoğun bir şekilde üzerinde çalışılan bir enzimdir. Fakat, kan dolaşımında hızlı bir şekilde eliminasyona uğraması ve hücre içine taşınımının zayıf olması gibi dezavantajları vardır [10].

Katalaz, hemen hemen tüm aerobik hücrelerin peroksizomlarında bulunan ve bu hücreleri hidrojen peroksitin toksik etkilerinden koruyan bir moleküldür. Bu koruyuculuğunu, hidrojen peroksiti moleküler hiçbir serbest radikal oluşturmaksızın oksijene ve suya parçalayarak göstermektedir. Bu parçalanmanın mekanizması kesin olarak bilinmemekle birlikte, Şekil 2.9'da gösterildiği gibi gerçekleştiği belirtilmektedir:



Şekil 2.9. Katalazın H₂O₂'yi suya ve oksijene parçalama reaksiyonunun şematik gösterimi.

Katalaz proteininin yapısı tetramerik bir yapı gösterir (Şekil 2.10.) ve bu 4 alt birimden her biri 220000-350000 kDa ortalama ağırlığa sahiptir. Her bir monomer, aktivite için gerekli olan prostetik grup olarak; merkezinde demir iyonu bulunan protoporfirin halkası şeklinde bir Hem grubuna (tıpkı hemoglobindeki gibi) sahiptir. Ayrıca katalaz monomerinde bulunan nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADP) molekülü, katalazı H_2O_2 'nin oksitleyici etkisinden korumaktadır. Çok fazla çalışılmış bir molekül olan katalazın, her ne kadar alt birim sayısı ve tipinde değişiklikler olsa da tüm canlılarda belli bir genel yapıya sahip olduğu kanıtlanmıştır.

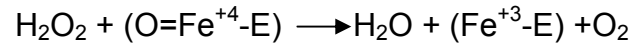


Şekil 2.10. Katalazın tetramerik yapısı.

Örnek olarak sığır karaciğer katalazı molekülünün yapısına bakıldığında; primer yapısında 506 aminoasitlik bir polipeptid zinciri ile birlikte bir Hem grubu ve bir NADP molekülünün bulunduğu gözlenmektedir. Sekonder yapısında ise % 26 oranında α -heliks ve % 12 oranında β -yapısı bulunduğu belirlenmiştir. Düzensiz yapısı sayesinde tetramer yapısı oluşmaktadır. Tersiyer yapısı incelendiğinde ise 4 alt biriminin olduğu gösterilmiştir. Bunlardan ilki, amino uçlu ilk 75 parçadan oluşmaktadır ve globüler yapıyı belirlemektedir. İkinci ve en büyük birim ise hem bölgesini içermektedir ve 76-320 arası parçalardan meydana gelmektedir. Üçüncü birimde 321-436 arası parçalar bulunmaktadır ve molekülün dönen yapısından sorumludur. Molekülün dördüncü ve karboksil uçlu birimi ise 437-506 arası parçalardan ibarettir ve tıpkı globin gibi 4-heliksli bir yapı şeklinde katlanmıştır. Katalaz tetramerinin kuaterner yapısı incelendiğinde merkezdeki Hem grubu ve

yüzeyde bulunan NADP dikkat çekmektedir. Buradaki Hem grubu 30 Å boyunda ve 15 Å genişliğinde huni benzeri bir şekilde bulunmaktadır.

Katalazın katalitik işleminin kimyası tam olarak çözülememiş olmakla birlikte iki aşamadan gerçekleştiği düşünülmektedir:



Belirtilen denklemlerde E katalaz enzimini işaret etmek üzere ($\text{Fe}^{+3}\text{-E}$) Hem grubundaki demiri; ($\text{O}=\text{Fe}^{+4}\text{-E}$) da bu demirin oksijen bağlanmış halini göstermektedir [91].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan Kimyasallar

Poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA, 50:50) RESOMER RG 502 H	Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. (Almanya)
1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid HCl (EDC)	Thermo Scientific (A.B.D.)
N-Hidroksisüksinimid (NHS)	Thermo Scientific (A.B.D.)
Karboksi-PEG ₂₄ -Amin (CA(PEG) ₂₄)	Thermo Scientific (A.B.D.)
N,N-Diizopropiletilamin	Sigma & Aldrich, Inc.(Almanya)
Diklorometan	Sigma & Aldrich, Inc.(Almanya)
Kloroform	Merck & Co, Inc. (Almanya)
Metanol	Merck & Co, Inc. (Almanya)
Dietil eter	Sigma & Aldrich, Inc.(Almanya)
Hidroklorik asit (HCl)	Merck & Co, Inc. (Almanya)
Sodyum hidroksit (NaOH)	Merck & Co, Inc. (Almanya)
Pluronic F68	Mediatech Inc. (A.B.D.)
Sodyum klorür (NaCl)	Carlo Erba Reagents (İtalya)
Potasyum dihidrojenfosfat (KH ₂ PO ₄)	Merck & Co, Inc. (Almanya)
Disodyum hidrojenfosfat (Na ₂ HPO ₄)	Merck & Co, Inc. (Almanya)
Potasyum klorür (KCl)	Merck & Co, Inc. (Almanya)
Katalaz (sığır karaciğerinden)	Sigma & Aldrich, Inc.(Almanya)
Sığır serum albümini, fraksiyon V	Sigma & Aldrich, Inc.(Almanya)
Hidrojen peroksit, 35%	Merck & Co, Inc. (Almanya)
Pronaz (Streptomyces griseus'tan)	Fluka Analytical (Japonya)
ICAM-1 monoklonal antikor, fare IgG2a, R6.5	Bender MedSystems (A.B.D.)
Pierce BCA protein test kiti	Thermo Scientific (A.B.D.)
IgG- sığır albümininden	Sigma-Aldrich, (A.B.D.)
Anti-human ICAM-1/FITC	eBioscience, (Avusturya)
3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5- difeniltetrazolyum bromit (MTT)	Sigma-Aldrich, (A.B.D.)
LDH Sitotoksisite Deney Kiti	Cayman Chemicals, (A.B.D.)
TBARS Deney Kiti	Cayman Chemicals, (A.B.D.)

3.1.2. Cihaz ve Aletler

Ultraturaks	PRO Scientific Inc. (A.B.D.)
Partikül Boyutu ve Zeta potansiyel Ölçüm Cihazı	Malvern Zetasizer Nano-ZS (İngiltere)
Santrifüj	Eppendorf 5430 R (Almanya)
Santrifüj	Hettich EBA21 (Almanya)
Manyetik Karıştırıcı	Heidolph MR 3002 (Almanya)
Vakumlu Evaporatör	Büchi Rotavapor R114 (İsviçre)
pH metre	inoLab (Almanya)
Terazi	Mettler-Toledo PB303-S (İsviçre)
Vakum Etüvü	Nüve EV018 (Türkiye)
Çalkalamalı Su Banyosu	Memmert (Almanya)
Spektrofotometre	UV-1800 Shimadzu Scientific Instruments (A.B.D.)
Avance NMR Spektrofotometre	Bruker (Almanya)
FT-IR Spektrofotometre	Perkinelmer Spectrum BX FT-IR system (A.B.D.)
İnverted Mikroskop	Leica DMIL (Almanya)
CO ₂ İnkübatörü	Thermo Scientific HeraCell (Almanya)
Otoklav	Raypa (İspanya)
Laminar kabin	Herasafe KS (Almanya)
Atomik Kuvvet Mikroskobu	Nanomagnetics Instruments (İngiltere)
SEM	Nova NanoSEM, (A.B.D.)
VersaMax Mikroplaka Okuyucu	Molecular Devices (A.B.D.)

3.2. Yöntem

3.2.1. PLGA-b-PEG Kopolimer Sentezi

PLGA-b-PEG-COOH kopolimeri, PLGA-COOH ve NH₂-PEG₃₄₀₀-COOH polimerleri kullanılarak Cheng ve ark. [92] tarafından geliştirilmiş yöntem ile sentezlenmiştir (Şekil 3.1.). Bu amaçla PLGA-COOH polimerinin ön aktivasyonu için karboksilik asit grubu taşıyan 300 mg Resomer 502H (PLGA-COOH) üzerine 20.7 mg N-hidroksisüksinamit (NHS) ve 34.5 mg 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimid (EDC) tartılarak 6 ml diklorometan (DCM) içerisinde çözdürülerek, 15 dk manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Sentezlenen PLGA-NHS polimeri etil eter yardımıyla çöktürülüp, etil eter:metanol (70:30) çözeltisi ile yıkandıktan sonra vakum etüvünde kurutulmuştur. Daha sonra elde edilen PLGA-NHS kloroformda çözdürülmüştür. Bu polimer çözeltisine 1:1 molar oranda CA(PEG)₂₄'ün (NH₂-PEG-COOH) kloroform içindeki çözeltisinden ve 1:3 molar oranda N,N-diizopropiletilamin çözeltisi eklenmiş ve CA(PEG)₂₄ yapısının konjugasyonu kloroform içinde 20 saatlik bir tepkime ile gerçekleştirilmiştir. Tepkime sonunda oluşan PLGA-b-PEG-COOH kopolimer yapısı etil eter ile çöktürülerek etil eter:metanol (70:30) çözeltisi ile yıkanmış, saflaştırılmış kopolimer yapısı vakum etüvünde kurutulmuştur.

Hazırlama verimi olarak, işlem sırasında kullanılan polimerlerin ağırlık toplamı ile elde edilen kopolimer ağırlıklarının orantısal olarak değerlendirilmesi yapılmış ve sonuçlar % verim olarak ifade edilmiştir.

$$\% \text{ Polimerizasyon Verimi} = \frac{W_3}{W_1 + W_2} \times 100$$

W₁ = sentezde kullanılan PLGA polimerinin ağırlığı

W₂ = sentezde kullanılan PEG polimerinin ağırlığı

W₃ = sentez sonunda elde edilen kopolimerin ağırlığı

3.2.2. PLGA-b-PEG Kopolimer Karakterizasyonu

Hazırlanan kopolimerin karakterizasyonu çalışmalarına yönelik olarak, ¹H-NMR ve FT-IR analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.1. ¹H-NMR analizi

Sentezlenen PLGA-b-PEG-COOH kopolimerinin yapı analizi ¹H-NMR analizi ile gerçekleştirilmiştir. Spektrum, 400 MHz Bruker NMR Spektrometre (AVANCE model, Almanya) ile 25°C'de kaydedilmiştir. Çözücü olarak dötoro kloroform (CDCl₃) kullanılmıştır.

3.2.2.2. FT-IR analizi

PLGA-b-PEG-COOH kopolimerinin yapı doğrulaması amacıyla gerçekleştirilen Fourier Transform Infrared (FT-IR) spektroskopisi analizinde, infrared spektrumları, Perkinelmer Spectrum BX FT-IR System (CT, USA) ile kaydedilmiştir. IR spektrumları oda sıcaklığında KBr pellet içinde 4000-400 cm⁻¹ aralığında gerçekleştirilmiştir. KBr ağırlığının örnek ağırlığına oranı yaklaşık 100 olarak alınmıştır.

3.2.3. Çift Emülsiyon Yöntemi ile Nanopartiküllerin Hazırlanması

3.2.3.1. Katalaz yüklü PLGA-b-PEG nanopartiküllerin hazırlanması

Katalaz yüklü nanopartiküller, Dziubla ve ark. [93] tarafından kullanılan çift emülsiyon sentez yöntemi modifiye edilerek hazırlanmıştır. 1. emülsiyon, DCM içindeki PLGA-b-PEG-COOH polimer çözeltisinin (20 mg/mL) 1mL'sine, pH 7.4 fosfat tamponu (PBS) içindeki katalaz çözeltisinden (2 mg/mL) 120 µL damla damla eklenerek, ultraturaksla 15000 rpm'de 1 dakika karıştırılması ile elde edilmiştir. Hazırlanan bu emülsiyon, enjektör yardımı ile kütlece % 2'lik Pluronic F68 çözeltisine (5 mL) damla damla eklenerek, ultraturaks ile 15000 rpm'de 1 dakika karıştırılmıştır ve 2. emülsiyon elde edilmiştir. Oluşturulan 2. emülsiyon bir enjektör yardımı ile manyetik karıştırıcıda karışmakta olan % 0.5'lik Pluronic F68 çözeltisine (50 mL) şırınga pompası yardımı ile eklenmiştir. Elde edilen emülsiyon, organik çözücünün uzaklaştırılması için bir gece boyunca +4°C'de manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Oluşan partikül süspansiyonu öncelikle 4 dakika

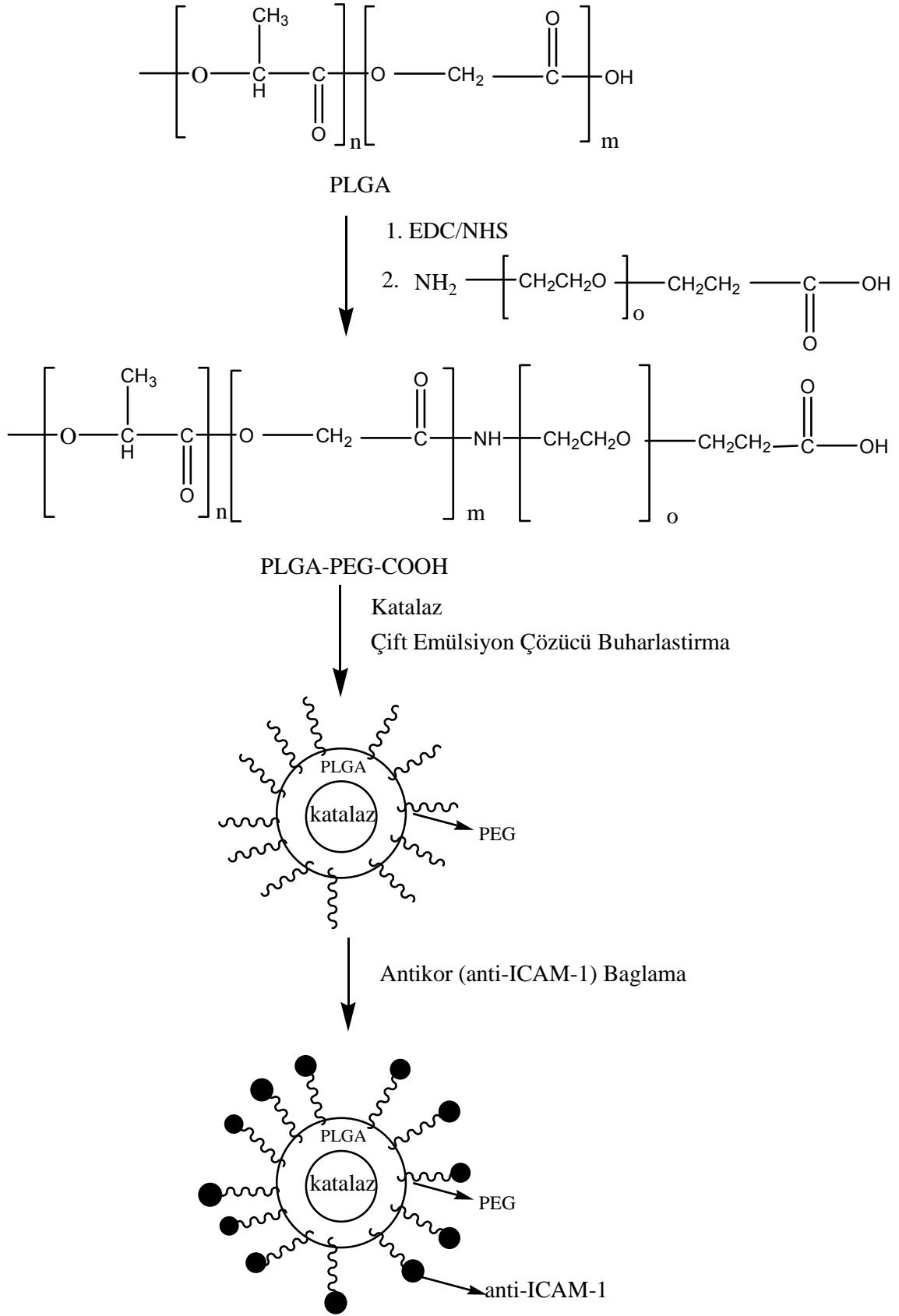
boyunca 4000 rpm'de santrifüjlenerek makroagregatların uzaklaştırılması sağlanmış, daha sonra elde edilen nanopartikül süspansiyonu 14000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenerek hazırlanmış olan nanopartiküller çöktürülmüştür. Elde edilen nanopartiküller 2 kez yıkanarak yüklenmemiş katalaz ve yüzey aktif maddenin fazlasının uzaklaştırılması sağlanmıştır. Katalaz aktivitesinin korunması için formülasyona sığır serum albümini (BSA), 1. emülsiyonun hazırlanması aşamasında PBS içindeki katalaz çözeltisine 1, 2 ve 5 mg/mL derişimlerinde eklenerek farklı formülasyonlar hazırlanmıştır. Katalaz içermeyen nanopartiküller kontrol amacıyla aynı yöntem ile hazırlanmıştır ve boş nanopartiküller NP olarak isimlendirilmiştir. Hazırlanan nanopartikül formülasyonları Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Hazırlanan nanopartikül (NP) formülasyonları

No	Nanopartikül Formülasyonları	Katalaz Derişimi (mg/mL)	BSA Derişimi (mg/mL)
1	NP	-	-
2	Kat-NP-1	2	-
3	Kat-NP-2	2	1
4	Kat-NP-3	2	2
5	Kat-NP-4	2	5

3.2.4. Nanopartiküllere Antikor Bağlama

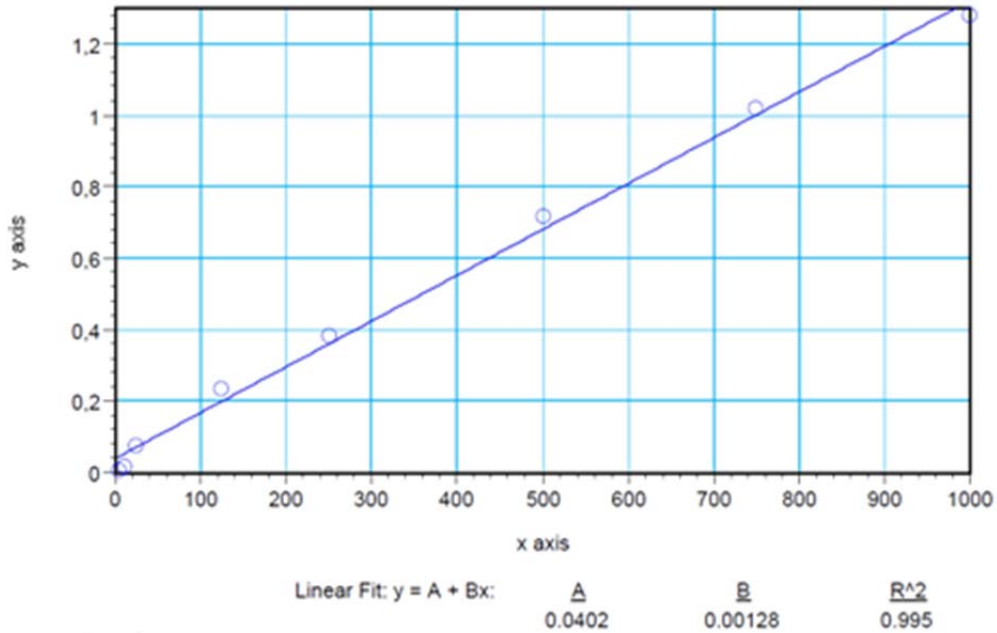
ICAM-1 olarak adlandırılan hücre içi adhezyon molekülü-1 temel olarak endotel hücrelerin lüminal yüzeyinde bulunan bir Ig ailesi transmembran glikoproteinidir. ICAM-1 karşıtı antikor olan anti-ICAM-1'in endotel hücrelere ilaç taşınımında sıklıkla kullanılan bir taşıyıcı olarak etkinliği hücre kültüründe, hayvan modellerinde ve erken klinik çalışmalarda kanıtlanmıştır. Bu çalışmada bölüm 3.2.3.1'de hazırlanan nanopartiküllerin endotel hücrelere hedeflendirilmesi için nanopartiküllere anti-ICAM-1 antikoruna bağlanmıştır. Anti-ICAM-1'in pahalı olması nedeniyle nanopartiküllere antikor bağlama ön çalışmaları IgG ile gerçekleştirilmiş daha sonra hücresel alım çalışmaları ve diğer in-vitro çalışmalarda anti-ICAM-1 bağlı nanopartiküller kullanılmıştır. Antikor bağlama çalışmaları detaylı olarak aşağıda verilmiştir.



Şekil 3.1. PLGA-b-PEG-COOH sentezi ve katalaz yüklü nanopartiküllerin oluşumunun şematik gösterimi.

Nanopartiküllere Anti-human ICAM-1 bağlanması için çift emülsiyon yöntemi ile hazırlanan nanopartiküllerin (KatNP) distile su içinde 1mg/mL derişimdeki süspansiyonları hazırlanmış ve bu süspansiyondan 100 µL alınarak üzerine 0.0012 mol EDC ve 0.0006 mol NHS eklenmiş, 15 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Daha sonra nanopartiküller 3 kez yıkanarak EDC ve NHS'in fazlası uzaklaştırılmıştır.

Nanopartiküllere IgG bağlanması için yukarıdaki derişimlerde aynı yöntem izlenmiş ve bu nanopartiküller IgG/KatNp olarak isimlendirilmiştir. Nanopartiküllere bağlanan IgG miktarının tayini Pierce BCA protein tayin kiti ile yapılmıştır. Sığır serum albümini (BSA) standartları kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Çalışma çözeltisi standart yöntemine uygun olarak çözelti A:çözelti B oranı 50:1 olacak şekilde hazırlanmıştır. 96 kuyucuklu plakaların her bir kuyucuğuna 25 µL süpernatant ve üzerine 200 µL standart çalışma çözeltisi eklenmiş ve 37°C'de 30 dk inkübe edildikten sonra plakaların oda sıcaklığına gelmesi beklenmiştir. Daha sonra mikropilaka okuyucuda 562 nm'de absorbanları ölçülmüştür. Bağlanan antikor miktarı kalibrasyon eğrisinden elde edilen denklem üzerinden hesaplanmıştır.



Şekil 3.2. BSA kalibrasyon eğrisi.

3.2.5. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

3.2.5.1. Partikül boyutu ve zeta potansiyel

Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının boyut ve zeta potansiyel analizleri Malvern Zetasizer Nano-ZS partikül boyutu ve zeta potansiyel ölçüm cihazı ile yapılmıştır. Partikül büyüklüğü dağılımı tayinindeki temel prensip, dinamik ışık saçılımı ile partiküllerin süspansiyon içinde Brownian hareketi yapmasına bağlı gelişen hareketlerinin ölçümüdür. Büyük boyutlu partiküllerin küçük olanlardan daha fazla ışık saçması sonucu boyut açısından hassas bir ölçüm yapılabilmekte ve özellikle agregasyon durumlarında stabil olmayan sistemler kolaylıkla ve hassas bir şekilde tespit edilebilmektedir. Dinamik ışık saçılımı tekniği, Foton Korelasyon Spektroskopisi ya da Kuazi-Elastik Işık Saçılımı olarak da bilinmektedir.

