

**KARDİYOVASKÜLER SİSTEM RAHATSIZLIKLARININ
TEŞHİS VE TEDAVİSİNDE KULLANILMAK ÜZERE YENİ
NESİL NANOTAŞIYICILARIN GELİŞTİRİLMESİ**

**DEVELOPMENT OF NOVEL NANOCARRIERS TO BE
USED IN CARDIOVASCULAR SYSTEM DISEASE
DIAGNOSIS AND THERAPY**

DAMLA TÜRKEY

**Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ
Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
NANOTEKNOLOJİ ve NANOTIP Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2013

Damla TÜRKAY'ın hazırladığı "**Kardiyovasküler Sistem Rahatsızlıklarının Teşhis ve Tedavisinde Kullanılmak Üzere Yeni Nesil Nanotaşıyıcıların Geliştirilmesi**" adlı bu çalışma aşağıdaki jürimiz tarafından **NANOTEKNOLOJİ ve NANOTIP ANABİLİM DALI**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.



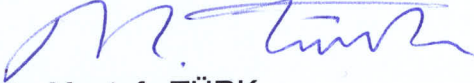
Başkan
Prof. Dr. Zakir Rzayev



Danışman
Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ



Üye
Prof. Dr. Mehmet Ali ONUR



Üye
Doç. Dr. Mustafa TÜRK



Üye
Yrd. Doç. Dr. Memed DUMAN

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

Prof.Dr. Fatma Sevin DÜZ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Hayatımın her anında, aldığım tüm kararlarda beni her zaman destekleyen
değerli aileme...

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım 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 herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı beyan ederim.

8 Mart 2013

Damla TÜRKAY

ÖZET

KARDİYOVASKÜLER SİSTEM RAHATSIZLIKLARININ TEŞHİS VE TEDAVİSİNDE KULLANILMAK ÜZERE YENİ NESİL NANOTAŞIYICILARIN GELİŞTİRİLMESİ

DAMLA TÜRKEY

Yüksek Lisans, Nanoteknoloji ve Nanotıp Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ

Mart 2013, 93 Sayfa

Damar daralma veya tıkanmaları ile ortaya çıkan kardiyovasküler sistem rahatsızlıkları, insanların yaşam kalitesini olumsuz yönde etkileyen ve ölümcül sonuçları olan en önemli rahatsızlıklardan biridir. Bu rahatsızlıkların erken dönemde teşhis edilebilmesi çoğunlukla tedavi etkinliğinin artmasına hatta hastanın hayatının kurtarılmasında etkili olabilmektedir. Kardiyovasküler rahatsızlıkların geç dönemde fark edilmesi; hastanın kalp krizi, beyin kanaması geçirmesi gibi çok ciddi ölümcül olaylarla sonuçlanabilmektedir.

Bugün halen daha kullanılmakta olan bir takım teşhis ve tanı sistemleriyle bu hastalıkların olabildiğince zamanında fark edilebilmesi her ne kadar mümkün olsa da; bu sistemlerin uygulanışı sırasında, hastaya enfeksiyon bulaşma riskinin yüksek olması, hastanın uygulanan girişimsel yöntemden rahatsızlık duyması ve de en önemlisi bu sistemlerin, hastalık belli bir düzeye ulaşmadan doğru bulguların elde edilememesi gibi dezavantajları bulunmaktadır.

Nanotıp alanında yapılan çalışmaların önemli bir bölümünü, erken teşhise olanak sağlayan, yüksek hassasiyete ve dokuya hedeflenebilir özelliklere sahip nanomateryallerin geliştirilmesi oluşturmaktadır. Bu nedenle, özellikle son yıllarda dikkatleri çeken nanoteknoloji ve nanotıp alanında yapılan çalışmalar sayesinde, birçok sağlık alanında olduğu gibi aterosklerotik koroner damar rahatsızlıklarının

erken dönem teşhis ve tedavisinde ilerleme kaydedilmesi, yeni ufukların açılması mümkün olabilecektir.

Sunulan tez çalışması kapsamında da belirtilen nanoteknoloji ve nanotıp uygulamalarının bir örneği olarak manyetik özelliklere sahip ve yüzeyleri damar daralma veya tıkanmalarının olduğu bölgeleri tanıma yeteneğine sahip olan biyomoleküller (ligandlar) ile donatılmış olan polimerik nanopartiküllerin hazırlanması ve karakterizasyonu ile bu nanopartiküllerin *in vitro* - *in vivo* çalışmalarının yapılması amaçlanmıştır. Bu amaca ulaşmak üzere öncelikle boyları yaklaşık olarak 15-20 nm dolayında olan demir oksit nanopartikülleri hazırlanmıştır. Ayrıca, bu nanopartikülleri bünyesinde bulunduran 150-250 nm aralığında, kendine has özelliklere sahip kitosan (CS), kitosan türevi suda çözünme yeteneğine sahip karboksimetil kitosan (CMCS) ve poliester yapısındaki polihidroksibütirat ile polisakkarit yapısındaki karboksimetil kitosan içeren polihidroksibütirat-karboksimetil kitosan (PHB-CMCS) polimerik nanopartikülleri hazırlanmış ve karakterizasyonları yapılmıştır. Bu malzemeler kullanılarak hazırlanan nanotaşıyıcıların morfolojik özelliklerinin belirlenmesinde taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve atomik kuvvet mikroskobu (AFM) kullanılmıştır. Partiküllerin boyut analizi içinse Zeta-Sizer cihazı kullanılmıştır. Hazırlanan manyetik özelliğe sahip olan ve olmayan nanopartiküller karakterize edildikten sonra referans ligand olan IgG-1 ile etkileştirilmiştir. Elde edilen % ligand bağlanma verimlilikleri kıyaslandığında, PHB-CMCS polimeri ile hazırlanmış manyetik nanopartiküllerin % ligand bağlanma verimliliğinin fazla olması nedeni ile deneysel çalışmalara bu partiküllerle devam edilmiştir.

Daha sonra, Anneksin-5 ve Anneksin-1 ligandları ile etkileştirilen manyetik PHB-CMCS nanopartiküllerin, % ligand bağlanma verimlilikleri hesaplanmıştır. Yapılacak hayvan deneyleri için nanopartiküllerin hücresel anlamda seçicilikleri ve sitotoksosite testleri *in vitro* olarak gerçekleştirilmiştir. Buradan alınan neticelere göre; daha az toksisite gösteren ve yüksek bağlanma oranına sahip olan Anneksin-5 ve IgG-1 ligandları ile fonksiyonleştirilmiş PHB-CMCS manyetik partiküllerin hayvan deneylerinde kullanılmasına karar verilmiştir.

Tez çalışmasının son basamağında ise, yüzeyleri ligandlar ile fonksiyonleştirilmiş PHB-CMCS nanopartiküllerin etkinliği *in vivo* olarak test edilmiştir.

Nanopartiküllerin vücut içi aterosklerotik plak etkileşimlerinin araştırılması amacı ile 30 tanesi %1 yağlı diyet ile beslenen, 6 tanesi normal sıçan yemi ile beslenen toplam 36 adet sekiz haftalık Wistar albino ırkı sıçana manyetik nanopartikül enjeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Enjeksiyonun yapıldığı 1. gün ve sonrasındaki 3. gün hayvanların aort incelemeleri için MRI görüntüleri alınmış ve bu görüntülerde ligandlarla fonksiyonelleştirilmiş manyetik PHB-CMCS nanopartiküllerin istenilen aterosklerotik bölgede görüntüleri elde edilmiştir.

Yapılan bu çalışma, 110S181 Nolu "Kardiyovasküler Sistem Rahatsızlıklarının Teşhis ve Tedavisinde Nanoteknolojik Yaklaşımlar" adlı TÜBİTAK Ar-Ge Projesi desteğiyle hazırlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kardiyovasküler sistem, aterosklerotik plak, manyetik nanopartikül, manyetik rezonans (MR) görüntüleme.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF NOVEL NANOCARRIERS TO BE USED IN CARDIOVASCULAR SYSTEM DISEASE DIAGNOSIS AND THERAPY

DAMLA TÜRKEY

**Master of Science, Department of Nanotechnology and
Nanomedicine**

Supervisor: Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ

March 2013, 93 Pages

Vascular narrowing or blockages caused by the cardiovascular system disorders, affecting the quality of life of people with deadly consequences, and is one of the most important illnesses. These disorders can be diagnosed early to increase the effectiveness of treatment often can be effective in saving the patient's life even. Late diagnoses of cardiovascular disorders; may be resulting with patients heart disease, such as bleeding in the brain undergo a very serious fatal incidents.

Today, diagnosis and diagnostic systems still in use in a number of these diseases, although it is possible to be realized in time as possible, during the implementation of these systems, have an increased risk of transmission of infection to the patient, the patient's discomfort, and most importantly, the inability in getting reliable informations until the disease comes to a critical level.

Nanomedicine includes an important part of the work done in the field of early diagnosis, allowing the development of nanomaterials with high precision and can be targeted to tissues.

Therefore, in the last decades remarkable studies in the field of nanotechnology and nanomedicine as well as many health scope of early diagnosis and treatment of atherosclerotic coronary artery disorders, and progress may be possible to open new horizons.

Also presented in this thesis mentioned as an example of applications of magnetic nanotechnology and nanomedicine vessel narrowing or obstruction in areas where the features and surfaces that are capable of recognition biomolecules (ligands) equipped with the preparation and characterization of nanoparticles of polymeric nanoparticles *in vitro* - *in vivo* studies intended.

To achieve this aim, primarily the iron oxide nanoparticles in size around 15-20 nm were prepared. In addition, these nanoparticles which comprise from 150 to 250 nm range, with unique properties of chitosan (CS), chitosan derivative carboxymethyl chitosan (CMCS) which is capable of water solubility and polihidroksibütirat (PHB-CMCS) polymeric nanoparticles were prepared and characterized.

In determination of the morphological characteristics of nanocarriers prepared with these materials, scanning electron microscopy (SEM) and atomic force microscopy (AFM) was used. Zeta-Sizer device is used for the analysis of particle size.

After characterization of nanoparticles with and without magnetic functionality, reference ligand IgG-1 is activated. When the resulting % efficiencies of ligand binding compared, the magnetic nanoparticles prepared with PHB-CMCS polymer is more than due to the % efficiency of ligand binding, experimental studies have been continued with these particles.

Then, % ligand binding efficiencies of magnetic PHB-CMCS nanoparticles that is activated with Annexin-5 and Annexin-1 ligands is calculated. Selectivity and cytotoxicity of nanoparticles cellular sense to do tests for animal experiments *in vitro* were performed.

According to the obtained outcomes; less toxic, and having high binding ratio Annexin-5 and IgG-1 ligands operationalized PHB-CMCS magnetic particles was decided to use in animal experiments.

In the final step of the thesis work, activities of PHB-CMCS nanoparticles whose surfaces operationalized with ligands have been tested as *in vivo*. With the aim of investigation of atherosclerotic plaque interactions of nanoparticles in body, 30 of them with 1% fat diet fed, 6 of them fed with normal rat chow, totally magnetic nanoparticle injection was applied to 36 eight-week Wistar albino rats.

At the injection site after the first day and third day, MRI images of the animals were taken for the aorta examination and magnetic PHB-CMCS nanoparticles functionalized ligands were obtained from images of the desired atherosclerotic region.

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

Keywords: Cardiovascular system, atherosclerotic plaque, magnetic nanoparticle, magnetic resonance (MR) imaging.

TEŞEKKÜR

Hacettepe Üniversitesi, Nanoteknoloji ve Nanotıp alanında yaptığım yüksek lisans eğitimim süresince; bilgi, birikim ve tecrübeleri ile her zaman beni destekleyen ve böyle güzel bir projeye dahil olmama imkân veren değerli hocam Prof. Dr. Emir Baki Denkbaş ve ailesine,

Yapmış olduğumuz proje çalışmamızın her aşamasında, bilgi ve tecrübeleriyle verdikleri destekten ötürü değerli Hocam Prof. Dr. Mehmet Ali Onur'a ve hayvan deneylerinde bizlere her anlamda destek oldukları için, Araştırma Görevlisi Esin Akbay ve Handan Sevim'e,

Proje çalışmamızda bilgi ve deneyimlerinden faydalandığımız değerli Hocam Doç. Dr. Mustafa Türk'e ve katkılarından dolayı Araştırma Görevlisi arkadaşım Esra Arat'a,

Sevgili hocalarım Yrd. Doç. Dr. Halil Murat Aydın ve Yrd. Doç. Dr. Memed Duman'a,

Tez çalışmamın başından sonuna dek bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşmaktan geri durmayan, her anlamda desteğini devamlı hissettiğim değerli arkadaşım ve hocam Doğa Kavaz'a,

Hayvan çalışmalarında bizden bilgi ve emeklerini esirgemeyen laboratuvarımızın abisi Dr. Murat Demirbilek ve eşi Yrd. Doç. Dr. Melike Erol Demirbilek'e,

Tecrübe ve deneyimlerinden her zaman faydalandığım değerli arkadaşlarım, Biyopolimerik Sistemler Araştırma Grubunun demirbaşları; Cem Bayram, Tamer Çırak, Tayfun Vural, Ebru Erdal, Zeynep Karahaliloğlu, Betül Pala ve Eda Yalçın'a,

Ve gecelerce laboratuvarıda beraber sabahladığım sevgili tezdaşım, değerli arkadaşım Gökçe Bozokalfa'ya,

Birlikte vakit geçirmekten büyük keyif aldığım, soğuk laboratuvar ortamından biraz olsun uzaklaşmamı sağlayan değerli arkadaşlarım; Esmâ Alp, Pezhman Hosseinian, Ekin Çelik, Öznur Akbal, Nazlı Çalışkan, Fatma Demir, Kübra Kıcı, Göknur Kara, Bağdat Burcu Cengiz, Sema Tuncer, Mehmet Doğan Aşık, Deniz Bulut'a,

Nanoteknoloji ve Nanotıp Bölümün'de yüksek lisansa başlamama vesile olan, ailemizin vazgeçilmezi, fotoğraf sevdalısı canım amcam Sami Türkay'a,

Son olarak, hayatımın her anında sevgi ve desteklerini esirgemeyen, varlıkları ile beni her zaman mutlu eden değerli ailem ve ailemizin neşe kaynağı Hamza'ya,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Damla TÜRKAY

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
ÖZ	i
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Ateroskleroz	3
2.2. Ateroskleroz Risk Faktörleri.....	4
2.3. Ateroskleroz Patolojisi (Patogenezi).....	5
2.4. Geleneksel Teşhis Yöntemleri.....	8
2.4.1. Fiziki muayene	9
2.4.2. Elektrokardiogram (EKG)	9
2.4.3. Kardiyak enzimler.....	10
2.4.4. Egzersiz Stres Testi (EST)	10
2.4.5. Ekokardiografi (EKO).....	10
2.4.6. Miyokard Perfüzyon Sintigrafisi (Talyum Testi)	11
2.4.7. Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG).....	11
2.4.8. Bilgisayarlı Kesit Tomografisi (CAT).....	12
2.4.9. Koroner Anjiyografi.....	12
2.4.10. Ultrason Görüntüleme (USG)	13
2.4.11. Pozitron Emisyon Tomografi (PET)	13

2.5. Nanoteknoloji.....	13
2.6. Nanopartiküller	14
2.6.1. Manyetik Nanopartiküller (MNP).....	15
2.6.1.1. Manyetik Nanopartiküllerin Kardiyovasküler Uygulamaları	16
2.7. Nanopartiküllerin Hazırlanmasında Kullanılan Biyopolimerler	17
2.7.1. Kitin	17
2.7.2. Kitosan	18
2.7.2.2. Kitosanın Kullanım Alanları	20
2.7.3. Karboksimetil Kitosan (CMCS)	20
2.7.3.1. Karboksimetil Kitosanın Türevleri	21
2.7.3.1.1. O-Karboksimetil Kitosan (O-CMCS)	21
2.7.3.1.2. N-Karboksimetil Kitosan (N-CMCS).....	22
2.7.3.1.3. N,O-Karboksimetil Kitosan (N,O-CMCS)	22
2.7.3.2. Karboksimetil Kitosan (CMCS) Türevlerinin Uygulama Alanları	23
2.7.4. Polihidroksibütirat (PHB)	23
2.8. Kardiyovasküler Teşhis Yöntemi için Kullanılan Ligandlar	24
2.8.1. P- ve E- Selektinler.....	25
2.8.2. VCAM-1 / ICAM-1 Adezyon Molekülleri.....	25
2.8.3. PECAM-1 Adezyon Molekülleri	25
2.8.4. Anneksin-1 / Anneksin-5 Ligand Molekülleri.....	25
2.8.5. İmmunoglobulin-G1 (Ig-G1).....	26
2.9. Partikül Ligand Etkileşimleri.....	26
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	27
3.1. Kimyasallar.....	27
3.2. Demir Nanopartiküllerin Sentezi	27
3.3. Manyetik Kitosan Nanopartiküllerin Sentezi	28

3.4. Karboksimetil Kitosan (CMCS) Nanopartiküllerin Sentezlenmesi.....	30
3.5. Manyetik Karboksimetil Kitosan Nanopartiküllerin Hazırlanması	31
3.6. Manyetik PHB\CMCS Nanopartiküllerin Hazırlanması	32
3.7. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu.....	33
3.7.1. Morfolojik Özelliklerin Belirlenmesi	33
3.7.2. Kimyasal Özelliklerin Belirlenmesi	33
3.7.3. Nanopartikül Boyut Analizi.....	33
3.8. Biyopolimerik NP'lerin Yüzey Modifikasyonu (Ligand Takılması)	34
3.9. Nanopartiküllerin Sitotoksosite Çalışmaları	37
3.10. Biyopolimerik Nanopartikül - Hücre Etkileşimleri (<i>in vitro</i> çalışmalar)	38
3.11. Manyetik Nanopartiküller ile Yapılan <i>in vivo</i> Çalışmalar	39
3.12. İstatistiksel analiz	39
4. DENEYSEL BULGULAR ve TARTIŞMALAR	41
4.1. Manyetik Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu.....	41
4.1.1. Manyetik Demir Oksit Nanopartiküllerin Karakterizasyonu.....	41
4.1.2. Manyetik Kitosan Nanopartiküllerin Karakterizasyonu.....	43
4.1.3. Manyetik Karboksimetil Kitosan Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	46
4.1.3.1. Karboksimetil Kitosan Polimeri Sentezi ve Karakterizasyonu.....	46
4.1.3.2. Manyetik CMCS Nanopartiküllerin Morfolojik Özellikleri	47
4.1.3.3. Manyetik CMCS Nanopartiküllerin Boy-Boy Dağılımına Etki Eden Parametreler.....	48
4.1.3.3.1. Çapraz Bağlanma Derecesinin Manyetik CMCS Nanopartiküllerin Boy- Boy Dağılımına Etkisi	48
4.1.3.3.2. CMCS Polimer Derişiminin Manyetik Karboksimetil Kitosan Nanopartiküllerin Boy-Boy Dağılımına Etkisi	49
4.1.4. Manyetik PHB/CMCS Nanopartiküllerin Karakterizasyonu.....	50
4.1.4.1. Karboksimetil kitosanın Sentezi ve Karakterizasyonu	50

4.1.4.2. Polihidroksibütirat - Karboksimetil Kitosan (PHB-CMCS) NP'lerin Morfolojik Özellikleri	51
4.1.4.3. PHB/CMCS Nanopartiküllerin Boy-Boy Dağılımına Etki Eden Parametreler	52
4.2. Biyopolimerik Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu	54
4.3. Biyopolimerik Nanopartiküllere Ligand Takılması	54
4.4. Biyopolimerik Nanopartikül-Hücre Etkileşimleri	58
4.4.1. L929 Hücreleri Üzerine Farklı Formülasyonlarda Hazırlanan Nanopartiküllerin Sitotoksitesisi	59
4.4.2. Biyopolimerik NP'ler ile Damar Endotel Hücrelerinin (HUVEC) Etkileşimi	62
4.4.3. Biyopolimerik Nanopartiküller ile Düz Kas (A7r5) Hücrelerinin Etkileşimi	66
4.4.4. Biyopolimerik Nanopartikül-Hücre Etkileşimlerinin Mikroskopik İncelenmesi ...	70
4.5. <i>In Vivo</i> Çalışmalar	74
4.5.1. Sıçanlarda Aterosklerotik Plak Oluşturulması	74
4.5.2. Aterosklerotik Plakların MR ile Görüntülenmesi	76
4.5.3. Manyetik Nanopartiküllerin Ateroskleroz Bölgelerinde MR ile Görüntülenmesi	79
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	82
6. KAYNAKLAR	85
ÖZGEÇMİŞ	92

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1. Normal aort duvarı	3
Şekil 2.2. Ateroskleroz oluşumu sırasındaki patolojik değişimler.....	5
Şekil 2.3. Aterosklerotik plak oluşum evreleri	6
Şekil 2.4. Ateroskleroz oluşumu sırasında hücre içi meydana gelen olaylar	7
Şekil 2.5. Damar içi pıhtılaşmanın görüldüğü koroner arter kesit alanı.....	8
Şekil 2.6. Kalp kası hücrelerinde elektrik akımı iletimi	9
Şekil 2.7. Doppler ekokardiyografisi ile alınmış bir görüntü	10
Şekil 2.8. Kalbin sistolik evrelerdeki MR görüntüleri	11
Şekil 2.9. Koroner anjiyografi görüntüleri.....	12
Şekil 2.10. Görüntüleme ve ilaç salım sistemlerinde kullanılan NP çeşitleri	15
Şekil 2.11. Kitinin kimyasal yapısı	17
Şekil 2.12. Kitosana ait yapısal formül.....	18
Şekil 2.13. Kitinden kitosan elde edilmiş şeması	19
Şekil 2.14. O-CMCS sentezlenme şeması	21
Şekil 2.15. N-karboksimetil kitosan sentezi	22
Şekil 2.16. N,O- karboksimetil kitosanın sentez şeması.....	22
Şekil 2.17. Polihidroksibütiratın kimyasal yapısı	23
Şekil 2.18. IgG1 antikoruna ait yapısal gösterim	26
Şekil 3.1. Manyetik demir nanopartiküllerin sentez şeması	28
Şekil 3.2. Manyetik kitosan nanopartiküllerin hazırlanış şeması	29
Şekil 3.3. Karboksimetil kitosan (CMCS) polimeri sentez prosedürü.....	31
Şekil 3.4. PHB-CMCS manyetik nanopartiküllerin hazırlanma prosedürü	32
Şekil 3.5. Ligandların manyetik nanotaşıyıcıya bağlanma mekanizması	35
Şekil 3.6. IgG1 model ligandı ile kitosan partiküllerin etkileşim mekanizması.....	36
Şekil 3.7. IgG1 ligandı ile CMCS nanopartiküllerin etkileşim mekanizması	36

Şekil 3.8. PHB-CMCS nanopartikülleri ile IgG1 ligand etkileşim mekanizması.....	36
Şekil 3.9. Anneksin A1 ve A5 ligandının PHB-CMCS nanotaşıyıcıya bağlanma mekanizması	37
Şekil 4.1. Fe ₃ O ₄ nanopartiküllerin SEM görüntüsü	41
Şekil 4.2. Fe ₃ O ₄ nanopartiküllerin AFM görüntüsü.....	42
Şekil 4.3. NH ₃ derişiminin Fe ₃ O ₄ nanopartiküllerin boy-boy dağılımına etkisi	43
şekil 4.4. Manyetik kitosan nanopartiküllerin SEM fotoğrafı.....	44
şekil 4.5. Manyetik kitosan nanopartiküllerin AFM fotoğrafı.....	44
şekil 4.6. Manyetik kitosan nanopartiküllerin boy-boy dağılımı değerleri	45
Şekil 4.7. Manyetik kitosan nanopartiküllerin farklı çapraz bağlayıcı konsantrasyonuna bağlı boy-boy dağılımı değerleri	46
şekil 4.8. (a) Kitosana ve (b) Karboksimetil kitosan ait FT-IR spektrumları	46
şekil 4.9. Manyetik karboksimetil kitosan nanopartiküllerin SEM fotoğrafı.....	47
Şekil 4.10. CaCl ₂ derişiminin CMCS nanopartikül boy-boy dağılımına etkisi.....	48
şekil 4.11. Karboksimetil kitosan derişiminin karboksimetil kitosan nanopartikül boy-boy dağılımına etkisi.....	49
Şekil 4.12. CMCS polimer (a) ve PHB-CMCS nanopartiküle (b) ait FT-IR spektrumları.....	50
şekil 4.13. PHB- karboksimetil kitosan nanopartiküllerin SEM fotoğrafı	51
şekil 4.14. Homojenizatör hızının partikül boyutuna etkisi	52
Şekil 4.15. Emulsifiyer (PVA) miktarının partikül boyutuna etkisi.....	53
şekil 4.16. Manyetik özelliğe sahip, Fe ₃ O ₄ yüklü nanopartiküllerinin IgG1 ligandına bağlanma %'leri.....	55
şekil 4.17. Manyetik özelliğe sahip olmayan nanopartiküllerin, IgG1 ligandı ile bağlanma %'leri.....	55
Şekil 4.18. PHB-CMCS Nanopartiküllerinin Anneksin A1 ligandına bağlanma %'leri	56
Şekil 4.19. PHB-CMCS Nanopartiküllerinin Anneksin A5 ligandına bağlanma %'leri	56
Şekil 4.20. Nanopartikül-L929 hücre etkileşimlerine Anneksin A5 ve IgG1 etkisi	59
Şekil 4.21. Nanopartikül-L929 hücre etkileşimlerine Anneksin A1 VE IgG1 etkisi	60
Şekil 4.22. Nanopartikül-L929 hücre etkileşimlerine IgG1 etkisi.....	61

Şekil 4.23. PHB-CMCS NP-HUVEC hücre etkileşimlerine anneksin A1 etkisi	62
Şekil 4.24. PHB-CMCS NP-HUVEC etkileşimlerine Anneksin A5 ve IgG1 etkisi.....	63
Şekil 4.25. CMCS ve mag-CMCS Nanopartikül-HUVEC etkileşimlerine IgG1 etkisi .	64
Şekil 4.26. CS ve mag-CS Nanopartikül-HUVEC etkileşimlerine IgG1 etkisi.....	65
Şekil 4.27. Fe ₃ O ₄ Nanopartikül-HUVEC etkileşimlerine IgG1 etkisi.....	66
Şekil 4.28. PHB-CMCS NP-düz kas hücre etkileşimlerine Anneksin A1 etkisi	66
Şekil 4.29. PHB-CMCS Nanopartikül-düz kas hücre etkileşimlerine Anneksin A5 ve IgG1 etkisi	67
Şekil 4.30. CMCS Nanopartikül-düz kas hücre etkileşimlerine IgG1 etkisi.....	68
Şekil 4.31. CS Nanopartikül-düz kas hücre etkileşimlerine IgG1 etkisi.....	69
Şekil 4.32. Fe ₃ O ₄ Nanopartikül-düz kas hücre etkileşimlerine IgG1 etkisi	70
Şekil 4.33. PHB-CMCS-Mag (Anneksin A5) HUVEC (normal ışık mikroskobu)	70
Şekil 4.34. PHB-CMCS-Mag (Anneksin A5) HUVEC (fluoresans mikroskobu)	71
Şekil 4.35. PHB-CMCS-Mag (IgG1) HUVEC (normal ışık mikroskobu).....	71
Şekil 4.36. PHB-CMCS-Mag (IgG1) HUVEC (fluoresans mikroskobu).....	72
Şekil 4.37. PHB-CMCS-Mag (A5) düz kas hücresi (normal ışık mikroskobu).....	72
Şekil 4.38. PHB-CMCS-Mag (A5) düz kas hücresi (fluoresans mikroskobu).....	73
Şekil 4.39. PHB-CMCS-Mag (IgG1) düz kas hücresi (normal ışık mikroskobu)	73
Şekil 4.40. PHB-CMCS-Mag (IgG1) düz kas hücresi (fluoresans mikroskobu)	74
Şekil 4.41. Standart sıçan yemi (a) ve %1 hayvansal yağ katkılı standart sıçan yemi (b) ile beslenen sıçanların sagittal MRG fotoğrafları	76
Şekil 4.42. A: sıçan aortuna yönelik olarak yapılan kontrastsız MR görüntüleri; B: karaciğer kubbesi düzeyinden geçen aksiyel t1 ağırlıklı görüntüleri; C: abdominal aort ve duvarı t1a görüntüleri.....	77
Şekil 4.43. %1 Hayvansal yağ ile beslenen (a) ve standart sıçan yemi ile beslenen sıçanların (b) MR fotoğrafları.....	78
Şekil 4.44. Negatif kontrol ve obez kontrol T1 ağırlıklı koronal 3B-space fotoğrafları	80
Şekil 4.45. Partikül verilmiş bir deneğin, koronal planda gradyent eko T1 ve turbo spin-eko T2 ağırlıklı MR görüntüleri.....	81

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Çizelge 2.1. Endotel hücre adezyon molekülleri ve özellikleri	24
Çizelge 3.1. Sekiz hafta boyunca % 1 hayvansal yağ katkılı standart sıçan yemi ile beslenmiş sıçanların grupları.....	40
Çizelge 4.1. CMCS ve Polihidroksibütirat' in FT-IR spektrumlarında görülen karakteristik pikler.....	51
çizelge 4.2. Ligand bağlanma deneylerinde kullanılan nanopartiküllerin boy-boy dağılımları.....	57
Çizelge 4.3. Sekiz hafta süresince %1 hayvansal yağ katkılı standart sıçan yemi ile beslenen sıçanların, diyet öncesi ve sonrası kan lipid değerleri	75
çizelge 4.4. Sekiz hafta süresince %1 hayvansal yağ katkılı standart sıçan yemi ile beslenen sıçanların, kilo alımları	75

SİMGELER VE KISALTMALAR

CS	: Kitosan
CMCS	: Karboksimetil Kitosan
PHB	: Poli [R-3-hidroksibütirat], P (3HB)
PHB-CMCS	: Polihidroksibütirat – Karboksimetil Kitosan
Ig-G1	: İmmünoglobulin G1
A-5	: Anneksin 5
A-1	: Anneksin 1
HDL	: Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
LDL	: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
VLDL	: Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
Ox-LDL	: Okside LDL
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
TEM	: Geçişli Elektron Mikroskobu
AFM	: Atomik Kuvvet Mikroskobu
FT-IR	: Fourier Transform Infrared Spektrometresi
MR	: Manyetik Rezonans
MRG	: Manyetik Rezonans Görüntüleme
TPP	: Tripoli fosfat
MES	: 2-(N-Morpholino) Etan Sülfonik Asit
EDC	: 1-Etil-3-(3-dimetil-aminopropil)-karbodiimid HCl
PBS	: Fosfat Tampon Çözeltisi
HUVEC	: İnsan Umbilikal Veni Endotel Hücreleri
NP	: Nanopartikül
MNP	: Manyetik Nanopartikül
PDI	: Çoklu Dağılım İndeksi

1. GİRİŞ

Aterosklerotik koroner damar hastalığı, damarların iç yüzeyinde bulunan düz kas hücrelerinin proliferasyonuna ve lipid depolanmasına bağlı olarak, orta ve büyük çapta koroner arterlerin daralmasının başlıca nedeni olarak tanımlanabilir [1].

Bugün, Birleşik Devletlerde ve pek çok gelişmekte olan ülkelerde üzerinde araştırma yapılmasını bu denli tetikleyen ve en iyi nasıl kontrol edilebilir sorusuna yanıt arayışı içinde olunan; aterosklerozdan daha fazla insan ölümünden sorumlu tutulan başka bir hastalık yoktur [2].

Türk Kardiyoloji Derneği'nin öncülüğünde 1990 yılından beri yürütülen TEKHARF (Türk Erişkinlerinde Kalp Hastalığı ve Risk Faktörleri) çalışmasının 12 yıllık verilerine göre, ülkemizde 2 milyon koroner kalp hastasının bulunduğu ve yılda 160 bin yurttaşımızın koroner kalp hastalıkları nedeni ile öldüğü tahmin edilmektedir. TEKHARF çalışması, erişkinlerde yıllık koroner kalp hastalığı mortalitesini erkeklerde binde 5.2, kadınlarda binde 3.2 olarak bulmuştur. Her 8 ölümden birinin nedeni belirlenememiş, nedeni bilinenler arasında koroner kalp hastalığı ölümü % 42.5'lik bir pay ile başı çekmiş, onu % 24'lük oranla kanser ve % 12'lik bir oranla da serebrovasküler olay nedenli ölümler takip etmiştir [3].

Nanoteknolojinin tıp alanındaki uygulamalarına bakıldığında ise, başta nanomalzemelerin teşhis ve tedavi amaçlı olarak kullanımı olmak üzere nanoelektronik biyosensörler ve bireysel tıp uygulamalarına imkan verecek moleküler nanoteknoloji gibi alanları içerisinde barındırdığı görülmektedir. Nanotıp alanında yapılan çalışmaların önemli bir bölümünü erken teşhise olanak sağlayan, yüksek hassasiyete ve dokuya hedeflenebilir özelliklere sahip nanoparçacıkların geliştirilmesi oluşturmaktadır.

Nanoparçacıklara istenilen yüzey modifikasyonlarının uygulanabilmesi sayesinde, parçacıklara biyotaklit özelliği kazandırılabilir. Bu sayede nanotaşıyıcıların yalnızca belirli bir bölgeye, belirli bir damara ya da belirli bir çevreye hedeflendirilmesi mümkün olabilmektedir [4]. Sağladığı bu avantajlar ile nanopartiküllerin, uygun biyoışaretçiler (ligandlar) ile modifiye edilerek; insan ölümlerinde başı çeken ve belirli bir noktaya gelmeden sağlıklı bulgular elde edilemeyen, kardiyovasküler

sistem rahatsızlıklarının erken teşhisinde kullanımının, umut vaat edici olduğu düşünülmektedir.

Damar içerisinde rahatça dolaşıma imkan tanıyan küçük boyutları, biyobozunur olmaları ve toksisitelerinin düşük oluşu gibi özellikleri; nanotaşıyıcıların pek çok tıbbi araştırma-geliştirme çalışmalarında olduğu gibi kardiyoloji alanında da tercih edilme sebebidir. Bu çalışmada, ateroskleroz endotelinde oluşan lezyonlara yönelik hedeflendirme çalışmaları yapılmış; kendine has eşsiz özelliklere sahip doğal bir polimer olan kitosan (CS), kitosan türevi ve suda çözünebilen yapısı ile biyomedikal uygulamalarda özellikle tercih edilen karboksimetil kitosan (CMCS) ve polihidroksibütirat – karboksimetil kitosan (PHB-CMCS) polimerleri, sahip oldukları düşük toksisite ve kolay modifiye edilebilir oluşları sebebi ile bu çalışmada tercih edilmiştir.

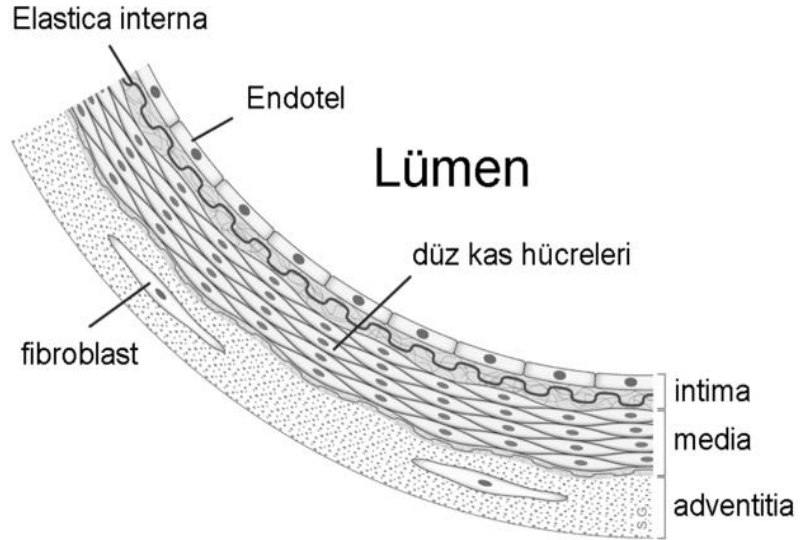
Sunulan tez çalışmasının amacı, aterosklerotik lezyonlarının olduğu bölgelere spesifik, yüzeyleri biyoişaretçilerle modifiye edilmiş manyetik özelliğe sahip nanopartiküllerin hazırlanması, karakterizasyonu ve yapılan *in vitro* – *in vivo* deneyler ile bu partiküllerin çeşitli özelliklerinin araştırılmasıdır. Nanopartiküllerin hazırlanmasında üç farklı polimer (CS, CMCS, PHB-CMCS) kullanılmış ve hastalık için teşhis etkinlikleri araştırılmıştır. Hazırlanan nanopartiküllerin fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi amacı ile taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve atomik kuvvet mikroskobu (AFM) kullanılmıştır. Partiküllerin boyut ölçümleri için Zeta-Sizer cihazından yararlanılmıştır. Partiküllerin “aktif” hedeflendirme çalışmalarında ise yüzeyleri IgG1, Anneksin-5 ve Anneksin-1 ile modifiye edilmiş ve ligand bağlanma etkinliği araştırılmıştır. *In vitro* çalışmalar ile hazırlanan nanopartiküllerin hücre etkileşimleri gerçekleştirilmiş, sonraki adım olan hayvan deneyleri için gerekli sitotoksisite çalışmaları yapılmıştır. Bu aşamada hazırlanan üç tür nanopartikülden bir tanesi seçilerek *in vivo* çalışmalara o partikül ile devam edilmiştir. Tez çalışmasının son basamağında ise, yüzeyleri ligandlar ile modifiye edilen PHB-CMCS nanopartiküllerin, vücut içi aterosklerotik plak etkileşimlerinin araştırılması amacı ile 30 tanesi %1 yağlı diyet ile beslenen, 6 tanesi normal sıçan yemi ile beslenen toplam 36 adet sekiz haftalık Wistar albino ırkı sıçana nanopartiküllerin enjeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Enjeksiyonun olduğu 1. gün ve 3. gün hayvanların aort incelemeleri için MR görüntüleri alınmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ateroskleroz

Dünya üzerinde erişkin insanlarda en önemli mortalite ve morbidite nedeni olan ateroskleroz, patogeneğinde çok karmaşık mekanizmaların rol alması nedeni ile uzun yıllar boyunca aydınlatılması oldukça zor bir alandı. İşlevi sadece kanı iletmek gibi görülen arterler, aslında ateroskleroz gelişiminde etkin role sahip yapılardır. Aterosklerotik lezyonların olduğu bölgeler, intima ve altında belli bölgelerde kalınlaşmalar olarak görülür [5].

