

**ATEROSKLEROTİK PLAKLARIN TEŞHİS VE
TEDAVİSİNDE KULLANILMAK ÜZERE BİYOKİMYASAL
OLARAK MODİFİYE EDİLMİŞ NANOPLATFORMLARIN
HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU**

**PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF
BIOCHEMICALLY MODIFIED NANOPLATFORMS USED IN
ATHEROSCLEROTIC PLAQUE DIAGNOSIS AND
THERAPY**

DOĞA KAVAZ

Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Kimya Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

DOKTORA TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2013

Doğa KAVAZ'ın hazırladığı " Aterosklerotik plakların teğhis ve tedavisinde kullanılmak üzere biyokimyasal olarak modifiye edilmiğ nanoplatformların hazırlanması ve karakterizasyonu" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından KİMYA ANABİLİM DALI'nda DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan

Doç. Dr. Nuray YAZIHAN

Danışman

Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ

Üye

Doç. Dr. Handan YAVUZ

Üye

Doç. Dr. Lokman UZUN

Üye

Doç. Dr. Mustafa TÜRK

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **DOKTORA TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ

Fen Bilimleri Enstitü Müdürü

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak yazdığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde her hangi bir tahrifat yapmadığımı
- ve bu tezin her hangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

06/08/2013

Doğa Kavaz

ÖZET

ATEROSKLEROTİK PLAKLARIN TEŞHİS VE TEDAVİSİNDE KULLANILMAK ÜZERE BİYOKİMYASAL OLARAK MODİFİYE EDİLMİŞ NANOPLATFORMLARIN HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU

DOĞA KAVAZ

Doktora, Kimya Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ

Ağustos 2013, 186 Sayfa

Kardiyovasküler sistem rahatsızlıkları gerek ülkemizde ve gerekse tüm dünyada ölümlerle sonuçlanabilen rahatsızlıkların başında gelmektedir. Söz konusu rahatsızlıkların değişik epidemiyolojik nedenlerden dolayı önümüzdeki yıllarda görülme sıklığının daha da artması beklenmektedir. Ateroskleroz bu rahatsızlıkların en önemlisi olup oluşan aterosklerotik plakların erken teşhisi, tedavi etkinliği ve ölüm riski açısından büyük bir önem taşımaktadır. Son yıllarda konu ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda, manyetik rezonans görüntüleme (MRG) damarlarının anatomik ve fonksiyonel incelemelerinde önemli bir rol oynamaktadır. Bu çalışmalarda geleneksel MRG kontrast ajanları yerine, toksik olmayan ve biyolojik olarak uyumlu demir oksit nanopartikülleri klinikte kullanılmaya başlanmıştır. Ancak, bu ajanların dokular tarafından tutulumu seçimli olmayıp *in*

vivo olarak görüntülenmek istenen plaklar için uygun değildir. Bu yüzden biyouyumlu polimerik malzemeler (örneğin; dekstran, kitosan vb gibi) kullanılarak, demir oksit nanopartiküller modifiye edilmekte ve *in vivo* uygulamalarda kullanılabilir. Kullanılan biyopolimerlerin değişik fonksiyonel gruplarının olması sayesinde çeşitli ligandlarla donatılarak görüntülenmek istenilen bölgeleri tanıma yeteneğine sahip olan nanopartiküller geliştirebilmektedir.

Sunulan tez kapsamında; kardiyovasküler sistem rahatsızlıklarından, aterosklerozun teşhis ve tedavisinde kullanılmak üzere manyetik özelliklere sahip nanoplatformların geliştirilmesi ve bu platformlarda kullanılmak üzere aterosklerotik plak bölgelerini tanıyan ligand moleküllerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaca ulaşmak üzere demir oksit nanopartiküller, manyetik özelliğe sahip poliester yapısındaki polihidroksibütirat (PHB) ile polisakkarit yapısındaki karboksimetil kitosan (CMCs) karışımı ile oluşturulan PHB/CMCs, poliester yapısındaki polihidroksibütirat ile polisakkarit yapısındaki kitosan karışımı ile oluşturulan PHB/Kitosan (PHB/Cs) nanopartiküller ve dekstran nanopartiküller hazırlanmıştır. Hazırlanan nanopartiküllerin boyutları Zeta Sizer sistemi kullanılarak karakterize edilmiş ve boyut dağılımına etki eden parametreler incelenmiştir. Nanopartiküllerin morfolojik özellikleri SEM ve AFM görüntüleme sistemleri yardımıyla manyetik özellikleri ise titreşimli manyetometre (VSM) kullanılarak belirlenmiştir. Hazırlanan nanoplatformların kardiyovasküler sistem rahatsızlıkları teşhis ve tedavisinde kullanabilmek üzere nanoplatformların yüzeyine model ligand olarak seçilen IgG 1, Anneksin A5 ve A1 liganları biyokimyasal yöntemlerle kovalent olarak takılmıştır. Hem hazırlanan nanopartiküllerin hem de ligand takılı formlarının sitotoksisiteleri incelenmiştir.

Çalışmaların ikinci bölümünde ise hazırlanan ligand takılı nanoplatformlarla *in vivo* çalışmalar gerçekleştirilmiş ve kullanılan Wistar albino ırkı sıçanların MRG görüntüleri incelenmiştir. MRG işlemlerinden sonra sistemik dolaşım içerisinde dolaşan ligand takılı nanoplatformların vücutta değişik organlara dağılımı ve bu organlarda meydana gelen biyokimyasal etkileşimleri biyokimyasal ve histolojik testlerle değerlendirilmiştir.

Tez çalışmalarının son bölümünde ise, aterosklerotik plak bölgelerine nanoplatformları seçimli/hedefli olarak ulaştırabilmek üzere ihtiyaç duyulan ve

aterosklerozun başlangıcında yer alan köpük hücrelerinin yüzey reseptörlerinin belirlenmesi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla ticari olarak temin edilen düşük yoğunluklu lipoprotein, bakır sülfat çözeltisi ile oksitlenerek, THP-1 insan monosit hücrelerinin farklılaşması sonucu oluşan makrofaj hücreleri ile etkileştirilerek köpük hücreleri oluşturulmuş daha sonra elde edilen köpük hücrelerinin yüzey reseptörleri/proteinleri MALDI-ToF tekniği yardımıyla belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre söz konusu reseptörlerin belirlenmesiyle bunlara uygun ligandların belirlenmesi ve ardından hazırlanan nanoplatformların bu ligandlarla dekore edilmesiyle kişiye özel teşhis ve tedavi sistemlerinin geliştirilmesi için gerekli alt yapı oluşturulmuştur.

Yapılan bu çalışma, 110S181 no'lu "Kardiyovasküler Sistem Rahatsızlıklarının Teşhis ve Tedavisinde Nanoteknolojik Yaklaşımlar" adlı TÜBİTAK Ar-Ge Projesi desteğiyle hazırlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kardiyovasküler sistem, manyetik nanoplatformlar, manyetik rezonans görüntüleme (MRG), okside-LDL, köpük hücreler, reseptör, MALDI-ToF-MS

ABSTRACT

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF BIOCHEMICALLY MODIFIED NANOPLATFORMS USED IN ATHEROSCLEROTIC PLAQUE DIAGNOSIS AND THERAPY

DOĞA KAVAZ

Doctor of Philosophy, Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ

August 2013, 186 Pages

Cardiovascular diseases are some of the leading causes of death all over the world, and the prevalence is expected to increase further during the next years. For early detection of atherosclerotic unstable plaques will be a great value in order to reduce the morbidity / mortality level in affected patients. With the developing technology nanomaterials aimed to develop to be used in the early diagnosis of atherosclerosis. In recent studies, magnetic resonance imaging (MRI) plays an important role in the anatomical and functional investigation of large vessels. Instead of conventional MRI contrast agents, non-toxic and biocompatible iron oxide nanoparticles have been started to use in the clinic. However, the uptake of these agents are nonspecific, so the labeling efficiency for plaques *in vivo* is not ideal. Iron oxide nanoparticles are modified with biocompatible polymeric materials such as dextran, chitosan, etc., and used *in vivo* applications. Biopolymers with different functional groups featured with a variety of ligands can be used developing nanoparticles that are capable of recognizing the desired areas.

In the thesis, development of magnetic biopolymeric nanoplatfoms were aimed to be used in the diagnosis and treatment of atherosclerosis. To achieve this aim; iron oxide nanoparticles, magnetic poly hydroxybutarate- carboxymethyl chitosan (PHB/CMCs), PHB/Cs (Chitosan) and dextran nanoparticles were prepared. The parameters that affect the size distribution of the prepared nanoparticles were investigated and size analyses were carried out using Zeta Sizer systems. Scanning electron microscope (SEM) and atomic force microscope (AFM) were used for morphological evaluations. Vibrational scanning microscope was used for the investigation of magnetic properties. Annexin A5, Annexin A1 and IgG 1 were covalently attached to the prepared nanoplatfoms as model ligands for diagnosis and treatment of cardiovascular system diseases. Cytotoxicity assays evaluated for both plain nanoparticles and ligand attached forms.

In the second part of the study, annexin A5 and IgG 1 attached PHB/CMCs nanoplatfoms have been tested *in vivo*. Wistar albino type rats were used for MRI imaging. After MR imaging, ligand attached nanoplatfoms, which were circulated in the systemic circulation, examined biochemically and histologically.

In the final part of thesis, the foam cells in the damaged area of the plaque were investigated to determine the surface receptors. For this purpose a commercially provided low density protein (LDL) was oxidized by copper sulfate solution. Macrophages which were differentiated from THP-1 Human monocytes, treated with oxidized LDL to form foam cells. Surface proteins derived from foam cells were determined using MALDI -ToF- mass spectroscopy system.

This work is supported by TÜBİTAK Project, named as “Nanotechnological Approaches in Cardiovascular System Diseases Diagnosis and Therapy” with the code number 110S181.

Keywords: Cardiovascular systems, magnetic nanoplatfoms, magnetic resonans imaging (MRI), oxidized- LDL, foam cells, receptor, MALDI -ToF- MS

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve doktora eğitimim süresince, bilgi, birikim ve tecrübelerinden yararlandığım, her zaman beni destekleyen ve yol gösteren çok değerli hocam Prof. Dr. Emir Baki Denkbaş'a ve ailemden uzakta yaşamama rağmen beni her ortamda aile sevgisini yaşatan ve yakınlıklarını eksik etmeyen sevgili ailesine;

Çalışmalarım süresince sahip olduğu bilgi, deneyim ve imkanları benimle paylaşarak desteğini esirgemeyen, laboratuvar imkanlarını sağlayan sayın hocam Doç. Dr. Nuray Yazıhan'a;

Tez çalışmalarımın en sıkıntı anında bana laboratuvarını açan, çalışmalarımda destek olan, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım sayın hocam Prof. Dr. Bekir Salih'e;

Bilgi ve birikimlerini benimle paylaşan çok değerli hocalarım sayın Doç. Dr. Mustafa Türk'e, Doç. Dr. Handan Yavuz'a, Doç. Dr. Lokman Uzun'a;

Tez çalışmam sırasında yardımlarından ve desteklerinden dolayı Doç. Dr. Ömür Çelikbıçak, Mehmet Atakay ve Mehmet Kayılı'ya;

Tezimin yazımındaki zorlu adımlarda yardımcı olan ve ihtiyacım olduğunda yanımda olan, espirileriyle bizleri motive eden sevgili arkadaşım Cem Bayram'a;

Sorunlarımda hep çözüm yolları arayan, deneylerimde yardımcı olmak için kendini parçalayan sevgili abim Dr. Murat Demirbilek ve eşi Dr. Melike Demirbilek'e;

Çalışmalarım boyunca bana sabırla destek olan çok sevgili çalışma arkadaşlarım Ebru Erdal, Damla Türkay ve Ceyda Ateş'e,

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum ve çalışma ortamımızı eğlenceli kılmalarından dolayı, sevgili Biyopolimerik Sistemler Araştırma Grubu üyeleri; Yrd. Doç. Dr. Ebru Kılıçay, Tamer Çırak, Tayfun Vural, Eda Yalçın, Zeynep Karahaliloğlu, Sema Tuncer, Göknur Kara, Betül Pala, Ekin Çelik, Gökçe Bozokalfa, Burcu Cengiz, Kübra Kıcır'a,

Arkadaşlıkları ve destekleri için çalışma arkadaşlarım, Yrd. Doç. Dr. Memed Duman, Doç. Dr. Halil Murat Aydın, Dr. Sedat Odabaş, Merve Gültekinoglu, Demet Çatçat, Didem Aksoy Körpe, Sühelyl Malekghasemi'ye;

İyi ve kötü günde hep benim yanımda olan ve destekleyen canım arkadaşlarım; Özge Sezgin, Ezgi Kadayıfçı, Dr. Feyza Genç Kırac, Dr. Meshude Akbulut ve Aslı Çal'a;

Sabırla doktora tezimin bitmesini bekleyen, her türlü desteğini ve varlığını hep yanımda hissettiğim İbrahim Aysal'a;

Hayatım boyunca her an yanımda olan, her alanda inanç ve sabırla bana olan desteklerini esirgemeyen canım aileme;

Sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim.....

Doğa KAVAZ

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLER.....	xv
ÇİZELGELER.....	xix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xx
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kardiyovasküler Sistem Rahatsızlıkları ve Ateroskleroz	4
2.2. Arter Duvarı	4
2.3. Ateroskleroz Patogenezi	6
2.4. İntraselüler Lipid Birikimi; Köpük Hücre Oluşumu	8
2.5. Arter İnflamasyonu.....	9
2.6. Düz Kas Hücre Migrasyonu ve Proliferasyonu.....	11
2.7. Düz Kas Hücre Ölümü	11
2.8. Lipoproteinler ve Genel Özellikleri	12
2.8.1. Şilomikron	12
2.8.2. Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein (VLDL).....	12
2.8.3. Orta Yoğunluklu Lipoprotein (IDL).....	13
2.8.4. Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein (HDL).....	13
2.8.5. Lipoprotein (a)	13
2.8.6. Düşük Yoğunluklu Lipoprotein (LDL).....	14
2.9. LDL Oksidasyonu	15
2.10. Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türleri.....	16
2.11. Reaktif Oksijen Metabolitlerinin Kaynakları.....	18
2.12. Serbest Radikallerin Organik Moleküllere Etkileri	18
2.13. Aterosklerozda Oksidatif Stresin Rolü.....	19

2.14. Aterosklerozda Okside-LDL ve Lipid İlişkisi	20
2.15. Protein Saflaştırılması ve Karakterizasyonu	22
2.15.1. Protein Karakterizasyonu	22
2.15.2. Protein Analiz Yöntemleri	23
2.15.2.1. 2D Jel Elektroforezi.....	23
2.15.2.2. Kütle Spektroskopisi	23
2.15.2.3. Matris yardımcı-Lazer Desorpsiyon/İyonlaştırma-Kütle Spektrometresi (MALDI-MS).....	24
2.16. Ateroskleroz Tedavisinde Yeni Yaklaşımlar	25
2.16.1. Nanoteknoloji ve Nanotıp	25
2.16.2. Nanopartiküller	27
2.16.3. Manyetik Nanopartiküller (MNP).....	28
2.16.3.1. Manyetik Nanopartiküllerin Kardiyovasküler Uygulamaları	31
2.17. Nanopartiküllerin Hazırlanmasında Kullanılan Biyopolimerler	32
2.17.1. Kitin	32
2.17.2. Kitosan	32
2.17.3. Karboksimetil Kitosan (CMCs)	34
2.17.4. O-Karboksimetil Kitosan (O-CMCs).....	35
2.17.5. Polihidroksibütirat (PHB)	35
2.17.6. Dekstran.....	36
2.18. Kardiyovasküler Teşhis Sistemi için Kullanılan Ligandlar	37
2.18.1. P- ve E- Selektinler.....	37
2.18.2. Vasküler Adezyon Molekülleri (VCAM-1)/İntrasellüler Adezyon Molekülleri (ICAM-1).....	38
2.18.3. Platelet Endotel Hücre Adezyon Molekülü-1	38
2.18.4. Anneksin-A1 / Anneksin-A5 Molekülleri.....	38
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	40
3.1. Kimyasallar	40
3.2. Nanoplatformların Hazırlanması ve Karakterizasyonu	41
3.2.1. Demir Nanopartiküllerin Sentezi	41
3.2.2. Manyetik PHB/CMCs Nanopartiküllerin Hazırlanması.....	42
3.2.3. Manyetik PHB/Kitosan (PHB/Cs) Nanopartiküllerin Hazırlanması.....	43
3.2.4. Manyetik Dekstran Nanopartiküllerin Hazırlanması.....	44

3.2.5. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu.....	44
3.2.5.1. Morfolojik Özelliklerin Belirlenmesi	44
3.2.5.2. Nanopartikül Boyut Analizi	45
3.2.5.3. Nanopartikül Yüzey Yükü Analizi	46
3.2.5.4. Miknatıslama Özelliklerinin Belirlenmesi.....	46
3.2.6. Biyopolimerik Nanopartiküllerin Yüzey Modifikasyonu (Ligand Takılması)	46
3.2.7. Nanopartiküllerin Sitotoksosite Çalışmaları	48
3.3. Manyetik Nanoplatformlarla Yapılan <i>In Vivo</i> Çalışmalar	49
3.3.1. Sıçanlarda Aterosklerotik Plak Oluşturulması	49
3.3.2. Sıçan Aterosklerotik Plakların MR ile Görüntülenmesi	50
3.3.3. Biyokimyasal Analizler.....	51
3.3.3.1. Kalp ve Damar Dokusunun Homojenizasyonu.....	51
3.3.3.2. Serum/doku MDA düzeyleri	52
3.3.3.3. Serum/AOPP ölçümü.....	52
3.3.3.4. Nitrit ve Nitrat tayini.....	52
3.3.3.5. Süperoksit dismutaz (SOD) Tayini.....	52
3.3.3.6. Glutatyon Tayini.....	52
3.3.4. Histopatolojik Analiz	52
3.4. Köpük Hücre Oluşum Modeli	54
3.4.1. Okside LDL'nin Elde Edilmesi	54
3.4.1.1. Okside LDL'nin Diyalizi	54
3.4.1.2. Diyaliz Torbalarının Hazırlanışı ve Diyalizin Yapılışı	54
3.4.2. Okside LDL Karakterizasyonu.....	54
3.4.2.1. MDA Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulması	54
3.4.2.2. MDA Tayini	55
3.4.2.3. Göreceli Lipid Elektroforetik Mobilitesi	55
3.4.2.4. ApoB Frakmentasyon Tayini.....	55
3.4.3. İnsan Monositinden Makrofaj Farklılaştırılması	56
3.4.3.1. İnsan Monositinden Makrofaj Farklılaştırılmasının Morfolojik İncelemesi	56
3.4.3.2. THP-1 Monosit Hücrelerinin Makrofaja Dönüştürülmesi Akış Sitometrik Histogramlar ve Değerlendirmeleri	56
3.4.4. Köpük Hücre Oluşumu ve Karakterizasyonu	56

3.4.4.1.Köpük Hücre Sitotoksisite Çalışmaları	57
3.4.5. Köpük Hücre Membran İzolasyonu	57
3.4.6. Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon- İyonlaşmalı Kütle.....	58
3.4.6.1. MALDI-MS analizleri için örnek hazırlama	58
3.4.6.2.Enzimatik Parçalama	58
3.4.6.3. ESI- MS Çalışmaları	59
3.5. İstatistiksel Analiz	59
4. DENEYSEL BULGULAR ve TARTIŞMALAR	60
4.1. Nanoplatformların Hazırlanması, Karakterizasyonu ve Ligand Çalışmaları	60
4.1.1. Nanoplatformların Hazırlanması ve Karakterizasyonu	60
4.1.1.1. Manyetik Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu	60
4.1.1.2. Manyetik PHB/CMCs Nanopartiküllerin Karakterizasyonu.....	62
4.1.1.3.Manyetik PHB/Kitosan (PHB/Cs) Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	65
4.1.1.4. Manyetik Dekstran Nanopartiküllerin Karakterizasyonu.....	71
4.1.2 Hazırlanan Nanoplatformların Manyetiklik Özellikleri	74
4.1.3. Hazırlanan Nanoplatformların Sitotoksisite Çalışmaları	75
4.1.3.1. PHB/CMCs Nanopartiküller	76
4.1.3.2. PHB/Cs Nanopartiküller.....	76
4.1.3.3. Dekstran Nanopartiküller	77
4.1.4. Hazırlanan Nanoplatformların Ligand Çalışmaları.....	78
4.1.5. Hazırlanan ligand takılı nanoplatformların Hücre Etkileşimleri	81
4.1.5.1. L929 Hücreleri Üzerine Nanoplatformların Sitotoksisitesi	81
4.1.5.2. HUVEC Hücreleri Üzerine Nanoplatformların Sitotoksisitesi	82
4.1.5.3. A7r5 Düz Kas Hücreleri Üzerine Nanoplatformların Sitotoksisitesi	83
4.1.5.4. Nanoplatformların Hücre Etkileşimlerinin Mikroskopik İncelenmesi	83
4.2. <i>In Vivo</i> Çalışmalar.....	86
4.2.1. Sıçanlarda Aterosklerotik Plak Oluşturulması	86
4.2.2. Aterosklerotik Plakların MR ile Görüntülenmesi	88
4.2.3. Manyetik Nanopartiküller Kullanılarak Aterosklerotik Plakların MR ile	90
Görüntülenmesi.....	90
4.2.4. Biyokimyasal İncelemeler.....	93

4.2.4.1. Serumda AOPP Değerlerinin İncelenmesi	95
4.2.4.2. Serumda MDA Değerlerinin İncelenmesi	96
4.2.4.3. Serumda SOD Değerlerinin İncelenmesi	97
4.2.4.4. Serumda Glutasyon Değerlerinin İncelenmesi.....	98
4.2.4.5. Serumda Nitrit ve Nitrat Değerlerinin İncelenmesi	99
4.2.4.6. AOPP değerlerinin kontrol ve Np grupları arası karşılaştırılması	101
4.2.4.7. AOPP değerlerinin dokular arası karşılaştırılması	103
4.2.4.8. MDA değerlerinin kontrol ve Np grupları arası karşılaştırılması ..	103
4.2.4.9. MDA değerlerinin dokular arası karşılaştırılması	104
4.2.4.10. Glutasyon değerlerinin kontrol ve Np grupları arası karşılaştırılması	105
4.2.4.11. Glutasyon değerlerinin dokular arası karşılaştırılması	107
4.2.4.12. SOD değerlerinin kontrol ve Np grupları arası karşılaştırılması	108
4.2.4.13. SOD değerlerinin dokular arası karşılaştırılması.....	109
4.2.4.14. Nitrit ve Nitrat değerlerinin kontrol ve Np grupları arası karşılaştırılması	109
4.2.4.15. Nitrit ve Nitrat değerlerinin dokular arası karşılaştırılması.....	110
4.2.4.16. Biyokimyasal incelemelerin değerlendirilmesi.....	111
4.2.5. Histolojik İncelemeler	113
4.3. Köpük Hücre Oluşum Modeli	116
4.3.1. Okside-LDL Eldesi.....	116
4.3.2. Okside-LDL Kinetiğine etki eden Parametreler	117
4.3.2.1.LDL Konsantrasyonunun Oksidasyona Etkisi	117
4.3.2.2.Bakır Sülfat Konsantrasyonunun Oksidasyona Etkisi	119
4.3.3.Okside LDL Karakterizasyonu	121
4.3.3.1.TBARS Analizi ve MDA Tayini	121
4.3.3.2. Göreceli Lipid Elektroforetik Mobilitesi	123
4.3.3.3. Apo B fragmentasyonu için SDS–Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE).....	124
4.3.4. İnsan Monositinden Makrofaj Farklılaştırılması	126
4.3.4.1. İnsan Monositinden Makrofaj Farklılaştırılmasının Morfolojik İncelemesi	126
4.3.4.2. THP-1 Monosit Hücrelerinin Makrofaja Dönüştürülmesi, Akış sitometrik Histogramlar Ve Değerlendirmeleri	127

4.3.5. Köpük Hücre Oluşumu ve Karakterizasyonu	127
4.3.5.1. Köpük Hücre Süpernatant ve Sitoplazma MDA Seviyeleri.....	128
4.3.5.2. Köpük Hücre Süpernatant ve Sitoplazma NOx Seviyesi.....	129
4.3.5.3. Köpük Hücre Süpernatant Sitokin Seviyeleri	129
4.3.6. Köpük Hücre Sitotoksosite Çalışmaları	132
4.3.7. MALDI-ToF Sonuçları.....	134
4.3.8. ESI-qToF-MS/MS Sonuçları	139
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	143
KAYNAKLAR.....	148
ÖZGEÇMİŞ	162

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. İntima, Medya ve Adventisya Kısımları	5
Şekil 2.2. Aterom oluşumunun şematik gösterimi	7
Şekil 2.3. Arterdeki İnflamasyonda Makrofajın Rolü	8
Şekil 2.4. Köpük Hücre Oluşumu	9
Şekil 2.5. Arter İnflamasyonu	10
Şekil 2.6. LDL yapısal görünümü	14
Şekil 2.7. Görüntüleme ve ilaç salım sistemlerinde kullanılan farklı malzemelerden sentezlenen ve farklı boyutlara sahip nanopartiküller.....	28
Şeki 2.8. Kitinin kimyasal yapısı	32
Şekil 2.9. Kitosan Kimyasal Yapısı	33
Şekil 2.10. O-CMCs sentezlenme şeması	35
Şekil 2.11. PHA'ın genel formülü	36
Şekil 3.1. Manyetik Demir Oksit Nanopartiküllerin sentez şeması.	42
Şekil 3.2. Manyetik PHB/CMCs nanopartiküllerin hazırlanma prosedürü.	43
Şekil 3.3. Manyetik Dekstran Nanopartiküllerin hazırlanma prosedürü.....	44
Şekil 3.4. IgG 1 ligandının PHB/CMCs nanopartiküllere kimyasal olarak bağlanma mekanizması	48
Şekil 3.5. <i>In vivo</i> hayvan çalışmaları	51
Şekil 3.6. Sıçanların MR ile görüntülenmesi	51
Şekil 4.1. Fe ₃ O ₄ nanopartiküllerin SEM görüntüsü	60
Şekil 4.2. Fe ₃ O ₄ nanopartiküllerin AFM görüntüsü.....	61
Şekil 4.3. Manyetik Demir Oksit Nanopartiküllerin Zeta Sizer Grafik gösterimi	62
Şekil 4.4. Manyetik PHB/CMCs nanopartiküllerin SEM görüntüsü.....	63
Şekil 4.5. Manyetik PHB/CMCs Nanopartiküllerin Zeta Sizer Grafik gösterimi	65
Şekil 4.6. Manyetik PHB/Cs nanopartiküllerin SEM görüntüsü	66
Şekil 4.7. (A). Manyetik PHB/Kitosan Nanopartiküllerin AFM fotoğrafı (B). Manyetik PHB/Kitosan Nanopartiküllerin 3D AFM fotoğrafı.....	66
Şekil 4.8. Manyetik PHB/Kitosan Nanopartiküllerin Zeta Sizer Grafik gösterimi ..	67
Şekil 4.9. Manyetik PHB/Kitosan Nanopartiküllerin Zeta Potansiyel Grafik Gösterimi.....	67
Şekil 4.10. Homojenizatör Hızının partikül boyutuna etkisi	68
Şekil 4.11. PVA miktarının partikül boyutuna etkisi.....	69

Şekil 4.12. PHB/Kloroform miktarının nanopartikül boyutuna etkisi	70
Şekil 4.13. Manyetik Dekstran nanopartiküllerin SEM görüntüsü.....	71
Şekil 4.14. Manyetik Dekstran Nanopartiküllerin AFM görüntüsü	72
Şekil 4.15. Manyetik Dekstran Nanopartiküllerin Zeta Sizer Grafik gösterimi	72
Şekil 4.16. Manyetik PHB/Kitosan Nanopartiküllerin Zeta Potansiyel Grafik gösterimi.....	73
Şekil 4.17. MBA Konsantrasyonunun nanopartikül boyutuna etkisi	74
Şekil 4.18. Hazırlanan Nanoplatformların Manyetizasyon Eğrisi	75
Şekil 4.19. PHB/CMCs nanopartiküllerin biyolojik uyum testleri.....	76
Şekil 4.20. PHB/Cs nanopartiküllerin biyolojik uyum testleri	77
Şekil 4.21. Dekstran nanopartiküllerin biyolojik uyum testleri.....	78
Şekil 4.22. (A) Anneksin A5 ligandı takılmış PHB/CMCs nanopartiküllerin AFM görüntüsü (B) Anneksin A5 ligandı takılmış PHB/CMCs nanopartiküllerin 3D AFM görüntüsü.....	79
Şekil 4.23. (A) Anneksin A5 takılı Manyetik PHB-CMCs Np (HUVEC) (Normal ışık mikroskobu) (B) Anneksin A5 takılı Manyetik PHB-CMCs Np HUVEC (Floresans mikroskobu).....	84
Şekil 4.24. (A) IgG 1 takılı Manyetik PHB-CMCs Np (HUVEC) (Normal ışık + Floresans mikroskobu) (B) IgG 1 takılı Manyetik PHB-CMCs Np (HUVEC) (Floresans mikroskobu).....	84
Şekil 4.25. (A) Anneksin A5 takılı Manyetik PHB-CMCs Np Düz Kas Hücresi (Normal ışık + Floresans mikroskobu) (B) Anneksin A5 takılı Manyetik PHB- CMCs Np Düz Kas Hücresi (Floresans mikroskobu).....	84
Şekil 4.26. (A) IgG1 takılı Manyetik PHB-CMCs Np Düz Kas Hücresi (Normal ışık + Floresans mikroskobu) (B) IgG1 takılı Manyetik PHB-CMCs Np Düz Kas Hücresi (Floresans mikroskobu).....	85
Şekil 4.27. Sıçanların aortlarının sagittal MR görüntüleri..	89
Şekil 4.28. Frontal MR fotoğrafları.	90
Şekil 4.29. T1 ağırlıklı koronal 3B-SPACE fotoğrafları.	91
Şekil 4.30. Koronal planda gradyent eko T1 ve turbo spin-eko T2 ağırlıklı MR görüntüleri.	92
Şekil. 4.31. Serum AOPP seviyeleri.....	95
Şekil. 4.32. Serum MDA seviyeleri.....	96
Şekil. 4.33. Serum SOD seviyeleri.....	97

Şekil 4.34. Serum glutatyon seviyeleri	98
Şekil 4.35. Serum Nitrat seviyeleri	99
Şekil 4.36. Serum Nitrit seviyeleri	100
Şekil 4.37. Doku AOPP (A) ve MDA (B) seviyeleri.....	101
Şekil 4.38. Doku glutatyon (A) ve SOD (B) seviyeleri	106
Şekil 4.39. Doku nitrit (A) ve nitrat (B) seviyeleri.....	110
Şekil 4.40. Prusya mavisi ile boyanmış sıçanların aort görüntüleri	113
Şekil 4.41. Hematoksinen-oesin ile boyanmış sıçanların aort görüntüleri	114
Şekil 4.42. LDL konsantrasyonunun, oksidasyon kinetiğine etkisi	117
Şekil 4.43. Bakır Sülfat konsantrasyonunun lag time ve maksimum dien oluşumuna etkisi	119
Şekil 4.44. İnkübasyon zamanı ve Bakır iyonu konsantrasyonunun TBARS etkisi	121
Şekil 4.45. LDL ve okside LDL örneklerinin göreceli elektroforetik hareketliği ...	123
Şekil 4.46. LDL (A) ve okside LDL'nin (B) Apo B fragmentasyonu	125
Şekil 4.47. (A) Normal THP-1 insan monosit hücreleri; (B) Makrofaja dönüşmüş hücreler	126
Şekil 4.48. (A) Naiv (Farklılaşmamış) ve (B) PMA ile uyarılarak farklılaşmış THP-1 hücrelerinin CD14 ifadeleri	127
Şekil 4.49. Lipid Profilleri	128
Şekil 4.50. LDL ve okside-LDL ile etkileştirilmiş THP-1 ve makrofajların süpernatant ve sitoplazma MDA seviyeleri.....	128
Şekil 4.51. LDL ve okside-LDL ile etkileştirilmiş THP-1 ve makrofajların süpernatant ve sitoplazma NOx seviyeleri	129
Şekil 4.52. LDL ve okside-LDL ile etkileştirilmiş THP-1 ve makrofaj hücrelerinin TNF- α salgılanması üzerine etkisi	130
Şekil 4.53. LDL ve okside-LDL ile etkileştirilmiş THP-1 ve makrofaj hücrelerinin IL- 10 salgılanması üzerine etkisi	131
Şekil 4.54. LDL ve okside-LDL ile etkileştirilmiş THP-1 ve makrofaj hücrelerinin midkin salgılanması üzerine etkisi.....	132
Şekil 4.55. LDL ve Okside-LDL etkileştirilen THP-1 ve makrofaj hücrelerinin hücre proliferasyon sonuçları	133

- Şekil 4.56.** Membran proteinlerinin MALDI-MS spektrumları. (A) THP-1 insan monosit hücresi, (B) LDL ile etkileştirilmiş THP-1 insan monosit hücresi ve (C) okside-LDL ile etkileştirilmiş THP-1 insan monosit hücresi. 135
- Şekil 4.57.** Membran proteinlerinin MALDI-MS spektrumları. (A) Makrofaj hücresi, (B) LDL ile etkileştirilmiş Makrofaj hücresi ve (C) okside-LDL ile etkileştirilmiş Makrofaj hücresi. 138

ÇİZELGELER

Çizelge 3.1. Sekiz hafta boyunca % 1 hayvansal yağ katkılı standart sıçan yemi ile beslenmiş sıçanların grupları.....	50
Çizelge 4.1. PHB/CMCs Nanopartiküllerin Boy Boy Dağılımına Etki Eden Parametreler	64
Çizelge 4.2. Sekiz hafta süresince %1 hayvansal yağ katkılı standart sıçan yemi ile beslenen sıçanların, diyet öncesi ve sonrası kan lipid değerleri.	87
Çizelge 4.3. Sekiz hafta süresince %1 hayvansal yağ katkılı standart sıçan yemi ile beslenen sıçanların, kilo alımları.	88
Çizelge 4.4. Değişen LDL konsantrasyonu ile değişen LDL oksidasyon parametreleri.....	118
Çizelge 4.5. LDL ve okside-LDL örneklerinin MDA Düzeyleri	122
Çizelge 4.6. ESI-qToF-MS/MS Sistemiyle Tanımlanabilen Membran Proteinleri	140

SİMGELER VE KISALTMALAR

An-1: Anneksin 1

An-5: Anneksin 5

AFM: Atomik Kuvvet Mikroskobu

AOPP: İleri Protein Oksidasyon Ürünleri (Advanced Oxidation Protein Products)

CMCs: Karboksimetil Kitosan

Cs: Kitosan

EDAC: 1-Etil-3-(3-dimetil-aminopropil)-karbodiimid HCl

EDTA: Etilen diamin tetraasetik asit

ESI: Elektrosprey iyonlaştırma

HDL: Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein

HUVEC: İnsan Umbilikal Veni Endotel Hücreleri

IgG 1: İmmüoglobulin G1

LDL: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein

m/z: Kütle/yük

MALDI: Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyon / İyonlaştırılmalı

MDA: Malondialdehit

MES: 2-(N-Morpholino) Etan Sülfonik Asit

MNP: Manyetik Nanopartikül

MR: Manyetik Rezonans

MRG: Manyetik Rezonans Görüntüleme

MS: Kütle Spektrometresi

NO: Nitrik oksit

NO_x: Nitrik oksit metabolitleri

NP: Nanopartikül

Ox-LDL: Okside LDL

PBS: Fosfat Tampon Çözeltisi (pH= 7.4)

PDI: (Poli Disoersite) Çoklu Dağılım İndeksi

PHB: Poli [R-3-hidroksibütirat]

PHB/CMC: Polihidroksibütirat – Karboksimetil Kitosan

PHB/CS: Polihidroksibütirat – Kitosan

PMA: Forbol 12- miristat 13- asetat

SDS: Sodyum Dodesil Sülfat

SEM: Taramalı Elektron Mikroskobu

SPION: Süper paramanyetik demir oksit nanopartiküller

SOD: Süperoksit Dismutaz

TBA: Tiyobarbütirik asit

TBARS: Tiyobarbütirik asit reaktif türleri

TEM: Geçişli Elektron Mikroskobu

ToF: Uçuş zamanlı

VLDL: Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein

VSM: Titreşimli Manyetometre

UV: Ultraviyole

1. GİRİŞ

Kardiyovasküler sistem rahatsızlıkları arasında damar daralma/tıkanmaları ölümcül sonuçlar doğurabilen önemli rahatsızlıkların başında gelmektedir. Günümüze kadar uygulanan teşhis ve tedavi yöntemleri ile söz konusu daralma oranları ancak belli bir seviyeye geldiği zaman belirlenebilmekte ve ne yazık ki çoğunlukla bu geç evre teşhis nedeniyle tedavi etkinliğinde(başarısında önemli oranda azalmalar yaşanmakta ve hastalığın seyri hızla kötüye gidebilmektedir. Hastalığın daha da ilerlemesi hastalarda kalıcı rahatsızlıklara veya ölüme sebebiyet verebilmektedir. Günümüzde daralma/tıkanmalar için kullanılan anjiyografik teknikler, hastaya verilen rahatsızlıklar, enfeksiyon riski ve ekonomik olumsuzluklar gibi çeşitli dezavantajlara sahiptir. Sözü edilen olumsuzlukların ortadan kaldırılabilmesi için en ideal yaklaşım hiç şüphesiz nanoteknolojik yaklaşımlarla ilgili daralma/tıkanmaların erken evrede (moleküler boyutta) aterosklerotik plak oluşumlarının belirlenmesi ve gerekli müdahalelerin yapılmasıyla sağlanabilecektir. Söz konusu yaklaşımlarla oluşturulan sistemler sayesinde damar tıkanma/daralma bölgelerinin hedefli ve seçimli olarak tanımlanması ve görüntülenmesi kolaylıkla sağlanabilecektir. Son yıllarda yapılan araştırmalarda görüntüleme ajanı olarak süper paramanyetik demir oksit nanopartiküller (SPION) kullanılmaktadır. Boyutlarının küçük olmasına bağlı olarak yüzey alanlarının geniş olması, yüksek oranda manyetiklik özellikleri, sentez kolaylıkları ve hedeflendirilmiş doku ve organda yığın oluşturma yetenekleri gibi özellikleri ile çeşitli bilimsel alanlarda geniş kullanım alanı kazanmışlardır. Yapılan çalışmalarda SPION'lerin kullanılmasıyla manyetik rezonans görüntüleme (MRG) sistemlerinde kontrast ajanların sahip olduğu dezavantaj ve toksik özelliklerin ortadan kaldırılmasına ek olarak doku ve organlarda etkin görüntüleme sağlandığı görülmüştür. Bu amaçla hâlihazırda klinik uygulamalarda yaygın olarak kullanılan ancak yukarıda belirtilen damar daralmaları ya da bir başka deyişle hastalık belli bir boyuta gelmeden sağlıklı sonuç veremeyen tekniklerin MRG tekniği yerini alacaktır. Kardiyovasküler sistem görüntülemelerinde kullanılan teknolojilere karşı manyetik nanopartiküllerin avantajları; yüksek boyutlarda sağladığı seçicilik, mükemmel yumuşak doku kontrastı ve plak bölgesinde hem anatomik hem de moleküler düzeyde bilgi vermesi olarak sıralanabilir.

Manyetik nanotaşıyıcıların hazırlanmasında kullanılan paramanyetik malzemelerin yanında özellikle polimerik malzemeler en uygun kaplama ya da kapsülleme malzemesi olarak bilinmektedir. Burada sözü edilen polimerik malzemelerin fonksiyonlarını ya da görevlerini yerine getirdikten sonra vücuttan atılmaları önemli bir avantajdır. Bu nedenle konu ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda biyolojik olarak bozunabilen polimerik malzemeler tercih edilmektedir.

Sözü edilen aterosklerotik plakların oluşmasında ve bu plakların özellikle stresli koşullar altında parçalanıp kopması ve migrasyonu ile değişik komplikasyonlar ortaya çıkmaktadır, bunlara neden olan temel unsurların başında ise yağ hücreleri gelmektedir. Yapılan diğer çalışmalar incelendiğinde, okside olmuş düşük yoğunluklu lipoprotein miktarının ateroskleroz oluşumunda etkin bir role sahip olduğu görülmüştür. Kan plazmasında bulunan düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) kolesterolü seviyesindeki azalmanın miyokardiyal enfarktüs ve diğer pek çok kardiyovasküler sistem rahatsızlığının oluşum riskini azalttığı düşünülmektedir

LDL'nin oksidatif modifikasyonu endotelin aktivasyonunu etkileyerek biyolojik karakterinin değişmesine neden olmaktadır. Endotel yapısındaki bozulmaların monositlerin toplanmasına, toplanan monositlerin makrofaja dönüşmesine neden olarak 'yağ çizgisi' diye adlandırılan köpük hücrelerinin oluşumunu kolaylaştırdığı tespit edilmiştir. Tüm bu olaylar meydana gelirken reaktif oksijen türlerinde de çeşitli değişimler meydana gelmekte ve bu değişimler endotelin fonksiyonunu kaybetmesini tetiklemektedir. Endotelde meydana gelen değişiklikler damar duvarında inflamasyona yol açarak aterosklerotik lezyonların başlama ve ilerlemesine neden olmaktadır.

Bu amaçla sunulan çalışmalar kapsamında öncelikle manyetik özelliğe sahip polimerik PHB/CMCs, PHB/Cs ve dekstran nanopartiküller hazırlanmıştır. Hazırlanan nanopartiküllerin boyut dağılımına etki eden parametreler incelenmiş ve boyutları Zeta Sizer sistemi kullanılarak karakterize edilmiştir. Morfolojik özellikleri SEM ve AFM ile karakterize edilen nanopartiküllerin manyetik özellikleri ise titreşimli manyetometre (VSM) incelenmiştir. Hazırlanan nanopartiküllere hali hazırda kullanılan model ligandlardan IgG1, Anneksin A5 ve A1 ligandları takılmış ve böylelikle ligand takılı nanoplatformların sitotoksiteleri incelenmiştir.

Daha sonra *in vitro* olarak gerçekleştirilen optimizasyon çalışmaları ile bu nanoplatformlardan Anneksin A5 ve IgG 1 takılı PHB/CMCs nanopartikülleri seçilerek aterosklerotik plak etkileşimleri *in vivo* olarak değerlendirilmiştir. Bu amaçla 30 adet Wistar albino ırkı sıçan % 1'lik yağ diyeti ile beslenmiş, 6 adet sıçan ise kontrol grubu olarak normal sıçan yemi ile beslenmiştir. Sekiz hafta sonunda oluşturulan plakları MRG tekniği ile görüntüleyebilmek için hazırlanan ligand takılı nanoplatformlar hayvanlara enjekte edilmiştir. Aortlarının MRG ile görüntülenmesinden sonra hayvanlar kapite edilerek doku ve serumlarında reaktif oksijen ve reaktif azot türlerinin etkisi araştırılmıştır.

Çalışmaların son aşamasında; seçimli teşhis/tedavi yöntemleri geliştirilebilmesi için insan aterosklerotik plak oluşum modeli geliştirilmiştir. Bu modelin oluşturulmasında ticari olarak temin edilen düşük yoğunluklu lipoprotein bakır sülfat çözeltisi ile oksitlenerek, THP-1 insan monosit hücrelerinin farklılaşması sonucu oluşan uygun insan makrofaj hücrelerine eklenmiş ve köpük hücrelerinin oluşumu sağlanmıştır. Elde edilen köpük hücreleri uygun tekniklerle karakterize edilmiş, okside-LDL'nin insan monosit ve makrofajı üzerine etkileri sitokin incelemeleriyle gerçekleştirilmiştir. Ayrıca okside-LDL'nin insan monosit ve makrofaj hücrelerine sitotoksitesi de incelenmiştir. Elde edilen köpük hücrelerinin yüzeyinde yer alan özgül reseptörlerin belirlenmesi için MALDI-ToF-MS tekniği kullanılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kardiyovasküler Sistem Rahatsızlıkları ve Ateroskleroz

Kardiyovasküler sistem rahatsızlıkları gerek ülkemizde ve gerekse tüm dünyada karşılaşılan en önemli sağlık problemlerinin başında gelmektedir. Klinik ağırlıklı olarak koroner ve karotis arterlerde meydana gelen ateroskleroz, tüm ırk, erkek ve kadınlarda kalıcı ve ölümcül sonuçlar doğuran damar rahatsızlıklarından biridir. Yapılan araştırmalar göre; kardiyovasküler sistem rahatsızlıkları insanlarda ciddi komplikasyonların yanı sıra yaşam kalitesini düşürmekte ve önemli oranlarda ölüme neden olmaktadır [1].

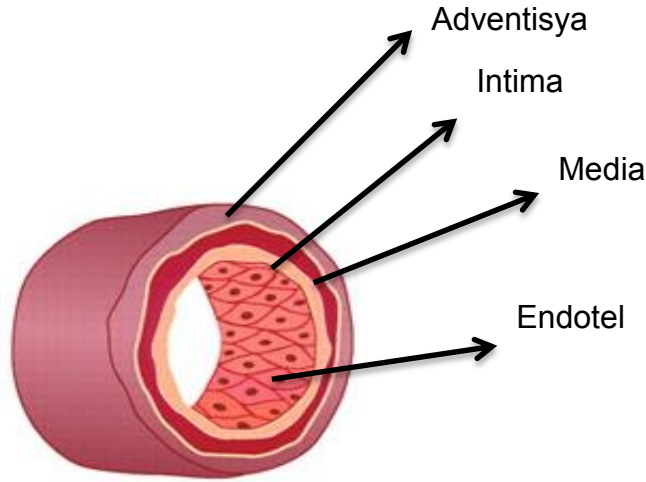
Genetik yatkınlık, yaş, hipertansiyon [2-4], dislipidemi [3-5], diyabet [2, 4, 5], obezite, yaş [3], sigara [2-4], bakteriyel ve viral enfeksiyonlar, hiperhomosisteinemi [3-5], oksidatif stres [5] ve doymuş yağ ve kolesterol oranı yüksek, sebze, meyve ve tahıl oranı düşük diyet [3] ateroskleroza neden olan başlıca risk faktörleridir. Bu faktörler hastalık başlamadan önce veya hastalığın erken teşhis edilmesi durumunda, engellendiğinde ateroskleroz gelişimi azaltılabilir veya hiç gelişmeyebilir. Engellenmemesi ya da geç teşhis edilmesi durumunda, kan damarları sertleşir, daralır ve semptomlar ortaya çıkmaya başlar. Ateroskleroza sadece yukarıda söylediğimiz risk faktörlerinin sebep olduğu ve bu risk faktörlerinin azaltılması veya ortadan kaldırılmasını temel alarak ateroskleroz için tedavi yöntemleri geliştirilmiştir [5]. Yapılan araştırmalar bunun yetersiz olduğunu, ateroskleroza sadece risk faktörlerinin değil, lipoprotein metabolizmasının da neden olduğunu göstermektedir. Düşük yoğunluklu lipoproteinler, modifiye edildiği veya okside-LDL (ox-LDL)'ye dönüştüğünde ateroskleroz oluşumunda önemli rol oynamaktadırlar [6, 7].

2.2. Arter Duvarı

Aterosklerozun gelişiminde etkin role sahip yapılar olan arterlerin, vücut içerisindeki başlıca görevi kanı iletmeektir. Arter duvarı üç tabakadan oluşur.

(Şekil 2.1.). Bunlar da damar boşluğundan dışa doğru;

- Tunika intima
- Tunika media
- Tunika adventisya



Şekil 2.1. İntima, Medya ve Adventisya Kısımları

Tunika intima: Arterin en iç tabakasını oluşturur. Tunika intima, endotel hücrelerinden oluşmuş tek sıralı bir yapı, bazal membran ve az miktarda pirimitif mezenkimal hücrelerle birlikte olan bir bağ dokusu tarafından oluşan kompleks heterojen yapı göstermektedir. Bu tabakada yaşam boyunca, arterlerin hemodinamik strese karşı normal adaptif bir özelliği olduğu kadar, arteriyel zedelenmelerin iyileşmesinin de karakteristik bir göstergesi olan ilerleyici intimal kalınlaşma olur. Buradaki endotel hücreleri, kan ile çok önemli bir temas yüzeyi oluşturmaktadır. Arteriyel endotel hücreleri, arteriyel hastalıkların patogenezi sırasında ters giden olayları düzenlemenin yanı sıra vasküler homeostaziye de düzenlemektedirler.

Tunika media: Arter duvarının en kalın tabakası olan Tunika media, vasküler düz kas hücrelerini içeren tek bir hücre tipinden oluşmuştur. Vasküler düz kas hücreleri, arterin hücre kitlesinin büyük bir kısmını ve medianın ekstrasellüler matriks bileşenlerini oluşturur. Düz kas liflerinin arasında bol miktarda elastik lifler bulunur. Tabakaya spiral şekilde yerleşmiş düz kas hücreleri birbirleri ile birleşmiş ve sirküler bir görüntüye sahiptir. Normal arterde, düz kas hücrenin bölünme hızı ve hücre ölümü oldukça yavaş ve ekstrasellüler matriks ile denge halindedir.

Tunika adventisya: Bağ dokusuna benzer lifli bir yapıya sahip olan Tunika adventisya, çevredeki bağ dokusu stroması içerisine yerleşmiş olarak bulunur. Ağırlıklı olarak, kollojen ve elastinden oluşmasına rağmen iç kısmı fibröz yapı gösterir. Media tabakasından uzaklaştıkça bunların yerini gevşek bağ dokusu alır.

Adventisya, genellikle intimadan daha az oranda kollajen lifleri içerir. Ayrıca bunlara ek olarak adventisya tabakasında; fibroblastlar, mast hücreleri, adipositler ve sempatik sinir uçları bulunmaktadır.

2.3. Ateroskleroz Patogenezi

Genel olarak damar sertleşmesi olarak bilinen Ateroskleroz, arterleri etkileyen bir hastalıktır. Ateroskleroz; ilk olarak arter duvarının intima tabakasındaki yağlı çizgilenmeler olup, bölgede lipit, kanın diğer yapı taşları ve fibröz dokunun zamanla birikmesi ve sertleşmesi olarak tanımlanmaktadır.

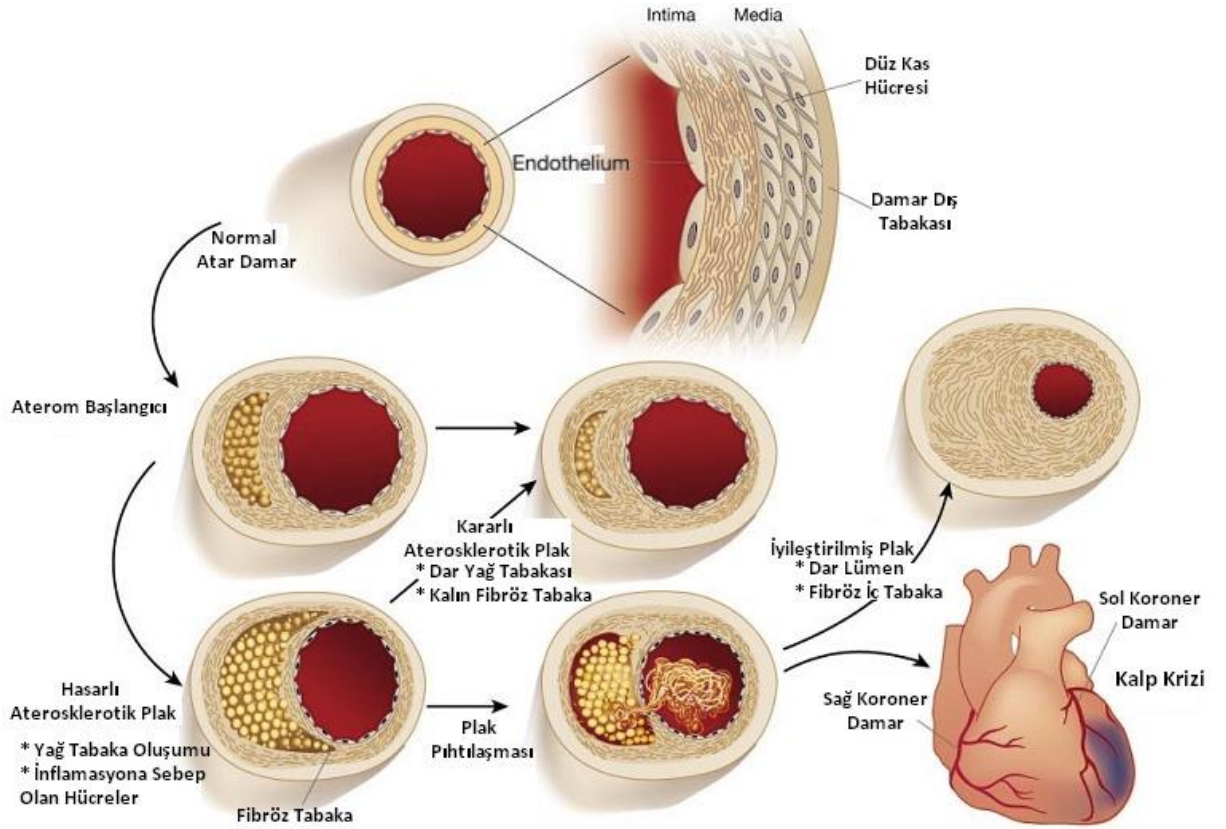
Koroner ateroskleroz, koroner arterlerin duvarındaki tabakaların birisi veya tamamının dejeneratif patolojisi veya arterlerde kolesterol, kalsiyum...vb. birikmesi sonucu ile tıkanabilir bir tıbbi durumun meydana gelmesi anlamına gelmektedir. Koroner aterosklerozda; arterlerin subintima tabakasında lipidler, kompleks karbonhidratlar, bazı kan türevi maddeleri, fibröz doku, kalsiyum gibi maddelerin lokal birikimleri sonucu kan damarının daralması, sertleşmesi ve bunlara bağlı olarak da kan akışının azalması söz konusudur [8].

Ateroskleroz patogenezinde genetik faktörlerin etkin olduğu bilinse de son yıllarda çevresel faktörlerin de bu hastalığı tetikleyici unsurlar oldukları yapılan araştırmalarla kanıtlanmıştır. Bahsedilen çevresel risk faktörleri olarak gösterilen, sigara, kolesterol, hipertansiyon, diabetes mellitus ve obezite, ateroskleroz gelişiminde önemli role sahiptirler [9]. Yapılan deneysel çalışmalarda bu risk faktörlerinin genel inflamatuvar bir yanıt başlatarak vücutta yaygın bir reaksiyon oluşturduğu gösterilmiştir.

Ateroskleroz lezyonunun anlaşılmasında, öncelikli olarak endotelin yapısına bakılması anlamlı olacaktır. Bir damarın kesiti düşünülecek olursa, kanın aktığı alan damar lümeni, endotel ise damarın iç yüzeyinde bulunan ve kanla temasta olan ilk tabakadır. Endotel tabakasının yüzeyinde hücrelerin yapışmasını, büyümesini ve gelişmesini engelleyen faktörler bulunmaktadır. Önceleri gayet pürüzsüz ve kaygan bir yapıya sahip olan endotel tabakasının sigara, kolesterol, obezite vb. risk faktörlerine ve bunlara maruz kalma sıklığı ve derecesine bağlı olarak zamanla yüzeyinde lezyonlar meydana gelir. Oluşan bu lezyonlar zamanla daha fazla birikerek aterosklerozun oluşumuna uygun ortam hazırlarlar (Şekil 2.2.) [10].

Ateroskleroz oluşumunda önemli role sahip etkenlerden bir tanesi de kanda yüksek oranda bulunan düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) miktarıdır [11, 12]. Düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) parçacıkları; bir kabuk ile çevrili fosfolipidler, serbest kolesterol ve apolipoprotein B100 gibi kolesterol esterleri ve triaçilgliserol içermektedirler.

Kan akış geriliminin (shear stress) az olduğu arterlerdeki daralma yerlerinde, LDL gibi çeşitli kan molekülleri lümen yüzeyi ile daha fazla ilişki içinde bulunurlar. Bu nedenle; lipoproteinlerin, özellikle hiperlipidemi durumunda endotelden daha fazla geçişi mümkün olabilmekte ve endotel altında lipid birikimi daha da artmaktadır [13, 14].



Şekil 2.2. Aterom oluşumunun şematik gösterimi

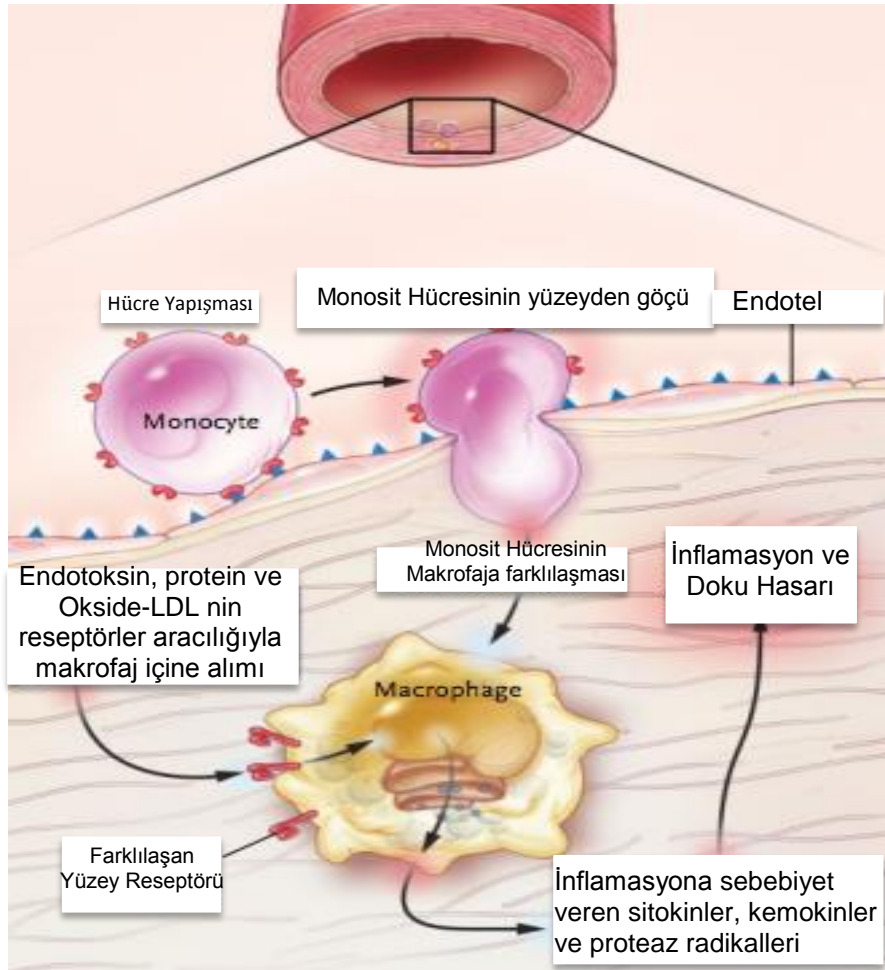
Arter intimasında kan plazmasından kaynaklanan aterojenik lipoprotein birikmesine karşı gelişen ateroskleroz, karmaşık bir inflamatuvar-fibroproliferatif yanıttır [15]. Aterojenik lipoproteinler, aterosklerotik plakların oluşum aşamasında ve gelişiminde önemli role sahip moleküllerdir. Bugün hala "lipid hipotezi" olarak bilinen görüşe göre, kan plazmasında bulunan düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) kolesterolü seviyesindeki azalmanın miyokardiyal enfarktüs ve diğer pek çok

kardiyovasküler hastalığın oluşum riskini azalttığı düşünülmektedir [16].

Bahsedilen aterosklerotik plakların oluşmasında ve bu plakların çatlayıp kopmasıyla değişik komplikasyonlar ortaya çıkmaktadır, bunlara neden olan temel unsurların başında ise yağ hücreleri gelmektedir. Ateroskleroz üzerine yapılan ilk çalışmalarda, okside-LDL (oxLDL)'nin makrofajlarda kolesterol toplanmasına neden olarak proaterojenik özellik gösterdiği bildirilmiş ve bugün, aterosklerotik plak oluşumunda, LDL oksidasyonun önemli bir basamak olduğu görüşü üzerinde ciddi anlamda durulmaktadır [17].

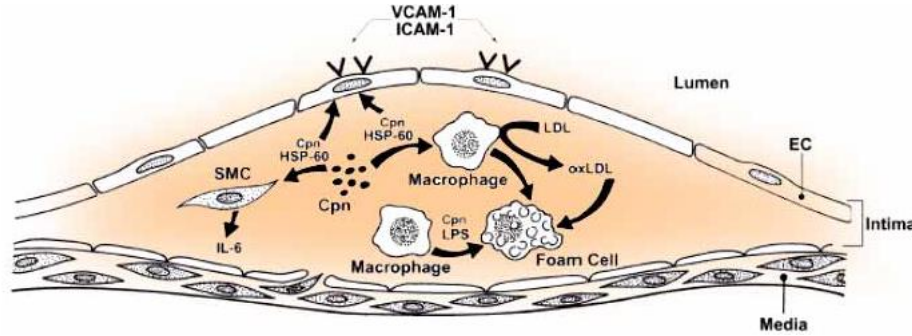
2.4. İntraselüler Lipid Birikimi; Köpük Hücre Oluşumu

Damarda çeşitli sebeplerden oluşan yangı sonucu monositler kandan arter duvarı içine girerler. İlk olarak, damarın intima tabakasında toplanırlar ve lipitleri fagosite ederler. Ardından, monositler değişime uğrayıp makrofaj olur ve oksitlenmiş LDL'yi içlerine alarak köpük hücrelerine dönüşmektedir (Şekil 2.3.).



Şekil 2.3. Arterdeki İnflamasyonda Makrofajın Rolü

Bu hücrelerin köpük hücresi olarak adlandırılmasının nedeni sitoplazmalarında çok sayıda yağ vezikülü biriktiği içindir. Bölgede ekstrasellüler lipid, köpük hücrelerindeki lipid ve düz kas hücrelerinin ürettiği kollajen gibi bağ dokusu elemanlarını içeren bir plak tabakası oluşur [18] (Şekil 2.4.).



Şekil 2.4. Köpük Hücre Oluşumu

Oksitlenmiş LDL üzerinde aşırı lipid alımını sağlayarak köpük hücre oluşumuna aracılık eden Avcı Reseptörleri (Scavenger receptor) bulunur. Bu yüzey reseptörleri, modifiye lipoproteinlerle bağlanmaya daha çok afinite gösterirler. Sakaguchi H. ve arkadaşlarının 1998 yılında yaptığı bir çalışmada; fonksiyonel scavenger receptor-A bulunmayan, mutasyonlu, ateroskleroz eğilimli fareler ile fonksiyonel scavenger receptor-A bulunan fareler lezyon oluşumu açısından karşılaştırılmış ve fonksiyonel scavenger receptor-A bulunmayan farelerde daha az miktarda aşırı yağlı lezyon oluşumu görülmüştür [19].

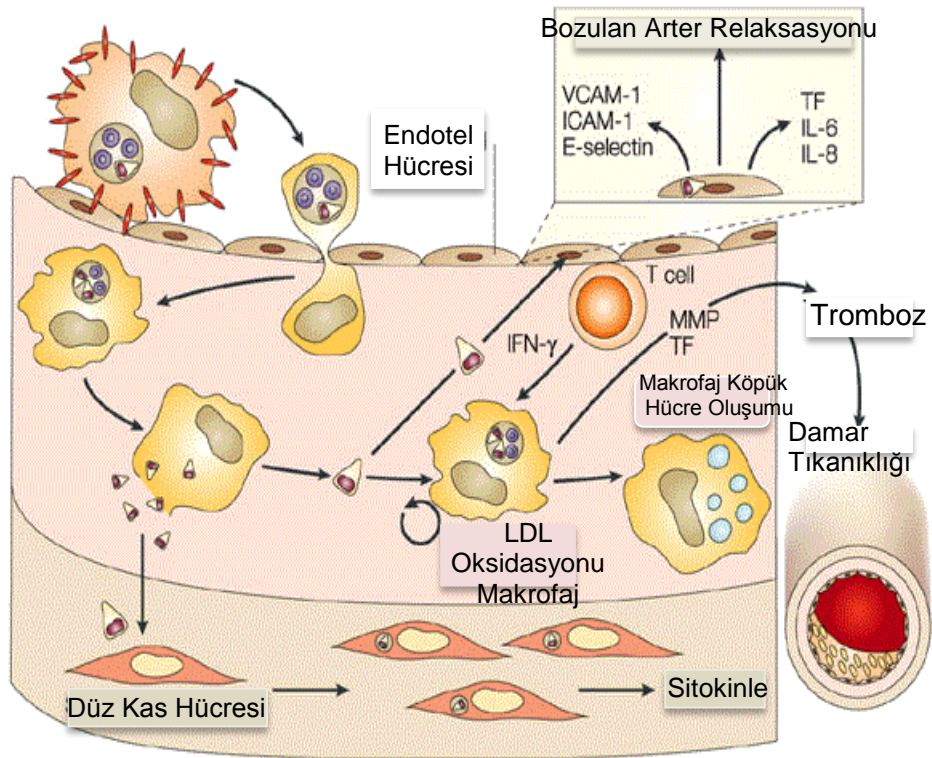
2.5. Arter Inflamasyonu

Son yıllarda yapılan çalışmalar, arterde meydana gelen inflamasyonun aterogenez oluşumunda en önemli role sahip olduğunu göstermektedir [20].

Arterde biriken monositlerde yağ toplanması sonucu oluşan köpük hücreleri arter duvarında birikerek bir lezyon oluşturmaya başlarlar.. IL-1, IFN- γ , TNF- β , Anjiotensin II...vb. Gibi sitokinler veya MCP-1, IL-8, IFN- γ ...vb gibi kimokinler adezyon moleküllerinin ekspresyonunu arttıırırlar [3, 5]. Adezyon molekülleri (P- ve E-selektinler, VCAM, ICAM) monosit ve T-hücreleri üzerinde bulunan glikokonjugatlar ve integrinler için reseptör görevini üstlenir [4].

Arterde inflamatuvar oluşmaya başladıktan sonra, Monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1) ile monosit hücreleri bölgeye gelirler. T-hücre sınıfı kemoatraktanlar ise plaktaki inflamasyonu artırarak lezyonun ilerlemesini sağlarlar [21, 22].

İnflamasyon bölgesindeki makrofajlar, dentritik hücreler veya endotelial hücreler, bölgede çok fazla miktarda bulunan T hücrelerine antijen sunarlar. Bu hücreler T hücreleri ile etkileşime girerek, T hücreleri ve antijenler arasındaki aktivasyonu sağlarlar. Böylece active edilen T hücreleri aterogenezin oluşumunu sağlayacak sitokinleri sentezler ve ortama salımını sağlar. (Şekil 2.5.)