Zeta potansiyeli, sulu ortamlarda partiküllerin yüzeyindeki iyonizasyon ya da yüzeylerine adsorbe olan iyonik maddelerin meydana getirdiği yüzey yükü olarak tanımlanmaktadır. Bu yüzey yüküne bağlı olarak partikülü çevreleyen iyonların dağılımı değişiklik göstermektedir. Partikül hareket ederken, bu iyon tabakası da onunla birlikte hareket etmekte, tıpkı bir parçası gibi davranmaktadır. Bu değer negatif ve pozitif her iki yönde de artması sonucu partiküller birbirini itmekte ve sistem kararlılığı korunmaktadır. Nanopartiküllerin zeta potansiyellerinin ölçümü için kullanılan Malvern Zetasizer Nano-ZS cihazı, bu potansiyeli ölçmek için süspansiyon boyunca bir elektriksel alan uygulamakta ve partiküllerin yüklerine bağlı olarak gelişen hareket hızlarını ölçerek bir hesaplama yapmaktadır [94].

3.2.5.2. Morfolojik analiz

Nanopartiküllerin yüzeylerinin topografik görüntüleri atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ve SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) kullanılarak elde edilmiştir. AFM analizi için nanopartiküller suda süspand edilip mika plakalar üzerine damlatıldıktan sonra oda sıcaklığında kurutulmuştur. Örneklerin AFM görüntüleri alınırken cihaz; dinamik modda (tapping mode), Buggetsensor Tap300-G model silikon uç kullanılarak (yarıçap < 10 nm), rezonans frekansı 300 kHz ve kuvvet sabiti 40 N/m değerlerinde çalıştırılmıştır. Uç açısı kantilever boyunca 20°-25°, yanlardan 25°-30° ve tepeden 10° olarak belirlenmiştir.

Nanopartiküllerin şekil, geometri, büyüklük ve dağılım gibi morfolojik özelliklerinin değerlendirilmesi için taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılmıştır. SEM analizinde nanopartiküller ince bir altın film tabakasıyla kaplanmış ve Nova NanoSEM cihazı ile örneklerin SEM görüntüleri alınmıştır.

3.2.6. Katalaz Aktivitesinin Ölçümü

Katalaz aktivitesinin ölçümü literatürde belirtilen yöntemlere göre yapılmıştır [93, 95]. Katalaz aktivitesinin ölçümü için öncelikle çöktürülmüş olan 1.2 mg nanopartikül 400 µL PBS içinde dağıtıldıktan sonra spektrofotometrik küvete 950 µL 5 mM H₂O₂ koyulmuş ve üzerine 50 µL nanopartikül süspansiyonundan eklenerek 242 nm'de 300 sn boyunca absorptans ölçümleri yapılmıştır. Katalaz aktivitesi aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

$$\text{Aktivite} \left(\frac{U}{\text{mg NP}} \right) = \frac{1}{\epsilon} \times \frac{\frac{\Delta \text{Absorbans}}{\text{Zaman(dk)}}}{\text{Seyreltme Faktörü}}$$

1 katalaz ünitesi, 25°C ve pH 7.0'de 1 dakikada 1 µmol H₂O₂'yi katalize eden miktar olarak tanımlanmıştır ($\epsilon=43.6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

3.2.7. Katalazın Proteolitik Enzimlerden Korunum Tayini

Katalaz aktivitesinin, nanopartiküller içinde ne kadar korunduğunun tayini pronaz enzimi varlığında in-vitro proteolitik deney ile yapılmıştır. Bu amaçla çöktürülmüş olan 1.2 mg nanopartiküller pronaz çözeltisi (PBS içinde 0.05 %) içinde dağıtılmış ve çalkalamalı su banyosunda 37°C'de inkübe edilmiştir. Belirli zaman aralıklarında (t=0, 0.5, 1, 2, 3, 4 ve 5 saat) aktivite ölçümü için örnek alınarak spektrofotometrik küvet içerisindeki 950 µL 5mM H₂O₂ üzerine eklenerek 242 nm'de 300 sn boyunca absorptans ölçümleri yapılmıştır. Katalaz aktivitesi (U) bölüm 3.2.6'da verilen formül ile hesaplanarak, t=0'daki ilk aktivite değerine göre kalan % aktivite değerleri bulunmuştur.

3.2.8. Hücre Kültürü Çalışmaları

3.2.8.1. Endotel hücrelerinin izolasyonu ve kültürü

Yenikent (Ankara) mezbahasında, genç sığırdan (6 aylık) steril pens ve makas yardımı ile çıkartılan aort örnekleri antibiyotikli taşıma solüsyonu (Hanks' veya % 10 FBS ve % 0.5 antibiyotik-antimikotik solüsyon içeren DMEM) içeren şişelere alınarak strafor kutularda buz kasetleri (+4⁰C) ile soğutularak laboratuvara taşınmıştır. Örnekler laboratuvarında laminar akışlı kabinde % 0.5 antibiyotik-antimikotik içeren PBS ile yıkandıktan sonra steril cam petrilere yerleştirilmiş, steril pens, makas ve bistüri yardımı ile damar örneklerinin önce dış kısmındaki bağ doku parçaları uzaklaştırılmıştır. Yeterince temizlendikten sonra farklı bir steril petriye alınan damar örnekleri farklı makaslar ile boyuna kesilerek açılmıştır. Açılan damar parçalarının iç yüzeyinde bulunan endotel hücrelerini izole etmek için steril bir bistüri yardımı ile bu tabaka nazikçe kazınmıştır. Bistürinin üzerinde kalan hücreler antibiyotikli PBS ile 15 mL'lik santrifüj tüplerinde yıkanmış, sonra santrifüjlenerek (800 rpm, 5 dakika) hücrelerin çökmesi sağlanmıştır. Çöken hücreler 2-3 mL besi ortamı ile süspanse edilmiş, kollajen kaplı T25'lik flasklara ekilerek inkübatörde (37⁰C ve % 10 CO₂) kültür edilmiştir. Endotel hücrelerin kültür ortamlarında; DMEM (Dulbecco'nun minimum esansiyel ortamı, 4.5 g/L Biochrom, Almanya), % 10 FBS (Fetal Sığır Serum, Biochrom, Almanya), %0.1 Penisilin-Streptomisin (10.000 U/10.000µg/mL, Biochrom, Almanya), % 1 gentamisin (Biochrom, Almanya), % 1 L-glutamin (Biochrom, Almanya) ve 125 µg/mL heparin (Biochrom, Almanya) kullanılmıştır. Hücre proliferasyonları mikroskop altında incelenmiştir. Kültür edilen hücreler farklı pasajlara getirilerek ileriki çalışmalar için dondurularak saklanmıştır. Tüm çalışmalar hücre kültürü 37⁰C ve % 10 CO₂ ortamında, HeraCell (Almanya) inkübatörde yapılmıştır. Pipetler, 96 kuyucuklu plakalar ve flasklar Greiner (Almanya) marka kullanılmıştır.

3.2.8.2. Nanopartiküllerin sitotoksitesinin belirlenmesi

Nanopartiküllerin sitotoksitesinin belirlenmesi amacıyla 1x10⁴ endotel hücresi (P/6) 96 kuyucuklu petri kaplarına ekilerek inkübatörde (37⁰C ve %10 CO₂) 24 saat kültür edilmiştir. 24 saatin sonunda hücre kültür ortamları uzaklaştırılıp, yine aynı hücre kültür ortamı içinde hazırlanmış farklı derişimlerdeki boş ve katalaz yüklü

nanopartikül süspansiyonları kuyucuklara eklenerek 24 saat ve 48 saat inkübe edilmiştir. 24 ve 48 saat sonra, bu çözeltiler de uzaklaştırılmış ve hücre canlılığı MTT test ile belirlenmiştir. Bu amaçla nanopartiküllerin hücre ile 24 ve 48 saat inkübasyonlarından sonra kuyucuklara 100 µL hücre kültür ortamı ve PBS içinde hazırlanmış 5 mg/ml derişimindeki 25 µL MTT çözeltisi eklenip 4 saat daha inkübatörde kültür edilmiştir. Daha sonra dimetilformamid (DMF) ve su çözeltisi içinde hazırlanmış % 23 derişimindeki 80 µL sodyumdodesilsülfat (SDS) çözeltisi kuyucuklara eklenmiştir. Bir gece boyunca inkübatörde kültür edilen hücrelerin absorbanları 570 nm'de mikropkaya okuyucuda okunmuştur. Nanopartikül süspansiyonu eklenmeyen hücrelerin verdiği absorban %100 olarak kabul edilip, % hücre canlılığı hesaplanmıştır.

3.2.8.3. Nanopartiküllerin hücresel alım çalışmaları

Nanopartiküllerin hücresel alım çalışmaları için lameller 6 kuyucuklu plakalara yerleştirildikten sonra 5×10^4 endotel hücresi (p/6) ekilerek, 2 mL besi ortamında 37°C ve % 10 CO₂ ortamında bir gece boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra hücrelerin üzerindeki besi ortamı çekilerek 100 µg anti-ICAM-1/KatNP hücrelere 2 mL besi ortamı içinde eklenmiş ve 30 dakika ve 2 saat inkübe edilmiştir. Belli inkübasyon sürelerinin ardından besi ortamları uzaklaştırılıp PBS ile yıkandıktan sonra, % 4'lük paraformaldehit çözeltisiyle hücreler fikse edilmiştir. Paraformaldehit uzaklaştırılıp PBS ile yıkama yapıldıktan sonra lamel bir spatül yardımı ile alınmış ve lam üzerine yerleştirilmiştir. Örnekler konfokal mikroskopu ile incelenmiştir (Zeiss LSM 510).

3.2.9. H₂O₂ Kaynaklı Oksidatif Stres Oluşturulması

Oksidatif hücre hasarı için H₂O₂'nin önemli bir mediatör olduğu birçok araştırmacı tarafından gösterilmiştir [63, 89, 93]. H₂O₂, sadece yüksek derişimlerde hücre hasarına yol açmakla birlikte, başka reaktif türlerin oluşumuna da neden olarak ciddi toksisite göstermektedir. Bu nedenle katalazın fizyolojik koşullarda hücre içi derişiminin kontrolü önem taşır. H₂O₂, organizmada katalaz veya glutatyon sistemleriyle suya indirgenerek uzaklaştırılmaktadır [96]. H₂O₂ daha sonra Fenton reaksiyonunda ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + \cdot OH + OH^-$) serbest demirle reaksiyona girerek $\cdot OH$ 'yi sentezler. $\cdot OH$, çok yüksek oranda reaktif olmakla birlikte; lipid

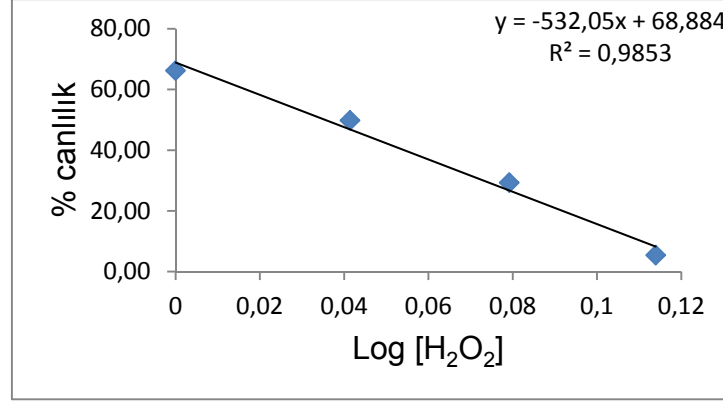
peroksidasyonuna ve hücre zarı hasarına yol açıp, proteinlere ve disülfid bağlarına zarar vermektedir [97].

Bu çalışmada endotel hücrelerde oksidatif stres oluşturmak için H₂O₂ kullanılmış ve farklı derişimlerin etkisi incelenmiştir.

3.2.9.1. H₂O₂ derişiminin hücre canlılığı üzerine etkisi ve LC₅₀'nin belirlenmesi

Endotel hücrelerde H₂O₂ kaynaklı hücre hasarı yaratmak amacıyla 1x10⁴ vasküler endotel hücresi (P/6) 96 kuyucuklu petri kaplarına ekilerek inkübatörde (37⁰C ve %10 CO₂) gece boyunca kültür edilmiştir. Daha sonra hücre kültür ortamları uzaklaştırılarak, artan derişimlerde (0, 0.5, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4 ve 1.5 mM) H₂O₂ çözeltisi endotel hücrelere eklenerek 6 saat ve 24 saat daha inkübe edilmiştir. Belirlenen inkübasyon sürelerinin ardından H₂O₂ derişiminin hücre canlılığına etkisi MTT test ile belirlenmiştir. Bu amaçla kuyucuklardaki kültür ortamı uzaklaştırılmış ve kuyucuklara 100 µL hücre kültür ortamı ve PBS içinde hazırlanmış 5 mg/ml derişimindeki 25 µL MTT çözeltisi eklenip 4 saat daha inkübatörde kültür edilmişlerdir. Ardından DMF ve su çözeltisi içinde hazırlanmış % 23 derişimindeki 80 µL SDS çözeltisi kuyucuklara eklenmiştir. Bir gece boyunca inkübatörde kültür edilen hücrelerin absorbansı 570 nm'de mikropilaka okuyucuda ölçülmüştür. Ayrıca H₂O₂'nin farklı derişimlerinin hücre hasarına etkisi inverted mikroskop ile izlenmiştir. H₂O₂ çözeltisi eklenmeyen hücrelerin absorbans değerleri %100 olarak kabul edilerek, hücre canlılığı yüzdeleri bulunmuştur.

H₂O₂ derişimlerinin logaritmasına karşı, elde edilen % hücre canlılık değerleri grafiğe aktarılarak, doğru denklemi ile % 50 hücre canlılığı karşılık gelen H₂O₂ derişimi hesaplanmış, bu değer hücrelerin % 50'sini öldüren letal derişim (LC₅₀) olarak kabul edilmiştir.



Şekil 3.3. H₂O₂ derişiminin hücre canlılığına etkisi.

3.2.10. Nanopartikül Formülasyonlarının H₂O₂ Kaynaklı Oksidatif Strese Karşı Cevabının İncelenmesi

Nanopartiküllerin (NP, kat NP ve anti-ICAM-1/katNP) H₂O₂ kaynaklı oksidatif strese karşı vereceği cevabın incelenmesi için hücrelere uygulanacak olan H₂O₂ derişimi, bölüm 3.2.9.1’de belirlenen LC₅₀ derişimi göz önünde bulundurularak (1.085 mM) 1.1 ve 1.2 mM olarak belirlenmiştir. Bu derişimlerin hücre üzerinde önemli derecede hasar yarattığı önceki verilerle ispatlanmıştır.

Bu amaçla, 1×10^4 sayıda endotel hücresi (P/6) 96 kuyucuklu plakalara ekilmiştir. Bir gece boyunca 37°C ve %10 CO₂ ortamında inkübe edilerek tutunmaları beklenmiştir. Daha sonra NP, Kat-NP ve anti-ICAM-1/KatNP olarak isimlendirilen nanopartikül formülasyonları 5 µg ve 10 µg olmak üzere farklı derişimlerde hücreler üzerine eklenmiştir. Hücrelerin nanopartikül formülasyonlarıyla 1 saat inkübasyonunun ardından (hücreler tarafından alımları başladıktan sonra) bu kuyucuklara H₂O₂ eklenmiştir. Aynı zamanda nanopartikül formülasyonlarında kullanılan katalaz miktarlarına eşit miktarda (0.06 ve 0.12 µg) serbest katalaz da benzer şekilde kullanılmıştır. Kontrol grubu olarak sadece besi ortamı ile inkübe edilen hücreler kullanılmıştır. H₂O₂ ile inkübasyon süresi olarak 6 ve 24 saat belirlenmiştir. Bu süreler sonunda oluşan hücre hasarı mikroskop ile izlenmiş ve daha sonra kuyucuklardaki besi ortamları toplanarak aşağıda verilen laktat dehidrogenaz (LDH) tayini için -20°C’de saklanmıştır. Diğer taraftan hücreler tripsin ile muamele edilerek kuyucuklardan kaldırılmış ve malondialdehit (MDA) tayini için -20°C’de saklanmıştır.

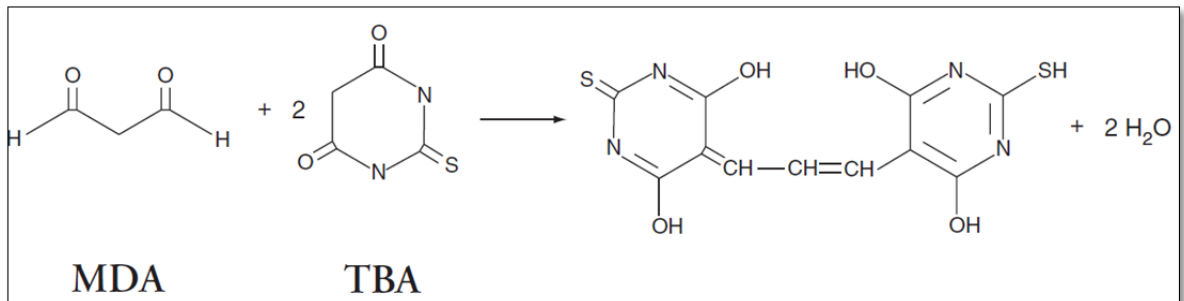
Nanopartiküllerin hücre hasarına etkilerini değerlendirmek için aynı prosedür H_2O_2 kullanılmadan izlenmiştir. Hücre hasarları aşağıda verilen yöntemlerle test edilmiştir.

3.2.10.1. LDH tayin yöntemi

Endotel hücrelerden kültür ortamına salınan LDH derişimi; kültür ortamında, LDH sitotoksisite deney kiti (Cayman Chemicals) kullanılarak saptanmıştır. Ölçüm, iki basamakta gerçekleşmektedir; ilk basamakta LDH, NAD^+ 'nın $NADH$ ve H^+ 'ya indirgenmesini katalizlerken laktatın pirüvata oksidasyonu gerçekleştirilir. Reaksiyonun 2. basamağında tetrazolyum tuzu 490-520 nm'de absorbands veren renkli formazan bileşimine indirgenir. Oluşan formazanın miktarı, besi ortamına salınan LDH ile orantılıdır. LDH tayini için toplanan besi ortamı, 400 g'de 5 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. 96 kuyucuklu plakalara 100 μ L standart ve örnekler pipetlenmiş; üzerlerine 100 μ L besi ortamı eklenmiştir. Üzerine 100 μ L reaksiyon çözeltisi eklendikten sonra plakalar, çalkalayıcı üzerinde ve oda sıcaklığında 30 dakika süreyle inkübe edilmiştir. 490 nm'de mikroparka okuyucuda absorbandslar ölçülmüştür. Sonuçlar U/L olarak ifade edilmiştir.

3.2.10.2. Lipid peroksidasyonunun tayin yöntemi

Oksidatif hasar ile hücre zarında oluşan lipid peroksidasyonu, MDA'nın tiyobarbitürik asitle (TBA) reaksiyona girmesiyle oluşan MDA-TBA kompleksinin 530-540 nm'de verdiği absorbandsın ölçülmesi temeline dayanan yöntem ile tayin edilmiştir [98, 99]. Bu çalışmada lipid peroksidasyonu, Cayman TBARS deney kiti kullanılarak ölçülmüştür.



Şekil 3.4. MDA-TBA kompleksinin oluşumu.

100 µL örnek kuyucuklara konulmuş, üzerlerine 100 µL SDS çözeltisi eklenmiş ve karıştırılmıştır. Bu karışımlara 4 mL renklendirme çözeltisi eklenerek kaynayan suyun içinde 1 saat süre ile bekletilmiştir. 1 saatin sonunda örnekler suyun içinden alınıp reaksiyonu durdurmak üzere buz banyosunda 10 dakika inkübe edilmiştir. Örnekler, 1600 g'de 4°C'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve oda sıcaklığında 30 dakika stabil hale gelmeleri beklenmiştir. Absorbanslar, 530-540 nm'de ölçülmüştür. Sonuçlar µmol/mg protein olarak ifade edilmiştir.

3.2.10.3. İstatistiksel analiz

Gruplar arasındaki fark, Scheffe testi ile değerlendirilmiş; $p < 0.05$ istatistiksel olarak önemli (significant) kabul edilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. PLGA-b-PEG Kopolimerleri

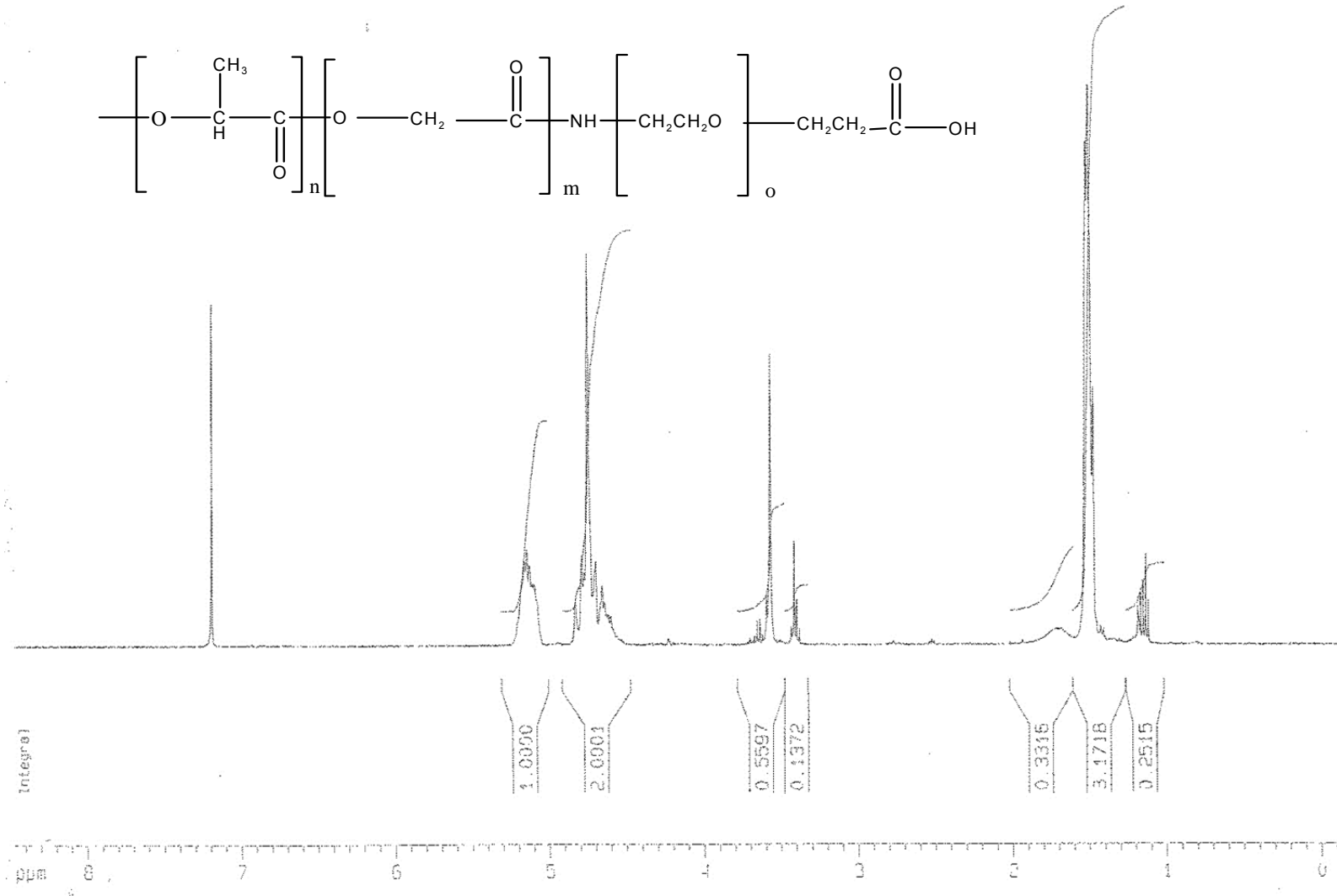
Karboksilik asit fonksiyonel grubu taşıyan PLGA-b-PEG kopolimeri, PLGA-COOH polimeri ile NH₂-PEG-COOH polimerinin konjugasyonu yoluyla sentezlenmiştir (Şekil 3.1). Başlangıç niteliğindeki çalışmalarda, PLGA-b-PEG kopolimeri hazırlama yöntemi, polimer oranları, yıkama ve çöktürme çözücü oranları gibi parametreler optimize edilerek istenilen polimer yapısının en yüksek verimle elde edilmesi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon çalışmalarının sonunda istenilen kopolimer yapısı ortalama % 91.45±6.28 verimle (n=6) elde edilmiştir. Klasik karbodiimid kimyası ile gerçekleştirilen polimer konjugasyonu yöntemi literatürdeki benzer sentez çalışmalarında düşük verimli olarak tanımlanırken, gerçekleştirdiğimiz optimizasyon çalışmaları sayesinde yöntemin verimi % 90'ın üzerinde bulunmuştur.