Normal aort duvarı; endotel hücrelerini bulunduran intima, düz kas hücrelerini içeren orta tabaka ve aort duvarının beslenmesini sağlayan adventisya kısımlarını içerir (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. Normal aort duvarı; intima, medya ve adventisya kısımlarını içerir [6].

Ateroskleroz arter duvarının intima tabakasındaki değişimlerin eşlik ettiği, lipidlerin, kanın diğer yapı taşlarının ve fibröz dokunun yerel birikiminden doğan değişikliklerin bir kombinasyonu olarak tanımlanır [7].

Esasen yaşlı kişileri etkileyen, uzun yıllar içinde yavaşça ilerleyen ve sonunda kan akımında mekanik etkilerle obstrüksiyona yol açan dejeneratif bir hastalıktır. Kardiyovasküler hastalıklar, komplikasyonları ile birlikte gelişmiş dünyada insanların yaşam kalitesini düşüren ve ölüm oranları açısından bakıldığında ilk sırayı alan hastalık türleridir ve majör 4 hastalık grubunu içerir. Bu hastalıklar şunlardır:

- 1) Koroner kalp hastalığı (Miyokart enfarktüsü, anjina pectoris, kalp yetersizliği ve koroner ölüm)
- 2) Serebrovasküler hastalıklar (Strok ve geçici iskemik atak)
- 3) Periferik arter hastalığı
- 4) Aortik ateroskleroz (Torasik veya abdominal aort anevrizması)

2002'de yayınlanan "National Cholesterol Education Program" koroner dışı aterosklerotik hastalığı olanların kardiyak olay geçirme riskinin koroner kalp hastalığı olanlarla aynı olduğunu belirtmiş ve bu hastalıkları koroner kalp hastalığı eşdeğerleri olarak kabul etmiştir.

Kardiyovasküler hastalıklar genel popülasyonda yaygın olarak görülür ve özellikle 60 yaş üstü erişkinleri daha fazla etkilemektedir. Amerika Birleşik Devletlerinde ve gelişmekte olan ülkelerde bugün, aterosklerozdan başka, insan ölümlerinden bu kadar sorumlu tutulan, üzerinde araştırmaya ihtiyaç duyulan ve kontrolünün nasıl sağlanacağı konusunda tartışmalar yürütülen başka bir hastalık yoktur [8]. Her yıl dünya genelinde 19 milyondan fazla insanın akut kardiyak olay (akut koroner sendrom veya ani kardiyak ölüm) geçirdiği tahmin edilmektedir. Bu sayı ABD'de 1 milyon, Türkiye'de 300.000'den fazladır [7] [9].

2.2. Ateroskleroz Risk Faktörleri

Ateroskleroz, patogenezinde çevresel ve genetik faktörlerin rol aldığı ve büyük arterlerde fibröz elemanların ve lipitlerin birikimi ile karakterize bir hastalıktır [10].

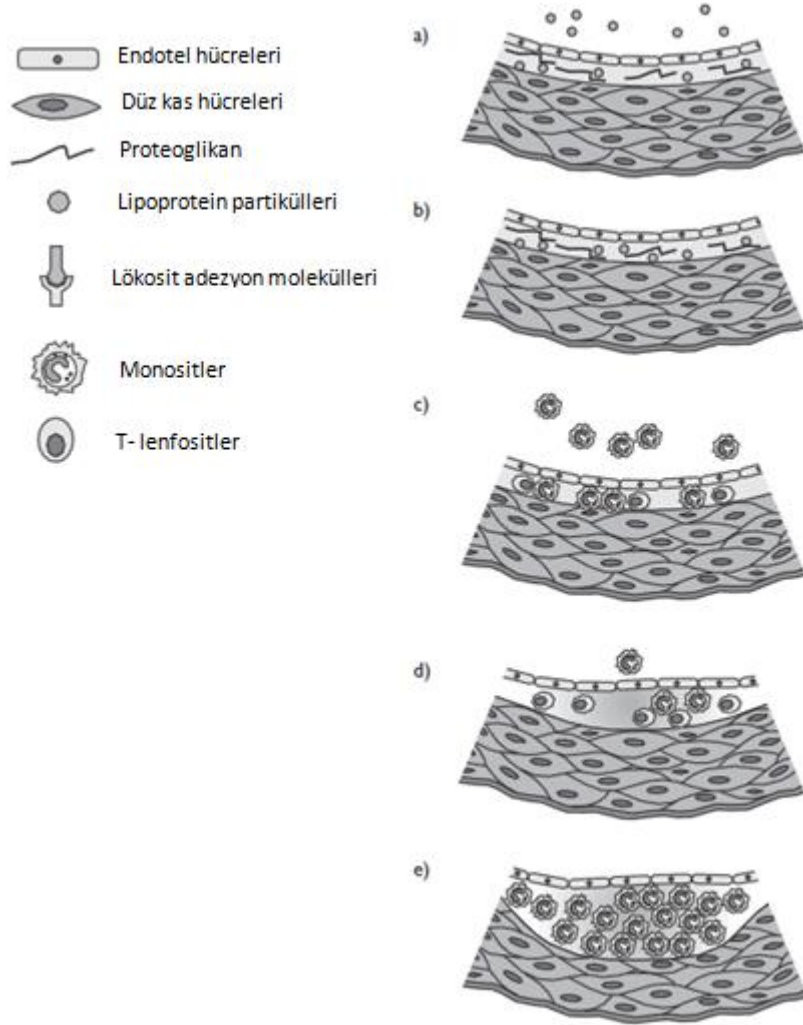
Çevre ve gen etkileşimi sonucunda ortaya çıkan aterosklerotik damar hastalığı, genetik eğilimi olan kişilerde çevresel risk faktörleri tetiği çekerek proinflamatuvar bir yanıt başlatır. Yapılan araştırmalar da, sigara, kolesterol, hipertansiyon, diabetes mellitus, obezite gibi risk faktörlerinin ateroskleroz gelişiminde rolleri olduğu kanıtlanmıştır [11].

DeneySEL çalışmalar ise bu risk faktörlerinin genel inflamatuvar bir yanıt başlatarak vücutta yaygın bir reaksiyon oluşturduğunu göstermiştir.

Aterojenik lipoproteinler, aterosklerotik plakların başlangıcında ve gelişiminde önemli role sahiptirler. Kan plazmasında bulunan düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) kolesterolünün seviyesindeki düşüş, miyokardiyal enfarktüs ve diğer pek çok kardiyovasküler komplikasyonların oluşum riskini azalttığı görüşü bugün hala "lipid hipotezi" olarak bilinen bir dogmadır [12].

2.3. Ateroskleroz Patolojisi (Patogenezi)

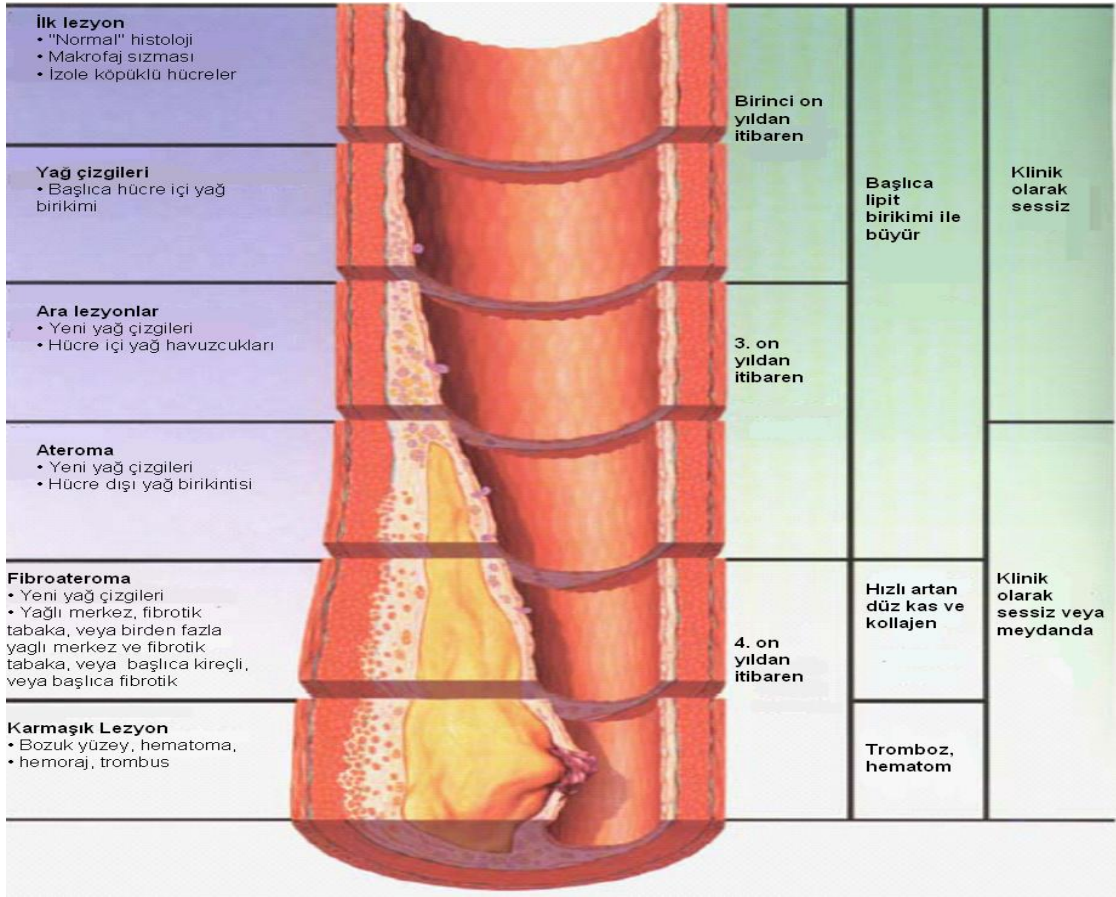
Ateroskleroz, arter intimasında plazmadan kaynaklanan aterojenik lipoprotein birikmesine karşı gelişen karmaşık bir inflamatuvar- fibroproliferatif yanıttır [13].



Şekil 2.2. Ateroskleroz oluşumu sırasındaki patolojik değişimler [14].

Damar yollarının daralma veya tıkanmasına neden olan aterotrombotik plakların başlıca bileşenleri şöyle sıralanabilir; a) içerisinde kollajen, proteoglikanlar ve fibronektin elastik fiberler içeren ekstraselüler matriks, b) kolesterol kristalleri, kolesterol esterleri ve fosfolipidler, c) monosit türevi makrofajlar, T-lenfositler ve düz kas hücreleri, d) fibrin atıkları, pıhtı hücreleri gibi trombotik materyaller [15]. Ateroskleroz oluşumu sırasında damarda görülen patolojik değişimler Şekil 2.2. ve 2.3.'te görülmektedir.

Bir damarın kesiti alınacak olursa kanın aktığı alan damar lümeni olup; endotel kısmı, bu damarın iç yüzeyini oluşturan ve kanla temas halinde olan bölümdür. Damarı oluşturan bölümlerden ilki olan intima, Şekil 2.1.'de görüldüğü gibi birbiri üzerine düzenli aralıklarla yapışmış hücrelerin topluluğu olan endotel tabakasını içerir. Onun altında ise düz kas hücrelerinin yer aldığı medya kısmı bulunur. Üçüncü damar katmanı olan adventisya ise bağ dokusundan oluşmuştur ve onu besleyen küçük damarlar içerir [1].

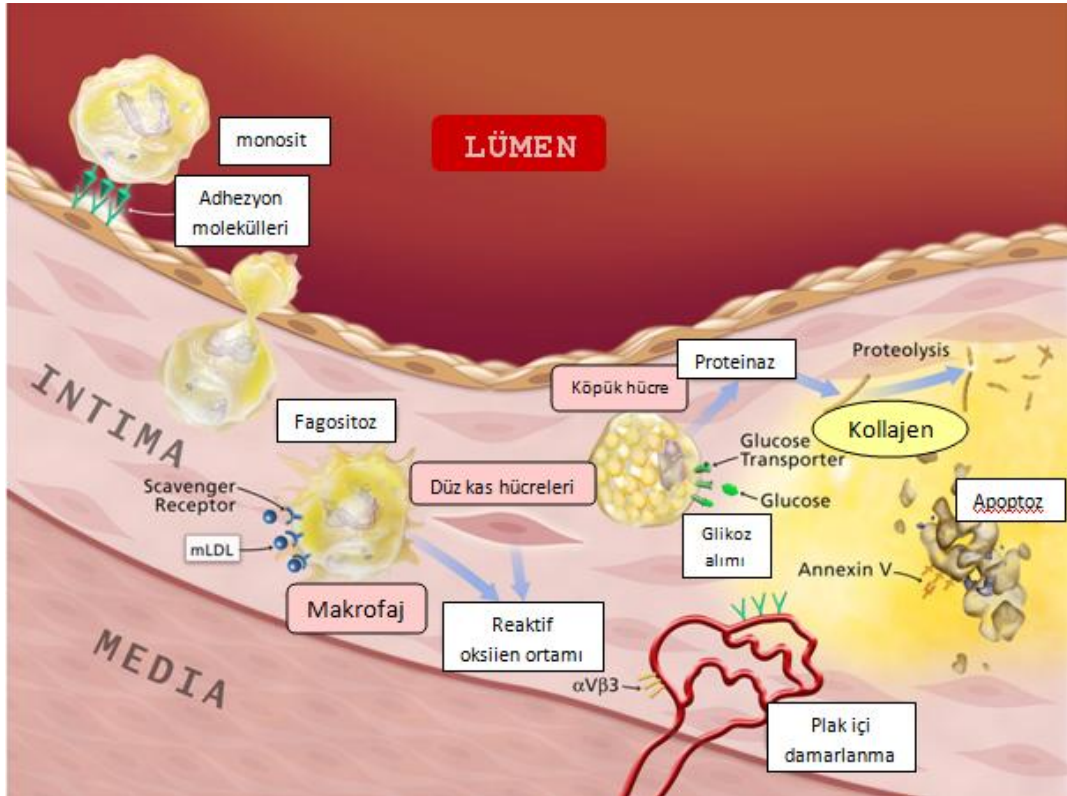


Şekil 2.3. Aterosklerotik plak oluşum evreleri [16].

Aterosklerozda ilk lezyon oluşumu, endotelin bozulması ile başlar. Parlak ve kaygan bir yapıya sahip olan endotelin üzerinde hücrelerin tutunmasını ve büyümesini önleyen maddeler bulunmaktadır. Fakat, endotelin hasar görmesi nedeni ile bu maddeler de etkinliğini yitirmeye başlar. Ateroskleroz Risk Faktörleri Bölümü'nde de bahsedildiği üzere, endotel bütünlüğünün bozulmasında; şeker hastalığı, hipertansiyon, okside LDL'ler gibi faktörlerin etkili olduğu bilinmektedir.

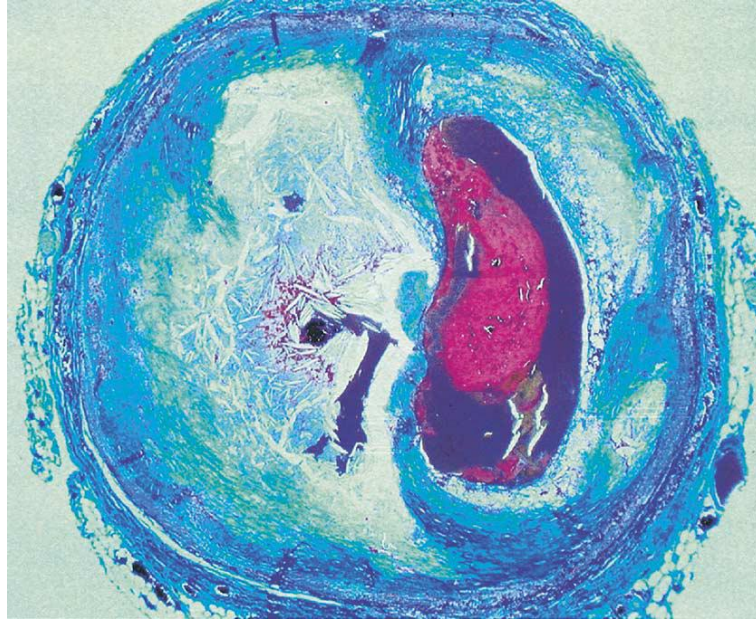
Ateroskleroz patogenezinden bahsederken endotel üzerinde durmak mantıklı olacaktır. Çünkü endotel, bugün aterosklerozdaki karmaşanın, ateroskleroz sorununun çözüldüğü tek yerdir [1].

Sanılanın aksine, ateroskleroz geç yaşların hastalığı değil; 10 yaşından itibaren lipit yüklü makrofajların damar içerisine nüfuzu ile ilerleyen dönemde ortaya çıkan bir rahatsızlıktır. Kan plazmasında bulunan LDL'nin endotel içerisine sızması ile oluşan ilk evrede endotelde bulunan serbest radikaller nedeni ile LDL'nin yükseltgenmesi ve okside LDL (ox-LDL) oluşumu görülür. Damar duvarında meydana gelen hasar enflamasyona neden olur. Bir akyuvar türü olan monositler, arter endotelinden geçerek değişime uğrar ve makrofaj hücrelerine dönüşürler. Makrofaj hücrelerinin okside LDL'leri yutması ile aterosklerotik plak oluşumuna neden olan köpük hücreler meydana gelir. Köpük hücreleri, beta-VLDL içeren makrofajlar ya da değişime uğramış asetil-LDL (okside LDL gibi) içerebilir [17]. Köpük hücrelerinin bir süre sonra, Şekil 2.4.'te görüldüğü üzere endotel ve düz kas hücreleri arasında apoptoza uğraması, koroner arterde enflamasyonun artışına sebep olur. Mikroskop altında ise bu lezyon artık yağ çizgilenmesi şeklinde görülür.



Şekil 2.4. Ateroskleroz oluşumu sırasında hücre içi meydana gelen olaylar [18].

Ateroskleroz oluşumu, aortadan epikardiyal koroner arterlere dek değişen büyüklükteki sistemik arterleri etkileyebilir. İleri evrelerde çeşitli lezyonlar bir arada görülebilirse de intimal plaklar karakteristik lezyon özelliği taşır. Plaklar daha çok lümen yüzeyi ile LDL gibi partiküllerin arasındaki etkileşim süresinin artmış olduğu dallanma bölgelerine yakın yerleşirler. Bu durum, lipoproteinlerin transendotelial difüzyonunda artışla ve hiperlipidemi varlığında subendotelial matrikste lipid birikiminde artışla ilişkilidir [19] [20]. Şekil 2.5.'te aterosklerotik damar tıkanmasının olduğu damar kesiti görülmektedir.



Şekil 2.5. Damar içi pıhtılaşmanın ve tıkanıklığın yoğun olarak görüldüğü koroner arter kesit alanı. Üç renkli boyayıcı ile yapılan renklendirmede, pıhtılaşmanın olduğu bölge **kırmızı**, kollajenler **mavi** ve lipid bölgesinin **renksiz** olduğu görülmektedir [21].

2.4. Geleneksel Teşhis Yöntemleri

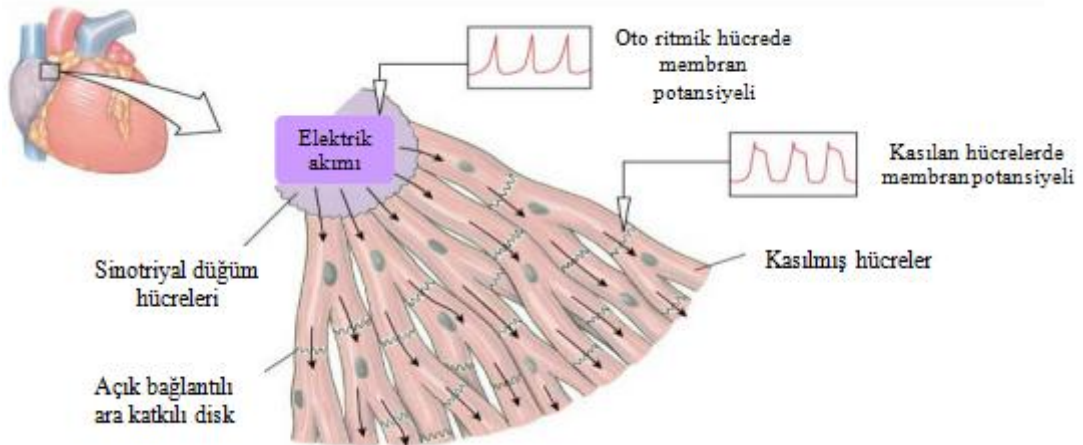
Dünya üzerinde insan ölümlerinde bu derece önemli role sahip olan aterosklerotik rahatsızlıkların en köklü ve etkili tedavisinde, izlenmesi gereken önemli stratejilerin başında; hastalığın çok önceden belirlenebilmesi ve ayrıntılı olarak tanımlanabilmesi olduğu yadsınamaz bir gerçektir. Bu amaçla kullanılan en yaygın teknikler sırasıyla aşağıda belirtilmiştir.

2.4.1. Fiziki muayene

Aterosklerozun teşhisi rutin fiziksel muayene ile konulabilir. Doktorun hastanın boynunda, kasıklarında veya kamındaki steteskop muayenesi sırasında, eğer ateroskleroz yok ise, kalın ve kaba tonda bir kan akışı sesi duyar. Eğer ateroskleroz var ise ve damar daralmışsa bu bölgelerden püskürme sesi duyar. Doktor damardan geçen kan akışı miktarını dirsek, bacak ve ayaktaki pulsasyonu (nabızı) hissederek tahmin edebilir. Bu pulsasyonlardaki azalma kısmi olarak kan akışının tıkanıdığı şüphesini ortaya çıkarır.

2.4.2. Elektrokardiogram (EKG)

Kalbin elektriksel aktivitesi hakkında bilgi almak için kullanılan yöntem, vücut yüzeyinden yapılan ölçümler ile kalp atım hızının tespitinde kullanılır. Yorumlanmasında uzun zamandır birikmiş tecrübeye gereksinim duyulan teşhis yöntemi ile aritminin tanınması ve supraventriküler - ventriküler aritminin ayırt edilmesi sağlanabilir, ayrıca iskemi gibi ciddi koroner arter hastalığı olduğunu bildiğimiz hastalıklarında teşhisi bu yolla mümkündür.



Şekil 2.6. Kalp kası hücrelerinde elektrik akımı iletimi.

EKG'ler kalbin bir tarafındaki tüm bir duvar boyunca devam eden hasarı (Q dalgası, kalp krizi) ayırt edebilir. Yeni bir Q dalgası gösteren EKG, kalp krizinin güçlü bir kanıtıdır. Q dalgası göstermeyen bir kalp krizini gösteren bir EKG'yi yorumlamak daha zordur.

2.4.3. Kardiyak enzimler

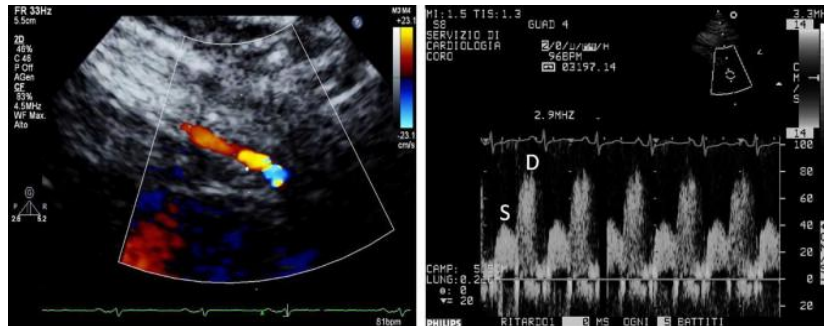
Kardiyak enzim testleri, kalp kası hasar gördüğünde kana boşaltılan belirli kardiyak enzimlerin varlığını tespit eder. Kalp hasarı tespit etmek için en sık olarak aranan iki enzim troponin ve keratin kinaz MB'dir. Troponin, bir kalp krizinden 4 saat sonra kanda tespit edilebilir; keratin kinaz MB 12 ila 24 saat sonra en yoğun düzeyde bulunur. Göğüs ağrısı mevcut bulunan ve EKG'sinde Q dalgası kalp krizi görülen bir kişinin kardiyak enzimlerini ölçmek, zaten kesin olan teşhis hakkında daha fazla bilgi sağlar. EKG'de Q dalgası görülmediğinde teşhis yaparken kardiyak enzimler daha fazla önem kazanmaktadır. Kalp kasının ne kadar hasar gördüğünü belirlemede ise keratin kinaz MB enzim ölçümleri faydalıdır çünkü kalp kasında ne kadar çok hasar, o kadar çok keratin kinaz MB enzim salımına sebep olur.

2.4.4. Egzersiz Stres Testi (EST)

Efor testi, mevcut riskleri yanında yaygın ve güvenle kullanılan bir testtir ve kalp hastalıklarının tanısı ve takibinde çok önemli bir yer tutmaktadır. Efor testi, fiziksel aktiviteye karşı kalp performansının kaydını ve bu yüklenme stres testinin amacı, tıbbi gözetim altında (doktor ya da teknisyen) hastanın kalbini zorlayarak verim sınırlarını öğrenmektir. Bu yöntemle, kalp damarının tıkanıklığı dolaylı olarak öğrenilebilir, hastanın geçirdiği balon anjiyoplastinin ya da by-pass ameliyatının yeterliliği test edilebilir.

2.4.5. Ekokardiyografi (EKO)

Ekokardiyografi kalbin ses dalgaları yolu ile (ultrasound) iç yapısının ve işlevlerinin incelenmesidir. Ses dalgalarının iletilmesini sağlayan bir alet (transdüser) vasıtası ile yapılır. Transdüser göğüs duvarının değişik yerlerine uygulanarak kalbin duvarları ve kapakları değişik pozisyonlarda incelenir.



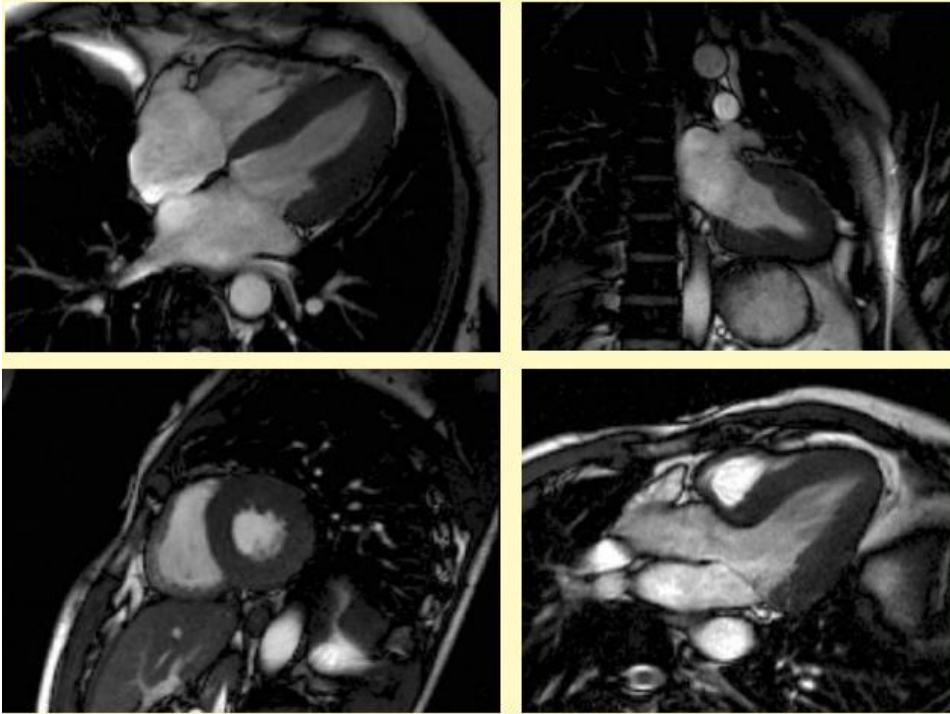
Şekil 2.7. Doppler Ekokardiyografisi ile alınmış bir görüntü; S: sistolik (kasılma) D: diastolik (gevşeme) akış esnasındaki koroner arter sinyalleri [22].

2.4.6. Miyokard Perfüzyon Sintigrafisi (Talyum Testi)

Film için düşük miktarda radyasyon içeren bir radyoaktif ilaç; uygulanacak stres testinin sonunda (egzersiz veya farmakolojik) damar yoluyla enjekte edilir. Radyoaktif ilaç kan akımı yoluyla koroner arterlere ve oradan kalp kasına ulaşır. Ardından özel bir kamera yardımıyla verilen radyoaktif maddenin kalpte nasıl dağıldığını gösteren görüntüler elde edilir. Görüntüler bir bilgisayar yardımıyla düzenlenerek, değerlendirilir.

2.4.7. Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG)

Manyetik rezonans görüntüleme, genel olarak hidrojen atomları çekirdeklerinin manyetik özelliklerine bağlı olarak geliştirilmiş bir sistemdir. Bu sistemde hasta, oldukça yüksek manyetik alan bulunan mekanizmanın merkezine yerleştirilir ki, hastanın vücudunda bulunan protonların, bu manyetik alanla etkileşime geçebilmesi mümkün olabilsin [23].



Şekil 2.8. Kalbin sistolik evrelerdeki MR görüntüleri; miyokardiyal kas ile kalbin odacıklarında bulunan kan arasında yüksek kontrast görüntülenmiştir [23].

MR görüntüleme sistemi ile vücudun tüm doku ve organlarından radyasyon kullanılmaksızın ayrıntılı görüntüleme yapılabilmektedir. Temel çalışma prensibi bir

manyetik alan içerisinde insan vücuduna radyo dalgaları gönderilmesi ve buna cevap olarak alınan sinyallerin bilgisayar yardımıyla görüntüye dönüştürülmesidir. Alıcılara ulaşan sinyaller bilgisayar analizleriyle siyah beyaz görüntülere (Perfüzyon görüntülemelerde sonuçlar renklendirilebilir) dönüştürülür. Bu amaçla kullanılan manyetik alan 1 - 1,5 Tesla aralığındadır [24].

2.4.8. Bilgisayarlı Kesit Tomografisi (CAT)

X-ışını kullanarak vücudun kesit şeklinde görüntülerini elde etmeyi sağlayan radyolojik teşhis yöntemidir. Bu yöntem, vücudun ince bir kesitinden (1,5-12 mm arasında değişir) zayıflamaların dedektörlerle ölçülerek bilgisayar yardımıyla görüntü oluşturma temeline dayanır. Ülkemizde ilk defa 1975 yılında Hacettepe Üniversitesi'nde uygulanmaya başlanan bu yöntem "Bilgisayarlı Beyin Tomografisi" (BBT) adı verilmiştir. Dokulardaki yoğunluk farkını çok iyi saptar. Bir röntgen üzerindeki yoğunluk farklılığı yaklaşık 20 iken BT'de 2000 veya daha fazladır. Bu nedenle röntgenle seçilemeyen ödem vb. yumuşak doku yoğunlukları BT'de çok iyi görüntülenir.

2.4.9. Koroner Anjiyografi

Koroner anjiyografi; koroner arterlerde aterosklerotik hastalık olup olmadığını anatomik olarak gösteren, tedavinin çeşidinin planlanmasında ve uygulanmasında kullanılan en güvenilir ve hala altın standart olmaya devam eden bir yöntemdir. Koroner anjiyografi periferik bir arterden yerleştirilen kateterin, koroner arterin orjinine kadar ilerletilmesi ve kateterin içerisinden verilen radyopak maddelerle x-ray altında koroner arter lümen anatomisinin radyografik olarak görüntülenmesi yöntemidir.



Şekil 2.9. Koroner anjiyografi görüntüleri [25].

Lezyonlar sağ koroner, sol ön inen dal ve sol sirkumfleks arterde % 70'den fazla ise, sol ana koroner arterde % 50'den fazla ise ciddi kabul edilirler. Bu lezyonlar kullanılan kateterin çapına oranlanarak mevcut olan darlığın ciddiyeti yönünden değerlendirilir.

2.4.10. Ultrason Görüntüleme (USG)

Ekokardiyografi ve vasküler ultrason yöntemleri, bir dönüştürücü vasıtası ile kardiyovasküler sistemlerin çok boyutlu olarak incelenmesine, hatta günümüzde üç boyutlu görüntü alınmasına imkan tanır. Vasküler ultrasonografi, periferel arterlerdeki damar trombozu, darlık ve yetersizliğin anlaşılmasında kullanılır [26].

2.4.11. Pozitron Emisyon Tomografi (PET)

Pozitron emisyon tomografi, memeli biyolojisindeki biyokimyasal süreçlerin izlenmesini ve çeşitli ölçümlerin alınmasını sağlayan gelişmiş analitik bir görüntüleme cihazıdır. Sistemde kullanılan pozitronlar, radyoizotopları yayan işaretlenmiş bileşiklerdir. Pozitron emisyon tomografisinden direkt olarak kimyasal analizin yapılması mümkün olmadığından bu işaretli moleküllerin kullanılması gerekmektedir [27].

2.5. Nanoteknoloji

Çok eski zamanlardan beri var olmasına rağmen, nanoteknolojinin keşfedilmesinin "*There's Plenty of Room at the Bottom*" adlı makalesi ile Amerikalı Fizikçi ve Nobel ödülü sahibi, Dr. Richard Philip Feynman tarafından olduğu dünyaca kabul görmüştür [28].

Nanoteknoloji içerisinde fizik, kimya, biyoloji, mühendislik, elektronik, tıbbi bilimleri barındıran ve bunların birbiri ile entegrasyonunu sağlayan multidisipliner bir alandır. Nanoteknolojiyi açıklarken bahsedilmesi gereken iki ana yaklaşım vardır, bunlar; "yukarıdan aşağıya (top-down)" ve "aşağıdan yukarıya (bottom-up)" yaklaşımlarıdır [28]. Bu iki yaklaşım şu şekilde özetlenebilir:

1) Bottom-up: Aşağıdan yukarıya yaklaşımı (küçükten büyüğe), moleküler düzeyde nanoteknolojiyi belirtir ve organik veya inorganik yapıları, maddenin en temel birimi olan atomlardan başlayarak atom atom, molekül molekül inşa edilmesini ifade eder.

2) Top-down: Yukarıdan aşağıya yaklaşımı (büyükten küçüğe) ise makineler, çeşitli kimyasallar ve mekanik yöntemlerin kullanılması ile nanofabrikasyonu ifade eder.

Teknolojinin bugünkü seviyesi sebebi ile yapılan çalışmaların birçoğu yukarıdan aşağıya (top-down) klasmanında değerlendirilir.

Kimyasal ve fiziksel özellikler yapının büyüklüğüne ve atom yapısının ayrıntılarına, dışarıdan sisteme bağlanan yabancı bir atomun cinsine ve yerine göre çok farklı ve olağanüstü davranışlar sergilemektedir. Nanobilim, nanometre ölçeğinde ortaya çıkan bu davranışları kuantum kuramı ile anlamamızı sağlarken; nanoteknoloji ise yeni nano yapıların tasarlanıp sentezlenmesine olanak sağlar ya da var olan nano yapılara yeni olağanüstü özellikler kazandırmayı ve bu özelliklerin farklı alanlarda kullanılmasını amaçlar [29].

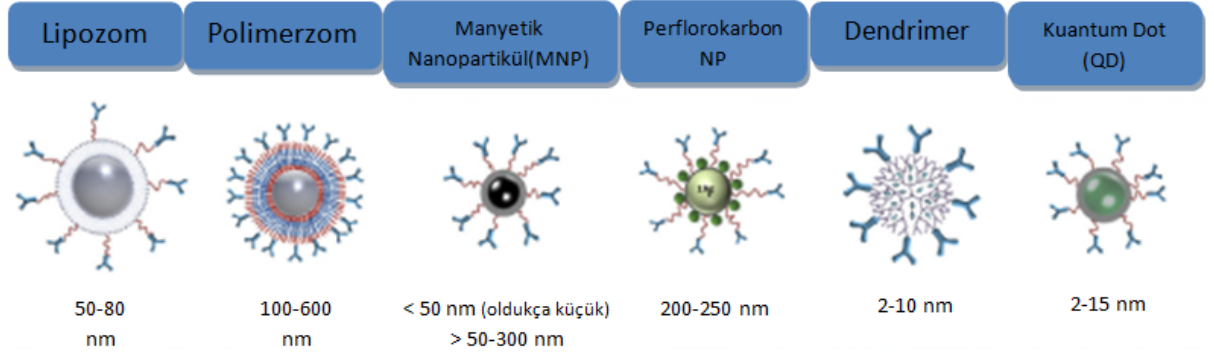
Nanoteknoloji, günümüzde oldukça yaygın kullanım alanına sahiptir. Bu alanlara örnek olarak, fiber ve tekstil alanları, ziraat, elektronik, adli tıp, uzay ve medikal alanları verilebilir [30].

2.6. Nanopartiküller

Nanopartiküller genellikle doğal ya da sentetik polimerlerden elde edilen, boyutları 100 nm civarında olan katı ve dairesel formda yapılardır. Hidrofobik ve hidrofilik olmak üzere çok çeşitli küçük ilaçlar, aşular ve biyolojik makromoleküllerin vücut içerisinde salımı nanopartiküller sayesinde sağlanabilmektedir. Ayrıca nanopartiküller, özel organlara ve hücrelere hedefleme yapılmasına, kontrollü ilaç salım çalışmalarına da imkân vermektedirler [31].

Nanopartiküllerin sentez aşamalarında da yine nanoteknoloji bölümü içerisinde bahsedilmiş olan top-down ve bottom-up stratejilerinden bahsetmek mümkündür. "Top-down" yani yukarıdan aşağıya metodunda, çeşitli materyallerin karışımı ile elde edilen büyük miktardaki yapıların küçültülerek nanoboyuta getirilmesi ön planda iken, "bottom-up" aşağıdan yukarı stratejisinde atom ve moleküllerin bir araya gelerek nanometre ölçeğindeki moleküler yapıları oluşturmaları söz konusudur. Günümüzde yapılan çalışmaların pek çoğunda nanopartiküllerin biyolojik ve kimyasal sentezi sırasında yukarıdan aşağı metodunun yaygın olarak kullanıldığı görülmektedir [32].

Farklı yapısal ve boyut özelliklerine sahip nanopartiküller, Şekil 2.10'da görülmektedir.



