

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**POLİVİNİLASETAT NANOPARTİKÜLLERİNİN
HAZIRLANMASI VE AKCİĞER HÜCRELERİNE
ETKİLERİ ÜZERİNE İN VİTRO ARAŞTIRMALAR**

MİNE ORLU GÜL

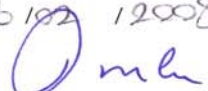
**DANIŞMAN
PROF.DR. AHMET ARAMAN**

**FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMASÖTİK TEKNOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2008

TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

26/02/2008

 Prof. Dr. Emine Kökoğlu
 Enstitü Müdürü

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
 Program Adı : Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı
 Programın seviyesi : Yüksek Lisans Doktora
 Anabilim Dalı : Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı
 Tez Sahibi : Mine Orlu Gül
 Tez Başlığı : Polivinilasetat Nanopartiküllerinin Hazırlanması ve Akciğer Hücrelerine Etkileri Üzerine İn Vitro Araştırmalar
 Sınav Yeri : Eczacılık Fakültesi B Blok Seminer Salonu
 Sınav Tarihi : 22 / 02 / 2008

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı

1. Prof. Dr. Ahmet Araman (Tez Danışmanı), İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

2. Prof. Dr. Nazan Bergişadi (Tez İzleme Komitesi Üyesi), İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

3. Prof. Dr. Tamer Güneri (Tez İzleme Komitesi Üyesi), Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

4. Prof. Dr. Yıldız Özsoy Erginer, İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

5. Yrd. Doç. Dr. Erdal Cevher, İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı


BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Mine Orlu Gül

“Aileme ve eşime ithaf ediyorum..”

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim sırasında tez çalışmalarımın yönetilmesinde bilimsel katkıları ile bana yardımcı olan, her zaman destekleriyle yanımda olan danışman hocam Prof.Dr. Ahmet Araman'a teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim sırasında çok değerli desteği ve yardımlarından dolayı Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Nazan Bergişadi'ye teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tez çalışmalarım süresince çok değerli görüşleri ve desteklerinden dolayı Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Tamer Güneri'ye teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim sırasında tüm sorularıma hızlı ve akılcı çözümleriyle, bilgi ve deneyimleri ile bilimsel bakış açımın gelişmesinde çok büyük katkısı bulunan Yard. Doç. Dr. Erdal Cevher'e teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamın University of London, King's College London, Department of Pharmacy' de gerçekleştirilen kısmında her türlü desteği esirgemeyen, bilimsel bakış açısıyla çok geniş perspektifte düşünebilme yeteneği kazandıran çok değerli hocalarım Dr. Ben Forbes' a, Dr. Stuart Jones' a, Dr. Lea Ann Dailey' e teşekkürlerimi iletirim.

Destekleri ile birlikte çalışmayı keyif haline getiren, sevgi ve anlayışlarını benden esirgemeyen Anabilim Dalımız araştırma görevlisi arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Yaşamımda kendimi geliştirebilmem için her türlü imkanı sunan, anlayışlı ve sevgi dolu kişilikleri ile daima yanımda olan, canım aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımda bilimsel kariyerime en çok değer veren insana, canım eşim Özgür Gül' e teşekkür ederim.

Bu çalışma Avrupa Birliği 6. çerçeve programı Marie Curie ön aşama eğitim programı altında yer alan Galenos Network bursu ile desteklenmiştir.

Mine Orlu Gül

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	ii
BEYAN.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLER LİSTESİ	xiii
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	xxiii
ÖZET	xxiv
ABSTRACT.....	xxv
GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
GENEL BİLGİLER	4
1. Akciğer Fizyolojisi	4
2. Akciğerin Fonksiyonları	7
2.1. Mukosilyer Temizleme	7
2.2. Metabolik Aktivite.....	7
3. Pulmoner Yolla İlaç Uygulanması.....	8
4. Pulmoner Hücre Kültürü Modelleri.....	12
5. <i>In Vitro</i> Hücre Kültürü Çalışmaları	18
5.1. Hücre Kültür Tipleri	18
5.2. Hücre Kültür Koşulları	19
5.3. Hücre Kültürü Sistemleri ile Çalışma Protokolü	20
5.4. Hücre Kültür Ortamının Genel Özellikleri	21
5.5. Hücre Kültürlerinin Soğukta Koruma Tekniği ile Saklanması.....	23
5.6. <i>In Vitro</i> Hücre Gelişimi	23
6. Solunum Epitelinin Fiziksel Bariyerini Karakterize Eden Parametreler	25
7. Solunum Yolu Hücre Kültürlerinin Uygulama Alanları.....	27
7.1. İlaç Permeabilite Çalışmaları.....	27
7.2. İlaç Absorpsiyon Çalışmaları.....	28
7.3. İlaç Metabolizma ve Toksikoloji Çalışmaları.....	28
7.4. İlaç Hedefleme Çalışmaları	28

8.	Hücre İçi Alım Çalışmalarının Değerlendirilmesi.....	29
8.1.	Floresans Spektrometresi.....	29
8.2.	Radyoaktivitenin Hücre Kültüründe Kullanımı.....	29
8.3.	Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop (CLSM).....	30
8.4.	Fluoresan İşaretli Polimerik Partiküller.....	32
9.	Nanopartiküller.....	32
9.1.	Nanopartikül Hazırlama Yöntemleri.....	34
9.1.1.	Polimerizasyon Yöntemi.....	34
9.1.2.	Dondurma-Çözme Yöntemi.....	35
9.1.3.	Katı-Lipid Nanopartikül Hazırlanması.....	36
9.1.4.	Emülsifikasyon Yöntemi.....	36
9.1.5.	Sulu Vasatta Faz Ayrımı.....	37
9.1.6.	Poliyon Kompleks Yöntemi.....	37
9.1.7.	Nanoçöktürme Yöntemi.....	38
9.2.	Nanopartiküllere Uygulanan Farmasötik İşlemler.....	39
9.2.1.	Saflaştırma.....	39
9.2.2.	Dondurarak Kurutma.....	40
9.2.3.	Püskürterek Kurutma.....	40
9.2.4.	Sterilizasyon.....	41
9.3.	Nanopartiküllerin Tedavide Kullanımı.....	41
10.	Polivinilasetat (PVA) ın Farmasötik Teknolojideki Güncel Kullanımı.....	43
	GEREÇ VE YÖNTEM.....	44
	I-GEREÇ.....	44
	Kimyasal Madde ve Çözücüler.....	44
	Aletler.....	45
	II-YÖNTEM.....	49
1.	5(6)-Karboksifloressein Miktar Tayini.....	49
1.1.	Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu.....	49
1.1.1.	Doğrusallık.....	49
1.1.2.	Kesinlik.....	49
1.1.3.	Doğruluk.....	50
1.1.4.	Seçicilik.....	50
2.	PVA nın KF ile İşaretlenmesi.....	50

3.	Nanopartiküller Üzerinde Yapılan Çalışmalar	52
3.1.	PVA Nanopartikülleri Ön Formülasyon Çalışmaları.....	52
3.2.	PVA Nanopartiküllerinin Hazırlanması.....	53
3.3.	Floresans İçeren PVA ve PS Nanopartiküllerin Miktar Tayini	54
3.3.1.	Floresans İçeren PVA ve PS Nanopartiküllerin Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu	54
3.3.1.1.	Doğrusallık.....	54
3.3.1.2.	Keskinlik.....	55
3.3.1.3.	Doğruluk	55
3.3.1.4.	Seçicilik	56
3.4.	Nanopartiküllerin Karakterizasyonu ile İlgili Yapılan Çalışmalar	56
3.4.1.	Nanopartiküllerin Yüzey Özelliklerinin İncelenmesi	56
3.4.2.	Partikül Büyüklüğü Dağılım Analizi	56
3.4.3.	Nanopartiküllerin Verimi.....	57
3.4.4.	Nanopartiküllerin Yüzey Yüklerinin (Zeta Potansiyel) Tayin Edilmesi	57
3.4.5.	Nanopartiküllerin Stabilitésinin İncelenmesi.....	57
4.	Hücre Kültürü Çalışmaları.....	57
4.1.	Hücre Kültürü	57
4.2.	Hücrelerin Mikroskopik Sayımı	58
4.3.	Toksisite Çalışmaları	61
4.3.1.	MTT Yönteminin Validasyonu.....	61
4.3.2.	MTT Yöntemi ile PVA ve PS Nanopartikül Formülasyonlarının Akciğer Hücreleri Yaşayabilirliği Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi	62
4.4.	Transepitel Elektrik Direnci (TER: Transepithelial Electrical Resistance) Ölçümü.....	63
4.5.	İnsan Bronş Hücrelerinin [¹⁴ C]- Mannitol Geçirgenliği	65
4.6.	Nanopartiküllerin İnsan Bronş Epitel Hücrelerinden (Calu-3) Geçiş Çalışmaları	67
4.7.	Nanopartikül Akciğer Hücreleri İçine Alım Çalışmaları.....	69
	BULGULAR.....	72
1.	5(6)-Karboksifloressein Miktar Tayinine Ait Bulgular	72
1.1.	Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu.....	72
1.1.1.	Doğrusallık.....	72

1.1.2. Kesinlik	73
1.1.3. Doğruluk	73
1.1.4. Seçicilik	74
1.2. PVA'nın KF ile İşaretlenmesine Ait Bulgular	74
2. Nanopartiküller Üzerinde Yapılan Çalışmalara Ait Bulgular.....	81
2.1. PVA Nanopartikülleri Ön Formülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular.....	81
2.2. Floresans İçeren PVA ve PS Nanopartiküllerinin Miktar Tayininin Ait Bulgular.	81
2.2.1. Floresans İçeren PVA ve PS Nanopartiküllerinin Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu	81
2.2.1.1. Doğrusallık.....	81
2.2.1.2. Kesinlik	87
2.2.1.3. Doğruluk	87
2.2.1.4. Seçicilik	88
2.3. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu ile İlgili Yapılan Çalışmalar	88
2.3.1. Nanopartiküllerin Yüzey Özelliklerinin İncelenmesine Ait Bulgular	88
2.3.2. Partikül Büyüklüğü Dağılım Analizi ve Nanopartikül Verimine Ait Bulgular.....	92
2.3.3. Nanopartiküllerin Yüzey Yüklerinin (Zeta Potansiyel) Tayin Edilmesine Ait Bulgular	115
2.3.4. Nanopartiküllerinin Stabilitésinin İncelenmesine Ait Bulgular.....	115
3. Hücre Kültürü Çalışmalarına Ait Bulgular	123
3.1. Toksikite Çalışmalarına Ait Bulgular	123
2.1.1. MTT Yönteminin Validasyonuna Ait Bulgular	123
2.1.2. MTT Yöntemi ile PVA ve PS Nanopartikül Formülasyonlarının Akciğer Hücreleri Yaşayabilirliği Üzerindeki Etkisinin İncelenmesine Ait Bulgular	130
2.2. Transepitel Elektrik Direnci Ölçümüne Ait Bulgular	139
2.3. [¹⁴ C]- Mannitol Geçirgenliği Ölçümüne Ait Bulgular.....	146
2.4. Nanopartiküllerin İnsan Bronş Epitel Hücrelerinden (Calu-3) Geçiş Çalışmalarına Ait Bulgular	153
2.5. Nanopartikül Akciğer Hücreleri İçine Alım Çalışmalarına Ait Bulgular.....	158
TARTIŞMA	182
KAYNAKLAR	195
ÖZGEÇMİŞ	222

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1 : Farklı lazer tiplerine ait eksitasyon dalga boyları	31
Tablo 2 : Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan çeşitli floresans gösteren işaretleyici maddeler.....	32
Tablo 3 : Ön formülasyon çalışmalarında hazırlanan PVA nanopartikül formülasyonları	53
Tablo 4 : KF standart eğrisine ait bulgular	73
Tablo 5 : KF nin miktar tayininde kullanılan yöntemin doğruluğuna ait bulgular.....	73
Tablo 6 : KF-PVA nın standart eğrisine ait bulgular.....	80
Tablo 7 : KF-PVA nın floresansla işaretlenme etkinliği	81
Tablo 8 : PS-NC-51 nanopartiküllerinin standart eğrisine ait bulgular	82
Tablo 9 : PS-NC-250 nanopartiküllerinin standart eğrisine ait bulgular	83
Tablo 10 : PS-C-50 nanopartiküllerinin standart eğrisine ait bulgular.....	84
Tablo 11 : PS-C-300 nanopartiküllerinin standart eğrisine ait bulgular.....	85
Tablo 12 : PVA-L-F2 nanopartiküllerinin standart eğrisine ait bulgular	86
Tablo 13 : PS-NC-51 nanopartiküllerinin miktar tayininde kullanılan yöntemin doğruluğuna ait bulgular	87
Tablo 14 : PS-NC-250 nanopartiküllerinin miktar tayininde kullanılan yöntemin doğruluğuna ait bulgular	87
Tablo 15 : PS-C-50 nanopartiküllerinin miktar tayininde kullanılan yöntemin doğruluğuna ait bulgular	88
Tablo 16 : PS-C-300 nanopartiküllerinin miktar tayininde kullanılan yöntemin doğruluğuna ait bulgular	88
Tablo 17 : PVA-L-F2 nanopartiküllerinin miktar tayininde kullanılan yöntemin doğruluğuna ait bulgular	88
Tablo 18 : Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının partikül büyüklüğüne ait bulgular	114
Tablo 19 : PVA ile hazırlanan nanopartiküllerin zeta potansiyel değerlerine ait bulgular	115
Tablo 20 : PS ile hazırlanan nanopartiküllerin zeta potansiyel değerlerine ait bulgular	115

Tablo 21 : PVA-UL-F2 nin distile sudaki stabilite değerleri.....	120
Tablo 22 : PVA-L-F2 ve PS nanopartikül formülasyonlarına ait hücre kültürü çalışma besiyerindeki stabilite değerleri.....	121
Tablo 23 : PVA ve PS nanopartikül formülasyonlarına ait HBSS deki stabilite değerleri	122
Tablo 24 : Calu-3 hücrelerinin MTT yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrilerine ait absorbans değerlerine ait bulgular	126
Tablo 25 : A549 hücrelerinin MTT yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrilerine ait absorbans değerlerine ait bulgular	130
Tablo 26 : PVA-UL-F2 formülasyonu ile inkübe edilmiş Calu-3 ve A549 hücrelerinin yaşayabilirlik değerlerine ait bulgular	131
Tablo 27 :PVA-L-F2 formülasyonu ile inkübe edilmiş Calu-3 ve A549 hücrelerinin yaşayabilirlik değerlerine ait bulgular	132
Tablo 28 : Saflaştırılmamış PS-NC-250 formülasyonu ile inkübe edilmiş Calu-3 ve hücrelerinin yaşayabilirlik değerlerine ait bulgular	133
Tablo 29: SDS %0,05 ile inkübe edilmiş Calu-3 hücrelerinin yaşayabilirlik değerlerine ait bulgular	133
Tablo 30 : Saflaştırılmış PS-NC-250 formülasyonu ile inkübe edilmiş Calu-3 ve A549 hücrelerinin yaşayabilirlik değerlerine ait bulgular	134
Tablo 31 : Saflaştırılmış PS-C-50 formülasyonu ile inkübe edilmiş Calu-3 ve A549 hücrelerinin yaşayabilirlik değerlerine ait bulgular	135
Tablo 32 : Polivinilalkol ve Polivinilpirolidon K15 karışımı ile inkübe edilmiş Calu-3 ve A549 hücrelerinin yaşayabilirlik değerlerine ait bulgular	137
Tablo 33 Bakır nanopartikülleri ile inkübe edilmiş Calu-3 ve A549 hücrelerinin yaşayabilirlik değerlerine ait bulgular	138
Tablo 34 : PVA-UL-F2 formülasyonun uygulanmasından sonra ölçülen Calu-3 hücrelerinin TER değerleri	140
Tablo 35 : PVA-L-F2 formülasyonun uygulanmasından sonra ölçülen Calu-3 hücrelerinin TER değerleri	141
Tablo 36 : PS-NC-51 formülasyonun uygulanmasından sonra ölçülen Calu-3 hücrelerinin TER değerleri	142
Tablo 37 : PS-NC-250 formülasyonun uygulanmasından sonra ölçülen Calu-3 hücrelerinin TER değerleri	143

Tablo 38 : PS-C-50 formülasyonun uygulanmasından sonra ölçülen Calu-3 hücrelerinin TER değerleri.....	144
Tablo 39 : PS-C-300 formülasyonun uygulanmasından sonra ölçülen Calu-3 hücrelerinin TER değerleri	145
Tablo 40 : Transwell hücre membranının TER değerleri	146
Tablo 41 : 240 dakikalık geçiş çalışması süresince Transwell hücre membranının TER değerindeki genel değişim	146
Tablo 42 : PVA-UL-F2 formülasyonun uygulanmasından sonra ölçülen Calu-3 hücrelerinin P_{app} değerleri ve kütle dengesi bulguları	147
Tablo 43 : PVA-L-F2 formülasyonun uygulanmasından sonra ölçülen Calu-3 hücrelerinin P_{app} değerleri ve kütle dengesi bulguları	148
Tablo 44 : PS-NC-51 formülasyonun uygulanmasından sonra ölçülen Calu-3 hücrelerinin P_{app} değerleri ve kütle dengesi bulguları	149
Tablo 45 : PS-NC-250 formülasyonun uygulanmasından sonra ölçülen Calu-3 hücrelerinin P_{app} değerleri ve kütle dengesi bulguları	150
Tablo 46 : PS-C-50 formülasyonun uygulanmasından sonra ölçülen Calu-3 hücrelerinin P_{app} değerleri ve kütle dengesi bulguları	151
Tablo 47 : PS-C-300 formülasyonun uygulanmasından sonra ölçülen Calu-3 hücrelerinin P_{app} değerleri ve kütle dengesi bulguları	152
Tablo 48 : PVA ve PS nanopartikül formülasyonlarının uygulanmasından sonra ölçülen Calu-3 hücrelerinin P_{app} deki değişime ait bulgular	153
Tablo 49 : PS nanopartikül formülasyonlarının 0.4 μ m Transwell membran filtreye uygulanmasından sonra ölçülen yüzde geçiş ve geri kazanım değerlerine ait bulgular.....	154
Tablo 50 : PS nanopartikül formülasyonlarının 1 μ m Transwell membran filtreye uygulanmasından sonra ölçülen yüzde nanopartikül geçişi ve geri kazanım değerlerine ait bulgular	155
Tablo 51 : PS nanopartikül formülasyonlarının 3 μ m Transwell membran filtreye uygulanmasından sonra ölçülen yüzde nanopartikül geçişi ve geri kazanım değerlerine ait bulgular	156
Tablo 52 : PS nanopartikül formülasyonlarının 1 μ m Transwell membran filtreye uygulanmasından sonra ölçülen Calu-3 hücrelerinin yüzde nanopartikül geçişi ve geri kazanım değerlerine ait bulgular.....	157

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Bronşiyol, alveol kanalı ve alveollerin taramalı elektron mikrokobu görüntüsü	5
Şekil 2 Akciğerlere ilaç salımında uygulama apareyi, formülasyon ve akciğer biyolojisi arasındaki ilişkinin şematik gösterimi	10
Şekil 3 : 162 cm ² taban alanına sahip havalandırmaya elverişli (ventilated) hücre kültürü erleni	24
Şekil 4 : Transwell geçirgen hücre kültürü destek kabına ekilmiş hücre tabakasının transepitel elektrik direncinin (TER) ölçümü	26
Şekil 5 : Transwell geçirgen hücre kültürü destek membranı kuyucuğunun apikal ve bazolateral bölümlerinin ayrılmış halinin gösterimi	27
Şekil 6 : Transwell sistemin şematik görünüşü (Porlu alt bölümü, <i>in vitro</i> geçiş ve metabolik aktivite çalışmalarında hücre tabakasının her iki tarafına da bağımsız erişilebilirliği sağlar)	27
Şekil 7 : PVA'nın KF ile işaretlenmesine ait reaksiyon	52
Şekil 8 : Hemositometreye ait şekil	59
Şekil 9 : Hemositometreye hücre kültürü süspansiyonunun uygulanmasına ait şekil	60
Şekil 10 : Neubauer tip hücre sayıcıya (hemositometre) ait lam [A, B, C, D olarak işaretlenmiş 1 mm ² lik dört adet kare üzerindeki parlak renksiz hücreler sayılır. Mavi renkteki daireler ölü hücreleri göstermektedir. Karelerin orta kenar çizgileri üzerine düşen hücreler de sayım işlemine tabi tutulurken diğer kenardakiler (Ø şeklinde gösterilen daireler) sayılmaz.]	60
Şekil 11 : MTT yönteminde SDS çözeltisi ilavesinden sonra 24 saat inkübe edilmiş 96 kuyucuklu plakaya ait fotoğraf	63
Şekil 12 : Transepitel elektrik direncini ölçen çubuk elektrodla sahip EVOM voltmetreye ait şekil (STX-2 and Evom G, World Precision Instruments, Stevenage, UK)	65
Şekil 13 : Sıvı ışımaya sayacına ait şekil (Multi-Purpose Liquid Scintillation Counter LS 6500) (Beckman Coulter, USA)	67
Şekil 14 : Floresanslı nanopartikül nanopartikül geçiş çalışmalarında kullanılan herbir kuyucuğu 12 mm çapında 1,12 cm ² membran büyüme alanına sahip hücre kültürü	

çalışmaları için işlem görmüş 12 kuyucuklu Transwell geçirgen hücre kültürü destek kabına ait fotoğraf.....	69
Şekil 15 : Konfokal lazer taramalı mikroskoba ait fotoğraf	71
Şekil 16 : KF nin florometrik yöntemine ait standart eğrisi	72
Şekil 17 : 0,5 mg/mL KF çözeltisinin gösterdiği floresans şiddeti.....	75
Şekil 18 : 2 mg/mL KF çözeltisinin gösterdiği floresans şiddeti.....	76
Şekil 19 : 4 mg/mL KF çözeltisinin gösterdiği floresans şiddeti.....	76
Şekil 20 : 20 mg/mL KF çözeltisinin gösterdiği floresans şiddeti.....	77
Şekil 21 : 25 mg/mL PVA çözeltisinin gösterdiği floresans şiddeti.....	77
Şekil 22 : 100 mg/mL PVA çözeltisinin gösterdiği floresans şiddeti.....	78
Şekil 23 : KF-PVA nın Sephadex LH-20 kolonda ayrıldıktan sonra elde edilen fraksiyon hacimlerine karşı ölçülen ağırlık farkı ve floresans şiddeti değerlerini gösteren grafik. 78	
Şekil 24 : 2 mg/mL KF-PVA çözeltisinin ikinci kez Sephadex LH-20 kolona uygulanmasından sonra gösterdiği floresans şiddeti	79
Şekil 25 : KF-PVA nın florometrik yöntemine ait standart eğrisi	79
Şekil 26 : PS-NC-51 nanopartiküllerinin fluorometrik yöntemine ait standart eğrisi	82
Şekil 27 : PS-NC-250 nanopartiküllerinin florometrik yöntemine ait standart eğrisi	83
Şekil 28 : PS-C-50 nanopartiküllerinin florometrik yöntemine ait standart eğrisi	84
Şekil 29 : PS-C-300 nanopartiküllerinin florometrik yöntemine ait standart eğrisi	85
Şekil 30 : PVA-L-F2 nanopartiküllerinin florometrik yöntemine ait standart eğrisi	86
Şekil 31: PVA-UL-F2 nin kriyojenik transmisyon elektron mikroskobu fotoğrafı-I.....	89
Şekil 32: PVA-UL-F2 nin kriyojenik transmisyon elektron mikroskobu fotoğrafı-II....	89
Şekil 33: PVA-UL-F2 nin kriyojenik transmisyon elektron mikroskobu fotoğrafı-III ..	90
Şekil 34: PVA-UL-F2 nin kriyojenik transmisyon elektron mikroskobu fotoğrafı-IV ..	90
Şekil 35: PVA-UL-F2 nin kriyojenik transmisyon elektron mikroskobu fotoğrafı-V ...	91
Şekil 36: PVA-UL-F2 nin kriyojenik transmisyon elektron mikroskobu fotoğrafı-VI ..	91
Şekil 37: PVA-UL-F1 formülasyonun 1. serisinin partikül büyüklüğü ölçümüne ait grafik.....	93
Şekil 38 : PVA-UL-F1 formülasyonun 2. serisinin partikül büyüklüğü ölçümüne ait grafik.....	94
Şekil 39 : PVA-UL-F1 formülasyonun 3. serisinin partikül büyüklüğü ölçümüne ait grafik.....	95

Şekil 40 : PVA-UL-F2 formülasyonun 1. serisinin partikül büyüklüğü ölçümüne ait grafik.....	96
Şekil 41 : PVA-UL-F2 formülasyonun 2. serisinin partikül büyüklüğü ölçümüne ait grafik.....	97
Şekil 42 : PVA-UL-F2 formülasyonun 3. serisinin partikül büyüklüğü ölçümüne ait grafik.....	98
Şekil 43 : PVA-UL-F3 formülasyonun 1. serisinin partikül büyüklüğü ölçümüne ait grafik.....	99
Şekil 44 : PVA-UL-F3 formülasyonun 2. serisinin partikül büyüklüğü ölçümüne ait grafik.....	100
Şekil 45 : PVA-UL-F3 formülasyonun 3. serisinin partikül büyüklüğü ölçümüne ait grafik.....	101
Şekil 46 : PVA-UL-F4 formülasyonun 1. serisinin partikül büyüklüğü ölçümüne ait grafik.....	102
Şekil 47 : PVA-UL-F4 formülasyonun 2. serisinin partikül büyüklüğü ölçümüne ait grafik.....	103
Şekil 48 : PVA-UL-F4 formülasyonun 3. serisinin partikül büyüklüğü ölçümüne ait grafik.....	104
Şekil 49 : PVA-UL-F5 formülasyonun 1. serisinin partikül büyüklüğü ölçümüne ait grafik.....	105
Şekil 50 : PVA-UL-F5 formülasyonun 2. serisinin partikül büyüklüğü ölçümüne ait grafik.....	106
Şekil 51 : PVA-UL-F5 formülasyonun 3. serisinin partikül büyüklüğü ölçümüne ait grafik.....	107
Şekil 52 : PVA-UL-F6 formülasyonun 1. serisinin partikül büyüklüğü ölçümüne ait grafik.....	108
Şekil 53 : PVA-UL-F6 formülasyonun 2. serisinin partikül büyüklüğü ölçümüne ait grafik.....	109
Şekil 54 : PVA-UL-F6 formülasyonun 3. serisinin partikül büyüklüğü ölçümüne ait grafik.....	110
Şekil 55 : PVA-L-F2 formülasyonun 1. serisinin partikül büyüklüğü ölçümüne ait grafik.....	111