4.1.1. PLGA-b-PEG-COOH Kopolimerinin ¹H-NMR Analizi

PLGA-b-PEG-COOH yapısına ait proton NMR spektrumunda (Şekil 4.1.) görülen pikler literatürü [100] doğrular şekildedir. 5.2 ppm'de laktit birimindeki hidrojene (-O-CH^{*}(CH₃)-CO-) ait pik, 4.8 ppm'de glikolit birimindeki hidrojene (-O-CH₂^{*}-CO-) ait pik ve 1.5 ppm'de bulunan laktit birimindeki metil hidrojenine (O-CH(CH₃^{*})-CO-) ait pik PLGA yapısını göstermektedir. Bunlara ek olarak, 3.6 ppm'de görülen pik PEG birimindeki hidrojen atomlarına (-O-CH₂^{*}-CH₂^{*}-) aittir. 1.2 ppm ve 3.4 ppm'de bulunan pikler polimerlerin konjugasyonu sırasında uygulanan çöktürme işlemi sırasında kullanılmış olan dietil eterin kalıntısına ait pikler olarak tanımlanmıştır.

4.1.2. PLGA-b-PEG-COOH Kopolimerinin FT-IR Analizi

PLGA-b-PEG-COOH kopolimerine ait FT-IR spektrumu ise Şekil 4.2'de gösterilmiştir. Spektrumda, 3500 cm⁻¹'deki geniş pik -OH grubu esnemesine, 2900-3000 cm⁻¹'de gözlemlenen pik CH₂ ve CH₃'e ait C-H esnemesine ve 1760 cm⁻¹'deki pik, C=O esnemesine aittir.



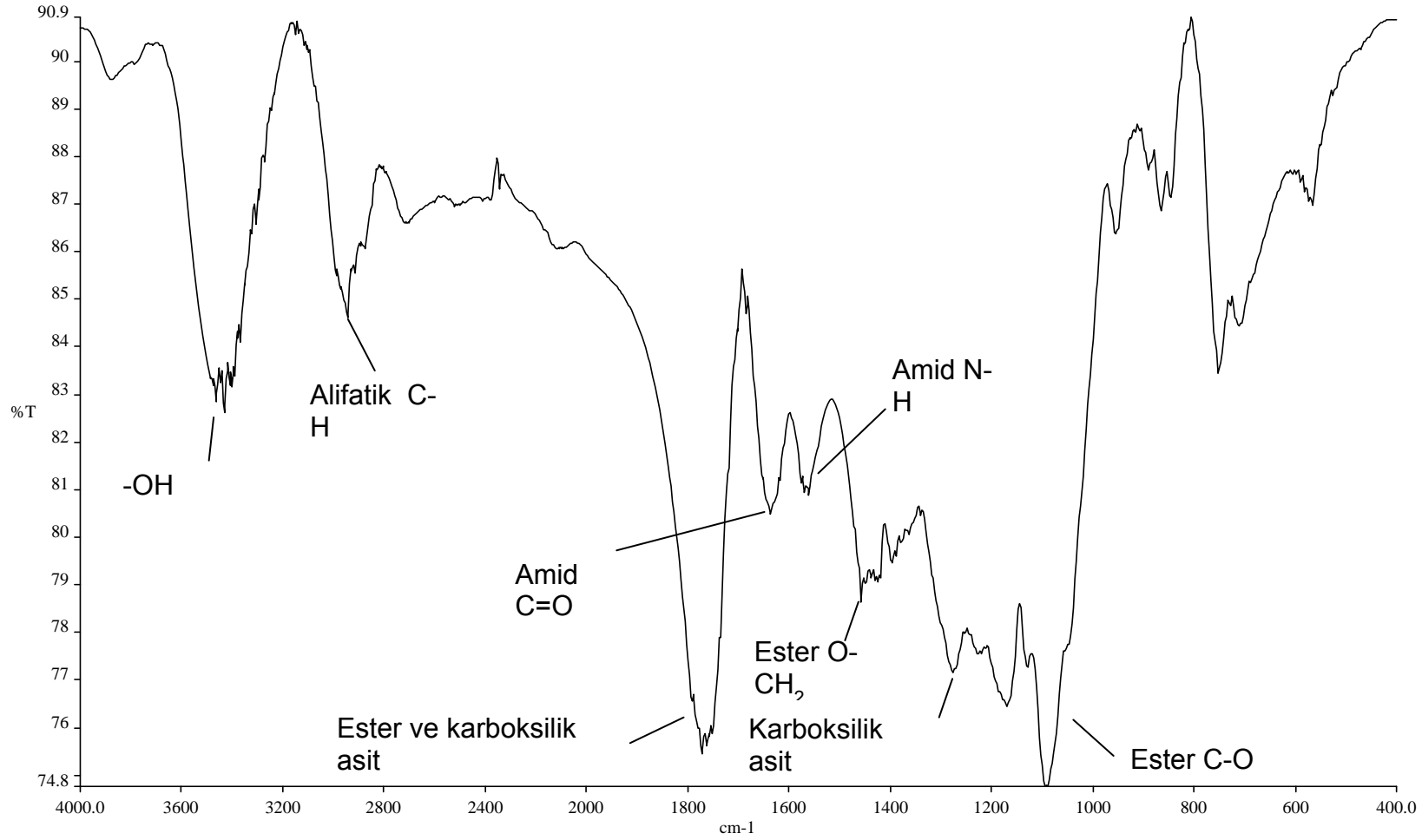
Şekil 4.1. PLGA-b-PEG-COOH kopolimerine ait ¹H-NMR spektrumu.

1300 cm^{-1} ve 1090-1170 cm^{-1} aralığındaki pikler ise sırasıyla karboksilik asite ait C-O esnemesine ve ester grubuna ait C-O esnemesine aittir. Şekil 3.1'de PLGA-b-PEG-COOH sentezi incelendiğinde, PLGA-COOH yapısında bulunmayan bir amid bağının PLGA-b-PEG-COOH yapısında bulunduğu görülmektedir. Bu bağın varlığı FT-IR spektrumunda 1650 cm^{-1} deki amid bağına ait C=O esnemesi ve 1550 cm^{-1} deki yine amid bağına ait N-H eğilmesi pikleri ile görülmektedir. Bu bulgular ışığında, PLGA-b-PEG-COOH yapısının başarı ile sentezlendiği görülmektedir.

4.2. Katalaz Yüklü PLGA-b-PEG Nanopartiküller

Peptit ve protein yapısındaki biyolojik moleküllerin terapötik ajan olarak kullanımları fizyopatolojideki rollerinin iyi bilinmesi sebebi ile ilgi çekici konumdadır. Özellikle rekombinant DNA teknolojisinin gelişmesi, bu bileşikler geçmişe göre çok daha büyük ölçekli araştırma alanlarına taşımıştır. Fakat bunların tedavi amaçlı kullanımlarında; (i) gastrointestinal sistemdeki proteolitik enzimlerce hızla bozulmaları, (ii) biyolojik yarı ömürlerinin kısa olması ve (iii) dağılım katsayılarının düşük ve difüzyon güçleri zayıf olduğu için biyolojik bariyerlerden geçişlerinin zor olması nedenlerinden ötürü biyobozunur partiküler sistemlerce taşınmaları uygun görülmektedir [11]. Nanoteknolojideki gelişmelerle birlikte, bu tez çalışmasının giriş bölümünde bahsedildiği üzere nanopartiküler sistemlerin çeşitliliği ve hücreye özgü antikorlarla konjugasyonu, biyolojik aktif moleküllerin proteolitik enzimlerden korunarak spesifik hücre ve dokulara taşınımını daha etkin hale getirmiştir.

Bu çalışmanın temelinde yatan strateji ise PLGA-b-PEG kopolimer bazlı terapötik enzim taşıyıcı nanopartiküllerin geliştirilmesi ve etkinliklerinin in-vitro deneylerle değerlendirilmesidir. Bu amaçla katalaz yüklü PLGA-b-PEG nanopartiküller çift emülsiyon yöntemi ile +4⁰C'de öngörülen boyutlarda (~200 nm) hazırlanmıştır. Hazırlanan bu katalaz yüklü taşıyıcı nanopartiküllerin, hücreleri H₂O₂'nin toksik etkilerinden koruyarak oksidatif strese karşı güçlü bir koruma sağlama potansiyeline sahip oldukları, ilerideki bölümlerde elde edilen verilerle ispatlanmıştır.



Şekil 4.2. PLGA-b-PEG-COOH kopolimerine ait FT-IR spektrumu.

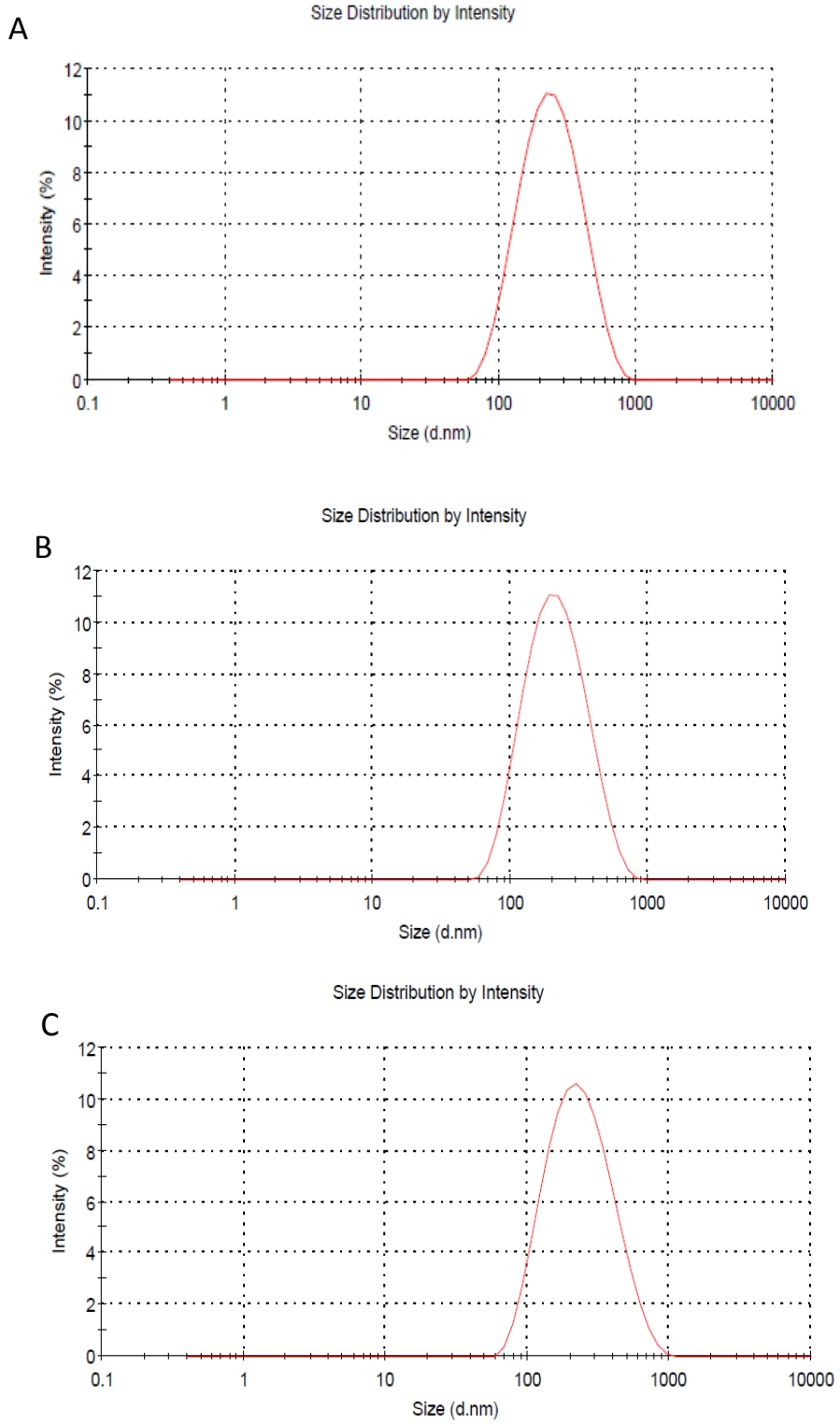
4.2.1. Nanopartiküllerin Boyut Analizi ve Zeta Potansiyeli

Hazırlanan NP formülasyonlarının boyutlarının 210-230 nm aralığında olduğu bulunmuştur. Polidispersite indekslerinin düşük olması (~ 0.2) partikül boyutu dağılımlarının homojen olduğunu göstermektedir. Her formülasyon için 6 örnekle çalışılmış; ortalama boyut, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel değerleri standart sapmaları hesaplanarak elde edilmiştir. Nanopartiküllerin zeta potansiyeli, yüzey yükü özelliğini karakterize etmek için kullanılmaktadır.

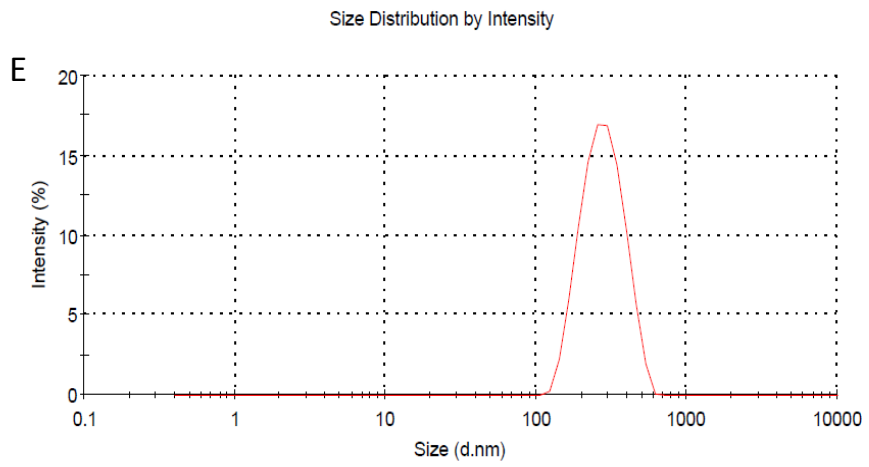
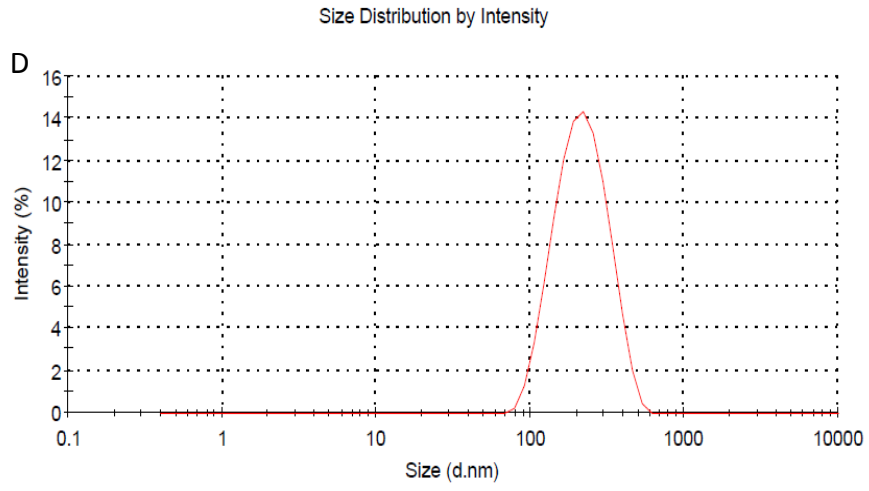
Zeta potansiyel, partiküllerin elektriksel potansiyellerini yansıtmaktadır ve partiküllerin ve içinde buldukları ortamın kompozisyonundan etkilenmektedir. ± 30 mV'den mutlak değerce yüksek zeta potansiyeli olan nanopartiküllerin sahip olduğu yüzey yükü sayesinde agregasyonlarının önlenildiği ve kararlı oldukları gösterilmiştir [101]. Çizelge 4.1'de görüldüğü üzere, hazırlanan NP formülasyonlarının zeta potansiyelleri -30 mV'tan mutlak değerce yüksektir. NP süspansiyonlarının kararlı olduğu, partiküllerin agregasyona eğilimli olmadıkları bu yolla gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Hazırlanan NP formülasyonlarının ortalama boyutları, polidispersite indeksleri ve zeta potansiyelleri (n=6).

Nanopartikül Formülasyonları	Ortalama boyut (nm)	Polidispersite İndeksi (PDI)	Zeta Potansiyel (mV)
NP	211.3 \pm 10.91	0.235 \pm 0.046	-47.0 \pm 6.59
KatNP-1	211.9 \pm 16.6	0.251 \pm 0.026	-38.8 \pm 7.83
KatNP-2	220.1 \pm 15.63	0.292 \pm 0.053	-38.5 \pm 5.76
KatNP-3	231.0 \pm 14.64	0.281 \pm 0.079	-39.5 \pm 5.29
KatNP-4	231.2 \pm 20.96	0.289 \pm 0.053	-38.2 \pm 7.53



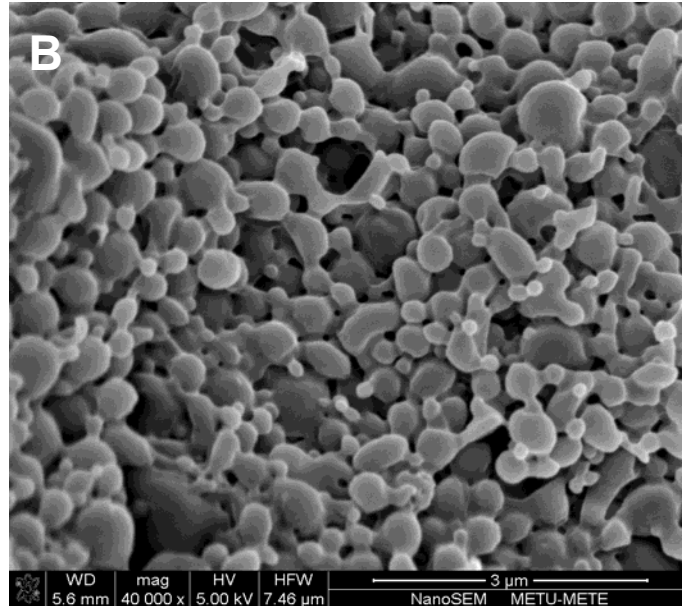
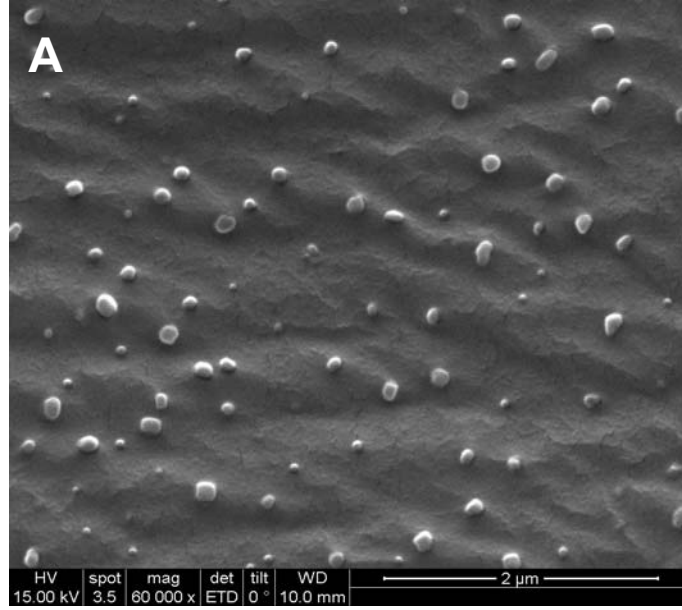
Şekil 4.3. Nanopartiküllerin boyut analizi A) NP, B) KatNP-1, C) KatNP-2, D) KatNP-3, E) KatNP-4.



Şekil 4.3'ün devamı.

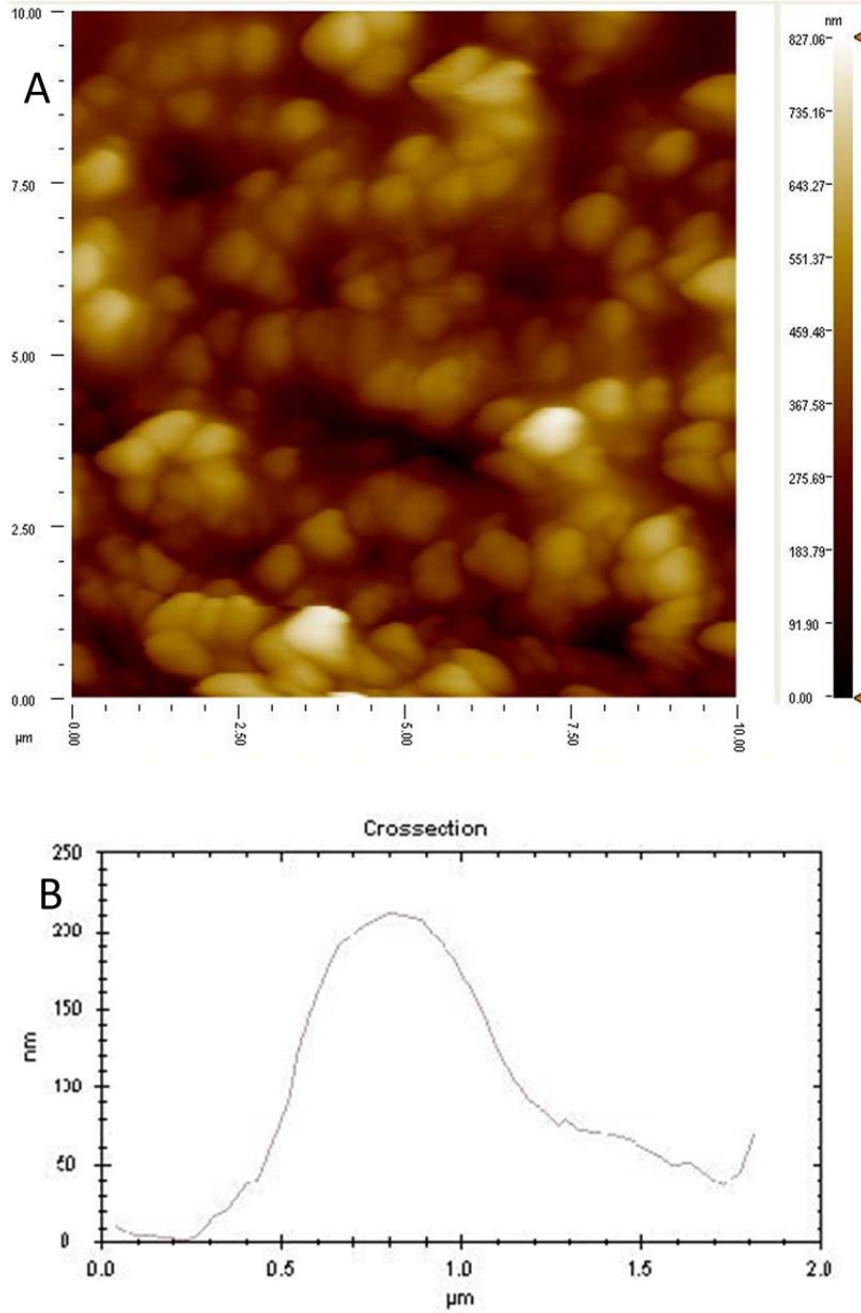
4.2.2. Nanopartiküllerin Morfolojisi

Nanopartiküllerin morfolojisi SEM ile incelenmiş ve partiküllerin küresel ve düzgün formda olduğu görülmüştür (Şekil 4.4.). Aynı zamanda Malvern Zetasizer Nano ZS cihazı ile yapılan nanopartiküllere ait ortalama partikül boyutu ölçüm sonuçlarının (Şekil 4.3.) AFM görüntüleri ile örtüştüğü gözlenmiştir.