Şekil 2.10. Görüntüleme ve ilaç salım sistemlerinde kullanılan NP çeşitleri [33].

Nanopartiküllerin sahip olduğu;

- Oldukça düşük toksisite
- Kolay hazırlanış
- Standart görüntüleme yöntemleri ile yerlerinin tespit edilebiliyor oluşu
- Vücut içerisindeki yarılanma ömrünün uzun oluşu
- İlaç taşıyıcı sistemlere ek potansiyel oluşturması

gibi özellikleri, onların nanotıp alanında yapılan çalışmalarda büyük ilgi görmesine neden olur [34].

Bugün pek çok terapötik taşıyıcının başarılı olamamasının asıl nedeni, hedef doku ya da bölgeye ulaşma yeteneğinin sınırlı oluşudur. Nanoteknoloji birçok bilim dalını kapsamakla beraber tıp alanında da oldukça çarpıcı gelişmelere imkân tanımaktadır. İnsan vücudunun içerisine girerek hücre seviyesinde onarım sağlayan mikroskobik robotlar, yine nanopartiküllerin kendine has özellikleri sayesinde, insan vücudundaki hastalıkları çok önceden saptayarak erken tedavi olanağı sağlaması ve kanser gibi ölümcül hastalıklarda, belli sıcaklıkta titreşime geçerek kanserli hücrenin parçalanarak yok edilmesi için kullanılması nanotıp alanına sağladığı avantajları arasındadır [34].

2.6.1. Manyetik Nanopartiküller (MNP)

Günümüzde, manyetik nanopartiküller mikro boyuttan nano boyuta kadar değişen boyutları sayesinde tıbbi uygulamalarda kullanılmaktadır. Sahip olduğu yüksek yüzey alanı/hacim oranı, yüzey enerjisi, neredeyse kusursuz oluşu gibi özellikler, manyetik nanopartiküllere; kendine has fiziksel, kimyasal, elektronik, mekanik,

manyetik vb. özellikleri kazandırır [32]. Sahip olduğu bu eşsiz özellikler sayesinde manyetik nanopartiküller, her gün gelişmekte olan nanoteknoloji alanında kendisine oldukça yer edinmeye başlamıştır.

MNP'lerin nanotıp alanında dikkat çeken özelliklerinden bazıları şöyle sıralanabilir;

- Enjeksiyon kolaylığı
- Toksisitelerinin oldukça düşük oluşu
- Hedeflenen organ ya da dokuda birikmesi
- Biyouyumlu olması

Önceleri, nikel ve kobalt bileşiklerinden hazırlanan MNP'ler, bu malzemelerden kaynaklı biyolojik dezavantajlar ortaya çıkması sebebi ile daha sonraları ferrik ya da ferröz oksit bileşikleri ile hazırlanmaya başlanmıştır. Dışarıdan uygulanan manyetik alana göre rahatça yönlenebilmesi manyetik nanopartiküllerin teşhis ve tedavi alanlarında kendisine çok sayıda uygulama alanı bulmasına imkan tanımıştır. Bu uygulama alanlarından bazıları; MR görüntülemeye kontrast ajan olarak, kanser tedavilerinde uygulanan hipertermide, doku mühendisliğinde ve son yıllarda ise özellikle kardiyovasküler hastalıkların görüntülenmesinde kullanılmaktadır [35].

2.6.1.1. Manyetik Nanopartiküllerin Kardiyovasküler Uygulamaları

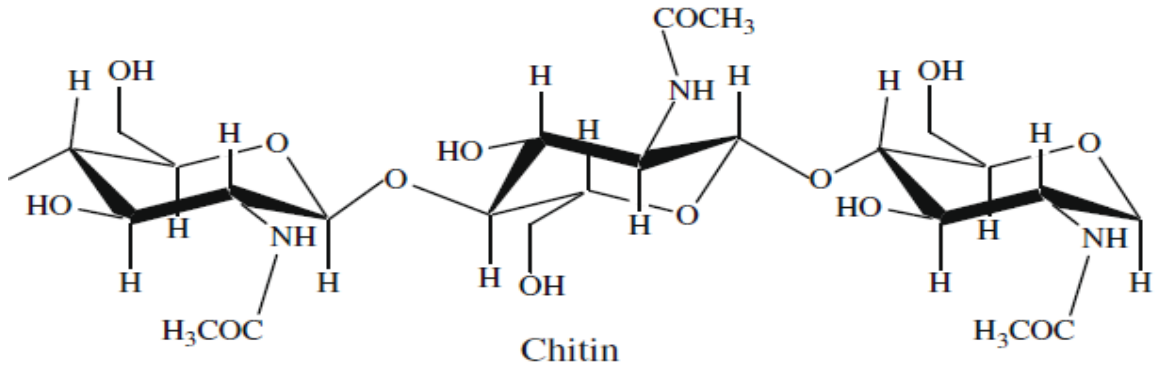
Kardiyovasküler hastalıkların görüntülenmesinde çok önemli bir yere sahip olan manyetik nanopartiküller, süperparamanyetik özelliğe sahip ve merkezinde demir oksit bulunan ve herhangi bir karbonhidrat veya polimerle kaplanmış olan yapılardır. Fiziksel yapıları ve boyutları itibarıyla ayrıca ilaç salım özellikleri sayesinde aterosklerotik plak ve miyokardiyal yaralanmaların hem hücresel hem de moleküler boyutta görüntülenmesinde manyetik nanopartiküllerin kullanımı oldukça uygundur [36] [37]. Kardiyovasküler görüntülemeye kullanılan teknolojilerle karşılaştırıldığında, manyetik nanopartiküllerin sağladığı kullanım avantajları; yüksek boyutlarda ayırıcılık sağlaması, mükemmel yumuşak doku kontrastı ve plak bölgesinde hem anatomik hem de moleküler düzeyde gayet iyi bilgi vermesidir [38].

Manyetik nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan paramanyetik malzemelerin yanı sıra, kaplama ya da kapsülleme malzemesi olarak özellikle polimerik malzemelerin kullanımı oldukça yaygındır. Burada sözü edilen polimerik malzemelerin işlevlerini yerine getirdikten sonra vücuttan atılmaları yapılan çalışmalar kapsamında en büyük avantaj sayılacaktır. Bu nedenle konu ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda biyolojik olarak bozunabilen polimerik malzemeler tercih edilmiştir.

2.7. Nanopartiküllerin Hazırlanmasında Kullanılan Biyopolimerler

2.7.1. Kitin

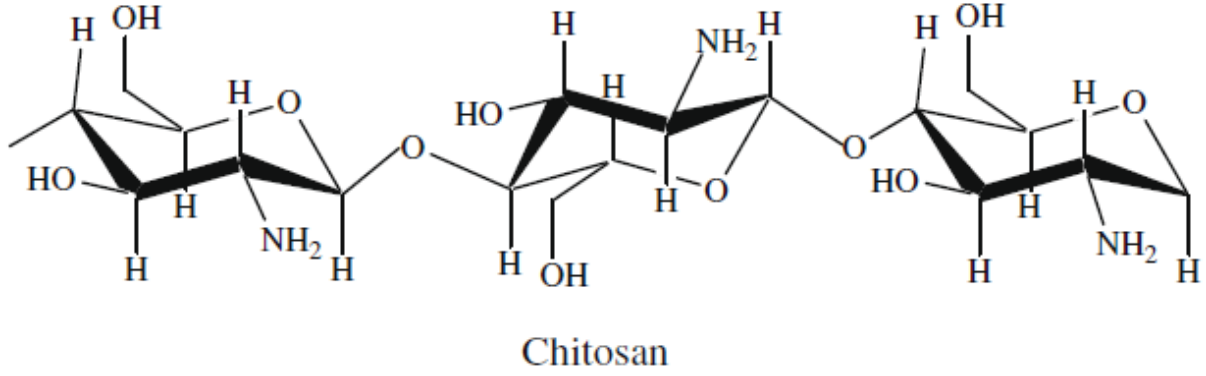
Selülozdan sonra yeryüzünde en fazla bulunan ikinci polisakkarit olarak da tanımlanan kitin, β -1,4- glikozidik bağlara sahip N-asetil-D-glukozamin (GlcNAc) rezidülerinden oluşmuştur [39]. Böceklerin iskeletinde ve mantarların hücre duvarlarının yapısında da bulunan kitin; yengeç, karides gibi su ürünleri kabuklarının ana bileşeni oluşturmaktadır. Kitinin birçok türevi bulunmakla beraber, bunlardan en önemlisi kitosandır. Suda çözünmeyen, beyaz, sert, elastik olmayan ve azot bakımından zengin bir bileşik olan kitin, molekül yapısı olarak da selüloza benzer. Kitinin kimyasal yapısı Şekil 2.11’de görüldüğü gibidir.



Şekil 2.11. Kitinin kimyasal yapısı [30].

2.7.2. Kitosan

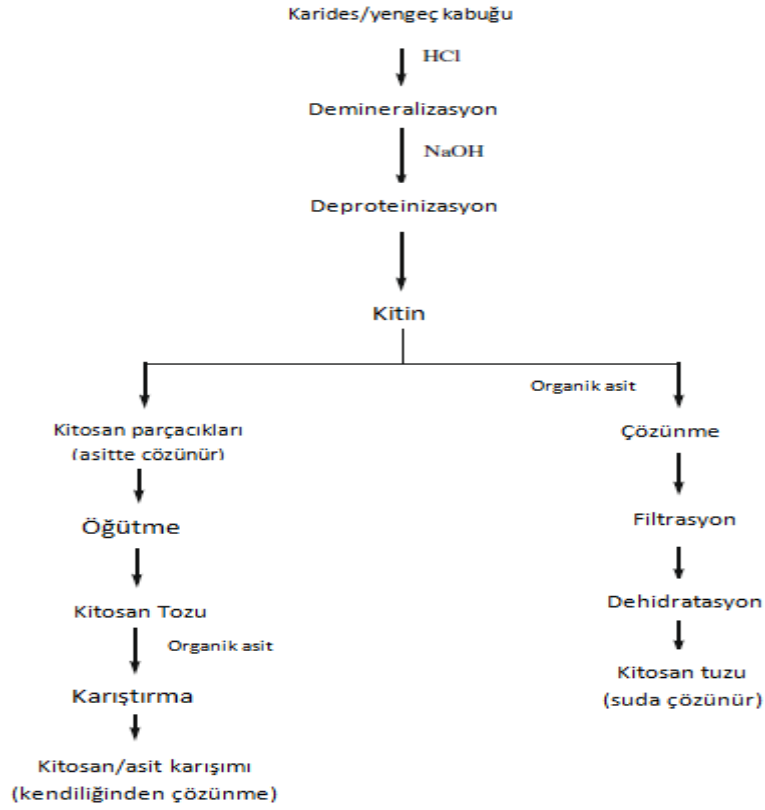
Kitinin deasetilasyonu sonucu elde edilen, 1→4 bağılı 2 - amino, 2 – deoksi, β- D – glukoz (Şekil 2.12) yapısında olan kitosan, doğal bir polisakkarittir [40].



Şekil 2.12. Kitosana ait yapısal formül [30].

Kitosan, kitin gibi doğada oldukça fazla bulunan bir polisakkarittir. Ucuz ve yüksek elde edilebilirliği olan çevreye ve insanlara zarar vermeyen bir maddedir. Kitosan, birçok organik reaksiyon -tosilleme, alkilleme, karboksilleme, sülfolama, schiff bazı, kuartarner tuz vs.- ile kolayca modifiye olabilen serbest amin gruplarını ve hidroksil gruplarına sahip olduğu için, sentetik polimerlerden oldukça farklı fonksiyonel gruplara sahip polimerlerin sentezlenmesinde, büyük bir potansiyele sahiptir.

Kitinin yüksek sıcaklıkta, sodyum hidroksit veya potasyum hidroksit içeren heterojen ortamda deasetilasyonu sonucu yapı kitosana [β -(1-4) 2-amino-2-deoksi D-glukoz] dönüşür. Buna ilişkin sentez şeması şekil 2.13'te gösterilmiştir.



Şekil 2.13. Kitinden kitosan elde ediliş şeması [30].

Atık suların arıtılmasından yemek ve kozmetik sanayine kadar tıp alanındaki çalışmalar da dahil olmak üzere pek çok alanda kullanımı olan kitosan, sahip olduğu düşük toksisite, ucuzluk, doğada bol miktarda bulunması gibi özellikleri nedeni ile tercih edilmektedir [40].

Yapısındaki amin grupları nedeniyle asidik ortamda çözünür özelliğe sahiptir. Bu çözünürlük, zincir boyunca tekrarlanan grupların dağılımı ile de kontrol edilebilir. Ayrıca yapısındaki serbest amin grupları, kitosana katyonik bir polielektrolit olma özelliği de kazandırmaktadır [41]. Katyonik bir poliamin olan kitosanın özelliklerine etki eden parametreler; deasetilasyon derecesi, molekül ağırlığı, viskozite, çözünürlük ve renk şeklinde sıralanabilmektedir. Kitinin aksine, kitosan sulu asetik asitte çözünmektedir. Kitin ve kitosan türevleri hem tek hücreli canlılarda hem de yüksek organizasyonlu ökaryot organizmalarda enzimatik olarak yıkıma uğrayabilmektedir. Mikroorganizmalardaki kitinaz ve kitozinaz enzimleri ile yüksek organizasyonlu canlılarda lizozomal enzimler, kitin ve kitosanı parçalarlar. Kitosanın lizozomal enzimlerin etkisi ile parçalanabilmesi, bu polimerin farmasötik alanda kullanımı açısından büyük önem taşımaktadır [42].

2.7.2.2. Kitosanın Kullanım Alanları

Kitosan ve kitosan türevi polimerler suların toksik maddelerden arındırılmasından, tıpta yapay deri uygulamalarına kadar çok geniş bir yelpazede kullanım alanı bulmuştur. Bu nedenle atık suların civa, kurşun ve krom gibi ağır metallere arındırılmasında kullanılır. Kitosanın antifungal özelliği nedeniyle çeşitli mikroorganizma enfeksiyonlarına ve parazitlere karşı tarımsal amaçlarla bitkilerin korunmasında önemli bir potansiyele sahiptir. Zayıflatıcı ve kolesterol düşürücü olarak, kozmetik endüstrisinde saç bakım ürünlerinde ve kontakt lens yapımında, fotoğrafçılıkta, tekstilde boya bağlama özelliğinden dolayı ağartıcı olarak, kağıt endüstrisinde selüloz gibi destek materyali olarak, tıp alanında dermatit, pürülan hastalıkların, yara ve yanıkların tedavisinde kitosan ve kitosan türevi bileşiklerinden yararlanılmaktadır. Kitosanın en önemli kullanım alanlarından biri ilaç endüstrisidir. İlaç taşıyıcı materyal olarak hidrojeller, tabletler, granüller ve mikropartiküller, sistemlerin hazırlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Kitosanın ilaç salım sistemlerinde kullanımının araştırıldığı birçok çalışma olmasına rağmen, kitosanın bu alanda kullanımında bazı dezavantajlarının olduğu bilinmektedir. Bu dezavantajlar, kitosanın seyreltik asetik asit hariç birçok organik çözücüde çözünmemesi, düşük mekanik özelliklere sahip olması ve ayrıca fiziksel özelliklerinin pH'a çok bağlı olmasıdır. Bu nedenle kitosanın, bir ilaç taşıyıcısı olarak kullanılması durumunda, özellikle ağızdan ilaç alımında insan vücudunun iç organlarının belirlediği farklı pH değerleri altında ilaç salım davranışının kontrolü zor olmaktadır. Bunun sonucu olarak, ilacın aşırı salımı insan vücudunda hastalığa sebep olabilir. Diğer taraftan, kitosanın başka polimerlerle karıştırılmasıyla modifikasyonu pratik kullanımlarda fiziksel özelliklerinin iyileştirilmesi için uygun ve etkili bir metottür.

2.7.3. Karboksümetil Kitosan (CMCS)

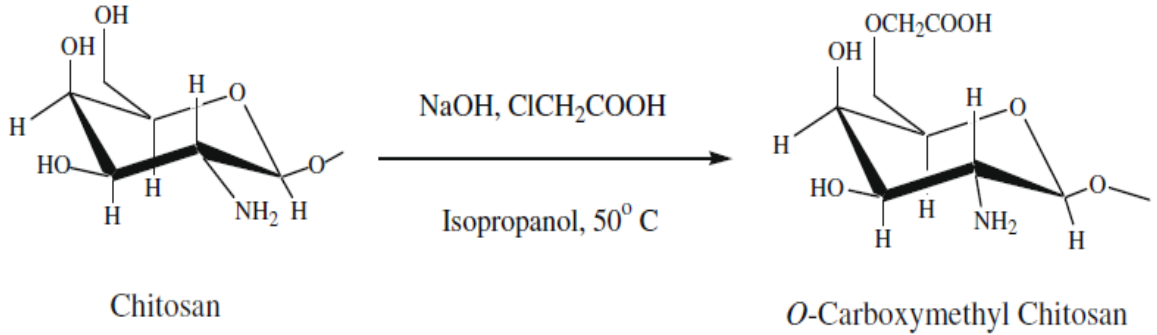
Yalnızca asidik ortamlarda çözünmesi, kitosanın bazı alanlardaki uygulamalarına kısıtlama getirir. Sudaki bu "sınırlı" çözünürlüğün aşılması bir takım kimyasal modifikasyon yöntemleri ile mümkün olabilmektedir [44]. Kimyasal modifikasyon yöntemlerinden en önemlisi ve yaygın olanı karboksimetillemedir. Bu modifikasyonlar sayesinde, polimerin çözünürlüğü, antimikrobiyal aktivitesi ve diğer materyallerle etkileşim yeteneği arttırılabilir [30] [44].

Kitosana çeşitli özelliklerin kazandırılması için yapılan kimyasal modifikasyonlarda, yapıdaki reaktif amino grupları, birincil ve ikincil hidroksil grupları kullanılır. Karboksimetil gibi karboksialkil gruplarının yapıya eklenmesi ile kitosanın hidrofilik özellik kazanması sağlanır [46]. Karboksimetil kitin ve kitosanın N-asetil glukozamin içeren orijinal yapıları, biyoyumluluk, hidrofilisite, biyobozunurluk ve farklı formlar alabilme özelliklerini arttırmaktadır [47]. Diğer suda çözünen kitosan türevleri ile karşılaştırıldığında, karboksimetil kitosan, anyonik ve katyonik gruplar barındıran yapıda ve kolay sentezleniyor oluşu nedeni ile pek çok tercih edilen bir polimerdir [30].

2.7.3.1. Karboksimetil Kitosanın Türevleri

2.7.3.1.1. O-Karboksimetil Kitosan (O-CMCS)

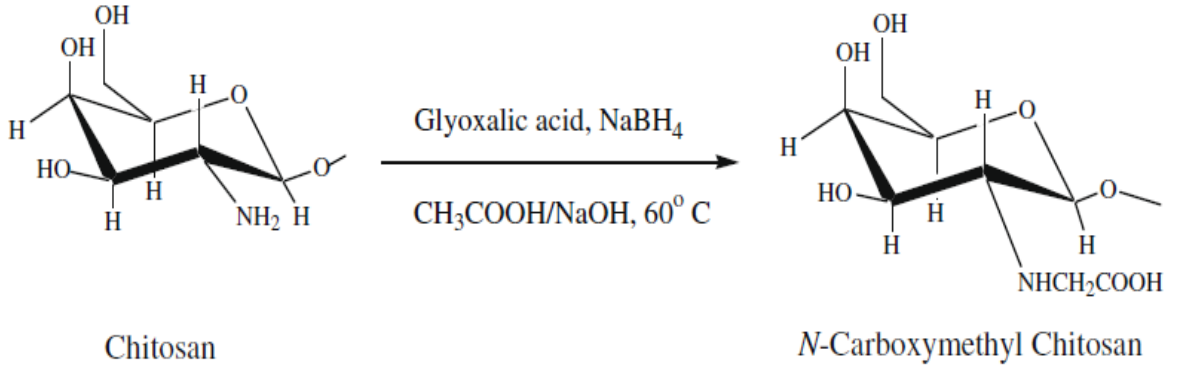
Biyoyumlu, biyobozunur, antibakteriyal oluşu ve toksik özellik taşıması, O-karboksimetil kitosanı biyomedikal uygulamalar açısından oldukça ilgi çekici kılar. Molekül yapısında $-COOH$ ve $-NH_2$ grupları bulunduran O-karboksimetil kitosan, amfiprotik eter türevi bir polimerdir. O-CMCS sentezlenme şeması Şekil.2.14'te gösterilmiştir.



Şekil 2.14. O-CMCh sentezlenme şeması [30].

2.7.3.1.2. *N*-Karboksimetil Kitosan (*N*-CMCS)

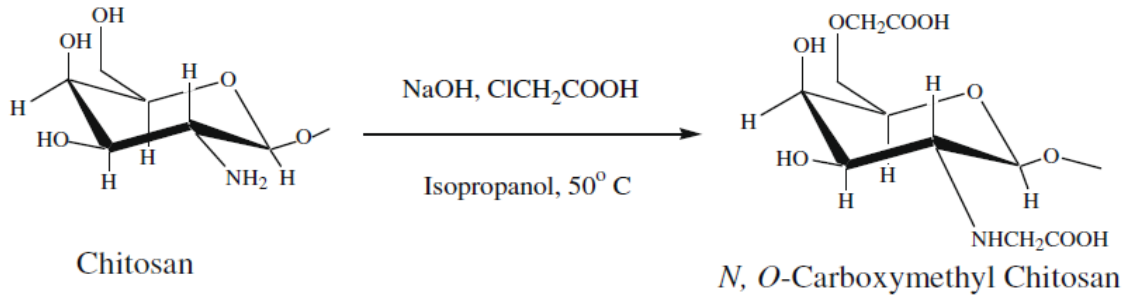
Kitosanın karboksimetillenmesi ile yapının amfiprotik özellikler kazanması sağlanır. Bu özellik *O*-karboksimetil kitosanda ortama monokloroasetik asit eklenmesi ile gerçekleştirilirken *N*- karboksimetil kitosan sentezinde ortama glioksilik asit eklenmesi ile sağlanır. *N*-CMCS sentez şeması Şekil 2.15'te gösterildiği gibidir.



Şekil 2.15. *N*-Karboksimetil kitosan sentezi [30].

2.7.3.1.3. *N,O*-Karboksimetil Kitosan (*N,O*-CMCS)

Suda çözünen kitosan türevlerinden bir diğeri olan *N,O*-CMCS, karboksimetil gruplarının yapı üzerindeki amin ve birincil hidroksil gruplarına bağlanması ile elde edilebilir. Suda çözünür olmasının yanı sıra *N,O*-CMCS'nin biyoyumlu, biyobozunur olması, jel oluşturabilmesi ve farklı formlar alabilme gibi olumlu özelliklere sahip olması onu pek çok biyomateryal arasında daha çekici kılmaktadır. Anyonik makromoleküler terapötiklerin taşınmasında ve emiliminde uygun bir polimer olduğu kanıtlanmıştır [30]. Sentezi Şekil 2.16'da gösterildiği gibidir.



Şekil 2.16. *N,O*-Karboksimetil Kitosanın sentez şeması [30].

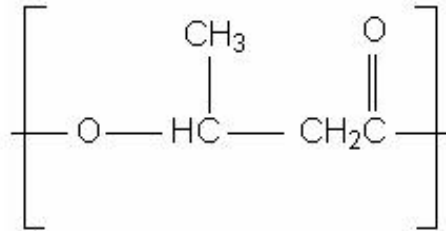
2.7.3.2. Karboksimetil Kitosan (CMCS) Türevlerinin Uygulama Alanları

Yapılarında bulunan, -hidroksil, amin, karboksil gibi- fonksiyonel grupların olması nedeni ile CMCS türevlerinin metal iyonları ile şelat oluşturma imkanları artmaktadır. Bu da bir anlamda, onlara iyi metal tutma özelliği kazandırır [48]. Kitin ve kitosanın yara iyileştirmeyi hızlandırıcı etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Suda çözünür türevlerinin de yara örtüsü olarak kullanımı mümkündür.

Gen taşınmasında, biyosensörlerde ve kozmetik, sağlık gibi çeşitli uygulama alanlarında kullanılmak üzere karboksimetillenmiş türevlerin nanopartikülleri, sentezlenmektedir [49].

2.7.4. Polihidroksibütirat (PHB)

Polihidroksialkanoatlar, doku mühendisliği ve ilaç salım uygulamaları için yüksek mekanik özelliklerinin yanı sıra biyoyumlu ve biyobozunur malzemeler olarak son zamanlarda büyük ilgi uyandıran mikrobiyal biyopolimer ailesinin bir sınıfıdır [50]. Poli-3-hidroksibütirat (PHB) polihidroksialkanoatların en genel tipidir; bu sınıfın diğer polimerleri olan poli-4-hidroksibütirat, polihidroksivalerat, polihidroksihekzanoat, polihidroksioktanoat ve bunların kopolimerleri farklı organizmalar tarafından da üretilmektedir. Poli-3-hidroksibütirat ilk olarak 1925 yılında Lemoigne tarafından bakteride keşfedilen D(-)-3-hidroksibütirik asit lineer poliesteridir. Karbon kaynağının fazla olduğu; oksijen, azot ya da fosfor gibi kaynakların sınırlandırıldığı şartlarda gram pozitif ve gram negatif çok sayıda organizmanın hücre içi granüllerinde biriktirilir. PHB suda çözünmez, hidrolitik degradasyona dirençlidir. Oksijen geçirgenliği iyidir, biyoyumlu ve nontoksiktir[51].



Şekil 2.17. Polihidroksibütiratın kimyasal yapısı

Polihidroksialkanoatlar arasında polihidroksibütirat (PHB) ve polihidroksibütirat-ko-hidroksivalerat stent, kemik plağı ve çivi yapımında kullanılmaktadır. İn-vitro testler

polihidroksibütiratın osteoblast, epitel hücreleri ve kondrosit gibi hücre tiplerine karşı biyoyumlu olduklarını göstermiştir [52]. Polihidroksialkanoatlardan salınan degradasyon ürünlerinden biri olan 3-HB monomerinin doku yenilenmesine katkıda bulunduğu ve apoptozu engellediği bildirilmektedir.

2.8. Kardiyovasküler Teşhis Yöntemi için Kullanılan Ligandlar

Kan damarının iç yüzeyini oluşturan tek katmanlı endotel tabakası, ateroskleroz, iskemi-reperfüzyon, hipertansiyon, kalp krizi gibi pek çok vasküler enflamasyona neden olan rahatsızlığın tedavisinde önemli bir terapötik hedefdir. Endotel tabakasında gerçekleşen moleküler ve fonksiyonel bozuklukların, invaziv olmayan bir yöntemle erken safhada ve tam zamanında görüntülenebilmesi oldukça önemlidir ve bunlar için özel moleküler işaretçilerin kullanılması gerekmektedir. Hasar sonucu aktive olmuş endotel damarı üzerine lökosit hücreleri tutunmaya başlar. Buna neden olan enflamasyonun işaretçileri ise endotel hücre adezyon molekülleri (CAM'lar) dir. Çizelge 2.1.'de bu adezyon molekülleri ve onlara ait bazı özellikler görülmektedir [24].

Çizelge 2.1. Endotel hücre adezyon molekülleri ve özellikleri.

Süperailisi	Lektin adezyon molekülleri		Ig- süperailisi hücre adezyon molekülleri		
Hücre Adezyon Molekül (CAM)	P-Selektin	E-Selektin	VCAM-1	ICAM-1	PECAM-1
CD Sınıfı	CD62P	CD62E	CD106	CD54	CD31
Yüzey etkileşimi	uyarılabilir	uyarılabilir	uyarılabilir	esas	esas
Geçici ekspresyon	Ekspresyon hızlı ve geçici	Ekspresyon 4 saatte (in vitro)	Çok düşük hücre çoğalması (10^4 - 10^5)	Normal dokuda 10^4 - 10^5 hücre kopyalanması	10^6 hücre çoğalması
Fonksiyon	Lökosit bağlama		Sıkı lökosit bağlama		Lökosit transmigrasyonu; anjiyonez

2.8.1. P- ve E- Selektinler

Normalde endotel yüzeyinde bulunmayan P- ve E- selektinler, enflamasyonla beraber endotel yüzeyinde bir artış gösterirler [24].

Selektinler, fukosillenmiş, sialillenmiş glikoprotein ligandlarını bağlayan karbonhidrat bağlayıcı moleküllerdir; endotel hücrelerinde, trombosit ve lökositlerde bulunurlar [53].

2.8.2. VCAM-1 / ICAM-1 Adezyon Molekülleri

Vasküler adezyon molekülleri-1(VCAM-1) ve intraselüler adezyon molekülleri-1 (ICAM-1), lökositlerin $\beta 1$ ve $\beta 2$ integrinleri sayesinde endotelial adezyonunu sağlamlaştıran transmembran proteinlerdir. VCAM-1 molekülleri selektinlere benzer özellik gösterir ve onlarda normal şartlarda endotel yüzeyinde bulunmazlar, diğer taraftan ICAM-1 molekülleri endotel yüzeyinde devamlı olarak bulunurlar fakat inflamasyon oluşum sırasında endotel katmanlarında ortaya çıkışı daha hızlanır [24].

2.8.3. PECAM-1 Adezyon Molekülleri

Platelet endotelial adezyon molekülü-1, endotel yüzeyinde temel olarak bulunan adezyon moleküllerindendir. Görüntüleme problemleri ve ilaçlarının iletiminde seçici olarak görev alması mümkün olmasa da endoteli koruyucu profilaktik girişim için etkili hedeflerdir [24].

2.8.4. Anneksin-1 / Anneksin-5 Ligand Molekülleri

Hücrelerin üremesinden apoptozuna kadar birçok hücre fonksiyonundan ikincil derecede sorumlu olan Ca^{+2} iyonu; kasların kasılmasında, adezyon, sekresyon, hareket, büyüme, gen ekspresyonu, hücre ölümü gibi olayların gerçekleşmesinde esansiyel bir mineraldir Bu nedenle kalsiyum konsantrasyonunda meydana gelen değişimler haberci moleküller için sinyal anlamı taşır. Sinyalleri ileten kalsiyum bağlayıcı proteinler, hücre fonksiyonlarının düzenlenmesinde de etkili role sahiptirler [54].

Aterosklerotik lezyonların içerisinde aktive olmuş hücrelerin yüzeyinde fosfatidilserin (PS) oluşumu gerçekleşir. Kalsiyum bağlayıcı özelliğe sahip anneksin ailesine ait ve yapısında floresans özelliğine sahip bir protein olan anneksin-A5, negatif yüklü fosfolipid yüzeyine bağlanır ve bu özelliği sayesinde

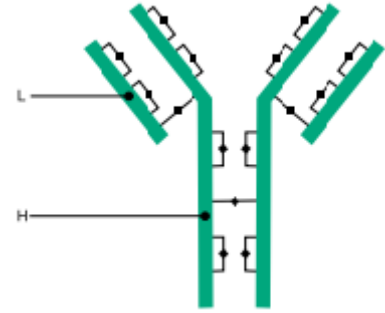
aterosklerotik lezyon görüntülenmesinde önemli role sahiptir. Bugün, anneksin A5'in anti-inflamatuvar ve anti-aterosklerotik özelliklere sahip olduğu bilinmektedir [55].

Anneksin A5 ile aynı familyada bulunan anneksin A1 proteini de A5'e benzer özellikler gösterir; kalsiyum ve fosfolipid bağlama özelliğe sahiptir. Yang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda anneksin A1'in de anti-inflamatuvar özelliğe sahip olduğu gösterilmiştir [56].

2.8.5. İmmunoglobulin-G1 (IgG-1)

IgG1 yapısında 2 ağır γ zinciri, 2 tanede hafif zincir bulunan immunoglobulin sınıfına ait ve yapısında floresans özelliğe sahip bir proteindir. İmmunoglobulin G1 yapısı Şekil 2.17'de gösterilmiştir.

Ylä-Herttua ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalar göstermiştir ki, insan ve tavşanda bulunan aterosklerotik lezyonlar, okside LDL'nin karakteristik uçlarını belirleyici IgG1 içermektedir [57].



Şekil 2.18. IgG1 antikoruna ait yapısal gösterim [58].

2.9. Partikül Ligand Etkileşimleri

Sunulan tez çalışması kapsamında, 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 [59]. Yapılan bu çalışmalar baz alınarak, aterosklerotik plak teşhisinde kullanılacak ligandların hazırlanan manyetik partiküllerle etkileşimi içinde aynı metodoloji izlenmiştir.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

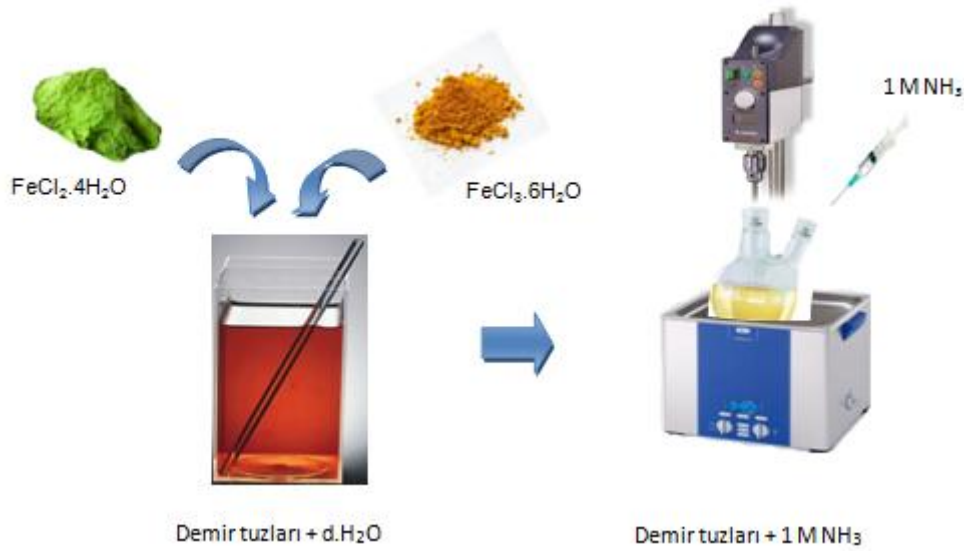
3.1. Kimyasallar

Yapılan tez çalışması sürecinde hazırlanan nanopartiküllerin sentezi için Kitosan (Fluka, Almanya), *Poli-β*-Hidroksibütirat (PHB) (Sigma, ABD) ve Karboksimetil kitosan (CMCS) sentezi için düşük molekül ağırlıklı Kitosan (low-MW) (Fluka, Almanya) kullanılmıştır. Kitosan nanopartiküllerin daha stabil olmasını sağlamak amacı ile çapraz bağlayıcı olarak tri-polifosfat (TPP) (Sigma, ABD) kullanılmıştır. Yine PHB-CMCS nanopartikül sentezinde dağıtıcı ortam olarak polivinil-alkol (PVA) (Sigma, ABD) ve organik çözücü olarak kloroform (Merch, Almanya) kullanılmıştır. Hücre sitotoksite testlerinde ise, Tripsin-EDTA (Tripsin-Etilendiamin tetraasetik asit), DMEM F-12 (“Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium”) besiyeri ve Fetal Sığır Serumumu (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; kitosan, karboksimetil kitosan ve PHB-CMCS nanopartiküllerine ligand bağlama prosedürlerinde kullanılmıştır. Tüm çalışmalar süresince kullanılan bu kimyasallar, analitik saflıkta olmalarından dolayı herhangi bir ekstra saflaştırma işlemine tabi tutulmamışlardır.

3.2. Demir Nanopartiküllerin Sentezi

Manyetik demir oksit nanopartiküllerin hazırlanması sırasında, kimyasal çöktürme yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde göre ilk olarak $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ ve $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 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 değişik derişimlerde 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). NH_3 derişimi ise yukarıda belirtildiği gibi 1, 1.25 ve 1.5 M olarak değiştirilmiştir. Manyetik nanopartiküllerin sentez şeması Şekil 3.1. deki gibidir.

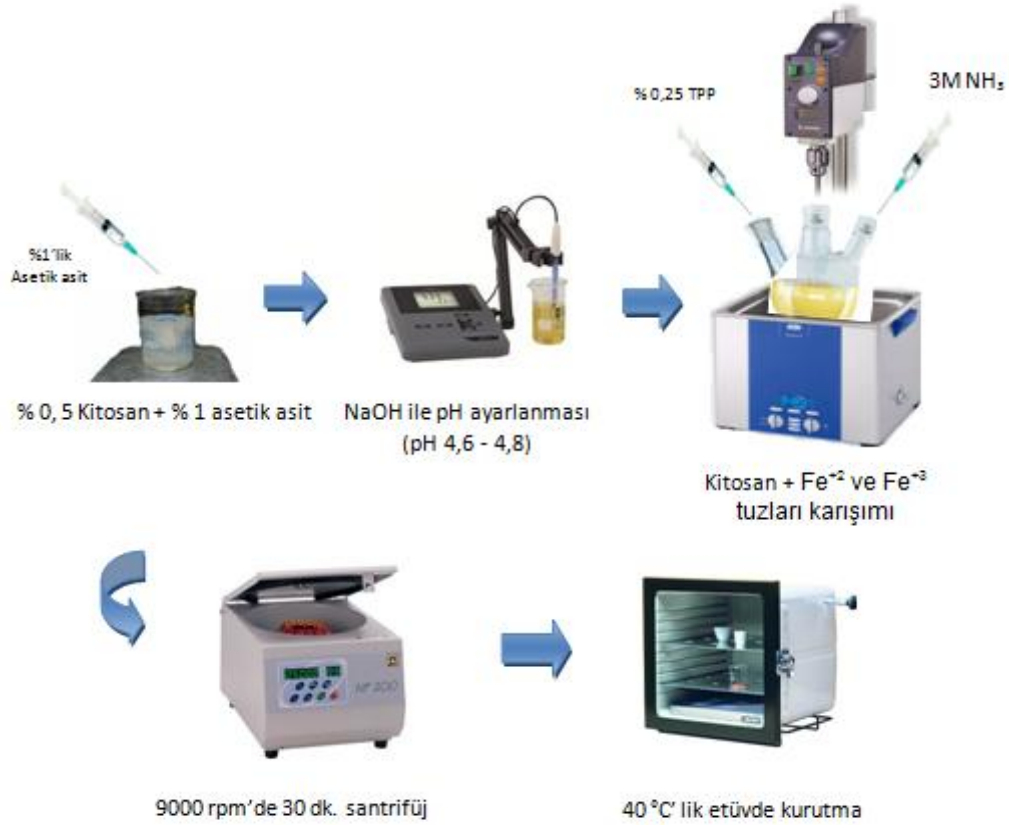


Şekil 3.1. Manyetik demir nanopartiküllerin sentez şeması.