Şekil 56 : PVA-L-F2 formülasyonun 2. serisinin partikül büyüklüğü ölçümüne ait grafik	112
Şekil 57 : PVA-L-F2 formülasyonun 3. serisinin partikül büyüklüğü ölçümüne ait grafik	113
Şekil 58 : PVA-UL-F2 formülasyonun 1. gün büyüklüğü ölçümüne ait grafik	116
Şekil 59 : PVA-UL-F2 formülasyonun 3. gün büyüklüğü ölçümüne ait grafik	117
Şekil 60 : PVA-UL-F2 formülasyonun 7. gün büyüklüğü ölçümüne ait grafik	118
Şekil 61 : PVA-UL-F2 formülasyonun 14. gün büyüklüğü ölçümüne ait grafik	119
Şekil 62 : PVA-UL-F2 formülasyonun 30. gün büyüklüğü ölçümüne ait grafik	120
Şekil 63 : %2 FBS içeren DMEM hücre kültürü çalışma besiyeri ile inkübasyona bırakılan Calu-3 hücrelerinin MTT yöntemi ile elde edilen 1. kalibrasyon eğrisi	123
Şekil 64 : %2 FBS içeren DMEM hücre kültürü çalışma besiyeri ile inkübasyona bırakılan Calu-3 hücrelerinin MTT yöntemi ile elde edilen 2. kalibrasyon eğrisi	124
Şekil 65 : %2 FBS içeren DMEM hücre kültürü çalışma besiyeri ile inkübasyona bırakılan Calu-3 hücrelerinin MTT yöntemi ile elde edilen 3. kalibrasyon eğrisi	124
Şekil 66 : %2 FBS içeren DMEM hücre kültürü çalışma besiyeri ile inkübasyona bırakılan Calu-3 hücrelerinin MTT yöntemi ile elde edilen 4. kalibrasyon eğrisi	125
Şekil 67 %2 FBS içeren DMEM hücre kültürü çalışma besiyeri ile inkübasyona bırakılan Calu-3 hücrelerinin MTT yöntemi ile elde edilen genel kalibrasyon eğrileri	125
Şekil 68 : %2 FBS içeren DMEM hücre kültürü çalışma besiyeri ile inkübasyona bırakılan Calu-3 hücrelerinin MTT yöntemi ile elde edilen genel kalibrasyon eğrisi..	126
Şekil 69 : %2 FBS içeren MEM hücre kültürü çalışma besiyeri ile inkübasyona bırakılan A549 hücrelerinin MTT yöntemi ile elde edilen 1. kalibrasyon eğrisi	127
Şekil 70 : %2 FBS içeren MEM hücre kültürü çalışma besiyeri ile inkübasyona bırakılan A549 hücrelerinin MTT yöntemi ile elde edilen 2. kalibrasyon eğrisi	127
Şekil 71 : %2 FBS içeren MEM hücre kültürü çalışma besiyeri ile inkübasyona bırakılan A549 hücrelerinin MTT yöntemi ile elde edilen 3. kalibrasyon eğrisi	128
Şekil 72 : %2 FBS içeren MEM hücre kültürü çalışma besiyeri ile inkübasyona bırakılan A549 hücrelerinin MTT yöntemi ile elde edilen 4. kalibrasyon eğrisi	128
Şekil 73 : %2 FBS içeren MEM hücre kültürü çalışma besiyeri ile inkübasyona bırakılan A549 hücrelerinin MTT yöntemi ile elde edilen genel kalibrasyon eğrileri .	129
Şekil 74 : %2 FBS içeren MEM hücre kültürü çalışma besiyeri ile inkübasyona bırakılan A549 hücrelerinin MTT yöntemi ile elde edilen genel kalibrasyon eğrisi....	129

Şekil 75 : PVA-UL-F2 formülasyonu ile inkübe edilmiş Calu-3 ve A549 hücrelerinin yaşayabilirliğine ait grafik	130
Şekil 76 : PVA-L-F2 formülasyonu ile inkübe edilmiş Calu-3 ve A549 hücrelerinin yaşayabilirliğine ait grafik	131
Şekil 77 : Saflaştırılmamış PS-NC-250 karışımı ile inkübe edilmiş Calu-3 hücrelerinin yaşayabilirliğine ait grafik	133
Şekil 78 : Saflaştırılmış PS-NC-250 karışımı ile inkübe edilmiş Calu-3 ve A549 hücrelerinin yaşayabilirliğine ait grafik	134
Şekil 79 : Saflaştırılmış PS-C-50 karışımı ile inkübe edilmiş Calu-3 ve A549 hücrelerinin yaşayabilirliğine ait grafik	135
Şekil 80 : Polivinilalkol ve Polivinilpirolidon K15 karışımı ile inkübe edilmiş Calu-3 ve A549 hücrelerinin yaşayabilirliğine ait grafik	136
Şekil 81 : Bakır nanopartikülleri ile inkübe edilmiş Calu-3 ve A549 hücrelerinin yaşayabilirliğine ait grafik	138
Şekil 82 : PVA-UL-F2 formülasyonun uygulanmasından sonra ölçülen Calu-3 hücrelerinin % TER değerlerine ait zamana bağlı profil	140
Şekil 83 : PVA-L-F2 formülasyonun uygulanmasından sonra ölçülen Calu-3 hücrelerinin % TER değerlerine ait zamana bağlı profil	141
Şekil 84 : PS-NC-51 formülasyonun uygulanmasından sonra ölçülen Calu-3 hücrelerinin % TER değerlerine ait zamana bağlı profil	142
Şekil 85 : PS-NC-250 formülasyonun uygulanmasından sonra ölçülen Calu-3 hücrelerinin % TER değerlerine ait zamana bağlı profil	143
Şekil 86 : PS-C-50 formülasyonun uygulanmasından sonra ölçülen Calu-3 hücrelerinin % TER değerlerine ait zamana bağlı profil	144
Şekil 87 : PS-C-300 formülasyonun uygulanmasından sonra ölçülen Calu-3 hücrelerinin % TER değerlerine ait zamana bağlı profil	145
Şekil 88 : PVA-UL-F2 formülasyonun uygulanmasından sonra ölçülen Calu-3 hücrelerinin P_{app} değerlerine ait nanopartikül konsantrasyonuna bağlı profili.....	147
Şekil 89 : PVA-L-F2 formülasyonun uygulanmasından sonra ölçülen Calu-3 hücrelerinin P_{app} değerlerine ait nanopartikül konsantrasyonuna bağlı profili.....	148
Şekil 90 : PS-NC-51 formülasyonun uygulanmasından sonra ölçülen Calu-3 hücrelerinin P_{app} değerlerine ait nanopartikül konsantrasyonuna bağlı profili.....	149

Şekil 91 : PS-NC-250 formülasyonun uygulanmasından sonra ölçülen Calu-3 hücrelerinin P_{app} değerlerine ait nanopartikül konsantrasyonuna bağlı profili.....	150
Şekil 92 : PS-C-50 formülasyonun uygulanmasından sonra ölçülen Calu-3 hücrelerinin P_{app} değerlerine ait nanopartikül konsantrasyonuna bağlı profili	151
Şekil 93 : PS-C-300 formülasyonun uygulanmasından sonra ölçülen Calu-3 hücrelerinin P_{app} değerlerine ait nanopartikül konsantrasyonuna bağlı profili	152
Şekil 94 : PS nanopartikül formülasyonlarının 0,4 μm Transwell membran filtreye uygulanmasından sonra ölçülen nanopartikül geçiş değerlerinin zamana bağlı profili	154
Şekil 95 : PS nanopartikül formülasyonlarının 1 μm Transwell membran filtreye uygulanmasından sonra ölçülen nanopartikül geçiş değerlerinin zamana bağlı profili	155
Şekil 96 : PS nanopartikül formülasyonlarının 3 μm Transwell membran filtreye uygulanmasından sonra ölçülen nanopartikül geçiş değerlerinin zamana bağlı profili	156
Şekil 97 : PVA ve PS nanopartikül formülasyonlarının 1 μm Transwell membran filtreye uygulanmasından sonra ölçülen nanopartikül geçiş değerlerinin zamana bağlı profili	158
Şekil 98 : Nanopartikül formülasyonu ile inkübasyona bırakılmamış, mukus taşıyan, yaşayan Calu-3 hücreleri konfokal mikroskop görüntüsü	159
Şekil 99 : Nanopartikül formülasyonu ile inkübasyona bırakılmamış, mukus tabakası uzaklaştırılmış, yaşayan Calu-3 hücreleri konfokal mikroskop görüntüsü.....	159
Şekil 100 : PS-C-50 formülasyonunun hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılarak kültür edilen A549 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-I.....	160
Şekil 101 : PS-C-50 formülasyonunun hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılarak kültür edilen A549 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-II	160
Şekil 102 : PS-C-50 formülasyonunun hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılarak kültür edilen A549 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-III	161
Şekil 103 : PS-NC-51 formülasyonunun hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılarak kültür edilen A549 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-I.....	161

Şekil 104 : PS-NC-51 formülasyonunun hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılarak kültür edilen A549 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-II	162
Şekil 105 : PS-NC-250 formülasyonunun hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılarak kültür edilen A549 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü	162
Şekil 106 : PS-C-300 formülasyonunun hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılarak kültür edilen A549 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-I.....	163
Şekil 107 : PS-C-300 formülasyonunun hücre kültürü besiyerine daldırılarak kültür edilen A549 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-II	163
Şekil 108 : PS-C-300 formülasyonunun hücre kültürü besiyerine daldırılarak kültür edilen A549 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-III	164
Şekil 109 : PS-C-300 formülasyonunun hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılarak kültür edilen A549 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-IV	164
Şekil 110 : PVA-L-F2A formülasyonunun hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılarak kültür edilen A549 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-I.....	165
Şekil 111 : PVA-L-F2A formülasyonunun hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılarak kültür edilen A549 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-II	165
Şekil 112 : PVA-L-F2A formülasyonunun hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılarak kültür edilen A549 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-III	166
Şekil 113 : PS-C-50 formülasyonunun hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılarak kültür edilen Calu-3 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-I.....	166
Şekil 114 : PS-C-50 formülasyonunun hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılarak kültür edilen Calu-3 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-II	167

Şekil 115 : PS-C-50 formülasyonunun hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılarak kültür edilen Calu-3 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-III	167
Şekil 116 : PS-C-50 formülasyonunun hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılarak kültür edilen Calu-3 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-IV	168
Şekil 117 : PS-NC-250 formülasyonunun hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılarak kültür edilen Calu-3 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-I.....	168
Şekil 118 : PS-NC-250 formülasyonunun hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılarak kültür edilen Calu-3 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-II	169
Şekil 119 : PS-NC-250 formülasyonunun hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılarak kültür edilen Calu-3 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-III	169
Şekil 120 : PS-NC-250 formülasyonunun hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılarak kültür edilen Calu-3 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-IV	170
Şekil 121 : PS-NC-250 formülasyonunun hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılarak kültür edilen Calu-3 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-V	170
Şekil 122 : PS-C-300 formülasyonunun hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılarak kültür edilen Calu-3 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-I.....	171
Şekil 123 : PS-C-300 formülasyonunun hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılarak kültür edilen Calu-3 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-II	171
Şekil 124 : PS-C-300 formülasyonunun hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılarak kültür edilen Calu-3 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-III	172
Şekil 125 : PS-C-300 formülasyonunun hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılarak kültür edilen Calu-3 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-IV.....	172

Şekil 126 : PS-C-300 formülasyonunun hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılarak kültür edilen Calu-3 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-V	173
Şekil 127 : PS-C-300 formülasyonunun hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılarak kültür edilen Calu-3 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-VI.....	173
Şekil 128 : PVA-L-F2A formülasyonunun hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılarak kültür edilen Calu-3 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-I.....	174
Şekil 129 : PVA-L-F2A formülasyonunun hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılarak kültür edilen Calu-3 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-II	174
Şekil 130 : PVA-L-F2A formülasyonunun hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılarak kültür edilen Calu-3 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-III	175
Şekil 131 : PS-NC-51 formülasyonunun hava-sıvı arayüzeyinde kültür edilen Calu-3 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-I	175
Şekil 132 : PS-NC-51 formülasyonunun hava-sıvı arayüzeyinde kültür edilen Calu-3 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-II	176
Şekil 133 : PS-NC-51 formülasyonunun hava-sıvı arayüzeyinde kültür edilen Calu-3 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-III	176
Şekil 134 : PS-C-300 formülasyonunun hava-sıvı arayüzeyinde kültür edilen Calu-3 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-I	177
Şekil 135 : PS-C-300 formülasyonunun hava-sıvı arayüzeyinde kültür edilen Calu-3 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-II	177
Şekil 136 : PS-NC-51 formülasyonunun hava-sıvı arayüzeyinde kültür edilen Calu-3 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-I	178
Şekil 137 : PS-NC-51 formülasyonunun hava-sıvı arayüzeyinde kültür edilen Calu-3 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-II	178

Şekil 138 : PS-C-300 formülasyonunun hava-sıvı arayüzeyinde kültür edilen Calu-3 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-III	179
Şekil 139 : PS-C-300 formülasyonunun hava-sıvı arayüzeyinde kültür edilen Calu-3 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-IV	179
Şekil 140 : PVA-L-F2A formülasyonunun hava-sıvı arayüzeyinde kültür edilen Calu-3 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-I	180
Şekil 141 : PVA-L-F2A formülasyonunun hava-sıvı arayüzeyinde kültür edilen Calu-3 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-II	180
Şekil 142 : PVA-L-F2A formülasyonunun hava-sıvı arayüzeyinde kültür edilen Calu-3 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-III	181

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

- CLSM: Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop
- Cryo-TEM: Kriyojenik Transmisyon Elektron Mikroskobu
- DAPI: 4,6-Diamidino-2-Fenilindol
- DIPAD: Diizopropilazodikarboksilat
- DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12 Ham
- DMF: N,N-Dimetil Formamid
- EDTA: Etilen Diamin Tetraasetik Asit
- FBS: Fetal Bovine Serum
- HBSS: Hanks' Balanced Salt Solution
- KF: 5(6)-Karboksifloressein
- KF-PVA: 5(6)-Karboksifloressein ile İşaretlenmiş Polivinilasetat
- MEM: Minimum Essential Medium
- Papp: Görünen Geçiş Katsayısı
- PBS: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
- PCS: Foton Korelasyon Spektroskopisi
- PS: Polistiren
- PVA: Polivinilasetat %40
- SDS: Sodyum Dodesil Sülfat
- TER: Transepitel Elektrik Direnci
- TPP: Trifenilfosfin

ÖZET

Orlu Gül, M. Polivinilasetat Nanopartiküllerinin Hazırlanması ve Akciğer Hücrelerine Etkileri Üzerine İn Vitro Araştırmalar, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Teknoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul, 2008.

Çalışmamızda, nanopartiküllerin in vitro hücre kültürü sisteminde izlenebilmesi amacıyla floresans özellik gösteren 5(6)-karboksifloressein (KF) ile polivinilasetat (PVA) in kimyasal modifikasyonu gerçekleştirilmiş ve modifiye polimer ile hazırlanan floresans işaretli nanopartiküllerin akciğer epitel hücreleriyle biyolojik etkileşimleri incelenmiştir. Stabil bir floresans işaretleme sağlamak için KF, trifenilfosfat ve dizopropilazodikarboksilat yardımıyla PVA ya kovalan yolla bağlanmıştır. Optimum floresans madde bağlanmış polimerin (KF-PVA) işaretlenme etkinliği $0,45 \pm 0,06$ olarak bulunmuştur. Bu modifiye polimer kullanılarak nanopartiküller (PVA-L-F2A) nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanmıştır. Karakterizasyon çalışmalarında, PVA nanopartiküllerinin cryo-TEM mikroskobu ile elde edilen veriler ışığında küresel bir görünüme; foton korelasyon spektroskopisiyle ölçümü sonucunda ortalama $297,33 \pm 5,9$ nm büyüklüğe, hücre kültürü çalışma besiyerinde ve tamponunda sırasıyla $0,23 \pm 0,4$ ve $1,92 \pm 3,76$ mV yüzey yüküne sahip oldukları ve hücre kültürü çalışma besiyerinde 48 saate kadar stabilitelerini korudukları saptanmıştır. PVA nanopartiküllerinin akciğer epitel hücreleriyle olan etkileşimleri, floresans gösteren ticari polistiren (PS) nanopartikülleri ile karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır. İnsan bronş epitel hücre kültürü (Calu-3) ve insan alveol epitel hücre kültürü (A549) ile gerçekleştirilen hücre yaşayabilirlik testinde, PVA ve PS nanopartikülleri hücre toksisiteye neden olmamıştır. Transepitel elektrik direnci ölçümü ve radyoaktif mannitol geçiş çalışması bulguları, floresans özellik gösteren PVA ve PS nanopartikül formülasyonlarının Calu-3 hücre bütünlüğünü olumsuz etkilemediğini göstermiştir. Calu-3 hücrelerinden nanopartikül geçiş çalışmaları, PVA nanopartiküllerin uygun bir pulmoner taşıyıcı sistem olduğunu belirtmiştir. Konfokal lazer taramalı mikroskop fotoğrafları, PVA nanopartiküllerinin akciğer hücreleri içine alınımının düşük oranda gerçekleştiğini göstermiştir. PVA'nın tarafımızdan literatürde ilk defa gerçekleştirilen bir uygulama ile floresans boya yardımıyla işaretlenerek modifiye hale getirilmesi, PVA nanopartiküllerinin akciğer epitel hücreleriyle etkileşiminin incelenmesini mümkün kılmıştır.

Anahtar Kelimeler: polivinilasetat, nanopartikül, hücre kültürü, Calu-3, floresans

Bu çalışma Avrupa Birliği 6. çerçeve programı Marie Curie ön aşama eğitim programı altında yer alan Galenos Network bursu ile desteklenmiştir.

ABSTRACT

Orlu Gül, M. Preparation of Polyvinylacetate Nanoparticles and In Vitro Studies on their Interaction with Lung Cells. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Pharmaceutical Technology PhD thesis, İstanbul, 2008.

In the present study, polyvinylacetate (PVA) was fluorescently labelled with 5(6)-carboxyfluorescein (KF) via covalent binding and the biological interaction between nanoparticles prepared with the modified fluorescent polymer and lung epithelial cells was studied with the aim of enabling the investigation of the biological fate of nanoparticles using in vitro cell culture systems. In order to provide a stable fluorescence labelling, KF was covalently attached to PVA (1:1) in the presence of triphenylphosphine and diisopropylazodicarboxylate. The labelling efficiency of the optimum fluorescent attached polymer (KF-PVA) was found $0.45 \pm 0.06\%$. Nanoparticle formulations (PVA-L-F2A) with this modified polymer were prepared using nanoprecipitation method. In the characterisation studies, cryo-TEM images revealed the spherical structure of PVA nanoparticles. The mean particle size of PVA nanoparticles was found as $297,33 \pm 5,9$ nm and the surface charge in cell culture working medium and buffer was determined as $0,23 \pm 0,4$ and $1,92 \pm 3,76$ mV, respectively. PVA nanoparticles were stable in cell culture medium up to 48 h. The interaction of PVA nanoparticles with respiratory epithelial cells was studied in vitro, with commercially available polystyrene (PS) fluorescein-labelled nanoparticles used for comparison. No overt cellular toxicity was observed in the cell viability assay (MTT) using the human bronchial epithelial cell line, Calu-3, and human alveolar epithelial cell line, A549. The transepithelial electrical resistance measurements and the radioactive mannitol permeability data did not produce any adverse effect on the Calu-3 cell integrity. Nanoparticle transport studies on Calu-3 cells indicated that PVA nanoparticles were suitable for pulmonary transport. Confocal laser scanning microscopy photos showed low PVA nanoparticle uptake from Calu-3 and A549 cells. The strategy of modifying PVA by fluorescent labelling, performed for the first time in this study, provided the evaluation of the interaction of PVA nanoparticles with lung epithelial cells.

Keywords: polyvinylacetate, nanoparticle, cell culture, Calu-3, fluorescence

This study was supported by Galenos network funded programme under The European Union 6th Framework Marie Curie Early Stage Training scheme.

GİRİŞ VE AMAÇ

Nanopartikül sistemleri için yeni uygulamalar hem endüstriyel hem de sağlık alanlarında geliştirilmeye devam etmektedir. Bu gelişimin bir sonucu olarak nanopartikül alanındaki çalışmalarda hızla bir artış gözlenmektedir. Bu artış hiç şüphesiz nanopartikül kullanımına bir ivme kazandıracaktır. Medikal amaçla üretilen nanopartiküller insan vücudu savunma mekanizmaları için yeni bir araştırma alanıdır. Nanopartiküller, geçiş suretiyle hasar görmüş deriden (1), gastrointestinal kanaldan (2) ve akciğerden (3) sistemik dolaşıma giriş yaparlar. Nanopartiküllerin potansiyel toksikolojik etkisine ait değerlendirmeleri içeren çalışma sonuçlarına rağmen, büyüklük ve yüzey kimyasının bu partiküllerin vücut tarafından alımlarına nasıl etki edeceği konusu halen çalışılmaktadır.

Solunumun doğal işleyişi, nanopartiküllerin hava yollarının nazofarenks, bronş ve alveol bölgelerinde yerleşmelerine izin vermektedir (3). Akciğerlere yerleştikleri andan itibaren nanopartiküllerin bu bölgede kalış süresi büyük partiküllere kıyasla anlamlı şekilde daha uzundur. Çünkü makrofajlar tarafından daha az miktarda kabul edilirler (3). Hava yollarında kalışı uzatmak toksikolojik etkiler doğurabilse de, akciğerlerde etkin ilaç salımını gerçekleştirmek amaçlandığında farmasötik formülasyonun tutulma süresini uzatmak istenilen bir durumdur. Akciğerler yoluyla terapötik etkin maddeleri salmak için nanopartiküllerin kullanımı güncel bir alandır ve çeşitli nano boyutlu ilaç taşıyıcıların bu amaçla dizayn edilmelerine (4-7) rağmen henüz klinik anlamda kullanım alanı bulamamıştır. Akciğerlere yerleşmelerini takiben nano boyutlu ilaç taşıyıcı sistemlerin biyolojik kaderini inceleyen az sayıda çalışma mevcuttur. Bu sistemlerin insanlarda kullanımlarından önce nanopartiküllerin tutulması, atılımı ve en önemlisi de toksisitesi çok iyi bir şekilde bilinmelidir.

Nanopartiküller ile akciğer arasındaki her potansiyel etkileşimi *in vivo* ortamda incelemek pratik olarak çok zor iken; doğal epiteli temsil eden Transwell geçirgen hücre kültürü destek membranında kültürü yapılan solunum epitel hücreler, hücre yüzeyine bağlanma, hücre içine alım, hücre içi kompartmanlar arasındaki trafik, ilaç geçişi ve ilaç metabolizmasını içeren taşıyıcı-hücre etkileşimini çalışmak için çok uygun ve güçlü bir araçtır (4, 8-10). *In vivo* çalışmalarla karşılaştırıldığında, *in vitro* yöntemler deneysel maliyeti düşürme ve canlı hayvan deneylerini en aza indirme ya da ortadan kaldırma

gibi avantajlarının yanı sıra kolaylık, güvenilirlik, deneysel şartların ve veri eldesinin güçlü bir şekilde kontrolünü sağlamaktadır (11, 12). İnsan bronş epitelinden elde edilen Calu-3 ve insan alveol epitelinden elde edilen A549 en yaygın kullanılan solunum hücreleridir (11, 13). Calu-3 hücreleri, nanopartiküllerin epitel bütünlüğü üzerine olan etkisinin incelenmesine imkan veren sıkı bağlantı bölgelerini (tight junction) oluşturması sebebiyle hava yolu epitelinin en uygun modelidir (9, 14-18).

Nanopartikülleri biyolojik sistemde izlemek için radyoaktivite (19), floresans işaretleme ve x-ışınları saçılımını içeren çeşitli spektroskopik yaklaşımlar daha önceden kullanılmıştır (20). Ancak kolaylık, maliyet ve hassasiyet açısından bakıldığında floresans işaretleme uygulamaları ilk tercih olarak ortaya çıkmaktadır (21). Nanopartikül bir floresans yayan boya ile kovalan bağ oluşturma suretiyle kimyasal olarak işaretlenebilir ya da bir floresans işaretli madde nanopartikül içine yerleştirilebilir. Enkapsülasyon olarak da isimlendirilen içine yerleştirme yöntemi, floresans madde sızıntısını önleyebilmek için nanopartikülleri hazırlamakta kullanılan polimer materyalin geniş bir çözücü madde grubuna dayanıklı olması durumunda uygulanabilir. Floressein, yüksek absorpsiyon kapasitesinde olması, yüksek floresans kuantum verimini sağlaması ve suda çözünülebilmesi nedenleriyle floresans işaretleyici olarak sıklıkla kullanılmaktadır (21). Kitozan (22, 23), lateks (24), lipit (25) ve poli-(L-laktik-koglikolik asit) (26) gibi nanopartikül hazırlamakta kullanılan geniş bir materyal grubunu işaretlemek üzere kullanılmıştır. Ayrıca çeşitli sayıda ticari olarak üretilen floresans işaretli nanopartiküller de mevcuttur. Ancak, ticari nanopartiküllerin büyük bir kısmı partikül agregasyonu, değişken yüzey yükü ve basit biyolojik sıvılarda floresans madde sızıntısı göstermesi nedenleriyle hücre kültürü modellerinde kullanıma uygun değildir. Bunun yanında, ticari ürünlerin pek çoğu, süspansiyon formlarının stabilitesini sürdürmek için sodyum dodesil sülfat (SDS) gibi yüzey etken maddeleri yüksek konsantrasyonda içermekte ve bu katkı maddeleri *in vitro* modellerde hücre hasarına neden olmaktadır.