Şekil 2.5. Arter İnflamasyonu [23].

CD4 taşıyan yardımcı T hücreleri iki genel kategoriye ayrılır; Bunlardan; Th-1 subtipi; interferon- γ , lenfotoksin, CD-40 ligant ve TNF- α (tümör nekrozis faktör- α) gibi 9 proinflamatuvar sitokinler salgılar. Th-1 sitokinleri, vasküler duvar hücrelerinin aktivasyonunu sağlar ve plak oluşumunu kontrol eder. Diğer Th hücreleri olan; Th-2 sitokin ve inflamasyon inhibitörleri olarak görev görmektedirler. İntimada monositler, makrofaj koloni stimüle edici faktör (M-CSF) etkisi ile makrofajlara dönüşür ve modifiye lipoproteinler için Scavenger receptor-A ekspresyonunu başlatırlar [4]. Hidrojen peroksit, lipid peroksit...vb. reaktif oksijen

türleri intimada kalan LDL'nin oksidasyonuna neden olur [3]. Adezyon moleküllerinin ve inflamatuvarı başlatan sitokinlerin makrofaj ve endotel hücrelerinde ekspresyonunu arttıran Ox-LDL, makrofajlar tarafından alınarak köpük hücreleri meydana getirirler. Başlangıçta köpük hücreleri ve T-hücrelerini içeren bu lezyon aterosklerozun başlangıcıdır ve “yağsı- çizgi” adını alır. Bölgeden salgılanan moleküller düz kas hücrelerinin proliferasyonuna ve bölgeye göçüne neden olur. Göç eden hücreler etraflarında kendi ekstrasellüler matriksini oluşturur. Bu aşamadan sonra “aterom plak” denen aterosklerozun ileri lezyonu oluşur [4]. Bölgedeki makrofaj köpük hücrelerinin yırtılması halinde hidrolitik enzimler serbest kalır. Bu enzimler oluşan aterom plağı yırtar ve bunun sonucunda bölgede tromboz gelişir. Meydana gelen tromboz damar tıkanıklığına neden olur.

2.6. Düz Kas Hücre Migrasyonu ve Proliferasyonu

Yetişkin bir insanın arterinde düz kas hücrelerinin replikasyonu sık karşılaşılan bir durum olmamasına rağmen, lezyon oluşumunda çok fazla miktarda düz kas hücrelerinde replikasyon gözlemlenir. Bölgede plak yırtılması sonucu serbest kalan mitojenler düz kas hücrelerinde anormal miktarda replikasyona neden olur. Buda ateroskleroz oluşumu ve ilerlemesinde düz kas hücrelerinin birikimi lineer bir çizgide gerçekleşmeyebilir [24].

2.7. Düz Kas Hücre Ölümü

İnflamasyonun meydana geldiği bölgede düz kas hücrelerinin anormal replikasyonu sonucu aynı zamanda burada bu hücrelerin ölüm miktarını da arttırmaktadır. Hücrelerin ölümü ve birikimi aterosklerotik plağın gelişimine ve ilerlemesine katkı sağlayabilir. Yapılan araştırmalar sonucu ilerlemiş insan ateromundaki düz kas hücrelerinin en azından bazılarında apoptoza özgü çekirdek DNA fragmantasyonu görülmüştür. İlerlemiş ateromda bulunan inflamatuvar sitokinlere yanıt olarak düz kas hücrelerinin bir kısmında apoptozis ortaya çıkar. Bunun dışında, plaklar içinde toplanmış olan bazı T hücreleri yüzeylerinde fas ligant oluşturabilir. Fas ligandı düz kas hücre yüzeyindeki fasa bağlanarak düz kas hücrelerinin ölümüne yol açar [25-27]. Yani; ilerleyen aterosklerotik plaktaki anormal miktardaki düz kas hücre replikasyonu ve hücre ölümü arasındaki dzensizliğin sonucu plaktaki düz kas hücrelerinin birikimi artmaktadır [28]. Zamanla, plak içindeki inflamasyon bölgelerinden düz kas hücreleri kopmaya başlar ve bölgede bir eksiklik meydana getirir. Düz kas hücrelerinin ürettiği kollajen, fibröz başlığın

matriksinin devamlılığı ve onarımı için gereklidir. Bundan dolayı düz kas hücrelerindeki kopmalar, fibröz başlığın zayıflamasına ve buna bağlı olarak aterosklerotik plağın çatlamasına neden olur.

2.8. Lipoproteinler ve Genel Özellikleri

Lipoproteinler, trigliserid, fosfolipid ve kolesterol vb. gibi lipid veya türevlerinin proteinlere kovalent veya kovalent olmayan bağlarla bağlanması sonucu oluşan biyokimyasal bileşiklerdir. Lipidlere bağlanarak lipoproteinleri oluşturan proteinler, bir bütünün parçası olmalarından dolayı apolipoprotein diye adlandırılırlar. Elektroforetik hareketliliklerine, yoğunluklarına, lipid ve apolipoprotein içeriklerine göre lipoproteinler 6 sınıfa ayrılmıştır; şilomikron (ŞM), çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL), düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL), orta yoğunluklu lipoprotein (IDL), yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) ve lipoprotein (a) [Lp (a)]. Lipoprotein tabakası, dışta serbest kolesterol içeren fosfolipid tabakası ve bu tabakayı çevreleyen apolipoproteinlerden meydana gelmektedir. Çekirdek kısmında trigliserid ve ester kolesterol gibi apolar lipidleri içerir. Lipitler tek başlarına suda çözünmezler, fakat lipoproteinler yapısında bulunan apolipoproteinlerin kısmen hidrofobik, kısmen hidrofilik olmasından dolayı, suda çözünürlük özelliği kazanarak kanda taşınımaları mümkün olabilmektedir.

2.8.1. Şilomikron

Şilomikronlar; çapı en büyük, yoğunluğu en az ve trigliserid içeriği en fazla lipoproteindir. Şilomikronlar, ince bağırsağın emici epitel hücrelerinin düz endoplazmik retikulumunda sentezlendikten sonra eksositoz yoluyla lenfatik sisteme geçerler, daha sonra juguler venden kan dolaşımına katılırlar. Şilomikronlar diyet ile alınan besinsel yağ, kolesterol ve kolesterol esterleri... vb gibi trigliseridleri barsaklardan dokulara taşırlar. Trigliseridlerin lipoprotein lipaz ile hidrolizi sonucu oluşan şilomikron kalıntıları ester kolesterol yönünden zengindir, trigliserid içeriği azalmıştır. Şilomikron kalıntıları lenfatik sistem ile kana verilir ve ardından karaciğere gelerek katabolize edilir. Barsaklarda sentezlenen şilomikronlar 12 saatlik açlıktan sonra dolaşımda bulunmazlar.

2.8.2. Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein (VLDL)

Şilomikronlardan daha küçüktürler. Kolesterol ve trigliseritleri ilgili hücrelerden alarak vücutta bunlara ihtiyaç duyan hücrelere taşımakla görevlidirler. Diyetle alınan fazla miktardaki karbohidrat ve yağ asitleri karaciğerde “çok düşük

yoğunluklu lipoprotein” metabolizması ile trigliseridlere dönüşür ve VLDL şeklinde dolaşıma verilir. Karaciğerden sistemik dolaşıma verilen VLDL kas ve adipoz dokuya taşınır. Lipoprotein lipazın apoC-II ile aktivasyonu sonucu VLDL trigliseridleri serbest yağ asitlerine parçalanır. Serbest yağ asitleri adipositlerde trigliseridlere dönüşürken, miyositlerde okside olurlar.

2.8.3. Orta Yoğunluklu Lipoprotein (IDL)

Karaciğerden dolaşıma verilen VLDL’ de bulunan trigliserit ve kolesterin esterlerinin hidrolizi ile oluşan plazma lipoproteinidir. 1,006-1,019 g/cm³ yoğunluğa sahip IDL’lerin çapları 25-35 nm arasında değişmektedir. Pek çok VLDL kalıntısı dolaşımdan hepatositlerle uzaklaştırılır.

2.8.4. Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein (HDL)

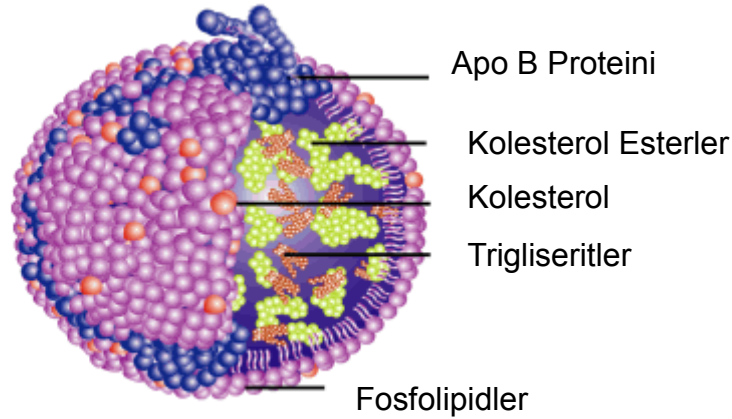
Yapısında az miktarda kolesterol bulunan, proteince zengin lipoproteinlerdir. LDL’lerden daha küçüktürler HDL en küçük lipoprotein olmasına rağmen içerdikleri yüksek miktardaki proteinden dolayı yoğundurlar. Protein içeriğinin yaklaşık %70’ini Apolipoprotein A-I (apo AI), %20’sini apoA-II oluşturur. Karaciğerde ve ince bağırsak duvarında fosfolipidler eşliğinde sentezlenen HDL, diskoidal şekillidir. Disk şeklinde yassı bir görünümde olan HDL, diğer lipoproteinlerin aksine vücuttaki dokulardan karaciğere kolesterol taşıdığı için, ters yönde kolesterol taşınımından sorumludur. Yakınından geçtikleri ekstrahepatik dokuların membranlarından aldığı kolesterolü plazmada bulunan lesitin kolesterol açıl transferaz (LCAT) enzimi ile esterleştirerek kolesterol estere dönüştürür. Yeni sentezlenen ve kan dolaşımına salıverilen HDL, dolaşımdaki diğer lipoproteinlerden kolesterol esterlerini toplar ve küre şekilli olgun HDL şekline dönüşür. HDL arterlerde oluşan ateromdaki kolesterolü alıp vücuttan atılmak üzere karaciğere taşıdığı için, ateroskleroza karşı koruyucu role sahiptir. Bundan dolayı, HDL, “iyi kolesterol” olarak da adlandırılır.

2.8.5. Lipoprotein (a)

Yapısında 514 kD ağırlığında yüksek glikolize bir protein olan apo (a) ve apo B-100 bulunur. Lipid bileşimi bakımından LDL’ ye benzer. Aterojenik bir protein olup intimada aterosklerotik plak oluşumunda rolü olduğu bilinmektedir. Tekrarlayan ve plazminojen ile homoloji gösteren kringle benzeri yan zincire sahiptir. Bu yan zincir endotelial plazminojen reseptörüne bağlanmak için yarışır ve tromboz oluşumuna neden olabilir [29].

2.8.6. Düşük Yoğunluklu Lipoprotein (LDL)

Dolaşımdaki başlıca kolesterol taşıyıcı moleküldür. Plazmadaki kolesterolün yaklaşık %70' i LDL tarafından taşınır. Eser miktarda apo E dışında protein içeriğinin %95' ini apo B-100 oluşturur (Şekil 2.6.). LDL' nin hemen hemen tümü VLDL' nin lipolizi sonucunda oluşur. LDL partiküllerinin yoğunluğu 1,019 g/mL ile 1,063 g/mL arasında değişmektedir. Düşük yoğunluklu lipoproteinler farklı büyüklükte ve yoğunlukta, farklı yapı ve fizikokimyasal kompozisyona sahip heterojen partiküllerdir [30]. LDL partiküllerinin çapı ortalama 22 nm' dir. Molekülün çekirdek kısmı yaklaşık 170 trigliserid ve 1600 ester kolesterol molekülü içerirken, çekirdek etrafındaki tabaka ise yaklaşık 700 fosfolipid molekülü ve bir tek apo B-100 molekülü içerir. Bunlara ilaveten 3' te 1' i çekirdekte, 3' te 2' si yüzeyde olmak üzere yaklaşık 600 serbest kolesterol molekülü yer alır. Molekülün başlıca fosfolipid bileşenleri fosfotidil kolin (\cong 450 molekül/LDL) ve sfingomiyelindir (\cong 185 molekül/LDL). Ayrıca LDL partikülleri lizo-fosfotidil kolin (\cong 80 molekül/LDL), fosfotidil etanolamin (\cong 10 molekül/LDL), diaçilgliserol (\cong 7 molekül/LDL), seramid (\cong 2 molekül/LDL) ve fosfoinozitol moleküllerini de içerir [30].



Şekil 2.6. LDL yapısal görünümü

Lipidlerin yanında LDL α -tokoferol (\cong 6-7 molekül/LDL) gibi lipofilik antioksidanları da yapısında bulundurur. α -tokoferol yanında eser miktarda γ -tokoferol, karotenoid, oksikarotenoid ve ubikinol-10 içerir. LDL partikülleri dinamiktir, yapıları ve fiziksel özellikleri sahip oldukları lipidlerin ve apo B-100' ün konformasyonuna bağlıdır. LDL molekülünün yapısı şekil 2.6'da gösterilmiştir.

Dokularda lipoprotein reseptörleri ile etkileşim için ligand olarak görev yaparlar. Ekstrahepatik dokular, ApoB-100'ü tanıyan spesifik yüzey reseptörlerine sahiptirler. ApoB-100'ü tanıyan reseptörler, kolesterol ve kolesterol esterlerinin dokular tarafından alınmasına aracılık ederler. Apo B-100, 4536 amino asit içeren, büyük, monomerik bir proteindir. LDL' nin yapısal bütünlüğünün korunmasında ve diğer moleküllerle etkileşimlerinin kontrolünde görev alır. Apo B-100' de birkaç fonksiyonel domain belirlenmiştir. LDL reseptörüne 3359. ve 3369. amino asitler arasında yer alan bölge üzerinden bağlanır. Molekülün N-terminaline lipoprotein lipazın bağlandığı düşünülmektedir. Pozitif yüklü lizin ve arginin amino asitlerinin glikozaminoglikanlarla etkileştiği bilinmektedir, dolayısıyla lizin ve arginin matriks-LDL etkileşimlerini kontrol eder [30].

2.9. LDL Oksidasyonu

LDL oksidasyonu, LDL yapısındaki doymamış yağ asitlerinin lipid peroksidasyonu ile yıkılarak, birçok aldehitin ve diğer peroksidasyon ürünlerinin oluştuğu bir serbest radikal reaksiyonudur.

LDL'nin oksidasyonu hücre içinde ve dışında yer alan çok karışık bir reaksiyon dizisine sahip bir işlemdir. LDL yapısındaki kolesterol ve doymamış yağ asitleri serbest radikal oluşturma eğilimine sahiptirler. Oksidasyon, LDL fosfolipid yapısındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu ile başlar. Reaksiyon sırasında oluşan konjuge dien, hidroperoksit ve pek çok ara ürün, reaksiyon sonucunda alkan ve reaktif aldehitlere dönüşerek, oksidasyon tamamlanır.

LDL oksidasyonu esas olarak endotel hücreler ve aktif lökositler tarafından fazla miktarda reaktif oksijen ürünlerinin üretildiği arter duvarı subendotelial alanında meydana gelmektedir. Dokumakrofajları, endotel ve düz kas hücreleri ise, lipid peroksidasyonunun özellikle gözlemlendiği hücre tipleridir.

Yapılan çalışmalarda, aterosklerotik plaklardan izole edilen LDL'nin üzerinde yapılan araştırmalarda LDL'nin biyolojik yapısının değiştiğini ve okside LDL'ye benzeyen yapı ve biyolojik özelliklerinin olduğu saptanmış ve aterosklerotik plaklarda okside LDL'nin biriktiği gösterilmiştir.

Lipid peroksidasyonu, LDL'nin hücre kültürü ortamında hiçbir başlatıcı içermeden sadece geçiş metalleri ile örneğin Fe^{+2} ve Cu^{+2} gibi iyonlarla belli bir süre okside olması sonucu *in vitro* olarak gözlemlenebilir. Yapılan araştırmalar sonucunda okside

olmuş LDL'nin oksidatif strese yatkınlığı olduğu saptanmıştır. Oksidasyon işleminin üç basamaktan oluştuğu düşünülmektedir.

1. Antioksidanların miktarının azaldığı lag fazı
2. Hızlı lipid peroksidasyonunun oluştuğu ilerleme (propagasyon) fazı
3. Son basamak ise dekompozisyon fazı olarak adlandırılır. Fosfolipid yapısındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin yaklaşık % 80' inin okside olması sonucu olarak Hexanal, 4- hidroksinonemal ve MDA son yıkım ürünleri olarak ortaya çıkmaktadır.

Oksidatif reaksiyonların tamamlanmasıyla, okside olmuş LDL parçacıkları kemotaktik, sitotoksik ve immünojenik özellik gösterirler. Özellikle yapılan çalışmalarda son ürün olarak ortaya çıkan MDA ve 4- hidroksinonemal bağlanmış LDL parçacıklarının antijenik özelliğe sahip olduğu saptanmıştır. Hatta MDA, apoB100 apolipoproteininin lizin kalıntılarına bağlanarak immünojenik özellik kazanmasına neden olmakta ve lizin kalıntısındaki pozitif yüklü amino grupları ile reaksiyona girerek Schiff bazlarını oluşturmaktadır. Bu şekilde de LDL daha da negatif yüklü hale gelmektedir.

Plack ve arkadaşları 2001 yılında yaptıkları çalışmada, Okside LDL'nin sitokinlerin ve adezyon moleküllerinin özellikle VCAM-1'in ekspresyonunu arttırdığı gözlenmiştir. Hidroksil radikalleri gibi ox-LDL de vasküler hücreler için sitotoksik etki göstererek doku hasarını tetikleyen lizozomal enzimlerin ve lipidlerin salınımında etkili olabileceğine katkıda bulunmuşlar ve ayrıca endotel hücrelerde PAI-1 seviyesini, hem endotel hücrelerde hem de makrofajlarda doku faktörü seviyesini yükselterek koagülasyona eğilimi arttırdığından bahsetmişlerdir [31].

2.10. Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türleri

Yapılarındaki elektron fazlalığı veya eksikliği nedeniyle yüklü olan ve bundan dolayı kimyasal olarak aktif atom veya moleküller; rastladıkları herhangi bir molekül ile etkileşime girerek bu molekülden elektron alan ya da ona bir elektron veren moleküllere "serbest radikaller" denilmektedir [32].

Serbest radikaller vücuttaki her molekülden kolayca elektron alabilir ya da verebilir. Bunun sonucunda, proteinleri denatüre olabilir, nükleik asitlerde kopmalar sonucu mutasyonlar meydana gelerek doku hasarına sebep olacak şekilde membran yapı ve fonksiyonunu değiştirebilir. Son yıllarda yapılan araştırmalardan elde edilen

sonuçlar, serbest radikal hasarlarının başta kanser olmak üzere amfizem, kardiyovasküler ve inflamatuvar hastalıklar gibi hayati öneme sahip birçok hastalığa neden olmaktadır [33, 34].

Normal koşullar altında biyolojik sistemlerde yaşamın devamı için gerekli olan ATP üretmek için moleküler oksijen bir dizi reaksiyon sonucunda su ve karbondioksite indirgenir. İndirgeme olayı bir dizi basamaktan meydana gelmektedir. Bu sırada moleküler oksijende meydana gelen kaçak, süperoksit anyonu, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali gibi reaktif oksijen türlerinin oluşumuna neden olur.

Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot-}$),

Hemen hemen tüm aerobik hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu süperoksit anyon radikali ($O_2^{\cdot-}$) meydana gelir. Diğer radikallere göre reaktivitesi daha azdır ve genellikle kendisi direkt zarar vermez. Süperoksit radikalinin doku hasarı oluşturmasındaki esas tehlike hidrojen peroksit kaynağı ve aynı zamanda geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır.

Hidrojen Peroksit (H_2O_2),

H_2O_2 (Hidrojen Peroksit) süperoksit radikalinde meydana gelmektedir. Speroksidin dismutasyonu reaksiyonu ile iki süperoksit molekülü iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni oluşturur. Aslında hidrojen peroksit serbest radikal olamamasına rağmen serbest radikal biyokimyasında önemli bir yere sahiptir. Çünkü eğer ortamda süperoksit radikalinin ($O_2^{\cdot-}$) varsa, Haber-Weiss reaksiyonu sonucu en reaktif serbest oksijen radikali olan hidroksil radikalini (OH^{\cdot}) oluşturur [35].

Hidroksil Radikali,

Hidrojen peroksidin, geçiş metalleri veya süperoksit radikalinin varlığında indirgenmesiyle meydana gelen hidroksil radikali (OH^{\cdot}), yarılanma ömrü çok kısa olan, en reaktif ve toksik hidroksil radikalidir. Aynı zamanda, suyun iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda da hidroksil radikali oluşabilmektedir. Hidroksil radikali, hücre membran yapısında bulunan doymamış yağ asitleri ve esterleri ile reaksiyona girerek lipit peroksitlerin ve endoperoksitlerin oluşturur.

Singlet (Tekli) Oksijen,

Singlet oksijen radikali normalde serbest radikal olmamasına rağmen radikal reaksiyonları sırasında açığa çıktığı için serbest oksijen radikali olarak kabul edilir. Bir oksijen molekülü dış ortamdan enerji absorpsiyonu ile uyarılması durumunda; dış spinde bulunan elektronlar, spinlerini değiştirerek ayrı ayrı ya da aynı orbitali işgal edebilir. Bu iki forma singlet oksijen adı verilmektedir.

Nitrik Oksit (NO-),

Tek sayıda elektron içeren ve hücrel haberleşmede görevli renksiz gaz yapısındaki ilk serbest radikaldir. NO hücrede enzimatik veya non-enzimatik olarak üretilir. Omurgalı canlılarda, nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi ile enzimatik olarak oluşturulurken; non-enzimatik olarak ultraviyole ışığın etkisiyle hücre içi depolarından da serbest kalabilir [36].

2.11. Reaktif Oksijen Metabolitlerinin Kaynakları

Hücrede yaşamsal faaliyetlerin sürmesi için gerekli olan birçok enzimin katalitik aktivitesi, mitokondriyal elektron transportu gibi faaliyetler elektron transferi içerir. Bu elektron transferleri sırasında serbest radikaller yan ürün olarak oluşur ve enzimlerin aktif yerinden sızarlar. Ortamdan sızan serbest radikaller, kazara moleküler oksijen ile birleşmeleri durumunda serbest oksijen radikalleri oluşur. Bu radikallerin hücrelerdeki kaynağı mitokondriyal elektron transport zincirinden kaynaklanan sızıntıdır [37].

2.12. Serbest Radikallerin Organik Moleküllere Etkileri

Serbest radikallerin nükleik asit ya da DNA'yı etkilemesi baz modifikasyonları ve zincirde kırılmalara bağlı olarak hücrel gelişimde aksaklıklara veya mutasyonlara sebebiyet verebilir. İyonize radyasyon ya da hücrel toksik etkisi olan çeşitli kimyasallar serbest radikaller meydana getirerek DNA yapısında hasara yol açabilirler. Bunun dışında DNA'da bir hasar olması durumunda devreye giren tamir mekanizmalarında da hasar meydana getirebilirler. DNA'yı etkileyen serbest radikaller kanser gibi hastalıklara da yol açabilmektedir [38, 39].

Serbest radikallerin kükürt içeren veya doymamış aminoasitlere reaktivitesi yüksektir. Bunun sonucunda; protein denatürasyonu, çapraz bağlanma ya da enzim inhibisyonu gibi istenmeyen durumlar meydana gelebilir. Serbest radikaller, triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi aminoasitleri kolaylıkla

etkileyerek kimyasal değişikliklere ortaya çıkmasına neden olurlar. Glutatyon redüktaz, gliseraldehit 3 fosfat dehidrogenaz ve papain gibi enzimlerin aktivitesi yukarıda sayılan aminoasitlere bağlıdır. Bu enzimler radikallere maruz kalmaları durumunda inhibe olarak aktivitelerini kaybederler [40]. Ayrıca, protein yapısında meydana gelecek denatürasyonlar, immun sistemi uyarabilir.

Serbest radikaller hücre komponentleri ile etkileşmek için hücre membranını geçmek zorundadırlar. Hücre zarında bulunan membran kolestrolü ve doymamış yağ asitleri serbest radikallerle reaksiyonu girdikleri zaman; radikalın etkisiyle doymamış yağ asitleri yıkılır ve peroksidasyona uğrarlar [41].

Lipit peroksidasyonu sonucunda, malondialdehit ve hidroksinonenal gibi aldehit ya da karbonil bileşikleri meydana gelir. Bu ürünler de proteinlere ve DNA'ya bağlanarak hücrede kalıcı hasarlara yol açarlar.

2.13. Aterosklerozda Oksidatif Stresin Rolü

Stres, sigara, yemek yeme alışkanlıkları, yaşlılık, heterojenik shear stres, hiperkolesterolemi, diyabet..vb. sonucu vücutta oksidatif strese neden olan serbest radikallerin üretimleri artmaktadır [42]. Bunun sonucunda da; oksidatif stres sırasında, kalsiyumun hücre içine girmesi ile düz kas hücreleri ve monositlerde disfonksiyon gelişir. Yapılan çalışmalar, oksidatif stres sonucu oluşan reaktif oksijen türleri (ROS) aterosklerotik plak oluşumu ve gelişiminde önemli rol oynadığını göstermektedir [43]. Vücuttaki ROS miktarının artmasına bağlı olarak, aterom plağın fibröz kalınlaşması artar veya yırtılır ve tromboz gelişimi hızlanır. ROS un sebep olduğu, lipitlerin oksidasyonu, adezyon moleküllerinin ekspresyonu, endotelde apoptosisin uyarılması..vb. ateroskleroz oluşumu ve gelişimi için önemli bir risk faktörleridir.

Vasküler sistemde endotel, düz kas hücreleri ve makrofajlar tarafından üretilen ROS, NO ile reaksiyona girer ve bunun sonucunda peroksinitrit oluşur. Peroksinitrit hidroksil radikalini oluşturarak doku ve hücreler üzerinde toksik etki gösterir. Bu da, ateroskleroz oluşumunu tetikler. Normalde ROS dokularda normal hücre fonksiyonu olarak üretilmesine rağmen, üretiminin artması ateroskleroz gibi vasküler hastalıklara neden olur [44, 45].

Yapılan çalışmalar yukarıda da bahsettiğimiz hipertansiyon, sigara, diyabet gibi aterosklerotik risk faktörlerinin yanı sıra, TNF- γ , interferon- γ , interlökin-1-6 ve

anjiotensin II (AT II) gibi ateroskleroz oluşumuna öncülük eden moleküller, yüksek seviyede LDL, özellikle ox-LDL'nin de ROS üretimini arttırdığını göstermektedir [46]. ROS üretimi LDL oksidasyonu, endotelial hücre disfonksiyonu, vasküler düz kas hücre proliferasyonu, monosit migrasyonunda etkisini gösterir. Aterosklerotik plağı oluşturan bu unsurlarda ROS'un etkisi ile aterogenez sürecini hızlandırır [47].

Yapılan çalışmalar, aterosklerozlu hastalarda okside LDL'nin (ox-LDL) plazma seviyesinde artış olduğu belirtilmiştir. Aterosklerotik süreçte; ox-LDL endotelial hücreleri aktive ederek, bölgeye monosit toplanmasını ve bu monositlerden birçok büyüme faktörünün salınımını tetikler. ox-LDL'nin etkilediği vasküler düz kas hücreleri yüksek miktarda proliferasyon gösterirler ve aynı zamanda ox-LDL, endotelial hücrelerdeki ekstraselüler matriks oluşumunu artırır [48].

Tüm bu olumsuzluklara karşın, normal koşullarda, oksidatif strese karşı hücrenin homeostazisini devam ettirmek için pek çok hücrenel enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan sistem vardır. Ancak, ROS üretiminin antioksidan sistemini yenmesi durumunda oksidatif stres oluşur. Bunlardan, SOD, katalaz, glutatyon peroksidaz enzimatik; E ve C vitaminleri, glutatyon, ürik asit ise enzimatik olmayan antioksidan sistemlerdir [49].

2.14. Aterosklerozda Okside-LDL ve Lipid İlişkisi

LDL'nin oksidatif modifikasyonu endotelin aktivasyonunu etkileyerek biyolojik karakterinin değişmesine neden olur. Ox-LDL, makrofajlardan makrofaj koloni stimulan faktör (M-CSF) ve monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1) serbestleşmesini sağlayarak bölgeye monositlerin toplanmasını ve buna bağlı olarak yağ çizgi lezyonlarının oluşturmaktadır. Bu sırada, ROS da endotelin fonksiyonunu kaybederek arter duvarında inflamasyona yol açar. Arter duvarında monosit kökenli makrofajların birikmesinden sonra, kolesterol esterleri hücre içinde birikerek köpük hücre oluşumu gerçekleşir. Bunlarda aterosklerozun başlaması ve ilerlemesini sağlar [50, 51].

Miyoshi ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada insan düşük dansiteli lipoproteinlerinde sitotoksik 9-oxononanoyl secosterol aldehitlerin ortaya çıkararak elde edilen tüm yapılar sıvı kromatografisi ve kütle spektroskopisi yöntemleri kullanılarak elde edilmesi sağlanmıştır. Elde ettikleri bulgulara göre 9-ON-secoA ve-B kanser, diyabet, ateroskleroz ve nörodejeneratif hastalık gibi çeşitli

inflamasyon ile ilişkili hastalıkların gelişiminde önemli rol oynayabileceğini düşündürmektedir [52].

Biyolojik sistemi anlayabilmek için 20 farklı aminoasitin farklı dizilimlerinden oluşan proteinlerin tek tek dizilimi, fonksiyonu, aktif bölgesi, işlevi, modifikasyonları, hücre içindeki yeri ve görevini bilmek gerekmektedir. Tüm bunları anlayabilmek için de protein kimyası hakkında oldukça geniş bir bilgiye sahip olmak gerekmektedir [53]. Protein kimyası, protein yapısı ve fonksiyonlarını fiziksel biyokimya veya mekanistik enzimoloji alanları altında inceler. Protein kimyası çalışmalarında tek bir protein incelenir ve yapısı ile fonksiyonu arasındaki bağlantılar incelenmektedir. Bir protein sistemindeki tüm proteinlerin yapıları incelenerek buldukları sistemdeki görevleri bu yapılar ile ilişkilendirilir. Kısacası tek bir yapı ve davranışları incelenmektedir. Böylece biyolojik sistemin yapıları ve işlevleri tanımlanabilir.

Günümüzde yapılmakta olan çalışmalarda asıl hedef hastalık yinelenmesinin erken dönemde saptanmasını sağlayacak biyolojik reseptörlerin belirlenmesi ve bunların diagnostik görüntüleme ile nasıl birlikte kullanılacağına anlaşılması sayılabilir. Bir biyolojik reseptör (belirteç) fizyolojik veya patolojik bir durumu gösteren biyolojik bir parametredir. Reseptör, sinyal alış-verişinde yer alan protein kapısında, hücre dışındaki bir sinyali hücre içine taşıyan yapılardır. Bir başka deyişle hücre dışındaki bir protein veya taneciğin hücre içine girmek için hücre zarında bağlandığı bir moleküldür. Hücreye bağlanan şey, bir protein (örneğin kolera toksini), bir virüs (örneğin HIV) veya bir lipoprotein taneciği olabilir (örneğin LDL). Sinyalin bir biçimden başka bir biçime dönüşmesini sağlayan protein hücre dışında olabileceği gibi hücre içinde de yer alabilir. Reseptöre bağlanan hücre dışındaki moleküle ligand denir, bu bir peptit (örneğin bir nörotransmitter), bir hormon, bir ilaç veya bir toksin olabilir, Bu bağlanma olunca reseptör biçimini değiştirir ve hücresel bir tepki meydana gelir. Hücre büyümesi uyarı alan ajanın spesifik reseptörlere bağlanmasıyla başlar. Reseptör proteinleri hedef hücrenin sitoplazmasında, hücre yüzeyinde veya nükleusunda olabilir. Üç tip hücre yüzey reseptörü hücre büyüme ve gelişmesinde önemlidir. Bu reseptörler ile alınan uyarı, uyarı iletim aracılığıyla nükleusa iletilir. Son birkaç yıl içerisinde yapılan çalışmalar, okside LDL bulunan ve aynı zamanda apoptotik hücrelerin zarında okside bulunan fosfolipitlerin ligandlarla bağlandığını kanıtlar niteliktedir [54]. Brown ve Goldstein,

yaptıkları çalışmada makrofaj temizleyici reseptörleri (SR), hücrel kolesterol içeriği ile inhibe olmayan mekanizmalarla LDL modifiye edilmiş formlarını geliştirebildiklerini göstermiştir. Okside LDL alımı ile değiştirilmiş lipoproteinlere ek olarak bu proteinler, apoptotik hücrelerin boşluklarını düzenlemek, sinyal iletimini başlatmak ve patojenler için tanıyıcı reseptör olarak işlev görmektedirler [55].

2.15. Protein Saflaştırılması ve Karakterizasyonu

İlgi duyulan veya araştırılmak istenen bir proteinin işlevi, mekanizması ve diğer proteinlerle etkileşiminin anlaşılması için öncelikli olarak mutlaka proteinin saflaştırılması ve karakterize edilmesi gerekmektedir. Protein saflaştırması, bir karışımdan tek bir tip proteini izole etmek için; canlı bir hücrenin ekstrakte edilip biyolojik aktivite kaybı olmaksızın, protein izolasyonunun yapılmasıdır. Proteinlerin büyüklüğü, yükü, suda çözünebilirlikleri farklı olduğundan tek bir metodla izole edilemezler. Bunun için bir dizi işlem yapılması gerekmektedir. Bunun için; ilk basamak hedeflenecek ya da izole edilecek protein kaynağının seçilmesidir. Protein kaynağı genellikle biyolojik doku, hücre veya mikrobiyal kültürdür. Bu işlemden sonraki ekstraksiyon basamağında; hücre mekanik (sonikasyon, homojenizasyon), fiziksel (dondurup/ çözdürme) veya kimyasal (deterjanlar, organik çözücüler, lizozim) tekniklerden biri veya birkaç kullanılarak parçalanabilirler. Ekstraksiyon basamağındaki başarı, özellikle tampon seçiminin doğru yapılmasına bağlıdır. Proteoliz ekstraksiyondan sonra ve saflaştırma işleminin tümünde önemli bir problemdir ve bunun engellenmesi için proteaz inhibitörleri kullanılır.

Saflaştırma işleminin daha iyi sonuçlanması ve hedeflenen proteinin istenilen şekilde saflaştırılması için ön saflaştırma işlemlerinin uygulanması etkili sonuçlar vermektedir. Bu amaçla ultrafiltrasyon ve diyaliz yöntemleri kullanılabilir. Saflaştırma işlemi proteinlerin, büyüklük, kütle, şekil, polarite, çözünürlük ve affinite gibi özelliklerinden yararlanılarak yapılabilir.

2.15.1. Protein Karakterizasyonu

Biyolojik reseptörleri (belirteç) saptama işlemi; biyolojik reseptör proteinlerinin eldesi ve saflaştırma aşamalarını içeren basamaklardan oluşmaktadır. Bu amaçla iki boyutlu (2D) jel elektroforezi, görüntüleme analizi, kütle spektrometresi, amino asit dizi analizi ve biyoinformatik gibi gelişmiş tekniklerin biri yada birkaçı birlikte kullanılmaktadır.

2.15.2. Protein Analiz Yöntemleri

2.15.2.1. 2D Jel Elektroforezi

Özellikle son yıllarda, proteinler üzerine yapılan çalışmaların artması sonucu, daha hassas yeni cihazlara ihtiyaç duyulmuş ve bu durumda da yeni yöntem ve cihazların keşfedilmesine olanak sağlamıştır. Bundan dolayı, iki boyutlu jel elektroforezi 1975 yılından beri protein tayinleri için kullanılmaktadır [56]. İki boyutlu jel elektroforezi özellikle kompleks protein ve karışımları farklı özelliklerine göre birbirinden ayırmayı ve bunların karakterizasyonunu sağlayan elektroforez yöntemidir. Bu yöntem ile proteinler birinci boyutta yüklerine göre ayrılırken, ikinci boyutta moleküler kütlelerine (Dalton) göre ayrılmaktadırlar.

Zhau ve arkadaşları, 2002 yılında yaptıkları çalışmada geleneksel 2D jel elektroforez yöntemini diferansiyel in jel elektroforez yöntemi (DIGE) ile birleştirerek proteomiks analizleri için yeni bir method önermişlerdir. Çeşitli boyalı kimyasallarla etiketlenmiş proteinle, karıştırılarak, 2D jel analizi ile ayrılmışlardır. Ardına uygulanan 2D DIGE lazer yakalama tekniği, kanser hücrelerinde ve normal epitel hücrelerdeki protein ekspresyonundaki farklılıkları ölçmek için uygulanmıştır. Zhau ve arkadaşları, kansere özgü ve normal spesifik protein belirteçlerini bu şekilde tanımladıklarını belirtmişlerdir. Hatta bu tanımlama işleminden sonra çalışmalarına kütle spektroskopisini de birleştirerek kansere spesifik protein belirteçlerinin birebir kimlik karakterizasyonunu moleküler boyutta yapabildiklerini belirtmişlerdir [57].

2.15.2.2. Kütle Spektroskopisi

Teknolojinin gelişmesiyle, protein analizlerinin hızlı yapılması ve daha hızlı bir şekilde sonuca gidilebilmesi için yeni sistemler geliştirilmiştir. Bu alanda yapılan en büyük gelişmelerden bir tanesi; kütle spektrometresi (MS) yöntemidir. MS yönteminde, moleküllerin molekül ağırlıklarının analizi, elektrik veya manyetik alanda yüklenmiş parçacıkların hareketine dayanmaktadır. Kütle spektrometresi (MS); bir iyon kaynağı, kütle analizör ve detektör olmak üzere temel olarak üç bileşenden meydana gelmektedir. Bu yöntemde, analiz edilecek maddelerin kütle/yük oranlarını tespit edilerek proteinin kütlesi ve buna bağlı olarak da bu kütleyle sahip protein tanımlanır. MS yöntemi ile hem ayrıştırılmış proteinlerin tanımlanması hem de direkt kompleks biyolojik örnekler kullanılarak da proteinler tanımlanabilmektedir.

2000'li yılların başından beri protein tanımlamalarında kullanılan analiz yöntemleri birleştirilerek kullanılmaya başlanmıştır. Khoo ve arkadaşları, yaptıkları 2012 yılında yaptıkları bir çalışmada; ekmek buğdayındaki erken mayoz dönemini araştırmışlardır. 2D elektroforez yöntemi ile beş farklı şekilde eksprese olmuş protein noktalarını belirledikten sonra elde ettikleri jel protein noktalarını çeşitli çözücüler yardımıyla ayrıştırarak, kütle spektroskopisi yardımıyla, peptid dizilimlerini belirlemişlerdir. Yaptıkları çalışma sonucunda buğday specule tipi POZ protein, TaSF21 benzeri proteini, heksoz taşıyıcı olan TaHSP70 ile kısmı uzunluktaki bir diğer heksoz taşıyıcı proteininin karakterize ettiklerini rapor etmişlerdir [58]. Kütle spektrometrisi, tüm elementlere kolay uygulanabilirliği, yüksek hassasiyeti ve gözlenebilme limiti olması gibi pek çok avantaja sahiptir. Katı-sıvı-gaz her tip örneğe uygulanabilir ve yüksek ayırma gücündeki cihazlarla kombine edilerek kullanılan etkin bir yöntemdir.

Kütle spektroskopilerinde elektron bombardımanlı iyonlaştırıcılar kullanılarak sadece uçucu örnekler analiz edilebiliyordu. Desorpsiyon/iyonlaştırılmalı tekniklerin geliştirilmesi, uçucu olmayan veya ısıl kararlılığı düşük olan türlerin de analiz edilmesini mümkün kılmıştır.

2.15.2.3. Matriks yardımcı-Lazer Desorpsiyon/İyonlaştırma-Kütle Spektrometresi (MALDI-MS)

Kütle spektrometresinde kullanılan, MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation) iyonizasyon yöntemi 1988 yılında Franz Hillenkamp ve Michael Karas tarafından geliştirilmiştir. MALDI; Protein, peptid, şeker gibi biyomolekülleri ve polimeri dendrimer gibi diğer organik molekülleri oldukça duyarlı bir biçimde, iyonize ederek analiz eden bir yöntemdir [59].

MALDI, yönteminde analiz edilecek molekül ışığı absorbe eden bir matrikse yerleştirilir. Analiz edilecek molekülün yüzeyden kopma ve iyonizasyonu için gerekli enerjiyi lazer kaynağından sağlanır. Matriks, bir yandan iyonizasyonu kolaylaştırırken, diğer yandan molekülü direk lazer atışının tahribinden korur. MALDI yönteminde gerekli enerji bir lazer kaynağından sağlandığı için, iyon ayırıcı kütle analizörü kullanılır. Kullanılan kütle analizörü, numuneden kopan iyonların ağırlıklarıyla doğru orantılı bir süre içerisinde detektöre ulaşmasını sağlayan "time of flight" (ToF) analizördür [60].

Kütle spektrometresinde MALDI-ToF-MS yönteminin dışında MALDI'ye göre daha kompleks bir yöntem olan Elektrosprey iyonizasyon (ESI) tekniği de kullanılmaktadır. ESI yöntemi yüksek voltaj ve atmosferik koşullarda gerçekleştirilmektedir. Bunun için; analiz edilmek istenen örnek ve çözücü ince kapillere verilir ve yüksek voltaj ve vakum koşulu altında; yüklü peptidler kütle/yük oranlarına göre elektrik alanında ayrışırlar.

MALDI-ToF/MS yöntemi hem birçok iyonlaştırma tekniğine göre daha hassas hem de 100.000 kDa' a kadar kütleyle sahip örneği analiz edebilir. Yöntemin ağırlıklı olarak kullanılmasının diğer bir nedeni de çok hızlı sonuç vermesi ve çok az örnekle bile sonuç vermesidir [60]. İki boyutlu jel elektroforezi yönteminin kütle spektrometresi temelli sekanslama metodu (2D-MS) ile birlikte kullanılması, protein analizinde ekonomik ve etkin bir yöntemdir. Buna rağmen günümüzde protein örnekleri 2D ile analiz edilirken; MALDI-ToF-MS sistemi ile tanımlanmaktadır.

Barcelo-Batllori ve arkadaşları, MALDI tabanlı kütle spektrometresi ile İBH (İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı) hastaları ve İBH olmayan sağlıklı kontrollerde intestinal epitelyum hücrelerinde sitokin etkisi ile protein ekspresyon düzeylerini karşılaştırmış ve İBH'lı hastalarda sitokinlerin triptofan metabolizmasına katılan indoleamin 2,3- deoksijenaz enzimi etkisini artırdığını gözlemişlerdir [61].

Çelikbıçak ve arkadaşları 2012 yılında yaptıkları çalışmada, MALDI yöntemi kullanarak herhangi bir parçalama yöntemine ihtiyaç duymadan biyomolekülleri ve kovalent olmayan kompleks yapıların molekül ağırlıklarını tayin etmeye çalışmışlardır. Küçük moleküllerin analizini yaparken çok fazla matriks kullanılmasından dolayı 1-800Da arasında düşük kütle aralıklarında yoğun fragmanlı iyon ve kümelerin oluştuğu dikkatlerini çekmiştir. Bu olumsuzluğu gidermek için modifiye edilmiş nano tabanlı yüzeyler sayesinde aşırı matriks kullanılmasını ortadan kaldırarak, MALDI tekniğiyle küçük moleküllerin de belirlenebildiğini göstermişler [62].

2.16. Ateroskleroz Tedavisinde Yeni Yaklaşımlar

2.16.1. Nanoteknoloji ve Nanotıp

Bir nanometre, bir milimetrenin milyonda biri olarak tanımlanmaktadır. Nano ve makro boyutu kıyaslayacak olursak; nanoboyutta bir malzemenin büyüklüğü bir

futbol topunun dünyaya göre büyüklüğü kadardır. Nanoteknoloji, ultra küçük maddeler ile çalışarak, nanometre ölçeğinde malzeme üretimi, moleküler modelleme ve fonksiyonlaştırma olarak tanımlanabilir.

Nanoteknoloji içerisinde fizik, kimya, biyoloji, mühendislik, elektronik, tıbbi bilimler vb. gibi alanları barındıran ve bunların birbirleri ile entegrasyonunu sağlayan ve bu alanlarda direkt önem kazanan multidisipliner bir bilim dalıdır. Nanoteknoloji ile yapılmak istenen aynı malzemenin boyutunun küçülmesi ile makro yapıda gösterdiği fiziksel ve kimyasal özelliklerden (iletkenlik, manyetizma, toksikoloji, vb.) farklı özellikler göstermesidir [63].

Nanobilim, malzemelerin ancak nanometre ölçeğinde ortaya çıkan değişikliklerini kuantum kuramı ile anlamamızı sağlar. Klasik fizikte yer ve hız aynı anda mutlak olarak belirlenir. Buna karşın atom altı ya da nano boyuttaki parçacıklarda ise yer belirlenince hızı, hız belirlenince yer belirlenemiyor. Heisenberg, 1927'de kuantum kuramının kavramsal zeminini genişleten belirsizlik ilkesini ileri sürerek nanoboyutta malzemelerin değişen davranışlarını açıklanabilir kılmıştır [64]. Kuantum kuramını temel alan nanoteknoloji ise, yeni yapıların tasarlanıp, sentezlenmesi veya var olan yapıların özelliklerinin güçlendirilmesini sağlayarak, bunların farklı alanlarda kullanılmasını sağlar [65].

Özellikle sağlık alanında pek çok araştırma yapılmakta ve uygulanmaktadır. Ancak bunların pek çoğu zaman alan ve pahalı tedavi yöntemleridir. Son yıllarda özellikle sağlık alanında nanoteknolojinin ilgi görmesinin sebeplerinden bir tanesi de, nanoteknoloji kullanılarak, daha hızlı ve daha ucuz tedavi yöntemleri geliştirilebilmek mümkündür. Geliştirilen malzemelerin bir kısmının vücutta yan etkileri bulunmasına rağmen, doğru kullanılmaları halinde yan etkiler tamamen ortadan kaldırılarak ya da minimal seviyeye indirilerek tedavi etkinliği artırılabilir.

Genel olarak nanoboyuttaki malzemeler ile biyolojik moleküller etkileştirilerek kullanılması hedeflenmektedir. Yani nanotıp, bilim ve teknolojinin birlikte kullanıldığı ve sağlık alanında karşılaşılan sorunları çözmek için yeni ve etkili yaklaşımlar sağlayan, çok hızlı bir şekilde gelişen yeni bir alandır. Nanotıp alanında yapılan araştırmalar ile moleküler düzeyde çalışan, kapsamlı izleme, kontrol, onarım, savunma ve tüm insan biyolojik sistemlerinin geliştirilmesini amaçlamaktadır.

Günümüzde yapılan araştırmalar ve geliştirilen ürünlerle nanoteknolojideki yenilikleri tıbbi uygulamalara dönüştürmek için çok büyük uğraşlar verilmektedir. Son yıllarda dikkat çeken konuların başında tıpta tanı ve tedavinin aynı anda yapılması amaçlanarak kişiye özel tedavi yöntemi gelişimine katkıda bulunması hedeflenmiştir. Böylelikle insanlar bu yenilikler sayesinde gelecekte daha sağlıklı ve daha uzun ve kaliteli bir hayat yaşamak için potansiyele sahip olacaklardır.

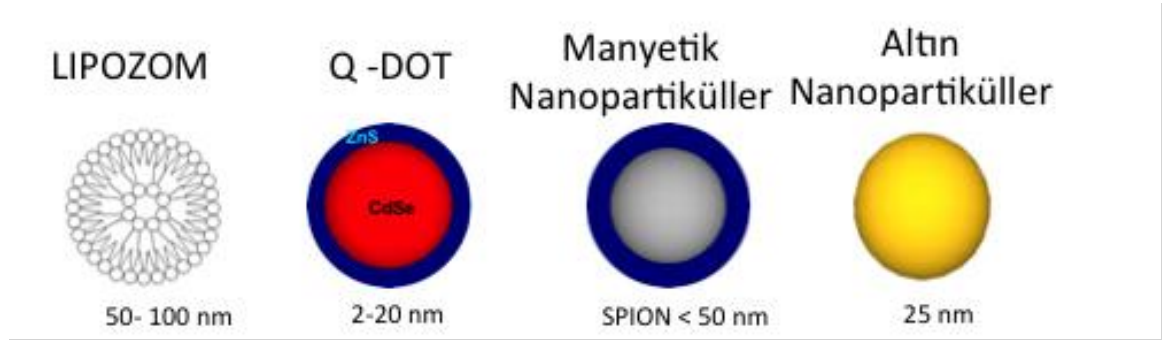
2.16.2. Nanopartiküller

Nanoteknoloji ve nanobilimdeki son gelişmeler sayesinde kimyasal ve biyolojik olarak sentezlenebilen nanoplatformlar tasarlanmaktadır. Örneğin nanopartikül bazlı nanoplatformların çok fonksiyonlu kullanılabilme yeteneklerinin olması, kararlı ve duyarlı olmaları, geleneksel yaklaşımlara göre daha fazla avantaj sağlamaktadır.

Nanopartiküller farklı şekilde ve çeşitli malzemeler kullanılarak sentezlenebilmektedir. Genellikle doğal ya da sentetik polimerlerden elde edilen, boyutları 100 nm civarında olan katı ve dairesel formda yapılarıdır. Nanopartiküller ile hidrofobik ya da hidrofilik olan farklı özelliklere sahip etken maddelerin, aşıların ve biyolojik moleküllerin hedeflenen bölgede salımını sağlayabilmektedirler. Nanopartiküllerin kullanım amacı, klasik tedavi yöntemlerinde karşılaşılan problemlerin aşılmasıdır. Yani, vücuda verilen etken maddelerin enjeksiyon yerinden hedeflenen dokuya parçalanmadan iletilmesini, etken maddenin sürekli salınarak kanda terapötik düzeyde kalmasını sağlamaktır [66]. Yakın gelecekte nanopartiküllerin kullanılması ile geliştirilecek teknolojiler arasında hedefe yönelik tedavi yöntemleri ve vücuda yerleştirilecek implantlar vardır [67].

Nanomalzemelerin hazırlanmasında genel olarak iki yaklaşım uygulanmaktadır. Bunlar; yukarıdan aşağıya “Top Down” ve aşağıdan yukarıya “Bottom Up” tır. “Top-down” yukarıdan aşağı yaklaşımı ile mevcut cihaz ya da materyallerin küçültülerek nanoboyuta indirilmesi hedeflenirken; “bottom-up” aşağıdan yukarı stratejisinde, atom ve moleküllerin istenilen sıra ve düzende bir araya gelerek nanoboyutta yeni malzemelerin hazırlanması amaçlanmaktadır. Biyolojik ve kimyasal yöntemler kullanılarak sentezlenen nanopartiküllerde çoğunlukla yukarıdan aşağıya metodu kullanılmaktadır [68].

Kullanılan materyale ve üretim metoduna bağlı olarak nanopartiküller hem farklı şekil ve büyüklüklerde sentezlenmekte hem de bu şekilde farklı özellikler kazanmaktadırlar. Örneğin; Lipozomlar, katı lipid partikülleri, miseller, küreler, dendrimerler, konjugatlar, hidrojeller vb. bu konuda araştırılan sistemlerdendir [69, 70] (Şekil 2.7.).



Şekil 2.7. Görüntüleme ve ilaç salım sistemlerinde kullanılan farklı malzemelerden sentezlenen ve farklı boyutlara sahip nanopartiküller.

Sıkça belirtilen nanopartikül özelliklerinin çekiciliğinin günümüzde bilinen nedenleri ise; kuantum boyut etkileri, elektronik yapısının boyut bağımlılığı, yüzey atomlarının benzersiz karakterleri ve yüksek yüzey/hacim oranı olarak ön plana çıkmaktadır. Nanopartikül sentezi bu yapıların sergiledikleri olağandışı özellikler sebebiyle yüksek aktiviteli katalizörler, optik uygulamalar için özel teknolojik malzemeler ile birlikte süperiletkenler, aşınmaya karşı katkılar, yüzey aktif maddeler, ilaç taşıyıcılar ve özel teşhis aletleri gibi birçok teknolojik ve farmakolojik ürünlerin hazırlanmasının yolunu açmıştır [71, 72].

Günümüzde uygulanan pek çok terapötik taşıyıcının enjekte edilen bölgeden hedef doku ya da bölgeye ulaşmasının sınırlı oluşu başarı oranını düşürmektedir. Nanoteknoloji bu sorunları aşmak için yeni umutlar vaadeden bir alandır. Özellikle tıp alanında, insan vücudunda hücre seviyesinde onarım sağlayan mikroskobik robotların, erken teşhis sağlayan çip ve sensörlerin gelişmesi ya da manyetik partiküllerin belirli frekansta titreşime geçip ısıyı arttırarak kanserin tedavisini sağlaması gibi oldukça çarpıcı gelişmelere imkan tanımaktadır [73].

2.16.3. Manyetik Nanopartiküller (MNP)

Son on yıl içinde tasarlanmış farklı kimyasal ve fiziksel özelliklere sahip nanoplatformlar pek çok uygulamada kullanılmıştır. Sahip olduğu yüksek yüzey

alanı/hacim oranı, yüzey enerjisi gibi özellikler, manyetik nanopartiküllere; kendine has fiziksel, kimyasal, elektronik, mekanik vb. özellikleri kazandırır [68]. Nanobilim ve nanoteknoloji alanlarındaki araştırma ve gelişmeler çeşitli alanlarda daha yenilikçi ve etkili yaklaşımlar sağlamaktadır. Sahip olduğu bu eşsiz özellikler sayesinde manyetik nanopartiküller, her gün gelişmekte olan nanoteknoloji alanında kendisine önemli bir yer edinmeye başlamıştır. Manyetik nanopartiküller, ilaç ve gen taşınımı, hipertermi, fototerapi, kontrollü ilaç salım sistemleri gibi çok geniş bir yelpazede kullanılmaktadır. Tek bir malzeme ile teragnostik, teşhis ve tedavi kombinasyonunun sağlanması son yıllarda çok fazla ilgi çekmekte ve daha etkili bir tedavi sağlamaktadır. Nanoteknolojik yöntemlerle geliştirilen teragnostik ajan ile hem görüntü elde etmek hem de aynı zamanda hedef bölgede tedavi yapabilmek amaçlanmaktadır. Bu şekilde, geleneksel tedavi yöntemlerinde karşılaşılan sorunları ortadan kaldırarak, kişiselleştirilmiş tedavinin önünü açmayı amaçlayan çok etkin bir yöntem geliştirilmeye çalışılmaktadır. Bu nedenle MNP'ler MR görüntüleme için kullanılan makromoleküller ile karşılaştırıldığında, uygun boyutları ve yüksek yüzey/hacim oranı ile pek çok uygulamada kullanılabilirler.

Nanotıp alanında, manyetik nanopartiküllerin teragnostik ajan olarak kullanılması için, süperparamanyetik, biyoyumlu, düşük toksisiteye sahip olması gerekmektedir. Bu özelliklere ek olarak ilaç yükleme, salım ve hedefleme çalışmaları için uygun fonksiyonel gruplara sahip olması sağlanmalıdır. Hipertermi gibi bazı uygulamaların etkinlik gösterebilmesi için, hedeflenen dokuda istenilen ısı dağılımının homojen bir şekilde sağlanması gerekmektedir. Son yıllarda bu gereksinimleri karşılayabilmek için fonksiyonel gruplara sahip çeşitli özelliklerde manyetik nanopartiküller sentezlenmiştir.

Önceleri, MNP'ler nikel ve kobalt bileşiklerinden hazırlanmıştır. Fakat yapılan araştırmalar, malzemelerin kimyasal özelliklerinden kaynaklanan biyolojik dezavantajları olduğunu göstermiştir. Bundan dolayı, daha sonraları bu durumun aşılması için malzemeler, ferrik ya da ferröz oksit bileşikleriyle hazırlanmaya başlanmıştır. MNP'ler dışarıdan uygulanan manyetik alanın büyüklüğü ve süresine bağlı olarak kolayca yönlenebilmesi ve kontrol edilmesinden dolayı, hastalıkların teşhis ve tedavisinde geniş kullanım alanına sahiptir. MNP'ler, MR'da kontrast artırıcı ajan olarak, kanser tedavisi için hipertermi uygulamalarında, doku

mühendisliği ve kardiyovasküler hastalıkların görüntülenmesinde kullanılmaktadır [74].

Süperparamanyetik demir oksit nanopartiküllerin sahip oldukları süperparamanyetik özellik sayesinde tıp uygulamalarında teragnostik ajan olarak kullanılması umut vericidir. Demir oksit nanopartiküllerin boyutu birkaç nanometreye (1-20 nm) düşürülünce, tek bir etki alanına sahip olmaktadır (single domain) ve bu da onları süperparamanyetik olmaya zorlamaktadır. Ferromanyetik malzemelere uygulanan manyetik alanı kaldırılrsa bile, partiküllerin manyetik özellikleri devam etmektedir. Çok etki (multi domain) alana sahip ferromanyetik malzemelerin aksine süperparamanyetik nanopartiküller manyetik alan etkisi kaldırılınca, buldukları ortamda agrege olmayıp dağılmaktadırlar. Bu özellik, agrege eğiliminde olan nanopartiküllere kıyasla klinik uygulamalarda önem arz etmektedir.

MNP'lerin yüzeyleri çeşitli kaplama materyelleri ile kaplanarak çeşitli reseptör, ligand, protein ve antikorlarla, artan kovalent bağlanma kapasitesine sahiptirler. Boyutlarının küçük olması ve dolayısıyla yüzey/hacim oranının büyük olması nedeniyle yüzeyleri hedeflendirme ve biyouyumlu hale getirmek için daha uygundur. Ligandlara olan yüksek bağlanma özelliği nedeniyle, süperparamanyetik nanopartiküller moleküler görüntülemelerde önemli role sahiptirler. Moleküler görüntüleme sayesinde, hücrelerin metabolik görevlerindeki değişimler detaylı bir şekilde görselleştirilmektedir. Aynı zamanda, süperparamanyetik nanopartiküller biyobozunabilir ve biyouyumlu olmaları sayesinde, biyomedikal alanlarda, gen tedavisi, hücre ve biyolojik madde ayırımı gibi uygulamalarda kendilerine geniş bir yer edinmişlerdir. Dışarıdan manyetik alan uygulayarak MNP ile hedeflendirmedeki temel amaç, vücuda verilen etken madde miktarını düşürmek, verilme sıklığını azaltmak ve tümörü çevreleyen dokularda meydana gelebilecek yan etkileri ortadan kaldırmaktır. MNP'in bu avantajları ile bölgesel rahatsızlıkların tedavisinde daha etkin olduğunu gösterilmiştir.

Boyutlarından dolayı immün sistem tarafından tanınmaması ve yüzeylerinin çeşitli moleküller ile modifiye edilebilmesi sayesinde hedefe daha etkili bir biçimde ulaşabilmelerinde dolayı polimer kaplı süperparamanyetik nanopartiküller, en uygun kaplama ya da kapsülleme malzemesi olarak bilinmektedir. Burada sözü edilen polimerik malzemelerin fonksiyonlarını yerine getirdikten sonra vücuttan

atılmaları gibi sahip oldukları pek çok avantaj dolayısıyla; çeşitli yüzey modifikasyon ajanları ile modifiye edilmiş polimerik nanopartiküllerin kanser tedavisi başta olmak üzere çeşitli terapötik alanlarda aldığı rol giderek artmakta ve büyük önem arz etmektedir.

2.16.3.1. Manyetik Nanopartiküllerin Kardiyovasküler Uygulamaları

Kardiyovasküler rahatsızlıkların teşhis ve tedavisindeki en önemli noktalardan bir tanesi etkili ve tam zamanlı görüntülemenin yapılmasıdır. Günümüzde kullanılan görüntüleme yöntemleri hastalığın erken teşhisinde çok yeterli olmamakla birlikte, son zamanların önemli alanlarında olan nanoteknoloji bunun için yeni olanaklar sağlamaktadır. Manyetik nanopartiküller, süperparamanyetik özelliğe sahip, merkezinde demiroksit bulunan ve herhangi bir karbonhidrat ya da polimer ile kaplanmış yapılardır. MNP sahip oldukları fiziksel yapıları ve boyutları itibariyle aterosklerotik plak ve miyokardiyal yaralanmaların hem hücresel hem de moleküler boyutta görüntülenme sistemlerinde kullanılmaktadır [75, 76].

Günümüzde kullanılan klasik görüntüleme sistemleri ile karşılaştırıldığında; MNP'ler, mükemmel yumuşak doku kontrastı sağlamak ve plak bölgesinde hem anatomic hem de moleküler düzeyde hassas görüntü vermektedir [77].

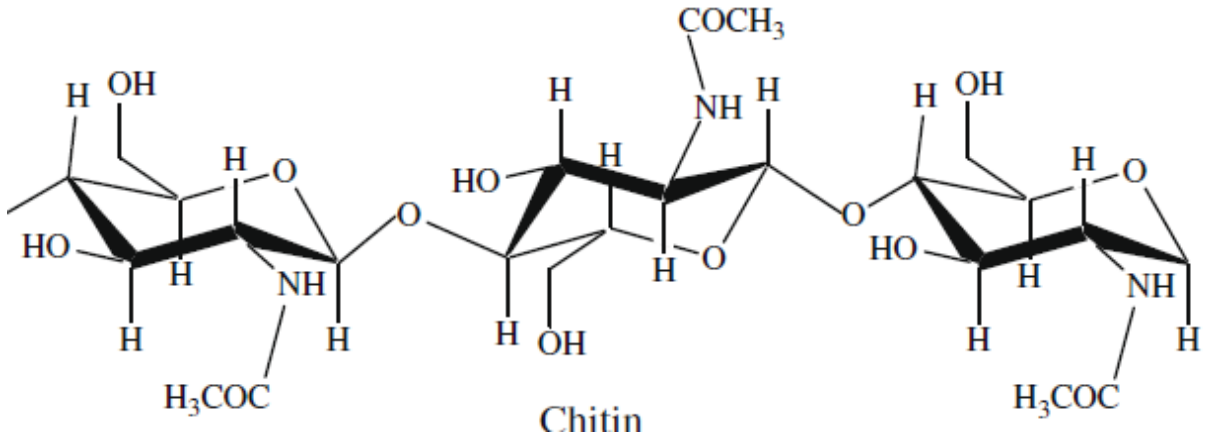
MNP'lerin hazırlanmasında yüzeyin daha kolay modifiye edilmesi için kaplama ya da kapsülleme malzemesi olarak polimerik malzemelerin kullanılması yaygın ve önemli bir noktadır. Demir oksit nanopartiküller işlevini yerine getirdikten sonra vücuttan atılmaktadırlar. Dolayısıyla kaplama malzemesi olarak kullanılan polimerin de vücutta birikmeyip atılması büyük önem arz etmektedir. Bundan dolayı, literatürde konu ile ilgili yapılan çalışmalarda biyolojik olarak bozunabilen ve kendisi ya da degradasyon ürünleri toksik özellik göstermeyen polimerler tercih edilmektedir [78]. Polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında proteinler (albumin, jelatin vb.) ve polisakkaritler (aljinat, kitosan, dekstran vb.) gibi doğal polimerler ya da polianhidrit, polikaprolakton-PCL, polilaktik asit-PLA, poli laktik-ko-glikolik asit PLGA...vb. gibi sentetik polimerler kullanılmaktadır.

2.17. Nanopartiküllerin Hazırlanmasında Kullanılan Biyopolimerler

2.17.1. Kitin

Selülozdan sonra yeryüzünde en fazla bulunan ikinci polisakarit olarak da tanımlanan kitin, β -1,4-glikozidik bağlara sahip N-asetik-D-glukozamin (GlcNAc) birimlerinin tekrarlanmasıyla oluşan uzun zincirli bir yapıya sahiptir [79].

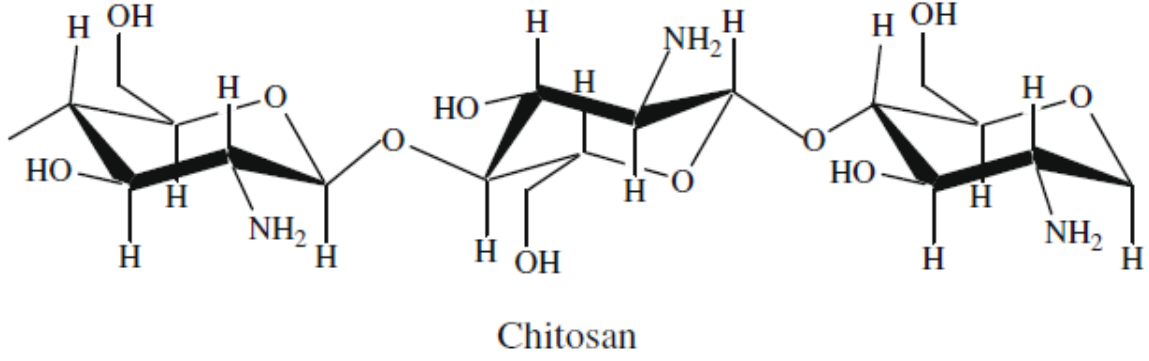
Böceklerin iskeleti ve mantarların hücre duvarının yapısında bulunan kitin, esas olarak yengeç, karides gibi suda yaşayan sert kabuklu canlıların dış iskeletinin ana bileşenidir. Azot bakımından zengin bir yapıya sahip olan kitin polimeri; suda çözünmeyen, beyaz sert, elastik olmayan bir malzemedir. Kitin molekül yapısı olarak selüloza benzemektedir. Kitinin birçok türevi bulunmakla beraber, bunlardan en önemlisi ve su arıtımı, ziraat, biyoteknoloji, kozmetik ve medikal alanlar gibi geniş kullanım alanlarına sahip olan kitosan polimeridir. Kitinin kimyasal yapısı Şekil 2.8'de görüldüğü gibidir.



Şeki 2.8. Kitinin kimyasal yapısı [80]

2.17.2. Kitosan

Kitinden asetil grubunun çıkartılması (Deasetilasyon) sonucu; $1 \rightarrow 4$ bağlı 2-amino,2-deoksi, β -D-glukan (Şekil 2.9.) yapısına sahip kitosan elde edilir [81].