3.3. Manyetik Kitosan Nanopartiküllerin Sentezi

Literatürdeki klasik bir kitosan partikül hazırlama prosedürüne göre; ilk olarak kitosan (Fluka, Almanya) konsantrasyonu % 0.5'lik olacak şekilde hazırlanmış ardından bu çözelti içerisinde %1'lik asetik asit (Carlo Erba, İtalya) çözeltisinden birkaç damla eklenerek kitosanın suda çözünmesi sağlanmıştır. Homojen bir çözelti elde etmek amacı ile hazırlanan çözeltinin manyetik karıştırıcıda bir gün karışması sağlanmıştır. Kitosan çözeltisi pH değerinin 4.6-4.8 arasında tutulabilmesi için 10 N'lik NaOH çözeltisi damlacıklar halinde manyetik karıştırıcı üzerinde karışmakta olan kitosan çözeltisine damlatılmıştır.

Kitosan çözeltisinin pH değeri uygun değere sabitlendikten sonra kitosan çözeltisi üç boyunlu balona alınarak bir süre karıştıktan sonra ortama, Fe^{+2} ve Fe^{+3} tuzları uygun derişimlerde çözünüp eklenmiştir. Kitosan ve demir tuzları ile elde edilen homojen karışıma aynı anda 3M NH_3 ve 10 ml deiyonize su içerisinde tripolifosfat (TPP) şırıngalar yardımı ile damla damla ortama eklenmiştir. Bu esnada yine inert bir ortam elde etmek amacı ile sonikatör içerisinde bulunan reaktöre azot gazı bağlanarak reaksiyonun gerçekleşmesi sağlanmıştır. Kitosan'ın kimyasal yapısı Şekil 2.1.1.'de sunulmuştur ve şekilden görüldüğü gibi yapıda yer alan amin, NH_2 grupları asidik ortamda protonize olarak pozitif yüklenir böylece tripolifosfat gruplarının negatif yüklü olması nedeniyle çökme reaksiyonu gerçekleşir.



Şekil 3.2. Manyetik kitosan nanopartiküllerin hazırlanış şeması.

Şekil 3.2.'de görüldüğü gibi hazırlanan çözelti oda sıcaklığında homojenizatör yardımı ile 1 saat çok yüksek karıştırma hızında karıştırılmıştır. Karıştırma işlemi sonrasında 9000 rpm'de 30 dk. ile üç kez santrifüj işlemine geçilmiş, ayırma işlemi sonrasında, manyetik kitosan nanopartiküllere birkaç defa deiyonize su ile yıkama işlemi uygulanmıştır.

Yıkama işleminden sonra nanopartiküller, 40 °C'de vakumlu etüvde 1 gün süre ile kurumaya bırakılmıştır. Manyetik kitosan nanopartiküllerin hazırlanış şeması şekil.15'te görüldüğü gibidir.

3.4. Karboksimetil Kitosan (CMCS) Nanopartiküllerin Sentezlenmesi

Karboksimetil kitosan nanopartiküllerin hazırlanmasından önce, CMCS polimerinin sentezi gerçekleştirilmiştir. Polimer sentezi için öncelikle 2,0 g düşük molekül ağırlıklı kitosan (Fluka, Germany) ve 20 ml izopropil alkol, 5 dakika süre ile mekanik karıştırıcı ve ultrasonik banyo (Elma, Almanya) kullanılarak karıştırılmıştır (Şekil 3.2.). CMCS sentezi, deney ortamı sıcaklığı 25°C'nin altında tutularak gerçekleştirilmiştir. 10 N NaOH çözeltisi karışıma dört dakikalık aralıklarla, 0,84 mL'lik 6 eşit hacimde (6 x 0,84 ml) eklenmiş ve 45 dakika 24000 rpm'de karıştırılmıştır. Bir sonraki basamakta kloroasetik asit beş dakikalık aralıklarla, beş eşit hacimde (5 x 0,48g) eklenmiş ve ultrasonik banyoda ısıtılarak reaksiyon sıcaklığı 60°C'ye yükseltilmiştir. Karışma ortamı olarak eklenen alkolün hızlı uçuyor oluşu ve ortam sıcaklığının arttırılması polimer ortamının devamlı kurummasına sebebiyet verdiği için, aralıklı olarak ortama alkol ilave edilmiştir. Elde edilen çözelti beş saat boyunca karışmaya bırakılmıştır. 1,7 ml soğuk distile su karışıma eklenmiş ve asetik asit ilavesi ile karışımın pH değeri 7.0'a ayarlanmıştır. Filtre kâğıdı yardımıyla süzülen karışım ve 30 ml %30'luk metanol çözeltisi içinde 30 dk. süre ile karıştırılarak yıkama yapılmıştır. Üçüncü yıkama sonrasında, sentezlenen karboksimetil kitosan etüvde kurumaya bırakılmıştır.



2,0 gr Kitosan + 20 mL isopropanol

- 1) 10 N NaOH ($6 \times 0,84$ mL)
- 2) ClCH_2COOH ($5 \times 0,48$ gr)
- 3) 60°C ısı (4 saat)
- 4) 2 mL d. H_2O + CH_3COOH (pH 7)
- 5) % 30'luk metanol ile yıkama
- 6) süzme ve kurutma

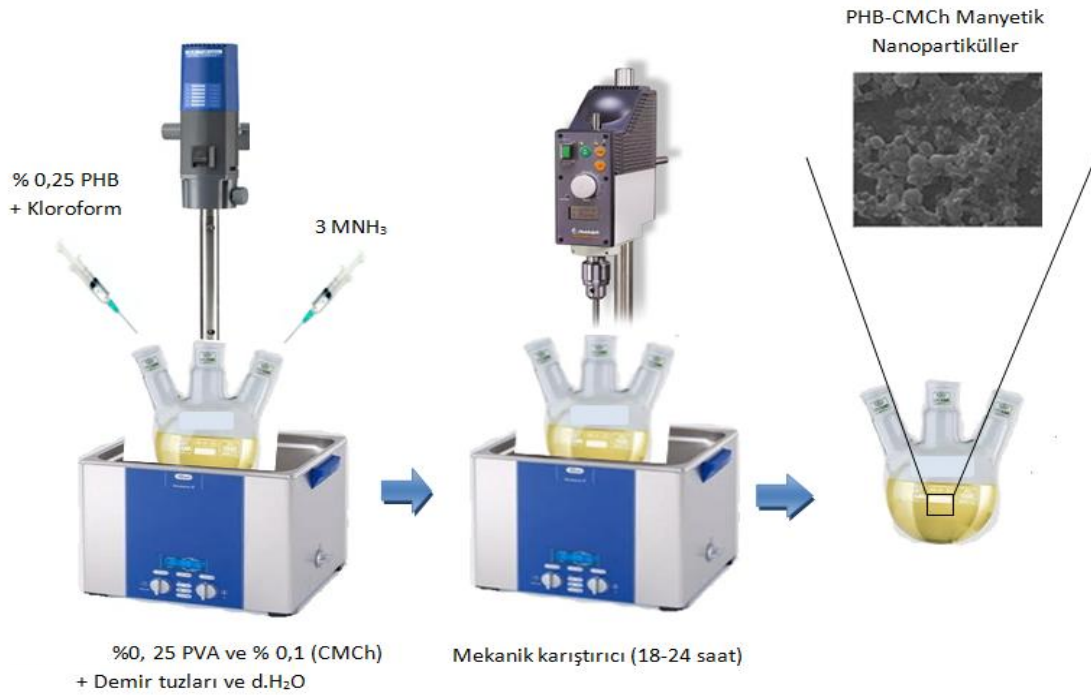
Şekil 3.3. Karboksimetil kitosan (CMCS) polimeri sentez prosedürü

3.5. Manyetik Karboksimetil Kitosan Nanopartiküllerin Hazırlanması

Kurutma işleminden sonra gerekli FTIR analizleri sonucunda kullanıma uygun olan toz karbosimetil kitosan % 0,5 derişimde olacak şekilde distile su içerisinde çözülür. Daha önceden hazırlanmış olan Fe_3O_4 nanopartiküller karbosimetil kitosan çözeltisine eklenir (Fe_3O_4 : karboksimetil kitosan oranı, 1:10) ve sonikatör varlığında homojenizatör yardımıyla yüksek hızda karışması sağlanır. Ardından % 0,5'lik CaCl_2 çözeltisi hazırlanır. Hazırlanan % 0,5'lik CaCl_2 çözeltisi mikropipet yardımıyla damla damla karıştırıcıda bulunan karboksimetil kitosan çözeltisine eklenir. Deney süresince ortamdaki azot gazı geçirilmektedir. En son çözelti hafif bulanık turuncu-kahverengindedir. Daha sonra elde edilen çözelti 1 saat yüksek hızlı karıştırıcıda karıştırılmaya bırakılır. Bir saatin ardından hazırlanan çözelti santrifüjlenerek ayırma işlemi uygulanır ve 3 kez 9000 rpm' de 15'er dakikalık aralıklarla distile su ile yıkanır. Elde edilen çökelek liyofilize edilerek küçük tüplerde saklanır.

3.6. 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 $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ve $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 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 (NH_3) ortama damla damla eklenir. Elde edilen emülsiyon, homojenizatör (Ultra-Turrax T10, Çin) kullanılarak 24.000 rpm'de 15 dakika oda sıcaklığında karıştırılmıştır (Şekil 3.3.). Daha sonra organik çözücünün uzaklaştırılması için, elde edilen süspansiyon 18-24 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.



Şekil 3.4. PHB\CMCS manyetik nanopartiküllerin hazırlanma prosedürü.

3.7. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

3.7.1. Morfolojik Özelliklerin Belirlenmesi

Sentezlenen kitosan, karboksimetil kitosan ve PHB\CMCS nanopartiküllerin morfolojik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve atomik kuvvet mikroskobu (AFM) 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.

3.7.2. Kimyasal Özelliklerin Belirlenmesi

Sentezlenen kitosan, karboksimetil kitosan ve PHB\CMCS nanopartiküllerin sahip olduğu kimyasal yapıları belirlemek, aynı zamanda bağlanan ligandı göstermek amacı ile her örnek için FTIR çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla, örnekler KBr ile uygun oranlarda (örneğin; ağırlıkça % 1 olacak şekilde) karıştırılarak 10 tonluk pres yardımıyla incelemeye hazır diskler haline getirilmiş ve FTIR (Schimadzu, DR8101, Japonya) spektrumları alınmıştır. Elde edilen FTIR spektrumlarının değerlendirilmesi sonucu hazırlanan örneklerin beklenen kimyasal yapıya sahip olup olmadığı incelenmiştir.

3.7.3. Nanopartikül Boyut Analizi

Sentezlenen kitosan, karboksimetil kitosan ve PHB\CMCS nanopartiküllerin boyut ve dağılımlarını belirlemek, AFM ve SEM çalışmalarında elde edilen bulgular ile karşılaştırılmak üzere Zeta-Sizer (3000 HSA, Malvern, İngiltere) cihazı kullanılmıştır. Kolloidal çözeltilerde partiküllerin boyutunu ve zeta-potansiyelini bulmak için kullanılan bir cihaz olan Zeta-Sizer, dinamik ve elektroforetik ışık saçılması yöntemleriyle çalışır ve otomatik titratörüyle pH'ya göre partikülün boyut ve yüzey yükündeki değişimlerin gözlenmesine imkân sunar. Dinamik ışık saçılması (DLS) yöntemine göre ölçüm yapmaktadır. Dinamik ışık saçılması, mikro saniyenin onda biri ile mili saniye zaman aralığında, örnek çözeltinin küçük bir kısmından saçılan ışığın zamanla değişiminin ölçülmesidir. Sentez sonrası

yıkılarak 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 içerisinden lazer ışığının geçirilmesi sonucu gerçekleştirilmiştir.

3.8. Biyopolimerik Nanopartiküllerin Yüzey Modifikasyonu (Ligand Takılması)

Sunulan tez çalışması kapsamında, gerekli yüzey modifikasyon işlemleri için proje önerisinde belirtilen ligandlardan öncelikle biri model olarak seçilmiş ve bu daha sonraki adımlarda nasıl bir yol izleneceği konusunda kolaylık sağlamıştır. 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 [59], bu nedenle yapılan ligand bağlanması deneylerinde ya da bir başka deyişle yüzey modifikasyon işlemlerinde de benzer işlem basamakları kullanılmıştır.

Takip edilen işlem basamakları şu şekildedir; öncelikle nanopartiküllerin aktivasyonu için 5mg Fe₃O₄ yüklü kitosan nanopartikülleri 3 defa pH 5.2 MES tamponu ile yıkayıp aynı hacimde süspansiyon 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 yıkayıp aynı hacimde MES tamponu ile süspansiyon hale getirilmiştir. Öncelikli olarak seçtiğimiz IgG1 (1mg/mL) ligandından 100 µl alınıp 1400 µl MES tamponunda çözülerek ligand süspansiyonu hazırlanmıştır. Ligand bağlama işlemlerinden sonra bağlama verimini belirlemek amacıyla sonradan yapılan ölçümlerde kullanmak için, ligand süspansiyonundan aynı oranda (1:15) alınarak "bağlama öncesi örnek" elde edilmiştir. Kalan ligand süspansiyonu ile aktive nanopartiküller 24 saat oda sıcaklığında sabit hızda rotatorda karıştırılmıştır. 24 saat sonunda nanopartiküller bir mıknatıs yardımı ile ayrılmıştır.

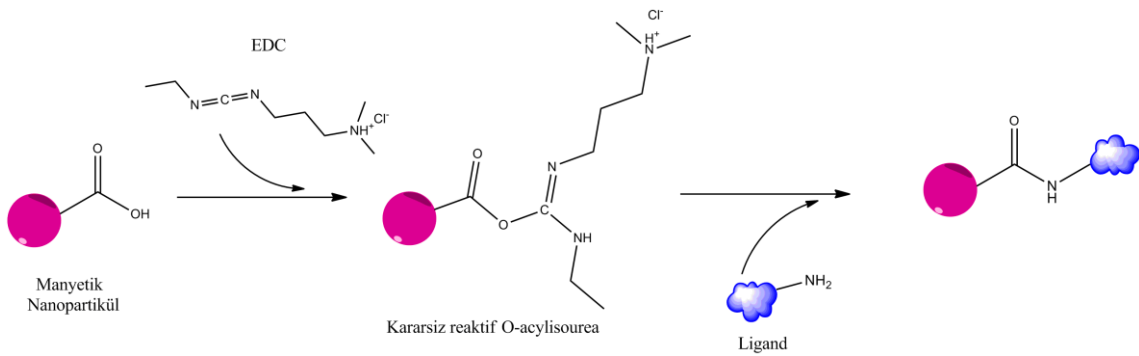
Ayrılan sıvı faz atılmadan “bağlanma sonrası örnek” olarak teste alınıp 280 nm dalga boyunda UV spektrofotometrede her iki örnek arasında ölçülen absorbans farkından yüzde bağlanma hesaplanmıştır. Formülasyon aşağıda verilmiştir.

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

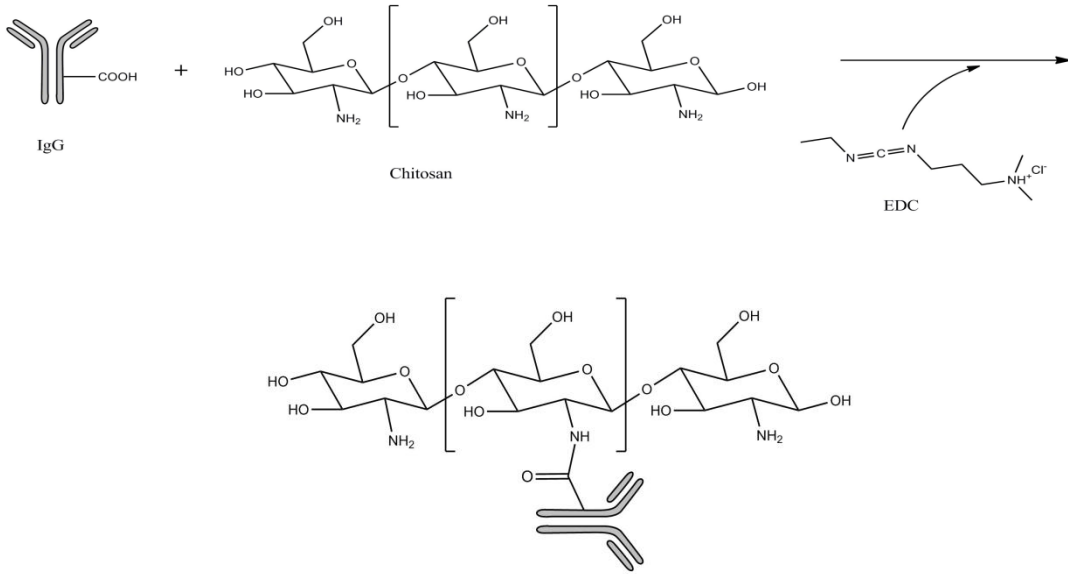
(Eşitlik 3.1.)

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 süspansiyon edilmiştir.

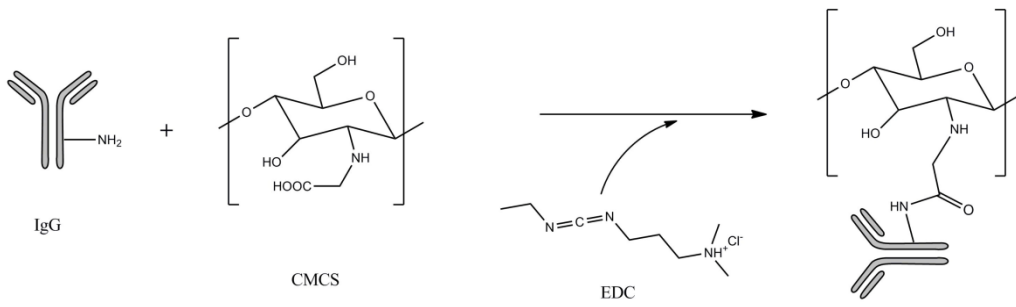
Yapılan çalışmaların daha sonrasında, model ligand olarak seçilen IgG1 ligandı ile Fe₃O₄ yüklü biyopolimerik nanopartiküller (örneğin; kitosan, karboksimetil kitosan, PHB-karboksimetil kitosan) etkileştirilmiş, elde edilen ligand bağlanmış nanopartiküller daha sonraki işlemlerde kullanılmak üzere +4°C’de saklanmıştır. Manyetik olmayan CS, CMCS, PHB-CMCS nanopartiküllerin ligand bağlanma işlemleri de yukarıdaki gibi olup sadece yıkama sürecinde ayırma için yüksek hızdaki santrifüjden yararlanılmıştır. Nanopartikül yüzeylerine ligandların kovalent bağlanma mekanizması Şekil 3.5.’te gösterilmiştir.



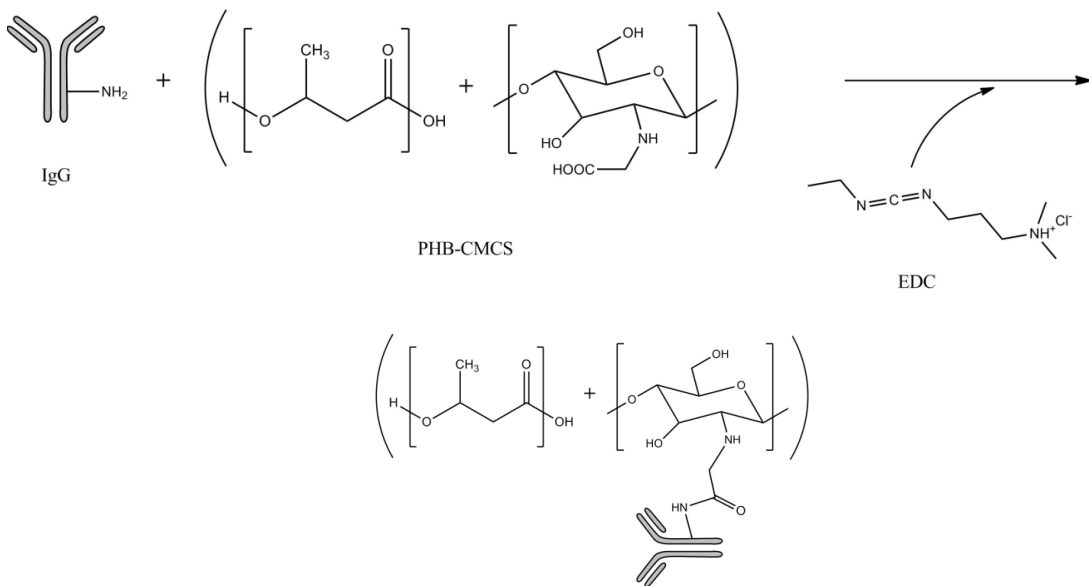
Şekil 3.5. Ligandların manyetik nanotaşıyıcıya bağlanma mekanizması.



Şekil 3.6. IgG1 model ligandı ile kitosan partiküllerin etkileşim mekanizması.

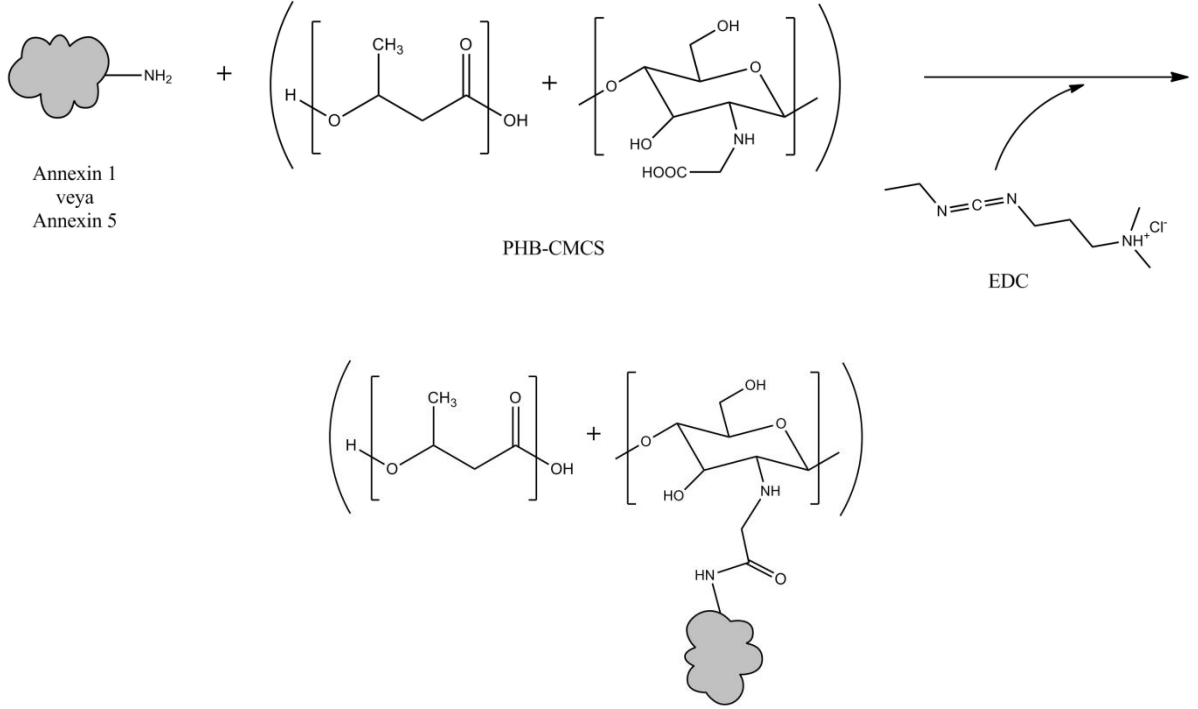


Şekil 3.7. IgG1 ligandı ile CMCS nanopartiküllerin etkileşim mekanizması.



Şekil 3.8. PHB-CMCS nanopartikülleri ile IgG1 ligand etkileşim mekanizması.

Tüm partiküllerin IgG1 ligandı ile bağlanma işlemleri gerçekleştirilmiştir. Bu işlemler sonucunda elde edilen % bağlanma verimine göre ise diğer ligandların, Anneksin A1 (0.85mg/mL) ve Anneksin A5 (50µg/250µL), hangi partikülle etkileştirileceğine karar verilmiştir. Seçilen PHB-CMCS partiküllerinin anneksin A5 ve anneksin A1 ile etkileşim mekanizmaları Şekil 3.9'da gösterilmiştir.



Şekil 3.9. Anneksin A1 ve A5 ligandının PHB-CMCS nanotaşıyıcıya bağlanma mekanizması.

3.9. Nanopartiküllerin Sitotoksosite Çalışmaları

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

Deneysel çalışmalarda kullanılan hücre hatları, UNAM hücre kültür merkezinden temin edilmiştir. Bu çalışmalar kapsamında farklı derişimlerde (1, 10, 25 ve 50 µg/ml) ve farklı formülasyonlara sahip nanopartiküllerin belirtilen ISO standardında yer alan standart hücre hatlarından biri olan L929 fare fibroblast hücreleri üzerine sitotoksitesi 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 5x10³ 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.

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

(Eşitlik 3.2.)

3.10. Biyopolimerik Nanopartikül - Hücre Etkileşimleri (*in vitro* çalışmaları)

Tez çalışmalarının bu aşamasında ise, proje kapsamında gerçekleştirilecek hayvan deneyleri öncesinde hazırlanan ligand takılı nanopartiküller ile uygun hücre hatlarının etkileştirilerek elde edilen bulguların sonraki aşamalarda alt yapı olarak kullanılması için gerekli çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla da

kardiyovasküler sistem hastalıkları söz konusu olduğunda canlı sistemde karşılaşılabilecek hücre hatlarından düz kas hücreleri ve damar endotel hücreleri yapılan değerlendirmelerde model hücre hatları olarak kullanılmıştır. Bu kapsamda A7r5 düz kas hücreleri (Smooth muscle cells from rat embryonic thoracic aorta) ile HUVEC endotel (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) hücreleri kullanılmıştır. Bu hücreler ile öncelikle MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) testi ile biyolojik uyumluluk testleri tekrarlanmış ve sonrasında floresans mikroskopu yardımıyla özellikle ileri aşamalarda kullanılması planlanan manyetik özellikli nanopartiküller kullanılarak hücre-nanopartikül etkileşimleri görsel olarak değerlendirilmiştir. Bu aşamada hücreler %10 FBS, %1 L-glutamin ve %1 penisilin-streptomisin içeren DMEM-F12 besi yeri ile 37°C'de, %5 CO₂ ortamında kültüre edilmiştir.

Yapılan çalışmalarda L929 hücreleri 5x10³ hücre/ml, A7r5 hücreleri 7x10³ hücre/ml ve HUVEC'ler ise 8x10³ hücre/ml konsantrasyonda 96 kuyucuklu plaklara ekilmiştir. Nanopartikül-hücre etkileşimleri bir önceki bölümde, sitotoksikite deneylerine benzer şekilde gerçekleştirilmiş ve yüzde hücre canlılığı değerleri aynı formülasyon ile belirlenmiştir.

3.11. Manyetik Nanopartiküller ile Yapılan *in vivo* Çalışmalar

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 [Yokogoshi H. Ve ark. 1999]. Pozitif kontrol olarak, bu 36 adet erkek sıçandan altı tanesi ayrılmış ve bu süre boyunca standart sıçan yemi ile beslenmiştir. Bu sıçanlar, MRG incelemeleri için negatif kontrol olarak kullanılmıştır. 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. MRG incelemelerinde öncelikli olarak hayvanların kardiyovasküler anatomisi tespit edilmiştir. Daha sonra standart yem ile beslenen sıçan ve kolesterolce zengin diyetle beslenen sıçanların aortları incelenmiştir.

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

IgG1 ve An-5 ile konjuge edilmiş 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 ve bu yolla nanopartiküller enjekte edilmiştir. Enjeksiyondan sonra operasyon hatları süturlanmıştır.

IgG1 ve Anneksin-5 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.

3.12. İstatistiksel analiz

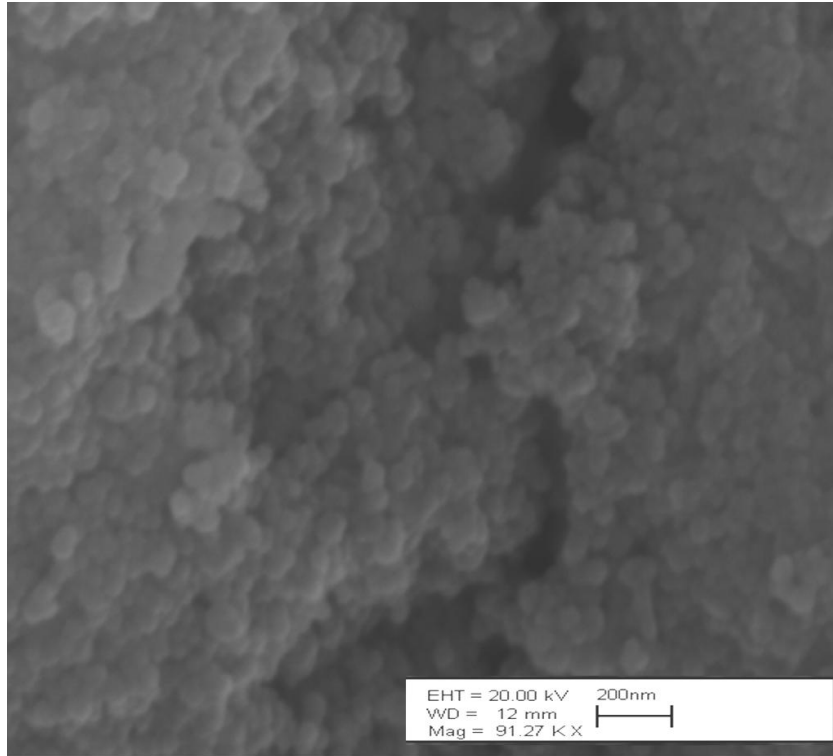
Çalışmamızda, sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir. Gruplar arasındaki farkların saptanmasında One Way ANOVA kullanılmıştır. Korelasyonların değerlendirilmesinde Scheffe testinden yararlanılmıştır. Bütün istatistiksel incelemeler SPSS-18 istatistik programı yardımıyla yapılmıştır.

4. DENEYSEL BULGULAR ve TARTIŞMALAR

4.1. Manyetik Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

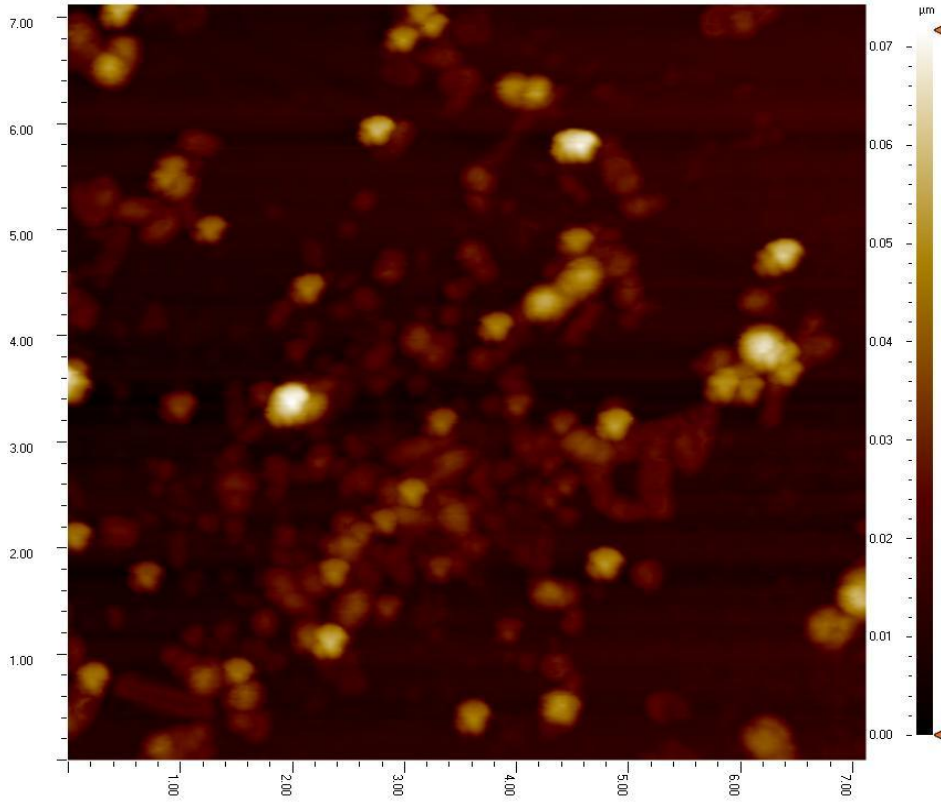
4.1.1. Manyetik Demir Oksit Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Belirtilen işlem basamakları uygulanarak elde edilen Fe_3O_4 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. Fe_3O_4 nanopartiküllerin SEM görüntüsü.

Sentezlenen demir oksit nanopartiküllerin karakterizasyonu sonucunda, elde edilen demir oksit nanopartiküllerin boyutlarının 11-20 nm aralığında ve küresel formda olduğu, agregasyonların minimal düzeyde olduğu görülmektedir. Küçük boyutlardaki nanopartiküllerin görüntülenmesinde AFM tekniğinden de yararlanılmıştır.



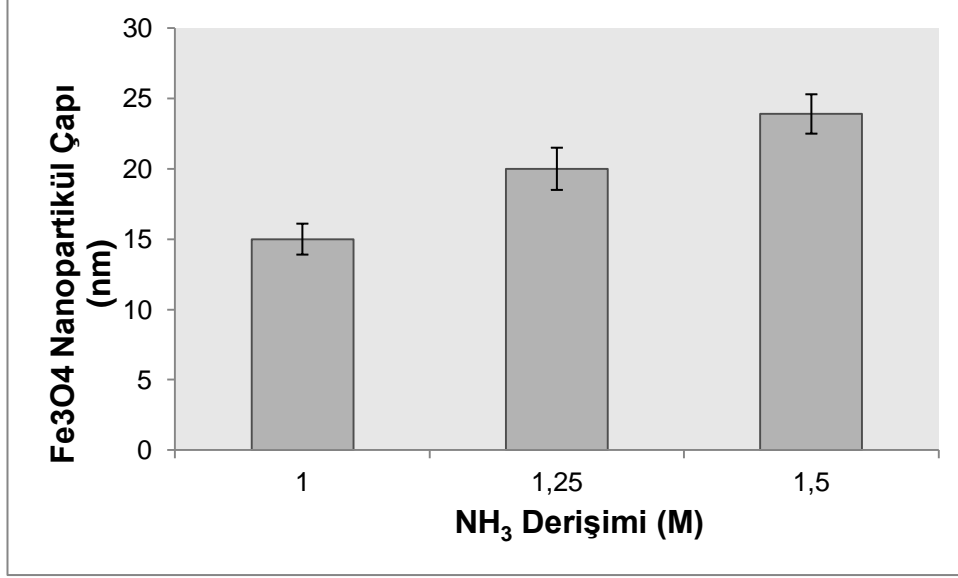
Şekil 4.2. Fe₃O₄ nanopartiküllerin AFM görüntüsü.

Elde edilen AFM görüntüsünde demir oksit nanopartikül boyutlarının dar bir aralıkta bulunduğu gözlenmiştir (Şekil 4.2.). AFM görüntülerinden elde edilen sonuçlara göre, nanopartiküllerin küresel boyutta ve agregasyonun minimal düzeyde olduğu görülmektedir.

Tez kapsamında kullanılmak üzere öncelikle manyetik nanopartiküller (örneğin; Fe₃O₄, demir oksit nanopartikülleri) sentezlenmiştir. Bu amaçla grubumuzda daha önceden kanser tedavisinde hipertermi uygulamaları için geliştirilen nanopartiküller için kullanılan metodoloji kullanılmıştır [59]. Elde edilen sonuçlar literatürle karşılaştırılmıştır. Wei- Wen Liu ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada demir oksit nanopartikülleri değişen molaritelerde HCl çözeltisi kullanılarak anyonik değişimlerle yaklaşık 20-25 nm aralığında sentezlemiştir [60]. Shantanu K. Behera ve arkadaşlarının yaptığı diğer bir çalışmada ise demir oksit nanopartiküller, çöktürme tekniği ile hazırlanmış ve 15-25 nm aralığında demir

oksit nanopartiküller elde edilmiştir [61]. Çalışmada elde ettiğimiz sonuçlar literatürü doğrular niteliktedir.

Öte yandan Fe_3O_4 nanopartiküllerin boy-boy dağılımına NH_3 derişiminin etkisi Şekil 4.3.'te gösterilmiştir.

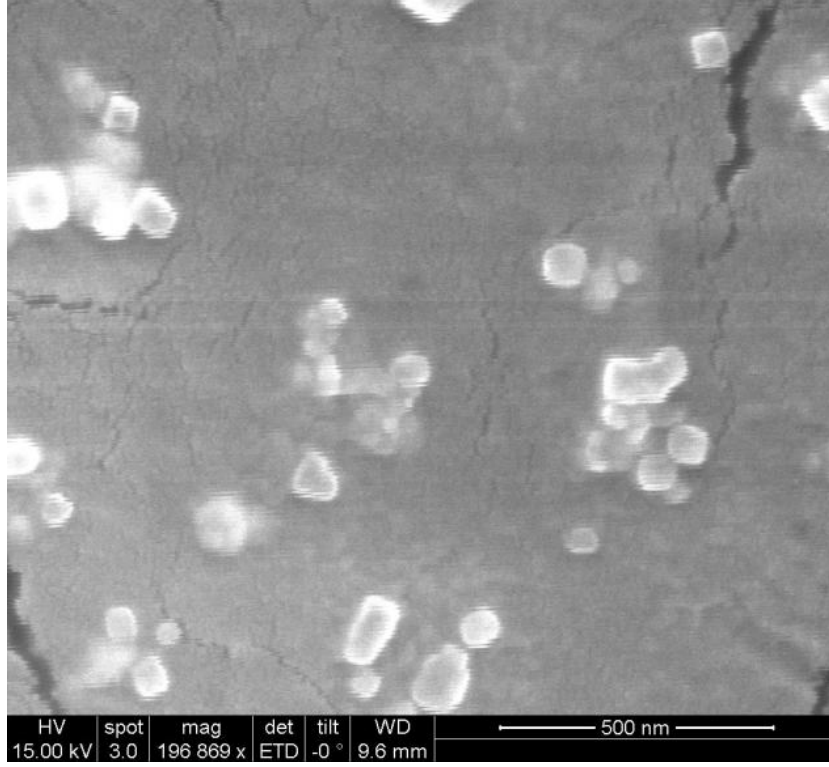


Şekil 4.3. NH_3 derişiminin Fe_3O_4 nanopartiküllerin boy-boy dağılımına etkisi.