Şekil 4.4. Nanopartiküllerin SEM görüntüleri.

Nanopartiküllere ait AFM görüntüleri (Şekil 4.5.) incelenerek, Malvern Zetasizer Nano ZS cihazı ile yapılan ortalama partikül boyutu ölçümleri ile bu görüntüler karşılaştırılmıştır. AFM görüntülerinde nanopartiküllerin boyutunun 220 nm civarında olduğu gözlenmektedir. Bu sonuç Malvern Zetasizer Nano ZS cihazı ile yapılan ortalama partikül boyutu ölçümleri ve SEM görüntüleri ile örtüşmektedir.



Şekil 4.5. Nanopartiküllerin A) AFM görüntüsü, B) boyut dağılımı.

4.3. Nanopartiküllerde Katalaz Aktivitesi

Katalaz, hücrelerin oksidatif savunmasında yer alan; Fenton tepkimesi aracılığı ile H_2O_2 ile reaksiyona girerek H_2O_2 'den hidroksil radikali oluşum riskini azaltan; aerobik organizmaları suya ve moleküler O_2 'ye parçalayarak organizmayı H_2O_2 'nin toksik etkilerine karşı koruyan bir enzimdir. Hücre dışı katalaz uygulaması, katalazın hücre dışında hızla parçalanması ve hücre içine alınmasındaki zorluk nedeniyle oksidatif stres kaynaklı doku hasarında fayda sağlayamamaktadır [102].

Diğer taraftan H_2O_2 'nin hücre membranından ve polimerik materyallerden benzer kinetiklerle difüze olduğu, literatürde yapılan çalışmalar ile ispatlanmıştır [103]. Yapılan çalışmalar doğrultusunda; polimerik partiküllerin koruyucu bir kafes gibi davranmasıyla, katalazın polimerik taşıyıcıdan salınmadığı, H_2O_2 'nin polimerik yapılara difüzyonu yoluyla etki sağlandığı ve böylece katalazın proteolizden korunarak, H_2O_2 ile etkileşiminin artırıldığı belirtilmiştir [103].

Hazırlanan katalaz yüklü nanopartiküllerin (KatNP-1) aktivitesi nanopartikül miktarı (mg) başına 27.39 ± 11.74 U olarak hesaplanmıştır. Nanopartiküllerin hazırlanması aşamasında katalazın DCM ile teması sonucunda aktivitesinin azaldığı belirlenmiştir. Literatürde enzim aktivitelerini korumak amacı ile mannitol, trehaloz, PEG400, sodyum florür (NaF), PVA, gliserol, gluteraldehit ve BSA gibi stabilizan katkı maddelerinin formülasyona eklendiği gösterilmiştir [104, 105]. BSA'nın formülasyona eklenme sebebi; ikinci bir protein yapısı sağlayarak, matriks ile katalazın kovalent bağ oluşturma gibi muhtemel etkilerini minimize edebilmesidir. Bu yüzden bu tez çalışması kapsamında hazırlanan formülasyonda stabilize edici katkı maddesi olarak BSA seçilmiştir. BSA formülasyona 1 mg/mL, 2 mg/mL ve 5 mg/mL derişimlerde eklenmiştir. Stabilizan olarak BSA'nın formülasyona eklenmesi ile 27.39 ± 11.74 U olarak bulunan aktivite, kullanılan en düşük BSA derişiminde (1 mg/mL) 39.72 ± 8.09 U'ya çıkmıştır. Ayrıca formülasyonlardaki BSA miktarının 1 mg/mL'den 5 mg/mL'ye artırılması ile katalaz aktivitesinin 39.72 ± 8.09 U'dan 45.66 ± 3.90 U'ya yükseldiği görülmüştür (Çizelge 4.2.). Böylece BSA'nın nanopartikül formülasyonlarında katalazı stabilize ettiği sonucuna varılmıştır. Bu durum, BSA'nın stabilizasyon etkisinin katalaz-matriks etkileşimlerini azaltmasından kaynaklandığı düşüncesini doğrulamıştır.

Çizelge 4.2. Hazırlanan NP formülasyonlarındaki katalaz aktivitesi

Nanopartikül Formülasyonları	Aktivite (U/mg NP)*
KatNP-1	27.39±11.74
KatNP-2	39.72±8.09
KatNP-3	42.48±7.33
KatNP-4	45.66±3.90

* 1 katalaz ünitesi, 25°C ve pH 7.0'de 1dakikada 1µmol H₂O₂'yi katalize eden miktar olarak tanımlanmıştır.

4.4. Proteolitik Enzim Ortamında Nanopartiküllerde Katalaz Aktivitesi

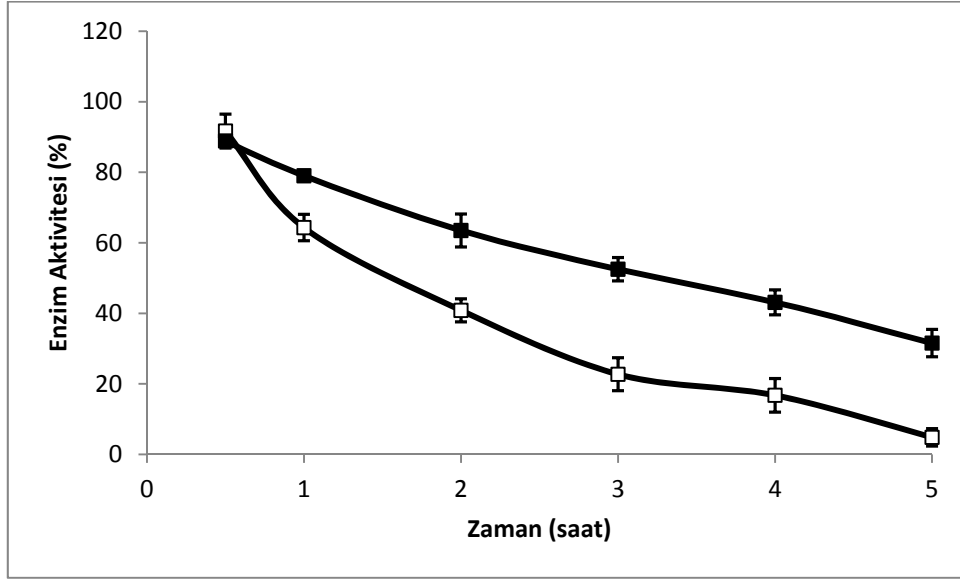
Terapötik proteinler (ör. enzimler); agregasyon, doğal inhibitörler ve proteazlar yoluyla inaktive olmaya yatkındırlar. Enzimleri, termal ve proteolitik degradesyondan korumak için 1970'li yılların sonlarına doğru immobilizasyon tekniği olarak, polimerik bir desteğin kullanılması öngörülmüştür. Enzimi enkapsüle eden biyoparçalanabilir polimerik nanotaşıyıcıların geliştirilmesi, terapötik etkinliği arttırmaktadır. Katalazın, proteolitik enzimler tarafından yıkıldığı bilinmektedir. Literatürde, katalazın proteolizden korunumu ile ilgili çalışmalarda güçlü bir proteolitik enzim olan pronaz kullanılmaktadır [93, 106].

Hazırlanan katalaz yüklü nanopartiküllerin pronaz ortamındaki aktivitelerinin zamana karşı ölçümleri yapılmış ve nanopartiküllerdeki katalaz aktivitesinin ne kadar korunduğu % aktivite-zaman grafikleri ile (Şekil 4.6.-4.9.) verilmiştir. 4 saatin sonunda ortama eklenen serbest katalazın aktivitesinin maksimum % 5 olduğu görülürken, KatNP-1 örneklerinde katalaz aktivitesinin % 43'ünün korunduğu izlenmiştir (Şekil 4.6.). Diğer taraftan nanopartikül formülasyonlarına farklı miktarlarda BSA eklenerek hazırlanan KatNP-2 (1 mg BSA içeren), KatNP-3 (2 mg BSA içeren) ve KatNP-4 (5 mg BSA içeren) nanopartiküllerinin proteolitik enzim varlığında 4 saat sonra % aktivileri sırasıyla % 39, % 40 ve % 46 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar katalazın nanopartiküllere enkapsülasyonununun aktiviteyi

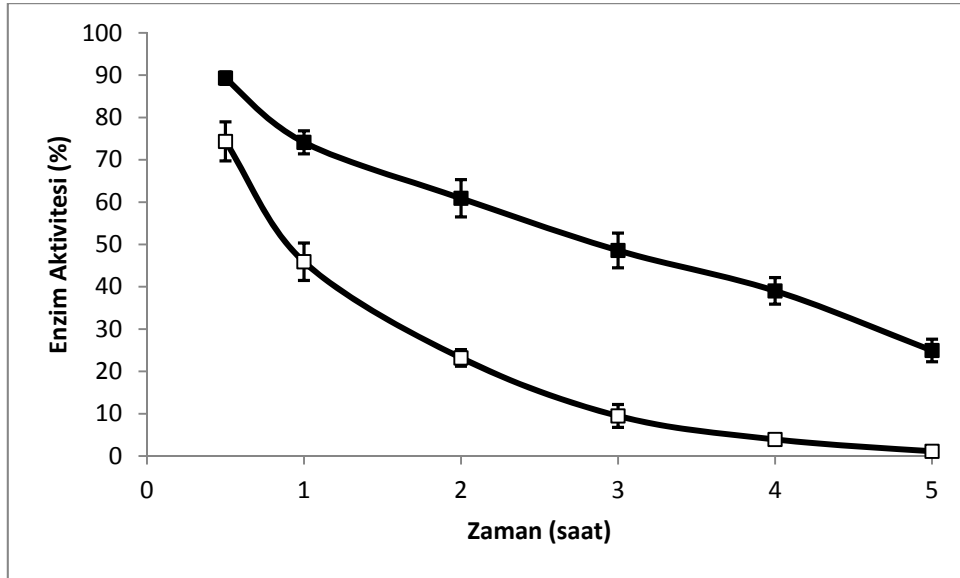
koruduğunu ancak nanopartikül formülasyonlarında ortama eklenen BSA'nın proteolitik enzim ortamında bir etkisinin olmadığını göstermiştir. Diğer taraftan nanopartiküllerin enzim aktivitelerindeki azalmanın, yüzeye adsorblanmış enzimlerden veya bir miktar enzimin nanopartiküllerden salımından kaynaklandığı düşünölmektedir.

Benzer şekilde Dziubla ve ark. [93] yaptıkları bir çalışmada, katalaz aktivitesini korumak için, çift emülsiyon yöntemine dondur-çöz (freze-thaw) tekniğini uygulayarak katalazı polimerik taşıyıcı içine yüklemişlerdir. Gerçekleştirdikleri proteolitik enzimlerden korunma çalışmasında 4 saat proteaza maruz kalan serbest katalazın başlangıçtaki aktivitesinin % 1'den azını koruduğunu, taşıyıcı içindeki katalazın ise 4 saat sonunda başlangıçtaki aktivitesinin % 35'ini koruduğunu göstermişlerdir.

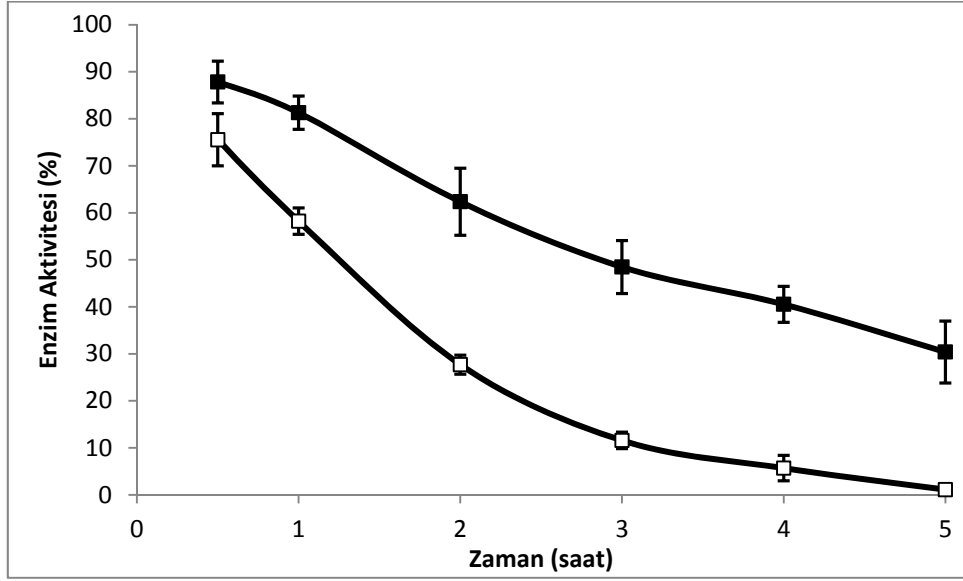
Küçük moleküller etkili bir şekilde taşıyıcı sistemlere yüklenirken, enzim gibi yüksek molekül ağırlığına sahip biyolojik aktif moleküllerin taşıyıcı sistemlere stabil halde yüklenmesindeki problemler henüz çözülmüş değildir. Örneğin; interferon-alfa'nın enkapsülasyonunda kullanılan çift emülsiyon tekniği (prob sonikasyonla) ve ardından hızlı buharlaşma tekniği sonunda aktivitelerinin kalmadığı bildirilmiştir [107]. Benzer şekilde DCM kullanılarak katalaz yüklenen PLGA-b-PEG nanopartiküllerinde katalaz aktivitesinin 10 saniye sonikasyonla % 80 oranında azaldığı görölmüştür. Ancak aynı sistemde, sulu ortamda 10 saniye sonikasyon yapıldığında sonikasyona bağlı enzim aktivitesi kaybının olmadığı izlenmiştir [108]. Sonuç olarak üretim koşullarındaki birçok parametre enzim aktivitesini etkilemektedir.



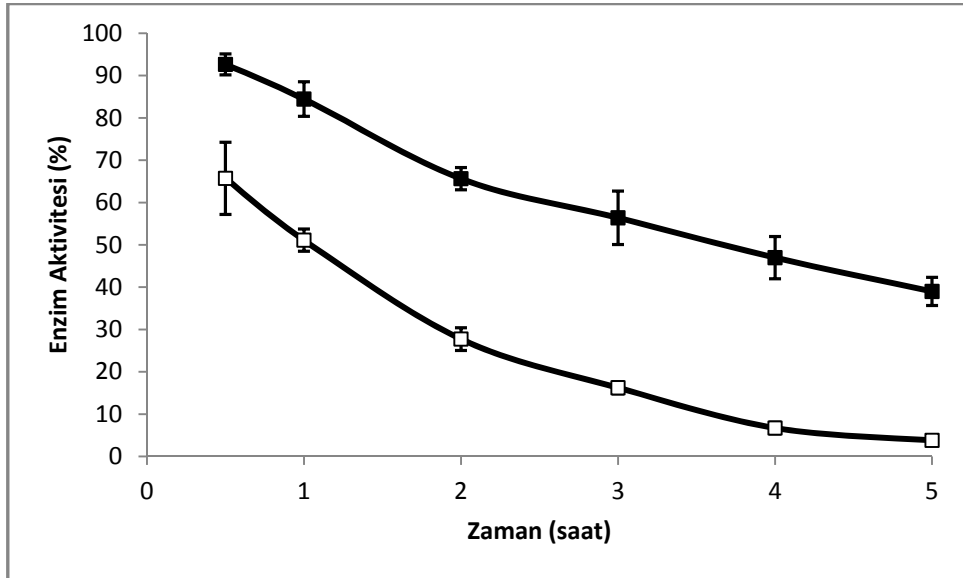
Şekil 4.6. Serbest katalaz (□) ve KatNP-1 (■) partikülleri içine hapsedilmiş katalazın pronaz enzimi ile muamelesi sonucu gözlenen zamana bağlı % aktivite kaybı.



Şekil 4.7. Serbest katalaz (□) ve KatNP-2 (■) partikülleri içine hapsedilmiş katalazın pronaz enzimi ile muamelesi sonucu gözlenen zamana bağlı % aktivite kaybı.



Şekil 4.8. Serbest katalaz (□) ve KatNP-3 (■) partikülleri içine hapsedilmiş katalazın pronaz enzimi ile muamelesi sonucu gözlenen zamana bağlı % aktivite kaybı.



Şekil 4.9. Serbest katalaz (□) ve KatNP-4 (■) partikülleri içine hapsedilmiş katalazın pronaz enzimi ile muamelesi sonucu gözlenen zamana bağlı % aktivite kaybı.

Diğer taraftan nanopartikül formülasyonlarında artan miktarda ortama eklenen BSA'nın proteolitik enzim ortamında bir etkisinin olmaması nedeniyle ve nanopartiküllerdeki enzim aktiviteleri dikkate alınarak, mg nanopartikül başına 42.48 ± 7.33 U aktiviteye sahip KatNP-3 nanopartikül formülasyonunun bundan sonraki deneyler için kullanılması uygun bulunmuştur. Karışıklığın önlenmesi için çalışmanın bundan sonraki bölümlerinde KatNP-3 formülasyonu sadece KatNP olarak anılacaktır.

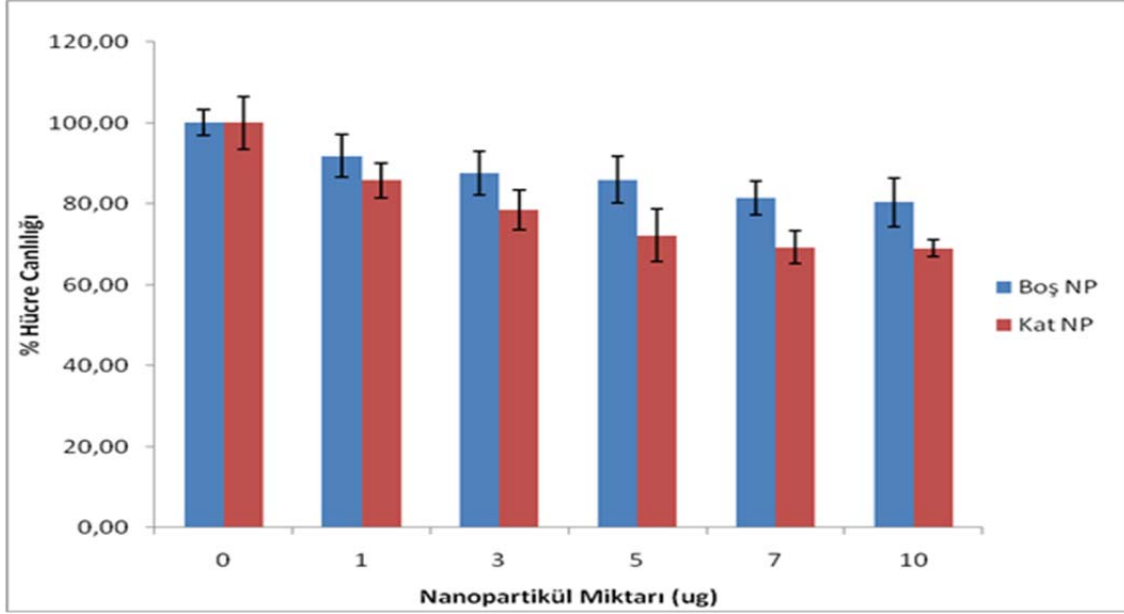
4.5. Nanopartiküllerin Sitotoksitesisi

Nanopartiküllerin sitotoksitesilerinin belirlenmesi amacıyla KatNP'ler artan derişimlerde (1 ile 10 μ g arasında) endotel hücreleri ile etkileştirilerek 24 ve 48 saat olmak üzere inkübe edilmiş ve hücre canlılıkları MTT testi ile analiz edilmiştir. Aynı zamanda katalaz içermeyen NP'ler ile de aynı testler uygulanmıştır. Nanopartikül süspansiyonu eklenmeyen hücrelerin verdiği absorbans %100 olarak kabul edilip, % hücre canlılığı hesaplanarak, sonuçlar Şekil 4.10. ve 4.11'de verilmiştir.

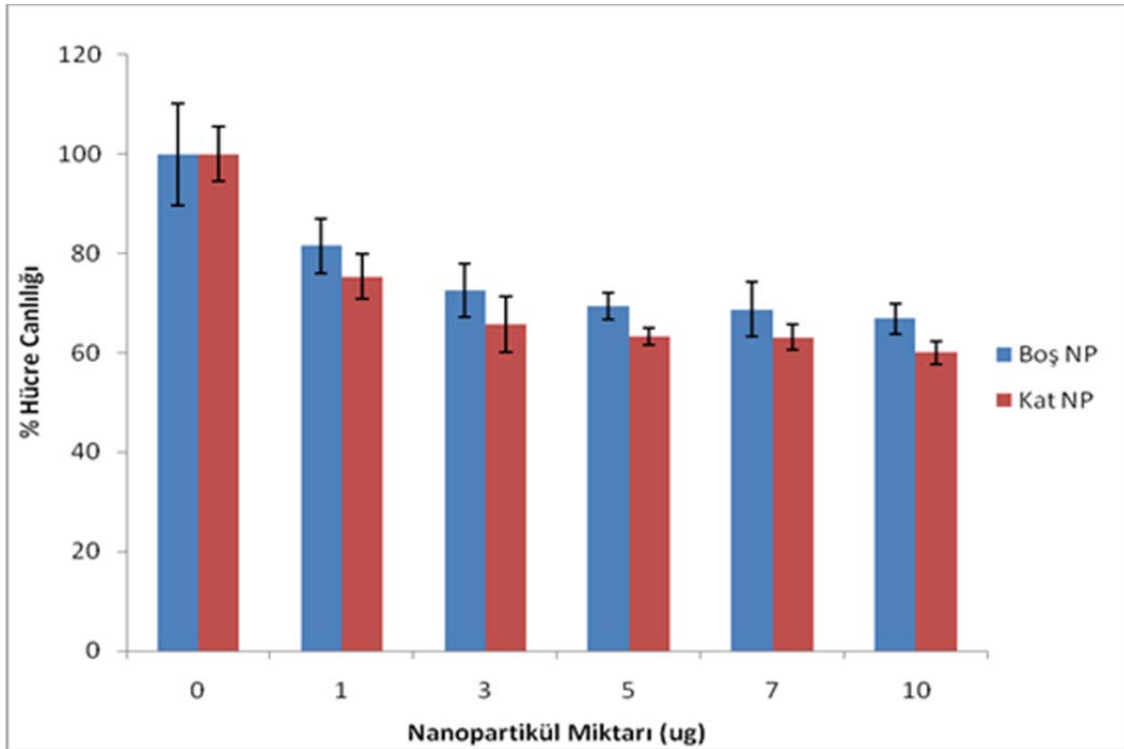
Sitotoksitesite deney sonuçlarına göre KatNP'lerin derişimi arttıkça % canlılığın 24 ve 48 saat sonra azaldığı izlenmiştir. 24 saat sonunda izlenen % canlılık oranları, 5 μ g ve 10 μ g KatNP uygulandığında sırasıyla % 72 ve % 70 olarak bulunmuştur. Katalaz içermeyen NP'lerde ise bu değerler % 86 ve % 80 olarak izlenmiştir. KatNP'lerde % canlılık oranlarının kontrol gruplarına göre azalma göstermesinin üretim koşullarında kullanılan kimyasalların nanopartiküllerden iyi arındırılmamasından dolayı olduğu düşünülmektedir. Çünkü nanopartiküllerin yapısında bulunan PLGA ve PEG polimerleri FDA tarafından biyoyumlu olarak kabul gören polimerlerdir.