Şekil 2.9. Kitosan Kimyasal Yapısı [82]

Kitinden deasetilasyon ile asetil grubunun çıkarılması işlemi, yüksek sıcaklıkta sodyum hidroksit veya potasyum hidroksit kullanılarak yapılmaktadır. Bunun sonucunda kitin polimeri, kitosana [β -(1-4) 2-amino-2- deoksi D-glukoz] dönüşmektedir.

Kitin gibi doğada oldukça fazla miktarda bulunan kitosanın, düşük maliyeti ve yüksek miktarlarda elde edilebilmesinin yanı sıra, çevreye ve insanlara zarar vermeyen biyoyumlu bir polimer olması kullanım alanlarını arttırmaktadır. Kitosan; alkilleme, karboksilleme, sülfolama, Schiff bazı gibi yöntemlerle kolayca modifiye edilebilmektedir. Bundan dolayı, modifiye edilebilen serbest amin ve hidroksil gruplarına sahip olduğu için, sentetik polimerlerden farklı yapı ve fonksiyonel gruplara sahip, kolay işlenen, biyoyumlu polimerlerin sentezlenmesinde büyük bir potansiyel ve kullanım alanına sahiptir. Deasetilasyon derecesi, molekül ağırlığı, viskozite, çözünürlük gibi parametreler kitosanın özelliklerine etki etmekte ve istenilen yapıya sahip polimerin sentezlenmesine olanak sağlamaktadır. Ayrıca kitosan ve türevleri, diğer polimerlerle birlikte de kullanılabilir.

Kitosan polimeri pek çok avantaja sahiptir.

- ❖ biyoyumlu
- ❖ doğada bol bulunur,
- ❖ elde edilmesi kolay ve ucuzdur
- ❖ kolay modifiye edilir.

Bunlardan dolayı; atık suların arıtılması, medikal uygulamalar (doku iskelesi, mikro ve nanopartiküller...vb.), kozmetik gibi çok geniş kullanım alanlarına sahiptir [83].

Uzun zincirli bir yapıya sahip olan kitosan polimeri içerdiği amin gruplarından dolayı katyonik bir polielektrolit olma özelliği gösterir ve asidik ortamlarda yüksek çözünürlüğe sahiptir. Ayrıca, zincir boyunca tekrarlanan grupların dağılımı asidik ortamda çözünürlüğü kontrol edilebilir kılmaktadır [84].

Kitin ve kitosan türevleri, hem mikroorganizmalardaki kitinaz ve kitozinaz enzimleri hem de yüksek organizasyonlu canlılarda da lizozomal enzimleri ile enzimatik olarak yıkıma uğrayabilmektedirler. Lizozomal parçalanma kitosan ve kitosandan modifiye türlerinin farmasötik alanda kullanımı açısından büyük önem taşımaktadır [85].

Kitosan ve kitosan türevi polimerler, sahip oldukları avantaj ve uygulama kolaylığından dolayı, suların arıtımından kanser tedavisinde kullanıma kadar çok geniş bir kullanım alanına sahiptir. Örneğin, yara, yanık örtü materyali, zayıflatıcı ve kolesterol düşürücü olarak, kontrollü ilaç salım sistemleri, atık sulardan ağır metaller (civa, krom, kurşun...vb) arıtımı, antifungal özellikleri sebebiyle bitkisel ilaçlama ve pestisit taşınımı olarak kullanılmaktadır.

Pek çok avantajlarına rağmen, son yıllarda yapılan çalışmalar kitosan ve türevlerinin farmasötik sistemlerde kullanımında bazı dezavantajları olduğunu göstermektedir. Kitosan asidik ortamda çözünürlüğü yüksektir. Fakat, seyreltik asetik asit haricindeki birçok organik ve inorganik çözücüde çözünmemektedir. Fiziksel özellikleri pH'a bağlıdır ve düşük mekanik özellik gösterir. Eğer kitosan bir ilaç taşıyıcı system olarak tasarlanacaksa; oral alımlarda vücut içinde farklı organlarda (ağız, mide, bağırsaklar...vb.) değişen pH göz önünde bulundurulmalıdır.

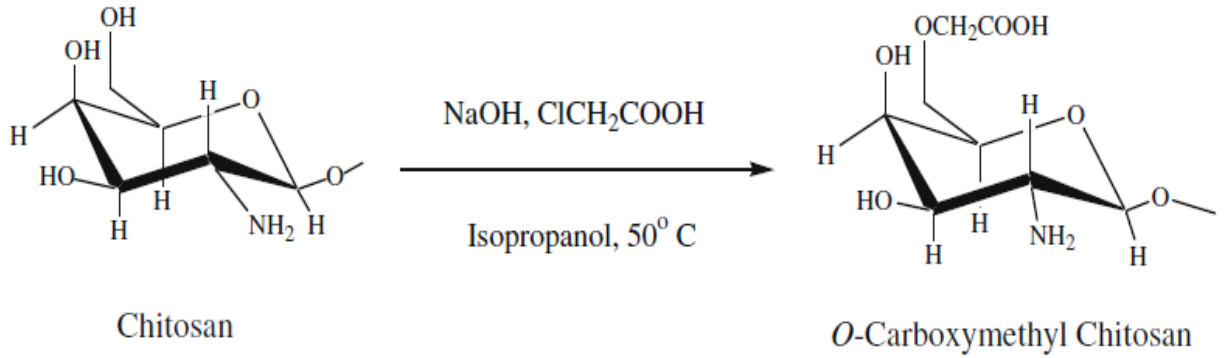
2.17.3. Karboksimetil Kitosan (CMCs)

Kitosanın sadece seyreltik asetik asitte çözünmesinin getirdiği kısıtlamayı, bazı kimyasal modifikasyon yöntemleri ile aşmak mümkündür. Bunun için; polimerin çözünürlüğünü ve böylece diğer polimer ve materyallerle etkileşiminin artmasını sağlayan karboksimetilleme yöntemi yaygın kullanılan yöntemlerden biridir [82]. Kitosanın hidroksil özellik kazanarak çözünürlüğün artırılması için, karboksimetil gibi karboksialkil gruplarının yapıdaki amino grupları, birincil ve ikincil hidroksil grupları ile yapıya katılması gerekmektedir [86]. Kitosan ve türevleri ile

karşılaştırıldığında; karboksimetil kitosanın yapısında anyonik ve katyonik grupların bulunması kullanımını kolaylaştırmaktadır [87] .

2.17.4. O-Karboksimetil Kitosan (O-CMCs)

O-Karboksimetil kitosan, biyoyumlu, biyobozunur ve antibakteriyel özelliklere sahiptir. Amfiprotik eter türevi olan O-Karboksimetil kitosan, yapısında hem amin hem karboksil grubunu bulundurmaktadır. O-Karboksimetil kitosan sentezleme şeması Şekil 2.10' da gösterilmektedir.

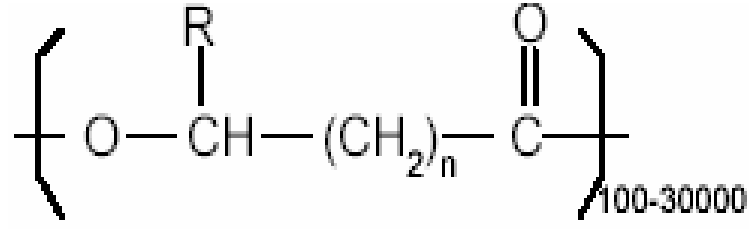


Şekil 2.10. O-CMCs sentezlenme şeması

Karboksimetil kitosan türevleri, içerdikleri hidroksil, amin, karboksil grupları sayesinde metal iyonları ile şelat oluşturarak metal iyonlarının etkisini indirgemekte, bu da atık suların arıtımında kullanımlarını kolaylaştırmaktadır [88]. Kitosanın hücreler üzerindeki proliferatif etkisinden dolayı, karboksimetil kitosan yara örtü materyali olarak da kullanılmaktadır.

2.17.5. Polihidroksibütirat (PHB)

Polihidroksialkanoatlar, doğada 300'den fazla bakteri türü tarafından stres koşulları (fazla karbon; yetersiz N,P,S,O ve Mg kaynağı) altında hücre içi depo maddesi olarak biriktirilen mikrobiyal orjinli polimer ailesinin genel adıdır [89, 90].1926 yılında mikrobiyolog Maurice Lemoignein tarafından *Bacillus megaterium* bakterisinde keşfedilmiştir. Bazı bakteriler, doğada şeker ve yağlar gibi tekrarlanabilen kaynaklarını bakteriyel fermantasyon ile kısa zincirli C-hidroksi yağ asiti monomerleri içeren tekrarlanan lineer hidrofobik birimlere dönüştürürler (Şekil 2.11.) [91].



Şekil 2.11. PHA'nın genel formülü [91]

PHA'lar kimyasal yapısı bakımından, polilaktikasit (PLA), poli laktik-glikolik asit (PLGA) gibi sentetik polimerlere benzemekle birlikte, biyoyumlu, biyobozunurdurlar ve yüksek mekanik özellik gösterirler. Aynı zamanda, bu polimerler bakteriyel kökenli olduğu için vücut dışında da kısa zaman içerisinde yıkılarak, doğal döngüye katılıp kirliliğe sebebiyet vermemektedir [92]. Poli-3-hidroksibüturat (PHB), PHA'ların en genel tipidir. Yapılarında bulunan monomere göre, poli-4-hidroksibüturat, polihidroksivalerat, polihidroksiheksanoat, polihidroksioktanoat...vb. gibi türleri mevcuttur. Yapılarında 100'den fazla monomer çeşidinin bulunması farklı özelliklere sahip polihidroksialkanoatların oluşumunu sağlamaktadır. PHA'lar biyoyumlu ve biyobozunur olmalarının yanı sıra, suda çözünmeleri hidrolitik degradasyona dirençli ve oksijen geçirgenliği de iyidir. Bundan dolayı PHA'lar, doku mühendisliği, ilaç salımı uygulamaları, yara örtü materyali gibi malzemelerin hazırlanmasında kullanımları büyük ilgi uyandırmaktadır.

Polihidroksialkanoatlar ailesinden olan, PHB ve Polihidroksibütirat-ko-hidroksivalerat (PHBV) stent, tıbbi tampon, vida, kemik plağı yapımında kullanılmaktadır. Endüstriyel amaçlı olarak, çocuk bezi, plastik torba ve film endüstrisinde de kullanım alanına sahiptir. Yapılan araştırmalar PHA'ların degradasyonu sonucu salınan degradasyon ürünlerinden 3-HB monomerinin doku yenilenmesine katkıda bulunduğu ve apoptozu engellediğini göstermektedir.

2.17.6. Dekstran

Dekstran polimeri, α (1-6) D- glikozidik bağlar ve bazı dallanmış 1-3 glikozidik bağlar içeren, yumuşak, yapışkan, yüksek molekül ağırlıklı anhidroglikozidik polisakkaritler. Dekstran doğal bir polimer olup, biyoyumlu, biyobozunur, immünojenik ve antijenik olmayan özelliklerinden dolayı, fizyolojik olarak zararsız bir biyopolimerdir. Karaciğer, dalak, böbrek ve mide-bağırsak sisteminin alt kısımlarında meydana gelen reaksiyonlarla, dekstran dekstronozlar gibi farklı

yapılara polimerize olabilmektedir [93]. Dekstran kimyasal yapı olarak hidroksil grupları içermektedir. Hidroksil grupları; protein, aptamer ve ilaçlarla bağlanarak, bu malzemelerin hücre içerisine alımlarını kolaylaştırmaktadır. Sulu çözeltilerde, dekstran metaller ile etkileşerek yüzeyde agregatlar oluşturur ve böylece metallerin yüzeyini hidrodinamik çapı 20 ile 150 nm arasında değişen boyutlarda kaplayabilir [94]. Bu özelliğinden dolayı dekstran, manyenik nanopartiküllerin kaplanarak biyouyumlu hale gelmesi ve çeşitli biyomedikal uygulamalarda kullanılmasına olanak sağlamaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, dekstranın, naproksen, mitomisin C ve sisplatin gibi çeşitli ilaç maddeleri ile fonksiyonelleştirilerek kontrollü ilaç salım alanlarında daha verimli kullanım alanına sahip olduğunu göstermiştir [95-98]. Horning ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, dekstran nanopartiküller dikkat çekici miktarlarda kolaylıkla insan fibroblastları içerisine girebilmektedir. Konfokal mikroskop ile yapılan incelemeler sonucunda, dekstranın sahip oldukları biyouyumlu özelliği sayesinde hücreler üzerinde 22 gün ve üzeri sürede herhangi bir toksik etki meydana getirmemiştir [99]. Dekstran, fizyolojik olarak değerlendirildiğinde, gelecek vaat eden bir taşıyıcı olma özelliği gösterdiği ve medikal malzemelerin hazırlanmasında geniş kullanıma sahip olduğu belirtilmiştir [100].

2.18. Kardiyovasküler Teşhis Sistemi için Kullanılan Ligandlar

Kan damarının iç yüzeyini oluşturan endotel tabakasında, modifikasyonların veya fonksiyonel bozuklukların meydana gelmesi, hücre bölünmesi ve ölümünün anormal olması ya da monosit hücrelerinin birikmesi gibi sebepler, ateroskleroz, hipertansiyon, kalp krizi gibi vasküler rahatsızlıklara sebep olmaktadır. Bu hastalıkların teşhis ve tedavisinde endotel tabakası önemli rol oynamaktadır ve invaziv olmayan bir yöntemle erken safhada ve tam zamanlı görüntülenmesi hastalığın tedavisi veya ilerleyişinin durdurulması için avantaj sağlamaktadır. Enfekte olmuş endotel duvarına lökosit hücreleri göç ederek burada tutunmaya başlarlar. Hücre birikmesinin görüntülenmesi için, endotel hücrelerde bulunan endotel hücre adezyon molekülleri (CAM) gibi enflamasyonun işaretçileri konumundaki yapılara özel moleküler işaretçilerin kullanılması gerekmektedir.

2.18.1. P- ve E- Selektinler

Selektinler, geçici transmembran bağlayıcı glikoproteinlerdir. Endotel hücresi ve lökositlerin yüzeyinde bulunan selektinler, sialyl Lewis-X ve SleA gibi sialize

glikanlar ile lökositlerin endotel hücrelerine adezyonunu ilk başlatan moleküllerdir. Selektinlerin üç alt grubu tanımlanmıştır.

- L - Selektin (Lökosit Selektini)
- E - Selektin (Endotel Selektini)
- P - Selektin; (Platelet Selektini)

Normalde P- ve E- selektinler endotel yüzeyinde bulunmazlar. Fakat arterde enflamasyon meydana geldikten sonra endotel hücrelerin yüzeyinde artış gösterirler [101].

2.18.2. Vasküler Adezyon Molekülleri (VCAM-1)/Intrasellüler Adezyon Molekülleri (ICAM-1)

ICAM-1 endotel hücrelerde; VCAM-1 ise lenfositlerde, eosinofillerde ve bazofillerde eksprese edilen transmembran proteinlerdir. ICAM-1 ve VCAM-1, lökositlerin içerdikleri $\beta 1$ ve $\beta 2$ yapıları ile lökositlerin endotelyal adezyonunu sağlamaktadırlar. ICAM-1'in baskılanması ile lökositlerin enflamasyon bölgesine göçlerinin ve birikmesinin engellenebileceği düşünülmüştür. Yapılan çalışmalar da bu görüşü destekler niteliktedir. Normal şartlarda; VCAM-1 molekülleri endotel yüzeyinde bulunmazken, ICAM-1 devamlı olarak bulunur. Fakat enflamasyonun başlaması ile hücre yüzeyindeki sayıları artış gösterir. Örneğin VCAM-1 ve ICAM-1'in normal koşullarda 10^4 - 10^5 hücre çoğalması varken, PECAM- 10^6 değerlerinde hücre artışı gözlenmektedir [101].

2.18.3. Platelet Endotel Hücre Adezyon Molekülü-1

Platelet endotel hücre adezyon molekülü-1 (PECAM-1), lökosit, trombosit ve endotel hücrelerde bulunan immunoglobulin ailesinin bir üyesidir. Görüntüleme için hedef molekül olarak kullanılmasından ziyade, engelleyici olarak kullanım için uygun moleküllerdir [101] .

2.18.4. Anneksin-A1 / Anneksin-A5 Molekülleri

Ca^{+2} iyonu hücrede, hücrele bölünmesi-ölümü, metabolizma, kasların kasılması-gevşemesi, hareket, protein ve hormon sekresyonu, gen ekspresyonu ve programlı hücre ölümü (apoptoz)...vb. gibi hayati öneme sahip işlevlerin gerçekleşmesinde önemli bir mineraldir. Dolayısıyla, Ca konsantrasyonunda meydana gelen değişimler haberci moleküller için uyarıcı niteliğindedir ve hücrel fonksiyonların düzenlenmesinde anahtar rol oynamaktadırlar [102]. Aterosklerotik

plağı meydana getiren hücrelerin yüzeyinde fosfatidilserin (PS) eksprese edilir. Anneksin-A5, hücrenin dış yüzeyinde ortaya çıkan fosfatidilserine bağlanabilen bir protein olduğu için, aterosklerotik plakların görüntülenmesinde kullanılabilir. Yapılan çalışmalar, yapısında floresan özelliği bulunan Anneksin-A5'in anti-inflamatuvar ve anti-aterosklerotik özellikte olduğunu göstermektedir [103]. Anneksin-A5 ile aynı familyada bulunan ve benzer özelliklere sahip Anneksin-A1'de Ca ve fosfolipid bağlama özelliğine sahip olduğu için aterosklerotik görüntüleme için kullanımı yaygındır [104].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Sunulan tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalar başlıca üç ana bölümden oluşmaktadır. İlk bölümde manyetik özelliğe sahip Demir Oksit, PHB/CMCs, PHB/CS ve dekstran nanoplatformların sentezlenmiştir. Sentez aşamalarında boyut dağılımına etki eden parametreler incelenmiştir ve boyutları Zeta Sizer sistemleri kullanılarak karakterize edilmiştir. Morfolojik özellikleri SEM ve AFM görüntüleme sistemleri yardımıyla elde edilmiştir. Manyetik özellikleri titreşimli manyetometre (VSM) kullanılarak karakterize edilmiştir. Hazırlanan nanoplatformların kardiyovasküler sistem rahatsızlıkları teşhis ve tedavisinde kullanılmak üzere nanoplatformların yüzeyine model ligand olarak seçilen IgG 1, Anneksin A5 ve A1 liganları biyokimyasal yöntemlerle kovalent olarak takılmıştır. Hem hazırlanan nanopartiküllerin hem de ligand takılı formlarının sitotoksiteleri standart hücre hattı L929 ile incelenmiştir. Ligand takılı nanoplatformların HUVEC ve A7r5 hücreleri ile hücre etkileşimleri incelenmiştir.

Çalışmaların ikinci bölümünde ise hazırlanan ligand takılı nanoplatformlarla *in vivo* çalışmalar yapılmış ve kullanılan sıçanların MRI görüntüleri incelenmiştir. MRI işleminden sonra sistemik dolaşım içerisinde dolaşan ligand takılı nanoplatformların vücutta diğer organlara zarar verip vermedikleri biyokimyasal incelemelerle yapılmıştır.

Çalışmamızın son bölümünde ise insan düşük yoğunluklu lipoproteini kullanılarak, okside hale getirilmiş ve makrofajlarla etkileştirilerek *ex vivo* ortamda köpük hücre oluşumu sağlanmıştır. Oluşan köpük hücrelerin yüzey proteinlerinin bulunabilmesi için hücre membranları izole edilmiş ve saflaştırılarak, MALDI-ToF yöntemiyle yüzey reseptörü (proteini) tayin işlemleri uygulanmıştır.

3.1. Kimyasallar

Yapılan tez çalışması sürecinde hazırlanan nanopartiküllerin sentezi için kitosan (Fluka, Almanya), Poli- β -Hidroksibütirat (PHB) (Sigma, ABD) ve dekstran (Fluka, Almanya) kullanılmıştır. PHB-CMCs ve PHB-Cs nanopartikül sentezlerinde dağıtıcı ortam olarak polivinil-alkol (PVA) (Sigma, ABD) ve organik çözücü olarak kloroform (Merck, Almanya) kullanılmıştır. Dekstran nanopartiküllerin daha stabil olmasını sağlamak amacı ile çapraz bağlayıcı olarak N-N-Metilen-bisakrilamit (MBA) (Sigma, ABD) kullanılmıştır. Hücre sitotoksite testlerinde ise, Tripsin-

EDTA (Tripsin-Etilendiamin tetraasetik asit), DMEM F-12 ("Dulbecco's Modified Eagle's Medium") besiyeri ve Fetal Sığır Serumunu (FBS), DMSO (Dimetilsülfoksit) Biological Industries (İsrail) firmasından, Tetrazolyum Tuzu (MTT) Serva'dan (ABD) temin edilmiş ve kimyasallara herhangi bir işlem uygulanmadan kullanılmıştır. Hücre kültür kapları ile çoklu kuyucuklu kültür kapları ise Corning (ABD) firmasından temin edilmiştir. MES (2-(N-morfolino) etansülfonik asid) tamponu, suda çözünebilen EDC (1-Etil-3-(3'-dimetil-aminopropil)-karbodiimid HCl), Glisin, fosfat tamponu (PBS), Sigma (ABD) ve VWR (Belçika) firmasından temin edilmiş olup bu kimyasallar; PHB/Cs, PHB/CMCs ve dekstran nanopartiküllerine ligand bağlama prosedürlerinde kullanılmıştır. Tüm çalışmalar süresince kullanılan bu kimyasallar, analitik saflıkta olmalarından dolayı herhangi bir ekstra saflaştırma işlemine tabi tutulmamışlardır.

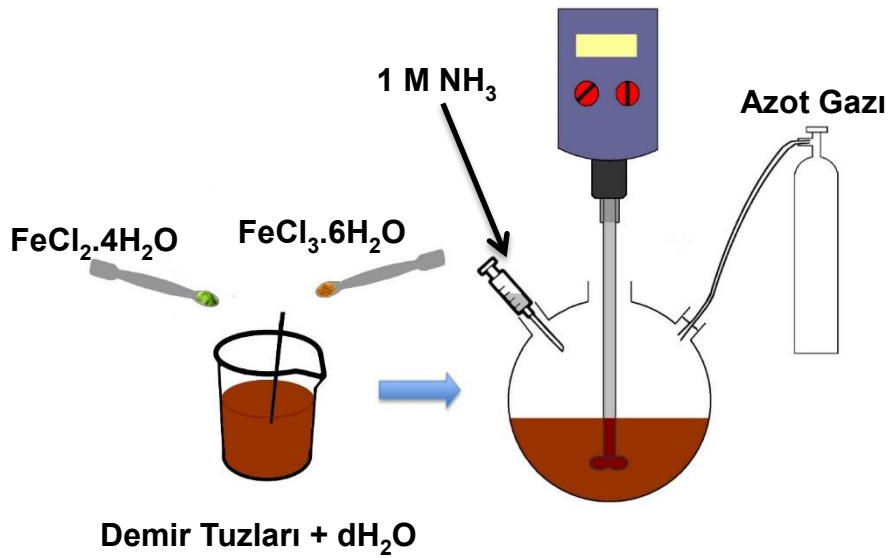
Raybiotech marka (228-11016) insan lipoproteini, ex vivo çalışmalarda kullanılmıştır. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Sigma, ABD), LDL oksidasyonu için kullanılmıştır. Diyaliz işlemleri için 12-14 kDa diyaliz torbası (Sigma, D 9777) kullanılmıştır. Biyokimyasal testler için Glutasyon Peroksidaz (200U, Sigma, ABD), 2-tiobarbitirik asit (Sigma, ABD), Tris (hidroksimetil)-aminometan (MERCK), Sülfanilamid (Sigma, ABD) kullanılmıştır. Elektroforez deneylerinde, agaroz (Merck), sodium barbital (MERCK), barbitürik asit (MERCK), Sudan Black (Sigma, ABD), Comassive Blue (Sigma, ABD), glycial asidik asit (MERCK), Etanol (MERCK) kullanılarak yapılmıştır. THP-1 insan monosit hücreleri (ATCC, TIB-202) ve Forbol 12- miristat 13- asetat (PMA) (Sigma) dan temin edilmiştir. Çalışmalar boyunca bütün kademelerde deiyonize distile su kullanıldı. Tüm deney malzemeleri deiyonize distile sudan geçirilerek çalışıldı.

3.2. Nanoplatformların Hazırlanması ve Karakterizasyonu

3.2.1. Demir Nanopartiküllerin Sentezi

Manyetik demir oksit nanopartiküllerin hazırlanması sırasında, kimyasal çöktürme yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde göre ilk olarak $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ve $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ reaktif tuzlarından belli oranlarda alınıp 10 ml'lik deiyonize su içerisinde çözüldükten sonra, oda sıcaklığında sonikatör içerisine yerleştirilmiş üç boyunlu balona alınarak, yüksek hızda karışım imkanı sağlayan homojenizatörde stabil hale gelmesi için bir süre karıştırılmıştır. Daha sonra 1 M amonyak, NH_3 çözeltisi ortama damlatılarak eklenmiştir, bu esnada inert bir ortam oluşturmak amacı ile

reaktör kabına azot gazı bağlanmıştır. Çözelti oda sıcaklığında 1 saat çok yüksek karıştırma hızında (2000 rpm gibi) karıştırılmıştır. Daha sonra bu çözelti 9000 rpm'de 30 dakika süreyle oda sıcaklığında santrifüjlenmiştir. Çökelek atılıp sulu faza üç defa deiyonize su ile yıkama işlemi uygulanmıştır. Bu amaçla çözelti yüksek hızda (22.000 rpm gibi) santrifüjlenerek çöktürülmüş ve yıkanmıştır. Çalışmanın bu bölümünde diğer çalışma koşulları önceki çalışmalarda optimize edilen değerler olarak kullanılmıştır (Fe^{+2}/Fe^{+3} mol oranı 1/2, sıcaklık 25 °C ve karıştırma hızı 2000 rpm). Manyetik nanopartiküllerin sentez şeması şekil. 3.1.deki gibidir.

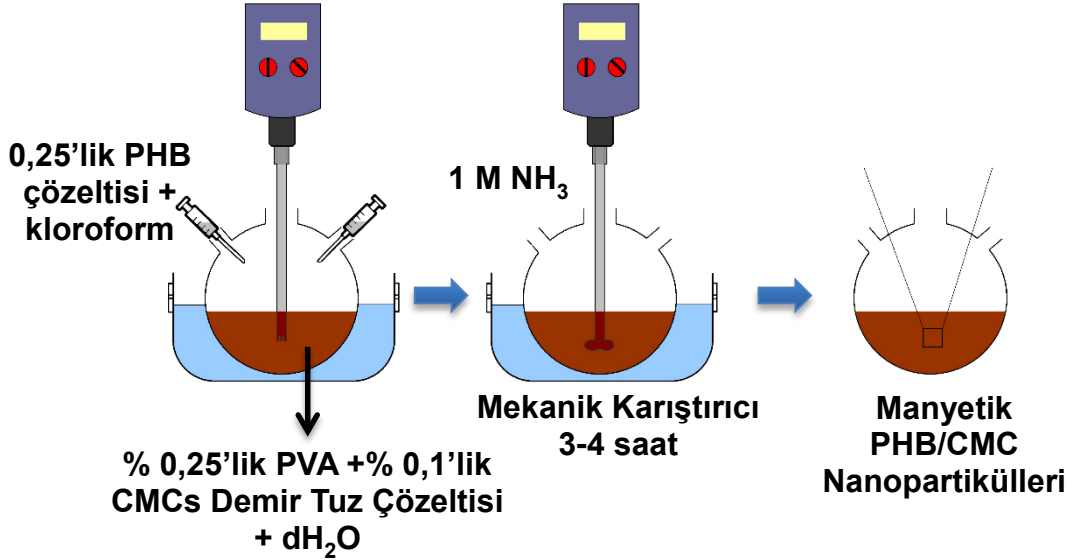


Şekil 3.1. Manyetik Demir Oksit Nanopartiküllerin sentez şeması.

3.2.2. Manyetik PHB/CMCs Nanopartiküllerin Hazırlanması

Manyetik PHB/CMCs nanopartiküllerin hazırlanmasında, emülsiyon oluşturma çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılmıştır. Bunun için 25 mg polihidroksi-bütirat (PHB), 10 ml kloroform içerisinde çözülerek % 0,25'lik PHB çözeltisi hazırlanmıştır. İçerisinde FeCl₂.4H₂O ve FeCl₃.6H₂O reaktif tuzlarının belli oranlarda alınıp distile su ile çözülmüş olduğu üç boyunlu reaktör kabına % 0,25 PVA (stabilize edici ajan) ve % 0.1 karboksimetil kitosan (CMCs) içeren sulu çözelti de azot gazı altında ilave edilir. Daha sonra reaktör kabının bir ucundan kloroformda çözülmüş olan PHB ilave edilirken, diğer ucundan ise demir tuzlarının çöktürücüsü olan amonyak (NH₃) ortama damla damla eklenir. Elde edilen emülsiyon, homojenizatör (Ultra-Turrax T10, Çin) kullanılarak 24.000 rpm'de 15 dakika oda sıcaklığında karıştırılmıştır (Şekil 3.2.). Daha sonra organik çözücünün uzaklaştırılması için,

elde edilen süspansiyon 3-4 saat süre ile oda sıcaklığında sabit hızda (600 rpm) manyetik karıştırıcı kullanılarak karıştırılmıştır. En son olarak da çözeltinin 12000 rpm' de 30 dakika süre ile santrifüjlenmesi ile elde edilen nanopartiküller distile su ile yıkanmış ve liyofilizatörde kurutulmuştur [105].



Şekil 3.2. Manyetik PHB/CMCs nanopartiküllerin hazırlanma prosedürü.

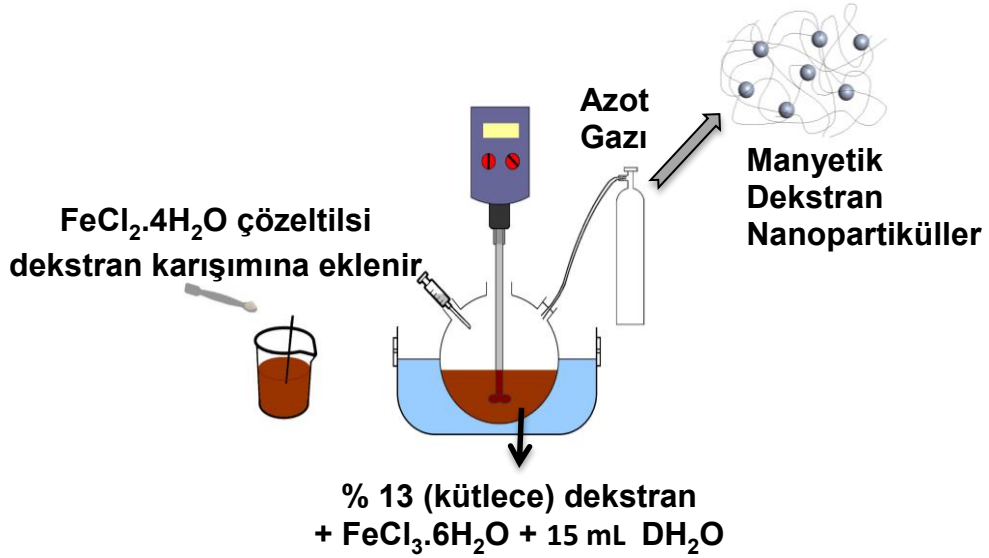
3.2.3. Manyetik PHB/Kitosan (PHB/Cs) Nanopartiküllerin Hazırlanması

Nanopartiküllerin hazırlanmasında emülsiyon oluşturma çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılmıştır. Bunun için; 50 mg PHB, 10 ml kloroform içerisinde çözülerek % 0.50'lik PHB çözeltisi hazırlanmıştır. İçerisinde FeCl₂.4H₂O ve FeCl₃.6H₂O reaktif tuzlarının belli oranlarda alınıp distile su ile çözülmüş olduğu üç boyunlu reaktör kabına, 200 mg PVA (stabilize edici ajan) ve % 0.5'lik kitosan içeren sulu çözelti 2 saat çözünme işlemine tabi tutulmuş ve analitik süzgeç kağıdı ile süzöldükten sonra azot gazı altında ilave edilmiştir. Daha sonra reaktör kabının bir ucundan kloroformda çözülmüş olan PHB ilave edilirken, diğer ucundan ise demir tuzlarının çöktürücüsü olan amonyak (NH₃) ortama damla damla eklenir. Elde edilen emülsiyon, homojenizatör (Ultra-Turrax T10, Çin) kullanılarak 24000 rpm'de 15 dakika oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Daha sonra organik çözücünün uzaklaştırılması için, elde edilen süspansiyon 2 saat süre ile oda sıcaklığında sabit hızda (600 rpm) manyetik karıştırıcı kullanılarak karıştırılmıştır. Son basamakta çözeltinin 12000 rpm'de 30 dakika süre ile santrifüjlenmesinin ardından elde edilen nanopartiküller distile su ile yıkanarak liyofilizatörde kurutulmuştur [105].

3.2.4. Manyetik Dekstran Nanopartiküllerin Hazırlanması

Daha önce yapılan çalışmalardan alınan prosedürün [106] geliştirilmesi ile oluşturulan protokolda, % 13 (kütlece) dekstran (MW 40 000, Sigma,USA) 1gr demir (III) klorür heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ile karıştırılır, üzerine 15 mL distile su eklenir. Üç boyunlu balona alınan karışım, oda ısısında iyice karıştıktan sonra solüsyon üzerine 0.4 gr demir (II) klorür tetrahidrat ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) eklenir ve solüsyonun 15 dk. boyunca mekanik karıştırıcıda azot ortamında karışması sağlanır (Şekil 3.3.). Daha sonra, dekstran ve demir tuzlarının bulunduğu bu çözeltiye 1M amonyak çözeltisi ile %2'lik metilen-bis-akrilamid çözeltisi damla damla eklenir, bu esnada çözelti yüksek karıştırma hızında olmalıdır (2000 rpm/dk).

Sıcaklığı değiştirilmeden, sonikasyon cihazında mekanik karıştırıcı ile 1 saat karışan çözelti, daha sonra santrifüjlenerek partiküllerin solüsyondan ayrılması sağlanır. Yüksek devirli santrifüjde çöktürme işleminden sonra 2 kez yıkama yapılan partiküller, petri kaplarına alınarak 37°C 'de etüvde kurutmaya bırakılır.



Şekil 3.3. Manyetik Dekstran Nanopartiküllerin hazırlanma prosedürü.

3.2.5. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

3.2.5.1. Morfolojik Özelliklerin Belirlenmesi

Sentezlenen PHB/CMCs, PHB/Cs ve dekstran nanopartiküllerin morfolojik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla taramalı elektron mikroskobu (SEM) (FEI

Quanta, ABD) ve atomik kuvvet mikroskobu (AFM) (Nanomagnetics, Türkiye) kullanılmıştır. Bu amaçla nanotaşıyıcılar ince bir altın film tabakasıyla kaplanarak SEM görüntüsü alınmış ve böylelikle örnekler, şekil ve boyut dağılım açısından değerlendirilmiştir.

Bu çalışmada hazırlanan nanopartiküller doğrudan AFM örnek tutucu ünitesine yerleştirilmiş ve özellikle örneklerin boyut dağılımlarının homojenitesi yönünden incelenebilmesi için AFM görüntüleri alınmıştır.

3.2.5.2. Nanopartikül Boyut Analizi

Zeta Sizer, çözeltideki partiküllerin molekül ağırlığı, zeta potansiyel ve hidrodinamik boyut ölçümü için kullanılmaktadır [107]. Partiküller için boyut oranı 0.6 nm ile 6 mikron, zeta potansiyel için 5 nm ile 10 mikron ve molekül ağırlığı için 1-20,000 kDa arasındadır. Bu cihaz, nanopartiküller, kolloidler ve biyomoleküller için çözeltideki partiküllerin boyutlarının tayininde kullanılabilir. Dinamik ve elektroforetik ışık saçılması yöntemiyle çalışmaktadır. Dinamik ışık saçılması, en son teknoloji ile 1 nanometreden küçük olan ve sub mikron bölgesindeki partikül ve moleküllerin boyutlarının ölçümünde kullanılan bir tekniktir. Çözeltiden lazer saçılmasının meydana gelmesiyle, Brownian hareketinin hızı, partiküllerin boyutunun hesaplanmasında kullanılabilir. Süspansiyon içerisindeki partiküller, emülsiyonlar ve moleküller Brownian hareketine maruz kalmaktadırlar. Bu harekete, termal enerjilerinden dolayı kendi başlarına hareket eden çözücü molekülleri tarafından bombardıman yoluyla neden olunmaktadır. Partiküller veya moleküller lazer ile aydınlatıldığında, saçılan ışığın yoğunluğu, partiküllerin boyutuna bağlı bir hızla dalgalanmaktadır. Oldukça küçük partiküller çözücü molekülleri tarafından ileriye doğru itilmekte ve çok daha büyük hızla hareket etmektedirler.

Sentezlenen PHB/CMCs, PHB/Cs ve dekstran nanopartiküllerin boyut ve dağılımlarını belirlemek, AFM ve SEM çalışmalarında elde edilen bulguları karşılaştırılmak için Zeta-Sizer (3000 HSA, Malvern, İngiltere) cihazı kullanılmıştır. Sentez sonrası yıkanarak elde edilen nanopartiküller deiyonize su ile seyreltilmiş ve yaklaşık 3 ml hacimli örnek çözeltisi, polistiren (PS) küvet içerisine konulmuştur. Alınan ölçümler birkaç defa tekrarlanarak ölçümün doğruluğu sağlanmaya çalışılmıştır. Ölçümler, örnek çözelti içerisinde lazer ışığının geçirilmesi sonucu gerçekleştirilmiştir.

3.2.5.3.Nanopartikül Yüzey Yükü Analizi

Hazırlanan nanopartiküllerin yüzey yükü analizi içinde Zeta-Sizer (3000 HSA, Malvern, İngiltere) cihazı kullanılmıştır.

Zeta potansiyelinin ölçülmesi, kolloidal dispersiyonun saklama stabilitesi hakkında tahminde bulunmaya olanak vermektedir. Genel olarak, yüklü partiküllerde (yüksek zeta potansiyeli), elektriksel itme nedeniyle, partikül agregasyonunun meydana gelme ihtimali daha azdır. Ancak bu kural, sterik stabilizatörler içeren sistemler için tam olarak geçerli olmamaktadır. Çünkü sterik stabilizatörlerin adsorpsiyonu, zeta potansiyeli azaltmaktadır

Hazırlanan nanopartiküller santrifüjlenerek yıkanmış ve 1:10 oranında seyreltilerek, belirli miktarda polistiren küvete konulmuştur. Boyutunu tayin etmek amacıyla küvet içerisine konulan partiküller yukarıda görülen cihaza yerleştirilerek ölçüm alınmıştır.

3.2.5.4.Mıknatıslama Özelliklerinin Belirlenmesi

Gerek manyetik demir oksit partiküllerin ve gerekse sentezlenen manyetik özelliklere sahip PHB\CMCs, PHB\Cs ve dekstran nanoplatformların kardiyovasküler rahatsızlıkların teşhis ve tedavisinde kullanılabilirlikleri yönünden büyük önem taşıyan mıknatıslama özelliğinin bulunmasında titreşimli manyetometre kullanılmıştır (Vibrating Sample Magnetometer, VSM, Fieldial Mark II Varian, Almanya). Yapılan VSM çalışmalarında; vakum etüvünde kurutulmuş olan örneklerin 0 ile 1.5 Tesla'lık bir manyetik alandaki mıknatıslama değerleri, oda sıcaklığında ölçülmüştür. Manyetik alan içindeki partiküllerin manyetik özellikleri birim kütle başına manyetik moment (emu) şeklinde ifade edilmiştir. Bu ölçüm tekniğinde kurutulmuş olan örneğe sabit frekansta manyetik alan uygulanmaktadır. Eğer örnek mıknatıslama özelliğine sahipse bir mıknatıs gibi davranarak geçici bir manyetik akış nedeniyle iletken çubuğun içinde potansiyel farkı oluşturmakta ve titreşimli manyetometre de bu potansiyel farkı ölçerek örneğin mıknatıslama özelliğini belirlemektedir.

3.2.6. Biyopolimerik Nanopartiküllerin Yüzey Modifikasyonu (Ligand Takılması)

Sunulan tez çalışması kapsamında, yapılan çalışmalar sonucunda sentezlenen değişik formlardaki nanoplatformlardan PHB/CMCs nanoplatformları seçilerek, IgG 1, Anneksin A5 ve Anneksin A1 ligandları ile etkileştirilmiştir. Daha önce yapılan

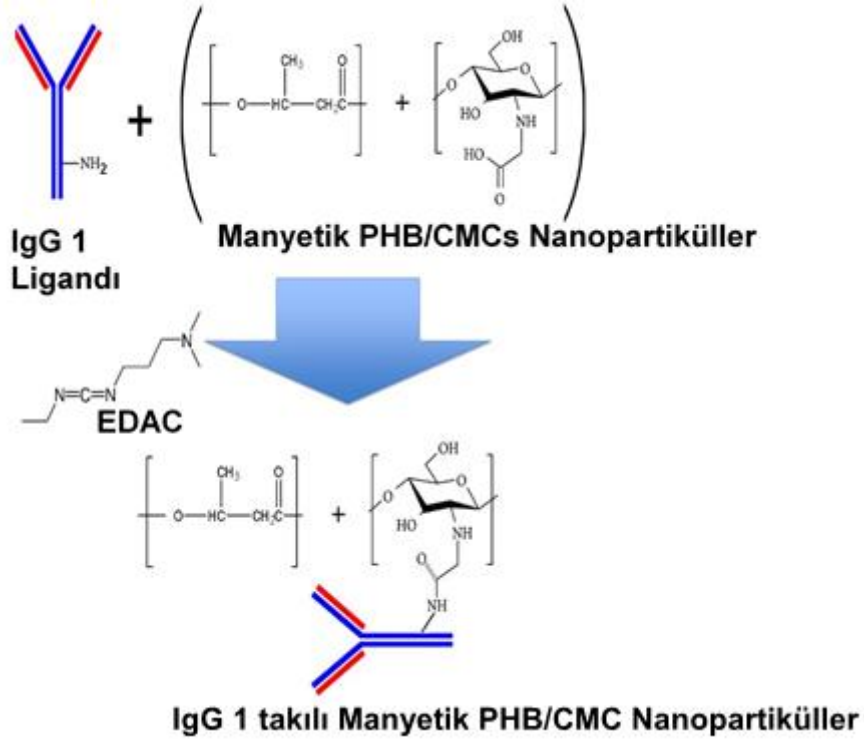
çalışmalarda kanser teşhis ve tedavisinde kullanılmak üzere hazırlanan, manyetik özelliğe sahip kitosan nanopartiküllerin yüzey modifikasyon işlemlerinde Konkavalin-A proteini model ligand olarak kullanılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir [108]. Bu nedenle yapılan ligand bağlanması deneylerinde ya da bir başka deyişle yüzey modifikasyon işlemlerinde de benzer işlem basamakları kullanılmıştır.

Takip edilen işlem basamakları řu şekildedir; öncelikle nanopartiküllerin aktivasyonu için manyetik nanopartiküller 3 defa pH 5.2 MES tamponu ile yıkanıp aynı hacimde süspanse edilmiştir. Aktive edilen nanopartiküller ile 25 mg/ml EDAC ile 30 dk süreyle oda sıcaklığında uygun hızlı dönen karıştırıcıda karıştırılmıştır ve böylelikle yapıdaki amin gruplarında özgün aktif ara formun oluşması sağlanmıştır. Ortamdaki fazla EDAC'ın uzaklaştırılması amacı ile, nanopartiküller 3 defa pH 5.2 MES tamponu ile yıkanıp aynı hacimde MES tamponu ile süspanse hale getirilmiştir. Öncelikli olarak seçtiğimiz IgG1 (1mg/mL) ligandından 100 µl alınıp 1400 µl MES tamponunda çözülerek ligand süspanasyonu hazırlanmıştır. Ligand bağlanma işlemlerinden sonra bağlanma verimini belirlemek amacıyla sonradan yapılan ölçümlerde kullanmak için, ligand süspanasyonundan aynı oranda (1:15) alınarak "bağlanma öncesi örnek" elde edilmiştir. Kalan ligand süspanasyonu ile aktive nanopartiküller 24 saat oda sıcaklığında sabit hızda rotatorda karıştırılmıştır. 24 saat sonunda nanopartiküller bir mıknatıs yardımı ile ayrılmıştır.

Ayrılan sıvı faz atılmadan "bağlanma sonrası örnek" olarak teste alınıp 280 nm dalga boyunda UV spektrofotometrede her iki örnek arasında ölçülen absorbans farkından yüzde bağlanma hesaplanmıştır. Formülasyon aşağıda verilmiştir.

$$\% \text{ Ligand bağlanma verimi} = \frac{\text{b.ö. absorbans değeri} - \text{b.s. absorbans değeri}}{\text{b.ö. absorbans değeri}} \times 100$$

Nanopartiküller bağlanma sonrası örnek ile ayrıldıktan sonra, 1 kez pH 5,2 MES tamponu ile yıkanıp mıknatıs yardımı ile ayrılmıştır. Daha sonra devam eden reaksiyonu durdurmak amacıyla ortama fazla amin kaynağı olarak pH 8.0, 1M glisin çözeltisi eklenir ve nanopartiküllerin 30 dk. boyunca oda sıcaklığında sabit hızda dönen rotatorda karışması sağlanmıştır. Karıştırma sonunda nanopartiküller mıknatıs ile ayrılıp pH 7.4 fosfat tamponu ile 3 defa yıkanmış ve 2 ml fosfat tamponunda süspanse edilmiştir. IgG 1 ligandının PHB/CMCs nanopartiküllere kimyasal olarak bağlanma işlemi aşağıdaki şekildeki gibidir.



Şekil 3.4. IgG 1 ligandının PHB/CMCs nanopartiküllere kimyasal olarak bağlanma mekanizması

Elde edilen ligand bağlanmış PHB/CMCs nanoplatformları daha sonraki işlemlerde kullanılmak üzere +4°C'de saklanmıştır.

3.2.7. Nanopartiküllerin Sitotoksisite Çalışmaları

Hazırlanan nanopartiküllerin boyut dağılımı, yüzey yükü gibi özellikleri belirlenmiş ve partiküller çeşitli fizikokimyasal karakterizasyon işlemlerinden geçirilmiştir. Elde edilen bulgulara ilave olarak, daha sonraki hayvan çalışmalarında kullanılan bu nanoplatformların biyolojik yönden güvenilirlikleri bir başka deyişle biyolojik uyumluluk testleri ISO 10993-5 no'lu uluslararası standarda uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmalar kapsamında farklı derişimlerde (1, 10, 25 ve 50 µg/ml) ve farklı formülasyonlara sahip nanoplatformlar belirtilen ISO standardında yer alan standart hücre hatlarından biri olan L929 fare fibroblast hücreleri üzerine sitotoksisitesi MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) testi ile incelenmiştir. L929 hücreleri %10 FBS, %1 L-glutamin ve %1 penisilin-streptomisin içeren DMEM-F12 besi yeri ile 37°C'de, %5 CO₃ ortamında kültüre edilmiştir.

Çalışmada 5×10^3 hücre/ml konsantrasyonda L929 hücreleri 96 kuyucuklu plaklara ekilmiştir. Hücreler bir gece etüvde inkübe edilmiştir. Nanopartiküller, sterilizasyon işlemi için UV ışık altında 30 dakika bekletilmiştir. Daha sonra farklı konsantrasyonlardaki nanopartiküller hücre kültür vasatı ile dilue edilerek hazırlanmış ve her bir kuyucuğa 200µl pipetlenmiştir. Plaklar 24 saat boyunca etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyon işleminden sonra, plaklardaki nanopartikül içeren vasat atılmış yerine 13 µl MTT solüsyonu, 100 µl taze vasatla birlikte pipetlenmiştir. Plaklar 4 saat süre ile etüvde inkübe edilmiştir. Bu inkübasyon sonrasında yine plaklardaki vasat atılmış ve 100 µl 0.08M HCl içeren saf izopropanol kuyucuklara pipetlenmiştir. Plaklar 30 dakika oda ısısında karanlıkta inkübe edilmiş ve daha sonra 570 nm’de mikropalak okuyucusunda okutulmuştur.

Kontrol çalışmasında hücreler sadece hücre kültür vasatı ile etkileştirilmiştir. Alınan absorbans yüzde yüz olarak kabul edilmiş, test kuyucuklarından alınan absorbanslar ile karşılaştırılarak nanopartiküllerin sitotoksiteleri % canlılık olarak, aşağıda verilen formül yardımı ile hesaplanmıştır.

$$\%Canlılık = OD (numune) \times 100 / OD (kontrol)$$

Kardiyovasküler sistem rahatsızlıkları söz konusu olduğunda canlı sistemde karşılaşılabilecek hücre hatlarından düz kas hücreleri ve damar endotel hücreleri tez çalışmamızda model hücre hatları olarak kullanılmıştır. Yapılan çalışmalarda L929 hücreleri 5×10^3 hücre/ml, A7r5 hücreleri 7×10^3 hücre/ml ve HUVEC’ler ise 8×10^3 hücre/ml konsantrasyonda 96 kuyucuklu plaklara ekilmiştir. Ligand takılı Nanoplatformların hücre etkileşimleri bir önceki bölümde, sitotoksite deneylerine benzer şekilde gerçekleştirilmiş ve yüzde hücre canlılığı değerleri aynı formülasyon ile belirlenmiştir

3.3. Manyetik Nanoplatformlarla Yapılan *In Vivo* Çalışmalar

2010/14 dosya numaralı ve ‘Kardiyovasküler Sistem Rahatsızlıklarının Teşhis ve Tedavisinde Nanoteknolojik Yaklaşımlar’ isimli çalışma Hacettepe Üniversitesi Hayvan Etik Kurul Komitesi tarafından onaylanmıştır.

3.3.1. Sıçanlarda Aterosklerotik Plak Oluşturulması

Nanopartiküllerin hayvan uygulamaları için 36 adet erkek, sekiz haftalık *Wistar albino* ırkı sıçan, sekiz hafta boyunca % 1 hayvansal yağ katkılı standart sıçan yemi ile beslenmiştir [109]. Hayvanların sularına herhangi ekstra bir şey

katılmamış, serbest su alımları sağlanmıştır. Sekiz hafta sonrası diyet ile beslenen hayvanların ve standart sıçan yemi ile beslenen sıçanların; standart anestezi altında plak oluşumunu incelenmek amacı ile MR görüntüleri alınmıştır.

3.3.2. Sıçan Aterosklerotik Plakların MR ile Görüntülenmesi

Diyet süresi bitiminde sıçanlar Çizelge 3.1.'deki gibi gruplara ayrılmıştır.

Çizelge 3.1. Sekiz hafta boyunca % 1 hayvansal yağ katkılı standart sıçan yemi ile beslenmiş sıçanların grupları.

Gruplar	Sıçan sayıları
Negatif Kontrol	6
Pozitif Kontrol	6
IgG1/PHB-CMCs Np 1.gün	6
IgG1/PHB-CMCs Np 3.gün	6
An-5/PHB-CMCs Np 1.gün	6
An-5/PHB-CMCs Np 3.gün	6

MRI incelemelerinde öncelikli olarak hayvanların kardiyovasküler anatomisi tespit edilmiştir. Daha sonra standart yem ile beslenen sıçan ve kolesterolce zengin diyetle beslenen sıçanların aortları incelenmiştir.

IgG 1 ve An-5 takılı PHB-CMCs nanopartikülleri total hacim 200 µl serum fizyolojik içerisinde 50 µg/ml konsantrasyonda hazırlanmıştır. Operasyonların tamamı aseptik koşullar altında yapılmıştır. Sıçanlara sistemik anestezi için intraperitoneal yolla 40 mg/kg ketamin ve 1mg/kg ksilazin verilmiştir. Sıçanların sağ femoral ven hattı belirlenmiş (Şekil 3.5.) ve bu yolla nanopartiküller enjekte edilmiştir. Enjeksiyondan sonra operasyon hatları süturlanmıştır.



Şekil 3.5. *In vivo* hayvan çalışmaları

IgG 1 ve Anneksin-A5 ile modifiye edilmiş PHB-CMCs nanopartikül enjekte edilen sıçanlar rastgele 1. gün ve 3. gün olarak ayrılmıştır ve 1. gün grubundaki sıçanların MR incelemeleri aynı gün yapılmıştır. Enjeksiyonlardan üç gün sonra ise 3. gün grubundaki sıçanların MR incelemeleri yapılmıştır (Şekil 3.6.).



Şekil 3.6. Sıçanların MR ile görüntülenmesi

3.3.3. Biyokimyasal Analizler

3.3.3.1. Kalp ve Damar Dokusunun Homojenizasyonu

1. ve 3. gün MR incelemeleri tamamlanan hayvanların serumları alındı ve akciğer, karaciğer, dalak, kalp ve böbrekleri çıkartıldı. Doku örnekleri önce kanı uzaklaştırmak için soğuk distile suyla yıkandı. Dokular hassas terazide tartılıp, 1/10 oranında fosfat tamponu ile dilüe edildi. Daha sonra homojenizatörle 9600 devir/dk'da 60 saniye süreyle mekanik olarak homojenize edildi. Burada parçalanmış numuneler 30 saniye süreyle sonifikasyon işlemine tabi tutuldular. Bu süre sonunda elde edilen % 10'luk homojenatlar, +4°C'de 5 dakika süreyle 3500 g'de santrifüj edilerek süpernatantlar elde edildi. Bu süpernatantlarda glutasyon,

malondealdehyd (MDA), ileri oksidasyon protein ürünleri (AOPP), süperoksit dismutaz (SOD), nitrit ve nitrat düzeyleri ölçüldü.

3.3.3.2.Serum/doku MDA düzeyleri

Serum/doku MDA düzeyleri Ohkawa ve arkadaşlarının tarif ettiği yöntemle göre tayin edilmiştir. Bu yöntemin ilkesi; homojenattaki proteinlerin sodyum dodesil sülfat (SDS) ile bağlanmasından sonra örnekte bulunan MDA'nın ortam pH'sı 3,5 olduğu koşullarda tiobarbitürik asit (TBA) ile oluşturduğu komplekse bağlı kırmızı rengin 532 nm'de spektrofotometrik ölçümüne dayanır [110].

3.3.3.3.Serum/AOPP ölçümü

Serum/AOPP ölçümü Witko'nun metoduna göre yapılmıştır. 1,6 ml PBS, 0,4 ml numune, 0,1 ml KI ve 0,2 ml asetik asit sırasıyla eklenerek 340 nm'de köre karşı okutulmuştur [111].

3.3.3.4. Nitrit ve Nitrat tayini

NO'nun ürünleri olan nitrit ve nitrat tayini Griess yönteminin esas alındığı Miranda K.M. ve arkadaşlarının çalışmaları dikkate alınarak gerçekleştirilmiştir [112].

3.3.3.5. Süperoksit dismutaz (SOD) Tayini

Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi, doku ekstratı SOD aktivitesi, Yi-Sun'un 1988'de tanımladığı, ksantin oksidaz ile $O_2^{\cdot-}$ oluşturması ve bunun da NBT ile renkli bir bileşik oluşturarak bu renk şiddetinin spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır. Ortamdaki SOD aktivitesi ne kadar fazla ise $O_2^{\cdot-}$ 'yi ortadan kaldıracığı için oluşan rengin şiddeti o kadar az olacaktır [113].

3.3.3.6.Glutatyon Tayini

Glutatyonunun ölçümü, Ellman'ın yöntemiyle yapılacaktır. Bu yöntem, hafif alkali ortamda, 5,5-ditiyobis 2-nitrobenzoik asidin (DTNB, Ellman reaktifi), hücredeki alifatik tiyol bileşikleriyle reaksiyonu sonucu her molekül tiyol başına oluşan, p-nitrofenol anyonunun miktarının spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır [114].

3.3.4. Histopatolojik Analiz

Histolojik incelemeler için pozitif ve negatif kontrol grubu sıçanlardan iki adet sıçan aortu çıkartılmış ve %10 formaldehid ile fikse edildi ve normal oda ısısında kapalı kapta saklandı. Dokular rutin alkol ve xylol serilerinden geçirilerek yüzeyi düzgün

kartondan yapılmış dikdörtgen şeklindeki küçük kutular içerisinde bloklandı. Dokular parafinle bloklandıktan sonra mikrotom ile 5 mikron kalınlığında ince kesitler yapıldı. Daha sonra abdominal aortta Prusya mavisi, hematoksilen-eosin ile boyanmış ve demir içeren nanopartiküllerin akümüasyonu ve aterosklerotik lezyonlar mikroskop altında 400x büyütmede histolojik yönden incelendi [115].

Prusya mavisi ile inceleme için dokular Thermo Excelsior Es doku takip cihazında doku takibine alınmıştır. Thermo Histostar cihazında parafin bloklara alınan numunelerin Leica RM2255 ultramikrotomda 6 µ kalınlığında kesitleri alınmıştır. Preparatlar deparafinize edildikten sonra hidroklorik asit ve potasyum ferrosiyanid solüsyonlarında 10 dakika bekletilmiştir. Çeşme suyunda 4 dakika yıkandıktan sonra distile sudan geçirilmiş ve nuclear fast red solüsyonunda 5 dakika bekletilmiştir. Çeşme suyunda 4 dakika yıkanan preparatlar %96'lık alkolden geçirilerek ksilole alınmıştır. Ksilolden çıkarılan preparatlar entellanla kapatılmıştır.

Hematoksilen-eosin boyama için dokular Thermo Excelsior Es doku takip cihazında doku takibine alınmıştır. Thermo Histostar cihazında parafin bloklara alınan numunelerin Leica RM2255 ultramikrotomda 6 µ kalınlığında kesitleri alınmıştır. Daha sonra preparatlar 1. ksilende 10 dakika, 2. ksilende 10 dakika bekletilmiştir. Sonrasında 1. alkolde (% 96) 2 dakika, 2. alkolde (% 96) 2 dakika bekletilmiştir ve preparatlar musluk suyunda 1- 2 dakika yıkanmıştır. Preparatlar hematoksilende 5 dakika bekletilmiş ve musluk suyunda 3 dakika yıkanmıştır. Daha sonra preparatlar asit alkole 2-3 defa daldırılmış ve musluk suyunda 1 – 2 dakika yıkanmıştır. Sonrasında preparatlar amonyak solüsyonuna 10 defa daldırılmış ve musluk suyu ile yıkanmıştır. Sonrasında preparatlar eozinde 5 dakika bekletilmiş ve musluk suyunda 3 dakika yıkanmıştır. Daha sonra preparatlar 1. alkolde (% 96) 1 dakika, 2. alkolde (% 96) 1 dakika bekletilmiştir ve preparatlar kurutulmuştur. Sonra preparatlar ksilende 3 dakika bekletilmiş ve üzerine entellan damlatarak lamel ile kapatılmıştır.

Mikroskop sahasında gözlenen damar kesitleri fotoğraflarla tespit edildi (H.E.X400).

3.4. Köpük Hücre Oluşum Modeli

3.4.1. Okside LDL'nin Elde Edilmesi

20 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ tartılıp 80 ml'ye distile su ile tamamlandı. LDL örnekleri (100 μg protein/ mL (Fosfat Tamponu) PBS) üzerine hazırlanmış olan CuSO_4 çözeltisi son konsantrasyonu 10 μM olacak şekilde ilave edildi. LDL içeren bu tüpler oksidasyonun gerçekleşmesi için 24 saat 37°C ' de etüvde inkübasyona bırakıldı. Oksidasyondan sonra reaksiyonu sonlandırmak için örnekler 1.5 mM (Etilen diamin tetraasetik asit) EDTA ilave edildi.

3.4.1.1. Okside LDL'nin Diyalizi

Okside-LDL'de diyaliz EDTA'yı ve diğer safsızlıkları uzaklaştırmak amacıyla yapıldı. Diyaliz işleminde selüloz membrandan yapılmış 12-14 kDa gözenekliliğine sahip diyaliz torbası (Sigma, D 9777) kullanıldı. Yarı geçirgen bir zar olan diyaliz torbası EDTA ve küçük moleküllerin dışarı çıkmasına izin verirken tamponun da içeri girmesini sağlar. Bunun sonucu olarak da diyaliz sırasında membran yüzey alanı artar. Denge konsantrasyonuna erişildiğinde, çözünenlerin dağılımı her iki yönde de aynı olmaktadır. Deneyler sırasında kullanılan tüm LDL ve okside-LDL örnekleri diyaliz işlemiyle saflaştırıldıktan sonra kullanılmıştır.

3.4.1.2. Diyaliz Torbalarının Hazırlanışı ve Diyalizin Yapılışı

Diyaliz torbaları yaklaşık 4-5 cm ebatlarda kesildi, 100 mM NaHCO_3 -10 mM Na_2EDTA (pH 7,4) çözeltisi içerisinde, 60°C 'de 2 saat boyunca sürekli ve yavaşça karıştırılarak açılması sağlandı. 10 mM EDTA-10 mM PBS (pH 7,4) çözeltisi ile yıkandı aynı çözelti içinde 4°C 'de saklandı.

Diyaliz torbalarına yerleştirilen okside olmuş LDL örnekleri önce 10 mM EDTA-10 mM PBS (pH 7,4) tamponu ile 24 saat, daha sonra 10 mM PBS (pH 7,4) tamponu ile yine 24 saat her 3-4 saatte bir tamponlar değiştirilerek, 4°C 'de, karanlıkta ve sürekli karıştırılarak diyaliz edildi. İlk aşamada EDTA'lı tampon kullanılmasının nedeni bakır çözeltisiyle başlatılan oksidasyonun sonlandırılmak istemesindedir. Örnekler diyalize tabi tutularak, diğer işlem basamaklarında saf kullanılması amaçlanmıştır.

3.4.2. Okside LDL Karakterizasyonu

3.4.2.1. MDA Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulması

Malonaldehide bis- dimetilasetal' in (MDA) 10 mM'lık stok solüsyonu hazırlandıktan sonra 4-160 μM aralığında standart konsantrasyonları hazırlanarak

deney protokolündeki örneklerde olduğu gibi 200 µL hacmin kullanılmasıyla elde edildi. 4- 160 µM konsantrasyon aralığında 13 ölçüm yapıldı ve elde edilen değerler grafiğe yerleştirilerek grafikten standart eğrisinin eğimi bulundu ve bu değer MDA hesaplanmasında formül üzerinde kullanıldı.

3.4.2.2.MDA Tayini

LDL ve okside edilen LDL örneklerinde MDA düzeyleri tayini için Beuge'nin çift kaynatmalı tiyobarbitürik asit reaktivitesi metodu kullanarak ölçüldü Bu metod, lipid peroksidasyonu yıkım ürünlerinden olan MDA'nın TBA (Tiyobarbitürik asit) ile reaksiyona girmesi sonucu oluşan pembe renkli kompleksin 532 nm dalga boyunda verdiği absorbansın spektrofotometrik olarak ölçülmesi prensibine dayanır [116]. 0.5 ml PBS içerisindeki LDL örnekleri, üzerine 2.5 ml % 10'luk trikloroasetik asit eklenerek karıştırıldı. 60 dakika kaynatıldı ve 4°C soğutuldu. 5000 devir/dk'da 10 dakika santrifüj edildi. 2 ml süpernatant alınıp, üzerine 1ml % 0.67'lik tiyobarbitürik asit eklendi. Tüpler karıştırıldıktan sonra 15 dakika kaynatıldı ve hemen soğutuldu. 532 nm'de absorbansları, numune yerine distile su konularak hazırlanan köre karşı okundu.

Sonuçlar, MDA-TBA kompleksinin 532 nm'deki molar ekstinksiyon katsayısından ($\epsilon=2.94 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) yararlanılarak nanomol/mg protein olarak hesaplanmıştır.

3.4.2.3.Göreceli Lipid Elektroforetik Mobilitesi

LDL ve Okside edilmiş LDL örnekleri agaroz jel elektroforezi yapılarak elektroforetik mobiliteleri saptanmıştır. Örnekler %0.5' lik agaroz jele yüklenerek 100 Voltta, 50mA 50 mM barbitürik asit (pH 8.6) içerisinde 60 dk elektroforez yapıldı. Daha sonra, jel 60% metanol, 30% su ve 10% asetik asit içeren çözelti ile 60 dk fikse edilmiş ve 80 °C olan fırında kurutulmuştur. 0.06% Sudan black B ile boyanarak görüntülenmiştir. Sonuçlar yürütülen mesafe açısından ifade edildi [117].

3.4.2.4.ApoB Frakmentasyon Tayini

LDL ve Okside edilmiş LDL örnekleri 3% SDS, 10% gliserol, and 5% bromofenol içeren çözelti ile 95 °C 15 dk denatüre edilmiştir. Daha sonra örnekler, 100 Voltta 60 dk, SDS-PAGE (8%) elektroforezine tabi tutulmuştur. Elektroforez işleminden sonra jel, 60% metanol, 30% su ve 10% asetik asit içeren çözelti ile 60 dk fikse edilmiş ve 60-70 °C'de 30 dk kurutuldu, Coomassie mavi ile jel 15 dk maruz bırakıldı. Jel daha sonra % 20 lik etanol çözeltisi ile boya giderme işlemine tabi tutularak görüntülendi [118].

3.4.3. İnsan Monositinden Makrofaj Farklılaştırılması

THP-1 (TIB-202), insan monosit hücre hattı, ATCC firmasından satın alınmıştır. Hücreler %5 CO₂ ile %10 cenin dana serumu (PAA, Linz, Avusturya), 2 mM/L-glutamin (Sigma) ve %1 antibiyotik-antimikotik çözelti ile takviye edilmiş RPMI 1640 ortamı içinde nemlendirilmiş bir inkübatör içinde kültüre edildi. THP-1 monosit hücreleri Yazıhan ve arkadaşlarının anlattığı gibi 100 ng /ml forbol 12-miristat-3-asetat (PMA) ilave edilmesi ile 48 saat inkübe edilerek makrofajlara farklılaştırılmıştır [119]. Deney başlatıldıktan 1 gün sonra PMA içeren RPMI medyumunu ortamdaki uzaklaştırarak, taze hazırlanmış PMA içermeyen RPMI medyumunu ile yenilendi.

3.4.3.1. İnsan Monositinden Makrofaj Farklılaştırılmasının Morfolojik İncelemesi

Morfolojik inceleme için, hücreler, 6 cm çapındaki plastik hücre kültürü petri tabakları içinde inkübe edildi. Farklılaşmamış THP-1 monosit hücreleri ve farklılaştırılmış makrofaj hücreleri faz kontrast mikroskopunda incelenmiştir. (Leica DMR epifluorescence microscope, Germany).