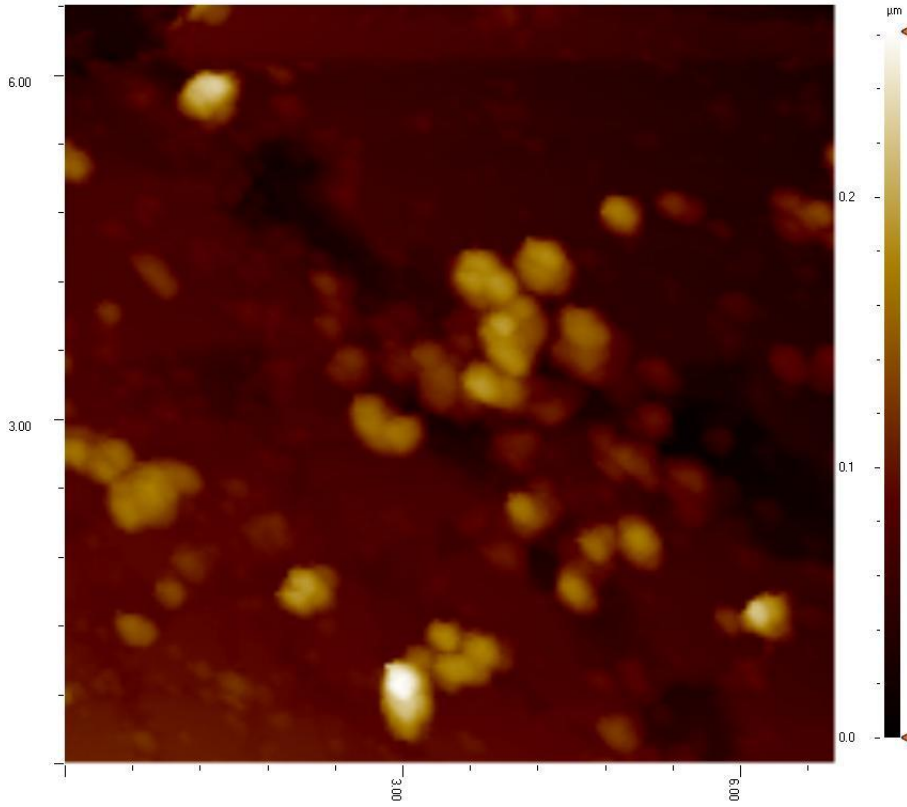
Ancak, söz konusu metodolojide ihtiyaç duyulan yüksek manyetiklik özelliği sağlamak amacıyla daha önce hazırlanan demir oksit nanopartiküllerden (çapı yaklaşık 20 nm) daha küçük demir oksit nanopartikülleri hazırlamak üzere en uygun parametre olan amonyak derişimi değerleri 1, 1.25 ve 1.5 M olarak seçilerek yapılan deneyler tekrarlanmıştır. Yapılan çalışmalar sonunda istenilen değerlere (20 nm'nin altındaki nanopartiküllere), 1 M'lık amonyak derişimi kullanılarak ulaşılmıştır.

4.1.2. Manyetik Kitosan Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

DeneySEL çalışmalar kısmında bahsedildiği üzere hazırlanan manyetik özelliğe sahip kitosan nanopartiküllerin morfolojik özelliklerinin karakterize edilmesinde taramalı elektron mikroskopundan (SEM) ve atomik kuvvet mikroskopundan (AFM) yararlanılmıştır. Yapılan çalışmalara ait görüntüler, Şekil 4.4'te ve 4.5'te görülmektedir.

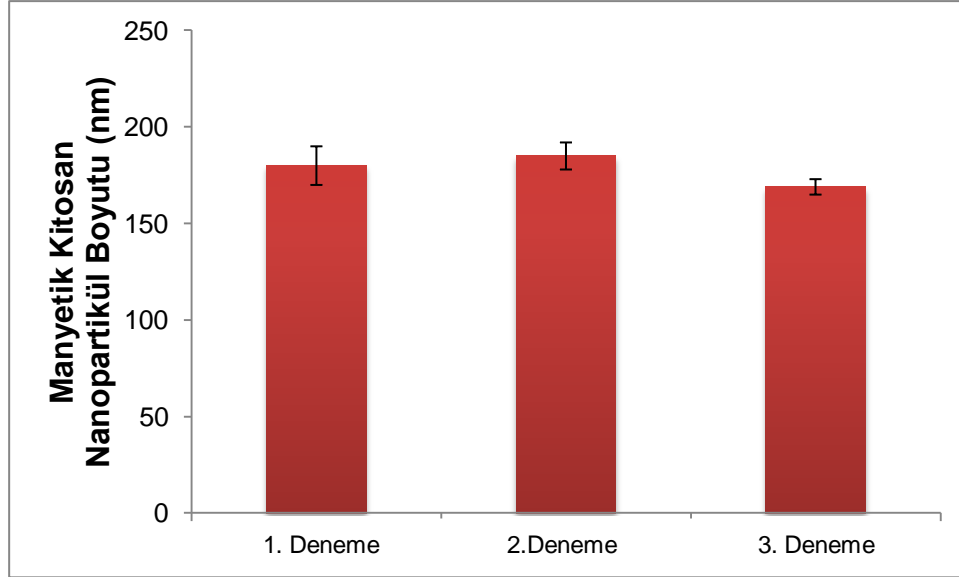


Şekil 4.4. Manyetik kitosan nanopartiküllerin SEM fotoğrafı



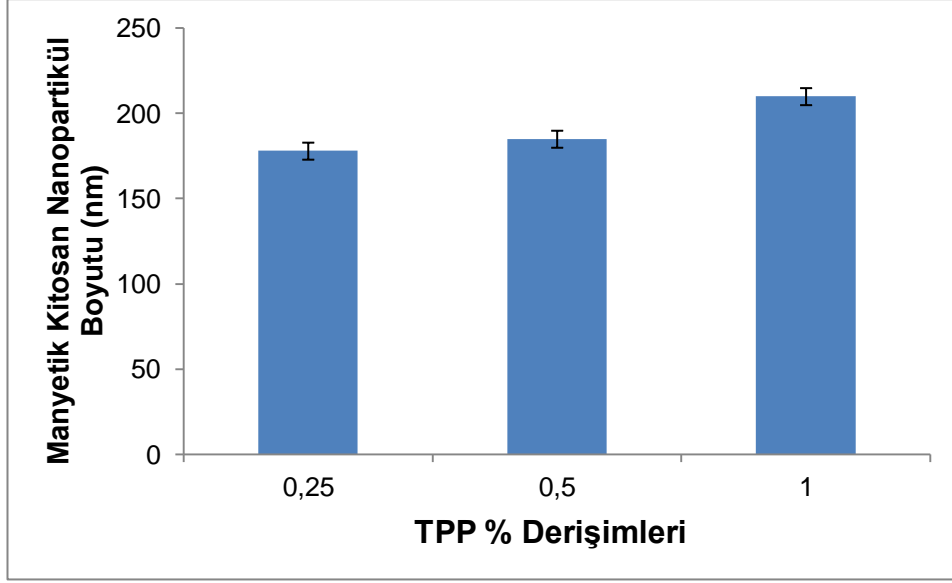
Şekil 4.5. Manyetik kitosan nanopartiküllerin AFM fotoğrafı

Tez çalışması kapsamında elde edilen kitosan nanopartiküllerin literatürdeki diğer çalışmalarla [62][63] karşılaştırılmıştır. Kitosan nanopartiküller Calvo ve ark., tarafından tarif edilen iyonik jelleşme yöntemi modifiye edilerek hazırlanmıştır. Calvo ve ark., (1997) yaptıkları çalışmada, yeni bir hidrofilik nano parçacık oluşturmuş ve proteinlerin tutulması ve kontrollü salımındaki yararlarını değerlendirmişlerdir [64]. Çalışma kapsamında elde edilen nanopartiküllerin (aynı koşullarda ve aynı madde miktarları ile tekrarlanan denemeler sonucu) ortalama büyüklüğü 169.6 ± 5.9 (0.259 ± 0.025) nm boyutları arasında bulunmuştur ve makaleyi [62] doğrular niteliktedir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Manyetik kitosan nanopartiküllerin boy-boy dağılımı değerleri

Hazırlanan manyetik özelliklere sahip kitosan nanopartiküllerin hazırlanmasında kitosan/TPP oranları değiştirilerek en uygun nanopartiküllerin hazırlanması hedeflenmiş ve elde edilen bulgular Şekil 4.7.'de verilmiştir. Şekilden anlaşılacağı gibi hazırlanan nanopartiküllerin boy aralığı 170-185 nm gibi dar bir aralıkta ve yapılan çalışmalarda kullanılmaya son derece uygun görünmektedir. Ayrıca çapraz bağlayıcı (TPP) konsantrasyonunun nanopartiküllerin boy-boy dağılımına etkisi araştırılmış, yapılan çalışmalar sonucunda %0.25 (w/v) derişimindeki TPP kullanılan deneylerde kitosan nanopartiküllerin en düşük boyuta sahip olduğu görülmüştür.

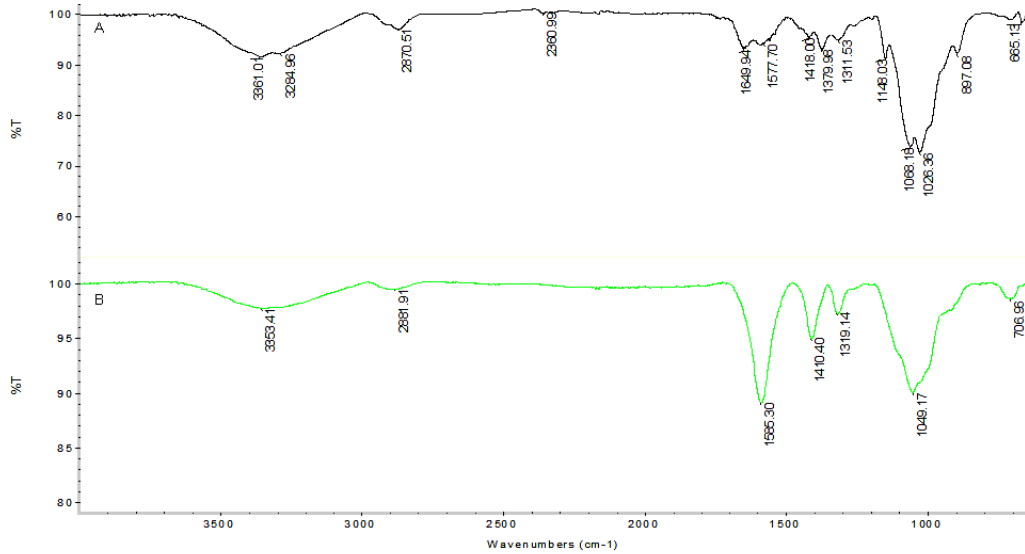


Şekil 4.7. Manyetik kitosan nanopartiküllerin farklı çapraz bağlayıcı konsantrasyonuna bağlı boy-boy dağılımı değerleri.

4.1.3. Manyetik Karboksimetil Kitosan Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

4.1.3.1. Karboksimetil Kitosan Polimeri Sentezi ve Karakterizasyonu

Karboksimetil kitosan nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılmak üzere sentezlenen CMCS'nin karakterizasyonu amacıyla, kullanılan kitosanın ve sentezlenen karboksimetil kitosanın FT-IR spektrumları alınmıştır.

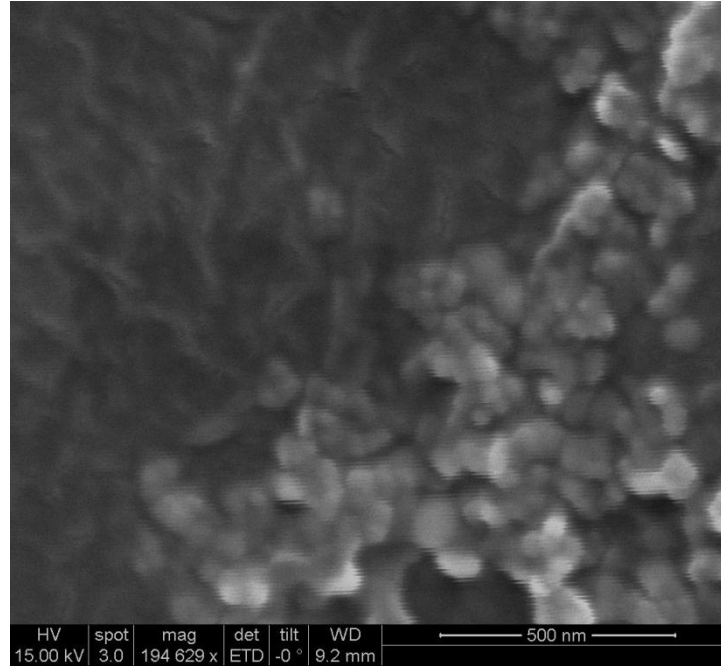


Şekil 4.8. (A) Kitosana ve (B) Karboksimetil Kitosan ait FT-IR spektrumları.

Kitosan ve Karboksimetil kitosana ait FT-IR spektrumları Şekil 4.8'de gösterilmiştir. Kitosan için karakteristik FT-IR absorpsiyon pikleri şöyle sıralanmaktadır: 3361 cm^{-1} (O-H gerilme), 2870 cm^{-1} (C-H gerilme), 1577 cm^{-1} (N-H eğilme), 1068 cm^{-1} (C-O gerilme) (Şekil 4.8.A). Karboksimetil kitosana ait 3353 cm^{-1} 'de görülen geniş band ise N-H gerilme bandıdır (Şekil 4.8.B). Ayrıca 1410 cm^{-1} ($-\text{COOH}$), 1049 cm^{-1} ($-\text{C}-\text{O}$)'de görülen absorpsiyon pikleri karboksimetil kitosanın karakteristik pikleridir (Şekil 4.8.B). 1585 cm^{-1} 'de ve 1410 cm^{-1} 'te sırasıyla COO^- karboksilat iyonları karakteristik asimetric ve simetric gerilme bantları görülmektedir. Alınan spektrumlar kitosandan karboksimetil kitosan eldesini konfirme etmektedir [65].

4.1.3.2. Manyetik CMCS Nanopartiküllerin Morfolojik Özellikleri

Sunulan tez çalışması kapsamında, hazırlanan manyetik karboksimetil kitosan nanopartiküllerin morfolojik özelliklerinin belirlenmesi amacı ile SEM (FEI, ABD) görüntülerinden yararlanılmıştır. Elde edilen nanopartiküllere ait SEM görüntüleri Şekil 4.9' da sunulmuştur.



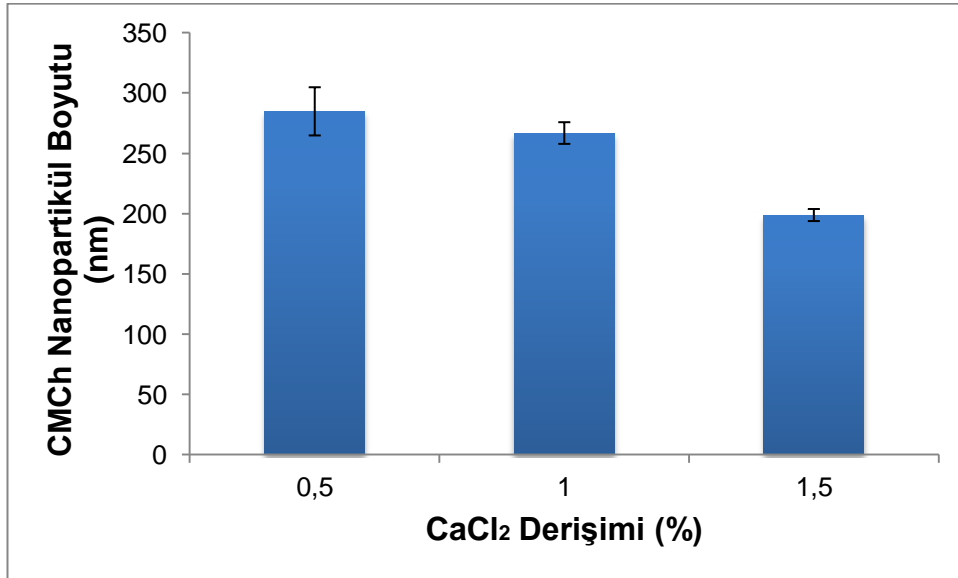
Şekil 4.9. Manyetik karboksimetil kitosan nanopartiküllerin SEM fotoğrafı.

4.1.3.3. Manyetik CMCS Nanopartiküllerin Boy-Boy Dağılımına Etki Eden Parametreler

Yapılan çalışmalar kapsamında hazırlanan karboksimetil kitosan nanopartiküllerin boy-boy dağılımına etki eden parametreler olarak CaCl_2 derişimi ve karboksimetil kitosan derişimi seçilmiş ve bu parametreler değiştirilerek üretilen nanopartiküllerin boy-boy dağılımı grafikleri Şekil 4.10 ve 4.11’de verilmiştir.

4.1.3.3.1. Çapraz Bağlanma Derecesinin Manyetik CMCS Nanopartiküllerin Boy-Boy Dağılımına Etkisi

Bu kısımda çapraz bağlayıcı ajan olarak CaCl_2 kullanılmıştır. Çapraz bağlayıcı miktarının partikül boyutuna etkisini incelemek amacıyla CaCl_2 konsantrasyonunu, % 0.5, % 1 ve % 1.5 arasında değiştirilip diğer parametreler sabit tutulmuştur (% 0,5 CMCS, karıştırıcı hızı 1800 rpm ve karışma süresi 1 saat). Elde edilen nanopartiküllerin boyutları Şekil 4.10’ da gösterilmiştir.



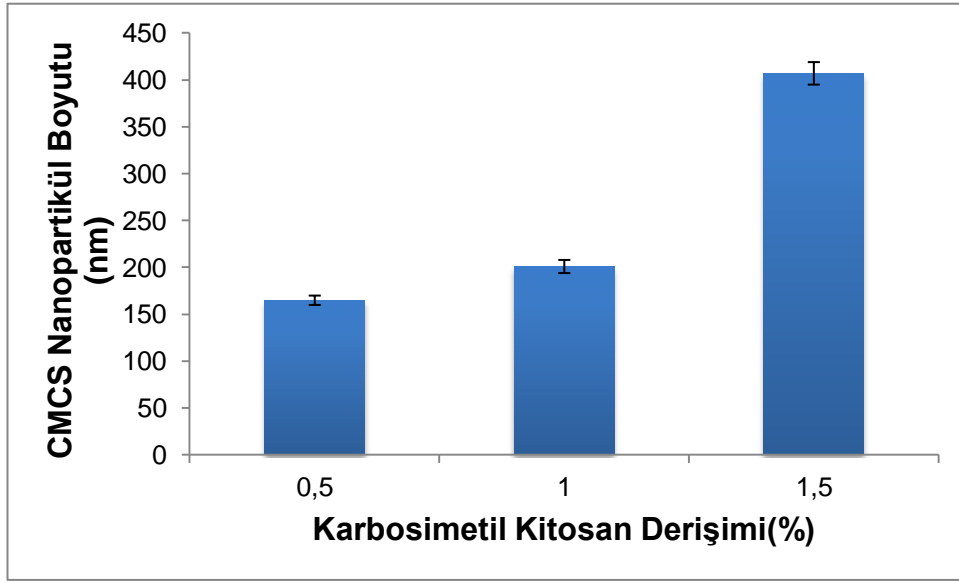
Şekil 4.10. CaCl_2 derişiminin CMCS nanopartikül boy-boy dağılımına etkisi.

Şekil 4.10’da görüldüğü gibi ortamdaki çapraz bağlayıcı oranı arttıkça manyetik karboksimetil kitosan nanopartiküllerin boyutları küçülmektedir. Bu durum CaCl_2

miktarındaki artışla daha küçük partiküllerin oluşmasına yol açan partikül büzüşmesi meydana gelmesi ile açıklanabilir [49]. Çalışma kapsamında elde edilen nanopartiküller makalede belirtilen boyutlardadır.

4.1.3.3.2. CMCS Polimer Derişiminin Manyetik Karboksimetil Kitosan Nanopartiküllerin Boy-Boy Dağılımına Etkisi

Polimer derişiminin partikül boyut etkisine bakmak amacı ile polimer miktarı % 0.5 ile % 1.5 arasında değiştirilerek bir seri deney yapılmıştır.



Şekil 4.11. Karboksimetil kitosan derişiminin karboksimetil kitosan nanopartikül boy-boy dağılımına etkisi.

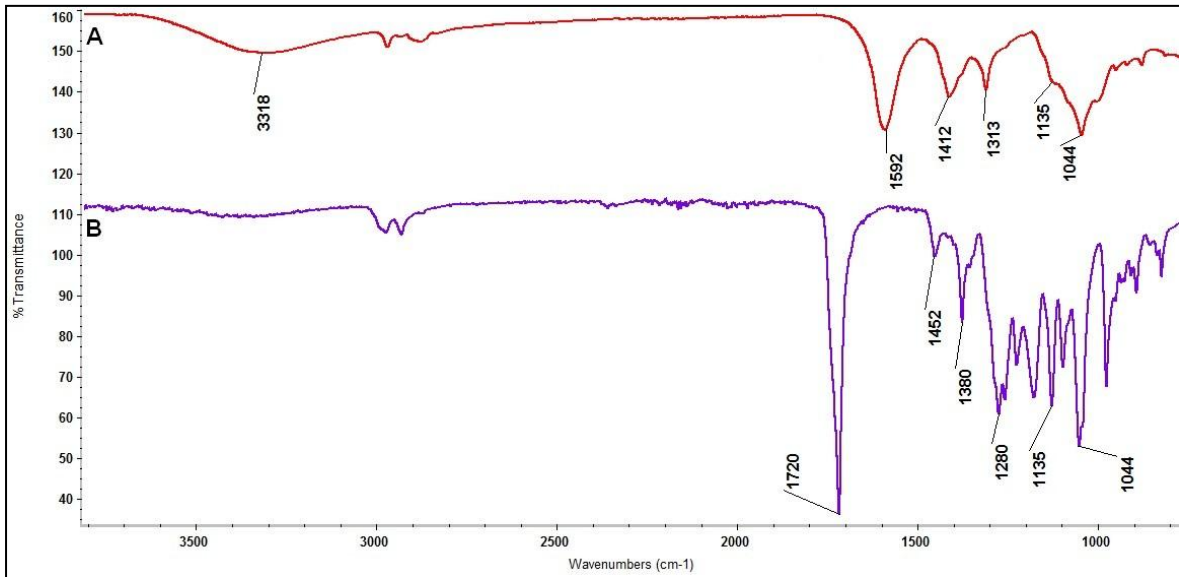
Polimer konsantrasyonu arttıkça viskozite artışından dolayı polimerin dispersiyon ortamında dağıtılması zorlaşacağından partikül boyutunda artışa neden olmaktadır [66]. Dolayısıyla Şekil 4.11' de görüldüğü gibi polimer miktarı arttıkça vizkozite artacağından dolayı nanopartiküllerin boyutlarında artış gözlenmiştir ve elde ettiğimiz bulgular makaleyi doğrular niteliktedir.

Sonuç olarak nanopartikül hazırlama prosedüründe karıştırma süresi ve hızı, CMCS polimer konsantrasyonu, CaCl₂ konsantrasyonu, sırasıyla 60 dakika, 1800 rpm, % 0,5 (w/v), ve kullanılan CMCS polimerinin CaCl₂ ye oranı 5:1 (w:w), olarak seçildiğinde en düşük nanopartikül boyutu olan 150 nm'ye ulaşılmıştır.

4.1.4. Manyetik PHB/CMCS Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

4.1.4.1. Karboksimetil Kitosanın Sentezi ve Karakterizasyonu

Yapılan çalışmada düşük molekül ağırlıklı kitosandan karboksimetil kitosan üretilmiş ve ardından polimer matriks olarak kullanılmak üzere nanopartikül sentezine katılmıştır. Elde edilen karboksimetil kitosanın FT-IR spektrumu Şekil 4.8’de verilmiştir. Ayrıca hazırlanan polihidroksibütirat/karboksimetil kitosan nanopartiküllerini karakterize etmek amacı ile CMCS polimeri ile karşılaştırmalı FT-IR spektrumları alınmıştır (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. CMCS polimer (A) ve PHB/CMCS nanopartiküle (B) ait FT-IR spektrumları.

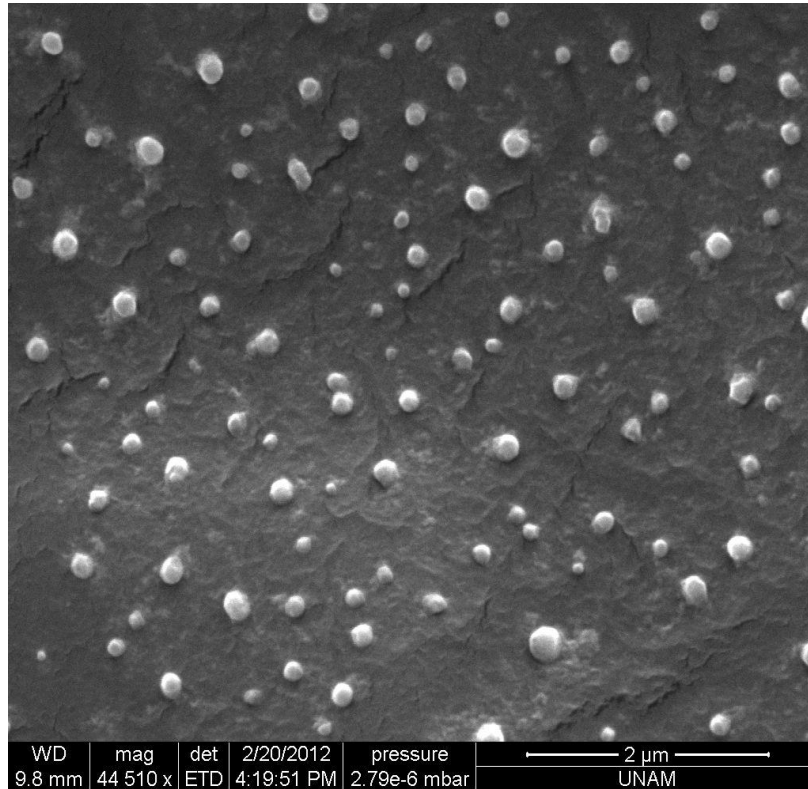
Çizelge 4.1.’ de verilen CMCS ve PHB/CMCS nanopartiküllerin FTIR spektrumundan elde edilen karakteristik pik grupları verilmiştir. Karboksimetil kitosan için 3318 (O-H gerilme), 1730-1590 (-COOH gerilme), 1412 (N-H gerilme), 1040–1135 cm⁻¹ (-C-O gerilme)’de görülen absorpsiyon pikleri karboksimetil kitosanın karakteristik pikleridir. Polihidroksibütirat için karakteristik pikler 1720 (C=O gerilme) ve 1280 (C-O gerilme) dalga sayısında gözlenmiştir. Buradaki FTIR spektrumunda elde edilen karakteristik pikler literatür ile uyushmaktadır [46][67].

Çizelge- 4.1. CMCS ve Polihidroksibütirat' ın FT-IR spektrumlarında görülen karakteristik pikler

Polihidroksibütirat		Karboksimetil Kitosan	
Karakteristik Pik	Dalga Sayısı (cm^{-1})	Karakteristik Pik	Dalga Sayısı (cm^{-1})
C=O gerilme	1850-1600	COOH gerilme	1730-1590
-C-O gerilme	1300-950	-C-O gerilme	1040-1135
CH ₃ eğilme	1380-1460	N-H gerilme	1414-1401

4.1.4.2. Polihidroksibütirat - Karboksimetil Kitosan (PHB-CMCS) Nanopartiküllerin Morfolojik Özellikleri

Sunulan çalışmalar kapsamında, hazırlanan PHB-karboksimetil kitosan nanopartiküllerin SEM fotoğrafı Şekil 4.13' te verilmiştir. Fotoğraftan da görüleceği üzere hazırlanan PHB-karboksimetil kitosan nanopartiküller küresel formda ve monodispers özelliğe sahiptir. Partiküller ortalama 180-200 nm boy aralığındadır.

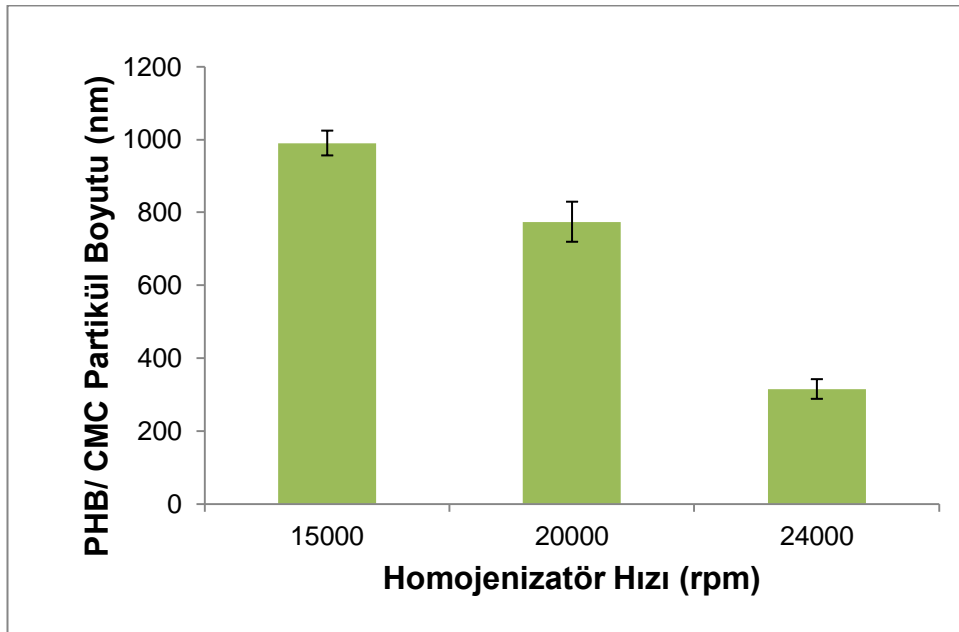


Şekil 4.13. PHB- karboksimetil kitosan nanopartiküllerin SEM fotoğrafı.

4.1.4.3. PHB/CMCS Nanopartiküllerin Boy-Boy Dağılımına Etki Eden Parametreler

Yapılan çalışmalar kapsamında, partiküllerin hazırlanması için kullanılan homojenizatör hızı ve emülsifier konsantrasyonu PHB/CMCS nanopartiküllerin boyutuna etki eden parametreler olarak belirlenmiş olup, elde edilen sonuçlar detaylarıyla alt başlıklar halinde verilmektedir. Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda 180-900 nm boyut aralığında PHB/Kitosan nanopartiküller elde edilmiştir.

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

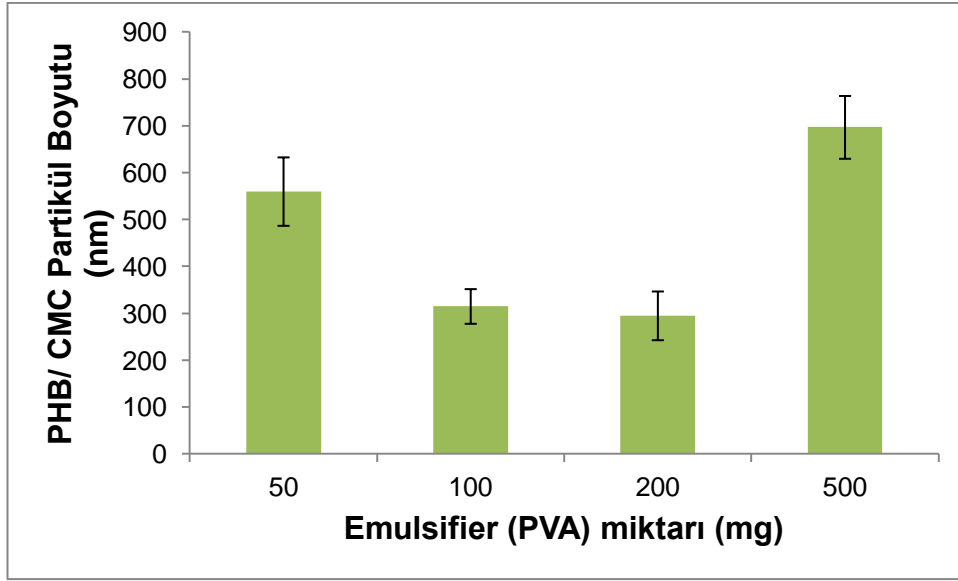


Şekil 4.14. Homojenizatör hızının partikül boyutuna etkisi.

Şekil 4.14' te görüldüğü gibi homojenizatör genliği 15000-24000rpm aralığında arttırıldığında PHB/CMCS nanopartiküllerin boyutlarının azaldığı gözlenmiştir. Homojenizatör 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 [68]. Lee ve ark., 2003 te yaptığı çalışmada homojenizatör hızı arttırıldığında birim zamandaki yüksek kayma dayanımı nedeniyle damlacıkların boyutunun azaldığı ve buna bağlı

olarak nanopartiküllerin boyutunun küçüldüğü görülmektedir [69]. Yapılan çalışmada 15000 rpm sonikatör genliği ile üretilen nanopartiküllerin boyutları 990 nm iken; 20000 rpm'de bu değer 774 nm'ye ve 24000rpm'de de 315 nm' ye düşmüştür. Nanopartiküllerin boy dağılım indeksleri (PDI) sırasıyla; 0,547; 0,306; 0,343.

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



Şekil 4.15. Emulsifier (PVA) miktarının partikül boyutuna etkisi

Emülsiyeye edici ajanın türü ve konsantrasyonu emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yönteminde oldukça önemli bir parametredir. Bu amaçla tween 80, jelatin, dextran ve PVA gibi çeşitli stabilize edici ajanlar kullanılmaktadır [70]. Nanopartiküllerin üretimi sırasında oluşan damlacık ve proto-nanopartiküllerin stabilize edilmesi parçacıkların yığın oluşturmalarını ve birleşmesini engelleyecek, bu da küçük boyutlarda partiküllerin oluşmasını sağlayacaktır [71]. 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 4.15'te de görüldüğü üzere, en küçük nanopartikül boyutuna 200 mg PVA kullanılarak ulaşılmaktadır. PVA miktarı 50 mg iken nanopartikül boyutu 560 nm; 100 mg iken 315 nm, 200 mg iken 295 nm ve

500 mg iken 597 nm'dir. Nanopartiküllerin boy dağılım indeksleri (PDI) sırasıyla; 0,341; 0,385; 0,214; 0,417.

4.2. Biyopolimerik Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Tezin ilk altı aylık dönemi içerisinde manyetik Fe₃O₄ nanopartiküllerin ardından bu nanopartikülleri ve daha sonraki uygulamalarda diğer ajanları (ligand, etken madde ve/veya biyomolekülleri) taşıyacak olan polimerik nanotaşıyıcılar geliştirilmiştir. Bu aşamada nanopartikül hazırlanmasında kullanılması planlanan polimerler suda çözünebilen ve suda çözünmeyen biyolojik olarak bozunabilen polimerik yapılardan seçilmiştir. Bu polimerler sırasıyla;

Suda (veya sulu çözeltilerde) çözünebilen polimerler

- Kitosan
- Karboksimetil kitosan

Organik çözücülerde çözünebilen polimerler

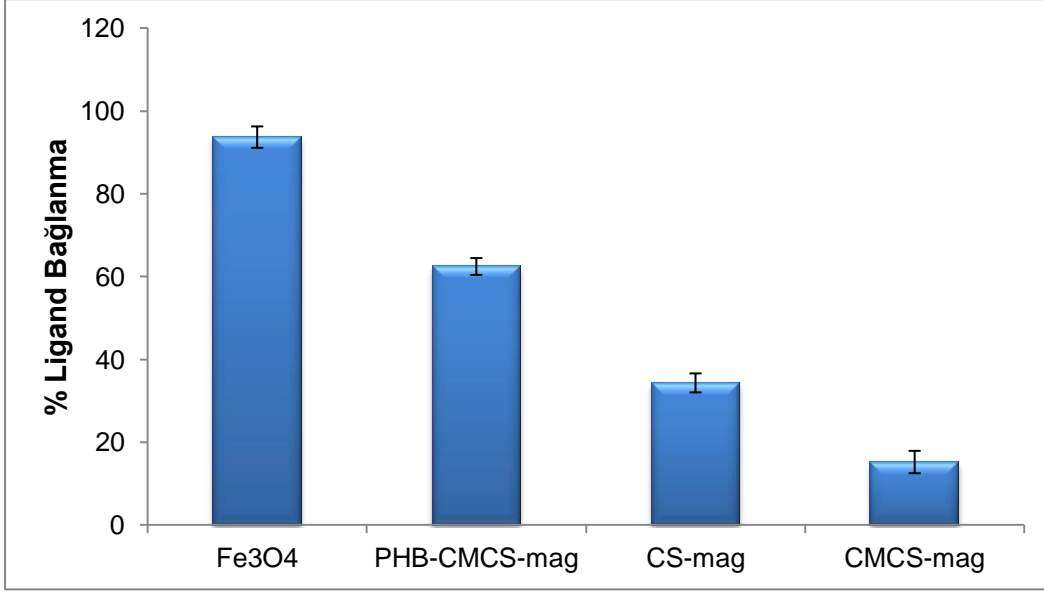
- PHB/Karboksimetil kitosan

4.3. Biyopolimerik Nanopartiküllere Ligand Takılması

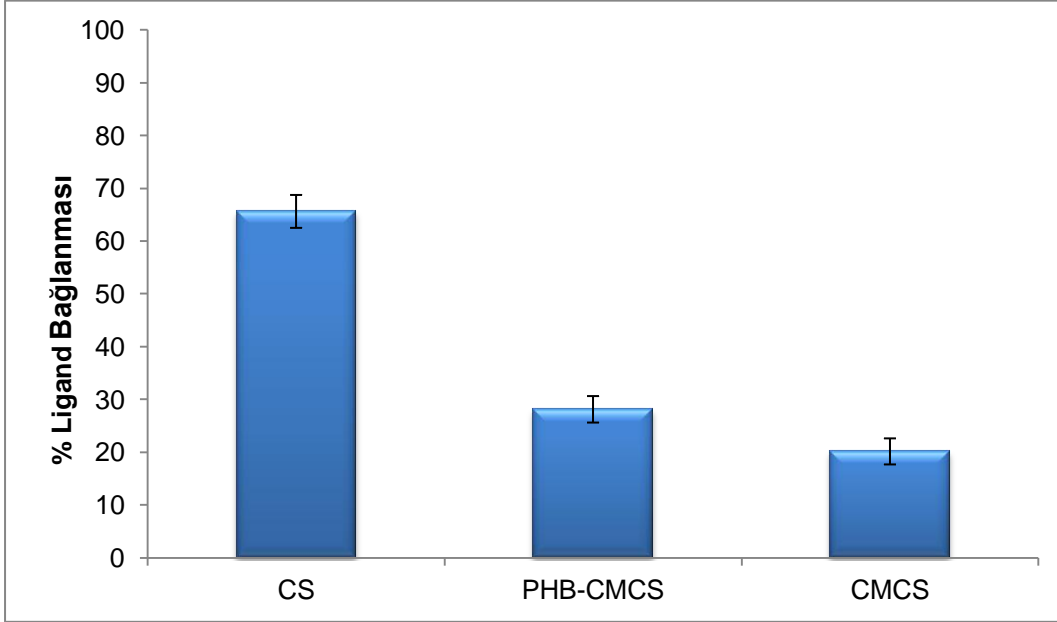
Sunulan tez çalışması kapsamında proje önerisinde belirtilen ligandlardan öncelikle biri model olarak seçilerek, gerekli yüzey modifikasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla daha önce yapılan çalışmalarda kanser teşhis ve tedavisinde kullanılmak üzere hazırlanan, manyetik özelliğe sahip kitosan nanopartiküllerin yüzey modifikasyon işlemlerinde Konkavalin-A proteini model ligand olarak kullanılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir [59]. Bu nedenle yapılan yüzey modifikasyon işlemlerinde bir başka deyimle ligand bağlanması deneylerinde de benzer işlem basamakları izlenmiştir.