Çalışmamız, farklı partikül büyüklüklerine ve yüzey kimyasına sahip biyoyumlu polimerlerle hazırlanan floresans ile işaretlenmiş partiküllerin, akciğerdeki biyolojik kaderlerinin araştırılmasına yönelik çalışmalara zemin hazırlamaktadır.

Bu çalışmanın amacı *in vitro* hücre kültürü modellerinde geçiş çalışmalarında kullanılacak inert bir materyalden meydana gelen floresans işaretli bir nanopartikül

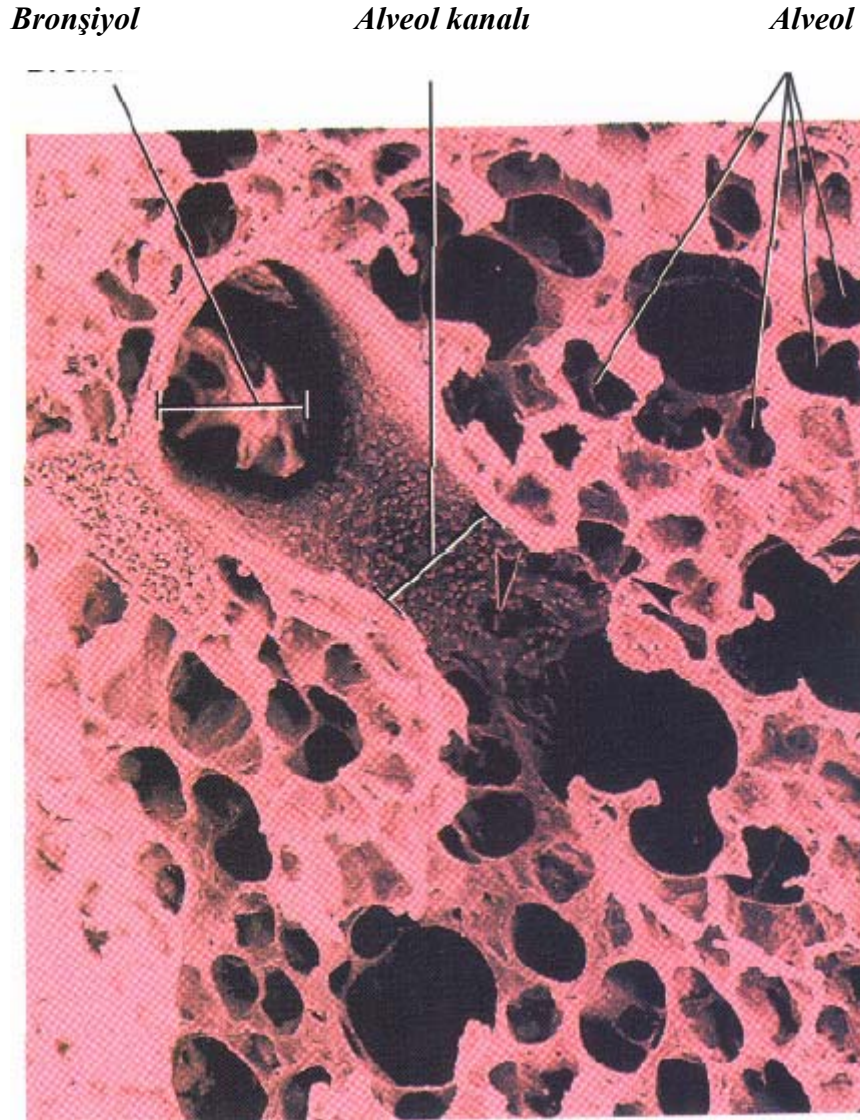
formülasyonunun hazırlanması ve karakterizasyonudur. Kaynaklarda nanopartiküllerin büyüklük dağılımı 1 ila 1000 nm arasında verilmektedir (27, 28). Bu çalışmada nanopartikül materyali olarak seçilen polivinilasetat, FDA tarafından onaylanmış, oküler, topikal ve oral salım sistemlerinde kullanılan bir sentetik polimerdir (29-33). Çalışmamızda, nanopartiküllerin *in vitro* hücre kültürü sisteminde izlenebilmesi için floresans gösteren bir boya ile PVA'nın kimyasal modifikasyonu gerçekleştirilmiş ve PVA ile ticari polistiren (PS) floresans işaretli nanopartiküllerin Calu-3 insan bronş epitel hücreleriyle biyolojik etkileşimleri incelenmiştir.

GENEL BİLGİLER

1. Akciğer Fizyolojisi

Akciğer, kan ile inhale edilen hava arasında oksijen ve karbon dioksitin değiştirildiği dış solunum organıdır. Göğüs boşluğunda büyük damarlar ve kalbin yan taraflarında yer alan, solunum havası ile kan arasındaki gaz alışverişini gerçekleştiren çift organdır. Solunum yollarının yapısı nefes alımı ile gelen yabancı maddelerin girişini engeller ve atımlarını etkin şekilde destekler. İki akciğer arasında, kalp, yemek borusu, soluk borusu ve büyük damarların yer aldığı mediastinum adı verilen bir orta bölüm bulunur (34).

Fonksiyonel olarak, bir insanda solunum yolu iki ana bölgeden meydana gelmektedir; bu bölgeler hava iletici bölüm ve alveolar bölge olarak isimlendirilmektedir. Hava iletici bölüm, nazal boşluk ve bağlantılı sinüslerden-nazofarenks, larenks, trakea, bronş ve bronşiyollerden oluşmaktadır. Nefes ile alınan hava, akciğerdeki alveolar bölgeye ulaşmadan önce havayollarında filtre edilir, ısıtılır ve nemlendirilir. Alveolar bölge, gazların ince alveolar kapiler membrandan hızlı değişiminin gerçekleştiği bronşiyollerden, alveol kanal ve alveollere uzanmaktadır (Şekil 1) (35). Anatomik olarak, akciğer, lobları oluşturmak üzere kendisini iki ana bronşa bölen trakeadan oluşmaktadır. Sağ bronş daha geniştir ve sol bronşa nazaran daha küçük bir açıyla trakeadan ayrılmaktadır ve dolayısıyla inhale edilen materyali almaya daha yatkındır (36). Hava iletici bölüm, havanın serbest geçişi için çok elverişli olduğu gibi aynı zamanda temizleme, ısıtma ve nemlendirme fonksiyonlarını yerine getirebilecek yeteneklere de sahiptir. Böylece oksijence zengin bir hava sağlamakla kalmaz, aynı zamanda atmosfer havasının eksikliklerini tamamlayıp, zararlı içeriklerini de yok eder.



Şekil 1: Bronşiyol, alveol kanalı ve alveollerin taramalı elektron mikrokobu görüntüsü

Epitel hücre bileşimi, trakeadan terminal bronşiyollere doğru her bir hava geçişi sağlanan yolda bölgesel olarak değişiklik göstermektedir. Solunum yolu epitelinin ana görevi fiziksel bir bariyer oluşturarak ve mukosilyer temizleme mekanizması aracılığıyla vücuda yabancı madde girişini kısıtlamaktır. Sıkı, üzeri mukusla örtülü, silli bariyer, alveol bölgesiyle temastan önce havayı nemlendirmektedir. Solunum yolu epiteli, bazal hücreler, mukus salgı yeteneğine sahip goblet hücreleri, havayolu mukusunda yakalanmış döküntüden solunum yolunu temizlemeye yardım eden silli hücreler, süpürücü hücreler, seröz hücreler, Clara hücreleri ve nöroendokrin hücreleri de içeren bir dizi hücre grubundan meydana gelmektedir (37). Lenfosit, lökosit ve mast hücreleri gibi bir dizi, bir bölgeden diğer bölgeye hareket yeteneğine sahip hücreler de

epitelde yer almaktadır (38). Hücre tiplerinin sayısı solunum yolu bölgesine bağlı olarak değişiklik göstermektedir.

Trakeadan alveol bölgesine doğru indikçe havayollarının iç çapı, 1,8 cm den alveol bölgesinde 0,04 mm ye düşmektedir (39). Bu azalma ile beraber solunum yollarının yüzey alanı artmaktadır. Ortalama bir yetişkin akciğerinde alveol epitelinin yüzey alanı 70-80 m² den (36); 100 m² ye (37) bazı kaynaklarda ise 140 m² ye kadar (38) bildirilmektedir.

Bronş epitel hücreleri kübik ya da sütunsal şekil gösterip; temel olarak silli hücreler ve Clara hücrelerinden oluşmaktadır. Bu hücreler yalancı çizgili epitel oluşturur ve hücreler arası boşluklar içinden geçişi kısıtlayan sıkı bağlantı (tight junction) noktalarına sahiptir. Sıkı bağlantı noktaları, protein ve epitelde apikal hücre yüzeyine yakın morfolojik ve fonksiyonel sınırı oluşturan lipidden ibarettir. Protein ile lipid, hücrelerarası boşluğun en dıştaki kenarında geniş bir yer kaplamakta ve hücrelerarası bölge boyunca seçici difüzyonu yönetmektedir. Solunum yolu epiteli ve *in vitro* olarak epitele model oluşturan birçok hücre kültürü sistemleri apikal membranlarında sıkı bağlantılara sahiptir (40).

Alveol bölgesi dört hücre tipinden oluşmaktadır: tip I ve II epitel hücreleri, alveol süpürücü hücreleri (tip III) ve mobil alveolar makrofajlar (41). Ortalama 0,26 µm lik bir hücre kalınlığı ile skuamöz tip I hücreler alveol yüzey alanının yaklaşık % 93-97 sini kaplamaktadır (42, 43) ve bu özellik bu tip hücreleri ilaç absorpsiyonu için üstün kılmaktadır. Kalan alveol yüzeyi, tip I hücrelerden daha küçük olan ve yüzey etkin maddeler salgılayan çeşitli küboidal tip II hücrelerle örtülüdür (44).

Fagositik alveolar makrofajlar, alveol yüzeyi üzerinde oturmakta ve inhale edilen bakteri ve partiküllere karşı savunmada çok büyük önem taşımaktadır. Alveolar makrofajların birkaç saat içinde meydana getirdikleri fagositozda, makrofajlar mukosilyer taşıyıcı ile alveollerden bronşiyollere doğru uzaklaştırma işlemini gerçekleştirmektedirler (45).

Epitel tarafından salgılanan mukus tabakasının jel benzeri yapısı, matriksteki kısıtlı difüzyon nedeniyle yüksek lipofilik ilaçlar ve peptidler için ilk bariyer niteliğindedir. Hücre yüzeyi glikokaliks, mukozal membran, sitoplazmik katılımlar ve serözal membran, hücre içi (transselüler: hücrenin bir tarafından diğer tarafına)

absorpsiyon için bir takım bariyer oluşturmaktadır. Sıkı bağlantı bölgeleri ise hücreler arası (paraselüler) absorpsiyonu düzenlemektedir.

2. Akciğerin Fonksiyonları

2.1.Mukosilyer Temizleme

Mukosilyer temizleme, akciğerdeki spesifik olmayan ana ev sahibi mekanizmadır. Mukus bezleri ve goblet hücreleri, silli epiteli örten iki tabakalı mukus battaniyesini oluşturdukları solunum yüzeyine mukus salgılamaktadır (46). Çözünmeyen partiküller jel tabakasında yakalanmakta ve farekse doğru taşınmaktadır (47). Fazlar arasındaki fosfolipid tabaka, hareketi kolaylaştırarak yüzey gerilimini azaltmaktadır (48). Mukus tabakasının kalınlığı havayolu boyunca değişmektedir; trakeada 8 µm, bronşiyollerde 2 µm kalınlığındadır (46). Mukus; su (%95), glikoprotein (musin) (%2), protein (%1), inorganik tuzlar (%1) ve lipidlerden (%1) meydana gelmektedir (48). Su içeriğinin kontrolü mukusun optimum viskoelastik özelliklerinin sürdürülmesi açısından önemlidir.

İnhalasyondan sonra, toz, mikroorganizmalar, allerjen maddeler, karsinojenler ve hücresel döküntü gibi hava kaynaklı kontaminantlar solunum yolu mukusu içinde tutulmaktadır. Daha sonra bu maddeler farekse doğru hareket halindeki birlikte çalışan bronşiyal silia tarafından mukus içine sevkedilmekte ve mukusun yutulduğu veya dışarı atıldığı yerde akciğerlerden dışarıya sürüklenmektedir. Genç sağlıklı bireylerde trakea mukosilyer temizleme hızının partikül bırakılma bölgesine bağlı olarak 0-6 saat arasında değiştiği bildirilmiştir (45). Mukusun hareketinin küçük havayollarına nazaran trakeada daha hızlı olduğu göz önünde bulundurulmalıdır (47). Mukosilyer düzeneğin ötesinde alveol bölgesinde biriken partiküllerin bu bölgede daha uzun süre kalma potansiyelleri, havayolları ile mukayese edildiğinde ilaç hedeflendirilmesi için akciğer periferini daha cazip bir bölge haline getiren önemli bir özelliktir.

2.2.Metabolik Aktivite

Akciğerler, ilk geçiş metabolizması ile sonuçlanan solunum yollarına uygulanan bileşikler metabolize etme potansiyeline sahiptir. Akciğer altmıştan fazla farklı hücre tipinden meydana geldiğinden (49), her bir hücre tipinin ilaç metabolizasyon karakterizasyonu kapsamlı bir konudur. Clara ve alveol tip II hücreler toplam akciğer hücre popülasyonunun %10 undan daha azını içermektedir (50). Akciğerdeki pek çok

diğer hücre tipi sitokrom P-450 içermez ve sonuç olarak akciğerde protein başına düşen P-450 miktarı, ekspresyonunun daha yaygın olduğu karaciğere kıyasla daha düşüktür. Sonuçta, karaciğer ve ince bağırsakla mukayese edildiğinde, akciğer ilaç metabolizmasında çok küçük bir role sahiptir (51).

Tüm kardiyak içerik akciğerlere perfüze olmakta ve toplam kan hacminin % 10-20 si pulmoner dolaşımında kalmaktadır. Karaciğer kardiyak içeriğın sadece % 25 ini almaktadır ve karaciğerde doku ağırlığına göre normalize edilen kan akışı akciğerdekenden 10 kat daha azdır. (50). Sonuç olarak, akciğerler tarafından temizlenen bazı ksenobiyotiklerin miktarı, akciğerlerin düşük enzim içeriğine rağmen karaciğerdekileri geçmektedir (52). Yabancı maddelerin pulmoner metabolizmasını belirleyen diğer bir faktör akciğerin değişik hücresel kompartmanlarına dağılımları ve oradaki enzim sistemlerine girişleridir. Havayolları veya pulmoner dolaşım ile akciğerlere giren pek çok ksenobiyotiğin hücresel ve althücresele dağılımı kapsamlı olarak çalışılmamıştır. Ancak, enzim sistemlerine girişin ksenobiyotik metabolizmasının hız belirleyici faktörü olduğu olasıdır (50).

Genellikle, akciğerin pek çok diğer organdan daha düşük bir proteolitik aktiviteye sahip olduğu düşünölmektedir (53). Bu enzimlerin büyük bir kısmı membrana bağlıdır (54). Proteazların, epiteli örten sıvıya hücresele salımı fagositik pulmoner ev sahibi savunma cevapları sırasında meydana gelmektedir; ancak bu salım hücre yaralanması veya ölümlü tarafından da tetiklenebilmektedir (41). Akciğer dokusununa zarar vermemek için, proteaz aktivitesi antiproteaz (örneğin α_1 -antitripsin, α_1 -antikimotripsin gibi) salımı ile dengelenmektedir (41).

3. Pulmoner Yolla İlaç Uygulanması

Farmakolojik etken maddelerin akciğere uygulanmasının faydaları, Gansslen'in 1925 te nebulize edilmiş insulin çözeltisini pulmoner yolla uygulamasından beri bilinmektedir (55). Son yıllarda, pulmoner uygulama ile solunum sistemi hastalıklarının, özellikle de astım, kronik obstruktif akciğer hastalığı (KOAH), sistik fibroz, pulmoner enfeksiyonların tedavisi güncel hale gelmiştir.

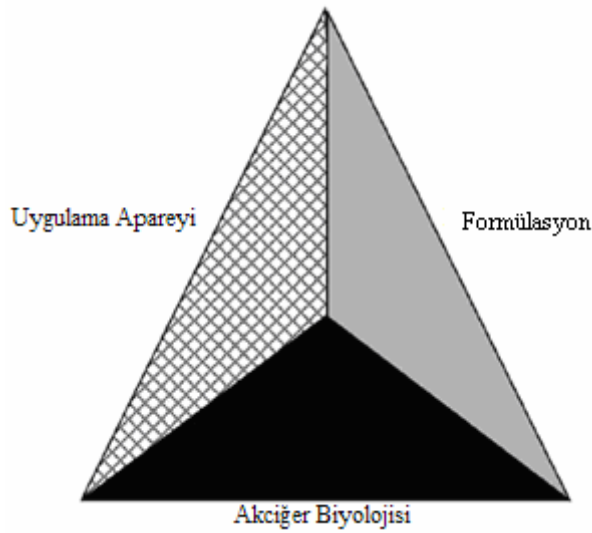
Bugüne kadar ilaçların oral yolla uygulanması, farmasötik etkin maddenin etki bölgesine ulaştırılmasında en çok tercih edilen yoldur. Ancak etkin maddenin, bazı kısıtlayıcı fizikokimyasal ve farmakolojik özelliklerinden ötürü oral yol her zaman ilk

seçenek olmamaktadır. Bu durumda, alternatif ilaç uygulama yolları araştırılmaktadır. Bunlardan biri akciğerlerden inhalasyonla ilaç uygulanmasıdır. Pulmoner yolla ilaç uygulanmasının en büyük avantajları hızlı etki başlangıcı ve ilk geçiş etkisinin görülmeşiştir. Akciğer hastalıklarının lokal tedavisinde sıklıkla kullanılan aerosoller genellikle bronkodilatör veya glukokortikoid içermekte ve obstruktif havayolu ve inflamatuvar hastalıkların tedavisinde direkt olarak akciğerlere uygulanmaktadır. İlacın direkt olarak etki bölgesine gönderilmesi yan etkilerin azalmasını ve derhal ilaç etkisinin görülmesini sağlamaktadır. Yeni uygulama apareylerinin teknolojisindeki gelişmeler derin akciğer bölgelerine inhalasyonu mümkün kılmaktadır. Özellikle peptid, protein gibi zayıf oral absorpsiyona sahip ilaçlar için pulmoner uygulama, sistemik dolaşıma ulaşan umut vaat edici alternatif bir yol niteliğindedir. Akciğer hücre kültürü modellerinin yeni ilaç formülasyonlarının geliştirilme sürecini kısaltması beklenmektedir. Klinik öncesi aşamada, maliyeti yüksek ve zaman alan hayvan çalışmaları yerine kullanılabilir. Hücre kültürlerinin kullanıldığı *in vitro* deney sonuçlarından elde edilen absorpsiyon mekanizmaları hakkındaki bilgi, daha iyi yönetilebilen ve daha düşük maliyetli klinik çalışmaya imkan vermekte ve yeni etkin maddelerin güvenliği konusunda muhakeme şansı vermektedir.

Lokal terapötik aktivite için ilaçların yüksek konsantrasyonda akciğerlere hedeflendirilmesine ait avantajlar arasında hızlı ilaç etki başlangıcının sağlanması, düşük sistemik etkiye maruz kalınması ve ilk geçiş metabolizmasından kaçınılması yer almaktadır (56). Akciğerler, yüksek oranda damarlanmış solunum mukozası, geniş absorpsiyon yüzey alanı, ince hava-kan bariyeri ve düşük enzimatik aktivite gibi ilaç absorpsiyonunu arttıracak avantajlara sahiptir. Akciğerlere ilaç salımı, gastrointestinal absorpsiyona etki eden beslenme komplikasyonlarından, sindirim enzimlerinden ve hastalar arası metabolik farklılıklarından bağımsızdır (57). Dalby ve ark. (58), inhalasyonla sistemik olarak salınan ilaçların oral yolla salınan terapötiklere göre çok az istenmeyen yan etki taşıdıklarını bildirmişlerdir.

Tüm avantajlarına rağmen, sistemik terapötik aktivite için ticari olarak akciğerlere ilaç uygulaması oral yolla ilaç salımı kadar yaygın değildir. Bu durum yüksek olasılıkla, oral yolla salınan terapötiklere olan yüksek hasta uyuncu ve bu konuda endüstrinin yıllardır süregelen yerleşmiş aktivitesidir.

Pulmoner yolla ilaç salımına olan ilginin artmasına neden olan faktörler konvansiyonel oral yolla salımları problemlili olan terapötik peptid ve proteinlerin sayısının artışı, akciğerden absorpsiyon hızının farmakokinetik profilleri daha istenene yakın hale getireceğinin tespit edilmesi ve akciğer hastalıkları için ilaçların solunum sistemine hedeflendirilmesine olan ilginin yükselmesidir. Farmasötik teknolojideki ilerlemeler, farmasötiksel açıdan problemlili molekül salımını inhalasyon suretiyle mümkün kılmaktadır. Ancak güvenli ve etkin ilaçların akciğer aracılığıyla uygulanmasına yönelik gelişmeler uygulama aleti ve formülasyonun optimizasyonunun yanında solunum yoluyla uygulanan biyofarmasötiklerin ve inhale edilen ilaçların akciğerlerle etkileşiminin de incelenmesini gerektirmektedir (Şekil 2).



Şekil 2 Akciğerlere ilaç salımında uygulama apareyi, formülasyon ve akciğer biyolojisi arasındaki ilişkinin şematik gösterimi

İlaçların akciğere salım teknolojisinin gelişmesine rağmen inhale edilen ilaçların akciğerlerle etkileşimi halen derinlemesine araştırma gerektiren bir konu niteliğindedir. Dolayısıyla, salım stratejilerini değerlendirme ve optimize etmeye yönelik yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Son yıllarda araştırmalar, genellikle terapötik peptidlerin (59), proteinlerin (59, 60), oligonükleotidlerin (61) ve aşuların (62-64) inhalasyonlarına yönelmiştir. Bu maddeler, farmakolojik açıdan aktif olmalarına rağmen, yüksek molekül ağırlıkları ve hidrofilik yapıları nedeniyle zayıf metabolik stabilite ve membran permeabilitesi başta olmak üzere oral ilaç uygulaması için uygun olmayan özellikler gösterirler. Dolayısıyla,

akciğerlere ilaç uygulaması, zayıf absorbe olan ilaçların sistemik absorpsiyonu için alternatif bir yol olarak önemli bir potansiyele sahiptir.

Akciğerlere optimum ilaç salımı, inhaler aparey, ilaç-formülasyon özellikleri, inhaler manevrası ve hasta patolojisi arasındaki karşılıklı dayanışmaya bağlıdır (36, 65). Klinik tedavide farmasötik aerosoller vasıtasıyla pulmoner ilaç uygulaması için günümüzde mevcut aletler nebulizörler, basınçlı ölçülü doz inhalerler ve kuru toz inhalerlerdir. Yeni inhalasyon aletlerini ve direk olarak uygulanabilecek formülasyonları geliştirme çalışmaları sürmektedir.

Akciğere ilaç salımıyla ilgili son çalışmalar, inhale edilen ilaçların organizmadaki kaderini ve ilaç ve formülasyonun akciğerlerle etkileşimini değerlendirmek üzere akciğerde ilaç bağlanma (binding), alım (uptake), geçiş (transport) (absorpsiyon hızını, mekanizmasını ve derecesini) ve metabolizmasını ölçen *in vitro* yöntemlere duyulan ihtiyacı arttırmaktadır. Hayvan kullanılarak yapılan deneysel çalışmalarla ilgili kısıtlamalar insan solunum epitel hücre kültürlerinin kullanımını desteklemektedir. Epitel hücre kültürlerinin, ilaç salımı araştırma-geliştirme çalışmalarındaki kullanımları kabul görmüştür (66).

İnhale edilen maddelerin kaderini değerlendirmek üzere hayvan ve hayvan dokularının kullanımına olan geleneksel güven azalmaktadır (43). 1959 da Russell ve Burch, İnsan Deneysel Tekniğin Prensipleri ni yayınlamışlardır. Önerilerine göre hayvanların deneylerde kullanılması halinde bu hayvanların daha az sezgili alternatifleriyle değiştirilmesi (**Replace**), kullanılan hayvan sayısının minimuma indirilmesi (**Reduce**), hayvanların kullanıldığı deneylerin rötuşlanması (**Refine**) gerekliliğini savunmuşlardır. Bu rehber prensipler hayvan araştırmalarının 3 R' si olarak belirlenmesine rağmen yeterli dikkat gösterilmemektedir.

Hücre kültürü metodlarının farmasötik endüstri tarafından kabulü, hayvanların kullanıldığı *in vivo* testlere kıyasla tahmin etme yetkinliği ile hızlı ve daha fazla sonuç çıkarması gibi avantajları sayesinde kolaylaşmıştır (67). Her geçen gün artan yeni etkin maddelerin (new chemical entity) hızlı ve etkin değerlendirme yöntemlerine olan ihtiyaç artmaktadır. Biyofarmasötik sınıflandırma sisteminin (BCS: Biopharmaceutics Classification System), Gıda ve Sağlık Daire Başkanlığı (FDA) rehberlerine girişi, hücre kültürü sistemleriyle permeabilite ölçümüne göre sınıflandırma yapılması açısından hücre kültürü sistemlerinin kullanımıyla ilgili yeni bir adımdır.

Özellikle Calu-3 ve 16HBE14o- olmak üzere iki havayolu hücre tipi ve primer insan alveolar tip-I hücreleri (hAEpC) önem kazanmıştır. Bu *in vitro* modeller doğal akciğer epiteliyle mukayese edilebilir permeabilite özelliklerine sahiptir. İlaç permeabilite çalışmaları için uygun olmayan insan alveol epitel hücre dizini A549 ise yüksek permeabiliteye sahiptir.

4. Pulmoner Hücre Kültürü Modelleri

Epitel biyolojik bariyerlerin taklit edilmesi için üç ana *in vitro* yaklaşım mevcuttur. Daha kompleks olandan daha az kompleks yapıda olana doğru sıralamak gerekirse bu yaklaşımlar, izole perfüze organlar, doku kültürleri ve hücre kültürü modelleridir Bunların arasından hücre kültürü modelleri, belli bir yaşam evresine sahip primer kültürlerden ve ölümsüz stabil hücre dizinlerinden ibarettir.