3.4.3.2. THP-1 Monosit Hücrelerinin Makrofaja Dönüştürülmesi Akış Sitometrik Histogramlar ve Değerlendirmeleri

CD14 yüzey markerı hücre aktivasyonu ve miyelomonositik hücre farklılaşmasının önerilen bir göstergesi olmuştur. THP-1 monosit hücrelerinde CD14 ifade seviyeleri, hem naiv (monositler) hem de PMA ile uyarılan (makrofajlar) hücrelerde akış sitometri ((Beckman-Coulter FC 500, CA, USA) ile değerlendirildi. CD 14 işaretlenmesini yapabilmek için hücreler fikoeritrin (PE)-etiketli CD14 antikoru ile +4°C de 60 dk süreyle inkübe edilmiştir. Fosfat tamponu (PBS) ile yıkandıktan sonra hücreler, RPMI ortamı içinde süspansiyon haline getirilmiştir. CD14 ile işaretlenen hücreler flow sitometri ile değerlendirildi. Floresan ölçümler 488 nm'lik bir uyarma dalga boyu ile 575 nm emisyon dalga boyunda ölçüldü.

3.4.4. Köpük Hücre Oluşumu ve Karakterizasyonu

THP-1 monosit ve farklılaştırılan makrofaz hücrelerine, (100 µg protein/ mL PBS) LDL ve o-LDL medyum içerisine ilave edilerek 24 saat 37 °C de inkübe edildi. Aşağıdaki deney grupları oluşturuldu:

- THP-1
- THP-1 + LDL

- THP-1 + okside-LDL
- MAKROFAJ (MQ)
- MQ + LDL
- MQ + okside-LDL

Elde edilen köpük hücrelerin hücre kültürü süpernatantları alınarak, TNF- α , IL-6 ve midkin seviyeleri 2, 6, 24 ve 48 saat sonra ELISA yöntemi ile ölçülmüştür. TNF- α , IL-6 ve midkin testlerinin en düşük dedeksiyon seviyeleri sırasıyla 16 pg/ml, 32 pg/ml ve 300 pg/ml olarak bulunmuştur.

Elde edilen köpük hücrelerin lipid profilleri karşılaştırılarak hücreye lipid alımı karakterize edilmiştir.

Elde edilen köpük hücrelerinin süpernatant ve sitoplazmalarında reaktif oksijen türlerinden MDA ve reaktif nitrojen türleri yukarıda bahsedildiği şekilde tekrar edilip, değişimler istatistiksel olarak belirlenmiştir.

3.4.4.1. Köpük Hücre Sitotoksisite Çalışmaları

Elde edilen makrofajlara son konsantrasyonu 100 μ g/mL olan Okside-LDL ilave edilerek 24 saat etüvde inkübe edileceklerdir. Hücrelerin sitotoksisiteleri MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoluim bromide; Thiazolyl blue) yöntemi kullanılarak incelenecektir, İnkübasyondan sonra plaklardaki vasat atılarak, kuyucuklara 100 μ l 0,08M HCl içeren saf izopropanol pipetlenecektir. Plaklar 30 dakika oda ısısında karanlıkta inkübe edilecekler ve daha sonra 570 nm'de mikropalak okuyucusunda okutulacaktır. Kontrol çalışmasında hücreler sadece hücre kültür vasatı ile etkileştirilecektir. Alınan absorbans yüzde yüz olarak kabul edilip, test kuyucuklarından alınan absorbanslar ile karşılaştırılarak optik dansite olarak ifade edilmiştir [119].

3.4.5. Köpük Hücre Membran İzolasyonu

Hücre membranının deterjan dirençli düşük yoğunluklu bir kısmını elde etmek için Brown ve Rose' un geliştirdiği yöntem kullanılmıştır [120]. Hücreler hazırlanan liziz tampon (5 mM Tris-HCl; pH 7.4 ve proteaz İnhibitör kocktail) içerisinde toplanmıştır. Toplanan lizat 450 \times g de 10 dk santrifüjlenerek, çekirdeklerinden ayrıştırılmıştır (pelet uzaklaştırılmıştır). Daha sonra hücre membranını elde etmek için alınan süpernatant mekanik yöntemle parçalanarak, 100,000 \times g de 30 dk santrifüj edilmiştir. Elde edilen pelet 250 μ l liziz tampon içerisinde çözülmüştür.

Örneklerin protein içerikleri mini Bradford testi ile hesaplanmıştır [121]. Elde edilen örnekler protein çalışmalarında kullanılmak üzere -80 °C de saklanmıştır [122].

3.4.6. Matris Destekli Lazer Desorpsiyon- İyonlaşmalı Kütle

Tüm kütle spektrumları, Voyager-DETM PRO MALDI-uçuş zamanlı-kütle Spektrometresi (Applied Biosystems, Amerika) ile elde edilmiştir. Sistemde 337 nm dalga boyunda çalışan azot lazeri (Spectra Physics, USA) kullanılmış ve uygulanan lazer enerjisi gerekli oldukça değiştirilmiştir. İyonlara yaklaşık 20 kV kadar bir hızlandırma potansiyeli uygulanmıştır. Bütün analizler esnasında sistemdeki vakum 5×10^{-8} torr değerinde, analizler için oldukça elverişli düzeyde tutulmuştur. Spektrumlar lineer modda alınmıştır. Kütle spektrumları yaklaşık 100 lazer vuruşu sonucu toplanarak elde edilmiş ve kütle hatalarını düzeltmek için anjiyotensin (1296.5 g/mol), insülin (5733.5 g/mol) ve bradikinin (1060.2 g/mol) ile kütle kalibrasyonu gerçekleştirilmiştir. Son olarak spektrumlar bilgisayara kaydedilmiştir.

3.4.6.1. MALDI-MS analizleri için örnek hazırlama

Tüm çalışmalarda protein analizleri için 3,5-Dimetoksi-4-hidroksi-sinamik asit (%1 TFA içeren 1:1 su-asetonitril karışımında, 10 mg/mL derişimde) MALDI matris kullanılmıştır. Protein çözeltisi:matris çözeltisi oranı 1:10 (hacimce) olacak şekilde iyice karıştırılıp homojen hale getirildikten sonra elde edilen örnek-matris karışımları bir MALDI örnek plakasındaki her bir spota 0.5 ile 1.0 µL hacimleri arasında uygulanıp açık havada kurutulmuştur. Kuruyan örnekler MALDI-Kütle Spektrometresi ile analiz edilmiştir.

3.4.6.2.Enzimatik Parçalama

Membran izolasyonuna tabi tutulan hücre örneklerinden (100µl) alınıp içerisine 20 µl üre ve 1 µl 1M 1-4-dithiotheitol (DTT) eklenerek 1 saat 37° C de bekletilmiştir. Bekletilen örnekler alınarak içerisine 20 µl 200mM Iodaasetat eklenerek karanlıkta 1 saat 37° C de bekletilmiştir. Daha sonra 4 µl 1M DTT ve 60 µl 25 mM Amonyum Bikarbonat çözeltiye ilave edilmiştir. Kullanılan bütün çözeltiler 25 mM Amonyum Bikarbonat (pH= 7.8) çözeltisi ile hazırlanmıştır. Proteinler, bu konudaki çalışmalarda en sık kullanılan proteolitik enzim olan tripsin ile arjinin ve lizin aminoasitlerinin karboksil uçlarından parçalanarak daha küçük peptit birimlerine ayrılmışlardır. Tripsin enzimi, KH_2PO_4 çözeltisi içerisinde hazırlanmıştır. İşlemlere tabi tutulan protein çözeltisine tripsin enzimi (enzim/ protein oranı, 1:30 mol olarak)

eklenerek 18 saat 37° C de inkübe edilmiştir. Enzimatik parçalama sonrası elde edilen örnekler ESI-qToF-MS cihazıyla analiz edilmek üzere – 80 ° C de saklanmıştır.

3.4.6.3. ESI- MS Çalışmaları

İnkübasyon sonrası elde edilen örnek 2 µL akış hızı 0.3 ml/ dk olacak şekilde ayarlanmıştır. Zorbax Extend C18 (gözenek boyutu 1.8 µM, uzunluk 2.1x50 mm) kolonu kullanılmıştır.

Analizde kullanılan mobil faz 1; asetonitril:su 3:97 % oranında hazırlanmış ve % 0.1 formik asit ilave edilmiştir. Mobil faz 2; asetonitril:su 97:3 % oranında hazırlanmış ve % 0.1 formik asit içermektedir. Gradyen çalışmada, ilk 2 dakika % 100 mobil faz 1 uygulanmış ve 20. dakikaya ulaşıldığında % 55 oranında kalacak şekilde kolondan geçirilmiştir. 30 dk sonunda % 10 luk orana ulaşılmış ve devamında 10 dakika süreyle % 10 mobil 1 fazı kolonda tutulmuştur. Cihazda ESI-qToF-MS (Agilent 6530, USA) yazılımı kullanılmış ve oto MS/MS modunda veriler elde edilmiştir. MASCOT arama motorunda MS/MS sonuçları analiz edilerek yapı tayini gerçekleştirilmiştir.

3.5. İstatistiksel Analiz

Çalışmamızda, sonuçlar ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir. Gruplar arasındaki farkların saptanmasında One Way ANOVA kullanılmıştır. Korelasyonların değerlendirilmesinde Scheffe testinden yararlanılmıştır. Değerlendirme esnasında 0.05'in altında olan p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Bütün istatistiksel incelemeler SPSS-18 istatistik programı yardımıyla yapılmıştır.

4. DENEYSEL BULGULAR ve TARTIŞMALAR

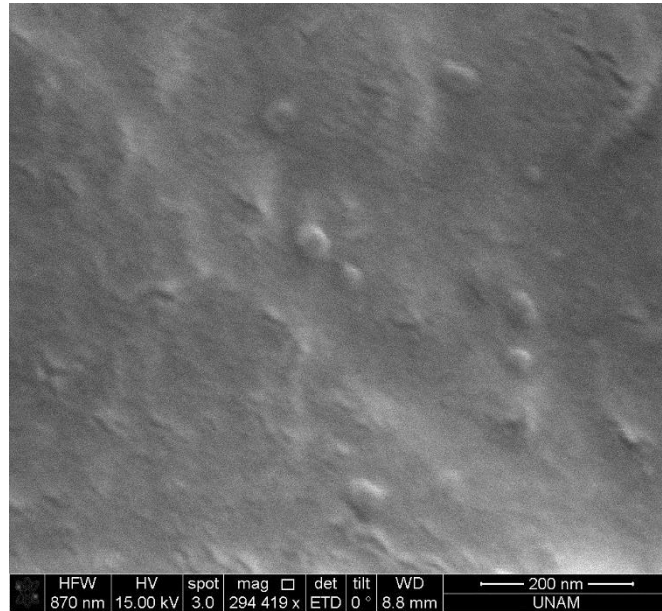
Tez çalışmaları kapsamında değişik polimerik özelliklerde nanoplatformlar hazırlanmış ve karakterize edilerek, kardiyovasküler sistem rahatsızlıklarında halihazırda kullanılan ligandla etkileştirilerek *in vivo* çalışmaları yapılmıştır. Tez çalışmasının esas amaçlarından olan yeni ligandların bulunabilmesi amacıyla insan hücreleri kullanılarak aterosklerotik plak oluşum modeli geliştirilmiştir. Çalışmalar lineer bir planda gerçekleşmediği için bulgular ve tartışma kısmı üç farklı alt başlığa bölünmüştür.

4.1. Nanoplatformların Hazırlanması, Karakterizasyonu ve Ligand Çalışmaları

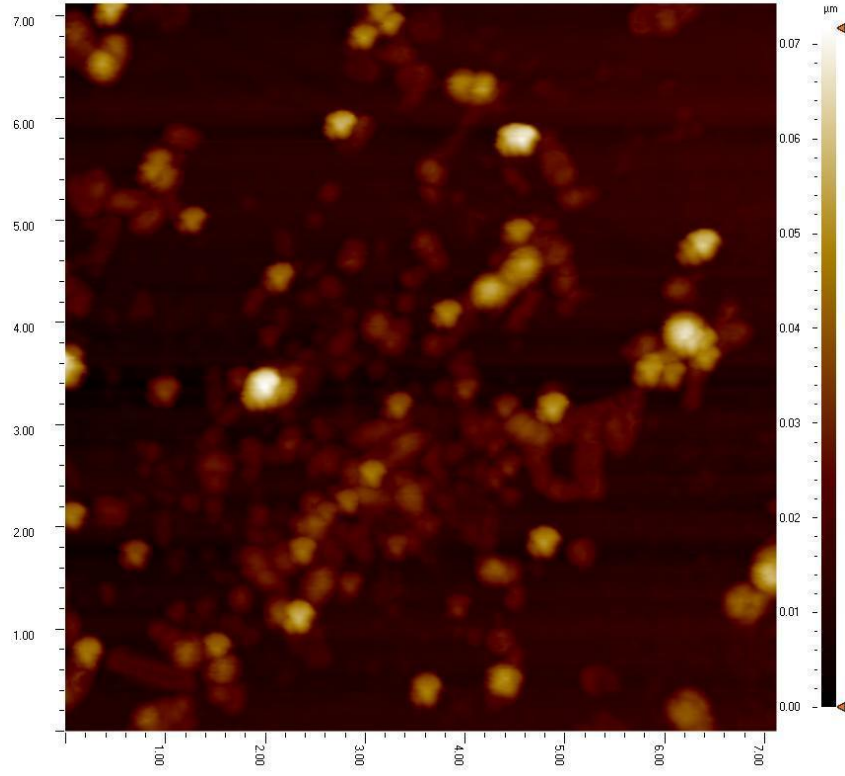
4.1.1. Nanoplatformların Hazırlanması ve Karakterizasyonu

4.1.1.1. Manyetik Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Belirtilen işlem basamakları uygulanarak elde edilen Fe₃O₄ nanopartiküllerin morfolojik incelemeleri taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ile karakterize edilmiştir. Elde edilen bulgular Şekil 4.1. ve 4.2.'de sırasıyla verilmiştir.



Şekil 4.1. Fe₃O₄ nanopartiküllerin SEM görüntüsü



Şekil 4.2. Fe₃O₄ nanopartiküllerin AFM görüntüsü

Sentezlenen demir oksit nanopartiküllere ait SEM görüntüleri detaylı bir şekilde incelendiğinde, elde edilen demir oksit nanopartiküller, 11-20 nm boyut aralığında ve küresel formda olduğu, agregasyonların minimal düzeyde olduğu görülmektedir. Küçük boyutlardaki nanopartiküllerin görüntülenmesinde AFM tekniğinden de yararlanılmıştır.

Elde edilen AFM görüntüsünde demir oksit nanopartiküllerin dar bir aralıkta bulunduğu gözlenmiştir (Şekil 4.2.). AFM görüntülerinden elde ettiğimiz sonuçta da, nanopartiküllerin küresel boyutta olduğu, agregasyonun minimal düzeyde olduğu görülmektedir.

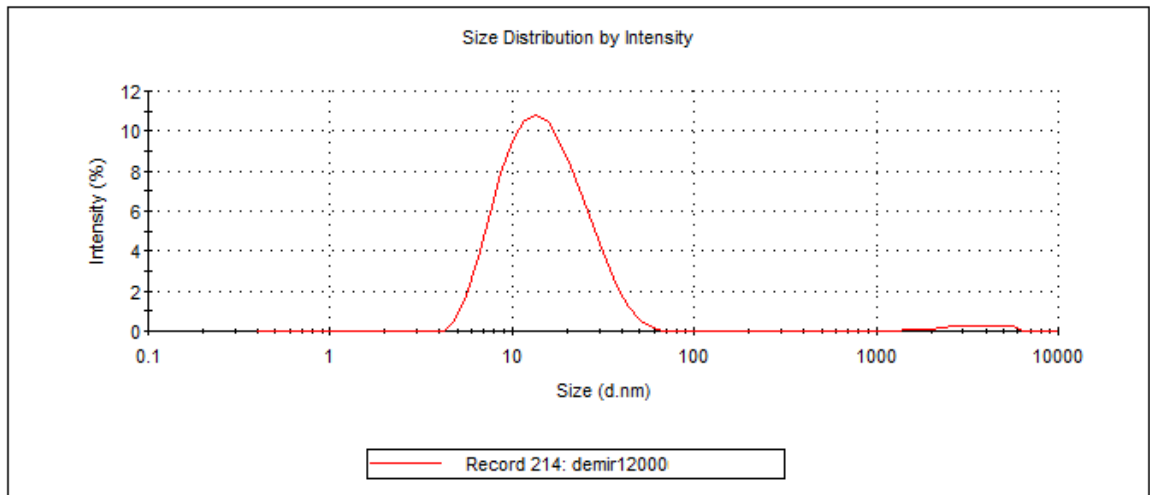
Tez kapsamında kullanılmak üzere öncelikle manyetik nanopartiküller (Fe₃O₄, demir oksit nanopartikülleri) sentezlenmiştir. Bu amaçla grubumuzda daha önce kanser tedavisinde hipertermi uygulamaları için geliştirilen nanopartiküller için kullanılan metodoloji kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar literatürle karşılaştırılmıştır. Wei-Wen Liu ve ark. [123] yaptıkları çalışmada demir oksit nanopartikülleri değişen molaritelerde HCl çözeltisi kullanılarak anyonik değişimlerle yaklaşık 20-25 nm aralığında sentezlemişlerdir. Bir diğer çalışmada

ise [124] demir oksit nanopartiküller bu çalışmada kullanılan çöktürme tekniği ile hazırlanmış ve 15-25 nm aralığında demir oksit nanopartiküller elde edilmiştir. Çalışmada elde ettiğimiz sonuçlar literatürü doğrular niteliktedir.

Çöktürme Ajanın Manyetik Demir Nanopartiküllerin Boyut Dağılımına etkisi

Kardiyovasküler sistemlerde kontrast ajan olarak kullanılacak nanopartiküllere gerekli manyetiklik özelliği sağlamak amacıyla amonyak derişim değeri 1, 1.25 ve 1.5 M olarak denenmiş ve yapılan deneyler tekrarlanmıştır. Yapılan çalışmalar sonunda istenilen değerlere (20 nm'nin altındaki büyüklüklere) 1 M'lık amonyak derişimi kullanılarak ulaşılmıştır.

Değişen amonyak derişimi ile oluşan nanopartiküllerin yüzey enerjisinin değiştiği görülmektedir. Elde edilen nanopartiküller 15-25 nm aralığında olsa da, yüzey yükleri ve kararlılıkları çok farklı bulunmuştur. 1.25 ve 1.5 M amonyak derişimi kullanıldığı zaman, nanopartiküller yüzey enerjisini düşürüp daha kararlı hale gelebilmek için birkaç yumağı birleştirerek agregasyon oluşturma eğilimindedirler. Ancak 1 M amonyak kullanıldığı zaman sentezlenen demir oksit nanopartiküllerin boyut dağılımları incelendiğinde, daha dar ve tek bir boyut dağılımına sahip oldukları görülmüştür. Elde edilen sonuçlar zeta sizer yöntemiyle Şekil 4.3'te gösterilmektedir.



Şekil 4.3. Manyetik Demir Oksit Nanopartiküllerin Zeta Sizer Grafik gösterimi

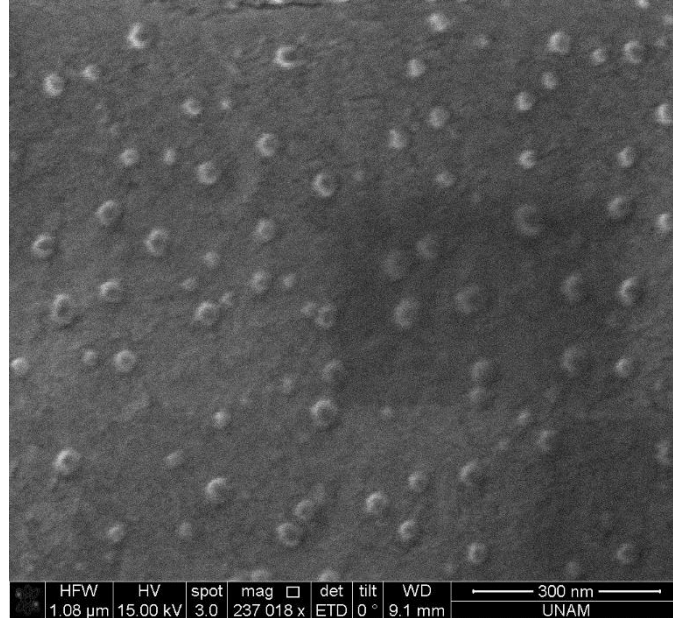
4.1.1.2. Manyetik PHB/CMCs Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

PHB/CMCs nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılacak olan karboksimetil (CMCs) polimer matriksi, düşük molekül ağırlıklı kitosan kullanılarak üretilmiş ve

FTIR spetrokopisi kullanılarak karakterize edilmiştir [125, 126]. Sentezlenen CMCs polimer matriksinin karakterizasyonu ayrıca literatürle karşılaştırılarak doğrulanmıştır [127, 128].

Manyetik PHB/CMCs Nanopartiküllerin Morfolojik Özellikleri

Sunulan çalışmalar [125, 126] kapsamında hazırlanan PHB/CMCs nanopartiküllerin SEM görüntüsü Şekil 4.4'te verilmiştir. Hazırlanan nanopartiküllerin küresel formda ve monodispers yapıda olduğu görülmüş ve AFM verilerinden yapılan hesaplamayla boy boy dağılımlarının 170-290 nm aralığında olduğu hesaplanmıştır.



Şekil 4.4. Manyetik PHB/CMCs nanopartiküllerin SEM görüntüsü

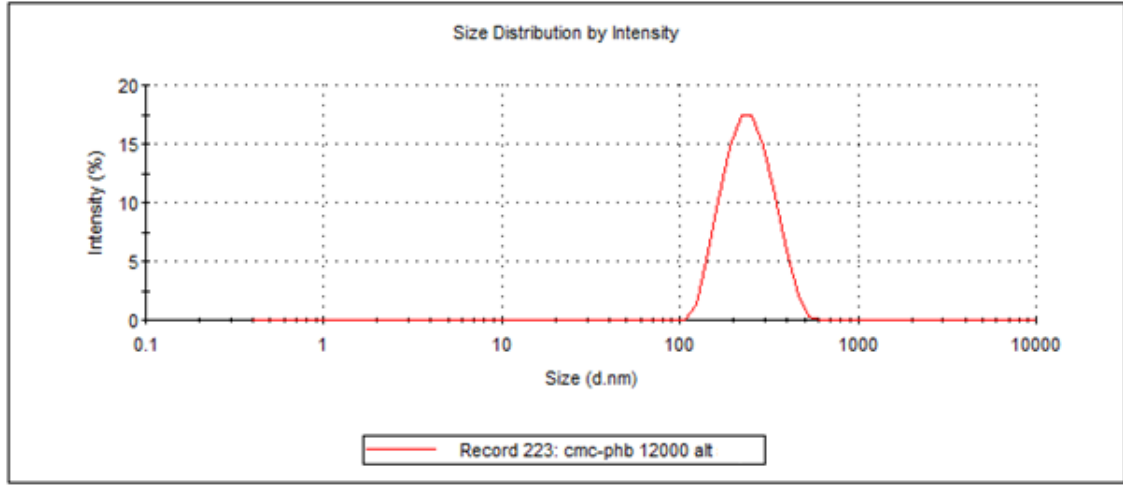
PHB/CMCs Nanopartiküllerin Boyut Dağılımına Etki Eden Parametreler

Yapılan çalışmada kullanılmak üzere en uygun boyutlara sahip partiküllerin hazırlanması için çeşitli parametreler incelenmiştir. İncelenen parametreler detaylarıyla Çizelge 4.1.'de sunulmaktadır. Yapılan deneyler sonucunda 170-290 nm boyut aralığında PHB/CMCs nanopartiküller elde edilmiştir.

Çizelge 4.1. PHB/CMCs Nanopartiküllerin Boy Boy Dağılımına Etki Eden Parametreler

PHB-CMCs oranı (mg/mg)/ Çözücü (mL)	Homozenizatör Hızı(rpm)	Emülsifier PVA Oranı(mg)	Boyut	PDI
(50/30)/10	15000	200	292	0.328
(50/30)/10	20000	200	264	0.209
(50/30)/10	24000	200	256	0.167
(50/30)/5	24000	200	249	0.210
(50/30)/10	24000	200	256	0.167
(50/30)/15	24000	200	260	0.223
(50/30)/10	24000	100	179	0.115
(50/30)/10	24000	200	256	0.234
(50/30)/10	24000	300	243	0.146

Yukarıdaki tabloda gösterildiği gibi çeşitli parametreler değiştirilerek, farklı boyutlarda nanopartiküller sentezlenmiştir. Elde edilen nanopartikül boyutları zeta sizer cihazında ölçülüp Şekil 4.5' de gösterilmiştir.



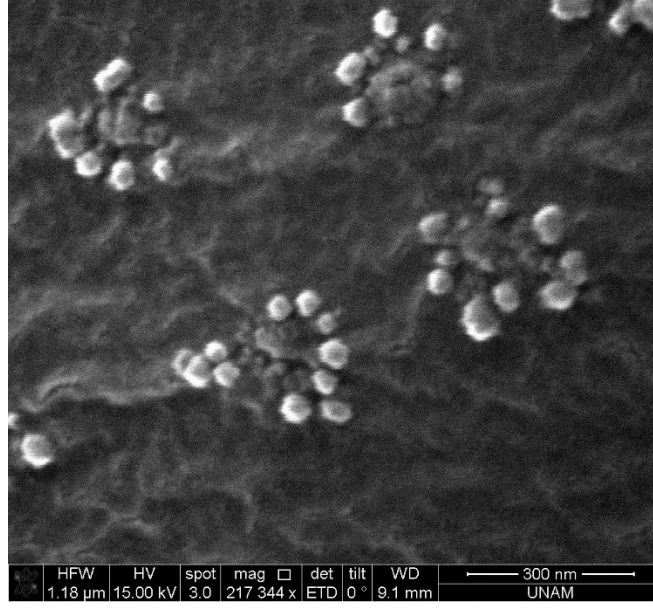
Şekil 4.5. Manyetik PHB/CMCs Nanopartiküllerin Zeta Sizer Grafik gösterimi

Yapılan deneyler sonucunda, ideal PHB/CMCs nanopartikülü elde edebilmek için standart koşullar olarak homojenizatör hızı 24000 rpm, emülsifiyer olarak kullanılan PVA miktarı 200 mg ve PHB/Kloroform oranı da 50/10 olarak seçilmiştir. Bu aşamadan sonra yapılmış olan çalışmalarda, nanopartikül üretimine bu seçilen parametrelerle devam edilmiştir.

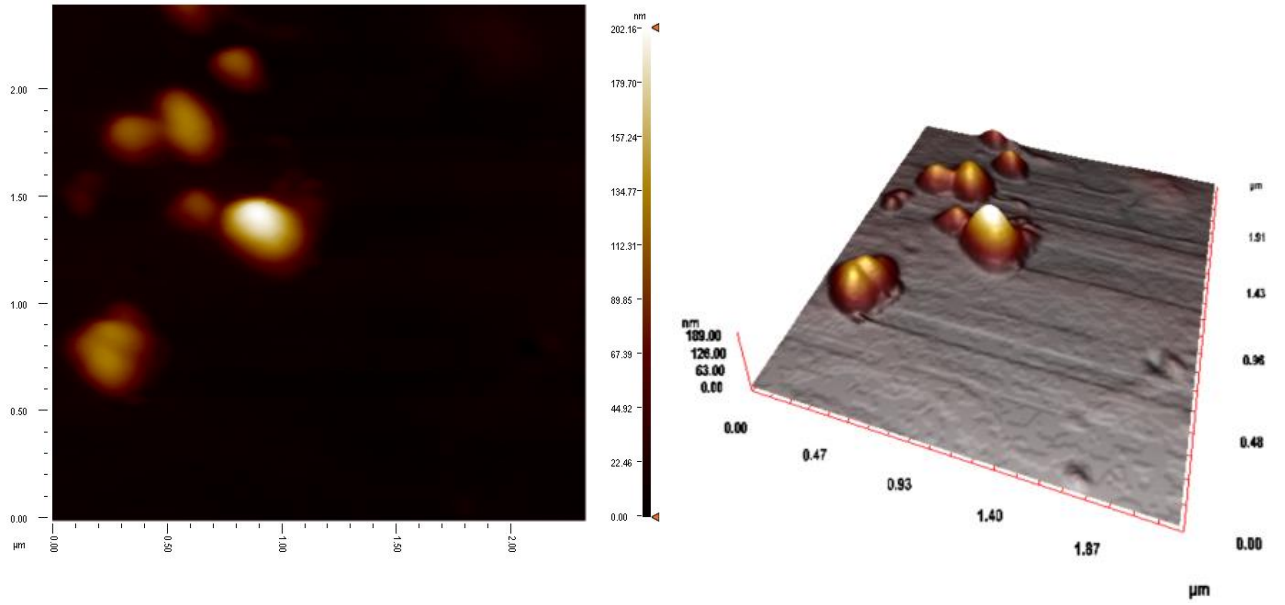
4.1.1.3. Manyetik PHB/Kitosan (PHB/Cs) Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Manyetik PHB/Cs Nanopartiküllerin Morfolojik Özellikleri

Sunulan çalışmalar kapsamında, hazırlanan PHB/kitosan nanopartiküllerin morfolojik özelliklerini incelemek amacıyla SEM ve AFM teknikleri kullanılmıştır. Elde edilen SEM ve AFM görüntüleri, Şekil 4.6 ve Şekil 4.7'de verilmiştir. SEM ve AFM görüntülerine bakıldığında nanopartiküllerin ortalama boyutları 200-250 nm aralığında olduğu görülmektedir.



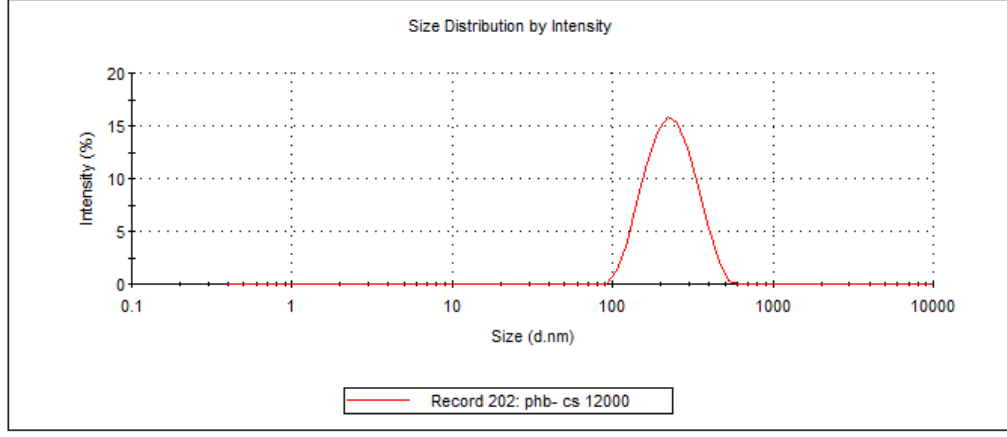
Şekil 4.6. Manyetik PHB/Cs nanopartiküllerin SEM görüntüsü



Sekil 4.7. (A). Manyetik PHB/Kitosan Nanopartiküllerin AFM fotoğrafı (B).
Manyetik PHB/Kitosan Nanopartiküllerin 3D AFM fotoğrafı

Manyetik PHB/Cs Nanopartiküllerin Boyut ve Yük Analizi

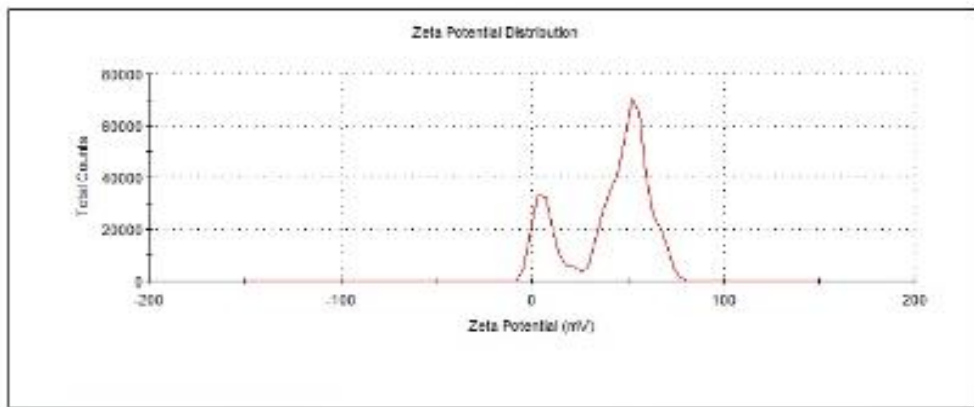
Hazırlanan PHB/Cs nanopartiküllerin zeta sizer sonuçları Şekil 4.8.'de sunulmaktadır.



Şekil 4.8. Manyetik PHB/Kitosan Nanopartiküllerin Zeta Sizer Grafik gösterimi

Elde edilen Zeta Sizer sonuçlarından anlaşılacağı gibi manyetik PHB/kitosan nanopartiküllerin ortalama büyüklüklerinin yaklaşık olarak 220-300 nm aralığında olduğu gözlenmiştir.

Hazırlanan PHB/kitosan nanopartiküllerin yüzey yükü incelenmiş ve zeta potansiyeli $+24.8 \pm 13.5$ mV olarak bulunmuştur. PHB ve PHB/CMCs nanopartiküllere göre daha yüksek zeta potansiyeline sahip olmasının nedeni, kitosan molekülündeki ($-NH_3^+$) gruplarının proton yükünün artmış olmasından kaynaklanmaktadır. Elde edilen sonuçlar 10 tane örneğin ortalamasıdır. Beklendiği gibi kitosan polimerinin katyonik özelliğinden dolayı pozitif özelliktedir [129].



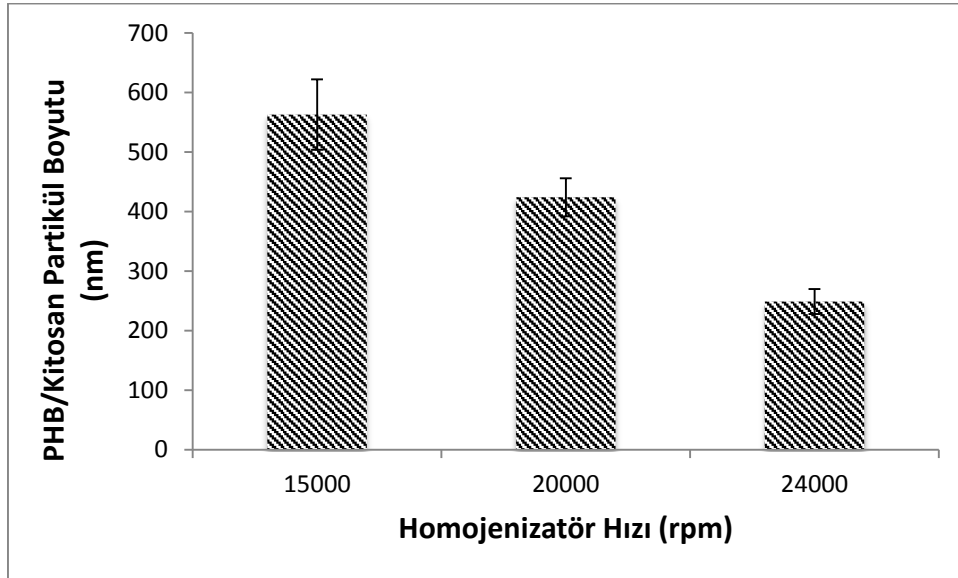
Şekil 4.9. Manyetik PHB/Kitosan Nanopartiküllerin Zeta Potansiyel Grafik Gösterimi

PHB/Kitosan Nanopartiküllerin Boyut Dağılımına Etki Eden Parametreler

Yapılan çalışmalar kapsamında, çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılarak, partiküllerin hazırlanması için homojenizatör hızı, emülsifiyer konsantrasyonu ve çözücü miktarı değiştirilerek bir dizi parametre incelenmiştir. PHB/Kitosan nanopartiküllerin boyutuna etki eden parametreler belirlenmiş olup, elde edilen sonuçlar detaylarıyla alt başlıklar halinde verilmektedir. Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda 200-255 nm boyut aralığında PHB/Kitosan nanopartiküller elde edilmiştir.

- Karıştırma Hızı

Homojenizatör hızının partikül boyutuna etkisini incelemek amacıyla homojenizatör dönüş hızı 15000-24000 rpm arasında değiştirilmiştir.



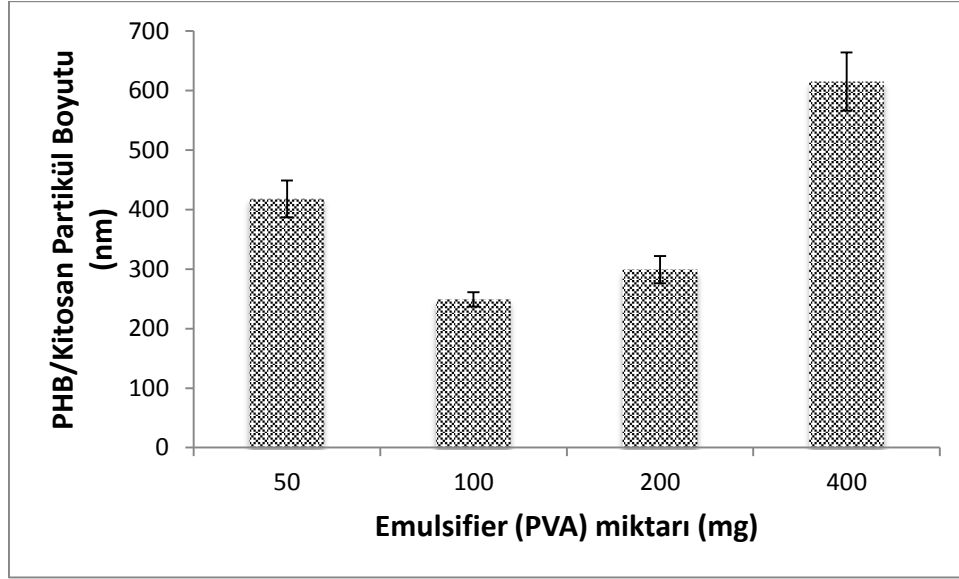
Şekil 4.10. Homojenizatör Hızının partikül boyutuna etkisi

Şekil 4.10'da görüldüğü gibi homojenizatör dönüş hızı 15000-24000 rpm aralığında arttırıldığında PHB/Kitosan nanopartiküllerin boyutlarının azaldığı gözlenmiştir. Homojenizatör dönüş hızı azaldıkça ortama aktarılan enerji miktarı azalacağından partikül boyutu artmaktadır. Bunun yanı sıra Alleman ve ark., yaptıkları çalışmada oluşacak nanopartikülün son boyutunun, ortama aktarılan damlacıkların boyutları ile ilişkili olduğunu ve yüksek karıştırma hızı polimer çözeltisinin daha küçük boyutlu damlacıklara dağılmasına neden olduğunu açıklamıştır [130]. Yapılan çalışmada 15000 rpm homojenizatör dönüş hızı ile üretilen nanopartiküllerin boyutları 563 nm iken; 20000 rpm'de bu değer 424 nm'ye

ve 24000 rpm'de de 249 nm' ye düşmüştür. Nanopartiküllerin boy dağılım indeksleri (PDI) sırasıyla; 0,612; 0,401; 0,254 olarak hesaplanmıştır.

- Emülsifier Konsantrasyonu

Emülsifier oranının partikül boyutuna etkisine bakmak için PVA miktarı 50 ile 500 mg arasında değiştirilmiştir.

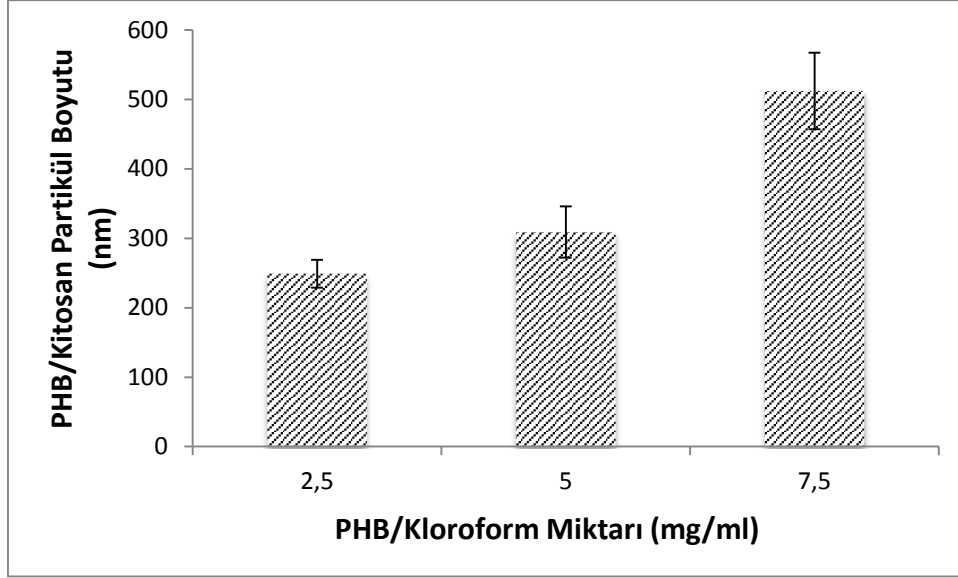


Şekil 4.11. PVA miktarının partikül boyutuna etkisi

Emülsifier edici ajanın türü ve konsantrasyonu emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yönteminde oldukça önemli bir parametredir. Nanopartiküllerin üretimi sırasında oluşan damlacıklar, parçacıkların yığın oluşturmalarını ve birleşmesini engelleyecek, bu da küçük boyutlarda partiküllerin oluşmasını sağlayacaktır. Yapılan çalışmada, emülsifier olarak kullanılan PVA, sulu faz ile polimer (organik faz) arasındaki ihtiyaç duyulan yüzey gerilimini sağlamaktadır. Teorik olarak beklenen bulgu, emülsifier konsantrasyonunun artması ile küçülen nanopartikül boyutudur. Fakat yapılan çalışmada, emülsifier miktarı ve partikül boyutu arasında bir bağlantı olmadığı gözlenmiştir. Şekil 4.11.'de de görüldüğü üzere, en küçük nanopartikül boyutuna 100 mg PVA kullanılarak ulaşılmaktadır. PVA miktarı 50 mg iken nanopartikül boyutu 418 nm; 100 mg iken 249 nm; 200 mg iken 299 nm ve 400 mg iken 615 nm'dir. Nanopartiküllerin boy dağılım indeksleri (PDI) sırasıyla; 0,402; 0,285; 0,327;0,438 olarak hesaplanmıştır.

- Polimer/Çözücü Oranı

Polihidroksibütirat/Kloroform oranının nanopartiküllerin boy-boy dağılımına etkilerini incelemek amacıyla Polihidroksibütirat/Kloroform oranı 2,5-7,5 (mg/ml) aralığında değiştirilerek nanopartiküller üretilmiştir. Polihidroksibütirat/Kloroform oranı kullanılarak yapılan deneylerde elde edilen partiküllerin boyut dağılımları Şekil 4.12'te sunulmuştur.



Şekil 4.12. PHB/Kloroform miktarının nanopartikül boyutuna etkisi

Polimer konsantrasyonunun nanopartikül çap boyutunu ve dağılımını önemli ölçüde etkilediği literatür tarafından doğrulanmıştır. Yüksek polimer konsantrasyonu kullanıldığı zaman daha büyük boyutlarda nanopartiküller elde edilmiştir. Sonuçlarımız literatürü doğrular niteliktedir [131].

Diğer tüm koşullar (30 mg Kitosan, 100 mg PVA, 24000 rpm homojenizatör hızı) sabit tutulduğunda, polimer konsantrasyonu arttıkça viskozite artışından dolayı kayma etkisi engellendiği için polimerin dispersiyon ortamında dağılması zorlaşır ve bu durum partikül boyutunun artmasına neden olmaktadır [132]. Yapılan çalışmalarda da partikül boyutunun, PHB/Kloroform oran arttıkça arttığı gözlemlenmiştir. Buna göre PHB/Kloroform oranı 2,5 mg/ml iken partikül boyutu 249 nm, 5 mg/ml iken 309 nm ve 7,5 mg/ml iken 512 nm olarak gözlemlenmiştir.

Ayrıca PHB polimeri organik çözücü içerisinde çözülmektedir ve yöntemimizde daha sonra sulu başka bir çözelti ilave bu çözücüye edilmektedir. Bu yaklaşım ile, organik çözelti içerisindeki sulu faz varlığı ile oluşan partiküller arasında hidrasyon

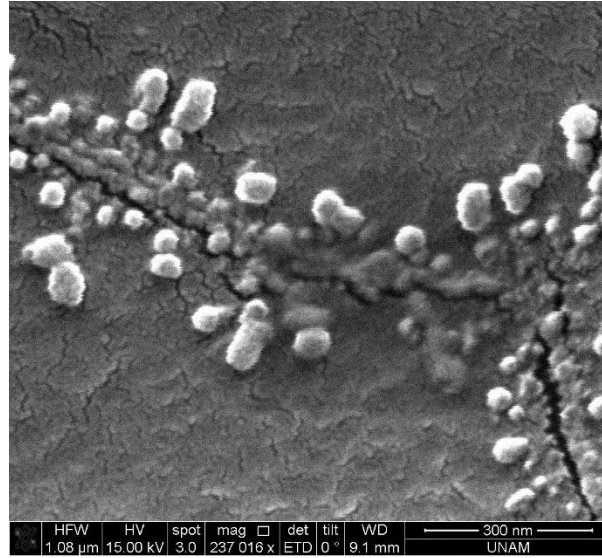
kuvvetleriyle denge sağlandığı görülmüştür. Tipik olarak polimer zincirinin polar başları partiküllerin yüzeyi üzerinde oluşmaktadır. Böylelikle hem daha küçük boyutlarda nanopartiküller sentezlenmekte hem de agregasyon azalmaktadır.

Yapılan deneyler sonucunda, ideal PHB/Kitosan nanopartikülü elde edebilmek için standart koşullar olarak homojenizatör hızı 24000 rpm, emülsifiyer olarak kullanılan PVA miktarı 100 mg ve PHB/Kloroform oranı 2.5 mg/ml olarak seçilmiştir. Bu aşamadan sonra yapılmış olan çalışmalarda, nanopartikül üretimine seçilen bu parametrelerle devam edilmiştir

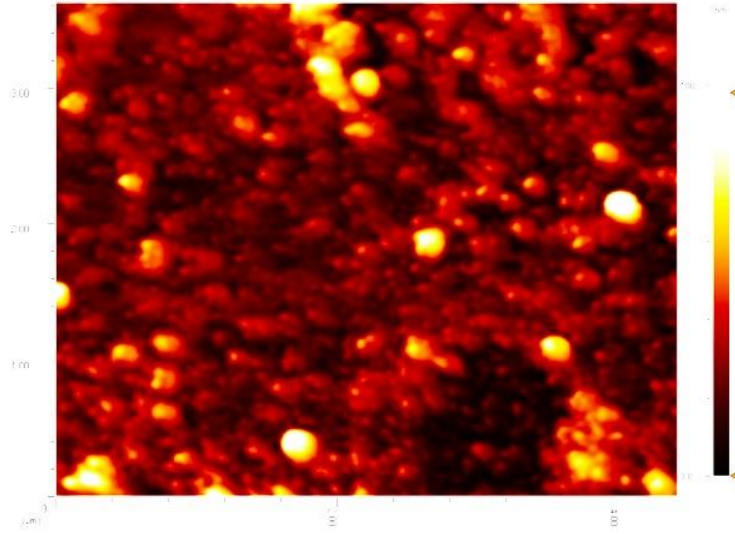
4.1.1.4. Manyetik Dekstran Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

- Manyetik Dekstran Nanopartiküllerin Morfolojik Özellikleri

Deneysel çalışmalar kısmında bahsedildiği üzere hazırlanan manyetik özelliğe sahip dekstran nanopartiküllerin morfolojik özellikleri, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve atomik kuvvet mikroskobu (AFM) kullanılarak karakterize edilmiştir. Elde edilen görüntüler, Şekil 4.13 'te ve 4.14 'te sunulmuştur.



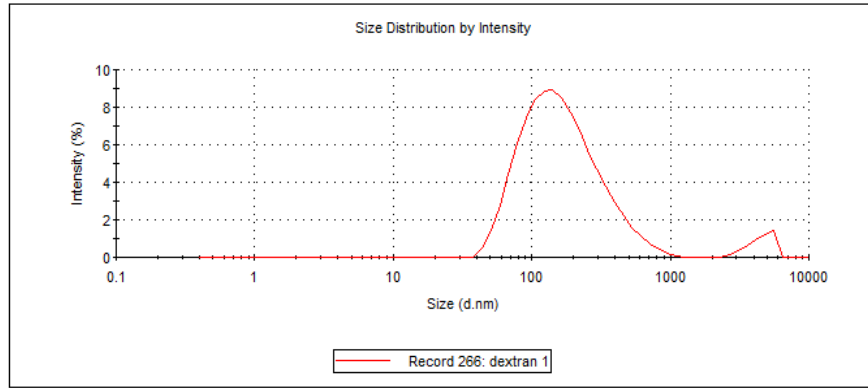
Şekil 4.13. Manyetik Dekstran nanopartiküllerin SEM görüntüsü



Şekil 4.14. Manyetik Dekstran Nanopartiküllerin AFM görüntüsü

Manyetik Dekstran Nanopartiküllerin Boyut ve Yük Analizi

Hazırlanan dekstran nanopartiküllerin zeta sizer sonuçları Şekil 4.15'te sunulmaktadır.

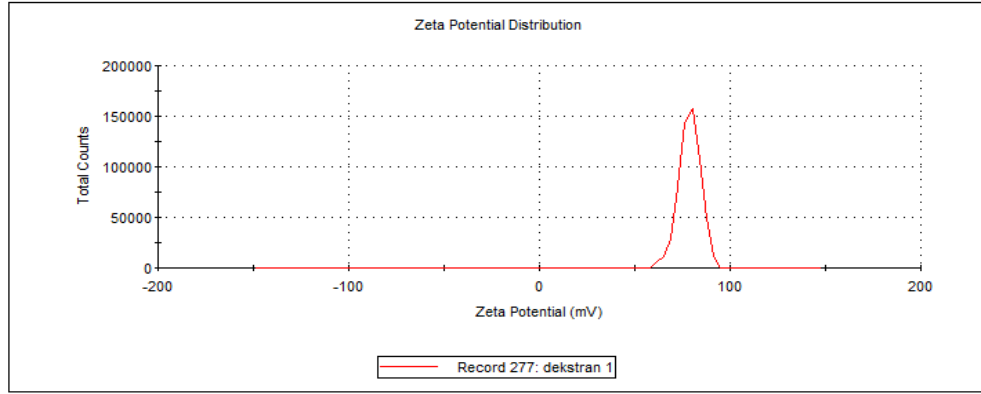


Şekil 4.15. Manyetik Dekstran Nanopartiküllerin Zeta Sizer Grafik gösterimi

Demir oksit nanopartiküllerin yüzey alanı/hacim oranı yüksek olmasından dolayı, yüzey enerjisini azaltmak için aggregasyona eğilimlidirler. Bununla birlikte demir oksit nanopartiküllerin kolloidal süspansiyonları çeşitli polimerler kullanılarak stabilize edilmektedir [133, 134]. Çalışmamızda, çöktürme tekniği kullanarak demir oksit nanopartiküller dekstran içerisinde oluşturulmuş daha kararlı hale getirilmiştir.

Dekstran demir oksit nanopartiküllerin yüzeyi yüksek polar etkileşimlere olanak vermektedir. Dekstran molekülündeki hidroksil grupları nispeten zayıf etkileşimlerde olmasına rağmen, polimer zincir uzunluğu arttıkça, hidroksil grupları

artmaktadır ve bu da hidrojen bağlarının toplam bağ enerjisine katkıda bulunarak demir oksit nanopartiküllerle etkileşimi artırmaktadır [135].



Şekil 4.16. Manyetik PHB/Kitosan Nanopartiküllerin Zeta Potansiyel Grafik gösterimi

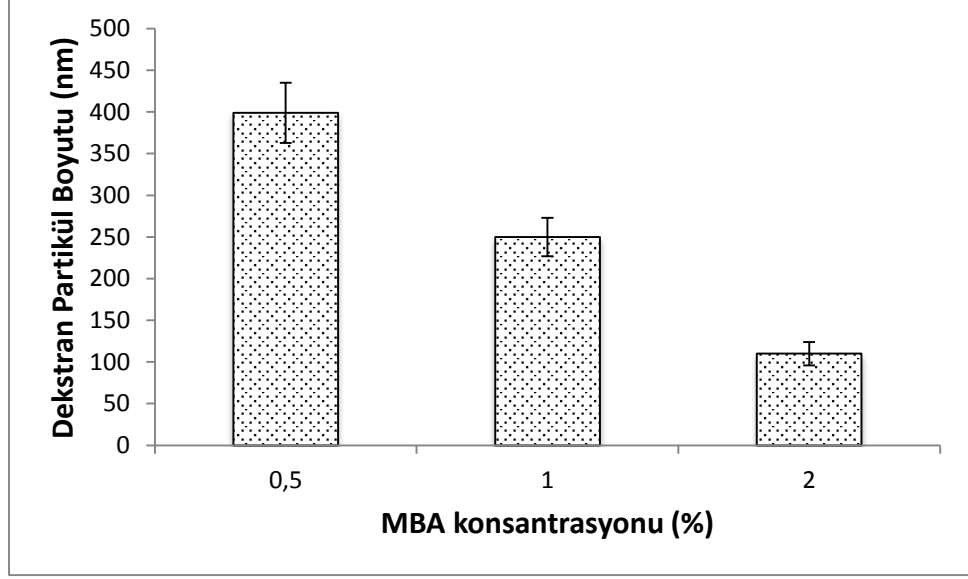
Hazırlanan dekstran nanopartiküllerin yüzey yükü incelenmiş ve zeta potansiyeli + 32.6 ± 5.71 mV dur. Elde edilen sonuçlar 12 tane örneğin ortalamasıdır. Elde ettiğimiz sonuçlar, literatürde belirtildiği gibi polimerler içerisinde oluşturulan demir oksit nanopartiküllerin agregasyon eğiliminin azaldığını destekler niteliktedir [136].

Manyetik Dekstran Nanopartiküllerin Boyut Dağılımına etki eden parametre

Yapılan çalışmalar kapsamında hazırlanan manyetik dekstran nanopartiküllerin boyut dağılımına etki eden parametre N-N metilen bisakrilamit (MBA) derişimi olduğundan bu parametre değiştirilerek üretilen nanopartiküllerin boy-boy dağılımına etkisi incelenmiştir.

- N-N Metilen Bisakrilamit Derişiminin Manyetik Dekstran Nanopartiküllerin Boyut Dağılımına Etkisi

Bu kısımda çapraz bağlayıcı ajan olarak N-N metilen bisakrilamit (MBA) seçilmiştir. Çapraz bağlayıcı miktarının partikül boyutuna etkisini incelemek amacıyla N-N metilen bisakrilamit konsantrasyonunu, % 0.5, % 1 ve % 2 arasında değiştirilip diğer parametreler sabit tutulmuştur (%13 dekstran (w/v), karıştırıcı hızı 1800 rpm ve karışma süresi 1 saat). Elde edilen nanopartiküllerin boyutları Şekil 4.17'de gösterilmiştir.



Şekil 4.17. MBA Konsantrasyonunun nanopartikül boyutuna etkisi

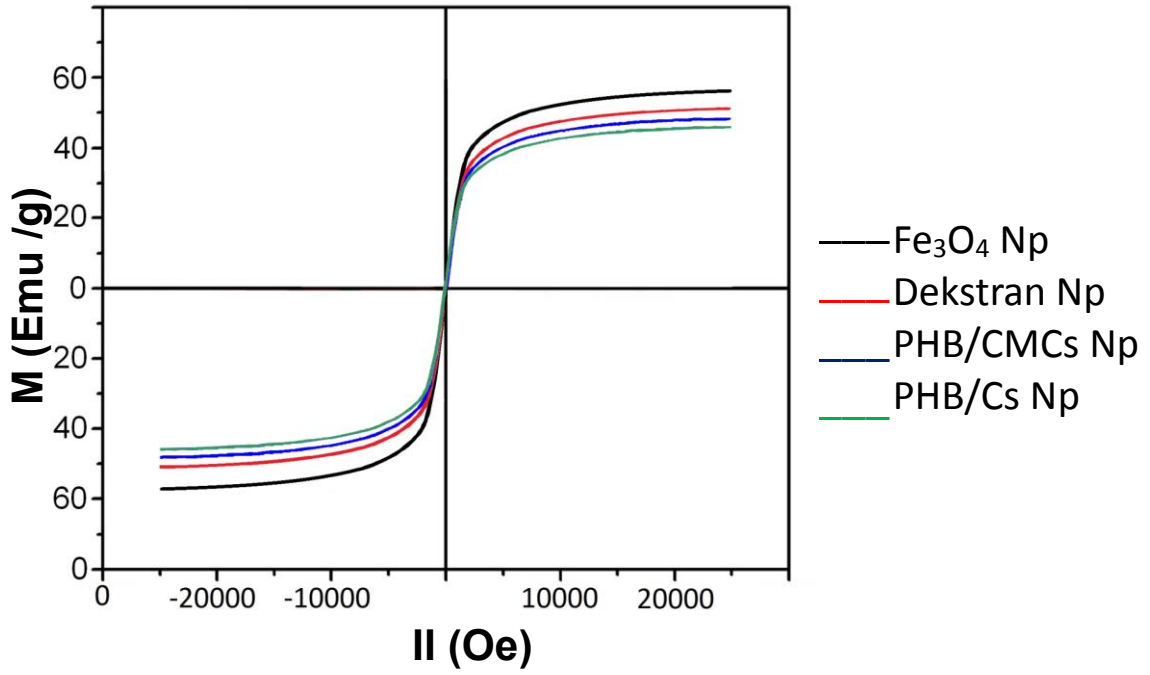
Şekil 4.17’de görüldüğü gibi ortamdaki çapraz bağlayıcı oranı arttıkça manyetik dekstran nanopartiküllerin boyutları küçülmektedir. Bu durum çapraz bağlayıcı miktarındaki artışla daha küçük partiküllerin oluşmasına yol açan partikül büzülmesi meydana gelmesi ile açıklanabilir. Dekstran nanopartikül boyutunun küçülmesi ile yüzey alanı/hacim oranı artmaktadır. Bu özellikleri sayesinde de kontrollü taşıyım için yüksek yükleme kapasitesine sahip olup pekçok biyomedikal uygulamalarda kullanılması kolaylaşmaktadır [137, 138].

Bir başka çalışmada ise partikül boyutunun polimerizasyon esnasındaki glikoz birimi/ Çapraz bağlayıcı oranına (mol/mol) büyük ölçüde bağlı olduğunu göstermiştir. Dekstranın karbonil gruplarının farklı noktalarından akrilik grupları ile daha etkili çapraz bağa sebep olduğu söylenmiştir. Bunun sonucu olarak da küçük partikül boyutunun elde edildiği gözlenmiştir [139]. Bu bilgilere göre, sunulan çalışmada elde edilen veriler literatürü doğrular niteliktedir.

4.1.2 Hazırlanan Nanoplatformların Manyetiklik Özellikleri

Manyetik özellikler polimer içeriği, kullanılan malzemenin yapısı ve morfolojisiyle farklılıklar göstermektedir [106].

Şekil 4.18’de manyetik demir oksit nanopartiküllerin, manyetik PHB/CMCs, PHB/Kitosan ve dekstran nanopartiküllerin manyetik alanının bir fonksiyonu olan manyetizasyon eğrisi verilmektedir.



Şekil 4.18. Hazırlanan Nanoplatformların Manyetizasyon Eğrisi

Histerisis eğrisinin yokluğu hazırlanan nanopartiküllerin karakteristik süperparamanyetik özellikte olduğunu göstermektedir. Bu süperparamanyetik özelliği sayesinde, tekli etki (domain) ve manyetik alan etkisi altında tek yönlü hizalanmasını sağlamaktadır [140].

Manyetik demir oksit nanopartiküllerin, manyetik PHB/CMCs, PHB/Kitosan ve dekstran nanopartiküllerin mıknatıslanma değerleri sırasıyla 58, 48, 46, 51 emu/g olarak bulunmuştur. Düşük veya ortalama mıknatıslanma değerlerinin olması demir nanopartiküllerin yüzeylerinin çeşitli polimerik tabakalarla sabitlenmesinden kaynaklanmaktadır. Örneğin hipertermi kanser tedavisi uygulamaları için nanopartiküllerin ısıtma esnasında üretilen güç kaybı esas alınmaktadır. Bu sınırlama, uygulanan harici AC manyetik alanının büyüklüğü artırılarak aşılabilir [140].

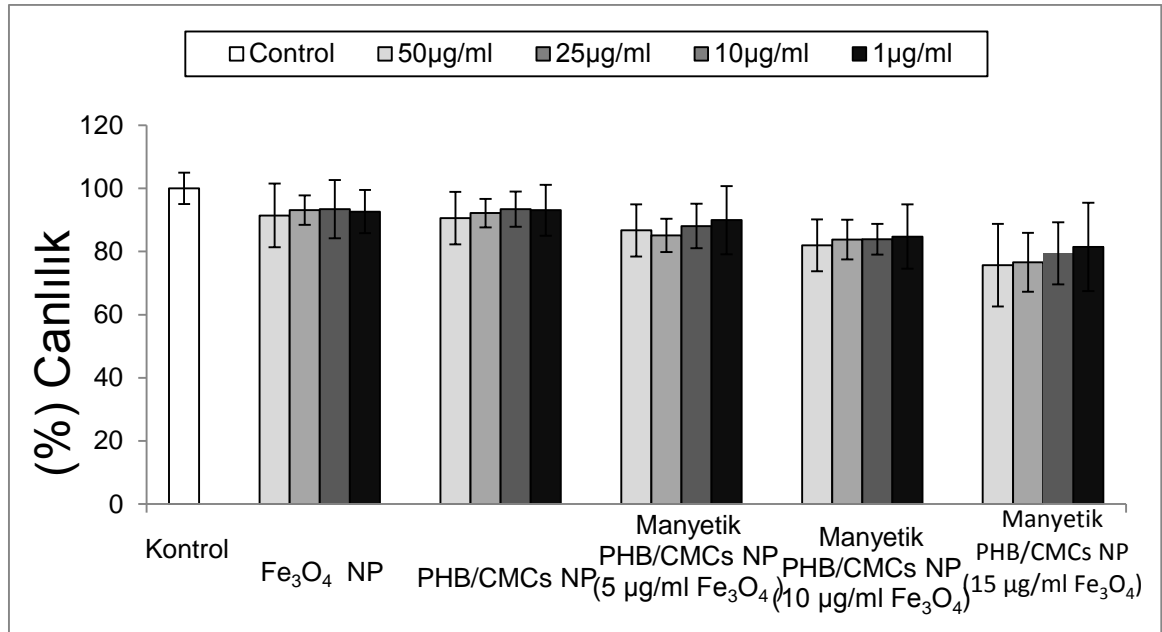
4.1.3. Hazırlanan Nanoplatformların Sitotoksosite Çalışmaları

Tez çalışmaları kapsamında hazırlanan nanoplatformların biyolojik uyum ya da bir başka deyişle sitotoksosite deneyleri ISO 10993-5 no'lu standartta belirtilen standart hücre hatlarından L929 (fare fibroblast hücreleri) ile farklı derişimlerde hazırlanan (100, 50, 25, 10 ve 1 µg/ml) nanopartiküllerin etkileştirilmesiyle incelenmiştir.

4.1.3.1. PHB/CMCs Nanopartiküller

Testte negatif kontrol, PHB-CMCs nanopartiküller, 5 µg/ml derişimde demir içeren PHB/CMCs nanopartiküller, 10 µg/ml derişimde demir içeren PHB/CMCs nanopartiküller, 15 µg/ml derişimde demir içeren PHB/CMCs nanopartiküller gruplanmış ve her grupta da 50 µg/ml; 25 µg/ml; 10 µg/ml ve 1 µg/ml derişimlerde alt gruplar teste tabi tutulmuştur.

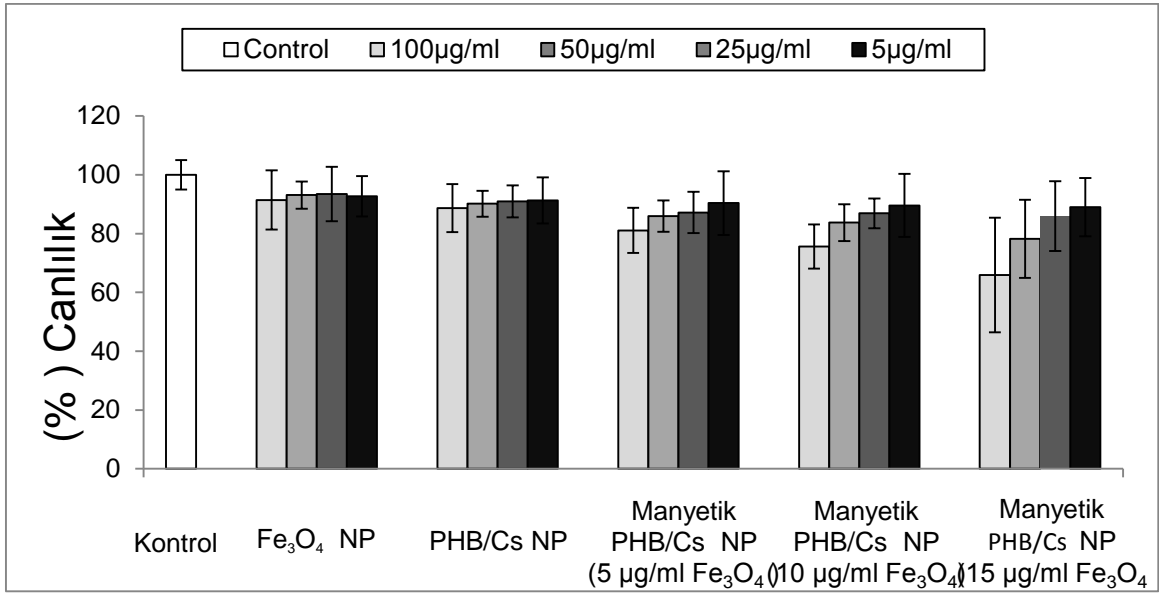
Nanopartikül konsantrasyonu ve her alt grupta incelenen demir oksit konsantrasyonu arttıkça hücre canlılık yüzdelerinde bir azalma trendi gözlenmiştir; ancak bu canlılığın en düşük olduğu örnek grubu olan 15 µg/ml demir oksit ve 100 µg/ml nanopartikül konsantrasyonunda bile oran % 78 olup nanopartiküllerin sitotoksitesisi hafif olarak etki göstermektedir.