Tez çalışmasında kullanılmak üzere hazırlanan kitosan, karboksimetil kitosan, PHB-CMCS partiküllerin IgG1 ligandı ile bağlanma işlemleri gerçekleştirilmiştir. Bu işlemler sonucunda elde edilen % bağlanma verimine göre ise diğer ligandların, Anneksin A1 (0.85mg/mL) ve Anneksin A5 (50µg/250µL), hangi partikülle etkileştirileceğine karar verilmiştir.

Partiküllerin IgG1 ligandı ile bağlanma %'leri Şekil 4.16. ve 4.17'deki gibidir.



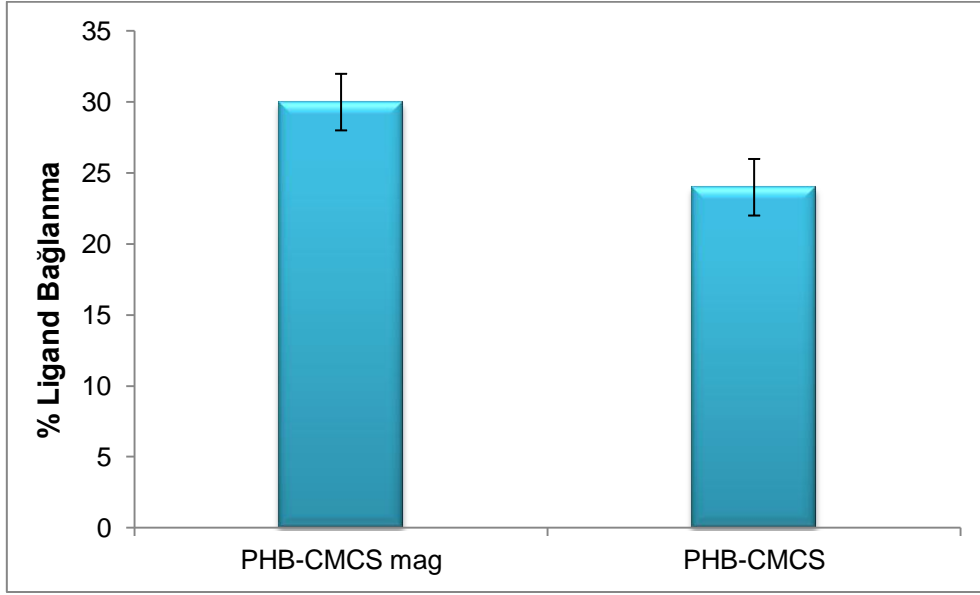
Şekil 4.16. Manyetik özelliğe sahip, Fe₃O₄ yüklü nanopartiküllerinin IgG1 ligandına bağlanma %'leri



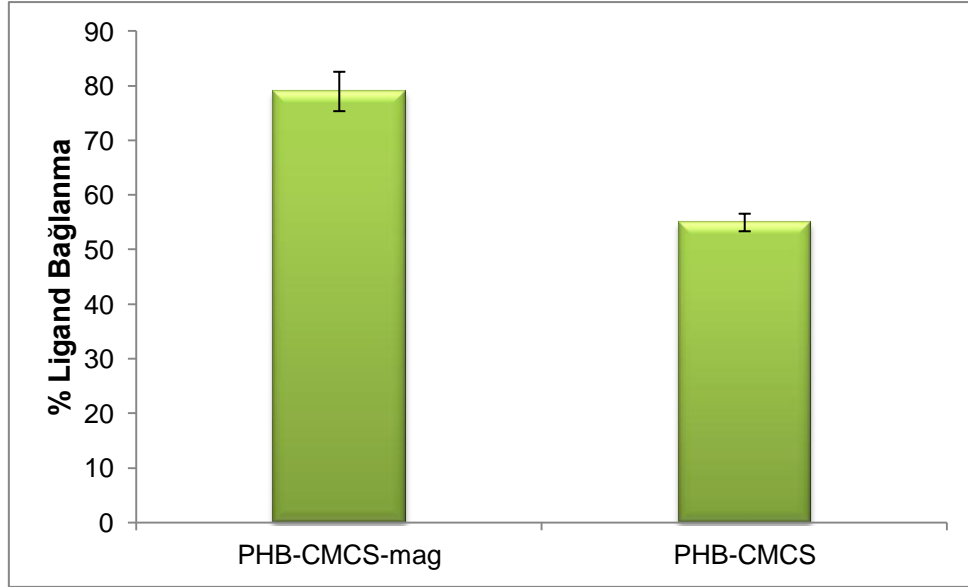
Şekil 4.17. Manyetik özelliğe sahip olmayan nanopartiküllerin, IgG1 ligandı ile bağlanma %'leri.

Bu veriler doğrultusunda manyetik özelliğe sahip olan ve olmayan PHB-CMCS nanopartiküllerinin Anneksin A1 ve Anneksin A5 ligandları ile etkileştirilmesine karar verilmiştir.

Şekil 4.18. ve 4.19'da Anneksin A1 ve A5 ligandlarının PHB-CMCS partiküllerine bağlanma %'leri aşağıda gösterilmiştir.



Şekil 4.18. PHB-CMCS nanopartiküllerinin Anneksin A1 ligandına bağlanma %'leri.



Şekil 4.19. PHB-CMCS nanopartiküllerinin Anneksin A5 ligandına bağlanma %'leri.

Sunulan çalışmalar kapsamında gerçekleştirilen deneysel çalışmalardan elde edilen bulgulara göre hazırlanan biyopolimerik nanopartiküllerden özellikle kitosan, karboksimetil kitosan ve polihidroksibütirat-karoksimetil kitosan (PHB-CMCS)

nanopartiküllerden özellikle manyetik nanopartikül içeren formlarda beklendiği gibi daha yüksek ligand bağlanma verimi elde edilmiştir. Ayrıca tüm bağlanma verimliliği değerleri incelendiğinde Fe_3O_4 nanopartiküller yalın olarak kullanıldığında en yüksek ligand bağlanma kapasitesine ulaşıldığı ve öte yandan manyetik nanopartikül içeren biyopolimerik nanopartiküllerinde boş nanopartiküllerden daha yüksek ligand bağlanma verimliliğine sahip olduğu belirlenmiştir. Buradaki temel farklılık protein yapısında olan ligandların özellikle metallerle şelat oluşturma yeteneğinden dolayı bu sonuçlar beklenen sonuçlar olarak değerlendirilmektedir.

Öte yandan gerçekleştirilen deneysel çalışmalarda kullanılan tüm nanopartiküllerin boyut analizleri yapıldığında Çizelge-4.2'de sunulan bulgular elde edilmiştir.

Çizelge-4.2. Ligand bağlanma deneylerinde kullanılan nanopartiküllerin boy-boy dağılımları

Nanopartikül türü	Nanopartikül boy aralığı (nm)
Fe_3O_4 nanopartikül	15-17
Kitosan nanopartikül (CS)	260-274
Manyetik kitosan nanopartikül (CS-mag)	190-263
Karboksimetil kitosan nanopartikül (CMCS)	144-212
Manyetik karboksimetil kitosan nanopartikül (CMCS-mag)	188-234
Polihidroksibütirat-karboksimetil kitosan nanopartikül (PHB-CMCS)	163-184
Manyetik Polihidroksibütirat-karboksimetil kitosan nanopartikül (PHB-CMCS-mag)	143-211

Çizelge-4.2.'de verilen bulgular incelendiğinde Fe_3O_4 nanopartiküllerin ortalama büyüklükleri yaklaşık olarak 16 nm dolayında ve diğer polimer kaplı nanopartiküllerden yaklaşık olarak 10-15 kat daha küçüktür. Bu nedenle Fe_3O_4

nanopartiküllerin aynı kütledeki polimer içeren nanopartiküller ile yüzey alanları karşılaştırıldığında oldukça büyük farklılıklar ortaya çıkmaktadır. Özet olarak ligand bağlanması esnasında bağlanma noktası olarak Fe_3O_4 nanopartiküllerde çok daha fazla imkan bulunduğundan bağlanma verimliliğinin son derece yüksek olması kolay anlaşılır bir durum haline gelmektedir. Ancak diğer formülasyonlar ile ilgili olarak benzer yorumları yapmak çizelge-4.2.'de verilen bulgular yeniden değerlendirildiğinde nanopartikül boy aralığı değerlerinin olabildiğince birbirine yakın olması nedeniyle benzer yorumları yapmak pek mümkün görünmemektedir.

4.4. Biyopolimerik Nanopartikül-Hücre Etkileşimleri

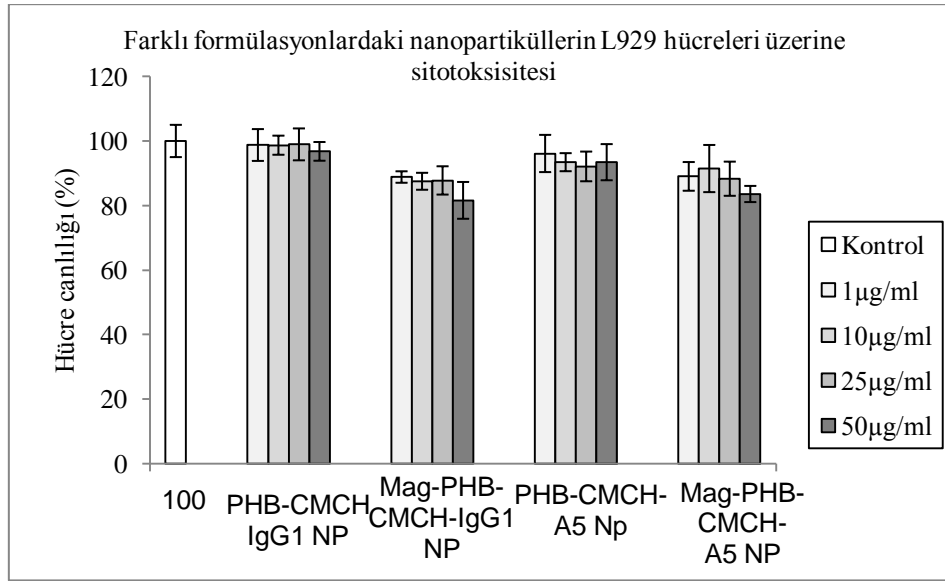
Tez çalışmaları bu aşamasında daha önceki proje gelişme döneminde hazırlanan biyopolimerik nanopartiküller kullanılarak gerçekleştirilen biyolojik uyum ya da bir başka deyimle sitotoksikite deneyleri ikinci gelişme döneminde hazırlanan ligand bağlanmış olan nanopartikül formülasyonları ile de tekrarlanmıştır. Bu amaçla öncelikle farklı formülasyonlara sahip nanopartiküller ISO 10993-5 no'lu standard'da belirtilen standart hücre hatlarından L929 (fare fibroblast hücreleri) ile farklı konsantrasyonlarda (50, 25, 10 ve 1 $\mu\text{g/ml}$) nanopartiküller şeklinde etkileştirilerek incelenmiştir.

Çalışmaların daha sonraki bölümlerinde ise hayvan deneyleri öncesinde hazırlanan ligand takılı nanopartiküller ile uygun hücre hatlarının etkileştirilerek elde edilen bulguların sonraki aşamalarda alt yapı olarak kullanılması için gerekli çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla da kardiyovasküler sistem rahatsızlıkları söz konusu olduğunda canlı sistemde karşılaşılabilecek hücre hatlarından düz kas hücreleri ve damar endotel hücreleri yapılan değerlendirmelerde model hücre hatları olarak kullanılmıştır. Bu kapsamda A7r5 düz kas hücreleri (Smooth muscle cells from rat embryonic thoracic aorta) ile HUVEC endotel (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) hücreleri kullanılmıştır. Bu hücreler ile öncelikle MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) testi ile biyolojik uyumluluk testleri tekrarlanmış ve sonrasında floresans mikroskobu yardımıyla özellikle ileri aşamalarda kullanılması planlanan manyetik özellikli nanopartiküller kullanılarak hücre-nanopartikül etkileşimleri görsel olarak değerlendirilmiştir.

4.4.1. L929 Hücreleri Üzerine Farklı Formülasyonlarda Hazırlanan Nanopartiküllerin Sitotoksitesisi

Bu bölümde yapılan çalışmalarda daha önceki bölümlerde ayrıntılı olarak ligand bağlanma verimlilikleri açıklanan nanoartikül formülasyonlarının (CS, CMCS, PHB-CMCS nanopartiküller) hem manyetik özelliğe sahip olmayan formları hem de manyetik özelliğe sahip olan formları ayrı ayrı değerlendirilmiş ve 3 farklı ligand (IgG1, Anneksin A1 ve Anneksin A5) için tüm deneyler benzer şekilde gerçekleştirilmiştir.

Şekil 4.20'de farklı konsantrasyonlarda (50, 25,10 ve 1µg/ml) IgG1 ve Annexin A5 ile modifiye edilmiş PHB-CMCS nanopartiküllerin L929 hücreleri üzerine sitotoksitesite sonuçları verilmiştir. Nanopartiküller hücreler ile 24 saat boyunca etkileştirilmiştir.

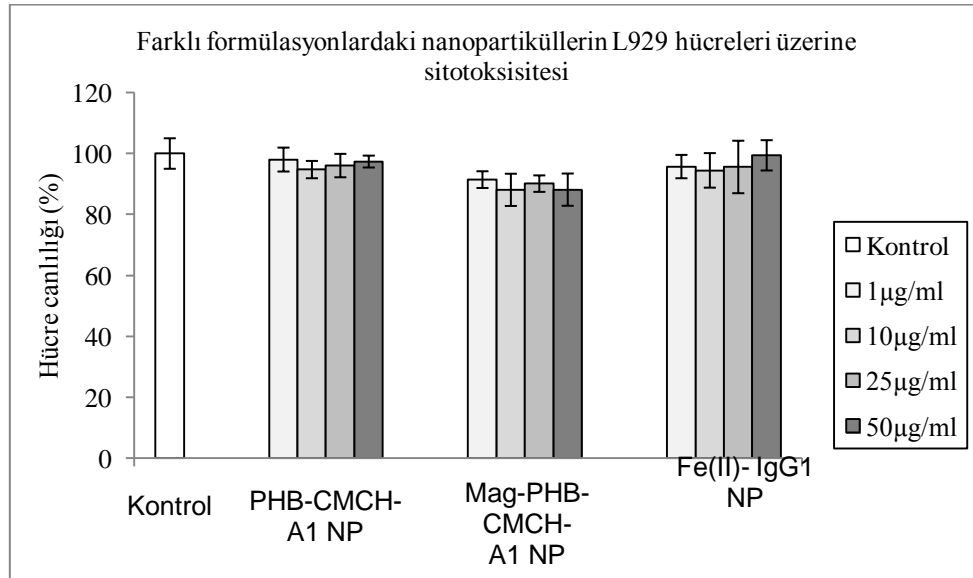


Şekil 4.20. Nanopartikül-L929 hücre etkileşimlerine Anneksin A5 ve IgG1 etkisi.

Sitotoksitesite çalışmaları sonuçlarına göre, IgG1 ile modifiye PHB-CMCS nanopartiküllerin sitotoksitesiteleri %5 ile sınırlı kalmıştır. Manyetik formdaki PHB-CMCS-IgG1 nanopartiküllerin sitotoksitesiteleri ile yaklaşık %12 olarak bulunmuştur. Bir önceki çalışmalardan alınan sonuçlar dikkate alındığında IgG1 modifikasyonun PHB-CMCS ve manyetik formunun sitotoksitesitesini etkilemediği görülmüştür.

Aneksin 5 ile modifiye edilmiş PHB-CMCS nanopartiküllerin L929 hücreleri üzerine sitotoksitelerinin yaklaşık %7, manyetik formdaki nanopartiküllerin ise yaklaşık %11 olduğu saptanmıştır. Bir önceki çalışmadan alınan sonuçlar dikkate alındığında aneksin 5 modifikasyonunun PHB-CMCS nanopartiküllerin sitotoksitelerinin etkilemediği, fakat manyetik formdaki nanopartiküllerin sitotoksitelerini yaklaşık %2 artırdığı saptanmıştır.

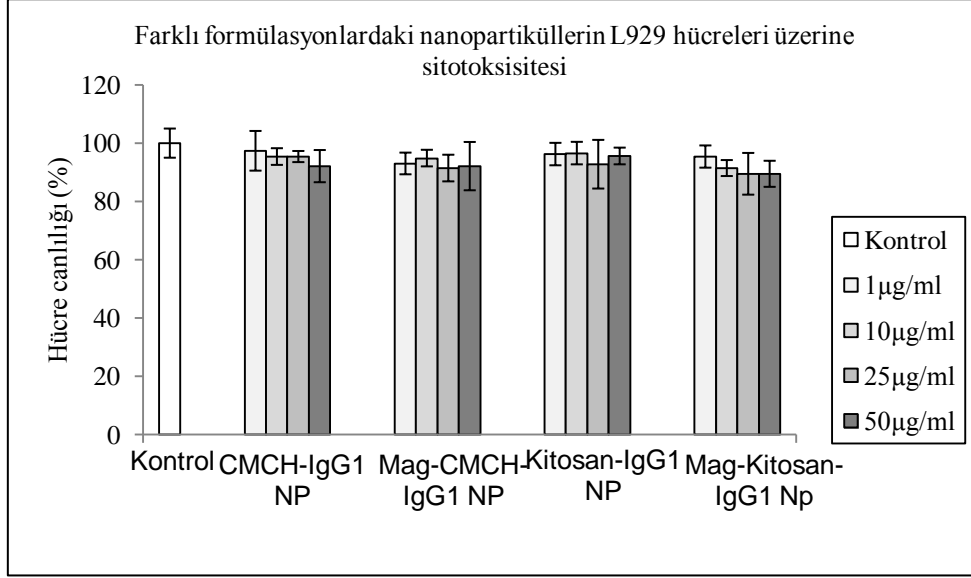
Şekil 4.21.'de farklı konsantrasyonlarda (50, 25, 10 ve 1 µg/ml) IgG1 ve Annexin A1 ile modifiye edilmiş PHB-CMCS ve demir nanopartiküllerin L929 hücreleri üzerine sitotoksite sonuçları verilmiştir. Nanopartiküller hücreler ile 24 saat boyunca etkileştirilmiştir.



Şekil 4.21. Nanopartikül-L929 hücre etkileşimlerine Anneksin A1 ve IgG1 etkisi.

Yapılan sitotoksite çalışmalarına göre, aneksin 1 ile modifiye edilmiş PHB-CMCS nanopartiküllerin sitotoksiteleri yaklaşık %3, manyetik formdaki nanopartiküllerin ise yaklaşık %10 olduğu saptanmıştır. Bir önceki çalışmalar dikkate alındığında annexin 1 ile modifikasyonun PHB-CMCS nanopartiküllerin ve bunların manyetik formülasyonlarının sitotoksitelerini etkilemediği saptanmıştır. IgG1 ile modifiye demir nanopartikülün sitotoksitesisi yaklaşık %5 olarak bulunmuştur ve bir önceki çalışma dikkate alındığında IgG1 modifikasyonunun demir nanopartiküllerin sitotoksitesini etkilemediği görülmüştür.

Şekil 4.22.'de farklı konsantrasyonlarda (50, 25, 10 ve 1 µg/ml) IgG1 ile modifiye edilmiş CMCS ve kitosan nanopartiküllerin ve bunların manyetik formlarının L929 hücreleri üzerine sitotoksosite sonuçları verilmiştir. Nanopartiküller hücreler ile 24 saat boyunca etkileştirilmiştir.

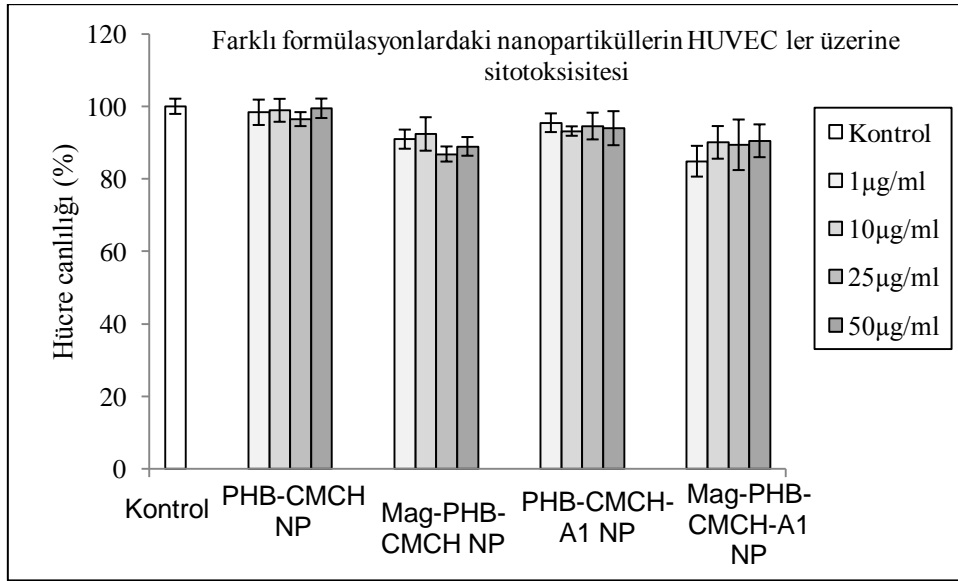


Şekil 4.22. Nanopartikül-L929 hücre etkileşimlerine IgG1 etkisi.

Yapılan sitotoksosite çalışmalarına göre, IgG1 ile modifiye edilmiş CMCS nanopartiküllerin sitotoksisitelerinin konsantrasyona bağlı olarak %3 ile %8 arasında değiştiği saptanmıştır. Manyetik formdaki CMCS-IgG1 nanopartiküllerin ise yaklaşık %7 sitotoksik olduğu görülmüştür. Bir önceki yapılan çalışmalara göre IgG1 modifikasyonun CMCS nanopartiküllerin L929 hücrelerine sitotoksitesini %2-3 azalttığı saptanmıştır. IgG1 modifiye kitosan nanopartiküllerin sitotoksisiteleri incelendiğinde konsantrasyona bağlı olarak %4 ile %8 arasında değiştiği saptanmıştır. Manyetik formdaki kitosan-IgG1 nanopartiküllerin ise %5 ile %11 arasında sitotoksik olduğu görülmüştür. Bir önceki çalışmalar dikkate alındığında, IgG1 modifikasyonun kitosan nanopartiküllerin sitotoksisiteleri üzerine bir etkilerinin olmadığı, fakat manyetik formdaki nanopartiküllerin sitotoksisitelerini yaklaşık % 3 arttırdıkları görülmüştür.

4.4.2. Biyopolimerik NP'ler ile damar endotel hücrelerinin (HUVEC) etkileşimi

Çalışmaların bu bölümünde daha önceki bölümlerde inceleme altına alınan biyopolimerik nanopartiküllerden PHB-CMCS-mag nanopartiküller her bir ligand ile (Anneksin A1, Anneksin A5 ve IgG1) biraraya getirilerek damar endotel hücreleri (HUVEC) ile etkileştirilmiştir. L-929 hücre hattı ile yapılan çalışmalara benzer şekilde öncelikle hücrelerin her bir nanopartikül formülasyonu karşısında gösterdikleri uyum (bir başka deyimle canlılık performansları) belirlenmiş daha sonra yapılan mikroskopik incelemeler ile nanopartiküllerin hücrelere girişi (ya da hücrelere tutunmaları) belirlenmiştir. İlk grupta elde edilen değerler Şekil 4.23.'de farklı konsantrasyonlarda (50, 25, 10 ve 1 µg/ml) PHB-CMCS nanopartikülleri ve bu partiküllerin manyetik formlarının HUVEC hücreleri üzerine sitotoksitesite sonuçları verilmiştir. Nanopartiküller hücreler ile 24 saat boyunca etkileştirilmiştir.

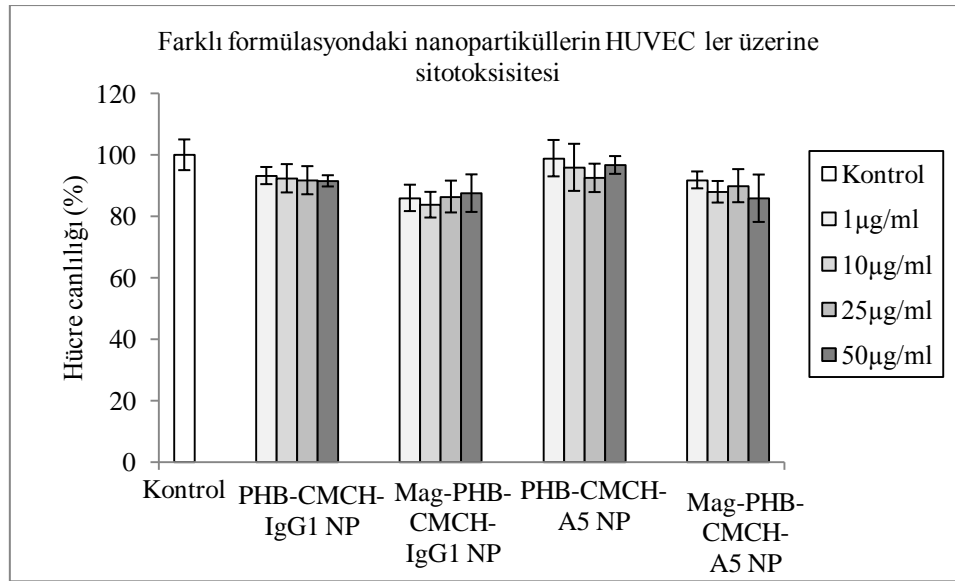


Şekil 4.23. PHB-CMCS NP-HUVEC hücre etkileşimlerine Anneksin A1 etkisi.

Sitotoksitesite çalışması sonuçlarına göre, PHB-CMCS nanopartiküllerin HUVEC'ler üzerine sitotoksitesitesinin % 2 ile % 4 arasında sınırlı kaldığı görülmüştür. Sitotoksitesite oranlarının nanopartikül konsantrasyonu ile değişmediği saptanmıştır. Manyetik formda hazırlanan PHB-CMCS nanopartiküllerin ise yaklaşık % 10 sitotoksik olduğu saptanmıştır. Bu da manyetik nanopartiküllerin daha reaktif olduğunu göstermektedir. Anneksin 1 ile modifiye PHB-CMCS partiküllerin % 5 ile

7 arasında sitotoksik olduğu saptanmıştır. Bu durum aneksin 1 modifikasyonunun nanopartiküllerin sitotoksik aktivitelerini yaklaşık % 5 artırdığını göstermektedir. Aneksin 1 takılı manyetik nanopartiküllerin sitotoksiteseleri incelendiğinde, sitotoksosite oranlarının % 10 ile % 16 arasında değiştiği saptanmıştır.

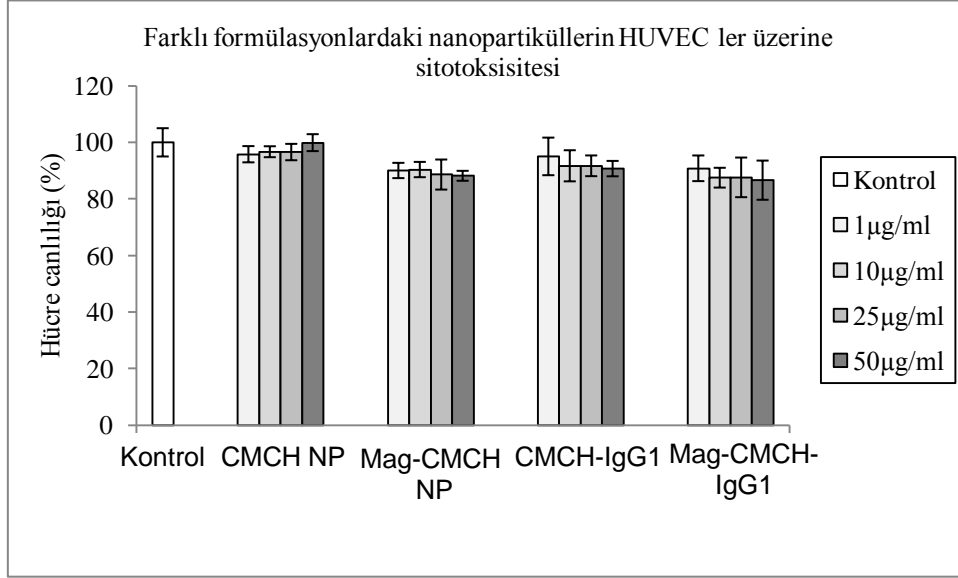
Şekil 10'da farklı konsantrasyonlarda (50, 25, 10 ve 1 µg/ml) IgG1 ve Anneksin 5 takılı PHB-CMCS nanopartikülleri ve bu partiküllerin manyetik formlarının HUVEC hücreleri üzerine sitotoksosite sonuçları verilmiştir. Nanopartiküller hücreler ile 24 saat boyunca etkileştirilmiştir.



Şekil 4.24. PHB-CMCS NP-HUVEC etkileşimlerine Anneksin A5 ve IgG1 etkisi.

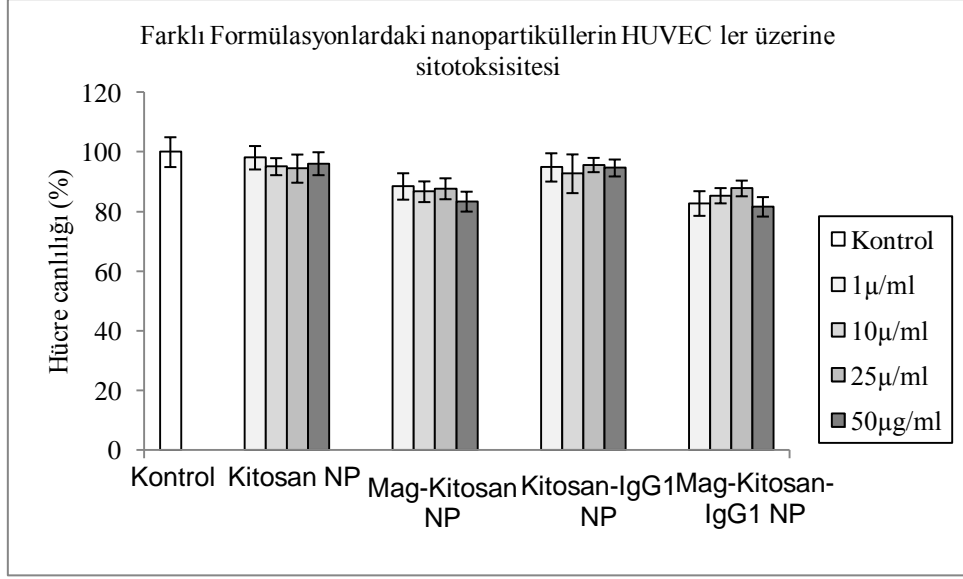
Sitotoksosite çalışması sonuçlarına göre, IgG1 ile modifiye edilmiş PHB-CMCS nanopartiküllerin HUVEC'ler üzerine sitotoksitesininin % 7 ile % 9 arasında sınırlı kaldığı görülmüştür. Sitotoksosite oranlarının nanopartikül konsantrasyonu ile değiştiği saptanmıştır. Anneksin 5 ile modifiye edilen nanopartiküllerin sonuçları incelendiğinde, bu partiküllerin HUVEC'ler üzerine sitotoksitesininin % 2 ile % 8 arasında olduğu ve nanopartikül konsantrasyonu arttıkça sitotoksitesinde artışı saptanmıştır. Anneksin 5 ve IgG1 takılı manyetik nanopartiküllerin sonuçları incelendiğinde, IgG1 ile modifiye edilen nanopartiküllerin % 13 ile % 17 arasında; aneksin 5 ile modifiye edilenlerin ise % 9 ile % 14 sitotoksik olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlara göre IgG1 modifikasyonunun manyetik partiküllerin sitotoksitesini yaklaşık % 6, annexin 5'in ise yaklaşık % 7 artırdığı saptanmıştır.

Şekil 4.25.'te farklı konsantrasyonlarda (50, 25, 10 ve 1 µg/ml) IgG1 takılı CMCH nanopartikülleri ve bu partiküllerin manyetik formlarının HUVEC hücreleri üzerine sitotoksosite sonuçları verilmiştir. Nanopartiküller hücreler ile 24 saat boyunca etkileştirilmiştir.



Şekil 4.25. CMCS ve Mag-CMCS nanopartikül-HUVEC etkileşimlerine IgG1 etkisi.

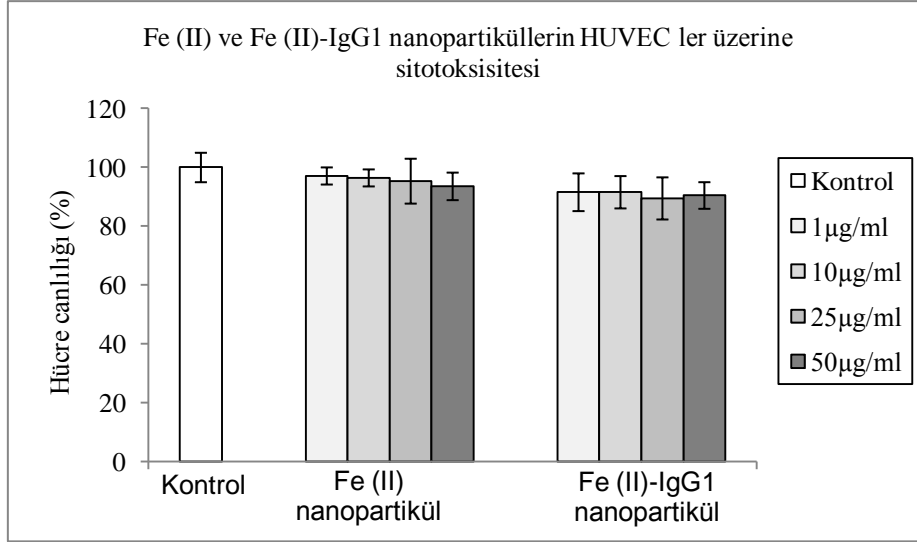
Sitotoksosite çalışması sonuçlarına göre, CMCS nanopartiküllerin sistoksitelerinin %5 ile sınırlı kaldığı görülmüştür. Manyetik CMCS'lerin ise %10 ile %12 arasında sitotoksik olduğu saptanmıştır. IgG1 ile modifiye edilmiş CMCS nanopartiküllerin konsantrasyona bağlı olarak % 5 ile % 10 arasında, IgG1 ile modifiye manyetik CMCS nanopartiküllerin ise % 10 ile % 14 arasında sitotoksik olduğu saptanmıştır. Sonuçlara göre IgG1 modifikasyonun CMCS nanopartiküllerin sitotoksitelerini yaklaşık olarak % 5, manyetik formdaki CMCS'lerin ise % 4 artırdığı görülmüştür. Şekil 4.26'da farklı konsantrasyonlarda (50, 25, 10 ve 1 µg/ml) IgG1 takılı kitosan nanopartikül ve bu partiküllerin manyetik formlarının HUVEC hücreleri üzerine sitotoksosite sonuçları verilmiştir. Nanopartiküller hücreler ile 24 saat boyunca etkileştirilmiştir.



Şekil 4.26. CS ve Mag-CS nanopartikül-HUVEC etkileşimlerine IgG1 etkisi.

Sitotoksosite çalışması sonuçlarına göre, kitosan nanopartiküllerin sitotoksitesilerinin %6 ile sınırlı kaldığı görülmüştür. Manyetik formdaki kitosan nanopartiküllerin ise sitotoksosite oranlarının % 12 olduğu saptanmıştır. IgG1 ile modifiye edilen nanopartiküllerin sitotoksitesilerinin % 8, IgG1 ile modifiye manyetik nanopartiküllerin ise % 15 olduğu saptanmıştır. Sonuçlara göre IgG1 ile modifikasyonun kitosan nanopartiküllerin sitotoksitesilerini % 2, manyetik formdakilerinin de % 4 oranında artırdığı saptanmıştır.

Şekil 4.27.'de farklı konsantrasyonlarda (50, 25, 10 ve 1 µg/ml) IgG1 ile modifiye edilmiş demir nanopartiküllerin HUVEC hücreleri üzerine sitotoksosite sonuçları verilmiştir. Nanopartiküller hücreler ile 24 saat boyunca etkileştirilmiştir.