İzole perfüze organlar (ex vivo modeller gibi)

Genellikle birkaç saat gibi belli bir yaşam süresine sahiptirler. *In vivo* durumu çok yakın olarak taklit etmekte; fakat yüksek derecede kompleks oluşları nedeniyle sorun yaratabilmektedirler. Ayrıca, hayvan ve doku modellerinden elde edilen sonuçların yorumlanması, türler arası değişkenlik, akciğere kesin olmayan ilaç salımı, hazırlanan formülasyonun yaşayabilirliği ile ilgili konular gibi nedenlerle kompleks bir hal alabilmektedir. Sonuç olarak da, kompleks izole perfüze organ modelleri *in vivo* çalışmalarda görülen deney dizaynlarına benzemekte ve avantajını yitirmektedir. Bununla birlikte, sıçan, koyun ve domuz izole perfüze akciğerler yüzey etkin madde salgılanması, permeabilite ölçümleri veya gen transfer metodlarının geliştirilmesi gibi değişik amaçlar için kullanılmaktadır (68-70). İzole perfüze organlar, organizma dışında canlı tutulan organ kültürlerinden farklıdır.

İzole perfüze organlardan daha az komplike bir model oluşturmak üzere, bazen hazırlanan epitel uygun bir *in vitro* ortama yerleştirilmektedir. Kolaylıkla bağırsak ya da deri dokusunda hazırlanabilir, ancak süngerimsi yapısı nedeniyle akciğerlerde benzer bir işlem gerçekleştirmek güçtür. Hem izole perfüze organlar hem de izole dokular sınırlı bir ömre sahip olduğundan, “yeniden yapılandırılmış epitel” (reconstructed epithelia) adı altında yapay epitel hazırlama yoluna gidilmiştir.

Primer hücreler

Primer hücreler belirli zaman aralıklarında taze olarak izole edildiklerinden ve her seferinde farklı bir canlı soyundan alındıklarından kültürde bekletildikleri sürece birbirlerinden tanımsal olarak ayrılmışlardır. Primer hücreler, normal insan havayolu dokusunun az bulunuşu, izolasyon verimi olarak isimlendirilen elde edilen hücre sayısının kısıtlı oluşu ve verici (donor) değişkenliği gibi bazı ana sınırlamalarla yüz yüzedir.

Karsinoma hücre dizinleri

Çeşitli akciğer tümörlerinden elde edilmektedir ve primer kültüre olan üstünlükleri hücre kültürünün hazırlanmasının kolaylığı ile hücre tiplerinin saflığıdır. Ancak tekrar üreyebilirlik anlamında, kritik pasaj sayılarının dikkate alınması gereklidir. Bir hücre dizininin genellikle kullanılabilirliğinin sürdürülüşü ve bakımı gayet kolaydır; primer kültürlerde karşılaşılan az çoğalabilirlik ya da yüksek maliyet gibi problemleri doğurmaz (71). Pulmoner konulu araştırmalar için hücre dizinleri ATCC (The American Type Culture Collection) den temin edilebilmektedir (72).

1990 yılında insan adenokarsinoma hücre dizini Caco-2 intestinal geçişle ilgili mekanik çalışmalar için deneysel bir model olarak sunulmuştur (73, 74). Bir yıl sonra, Caco-2 modelinin, intestinal ilaç permeabilitesinin görüntülenmesi ve potansiyel yeni ilaç maddelerinin oral absorpsiyonlarının tahmin edilmesi için uygun olduğu bildirilmiştir (75).

Caco-2 hücreleri, insan kolorektal karsinoma kaynaklı oldukları halde (76-78) pek çok bakımdan insan ince bağırsak epiteline fonksiyonel benzerlikler göstermektedir (79-81). Ancak Caco-2 hücrelerinde hücreler arası (paraselüler) yol *in vivo* ince bağırsaktakinden daha sıkı olması nedeniyle araştırmalardaki kullanımları kısıtlıdır (82). Caco-2 oral yolla uygulanan bileşiklerin absorpsiyon karşılaştırmaları için kullanılırken, pulmoner absorpsiyonun değerlendirilmesinde uygun olmadığı düşünülmektedir (83, 84).

Geçmişte, intestinal absorpsiyonu modellemede kullanılmış Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) gibi spesifik epitel modeller, insan oral biyoyararlanımıyla korelasyon göstermiştir; ancak karşılaştırma amacıyla kullanımları kısıtlıdır (85). Epitel ile ilgili spesifik işlemler hakkındaki kısıtlı bilginin ışığı altında, detaylı ilaç

absorpsiyon ve hedefleme araştırmalarında epitel-spesifik insan hücre kültürü modellerinin kullanımı desteklenmektedir (86).

İlaç uygulama yolu olarak düşünölen yola benzer permeabilite bariyer özellikleri gösteren, iyi karakterize edilmiş bir epiteli temsil etmesi durumunda, bu modeller formölasyon geliştirmenin daha ileriki aşamaları için uygun olmayan bileşiklerin elimine edilmesi için kullanılabilir.

Akciğerlerden elde edilen hücre kültürü modelleri *in vivo* modellere bazı üstönlükler göstermektedirler. Bu modeller, *in vivo* koşulda mevcut mukosilyer geçiş ve fagositoz gibi komplike temizleme mekanizmalarına sahip değildir. Spesifik geçiş mekanizmaları olan pasif hücre içi (transselöler) ve hücreler arası (paraselöler) geçiş hakkında bilgi *in vitro* modeller ile daha kolaylıkla edinilmektedir. Solunum yolu epitelinin hücre kültürü modelinin, ilacın tutulması ve akciğerden temizlenmesinin araştırılması için çok uygun olduğu şüphesizdir. Bu modeller, solunum yolu epitel hücreleri boyunca hızlı ve tekrar edilebilir absorpsiyon çalışmalarının yapılmasına olanak vermektedir. Pulmoner araştırmalar, solunum yolu ve alveolar epitelin pulmoner ilaç absorpsiyonu için temel bariyer niteliğinde olduğunu göstermişlerdir (87, 88). İlaç geçişi, ilaç metabolizması ve gen salım çalışmalarında kullanılan en umut vaat edici insan havayolu hücre dizinleri (cell line) 16HBE14o-, Calu-3 ve BEAS-2B'dir (86). Hücre kültürü modelleri aktif transport mekanizmalarını incelemek üzere de kullanılmaktadır. Daha güncel araştırmalar ise ilaç taşıyıcıları, ilaç metabolizması, ilaç geçişi ve pasif-aktif transport mekanizmalarının ilacın tüm geçişi üzerine olan relatif katkısı üzerinedir.

Alveol epitel hücre kültürü

Alveol epitel hücre kültürleri normal insan akciğerinden elde edilen alveol tip II hücrelerinden hazırlanmaktadır (89). Bu hücre dizininin, sıkı bağlantı proteinlerini üretmediği ve dolayısıyla sıkı bağlantı noktalarına sahip olmadığı bilinmektedir. Primer tip II hücre kültürlerinin önemli bir özelliği tip I hücre benzeri morfolojiye sahip hücre tabakalarına dönüşme durumlarıdır. Günümüzde, araştırmalar için en uygun alveol epitel hücre kültürü modeli A549'dur.

Alveol tip II hücreleri (ATII), yaklaşık olarak % 60 alveol epitel hücrelerden ve % 15 tüm akciğer parenkimal hücrelerden ibarettir; diğer yandan insan akciğerinin

alveol hava boşluklarının % 5 inden azını örtmektedir (90). ATII hücreleri yerini alma mekanizması olarak alveol tip I (ATI) hücrelerine farklılaşmayı da içeren alveolar homeostazda önemli ve çok fonksiyonlu role sahiptir (91). ATI hücrelerinin varsayılan fonksiyonları akciğer hücrelerinin çoğalmasının kontrolü, peptid / peptid büyüme faktörlerinin metabolizma ve/veya parçalanması, sitokinlerin oluşumu, alveol sıvı dengesinin, hücre içi iyon ve su geçişinin düzenlenmesidir.

İnsan alveol epitel hücreleri A549, ATII hücrelerinin fizyolojisi çalışmalarında ve pulmoner uygulanan maddelerin permeabilite ölçümlerinde kullanılmaktadır (92, 93). Ancak, bu hücre grubunun fonksiyonel sıkı bağlantı noktalarına sahip olmayışı ilaç absorpsiyon çalışmalarındaki kullanımını sınırlandırmaktadır. Primer kültürde pnömositlerin tek tabakalarında alveolar geçiş çalışmaları uygulanmıştır (94). İnsan alveolar hücre kültürü modelleri akciğer çıkarım (rezeksiyon) operasyonu geçiren hastalardan temin edilmektedir. Kısaca, doku kesilmekte ve devamında tripsin ve elastaz kombinasyonu kullanılarak özümlemektedir. Daha sonra ATI II hücre popülasyonu hücre yapıştırılması, santrifüj ve magnetik hücre ayrılması (sorting) işlemleri ile saflaştırılmaktadır. ATI II hücreleri polistirel membranlarda üretildiğinde, ekimi takip eden 6-8 gün içerisinde $\sim 2500 \Omega \text{ cm}^2$ TER değerine sahip ATI benzeri hAEpC tek tabakalarını oluşturmaktadır.

ATI II ve ATI I hücre fenotiplerini birbirinden ayırmaya yönelik çeşitli yaklaşımlarda bulunulmuştur. Bunlar arasında, basit morfolojik karakterizasyon (tabakasal yapılar, küboidal şekil gibi), Papanicolaou boyaması, hücreye spesifik lektin ve aquaporin-5 (95), caveolin-1 gibi immunohistokimyasal/immunositokimyasal işaretleyicilerin kullanımı yer almaktadır.

Domuz akciğer epitel hücre primer kültürü (pAEpC), sıçan ve insan gibi mevcut diğer tür hücre kültürlerine alternatif niteliktedir (96, 97). Filtre tabakalar üzerine ekilen domuz (porcine) alveol epitel hücrelerin, alveol epitel bariyer karşısında ilaç geçişinin değerlendirildiği çalışmalarında kullanılabileceği ve pulmoner ilaç absorpsiyonu ve salım çalışmaları için uygun bir *in vitro* model olarak kabul edilebileceği bildirilmiştir. Literatürde, pAEpC'den ilaç geçiş çalışmaları için geçiş vasatı olarak hidrokortizonla desteklenmiş küçük havayolu bazal vasatı ve maksimum çözücü konsantrasyonu olarak % 1,5 dimetilsulfoksit uygun koşullar olarak tespit edildiği kayıtlıdır (98). pAEpC modeli kullanılarak yapılan ilaç absorpsiyon çalışmalarında tek tabaka bütünlüğünü

sağlamak üzere minimum kabul kriteri $600 \Omega.cm^2$ transepitel elektriksel direnç (TER) ve bu dirence bağlı temin edilen sabit hidrofilitik işaretleyici (sodyum floressein) geçişidir.

BEAS-2B

BEAS-2B hücre dizini, 12-simian 40 hibrid adenovirüs kullanılarak ölümsüzlük özelliği kazandırılmış normal insan epitel hücrelerinden elde edilmiştir (99). Bu hücreler fenotipleme ve sitokin regülasyonu (100, 101), glukokortikoid reseptörlerinin düzenlenmesi (102) ve tütün içimi (103), partiküller (104) ve hiperoksi (105, 106) gibi istenmeyen durumlara vücudun verdiği cevabı içeren bir dizi havayolu epitel hücre yapısı ve fonksiyonu çalışmalarında popülerdir. Ayrıca ilaç metabolize edici enzimlerin ekspresyon ve aktivitesini çalışmak üzere de kullanılmaktadırlar (107, 108). Ancak, orta bir pasaj sayısına sahip kültürdeki BEAS-2B'nin düşük bir transepitel elektrik direnci (TER) ($< 150 \Omega.cm^2$) gösterdiği bildirilmiş (109) ve benzer düşük TER değerleri başka araştırmacılar tarafından da gözlenmiştir (110). Bu durum, BEAS-2B hücrelerinin sıkı bağlantı oluşumu ile ilgili eksiklik taşıdığını ve ilaç geçiş çalışmaları için uygun olmadıklarını akla getirmektedir.

Calu-3

Calu-3 adenokarsinoma epitel hücre dizini, 25 yaşındaki Kafkasyalı bir erkeğin proksimal bronş havayollarından elde edilmiş seröz kaynaklı bir hücre kültürü modelidir. Doygun (confluent) silli ve salgısal kültür karışımı oluşturmaktadır (111). Primer kültürler ve SV40-transforme hücre dizinleri ile ilgili problemleri ortadan kaldırmaya yönelik bir çalışmada, Finkbeiner ve ark. (112) akciğer karsinomalarından elde edilen bir grup hücre dizinini görüntülemişler ve Calu-3 ün sistik fibrozis transmembran iletkenlik regülatörünü (CFTR: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) taşıdığını bulmuşlardır. Calu-3 hücre dizini, farklılaşmış, polarize, hava-sıvı arayüzey kültür koşulları altında apikal mikrovili oluşturan bir hücre kültür modelidir (15, 113). Calu-3 en çok kullanılan solunum yolu ile uygulanan ilaç absorpsiyon modelidir (65) ve ilaç geçiş çalışmaları (114, 115), (116), iyon geçiş çalışmaları (117) ve geçiş mekanizmasının incelenmesine yönelik çalışmalar (116-120) için de uygun adledilmektedir. Kùltürler, yüksek transepitel elektrik direnci (TER) $> 1000 \Omega.cm^2$ ve paraselüler geçiş işaretleyicilerine düşük permeabilite ile kendini gösteren bariyer özelliklerini sunmak üzere farklılaşan silli ve salgısal hücrelerin karışık

bir fenotipinden oluşmaktadır (114, 117, 121). Fonksiyonel anlamda, Calu-3 hücreleri polarize musin salgılama da dahil olmak üzere birçok bakımdan doğal havayolu epiteline benzemektedir (122).

16HBE14o-

16HBE14o- hücreleri, 1 yaşındaki kalp-akciğer transplant hastasından transforme edilmiş bronş epitel hücreleri olup farklılaşmış epitel morfolojisine ve fonksiyonlara sahiptir (123). Hücreler, ikinci kulak bronş, yüzey epitelinin ana akışından elde edilmişlerdir (123). 16HBE14o- hücre dizini havayolu epitel modeli olarak uygun bir aday olarak tanımlanmaktadır (86). Çünkü, bu hücre dizini sıkı bağlantıları oluşturması, iyon taşınmasını düzenlemesi ve apikal mikrovililere sahip olması bakımından *in vivo* da mevcut pek çok anahtar özelliği taşımaktadır (123).

Kültürde, hücreler farklılaşmış ve polarize olmuş epitel morfolojisini sürdürmektedir. Bu hücre kültürünün yeni geliştirilmiş olmasına bağlı olarak, Caco-2 de olduğu gibi bir ölçüde ilaç geçiş karakterizasyonu hakkında bilgiye sahip olmak için daha fazla sayıda çalışmanın yapılması gerekmektedir. 16HBE14o- hücre dizini, inflamasyon (124-126), infeksiyon (127), sitokin ekspresyonu (128), ilaç geçişi (129) ve gen salımı (130, 131) gibi çeşitli fizyolojik ve patolojik işlemlerde kendisini tercih edilir kılan çok iyi korunmuş bir fenotipe sahiptir. Bu birkaç örnek ilaç salım çalışmaları için 16HBE14o- hücre modelinin kullanımı için yüksek bir potansiyel taşıdığını ileri sürmektedir. 6 yıl önce dikkat çekilmiş olmasına rağmen, halen 16HBE14o- nun biyofarmasötik amaçla kullanımı için sınırlı sayıda çalışma mevcuttur (18, 86, 132, 133).

Standart koşullar altında hücre kültürü modeli, çok geniş bir yelpazedeki yeni ilaç adaylarının ilaç transport karakteristiklerini incelemek için pahalı olmayan ve tekrar edilebilir sonuçlar veren bir araçtır. Bu özellikler yüksek kalitede görüntülemeye büyük önem taşımaktadır. Kimyadaki gelişmeler ilaç keşfini kökten değiştirmiş ve böylece biyofarmasötik özelliklerinin açığa çıkartılması için bekleyen yüksek sayıda potansiyel ilaç maddesi adayı ortaya çıkmıştır. Maliyet avantajlarına rağmen, her zaman dikkate alınması gereken nokta hücre kültürü modellerinin mevcut *in vivo* özellikleri aynen taşınması gerektiğidir. Ancak, çalışmanın amacına ve kullanılan tekniğin sınırlarına cevap verdiği sürece *in vitro* hücre kültürü modelleri çok büyük avantajlar sunan bir çalışma aracıdır.

Bu hücre gruplarının kültür edilme yöntemleri özelliklerine önemli ölçüde yansımaktadır. Hava-sıvı arayüzey (air-liquid interface culture) veya hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılmış (submerged culture) halde kültür edilmeleri, gösterdikleri transepitel elektrik direnci (TER) ve yaygın işaretleyiciler olan mannitol ve floressein permeabilitesine etki etmektedir. Calu-3 hücreleri tarafından mukus üretimi; Calu-3 ve 16HBE14o- hücrelerinin çalışma besiyeri değişimine karşı olan dirençleri sıvı altında kültür koşullarında azalabilmektedir (134).

Hücre özelliklerine etki eden diğer faktörler arasında hücrelerin pasaj sayısı, kültür edildikleri yüzey, hücre ekim yoğunluğu, hücre kültür çalışma besiyeri bileşimi ve kültürdeki destek maddeler ile zamandır. Kültür yüzeyinin kaplanması primer kültür havayolu hücrelerinin permeabilitesine etki edebilmektedir. Öte yandan, standart fetal buzağı / sığır serumu ve esansiyel olmayan aminoasitler kullanıldığında Calu-3 ve 16HBE14o- hücreleri filtre kaplama olmaksızın dahi uygun permeabilite bariyeri oluşturabilmektedirler. Her iki tip hücre grubu yaklaşık 10^5 hücre/mL yoğunluğunda ekilmektedir; daha düşük ya da daha yüksek yoğunlukta ekilmeleri, kültürde devamlı bir yapı ve maksimum permeabilite bariyerine daha önce ya da daha sonra bir zamanda oluşturmaları şeklinde etki etmektedir (14, 135).

5. *In Vitro* Hücre Kültürü Çalışmaları

5.1. Hücre Kültür Tipleri

Birincil Hücre Kültürleri

Primer kültürler, normal hayvan dokusundan doğrudan elde edilir ve ayrı bir ortamda ek hücre süspansiyonuna ayrışana kadar enzimatik sindirime tabi tutulurlar. Bu tip kültürler heterojendir ve fibroblastlar tarafından etkinleştirilirler. Bu kültürlerin oluşturulması emek gerektirir ve kısıtlı zaman için sadece *in vitro* koşullarda saklanabilir. Bu elde edilen hücreler, *in vivo* ortamdaki hücrelerden farklı karakteristikler göstermektedirler.

Sürekli Hücre Kültürleri

Sürekli kültürler, hedef kültüre seri olarak dönüştürülen veya kısıtlı bölünme sayısına izin verilen, tek hücre tipinden oluşmuştur. Kısıtlı ömürlü hücre toplulukları diploiddir ve kısmen farklılaşmayı da barındırabilirler. Gerçekte bu tip hücre toplulukları, 30 veya daha fazla bölünme tekrarı sonrasında da, farklı ve uzun süre

saklanma yöntemlerini içeren bir sistem ile saklanmalıdır. Sürekli hücre toplulukları, spontan gelişim ile çoğalabilirler ve kontamine hücre yaratma ihtimalleri vardır. Değiştirilmiş hücreler sınırsız ulaşabilirliğe sahiptirler.

5.2.Hücre Kültür Koşulları

Hücre kültürü çalışmalarında, kültür koşulları hücre çoğalması ve farklılaşması üzerinde anlamlı etkiye sahiptir. Hava-sıvı arayüzeyinde (air-liquid interface) ya da hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılmış (submerged) kültür koşulları altındaki hücreler, kültür vasatı bileşimi, hücre ekim yoğunluğu, ekimin yapıldığı Transwell geçirgen hücre kültürü destek kabı kaplama materyali, kültürde geçen süre, pasaj sayısı ve epitel bariyerin her iki tarafındaki hücre vasatı hacmi gibi faktörlerden etkilenmektedir (71).

Hava-sıvı arayüzey kültür koşulu

In vivo havayolu epitel hücreleri direk olarak havaya maruz kaldıklarından, doğal ortamı taklit etmesi itibariyle hava-sıvı arayüzey koşulda kültür edilmiş epitel kültürler iyi farklılaşmış bir fenotip olarak değerlendirilmektedir (136-139). Yamaya ve ark. (136), kültür edilen insan trakea epitel hücrelerinin farklılaşma sürecinin hücrelerin yüzeyini kaplayan apikal sıvı derinliğiyle ters orantılı olduğunu bildirmişlerdir.

Hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılmış (submerged) kültür koşulu

Bronşiyal epitel hücre dizinlerinin hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılmış kültür koşulu altında kültürlenmesi *in vivo* epitel fizyolojik ortamıyla uyum sağlamasa da halen kullanılmaktadır. Ehrhardt ve ark. (71), hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılmış koşulda ve standart hacimler (500 μ L apikal – 1500 μ L bazolateral) ile 1 cm^2 12-kuyucuklu transwell hücre kültürü sistemlerinde ya da modifiye metotla (250 μ L apikal – 900 μ L bazolateral) çalışıldığında TER değerlerinde hiçbir istatistiksel farklılığa rastlanmadığını bildirmişlerdir. Modifiye koşullarda, 7-8 günde 500-800 $\Omega.\text{cm}^2$ TER değerine ulaşılırken; standart koşullarda büyüme gösteren hücrelerin 671 $\Omega.\text{cm}^2$ TER değerine ulaştığı saptanmıştır. Ancak, sıklıkla önerilen, birebir *in vivo* koşulları yansıtmadığından permeabilite çalışmalarında hava-sıvı ara yüzey koşullarının kültür ortamı olarak tercih edilmesidir. 16HBE14o- hücrelerinin kültür çalışma besiyeri daldırılmış (submerged) koşul altında kültür edildiği çalışmada elde edilen umut vaat

edici sonuçlara rağmen (71), hava-sıvı arayüzey kültür metodu en sıklıkla kullanılan protokoldür (40, 86, 121, 129, 135, 140, 141).

5.3.Hücre Kültürü Sistemleri ile Çalışma Protokolü

Hücre kültürü laboratuvar çalışmalarında, dikkat edilecek ilk husus hücre kültürü çalışmalarının güvenliğinin ve çalışanların sağlık güvencelerinin sağlanmasıdır. Bu bağlamda, laboratuvar tasarımı çok önemlidir. Yüzeyler, duvarlar, ışık durumu, aydınlatma, havalandırma, direnaj, atıklar, laboratuvar hijyeni gibi faktörler dikkat gerektiren hususlardır. Laboratuvar ortamına girecek her kişinin ara odada atılabilir (disposable) bone, galoş, özel mavi önlük, eldivenlerden oluşan kıyafetleri giymesi ve laboratuvar ara odasına geçmeden eldivenleri atması zorunludur. Kullanılan bazı mikroorganizmalar patojenik karakterde veya patojen potansiyelli olduklarından, organizmaların uygun aseptik tekniklerle nakledilmesi ve bir bulaşmaya yol açmadan kullanılması ve her inkübatör-steril kabin transportunda uygun sterilizasyon şartlarına uyulması zorunludur. Bankolar, steril kabinler ve tüm çalışma yüzeyleri her laboratuvar aktivitesinin öncesinde, sonrasında ve gereğinde de çalışma sırasında izopropil veya etil alkol (% 70 lik) ile dezenfekte edilmelidir. İstenmeyen çapraz bulaşmaya (kontaminasyonlara) sebep olmaktan kaçınmak üzere, her seferinde tek bir hücre kültürü ile işlem gerçekleştirilmelidir. Farklı hücre kültürleri ile takip eden çalışmalar yapılacaksa, yine bu tarz dezenfeksiyon yapıp 15 dakika kadar beklendikten sonra, diğer hücre kültürüyle çalışmaya geçilmesi tercih edilmelidir. Her bir hücre kültürü ile yürütülecek çalışmalar için mümkünse, farklı özelliklerdeki (renk vb.) laboratuvar düzenekleri kullanılmalıdır. Kullanım öncesi kültürlerin canlılık durumları kontrol edilmelidir. Bir kültür dökülmesi halinde, kültür sıvısının döküldüğü yerin üzerine izopropil veya etil alkolle (% 70 lik) silinmesi, kontamine kültürün dezenfektan tabletle muamelesinden sonra laboratuvar dışında yok edilmesi ve durumun uygulamayı yöneten sorumluya bildirilmesi, laboratuvara her giriş-çıkışta dezenfektanlı sabunla ellerin yıkama işleminin gerçekleştirilmesi, kullanılan laboratuvar malzemelerinin özel dezenfektanlı toplama kaplarında biriktirilmesi ve ayrılmış biyoatık taşıyıcılara atılması sağlanmalıdır. Çalışılan çözeltiler ve kültürler düzenli bir biçimde – tanımlayıcı bilgi (hücre kültürleri için gerekli bilgiler: hücre tipi, hücre pasaj numarası ve pasajlanma tarihi, çalışan kişinin adı) – ifade veya sembollerle, silinmeyen ve sabit işaretleyici (cam yazar) özel kalemlerle işaretlenmelidir. Ekimi (inokülasyonu) yapılan materyal

bekletmeden ilgili inkubatörün raflarına yerleştirmelidir. Çalışmalarda tek kullanımlık (disposable), ağzı pamuklu pipetler tercih edilmelidir.