Şekil 4.19. PHB/CMCs nanopartiküllerin biyolojik uyum testleri

4.1.3.2. PHB/Cs Nanopartiküller

Testte negatif kontrol, PHB/Cs nanopartiküller, 5 µg/ml derişimde demir içeren PHB/Cs nanopartiküller, 10 µg/ml derişimde demir içeren PHB/Cs nanopartiküller, 15 µg/ml derişimde demir içeren PHB/Cs nanopartiküller gruplanmış ve her grupta da 100 µg/ml; 50 µg/ml; 20 µg/ml ve 5 µg/ml derişimlerde alt gruplar teste tabi tutulmuştur.



Şekil 4.20. PHB/Cs nanopartiküllerin biyolojik uyum testleri

Sonuçlara göre hem artan demir içeriği hem de alt gruplarda artan nanopartikül konsantrasyonuna göre canlı hücre oranlarında azalma gözlemlenmektedir. Demir partikül içermeyen örnek grubunda nanopartiküllerin hücre hattına etkisi çok az olup malzemeler tüm konsantrasyonlarda sadece hafif bir sitotoksik etki göstermektedir (% 80 ve üzeri oranda hücre canlılığı).

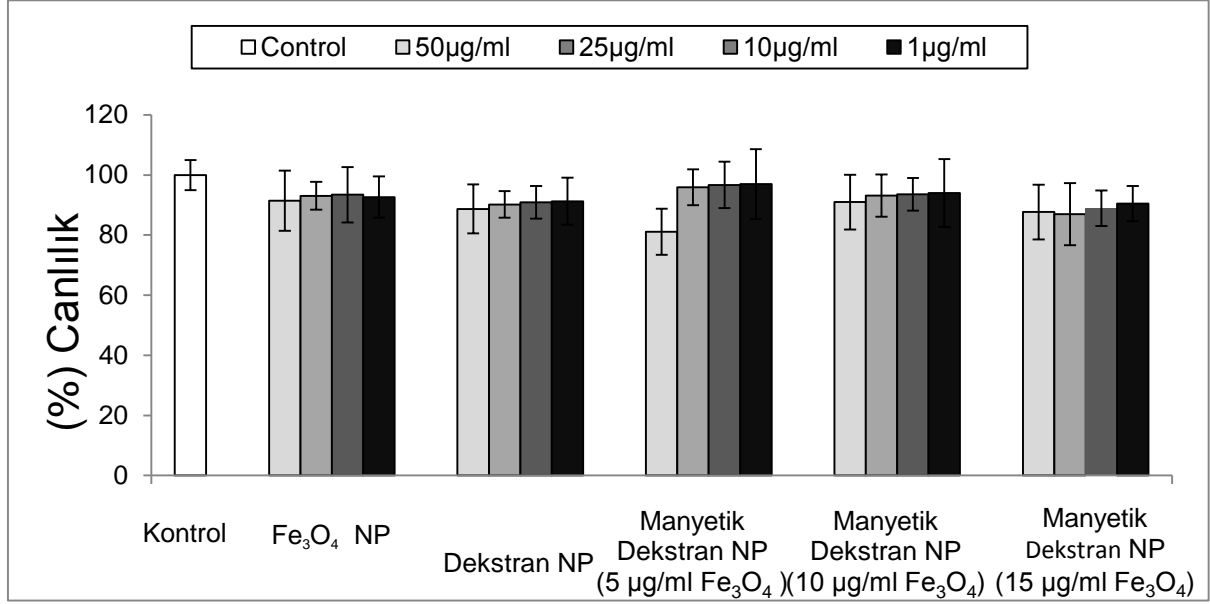
Partiküller demir nanopartiküller ile etkileştirildiği zaman yüksek demir içeriğine sahip ve partikül konsantrasyonu yüksek örnek gruplarında (100 µg/ml ve 50 µg/ml) sitotoksik etki artmaktadır ve sitotoksik özellik az-orta seviyelere çıkmaktadır ancak düşük partikül konsantrasyonlarında (20 µg/ml ve 5 µg/ml) demir içeriği artırıldığında bile sitotoksik etki hafif seviyelerdedir (% 75- 80 ve üzeri oranda hücre canlılığı).

4.1.3.3. Dekstran Nanopartiküller

Testte negatif kontrol, dekstran nanopartiküller, 5 µg/ml derişimde demir içeren dekstran nanopartiküller, 10 µg/ml derişimde demir içeren dekstran nanopartiküller, 15 µg/ml derişimde demir içeren dekstran nanopartiküller gruplanmış ve her grupta da 50 µg/ml; 25 µg/ml; 10 µg/ml ve 1 µg/ml derişimlerde alt gruplar teste tabi tutulmuştur.

Grafikten de anlaşıldığı gibi nanopartikül türleri ile etkileşen örneklerdeki hücre canlılık oranları düşük sayılabilecek azalmalar ile çok hafif sitotoksik etki (canlılık oranı >%80) göstermiştir. Örneklerdeki nanopartikül konsantrasyonu değıştikçe

negative kontrol grubuna göre görülen farklılıklar gruplar arasında ya da alt gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı değildir.



Şekil 4.21. Dekstran nanopartiküllerin biyolojik uyum testleri

4.1.4. Hazırlanan Nanoplatformların Ligand Çalışmaları

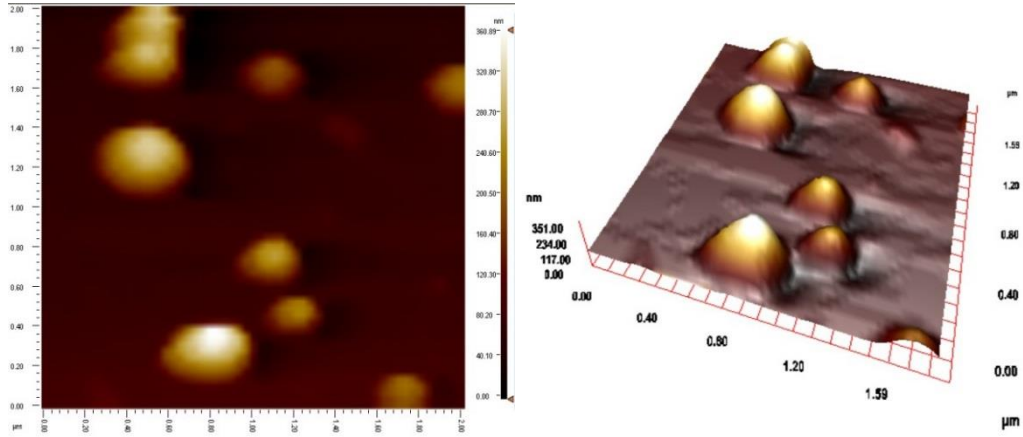
Hazırlanan nanoplatformların hedefli olarak teşhis ve tedavide kullanılabilmesi için kimyasal yöntemlerle yüzeylerine ligand takılması gerekmektedir. Bu sebeple hali hazırda kardiyovasküler sistemlerde kullanılan ligandlardan Anneksin A1, Anneksin A5 ve IgG1 ligandları model ligandlar olarak seçilmiş ve gerekli yüzey modifikasyon işlemlerine tabi tutulmuşlardır. Bu amaçla daha önce yapılan çalışmalarda kanser teşhis ve tedavisinde kullanılmak üzere hazırlanan, manyetik özelliğe sahip kitosan nanopartiküllerin yüzey modifikasyon işlemlerinde Konkavalin-A proteini model ligand olarak kullanılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir [108]. Bu sebeple uygulanan işlem basamakları değiştirilmeden yüzey modifikasyon işlemleri bu yönetime göre yapılmıştır.

Daha önceki çalışmalarda kitosan, karboksimetil kitosan ve PHB/CMCs nanopartikülleri hazırlanarak, sırasıyla IgG1, Anneksin A5 ve A1 ligandlarıyla etkileştirilmiştir [126]. En yüksek bağlanma verimliliğinin demir nanopartiküllerinin eklenmesinden sonra PHB/CMCs nanopartikülerde gerçekleştiğinin bulunması nedeniyle bu tez çalışmasında da hayvan deneyleri için hazırlanan diğer nanoplatformlar yerine PHB/CMCs nanopartiküller kullanılmıştır.

Hazırlanan nanopartiküllerin boyutlarının değişkenliği ve sahip oldukları fonksiyonel grupların farklı olması nedeniyle, bağlanma verimi sonuçları da farklılık göstermiştir.

Yapılan çalışmalar sonucunda, hidrofobik yüzeye sahip PHB nanopartiküllerin karboksimetil kitosan grupları ile etkileştirilmesi ile bağlanma verimliliğinin hazırlanan diğer nanopartiküllere göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bunun nedeni ise, karboksimetil gruplarının PHB yüzeyi üzerinde büyüyerek, zincirler arasında etkileşimi artırmasıdır [141, 142].

Gerekli yüzey modifikasyon işlemleri ile fonksiyonelleştirilen PHB/CMCs nanopartiküller iyi bir şekilde stabilize edilmiş ve çevresindeki hidrofilik protein blokları ile sulu çözelti içinde iyi bir şekilde dağıtılmışlardır. Ligand takılma prosedüründen sonra bu nanopartiküllerin vücut içerisinde kullanılacağı düşünüldüğünden Anneksin A5 ligandı takılmış PHB/CMCs nanopartiküllerin boyutlarındaki artış AFM tekniği kullanılarak gösterilmiştir.



Şekil 4.22. (A) Anneksin A5 ligandı takılmış PHB/CMCs nanopartiküllerin AFM görüntüsü (B) Anneksin A5 ligandı takılmış PHB/CMCs nanopartiküllerin 3D AFM görüntüsü

Elde edilen AFM görüntüsünden de anlaşılacağı gibi ligand bağlanmış nanopartiküllerin ortalama büyüklükleri yaklaşık olarak 350 nm dolayında olduğu anlaşılmaktadır. Öte yandan elde edilen nanopartiküllerin oldukça düzgün ve küresel formda oldukları anlaşılmaktadır. Bu geometrinin dairesel karıştırma etkisinden olduğu bilinmektedir. AFM görüntülerinden anlaşılacağı gibi ligand takılması ile nanopartiküllerin boyutunda aşırı bir büyüme gözlenmemiştir.

Lee ve arkadaşları da, yaptıkları çalışmada hibrit PHB nanopartiküller hazırlayıp, karakterize etmişlerdir. Daha sonra elde ettikleri nanopartikülleri enzimlerle etkileştirerek enzim-polimer kompleksi oluşturulmuş ve kompleks oluşum reaksiyonundan sonra PHB nanopartiküllerin boyut dağılımında bir değişim gözlenmiştir. PHB nanopartiküllerin çapı enzimatik yüzey modifikasyonu ile 46 nm arttığı saptanmıştır. Enzimatik sentez reaksiyonunun protein polimer kabuk bölgesinin oluşumuna katkıda bulunduğu bir göstergesidir. Tez çalışmalarında elde edilen sonuçlar da literatürle uyushmaktadır [142].

Seçilen ligandların bağlanma verimine manyetik özelliğın etkisini inceleme amaçlı olarak manyetik olmayan PHB/CMCs nanopartiküller ve Fe₃O₄ nanopartiküller ile karşılaştırma çalışmaları yapılmıştır.

Manyetik özelliğe sahip PHB/CMCs nanopartiküllerin Anneksin A5 ligandına bağlanma verimliliği % 30 olup; Anneksin A1 ligandına bağlanma verimliliği % 78 ve IgG ligandına bağlanma verimliliği ise % 28 olarak bulunmuştur.

Manyetik özelliğe sahip olmayan PHB/CMCs nanopartiküllerin ise Anneksin A5 ligandına bağlanma verimliliği % 22, Anneksin A1 ligandına bağlanma verimliliği % 5 ve IgG ligandına bağlanma verimliliği ise % 20 olarak bulunmuştur.

Manyetik (demir oksit) nanopartiküllerin Anneksin A5 ligandına bağlanma verimliliği % 52, Anneksin A1 ligandına bağlanma verimliliği % 25 ve IgG ligandına bağlanma verimliliği ise % 80 olarak bulunmuştur.

Daha önceki çalışmalarımızda, manyetik özelliğe sahip olan ve olmayan sistemlerde bağlanma verimliliği incelenmiş ve manyetik nanopartikül içeren formlarda beklendiği gibi daha yüksek ligand bağlanma verimi elde edildiği görülmüştür [126].

Bir diğeri bulgu ise, Fe₃O₄ nanopartiküllerin ortalama büyüklüklerinin yaklaşık olarak 16 nm dolayında ve diğeri polimer kaplı nanopartiküllerden yaklaşık olarak 10-15 kat daha küçük olduğudur. Bu nedenle Fe₃O₄ nanopartiküllerinin aynı kütledeki polimer içeren nanopartiküller ile yüzey alanları karşılaştırıldığında oldukça büyük farklılıklar ortaya çıkmaktadır. Özet olarak ligand bağlanması esnasında Fe₃O₄ nanopartiküllerde bağlanma verimliliğinin son derece yüksek olması, yeterli bağlanma noktasına (yüksek yüzey alanı) sahip olmasındandır. Ayrıca, metal bağlama, proteinlerin yapısal ve fonksiyonel karakterizasyonu için

önemlidir. Protein yapısında olan ligandların özellikle metallerle kolaylıkla şelat oluşturma özelliğindedir [143].

4.1.5. Hazırlanan ligand takılı nanoplatformların Hücre Etkileşimleri

Tez çalışmaları kapsamında hazırlanan ligand takılı nanoplatformlar L929 fibroblast standart hücre hattı kullanılarak sitotoksiteleri incelenmiştir. Ayrıca hazırlanan nanoplatformlar, kardiyovasküler sistem rahatsızlıkları teşhis ve tedavisinde kullanılacağından, canlı sistemde karşılaşılabilecek hücre hatlarından düz kas hücreleri ve damar endotel hücre hatları da kullanılmıştır. Bu kapsamda HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) endotel hücreleri ile A7r5 (smooth muscle cells from rat embryonic thoracic aorta) düz kas hücreleri tercih edilmiştir. Bu hücreler ile ligand takılı nanoplatformların, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) biyolojik uyumluluk testleri tekrarlanmış ve floresans mikroskopu kullanılarak hücre-nanoplatform etkileşimleri gösterilmiştir.

4.1.5.1. L929 Hücreleri Üzerine Nanoplatformların Sitotoksitesi

Tez çalışmaları kapsamında hazırlanan ligand takılı PHB-CMCs nanoplatformların biyolojik uyum ya da bir başka deyişle sitotoksite deneyleri ISO 10993-5 no'lu standartta belirtilen standart hücre hatlarından L929 (fare fibroblast hücreleri) ile farklı derişimlerde hazırlanan (100, 50, 25, 10 ve 1 µg/ml) nanopartiküller etkileştirilmesiyle, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) biyolojik uyumluluk testi uygulanmıştır.

Sitotoksite çalışmaları sonuçlarına göre, IgG1 takılı manyetik olmayan PHB/CMCs nanopartiküllerinin sitotoksiteleri % 5 ile sınırlı kalmıştır. IgG1 takılı manyetik PHB/CMCs nanopartiküllerin hücre canlılık yüzdesi kontrol grubuna göre yaklaşık % 12 azalma olmuştur. Manyetik olmayan formlarına göre manyetik formunun sitotoksitesinin çok fazla değişmediği gözlenmiştir.

Anneksin A5 takılı manyetik olmayan PHB/CMCs nanopartiküllerin sitotoksiteleri yaklaşık % 7 ve manyetik olan yapılarının ise % 11 olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre, demir içeriği arttırıldığında bile sitotoksik etki hafif seviyelerde gözlenmiştir.

Anneksin A1 takılı manyetik olmayan PHB/CMCs nanopartiküllerin sitotoksiteleri yaklaşık % 3, manyetik olan yapıların ise yaklaşık % 10 olduğu saptanmıştır. Bu

sonuçlara göre manyetik yapıdaki nanopartiküllerin sitotoksisiteyi çok etkilemediği gözlenmiştir. Ancak artan demir içeriği ile artan nanopartikül konsantrasyonuna göre canlı hücre oranlarında azalma gözlemlenmektedir.

4.1.5.2. HUVEC Hücreleri Üzerine Nanoplatformların Sitotoksisitesi

L929 standart hücre hattı ile yapılan çalışmalara benzer şekilde farklı derişimlerde hazırlanan (100, 50, 25, 10 ve 1 µg/ml) Anneksin A1, Anneksin A5, IgG 1 ligandlarıyla etkileştirilmiş PHB/CMCs nanopartiküller, damar endotel hücreleri (HUVEC) etkileştirilerek tekrarlanmıştır.

Sitotoksisite çalışmalarının sonuçlarına göre, manyetik olmayan PHB/CMCs nanopartiküllerin HUVEC hücreleri üzerine sitotoksisitesinin % 2-4 arasında sınırlı kaldığı görülmüştür. Ancak sitotoksisite oranının değişen nanopartikül konsantrasyonu ile değişmediği gözlenmiştir. Manyetik PHB/CMCs nanopartiküllerin sitotoksisite oranları ise % 10 olarak bulunmuştur. Manyetik formdaki yapıların HUVEC hücre sitotoksisitesi üzerinde aktif bir etkisi olduğu saptanmıştır.

IgG1 takılı manyetik olmayan PHB/CMCs nanopartiküllerinin HUVEC hücreleri üzerine sitotoksisite oranları % 7 ile % 9 arasında sınırlı kalmıştır. Sitotoksisite oranının değişen nanopartikül konsantrasyonundan etkilendiği gözlenmiştir. IgG 1 takılı manyetik PHB/CMCs nanopartiküllerinin HUVEC hücreleri üzerine sitotoksisite oranları % 13 ile % 17 arasında sınırlı kalmıştır. Sonuçlara göre artan demir içeriği ve artan nanopartikül konsantrasyonuna göre canlı hücre oranlarında azalma gözlemlenmektedir.

Anneksin A5 takılı manyetik olmayan nanopartiküllerin sonuçları incelendiğinde ise sitotoksisite oranlarının % 2 ile % 7 arasında olduğu bulunmuştur. Sitotoksisite oranının değişen nanopartikül konsantrasyonundan etkilendiği gözlenmiştir. Anneksin A5 takılı manyetik PHB/CMCs nanopartiküllerinin HUVEC hücreleri üzerine sitotoksisite oranları % 9 ile % 14 arasında sınırlı kalmıştır. Bu sonuçlara göre manyetik özelliğe sahip nanopartiküllerin hücre canlılığı % 7 oranında negatif yönde değiştiği saptanmıştır.

Anneksin A1 takılı manyetik olmayan PHB/CMCs nanopartiküllerin sitotoksisite oranları yaklaşık % 5 ile % 7 arasında sınırlı kalmıştır. Manyetik olan yapıların ise yaklaşık % 14 olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlara göre manyetik özelliğe sahip nanopartiküllerin hücre canlılığını azalttığı gözlenmiştir.

4.1.5.3. A7r5 Düz Kas Hücreleri Üzerine Nanoplatformların Sitotoksitesisi

Farklı derişimlerde hazırlanan (100, 50, 25, 10 ve 1 µg/ml) Anneksin A1, Anneksin A5, IgG 1 ligandlarıyla etkileştirilmiş PHB/CMCs nanopartiküller, A7r5 düz kas hücreleri etkileştirilerek sitotoksitesite deneyleri tekrarlanmıştır.

Sitotoksitesite çalışmaları sonuçlarına göre manyetik olmayan PHB/CMCs nanopartiküllerin A7r5 hücreleri üzerine sitotoksitesitelerinin % 4, manyetik PHB/CMCs nanopartiküllerin ise konsantrasyona bağlı olarak % 8 ile % 10 arasında bulunmuştur.

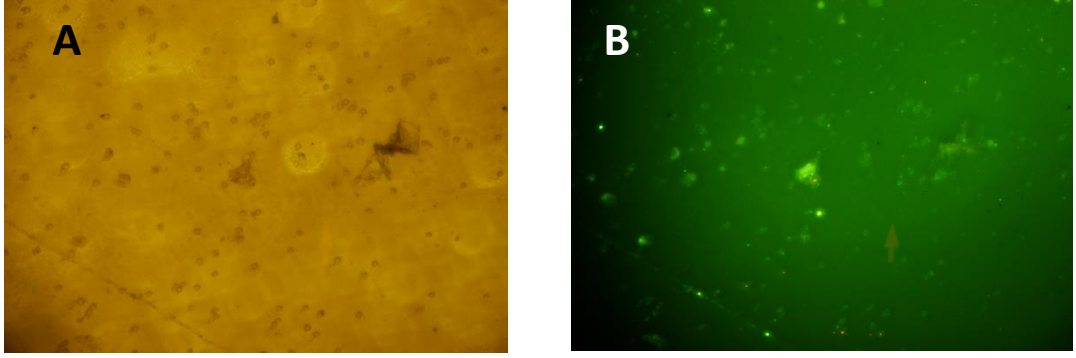
IgG 1 takılı manyetik olmayan PHB/CMCs nanopartiküllerin A7r5 hücreleri üzerine sitotoksitesitelerinin % 5, IgG 1 takılı manyetik PHB/CMCs nanopartiküllerin ise konsantrasyona bağlı olarak % 3 ile % 10 arasında bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre IgG1 modifikasyonunun hem manyetik olmayan hem de manyetik olan nanopartiküllerin A7r5 hücrelerinin sitotoksitesitelerini etkilemediğini göstermektedir.

Anneksin A5 takılı manyetik olmayan nanopartiküllerin sonuçları incelendiğinde ise sitotoksitesiteleri % 4 olarak bulunmuştur. Anneksin A5 takılı manyetik PHB/CMCs nanopartiküllerinin A7r5 hücreleri üzerine sitotoksitesiteleri % 9 ile % 14 arasında sınırlı kalmıştır. Bu sonuçlara göre manyetik özelliğe sahip nanopartiküllerin hücre canlılığını % 8 oranında değiştirdiği saptanmıştır.

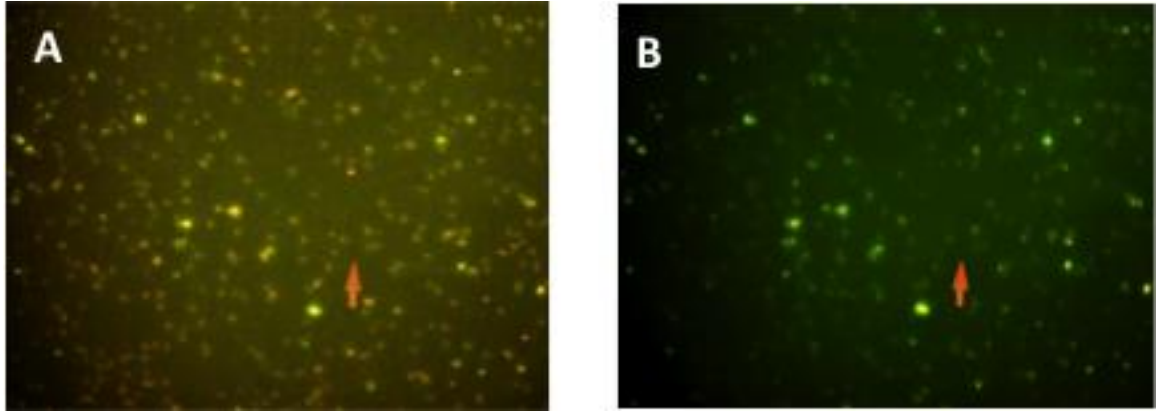
Anneksin A1 takılı manyetik olmayan PHB/CMCs nanopartiküllerin sitotoksitesite oranları % 10, manyetik PHB/CMCs nanopartiküllerin ise % 14 olduğu saptanmıştır. Sonuçlara göre Anneksin A1 modifikasyonunun hücrelerin sitotoksitesitesine herhangi bir etkisinin olmadığı hatta manyetik formlarının hücre canlılığını çok etkilemediği düşünülmektedir.

4.1.5.4. Nanoplatformların Hücre Etkileşimlerinin Mikroskopik İncelenmesi

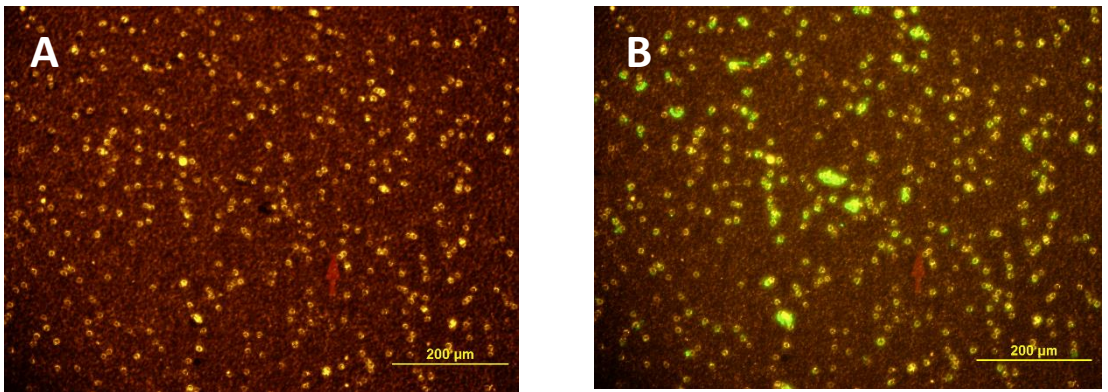
Tez çalışması kapsamında optimum özelliklere sahip olan manyetik PHB/CMCs nanopartiküllerin Anneksin A5 ve IgG 1 ligandları ile modifikasyonu sonucu endotel hücreleri ve düz kas hücreleri ile etkileştirilmiş ve hem normal ışık mikroskobu hem de floresan mikroskop ile hücre etkileşimleri incelenmiştir. Elde edilen görüntüler Şekil 4.23' te sunulmuştur.



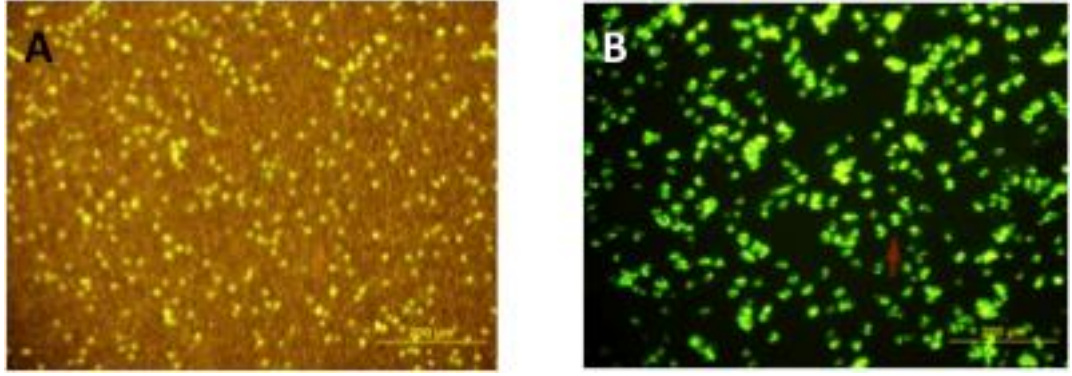
Şekil 4.23. (A) Anneksin A5 takılı Manyetik PHB-CMCs Np (HUVEC) (Normal ışık mikroskobu) (B) Anneksin A5 takılı Manyetik PHB-CMCs Np HUVEC (Floresans mikroskobu)



Şekil 4.24. (A) IgG 1 takılı Manyetik PHB-CMCs Np (HUVEC) (Normal ışık + Floresans mikroskobu) (B) IgG 1 takılı Manyetik PHB-CMCs Np (HUVEC) (Floresans mikroskobu)



Şekil 4.25. (A) Anneksin A5 takılı Manyetik PHB-CMCs Np Düz Kas Hücresi (Normal ışık + Floresans mikroskobu) (B) Anneksin A5 takılı Manyetik PHB-CMCs Np Düz Kas Hücresi (Floresans mikroskobu)



Şekil 4.26. (A) IgG1 takılı Manyetik PHB-CMCs Np Düz Kas Hücresi (Normal ışık + Floresans mikroskobu) (B) IgG1 takılı Manyetik PHB-CMCs Np Düz Kas Hücresi (Floresans mikroskobu)

Çalışmaların bu bölümünde Annexin A5 ve IgG1 ile damar endotel hücreleri (HUVEC) ve düz kas hücrelerinden (A7r5) elde edilen bulgular değerlendirildiğinde nanopartiküllerin özellikle düz kas hücrelerine bir miktar daha fazla (seçimli olarak) yönlendikleri anlaşılmaktadır. Burada endotel hücrelerine de bir miktar yönlenme olmuştur.

Sentezlenen nanopartiküller ile gerçekleştirilen *in vitro* sitotoksisite, boyut analizi, ligand bağlanma verimliliği gibi çalışmalar sonunda *in vivo* çalışmalara en uygun niteliklere sahip olan PHB/CMCs nanopartiküllerin ileri tez çalışmalarında kullanılmasına karar verilmiştir.

4.2. *In Vivo* Çalışmalar

4.2.1. Sıçanlarda Aterosklerotik Plak Oluşturulması

Domuz, maymun, köpek, sıçan, tavşan, fare gibi pek çok hayvan kardiyovasküler sistem araştırmalarında kullanılmıştır. Hayvan modellerinde karşılaşılabilecek en büyük zorluk insanda aynı yerde gözlenen aterosklerozun oluşturulmasıdır. 1992 yılından bu yana, önceki hayvan modelleri ile karşılaştırıldığında, sıçan, ateroskleroz üzerindeki çalışmalar için mükemmel bir nesne haline gelmiştir [144, 145].

Küçük hayvanların düşük maliyeti, kolay bulunabilmesi, *in vivo* tarama için gerekli yeni ajanların miktarlarını sınırlaması ve en önemlisi büyük hayvan modelleri ile karşılaştırıldığında duyulan etik endişe azalmaktadır [146].

Deneysel ateroskleroz çalışmalarında, yüksek kolesterol diyeti, hem sıçan hem de tavşan modellerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Kısmen insan plak yapısına benzeyen lezyonlar, bu modellerde aort veya iliak arterlerde gelişmektedir [147].

Paigen diyeti olarak bilinen diyet programı % 15 yağ, % 1.25 kolesterol, ve % 0.5 kolik asit içermektedir. Ancak bu diyetin, çok yüksek kolesterol içeriği (% 1.25) ve kolik asidin varlığından dolayı çeşitli komplikasyonlara neden olduğu görülmüştür [148]. Bu sebepten dolayı kendi çalışmamızda kullanılmak üzere Yokogoshi ve ark. uyguladığı hayvansal yağ katkılı lipid diyeti seçilmiştir [109].

Lipid diyeti öncesi ve sonrası hayvanlardan kan alınmış ve lipid paneli (Total kolesterol, Trigliserid, HDL kolesterol, LDL kolesterol, VLDL kolesterol) çalışılmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.2'te verilmiştir. Lipid paneli sonuçlarına göre sıçanların serum total kolesterol ve trigliserid seviyelerinin arttığı saptanmıştır. Ayrıca hayvanların kilo alımları haftalık tartımlar ile belirlenmiş, elde edilen sonuçlara göre sıçanların sekiz hafta sonunda yaklaşık 100 g kilo aldıkları gözlenmiştir (Çizelge 4.3).

Kullanılan lipid diyeti literatürde Ren ve ark., kullandığı tavşan modeli ile uyuşmaktadır. Elde edilen sonuçlar literatür ile oldukça uyumludur [149].

Çizelge 4.2. Sekiz hafta süresince %1 hayvansal yağ katkılı standart sıçan yemi ile beslenen sıçanların, diyet öncesi ve sonrası kan lipid değerleri.

Lipid paneli	Diyet öncesi	Diyet sonrası
Total kolesterol (mg/dl)	46	75
Trigliserid (mg/dl)	71	89
HDL kolesterol (mg/dl)	32	55
VLDL kolesterol (mg/dl)	14	13
LDL kolesterol (mg/dl)	3	7

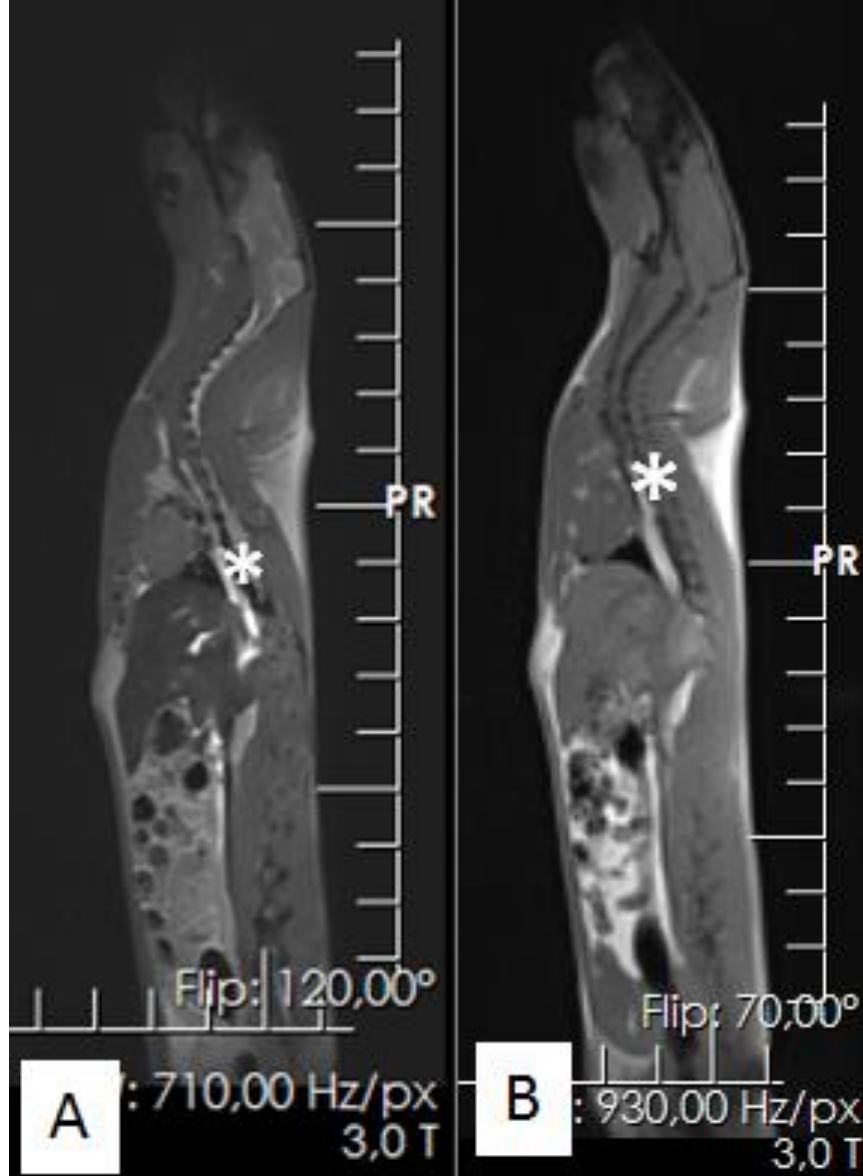
Çizelge 4.3. Sekiz hafta süresince %1 hayvansal yağ katkılı standart sıçan yemi ile beslenen sıçanların, kilo alımları.

	1.sıçan	2.sıçan
Başlangıç ağırlığı	211	202
1. Hafta	224	219
2. Hafta	237	238
3. Hafta	253	250
4. Hafta	274	272
5. Hafta	282	280
6. Hafta	294	294
7. Hafta	302	299
8. Hafta	311	307

4.2.2. Aterosklerotik Plakların MR ile Görüntülenmesi

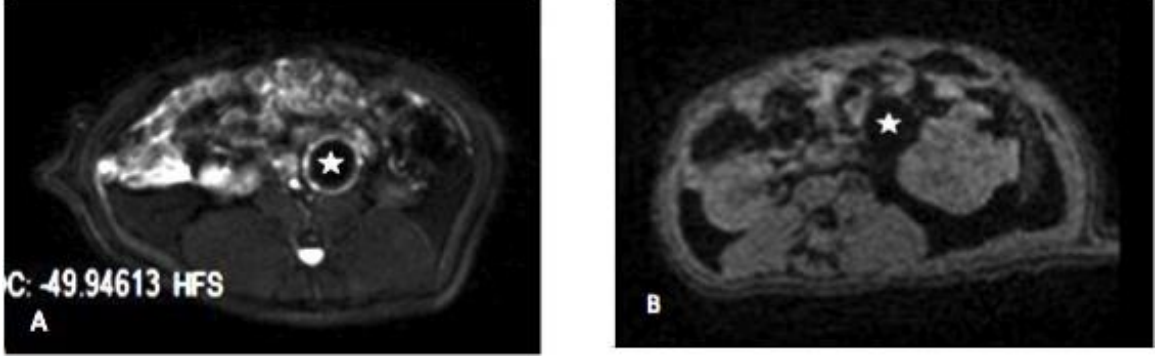
Standart sıçan yemi ile ve hayvansal yağ katkılı diyet ile beslenen sıçanların aortları sagittal MR görüntüleri ile gösterilmiştir (Şekil 4.27.). Sıçan aortuna yönelik olarak yapılan kontrastsız MR anjiyografi (TOF tekniği ile) incelemesinden elde edilen koronal MIP görüntülerle aortlar ve aort duvarları net olarak incelenebilmiştir. Ayrıca yağ diyeti ile beslenen sıçanlardaki plak oluşumu ve standart yem ile beslenen hayvanda plak olmayışı ilave MR görüntüleriyle Şekil 4.28'de ortaya konulmuştur.

Herhangi bir kontrast ajan enjekte edilmeden, standart yem ve hayvansal yağ katkıli diyetle beslenen sıçanların aortlarında yağ oluşumunun olup olmadığı MR ile gösterilmiştir.



Şekil 4.27. Sıçanların aortlarının sagittal MR görüntüleri. (A) Standart sıçan yemi (B) %1 hayvansal yağ katkıli standart sıçan yemi ile beslenen sıçanların sagittal MR fotoğrafları ile aortları gösterilmiştir.

% 1 hayvansal yağ katkılı standart sıçan yemi ile beslenen sıçanların sagittal MR fotoğraflarından anlaşılacağı gibi damar bölgesinde kalınlaşma (B*) ve dallanmalar gözlenmiştir.



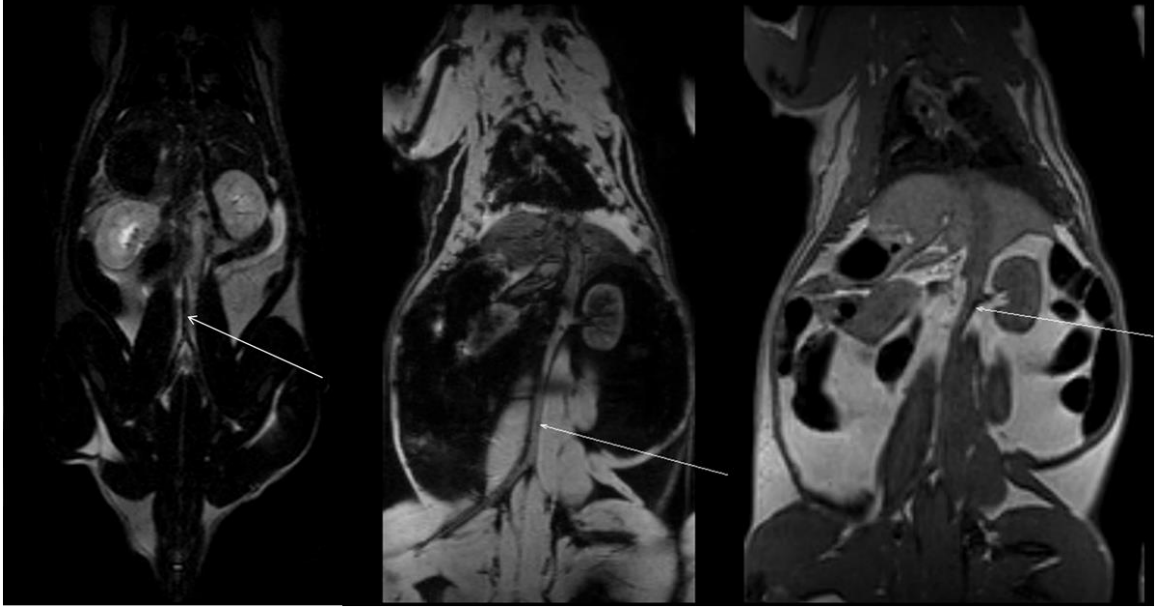
Şekil 4.28. Frontal MR fotoğrafları. (A) %1 hayvansal yağ ile beslenen (B) Standart sıçan yemi ile beslenen sıçan

Sagittal MR fotoğraflarına ek olarak frontal MR fotoğrafları elde edilmiştir. Kolesterolce zengin diyet ile beslenen sıçanlarda; aort duvarında aterom plaklarına sekonder gelişen kalınlaşma net olarak izlenmektedir (asterisk). Standart yem ile beslenen sıçanda ise, aort duvarı belirgin ince ve bu nedenle sınırları zorlukla seçilebilmektedir (asterisk). Bu sonuçta uygulanan lipid diyeti ile istenilen amaca ulaşıldığını göstermektedir.

4.2.3. Manyetik Nanopartiküller Kullanılarak Aterosklerotik Plakların MR ile Görüntülenmesi

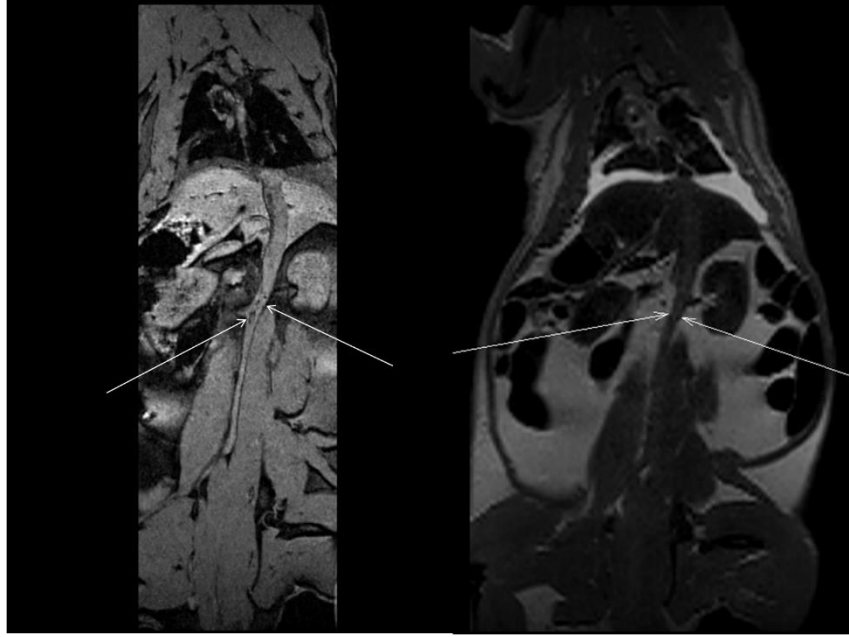
Aterosklerotik plak oluşumu gösteren normal ve obez hayvan MR görüntülerinden sonra, sıçan aortlarında hazırlanan IgG1 ile modifiye edilmiş PHB/CMCs ve Anneksin A5 ile modifiye edilmiş PHB/CMCs nanopartiküllerin *in vivo* MR incelemelerinde söz konusu nanopartiküller hedeflemenin etkinlikleri incelenmiştir.

MR incelemeler 3 tesla (3T) MR cihazında (Tim Trio system, Siemens, Erlangen, Almanya), 15 kanallı diz sarmalı kullanılarak yapılmıştır. Çalışmaya alınan tüm hayvanların T1 ve T2 ağırlıklı görüntüleri elde edilmiştir. Her bir hayvan için MR çekim süresi yaklaşık 20 dakikadır. MR inceleme sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde; nanopartikül verilen hayvanların aort duvarının daha kalın olduğu ve batin içi yağ miktarlarının artmış olduğu dikkati çekmiştir.



Şekil 4.29. Negatif kontrol (soldaki resim) ve obez kontrol (orta ve sağdaki resimler) T1 ağırlıklı koronal 3B-SPACE fotoğrafları. Negatif kontrolün aort çapının ve batin içi yağ miktarının, obez deneğe oranla belirgin düşük olduğu izleniyor (oklar).

Yapılan MR incelemeleri sonucunda; IgG 1 ile modifiye edilmiş PHB/CMCs ve Anneksin A5 ile modifiye edilmiş PHB/CMCs nanopartiküllerin vasıtasıyla milimetrik boyutlu aterosklerotik plak lezyonları, deneklerin çoğunda saptanabilmiştir. Bu plaklar çoğunlukla infrarenal düzeyde ve dağınık yerleşim göstermektedir. Plaklar genel olarak, tüm sekanslarda hipointens görünümündedir (Şekil 4.29.). Bununla birlikte; MR görüntüleri karşılaştırıldığında, partiküller arasında herhangi bir üstünlük veya anlamlı farklılık saptanmamıştır.



Şekil 4.30. Partikül verilmiş bir deneğin, koronal planda gradyent eko T1 (soldaki resim) ve turbo spin-eko T2 (sağdaki resim) ağırlıklı MR görüntüleri. Aterosklerotik plaklar hipointens görünümündedir (oklar).

Bryan R. Smith ve arkadaşları süpermanyetik demir oksit nanopartiküllerden MR kontrast maddesi hazırlamak amacı ile demir nanopartikülleri heparin ile kaplamış ve annexin-5 ile modifiye etmişlerdir. Hazırladıkları süpermanyetik nanopartikülü aterosklerotik lezyonlar oluşturdukları tavşanlara uygulamışlardır. Hedefleme olmayan nanopartiküller ile spesifik olmayan negatif kontrast elde etmelerine karşın, Annexin-5 ile modifiye ettikleri nanopartiküller ile 2000 kat daha fazla negatif kontrast elde etmişlerdir [150]. Bu çalışmada da hazırlanan Anneksin A5 takılı PHB/CMCs nanopartiküllerde oldukça iyi bir kontrast sağlayarak T2 ağırlıklı görüntülerde plak dokusunda kontrastı geleneksel gadolinyum tabanlı MR görüntülemeye göre doğrulanmıştır.

Liao ve arkadaşları, surfaktin kullanarak süperparamanyetik demir oksit nanopartikülleri (SPIONs) stabilize etmişler ve manyetik rezonans görüntülemeye hassas bir kontrast madde hazırlamışlardır. Hücre ve hayvan deneylerinden önce, suda yaptıkları çalışmada nanopartiküllerin MRG T₂ ağırlıklı sekanslarda kontrast etkisi doğrulamışlardır [151].

Bir diğer çalışmada, Tu ve arkadaşları, makrofaj temizleyici reseptör SR-A takılı sülfür trioksitle etkileştirilmiş kükürtlenmiş dekstran kaplı demir oksit nanopartiküller hazırlamışlardır. Hücre çalışmaları bu partiküllerin toksik

olmadığını doğrulamış ve makrofajlara hedeflendiğini göstermiştir. Aterosklerotik fare yaralanma modeli kontrast madde enjeksiyonundan sonra 4 ve 24. saatlerde görüntülenmiştir. 4. saatin sonunda elde edilen MR görüntülerinde aterosklerotik plak bölgesinde nanopartiküllerin tercihli alımı MR sayesinde gösterilmiş olup; 24. saatin sonunda elde edilen MR görüntülerinde ise önemli ölçüde sinyal kaybı olduğu gözlenmiştir [152].

4.2.4. Biyokimyasal İncelemeler

Tez kapsamında, biyokimyasal incelemeler nanopartikül verilen sıçanların serum ve dokularındaki pro-oksidan ve antioksidan yapıların seviyelerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

MR incelemeleri tamamlanmış sıçanların serumları alınmıştır ve daha sonra kalp, akciğer, dalak, karaciğer, böbrek, akciğerleri çıkartılmış ve sonrasında ise serum/doku MDA, glutatyon, AOPP, SOD, nitrit ve nitrat seviyeleri belirlenmiştir. Çalışma gününe kadar dokular ve serumlar -80°C'de saklanmıştır.

Serum/doku MDA düzeyleri Ohkawa ve arkadaşlarının tarif ettiği yöntemle göre tayin edilmiştir [110]. Serum/AOPP ölçümü Witko'nun metoduna göre yapılmıştır [111]. NO'nun ürünleri olan nitrit ve nitrat tayini Griess yönteminin esas alındığı Miranda K.M. ve arkadaşlarının çalışmaları dikkate alınarak gerçekleştirilmiştir [112].

Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi, doku ekstratı SOD aktivitesi, Yi-Sun'un 1988'de tanımladığı, ksantin oksidaz ile $O_2^{\cdot-}$ oluşturması ve bunun da NBT ile renkli bir bileşik oluşturarak bu renk şiddetinin spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır. Glutatyonunun ölçümü, Ellman'ın yöntemiyle yapılmıştır [114]. Doku ekstratları total protein tayini Lowry'nin belirlediği yöntemle göre yapılmıştır [153].

Çalışmaların bu bölümünde yukarıda belirtilen temeller esas alınarak gerçekleştirilen çalışmalardan elde edilen bulgular (serum AOPP, MDA, SOD, glutatyon, nitrat ve nitrit seviyeleri) sırasıyla sunulmuş ve izleyen bölümlerde her bir parametre ve kullanılan nanopartikül formülasyonu ayrıntılı bir şekilde değerlendirilmiştir.

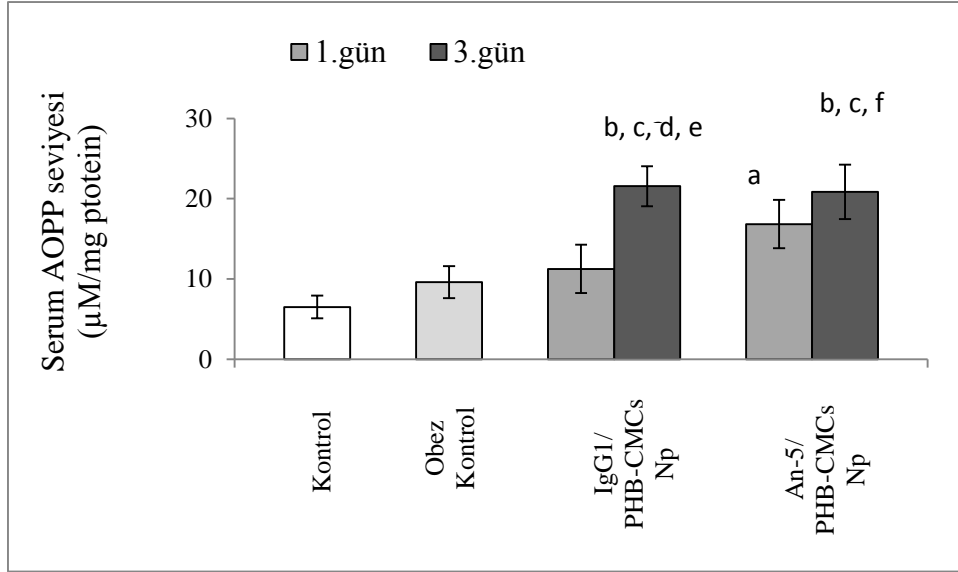
Oksidatif stres ve serbest radikaller özellikle lipitlerde hasara neden olur. Yağ asitlerinin oksidasyonu reaktif bir radikal tarafından yağ asitlerinin metilen gruplarından bir hidrojen atomunun koparılması ile başlar. Karbon merkezli radikal oluşması ve daha sonra moleküler oksijenin bağlanması ile lipit hidroperoksitleri meydana gelir. Lipit hidroperoksitleri, lipit peroksidasyonunun erken aşamasını oluşturur. Lipit hidroperoksitlerinin yıkımı ise biyoaktif aldehitleri oluşturur. Bunlardan başlıcaları malondialdehit (MDA) ve hidroksialkenaller (örn. 4-OH-nonenal)'dir [154]. Reaktif oksijen ürünleri, direkt olarak proteinler üzerine etki ederek okside olmuş aminoasitlerin oluşumuna yol açtıkları gibi, indirekt yolla karbonhidrat ve lipidlerin otooksidasyonu sonucu ortaya çıkan reaktif karbonil bileşiklerinin etkisi ile de ileri glikozillenmiş son ürünlerine ve ileri lipoksidasyon son ürünlerine dönüşürler. ROS, tirozin aminoasidini direkt olarak okside ederek ditirozin yapısını oluşturup protein yapıda agregasyona ve fragmentasyona yol açar. Bu karşılıklı bağlar ile oluşan ürüne "İleri Oksidasyon Protein Ürünleri" (AOPP) adı verilir [111, 155].

Nanopartikül uygulanan grupların serum AOPP ve MDA seviyeleri incelendiğinde (Şekil 4.31. ve Şekil 4.32.) iki oksidan yapının seviyelerinin kontrol ve obez kontrole göre arttığı ve 3.gün gruplarında 1.gün gruplarına göre arttığı saptanmıştır ($p=0.01$). SOD süperoksit anyonunun ($\cdot O_2^-$), hidrojen perokside (H_2O_2) ve oksijene dönüşümünü katalize ederek bu radikallerin etkisini azaltmaktadır [156]. Tiyol grubu taşıyan bir tripeptid olan glutatyon, serbest radikallerin yıkıcı etkilerini önleyen veya azaltan transferazlar, peroksidazlar gibi birçok enzimin substratı olarak görev yapmaktadır. Glutatyon aynı zamanda hücre içinde tekli oksijen (1O_2), süperoksit anyonu ($\cdot O_2^-$), hidroksi ($\cdot OH$) radikalleri gibi birçok zararlı oksidanla enzim katalizi olmaksızın da reaksiyona girmektedir [157].

Serum SOD ve glutatyon seviyeleri incelendiğinde (Şekil 4.33., Şekil 4.34.) iki antioksidan seviyelerinde de kontrol ve obez kontrole göre arttığı görülmüş; aynı zamanda 3.gün gruplarında 1.gün gruplarına göre azaldığı saptanmıştır ($p=0.01$). Nitrik oksit birçok farklı biyolojik olaya arabuluculuk yapan güçlü bir biyolojik molekül olup aynı zamanda bir serbest radikaldir. Organizmada peroksinitrit anyonu ve hidroksil radikali gibi pek çok radikallerin üretilmesine neden olabilir. Ayrıca mitokondriyal solunum zincirinin inhibisyonuna da neden olabilir [158]. Nitrik oksitin oksidasyonu ile şekillenen nitrit ve nitrat, yoğun olarak nitrik oksit

aktivitesinin markeri olarak kullanılmaktadır [159]. Çünkü nitrik oksit radikalının kendisini ölçmek, stabilitesi çok zayıf ve yarı ömrü çok kısa olduğu için oldukça zordur [160]. Serum nitrat ve nitrit seviyeleri incelendiğinde (Şekil 4.35., Şekil 4.36.) kontrol gruplarına göre nanopartikül verilen sıçanlarda nitrit ve nitrat seviyelerinin yükseldiği, 3.gün gruplarında 1.gün gruplarına göre daha yüksek nitrit ve nitrat seviyesi olduğu görülmüştür ($p=0.01$).

4.2.4.1. Serumda AOPP Değerlerinin İncelenmesi

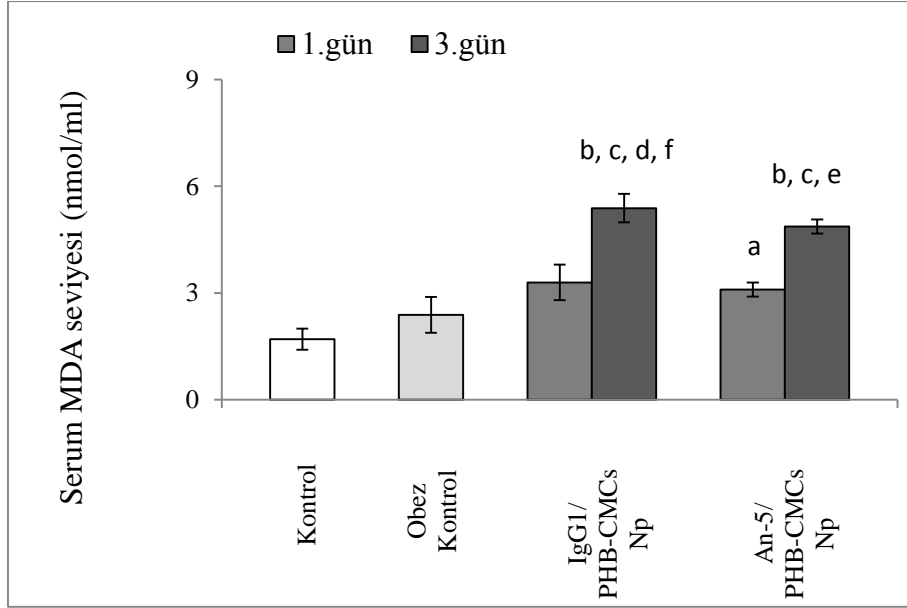


Şekil. 4.31. Kontrol, obez kontrol, IgG1/PHB-CMCs Np birinci ve üçüncü gün ile An-5/PHB-CMCs Np birinci ve üçüncü gruplarına ait sıçanların serum AOPP seviyeleri (n=6). Küçük harfler istatistiksel farkı göstermektedir. a) 1. günde kontrol grubuna göre anlamlı fark ($p<0.05$) ; b) 3. günde kontrol grubuna göre anlamlı fark ($p<0.05$); c) 3. günde obez kontrol grubuna göre anlamlı fark ($p<0.05$) ; d) IgG1/PHB-CMCs Np 3. günde 1. gün grubuna göre anlamlı fark ($p=0.01$); e) IgG1/PHB-CMCs Np 3.günde An- 5/ PHB-CMCs Np 1. gün grubuna göre anlamlı fark ($p<0.05$); f) An-5 /PHB-CMCs Np 3.günde IgG 1/ PHB-CMCs Np 3. Gün grubuna göre anlamlı fark ($p<0.05$).

Serum AOPP seviyeleri incelendiğinde (Şekil 4.31.) obez kontrol grubu sıçanlarda kontrol grubuna göre yaklaşık $3.1\pm 0.82\mu\text{M}$ daha yüksek ileri oksidasyon proteini saptanmıştır ($p<0.05$). Nanopartikül enjekte edilen gruplar ile obez kontrol grubu

karşılaştırıldığında; IgG1 ve Anneksin A5 takılı PHB-CMCs nanopartiküllerin hem 1.gün hemde 3. gün gruplarında AOPP seviyesinin arttığı saptanmıştır.

4.2.4.2. Serumda MDA Değerlerinin İncelenmesi

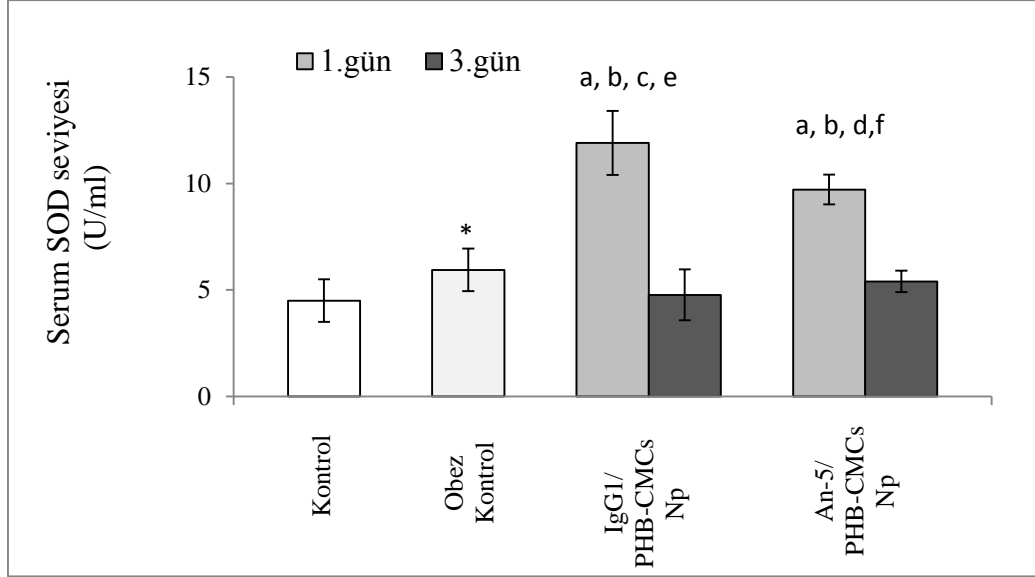


Şekil. 4.32. Kontrol, obez kontrol, IgG1/PHB-CMCs Np birinci ve üçüncü gün ile An-5/PHB-CMCs nanopartikül birinci ve üçüncü gruplarına ait sıçanların serum MDA seviyeleri (n=6). Küçük harfler istatistiksel farkı göstermektedir. a) 1. günde kontrol grubuna göre anlamlı fark ($p<0.05$); b) 3. günde kontrol grubuna göre anlamlı fark ($p<0.05$); c) 3. günde obez kontrol grubuna göre anlamlı fark ($p<0.05$); d) IgG 1/PHB-CMCs Np 3. günde 1. Gün grubuna göre anlamlı fark ($p=0.01$); e) An-5/PHB-CMCs 3. günde 1. Gün grubuna göre anlamlı fark ($p=0.01$); f) IgG 1/PHB-CMCs Np 3.günde An- 5/ PHB-CMCs Np 1. Gün grubuna göre anlamlı fark ($p<0.05$).

Serum MDA seviyeleri (Şekil 4.32.) incelendiğinde; obez kontrol grubunda MDA seviyesinin arttığı saptanmıştır ($p<0.05$). Kontrol grubuna göre IgG 1/PHB-CMCs Np 1.gün ve 3.gün gruplarının MDA seviyelerinin sırasıyla 1.37 ± 0.87 nmol/ml ($p=0.02$) ve 3.68 ± 0.91 nmol/ml ($p=0.02$) arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır. Kontrol grubuna göre An-5/PHB-CMCs Np 1.gün ve 3.gün gruplarının MDA seviyelerinin arttığı ve artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p<0.01$); IgG 1/PHB-CMCs Np 1.gün grubuna göre MDA seviyesinin An-

5/PHB-CMCs Np 1.gün ve 3.gün grupları ile karşılaştırıldığında ise aralarında yine istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu bulunmuştur ($p<0.01$).

4.2.4.3. Serumda SOD Değerlerinin İncelenmesi

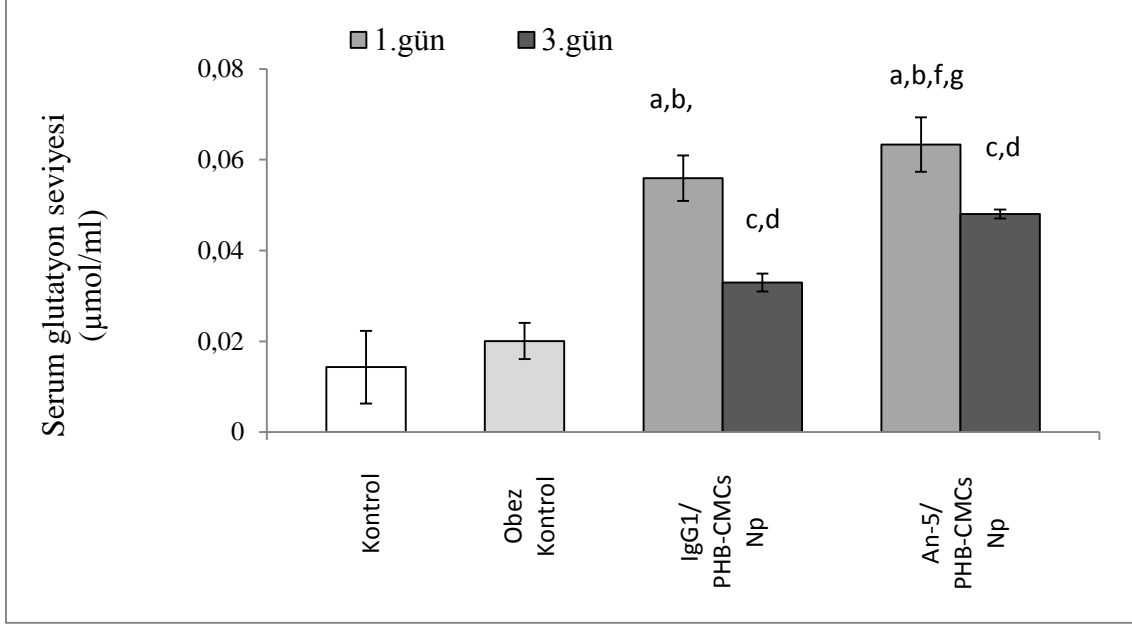


Şekil. 4.33. Kontrol, obez kontrol, IgG1/PHB-CMCs Np birinci ve üçüncü gün ile An-5/PHB-CMCs nanopartikül birinci ve üçüncü gruplarına ait sıçanların serum SOD seviyeleri (n=6). Küçük harfler istatistiksel farkı göstermektedir. a) 1. günde kontrol grubuna göre anlamlı fark ($p<0.05$); b) 1.günde obez kontrol grubuna göre anlamlı fark ($p<0.05$); c) IgG 1/PHB-CMCs Np 1.günde 3.gün grubuna göre anlamlı fark ($p=0.01$); d) An-5/PHB-CMCs Np 1.günde An- 5/ PHB-CMCs Np 3.gün grubuna göre anlamlı fark ($p=0.01$); e) IgG 1/PHB-CMCs 1.günde An-5 /PHB-CMCs Np 3.gün grubuna göre anlamlı fark ($p=0.01$); f) An-5/PHB-CMCs Np 1.günde IgG 1/ PHB-CMCs Np 3. Gün grubuna göre anlamlı fark ($p<0.05$); * obez kontrol grubunun kontrol grubuna göre anlamlı fark ($p<0,05$).

Serum SOD seviyeleri (Şekil 4.33.) incelendiğinde; obez kontrol grubunun kontrol grubuna göre arttığı saptanmıştır ($p<0,05$). Obez kontrol SOD seviyesi ile karşılaştırıldığında IgG1/PHB-CMCs Np 1.gün grubunun ortalama 5.32 ± 0.98 U/ml ($p=0.01$), An-5/PHB-CMCs Np 1.gün grubunun ise ortalama 3.8 ± 0.28 U/ml ($p=0.01$) arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ($p<0.01$). IgG1/PHB-CMCs Np ($p=0.99$) ve An-5/PHB-CMCs Np ($p=0.99$) nanopartikülün 3.gün grupları ile karşılaştırıldığında ise aralarında anlamlı bir

farkın olmadığı görülmüştür. IgG1/PHB-CMCs Np 1.gün ile 3.gün grupları karşılaştırıldığında SOD seviyesinin $5.97 \pm 1.75 \text{U/ml}$ ($p=0.01$), An-5/PHB-CMCs Np 3.gün grubuna göre ise $5.78 \pm 1.88 \text{U/ml}$ ($p=0.01$) azaldığı ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p<0.01$).