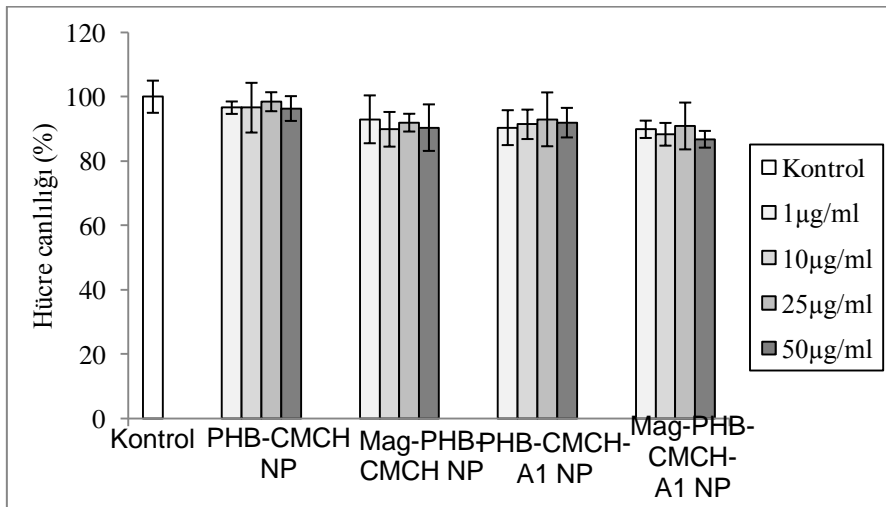


Şekil 4.27. Fe₃O₄ nanopartikül-HUVEC etkileşimlerine IgG1 etkisi

Sitotoksosite çalışması sonuçlarına göre, demir nanopartiküllerin sitotoksitesilerinin %4 ile sınırlı kaldığı görülmüştür. IgG1 ile modifiye edilmiş demir nanopartiküllerin ise sitotoksosite oranları yaklaşık olarak % 10 olarak bulunmuştur. IgG1 modifikasyonunun demir nanopartiküllerin sitotoksitesilerini % 6 oranında artırdığı görülmüştür.

4.4.3. Biyopolimerik nanopartiküller ile düz kas (A7r5) hücrelerinin etkileşimi

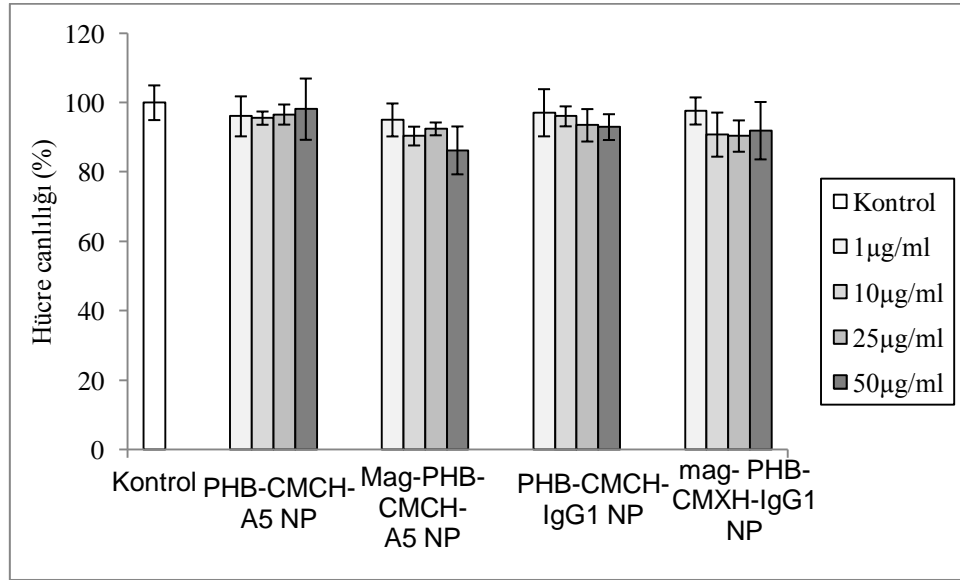
Şekil 4.28.'de farklı konsantrasyonlarda (50, 25, 10 ve 1 µg/ml) aneksin 1 ile modifiye edilmiş PHB-CMCS nanopartiküllerin ve bunların manyetik formlarının A7r5 hücreleri üzerine sitotoksosite sonuçları verilmiştir. Nanopartiküller hücreler ile 24 saat boyunca etkileştirilmiştir.



Şekil 4.28. PHB-CMCS NP-düz kas hücre etkileşimlerine Aneksin A1 etkisi

Sitotoksosite çalışmaları sonuçlarına göre PHB-CMCS nanopartiküllerinin A7r5 hücreleri üzerine sitotoksitelerinin % 4, manyetik PHB-CMCS nanopartiküllerin ise konsantrasyona bağlı olarak % 8 ile % 10 olduğu saptanmıştır. Aneksin 1 ile modifiye edilen PHB-CMCS nanopartiküllerin ise sitotoksosite oranlarının % 10, manyetik formların ise % 14 olduğu saptanmıştır. Sonuçlara göre aneksin 1 modifikasyonun PHB-CMCS nanopartiküllerin sitotoksitelerini % 6, manyetik formların ise yaklaşık % 4 artırdığı saptanmıştır.

Şekil 4.29.'da farklı konsantrasyonlarda (50, 25, 10 ve 1 µg/ml) IgG1 ve Aneksin 5 ile modifiye edilmiş PHB-CMCS nanopartiküllerin ve bunların manyetik formlarının A7r5 hücreleri üzerine sitotoksosite sonuçları verilmiştir. Nanopartiküller hücreler ile 24 saat boyunca etkileştirilmiştir.

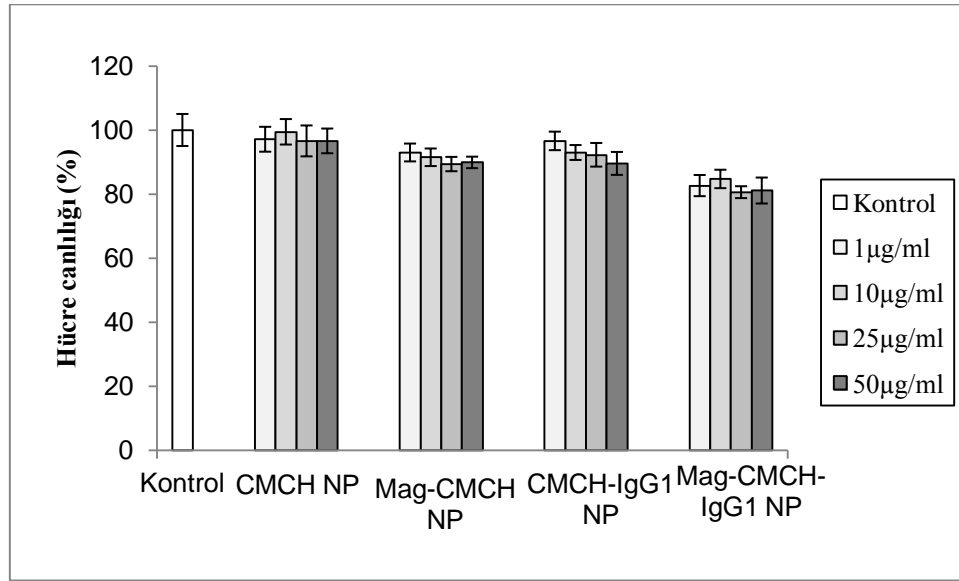


Şekil 4.29. PHB-CMCS nanopartikül-düz kas hücre etkileşimlerine Aneksin A5 ve IgG1 etkisi

Sitotoksosite çalışmalarının sonuçlarına göre aneksin 5 ile modifiye edilen PHB-CMCS nanopartiküllerin sitotoksitelerinin % 4, aneksin 5 ile modifiye manyetik PHB-CMCS nanopartiküllerin ise % 14 olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlara göre aneksin 5 ile modifikasyonun PHB-CMCS nanopartiküllerin sitotoksik etkileri üzerinde herhangi bir etkisinin olmadıkları saptanmıştır. Bununla birlikte aneksin 5 modifikasyonun manyetik PHB-CMCS nanopartiküllerin sitotoksitelerini yaklaşık %4 artırdığı saptanmıştır. IgG1 ile modifiye PHB-CMCS nanopartiküllerin

sitotoksitelerinin %2 ile %7 arasında değiştiği saptanmıştır. Manyetik formdaki IgG1 modifiye PHB-CMCS nanopartiküllerin ise %3 ile %10 arasında olduğu görülmüştür. Bu sonuçlarda IgG1 modifikasyonun PHB-CMCS nanopartiküllerin ve bu partiküllerin manyetik formlarının A7r5 hücreleri üzerine sitotoksitelerini etkilemediğini göstermektedir.

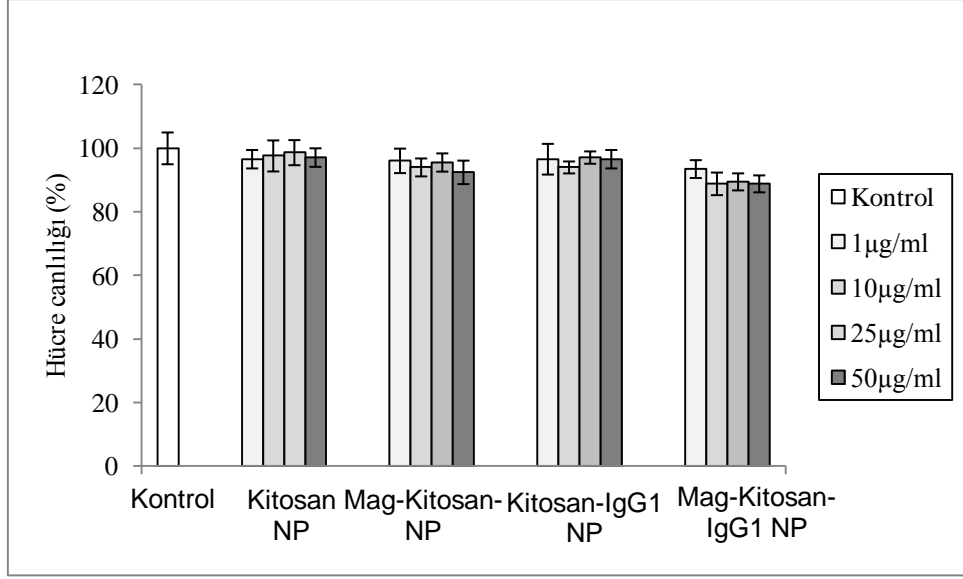
şekil 4.30.'da farklı konsantrasyonlarda (50, 25, 10 ve 1 $\mu\text{g/ml}$) IgG1 ile modifiye edilmiş CMCS nanopartiküllerin ve bunların manyetik formlarının A7r5 hücreleri üzerine sitotoksitite sonuçları verilmiştir. Nanopartiküller hücreler ile 24 saat boyunca etkileştirilmiştir.



şekil 4.30. CMCS nanopartikül-düz kas hücre etkileşimlerine IgG1 etkisi

Sitotoksitite çalışması sonuçlarına göre, CMCS nanopartiküllerin yaklaşık % 4, manyetik formdakilerin ise % 9 sitotoksik olduğu saptanmıştır. IgG1 modifiye CMCS nanopartiküllerin yaklaşık % 8, IgG1 modifiye manyetik CMCS nanopartiküllerin ise yaklaşık % 17 sitotoksik olduğu saptanmıştır. Bu durum da IgG1 modifikasyonun CMCS nanopartiküllerin sitotoksitelerini % 4, manyetik formdakilerin ise % 9 artırdığını göstermektedir.

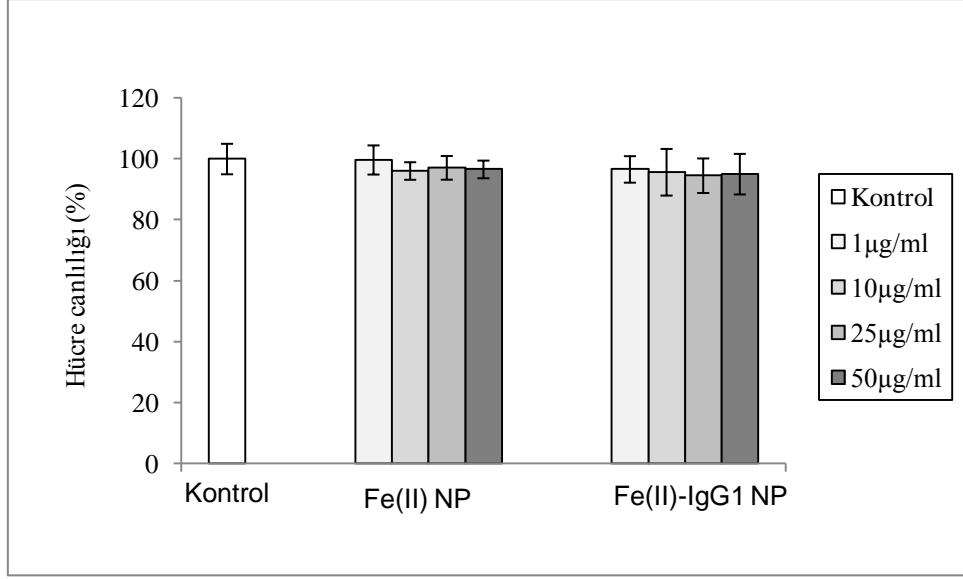
şekil 4.31.'de farklı konsantrasyonlarda (50, 25, 10 ve 1 $\mu\text{g/ml}$) IgG1 ile modifiye edilmiş kitosan nanopartiküllerin ve bunların manyetik formlarının A7r5 hücreleri üzerine sitotoksitite sonuçları verilmiştir.



Şekil 4.31. CS nanopartikül-düz kas hücre etkileşimlerine IgG1 etkisi

Sitotoksosite çalışmalarına göre, kitosan nanopartiküllerin sitotoksisitelerinin % 5, manyetik formlardakilerin ise konsantrasyona bağlı olarak % 2 ile % 8 arasında değiştiği saptanmıştır. IgG1 modifiye kitosan nanopartiküllerin yaklaşık % 6, manyetik IgG1 modifiye kitosan nanopartiküllerin ise konsantrasyona bağlı olarak % 7 ile %12 arasında olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlara göre IgG1 modifikasyonun kitosan nanopartiküllerin sitotoksisitelerini etkilemediği, bununla birlikte manyetik formlardakilerin sitotoksisitelerini % 5 artırdığı görülmüştür.

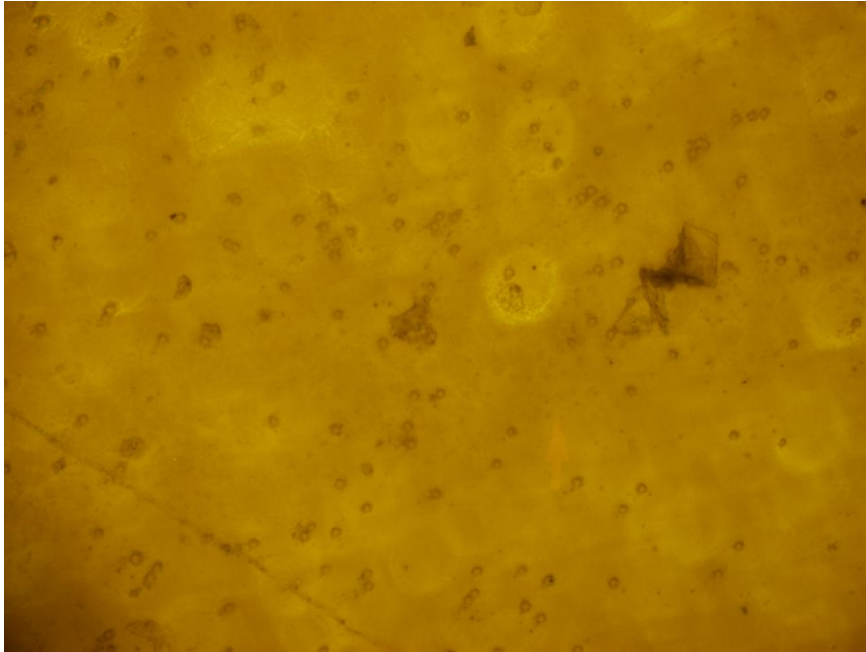
Şekil 4.32.'de farklı konsantrasyonlarda (50, 25, 10 ve 1 µg/ml) IgG1 ile modifiye edilmiş demir nanopartiküllerin A7r5 hücreleri üzerine sitotoksosite sonuçları verilmiştir. Nanopartiküller hücreler ile 24 saat boyunca etkileştirilmiştir.



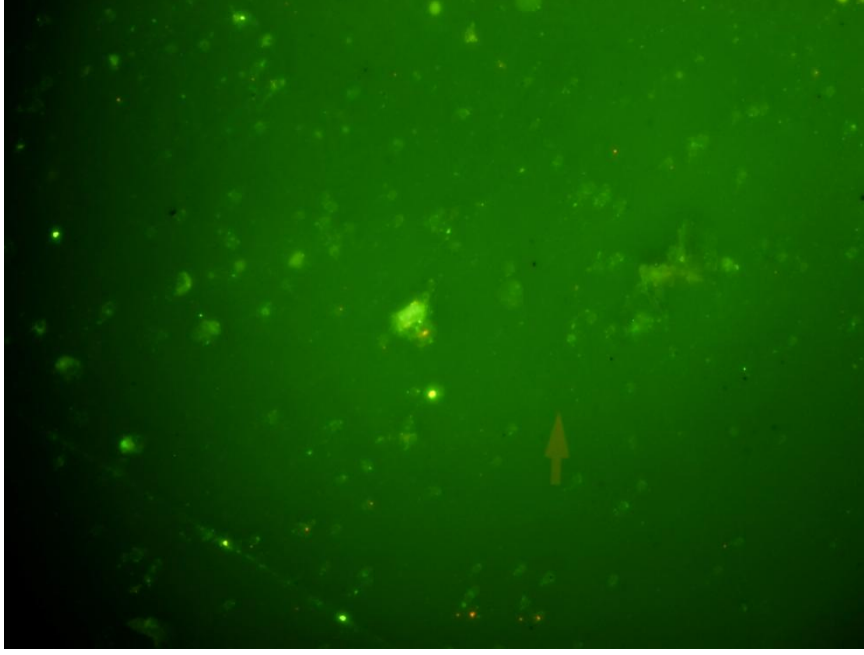
Şekil 4.32. Fe₃O₄ nanopartikül-düz kas hücre etkileşimlerine IgG1 etkisi

Yapılan sitotoksosite çalışmaları sonuçlarına göre demir nanopartiküller sitotoksisitelerinin % 4, IgG1 modifiye olanların ise yaklaşık % 4 olduğu görülmüştür. Bu sonuçlara göre IgG1 modifikasyonu demir nanopartiküllerin sitotoksitesini etkilememektedir.

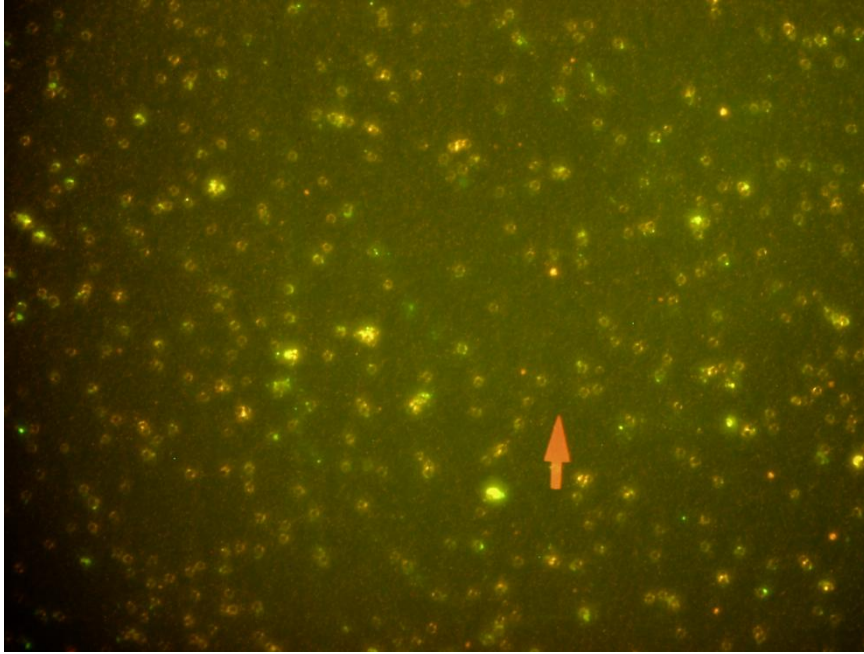
4.4.4. Biyopolimerik Nanopartikül-Hücre Etkileşimlerinin Mikroskopik İncelenmesi



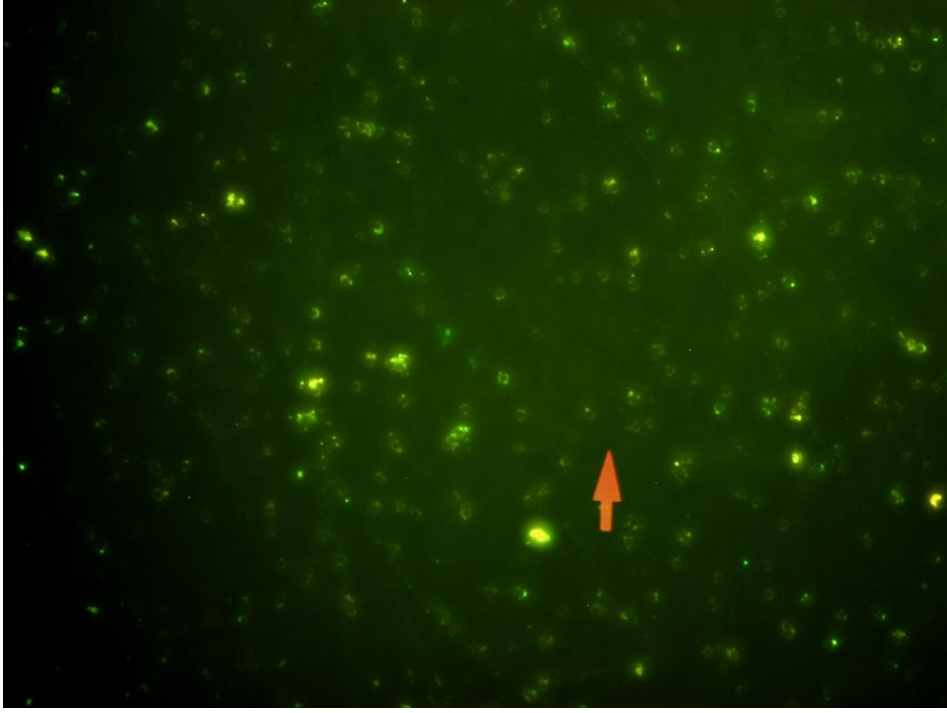
Şekil 4.33. PHB-CMCS-mag (Anneksin A5) HUVEC (Normal ışık mikroskobu)



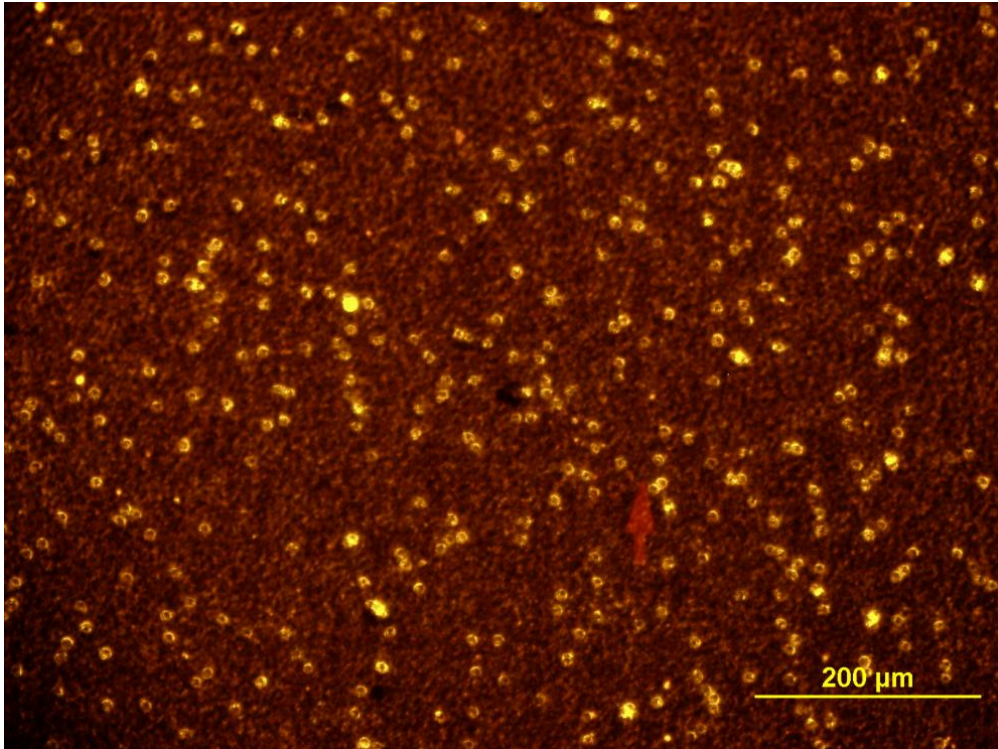
Şekil 4.34. PHB-CMCS-mag (Anneksin A5) HUVEC (Fluoresans mikroskobu)



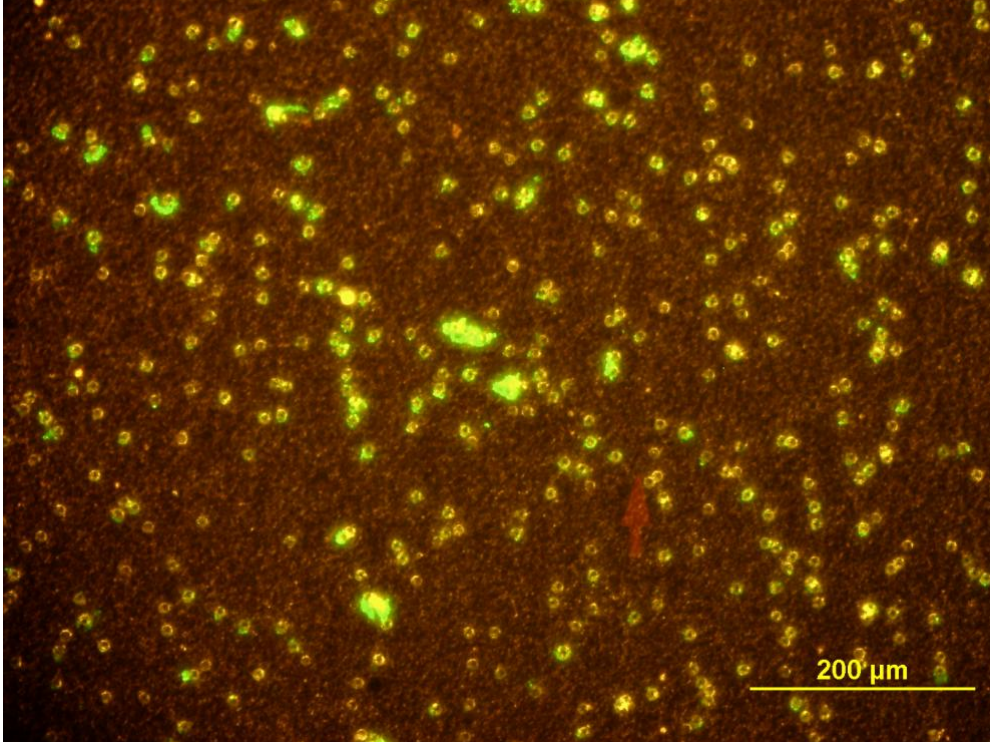
Şekil 4.35. PHB-CMCS-mag (IgG1) HUVEC (Normal ışık+Fluoresans mikroskobu)



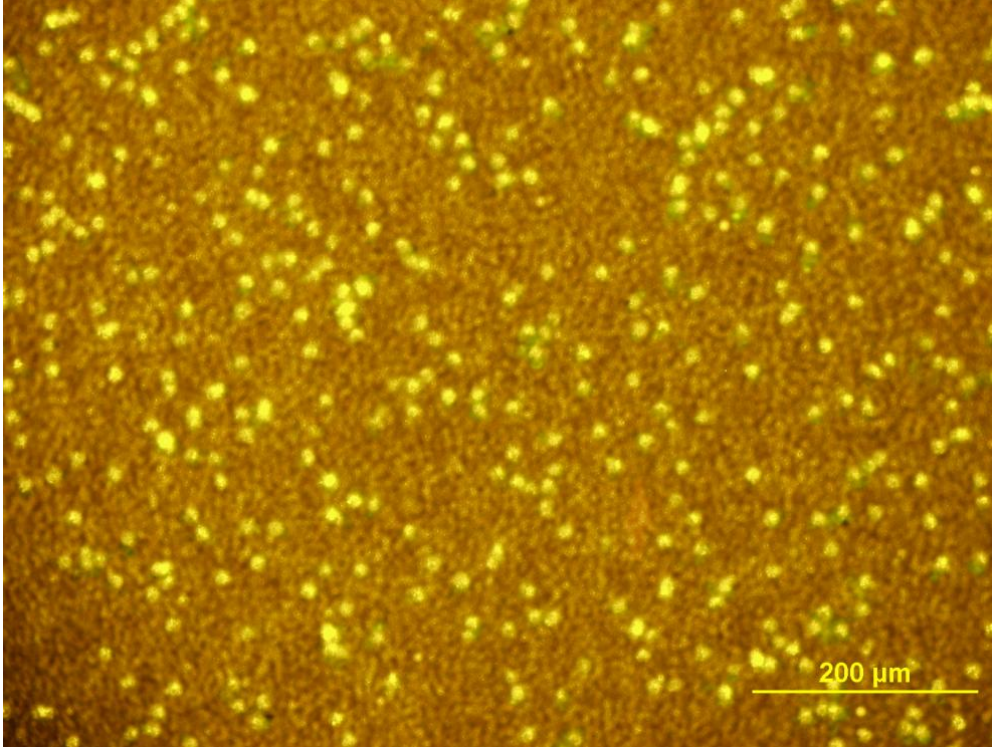
Şekil 4.36. PHB-CMCS-mag (IgG1) HUVEC (Fluoresans mikroskobu)



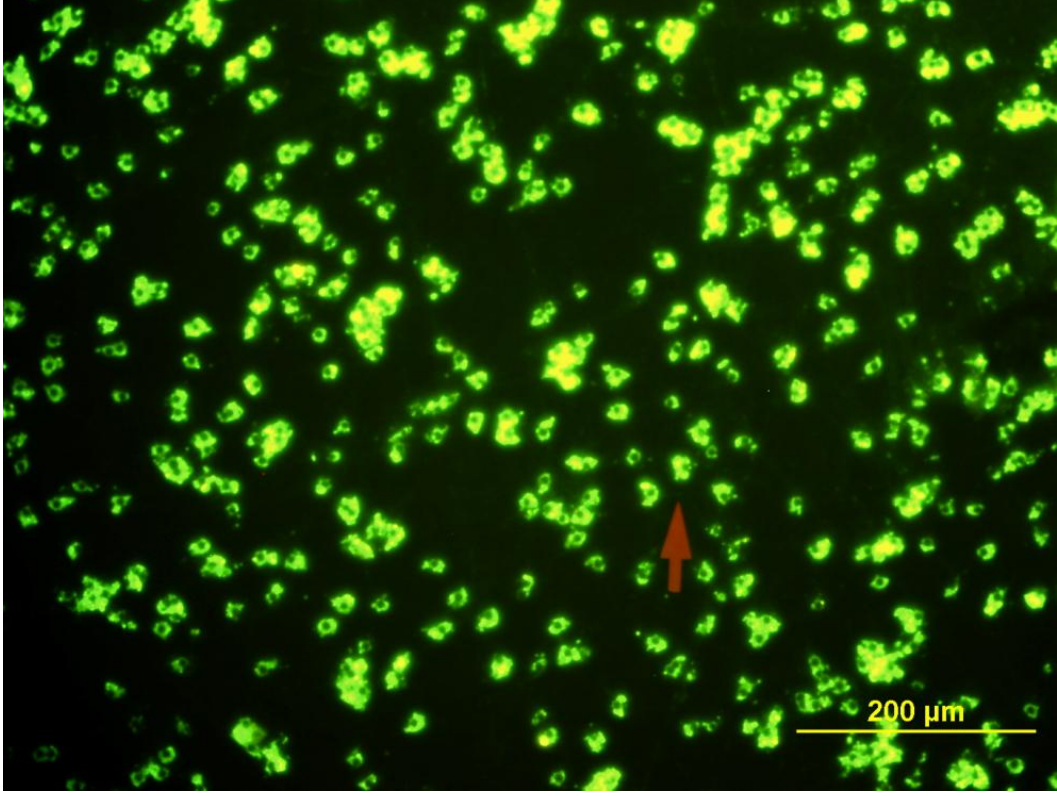
Şekil 4.37. PHB-CMCS-mag (Anneksin A5) Düz Kas Hücresi (Normal ışık+Floresans mikroskobu)



Şekil 4.38. PHB-CMCS-mag (Anneksin A5) Düz Kas Hücresi (Fluoresans mikroskobu)



Şekil 4.39. PHB-CMCS-mag (IgG1) Düz Kas Hücresi (Normal ışık+Fluoresans mikroskobu)



Şekil 4.40. PHB-CMCS-mag (IgG1) Düz Kas Hücresi (Fluoresans mikroskobu)

Çalışmaların bu bölümünde Annexin A5 ve IgG1 ile damar endotel hücreleri (HUVEC) ve düz kas hücrelerinden elde edilen bulgular değerlendirildiğinde nanopartiküllerin özellikle düz kas hücrelerine seçimli olarak yönlendikleri anlaşılmaktadır. Burada endotel hücrelerine de bir miktar yönelme olmuştur. Elde edilen bulguların ışığı altında gerekli olan veriler toplanmış ve hayvan deneyleri için gerekli altyapı hazırlanmıştır.

4.5. *In Vivo* Çalışmalar

4.5.1. Sıçanlarda Aterosklerotik Plak Oluşturulması

Lipid diyeti öncesi ve sonrası hayvanlardan kan alınmış ve lipid paneli (Total kolesterol, Triglicerid, HDL kolesterol, LDL kolesterol, VLDL kolesterol) çalışılmıştır. Sonuçlar Çizelge-4.3'te verilmiştir. Lipid paneli sonuçlarına göre sıçanların serum total kolesterol ve triglicerid 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 lipit diyeti literatürde Ren ve ark. kullandığı tavşan modeli ile aynı özelliktedir. Elde edilen sonuçlar literatür ile oldukça uyumludur [72].

Çizelge-4.3. Sekiz hafta süresince %1 hayvansal yağ katkılı standart sıçan yemi ile beslenen sıçanların, diyet öncesi ve sonrası kan lipid değerleri.

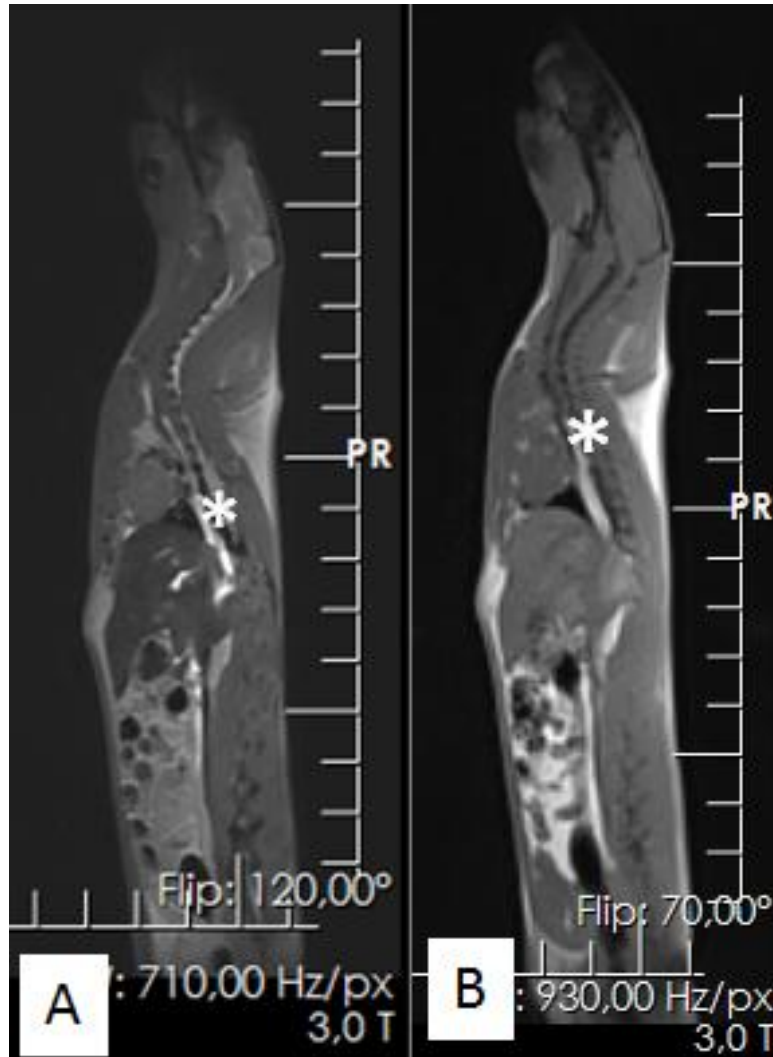
Lipid paneli	Diyet öncesi	Diyet sonrası
Total kollesterol (mg/dl)	46	75
Trigliserid (mg/dl)	71	89
HDL kollesterol (mg/dl)	32	55
VLDL kollesterol (mg/dl)	14	13
LDL kollesterol (mg/dl)	3	7

Çizelge-4.4. 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

4.5.2. Aterosklerotik Plakların MR ile Görüntülenmesi

Standart sıçan yemi ile ve hayvansal yağ katkılı diyet ile beslenen sıçanların aortları sagittal MR görüntüleri ile gösterilmiştir (Şekil 4.41). 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 standard yem ile beslenen hayvanda plak olmayışı ilave MR görüntüleriyle Şekil 4.41'de ortaya konulmuştur.