48 saat sonra % hücre canlılığı değerlerinin her iki grupta da azaldığı görülmüştür. Bu azalma beklenen bir sonuçtur. Bu durum hücrelerin ikilenme zamanının yaklaşık 48 saat olmasından kaynaklanmaktadır. Diğer taraftan KatNP ile NP arasındaki farkın katalazın etkisinden kaynaklanabileceği ihtimali üzerine farklı miktarlardaki serbest katalaz kültür ortamına eklenerek 24 saat sonra hücre canlılığı üzerine etkisi değerlendirilmiştir. Katalazın düşük derişimlerinde hücre

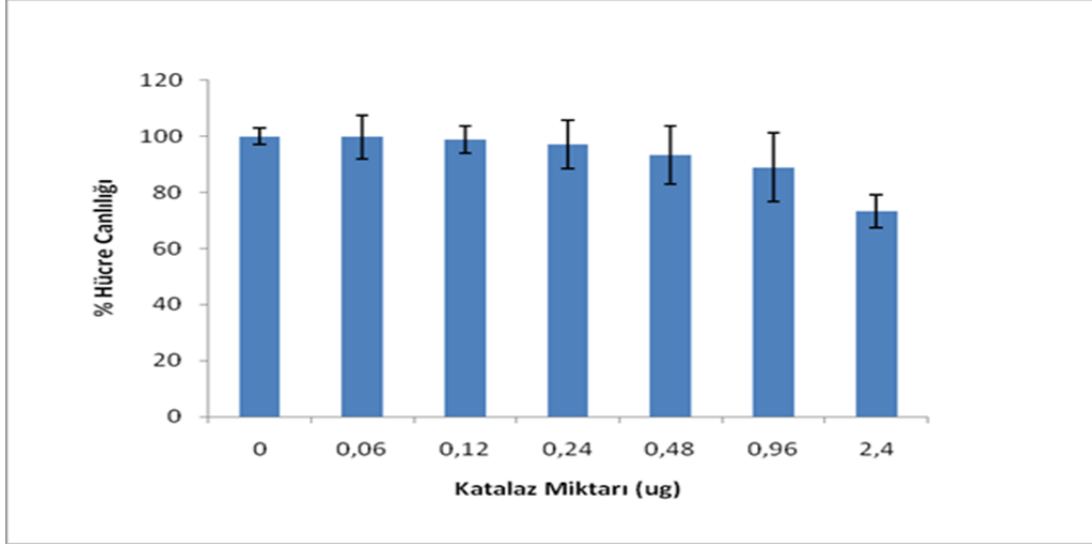
canlılığı üzerine bir etkisinin olmadığı ancak 0.48 µg katalaz miktarından itibaren kontrol grubuna göre anlamlı bir etkisinin olduğu izlenmiştir (Şekil 4.12.).



Şekil 4.10. Nanopartikül derişimlerinin 24 saat sonraki hücre canlılığı üzerine etkisi (n=6).



Şekil 4.11. Nanopartikül derişimlerinin 48 saat sonraki hücre canlılığı üzerine etkisi (n=6).



Şekil 4.12. Katalaz derişimlerinin 24 saat sonraki hücre canlılığı üzerine etkisi (n=6).

4.6. ICAM-1'e Yönlendirilmiş Katalaz Yüklü Nanopartiküllerin Hücresel Alımı

Nanopartiküllerin hücresel alım çalışmaları için FITC işaretli anti-human ICAM-1 antikoru bölüm 3.2.4'te anlatıldığı gibi, nanopartiküllere kovalent olarak bağlanarak kullanılmıştır. Antikor bağlanma etkinliği model antikor olan IgG ile belirlenmiş ve $28.6 \pm 7.2 \mu\text{g}$ IgG/ mg nanopartikül olarak bulunmuştur.

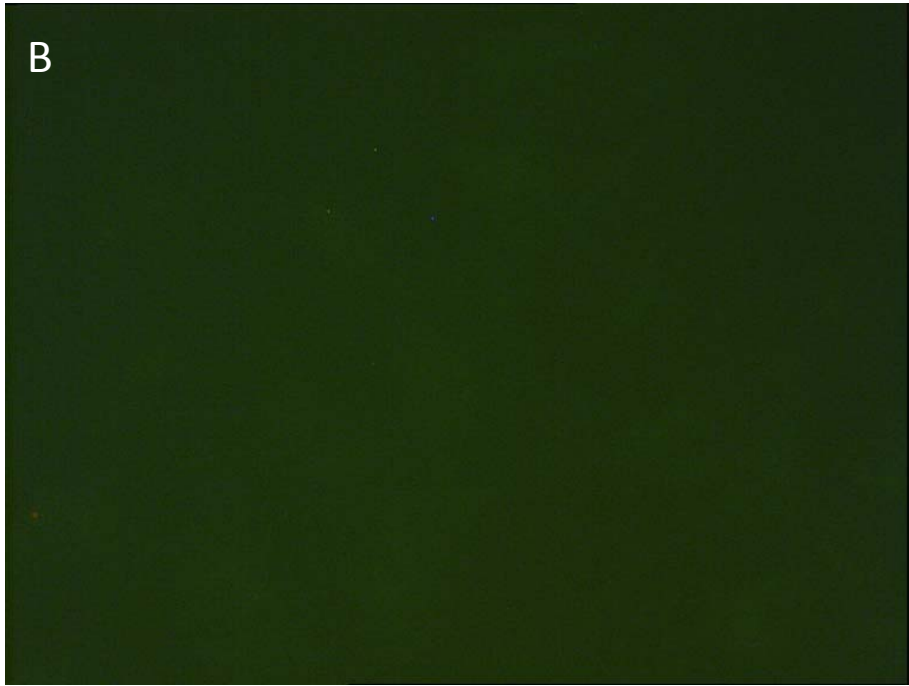
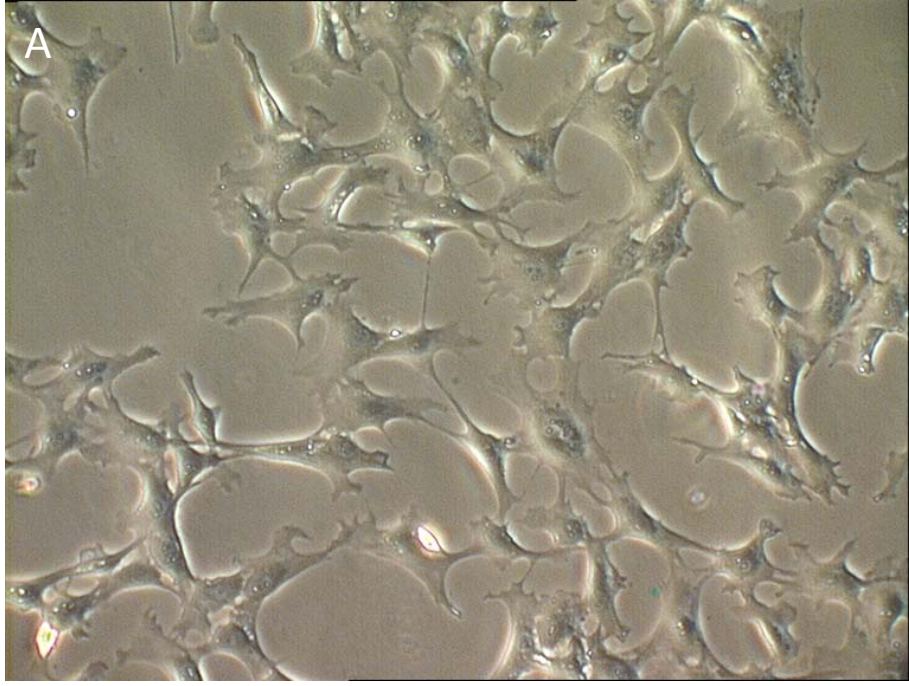
FITC işaretli anti-ICAM-1/KatNP'lerin endotel hücreler ile 30 dakika ve 2 saat inkübasyonlarının ardından hücreler konfokal mikroskobu ile incelenmiştir (Zeiss LSM 510) ve görüntüler Şekil 4.15 ve 4.16'da verilmiştir.

Şekil 4.13-A'da sitoplazmik uzantıları ile tutunan kaldırım taşı morfolojisine sahip hücreler izlenmektedir. Bu hücrelerin floresan ışığa vermediği Epi-floresan görüntüleri ile belirlenmiştir (Şekil 4.13-B). Benzer şekilde kontrol amacıyla boş NP'ler endotel hücre ile etkileştirilmiş ve 2 saat inkübasyonlarının ardından endotel hücre morfolojisinde bir değişikliğin olmadığı ve floresan ışığa vermediği görülmüştür (Şekil 4.14-A ve B).

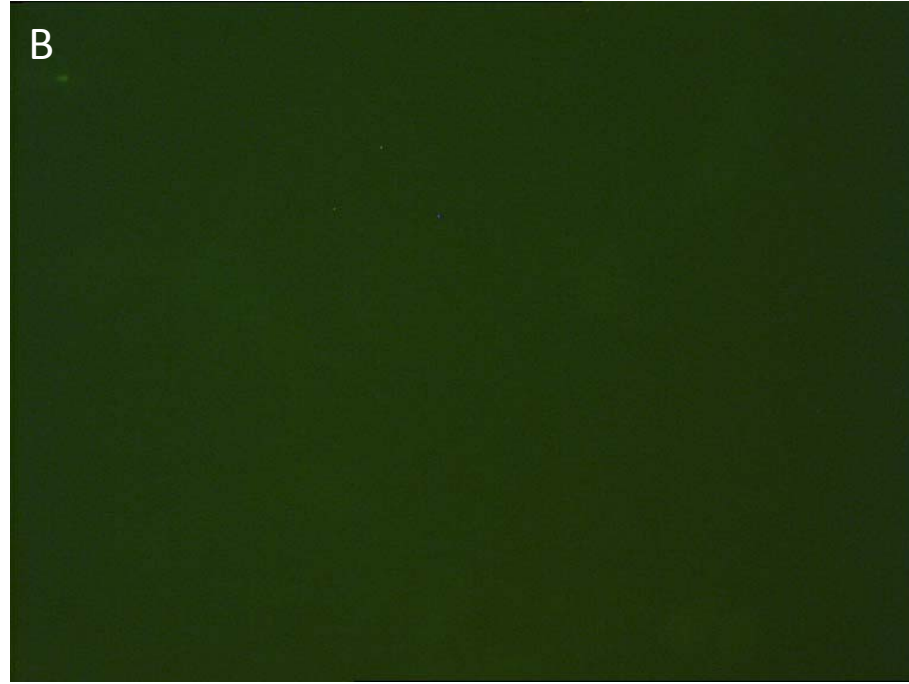
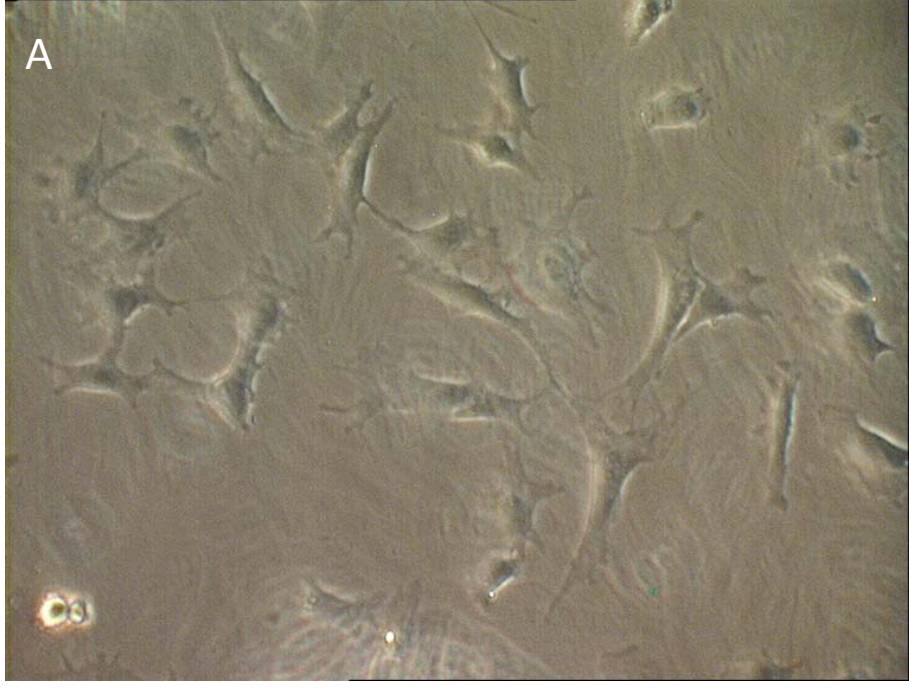
Şekil 4.15'te anti-ICAM-1/NP'lerin endotel hücrelerle 30 dakika inkübasyon sonrasında çekirdeklerinin etrafında az şiddette floresan ışığa verdiği izlenmiştir ve bunun muhtemelen FITC işaretli anti-ICAM-1/NP'lerin varlığını ifade ettiği düşünülmektedir. Bu izlenimle anti-ICAM-1/NP'lerin hücre içine geçişinin başladığı

söylenbilir. İnkübasyon süresinin 2 saate uzamasının ardından floresan ışımının şiddetinin artarak birçok hücre çekirdeğinin etrafında izlenmesiyle birlikte hücre içine taşınan anti-ICAM-1/NP'lerin arttığı sonucuna varılabilir (Şekil 4.16.).

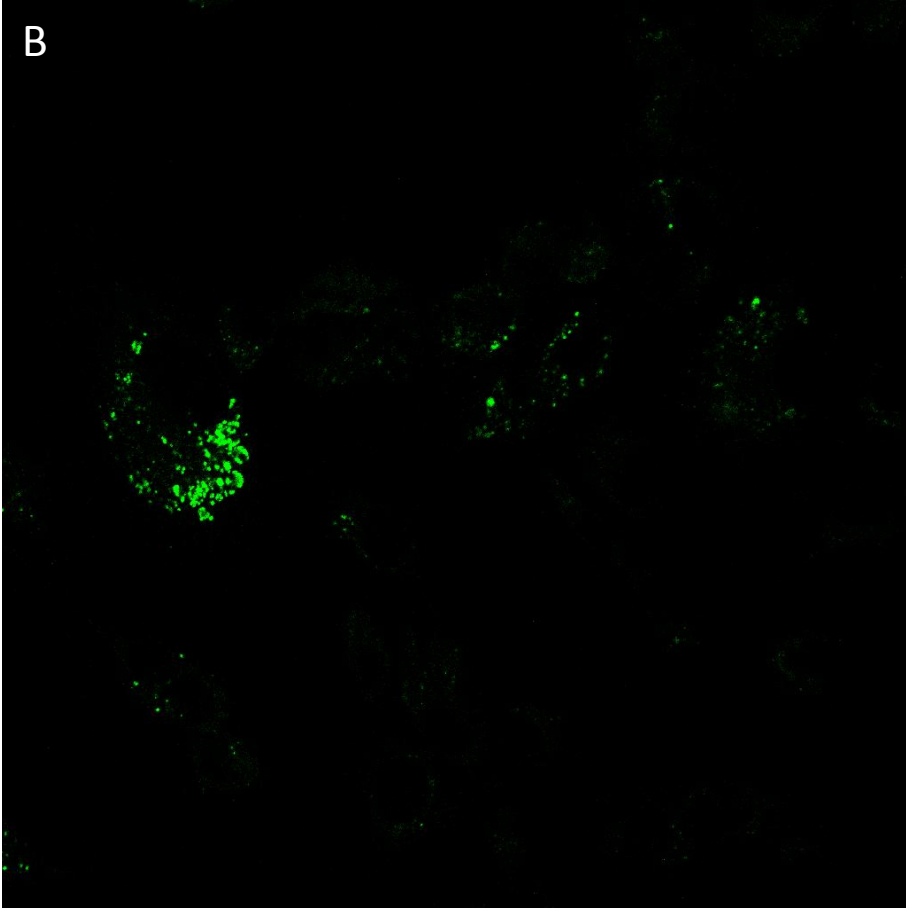
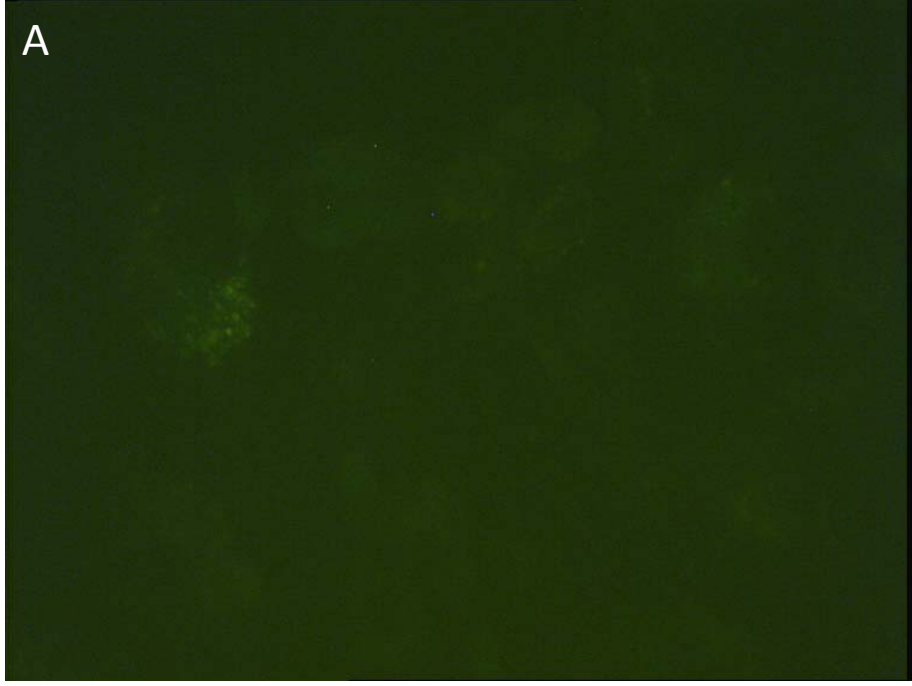
Nanopartiküllerin hücre tarafından alımı; boyut, partikül geometrisi, yüzey kimyası, yüzey yükü vb. birçok parametreye bağlıdır. Hücresel alım mekanizmalarının detaylı olarak anlatıldığı, PLGA nanopartiküllerine floresan işaretçiler takılarak bunların hücre içerisine alınımının gösterildiği çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar sonunda yaklaşık 200 nm boyutundaki PLGA nanopartiküllerinin hücre içerisine endositoz ile alındığı ve ilacı saldıgı birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir [109].



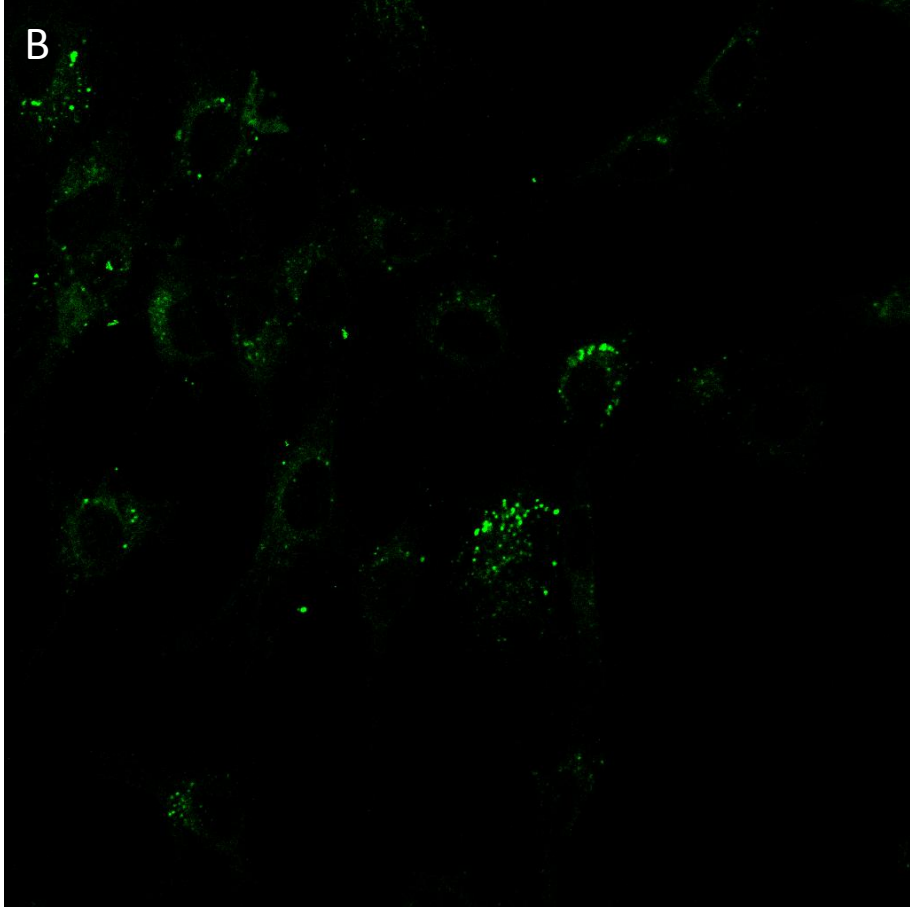
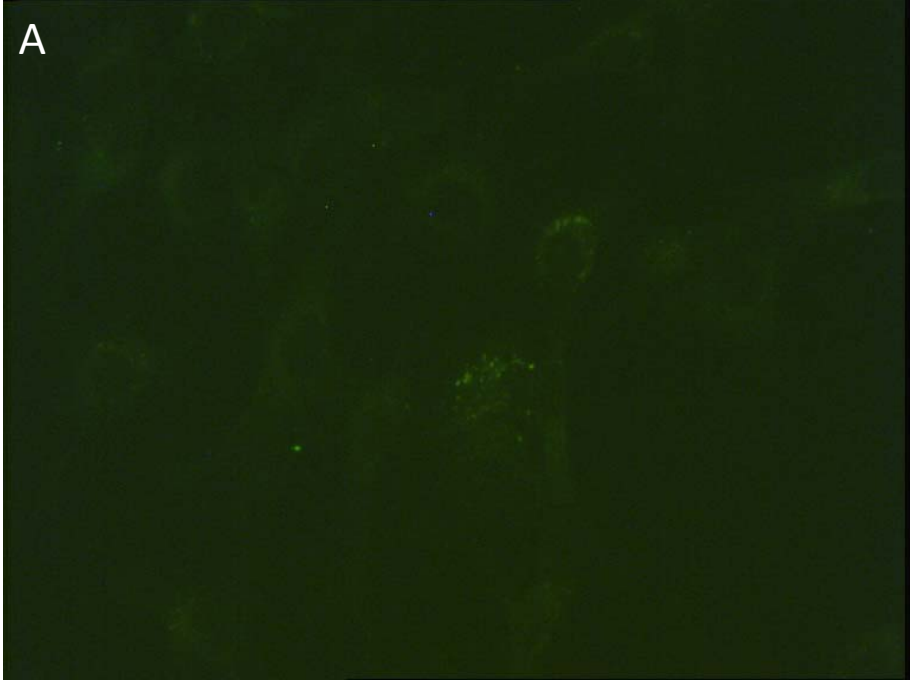
Şekil 4.13. Endotel hücrelerin A) Konfokal görüntüsü x40, B) Epi-floresan görüntüsü x40.