4.2.4.4. Serumda Glutasyon Değerlerinin İncelenmesi

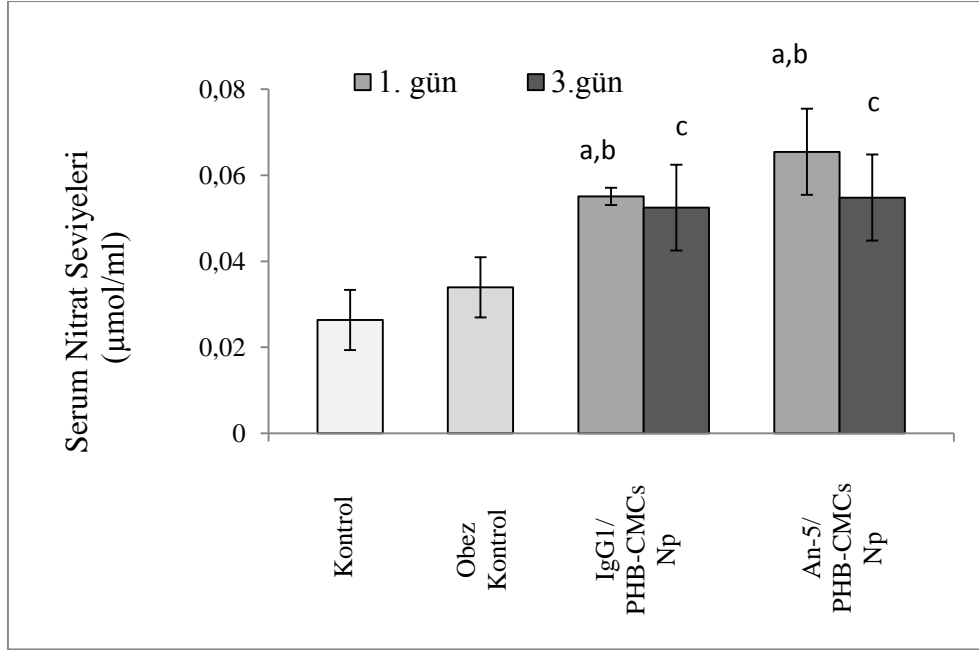


Şekil. 4.34. Kontrol, obez kontrol, IgG1/PHB-CMCs Np birinci ve üçüncü gün ile An-5/PHB-CMCs Np birinci ve üçüncü gruplarına ait sıçanların serum glutasyon seviyeleri (n=6). Küçük harfler istatistiksel farkı göstermektedir. a) 1. günde kontrol grubuna göre anlamlı fark ($p=0.01$); b) 1. günde obez kontrol grubuna göre anlamlı fark ($p=0.01$); c) 3. günde kontrol grubuna göre anlamlı fark ($p<0.05$); d) 3. günde obez kontrol grubuna göre anlamlı fark ($p<0.05$); e) IgG 1/PHB-CMCs Np 1. günde 3. gün grubuna göre anlamlı fark ($p<0.05$); f) An-5/PHB-CMCs Np 1.günde An-5/PHB-CMCs Np 3. gün grubuna göre anlamlı fark ($p<0.05$); g) An-5/PHB-CMCs Np 1.günde IgG1/PHB-CMCs Np 3. gün grubuna göre anlamlı fark ($p<0.05$).

Serum glutasyon seviyeleri karşılaştırıldığında (Şekil 4.34.); obez kontrol grubu glutasyon seviyesinin negatif kontrol grubuna göre yükseldiği ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür. Obez kontrol ile IgG1/PHB-CMCs Np ve An-5/PHB-CMCs Np 1.gün ve 3.gün grupları karşılaştırıldığında sırası ile glutasyon seviyesinin arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ($p<0.01$). Ancak IgG1/PHB-CMCs Np ve An-5/PHB-CMCs Np 1.gün ile 3.gün

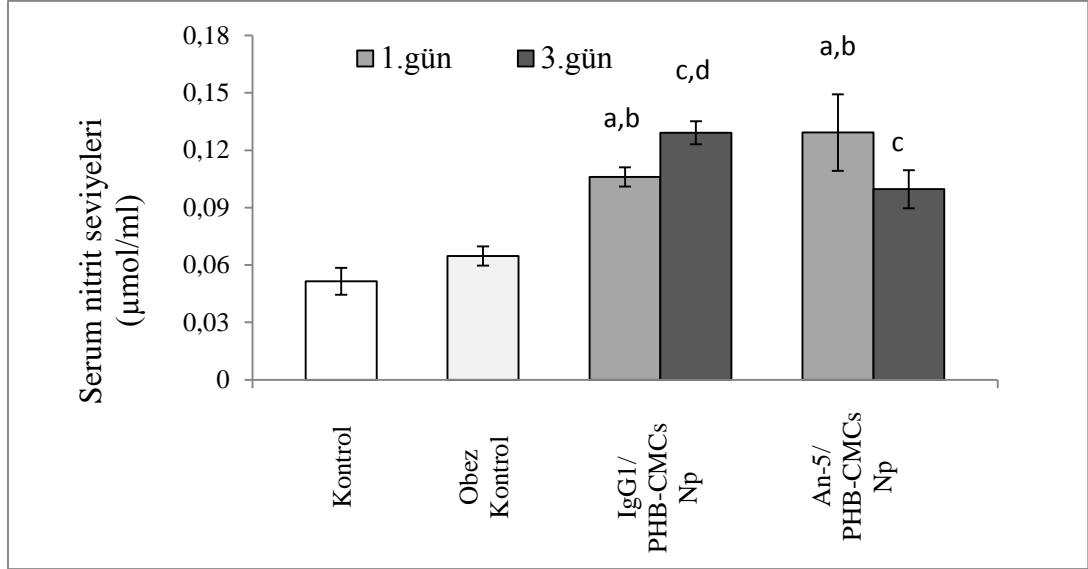
grupları karşılaştırıldığında serum glutasyon seviyesinin azaldığı ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($p<0.01$).

4.2.4.5. Serumda Nitrit ve Nitrat Değerlerinin İncelenmesi



Şekil. 4.35. Kontrol, obez kontrol, IgG1/PHB-CMCs Np birinci ve üçüncü gün ile An-5/PHB-CMCs Np birinci ve üçüncü gruplarına ait sıçanların serum Nitrat seviyeleri (n=6). Küçük harfler istatistiksel farkı göstermektedir. a) 1. günde kontrol grubuna göre anlamlı fark ($p=0.01$); b) 1. günde obez kontrol grubuna göre anlamlı fark ($p=0.01$); c) 3. günde kontrol grubuna göre anlamlı fark ($p<0.05$).

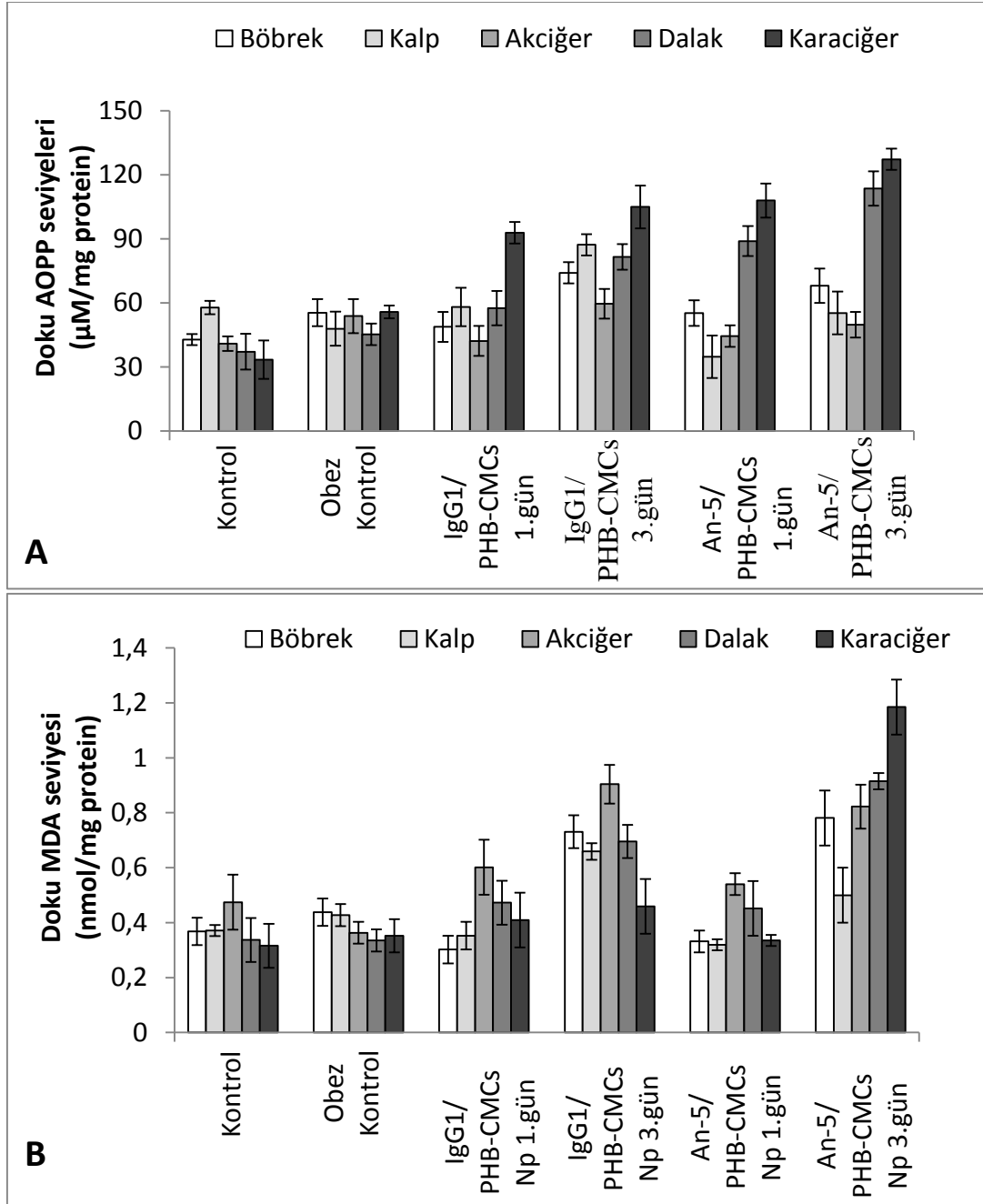
Serum nitrat seviyeleri karşılaştırıldığında (Şekil 4.35.); obez kontrol grubunun kontrol grubuna göre arttığı ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır ($p=0.01$). IgG 1/PHB-CMCs Np 1.gün grubu ile IgG 1/PHB-CMCs Np 3.gün grubu karşılaştırıldığında da aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p=1.0$). Ayrıca IgG 1/PHB-CMCs Np ile An-5/PHB-CMCs Np 1. ve 3. gün grupları sırasıyla karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir farkın olmadığı görülmüştür ($p<0.05$).



Şekil 4.36. Kontrol, obez kontrol, IgG 1/PHB-CMCs Np birinci ve üçüncü gün ile An-5/PHB-CMCs Np birinci ve üçüncü gruplarına ait sıçanların serum Nitrit seviyeleri (n=6). Küçük harfler istatistiksel farkı göstermektedir. a) 1. günde kontrol grubuna göre anlamlı fark ($p=0.01$); b) 1. günde obez kontrol grubuna göre anlamlı fark ($p=0.01$); c) 3. günde kontrol grubuna göre anlamlı fark ($p<0.05$); d) 3. günde obez kontrol grubuna göre anlamlı fark ($p<0.05$)

Serum nitrit seviyeleri incelendiğinde (Şekil 4.36.); obez kontrol grubunun kontrol grubuna göre arttığı saptanmıştır. IgG 1/PHB-CMCs Np 1.gün grubu ile IgG 1/PHB-CMCs Np 3.gün ($p=0.53$), An-5/PHB-CMCs Np 1.($p=0.72$) ve 3.gün ($p=0.96$) grupları karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel bir farkın olmadığı görülmüştür. IgG 1/PHB-CMCs Np 3.gün grubu ile An-5/PHB-CMCs Np 1.($p=1.0$) ve 3.gün ($p=0.13$) grupları karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel bir farkın olmadığı görülmüştür.

4.2.4.6. AOPP değerlerinin kontrol ve Np grupları arası karşılaştırılması



Şekil 4.37. Kontrol, obez kontrol, IgG 1/PHB-CMCs Np 1.gün ve 3.gün ile An-5/PHB-CMC Np 1.gün ve 3.gün gruplarına ait sıçanların doku AOPP (A) ve MDA (B) seviyeleri (n=6).

Böbrek AOPP (Şekil 4.37.A) seviyeleri incelendiğinde kontrol grubuna göre obez kontrol grubu değerlerinin anlamlı olarak yükseldiği saptanmıştır ($p<0.05$). Obez

kontrol grubuna göre IgG 1/PHB-CMCs Np ve An-5/PHB-CMCs Np 1.gün ve 3.gün gruplarının AOPP değerleri arasında anlamlı farkların olmadığı bulunmuştur ($p<0.05$).

Kalp AOPP seviyeleri incelendiğinde (Şekil 4.37.A) obez kontrol grubu değerlerinin negatif kontrol grubuna göre anlamlı olarak yükseldiği saptanmıştır ($p<0.05$). Obez kontrol ile karşılaştırıldığında; IgG 1/PHB-CMCs Np 1.gün grubunun obez kontrolden anlamlı olarak farklı olmadığı ($p=1.0$), bununla birlikte IgG 1/PHB-CMCs Np 3.gün grubu AOPP değerinin arttığı ve bu artışın anlamlı olduğu saptanmıştır ($p=0.05$). IgG1/PHB-CMCs Np 3.gün grubu ile An-5/PHB-CMCs Np 1.gün grubu karşılaştırıldığında değer, $52.45\pm 6.8\mu\text{M}/\text{mg}$ protein fazla bulunmuştur ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p=0.01$), bununla birlikte IgG 1/PHB-CMCs Np 3.gün grubu ile An-5/PHB-CMCs Np 3.gün AOPP değerleri arasında anlamlı bir farkın olmadığı saptanmıştır ($p=0.28$).

Akciğer AOPP seviyeleri incelendiğinde (Şekil 4.37.A); obez kontrol grubu değerlerinin negatif kontrole göre anlamlı yükseldiği saptanmıştır ($p<0.05$). Obez kontrol ile IgG 1/PHB-CMCs Np 1.gün ($p=1.0$), 3.gün ($p=1.0$), An-5/PHB-CMCs Np 1.gün ($p=1.0$) ve 3.gün ($p=1.0$) grupları arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. IgG 1/PHB-CMCs Np 1.gün ile 3.gün arasında anlamlı bir fark görülmemiştir ($p=0.96$). An-5/PHB-CMCs Np 1.gün ve 3.gün ($p=1.0$) grupları arasında anlamlı bir fark görülmemiştir.

Dalak AOPP seviyeleri incelendiğinde (Şekil 4.37.A); obez kontrol grubu değerlerinin negatif kontrole göre anlamlı bir şekilde yükseldiği saptanmıştır ($p<0.05$). Obez kontrol grubu ile IgG1/PHB-CMCs Np 1.gün ($p=1.0$) grubu arasında anlamlı bir fark yoktur. Fakat obez kontrole göre IgG1/PHB-CMCs Np 3.gün ($p=0.01$), An-5/PHB-CMCs Np 1.gün ($p=0.01$) ve 3.gün ($p=0.01$) gruplarında AOPP seviyesinin anlamlı bir şekilde yükseldiği saptanmıştır. IgG1/PHB-CMCs Np 3.gün grubuna göre An-5/PHB-CMCs Np 3.gün grubu daha yüksek bulunmuştur ($p=0.09$). An-5/PHB-CMCs Np 1.gün ve 3.gün arasında ise anlamlı bir fark yoktur ($p=0.35$).

Karaciğer AOPP değerleri incelendiğinde (Şekil 4.37.A); obez kontrol grubu değerlerinin negatif kontrole göre anlamlı olarak yükseldiği saptanmıştır ($p<0.05$). Obez kontrol grubuna göre IgG1/PHB-CMCs Np 1.gün ($p=0.01$) ve 3.gün ($p=0.01$), An-5/PHB-CMCs Np 1.gün ($p=0.01$) ve 3.gün ($p=0.01$) gruplarındaki AOPP değerlerinin arttığı saptanmıştır. IgG 1/PHB-CMCs Np 1.gün ve 3.gün grupları ile

An-5/PHB-CMCs Np 1.gün ve 3.gün grupları arasında AOPP seviyeleri açısından anlamlı bir fark görülmemiştir ($p=0.89$).

4.2.4.7. AOPP değerlerinin dokular arası karşılaştırılması

MR görüntülemelerinden sonra sakrifiye edilen sıçanlardan IgG 1/PHB-CMCs Np enjekte edilen grupta (Şekil 4.37.A); böbrek ile kalp ($p=0.223$), akciğer ($p=0.606$) ve dalak ($p=0.509$) AOPP değerleri arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. En yüksek AOPP seviyesi ise karaciğerde tespit edilmiştir ($p=0.01$).

IgG 1/PHB-CMCs Np enjeksiyonlardan üç gün sonra yapılan AOPP çalışmasında (Şekil 4.37.A); böbrek ile kalp ($p=0.11$), akciğer ($p=0.06$) ve dalak ($p=0.62$) arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. IgG1/PHB-CMCs Np enjekte edilen sıçanlarda birinci gün grubu gibi en yüksek AOPP değeri karaciğerde bulunmuştur ($p=0.01$).

An-5/PHB-CMCs Np enjekte edilen sıçanlarda birinci gün AOPP değerleri incelendiğinde (Şekil 4.37.A); AOPP değerleri böbreklerde 55.17 ± 9.5 ; kalpte 34.76 ± 3.8 ; akciğerde 44.4 ± 5.0 ; dalakta 88.9 ± 3.8 ve karaciğerde 107.9 ± 5.04 $\mu\text{M}/\text{mg}$ protein bulunmuştur. Kalp ve akciğer değerleri arasında anlamlı bir fark görülmemiştir ($p=0.09$), diğer dokuların AOPP sonuçları arasındaki farklar birbirleri ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.01$).

An-5/PHB-CMCs Np enjekte edilen sıçanlarda üçüncü gün AOPP değerleri incelendiğinde (Şekil 4.37.A); böbrek ve kalp ($p=0.22$), kalp ve akciğer ($p=0.88$) ve dalak ve karaciğer ($p=0.16$) AOPP değerleri arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. Böbrek, kalp, akciğer ve karaciğer değerleri incelendiğinde en yüksek AOPP değeri karaciğerde görülmüştür ($p=0.01$).

4.2.4.8. MDA değerlerinin kontrol ve Np grupları arası karşılaştırılması

Böbrek MDA seviyesi incelendiğinde (Şekil 4.37.B); obez kontrol grubuna göre IgG 1/PHB-CMCs Np 1.gün ($p=1.0$) ve 3.gün ($p=0.18$) ile An-5/PHB-CMCs Np 1.gün ($p=1.0$) grubu böbrek MDA seviyeleri arasında anlamlı bir fark yoktur. Obez kontrol grubuna göre An-5/PHB-CMCs Np 3.gün MDA değeri yüksek bulunmuştur ($p=0.01$). Ayrıca IgG 1/PHB-CMCs Np 3.gün ve An-5/PHB-CMCs Np 3.gün grupları MDA seviyeleri daha yüksek bulunmuştur ($p=0.01$).

Kalp MDA seviyeleri incelendiğinde (Şekil 4.37.B); obez kontrol grubu ile IgG 1/PHB-CMCs Np 1.gün ve 3.gün grupları, An-5/PHB-CMCs Np 1.gün ve 3.gün grupları arasında anlamlı bir fark görülmemiştir ($p=1.0$).

Akciğer MDA seviyeleri incelendiğinde (Şekil 4.37.B); obez kontrol grubuna göre IgG 1/PHB-CMCs Np 1.gün ($p=0.73$) ve An-5/PHB-CMCs Np 1.gün ($p=0.98$) grupları arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. Ancak obez kontrol grubuna göre nanopartiküllerin 3.gün grupları MDA seviyeleri daha yüksek bulunmuştur ($p=0.01$).

Dalak MDA seviyeleri incelendiğinde (Şekil 4.37.B); obez kontrol ile karşılaştırıldığında IgG 1/PHB-CMCs Np 1.gün ve An-5/PHB-CMCs Np 1.gün grupları arasında anlamlı bir fark görülmemiştir ($p=1.0$), IgG 1/PHB-CMCs Np 3.gün ve An-5/PHB-CMCs Np 3.gün grupları MDA seviyeleri daha yüksek bulunmuştur ($p=0.01$).

Karaciğer MDA seviyeleri incelendiğinde (Şekil 4.37.B); obez kontrol ile karşılaştırıldığında; IgG 1/PHB-CMCs Np 1.gün ve 3.gün, An-5/PHB-CMCs Np 1.gün grupları arasında anlamlı bir fark görülmemiştir ($p=1.0$). Obez kontrol grubuna göre An-5/PHB-CMCs Np 3.gün MDA seviyesi daha yüksek bulunmuştur ($p=0.01$). En yüksek MDA seviyesi An-5/PHB-CMCs Np 3.gün grubunda tespit edilmiştir ($p=0.01$).

4.2.4.9. MDA değerlerinin dokular arası karşılaştırılması

IgG 1/PHB-CMCs Np enjekte edilen sıçanlarda birinci gün MDA seviyesi incelendiğinde (Şekil 4.37.B); böbrek ile kalp ($p=0.71$) ve karaciğer ($p=0.32$) dokuları arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. MDA değeri akciğer ($p=0.01$) ve dalakta ($p=0.01$) böbreğe göre daha yüksek bulunmuştur. Akciğer MDA seviyesi kalbe göre daha yüksek bulunmuştur ($p=0.01$), fakat dalak ile aralarında anlamlı bir fark görülmemiştir ($p=0.1$). En yüksek MDA seviyesi dalakta bulunmuştur; fakat bu değer kalp ($p=0.26$), akciğer ($p=0.17$) ve karaciğer ($p=0.64$) MDA seviyeleri ile anlamlı bulunmamıştır.

IgG 1/PHB-CMCs Np enjekte edilen sıçanlarda üçüncü gün MDA seviyesi incelendiğinde (Şekil 4.37.B); en yüksek değer akciğerde tespit edilmiştir ($p=0.01$). Karaciğerden sonra en yüksek MDA seviyesi dalakta tespit edilmiştir, fakat dalak ile böbrek ($p=0.95$) ve kalp ($p=0.95$) MDA seviyeleri arasında anlamlı bir fark

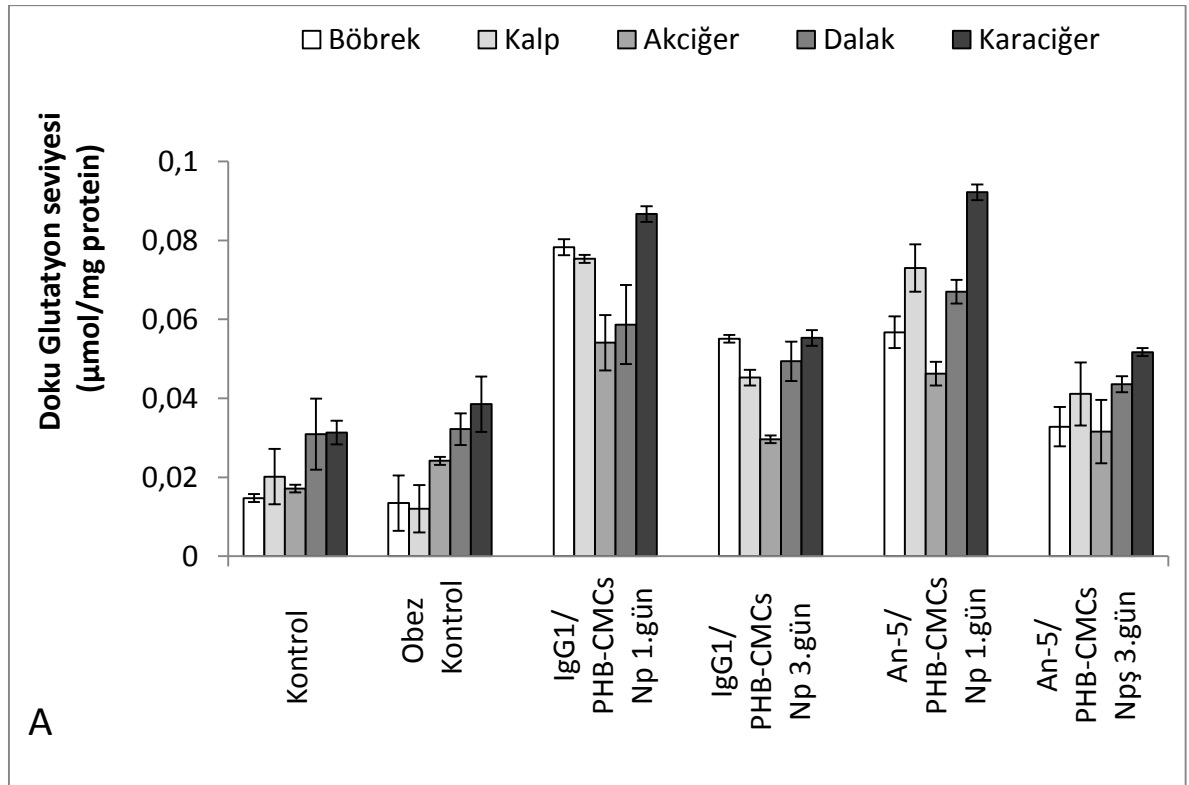
görülmektedir, bu değerin akciğer ($p=0.01$) ve karaciğer ($p=0.01$) MDA seviyelerine göre anlamlı olduğu saptanmıştır.

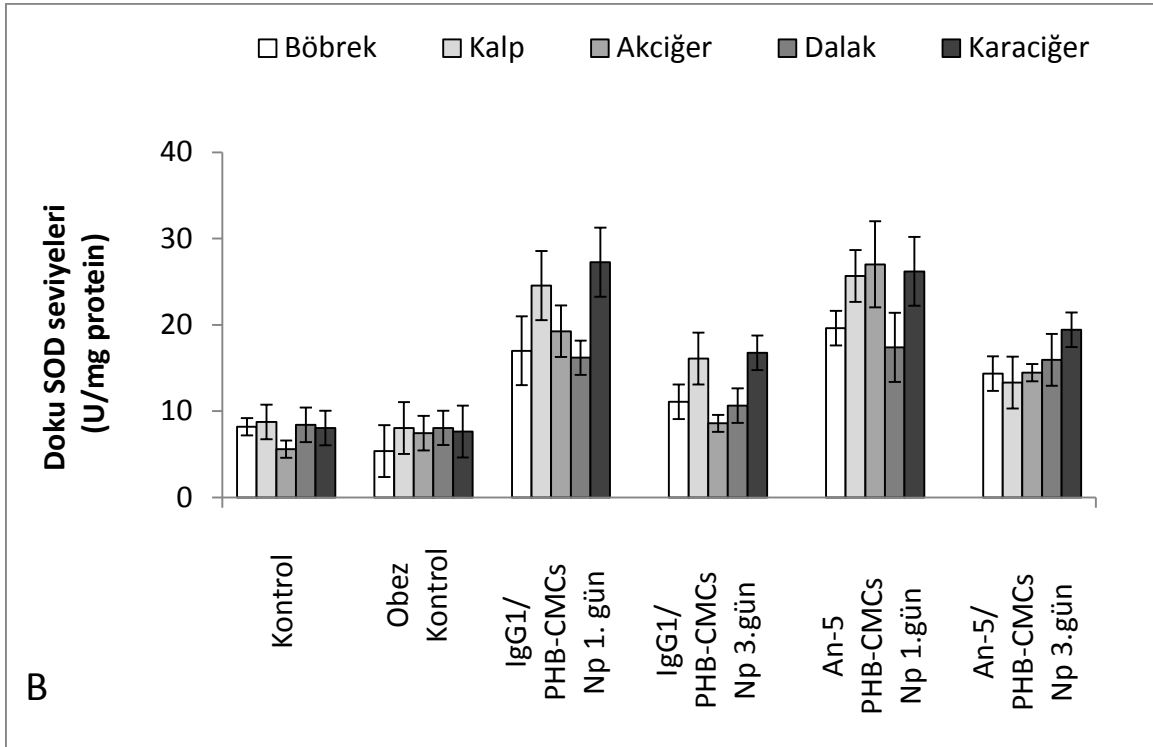
An-5/PHB-CMCs Np enjekte edilen sıçanlarda birinci gün MDA seviyesi incelendiğinde (Şekil 2.2.55B); en yüksek değer akciğerlerde görülmüştür. Akciğer MDA seviyesi böbrek, kalp ve karaciğer ($p=0.01$) için anlamlı iken dalak MDA seviyesi ($p=0.54$) ile anlamlı olmadığı saptanmıştır.

An-5/PHB-CMCs Np enjekte edilen sıçanlarda üçüncü gün MDA seviyesi incelendiğinde (Şekil 4.37.B); en yüksek değer karaciğerde tespit edilmiştir ($p=0.01$). Dalak MDA değerinin böbrek ($p=0.49$) ve akciğer ($p=0.79$) MDA değerleri ile anlamlı olmadığı, kalp MDA değerine göre daha yüksek olduğu ($p=0.01$) saptanmıştır.

MDA lipid, AOPP de protein oksidasyonunu gösteren iki markıdır. MDA ve AOPP değerleri karşılaştırıldığında; her iki oksidanın da birinci gün kontrol gruplarına göre arttığı ($p=0.01$), üçüncü gün ise birinci güne göre daha yüksek olduğu görülmüştür ($p=0.01$).

4.2.4.10. Glutasyon değerlerinin kontrol ve Np grupları arası karşılaştırılması





Şekil 4.38. Kontrol, obez kontrol, IgG1/PHB-CMCs Np 1.gün ve 3.gün ile An-5/PHB-CMCs Np 1.gün ve 3.gün gruplarına ait sıçanların doku glutatyon (A) ve SOD (B) seviyeleri (n=6).

Böbrek glutatyon seviyesi incelendiğinde (Şekil 4.38A); IgG 1/PHB-CMCs Np ve An-5/PHB-CMCs Np 1.gün ve 3. glutatyon değerleri obez kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur. Nanopartiküllerin 1.gün ve 3.gün grupları arasında anlamlı bir fark görülmemiştir ($p=0.98$).

Kalp glutatyon seviyesi incelendiğinde (Şekil 4.38A); obez kontrol grubu ile An-5/PHB-CMCs Np 3.gün grubu arasında anlamlı bir fark görülmemiştir ($p=0.99$). Obez kontrol grubuna göre IgG 1/PHB-CMCs Np 1.gün ve 3.gün, An-5/PHB-CMCs Np 1.gün grupları daha yüksek bulunmuştur ($p=0.01$). IgG 1/PHB-CMCs Np 1.gün ile 3.gün ($p=0.98$), An-5/PHB-CMCs Np 1.gün ($p=1.0$) ve 3.gün ($p=0.89$) grupları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Akciğer glutatyon seviyesi incelendiğinde (Şekil 4.38.A); obez kontrol grubuna göre nanopartiküller arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. IgG1/PHB-CMCs Np 1.gün grubu ile 3.gün ($p=0.98$), An-5/PHB-CMCs Np 1.gün ($p=1.0$) ve 3.gün ($p=0.99$) grupları arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır.

Dalak glutasyon seviyesi incelendiğinde (Şekil 4.38.A); obez kontrol grubuna göre nanopartikül grupları arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. Ayrıca hazırlanan nanopartiküllerin 1.gün ($p=1.0$) ve 3.gün ($p=1.0$) grupları arasında da anlamlı bir fark yoktur.

Karaciğer glutasyon seviyesi incelendiğinde (Şekil 4.38.A); obez kontrol grubuna göre nanopartikül gruplarının 1. Günlerinde artış gözlenmiş ve bu artış istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur. Bunu karşın nanopartiküllerin 3. gün değerleri arasında herhangi bir fark gözlenmemiştir.

4.2.4.11. Glutasyon değerlerinin dokular arası karşılaştırılması

IgG 1/PHB-CMCs Np enjekte edilen sıçanların birinci gün yapılan glutasyon çalışmasında (Şekil 4.38.A); böbrek ile kalp ($p=0.95$), akciğer ($p=0.23$), dalak ($p=0.57$) ve karaciğer ($p=0.98$) arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. En yüksek glutasyon seviyesi karaciğerde tespit edilmiştir ($0.084\pm 0.002\mu\text{mol/mg}$ protein) ve karaciğer ile böbrek ($p=0.98$), kalp ($p=0.75$), akciğer ($p=0.09$) ve dalak ($p=0.3$) arasında da anlamlı bir fark bulunmamıştır.

IgG 1/PHB-CMCs Np enjeksiyonundan üç gün sonra yapılan glutasyon çalışmasında (Şekil 4.38.A); en yüksek glutasyon seviyesi karaciğerde saptanmıştır. Karaciğer ile böbrek ($p=1.0$), kalp ($p=0.57$) ve dalak ($p=0.9$) glutasyon seviyeleri arasında anlamlı bir fark gözlenmezken akciğer glutasyon seviyesi karaciğere göre ortalama $0.025\pm 0.001\mu\text{mol/mg}$ protein daha düşük bulunmuştur ($p=0.01$).

An-5/PHB-CMCs Np enjekte edilen sıçanların birinci gün yapılan glutasyon çalışmasında (Şekil 4.38.A); glutasyon seviyesi en yüksek karaciğerde tespit edilmiştir ($p=0.01$). Kalp ile dalak ($p=0.82$) arasında anlamlı bir fark gözlenmezken, kalp ile böbrek ($p=0.05$), akciğer ($p=0.01$) ve karaciğer ($p=0.01$) arasında anlamlı fark saptanmıştır. Glutasyon seviyesi en düşük akciğerlerde saptanmıştır ($p=0.01$), fakat akciğer ile böbrek ($p=0.37$) arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

An-5/PHB-CMC Np enjekte edilen sıçanlarda üçüncü gün yapılan glutasyon çalışmasında (Şekil 4.38.A); karaciğer glutasyon seviyesi ile kalp ($p=0.28$) ve dalak ($p=0.54$) arasında anlamlı bir fark görülmezken, böbrek ($p=0.01$) ve akciğer ($p=0.01$) glutasyon seviyeleri daha düşük bulunmuştur. Akciğer glutasyon seviyesi

ile böbrek ($p=0.99$), kalp ($p=0.38$) ve dalak ($p=0.18$) seviyeleri arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır.

4.2.4.12. SOD değerlerinin kontrol ve Np grupları arası karşılaştırılması

Böbrek SOD seviyesi incelendiğinde (Şekil 4.38.B); obez kontrol grubu ile IgG 1/PHB-CMCs Np 3.gün grubu arasında anlamlı bir fark görülmezken ($p=0.9$), IgG 1/PHB-CMCs Np 1.gün ($p=0.01$), An-5/PHB-CMC Np 1.gün ($p=0.01$) ve 3.gün ($p=0.03$) SOD değerleri obez kontrole göre anlamlı yüksek bulunmuştur.

Kalp SOD seviyesi incelendiğinde (Şekil 4.38.B); obez kontrol grubu ile An-5/PHB-CMCs Np 3.gün grubu ($p=0.96$) arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. IgG 1/PHB-CMCs Np 1.gün ($p=0.01$) ve 3.gün ($p=0.01$), An-5/PHB-CMCs Np 1.gün ($p=0.01$) grupları obez kontrole göre anlamlı yüksek bulunmuştur. IgG 1/PHB-CMCs Np 1.gün grubu ile 3.gün ($p=0.25$), An-5/PHB-CMCs Np 1.gün ($p=1.0$) grupları arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. An-5/PHB-CMCs Np 3.gün grubu SOD değeri IgG 1/PHB-CMCs Np 1.gün grubuna göre anlamlı düşük bulunmuştur ($p=0.01$). An-5/PHB-CMCs Np 1.gün grubuna göre IgG 1/PHB-CMCs Np 3.gün ($p=0.04$) ve An-5/PHB-CMCs Np 3.gün ($p=0.01$) grupları SOD değerleri anlamlı düşüktür.

Akciğer SOD seviyesi incelendiğinde (Şekil 4.38.B); obez kontrol grubu ile An-5/PHB-CMCs Np 1.gün ($p=1.0$) ve 3.gün ($p=0.48$) grupları arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. IgG 1/PHB-CMCs Np 1.gün ($p=0.01$) ve 3.gün ($p=0.01$) SOD değerleri obez kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulunmuştur. IgG 1/PHB-CMCs Np 1.gün ile 3.gün ($p=0.42$) ve An-5/PHB-CMCs Np 3.gün ($p=0.95$) grupları arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. An-5/PHB-CMCs Np 1.gün SOD değeri IgG 1/PHB-CMCs Np 1.gün grubuna göre anlamlı yüksek bulunmuştur ($p=0.01$).

Dalak SOD seviyesi incelendiğinde (Şekil 4.38.B); obez kontrol grubu ile IgG 1/PHB-CMCs Np 1.gün ($p=0.14$), 3.gün ($p=1.0$) ve An-5/PHB-CMCs Np 3.gün ($p=0.19$) grupları arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. An-5/PHB-CMCs Np 1.gün grubu obez kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulunmuştur ($p=0.01$). IgG 1/PHB-CMCs Np 1.gün grubu ile 3.gün ($p=0.93$), An-5/PHB-CMCs Np 1.gün ($p=1.0$) ve 3.gün ($p=1.0$) grupları arasında anlamlı bir fark görülmemiştir.

Karaciğer SOD seviyesi incelendiğinde (Şekil 4.38.B); obez kontrol grubuna göre diğer grupların SOD seviyeleri anlamlı yüksek bulunmuştur ($p=0.01$). Bununla

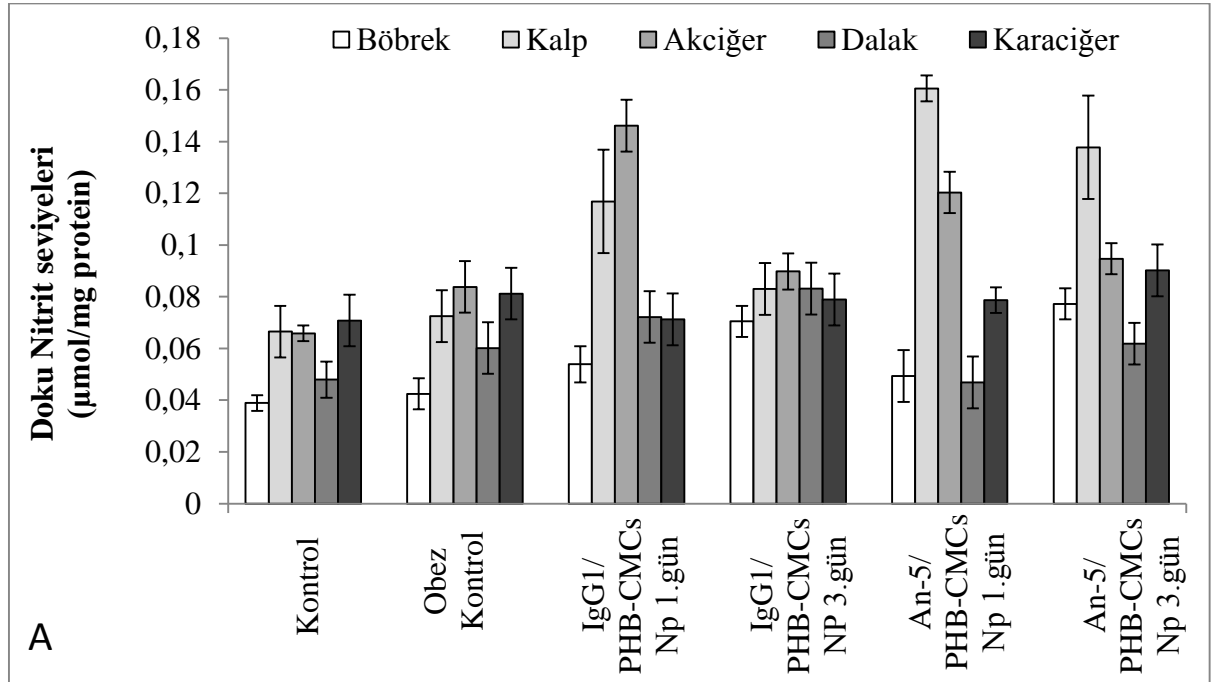
birlikte An-5/PHB-CMCs Np 1.gün ($p=1.0$) ve 3.gün ($p=0.5$) grupları aralarında anlamlı bir fark saptanmamıştır.

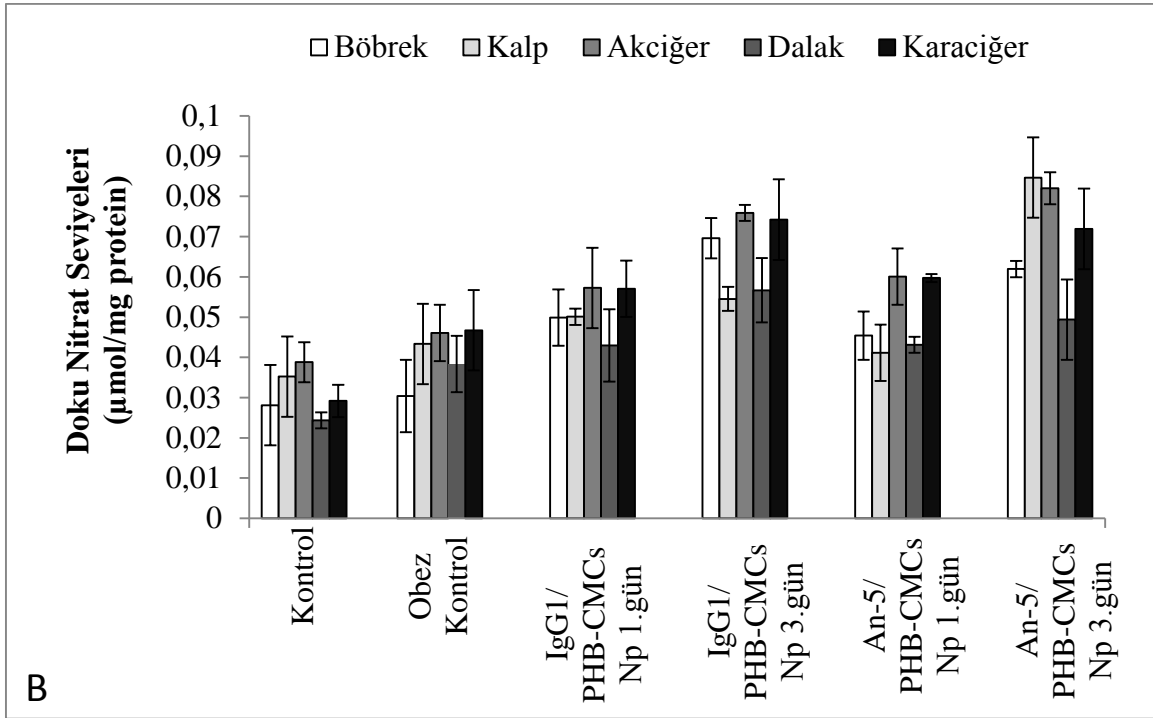
4.2.4.13. SOD değerlerinin dokular arası karşılaştırılması

IgG 1/PHB-CMCs Np enjekte edilen sıçanlarda birinci gün SOD çalışmasında (Şekil 4.38B); en yüksek SOD değeri karaciğerde görülmüştür. Karaciğerden sonra en yüksek SOD değeri kalpte görülmüştür. Kalp SOD değeri akciğere ($p=0.2$) göre anlamlı olarak yüksek değilken böbrek ($p=0.01$) ve dalağa ($p=0.01$) göre anlamlı olarak yüksektir.

IgG 1/PHB-CMCs Np enjekte edilen sıçanlarda üçüncü gün SOD çalışmasında (Şekil 4.38B); üçüncü gün SOD değerlerinin birinci güne göre azaldığı saptanmıştır. Bununla birlikte en yüksek değer ilk gün çalışması gibi karaciğer ve kalpte görülmüştür. Bu çalışmada da karaciğer ve kalp SOD değerleri arasında anlamlı bir fark görülmemiştir ($p=0.97$).

4.2.4.14. Nitrit ve Nitrat değerlerinin kontrol ve Np grupları arası karşılaştırılması





Şekil 4.39. Kontrol, obez kontrol, IgG 1/PHB-CMCs Np 1.gün ve 3.gün ile An-5/PHB-CMCs Np 1.gün ve 3.gün gruplarına ait sıçanların doku nitrit (A) ve nitrat (B) seviyeleri (n=6).

Dalak, karaciğer, akciğer, kalp, böbrek dokularının nitrit ve nitrat seviyesi incelendiğinde (Şekil 4.39A, Şekil 4.39B), obez kontrol, IgG 1/PHB-CMCs Np 1.gün ve 3.gün ile An-5/PHB-CMCs Np 1.gün ve 3.gün grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p=1.0$).

4.2.4.15. Nitrit ve Nitrat değerlerinin dokular arası karşılaştırılması

IgG 1/PHB-CMCs Np enjekte edilen sıçanların birinci gün nitrit sonuçları incelendiğinde (Şekil 4.39.A); en yüksek değerlerin kalp ve akciğerde olduğu ancak nitrit seviyelerinin dalak, böbrek ve karaciğere göre istatistiksel olarak farklı olmadığı görülmüştür ($p=0.90$).

IgG 1/PHB-CMCs Np enjekte edilen sıçanların üçüncü gün nitrit sonuçları incelendiğinde (Şekil 4.39.A); kontrol ve obez kontrol grubuna göre akciğer nitrit seviyesinin arttığı, bununla birlikte kalp, dalak, böbrek ve karaciğer doku nitrit seviyeleri arasında anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür ($p=1.0$).

An-5/PHB-CMCs Np enjekte edilen sıçanlarda birinci gün yapılan çalışmada (Şekil 4.39.A); en yüksek nitrit değeri kalpte görülmüştür ($p=0.01$). Böbrek nitrit değerinin

ise kalp, akciğer ve karaciğere göre anlamlı bir şekilde düşük olduğu bulunmuştur ($p=0.01$).

An-5/PHB-CMCs Np enjekte edilen sıçanlarda üçüncü gün yapılan çalışmada (Şekil 4.39.A); en yüksek değer nitrit değeri kalpte görülmüştür ($p=0.01$). En düşük değer ise dalakta görülmüştür.

IgG 1/PHB-CMCs Np enjekte edilen sıçanların birinci gün nitrat sonuçları incelendiğinde (Şekil 4.39.B); en yüksek değer akciğerde saptanmıştır ve bu değer dalağa ($p=0.02$) göre anlamlı iken böbrek, kalp ($p=0.3$) ve karaciğere ($p=0.9$) göre anlamlı bulunmamıştır.

IgG 1/PHB-CMCs Np enjekte edilen sıçanların üçüncü gün nitrat sonuçları incelendiğinde (Şekil 4.39.B); en yüksek değer akciğerde saptanmıştır ve bu değerinin kalbe ($p=0.02$) göre anlamlı olarak yüksek olduğu, böbreğe ($p=0.8$), dalağa ($p=0.05$) ve karaciğere ($p=0.9$) göre ise anlamlı olarak yüksek olmadığı görülmüştür. Karaciğer nitrat seviyesinin kalp değerine göre yüksek olduğu bulunmuştur ($p=0.04$).

An-5/PHB-CMCs Np enjekte edilen sıçanlarda birinci gün nitrat sonuçları incelendiğinde (Şekil 4.39.B); en yüksek değer akciğerde görülmüştür ($p=0.01$). Kalp nitrat seviyesinin böbrek ($p=0.5$) ve dalağa ($p=0.9$) göre farklı olmadığı akciğer ve karaciğere göre ise anlamlı düşük olduğu bulunmuştur ($p=0.01$).

An-5/PHB-CMCs Np enjekte edilen sıçanlarda üçüncü gün nitrat sonuçları incelendiğinde (Şekil 4.39.B); en yüksek değer kalpte görülmüştür. Dalak nitrat değerinin kalp ve akciğere göre anlamlı düşük olduğu bulunmuştur ($p=0.01$).

4.2.4.16. Biyokimyasal incelemelerin değerlendirilmesi

Biyokimya çalışmaları sonucunda; serum obez kontrol grubu SOD, MDA, AOPP, glutatyon, nitrit-nitrat seviyelerinin negatif kontrol grubuna göre arttığı saptanmıştır. Aynı zamanda obez kontrol grubuna göre; AOPP ve MDA seviyelerinin An-5/PHB-CMCs Np enjekte edilen grupta arttığı saptanmıştır ($p<0,05$). Bununla birlikte antioksidanlardan SOD ve glutatyon seviyelerinde birinci gün artış, üçüncü gün yapılan çalışmalarda ise azalma saptanmıştır. Nitrit-nitrat seviyelerinin de genel olarak bir artış saptanmıştır. Guohua ve arkadaşları hiperlipidemik sıçan serumunda glutatyon, MDA ve SOD seviyelerini incelemiştir. Hiperlipidemik sıçanlarda GSH seviyesinin, SOD aktivitesinin azaldığını, MDA seviyesinin de

arttığını saptamışlardır [161]. Sun ve arkadaşları sıçanlarda aterosklerotik lezyonlar oluşturmuşlardır. Çalışmalarının sonucunda plak oluşturdukları sıçanlarda TNF- α , IL-6 ve C-reaktif protein miktarlarının normal kontrol grubuna göre arttığını saptamışlardır [162].

MDA ve AOPP değerleri karşılaştırıldığında; her iki oksidanın da birinci gün kontrol gruplarına göre arttığı ($p=0.01$), üçüncü gün ise birinci güne göre daha yüksek olduğu görülmüştür ($p=0.01$). Bu durum nanopartiküllerin hayvanlarda dokulara göre değişmekle birlikte oksidatif strese sebep olduğunu göstermektedir. En yüksek AOPP seviyesi karaciğerde saptanmıştır ve karaciğer AOPP değerlerine göre kısmi olarak IgG 1/PHB-CMCs nanopartiküllerin daha az oksidatif strese sebep olduğu söylenebilir. En yüksek doku MDA seviyesi akciğerlerde gözlenmiştir ve akciğer MDA seviyesine göre IgG1/PHB-CMCs ile An-5/PHB-CMCs nanopartiküllerin arasında belirgin bir fark gözlenmemiştir. Cüre ve arkadaşları, 2007 yılında yaptıkları bir çalışmada 100 mg/kg demiri sıçanlara intraperitoneal yolla 5 gün boyunca enjekte etmişlerdir. Enjeksiyonlardan 12 saat sonra sıçanları sakrifiye etmiş, kalp ve karaciğer SOD, MDA seviyelerini incelemişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara göre her iki organda da SOD, MDA ve glutatyon seviyelerinin kontrol gruplarına göre arttığı saptamışlardır [163]. Bu sonuçlar tez kapsamında yapılan SOD ve MDA sonuçları ile örtüşmektedir.

Her iki antioksidan, glutatyon ve SOD değerleri karşılaştırıldığında birinci gün yapılan çalışmada her iki antioksidanın değerinin daha yüksek, üçüncü gün ise daha düşük olduğu saptanmıştır. Bu durumda oksidanların eliminasyonu için antioksidanların harcandığını göstermektedir. En yüksek SOD değeri karaciğerde tespit edilmiş ve karaciğer SOD değerine göre iki nanopartikül arasında oksidan aktivite yönünden anlamlı bir fark gözlenmemiştir. En yüksek glutatyon değeri karaciğerde bulunmuştur. Özellikle birinci gün yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen sonuçların obez kontrollere göre anlamlı yüksek olduğu saptanmıştır. SOD ve glutatyon sonuçları değerlendirildiğinde IgG 1/PHB-CMCs nanopartiküllerin kısmi olarak daha biyouyumlu olduğu gözlenmiştir. Bayır ve arkadaşları sekiz hafta boyunca %1 kolesterolce zengin diyetle besledikleri sıçanlara N-asetil sistein uygulamışlardır. Yaptıkları çalışmada sıçanların aort dokusunda, kontrol grubuna göre kolesterol grubu sıçanlarda glutatyon seviyesinin azaldığını, MDA ve NO seviyelerinin ise arttığını saptamışlardır [164]. Futian Tang ve arkadaşları

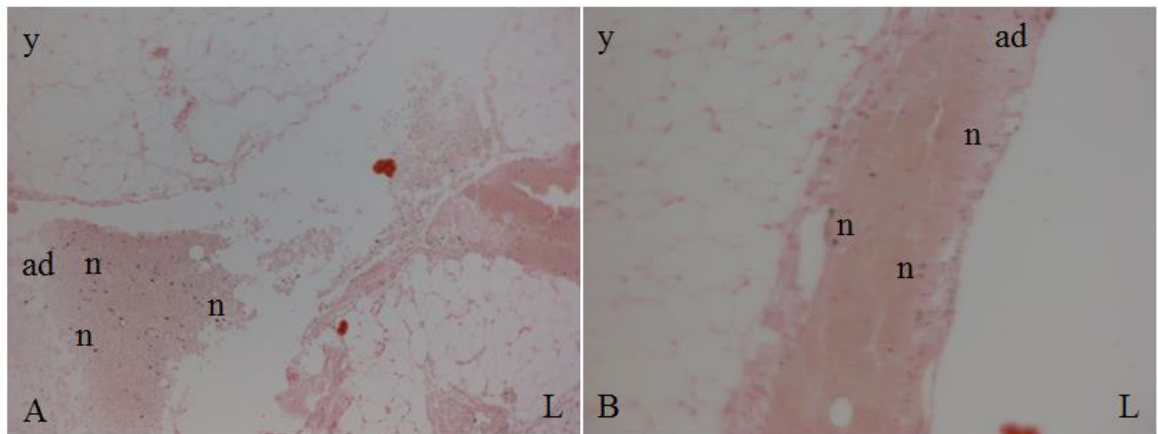
aterosklerotik plak oluşturdıkları sıçanların aortlarını çıkartıp SOD ve MDA seviyelerini incelemiştir. Yaptıkları çalışma sonucun da plaklı dokuda MDA seviyesi yükselirken SOD seviyesinin onunla paralel olarak azaldığını saptamışlardır [165].

Nitrit ve nitrat değerlerinin dokulara göre birinci ve üçüncü gün çalışmalarında azaldığı veya arttığı saptanmıştır. Bununla birlikte genel olarak en yüksek değer akciğerlerde olduğu saptanmıştır. Akciğer nitrit seviyesine göre nanopartiküller arasında açık bir fark bulunamamıştır. Nitrat sonuçları değerlendirildiğinde özellikle kalp ve dalak değerleri ile obez kontrol değerlerinin arasında anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur. Akciğer değerleri dikkate alındığında nitrat sonuçlarına göre iki nanopartikül arasında anlamlı bir fark görülmemiştir.

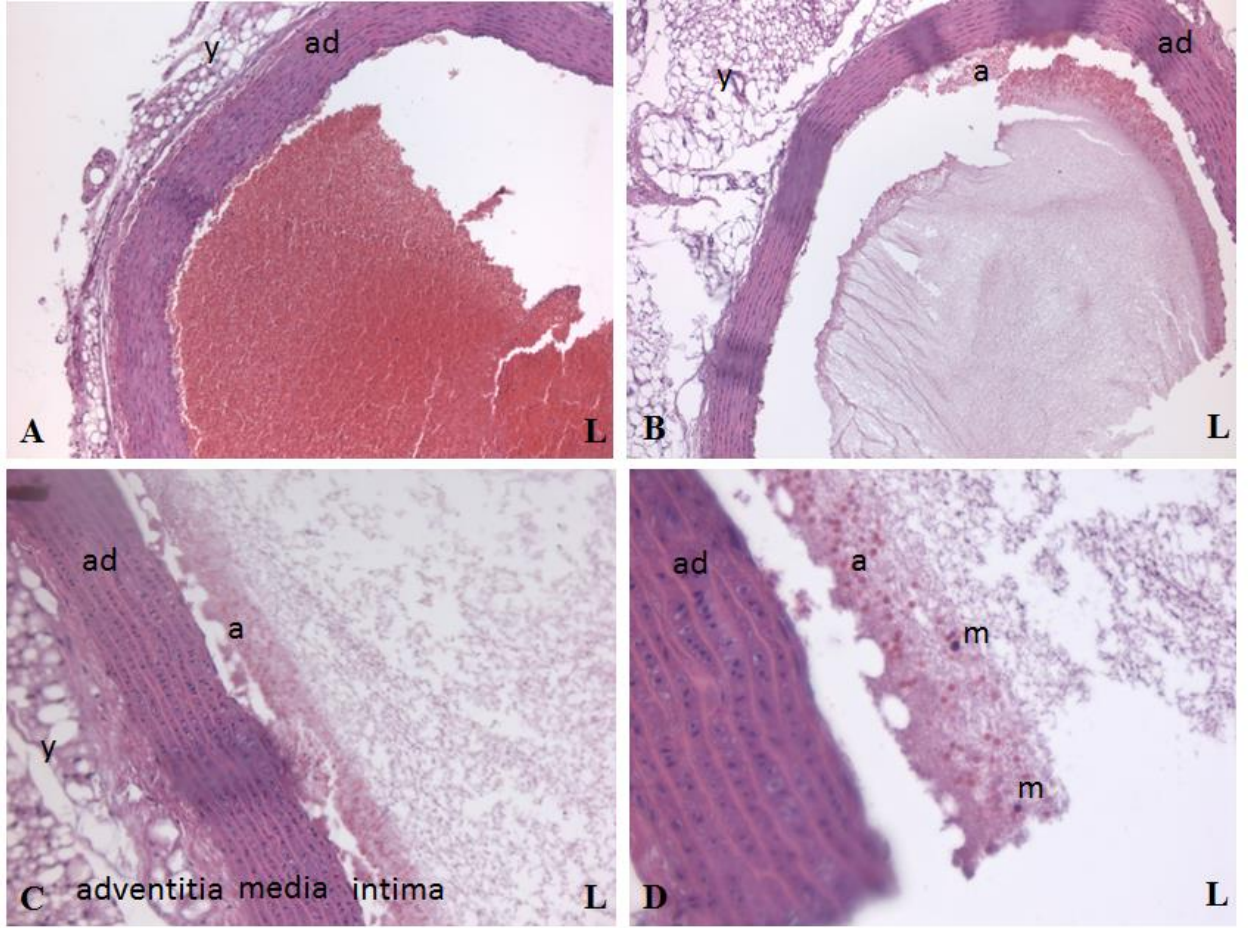
Sıçanların doku ve serum örneklerinde yapılan biyokimyasal incelemeler sonucunda kullanılan nanopartikül miktarının fazla olması sebebiyle organ ve dokularda belli bir oranda oksidatif strese neden olduğu gözlenmiştir.

4.2.5. Histolojik İncelemeler

Kontrol, An-5/PHB-CMCs Np ve IgG1/PHB-CMCs Np enjekte edilen sıçanlar MRI incelemeleri tamamlandıktan sonra standart anestezi altında sakrifiye edildi. Aortları çıkartıldı ve %10 formol içerisinde alındı. Sıçan aortları demir içeren nanopartiküllerin incelenmesi için prusya mavisi ile (Şekil 4.40.), yağ ve plak içeriğinin incelenmesi için hematoksilin eosin ile boyandı (Şekil 4.41.).



Şekil 4.40. Prusya mavisi ile boyanmış IgG 1/PHB-CMCs Np (A, 10x10 büyütme) ve An-5/PHB-CMCs Np (B, 10x40 büyütme) enjekte edilen sıçanların aortları (*ad*: aort duvarı, *L*: lümeni, *n* nanopartiküllerin akümülayon bölgeleri *m*: makrofaj, *y*: yağ tabakası).



Şekil 4.41. Hematoksilen-oesin ile boyanmış standart yem ile beslenen (A, 10x10) ve %1 hayvansal yağ katkılı diyet ile beslenen sıçanların (B, 10x10; C 10x40; D10x40) aortları (*a: aterosklerotik plak oluşumu, ad: aort duvarı, L: lümeni, m: makrofaj, y: yağ tabakası*).

Sekiz haftanın sonunda normal sıçan diyeti ile beslenen sıçanların damar kesitlerinin hematoksilen-eosin boyama ile incelenmesinde herhangi bir patolojiye rastlanmamıştır. Normal damarların ince ve düzgün bir endotele, ince ve kıvrımlaşmamış internal elastik laminaya ve konsantrik yerleşmiş düz adale hücrelerinden oluşan medya tabakasına sahip olduğu izlenmiştir. Damar duvarları kalınlığında anormallik izlenmemiştir. (Şekil 4.41.A). %1 hayvansal yağ katkılı diyet ile beslenen gruptaki sıçanların damar kesitlerinin incelemesinde ateroskleroz ile uyumlu olarak subendotelyal ve medial tabakalarda lipid depolanmaları, media tabakasındaki elastik lif yapılarında dejenerasyon, endotelyal hücre diziliminde düzensizlik, damar duvarında kalınlaşma görülmüştür. Ayrıca bu grupta, damarlarda tipik ateromatöz plakların oluştuğu da tespit edilmiştir. Bu gruptaki

sıçanların aort adventitia yönünde çok daha kalın bir yağ tabakası izlenmiştir (Şekil 4.41 B, C, D).

Demir içeren manyetik IgG 1/PHB-CMCs (Şekil 4.40A) ve An-5/PHB-CMCs (Şekil 4.40B) nanopartiküllerin abdominal aortta akümülyasyonunun incelenmesi için dokular prusya mavisini ile boyanmıştır. IgG 1 ve Annexin-5 ligandları ile modifiye edilmiş PHB-CMCs blend nanopartiküllerin abdominal aortta, özellikle lümen yönünde lezyon çevresinde akümüle olduğu gözlenmiştir.

Joanne B. Morris ve arkadaşları ApoE^{-/-} farelerin aterosklerotik lezyonlarını MR ile incelemek için Ferumoxtran-10 (Combidex), ultrasmall superparamanyetik demiroksit nanopartikülleri kullanmışlardır ve yaptıkları histolojik incelemede fare aortunda demir içeren bölgeleri Perl boyama ile belirlemişlerdir. Aynı zamanda lezyon bölgelerinde makrofajların varlığını ve akümülyasyonunu Cat-S boyama ile göstermişlerdir. Çok küçük boyutlardaki süperparamanyetik demiroksit nanopartiküllerin aterosklerotik lezyon bölgesinde akümülyasyonunu makrofaj varlığı ile açıklamışlardır [166].

4.3. Köpük Hücre Oluşum Modeli

Aterosklerotik plak oluşumu ile ilgili olarak gerçekleştirilen çalışmalarda aterosklerozun ilerleyişini düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) oksidasyonunun artırdığı gözlenmiştir. Bunun nedeni; LDL 'nin özel reseptörlerle hücre içine alınarak oksitlenmesi sonucu oluşan okside-LDL yapısının kontrol dışı makrofajlarla köpük hücrelerini oluşturarak, endotel hücrelerinin altında birikmesiyle aterosklerozunun ilk adımlarının atıldığı düşünülmektedir [167].

Sunulan çalışmaların son bölümünde daha önceki bölümlerde geliştirilen nanoplatformlarda kullanılmak üzere ihtiyaç duyulan seçici reseptör/ligand ikililerinin belirlenmesinde kullanılmak üzere, köpük hücreleri *ex vivo* ortamda oluşturularak, okside-LDL'nin köpük hücreleri yüzeyinde meydana getirecek değişiklikler incelenmiş ve hücrelerin yüzeyinde yer alan spesifik reseptörler belirlenmeye çalışılmıştır.

Bu bağlamda çalışmaların bu bölümünde ilk olarak insan LDL' sinden okside-LDL eldesi sağlanmış ve okside-LDL makrofajlarla etkileştirilerek köpük hücreleri elde edilmiştir.

4.3.1. Okside-LDL Eldesi

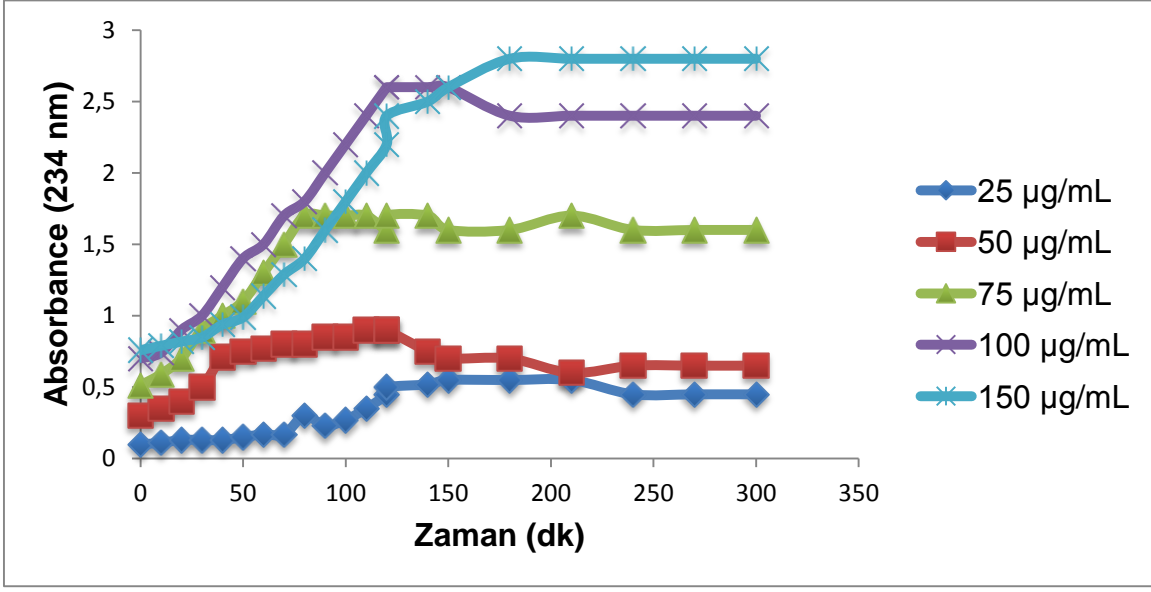
In vitro olarak oluşturulan oksidasyon işlemi üç basamaktan oluşmaktadır. Bunlar; oksidasyon, ilerleme (propagasyon) ve lag fazı olarak adlandırılan basamaklardır. Birinci basamakta, LDL yapısındaki doymamış yağ asitlerinin yapısındaki metilen grupları, metal varlığında oluşan hidroksil radikalleri ile molekül içi düzenlemelere giderek dien konjugatlarını oluşturmaktadır. Oluşan dien yapıları oksijenle birleşerek lipid peroksil radikallerine dönüşmektedir. Daha sonraki basamakta hızlı lipid peroksidasyonu basamağı gelmektedir. En son basamak olan lag fazı basamağında ise antioksidanların miktarı azalmaya başlamaktadır.

Oksidasyon dalga boyunu belirlemek için Esterbauer ve arkadaşlarının izlediği yöntemle; 100 µg protein/ mL LDL çözeltisine, 10 µM Cu⁺² çözeltisi ilave edilerek 37° C iki saat boyunca, 10 dakikalık zaman periyodlarında ve 200-290 nm aralığında UV absorbans taramaları yapılmıştır. Yapılan taramalar sonucunda oksidasyon için en uygun absorbansın 234 nm olduğu bulunmuştur [168].