Hücre kültürü çalışmalarında önemli bir faktör olan çalışma ortamını, kaliteli materyalin güvenli ve verimli bir şekilde üretilmesini sağlamak üzere tasarlamaktır. Mikrobiyolojik güvenlik kabini, kullanıcıyı aerosollerden koruyabilecek en önemli araçtır. Bu kabinlerde ürün ve kullanıcının korunumu HEPA filtreleri kullanılarak gerçekleştirilir. Sağlanan koruma, kullanılan kabinin güvenlik derecesine bağlıdır. Hücre kültürü çalışmaları için 2. sınıf kabinler uygundur. Santrifüjlerden ağzı kapalı modeller tercih edilir. Tüplerin aşırı doldurulmamasına ve dengeli yerleştirilmelerine özen gösterilmelidir. Hücre kültürleri, gelişimlerinde sıkı kontrol edilen ortamlar gerektirirler. Özel inkübatörler doğru koşulların oluşturulmasında kullanılır (sıcaklık, nem ve CO₂ düzeyi vb. gibi faktörler açısından). Genellikle hücre kültürü çalışmalarında, 37 °C’de ve % 5-10 seviyesinde CO₂ kullanılır. Bazı inkubatörlerde O₂ düzeyi de değiştirilebilir. Su ceketli inkübatörlerde su banyosu için kullanılan özel koruma sıvısı ile de bakteriyel gelişme önenebilir. Ayrıca inkübatör iç yüzeyleri, Barrycidal dezenfektan çözelti ve % 70 lik alkolle silinerek dezenfekte edilmektedir, dezefeksiyon işlemiyle birlikte su tepsilerindeki distile su değiştirilmelidir. Her tip hücre kültürü için, tüp pipet tek kullanımlık steril birim ambalajlı gereçler kullanılması önerilmektedir.

5.4.Hücre Kültür Ortamının Genel Özellikleri

Hücre kültürü besiyeri çalışma ortamında inorganik tuzların birçok görevi vardır, sodyum, kalsiyum ve potasyum iyonları ile hücrenin osmotik basıncını sağlarlar.

Çoğu hücreler 7,2 -7,4 pH aralığında gelişebilirler. Fibroblastlar daha yüksek pH ya, sürekli dönüşen hücreler ise, daha asidik ortama ihtiyaç duyarlar. Yeni kültür oluşturulması sırasında pH çok önemlidir ve iki ayrı sistem ile dengelenir. Bunlar; doğal tampon sistemi CO₂ gazı CO₃/HCO₃ ile dengelenir, yine HEPES adı verilen özel bir kimyasal tampon kullanılarak dengelenebilir. Doğal bikarbonat (HCO₃) CO₂ tampon sistemleri; CO₂ inkübatörde % 5-10 luk CO₂ atmosfer ile birlikte kullanılır. Bikarbonat-CO₂ maliyetsizdir ve hücreler için toksik değildir. HEPES ise, çok yüksek tampon kapasitesine sahip olmasına rağmen; 7,2 – 7,4 pH değerindedir ve yüksek konsantrasyonları toksik etki yapabilir. Bu tampon sisteminde, ayrıca gaz atmosfere gerek yoktur.

Karbohidratlardan açığa çıkan enerji genellikle şekerlerden meydana gelir. Ana şekerler glukoz ve galaktozdur, ancak besi ortamında maltoz ve fruktoz da bulunabilir. Yüksek şeker konsantrasyonu daha geniş aralıktaki hücre tiplerinin gelişmesine olanak verir (142, 143).

Serum, hücre kültüründe çok önemli bir vitamin kaynağıdır. Çoğu besi ortamı çeşitli besin öğeleriyle zenginleştirilir. B grubu vitaminleri, hücre gelişiminde çok önemlidir. Bazı besi ortamları, A ve E vitaminleri de gerektirebilirler.

Proteinler ve peptitlerden en yaygın olarak albümin ve transferrin fibronektin kullanılır.

Yağ asitleri ve lipitler de besi ortamına ilave edilen besi öğelerinden biridir. Kolesterol ve steroidler özelleşmiş hücreler için gerekli olabilmektedir.

Eser elementlerden çinko, bakır, selenyum ve trikarboksilik asit gibi maddeler besi ortamına ilave edilebilir. Her besi ortamı temel bileşenlerinden oluştuysa da zamanla kontamine olabilirler.

Serum albumin, gelişme faktörü ve gelişme inhibitörlerinin birleşimidir ve hücre kültür ortamında çok önemlidir. Başlıca serum tipleri; yeni doğmuş buzağı serumu (FBS: fetal bovine serum) ve at serumudur. Serumun kalitesi, tipi ve konsantrasyonu hücrelerin gelişmesini etkiler. Serum, kültürlerin tamponlanma kapasitesini artırır, yavaş gelişen hücreler için çok önemlidir. Hücrelerin mekanik yollarla hasar görmesini de engeller. Serum çok çeşitli hücre tipleri için de gelişme faktörü olarak kullanılır ve toksinlere bağlanarak toksik etkilerini nötralize edebilir. Serumun kullanımı ile ilgili olarak kontaminasyon riski de bulunmaktadır. Bu bakımdan kalitesi onaylanmış, sertifikalı serumların kullanılması güvenceyi arttırmaktadır.

Hücre kültürü çalışmalarında, kültür koşulları hücre çoğalması ve farklılaşması üzerinde anlamlı etkiye sahiptir. Hava-sıvı arayüzeyinde ya da hücre kültür çalışma besiyerine daldırılmış kültür koşulları altındaki hücreler, kültür vasatı bileşimi, hücre ekim yoğunluğu, Transwell geçirgen hücre kültürü destek membranı kaplama materyali, kültürde geçen süre, pasaj sayısı ve epitel bariyerin her iki tarafındaki hücre vasatı hacmi gibi faktörlerden etkilenmektedir (71).

Hava-sıvı arayüzey kültür koşulunda, *İn vivo* akciğer epitel hücreleri direk olarak havaya maruz kaldıklarından, doğal ortamı taklit etmesi itibarıyla hava-sıvı

arayüzey koşulda kültür edilmiş epitel kültürler iyi farklılaşmış bir fenotip olarak değerlendirilmektedir (136-141). Hava-sıvı arayüzey kültür koşulları altında, hücre kültürü çalışma besiyeri yaklaşık 15 µm derinlikte hücrelerin apikal yüzeyini örtmektedir .

5.5.Hücre Kültürlerinin Soğukta Koruma Tekniği ile Saklanması

Soğukta koruma ile hücre stokları oluşturulmakta ve gerektiği zaman, elde tüm hücre türlerine ait örneğin depolanabilmesi sağlanmaktadır. Soğukta korumanın (kriyoprezervasyon) başlıca avantajları mikrobiyal bulaşmanın (kontaminasyon) riskinin azaltılması, diğer hücre toplulukları ile çapraz bulaşma riskinin azaltılması, sabit geçiş sayısındaki hücreler ile çalışılmasıdır. Kültürler kriyoprotektanların bulunduğu ortamda, kontrollü dondurma uygulaması ile -196 °C ye kadar genellikle çok uzun sürelerde bekletilebilirler. Bu dondurucular sıvı veya buhar fazındaki azot ile çalışmaktadırlar.

5.6.In Vitro Hücre Gelişimi

Taze olarak hayvan ya da insan dokusundan izole edilen hücreler, ilk kez pasajlanana diğer bir deyişle subkültür edilene kadar *in vitro* ortamda geçirdikleri süre boyunca “primer kültür” olarak isimlendirilmektedirler. Pasaj ya da subkültür işlemi, hücrelerin adezif kültürden (plastik bir kültür üzerinde hücrelerden ibaret bir ekstraselüler matrikse adezif şekilde büyüme gösteren kültür) ya da süspansiyon kültüründen (kültür vasatı süspansiyonunda büyüme gösteren hücreler) ikinci bir kültür erlenine transfer edilmesidir. Hücreler çalışmalarda 75 cm² ya da 162 cm² yüzey alanına sahip hücre kültürü erlenlerinde kültür edilmektedir (Şekil 3). Adezif hücre kültürlerinde pasaj, hücre kültürlerinin tripsin ve/veya bir divalan iyon (Ca⁺⁺) şelat yapıcı ajan olan etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) çözeltisi ile muamele edilerek hücre-matriks ve hücre-hücre etkileşimlerinin ayrılmasıyla sağlanmaktadır. EDTA kalsiyuma bağlanmakta ve dolayısıyla hücre-hücre, hücre-matriks arasındaki kalsiyuma bağımlı adezif kuvvetlerin bozulmasına yol açmaktadır. Süspansiyon kültürlerinde ise pasaj, basit olarak hücre süspansiyonunun bir kısmının taze hücre vasatına transfer edilmesinden ibarettir. Her iki durumda da, pasaj işlemi, bir hücre yoğunluğunun seyreltilerek besleyici madde kaynağı, büyüme yüzey alanı veya hacmi gibi faktörlerle sınırlandırılmaksızın uygun koşullar altında yeniden büyümesine imkan vermektedir.



Şekil 3 : 162 cm² taban alanına sahip havalandırmaya elverişli (ventilated) hücre kültürü erleni

Primer kültür hazırlanmasında ilk olarak dikkat edilmesi gereken husus yüksek saflıkta bir hücre grubunun elde edilmesidir. Bununla birlikte, primer kültür hücre seçim işlemi hücre büyüme hızı temel alınarak yapılmaktadır. Bazı hücreler kültürde sayıca çoğalmakta, bazı hücreler ancak canlılığını sürdürebilmekte ve çoğalmakta, diğerleri ise belirli kültür koşulları altında canlı kalamamaktadır. Dolayısıyla, primer kültürün devam ettiği hücre tipleri değişmektedir.

İlk pasaj işleminden sonra, hücreler “hücre dizini (cell line)” haline gelmekte ve yapıları ile büyüme özelliklerine göre çeşitli defalarda çoğalıp ikincil kültür (subkültür) edilebilmektedir. Normal bir dokudan hücrelerin izole edilmesi genellikle kültüre sınırlı ve kısa bir yaşam süresi tanımaktadır. Birçok normal hücre, 20-100 nüfus katlaması ya da bölünmesi kadar bir ömre sahip olabilmektedir.

Nüfus katlaması ile pasaj arasındaki ilişki bir takım açıklamaları gerekli kılmaktadır. Her bir pasaj içinde hücreler, ilk olarak yerleştirdikleri kültür ortamındaki yoğunluklarına (hücre ekilme yoğunluğu), büyüme hızlarına ve kültür ortamında bırakıldıkları süreye bağlı olarak belli bir sayıda nüfus katlaması geçirmektedir. Ancak pratikte kültür ortamına ekilen hücrelerin bir bölümü çoğalmaya devam edebilmektedir. Kültür ortam tabanına yapışan ve büyümeye devam eden hücre yüzdesi “kaplama verimi (plating efficiency)” olarak tanımlanmakta ve hücrelerin yaşamaya devam etme kapasitelerini göstermektedir. Bir hücre ortamının tüm yönleri (büyüme vasatı/matriksi, hücre ekim yoğunluğu) bir kültürün, doku sindirim etkinliği veya pasajlama sırasındaki hücre ayrılması gibi ilk uygulamaları da içine alan kaplama etkinliğine etki etmektedir.

Primer hücrenin birkaç kez pasajlanmasının ardından, hücre dizinleri, çoğalmalarını bloke ederek (senescence) hücre ölümü meydana gelmekte ya da devamlı

bir hücre dizini oluşturmak üzere dönüşüme uğramaktadır. Bir hücre dizininin devamlı bir hücre dizini (continuous cell line) haline gelmesi transformasyon (transformation) olarak adlandırılmaktadır (144).

6. Solunum Epitelinin Fiziksel Bariyerini Karakterize Eden Parametreler

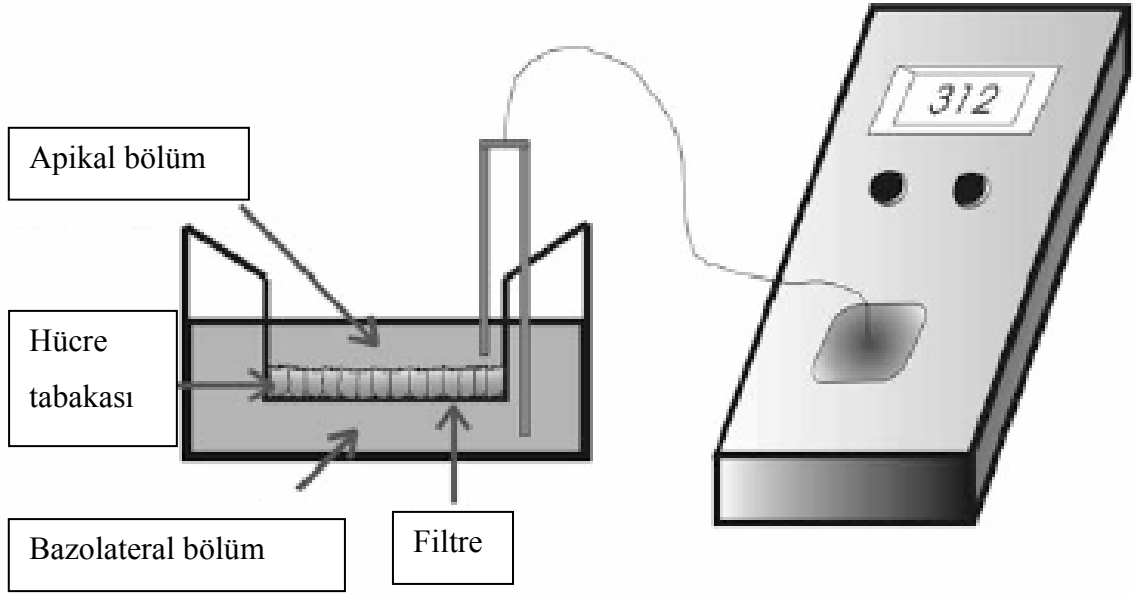
Solunum epitelinde yürütülen tüm araştırmalardan elde edilen sonuçlardan emin olmak için epitelin sıklık (tightness) ve permeabiliteyi gösterdiği karakterize edilmelidir. Epitel hücrelerin bariyer özelliklerini ortaya çıkarmak için kullanılan en yaygın üç teknik: (a) sıkı bağlantıların direk görüntülenmesini sağlayan ince dilim elektron mikroskobu, (b) parasetül iyon akışı için de bir gösterge olan transepitel elektrik direnci ölçümleri (TER), (c) çözünen büyüklüğü, şekli ve yüküne bağlı olarak sıkı bağlantılardan çözünen geçişini fonksiyonel olarak kısıtlamasını gösteren bir parametre olarak da kullanılan, hücrelerarası yol ile hücre tabakasının bir tarafından diğer tarafına geçen bileşik permeabilitesi (örneğin hidrofilik elektrolit olmayan çözünenlerin akış ölçümleri) (10, 86).

Hücre-hücre etkileşimlerini araştıran güncel çalışmalar sıkı bağlantı plağının muhtemel moleküler mimarisini incelemeye ve sıkı bağlantı proteini zonula-occludens protein-1 (ZO-1) in fonksiyonel rolünün, sıkı bağlantı bileşiklerini organize etmek ve bu bileşikleri hücre iskeletine bağlamak olduğunu ispatlamaya yöneliktir (145, 146).

Genel olarak, mikroskopla ve belirli işaretleyicilerin davranışlarının belirlenmesi suretiyle uygulanan histolojik ve morfolojik çalışmaların ardından, pasif fiziksel bariyerin fonksiyonelliği temel olarak TER ve geçirgenlik (permeabilite) adı altında iki parametre ile belirlenmektedir.

Transepitel elektrik direnci (TER)

Bariyer özellikleri ve hücre-hücre teması *in vitro* modeller için merkezi incelenmesi hedeflenen bir özellik olduğundan; bağlantılı parametrelerin belirlenmesi büyük öneme sahiptir. Bu anlamda, bahsedilen parametrelerden ilki geniş çapta kabul görmüş bir *in vitro* kültür tekniği olan TER ölçümüdür (65, 86, 147). Şekil 4 hücre yüzeyine zarar vermeden bir çubuk çifti elektrodla transepitelyal direncin nasıl ölçüldüğünü göstermektedir. Ölçülen değerler genellikle karşılık gelen yüzey alana göre hesaplandığından, neticedeki TER birimi [$\Omega \cdot \text{cm}^2$] dir (147).



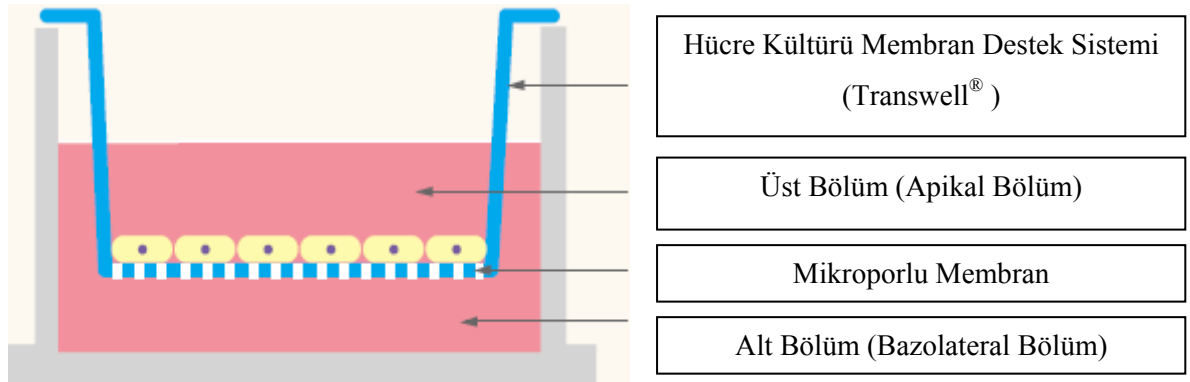
Şekil 4 : Transwell geçirgen hücre kültürü destek kabına ekilmiş hücre tabakasının transepitel elektrik direncinin (TER) ölçümü

Görünen geçiş katsayısı (Permeabilite katsayısı)(Papp: Apparent permeability coefficient)

İlaç absorpsiyonunun çalışıldığı hücre kültürü modellerinin çoğu Transwell geçirgen hücre kültürü destek membranı yüzeyini tam olarak kaplayacak şekilde büyüyen epitel hücrelerden oluşmaktadır. Prensipinde, polarize hücreler çok yüzeyli bir Transwell geçirgen hücre kültürü destek kabında bazolateral kompartman ve apikal kompartmanı farklı bölümler olarak taşımaktadır (Şekil 5-6). Bu özellik, hem donör kompartmana (apikal ya da bazolateral bölüm) test maddesinin uygulanması hem de zamana bağlı olarak akseptör odacığa ulaşan ilaç miktarının görüntülenmesi ve belirlenmesini mümkün kılmaktadır (86). Belirlenen ilaç miktarı karşılık gelen permeabilite katsayısını hesaplamak için kullanılmaktadır ve bu parametre epitel bariyeri karakterize etmeyi sağlamakta ve *in vivo* potansiyel biyoyararlanım için ilk ipucunu teşkil etmektedir. Hidrofilik maddelerin permeabilitesi temelde paraselüler geçiş yoluyla ve epitel tabakanın sıklığına bağlıdır. Hücre tabakasının sıklığı aynı zamanda TER ölçümüyle de doğrulanmaktadır.



Şekil 5 : Transwell geçirgen hücre kültürü destek membranı kuyucuğunun apikal ve bazolateral bölümlerinin ayrılmış halinin gösterimi



Şekil 6 : Transwell sistemin şematik görünüşü (Porlu alt bölümü, *in vitro* geçiş ve metabolik aktivite çalışmalarında hücre tabakasının her iki tarafına da bağımsız erişilebilirliği sağlar)

7. Solunum Yolu Hücre Kültürlerinin Uygulama Alanları

7.1.İlaç Permeabilite Çalışmaları

16HBE14o- (93) ve Calu-3 (113) hücreleri grubunda da permeabilitenin lipofilikliğe bağlı olduğu bulunmuştur; durum başka epitel dokuya sahip hücre kültürü modellerinde pasif yolla absorbe olan bileşikler için de aynıdır (74). Ayrıca, Calu-3 hücrelerinde partikül büyüklüğünün de permeabilite üzerinde etkin bir faktör olduğu bildirilmiştir (113). Çözünen permeabilitesi her iki insan akciğer hücre grubunda da normal tavşan trakea epitel hücre kültüründeki permeabilite ile mukayese edilmiş ve benzer olduğu bulunmuştur (93, 113). İnsan alveol epitel hücrelerinde de permeabilitenin partikül büyüklüğüne bağlı olduğu bildirilmiştir (89). Ancak, insan alveol epitel hücreleri üzerinde yapılan permeabilite çalışmaları sınırlıdır.

7.2.İlaç Absorpsiyon Çalışmaları

Polarize hücre tek tabakalarından maddelerin pasif yolla geçişi molekül büyüklüğü ve lipofilikliğe bağlıdır. Dolayısıyla, farklı organ ve türlerdeki benzer permeabilite çalışma sonuçları alternatif absorpsiyon bölgelerinden ilaç absorpsiyonunu yansıtmaktadır. Örneğin, köpek böbrek epitel hücreleri (MDCK: canine kidney epithelial cells), insan oral absorpsiyonu (85) ve insan gastrointestinal hücreleri ise sıçan akciğerinden absorpsiyonu (83) mukayese etmek üzere kullanılmıştır. Hücre kültürü teknikleri ilaç geçiş mekanizmalarını çalışma için uygundur; ancak aksi durumda bariyer etkisi olmaksızın gerçekleşen difüzyif işlemler direk aktif transportu maskeleyeceğinden aktif transepitel transport işlemlerinde sıkı bir tabaka oluşturmuş polarize büyüyen durumdaki hücrelerin kullanılmasına önem verilmelidir. Tespit edilen akciğerdeki transport mekanizmaları P-gp (118), organik iyon taşıyıcıları (148) ile peptid taşıyıcılarıdır (149).

7.3.İlaç Metabolizma ve Toksikoloji Çalışmaları

İlaç metabolizması ve toksikolojisini incelemek amacıyla solunum epitel hücrelerinin kullanıldığı çalışmalar, kültürde fonksiyonel sıkı bağlantı noktalarının oluşmasına ve epitel benzeri permeabilite bariyerinin oluşmasına bağlı değildir. Fonksiyonel sıkı bağlantı noktaları oluşturmayan BEAS-2B (havayolu) ve A549 (alveolar) gibi insan solunum hücre grupları da toksikoloji çalışmaları için uygundur.

Sitotoksite çalışmalarında pulmoner hücre kültürleri yaygın şekilde kullanılmaktadır. Son yıllarda, MTT testi (150) en sıklıkla tercih edilen hücre yaşayabilirliğini ölçen kolorimetrik bir yöntemdir. 5-trifosfat içeren biyoparçalanabilir Nanogel taşıyıcı sistem formülasyonlarının sitotoksitesini MTT testi ile insan göğüs karsinoma hücreleri (MCF-7) üzerinde araştırılmış ve Nanogel toksitesinin taşıyıcınının toplam pozitif yüküne bağlı olduğu bildirilmiştir (151).

7.4.İlaç Hedefleme Çalışmaları

Son yıllarda, hücre kültürü optimum çalışma şartlarını belirlemeye yönelik yapılan güncel çalışmalarda hücrelerin sıvı kaplı yüzey (LCC: liquid-covered culture) ya da hava-sıvı arayüzey (AIC: air-liquid interface culture) kültür ortamında gösterdikleri özellikler incelenmiştir. Lee ve ark. (152), insan nazal epitel hücreleri kullanılarak ilaç geçiş çalışma şartlarını optimize etmek ve bu bağlamda *in vitro* nazal

ilaç salım çalışmaları için uygun bir model oluşturmak üzere sıvı kaplı yüzeyde kültürlenmiş hücrelere kıyasla hava-sıvı arayüzeyinde kültürlenmiş hücreleri incelemiştir (152). İki farklı yüzeyde kültürlenmiş insan nazal epitel hücrelerden hava-sıvı arayüzeyinde olanların daha yüksek transepitel elektrik direnci ($>1000 \text{ ohm} \cdot \text{cm}^2$) gösterdikleri bildirilmiştir (152).

8.Hücre İçi Alım Çalışmalarının Değerlendirilmesi

8.1.Floresans Spektrometresi

Fotonların moleküllerle etkileşerek değerlik elektronlarının daha yüksek enerjili yörüngelere geçmesiyle uyarılmış duruma dönüşen moleküller bu durumda uzun süre kalmazlar, çarpışma enerjilerini çözücüye ya da çözültideki diğer moleküllere aktararak, daha kararlı olan alt duruma dönerek orada dinlenmeyi tercih ederler. Bazı moleküller bu geri dönüş sırasında enerji fazlasını ışık halinde yayarlar. Bu sürece floresans adı verilir (153). Uyarılmış molekülün daha düşük enerji düzeylerine dönüşünde çarpışmayla olan transfer veya ışık yayılımı süreçleri rol oynar. Bunlar birbirleriyle yarışmalı etkiye sahip oldukları için, floresans şiddeti bu süreçlerin her birinin göreceli önemine bağlıdır.

Floresans ölçümünde kullanılan temel alet floresans plaka okuyucudur. Bu alet ışık kaynağı, iki monokromatör, örnek tutucu ve detektörden (fotosel, ışık hücresi) oluşur. Düzenek absorpsiyon ölçümlerinde kullanılabilecek çok benzerlikle birlikte iki önemli farklılığı vardır: (i) biri uyarıcı dalga boyunu diğeri yayılan ışığın analizindeki dalga boyunu seçen iki monokromatör bulunur; (ii) detektör uyarıcı ışıklara genelde 90° açıyla yerleştirilmiş durumdadır. Bu şekilde örnekten geçen ışığın karışması engellenmiş olur. Örnekteki moleküllerin uyarılmasıyla oluşan floresans her yönde yayılır ve uyarıcı ışık yoluna dik açılı olarak yerleştirilmiş bir ışık hücresi (fotosel) tarafından saptanır.

8.2.Radyoaktivitenin Hücre Kültüründe Kullanımı

Radyoizotoplarla işaretlenmiş makromolekül öncüllerinin kullanılması kompleks bir karışım içindeki özel ve çok az miktarda bulunan bir molekülün, hücre içinde bir çok biyokimyasal olayın basit ve duyarlı şekilde izlenmesine olanak vermekte ve moleküllerin davranışlarının saptanmasında prob olarak kullanılmaktadırlar. Radyoaktif madde kullanımının diğer analitik tekniklere göre başlıca iki üstünlüğü

vardır: (i) duyarlı aletlerin kullanımıyla çok az miktarlarda (10^{-12} düzeyinde) radyoaktif materyal saptanabilir; (ii) kimyasal olarak ayırt edilemeyen maddeler arasındaki farklılıklar fiziksel olarak belirlenebilir.