Şekil 4.14. NP'lerin endotel hücrelerle 2 saat inkübasyon sonrası, A) Konfokal görüntüsü x40, B) Epi-floresan görüntüsü x40.



Şekil 4.15. Anti-ICAM-1/NP'lerin endotel hücrelerle 30 dakika inkübasyon sonrası, A) Epi-floresan görüntüsü x40, B) Floresan görüntüsü x40.



Şekil 4.16. Anti-ICAM-1/NP'lerin endotel hücrelerle 2 saat inkübasyon sonrası, A) Epi-floresan görüntüsü x40, B) Floresan görüntüsü x40.

4.7. In-Vitro Oksidatif Stres Oluşumu ve H₂O₂ Derişiminin Etkisi

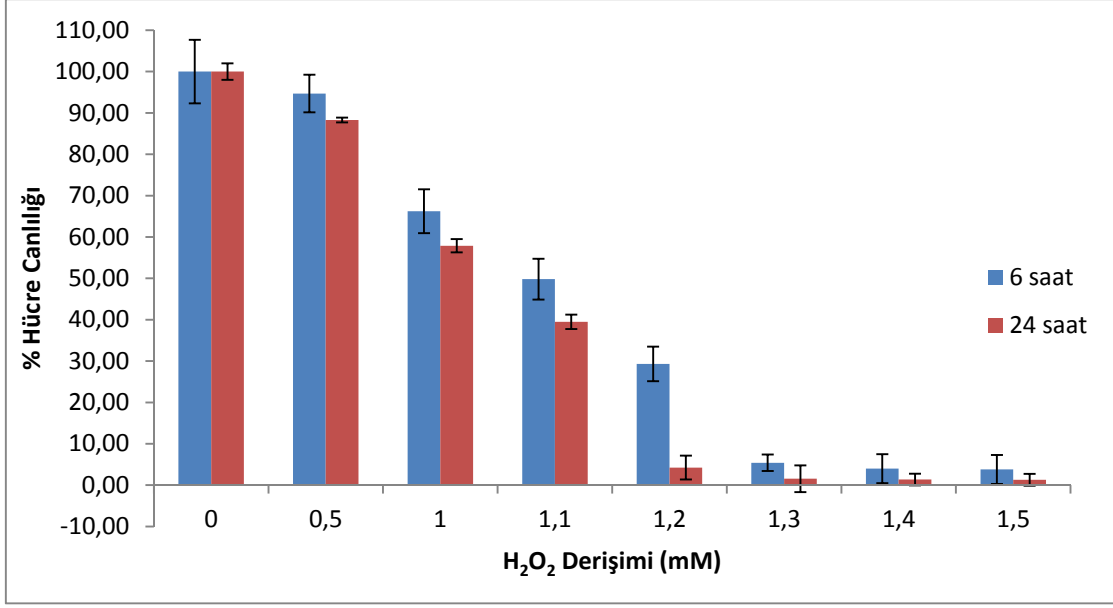
Giriş bölümünde değinildiği gibi H₂O₂, ROS'un ana kaynağıdır. Fe⁺² veya Cu⁺ gibi geçiş metallerinin varlığında H₂O₂, hidroksil radikali (OH·) ve süperoksit anyonu (O⁻²) gibi yüksek derecede reaktif ve toksik radikallere non-enzimatik olarak dönüştürülebilir [110]. Yüksek kararlılığına ve yüksek membran permeabilitesine bağlı olarak hücre içinde oluşan H₂O₂ zararlı etkilerini sadece oluştuğu hücrede değil komşu hücrelerde de gösterebilir.

Vasküler sistemde ve nörodejeneratif hastalıkların patogenezinde üretilen aşırı H₂O₂; hücelere lipidlerin, proteinlerin ve DNA'nın doğrudan oksidasyonu ile zarar vererek veya hücre ölümüne götüren hücre içi yolları tetikleyecek sinyal molekülü olarak rol almaktadır [111].

Bu çalışmada endotel hücreler, farklı derişimlerde H₂O₂ çözeltileri ile muamele edilerek in-vitro hücre hasar modeli oluşturulmuştur. H₂O₂ derişiminin % hücre canlılığı üzerine etkisi Şekil 4.17'de verilmiştir. H₂O₂ derişimi 0.5 mM'dan, 1.2 mM'a artarken % hücre canlılığının buna bağlı olarak dereceli olarak azaldığı ancak 1.2 mM'dan sonra hücrelerin hızlı bir şekilde öldüğü izlenmiştir.

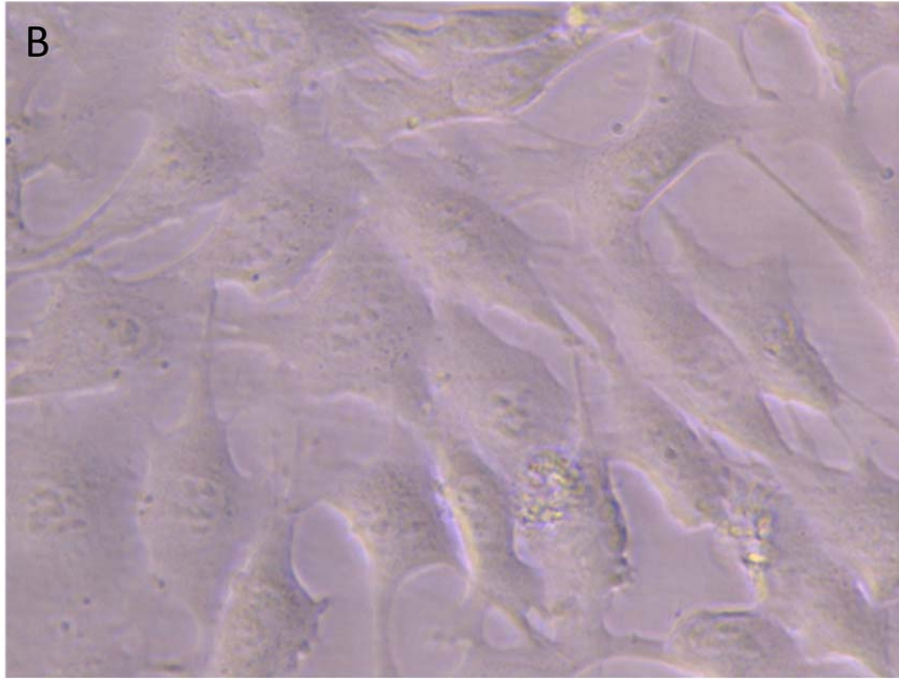
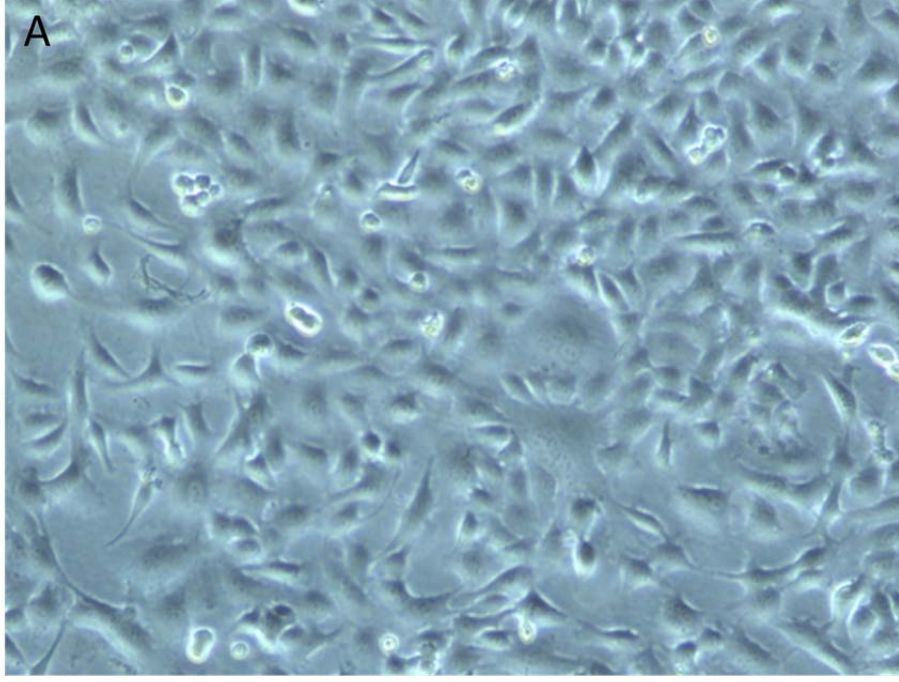
H₂O₂ derişimlerinin logaritmasına karşı, elde edilen % hücre canlılık değerleri grafiğe aktarılarak, doğru denklemi ile % 50 hücre canlılığa karşılık gelen H₂O₂ derişimi hesaplanmış, bu değer hücrelerin % 50'sini öldüren letal derişim (LC₅₀) olarak kabul edilmiştir. Endotel hücreler için bu değer 1.085 mM olarak bulunmuştur. Bu nedenle in-vitro oksidatif hasarı oluşturma modelinde kullanılacak H₂O₂ derişimlerinin LC₅₀ üzerinde bir değer olmasının uygun olacağı düşünülmüş ve 1.1 mM ve 1.2 mM H₂O₂ derişimlerinin kullanılması planlanmıştır.

Katalaz yüklü nanopartiküllerin etkinliğini izlemek üzere oksidatif hasar oluşturma modelinde kullanılacak olan 1.1 mM ve 1.2 mM derişimindeki H₂O₂ çözeltileri endotel hücelere uygulanmış, etkisi zamana bağlı olarak inverted mikroskopta izlenmiştir (Şekil 4.18-21.). Şekil 4.18'de verilen kontrol grubunda (H₂O₂ uygulanmamış) kollajen A kaplı plaka yüzeyinde proliferatif olmuş endotel hücreler, kaldırım taşı morfolojisine sahiptir. Pasaj 6'daki bu hücrelerin çekirdekleri ve sitoplazmaları düzgün ve sağlıklıdır.

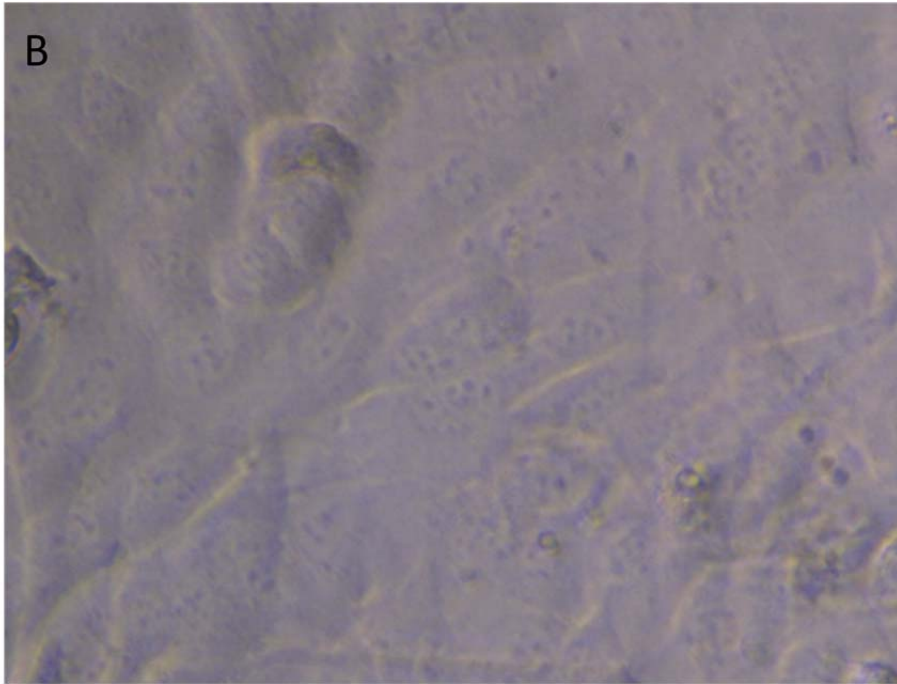
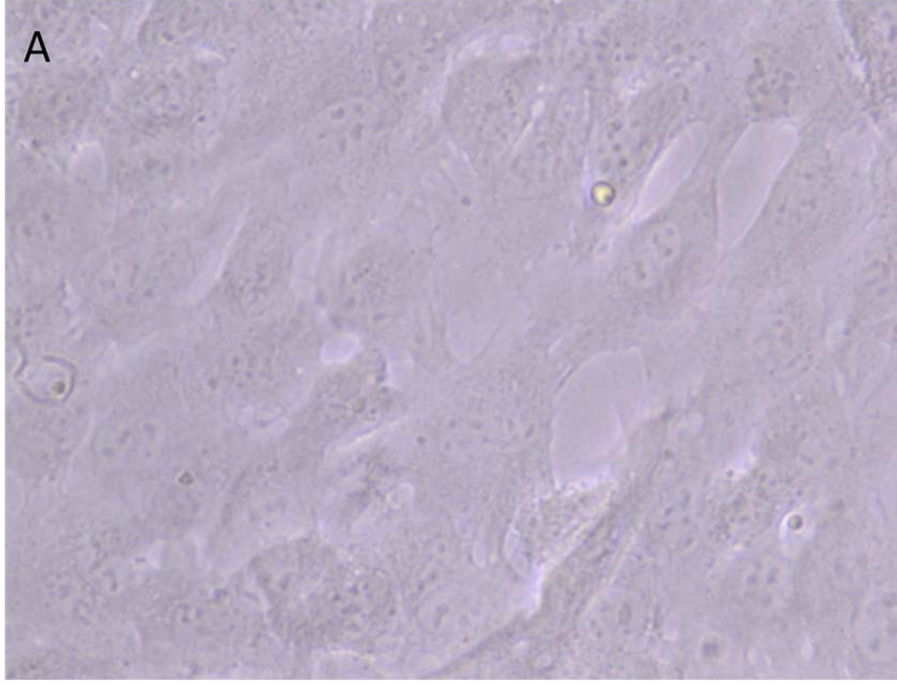


Şekil 4.17. H₂O₂'nin endotel hücre canlılığına etkisi.

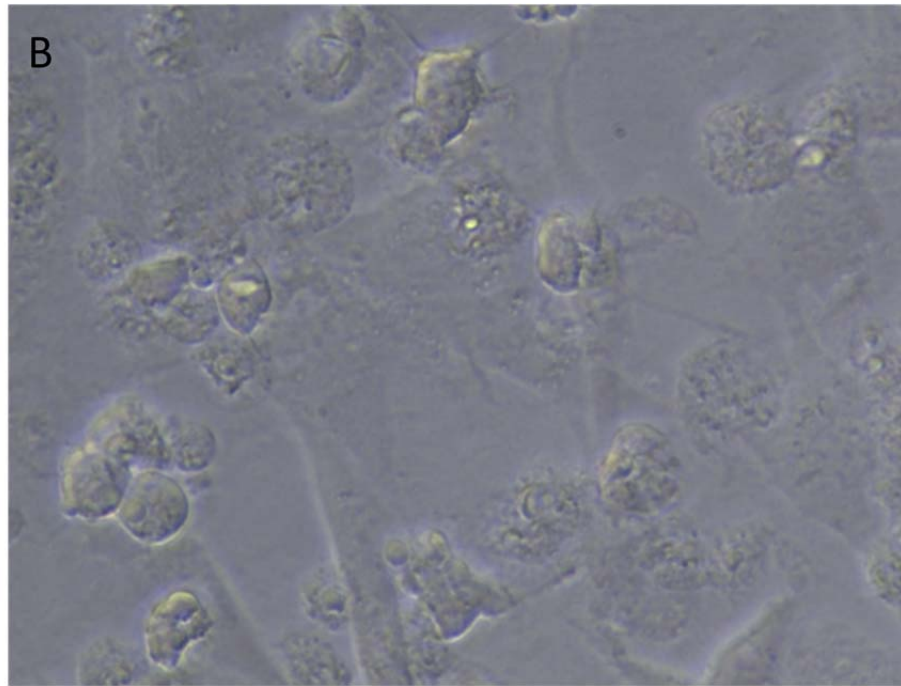
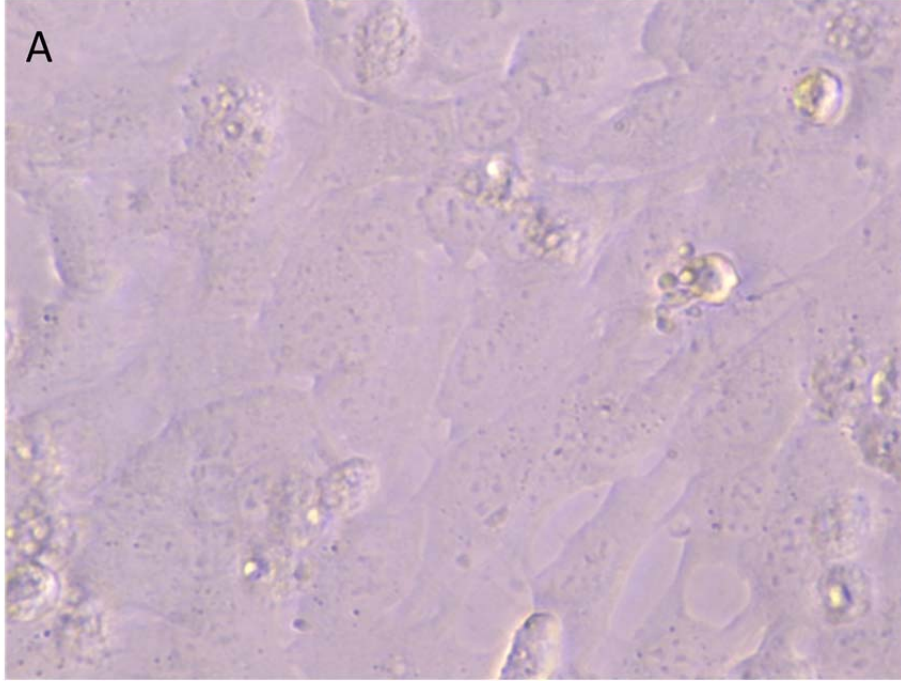
Hücreler, 1.1 mM ve 1.2 mM H₂O₂ ile muamele edilmelerini takiben 1, 6 ve 24 saat sonra yüksek büyütmede (x40) inverted mikroskop ile incelenmiştir (Şekil 4.19-21.). Bu görüntüler incelendiğinde, 1 saat sonra hücre morfolojilerinde ciddi bir değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 4.19.). 6 saat sonra hücre zar yapısının bozulmaya başladığı, bazı hücrelerin kaldırım taşı morfolojisinden uzaklaştığı, uzantılarını kaybettiği görülmektedir (Şekil 4.20.). 1.1 mM H₂O₂ uygulanan grupta bu bozulmaların daha az, 1.2 mM H₂O₂ uygulanan grupta daha fazla olduğu izlenmiştir. 1.1 mM H₂O₂ ile 24 saat boyunca muamele edilmiş endotel hücrelerin morfolojilerinin 6 saat ile kıyasla daha fazla bozulduğu, sitoplazmasında granüllerin oluştuğu görülmektedir (Şekil 4.21.). 1.2 mM H₂O₂ ile 24 saat muamele edilen grupta ise canlılığın neredeyse tamamen kaybolduğu, hücre morfolojisinin bozulduğu görülmektedir. Elde edilen bu bulgular H₂O₂ kaynaklı sitotoksosite değerleri (Şekil 4.17.) ile uyum içerisindedir.



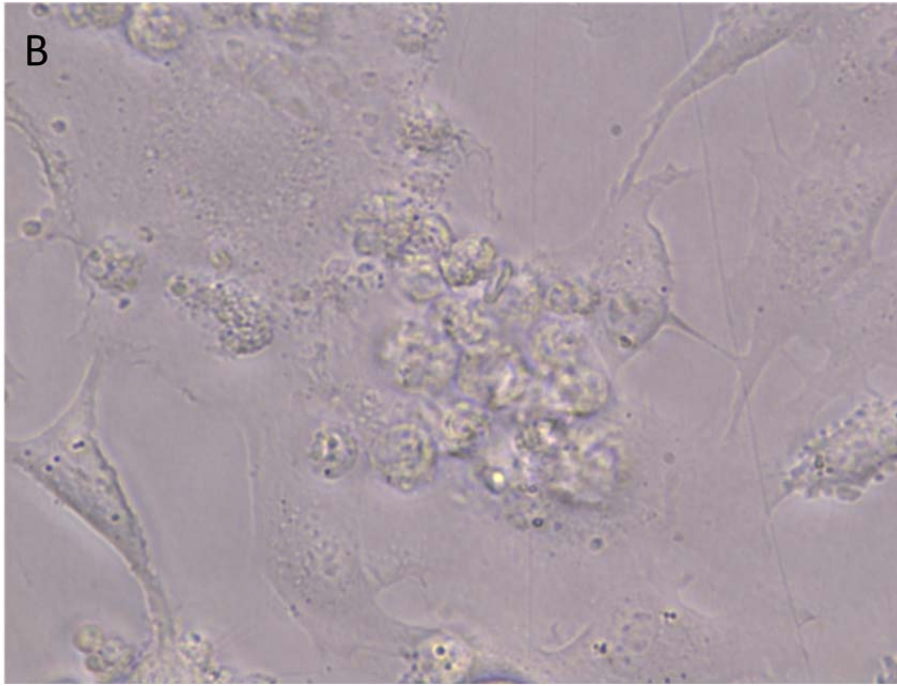
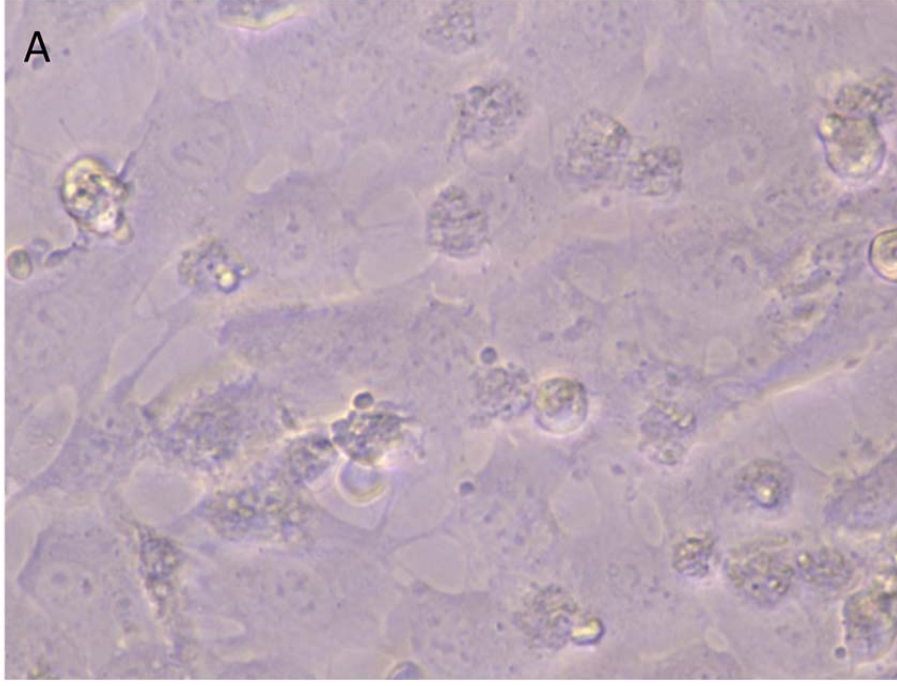
Şekil 4.18. A) Kontrol grubu endotel hücreler (x20), B) Kontrol grubu endotel hücreler (x40).