4.3.2. Okside-LDL Kinetiğine etki eden Parametreler

4.3.2.1.LDL Konsantrasyonunun Oksidasyona Etkisi

Tez çalışmasında, tüm oksidasyon basamakları gerçekleştirilirken, değişen LDL konsantrasyonlarında (25, 50, 75, 100, 150 $\mu\text{g/mL}$) 10 dakikalık zaman dilimlerinde ölçümler yapılarak LDL konsantrasyonunun oksidasyona etkisi araştırılmıştır. (Şekil 4.42.)



Şekil 4.42. LDL konsantrasyonunun, oksidasyon kinetiğine etkisi

Dien oluşumu, 234 nm UV absorbansında, 37° C'de inkübe edilerek ve 25-150 $\mu\text{g/mL}$ arasındaki LDL protein konsantrasyonlarında gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.42.). LDL konsantrasyonundaki artış sayesinde, başlangıç dien miktarı, lag time, maksimum dien ürününü ve ürün oluşum hızının da artırdığı gözlenmiştir. Bu artış en düzgün ve en iyi 100 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonundaki LDL örneklerinde görülmüştür ve bu konsantrasyon değeri ile çalışmaya devam etmeye karar verilmiştir.

Oksidasyon kinetiğine ait parametrelere uygun olarak, değişen LDL konsantrasyonu ile elde edilen verilere göre yapılan hesaplamaların sonuçları Çizelge 4. 4'te verilmektedir.

Çizelge 4.4. Değişen LDL konsantrasyonu ile değişen LDL oksidasyon parametreleri (n=4)

LDL Konsantrasyonu (µg/mL)	Lag Time (Dakika)	Başlangıç Dien Miktarı (µmol/L)	Maksimum Dien Miktarı (µmol/L)
25	50	13.1 ± 1.4	21.3 ± 2.3
50	37	19.4 ± 3.5	28.5 ± 2.9
75	32	27.0 ± 3.9	50.1 ± 3.6
100	25	38.8 ± 4.7	69.3 ± 6.2
150	12	40.1 ± 3.3	76.2 ± 9.2

Özellikle artan protein içeriği ile lag time değerinin düştüğü gözlenmiştir. Ayrıca oksidasyonun oldukça hızlı gelişmesine neden olmaktadır. Oksidasyonun en iyi kontrol edilebilir değeri 100 µg protein/mL LDL konsantrasyonu olarak bulunmuştur. Literatürdeki çalışmalarda özellikle 100 µg protein/mL LDL içeriğinin üzerindeki derişimlerle oksidasyonun kontrol edilebilirliğinin oldukça zor olduğundan bahsedilmektedir [169].

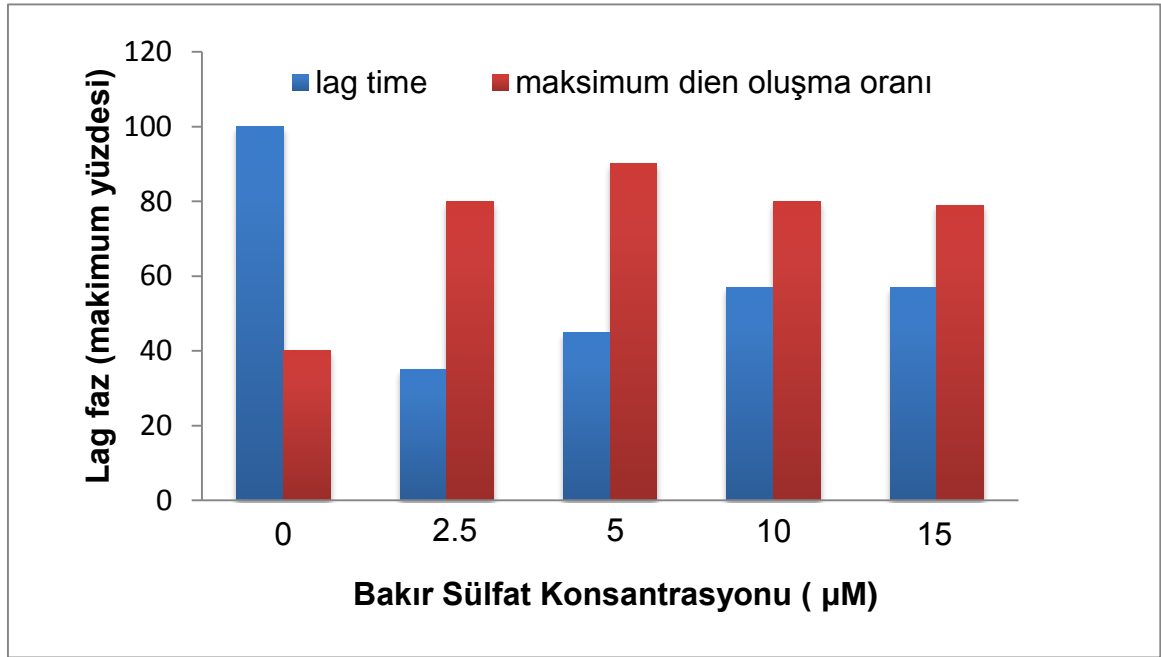
Young ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, LDL oksidasyonunun aterosklerozun gelişmesindeki anahtar basamak olduğundan bahsetmişlerdir. Çalışmalarında düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) oksidasyonu, *in vivo* olarak enzim aracılı ve enzimatik olmayan mekanizmalar tarafından başlatılmış ve LDL bir çok aterojenik özelliklere sahip olarak oksitlenmiştir. *In vivo* LDL oksidasyonun, LDL protein konsantrasyonundan etkilendiğini, miktardaki değişimlerle ortamın pH'ı gibi yerel çevresel faktörleri de etkilediği bulunmuştur. Oksidasyonun, LDL bileşimi, antioksidan içeriği, yağ asiti ve parçacık boyutu gibi faktörler de dahil olmak üzere de çok önemli olduğundan bahsedilmektedir [170].

Bir diğer çalışmada LDL yapısındaki lipidlerin ve yağ asitlerinin oksidasyonu artırıcı yönde katkı sağladığını göstermişlerdir. Artan lipid içeriği ile lipid saklama

için adiposit kapasitesi aşılrırsa, nonadipose depolarında lipidin anormal birikime yol açtığı görülmüştür ve sonuçta çeşitli dokularda örneğin karaciğer, dalak gibi metabolik düzensizliğe yol açtığı gözlenmiştir [171].

4.3.2.2. Bakır Sülfat Konsantrasyonunun Oksidasyona Etkisi

Tez konusu ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda LDL'nin *in vitro* oksidasyonu metal iyonlarla inkübe edilerek yapılmaktadır ve oksidasyondaki değişimler literatürde daha önceden işaret edilmiş absorbans (234 nm) artışı ile izlenmektedir [172-174].



Şekil 4.43. Bakır Sülfat konsantrasyonunun lag time ve maksimum dien oluşumuna etkisi

100 µg/mL konsantrasyonundaki LDL kullanılarak ve 0-15 µM arasındaki bakır konsantrasyon değerleri değiştirilerek lag time ve maksimum dien oluşumuna etkisi 37°C inkübe edilerek incelenmiştir (Şekil 4.43). Bakır konsantrasyonu 2.5 µM olduğunda lag time'in % 67 azaldığı gözlenmiştir. Ancak bakır konsantrasyonunu artırdığımız zaman belirgin bir azalma olmadığı gözlenmektedir. Diğer yandan Bakır konsantrasyonu 2.5 µM olunca maksimum dien oluşumunda % 50 artış olduğu ancak 10 µM bakır konsantrasyonundan sonra bu artışta önemli bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir. Bu nedenle çalışmamıza 10 µM bakır sülfat konsantrasyonu ile devam edilmiştir.

Literatürde değişik metal iyon kompleksleri kullanılarak (örneğin $FeCl_2$, $CuCl_2$, $CuSO_4$) LDL oksidasyonları incelenmiştir. Esterbauer yaptığı çalışmada, değişik tamponlar kullanarak demir iyonunun bakır iyonunun yaptığı oksidasyonun % 20 sinin altında bir değerde oksidasyon yapabildiğini göstermiştir [168]. Kuzuya ve arkadaşları; düşük yoğunluklu lipoproteininin demir ve bakır katalizli oksidasyonuna fosfat tampon etkisini incelemişlerdir. Yapılan incelemelerde $FeCl_3$ ün lag fazına neden olduğunu ancak bakır kompleksinde böyle bir değişim olmadığı sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte fosfat tamponunun demire bağlı oksidasyonu azalttığı, bakır iyonuyla olan oksidasyonu ise etkilemediği gözlenmiştir [174].

Morgan ve Leake çalışmalarında, demir ve bakır iyon çözeltileri kullanılarak LDL oksidasyonuna pH etkisini incelemişlerdir. Asidik pH'larda oksidasyonun daha iyi sonuç verdiğini hatta aktif makrofaj yüzeyininin pH'ının 3.6 olduğunu belirtmişlerdir. Ancak düşük pH seviyelerinde demir çözeltilerinden düşük oksidasyon verimi elde ettiklerini kaydetmişlerdir. Ayrıca asidik pH'ta LDL oksidasyonun artışının artan sistein konsantrasyonundan kaynaklandığını ve bakır ile oksitlenen LDL'nin asidik pH'ta dienler, hidroperoksitler ve (Tiyobarbütirik asit reaktif türleri) TBARS hızlı oluşumundan önce gecikme fazını arttırdığı ve bununla beraber makrofajlar tarafından alımının da artırdığını kaydetmişlerdir [175]. Düşük pH seviyelerinde çalışıldığında oksidasyon kinetiği daha iyi sonuç vermiş olsa da deneyler pH 7.4 fosfat tampon içerisinde gerçekleştirilmiştir. İlerleyen aşamalarda da bahsedileceği gibi çalışmanın esas amacı okside-LDL ile insan makrofajlarını etkileştirecek köpük hücre oluşturmak ve bu hücrelerin yüzey proteinleri tayin etmektir. Herhangi bir pH değişikliğinden yüzey proteinlerinin etkilenmemesi amacıyla deneyler pH 7.4'te gerçekleştirilmiştir.

Satchell ve Leake yaptıkları çalışmada, Fe^{2+} ile Fe^{3+} iyonlarının etkilerini karşılaştırmışlardır. Fe^{2+} iyonunun lipid hidroperoksitler ile daha hızlı tepkimeye girdiklerini reaksiyon hız denklemiyle göstermişlerdir. İlginç bir şekilde, Fe^{2+} 'nin yüksek konsantrasyonlarda eklenmesi lag fazını kısalttığı görülmüştür. Fe^{3+} konsantrasyonu yerine, Fe^{2+} seçilmesi ile LDL oksidasyonu oran-sınırlayıcı aşaması belirlenebildiğini rapor etmişlerdir. [176].

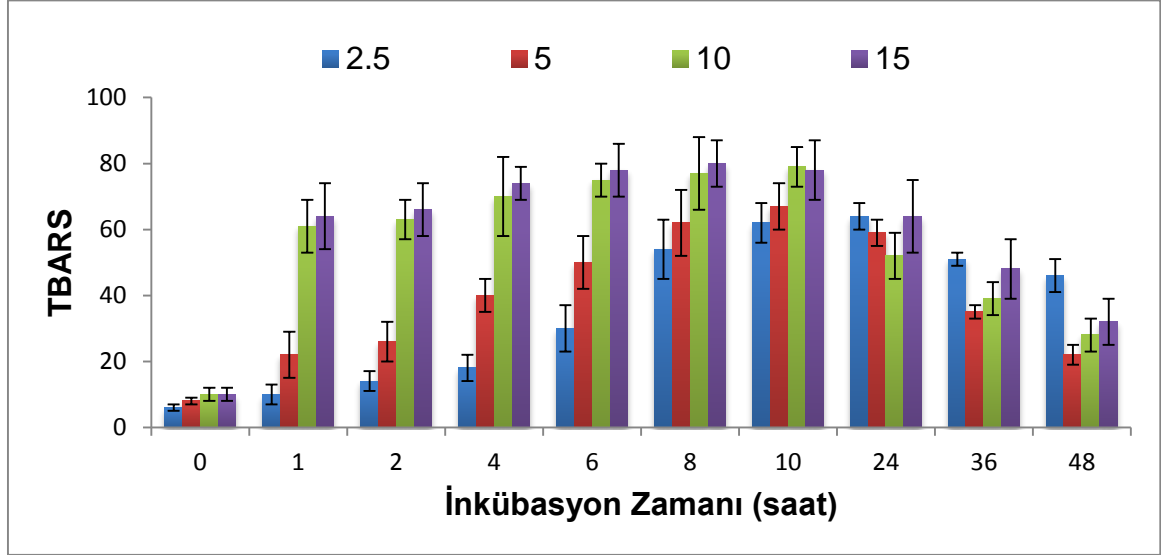
Tüm bu araştırmaları gözönünde bulundurarak tez çalışmasında da *in vitro* LDL oksidasyonu fosfat tampon içerisinde ve $CuSO_4$ kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

CuSO₄'ün, PBS içinde uzun süre kalması sonucu dibe çöktüğü gözlemlendiğinden, bakır çözeltileri hep oksidasyon öncesi hazırlanarak taze kullanılmıştır.

4.3.3. Okside LDL Karakterizasyonu

4.3.3.1. TBARS Analizi ve MDA Tayini

Çalışmaların bu bölümünde değişen Cu²⁺ konsantrasyonunun (0-15 µM) (Tiyobarbütirik asit reaktif türleri) TBARS'lara etkisi incelenmiştir (Şekil 4.44.).



Şekil 4.44. İnkübasyon zamanı ve Bakır iyonu konsantrasyonunun TBARS etkisi (n=4)

Reaksiyon karışımları, 37°C de 48 saat için oksijen varlığında inkübe edilmiştir. Çeşitli zaman aralıklarında, her bir tepkime karışımından numuneler çıkarılıp toplu analiz için -20°C'de saklanmış ve TBARS için çözülmüş ve analiz edilmiştir. Örnekler, okside lipid bileşenini temsil etmektedir. Reaksiyon karışımları mevcut okside olmuş lipidlerin hem lipoprotein hem de lipoproteinden parçalanabilen olanlar ile ilişkilidir.

Elde edilen sonuçlara göre; 2.5 µM bakır iyonu ile gerçekleştirilen çalışmalarda, TBARS değeri ilk saatlerde eğrisel bir şekilde artmış ve 24 saat sonunda en yüksek değerine ulaşmış, daha sonra azalmıştır. 48 saatin sonuna bakıldığında ise en yüksek seviye % 60 dolayında seyretmektedir. 5 µM bakır iyonu da 2.5 µM bakır iyonu gibi ilk saatlerde eğrisel bir artış göstermiştir. 48 saatin sonuna bakıldığında ise en yüksek seviye % 67 olarak hesaplanmıştır. 10 ve 15 µM bakır iyonu konsantrasyonlarında ise 2.5 ve 5 µM bakır iyonu konsantrasyonunun aksine TBARS seviyeleri aniden yükselmiştir ve daha sonra düşmüştür. Ancak,

TBARS düzeyindeki artışın 2.5 ve 5 µM bakır iyonu konsantrasyonlarına göre daha hızlı olduğu; ancak 48 saatin sonunda ise TBARS değerlerinin daha düşük seviyelere gerilediği görülmüştür.

Yagi yaptığı araştırmada 0.1–20 µM bakır iyonu konsantrasyonlarını denemiş ve 0.1 µM bakır iyonu konsantrasyonunda çok yavaş ilerleyen bir oksidasyon gözlemlemiştir. Ancak bunun aksine 20 µM bakır iyonu konsantrasyonunda ise aniden bir artış ve 24 saat ile 48 saat aralıklarında ise düşüş kaydetmiştir. Bu bilgilere göre sunulan çalışmadaki elde edilen veriler literatürü doğrular niteliktedir.

Yapılan çalışmaların devamında standart grafik kullanılarak LDL, ve Cu²⁺ ile okside edilen LDL örneklerinin MDA düzeyleri nmol/ml olarak belirlemiştir. Bu değerler Çizelge 4.5'te gösterildiği gibi lipoproteinlerin protein içeriklerine bölünerek nmol/mg protein olarak ifade edilmiştir (n=4).

Çizelge 4.5. LDL ve okside-LDL örneklerinin MDA Düzeyleri

	LDL (nmol/mg LDL protein)	Okside-LDL (nmol/ mg LDL protein)
Ortalama MDA Düzeyleri	3.9 ± 0.5	52. 4 ± 13.7*

* LDL grubuna göre p< 0.001

Cu²⁺ iyonu aracılığında LDL oksidasyonunun MDA seviyeleri TBARS grafikleri kullanılarak belirlenmiştir. MDA sonuçlarına göre okside-LDL'li örnekler istatistiksel olarak LDL'li örneklere göre anlamlı bir artış göstermiştir. MDA düzeyindeki artış oksidasyona duyarlılığının fazla olduğunu göstermektedir.

Gallou ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada makroanjiopatili Tip 2 Diabetes Mellitus hastalarının LDL'lerinin, vasküler komplikasyonsuz makroanjiopatili Tip 2 Diabetes Mellitus hastalarının ve kontrol grubunun LDL oksidasyonuna duyarlılığını TBARS yöntemiyle analiz etmişler ve makroanjiopatili Tip 2 Diabetes Mellitus hastalarının LDL'lerinin oksidasyona yatkınlıklarının diğer gruplardan daha fazla olduğunu göstermişlerdir [177].

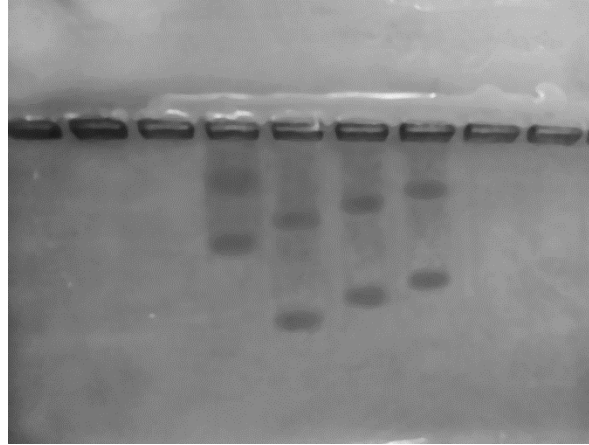
Konukoğlu ve arkadaşları ise, anjiopati komplikasyonu gelişmiş tip 2 diyabetli hastalarda TBARS metoduyla hidrojen peroksitle muamele sonrası, eritrositlerde

gerçekleştirdikleri lipid peroksidasyonu incelemelerinde, anjiopati komplikasyonu gelişmemiş olan gruba göre MDA seviyelerini daha yüksek tespit etmişlerdir [178].

Bir diğer çalışmada, dolaşımdaki yağ değerlerinin okside-LDL etkisine bakılmış ve hastaların değişen yaş grupları ile belirgin tip 1 diyabette karotis IMT ilerlemesi ve artan düzeyleri ile ilişkili kurulmaya çalışılmıştır. Artan yağ konsantrasyonu değerleri MDA ile tespit edilmiş ve LDL düzeyi yüksek tip 1 diyabette karotis IMT ilerlemesi üzerinde büyük bir etkiye sahip olduğu açıkça görülmüştür [179].

4.3.3.2. Göreceli Lipid Elektroforetik Mobilitesi

Lipid ve okside LDL partiküllerin hem protein bileşenleri hem de lipid değişiklikleri jel elektroforezi ile değerlendirilmiştir. Oksitlenmiş LDL elektroforetik göçü sodyum barbital tamponunda agaroz jel elektroforezi ile belirlenmiştir. Lipoproteinler Sudan Siyah B ile boyanarak görüntülenmiştir. Elektroforez görüntüsünden de anlaşılacağı gibi okside LDL'nin oksidasyon derecesine göre LDL'ye göre daha fazla elektroforetik mobiliteye sahip olup bu fazlalık, oksidasyon derecesi arttıkça büyümektedir (Şekil 4.45). Tez çalışması sonucunda LDL ve okside-LDL'nin literatüre göre uygun/doğru yerlerde bantlar oluşturduğu gözlenmiştir [117]. Okside-LDL bandının normal LDL bandından daha uzakta belirlenmesi oksidasyonun da gerçekleştiğinin bir göstergesidir.



Şekil 4.45. (Soldan Sağa Doğru) LDL, okside LDL (24 saat inkübasyon), okside LDL (12 saat inkübasyon), okside LDL (18 saat inkübasyon) örneklerinin göreceli elektroforetik hareketliği

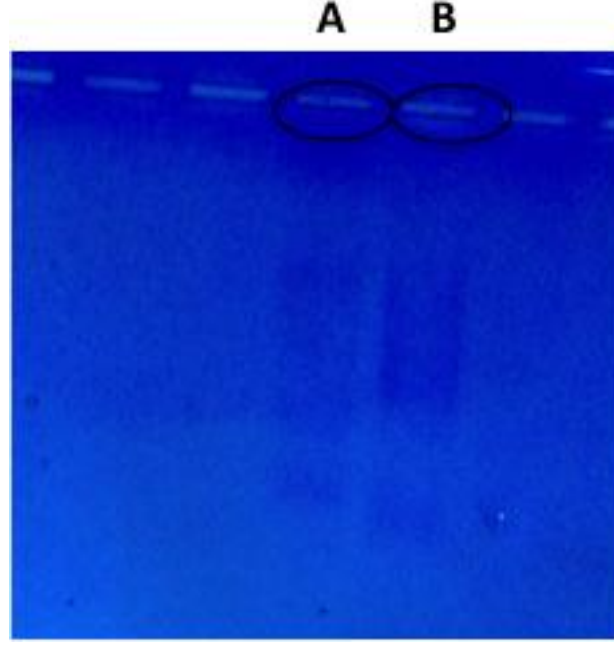
Elde edilen elektroforez sonucuna göre, LDL örneklerinin göreceli elektroforetik mobilite (REM) değeri 2 mm olarak bulunmuştur. 12,18, ve 24 saat bakır sülfat çözeltisi ile okside edilen LDL örneklerinin göreceli elektroforetik mobilite (REM) değerleri sırası ile 3.4, 3.5 ve 3.7 m (REM) olarak bulunmuştur. Literatürde de benzer sonuçlar gözlenmektedir [180].

Elektroforez yöntemiyle yağın hem saf olup olmadığını hem de oksidasyonun gerçekleşip gerçekleşmediği hakkında bilgi edinilebilmektedir. Noble 1968 yılında yaptığı çalışmada plazma lipoproteinlerinin agaroz jel içerisinde elektroforetik ayrılmasını hedeflemiştir. Bu çalışmada çeşitli yağ boyaları örneğin Fat red 7, oil red o, sudan kırmızısı ve siyahı boyaları kullanılarak lipidlerin yürütüldüğü agaroz jel görüntülenmeye çalışılmıştır. Bu boyaların dışında azot bazlı düşük molekül ağırlıklı boyalar da kullanılmış ancak herhangi bir sonuç elde edilemediğinden, bu boyalardan da sudan kırmızısının lipid boyaması için en uygun nitelikte olduğu tespit edilmiştir [181]. Sudan kırmızı boyamasının diğer boyalara göre lipidlerle daha çok kimyasal etkileşime girdiği gösterilmiştir.

Ichikawa ve arkadaşları yaptıkları çalışmada kolesterol diyet ile besledikleri tavşan ve normal yem ile beslenen tavşanların kanlarından plazmaları toplanmış ve karşılaştırılmıştır. Elde edilen plazmalar % 1 agaroz jeli üzerinde elektroforez edilmiştir. Kolesterolce zengin diyetle beslenen tavşanların plazmalarındaki yağ oranlarının arttığı hatta bazı durumlarda normal yağdan farklı olduğunu yağ kırmızısı 7B ile boyayarak göstermişlerdir [182].

4.3.3.3. Apo B fragmentasyonu için SDS–Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

LDL ve okside-LDL örnekleri % 10 SDS-PAGE de yürütülerek coomassie mavi ile görüntülenmiştir. Elde edilen elektroforez görüntüsü Şekil 4.46' da gösterildiği gibidir.



Şekil 4.46. LDL (A) ve okside LDL'nin (B) Apo B fragmentasyonu

Çalışmamızda, LDL örnekleri ile okside-LDL örnekleri karşılaştırıldığında, LDL örneklerinin daha az Apo B içerdiği gözlenmiştir. Yani oksidasyon ne kadar artarsa Apo B konsantrasyonunun da doğrusal olarak arttığı gözlenmiştir.

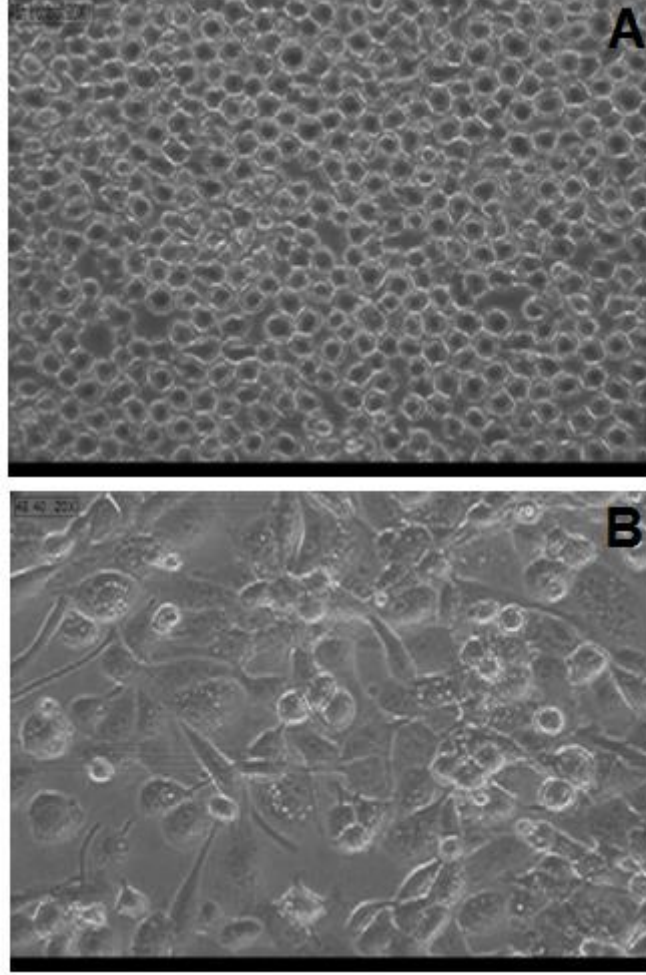
Thilakarathna ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada kuarsetinin LDL oksidasyonuna etkisine bakılmıştır. Oksidasyonun Apo B fragmentasyonundaki değişime SDS-PAGE yapılarak karar verilmiştir. Elektroforez sonucuna göre kuarsetinin yüksek konsantrasyonlarda (10-100 mg/L) kullanıldığında daha az Apo B konsantrasyonu elde edilmiş ve kuarsetinin LDL oksidasyonunu inhibe ettiği gözlenmiştir [183].

Diğer bir çalışmada ise, Clerodendron glandulosum özü varlığında veya yokluğunda Okside-LDL'nin ApoB parçalanmasına ve elektroforetik etkisine bakılmıştır. Clerodendron glandulosum özü ortak varlığı önemli ölçüde okside-LDL kaynaklı Apo B parçalanmasını engellediği gözlenmiştir [180].

4.3.4. İnsan Monositinden Makrofaj Farklılaştırılması

4.3.4.1. İnsan Monositinden Makrofaj Farklılaştırılmasının Morfolojik İncelemesi

Uyarılmamış THP-1 ve MQ hücrelerinin faz kontrast görüntüleri sırasıyla Şekil 4.47. A ve B sırasıyla gösterilmektedir.

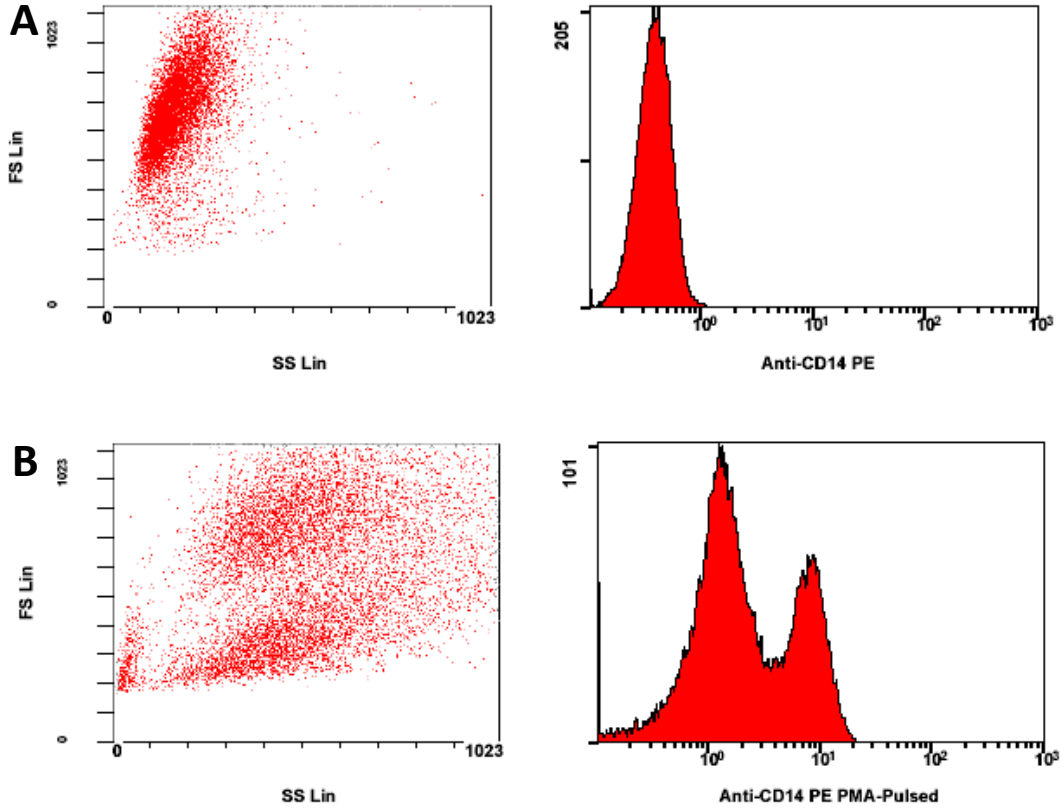


Şekil 4.47. (A) Normal THP-1 insan monosit hücreleri; (B) Makrofaja dönüşmüş hücreler

Yuvarlak hatlara sahip monosit hücreleri PMA ile uyarılınca oluşan makrofaj hücrelerinde hücre uzamaları gözlenmiştir. Ayrıca çekirdek/sitoplazma oranında artış, sitoplazma görüntüsünün parlaklığında azalma ve belirgin granüller oluştuğu saptanmıştır. Vakuolleşmenin farklılaşmış hücrelerin sitoplazması içinde mevcut olduğu belirlenmiştir.

4.3.4.2. THP-1 Monosit Hücrelerinin Makrofaja Dönüştürülmesi, Akış sitometrik Histogramlar Ve Değerlendirmeleri

THP-1 monosit hücrelerinde CD14 ifade seviyeleri, hem stimüle (monositler) hemde (Phorbol myristate acetate) PMA ile uyarılan (makrofajlar) hücrelerde akış sitometri ile değerlendirilmiştir (Şekil 4. 48).

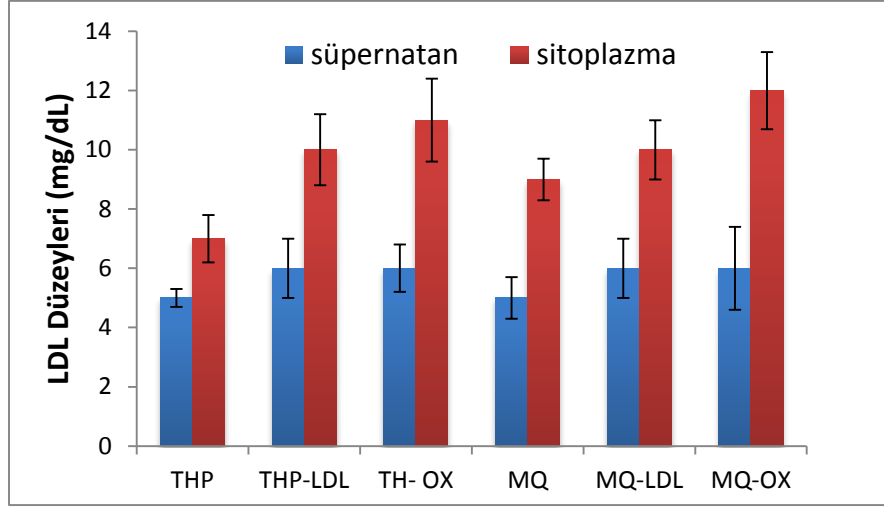


Şekil 4.48. (A) Naiv (Farklılaşmamış) ve (B) PMA ile uyarılarak farklılaşmış THP-1 hücrelerinin CD14 ifadeleri

Farklılaşmamış THP-1 hücreleri üzerinde CD14 ifadesinin düşük olduğu; ancak 2 gün süre ile PMA ile uyarılan (makrofaja dönüştürülen) hücrelerde ise önemli ölçüde artış olduğu gözlemlenmiştir [119].

4.3.5. Köpük Hücre Oluşumu ve Karakterizasyonu

Elde edilen köpük hücrelerin lipid profilleri karşılaştırılarak hücreye lipid alımı karakterize edilmiştir.

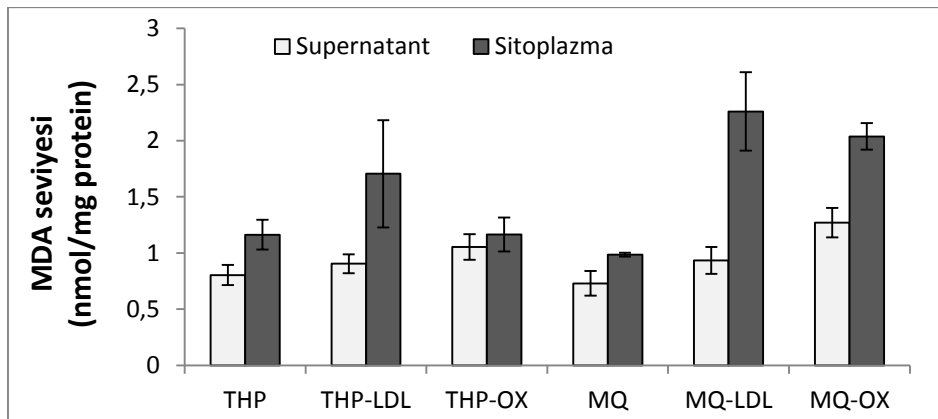


Şekil 4.49. Lipid Profilleri

Elde edilen lipid profillerine göre, eklenen LDL ve okside-LDL değerine bağlı olarak sitoplazmada biriken LDL düzeyinin artmasıyla LDL ve okside-LDL'nin hücrelerin içerisine alındığı saptanmıştır. Ayrıca eklenen LDL ve okside-LDL değerine bağlı olarak süpernatana göre sitoplazmadaki LDL düzeyinde artış gözlenmiştir.

4.3.5.1. Köpük Hücre Süpernatant ve Sitoplazma MDA Seviyeleri

LDL ve okside-LDL ile etkileştirilmiş THP-1 ve makrofajların süpernatant ve sitoplazma MDA seviyeleri Şekil 4.50'de verilmiştir. Test üç tekrarlı çalışılmış (n=3) ve sonuçlar ortalama değer \pm standart sapma şeklinde verilmiştir.



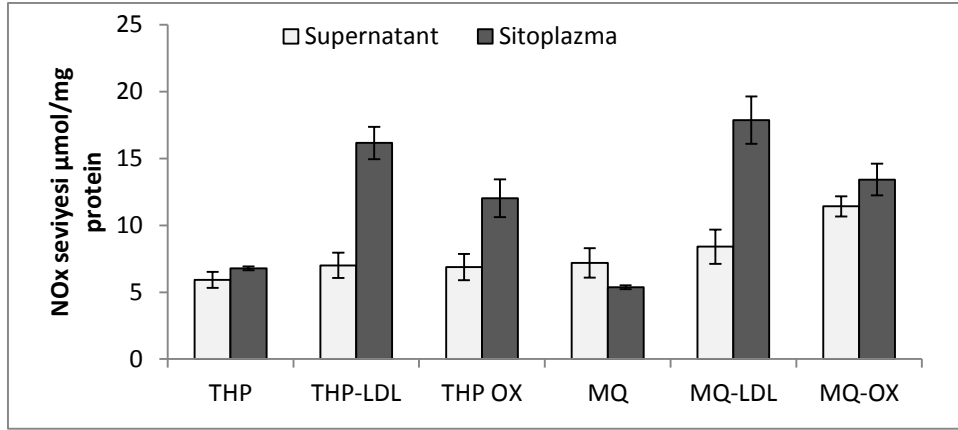
Şekil 4.50. LDL ve okside-LDL ile etkileştirilmiş THP-1 ve makrofajların süpernatant ve sitoplazma MDA seviyeleri

MDA seviyeleri incelendiğinde sitoplazma değerinin supernatant değerlerine göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. THP-1 ve makrofaj hücrelerinin MDA seviyeleri

karşılaştırıldığında ise LDL ile okside edilen hücrelerin hem süpernatant hem de sitoplazma değerlerinin diğer gruplara göre daha yüksek olduğu saptanmıştır.

4.3.5.2. Köpük Hücre Süpernatant ve Sitoplazma NOx Seviyesi

LDL ve okside-LDL ile etkileştirilmiş THP-1 ve makrofajların süpernatant ve sitoplazma NOx seviyeleri Şekil 4.51'de belirlenmiştir. Test üç tekrarlı çalışılmıştır (n=3). Sonuçlar ortalama değer \pm standart sapma şeklinde verilmiştir.

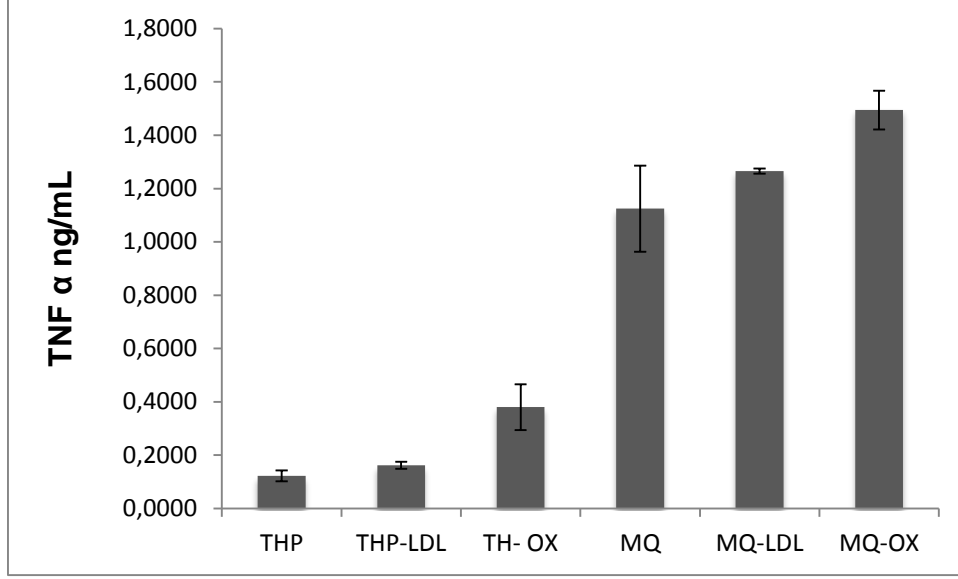


Şekil 4.51. LDL ve okside-LDL ile etkileştirilmiş THP-1 ve makrofajların süpernatant ve sitoplazma NOx seviyeleri

NOx seviyeleri incelendiğinde sitoplazma değerinin süpernatant değerlerine göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. THP-1 ve makrofaj hücrelerinin NOx seviyeleri karşılaştırıldığında ise LDL ile okside edilen hücrelerin hem süpernatant hem de sitoplazma değerlerinin diğer gruplara göre daha yüksek olduğu saptanmıştır.

4.3.5.3. Köpük Hücre Süpernatant Sitokin Seviyeleri

Kültür ortamına eklenen LDL ve okside-LDL, THP-1 ve makrofaj hücrelerinin süpernatantlarının TNF- α , IL-10 ve midkin seviyeleri aşağıdaki grafiklerde gösterilmiştir. Testler iki tekrarlı çalışılmıştır (n=2). Sonuçlar ortalama değer \pm standart sapma şeklinde verilmiştir.



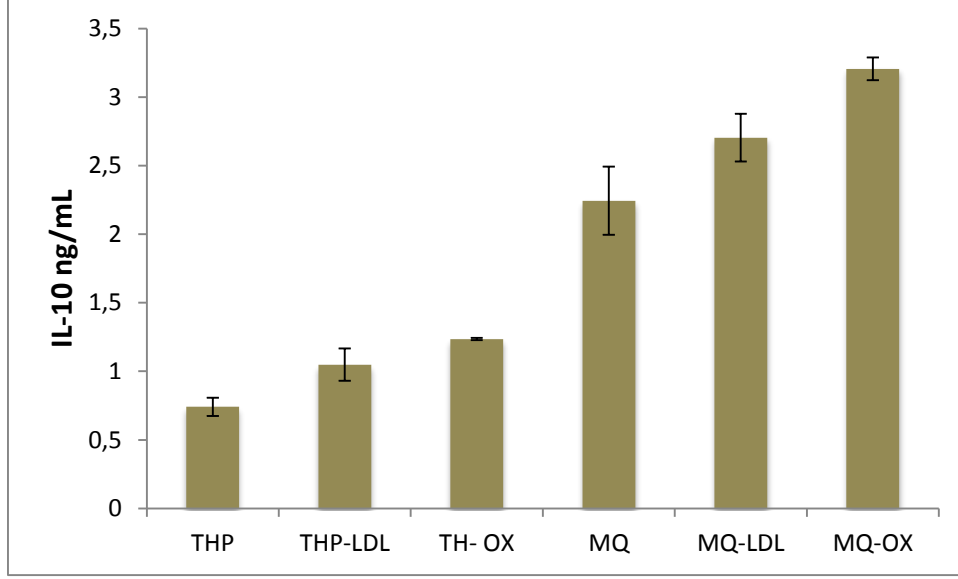
Şekil 4.52. LDL ve okside-LDL ile etkileştirilmiş THP-1 ve makrofaj hücrelerinin TNF- α salgılanması üzerine etkisi

LDL ve okside-LDL eklenmesiyle tümör nekrotizan faktör (TNF- α) salgısının arttığı gözlenmiştir. MacEwan yaptığı çalışmada, aktive olan monositler ve makrofaj TNF endojen sentezinin ana kaynağı olduğunu rapor etmiştir. Hücre tipi ve koşullarına bağlı olarak, TNF- α nekrotik ve apoptotik hücre ölümüne neden olduğunu göstermiştir [184].

Bir diğer çalışmada ise, okside- LDL ile meydana gelmiş immün komplekslerin, makrofajların köpük hücreye dönüşümünü sağladığı ve makrofajlardan proinflamatuvar medyatörlerin salgısına sebep olduğu gözlenmiştir. Böylelikle THP-1 insan monosit hücrelerinden TNF- α salgısını arttırdığını belirlemişlerdir [185].

Literatürde yapılan çalışmalara göre, TNF- α , monositler ve makrofajlardan IL-1, IL-6 ve, IL-8 gibi çeşitli sitokinlerin salgılanmasına neden olduğu gözlenmiştir [186]. IL-6, monosit/ makrofaj stimülasyonunun önemli bir ürünü olmasına rağmen, IL-1 p ve TNF- α üretimini inhibe ettiğini kanıtlayan çalışmalar vardır.

Literatürdeki sonuçlar gözönünde bulundurularak, farklılaşmamış ve farklılaşmış hücrelerin, TNF salgılarındaki gözlenen artışı açıklamamıza yardımcı olmaktadır. Jin ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, makrofajların fazla aktivasyonu, TNF- α ve IL-6 gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin fazla üretimi nedeniyle, hücrelerde hasara neden olduğunu göstermişlerdir [187].



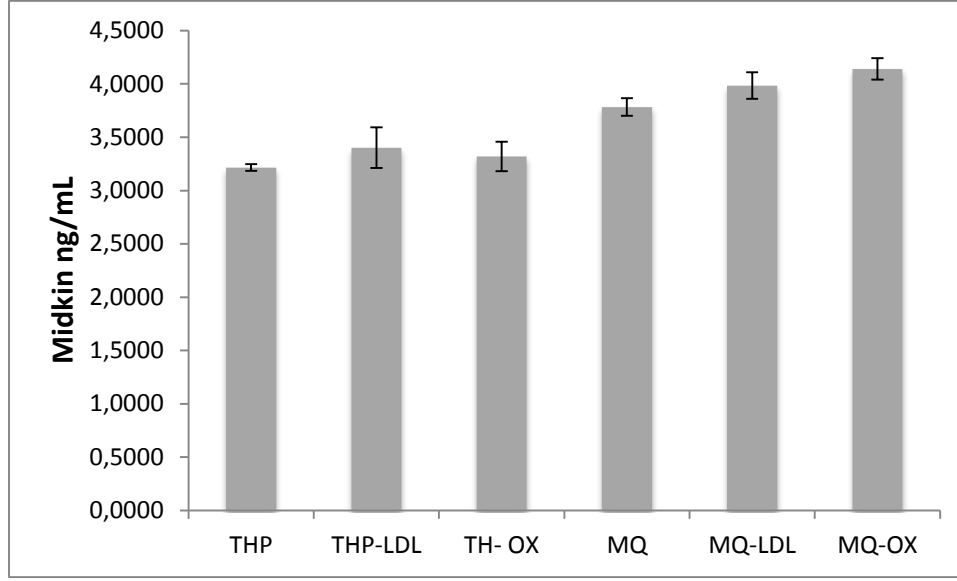
Şekil 4.53. LDL ve okside-LDL ile etkileştirilmiş THP-1 ve makrofaj hücrelerinin IL-10 salgılanması üzerine etkisi

Hem THP-1 hücrelerine hem de makrofaj hücrelerine LDL ve okside-LDL eklenmesiyle IL-10 salgınının arttığı gözlenmiştir.

Yakın zamanda interlökin-10 (IL-10) makrofaj kolesterol emilimini ve akışını güçlendirerek, lipid metabolizmasını modüle ettiğini gösteren çalışmalar mevcuttur.

IL-10 özellikle makrofajlar tarafından aterosklerotik lezyon bölgelerinde ağırlıklı olarak üretilmektedir. IL-10, hem makrofajlar ve T hücreleri hem de lokal enflamatuvar yanıtın modülasyonunda önemli bir rol oynayabildiği yapılan çalışmalarda gözlenmiştir. Bu çalışmada da makrofaj hücrelerinin THP-1 hücrelerine kıyasla IL-10 seviyelerinin oldukça yüksek olduğu gözlenmiştir. Elde ettiğimiz sonuç literatürle uygunluk göstermektedir [188].

Okside-LDL ile etkileştirilen hücre gruplarında, IL-10 ve TNF- α düzeylerinde, THP-1 ve makrofaj hücrelerine göre yüksek bir artış saptanırken, özellikle makrofaj hücreleri ile etkileştirilen okside-LDL grupları IL-10 ve TNF- α sitokinlerin salgılarının oldukça yüksek değerlerde olduğu belirlenmiştir.



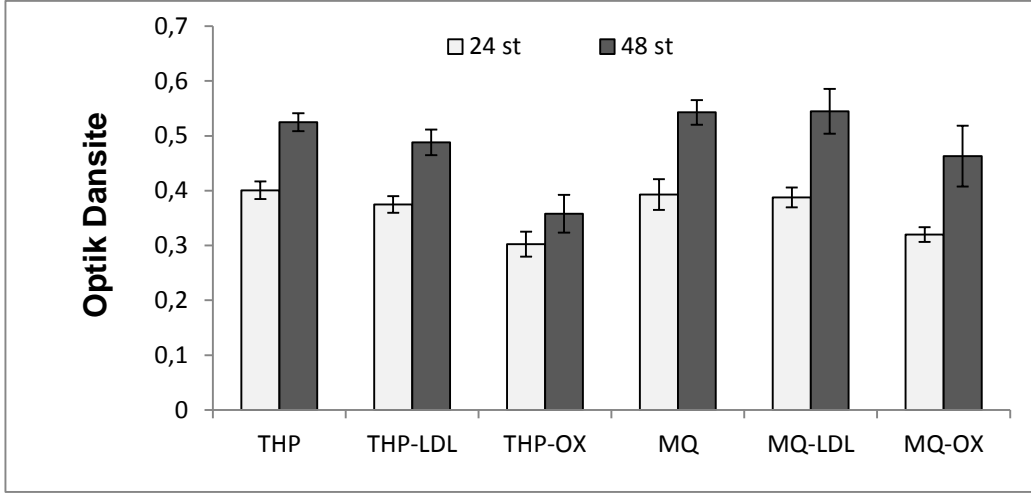
Şekil 4.54. LDL ve okside-LDL ile etkileştirilmiş THP-1 ve makrofaj hücrelerinin midkin salgılanması üzerine etkisi

LDL ve okside-LDL ile inkübe edilen THP-1 ve makrofaj hücrelerinin deneyler sonucunda midkin salgıladıkları görülmektedir. LDL ve okside-LDL etkileştirilen THP-1 hücrelerinin midkin seviyelerinde bir değişiklik gözlenmezken, THP-1 monosit hücrelerinden farklılaştırılan makrofaj hücrelerin de doğrusal bir artış gözlenmektedir. Midkin salgılanmasının PMA-kaynaklı hücrelerde daha belirgin olduğu görülmüştür.

Monosit hücrelerinin midkin salgılama fonksiyonu bir *in vitro* hücre kültürü modeli ile teyit edilmiştir [189]. Elde ettiğimiz sonuçlar bu çalışmayla örtüşmektedir. Midkin etkileri enflamatuvar koşullarının patojenezinde kritik rol üstlendiği ilgili literatürde de gösterilmektedir.

4.3.6. Köpük Hücre Sitotoksisite Çalışmaları

LDL ve okside-LDL ile etkileştirilmiş THP-1 insan monosit hücrelerinin ve farklılaştırılan makrofajların 24 ve 48 saatlik hücre proliferasyonları belirlenmiştir (Şekil 4. 55.). Test yedi tekrarlı çalışılmıştır (n=7). Oksitlenmemiş THP ve makrofaj hücrelerinin 24 ve 48 saatlik hücre proliferasyon değerleri kontrol olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.55. LDL ve Okside-LDL etkileştirilen THP-1 ve makrofaj hücrelerinin hücre proliferasyon sonuçları (Grup başına zamana bağlı hücre sayısı grafikte gösterilmiştir. Sonuçlar ortalama değer \pm standart sapma şeklinde verilmiştir.)

Hücre proliferasyon sonuçlarına göre, THP-1 hücrelerine PMA uygulanarak makrofajlara farklılaştırılmasının herhangi bir sitotoksik etki gözlenmemiştir. Her iki hücre grubunun LDL ile etkileştirilmesi sonucunda herhangi bir sitotoksik etki göstermezken, okside-LDL ile etkileştirilen hücre gruplarında sitotoksik etki yarattığı görülmüştür.

Birinci ve ikinci gün, THP-1 kontrol gruplarına göre, LDL ile etkileştirilmiş THP-1 hücrelerinin formazan absorbanslarında azalma görülmüştür; fakat bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0.05$). Bununla birlikte birinci ve ikinci gün yapılan çalışmalara göre okside LDL ile etkileşen hücrelerin absorbanslarında anlamlı bir azalma saptanmıştır ($p < 0.05$). Makrofajlarda ise birinci gün yapılan çalışmaya göre LDL ve okside LDL ile etkileştirilen hücreler ile kontrol çalışması aralarında anlamlı bir fark görülmemiştir ($p < 0.05$).

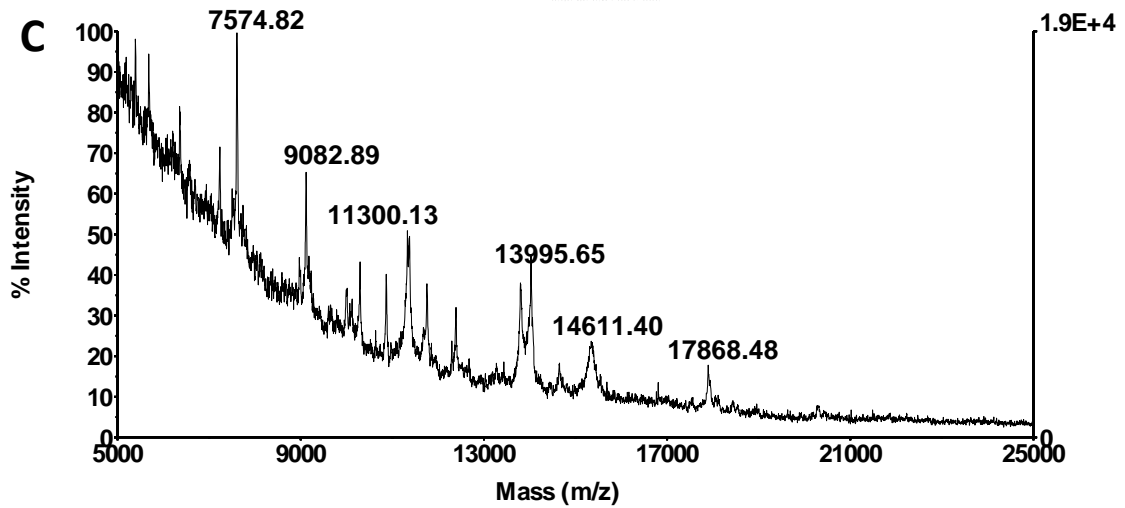
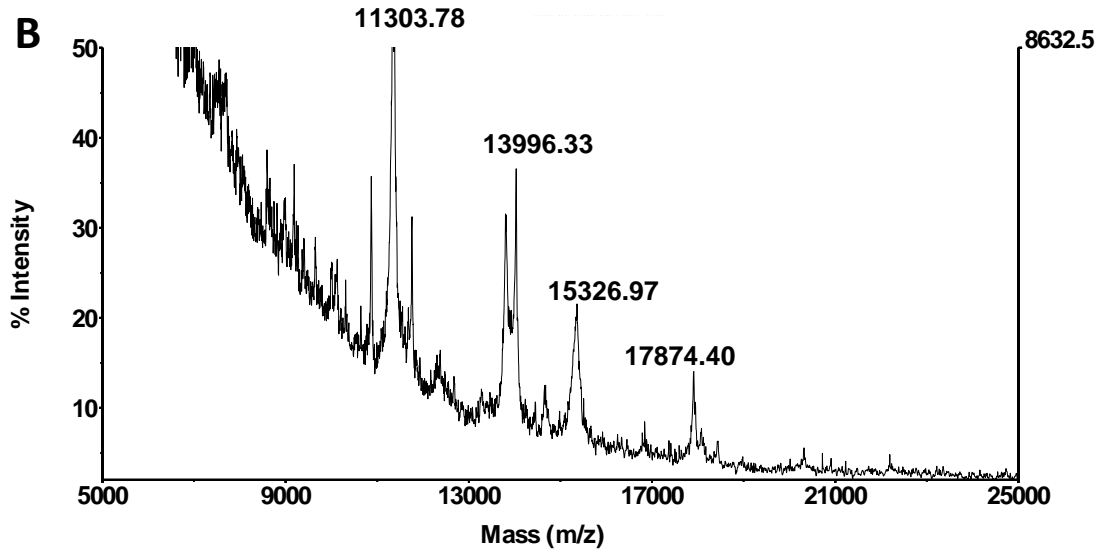
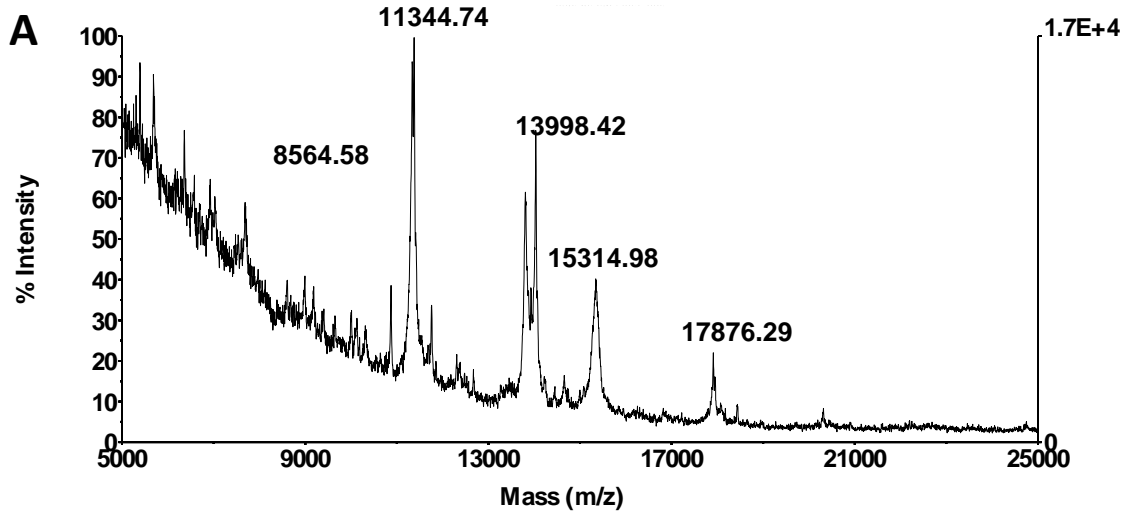
İkinci gün yapılan çalışmalara göre, LDL etkileştirilen THP-1 hücrelerinin absorbansları anlamlı bir azalma saptanmamışken ($p > 0.05$), okside LDL ile etkileştirilen hücrelerin absorbanslarında anlamlı bir azalma belirlenmiştir ($p < 0.05$). LDL ile etkileştirilen makrofajlar ile kontrol absorbansları arasında anlamlı bir fark görülmemiştir ($p > 0.05$). Bununla birlikte okside LDL ile etkileştirilen makrofajların birinci gün absorbansı ile kontrol çalışması arasında fark görülmezken, ikinci gün absorbanslarında anlamlı bir düşüş saptanmıştır ($p < 0.05$).

4.3.7. MALDI-ToF Sonuçları

Yapılan deneyler sonucunda elde edilen THP-1 insan monosit hücrelerinin membran proteinlerine ait MALDI-MS kütle spektrumunda, 11374.74, 13998.42, 15341.98 ve 17878.29 m/z değerlerinde yüksek Şiddetli sinyaller gözlenmiştir (Şekil 4.56.A).

LDL ile etkileştirilen THP-1 insan monosit hücrelerinin kütle spektrumunda ise 11303.78, 13996.33, 15326.97, 17876.40 m/z değerlerinde yüksek Şiddetli sinyaller gözlenmiştir (Şekil 4.56.B). Aynı proteinler, THP-1 insan monosit hücrelerine ait kütle spektrumunda da gözlenmektedir. Ancak bu örneğin kütle spektrumunda gözlenen sinyallerin Őiddetlerinde artış olduğu tespit edilmiştir. Bunların yanı sıra 8564.58 m/z sinyali, THP-1 insan monosit hücrelerin kütle spektrumunda gözlenmeyip, sadece LDL ile etkileştirilen monosit hücrelerin spektrumunda gözlenmektedir. Bu farklılığın LDL'nin THP-1 monosit hücrelerinin yapısında meydana gelen deęiŐikliklerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Okside-LDL ile etkileştirilmiş THP-1 monosit hücrelerinin kütle spektrumu, THP-1 ve LDL ile etkileştirilen THP-1 insan monosit hücrelerinin kütle spektrumları ile karşılaştırıldığında bu spektrumda diğerlerinden farklı m/z değerlerinde sinyaller gözlendiği belirlenmiştir. Elde edilen kütle spektrumunda diğerlerinden farklı olarak 7574.82, 9082.89, 14611.40 m/z değerlerinde sinyaller gözlenmektedir (Şekil 4.56.C). Bunun yanı sıra üç farklı örneğe ait kütle spektrumlarında aynı proteinlere ait sinyaller gözlenmiştir. Bu bulgular ıŐıęında okside-LDL ile etkileştirilen THP-1 monosit hücrelerinin yapısal farklılıklar gösterdiği düşünülmektedir. Bu durum, LDL ve okside-LDL ile etkileştirilen THP-1 insan monosit hücrelerinin membran yüzeylerinde farklı türlerin oluştuğunun veya türlerin değişikliğe uğradığının bir göstergesidir.



Şekil 4.56. Membran proteinlerinin MALDI-MS spektrumları. (A) THP-1 insan monosit hücresi, (B) LDL ile etkileştirilmiş THP-1 insan monosit hücresi ve (C) okside-LDL ile etkileştirilmiş THP-1 insan monosit hücresi.

Makrofaj hücrelerinin membran proteinlerine ait MALDI-MS kütle spektrumunda (Şekil 4.56), 11294.85, 13998.32, 15316.51 ve 17866.10 m/z değerlerinde yüksek şiddetli sinyaller gözlenmektedir (Şekil 4.57.A).

LDL ile etkileştirilen makrofaj hücrelerinin izole edilen membranlarına ait kütle spektrumunda ise 11297.17, 13995.11, 15322.58, m/z değerlerinde yüksek şiddetli sinyaller gözlenmiştir (Şekil 4.57.B). Söz konusu sinyaller, makrofaj hücre membranına ait kütle spektrumunda da gözlenmektedir. Ancak bu sinyaller, her iki örneğe ait kütle spektrumlarında yaklaşık olarak aynı m/z değerlerinde elde edilse de, LDL ile etkileştirilen makrofaj hücrelerinin izole edilen membranlarına ait kütle spektrumunda sinyal şiddetlerinin daha yüksek olduğu görülmektedir. LDL etkileşiminden sonra, makrofaj hücrelerinin izole edilen membranlarına ait kütle spektrumunda 17866.10 m/z değerlerinde gözlenmekte olan sinyalin kaybolduğu tespit edilmiştir.

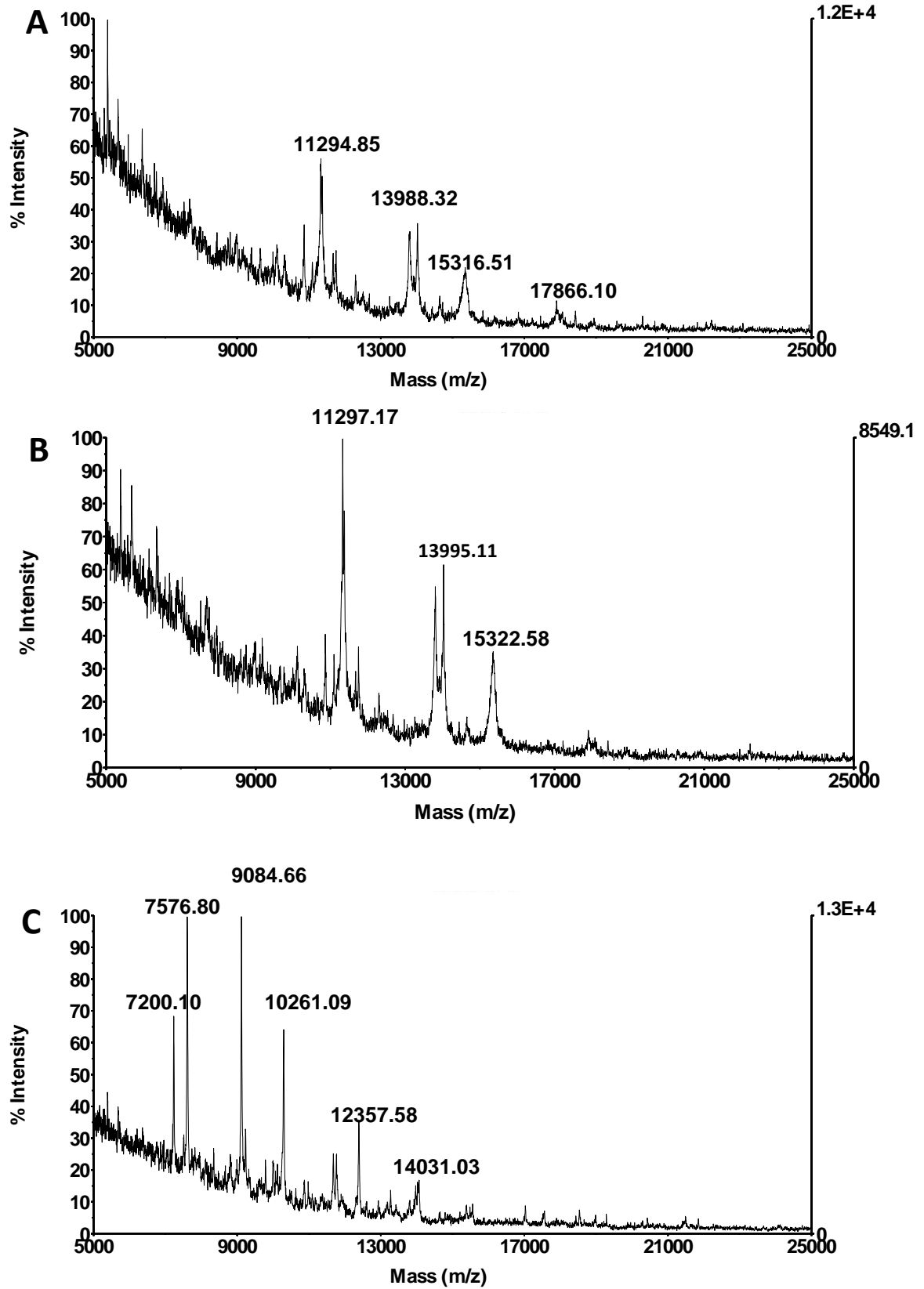
Okside-LDL ile etkileştirilen makrofaj hücrelerinin izole edilen membranlarının kütle spektrumu, makrofaj ve LDL ile etkileştirilen makrofaj örneklerinin kütle spektrumlarından tamamen farklılık göstermektedir. Okside-LDL ile etkileştirilen makrofaj hücrelerinin izole edilen membranlarına ait kütle spektrumunda özellikle düşük molekül aralığı bölgesinde yüksek şiddetli sinyaller gözlenmiştir. Bu spektrumda 7200.10, 7576.60, 9084.66, 10261.09, 12357.58, 14031.03 m/z değerlerindeki sinyaller bulunmaktadır (Şekil 4.57.C). Makrofaj ve LDL ile etkileştirilen makrofaj örneklerine ait kütle spektrumlarında ortak olarak gözlenen sinyallerin okside-LDL ile etkileştirilen örneğe ait kütle spektrumunda bulunmadığı gözlenmiştir. Tez çalışmasının köpük hücre oluşumu ile ilgili bölümünde makrofaj hücrelerinin okside-LDL partiküllerini içerisine almasıyla köpük hücrelerinin oluştuğu gösterilmiştir. MALDI-MS sistemi ile gerçekleştirilen analizler sonucunda elde edilen veriler değerlendirildiğinde okside-LDL ile etkileştirilen makrofaj hücrelerinin yapılarında değişikliklerin meydana geldiği ifade edilebilmektedir. Bu sonuçlar, oluşan köpük hücre yapılarının makrofaj hücrelerinden farklı olduklarının bir göstergesi olarak kabul edilebilir.