Radyoaktiflerin ölçümünde başlıca kullanılan teknikler ışıma (scintillation) sayımı ve Geiger-Müller sayımıdır.

Sıvı Işıma Sayacı

Bu alette ölçümü yapılacak örnekler üç elemandan oluşur: (i) radyoaktif materyal, (ii) materyalin çözünmüş ya da süspansiyon halinde bulunduğu bir çözücü (iii) organik floresan molekül. Çözücü ve floresan yapılar sıvı ışıma sistemini oluştururlar. Radyoaktif örnekten çıkan β partikülleri bu sistemle küçük ışımalar meydana getirerek etkileşime girer. Işımlar bir ışık artırıcı tüp tarafından saptanır. Bu tüpten güçlendirilmiş olarak çıkan elektronik atışlar bir sayaç tarafından kaydedilir.

8.3.Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop (CLSM)

Konfokal lazer taramalı mikroskop (CLSM) araştırmacılara floresan veya yansıtıcı problemler ile işaretlenmiş kemik, beyin ve diğer benzeri dokuların oldukça kalın kesitleri, gelişmekte olan embriyolar gibi küçük organizmalar ve bütün haldeki hücre örnekleri ile çalışma imkanı sağlar. Bu teknoloji araştırmacılara ulaşılabilecek en yüksek ışık mikroskobu çözünürlüğü ile hücre altı yapılar, fonksiyonları ve hücre/organizma yapısının temiz bir şekilde görüntülenmesini sağlar. Bu işlem tek veya çoklu işaretlenmiş örnekler üzerine uygulanır. Konfokal mikroskobun avantajı tek bir plandan gelen ışığı toplayabilmesidir. Objektifteki optiklerin optimal kullanımı için bir lazer ışını gönderilir. x-y yansıtma mekanizması ile bu ışın tarama ışınına çevrilir ve objektif lensi yardımıyla floresan işaretlenmiş örnek üzerindeki tek bir küçük noktaya odaklanır. Yansıtılan lazer ışını ve örnek tarafından yayılan floresan ışık karışımı aynı objektif ile tutularak dikroik ayna ile bir fotodedektör üzerine odaklanır. Floresan işaretlenmiş örnek tarafından yayılan ışık fotomultiplier tüpe gönderilirken yansıtılan ışık dikroik ayna ile ayrıştırılır. Fotodedektör önünde bulunan konfokal açıklık örnek üzerindeki tek bir noktadan yayılan floresan ışığın toplanmasını sağlar. Bu şekilde odaklanan noktanın etrafından yayılan ışığın toplanması azaltılır. Bu özellikle kalın kesitlerle çalışırken önemlidir. Konfokal açıklığın ortasına odaklanan nokta konfokal spot olarak tanımlanır. Sonuç olarak taranan örnek yüksek çözünürlükte görüntülenir. Optik kesit alma xy

düzleminde veya xz, yz dikey düzlemlerinde gerçekleştirilebilir. x ve y düzlemlerinin yanısıra z ekseninde tarama fokal planın yandan görüntülenmesi etkisini yaratır. Ayrıca gerçek 3 boyutlu veri setleri toplanabilir. Fokal düzlemlerden elde edilen optik kesit katmanları tekrar üst üste yapılandırılarak 3 boyutlu görüntü üretilir.

Konfokal mikroskoplar lazer eksitasyona ve iki veya daha fazla sayıda yayılmış rengi teşhis edebilme yeteneğine sahiptir. En yaygın kullanılan eksitasyon kaynakları argon, helyum ve neon iyon lazeridir. Bu lazer tiplerine ait eksitasyon dalga boyları Tablo 1 de ve hücre kültürü çalışmalarında kullanılan çeşitli floresans gösteren işaretleyici maddeler Tablo 2 de verilmiştir.

Mikroskop, kullanıldıktan sonra mutlaka temiz bırakılmalıdır. Özellikle immersiyon objektifi kullanıldığında, özel yağı (immersiyon yağı) merceğin üzerinden bir parça lens kağıdı ile temizlenmelidir.

Tablo 1 : Farklı lazer tiplerine ait eksitasyon dalga boyları

Lazer Tipi	Eksitasyon Dalga Boyları (nm)
Argon	488 514
Helyum/Neon	543
Kripton/Argon	488 568 647

Tablo 2 : Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan çeşitli floresans gösteren işaretleyici maddeler

İlgili Konu		Floresan İşaretleyici
Ca ⁺² , Na ⁺ , K ⁺ , Mg ⁺² , Cl ⁻ , Zn ⁺²		Quin-2, Indo-2, Fluo-2
Tiyol grupları		Biman
Membran		Rodamin 123, Tetrametilrodamin
Lipid peroksidasyonu		Dihidrorodamin
Hücre yaşayabilirliği		Propidyum iyodür
Organellerin lokalizasyonu	Asidik organeller	Nötral kırmızı
	Endoplazmik retikulum	Karbosiyanin
	Golgi cisimciği	Seramid
	Mitokondriya	Rodamin
	Nukleus	Akridin
	Membran	Floresan fosfolipidler

8.4. Floresan İşaretli Polimerik Partiküller

Polimerik partiküllerin, özellikle hücre içi kompartmanlarda degradasyonu ve hücre içi alımı gibi hücrelerle olan etkileşimini incelemek *in vitro* ve *in vivo* davranışlarını değerlendirmek açısından çok önemlidir.

Biyomedikal uygulamalarda *in vivo* teşhis için hücrelerin floresans işaretli partiküllerle etiketlenmesi mümkündür. Lorenz ve ark. (154), miniemülsiyon işlemiyle sentetize edilmiş mikrondan küçük partiküllere floresans boyasının (*N*-(2,6 diizopropilfenil)-perilen-3,4-dikarbonasitimide(PMI) yüklenmesi ile hücre içine alım çalışmalarını yürütmüşlerdir. Konfokal taramalı lazer mikroskop ve transmisyon elektron mikroskop ile yapılan incelemelerde, floresans işaretli polimerik partiküllerin mezenkimal kök hücreleri ve HeLa hücrelerinde endozomal hücresel kompartmanların içine yerleşirken; Jurkat ve KG1a hücrelerinde hücre yüzeyi girintilerinde kaldıklarını tespit edilmiştir.

9. Nanopartiküller

İlaçların farmakolojik etkilerinin optimizasyonu ve toksik etkilerinin azaltılmasına yönelik girişimlerden biri optimum salım profili ile etki bölgesine spesifik / hedeflenmiş ilaç salımı sağlayan koloidal ilaç taşıyıcılarının kullanılmasıdır. Bu amaçlara hizmet eden taşıyıcılar arasında lipozomlar ve nanopartiküller bulunmaktadır.

Lipozomal formülasyonların zayıf stabiliteleri ve düşük yükleme etkinlikleri nedenleriyle polimerik nanopartiküller öne çıkan alternatif ilaç taşıyıcı sistemlerdir. Nanopartiküller, büyüklükleri 10-1000 nm arasında değişen, çözünmüş, hapsedilmiş veya adsorbe olan etkin maddeyi kontrollü olarak salan katı koloidal partiküllerdir. Sentetik veya doğal kaynaklı bir makromolekülden meydana gelirler. Nanopartiküller hazırlanma yöntemlerine göre nanoküre ve nanokapsül olarak isimlendirilmektedir. Nanokapsülde etkin madde bir polimerik membran ile çevrili iken nanokürede etkin madde matris sistem içinde homojen olarak dağıtılmıştır.

Nanopartiküller günümüzde özellikle pulmoner yolla ilaç uygulamasında tercih edilen bir farmasötik dozaj şekli haline gelmiştir. Hidrofobik yapısı, düşük partikül büyüklük dağılımına sahip olması gibi etkenler nedeniyle hem sistemik hem lokal etki amacıyla büyük avantajlara sahiptir. Nanopartiküller özellikle lokal tedavide alveollere kadar inmeyi sağlar.

Yüzey yükü hücre içi alımı etkilemektedir. Son yıllarda yapılan yüzey yükünün hücre içi alıma etkisinin incelendiği çalışmalarda, partikülün hazırlandığı polimerik yapıda amino gruplarına sahip kopolimerize monomer yapının miktarı ayarlanarak yüzey yükü değiştirilmektedir (154).

Nanopartiküller, mikron altı partikül büyüklükleri ile kapiler damarlar aracılığıyla derin dokulara geçebilmekte, epitel dokuya kolayca penetre olup hücre içine alınabilmektedir (155). Bu özellikleri sayesinde terapötik etkin maddeler nanopartikül formu halinde vücutta istenilen hedef bölgeye gönderilebilmektedir. Ayrıca nanopartikül hazırlanmasında kullanılan polimer karakteristiklerinin değiştirilmesiyle istenilen hedef dokuda, gerekli kalış süresi boyunca optimum terapötik etkinlik sağlanabilmektedir. Nanopartiküllerin vücutta ulaşılması zor bölgelere kateter bazlı bir yöntemle lokal olarak salımı da mümkündür (156).

Nanopartiküllerin mikropartiküllere de üstünlükleri bulunmaktadır. Mikropartiküllere kıyasla nanopartiküllerin hücre içine alımı yüksektir (157). Desai ve ark. (158), 1 µm partiküllerle karşılaştırıldığında 100 nm boyutundaki partiküllerin, Caco-2 hücrelerinden 2,5 kat fazla hücre içine alındıklarını ve 10 µm partiküllere kıyasla 10 kat fazla Caco-2 hücreleri içine alındıklarını bildirmişlerdir.

9.1.Nanopartikül Hazırlama Yöntemleri

Yapı, kompozisyon ve fizikokimyasal özelliklerinin değiştirilmesine izin veren çeşitli nanopartikül hazırlama yöntemleri mevcuttur. Hazırlama yönteminin seçimi kullanılan polimerin yapısına ve etkin maddenin çözünürlük özelliğine göre belirlenir (159). Kullanılan polimer baz alındığında, biyouyumluluk, parçalanma davranışı, uygulama yolu, ilacın istenilen salım profili, biyomedikal uygulama tipi polimer seçimini etkilemektedir. Nanopartikül hazırlama yöntemleri tarihsel olarak bakıldığında, ilk yıllarda monomerlerin çeşitli ortamlarda in situ polimerizasyonuna dayanmaktadır. İlerleyen yıllarda, tam olarak karakterize edilmiş önceden sentezlenmiş polimer veya doğal makromoleküllerin dispersiyonlarına dayalı yöntemler geliştirilmiştir.

9.1.1.Polimerizasyon Yöntemi

In Situ Polimerizasyon Yöntemi

İn situ polimerizasyon ile nanopartikül hazırlamak için iki yaklaşım mevcuttur. İlk yaklaşımda çözücü olmayan fazda polimerize olacak monomer emülsifiye edilmektedir (emülsifikasyon polimerizasyonu), ikinci yaklaşımda ise monomer, elde edilecek polimerin çözünmediği çözücüde çözündürülmektedir (dispersiyon polimerizasyonu) (159). Emülsiyondaki devamlı fazın yapısına bağlı olarak konvansiyonel emülsifikasyon polimerizasyonu ile ters emülsifikasyon polimerizasyonları farklıdır. İlkinde, devamlı faz sulu (yağ/su emülsiyonu) iken, ters emülsifikasyon polimerizasyonunda devamlı faz organikdir (su/yağ emülsiyonu). Her iki durumda da monomer yüzey etken madde molekülleriyle çözünmediği fazda emülsifiye olmakta ve monomerlerin şişmesiyle misel yapılar oluşmaktadır (160). Polimerizasyon reaksiyonu bir fiziksel ya da kimyasal tetikleyici bir başlangıç maddesi varlığında gerçekleşir. Bu maddenin yarattığı enerji devamlı fazdaki serbest reaktif monomerlerin oluşmasını ve daha sonra bu monomerlerin reaktif olmamış çevredeki monomerlerle birleşmesini ve polimerizasyon zincir reaksiyonunu başlatmasını sağlar. Reaksiyon genellikle monomerin tam olarak tüketilmesiyle son bulur. Nanopartiküllere yüklenecek ilaç polimerizasyon esnasında ortama ilave edilebilir ya da oluşmuş nanopartikül vasatına eklenip matriks içine girmesi veya daha basit bir mekanizmayla yüzeye adsorbe olur. Varsayılan emülsifikasyon polimerizasyonu mekanizmalarından ilki şişen monomer miselleri oluşumunu kabul eden miseller polimerizasyon mekanizmasıdır (160). Bu yaklaşımda, devamlı fazda serbest reaktif monomerler oluşarak misel içindeki

reaksiyonu başlatmaktadırlar. Bu durumda monomer damlacıkları monomer rezervuarları olarak rol oynamaktadır. İkinci mekanizma ise homojen çekirdekleşme ve polimerizasyon işlemi olarak adlandırılmaktadır. Monomerin devamlı dış fazda yeterli çözünürlüğe sahip olması durumunda, oligomer olarak isimlendirilen primer polimer zincirlerinin oluşmasını sağlayan çekirdekleşme ve polimerizasyon aşamaları devamlı dış fazda gerçekleşmektedir. Bu durumda, miseller ve damlacıklar misel rezervuarları olarak polimer zincirinin oluşmasında görev almaktadır. Oligomerler belli bir uzunluğa ulaştığında çökmekte miseller tarafından sağlanan yüzey etken madde molekülleri tarafından stabilize olan primer partikülleri oluşturmaktadırlar. Sistemin stabilitesine bağlı olarak final ürünü nanopartiküller primer partiküllere ilave monomer eklenmesiyle meydana gelmektedir (159).

Organik Devamlı Fazda Emülsifikasyon Polimerizasyonu

Devamlı fazı organik fazın oluşturduğu ters emülsifikasyon polimerizasyonunda, suda yüksek çözünürlüğe sahip monomerler düşük partiyon katsayıları nedeniyle misellerden organik faza difüze olamazlar (159). Sonuç olarak, partikül oluşumu sabit büyüklükteki küçük misellerin füzyonu ile gerçekleşmektedir. Bu nedenle, işlem ters “mikroemülsifikasyon” polimerizasyonu olarak isimlendirilmektedir. Elde edilen nanopartiküller konvansiyonel emülsifikasyon polimerizasyonu ile hazırlanan partiküllere göre daha az sayıda polimerik zincir içermekte ve daha dar aralıkta dağılım büyüklüğü göstermektedir (159).

Sulu Devamlı Fazda Emülsifikasyon Polimerizasyonu

Bu yöntemin en avantajlı yönü çok az miktarda yüzey etken madde kullanılması ya da yüzey etken maddenin formülasyona hiç girmemesidir. Yöntemde, emülsifiyan maddeden ziyade yüzey etken madde polimerize partiküllerin stabilizatörü olarak fonksiyon görmektedir (159).

9.1.2.Dondurma-Çözme Yöntemi

Dondurma-çözme işlemini etkileyen anahtar faktörler ilave edilen yüzey etkin madde miktarı, karıştırma hızı, dondurma döngülerinin sayısı, dondurma ve çözme sıcaklık dereceleri ve formülasyona eklenen diğer yardımcı maddelerdir (33). Yağ içinde su emülsiyonu teknolojisini takip eden siklik dondurma-çözme işlemiyle hazırlanmış, model protein olarak sığır serum albumini yüklenmiş poli(vinil alkol)

hidrojel nanopartikül formülasyonlarının dondurma-çözme siklus sayısına bağlı bir salım özelliği gösterdikleri tespit edilmiştir (30).

9.1.3.Katı-Lipid Nanopartikül Hazırlanması

Katı lipit nanopartiküller, yağ/su emülsiyonundaki sıvı yağın katı lipitle değiştirilmesiyle oluşan katı nanopartiküllerdir (161). Yağ/su tipi mikroemülsiyonların dondurarak kurutulması veya katı lipit ve lipit karışımlarının yüksek basınçla homojenizasyonu sonucu oluşan, kolloit boyutta, yüzeyinde tek tabaka halinde fosfolipit molekülü bulunan bir katı hidrofobik çekirdekten ibaret, lipozom ve nanopartikül arasında bir yapı olan, ilaç taşıyıcısı olarak kullanılan katı partiküllerdir. Yüksek basınçla homojenizasyon (sıcak ve soğuk homojenizasyon) (162) mikroemülsiyon ve çözücü çöktürme (163) yöntemleriyle hazırlanırlar (164). Katı lipit partikül uygulamaları, kozmetik alanda geniş yer bulmaktadır (165).

9.1.4.Emülsifikasyon Yöntemi

Emülsiyon oluşturma / Çözücü Buharlaştırma Yöntemi

Peptit, protein ve diğer makromoleküllerin hapsedilmesine olanak sağlayan çift emülsiyon oluşturma yönteminde etkin maddenin sulu çözeltisi polimer çözeltisinde dağıtılır ve bu karışıma yağ/su emülgatörünün sulu çözeltisi eklenir; takiben su/yağ/su emülsiyonu ilaç çözeltisini içeren polimer çözeltisi damlacıkları oluşur ve çözücünün buharlaşmasından sonra etkin maddenin sulu çözeltisini içeren nanopartikül süspansiyonu elde edilir. Organik çözücü olarak metilen klorür ve yüzey etken madde olarak polivinilalkol kullanılarak çift emülsiyon metoduyla (su/yağ/su) hazırlanan ortalama 200 nm büyüklüğündeki nanopartiküllerin dış sulu fazdaki yüzey etken madde konsantrasyonu arttırıldıkça partikül büyüklüğünün ve polidispersitenin azaldığı bulunmuştur (166). Çift emülsiyon oluşturma / çözücü buharlaştırma yöntemiyle hazırlanan polilaktik-ko-glikolik asit (PLGA) nanopartiküllerinin yüzeyinin monoklonal antikor ile kaplanması ile insan göğüs epitel hücrelerine (MCF-7, MCF-10A neoT) başarıyla hedeflendirildiği bildirilmiştir (167). Cegnar ve ark. (168), su/yağ/su emülsiyon oluşturma-çözücü difüzyon yöntemiyle, 300-350 nm büyüklüğünde, kanser tedavisinde kullanılan potansiyel bir protein olan sistatin yüklü poli laktik-ko-glikolik asit nanopartikülleri hazırlamışlar ve nanopartiküllerin % 85 antikanser etkinliği gösterdiklerini bildirmişlerdir. Çift emülsiyon oluşturma yöntemiyle ilgili temel

problemler, düşük ilaç yükleme kapasitesi ve etkinliği ile partikül büyüklüğü dağılımının düzensiz oluşudur (169). Bu yöntemdeki en büyük güçlüklerden biri düşük molekül ağırlığındaki hidrofilik ilaçların polimere olan düşük afinitesi nedeniyle yükleme etkinliğini sınırlı tutmalarıdır (170).

Emülsiyon oluşturma / Çözücü Difüzyon Yöntemi

Partiküler sistem hazırlama şekillerinden biri olan emülsiyon-çözücü difüzyon yönteminin esası suda çözünmeyen etken madde ile polimerin ortak çözüldükleri bir organik çözücüde sıcakta çözüldürülmesi ve yüzey etken madde içeren ortama karıştırılarak ilave edilmesidir (171). Bu yöntemde iç faz olarak bilinen etkin madde ve polimeri içeren organik çözücü, sabit karıştırma ile su ve emülgatör maddeden meydana gelen dış faza disperse edilerek su içinde yağ (Y/S) emülsiyonu oluşturulur. İç fazın ilk damlatıldığı dakikalarda sistemin emülsiyon benzeri opak bir görünümü olduğu için yöntem emülsiyona benzer çözücü difüzyon olarak da isimlendirilmektedir. İç fazı oluşturan emülsiyon damlacıklarından çözücünün dış faza difüze olması ile ilk anda saydam görünümde olan damlacıklar sertleşerek etkin maddeyi taşıyan nanopartiküllere dönüşmektedir. Son yıllarda, emülsiyon çözücü difüzyon yöntemiyle PLGA / PLA nanopartikülleri (172), flurbiprofen yüklü akrilat polimer nanopartikülleri (173), lipit bazlı nanopartiküller (174) hazırlanmıştır.

9.1.5.Sulu Vasatta Faz Ayrımı

Emülsifikasyon temelli yöntemlerin en büyük dezavantajı büyük miktarlarda organik çözücü kullanımınıdır. Diğer bir dezavantaj da ısı veya çapraz bağlama ile sertleştirme işleminden önce emülsiyonun intrinsik stabilite problemlerine bağlı olarak küçük (< 500 nm) ve dar partikül büyüklüğü dağılımı gösteren nanopartikül hazırlamanın güç oluşudur. Koaservasyon metodu bu dezavantajları ortadan kaldırmak üzere geliştirilmiştir. Bu durumda, partiküller faz ayrımı işlemiyle sulu fazda oluşmakta ve akabinde glutaraldehit gibi bir çapraz bağlama ajanıyla stabilize edilmektedir.

9.1.6.Poliiyon Kompleks Yöntemi

İyonik etkileşim, koordinasyon veya hidrojen bağı oluşumu suretiyle oligomerik amfifillerin kompleksleştirme reaksiyonu nanometre boyutunda partiküllerin oluşuma neden olmaktadır (175). Koaservasyon yönteminden çok daha güvenli bir yöntem olan poliyon kompleks yöntemiyle çinko sülfat stabilite arttırıcı maddesi kullanılarak zıt

yüklü kitozan/dekstran sülfat nanopartikülleri hazırlanmıştır (176). Poliyon kompleks yöntemi diyabetik sıçanlara oral uygulama ile farmakolojik etkinliği araştırmak üzere verilen insülin yüklü aljinat / kitozan nanopartiküllerinin hazırlanmasında kullanılmıştır (177).

9.1.7. Nanoçöktürme Yöntemi

Nanoçöktürme yöntemi, derhal ve tek bir aşamada nanopartikül oluşumuna olanak vermesi, uygulaması basit ve hızlı bir teknik olması itibarıyla avantajlıdır. Birbiri ile karışan iki çözücü gerektirmektedir. İlaç ve polimer çözücü olarak adlandırılan ilk fazda çözünmeli, çözücü olmayan faz olarak isimlendirilen ikinci fazda ise çözünmemelidir. Polimer çözeltisi çözücü olmayan faza ilave edildiğinde polimerin hızla katılaşmasıyla nanoçöktürme meydana gelmektedir. Polimeri içeren çözücünün karışan faza difüze olmasıyla polimerin çökmesi gerçekleşmektedir. Hızlı nanopartikül oluşumu, çözücü ve çözücü olmayan fazların arayüzeyinde gerçekleşen yüzeylerarası türbülansa bağlı Marangoni etkisi ile yönetilmektedir (178). Yüzey etkin maddelerin, yağ ve su fazları arasındaki yüzey gerilimini düşürerek ve bu şekilde damlacıkların parçalanmasını sağlamak suretiyle emülsiyon oluşumu sırasında parçalanmış damlacıkların tekrar birleşme eğilimini engelleme mekanizması Gibbs-Marangoni etkisi olarak bilinmektedir (179). Nanoçöktürme, genellikle poly(D,L-laktik-ko-glykolik asit), selüloz deriveleri, poly ε-kaprolakton gibi polimerlerle, dar bir dağılım aralığında 100-300 nm büyüklüğünde nanopartiküllerin hazırlanmasına olanak vermektedir. Bu yöntem, arttırılmış kesme/karıştırma hızları, sonikasyon veya yüksek sıcaklık dereceleri gerektirmez; bir protein yapısını bozabilecek koşulları barındırmaz. Etanol veya asetonda çözünen indometazin gibi hidrofobik karakterde olan ilaçların yüklenmesi açısından çok uygun olan nanoçöktürme yöntemi, dış faza ilaç geçişini en aza indirerek yüksek yüklenme (enkapsülasyon) etkinliği sağlamaktadır. Öte yandan, nanoçöktürme yöntemi ile suda çözünür ilaçların yüklenmesiyle ilgili son yıllarda yapılan çalışmalar da umut vaat edicidir. Örneğin, ilaç iyonizasyonunu ve dolayısıyla sudaki çözünürlüğünü azaltan dış faz pH sınırının optimuma getirilmesiyle prokain hidroklorür etkin bir şekilde nanopartiküllere yüklenmiştir (180). Hidrofilik ilaçların enkapsülasyonunun sağlanmasına yönelik olarak nanoçöktürme yönteminin optimize edilmesinin amaçlandığı çalışmada, polimerik nano-taşıyıcıların hazırlamak üzere çözücü ve çözücü olmayan fazın yapısı, çözücü/çözücü olmayan faz hacim oranı ve

polimer konsantrasyonunun partikül büyüklüğüne olan etkileri araştırılmıştır. (181). Bu çalışmada, çözücü olmayan faz olarak farklı alkol tipleri kullanıldığında metanol ve etanole kıyasla propanol ile en yüksek partikül büyüklüğüne ulaşıldığı; çözücü/çözücü olmayan faz hacim oranının anlamlı şekilde partikül büyüklüğünü etkilemediği; çok yüksek konsantrasyondaki polimerin ise nano boyutta partikül oluşumunu engellediği bildirilmiştir. Yoo ve ark. (182), lizozimi enkapsüle etmek üzere nanoçöktürme yönteminde temel değişiklikler yapmışlardır. Protein ve polimeri (PLGA) içeren dimetilsulfoksit (DMSO) çözeltisinin, polaksamer 407 barındıran sulu faza ilave edildiği bu çalışmada aseton ve etanol dışındaki çözücülerle de nanoçöktürme oluşabileceği ve yöntemin hidrofilik ilaçların enkapsülasyonu amacıyla da kullanılabilceği bildirilmiştir.

9.2.Nanopartiküllere Uygulanan Farmasötik İşlemler

Nanopartiküller, insanlarda farmasötik dozaj şekilleri olarak kullanıldığından (i) potansiyel toksik bir safsızlık içermemeli, (ii) saklanması ve uygulanması kolay olmalı, (iii) parenteral olarak uygulanacaksa steril olmalıdır (159).