Şekil 4.19. A) 1.1 mM H₂O₂ ile 1 saat boyunca muamele edilmiş endotel hücreler, B) 1.2 mM H₂O₂ ile 1 saat boyunca muamele edilmiş endotel hücreler.



Şekil 4.20. A) 1.1 mM H₂O₂ ile 6 saat boyunca muamele edilmiş endotel hücreler, B) 1.2 mM H₂O₂ ile 6 saat boyunca muamele edilmiş endotel hücreler.



Şekil 4.21. A) 1.1 mM H₂O₂ ile 24 saat boyunca muamele edilmiş endotel hücreler, B) 1.2 mM H₂O₂ ile 24 saat boyunca muamele edilmiş endotel hücreler.

4.8. Nanopartikül Formülasyonlarının Oksidatif Strese Karşı Koruyucu Etkisinin Değerlendirilmesi

Hücrel detoksifikasyon sistemlerinin, OH⁻ ve özellikle H₂O₂ öncüllerini ortadan kaldırmada yetersiz kaldığı durumlarda, reaktif oksijen türleri lipid peroksidasyonunu uyararak, hücrenin fosfolipid zarlarının temel bileşeni olan çoklu doymamış yağ asitlerine zarar verir [112]. Lipid peroksidasyon ürünleri olarak açığa çıkan lipid hidroperoksitleri membran yapısına doğrudan, diğer hücre bileşenlerine ise aldehit üreterek dolaylı olarak zarar verir. Lipid peroksidasyonu sonucu çeşitli lipid peroksitlerinin yanında ikincil ürün olarak MDA oluşur. MDA, kısa zincirli bir aldehittir ve çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif parçalanmasını belirlemek için kullanılır.

MDA, zar bileşenlerinde çapraz bağlanmalara ve polimerizasyona yol açar. Bunlar membran fonksiyonunun bozulmasına, membran akışkanlığının azalmasına, membran reseptör ve enzimlerinin inaktivasyonuna, Ca⁺² gibi iyonlara karşı geçirgenliğin artmasına neden olur. Bunun sonucu; zar yapısında, iyon taşınmasında ve enzim aktivitelerinde bozulmalar ortaya çıkar. Bu bozukluklar da zamanla hücre ve doku hasarlarına neden olur [113]. Oksidatif stresin direkt olarak ölçülmesi aktif oksijen ve serbest radikal türlerinin çok kısa ömürlü olması sebebi ile çok güçtür. Bu yüzden oksidatif stresin göstergesi olarak en çok başvurulan yöntemler, oksidatif sürecin ürünlerini ölçmeye yöneliktir.

Hücre kültür ortamında, LDH enzim düzeyinin artması, hücre zarı bütünlüğünün azaldığını göstermektedir. Dolayısı ile LDH aktivitesi hücre hasarının bir göstergesi olarak kabul edilmektedir [114].

Bu çalışmada; (i) öncelikle serbest katalazın ve nanopartiküllerin endotel hücreler üzerinde herhangi bir hasar yapıcı etkisinin olup olmadığını incelemek amacıyla serbest katalaz ve nanopartikül formülasyonları hücreler ile sadece besi ortamında inkübe edilmiş, (ii) diğer taraftan hücrelerde H₂O₂ kaynaklı yaratılan oksidatif strese karşı farklı derişimlerdeki serbest katalaz ve NP formülasyonlarının koruyucu etkisi LDH aktivitesi ve MDA düzeylerinin ölçümleri ile değerlendirilmiştir ve sonuçlar aşağıda tartışılmıştır.

4.8.1. Katalaz ve Nanopartikül Formülasyonlarının Hücre Hasarına Etkisi

Farklı miktarlarda katalaz ve NP formülasyonları eklenerek 6 saat ve 24 saat inkübe edilen hücrelerin LDH aktiviteleri ve MDA değerleri Çizelge 4.3'te verilmiştir.

6 ve 24 saat inkübe edilen hücrelerin (kontrol grup) bazal LDH değerleri sırasıyla 107.25 ± 2.54 U/L ve 108.23 ± 2.40 , MDA değerleri ise sırasıyla 0.82 ± 0.01 $\mu\text{mol/mg}$ protein ve 0.81 ± 0.02 $\mu\text{mol/mg}$ protein olarak bulunmuştur. Farklı derişimlerde katalaz ve nanopartikül formülasyonlarının 6 ve 24 saat sonraki LDH aktiviteleri ve MDA düzeylerinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. Dolayısı ile nanopartikül formülasyonlarının ve serbest katalaz çözeltisinin hücrelerde oksidatif strese ve herhangi bir hasara yol açmadığını söyleyebiliriz.

4.8.2. Katalaz ve Nanopartikül Formülasyonlarının H₂O₂ Kaynaklı Hücre Hasarına Koruyucu Etkisi

Çizelge 4.4'te verilen LHD aktiviteleri incelendiğinde 1.1 mM H₂O₂ ile muamele edilmiş kontrol grubunun 6 ve 24 saat sonraki LDH aktivite değerleri 958.76 U/L ve 1178.93 ± 50.11 U/L olduğu gözlenmektedir. H₂O₂ derişiminin 1.2 mM'a artmasıyla 6 ve 24 saat sonraki LDH aktivite değerleri sırasıyla 1178.93 ± 50.11 U/L ve 1445.53 ± 42.81 U/L'dir.

Çizelge 4.5'te verilen kontrol grubunun 6 saat sonraki MDA değerleri ise 1.1 mM H₂O₂ ile muamele edilmiş hücrelerde 2.39 ± 0.05 $\mu\text{mol/mg}$ protein, 1.2mM ile muamele edilmiş hücrelerde ise 2.89 ± 0.06 $\mu\text{mol/mg}$ protein olduğu gözlenmektedir. Bu değerler çizelge 4.3'te verilen hücrelerin bazal LDH ve MDA değerleri ile karşılaştırıldığında MDA ve LDH seviyelerindeki bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p < 0.001$) gözlenmiştir. Sonuç olarak H₂O₂'nin hücreler üzerinde hasara yol açarak oksidatif strese neden olduğu söylenebilir. Bu hasarda H₂O₂ derişimi ve inkübasyon süresinin (6 ve 24 saat) etkisi incelendiğinde her iki parametrenin de istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p < 0.001$). 1.2 mM derişimdeki H₂O₂'nin 1.1 mM derişimdeki H₂O₂'ye göre MDA düzeyi ve LDH aktivitesini anlamlı bir şekilde artırdığı gözlenmiştir ($p < 0.001$).

Serbest katalazın etkisi incelendiğinde, 0.06 µg derişimde eklenen serbest katalaz, H₂O₂ ile oluşturulan endotel hasarının ve oksidatif stresin göstergelerinde (LDH ve MDA) bir miktar azalmaya yol açsa da aradaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. H₂O₂ derişimi ve inkübasyon süresinin de önemli bir etkisi görülmemiştir. Oksidatif stres esnasında oluşan H₂O₂'yi nötralize etmekle görevli en önemli endojen antioksidan enzim olan katalaz, hücre dışı aktivitesinin stabil olmayışı; artan oksidan düzeyine paralel olarak yeterince fazla eksprese olamayışı ve proteazlara dayanıksızlığı nedeniyle endotel hücrlerle doğrudan inkübe edildiğinde yüksek derişimdeki H₂O₂'yi yeterince uzaklaştıramamış olabilir. 0.12 µg derişiminde endotel hücrelerle 24 saat inkübe edilen serbest katalaz, LDH ve MDA düzeylerinde bir miktar azalmaya neden olmakta (p<0.001); ancak oksidatif hasarı önemli ölçüde engelleyememektedir (Çizelge 4.4 ve 4.5, Şekil 4.22. ve 4.23.).

Boş nanopartiküllerin (NP) (5 ve 10 µg), 1.1 mM ve 1.2 mM derişimlerdeki H₂O₂ ile oluşturulan endotel hücre hasarına etkisi incelendiğinde LDH ve MDA düzeylerini düşürmediği Çizelge 4.4'te ve 4.5'te, Şekil 4.22. ve 4.23'te görülmektedir. Hücre kültür ortamına eklenen boş nanopartiküllerin H₂O₂ ile oluşturulan oksidatif endotel hücre hasarını engellemediği sonucuna varılmıştır.

Katalaz içeren nanopartiküllerin (KatNP 5 µg ve KatNP 10 µg), H₂O₂ (1.1 ve 1.2 mM) hasarına maruz bırakılmış endotel hücreler üzerindeki koruyucu etkileri Çizelge 4.4 ve 4.5, Şekil 4.22. ve 4.23'te görülmektedir. 1.1 mM H₂O₂ ile muamele edilen hücrelerde LDH aktivitesi 958.76±25.76 U/L iken, sırasıyla KatNP 5 µg ve KatNP 10 µg ile muamele edildikten sonra 1.1 mM H₂O₂ eklenen hücrelerde LDH aktiviteleri 470.128±14.33 U/L ve 278.61±8.23 U/L olarak ölçülmüştür. H₂O₂ ile hasara uğratılan endotel hücreler KatNP'ler (5 µg ve 10 µg) ile 6 ve 24 saat muamele edildikten sonra LDH aktivitesinin ve lipid peroksidasyonunun dikkat çekecek miktarda azaldığı (p<0.001) görülmüştür. Bu azalma, H₂O₂ derişimi ile ilgili olup H₂O₂ derişimi arttığında koruma azalmaktadır (p<0.001). KatNP 10 µg ile muamele edilen hücrelerdeki LDH ve MDA düzeyleri, KatNP 5 µg ile muamele edildiği durumdaki değerlere oranla daha fazla düşüş göstermektedir (p<0.001). İnkübasyon süresi de koruyucu etki açısından önemlidir. 24 saatlik inkübasyonda ölçülen LDH aktivitesi ve MDA düzeyi, 6 saatlik inkübasyon sonrası elde edilen değerlere oranla daha çok azalmıştır. Bu veriler, KatNP formülasyonunun H₂O₂ ile

oluşturulan endotel hücre hasarına ve oksidatif strese karşı önemli ölçüde koruma sağladığını ve 10 µg derişimde hazırlanan katalaz içeren nanopartiküllerin hasarı engellemede daha iyi sonuç verdiğini göstermiştir.

Antikor bağlanarak hedeflenmeye uygun hale getirilmiş anti-ICAM-1/KatNP formülasyonunun, oksidatif stres hasarına maruz bırakılmış endotel hücrelere olan etkileri Çizelge 4.4 ve 4.5, Şekil 4.22. ve 4.23'te görülmektedir. 1.2 mM H₂O₂ ile hasara uğratılan (6 saat inkübasyon) endotel hücrelerin (kontrol grup), LDH aktivitesi 1178.93±50.11 U/L iken, anti- anti-ICAM-1/KatNP 10 µg ile inkübe edilip daha sonra hasara uğratılan hücrelerin 6 saat sonraki LDH aktivitesi 128.25±5.10 U/L olarak gözlenmiştir. Bu değer hücrelerin normal şartlardaki LDH aktivitesine yaklaşmıştır. Tüm veriler incelendiğinde 1.1 mM ve 1.2 mM H₂O₂ ile hasara uğratılan endotel hücreler anti-ICAM-1/KatNP 5 µg ve 10 µg ile 6 ve 24 saat muamele edildikten sonra LDH aktivitesinin ve lipid peroksidasyonunun dikkat çekecek miktarda azaldığı, hatta bazal düzeylere yaklaştığı (p<0.001) görülmüştür. Bu azalma, H₂O₂ derişimi ile doğrudan ilişkilidir ve H₂O₂ derişimi arttığında koruma azalmaktadır (p<0.001). Anti-ICAM-1/KatNP 10 µg ile muamele edilen hücrelerdeki LDH ve MDA düzeyleri, anti-ICAM-1/KatNP 5 µg ile muamele edildiği durumdaki değerlere oranla daha fazla düşüş göstermiştir (p<0.001). İnkübasyon süresi de koruyucu etki açısından önemlidir. 24 saatlik inkübasyonda ölçülen LDH aktivitesi ve MDA düzeyi, 6 saatlik inkübasyon sonrası elde edilen değerlere oranla daha çok azalmıştır (p<0.001).

Bu veriler, anti-ICAM-1/KatNP formülasyonunun H₂O₂ ile oluşturulan endotel hücre hasarına ve oksidatif strese karşı önemli ölçüde koruma sağladığını ve 10 µg anti-ICAM-1/KatNP'lerin 5 µg anti-ICAM-1/KatNP'lere göre oksidatif hasarı engellemede daha iyi sonuç verdiğini göstermiştir.

Hedeflendirme yapılmış anti-ICAM-1/KatNP ile hedeflendirme yapılmayan KatNP formülasyonlarının sağladığı koruma kıyaslandığında, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0.001).

Çizelge 4.3. Katalaz ve nanopartikül formülasyonlarının hücre hasarına etkisi: LDH ve MDA değerleri (n=6).

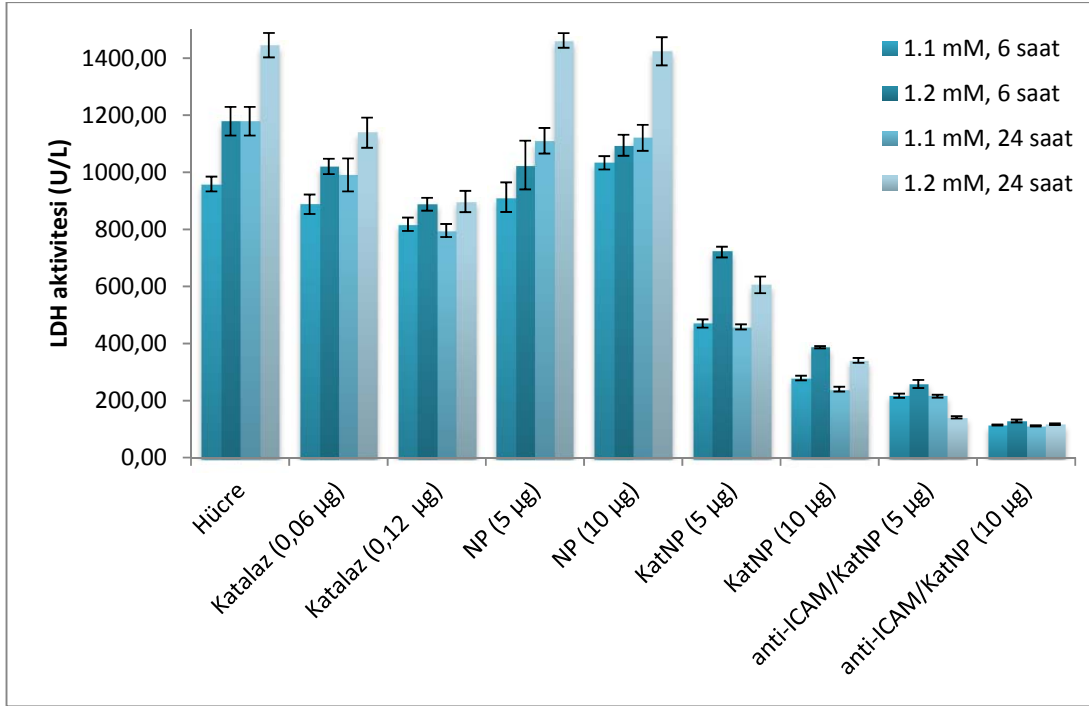
	Hücre (kontrol grup)	Katalaz (0.06 µg)	Katalaz (0.12 µg)	NP (5 µg)	NP (10 µg)	KatNP (5 µg)	KatNP (10 µg)	anti-ICAM-1/ KatNP (5 µg)	anti-ICAM-1/ KatNP (10 µg)
6 SAAT İNKÜBASYON									
LDH (U/L)	107.25±2.54	105.38±0.88	--	104.24±1.52	104.9±0.94	104.06±1.69	104.8±1.78	106.16±1.00	103.74±1.86
MDA (µmol/mg protein)	0.82±0.01	0.81±0.01	---	0.82±0.03	0.82±0.02	0.83±0.03	0.82±0.02	0.82±0.03	0.80±0.01
24 SAAT İNKÜBASYON									
LDH (U/L)	108.23±2.40	106.39±0.71	103.9±2.09	106.89±1.39	108.12±2.66	108.96±3.03	106.70±1.22	106.84±1.05	107.13±1.11
MDA (µmol/mg protein)	0.81±0.02	0.80±0.01	0.80±0.01	0.80±0.01	0.80±0.00	0.82±0.02	0.80±0.01	0.81±0.02	0.80±0.02

Çizelge 4.4. Hücrelerden salınan LDH aktivitesi (U/L), (n=6).

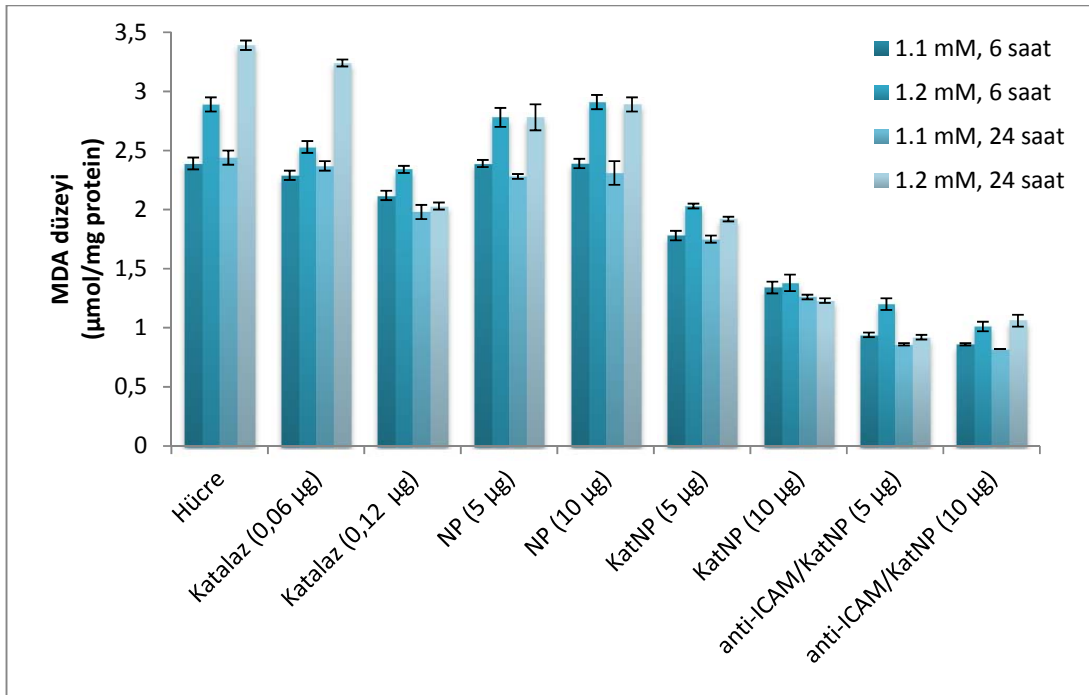
	Hücre (kontrol grup)	Serbest Katalaz (0,06 µg)	Serbest Katalaz (0,12 µg)	NP (5 µg)	NP (10 µg)	KatNP (5 µg)	KatNP (10 µg)	anti-ICAM- 1/KatNP (5 µg)	anti-ICAM- 1/KatNP (10 µg)
6 SAAT İNKÜBASYON									
1,1 mM H₂O₂	958.76 ±25.76	887.80 ±34.06	817.90 ±23.43	912.56 ±51.67	1033.22 ±23.22	470.128 ±14.33	278.61 ±8.23	216.86 ±7.51	114.35 ±2.09
1,2 mM H₂O₂	1178.93 ±50.11	1020.35 ±27.06	887.83 ±22.87	1025.32 ±85.23	1094.69 ±36.96	720.38 ±19.07	387.02 ±3.83	258.00 ±14.20	128.25 ±5.10
24 SAAT İNKÜBASYON									
1,1 mM H₂O₂	1178.93 ±50.11	990.53 ±57.90	795.83 ±22.98	1110.53 ±45.05	1120.65 ±45.45	457.95 ±8.96	239.68 ±8.34	215.29 ±4.94	111.39 ±2.19
1,2 mM H₂O₂	1445.53 ±42.81	1138.59 ±52.81	897.81 ±37.32	1461.96 ±25.85	1424.22 ±49.43	605.22 ±29.29	340.72 ±8.52	140.94 ±4.14	117.17 ±2.86

Çizelge 4.5. Hücrelerdeki MDA düzeyi ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein),n=6

	Hücre (kontrol grup)	Serbest Katalaz (0,06 μg)	Serbest Katalaz (0,12 μg)	NP (5 μg)	NP (10 μg)	KatNP (5 μg)	KatNP (10 μg)	anti-ICAM-1/KatNP (5 μg)	anti-ICAM-1/KatNP (10 μg)
6 SAAT İNKÜBASYON									
1,1 mM H₂O₂	2.39 ± 0.05	2.29 ± 0.04	2.12 ± 0.04	2.39 ± 0.03	2.39 ± 0.04	1.78 ± 0.04	1.34 ± 0.05	0.94 ± 0.02	0.86 ± 0.01
1,2 mM H₂O₂	2.89 ± 0.06	2.53 ± 0.05	2.34 ± 0.03	2.78 ± 0.08	2.91 ± 0.06	2.03 ± 0.02	1.38 ± 0.07	1.20 ± 0.05	1.01 ± 0.04
24 SAAT İNKÜBASYON									
1,1 mM H₂O₂	2.44 ± 2.86	2.37 ± 0.04	1.98 ± 0.06	2.28 ± 0.02	2.31 ± 0.10	1.75 ± 0.03	1.26 ± 0.02	0.86 ± 0.01	0.82 ± 0.00
1,2 mM H₂O₂	3.39 ± 0.04	3.24 ± 0.03	2.03 ± 0.03	2.78 ± 0.11	2.89 ± 0.06	1.92 ± 0.02	1.23 ± 0.02	0.92 ± 0.02	1.06 ± 0.05



Şekil 4.22. Katalaz ve nanopartikül formülasyonlarının H_2O_2 ile indüklenmiş oksidatif stres sonrası LDH aktivite düzeyleri.