Şekil 4.41. Standart sıçan yemi (A) ve %1 hayvansal yağ katkılı standart sıçan yemi (B) ile beslenen sıçanların sagittal MRG fotoğrafları ile aortları gösterilmiştir.

Literatürdeki bir başka çalışmada da Poli-L-lizin ile değiştirilmiş yüzeyler, dekstran

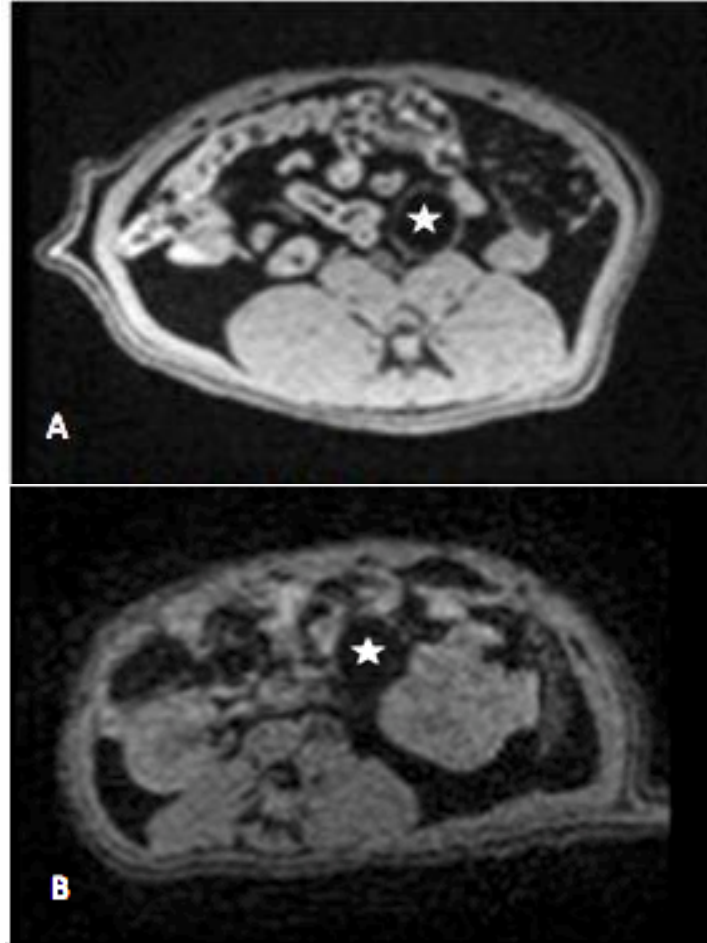
kaplı demir oksitlerin biyodağılımı tavşanlarda ve farelerde denenmiştir. Çalışma da demir oksitlerin dekstran ile kaplanması farelerin lenf bezlerinde partikül birikmelerine yol açtığı gözlemlenmiştir. Ayrıca intravenöz enjeksiyonla verilen polimer kaplı demir oksit nanopartikülleri bazı manyetik alanlarda korunmaktadır. Parçalar önce akyuvarlara ardından da kemik iliği ve RES yapılarına (karaciğer, dalak ve lenf bezleri) geçer. Bu fiziksel hareketler tahmin edilebilir fizyolojik dağılımlardır ve manyetik açıdan hedefe yönlendirme aşamasında yararlı olabilir. Çalışmada kalıcı mıknatıslık oluşturulmuş ve hazırlanan manyetik partiküller MR kontrast ajan olarak gösterilmişler [73].



Şekil 4.42. A: Sıçan aortuna yönelik olarak yapılan kontrastsız MR anjiyografi (TOF tekniği ile) incelemesinden elde edilen koronal MIP görüntülerde; arkus aorta, inen aort ve aortun ana dalları net olarak izlenmiştir (oklar). B: Karaciğer kubbesi düzeyinden geçen aksiyel T1 ağırlıklı görüntüde, sıçan aortu ve lümen

açıklığı net olarak izlenmiştir (ok). C: T1A aksiyel görüntüde, abdominal aort ve duvarı izlenmiştir (ok).

Literatür deki bir diğer çalışmada da süperparamanyetik demir oksit nanopartiküller kontrast ajan olarak kullanılarak lenf nodu metastazı tanısında kullanılmıştır. İnsan dokusunda özellikle su ve lipid yapısında bulunan hidrojen çekirdeğinin oluşturduğu manyetik rezonans sinyalinin analizi kullanılmıştır [74]. Manyetik rezonans gevşeme zamanlarına göre T1-ağırlıklı ve T2-ağırlıklı sekanslar elde edilmiştir. Bizim çalışmamızda da T1 ve T2 bölgelerini elde edebilmek için su ve lipid özellikleri kullanılarak MR görüntülerimiz elde edilmiştir.



Şekil 4.43. %1 hayvansal yağ ile beslenen (A) ve standart sıçan yemi ile beslenen sıçanların (B) MR fotoğrafları.

Kolesterolce zengin diyet ile beslenen sıçanlarda; aort duvarında aterom plaklarına sekonder gelişen kalınlaşma net olarak izlenmektedir (asteriksler).

Standart yem ile beslenen sıçanda ise, aort duvarı belirgin ince ve bu nedenle sınırları zar zor seçilebilmektedir (asteriks).

Diğer bir çalışmada da uygulanan lipit diyeti ile tavşanlar beslenmiş ve yine MR görüntüleri elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar literatürle uyumlu haldedir [75].

4.5.3. Manyetik Nanopartiküllerin Ateroskleroz Bölgelerinde MR ile Görüntülenmesi

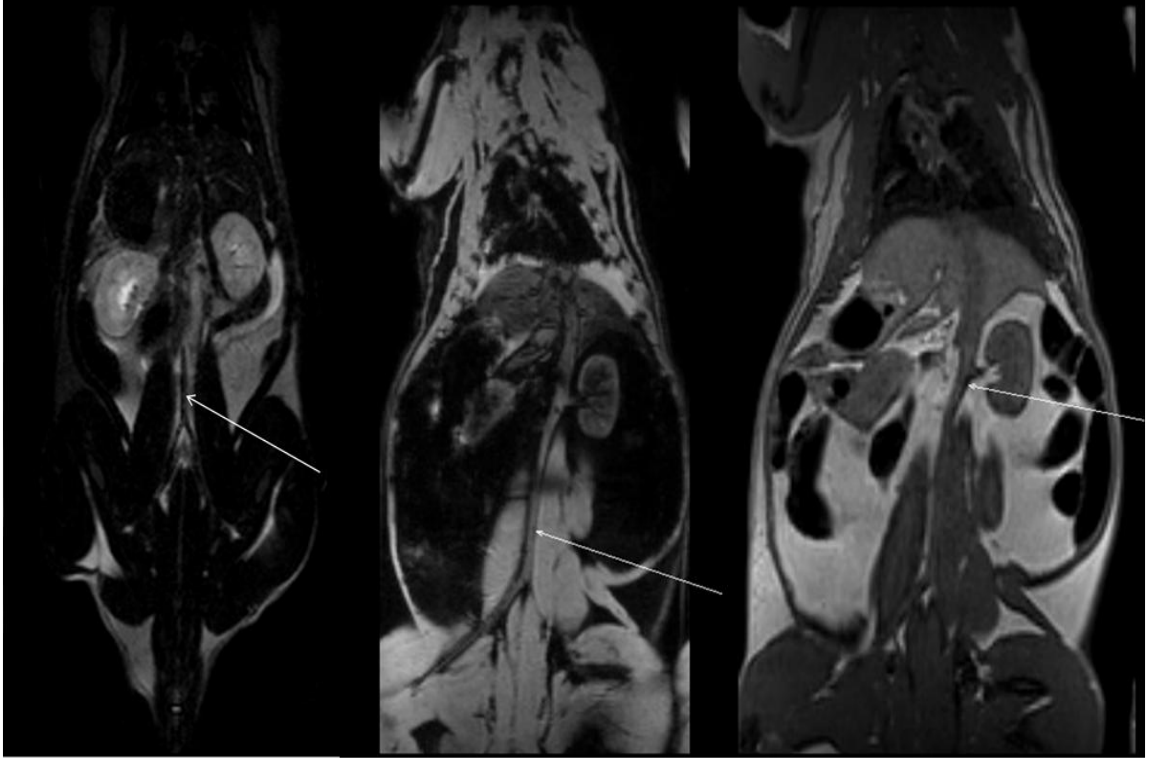
Çalışmamızda sıçan aortlarında hazırlanan IgG1/PHB-CMCS ve An-5/PHB-CMCS nanopartiküllerin *in vivo* MR incelemelerinde söz konusu nanopartiküller hedeflemenin etkinlikleri incelenmiştir.

MR incelemeler 3 tesla MR cihazında (Tim Trio system, Siemens, Erlangen, Almanya), 15 kanallı diz koili kullanılarak yapılmıştır. Çalışmaya alınan tüm hayvanların T1 ve T2 ağırlıklı görüntüleri elde olunmuştur. 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 batın içi yağ miktarlarının artmış olduğu dikkati çekmiştir (Şekil 4.44). Nanopartikül verilen hayvanların karaciğer, dalak ve lenf nodları gibi retiküloendotelyal organlarında belirgin bir tutulum saptanmamıştır. Bu durumun sebebi venöz yol ile verilen partikülün büyük kısmının akciğerde tutulması (ilk geçiş etkisi nedeniyle) olabilir. MR çekimlerinde akciğer tutulumuna ilişkin yorum yapılamamıştır. Akciğer hareketli bir organ olup, tüm sekanslarda hava bulundurması nedeniyle hipointens karakterdedir ve bu nedenler ile akciğer parankiminin MR ile değerlendirilmesi mümkün değildir. Batın içi organlarda belirgin bir nanopartikül tutulumu izleyemememizin bir diğer nedeni de nanopartikül birikiminin veya tutulumunun MR rezolüsyon sınırlarının altında olması olabilir. Zira milimetrik boyutlu birikimler çoğunlukla MR incelemelerde saptanamamaktadır.

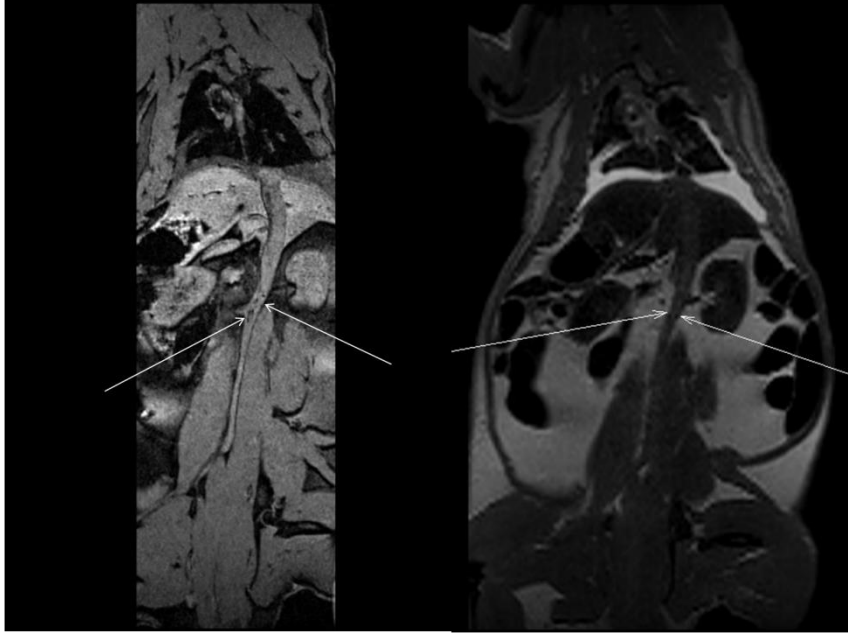
Yapılan MR incelemeleri sonucunda; proje kapsamında hazırlanan IgG1 veya An-5 ile modifiye edilmiş PHB-CMCS nanopartiküller vasıtasıyla milimetrik boyutlu aterosklerotik plak lezyonları, deneklerin çoğunda saptanabilmiştir. Bu plaklar çoğunlukla infrarenal düzeyde ve dağınık yerleşim göstermektedir. Plaklar genel olarak, tüm sekanslarda hipointens görünümündedir (Şekil 4.44). Bununla birlikte;

MR görüntüleri karşılaştırıldığında, partiküller arasında herhangi bir üstünlük veya anlamlı farklılık saptanmamıştır.

Bryan R. Smith ve arkadaşları süpermanyetik demir oksit nanopartiküllerden MR kontrast maddesi hazırlamak amacı ile demir nanopartikülleri heparin ile kaplamış ve annexin-V 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 [76].



Şekil 4.44. Negatif kontrol (soldaki resim) ve obez kontrol (orta ve sağdaki resimler) T1 ağırlıklı koronal 3B-SPACE fotoğrafları. Negatif kontrolün aort çapının ve batın içi yağ miktarının, obez deneğe oranla belirgin düşük olduğu izleniyor (oklar).



Şekil 4.45. 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).

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 nanopartiküler akıllı taşıyıcıların geliştirilmesi aşamasında öncelikle manyetik nanopartiküller demir klorür bileşikleri kullanılarak 15-20 nm arasında başarıyla hazırlanmış ve karakterize edilmiştir. Ardından ilgili literatürde yer alan ve yer almayan biyopolimerik malzemeler (kitosan, karboksimetil kitosan, polihidroksibütirat-karboksimetil kitosan) kullanılarak uygun boy-boy aralığında (150-300 nm) nanopartiküller hazırlanmıştır. Bu nanopartiküllere aynı zamanda demir oksit nanopartiküller yüklenmiş ve böylece bu nanopartiküllere manyetiklik özelliği kazandırılmıştır.
- Hazırlanan nanopartiküllerin morfolojik karakterizasyonları SEM ve AFM cihazları kullanılarak yapılmıştır. Morfolojik incelemeler sonucunda nanopartiküllerin küresel yapıya sahip oldukları belirlenmiştir.
- Ancak, SEM görüntüleri daha küçük boyutlarda olan nanopartikülleri görüntüleme açısından yetersiz kaldığını gözlenmiştir. Bu sebeple özellikle TEM cihazı kullanılarak görüntüleme yapılarak daha net sonuçlar elde edilebileceği düşünülmektedir.
- Hazırlanan tüm biyopolimerik nanopartiküllerin ISO 10993-5 standardına göre biyolojik uyum testleri yapılmış ve tüm formülasyonların toksik etkilerinin oldukça düşük seviyelerde olduğu belirlenmiştir.
- Çalışmaların bir diğer bölümünde hazırlanan nanopartiküller *in vivo* uygulamalarda kullanılması planlanan ligandlar ile etkileştirilerek bu ligandların nanopartiküllere bağlanması sağlanmıştır.
- Fe₃O₄ nanopartiküller yalın olarak kullanıldığında en yüksek ligand bağlanma kapasitesine ulaşıldığı ve öte yandan manyetik nanopartikül içeren biyopolimerik nanopartiküllerinde boş nanopartiküllerden daha yüksek ligand bağlanma verimliliğine sahip olduğu belirlenmiştir. Buradaki

temel farklılık protein yapısında olan ligandların özellikle metallerle şelat oluşturma yeteneğinden dolayı bu sonuçlar beklenen sonuçlar olarak değerlendirilmektedir.

- Fe_3O_4 nanopartiküllerin ortalama büyüklükleri yaklaşık olarak 16 nm dolayında ve diğer polimer kaplı nanopartiküllerden yaklaşık olarak 10-15 kat daha küçüktür. Bu nedenle Fe_3O_4 nanopartiküllerin aynı kütledeki polimer içeren nanopartiküller ile yüzey alanları karşılaştırıldığında oldukça büyük farklılıklar ortaya çıkmaktadır. Özet olarak ligand bağlanması esnasında bağlanma noktası olarak Fe_3O_4 nanopartiküllerde çok daha fazla imkan bulunduğundan bağlanma verimliliğinin son derece yüksek olması kolay anlaşılır bir durum haline gelmektedir.
- Nanopartikül boy aralığı değerlerinin olabildiğince birbirine yakın olmasından dolayı hazırlanan diğer polimerik nanopartiküller için aynı yorumları yapmak pek mümkün görünmemektedir.
- Sitotoksosite çalışması sonuçlarına göre, Fe_3O_4 nanopartiküllerin sitotoksitesisi % 9 ile sınırlı kalmıştır. Fe_3O_4 nanopartiküllerin sitotoksitesinin konsantrasyona bağlı olmadığı görülmüştür. Bunun yanı sıra manyetik özelliğe sahip polimerik nanopartiküllerin boş Fe_3O_4 nanopartiküllerden daha az sitotoksik oldukları saptanmıştır.
- Yapılan bağlanma verimliliği çalışmalarının sonuçlarına göre en yüksek bağlanma verimliliği PHB/karboksimetil kitosan polimerlerinin bir arada kullanımıyla hazırlanan nanopartiküller ile elde edilmiştir. Bu nedenle hayvan deneylerinin yer aldığı *in vivo* deneylerde bu formülasyona ve Anneksin V ile IgG1 ligandlarına yer verilmiştir.

- Hayvanlara 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.

KAYNAKLAR

- [1] Dörtlemez, Ö., Kardiyovasküler Sistemin Kliniği ve Farmakolojisinden, M. Biyoloji ve Genom Projesine, *Ateroskleroz ve Patogenezi*, **2001**.
- [2] Abanonu, G. B., *Koroner Arter Hastalığı Majör Risk Faktörleri ve C-Reaktif Proteinin Değerlendirilmesi* (İç Hastalıkları Uzmanlık Tezi), Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi , İstanbul, **2005**.
- [3] *TEKHARF; Oniki Yıllık İzleme Deneyimine Göre Türk Erişkinlerinde Kalp Sağlığı*. Prof. Dr. Altan Onat, Prof. Dr. Vedat Sansoy, Prof. Dr. İnan Soydan, Prof. Dr. LaleTokgözoğlu, Prof. Dr. Kamil Adalet. Argos İletişim Hizmetleri Reklamcılık ve Ticaret Anonim Şirketi. Temmuz **2003**, İstanbul.
- [4] Kocaefe, Ç., *Nanotıp: Yaşam Bilimlerinde Nanoteknoloji Uygulamaları*, H.Ü. Tıp Dergisi, 38:33-38, **2007**.
- [5] Tokgözoğlu, L., *Ateroskleroz ve enflamasyonun rolü*, Türk Kardiyol Dern Arş - Arch Turk Soc Cardiol,37 Suppl 4:1-6, **2009**.
- [6] Geshquiere, S.A.I., *Anatomy Overwiev of Human Artery made for Ph.D. Project*, **2005**.
- [7] *Atlas of Coroner Arter Disease* ,Lippincott - Publishers ,Yelkovan Yayıncılık, Sayfa 23-54, **2000**.
- [8] Kaplan, L. A; Pesce, A. J.; Kazmierczak, S. C.; *Clinical Chemistry: Theory, Analysis, Correlation*,4th ed., Mosby, Inc. Elsevier Health Science, PA, USA,747, **2003**.
- [9] Pocock, S. J., Shaper A.G., Phillips A.N., HDL-Cholesterol, triglyserides and total cholesterol in ischaemic heart disease. Br Med J, 298: 998-1002, **1989**.
- [10] *Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III), Final Report, National Cholesterol Education Program National Heart, Lung, and Blood Institute and National Institutes of Health*, NIH Publication No. 02-5215, September **2002**.
- [11] Creswell, L. L., *Postoperative atrial arrhythmias: risk factors and associated adverse outcomes*, Semin Thorac Cardiovasc Surg,11:303-7, **1999**.
- [12] Fuster, V., *Exploration of the atherosclerotic plaque*, Biomedicine & Pharmacotherapy, pp. 343–352, 1990. Yang, Y., Leech, M., Hutchinson, P., Holdsworth SR, Morand EF. Antiinflammatory effect of lipocortin 1 in experimental arthritis, Inflammation ;21:583-596, **1997**.

- [13] Van Der Wal, A., Becker, A. E., Atherosclerotic plaque rupture – pathologic basis of plaque stability and instability. *Cardiovasc Res* ; 41: 334-344, **1999**. Naito, H. K., *Coronary Artery Disease and Disorders of Lipid Metabolism. Clinical Chemistry*, 4.baskı, pp.603-638, **2003**.
- [14] Plutzky, J., Libby, P., *Atherosclerosis and Heart Disease Book*, Chapter 1. Pathophysiology of Atherosclerotic Heart Disease, **2004**.
- [15] Fuster, V., Rydén, L. E., Cannom, D. S., Crijns, H. J., Curtis, A. B., et al., ACCF/AHA/HRS focused updates incorporated into the ACC/AHA/ESC 2006 guidelines for the management of patients with atrial fibrillation: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on practice guidelines, 123:269-367, **2011**.
- [16] Anonim, Aterojenez tr., http://tr.wikipedia.org/wiki/Dosya:Aterojenez_tr.png. (Mart, **2013**).
- [17] Munro, J. M., Cotran, R. S., *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* [**1988**, 58(3):249-261] Park, J.K., Jeong S.J., Jeon H.J., Son S.K., Lee M.R., Lee M.N., Yoo J.Y., Kim B., ve ark., Peroxiredoxin 2 Inhibits the Production of Ox-LDL Induced Hydrogen Peroxide via NADPH Oxidase, *Atherosclerosis Supplements*, Volume 9, Issue 1, Page 59, **2008**.
- [18] Libby ve ark., *Vascular Biology of Atherosclerosis*, *The Journal of Nuclear Medicine* Vol. 51 No. 5 (Suppl) May **2010**.
- [19] Mc Gill, H. C.,:The Pathogenesis of Atherosclerosis.*Clinical Chem*; 34-8 (B): B33-B39, **1988**.
- [20] Packard, C. J., *Triacylglycerol- rich lipoproteins and the generation of small, dense low - density lipoprotein*. *Biochemical Soc. Transactions* ,31(5):1066-1069, **2003**.
- [21] Fuster, V., Moreno P. R., ve ark., Atherothrombosis and High-Risk Plaque, *Journal of the American College of Cardiology*, 2005. Libby, P., Nissen S.E., Tuzcu, E.M., Effect of antihypertensive agents on cardiovascular events in patients with coronary disease and normal blood pressure, *ACC Current Journal Review*, Volume 14, Issue 3, pp 11-12, **2005**.
- [22] Turiel, M., Gianturco, L., ve ark., Echocardiographic approach in systemic autoimmune diseases, *Journal of Cardiovascular Echography*, December, pp.152–156, **2011**.
- [23] Neubauer, S., *MR and CT Investigations*, Elsevier Ltd., **2006**. Karamürsel, S., Ateroskleroz mekanizmaları ve Santral Sinir Sistemi.
- [24] Chacko, A. M., Hood, E. D., Zern, B. J., Muzykantov, V. R., Targeted nanocarriers for imaging and therapy of vascular inflammation, *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 16, 215–227, **2011**.

- [25] Gotarredona, M.P.S., Romero-Rodríguez, N., et al, Usefulness of cardio MRI on thrombosis of coronary aneurysm as an infrequent cause of ST-elevation coronary syndrome, **2009**. Michaels, A.D. ve Chatterjee K., Angioplasty versus bypass surgery for coronary artery disease, American Heart Association, **2002**.
- [26] Deckers, R., Rome, C., Moonen, CT., *The role of ultrasound and magnetic resonance in local drug delivery*, 27(2):400-9, Feb **2008**.
- [27] Schaller, B., *Usefulness of positron emission tomography in diagnosis and treatment follow-up of brain tumors*, Neurobiology of Disease Volume 15, Issue 3, pp. 437–448, April **2004**.
- [28] Subramani, K., Ahmed, W., *Nanotech. and Future of Dentistry*, Emerging Nanotech. in Dentistry, Chapter-1, pp. 10-14, **2012**.
- [29] Tübitak Bilim ve Teknik Dergisi sayı 469, Aralık **2006**.
- [30] 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, 675–709, **2010**. Horton D. and Lineback D. R., N-deacetylation, chitosan from chitin, in Methods in Carbohydrate Chemistry, R.L. Whistler and M. L. Wolfson, Eds., p. 403, Academic Press, New York, NY, USA, **1995**.
- [31] Danhier, F., Lecouturier, N., Vroman, B., ve ark., Journal of Controlled Release vol 133, issue 1, pp. 11-17, **2009**. Ravi Kumar M. N. V., A review of chitin and chitosan applications, Reactive and Functional Polymers, vol. 46, no.1, pp. 1–27, **2000**.
- [32] Narayanan, B. K., Sakthivel, N., Green synth. of biogenic metal nanoparticles by terrestrial and aquatic phototrophic and heterotrophic eukaryotes and biocompatible agents. Advances in Colloid and Interface Science 169, 59–79, **2011**.
- [33] Chacko, A. M., Elizabeth, D.Hood ve ark., Targeted nanocarriers for imaging and therapy of vascular inflammation Current Opinion in Colloid & Interface Science 16 ,pp. 215–227, **2011**.
- [34] Patel, D. N., Bailey, S. R., *Nanotechnology in Cardiovascular Medicine, Catheterization and Cardiovascular Interventions*, 69:643–654 , **2007**.
- [35] Gupta, A. K., Gupta, M., Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications, Biomaterials, Vol. 26 issue 18, pp.3995-4021, **2005**.
- [36] Weissleder, R., Bogdanov, A., Neuwelt, E. A., Papisov. M., Long-circulating iron oxides for MR imaging. Adv Drug Del Rev. ;16:321–334, **1995**.

- [37] Wunderbaldinger, P., Josephson, L., Weissleder, R., Crosslinked iron oxides: a new platform for the development of targeted MR contrast agents, *Acad Radiol. Suppl 2* S304-6, **2002**.
- [38] Sosnovik, D. E., Nahrendorf, M., Weissleder, R., Molecular MR imaging in cardiovascular medicine. *Circulation*;115(15):2076-86, **2007**. Thomas J. D., Zoghbi A. W., Fuster V., ve ark., ACCF Training Statement on Multimodality Noninvasive Cardiovascular Imaging, *Journal of the American College of Cardiology*, **2009**.
- [39] Ruiz-Herrera, J., *Fungal Cell Wall: Structure, Synthesis, and Assembly, International Stanrd Book* No: 13:978-1-4398-4838-8, 1978. Goy R.C., D. De Britto and O.B.G. Assis, A review of the antimicrobial activity of chitosan, *Polimeros*, vol. 19, no. 3, pp. 241–247, **2009**.
- [40] El-Hefian, E. A., Elgannoudi, E. S., Mainal, A., Yahaya, A.H., Charact. of chitosan in acetic acid: Rheological and thermal studies, *Turk J Chem* 34, 47 – 56, **2010**. Freier, T., Carmen, K., Claudia, N., Sven, K., Katrin, S., Marko, S., Ullrich T. Hopt, Klaus-Peter Schmitz, In vitro and in vivo degradation studies for development of a biodegradable patch based on poly(3-hydroxybutyrate) Original Research Article *Biomaterials*, Volume 23, Issue 13, pp. 2649-2657, 2002.
- [41] Wan, Y., Creber, A. M. K., et al., Ionic conductivity and related properties of crosslinked chitosan membranes, DOI: 10.1002/app.12090, 2003. Dash, M., et al, Chitosan Polymer in Biomedical Applications, *Progress in polymer science* ; 36 pp. 981- 1014, **2011**.
- [43] Başer, B., *Kitosan Üzerine Tarak Tipi Aşılanmış poli(N,N- dimetilakrilamit) ve poli(akrilamit) Hidrojellerinin Hazırlanması ve DNA Adsorpsiyonunda Kullanımı*. G.Ü. Fen Bil. Ens., Yüksek Lisans Tezi, Ankara, **2007**.
- [44] Jayakumar, T., G., Gnanaprakash, S., Mahadevan, P., Kalyanasundaram, ve ark., Effect of initial pH and temperature of iron salt solution on formation of magnetite nanoparticles, *Materials Chemistry and Physics*, Volume 103, Issue 1, , Pages 168-175, 15 May **2007**.
- [45] Kumari, S., Singh, R. P., Glycolic acid functionalized chitosan–Au–Fe₃O₄ hybrid nanoparticle based nanohybrid scaffold for drug delivery, *International Journal of Biological Macromolecules*, Volume 54, pp.244–249, March **2013**. Rinaudo M., Chitin and chitosan: properties and applications, *Progress in Polymer Science*, vol. 31, no. 7, pp. 603–632, 2006.
- [46] Mourya, V. K., Inamdar, N. N., et al., Carboxymethyl chitosan and its app., *Adv. Mat. Lett.* **2010**, 1(1), 11-33. Khor E., L. Y. Lim, Implantable Applications of Chitin and Chitosan, *Biomaterials*, 24, pp. 2339-2349, 2003. Synowiecki J. and N.A. Al-Khateeb, "Production, properties and some new applications of chitin and its derivatives," *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 43, no. 2, pp. 145–171, **2003**.

- [47] Muzarelli R, Conti F, Ferrara P: Biological activity of chitosan: ultrastructural study. *Biomaterials*, 1988; 9: 247-252. Kurita, K. ,Chemistry and application of chitin and chitosan. *Polym Degrad Stabil* 59, 117-120, **1998**. Sashiwa, H., S.-i. Aiba, *Chemically Modified Chitin and Chitosan as Biomaterials*, *Prog. Polym. Sci.* , 29, 887- 908, **2004**.
- [48] Zhou L. ve ark., Carboxymethyl Chitosan-Fe₃O₄ Nanoparticles: Preparation and Adsorption Behavior toward Zn²⁺ Ions, *Acta Physico-Chimica Sinica* Volume 22, Issue 11, November **2006**, Pages 1342–1346. Muzzarelli R. A. A., *Chitin and its derivatives: new trends of applied research*, *Carbohydrate Polymers*, vol.3,no.1,pp.53–75, 1983.
- [49] Anitha, A., Divya Rani, V.V.,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, *Carbohyd. Polymers*, Volume 78, Issue 4, 17 November **2009**, Pages 672–677.
- [50] Chen G.Q., Wu Q., The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials* **2005**; 26:6565-78. Braunegg G., Gilles L, Klaus F G, *Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects* Review Article *Journal of Biotechnology*, Volume 65, Issues 2–3, pp. 127-161, **1998**.
- [51] Zhang, M., Thomas, N. L.,Preparation and Properties of PHB Blended with Different Types of Starch, *Journal of Applied Polymer Science* **2010**; 116:688-694. Sudesh, K., Abe, H., Doi, Y., Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters Review Article *Progress in Polymer Science*, Volume 25, Issue 10, Pp 1503-1555, **2000**.
- [52] Rivard, C.H., Chaput, C., Rhalmi, S., Selmani, A., *Bio-absorbable synthetic polyesters and tissue regeneration: a study of three-dimensional proliferation of ovine chondrocytes and osteoblasts*, *Ann. Chir.*, 50 (8) (1996), pp. 651–658.
- [53] Ley K., Trends in Molecular Medicine, Vol.9 No.6 ,June **2003**. Poirier Y., Polyhydroxyalkanoate synthesis in plants as a tool for biotechnology and basic studies of lipid metabolism Review Article *Progress in Lipid Research* Volume 41, Issue 2, Pages 131-155, **2002**.
- [54] Tandoğan B., Ulusu N. N., *Turkish Journal of Biochemistry*, 31 (1); pp.36–40, **2005**.
- [55] Ewing, M. M., Karper, J. C., Sampietrod, M. L., et. al., Quaxb ,Annexin A5 prevents post-interventional accelerated atherosclerosis development in a dose-dependent fashion in mice, *Atherosclerosis* 221 ,pp. 333– 340, **2012**.

- [56] Cheuk, B. L. Y., Cheng, S.W.K., Annexin A1 Expression in Atherosclerotic Carotid Plaques and its Relationship with Plaque Characteristics, *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 41,364- 371, **2011**. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*; 362: 801-809, 1993.
- [57] Herttuala, S. Y., Palinski, W., Butler W., Rabbit and human atherosclerotic lesions contain IgG that recognizes epitopes of oxidized LDL, 14(1):32-40, **1994**.
- [58] Boenisch, T., MS Revised by Betsy Spaulding, Henrik Winther PhD, Sussie Steen Jensen MS, IHC Staining MethodS, 5th edition.
- [59] Kavaz, D., ve ark.,Bleomycin Loaded Magnetic Chitosan Nanoparticles as Multifunctional Nanocarriers, *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* May 2010 25: 305-318, first published on January 25, **2010**.
- [60] Liu, W. W., Aziz, A., Chai, S. P., Mohamed, A. R., ve ark., Preparation of iron oxide nanoparticles supported on magnesium oxide for producing high-quality single-walled carbon nanotubes, *New Carbon Materials*, **2011**, 26(4): 255–261)
- [61] Shantanu K. Behera, Facile synthesis and electrochemical properties of Fe₃O₄ nanoparticles for Li ion battery anode, *Journal of Power Sources* 196, 8669–8674, **2011**.
- [62] Sharma, K., Somavarapu, S., Colombani, A., Govind, N., Taylor, M. G. K., Crosslinked chitosan nanoparticle formulations for delivery from pressurized metered dose inhalers, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 81 (**2012**) 74–81
- [63] Bulmera, C., Margaritisa, A., Xenocostas, A.,Production and charact. of novel chitosan nanoparticles for controlled release of rHu-Erythropoietin, *Biochemical Engineering Journal* 68 (**2012**) 61–69. Shigemasa Y. and Minami S., Applications of chitin and chitosan for biomaterials, *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, vol. 13, pp. 413–420, 1996.
- [64] Calvo, P., Remunan-Lopez, C., Vila-Jato, J.L., Alonso, M.J., **1997**. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *J. Appl. Polym. Sci.* 63, 125–132. Shi P., Yi Zuo, Qin Zou, Juan Shen, Li Zhang, Yubao Li, Yos S. Morsi, Improved properties of incorporated chitosan film with ethyl cellulose microspheres for controlled release, *International Journal of Pharmaceutics*, Volume 375, Issues 1–2, 22, Pp 67-74, **2009**.
- [65] Shena, J.M., Tang, W. J., Zhang, X. L., ve ark., A novel carboxymethyl chitosan-based folate/Fe₃O₄/CdTe nanoparticle for targeted drug delivery and cell imaging, *Carbohydrate Polymers* 88 (**2012**) 239–249.

- [66] Anithaa, A., Mayaa, S., Deepaa, N., Chennazhia, K.P., Naira, S.V., Tamurab, H., Jayakumar, R., Efficient water soluble O-carboxymethyl chitosan nanocarrier for the delivery of curcumin to cancer cells, *Carbohydrate Polymers* 83, 452–461, **2011**.
- [67] Kecshkemeti, G., ve ark., Pulsed laser deposition of polyhydroxybutyrate biodegradable polymer thin films using ArF excimer laser, *Applied Surface Science* Volume 253, Issue 3, 30 November **2006**, Pages 1185–1189.
- [68] Alleman, E., Mansot, J. L, Golabkan, v., Romana, L., Bilas, P., Bercion, Y., Tribological and physicochemical characterization of strontium colloidal additives in mild wear regime, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, Volume 243, Issues 1–3, 20 August **2004**, Pages67-77.
- [69] Lee, D. W., Hwang, S.J., Park, J.B., Park H.J., Preparation and release characteristics of polymer-coated and blended alginate microspheres. **2003**, Vol. 20, No. 2 , Pages 179-192.
- [70] Lourenco, S., Teixeira, M., Simões, S., Gaspar,R., Steric stabilization of nanoparticles: Size and surface properties, *International Journal of Pharmaceutics*, Volume 138, Issue 1, 12 July **1996**, Pages 1-12.
- [71] Kwon, H. Y., Lee, Y. L., Choi, S. W., ve ark.,Preparation of PLGA nanoparticles containing estrogen by emulsification–diffusion method, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, Volume 182, Issues 1–3, 30 June **2001**, Pages 123-130.
- [72] Ren, H., Li M, Feng L, et al. Effects of clopidogrel on vascular proliferation and apoptosis in an atherosclerotic rabbit model. *J Cardiovas Pharmacol.* **2010**; 55: 617–24.
- [73] Babes L, Denizot B, Tanguy G, Le Jeune JJ ve ark. Synthesis of iron oxide nanoparticles used as MRI contrast agents: A parametric study. *Journal of Colloid and Interface Science* **1999**;212:474-482.
- [74] Candefjord, S., Ramser K, Lindahl OA. Technologies for localization and diagnosis of prostate cancer. *J Med Eng Technol.* **2009**; 33: 585-603.
- [75] MRI of coronary artery atherosclerosis in rabbits: Histopathology-MRI correlation and atheroma characterization Rakesh Sharma,Ram B Singh, *Thrombosis Journal* **2004**, 2.
- [76] Smith, B. R., Heverhagen, J., Knopp, M., ve ark., *Localization to atherosclerotic plaque and biodistribution of biochemically derivatized superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) contrast particles for magnetic resonance imaging (MRI)* *Biomedical Microdevices*, October **2007**, Volume 9, Issue 5, pp 719-727.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Damla TÜRKAY

Doğum Yeri : Ankara

Medeni Hali : Bekâr

E-Posta : damlaturkay@gmail.com

Adresi : Ergazi Mah. Özaşıyan Sitesi 3A-Blok No: 41 Batıkent/ANKARA

Eğitim

Lise : Ankara Anadolu Lisesi

Lisans : Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Kimya Bölümü

Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Nanoteknoloji ve Nanotıp Bölümü

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce / Orta

Almanca / Orta

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

277.725 ₺ bütçeli, 110S181 Nolu "Kardiyovasküler Sistem Rahatsızlıklarının Teşhis ve Tedavisinde Nanoteknolojik Yaklaşımlar" adlı TÜBİTAK Ar-Ge Projesi.

Tezden Üretilmiş Tebliğ veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

- **Chitosan Based Nanoparticles for Cardiovascular System Therapies** (7th Nanoscience and Nanotechnology Conference, Sabancı University, Istanbul, Turkey, July, 2011).
- **Carboxymethyl Chitosan Nanoparticles for Drug Delivery** (17th International Biomedical Science and Technology Symposium, Ankara University, Ankara, Turkey, November, 2011).

- **Magnetic Polyhydroxybutyrate-Carboxymethylated Chitosan (PHB-CMCh) Nanoparticles for Atherosclerotic Plaque Theragnosis** (8th Nanoscience and Nanotechnology Conference, Hacettepe University, Ankara, Turkey, June-July, 2012).
- **IgG1 Attached Dextran Coated Iron-Oxide Nanoparticles for Cardiovascular System Disease Theragnosis** (8th Nanoscience and Nanotechnology Conference, Hacettepe University, Ankara, Turkey, June-July, 2012).