9.2.1.Saflaştırma

Hazırlama metoduna bağlı olarak organik çözücü, rezidüel monomer, polimerizasyonu başlatıcı madde, elektrolit, surfaktan, stabilizatör, büyük polimer agregatları gibi potansiyel toksik safsızlıklar nanopartikül süspansiyonlarında bulunabilmektedir (159). Saflaştırma işleminin gerekliliği ve derecesi formülasyonun hizmet ettiği final amaca göre gerçekleştirilmektedir. Polimer agregatları cam filtrelerden basit filtrasyonla uzaklaştırılabildiği halde diğer safsızlıkların uzaklaştırılması daha komplike yöntemler gerektirmektedir. En yaygın saflaştırma yöntemleri arasında jel filtrasyon, dializ ve ultrasantrifüj yer almaktadır (183-185). Etkin bir saflaştırma yönteminin gerekliliği çapraz-akış filtrasyon yönteminin geliştirilmesine neden olmuştur. Bu teknikte nanopartikül süspansiyonu membran filtreden, membran yüzeyine teğet sıvı akış yönünde filtre edilmektedir. Dikey filtrasyon yöntemlerine göre, filtrelerin tıkanma durumu söz konusu değildir. Kullanılan membran tipine bağlı olarak, mikrofiltrasyon ya da ultrafiltrasyon uygulanabilmektedir. Süspansiyon çeşitli filtrasyon sikluslarına maruz bırakılırken; çözünebilir safsızlıklar ve membran porlarından daha küçük olan tüm bileşenleri içeren filtre edilen sıvı uzaklaştırılmaktadır. İlk olarak, süspansiyon konsantrasyonu sağlanmakta ve

sirkülasyon hacmi sabit tutulacak şekilde aynı filtrasyon hızında sisteme saf su ilave edilmektedir. Bu teknik, partikül büyüklüğünü değiştirmeksizin, büyük miktardaki nanopartikül formülasyonunun hızlı şekilde saflaştırılmasını sağlamaktadır (159).

9.2.2.Dondurarak Kurutma

Nanopartiküller sulu süspansiyon şeklinde saklanacaklarsa, polimerin parçalanması ve / veya çözünmesi, ilaç sızıntısı ve / veya parçalanması meydana gelebilir. Polimerik nanopartiküllerin uzun süreli korunmasını sağlayan en uygun yöntemlerden biri dondurarak kurutma (liyofilizasyon) dır. Bu teknik, süspansiyonun dondurulmasını ve takiben düşük basınç altında süblimasyon ile su içeriğinin eliminasyonunu kapsar. Desikasyonun tamamlanmasından ardından nanopartiküller muamele edilmeleri ve saklanmaları kolay olan kuru toz formunda elde edilirler. Dondurarak kurutulmuş nanopartiküller, fizikokimyasal özellikleri değiştirilmeksizin suda derhal redisperse olurlar. Çünkü nanopartiküller genellikle yüzey etkin madde veya stabilizatör ile hazırlanırlar ve bu maddelerin rezidüel varlığı redispesiyonu kolaylaştırır. Ancak, polimerik bir duvarla çevrili yağlı bir çekirdekten oluşan nanokapsüllerde tam redispersiyon sağlanamayabilmektedir. Liyofilizasyon yönteminin diğer bir dezavantajı ise agregasyondur. Dondurmaya karşı koruma sağlayan soğuktan koruyucu ve denatürasyondan koruyan liyoprotektan maddeler arasında şekerler, polioller, polimerler, proteinler, suda çözünmeyen solvanlar, yüzey etkin maddeler, amino asitler bulunmaktadır (186).

9.2.3.Püskürterek Kurutma

Püskürterek kurutma yönteminde konik veya silindirik bir kurutma kazanında, üstten aşağıya doğru püskürtülen çözelti damlacıkları, aynı yönden gelen sıcak hava içinde her biri birer nanopartikül olacak şekilde kurur. Püskürterek kurutma aletinde; kurutucu hava ve çözücü buharı ile birlikte içteki boruya teğet yaparak siklon ayırıcıya hızla girer. Merkezkaç kuvvet ile tozlar, ayırıcının iç çeperine doğru hızla savrulur ve buradan akarak toplanma kabında birikir ve nanopartiküller elde edilir. Kurutma basamağından önce dağıtıcıların ortama eklenmesi gereklidir. Yaygın dağıtıcı maddeler arasında sukroz, laktoz, mannitol gibi şekerler bulunmaktadır. Nanosüspansiyonlarda kurutma süresini en aza indirmek için nanopartiküllere yüklenmiş katı madde miktarının en yüksek düzeye getirilmesi gereklidir (187). Radyasyon tedavisi ve kemoterapi gören hastalarda hücre koruyucu olarak kullanılan amifostin nanopartikülleri püskürterek

kurutma tekniği ile hazırlanmıştır (188). Nanopartiküller, sahip olduğu özellikler korunarak inert bir matrise hapsedilerek mikrometre boyutunda partiküller hazırlanmaktadır (189). Püskürterek kurutma yöntemi ile i.v. uygulama için redisperse edilebilir katı lipid nanopartiküller hazırlanırken kullanılan yaygın bir yöntemdir (162).

9.2.4.Sterilizasyon

Parenteral amaçla kullanılan nanopartiküller steril ve apirojen olmalıdır. 0.22 µm filtre ile steril filtrasyon, mikroorganizma ve nanopartiküller genellikle küçük olduklarından (0,25-1 µm) nanopartikül süspansiyonları için uygun değildir. Mikropartikül sistemlerin sterilizasyonu, otoklav veya γ-radyasyon ile yapılmaktadır (159).

9.3.Nanopartiküllerin Tedavide Kullanımı

Gen Tedavisi

Nanopartiküllerin gen tedavisinde kullanılması ile ilgili son yıllarda yapılan çalışmalar uzun ekspresyon süreleri ve yüksek transfeksiyon etkinliği sağlandığına ilişkindir. Oküler tedavi için gen taşıyan nanopartikül sistemleri özellikle kanserli hücrelere hedeflenmektedir (190). Özellikle poli (D,L laktik ko-glikolik asit) (PLGA) nanopartiküllerinin, plazmid DNA'nın uzatılmış salımı için kullanımıyla ilgili araştırmalar bildirilmiştir (157). Gen terapisi için kullanılan PLGA nanoküreleri çıplak plazmid DNA ya nazaran iskemik bölgelerde daha geniş bir yeniden damarlanma sağladığı tespit edilmiştir (191).

Kanser Tedavisi

Nanoteknolojinin kanserde kullanımı, moleküler görüntüleme, moleküler tanı ve hedeflendirilmiş ilaç tedavisi için bilim, mühendislik ve tıptaki incelemelerin interdisipliner birleşimini kapsamaktadır. Yarı iletken quantum dotlar ve demir oksit kristalleri gibi nanometre boyutundaki partiküller, diğer moleküllerde mevcut olmayan optik, manyetik ve yapısal özelliklere sahiptir. Monoklonal antikolarlar, peptidler ve küçük moleküller gibi tümöre hedeflendirilmiş ligandlarla bağlandığında, nanopartiküller tümör antijenlerine veya tümör damarlarına yüksek afinite ve spesifikle hedeflendirilmede kullanılabilir. Nanopartiküller, multipl teşhis (optik, radyoizotopik veya manyetik) ve terapötik (antikanser) maddelerin bağlanması

için geniş yüzey alanına ve fonksiyonel gruplara sahiptirler. Son yıllarda, moleküler ve hücresele görüntüleme için biyoafinite gösteren nanopartiküller, kanser tedavisi için ilaç taşıyan hedeflendirilmiş nanopartiküller ve erken kanser tanısı/görüntülenmesi için nanocihazlar ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır (192). Nanopartiküller, her bir hastanın moleküler profiline bağı olarak kanserin teşhis ve tedavisinde kullanılan genetik ve protein biyoışaretliyecileri kapsayan kişisel onkolojiyi imkan sağlamaktadır.

Aşı Formülasyonlarında Nanopartikül Kullanımı

Biyoparçalanır ve biyoyumlu polimerlerden hazırlanan nanopartiküller, hümmoral ve hücresele immun cevapları indükleyerek aşı formülasyonlarında kullanılmaktadır (193). Hepatit B yüzey antijeni salımı için PLGA nanopartikülleri kullanılmıştır. Nanopartiküller ile adjuvan aktivitenin artırılmasına ve güçlü immun cevapların alınmasına yönelik umut vaat edici çalışmalar yapılmıştır (194).

Peptid ve Proteinlerin Oral Yolla Vücuda Verilişi İçin Nanopartikül Kullanımı

Nanopartiküllerin peptid ve proteinlerin vücuda verilişi ile ilgili avantajlar parçalanmadan koruması, absorpsiyonu artırması, hedefleme ve ilaçların kontrollü salımını sağlamasıdır (195).

Tanı İçin Görüntüleme

Nanopartiküllerin teşhisin hassasiyetini ve spesifikliğini artırma potansiyeli sayesinde tanı için kullanılan biyopsi, cerrahi müdahale ve diğere zor tanı tekniklerinin daha kolay hale getirilmesi sağlanmaktadır (196). Erken teşhisi hızlandıran ve teşhisi yönteminin hasta için güç bir tablo oluşturan yan etkilerini ortadan kaldırması itibariyle nanopartiküllerin görüntüleme ajanı olarak kullanımları umut vaat edicidir.

Akciğerlere İlaç Salımı

Akciğerlere yeterli miktar ilaç taşınabilmesi için nanopartikül gibi uygun ilaç taşıyıcı sistemlere ihtiyaç bulunmaktadır (197). Nanotaşıyıcı tip taşıyıcı sistemin kullanılması yüksek yükleme kapasitesi, kontrollü partikül büyüklüğü ve geçişi ile ilacın sistemden kontrollü salım kinetiğı gibi önemli avantajları beraberinde getirmektedir. Efervesan formülasyon içine yerleştirilen polibutilsiyanoakrilat nanopartikülleri akciğerin derin bölgelerine siprofloksazin salımı için hazırlanmıştır (198). Grenha ve ark. (199), hazırladıkları protein yüklü kitozan/tripolifosfat

nanopartiküllerini, mannitol ve laktoz yardımcı maddeleriyle püskürterek kurutma tekniği vasıtasıyla kaplamışlar ve elde ettikleri sistemin akciğerin derin bölgelerindeki sulu ortamla temas ettiğinde sahip olduğu partikül büyüklüğü, yüzey yükü gibi özelliklerini koruyarak terapötik makromolekülü serbestlediğini bildirmişlerdir. Hücrelerarası sıkı bağlantı noktalarını açmak suretiyle akciğerlere daha etkin kalsitonin salımını sağlamak üzere PLGA nanopartikülleri hazırlanmıştır (200). Rifampisin, izoniazid, pirazinamid içeren nanopartikül formülasyonu uygulama dozunu düşürerek tüberküloz tedavisinde daha iyi bir hasta uyuncu sağlamıştır (201).

10. Polivinilasetat (PVA) ın Farmasötik Teknolojideki Güncel Kullanımı

Ultrayüksek basınç teknolojisiyle hazırlanan Polivinilalkol-DNA nanopartiküllerinin floresans mikroskobu ile hücrelerdeki hücre içi alım davranışı incelenmiştir (202). PVA partiküler sistemlerine ait başka bir çalışma, mikroreaktörde γ -ışınları indüklü dispersiyon polimerizasyonu ile PVA mikrokürelerinin hazırlanmasıdır (203). Emülsifikasyon/çözücü uzaklaştırma ile hazırlanan teofilin içeren PVA mikrokürelerinden salımın difüzyon kontrollü olduğu bildirilmiştir (204). Sodyumdodesilsülfat ve sodyum montmorillonit varlığında, vinil asetatın emülsiyon polimerizasyonu polimer-kil hibritlerinin hazırlanması için gerçekleştirilmiştir (205).

Zayıf bazik bir ilaç içeren, ekstrüzyon/küreselleştirme ile hazırlanan uzun etkili pellet formülasyonunun film kaplanmasında Polivinilalkol-polivinilpirolidon karışımı kullanılmıştır (206). Aynı karışım, suda az çözünür zayıf asidik bir ilacın uzun etkili mini matriks tabletlerinin hazırlanmasında matriks oluşturmak amacıyla formülasyon içeriğinde yer almıştır (207). PVA/polivinilpirolidon karışımı propranololun uzatılmış salım tabletlerinde matriks oluşturucu ajan olarak da rol oynamıştır (208). Karışımın uzatılmış etkili matriks taşıyıcısı olarak kullanımı geniştir (209).

PVA, medikal sakızların bileşiminde de baz madde olarak rastlanılmaktadır (210). PVA makro başlatıcı (macro-initiator) olarak kullanıldığı birleşme reaksiyonunda izobutilenin katyonik polimerizasyonu gerçekleştirilmiştir (211). Kontrollü salım sistemlerinde, PVA'nın hidroksiapatit tabletlerinde matriks maddesi olarak kullanıldığı bildirilmiştir (212). PVA'nın hidrofilik formunun mikro ve nanopartiküllerin hazırlanmasında yüzey etken madde olarak kullanıldığı literatürlerde kayıtlıdır (213-218). Geçmiş çalışmalarda farmasötik süspansiyonların fiziksel stabilitesinin artırılması amacıyla PVA polimeri kullanılmıştır (219).

GEREÇ VE YÖNTEM

I-GEREÇ

Kimyasal Madde ve Çözücüler

3-[4,5-Dimetiltiazol-2yl]-2,5-difenil tetrazolyum bromid (MTT) (Sigma-Aldrich, Poole, UK)

5(6)-Karboksifloressein (Fluka/BioChemika)

96-kuyucuklu floresans plaka (96 well plate fluorescence D/N Fischer-Nunc -Nunclon Surface, Roskilde, Denmark)

A549 hücre kültürü (ATCC -Rockville, MD, USA)

A549 hücre kültürü besiyeri: Minimum Essential Medium (MEM) (Sigma-Aldrich, Poole, UK)

Barrycidal 36 disinfektant çözelti (Interchem Hygiene GmbH, Zürich, Avusturya)

Calu-3 hücre kültürü (ATCC -Rockville, MD, USA)

Calu-3 hücre kültürü besiyeri: Dulbecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12 Ham (DMEM) (Sigma-Aldrich, Poole, UK)

DAPI (4,6-Diamidino-2-Fenilindol) (Sigma)

Diizopropil azodikarboksilat (Sigma-Aldrich, UK)

Fetal Bovine Serum (FBS)(Sigma-Aldrich, Poole, UK)

Floresanslı karboksillenmemiş mikroküreler (Fluorescent Polymer Microspheres (Aqueous) -diameter size: 0.05 μm -G50 ve 0.25 μm -G250) (DukeScientific (California, USA)

Floresanslı karboksillenmiş mikroküreler (Fluoresbrite YG Carboxylate Microspheres - diameter size: 0.30 μm ve Fluoresbrite BB Carboxylate Microspheres - diameter size: 0.05 μm) (Polysciences, UK)

FluorSave Reagent (Calbiochem, Merck, UK)

FM 4-64FX Membran Boyası (Molecular Probes-Invitrogen)

Fosfat tamponlu tuz tabletleri (PBS-Phosphate Buffered Saline-Dulbecco A) (Oxoid Limited, Hampshire, UK)

Gliserol 99% (Riedel-de Haen, Germany)

Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) (Sigma-Aldrich, Poole, UK)

L-glutamin (Sigma-Aldrich, Poole, UK)

Metanol (Fisher Scientific, Leicestershire, UK)

N,N-dimetil formamid (DMF) (Sigma-Aldrich, Poole, UK)

N-Metil-2-Pirolidon (Biotech Qualitat Aldrich, UK)

Paraformaldehit (Sigma, UK)

Penisilin-Streptomisin (Sigma-Aldrich, Poole, UK)

Polivinilalkol % 80 hidrolize (Aldrich, USA)

Polivinilasetat % 40 hidrolize (PVA) (PolySciences, UK)

Polivinilpirolidon K15 (PVPK15) (Fluka, Switzerland)

Ready Protein⁺™ sıvı sintilasyon kokteyli (Ready Protein⁺™ Liquid Scintillation Cocktail for Protein, Peptides and Nucleic Acids (Beckman Coulter, USA)

Sephadex LH-20 (Sigma, St.Louis, USA)

Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Sigma-Aldrich, Poole, UK)

Trifenilfosfin (Sigma-Aldrich, UK)

Tripan mavisi çözeltisi (0,4%) (Sigma-Aldrich, Poole, UK)

Tripsin-EDTA çözeltisi (0,25%) (Sigma-Aldrich, Poole, UK)

Tris (hidroksimetil) metillamin (BDH, AnalaR)

Aletler

Buzdolabı (Beko)

Distile su aleti (EasyPure UV/UF compact reagent grade water system) (Barnstead/Thermolyne, Dubuque Iowa, USA)

Dondurucu (Freezer -80C- Herafreeze) (Heraeus, Germany)

Dondurucu (Kelvinator)

Eldiven (Examination Gloves VWR International Latex –Class 1, powder free, Natural Rubber Latex)

Eppendorf tüp (Eppendorf Safe-Lock Tubes-1.5 ml - Eppendorf AG, Hamburg, Germany)

Etüv (Leec)

EVOM voltmetre (STX-2 and Evom G, World Precision Instruments, Stevenage, UK)

Falkon tüp (Falcon Tube 15 ml, 50 ml -Becton Dickinson, NJ, USA)

Floresans okuyucu için işlem görmüş 96-kuyucuklu plaka (D/N Fischer-Nunc, Nunclon Surface, Roskilde, Denmark)

Fluorometre (Cytofluor plate reader series 4000) (Perspective Biosystems)

Foton korelasyon spektroskopisi (PCS) (Brookhaven Instruments Corporation)

Galoş (ShoeCover GenPro Critical Cover -VWR International, Zierikzee, Hollanda)

Gatan Ultrascan 2k x 2k CCD kamera (Gatan Inc., Pleasanton, CA, USA)

Gilson pipette (1 µl, 5 µl, 10 µl, 25 µl) (France)

Hemasitometre (Neubauer)

Homojenizatör (Silverstone L4RT)

Hücre kültürü erleni (Cell culture flask-treated, non-pyrogenic, polystyrene, sterile - 75 cm² and 162 cm² with ventilated caps - 2 µm phenolic style vent cap) (Corning Incorporated, Corning, NY, USA)

Hücre kültürü için işlem görmüş 96-kuyucuklu plaka (Cell culture treated-sterile 96-well plates - Corning Incorporated, Corning, NY, USA)

Isıtıcı (Fisons, UK)

İnkübatör (Heraeus Instruments, Function Line, Germany)

İnkübatör (NuAire DH Autoflow CO₂ Air-Jacketed Incubator)

İnkübatör (Leec Compact Incubator)

Konfokal taramalı elektron mikroskobu (CLSM-Confocal Laser Scanning Microscope) (Leica DMIR E2, Leica Microsystems, UK)

Konfokal taramalı elektron mikroskobuna ait bilgisayar yazılımı (LCS Lite, Leica Confocal Software, Leica GmbH, Germany)

Kriyojenik transmisyon elektron mikroskobu (cryo-TEM: cryo-Transmission Electron Microscopy) (FEI Tecnai G² T20 model, (FEI Company, Hillsboro, OR, USA)

Kriyojenik transmisyon elektron mikroskobuna ait cryo-tutucu (Gatan 626 side-entry cryo holder) (Gatan Inc., Pleasanton, CA, USA)

Kriyojenik transmisyon elektron mikroskobuna ait kamera (Gatan Ultrascan 2k x 2k CCD Kamera) (Gatan Inc., Pleasanton, CA, USA)

Kurulama bezi (Wipers Wypall L - Kimberly-Clark Professional, UK)

Lamel (CoverGlass BDH 22*22 mm Thickness No 1 Borosilicate Glass, VMR, UK)

Manyetik karıştırıcı (Bibby Stuart, UK)

Membran filtre (Filter GyroDisc Syr. 30 mm, 0.2 µm sterile-Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Belgium)

Mikroskobik güvenlik kabini-Sınıf 2 (Safety Cabinet –Class 2) [MCC/SC2/DB/12] Safety Cabinet Room 5-168 (Howorth Airtech, UK)

Mikroskop (Hund Wetzlar-Hund Wilovert S, Germany)

Neşter (Scalpel-Swann-Mortor, Sheffield, England)

Orbital inkübatör –(Stuart Scientific, Orbital Incubator SI 50, UK)

Parafilm (Pechiney Plastic Packaging, Menasha, WI)

pH-metre (pHmeter- Inolab ph level 2) (WTW)

Pipet-25 ml, 10 ml, 5 ml, 1 ml (tek kullanımlık) (Stripette Disposable Serological Pipette, Plugged, Non-pyrogenic, Sterile, Polystyrene -Corning Incorporated, Corning NY, USA)

Pipetboy (IBS Integra Biosciences)

Presept efervesan disinfektant tablet (Johnson&Johnson, Skipton, UK)

Rotaevaporatör – Büchi RE 111 Rotavapor (Switzerland)

Rotaevaporatör –Büchi 461 (Switzerland)

Santrifüj (Beckman Coulter, Allerga X-22R Centriguge, USA)

Santrifüj Biofuge pico (Heraeus, Germany)

Sıvı nitrojen haznesi (Liquid Nitrogen Bottle) (Jencons 35HVC)

Sıvı ışıma sayacı (Multi-Purpose Liquid Scintillation Counter LS 6500) (Beckman Coulter, USA)

Sonikatör (Kerry, UK)

Spektrofotometre (Spectramax 190, Molecular Devices, USA)

Su banyosu (Clifton, UK)

Şırınga pompa (Model R99-E, Razel Scientific Instruments Inc.)

Transwell geçirgen hücre kültürü destek kabı (Transwell clear permeable supports) (1.12 cm² polyester - 0.4 µm pore size, 4.67 cm² polycarbonate - 3 µm pore size , tissue culture treated) (Corning Incorporated, Corning, NY, USA) (0.33 cm² polyester - 1 µm pore size) (Falcon Becton Dickinson, NJ, USA)

Ultrasonikatör (Decon F93006)

Vorteks WhirliMixer (Fisons Scientific Equipment, UK)

Zetametre (ZetaPlus Zeta Potential Analyzer) (Brookhaven Instruments Corporation)

II-YÖNTEM

1.5(6)-Karboksifloressein Miktar Tayini

Polimer işaretleme etkinliğinin tespit edilmesinde, 5(6)-karboksifloressein (KF) miktar tayini için fluorometrik yöntem kullanıldı. Bu yöntemin güvenilirliğini saptamak üzere analitik yöntem validasyon çalışması yapıldı. KF 96-kuyucuklu floresans plakaya uygulandı.

1.1.Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu

Analitik yöntem validasyonu, bir test yönteminin doğru ve kesin bir şekilde sürekli olarak bekleneni gerçekleştirildiğinin kanıtlanmasıdır (220). KF miktar tayini yönteminin validasyonu için, doğrusallık (linearity), kesinlik (precision), doğruluk (accuracy) ve seçicilik (specifity) çalışması yapıldı (221, 222).

1.1.1. Doğrusallık

Bir analitik yöntemin doğrusallığı, deney bulgularının örnek çözeltisi içindeki madde konsantrasyonu ile belli aralıkta olmasıdır (221). Stok çözelti için 100 mg KF hassas olarak tartıldı, 75:25 oranında N-metil-2-pirolidon: HBSS (pH: 8,5) içinde çözündürülerek 100 mL ye tamamlandı. Bu stok çözülden (1 mg/mL) 10 µL lik miktar hassas olarak alındı, üzerine 75:25 oranında N-metil-2-pirolidon: HBSS (pH=8.5) ilave edildi ve balon jöjede 10 mL ye tamamlandı (1 µg/mL). Seri seyreltmeler ile 5 farklı konsantrasyonda (1 µg/mL, 0,5 µg/mL, 0,25 µg/mL, 0,125 µg/mL, 0,0625 µg/mL) çözelti hazırlandı. Çözeltiler, her bir konsantrasyon 6 kez olmak üzere floresans okuyucu için işlem görmüş 96-kuyucuklu plakaya uygulandı ve gösterdikleri floresans 485/20 nm eksitasyon ve 530/25 nm emisyon dalga boylarında ölçüldü. Floresans şiddeti değerlerinin konsantrasyona karşı grafiği çizildi, doğru denklemi ve determinasyon katsayısı hesaplandı.

1.1.2.Kesinlik

Bir analitik yöntemin kesinliği, belirlenen çalışma koşullarında hazırlanan aynı örnek çözeltisinden birden fazla seyreltme ile elde edilen bir serinin ölçümleri arasındaki uyumun yakınlığını ifade eder (221). Standart sapma veya değişim katsayısı (% CV) değeri ile ifade edilir. Kesinlik tayini için, KF nin üç farklı konsantrasyonda (1 µg/mL, 0,5 µg/mL, 0,25 µg/mL) çözeltileri hazırlandı. Çözeltilerin floresansları, floresans okuyucu için işlem görmüş 96-kuyucuklu plakada 485/20 nm eksitasyon ve

530/25 nm emisyon dalga boylarında okundu. Her konsantrasyon değeri için deney altı kez tekrarlandı. 1. gün için yapılan tüm bu çalışmalar 2. ve 3. günlerde de yapıldı. Üç gün boyunca elde edilen sonuçların ortalamaları alındı, SD ve % CV değerleri hesaplandı.

1.1.3.Doğruluk

Kullanılan analitik yöntemin doğruluğunu saptamak için, 75:25 oranında N-metil-2-pirolidon: HBSS (pH=8,5) ile KF nin üç farklı konsantrasyonda (1 µg/mL, 0,5 µg/mL, 0,125 µg/mL) çözeltileri hazırlandı. Daha sonra gerekli seyreltmeler yapılarak 485/20 nm eksitasyon ve 530/25 nm emisyon dalga boylarında çözeltilerin floresans şiddeti değerleri okundu. Her konsantrasyon için deney altı kez tekrarlandı. Elde edilen sonuçlardan doğru denklemi yardımıyla, çözeltilerdeki KF konsantrasyonu hesaplandı. Yöntemin doğruluğu, değişim katsayısı değeri (% CV) hesaplanarak saptandı.

1.1.4.Seçicilik

Nanoçöktürme yöntemiyle hazırlanan nanopartikül formülasyonlarında kullanılan maddelerin analiz yöntemini etkileyip etkilemediğini saptamak üzere, her formülasyon için kullanılan maddeler tartıldı ve KF ilave edilmeden yöntem 1.1.1. deki gibi çalışılarak stok çözeltiler hazırlandı ve seyreltmeler yapıldı. Çözeltilerin floresans değerleri floresans plaka okuyucuda ölçüldü. Bu işlem ile, yöntemin seçiciliğini saptamak üzere, formülasyonlarda kullanılan maddelerin 485/20 nm eksitasyon ve 530/25 nm emisyon dalga boylarında floresans verip vermediği saptandı.