Şekil 4.23. Katalaz ve nanopartikül formülasyonlarının H_2O_2 ile indüklenmiş oksidatif stres sonrası MDA düzeyleri.

5.SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında vasküler oksidatif strese karşı endotele yönlendirilmiş terapötik enzim taşıyıcı nanotaşıyıcıların geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaca yönelik olarak, sentezlenen PLGA-b-PEG kopolimerinden katalaz yüklü nanopartiküller çift emülsiyon yöntemi ile hazırlanmıştır ve bu nanopartiküller anti-ICAM-1 antikoruna ile konjuge edilerek endotel hücrelerine hedeflenmeleri sağlanmıştır.

PLGA-b-PEG kopolimerinin sentezinde literatürde bahsedilen düşük verim oranlarının üzerine çıkılmış ve üretim verimi % 92 olarak bulunmuştur. Hazırlanan PLGA-b-PEG-COOH polimerinin ¹H-NMR ve FT-IR analizleri yapılarak, başarı ile sentezlendiği gösterilmiştir.

210 ile 230 nm boyutlarında elde edilen nanopartiküllerin boyut dağılımları monodispers sistemlere yakın bulunurken, zeta potansiyellerinin (-38mV ve üzerinde) kararlı süspansiyonlar elde etmek için uygun olduğu görülmüştür. 210 ile 230 nm boyuta ve küresel simetriye sahip bu sistemin endotel hücreler tarafından alınımının hızlı olacağı sonucuna varılmıştır.

Katalaz yüklü nanopartiküllerin, BSA'nın stabilizatör etkisi ile mg nanopartikül başına 46 U enzim aktivitesine sahip olduğu ve bu sistemin proteolitik enzim ortamında katalaz aktivitesini % 40 civarında koruyarak, in-vivo'da terapötik etkiye sahip olacağı düşünülmektedir.

Nanopartiküllerin hücre içine geçişinin 30 dakikada başladığı ve inkübasyon süresince arttığı sonucuna varılmıştır. NP'lerin endositoz aracılığı ile hücre içine geçtikleri düşünülmekle birlikte mekanizmanın aydınlatılması için daha detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır. Ayrıca nanopartikülleri, endotel hücrelere anti-ICAM-1 ile hedeflendirmenin hücre geçişinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir.

Katalaz yüklü nanopartiküllerin oksidatif strese karşı önemli derecede etkilerinin olduğu biyokimyasal bulgular ile kanıtlanmış olup anti-ICAM-1 ile hedeflendirmenin daha etkin olduğu ispatlanmıştır.

Sonuç olarak hazırlanan anti-ICAM-1/katalaz yüklü PLGA-b-PEG nanopartiküllerinin oksidatif stresin sebep olduğu kardiyovasküler rahatsızlıklar için umut verici nanosistemler olduğu görülmüştür.

İleriye yönelik olarak bu sistemin, farklı antioksidan ve farklı antikorlarla geliştirilerek kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde kullanılması için araştırılması planlanmıştır.

KAYNAKLAR

1. Touyz, R.M., *Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance?* Hypertension, 2004. **44**(3): p. 248-52.
2. Clempus, R.E. and K.K. Griendling, *Reactive oxygen species signaling in vascular smooth muscle cells.* Cardiovasc Res, 2006. **71**(2): p. 216-25.
3. Demircan, G., Diraman, E., Demircan, S. *Kalp hastalıklarında oksidatif stresin rolü.* 2005; Available from: http://www.tkd.org.tr/pages.asp?pg=:dergi/dergi_content&plng=tur&id=1387&dosa=137.
4. Cai, H. and D.G. Harrison, *Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress.* Circ Res, 2000. **87**(10): p. 840-4.
5. Muzykantov, V.R., *Targeting of superoxide dismutase and catalase to vascular endothelium.* J Control Release, 2001. **71**(1): p. 1-21.
6. Pueyo, M.E., et al., *Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor-kappaB activation induced by intracellular oxidative stress.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(3): p. 645-51.
7. Zafari, A.M., et al., *Role of NADH/NADPH oxidase-derived H₂O₂ in angiotensin II-induced vascular hypertrophy.* Hypertension, 1998. **32**(3): p. 488-95.
8. Muro, S., et al., *ICAM-1 recycling in endothelial cells: a novel pathway for sustained intracellular delivery and prolonged effects of drugs.* Blood, 2005. **105**(2): p. 650-8.
9. Schulz, J.B., et al., *Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration.* Eur J Biochem, 2000. **267**(16): p. 4904-11.
10. Loew, O., *A New Enzyme of General Occurrence in Organisms.* Science, 1900. **11**(279): p. 701-2.
11. Soppimath, K., et al., *Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices.* Journal of controlled release, 2001. **70**(1-2): p. 1-20.
12. Frijns, C. and L. Kappelle, *Inflammatory cell adhesion molecules in ischemic cerebrovascular disease.* Stroke, 2002. **33**(8): p. 2115.
13. Muro, S., et al., *Slow intracellular trafficking of catalase nanoparticles targeted to ICAM-1 protects endothelial cells from oxidative stress.* Am J Physiol Cell Physiol, 2003. **285**(5): p. C1339-47.
14. Sakharov, D.V., et al., *Protection of cultured endothelial cells from hydrogen peroxide-induced injury by antibody-conjugated catalase.* Biochim Biophys Acta, 1987. **930**(2): p. 140-4.
15. Farokhzad, O. and R. Langer, *Nanomedicine: developing smarter therapeutic and diagnostic modalities.* Advanced drug delivery reviews, 2006. **58**(14): p. 1456-1459.
16. Wang, M.D., et al., *Nanotechnology for targeted cancer therapy.* Expert review of anticancer therapy, 2007. **7**(6): p. 833-837.
17. Groneberg, D.A., et al., *Nanoparticle-based diagnosis and therapy.* Current Drug Targets, 2006. **7**(6): p. 643-648.
18. Jain, K.K., *Nanotechnology in clinical laboratory diagnostics.* Clinica Chimica Acta, 2005. **358**(1-2): p. 37-54.

19. Sumer, B. and J. Gao, *Theranostic nanomedicine for cancer*. *Nanomedicine*, 2008. **3**(2): p. 137-140.
20. Moghimi, S., A. Hunter, and J. Murray, *Nanomedicine: current status and future prospects*. *The FASEB Journal*, 2005. **19**(3): p. 311.
21. Avgoustakis, K., *Pegylated poly(lactide) and poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: preparation, properties and possible applications in drug delivery*. *Curr Drug Deliv*, 2004. **1**(4): p. 321-33.
22. Suri, S.S., H. Fenniri, and B. Singh, *Nanotechnology-based drug delivery systems*. *J Occup Med Toxicol*, 2007. **2**: p. 16.
23. Sweitzer, T.D., et al., *PECAM-directed immunotargeting of catalase: specific, rapid and transient protection against hydrogen peroxide*. *Free Radic Biol Med*, 2003. **34**(8): p. 1035-46.
24. Gref, R., et al., *The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1995. **16**(2-3): p. 215-233.
25. Douglas, S., S. Davis, and L. Illum, *Nanoparticles in drug delivery*. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*, 1987. **3**(3): p. 233.
26. Harashima, H., et al., *Enhanced hepatic uptake of liposomes through complement activation depending on the size of liposomes*. *Pharmaceutical research*, 1994. **11**(3): p. 402-406.
27. Devine, D.V., et al., *Liposome--complement interactions in rat serum: implications for liposome survival studies*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1994. **1191**(1): p. 43-51.
28. Moghimi, S., et al., *An investigation of the filtration capacity and the fate of large filtered sterically-stabilized microspheres in rat spleen*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1993. **1157**(2): p. 233-240.
29. Ranade, V., *Drug delivery systems. 1. site-specific drug delivery using liposomes as carriers*. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 1989. **29**(8): p. 685.
30. Torchilin, V., *Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers*. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2005. **4**(2): p. 145-160.
31. Kawasaki, E. and A. Player, *Nanotechnology, nanomedicine, and the development of new, effective therapies for cancer*. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2005. **1**(2): p. 101-109.
32. Yang, C., et al., *Oxaliplatin long-circulating liposomes improved therapeutic index of colorectal carcinoma*. *BMC biotechnology*, 2011. **11**(1): p. 21.
33. Rawat, M., D. Singh, and S. Saraf, *Nanocarriers: promising vehicle for bioactive drugs*. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 2006. **29**(9): p. 1790-1798.
34. Baba, K., et al., *New method for delivering a hydrophobic drug for photodynamic therapy using pure nanocrystal form of the drug*. *Molecular pharmaceutics*, 2007. **4**(2): p. 289-297.
35. Boas, U. and P.M. Heegaard, *Dendrimers in drug research*. *Chem Soc Rev*, 2004. **33**(1): p. 43-63.
36. Majoros, I.J., et al., *Poly (amidoamine) dendrimer-based multifunctional engineered nanodevice for cancer therapy*. *Journal of medicinal chemistry*, 2005. **48**(19): p. 5892-5899.

37. Khandare, J., et al., *Synthesis, cellular transport, and activity of polyamidoamine dendrimer-methylprednisolone conjugates*. *Bioconjugate chemistry*, 2005. **16**(2): p. 330-337.
38. Tomalia, D.A., et al., *A new class of polymers: starburst-dendritic macromolecules*. *Polymer Journal*, 1985. **17**(1): p. 117-132.
39. Svenson, S. and D.A. Tomalia, *Dendrimers in biomedical applications--reflections on the field*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2005. **57**(15): p. 2106-2129.
40. Aulenta, F., W. Hayes, and S. Rannard, *Dendrimers: a new class of nanoscopic containers and delivery devices*. *European Polymer Journal*, 2003. **39**(9): p. 1741-1771.
41. Caminade, A.M., R. Laurent, and J.P. Majoral, *Characterization of dendrimers*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2005. **57**(15): p. 2130-2146.
42. D'Emanuele, A. and D. Attwood, *Dendrimer-drug interactions*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2005. **57**(15): p. 2147-2162.
43. Lee, C.C., et al., *Designing dendrimers for biological applications*. *Nature biotechnology*, 2005. **23**(12): p. 1517-1526.
44. Gillies, E.R. and J.M.J. Frechet, *Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery*. *Drug Discovery Today*, 2005. **10**(1): p. 35-43.
45. Duncan, R. and L. Izzo, *Dendrimer biocompatibility and toxicity*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2005. **57**(15): p. 2215-2237.
46. Wiwattanapatapee, R., et al., *Anionic PAMAM dendrimers rapidly cross adult rat intestine in vitro: A potential oral delivery system?* *Pharmaceutical research*, 2000. **17**(8): p. 991-998.
47. Henck, J.O. and S.R. Byrn, *Designing a molecular delivery system within a preclinical timeframe*. *Drug Discovery Today*, 2007. **12**(5-6): p. 189-199.
48. Zhuo, R.X., B. Du, and Z.R. Lu, *In vitro release of 5-fluorouracil with cyclic core dendritic polymer*. *Journal of controlled release*, 1999. **57**(3): p. 249-257.
49. Kojima, C., et al., *Synthesis of polyamidoamine dendrimers having poly (ethylene glycol) grafts and their ability to encapsulate anticancer drugs*. *Bioconjugate Chemistry*, 2000. **11**(6): p. 910-917.
50. Kroto, H.W., et al., *C-60 - Buckminsterfullerene*. *Nature*, 1985. **318**(6042): p. 162-163.
51. Richard Booker, E.B., *Nanotechnology for Dummies*. 2005: Wiley Publishing, Inc.
52. Erkoç, Ş., *Nanobilim ve Nanoteknoloji*. 2007, Ankara: ODTU yayıncılık.
53. Zakharian, T.Y., et al., *A fullerene-paclitaxel chemotherapeutic: synthesis, characterization, and study of biological activity in tissue culture*. *Journal of the American Chemical Society*, 2005. **127**(36): p. 12508-12509.
54. Friedman, S.H., et al., *Inhibition of the HIV-1 protease by fullerene derivatives: model building studies and experimental verification*. *Journal of the American Chemical Society*, 1993. **115**(15): p. 6506-6509.
55. Gonzalez, K.A., et al., *Synthesis and In vitro characterization of a tissue-Selective fullerene: vectoring C60 (OH) 16AMBP to mineralized bone*. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 2002. **10**(6): p. 1991-1997.
56. Dugan, L., et al., *Fullerene-based antioxidants and neurodegenerative disorders*. *Parkinsonism & Related Disorders*, 2001. **7**(3): p. 243-246.

57. Cai, D., et al., *Highly efficient molecular delivery into mammalian cells using carbon nanotube spearing*. Nature Methods, 2005. **2**(6): p. 449-454.
58. Bhirde, A.A., et al., *Targeted killing of cancer cells in vivo and in vitro with EGF-directed carbon nanotube-based drug delivery*. ACS nano, 2009. **3**(2): p. 307-316.
59. Park, J. and J. Bronzino, *Biomaterials: principles and applications*. 2003: CRC press Boca Raton, FL.
60. Ikada, Y. and H. Tsuji, *Biodegradable polyesters for medical and ecological applications*. Macromolecular Rapid Communications, 2000. **21**(3): p. 117-132.
61. Semete, B., et al., *In vivo evaluation of the biodistribution and safety of PLGA nanoparticles as drug delivery systems*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2010.
62. Pamujula, S., et al., *Radioprotection in mice following oral administration of WR-1065/PLGA nanoparticles*. International Journal of Radiation Biology, 2008. **84**(11): p. 900-908.
63. Christofidou-Solomidou, M., et al., *PECAM-directed delivery of catalase to endothelium protects against pulmonary vascular oxidative stress*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003. **285**(2): p. L283-92.
64. Beletsi, A., et al., *Effect of preparative variables on the properties of poly (dl-lactide-co-glycolide)-methoxypoly (ethyleneglycol) copolymers related to their application in controlled drug delivery*. International journal of pharmaceutics, 1999. **182**(2): p. 187-197.
65. Kissel, T., Y. Li, and F. Unger, *ABA-triblock copolymers from biodegradable polyester A-blocks and hydrophilic poly (ethylene oxide) B-blocks as a candidate for in situ forming hydrogel delivery systems for proteins*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2002. **54**(1): p. 99-134.
66. Jeong, B., Y.H. Bae, and S.W. Kim, *Drug release from biodegradable injectable thermosensitive hydrogel of PEG-PLGA-PEG triblock copolymers*. Journal of controlled release, 2000. **63**(1-2): p. 155-163.
67. Bae, Y.H., et al., *Biodegradable amphiphilic multiblock copolymers and their implications for biomedical applications*. Journal of controlled release, 2000. **64**(1-3): p. 3-13.
68. Breitenbach, A., Y.X. Li, and T. Kissel, *Branched biodegradable polyesters for parenteral drug delivery systems*. Journal of controlled release, 2000. **64**(1-3): p. 167-178.
69. Torchilin, V., *Multifunctional pharmaceutical nanocarriers*. Vol. 4. 2008: Springer Verlag.
70. De Villiers, M.M., P. Aramwit, and G.S. Kwon, *Nanotechnology in drug delivery*. 2008: Springer Verlag.
71. Sheng, Y., et al., *Long-circulating polymeric nanoparticles bearing a combinatorial coating of PEG and water-soluble chitosan*. Biomaterials, 2009. **30**(12): p. 2340-2348.
72. Gaucher, G., et al., *Effect of poly (N-vinyl-pyrrolidone)-block-poly (D, L-lactide) as coating agent on the opsonization, phagocytosis, and pharmacokinetics of biodegradable nanoparticles*. Biomacromolecules, 2009. **10**(2): p. 408-416.

73. Kim, S., et al., *Engineered polymers for advanced drug delivery*. European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV, 2009. **71**(3): p. 420.
74. Boghaert, E.R., et al., *Tumoricidal effect of calicheamicin immuno-conjugates using a passive targeting strategy*. International journal of oncology, 2006. **28**(3): p. 675-684.
75. Ye, J., et al., *Injectable actarit-loaded solid lipid nanoparticles as passive targeting therapeutic agents for rheumatoid arthritis*. International journal of pharmaceutics, 2008. **352**(1-2): p. 273-279.
76. Kabanov, A., et al., *The neuroleptic activity of haloperidol increases after its solubilization in surfactant micelles:: Micelles as microcontainers for drug targeting*. FEBS letters, 1989. **258**(2): p. 343-345.
77. Zhang, N., et al., *PLGA Nanoparticle- Peptide Conjugate Effectively Targets Intercellular Cell-Adhesion Molecule-1*. Bioconjugate chemistry, 2007. **19**(1): p. 145-152.
78. Muzykantov, V.R., et al., *Immunotargeting of antioxidant enzyme to the pulmonary endothelium*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996. **93**(11): p. 5213.
79. Pinto Reis, C., et al., *Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2006. **2**(1): p. 8-21.
80. Jain, R., *The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly (lactide-co-glycolide)(PLGA) devices*. Biomaterials, 2000. **21**(23): p. 2475-2490.
81. Torchilin, V.P., *Nanoparticulates as drug carriers*. 2006: Imperial College Pr.
82. Delbosc, S., et al., *Involvement of oxidative stress and NADPH oxidase activation in the development of cardiovascular complications in a model of insulin resistance, the fructose-fed rat*. Atherosclerosis, 2005. **179**(1): p. 43-49.
83. Oyama, Y., et al., *Ginkgo biloba extract protects brain neurons against oxidative stress induced by hydrogen peroxide*. Brain research, 1996. **712**(2): p. 349-352.
84. Marks, D., A. Marks, and C. Smith, *Basic medical biochemistry: a clinical approach*. 1996: Williams & Wilkins, Baltimore.
85. Şener, G., Yeğen, B.Ç., *İskemi reperfüzyon hasarı*. Klinik Gelişim, 2009. **22**(3).
86. Atochina, E.N., et al., *Immunotargeting of catalase to ACE or ICAM-1 protects perfused rat lungs against oxidative stress*. Am J Physiol, 1998. **275**(4 Pt 1): p. L806-17.
87. Muzykantov, V.R., *Conjugation of catalase to a carrier antibody via a streptavidin-biotin cross-linker*. Biotechnol Appl Biochem, 1997. **26 (Pt 2)**: p. 103-9.
88. Dziubla, T.D., et al., *Endothelial targeting of semi-permeable polymer nanocarriers for enzyme therapies*. Biomaterials, 2008. **29**(2): p. 215-227.
89. Chorny, M., et al., *Endothelial delivery of antioxidant enzymes loaded into non-polymeric magnetic nanoparticles*. Journal of Controlled Release, 2010. **146**(1): p. 144-151.
90. Zamocky, M. and F. Koller, *Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis*. Prog Biophys Mol Biol, 1999. **72**(1): p. 19-66.
91. Boon, E.M., A. Downs, and D. Marcey. *Catalase: H2O2, H2O2 Oxidoreductase*

- 2010 07/10/2010]; Available from:
http://www.callutheran.edu/Academic_Programs/Departments/BioDev/omm/catalog/cat1.htm.
92. Cheng, J., et al., *Formulation of functionalized PLGA-PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery*. *Biomaterials*, 2007. **28**(5): p. 869-876.
 93. Dziubla, T.D., A. Karim, and V.R. Muzykantov, *Polymer nanocarriers protecting active enzyme cargo against proteolysis*. *J Control Release*, 2005. **102**(2): p. 427-39.
 94. Malvern Instruments Ltd. Technology, Malvern.; Available from:
<http://www.malvern.com/>.
 95. Beers, R.F. and I.W. Sizer, *A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase*. *Journal of Biological Chemistry*, 1952. **195**(1): p. 133.
 96. Halliwell, B. and J.M.C. Gutteridge, *Free radicals in biology and medicine*. Vol. 137. 1989: Clarendon Press Oxford.
 97. Ryter, S.W., et al., *Mechanisms of cell death in oxidative stress*. *Antioxidants & redox signaling*, 2007. **9**(1): p. 49-89.
 98. Little, R.E. and B.C. Gladen, *Levels of lipid peroxides in uncomplicated pregnancy: a review of the literature*. *Reproductive toxicology* (Elmsford, NY), 1999. **13**(5): p. 347.
 99. Urso, M.L. and P.M. Clarkson, *Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation*. *Toxicology*, 2003. **189**(1-2): p. 41-54.
 100. Friess, W. and M. Schlapp, *Sterilization of gentamicin containing collagen/PLGA microparticle composites*. *Eur J Pharm Biopharm*, 2006. **63**(2): p. 176-87.
 101. Mohanraj, V. and Y. Chen, *Nanoparticles-a review*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2007. **5**(1): p. 561-573.
 102. Nishikawa, M., M. Hashida, and Y. Takakura, *Catalase delivery for inhibiting ROS-mediated tissue injury and tumor metastasis*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2009. **61**(4): p. 319-326.
 103. Simone, E.A., et al., *Loading PEG-catalase into filamentous and spherical polymer nanocarriers*. *Pharm Res*, 2009. **26**(1): p. 250-60.
 104. Giovagnoli, S., et al., *Biodegradable microspheres as carriers for native superoxide dismutase and catalase delivery*. *AAPS PharmSciTech*, 2004. **5**(4): p. 1-9.
 105. Jurgen-Lohmann, D.L. and R.L. Legge, *Immobilization of bovine catalase in sol-gels*. *Enzyme and microbial technology*, 2006. **39**(4): p. 626-633.
 106. Simone, E.A., et al., *Filamentous polymer nanocarriers of tunable stiffness that encapsulate the therapeutic enzyme catalase*. *Biomacromolecules*, 2009. **10**(6): p. 1324-30.
 107. Sánchez, A., et al., *Biodegradable micro-and nanoparticles as long-term delivery vehicles for interferon-alpha*. *European journal of pharmaceutical sciences*, 2003. **18**(3-4): p. 221-229.
 108. Dziubla, T.D., A. Karim, and V.R. Muzykantov, *Polymer nanocarriers protecting active enzyme cargo against proteolysis*. *Journal of controlled release*, 2005. **102**(2): p. 427-439.

109. Xu, P., et al., *Intracellular drug delivery by poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles, revisited*. Mol Pharm, 2009. **6**(1): p. 190-201.
110. Schipper, H.M., *Brain iron deposition and the free radical-mitochondrial theory of ageing*. Ageing research reviews, 2004. **3**(3): p. 265-301.
111. Barbouti, A., et al., *Intracellular iron, but not copper, plays a critical role in hydrogen peroxide-induced DNA damage*. Free Radical Biology and Medicine, 2001. **31**(4): p. 490-498.
112. Gros, L., A.A. Ishchenko, and M. Saporbaev, *Enzymology of repair of etheno-adducts*. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2003. **531**(1-2): p. 219-229.
113. Reiter, R.J., *Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin*. Progress in neurobiology, 1998. **56**(3): p. 359-384.
114. Spencer, J., et al., *Epicatechin and its in vivo metabolite, 3'-O-methyl epicatechin, protect human fibroblasts from oxidative-stress-induced cell death involving caspase-3 activation*. Biochemical Journal, 2001. **354**(Pt 3): p. 493.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ece SARI
Doğum Yeri : Uşak
Doğum Yılı : 1986
Medeni Hali : Bekar
Elektronik Posta: ecesari@gmail.com

Eğitim ve Akademik Durumu:

Lise : İzmir Fen Lisesi (2001-2004)
Lisans: Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (2004 – 2008)

Yabancı Dil: İngilizce

İş Tecrübesi:

2008 - : Araştırma Görevlisi, Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi,
Eczacılık Temel Bilimleri Anabilim Dalı