THP-1 monosit hücre membranı ve makrofaj hücre membranına ait kütle spektrumları karşılaştırıldığında ise THP-1 monosit hücrelerine ait kütle spektrumunda elde edilen sinyallerin sinyal/gürültü oranının daha düşük olduğu gözlenmektedir. Ayrıca her iki kütle spektrumunda yaklaşık aynı m/z değerlerinde

sinyaller elde edilmiştir. Makrofaj hücre membranına ait kütle spektrumunda sinyallerin şiddetlerinin düşük olduğu gözlenmektedir. MALDI-MS sistemi ile elde edilen veriler, THP-1 hücrelerinin PMA ile etkileştirilmeleri sonucunda makrofaj hücrelerine farklılaştıklarını göstermektedir. Elde edilen bu sonuçlarla birlikte yapıya uygulanan bu işlemin yapıda az da olsa farklılıklara neden olduğu düşünülmektedir.

LDL ile etkileştirilen THP-1 monosit hücrelerinin membranları ve LDL ile etkileştirilen makrofaj hücre membranlarına ait kütle spektrumları karşılaştırıldığında her iki kütle spektrumunda elde edilen sinyallerin m/z değerlerinde farklılık gözlenmemektedir. LDL ile etkileştirilen THP-1 monosit hücrelerinin membranlarına ait spektrumunda gözlenen 8564.58 m/z sinyalinin LDL-makrofaj örneğine ait kütle spektrumunda gözlenmediği belirlenmiştir.

Okside-LDL ile etkileştirilen THP-1 monosit ve makrofaj membranlarının kütle spektrumlarında aynı m/z değerlerinde sinyaller gözlense de, okside-LDL ile etkileştirilen makrofaj membranı örneğine ait kütle spektrumundaki sinyallerin şiddetlerinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. MALDI-MS sistemi ile elde edilen veriler değerlendirildiğinde okside-LDL ile etkileştirilen makrofaj hücrelerinin izole edilen membranlarının kütle spektrumunun diğer tüm örnek gruplarının spektrumlarına göre farklılık gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 4.57. Membran proteinlerinin MALDI-MS spektrumları. (A) Makrofaj hücresi, (B) LDL ile etkileştirilmiş Makrofaj hücresi ve (C) okside-LDL ile etkileştirilmiş Makrofaj hücresi.

Ouedraogo ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, IFN- γ and IL-4 sitokinleri kullanılarak makrofaj hücreleri 18 saat süre ile stimüle edilmiştir. Söz konusu indükleyici ajanlar ile M1 ve M2 makrofaj kutuplaşması, MALDI-ToF-MS sistemi kullanılarak 2-12 KDa aralığında elde edilen kütle spektrumlarıyla belirlenmiştir. Bu çalışmada uyarılmamış ve uyarılmış makrofajların kütle spektrumlarının birbirlerinden tamamıyla farklı oldukları belirtilmiştir. Tez çalışmasında elde edilen LDL ve okside-LDL'ye maruz bırakılan monosit ve makrofaj hücrelerine ait kütle spektrumlarının söz konusu çalışmanın sonuçları ile uyumluluk gösterdiği görülmektedir [190].

MALDI-ToF-MS sistemi, tüm hücre örneklerindeki bakteri türlerinin tespit edilmesi çalışmalarında kullanılmaktadır. Son yıllarda yapılan proteomiks uygulamalarında da iki boyutlu elektroforetik sistemlerle beraber kullanılmaktadır. Slomianny ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, monosit ve makrofaj hücreleri kullanılmıştır. Bu çalışmada monosit ve makrofaj hücrelerinin membran izolasyonu için deterjan ağırlıklı izolasyon yöntemi uygulanmıştır. Bu nedenle membran izolasyon basamağından sonra MALDI-ToF-MS analizleri sırasında karşılaşılabilecek olumsuz etkilerin önlenmesi amacıyla çeşitli saflaştırma işlemleri uygulanarak membran içindeki fazla deterjan yapıları uzaklaştırılmaya çalışılmıştır. Yapılan iki boyutlu elektroforez işleminden sonra yürütülen jeller kesilerek kesitlerde bulunan proteinler jel içerisinde enzimatik olarak parçalanmıştır. Enzimatik parçalama işlemi sonrasında elde edilen peptit birimleri, MALDI-ToF-MS sistemiyle tayin edilerek insan makrofajlarının membran proteinlerinin profilleri belirlenmiştir [191].

4.3.8. ESI-qToF-MS/MS Sonuçları

Literatürde yapılan bazı araştırmalara göre protein tanımlanmasının türlerin sadece moleküler ağırlıklarının belirlenmesiyle gerçekleştirildiği ifade edilmektedir. Ancak son yıllarda yapılan araştırmalarda, yalnızca protein birimlerinin moleküler ağırlıklarının belirlenmesinin, protein tanımlanmasında yetersiz olduğu belirtilmektedir. Kesin protein tanımlanması, proteinin enzimatik olarak parçalanmasının ardından elde edilen peptit birimlerinin amino asit dizilimlerinin doğru bir şekilde belirlenmesi ile gerçekleştirilebilmektedir. Elektrosprey iyonlaştırma (Electrospray ionization, ESI) tekniği ile birlikte tandem (MS/MS) kütle spektrometrisi bir arada kullanılarak, peptit birimlerinin amino asit dizilimleri belirlenebilmektedir. Örnek içerisinde tayin edilen peptit birimlerinin ve bu peptit

birimlerinin amino asit dizilimlerinin, protein veritabanı ile karşılaştırılması ile protein tanımlama sonuçları elde edilmektedir. Bunun için Mascot gibi yazılımlar kullanılarak, her protein dizilimi hakkındaki detaylı bilgi elde edilebilmektedir.

Membran izolasyonundan sonra elde edilen örnek grupları; THP-1(T), T-LDL, T-oksidede-LDL, makrofaj (MQ), MQ-LDL ve MQ- oksidede-LDL, tripsin enzimi ile proteolitik parçalama işlemine maruz bırakılarak peptit birimlerine ayrılmıştır. Enzimatik parçalama işlemi sonucunda elde edilen peptit birimleri ESI-qToF kütle spektrometresi kullanılarak analiz edilmiştir. Analizler sonucunda elde edilen kütle spektrometrik veriler, Mascot yazılımı kullanılarak değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.6' da verilmektedir.

Çizelge 4.6. ESI-qToF-MS/MS Sistemiyle Tanımlanabilen Membran Proteinleri

ÖRNEK GRUBU	TANIMLANABİLEN PROTEİNLER
THP-1(T)	Histon H2tip 1B (<i>H2A1B/Homo Sapien</i>)
T-LDL	Histon H2tip 1B (<i>H2A1B/Homo Sapien</i>)
T-OKSİDE-LDL	Histon H2tip 1B (<i>H2A1B/Homo Sapien</i>) ADAM metallopeptidase domain 19 (<i>ADAM19/Homo sapiens</i>)
MAKROFAJ(MQ)	Histon H2tip 1B (<i>H2A1B/Homo Sapien</i>) Trans Membran 9 Superfamily member 1 (<i>TM9S1/Homo sapiens</i>)
MQ-LDL	Histon H2tip 1B (<i>H2A1B/Homo Sapien</i>) Trans Membran 9 Superfamily member 1 (<i>TM9S1/Homo sapiens</i>)
MQ-OKSİDE-LDL	Histon H2tip 1B (<i>H2A1B/Homo Sapien</i>) ADAM metallopeptidase domain 19 (<i>ADAM19/Homo sapiens</i>)

	Histon H2tip 2A (H2A2A/Homo Sapien) Trans Membran 9 Superfamily member 1(TM9S1/Homo sapiens) Adenin Fosforibosil transfer (APRT)
--	---

Çizelge 4.6'da gösterilen sonuçlara göre, tüm hücre gruplarında Histon H2 tip 1B proteini ortak olarak bulunmuştur. Okside-LDL ile etkileştirilen, THP-1 insan monosit ve makrofaj hücrelerinde ADAM metallopeptidaz domain 19 proteini bulunmuştur. Makrofaj, LDL ile etkileştirilen makrofaj ve okside-LDL ile etkileştirilen makrofaj hücrelerin hepsinde Trans Membran 9 Superfamily member 1 proteini gözlenmiştir. Okside-LDL ile etkileştirilen makrofaj hücrelerinde Histon H2tip 1B proteinin örnek içerisindeki yüzdesinin azaldığı, yapı içerisinde Histon H2tip 2A proteininin olduğu gözlenmiştir. Okside-LDL ile etkileştirilen makrofaj hücrelerinde, adenin fosforibosil transfer (APRT) protein tanımlanmıştır. Bu proteinlerden H2A tip 2A histon proteini ESI-MS yöntemi ile ilk kez tanımlanmıştır. Okside-LDL ile etkileştirilmiş makrofaj hücrelerinin membranlarında diğerlerinden farklı olarak H2A2A histon ve adenin fosforibosil transfer proteinlerinin var olduğu belirlenmiştir.

Literatürde yapılan benzer bir çalışmada, insan makrofaj hücrelerinin membran proteinleri öncelikli olarak iki boyutlu elektroforez yöntemiyle boyutlarına ve pI (isoelektronik noktalarına) değerlerine göre birbirlerinden ayrılmıştır. Proteinlerin jel üzerinde bulunduğu her bir bölge tek tek alınarak, uygun çözücülerde çözülmüş ve enzimatik parçalamaya hazır hale getirilmiştir. Enzimatik parçalama sonucunda elde edilen peptit birimleri, ESI-MS sistemi ile analiz edilmiştir. Membran proteinlerinin hidrofobik özellikli olması nedeniyle anyon değiştirici malzemeler kullanılarak ayırma işlemi gerçekleştirilmiş, insan makrofaj izole membranları analiz edilmiş ve elde edilen sonuçlar UniProt veritabanı kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu çalışmada dört adet dahili zar proteini, on adet tip I, iki adet tip II, bir adet tip III membran proteinleri de dahil olmak üzere toplamda 49 membran proteini tanımlanabilmiştir [191]. Tez çalışmasında membran yüzey proteinlerinin tayininde kütle spektrometrik analiz öncesinde gerçekleştirilen

ayırma ve saflaştırma işlemlerinde C-18 dolgu maddesi içeren kolon kullanılmıştır. Bu aşamada kullanılan C18 malzemesinin hidrofobik özellikli proteinlerden elde edilen peptit birimlerinin ayrılmaları veya saflaştırılmaları için uygun olmadığı görülmüştür. Buna rağmen ESI-qToF sistemi ile yapılan analizler sonucunda örnekler içerisinde bulunan proteinler belirlenebilmiştir. Okside-LDL ile etkileştirilmiş makrofaj hücrelerinin membranlarında diğerlerinden farklı olarak H2A2A histon ve adenin fosforibosil transfer proteinlerinin var olduğu belirlenmiştir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yapılan tüm çalışmalar sonunda elde edilen bulgular ve bulguların ışığı altında ortaya konulan sonuç özetleri ve öneriler aşağıda sunulmuştur.

- Yeni nesil nanoplatformların geliştirilmesi aşamasında öncelikle manyetik nanopartiküller, demir klorür bileşikleri kullanılarak 15-20 nm arasında başarıyla hazırlanmış ve karakterize edilmiştir. Daha sonra manyetik özelliğe sahip PHB/CMCs, PHB/Cs ve Dekstran nanopartikülleri yaklaşık 100-300 nm aralığında sentezlenmiştir.
- Hazırlanan nanopartiküllerin morfolojik incelemeleri, Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) ve Atomik kuvvet mikroskopu (AFM) kullanılarak yapılmıştır. Morfolojik incelemeler sonucunda nanopartiküllerin küresel yapıya sahip oldukları belirlenmiştir.
- Elde edilen SEM görüntülerinden de anlaşılacağı gibi 30 nm ve altındaki nanopartiküllerin görüntülenmesinin yetersiz kaldığını gözlenmiştir. Özellikle demir oksit nanopartiküllerin boyutlarının 15-20 nm arasında olması nedeniyle net bir görüntü elde edilememiştir. Bu sebeple özellikle TEM cihazı kullanılarak görüntüleme yapılarak daha net sonuçlar elde edilebileceği düşünülmektedir.
- Hazırlanan tüm nanopartiküller ISO 10993-5 standardına göre L929 hücre hattı ile biyolojik uyum testleri yapılmış ve tüm formülasyonların toksik etkilerinin oldukça düşük seviyelerde olduğu belirlenmiştir.
- Hazırlanan manyetik nanopartiküllerin, yüksek demir içeriğine sahip ve partikül konsantrasyonu yüksek örnek gruplarında (100 µg/ml ve 50 µg/ml) sitotoksik etki artmaktadır ve sitotoksik özellik az-orta seviyelere çıkmaktadır ancak düşük partikül konsantrasyonlarında (20 µg/ml ve 5 µg/ml) demir içeriği arttırıldığında bile sitotoksik etki hafif seviyelerdedir (% 75- 80 ve üzeri oranda hücre canlılığı).

- Hazırlanan nanopartiküller, tez çalışmamızın ikinci bölümünde *in vivo* uygulamalarda MR teşhis ve tedavisinde kullanılacak nanoplatformların hazır hale getirilmesi için IgG 1, Anneksin A5 ve Anneksin A1 ligandları hazırlanan PHB/CMCs nanopartiküllere kimyasal olarak takılması sağlanmıştır.
- Yapılan çalışmalar sonucunda, hidrofobik yüzeye sahip PHB nanopartiküllerin, karboksimetil kitosan grupları ile etkileştirilmesi ile bağlanma verimliliğinin hazırlanan diğer nanopartiküllere göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bunun nedeni ise, karboksimetil gruplarının PHB yüzeyi üzerinde büyüyerek, zincirler arasında etkileşimi arttırmasıdır.
- Yapılan çalışmalarda Fe₃O₄ nanopartiküllerin bağlanma verimliliğinin diğer nanopartiküllerden daha fazla olduğu gözlenmiştir. Bunun en büyük nedeni boyutlarının 15-20 nm arasında olmasıyla yüzey alanı/ hacim oranında artış meydana gelmektedir. Böylelikle bağlanma noktalarında artış meydana gelecektir. Ayrıca, metal bağlama, proteinlerin yapısal ve fonksiyonel karakterizasyonu için önemlidir. Protein yapısında olan ligandların özellikle metallerle kolaylıkla şelat oluşturma özelliğindedir.
- Yapılan bağlanma verimliliği çalışmalarının sonuçlarına göre en yüksek bağlanma verimliliği Anneksin A5 ve IgG 1 ligandlarında görülmüştür. Ayrıca hazırlanan nanoplatformlar, kardiyovasküler sistem rahatsızlıkları teşhis ve tedavisinde kullanılacağından, canlı sistemde karşılaşılabilecek hücre hatlarından düz kas hücreleri (A7r5) ve damar endotel hücre hatlarında HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) kullanılmıştır.
- Elde edilen sitotoksikite sonuçlarına göre Anneksin A5 ve IgG1 takılı PHB/CMCs nanoplatformların sitotoksikite açısından en uygun yapıya sahip olduğu gözlenmiş ve *in vivo* çalışmalara bu formülasyonlarla devam edilmesine karar verilmiştir.
- Hayvanlara %1' lik yağ diyeti uygulanmış ve kilo alımları haftalık tartımlar ile belirlenmiş, elde edilen sonuçlara göre sıçanların sekiz hafta sonunda

yaklaşık 100 g kilo aldıkları gözlenmiştir.

- Hayvan deneylerinden elde edilen bulgulara göre öncelikle yağ diyetine sokulan hayvanların aortlarında standart yem ile beslenen sıçanlara göre önemli oranda aterosklerotik plak oluşumunun gerçekleştiği MR görüntüleriyle ortaya konulmuştur.
- Daha sonra bu sıçanlar ligand takılı manyetik özelliğe sahip nanopartiküller uygulanarak hedefleme etkinliği testlerine tabi tutulmuştur.
- Yapılan MR incelemelerine göre, uygulanan nanopartiküler yapıların hedeflenen (oluşturulan) aterosklerotik plak bölgesine başarıyla ulaştırıldığı gözlemlenmiş ve hedeflenen akıllı nanotaşıyıcı formlarının geliştirilmiş olduğu ortaya konulmuştur.
- Yapılan biyokimyasal testlerin sonuçlarına göre öncelikle uygun yağ diyeti ile beslenen sıçanlar ile standard yem ile beslenen sıçanlar arasında kayda değer farklılıklar değişik organ ve dokularda tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra tüm organ ve dokularda, manyetik özelliğe sahip biyopolimerik nanopartikül miktarının belli bir oranda oksidatif strese neden olduğu gözlenmiştir.
- Yapılan hayvan deneylerinden elde edilen bulgulara göre gerek MR incelemelerinde, gerek biyokimyasal testlerde ve gerekse histolojik incelemelerde uygulanan nanopartiküler yapıların hedeflenen (oluşturulan) aterosklerotik plak bölgesine başarıyla ulaştırıldığı gözlemlenmiş ve hedeflenen *nanoplatformların* geliştirilmiş olduğu ortaya konulmuştur.
- Çalışmamızın son bölümünde, *ex vivo* ortamda aterosklerotik plak oluşumu geliştirilmiştir.
- İnsan LDL'si temin edilerek, bakır sülfat ile okside edilmiştir. LDL miktarının ve Cu²⁺ iyon derişiminin oksidasyona etkileri incelenmiş ve Okside-LDL oluşumu, TBARS yöntemi ve elektroforetik sistemler kullanılarak karakterize edilmiştir.

- THP-1 insan monosit hücreleri kullanılarak, PMA ile uyarılması sonucu makrofaj hücreleri elde edilmiştir. Farklılaşan makrofaj hücreleri okside-LDL ile etkileştirilerek köpük hücreleri *ex vivo* ortamda oluşturulmuştur.
- THP-1 insan monositi ve makrofaj hücreleriyle etkileştirilen LDL ve okside-LDL'nin TNF α , IL-10 ve midkin salgılanması üzerine etkisi incelenmiştir.
- Elde edilen köpük hücrelerinin membran proteinleri izole edilmiş ve MALDI-MS ve ESI-qToF-MS kütle spektroskopisi sistemleri ile membran yüzey proteinleri tayin edilmiştir.
- MALDI sonuçlarına göre, THP-1 ve LDL ile etkileştirilen THP-1 insan monosit hücre membran kütle spektrumlarının farklılık göstermediği ancak okside-LDL ile etkileştirilen THP-1 monosit hücrelerinin yapısal farklılıklar gösterdiği düşünülmektedir. Okside-LDL ile etkileştirilen THP-1 insan monosit hücrelerinin membran yüzeylerinde farklı türlerin oluştuğunun veya türlerin değişikliğe uğradığının bir göstergesidir.
- MALDI-MS sistemi ile elde edilen veriler değerlendirildiğinde okside-LDL ile etkileştirilen makrofaj hücrelerinin izole edilen membranlarının kütle spektrumunun diğer tüm örnek gruplarının spektrumlarına göre farklılık gösterdiği belirlenmiştir.
- ESI-qToF-MS sonuçlarına göre, tüm hücre gruplarında Histon H2 tip 1B proteini ortak olarak bulunmuştur. Okside-LDL ile etkileştirilen, THP-1 insan monosit ve makrofaj hücrelerinde ADAM metallopeptidaz domain 19 proteini bulunmuştur. Makrofaj, LDL ile etkileştirilen makrofaj ve okside-LDL ile etkileştirilen makrofaj hücrelerin hepsinde Trans Membran 9 Superfamily member 1 proteini gözlenmiştir. Okside-LDL ile etkileştirilen makrofaj hücrelerinde Histon H2tip 1B proteinin örnek içerisindeki yüzdesinin azaldığı, yapı içerisinde Histon H2tip 2A proteininin oluştuğu gözlenmiştir. Okside-LDL ile etkileştirilen makrofaj hücrelerinde, adenin fosforibosil transfer (APRT) protein tanımlanmıştır. Bu proteinlerden H2A tip 2A histon proteini ESI-MS yöntemi ile ilk kez tanımlanmıştır. Okside-LDL ile etkileştirilmiş makrofaj hücrelerinin membranlarında diğerlerinden farklı

olarak H2A2A histon ve adenin fosforibosil transfer proteinlerinin var olduğu belirlenmiştir.

- Tez çalışmasında membran yüzey proteinlerinin tayininde kütle spektrometrik analiz öncesinde gerçekleştirilen ayırma ve saflaştırma işlemlerinde C-18 dolgu maddesi içeren kolon kullanılmıştır. Bu aşamada kullanılan C-18 malzemesinin hidrofobik özellikli proteinlerden elde edilen peptit birimlerinin ayrılmaları veya saflaştırılmaları için uygun olmadığı görülmüştür. Membran proteinleri tayininde anyon değiştiricili dolgu maddesi içeren kolonlarının kullanılmasıyla, daha net sonuçlar elde edilebileceği düşünülmektedir.
- Okside-LDL ile etkileştirilmiş makrofaj hücrelerinin (elde edilen köpük hücrelerin) membranlarında diğerlerinden farklı olarak H2A2A histon ve adenin fosforibosil transfer proteinlerinin var olduğu belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre söz konusu reseptörlerin belirlenmesiyle bunlara uygun ligandların belirlenmesi ve ardından hazırlanan nanoplatformların bu ligandlarla dekore edilmesiyle kişiye özel teşhis ve tedavi sistemlerinin geliştirilmesi için gerekli alt yapı oluşturulmuştur.

KAYNAKLAR

- [1] Hansson, G.K., Mechanisms of disease - Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *New England Journal of Medicine*, 352, 16, 1685-1695, **2005**.
- [2] Greaves, D.R. Channon, K.M., Inflammation and immune responses in atherosclerosis. *Trends in Immunology*, 23, 11, 535-541, **2002**.
- [3] Scott, J., Pathophysiology and biochemistry of cardiovascular disease. *Current Opinion in Genetics & Development*, 14, 3, 271-279, **2004**.
- [4] Kaperonis, E.A., Liapis, C.D., Kakisis, J.D., Dimitroulis, D., Papavassiliou, V.G., Inflammation and atherosclerosis. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 31, 4, 386-393, **2006**.
- [5] Wu, J.T. Wu, L.L., Linking inflammation and atherogenesis: Soluble markers identified for the detection of risk factors and for early risk assessment. *Clinica Chimica Acta*, 366, 1-2, 74-80, **2006**.
- [6] Lowenstein, C. Matsushita, K., The acute phase response and atherosclerosis. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, 1, 1, 17-22, **2004**.
- [7] Neuzil, J., Weber, C., Kontush, A., The role of vitamin E in atherogenesis: linking the chemical, biological and clinical aspects of the disease. *Atherosclerosis*, 157, 2, 257-283, **2001**.
- [8] Kumral, E., *Aterosklerozun Epidemiyolojisi ve Genel Özellikleri*, Ateroskleroz ve Serebrovasküler Hastalıklar, (Ed: Kumral, E.İnce, B.). Tayf Matbacılık, İstanbul. 3-9, **2003**.
- [9] Creswell, L.L., Postoperative atrial arrhythmias: risk factors and associated adverse outcomes. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*, 11, 4, 303-307, **1999**.
- [10] Poole, J.C.F. Florey, H.W., Changes in the Endothelium of the Aorta and the Behaviour of Macrophages in Experimental Atheroma of Rabbits. *Journal of Pathology and Bacteriology*, 75, 2, 245-&, **1958**.
- [11] Okrainec, K., Banerjee, D.K., Eisenberg, M.J., Coronary artery disease in the developing world. *American Heart Journal*, 148, 1, 7-15, **2004**.
- [12] Stary, H.C., Chandler, A.B., Dinsmore, R.E., Fuster, V., Glagov, S., Insull, W., Rosenfeld, M.E., Schwartz, C.J., Wagner, W.D., Wissler, R.W., A Definition of Advanced Types of Atherosclerotic Lesions and a Histological Classification of Atherosclerosis - a Report from the Committee on Vascular-Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American-Heart-Association. *Circulation*, 92, 5, 1355-1374, **1995**.
- [13] Libby, P., Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, 420, 6917, 868-874, **2002**.
- [14] Geng, Y.H. Libby, P., Progression of atheroma - A struggle between death and procreation. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 22, 9, 1370-1380, **2002**.

- [15] van der Wal, A.C. Becker, A.E., Atherosclerotic plaque rupture - pathologic basis of plaque stability and instability. *Cardiovascular Research*, 41, 2, 334-344, **1999**.
- [16] Yang, Y.H., Leech, M., Hutchinson, P., Holdsworth, S.R., Morand, E.F., Antiinflammatory effect of lipocortin 1 in experimental arthritis. *Inflammation*, 21, 6, 583-596, **1997**.
- [17] Ross, R., The Pathogenesis of Atherosclerosis - a Perspective for the 1990s. *Nature*, 362, 6423, 801-809, **1993**.
- [18] Davies, M.J., *Pathology of Coronary Atherosclerosis*, Hurst's The Heart, (Ed: Fuster, V., Alexander, R.W., O'Rourke, R.A.). International Edition McGraw-Hill Medical Publishing Division, USA. 1095-1105, **2001**.
- [19] Sakaguchi, H., Takeya, M., Suzuki, H., Hakamata, H., Kodama, T., Horiuchi, S., Gordon, S., van der Laan, L.J.W., Kraal, G., Ishibashi, S., Kitamura, N., Takahashi, K., Role of macrophage scavenger receptors in diet-induced atherosclerosis in mice. *Laboratory Investigation*, 78, 4, 423-434, **1998**.
- [20] Spagnoli, L.G., Bonanno, E., Sangiorgi, G., Mauriello, A., Role of inflammation in atherosclerosis. *Journal of Nuclear Medicine*, 48, 11, 1800-1815, **2007**.
- [21] Hansson, G.K., Libby, P., Schonbeck, U., Yan, Z.Q., Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circulation Research*, 91, 4, 281-291, **2002**.
- [22] Binder, C.J., Chang, M.K., Shaw, P.X., Miller, Y.I., Hartvigsen, K., Dewan, A., Witztum, J.L., Innate and acquired immunity in atherogenesis. *Nature Medicine*, 8, 11, 1218-1226, **2002**.
- [23] Campbell, L.A. Kuo, C.C., Chlamydia pneumoniae - An infectious risk factor for atherosclerosis? *Nature Reviews Microbiology*, 2, 1, 23-32, **2004**.
- [24] Libby, P., *The Vascular Biology of Atherosclerosis*, Braunwald's heart disease, (Ed: Zipes, D.P., Braunwald, E.). Philadelphia. 921-958, **2005**.
- [25] Nagai, R., Suzuki, T., Aizawa, K., Miyamoto, S., Amaki, T., Kawai-Kowase, K., Sekiguchi, K., Kurabayashi, M., Phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells - Dissection of transcriptional regulatory mechanisms. *Ann N Y Acad Sci*, 947, 56-67, **2001**.
- [26] Manabe, I. Nagai, R., Regulation of smooth muscle phenotype. *Curr Atheroscler Rep*, 5, 3, 214-222, **2003**.
- [27] Boyle, J.J., Weissberg, P.L., Bennett, M.R., Tumor necrosis factor-alpha promotes macrophage-induced vascular smooth muscle cell apoptosis by direct and autocrine mechanisms. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 23, 9, 1553-1558, **2003**.
- [28] Littlewood, T.D. Bennett, M.R., Apoptotic cell death in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*, 14, 5, 469-475, **2003**.
- [29] Malaguarnera, M., Vacante, M., Russo, C., Malaguarnera, G., Antic, T., Malaguarnera, L., Bella, R., Pennisi, G., Galvano, F., Frigiola, A.,

- Lipoprotein(a) in Cardiovascular Diseases. *Biomed Research International*, **2013**.
- [30] Hevonoja, T., Pentikainen, M.O., Hyvonen, M.T., Kovanen, P.T., Ala-Korpela, M., Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: Basis for understanding molecular changes in modified LDL. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1488, 3, 189-210, **2000**.
- [31] Black, P.H. Garbutt, L.D., Stress, inflammation and cardiovascular disease. *J Psychosom Res*, 52, 1, 1-23, **2002**.
- [32] Stocker, R. Keane, J.F., Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiological Reviews*, 84, 4, 1381-1478, **2004**.
- [33] Machlin, L.J. Bendich, A., Free-Radical Tissue-Damage - Protective Role of Antioxidant Nutrients. *Faseb Journal*, 1, 6, 441-445, **1987**.
- [34] Buettner, G.R., The Pecking Order of Free-Radicals and Antioxidants - Lipid-Peroxidation, Alpha-Tocopherol, and Ascorbate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 300, 2, 535-543, **1993**.
- [35] Bagchi, D., Bagchi, M., Hassoun, E.A., Stohs, S.J., In vitro and in vivo generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides. *Toxicology*, 104, 1-3, 129-140, **1995**.
- [36] Abu-Soud, H.M. Hazen, S.L., Nitric oxide is a physiological substrate for mammalian peroxidases. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 48, 37524-37532, **2000**.
- [37] Mugge, A., The role of reactive oxygen species in atherosclerosis. *Zeitschrift Fur Kardiologie*, 87, 11, 851-864, **1998**.
- [38] Yu, T.W. Anderson, D., Reactive oxygen species-induced DNA damage and its modification: A chemical investigation. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 379, 2, 201-210, **1997**.
- [39] Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu, M., Lunec, J., Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *Faseb Journal*, 17, 10, 1195-1214, **2003**.
- [40] Mates, J.M., Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*, 153, 1-3, 83-104, **2000**.
- [41] Hulsmans, M., Van Dooren, E., Holvoet, P., Mitochondrial Reactive Oxygen Species and Risk of Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*, 14, 3, 264-276, **2012**.
- [42] Matsuoka, H., Endothelial dysfunction associated with oxidative stress in human. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 54, S65-S72, **2001**.
- [43] Vogiatzi, G., Tousoulis, D., Stefanadis, C., The Role of Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Hellenic Journal of Cardiology*, 50, 5, 402-409, **2009**.
- [44] Bonomini, F., Tengattini, S., Fabiano, A., Bianchi, R., Rezzani, R., Atherosclerosis and oxidative stress. *Histology and Histopathology*, 23, 3, 381-390, **2008**.

- [45] Özdemir, A.Ö. Özdemir, G., Neurological affect of homeostasis disturbances. *Journal of Turkish Cerebrovascular Diseases*, 12, 2, 33-40, **2006**.
- [46] Ait-Oufella, H., Taleb, S., Mallat, Z., Tedgui, A., Recent Advances on the Role of Cytokines in Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 31, 5, 969-979, **2011**.
- [47] Tedgui, A. Mallat, Z., Cytokines in atherosclerosis: Pathogenic and regulatory pathways. *Physiological Reviews*, 86, 2, 515-581, **2006**.
- [48] Li, D.Y. Mehta, J.L., Oxidized LDL, a critical factor in atherogenesis. *Cardiovascular Research*, 68, 3, 353-354, **2005**.
- [49] Moukdar, F., Robidoux, J., Lyght, O., Pi, J.B., Daniel, K.W., Collins, S., Reduced antioxidant capacity and diet-induced atherosclerosis in uncoupling protein-2-deficient mice. *Journal of Lipid Research*, 50, 1, 59-70, **2009**.
- [50] Leitinger, N., Cholesteryl ester oxidation products in atherosclerosis. *Mol Aspects Med*, 24, 4-5, 239-250, **2003**.
- [51] Ağaçhan, B., Yılmaz, H., Öztürk, O., Ergen, H.A., İsbir, C.S., Aterosklerozda Apolipoprotein E, Okside-Ldl Ve Lipid Profili İlişkisinin Araştırılması. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Tıp Dergisi*, 19, 3, 193-197, **2005**.
- [52] Miyoshi, N., Iwasaki, N., Tomono, S., Higashi, T., Ohshima, H., Occurrence of cytotoxic 9-oxononanoyl secosterol aldehydes in human low-density lipoprotein. *Free Radical Biology and Medicine*, 60, 73-79, **2013**.
- [53] Witze, E.S., Old, W.M., Resing, K.A., Ahn, N.G., Mapping protein post-translational modifications with mass spectrometry. *Nature Methods*, 4, 10, 798-806, **2007**.
- [54] Mitra, S., Deshmukh, A., Sachdeva, R., Lu, J.J., Mehta, J.L., Oxidized Low-Density Lipoprotein and Atherosclerosis Implications in Antioxidant Therapy. *American Journal of the Medical Sciences*, 342, 2, 135-142, **2011**.
- [55] Goldstein, J.L. Brown, M.S., The LDL Receptor. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 29, 431-438, **2009**.
- [56] O'Farrell, P.H., High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 250, 10, 4007-4021, **1975**.
- [57] Zhou, G., Li, H., DeCamp, D., Chen, S., Shu, H., Gong, Y., Flaig, M., Gillespie, J.W., Hu, N., Taylor, P.R., Emmert-Buck, M.R., Liotta, L.A., Petricoin, E.F., 3rd, Zhao, Y., 2D differential in-gel electrophoresis for the identification of esophageal scans cell cancer-specific protein markers. *Molecular & Cellular Proteomics*, 1, 2, 117-124, **2002**.
- [58] Khoo, K.H.P., Able, A.J., Chataway, T.K., Able, J.A., Preliminary characterisation of two early meiotic wheat proteins after identification through 2D gel electrophoresis proteomics. *Functional Plant Biology*, 39, 3, 222-235, **2012**.
- [59] Karas, M. Hillenkamp, F., Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem*, 60, 20, 2299-2301, **1988**.

- [60] Özen Karataylı, S.C. Bozdayı, A.M., Proteomiks ve Gastroenteroloji. *Güncel Gastroenteroloji*, 12, 2, 72-76, **2008**.
- [61] Barcelo-Batllori, S., Andre, M., Servis, C., Levy, N., Takikawa, O., Michetti, P., Reymond, M., Felley-Bosco, E., Proteomic analysis of cytokine induced proteins in human intestinal epithelial cells: implications for inflammatory bowel diseases. *Proteomics*, 2, 5, 551-560, **2002**.
- [62] Celikbicak, O., Demirel, G., Piskin, E., Salih, B., Small molecule analysis using laser desorption/ionization mass spectrometry on nano-coated silicon with self-assembled monolayers. *Analytica Chimica Acta*, 729, 54-61, **2012**.
- [63] Schmid, G., Decker, M., Ernst, H., Fuchs, H., Grünwald, W., Grunwald, A., Hofmann, H., Mayor, M., Rathgeber, W., Simon, U., Wyrwa, D., Small Dimensions and Material Properties A Definition of Nanotechnology. *Europäische Akademie Graue Reihe - Bad Neuenahr*, 35, 1-134, **2003**.
- [64] McClellan, J.E. Dorn, H., *Dünya tarihinde bilim ve teknoloji*, (Cev: H., Y.): Arkadaş Yayınevi. **2006**
- [65] *Tübitak Bilim ve Teknik Dergisi*, Vol. 469. **2006**
- [66] Danhier, F., Lecouturier, N., Vroman, B., Jerome, C., Marchand-Brynaert, J., Feron, O., Preat, V., Paclitaxel-loaded PEGylated PLGA-based nanoparticles: in vitro and in vivo evaluation. *Journal of Controlled Release*, 133, 1, 11-17, **2009**.
- [67] Lehn, J.M., Toward self-organization and complex matter. *Science*, 295, 5564, 2400-2403, **2002**.
- [68] Narayanan, K.B. Sakthivel, N., Green synthesis of biogenic metal nanoparticles by terrestrial and aquatic phototrophic and heterotrophic eukaryotes and biocompatible agents. *Adv Colloid Interface Sci*, 169, 2, 59-79, **2011**.
- [69] Wang, X., Yang, L., Chen, Z.G., Shin, D.M., Application of nanotechnology in cancer therapy and imaging. *CA Cancer J Clin*, 58, 2, 97-110, **2008**.
- [70] Rao, C.N.R., Müller, A., Cheetham, A.K., *The Chemistry of Nanomaterials*: Wiley. **2006**
- [71] Miller, J.C., Serrato, R., Represas-Cardenas, J.M., Kundahl, G., *The Handbook of Nanotechnology: Business, Policy, and Intellectual Property Law*, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. **2004**
- [72] Liveri, V.T.U., *Controlled Synthesis of Nanoparticles in Microheterogeneous Systems*, New York: Springer. **2006**
- [73] Patel, D.N. Bailey, S.R., Nanotechnology in cardiovascular medicine, Catheterization and Cardiovascular Interventions. *Catheterization and Cardiovascular Interventions*, 69, 5, 643-654, **2007**.
- [74] Gupta, A.K. Gupta, M., Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*, 26, 18, 3995-4021, **2005**.
- [75] Weissleder, R., Bogdanov, A., Neuwelt, E.A., Papisov, M., Long-Circulating Iron-Oxides for Mr-Imaging. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 16, 2-3, 321-334, **1995**.

- [76] Wunderbaldinger, P., Josephson, L., Weissleder, R., Crosslinked iron oxides (CLIO): A new platform for the development of targeted MR contrast agents. *Academic Radiology*, 9, S304-S306, **2002**.
- [77] Sosnovik, D.E., Nahrendorf, M., Weissleder, R., Molecular magnetic resonance imaging in cardiovascular medicine. *Circulation*, 115, 15, 2076-2086, **2007**.
- [78] Singh, R. Lillard, J.W., Jr., Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Exp Mol Pathol*, 86, 3, 215-223, **2009**.
- [79] Lenardon, M.D., Munro, C.A., Gow, N.A., Chitin synthesis and fungal pathogenesis. *Curr Opin Microbiol*, 13, 4, 416-423, **2010**.
- [80] Synowiecki, J. Al-Khateeb, N.A., Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43, 2, 145-171, **2003**.
- [81] Horton, D. Lineback, D.R., *N-deacetylation, chitosan from chitin*, Methods in Carbohydrate Chemistry, (Ed: Whistler, R.L. Wolfson, M.L.). Academic Press, New York, NY, USA. 403, **1995**.
- [82] Jayakumar, R., Prabakaran, M., Nair, S.V., Tokura, S., Tamura, H., Selvamurugan, N., Novel carboxymethyl derivatives of chitin and chitosan materials and their biomedical applications. *Progress in Materials Science*, 55, 7, 675-709, **2010**.
- [83] Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R.M., Chiellini, E., Chitosan-A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 36, 8, 981-1014, **2011**.
- [84] Kumar, M.N.V.R., A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers*, 46, 1, 1-27, **2000**.
- [85] Rinaudo, M., Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31, 7, 603-632, **2006**.
- [86] Mourya, V.K., Inamdar, N.N., Tiwari, A., Carboxymethyl chitosan and its applications. *Advanced Materials Letters*, 1, 1, 11-13, **2010**.
- [87] Anitha, A., Rani, V.V.D., Krishna, R., Sreeja, V., Selvamurugan, N., Nair, S.V., Tamura, H., Jayakumar, R., Synthesis, characterization, cytotoxicity and antibacterial studies of chitosan, O-carboxymethyl and N,O-carboxymethyl chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 78, 4, 672-677, **2009**.
- [88] Zhou, L.M., Wang, Y.P., Liu, Z.R., Huang, Q.W., Carboxymethyl chitosan-Fe₃O₄ nanoparticles: Preparation and adsorption behaviors towards Zn²⁺ ions. *Acta Physico-Chimica Sinica*, 22, 11, 1342-1346, **2006**.
- [89] Freier, T., Kunze, C., Nischan, C., Kramer, S., Sternberg, K., Sass, M., Hopt, U.T., Schmitz, K.P., In vitro and in vivo degradation studies for development of a biodegradable patch based on poly(3-hydroxybutyrate). *Biomaterials*, 23, 13, 2649-2657, **2002**.
- [90] Taguchi, S., Nakamura, H., Kichise, T., Tsuge, T., Yamato, I., Doi, Y., Production of polyhydroxyalkanoate (PHA) from renewable carbon sources

- in recombinant *Ralstonia eutropha* using mutants of original PHA synthase. *Biochemical Engineering Journal*, 16, 2, 107-113, **2003**.
- [91] Poirier, Y., Polyhydroxyalkanoate synthesis in plants as a tool for biotechnology and basic studies of lipid metabolism. *Prog Lipid Res*, 41, 2, 131-155, **2002**.
- [92] Braunegg, G., Lefebvre, G., Genser, K.F., Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: physiological and engineering aspects. *J Biotechnol*, 65, 2-3, 127-161, **1998**.
- [93] Cadee, J.A., van Luyn, M.J., Brouwer, L.A., Plantinga, J.A., van Wachem, P.B., de Groot, C.J., den Otter, W., Hennink, W.E., In vivo biocompatibility of dextran-based hydrogels. *J Biomed Mater Res*, 50, 3, 397-404, **2000**.
- [94] Shen, T., Weissleder, R., Papisov, M., Bogdanov, A., Jr., Brady, T.J., Monocrystalline iron oxide nanocompounds (MION): physicochemical properties. *Magnetic Resonance in Medicine*, 29, 5, 599-604, **1993**.
- [95] Larsen, C., Harboe, E., Johansen, M., Olesen, H.P., Macromolecular prodrugs. XVI. Colon-targeted delivery--comparison of the rate of release of naproxen from dextran ester prodrugs in homogenates of various segments of the pig gastrointestinal (GI) tract. *Pharm Res*, 6, 12, 995-999, **1989**.
- [96] Levi-Schaffer, F., Bernstein, A., Meshorer, A., Arnon, R., Reduced toxicity of daunorubicin by conjugation to dextran. *Cancer Treat Rep*, 66, 1, 107-114, **1982**.
- [97] Kojima, T., Hashida, M., Muranishi, S., Sezaki, H., Mitomycin C-dextran conjugate: a novel high molecular weight pro-drug of mitomycin C. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 32, 1, 30-34, **1980**.
- [98] Ohya, Y., Oue, H., Nagatomi, K., Ouchi, T., Design of macromolecular prodrug of cisplatin using dextran with branched galactose units as targeting moieties to hepatoma cells. *Biomacromolecules*, 2, 3, 927-933, **2001**.
- [99] Hornig, S., Biskup, C., Grafe, A., Wotschadlo, J., Liebert, T., Mohr, G.J., Heinze, T., Biocompatible fluorescent nanoparticles for pH-sensing. *Soft Matter*, 4, 6, 1169-1172, **2008**.
- [100] Heinze, T., Liebert, T., Heublein, B., Hornig, S., Klemm, D., *Polysaccharide II*, Polysaccharide II, (Ed: Klemm, D.). Springer 199, **2006**.
- [101] Chacko, A.M., Hood, E.D., Zern, B.J., Muzykantov, V.R., Targeted nanocarriers for imaging and therapy of vascular inflammation. *Curr Opin Colloid Interface Sci*, 16, 3, 215-227, **2011**.
- [102] Tandogan, B. Ulusu, N.N., Calcium Binding proteins. Kalsiyum bağlayıcı proteinler. *Turkish Journal of Biochemistry*, 31, 1, 36-40, **2006**.
- [103] Ewing, M.M., Karper, J.C., Sampietro, M.L., de Vries, M.R., Pettersson, K., Jukema, J.W., Quax, P.H.A., Annexin A5 prevents post-interventional accelerated atherosclerosis development in a dose-dependent fashion in mice. *Atherosclerosis*, 221, 2, 333-340, **2012**.

- [104] Cheuk, B.L.Y. Cheng, S.W.K., Annexin A1 Expression in Atherosclerotic Carotid Plaques and its Relationship with Plaque Characteristics. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 41, 3, 364-371, **2011**.
- [105] Kumar, M.N.V.R., Bakowsky, U., Lehr, C.M., Preparation and characterization of cationic PLGA nanospheres as DNA carriers. *Biomaterials*, 25, 10, 1771-1777, **2004**.
- [106] Liu, G., Hong, R.Y., Guo, L., Li, Y.G., Li, H.Z., Preparation, characterization and MRI application of carboxymethyl dextran coated magnetic nanoparticles. *Applied Surface Science*, 257, 15, 6711-6717, **2011**.
- [107] Zeta Sizer. 2013 Augustos;
http://www.malvern.com/LabEng/technology/laser_diffraction/particle_sizing.htm.
- [108] Kavaz, D., Odabas, S., Guven, E., Demirbilek, M., Denkbas, E.B., Bleomycin Loaded Magnetic Chitosan Nanoparticles as Multifunctional Nanocarriers. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 25, 3, 305-318, **2010**.
- [109] Yokogoshi, H., Mochizuki, H., Nanami, K., Hida, Y., Miyachi, F., Oda, H., Dietary taurine enhances cholesterol degradation and reduces serum and liver cholesterol concentrations in rats fed a high-cholesterol diet. *Journal of Nutrition*, 129, 9, 1705-1712, **1999**.
- [110] Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., Assay for Lipid Peroxides in Animal-Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. *Analytical Biochemistry*, 95, 2, 351-358, **1979**.
- [111] WitkoSarsat, V., Friedlander, M., CapeillereBlandin, C., NguyenKhoa, T., Nguyen, N.T., Zingraff, J., Jungers, P., DescampsLatscha, B., Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney International*, 49, 5, 1304-1313, **1996**.
- [112] Miranda, K.M., Espey, M.G., Wink, D.A., A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide-Biology and Chemistry*, 5, 1, 62-71, **2001**.
- [113] Sun, Y., Oberley, L.W., Li, Y., A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem*, 34, 3, 497-500, **1988**.
- [114] Ellman, G.L., Tissue Sulfhydryl Groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82, 1, 70-77, **1959**.
- [115] Bancroft, J.D. Stevens, A., *Theory and Practice of Histological Techniques*: London: Churchill Livingstone. **1990**
- [116] Buege, J.A. Aust, S.D., Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*, 52, 302-310, **1978**.
- [117] Reid, V.C. Mitchinson, M.J., Toxicity of oxidised low density lipoprotein towards mouse peritoneal macrophages in vitro. *Atherosclerosis*, 98, 1, 17-24, **1993**.
- [118] Lee, M.J., Chou, F.P., Tseng, T.H., Hsieh, M.H., Lin, M.C., Wang, C.J., Hibiscus protocatechuic acid or esculetin can inhibit oxidative LDL induced

- by either copper ion or nitric oxide donor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7, 2130-2136, **2002**.
- [119] Yazihan, N., Karakurt, O., Ataoglu, H., Erythropoietin reduces lipopolysaccharide-induced cell Damage and midkine secretion in U937 human histiocytic lymphoma cells. *Adv Ther*, 25, 5, 502-514, **2008**.
- [120] Brown, D.A. Rose, J.K., Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell*, 68, 3, 533-544, **1992**.
- [121] *Bradford Protokolü*. 2013 Ağustos; <http://www.nanodrop.com/Library/T069-NanoDrop-8000-Bradford-Protocol.pdf>.
- [122] Oner, S.S., Kaya, A.I., Onaran, H.O., Ozcan, G., Ugur, O., beta2-Adrenoceptor, Gs and adenylate cyclase coupling in purified detergent-resistant, low density membrane fractions. *Eur J Pharmacol*, 630, 1-3, 42-52, **2010**.
- [123] Liu, W.W., Aziz, A., Chai, S.P., Mohamed, A.R., Tye, C.T., Preparation of iron oxide nanoparticles supported on magnesium oxide for producing high-quality single-walled carbon nanotubes. *New Carbon Materials*, 26, 4, 255-261, **2011**.
- [124] Behera, S.K., Facile synthesis and electrochemical properties of Fe₃O₄ nanoparticles for Li ion battery anode. *Journal of Power Sources*, 196, 20, 8669-8674, **2011**.
- [125] Akbal, Ö., *Kanser tedavisinde kullanılmak üzere protein ve polisakkarid bazlı nanokürelerin hazırlanması ve karakterizasyonu*. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2012**.
- [126] Türkay, D., *Kardiyovasküler Sistem rahatsızlıklarının teşhis ve tedavisinde kullanılmak üzere yeni nesil nanotaşıyıcıların geliştirilmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2013**.
- [127] Maya, S., Indulekha, S., Sukhithasri, V., Smitha, K.T., Nair, S.V., Jayakumar, R., Biswas, R., Efficacy of tetracycline encapsulated O-carboxymethyl chitosan nanoparticles against intracellular infections of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 51, 4, 392-399, **2012**.
- [128] Sahu, S.K., Mallick, S.K., Santra, S., Maiti, T.K., Ghosh, S.K., Pramanik, P., In vitro evaluation of folic acid modified carboxymethyl chitosan nanoparticles loaded with doxorubicin for targeted delivery. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, 21, 5, 1587-1597, **2010**.
- [129] Fan, W., Yan, W., Xu, Z.S., Ni, H., Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 90, 21-27, **2012**.
- [130] Mansot, J.L., Golabkan, V., Romana, L., Bilas, P., Alleman, E., Bercion, Y., Tribological and physicochemical characterization of strontium colloidal additives in mild wear regime. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects*, 243, 1-3, 67-77, **2004**.

- [131] Errico, C., Bartoli, C., Chiellini, F., Chiellini, E., Poly(hydroxyalkanoates)-Based Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, **2009**.
- [132] Schlicher, E.J.A.M., Postma, N.S., Zuidema, J., Talsma, H., Hennink, W.E., Preparation and characterisation of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres containing desferrioxamine. *International Journal of Pharmaceutics*, 153, 2, 235-245, **1997**.
- [133] Zhang, Y., Kohler, N., Zhang, M.Q., Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake. *Biomaterials*, 23, 7, 1553-1561, **2002**.
- [134] Lacava, L.M., Lacava, Z.G.M., Da Silva, M.F., Silva, O., Chaves, S.B., Azevedo, R.B., Pelegrini, F., Gansau, C., Buske, N., Sabolovic, D., Morais, P.C., Magnetic resonance of a dextran-coated magnetic fluid intravenously administered in mice. *Biophysical Journal*, 80, 5, 2483-2486, **2001**.
- [135] Laurent, S., Nicotra, C., Gossuin, Y., Roch, A., Ouakssim, A., Vander Elst, L., Cornant, M., Soleil, P., Muller, R.N., Influence of the length of the coating molecules on the nuclear magnetic relaxivity of superparamagnetic colloids. *Second Seeheim Conference on Magnetism, Proceedings*, 3644-3650, **2004**.
- [136] Easo, S.L. Mohanan, P.V., Dextran stabilized iron oxide nanoparticles: Synthesis, characterization and in vitro studies. *Carbohydrate Polymers*, 92, 1, 726-732, **2013**.
- [137] Thurmond, K.B., Kowalewski, T., Wooley, K.L., Shell cross-linked knedels: A synthetic study of the factors affecting the dimensions and properties of amphiphilic core-shell nanospheres. *Journal of the American Chemical Society*, 119, 28, 6656-6665, **1997**.
- [138] Samarajeewa, S., Shrestha, R., Li, Y.L., Wooley, K.L., Degradability of Poly(Lactic Acid)-Containing Nanoparticles: Enzymatic Access through a Cross-Linked Shell Barrier. *Journal of the American Chemical Society*, 134, 2, 1235-1242, **2012**.
- [139] Tang, M.H., Dou, H.J., Sun, K., One-step synthesis of dextran-based stable nanoparticles assisted by self-assembly. *Polymer*, 47, 2, 728-734, **2006**.
- [140] Si, S.F., Li, C.H., Wang, X., Yu, D.P., Peng, Q., Li, Y.D., Magnetic monodisperse Fe₃O₄ nanoparticles. *Crystal Growth & Design*, 5, 2, 391-393, **2005**.
- [141] Kim, Y.R., Paik, H.J., Ober, C.K., Coates, G.W., Batt, C.A., Enzymatic surface-initiated polymerization: A novel approach for the in situ solid-phase synthesis of biocompatible polymer poly(3-hydroxybutyrate). *Biomacromolecules*, 5, 3, 889-894, **2004**.
- [142] Lee, J., Jung, S.G., Park, C.S., Kim, H.Y., Batt, C.A., Kim, Y.R., Tumor-specific hybrid polyhydroxybutyrate nanoparticle: Surface modification of nanoparticle by enzymatically synthesized functional block copolymer. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 21, 10, 2941-2944, **2011**.

- [143] Babor, M., Gerzon, S., Raveh, B., Sobolev, V., Edelman, M., Prediction of transition metal-binding sites from apo protein structures. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics*, 70, 1, 208-217, **2008**.
- [144] Moghadasian, M.H., Experimental atherosclerosis - A historical overview. *Life Sciences*, 70, 8, 855-865, **2002**.
- [145] Paigen, B., Plump, A.S., Rubin, E.M., The mouse as a model for human cardiovascular disease and hyperlipidemia. *Curr Opin Lipidol*, 5, 4, 258-264, **1994**.
- [146] Vilahur, G., Padro, T., Badimon, L., Atherosclerosis and Thrombosis: Insights from Large Animal Models. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, **2011**.
- [147] Badimon, L., Atherosclerosis and thrombosis: Lessons from animal models. *Thrombosis and Haemostasis*, 86, 1, 356-365, **2001**.
- [148] Paigen, B., Morrow, A., Brandon, C., Mitchell, D., Holmes, P., Variation in Susceptibility to Atherosclerosis among Inbred Strains of Mice. *Atherosclerosis*, 57, 1, 65-73, **1985**.
- [149] Ren, H.S., Li, M., Feng, L.L., Jiang, J.J., Zhang, Y.J., Zhang, Y.C., Zhu, X.L., Effects of Clopidogrel on Vascular Proliferation and Apoptosis in an Atherosclerotic Rabbit Model. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 55, 6, 617-624, **2010**.
- [150] Smith, B.R., Heverhagen, J., Knopp, M., Schmalbrock, P., Shapiro, J., Shiomi, M., Moldovan, N.I., Ferrari, M., Lee, S.C., Localization to atherosclerotic plaque and biodistribution of biochemically derivatized superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) contrast particles for magnetic resonance imaging (MRI). *Biomedical Microdevices*, 9, 5, 719-727, **2007**.
- [151] Liao, Z.Y., Wang, H.J., Wang, X.D., Wang, C.L., Hu, X.F., Cao, X.H., Chang, J., Biocompatible surfactin-stabilized superparamagnetic iron oxide nanoparticles as contrast agents for magnetic resonance imaging. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects*, 370, 1-3, 1-5, **2010**.
- [152] Tu, C.Q., Ng, T.S.C., Sohi, H.K., Palko, H.A., House, A., Jacobs, R.E., Louie, A.Y., Receptor-targeted iron oxide nanoparticles for molecular MR imaging of inflamed atherosclerotic plaques. *Biomaterials*, 32, 29, 7209-7216, **2011**.
- [153] Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 1, 265-275, **1951**.
- [154] Clarkson, P.M., Antioxidants and Physical Performance. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35, 1-2, 131-141, **1995**.
- [155] Gil-Del Valle, L., Milian, L.D., Toledo, A., Vilaro, N., Tapanes, R., Otero, M.A., Altered redox status in patients with diabetes mellitus type I. *Pharmacological Research*, 51, 4, 375-380, **2005**.
- [156] Larson, R.A., The Antioxidants of Higher-Plants. *Phytochemistry*, 27, 4, 969-978, **1988**.

- [157] Lavelli, V., Peri, C., Rizzolo, A., Antioxidant activity of tomato products as studied by model reactions using xanthine oxidase, myeloperoxidase, and copper-induced lipid peroxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5, 1442-1448, **2000**.
- [158] İmamoğlu Gül, D., *Pelvik Bölgeye Radyoterapi Uygulanan Serviks Kanserli Hastalarda Oluşan Yan Etkilerle Serum Nitrik Oksit Seviyesi Arasındaki İlişki*. Uzmanlık Tezi, T.C. Sağlık Bakanlığı, Dr Lütfi Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Radyasyon Onkolojisi Kliniği, İstanbul, **2006**.
- [159] Glantzounis, G.K., Rocks, S.A., Sheth, H., Knight, I., Salacinski, H.J., Davidson, B.R., Winyard, P.G., Seifalian, A.M., Formation and role of plasma S-nitrosothiols in liver ischemia-reperfusion injury. *Free Radic Biol Med*, 42, 6, 882-892, **2007**.
- [160] Moshage, H., Kok, B., Huizenga, J.R., Jansen, P.L., Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. *Clin Chem*, 41, 6 Pt 1, 892-896, **1995**.
- [161] Cong, G.H., Qin, Y., Huang, W., Zhou, S., Wu, X.H., Yang, X.H., Zhao, Y.L., Li, D., Protective effects of diosgenin in the hyperlipidemic rat model and in human vascular endothelial cells against hydrogen peroxide-induced apoptosis. *Chemico-Biological Interactions*, 184, 3, 366-375, **2010**.
- [162] Sun, X., Han, F., Yi, J., Han, L., Wang, B., Effect of aspirin on the expression of hepatocyte NF-kappaB and serum TNF-alpha in streptozotocin-induced type 2 diabetic rats. *J Korean Med Sci*, 26, 6, 765-770, **2011**.
- [163] Cüre, E., *Ratlarda Demir Yüklenmesi İle Oluşturulan Oksidatif Stresin Önlenmesinde Kafeik Asit Fenetil Ester'in Etkinliğinin Araştırılması*. Uzmanlık Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Isparta, **2007**.
- [164] Bayır, S., Eskiocak, S., Altaner, Ş., Çakır, E., Kolesterolde Zengin Diyetle Beslenen Ratlarda N-Asetilsisteinin Anti-oksidan/Pro-oksidan Etkileri. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, 4, 1, 15-23, **2006**.
- [165] Tang, F., Wu, X., Wang, T., Wang, P., Li, R., Zhang, H., Gao, J., Chen, S., Bao, L., Huang, H., Liu, P., Tanshinone II A attenuates atherosclerotic calcification in rat model by inhibition of oxidative stress. *Vascul Pharmacol*, 46, 6, 427-438, **2007**.
- [166] Morris, J.B., Olzinski, A.R., Bernard, R.E., Aravindhan, K., Mirabile, R.C., Boyce, R., Willette, R.N., Jucker, B.M., p38 MAPK inhibition reduces aortic ultrasmall superparamagnetic iron oxide uptake in a mouse model of atherosclerosis - MRI assessment. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 28, 2, 265-271, **2008**.
- [167] Witztum, J.L., Horkko, S., The role of oxidized LDL in atherogenesis: immunological response and anti-phospholipid antibodies. *Ann N Y Acad Sci*, 811, 88-96; discussion 96-89, **1997**.
- [168] Esterbauer, H., Striegl, G., Puhl, H., Rotheneder, M., Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radic Res Commun*, 6, 1, 67-75, **1989**.

- [169] van Tits, L.J.H., Hak-Lemmers, H.L.M., Demacker, P.N.M., Stalenhoef, A.F., Willems, P.H.G.M., Oxidized low-density lipoprotein induces calcium influx in polymorphonuclear leukocytes. *Free Radical Biology and Medicine*, 29, 8, 747-755, **2000**.
- [170] Young, I.S. McEneny, J., Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochemical Society Transactions*, 29, 358-362, **2001**.
- [171] Chui, P.C., Guan, H.P., Lehrke, M., Lazar, M.A., PPARgamma regulates adipocyte cholesterol metabolism via oxidized LDL receptor 1. *Journal of Clinical Investigation*, 115, 8, 2244-2256, **2005**.
- [172] Kalyanaraman, B., Antholine, W.E., Parthasarathy, S., Oxidation of low-density lipoprotein by Cu²⁺ and lipoxygenase: an electron spin resonance study. *Biochim Biophys Acta*, 1035, 3, 286-292, **1990**.
- [173] Singh, R.J., Feix, J.B., Mchaourab, H.S., Hogg, N., Kalyanaraman, B., Spin-Labeling Study of the Oxidative Damage to Low-Density-Lipoprotein. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 320, 1, 155-161, **1995**.
- [174] Kuzuya, M., Yamada, K., Hayashi, T., Funaki, C., Naito, M., Asai, K., Kuzuya, F., Oxidation of Low-Density-Lipoprotein by Copper and Iron in Phosphate Buffer. *Biochim Biophys Acta*, 1084, 2, 198-201, **1991**.
- [175] Morgan, J. Leake, D.S., Oxidation of low density lipoprotein by iron or copper at acidic pH. *Journal of Lipid Research*, 36, 12, 2504-2512, **1995**.
- [176] Satchell, L. Leake, D.S., Oxidation of Low-Density Lipoprotein by Iron at Lysosomal pH: Implications for Atherosclerosis. *Biochemistry*, 51, 18, 3767-3775, **2012**.
- [177] Gallou, G., Ruelland, A., Campion, L., Allannic, H., Legras, B., Cloarec, L., Susceptibility of LDL to lipid peroxidation in non-insulin-dependent diabetes mellitus with or without macroangiopathy. *Ann Biol Clin (Paris)*, 52, 10, 695-699, **1994**.
- [178] Konukoglu, D., Akcay, T., Dincer, Y., Hatemi, H., The susceptibility of red blood cells to autoxidation in type 2 diabetic patients with angiopathy. *Metabolism-Clinical and Experimental*, 48, 12, 1481-1484, **1999**.
- [179] Lopes-Virella, M.F., Hunt, K.J., Baker, N.L., Lachin, J., Nathan, D.M., Virella, G., Diabetes, C., Complications Trial/Epidemiology of Diabetes, I., Complications Research, G., Levels of oxidized LDL and advanced glycation end products-modified LDL in circulating immune complexes are strongly associated with increased levels of carotid intima-media thickness and its progression in type 1 diabetes. *Diabetes*, 60, 2, 582-589, **2011**.
- [180] Jadeja, R.N., Thounaojam, M.C., Devkar, R.V., Ramachandran, A.V., Clerodendron glandulosum. Coleb extract prevents in vitro human LDL oxidation and oxidized LDL induced apoptosis in human monocyte derived macrophages. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 6, 1195-1202, **2011**.
- [181] Noble, R.P., Electrophoretic Separation of Plasma Lipoproteins in Agarose Gel. *Journal of Lipid Research*, 9, 6, 693-&, **1968**.
- [182] Ichikawa, T., Unoki, H., Sun, H., Shimoyamada, H., Marcovina, S., Shikama, H., Watanabe, T., Fan, J.L., Lipoprotein(a) promotes smooth muscle cell proliferation and dedifferentiation in atherosclerotic lesions of

- human apo(a) transgenic rabbits. *American Journal of Pathology*, 160, 1, 227-236, **2002**.
- [183] Thilakarathna, S.H., Rupasinghe, H.P.V., Needs, P.W., Apple peel bioactive rich extracts effectively inhibit in vitro human LDL cholesterol oxidation. *Food Chemistry*, 138, 1, 463-470, **2013**.
- [184] MacEwan, D.J., TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. *Cell Signal*, 14, 6, 477-492, **2002**.
- [185] Virella, G., Atchley, D., Koskinen, S., Lopes-Virella, M.F., Grp, D.E.R., Proatherogenic and proinflammatory properties of immune complexes prepared with purified human oxLDL antibodies and human oxLDL. *Clinical Immunology*, 105, 1, 81-92, **2002**.
- [186] Neta, R., Sayers, T.J., Oppenheim, J.J., Relationship of TNF to interleukins. *Immunol Ser*, 56, 499-566, **1992**.
- [187] Jin, M., Iwamoto, T., Yamada, K., Satsu, H., Totsuka, M., Shimizu, M., Effects of chondroitin sulfate and its oligosaccharides on toll-like receptor-mediated IL-6 secretion by macrophage-like J774.1 cells. *Biosci Biotechnol Biochem*, 75, 7, 1283-1289, **2011**.
- [188] Chalikias, G.K., Tziakas, D.N., Kaski, J.C., Hatzinikolaou, E.I., Stakos, D.A., Tentes, I.K., Kortsaris, A., Hatseras, D.I., Interleukin-18: interleukin-10 ratio and in-hospital adverse events in patients with acute coronary syndrome. *Atherosclerosis*, 182, 1, 135-143, **2005**.
- [189] Inoh, K., Muramatsu, H., Ochiai, K., Torii, S., Muramatsu, T., Midkine, a heparin-binding cytokine, plays key roles in intraperitoneal adhesions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 317, 1, 108-113, **2004**.
- [190] Ouedraogo, R., Daumas, A., Ghigo, E., Capo, C., Mege, J.L., Textoris, J., Whole-cell MALDI-TOF MS: A new tool to assess the multifaceted activation of macrophages. *Journal of Proteomics*, 75, 18, 5523-5532, **2012**.
- [191] Slomianny, M.C., Dupont, A., Bouanou, F., Beseme, O., Guihot, A.L., Amouyel, P., Michalski, J.C., Pinet, F., Profiling of membrane proteins from human macrophages: Comparison of two approaches. *Proteomics*, 6, 8, 2365-2375, **2006**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri:

Adı Soyadı : Doğa Kavaz

Doğum Yeri : Lefkoşa/ K.K.T.C.

Medeni Hali : Bekar

E-posta : dogakvz@hacettepe.edu.tr

Adresi: Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümü Biyokimya A.B.D. Beytepe/ANKARA

Eğitim:

Lise : Türk Maarif Koleji/ Lefkoşa K.K.T.C.

Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü

Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Ana Bilim Dalı

Doktora : Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Ana Bilim Dalı

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce, iyi

İş Deneyimi

2007 – Araştırma Görevlisi, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Ana Bilim Dalı

Deneyim Alanları

Akademik

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

277.725 ₺ bütçeli, 110S181 no'lu “Kardiyovasküler Sistem Rahatsızlıklarının Teşhis ve Tedavisinde Nanoteknolojik Yaklaşımlar” adlı TÜBİTAK Ar-Ge Projesi

Tezden Üretilmiş Yayınlar

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile katıldığı toplantılar

1. **Doğa Kavaz**, Damla Türkay, Murat Demirbilek, Mehmet Ali Onur, Hürkan Kurşaklıoğlu and Emir Baki Denkbaş, ‘Kardiyovasküler sistem terapilerinde

kullanılmak için kitosan nanotaşıyıcılar' NanoTR VII, 7th Nanoscience and Nanotechnology Conference, Istanbul, Turkey, June 27- July 1, 2011.

2. Damla Türkay, **Doğa Kavaz**, Murat Demirbilek, Mustafa Türk, Emir Baki Denkbaş, Magnetic Polyhydroxybutyrate-Carboxymethylated Chitosan (PHB-CMCh) Nanoparticles for Atherosclerotic Plaque Theragnosis, NanoTR VIII, 8th Nanoscience and Nanotechnology Conference Ankara, Türkiye, 25-29 Haziran 2012
3. Emir Baki Denkbaş, Damla Türkay, **Doğa Kavaz**, Murat Demirbilek, Ebru Erdal, Mustafa Türk, Melike Erol Demirbilek, Mehmet Ali Onur, Oktay Algin, Polymeric Nanocarriers for Atherosclerotic Plaque Targetting: *in Vitro* Studies, 16th IPTS, The Marmara Hotel, Lara, Antalya/ Turkey September 10-12, 2012