2.PVA nın KF ile İşaretlenmesi

PVA nın KF ile işaretlenme reaksiyonu, KF nin karboksil grubu ile PVA nın alkol grubu arasında gerçekleştirildi. PVA nın KF ile kovalan bağ ile bağlanarak KF ile işaretlenmiş PVA (KF-PVA) nın elde edilmesi amacıyla yapılan ön çalışmalarda hazırlanan ilk formülasyonda, 10 mL dimetilformamid (DMF) içinde çözüldürülmüş 0,02 mmol trifenilfosfin (TPP), 0,0073 mmol PVA ile 10 mL DMF içinde çözüldürülmüş 0,0188 mmol diizopropil azodikarboksilat (DIPAD) ve 0,0162 mmol KF kullanıldı. Daha sonra hazırlanan formülasyonda optimum floresansla işaretlenme etkinliğine ulaşmak için KF miktarı arttırıldı.

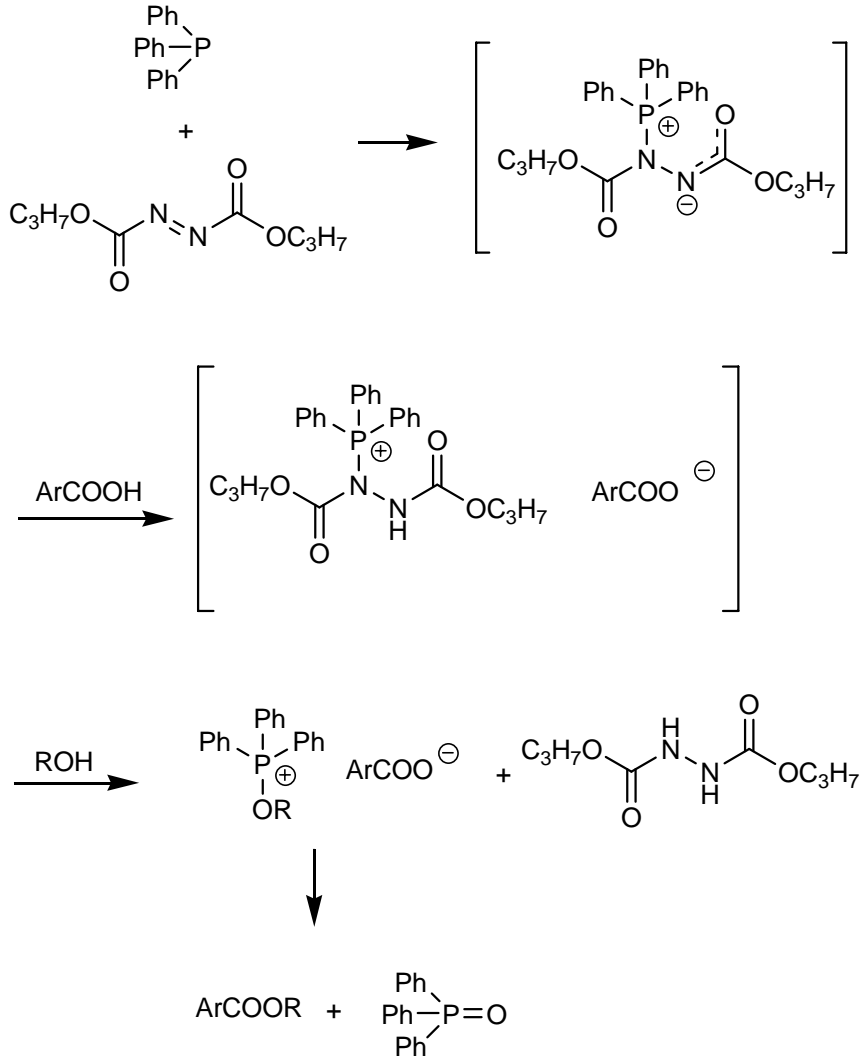
0,16 mmol TPP ve 0,0058 mmol PVA, 10 mL DMF içinde çözüldürülüp, 0,15 mmol DIPAD ve 0,13 mmol KF nin 10 mL DMF içindeki çözeltisine oda sıcaklığında

ilave edildi. Karışım bir gece manyetik karıştırıcı ile oda sıcaklığında karıştırılarak düşük basınçta çözücünün uzaklaştırılması sağlandı.

Ayırma işleminden önce, Sephadex çözücü karışımı içinde (90:10 - metanol : distile su) süspansiyon edilerek 1,5 x 25 cm boyutlarındaki cam kolona yerleştirildi ve kullanılmadan önce dengeye gelmesi amacıyla 1 gece bekletildi. Ayrıca ayırma işleminin kolonda meydana gelme prensibinin belirlenmesi ve etkin bir şekilde gerçekleştirilmesi amacıyla ön çalışmalarda KF-PVA karışımından önce, farklı konsantrasyonlardaki KF (0,5 mg/mL, 2 mg/mL, 4 mg/mL ve 20 mg/mL) ve PVA'nın (25 mg/mL ve 100 mg/mL) nın kolondan geçiş zamanları tayin edildi.

PVA'nın KF ile işaretleme reaksiyonunda elde edilen ürün, 90:10 oranında metanol : distile su ile hidrate edilmiş Sephadex LH-20 kolondan geçirilerek reaksiyona girmemiş KF den fraksiyonlar halinde jel filtrasyonuna dayalı kolon kromatografisi ile ayrıldı. Floresansla işaretli nanopartikülleri hazırlamak üzere bu formülasyonla elde edilen KF-PVA kullanıldı. KF'nin karboksil grubu ile PVA'nın alkol grubu arasında geçen konjugasyon reaksiyonu Şekil 7 de verilmiştir. KF-PVA fraksiyonları toplandı ve çözücü karışımını uzaklaştırmak amacıyla vakumlu etüvde 80°C'de 1 gece bekletildi. Ayırma yönteminin etkinliği, elde edilen KF-PVA'nın metanolde çözündürülüp kolondan ikinci kez geçirilmesi suretiyle test edildi. KF-PVA'ya ait standart eğri, yöntem 1.1.1. kullanılarak, 90:10 metanol:distile su içindeki 5 farklı konsantrasyonuna (0,0625 mg/mL, 0,125 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1 mg/mL) karşılık floresans şiddeti değerlerinin işaretlenmesiyle çizildi. KF-PVA içindeki KF miktarı, KF-PVA'nın konsantrasyon-floresans standart eğrisinden elde edilen floresans şiddeti değerlerinin Yöntem 1.1.1. de anlatıldığı şekilde elde edilen saf KF standart eğrisine uygulanmasıyla bulundu. Fraksiyonların gösterdiği floresans Cytofluor plaka okuyucuda ölçüldü. Floresans değerleri, floresans okuyucu için işlem görmüş 96-kuyucuklu plakada, 485/20 nm eksitasyon ve 530/25 nm emisyon dalga boylarında tespit edildi. PVA'nın KF ile işaretleme etkinliği aşağıdaki formül (3-1) kullanılarak tayin edildi (23).

$$\% \text{ Floresansla İşaretleme Etkinliği} = \frac{\% \text{ Ağırlık}_{KF}}{\% \text{ Ağırlık}_{KF-PVA}} \quad (3-1)$$



Şekil 7 : PVA nın KF ile işaretlenmesine ait reaksiyon

3. Nanopartiküller Üzerinde Yapılan Çalışmalar

3.1.PVA Nanopartikülleri Ön Formülasyon Çalışmaları

Çalışmamızda PVA % 40 (polivinilasetat) polimeri ile nanopartikül formülasyonları nanoçöktürme yöntemi ile hazırlandı.

Ön formülasyon çalışmalarında değerlendirilen parametreler aşağıda belirtilmiştir:

- Yüksek verimde nanopartikül elde etmek amacıyla iç fazı oluşturan polimer (PVA) çözeltisinin farklı konsantrasyonlarının (% 1, % 2, % 4 a/h) etkisi değerlendirildi.

- ii. Nanopartikülleri hazırlamak amacıyla iç faz olarak farklı hacimlerde (1 mL, 3 mL ve 5 mL) PVA'nın metanoldeki çözeltisi kullanıldı ve iç faz miktarının nanopartikül oluşumuna etkisi saptandı.

Tablo 3 'de verilen PVA formülasyonlarının her biri 3 seri olarak hazırlandı.

Tablo 3 : Ön formülasyon çalışmalarında hazırlanan PVA nanopartikül formülasyonları

Formülasyon	Organik faz: sulu faz oranı	PVA konsantrasyonu
PVA-UL-F1	1:30	% 1
PVA-UL-F2	1:10	% 1
PVA-UL-F3	1:10	% 2
PVA-UL-F4	1:6	% 2
PVA-UL-F5	1:10	% 4
PVA-UL-F6	1:6	% 4

3.2.PVA Nanopartiküllerinin Hazırlanması

PVA nanopartikülleri ön formülasyon çalışmalarında optimize edilen parametreler kullanılarak nanoçöktürme yöntemi ile hazırlandı.

- i. PVA nanopartiküllerinin hazırlanması: 3 mL PVA'nın metanoldeki çözeltisi (10 mg/mL), homojenizatör ile 4000 devir/dakika hızda karıştırılan 4 mL polivinil alkol (%10 a/h) ve 26 mL polivinilpirolidon K15 (% 1,54 a/h) karışımına 25 mL/saat hızdaki şırınga pompası yardımıyla oda sıcaklığında damla damla ilave edildi. İç fazın ilavesinin tamamlanmasından sonra homojenizatör ile aynı hızda 2 saat daha karıştırma işlemine devam edildi ve metanolün tamamen uçması sağlandı.
- ii. KF-PVA nanopartiküllerinin hazırlanması: Çalışmada elde edilen işaretli polimer (KF-PVA) kullanılarak Yöntem 3.2.i. de anlatıldığı şekilde floresans işaretli PVA nanopartikülleri (PVA-L-F2) hazırlandı. PVA-L-F2 formülasyonuna ait parametreler aşağıda verilmiştir.

Formülasyon	Organik faz: Sulu faz oranı	PVA konsantrasyonu
PVA-L-F2	1:10	% 1

3.3.Floresans İçeren PVA ve PS Nanopartiküllerin Miktar Tayini

Nanopartikül geçiş çalışmalarında nanopartikül miktarının tespit edilmesi amacıyla floresans içeren PVA ve polistiren (PS) nanopartiküllerinin miktar tayini yapıldı. PVA nanopartikülleri ile karşılaştırılması amacıyla floresans gösteren PS nanopartikül formülasyonları olarak, yüzeyi karboksillenmemiş 51 nm büyüklüğünde PS nanopartikülleri (PS-NC-51), yüzeyi karboksillenmemiş 250 nm büyüklüğünde PS nanopartikülleri (PS-NC-250), yüzeyi karboksillenmiş 50 nm büyüklüğünde PS nanopartikülleri (PS-C-50) ve yüzeyi karboksillenmiş 300 nm büyüklüğünde PS nanopartikülleri (PS-C-300) kullanıldı. PVA-L-F2, PS-NC-51, PS-NC-250 ve PS-C-300 formülasyonlarının gösterdiği floresans 485/20 nm eksitasyon ve 530/25 nm emisyon dalga boylarında; PS-C-50 formülasyonunun gösterdiği floresans şiddeti ise 360/40 nm eksitasyon ve 420/50 nm emisyon dalga boylarında Cytofluor plaka okuyucuda ölçüldü. Konsantrasyon- floresans şiddeti grafikleri en küçük kareler yöntemi kullanılarak çizildi. Bu yöntemin güvenilirliğini saptamak üzere analitik yöntem validasyon çalışması yapıldı. PVA nanopartikülleri ile karşılaştırılması amacıyla seçilen PS nanopartikül formülasyonlarına ait parametreler aşağıda verilmiştir.

<i>Formülasyon</i>	<i>Partikül Büyüklüğü</i>	<i>Yüzey Özelliği</i>
PS-NC-51	51 nm	Karboksillenmemiş
PS-NC-250	250 nm	Karboksillenmemiş
PS-C-50	50 nm	Karboksillenmiş
PS-C-300	300 nm	Karboksillenmiş

3.3.1.Floresans İçeren PVA ve PS Nanopartiküllerin Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu

Yöntem 1.1. de anlatıldığı şekilde floresans içeren PVA ve PS nanopartiküllerinin miktar tayini yönteminin validasyonu gerçekleştirildi.

3.3.1.1.Doğrusallık

PS nanopartikül formülasyonlarının stok çözeltisi için % 2,6 (a/h) nanopartikül içeren formülasyonlardan (PS-NC-51, PS-NC-250, PS-C-50, PS-C-300) 100 µL hassas olarak alındı; 75:25 oranında N-metil-2-pirolidon: HBSS (pH=8,5) içinde

çözündürülerek 30 dakika ultrasonik su banyosunda bekletildi ve 10 mL ye tamamlandı. Elde edilen stok çözeltiden (0,26 mg/mL), 75:25 oranında N-metil-2-pirolidon: HBSS (pH=8.5) ile seri seyreltmeler yapılarak 7 farklı konsantrasyonda (40 µg/mL, 20 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL, 2,5 µg/mL, 1,25 µg/mL, 0,625 µg/mL) çözelti hazırlandı. PVA-L-F2 formülasyonunun stok çözeltisini hazırlamak için ise 1 mg/mL nanopartikül içeren PVA-L-F2 formülasyonundan 833 µL hassas olarak alındı; 75:25 oranında N-metil-2-pirolidon: HBSS (pH=8,5) içinde çözündürülerek 30 dakika ultrasonik su banyosunda bekletildi ve 10 mL ye tamamlandı. Elde edilen stok çözeltiden (83,3 µg/mL), 75:25 oranında N-metil-2-pirolidon: HBSS (pH=8.5) ile seri seyreltmeler yapılarak 7 farklı konsantrasyonda (41,65 µg/mL, 20,83 µg/mL, 10,41 µg/mL, 5,21 µg/mL, 2,6 µg/mL, 1,3 µg/mL, 0,65 µg/mL) çözelti hazırlandı. Çözeltiler her bir konsantrasyon 6 kez olmak üzere floresans okuyucu için işlem görmüş 96 kuyucuklu plakaya uygulandı. PVA-L-F2, PS-NC-51, PS-NC-250 ve PS-C-300 formülasyonlarının gösterdiği floresans şiddeti 485/20 nm eksitasyon ve 530/25 nm emisyon dalga boylarında; PS-C-50 formülasyonunun gösterdiği floresans şiddeti ise 360/40 nm eksitasyon ve 420/50 nm emisyon dalga boylarında ölçüldü. Floresans şiddeti değerlerinin konsantrasyona karşı grafiği çizildi, doğru denklemi ve determinasyon katsayısı hesaplandı.

3.3.1.2.Kesinlik

Kesinlik tayini için, PS nanopartikül formülasyonlarının (PS-NC-51, PS-NC-250, PS-C-50, PS-C-300) üç farklı konsantrasyonda (40 µg/mL, 20 µg/mL, 10 µg/mL) çözeltileri ve PVA-L-F2 nin üç farklı konsantrasyonda (41,65 µg/mL, 20,83 µg/mL, 10,41 µg/mL) çözeltileri hazırlandı. Çözeltilerin floresansları, floresans okuyucu için işlem görmüş 96 kuyucuklu plakada PVA-L-F2, PS-NC-51, PS-NC-250 ve PS-C-300 formülasyonları için 485/20 nm eksitasyon ve 530/25 nm emisyon dalga boylarında; PS-C-50 formülasyonu için ise 360/40 nm eksitasyon ve 420/50 nm emisyon dalga boylarında okundu. Her konsantrasyon değeri için deney altı kez tekrarlandı. 1. gün için yapılan tüm bu çalışmalar 2. ve 3. günlerde de yapıldı. Üç gün boyunca elde edilen sonuçların ortalamaları alındı, SD ve % CV değerleri hesaplandı.

3.3.1.3.Doğruluk

Kullanılan analitik yöntemin doğruluğunu saptamak için, PS nanopartikül formülasyonlarının (PS-NC-51, PS-NC-250, PS-C-50, PS-C-300) üç farklı konsantrasyonda (40 µg/mL, 20 µg/mL, 10 µg/mL) çözeltileri ve PVA-L-F2 nin üç

farklı konsantrasyonda (41,65 µg/mL, 20,83 µg/mL, 10,41 µg/mL) çözeltileri hazırlandı. Çözeltilerin floresansları, floresans okuyucu için işlem görmüş 96 kuyucuklu plakada PVA-L-F2, PS-NC-51, PS-NC-250 ve PS-C-300 formülasyonları için 485/20 nm eksitasyon ve 530/25 nm emisyon dalga boylarında; PS-C-50 formülasyonu için ise 360/40 nm eksitasyon ve 420/50 nm emisyon dalga boylarında okundu. Her konsantrasyon için deney altı kez tekrarlandı. Elde edilen sonuçlardan doğru denklemi yardımıyla, çözeltilerdeki nanopartikül konsantrasyonu hesaplandı. Yöntemin doğruluğu, değişim katsayısı değeri (% CV) hesaplanarak saptandı.

3.3.1.4. Seçicilik

Yöntem 1.1.4. de anlatıldığı şekilde floresans içermeyen boş PVA nanopartikül formülasyonunun miktar tayini yönteminin seçiciliği saptandı.

3.4. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Hazırlanan PVA nanopartikül formülasyonları üzerinde aşağıda belirtilen karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır.

3.4.1. Nanopartiküllerin Yüzey Özelliklerinin İncelenmesi

Nanoçöktürme yöntemi ile elde edilen PVA nanopartiküllerinin yüzey özellikleri ve şekilleri, kriyojenik transmisyon elektron mikroskobu (cryo-TEM: cryo Transmission Electron Microscopy) ile fotoğrafları çekilerek incelendi.

3.4.2. Partikül Büyüklüğü Dağılım Analizi

Nanoçöktürme yöntemi ile ön çalışmalarda hazırlanan PVA nanopartiküllerinin (PVA-UL-F1, PVA-UL-F2, PVA-UL-F3, PVA-UL-F4, PVA-UL-F5, PVA-UL-F6, PVA-L-F2) partikül büyüklüğü dağılım analizi foton korelasyon spektroskopisi (PCS: Photon Correlation Spectrometer) kullanılarak yapıldı.

PVA nanopartiküllerinin distile su (refraktif indeks: 1,33 , viskozite: $8,90 \times 10^{-4}$ Pa.s) içinde farklı konsantrasyonlarda (0,05 mg/mL, 0,0625 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,125 mg/mL, 0,25 mg/mL) dispersiyonları hazırlandı ve foton korelasyon spektroskopisi kullanılarak nanopartikül büyüklüğü ve dağılımı tayin edildi. Nanopartikül konsantrasyonu, foton korelasyon spektroskopisiyle okunan etkin partikül çapına karşı işaretlendi. Elde edilen eğrinin regresyon katsayısı bulundu. Regresyon katsayısı ortalama partikül büyüklüğü olarak hesaplandı.

3.4.3.Nanopartiküllerin Verimi

Nanoçöktürme yöntemi ile elde edilen PVA nanopartikülleri tartıldı ve aşağıdaki formül (3-2) yardımıyla elde edilen nanopartikül verimleri hesaplandı.

$$\text{Verim (\%)} = \frac{\text{Tartılan miktar (g)}}{\text{Teorik ağırlık (g)}} \times 100 \quad (3-2)$$

3.4.4.Nanopartiküllerin Yüzey Yüklerinin (Zeta Potansiyel) Tayin Edilmesi

PVA nanopartiküllerinin (PVA-UL-F2, PVA-L-F2) ve PS nanopartiküllerinin (PS-NC-51, PS-NC-250, PS-C-50, PS-C-300) yüzey yükleri Zetametre (Alan Gücü: 0-60 kV/m, Elektrod: akrilik destekli palladyum elektrod, İletkenlik Aralığı: 0-20 S/m) kullanılarak 25°C de tayin edildi. Nanopartikül formülasyonları, Calu-3 hücre kültürü çalışma besiyeri ve HBSS ile seyreltildi (% 0,05 a/h) ve zeta potansiyel ölçümleri yapıldı.

3.4.5.Nanopartiküllerin Stabilitesinin İncelenmesi

PVA-UL-F2 nanopartiküllerinin distile su içindeki dispersiyonlarının (% 0,05 a/h) oda sıcaklığındaki stabilitesi, 1. gün, 3. gün, 7. gün, 14. gün ve 30. günde partikül büyüklüklerinin foton korelasyon spektroskopisiyle ölçülmesi suretiyle değerlendirildi.

Ayrıca PVA-L-F2 ve PS nanopartikül dipersiyonlarının stabilitesi Calu-3 hücre kültürü çalışma besiyeri ve HBSS de incelendi. Partikül büyüklüğü ölçümleri 37° C de, 0. saat, 24. saat ve 48. saat sonunda gerçekleştirildi.

4.Hücre Kültürü Çalışmaları

4.1.Hücre Kültürü

Hücre kültürü çalışmalarında, Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu (ATCC: American Type Culture Collection) ndan alınan insan bronş epitel hücresi Calu-3 ve insan alveol epitel hücresi A549 kullanıldı. Her iki hücre grubu da adezif şekilde hücre kültürü erleninde tek tabakalı olarak üreme özelliğine sahiptir. Calu-3 hücreleri, hücre kültürü çalışma besiyeri (working media) olarak 500 mL Dulbeco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12 Ham (1:1) (DMEM), 50 mL fetal sığır serumu (FBS: fetal bovine serum), 5 mL esansiyel olmayan amino asit çözeltisi (x100), 5 mL L-glutamin çözeltisi (200 mM) ve 5 mL penisilin-streptomisin çözeltisi (10000

ünite/mL Penisilin and 10 mg/mL Streptomisin) ile desteklendi. A549 hücreleri çalışma besiyeri olarak 500 mL Minimum Essential Medium (MEM), 50 mL FBS, 5 mL L-glutamin çözeltisi (200 mM) ve 5 mL penisilin-streptomisin çözeltisi (10000 ünite/mL Penisilin and 10 mg/mL Streptomisin) ile desteklendi. Hücreler, nemlendirilmiş % 5 CO₂-% 95 atmosferik hava inkübatöründe 37°C de inkübe edildi. Sıvı azot içinde (-196°C de) saklanan hücre dispersiyonlarını içeren şişeler 25°C de su banyosunda 1-2 dakika bekletildi ve pipet yardımıyla 75 cm² lik hücre kültürü erlenine alınarak üzerine 12 mL besiyeri eklendi. % 85 doyumluğa (confluency) ulaştığı zaman alt kültür (sub-culture) yapıldı ve 162 cm² lik hücre kültürü erlenine ekim yapılarak üzerine 22 mL besiyeri ilave edildi. Calu-3 ve A549 hücreleri çalışma süresince alt kültür diğer ismiyle pasajlama işlemine tabi tutuldu. Kullanılan Calu-3 hücrelerinin pasaj numaraları 32-54 ve A549 hücrelerinin pasaj numaraları ise 115-119 dur. Hücre kültürü çalışma besiyeri 48 saatte bir değiştirildi. Hücreler her hafta 1:3 bölünme oranında 5 mL tripsin : EDTA çözeltisi (% 0,25) ile pasajlandı.

4.2.Hücrelerin Mikroskopik Sayımı

Calu-3 hücreleri ve A549 hücreleri, pasajlama işlemi öncesi, toksisite çalışmalarında 96 kuyucuklu plakaya ekilmeden önce, radyoaktif mannitol geçiş çalışmalarında, nanopartikül geçiş çalışmalarında ve hücre içi alım çalışmalarında ise Transwell geçirgen hücre kültürü destek kabına ekilmeden önce doğrudan mikroskopik sayıma tabi tutuldu; toplam canlı ve ölü hücre sayıları belirlendi. İlk olarak buzdolabından alınan fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS: phosphate buffered saline), tripsin-EDTA çözeltisi ve hücre kültürü çalışma besiyeri 37°C ye ulaşana dek su banyosunda bekletildi. İnkübatörden alınan hücre kültürü erleni mikroskop altına yerleştirilerek kontaminasyon taşımadığı, adezifliği ve doyumluğu kontrol edildi. Sınıf-II mikrobiyolojik güvenlik kabini altında açılan erlenden hücre kültürü süspansiyonu erlen tabanına değmeden dikkatlice pipet yardımıyla uzaklaştırıldı. Erlenin içi 2 kez 10 mL PBS ile yıkandı ve ardından 5 mL tripsin-EDTA çözeltisi ilave edildi. Erlen inkübatörde 37°C de 100 devir/dakika hızda 30 dakika süreyle bekletilerek adezif haldeki hücrelerin erlen tabanından ayrılması sağlandı. 10 mL hücre kültürü çalışma besiyeri ilave edildi ve tripsininin etkisi durduruldu. Hücre süspansiyonu bir santrifüj tüpüne aktarıldı ve 1500 devir/dakika hızda 25 °C de 4250 dönme hareketinde (rotor) 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Üstte toplanan sıvı çalışma kabini altında

uzaklaştırıldı ve dipte toplanan hücre pelleti 10 mL besiyeri ile resüspande edilerek dikkatlice karıştırıldı. Elde edilen hücre süspansiyonundan 100 µL bir ependorf tüpe aktarıldı ve üzerine 100 µL tripan mavisini çözeltisi (% 0,4 a/h) eklenerek iyice karıştırıldı (seyreltme faktörü =2). Neubauer tip hücre sayıcı (hemasitometre) lamı üzerine lamel yerleştirildi (Şekil 8) ve oluşan dairecekler kenarlarından yaklaşık 5-10 µL hücre süspansiyonu ile kapiler etkiyle dolduruldu (Şekil 9). Işık mikroskobu altında, hücre sayıcı lamı oluşturan dört karenin kenar çizgileri hariç üzerlerindeki hücreler sayıldı (Şekil 10) Yaşayan hücreler parlak ve renksiz görülürken ölü hücreler maviye boyandı (Şekil 10). Hücre sayımının doğru ve kesin bir şekilde yapılabilmesi için ideal olarak her işlemde 200 ve üzeri hücre sayıldı. Yaşayan hücrelerin konsantrasyonunu hesaplamak için aşağıdaki formül kullanıldı:

$$\text{Yaşayan Hücre Konsantrasyonu (hücre/mL)} = A \times B \times C$$

A: Sayılan yaşayan hücre sayısının ortalaması (4 karede sayım yapıldığından toplam sayı dörde bölünerek ortalama sayı tespit edilir)

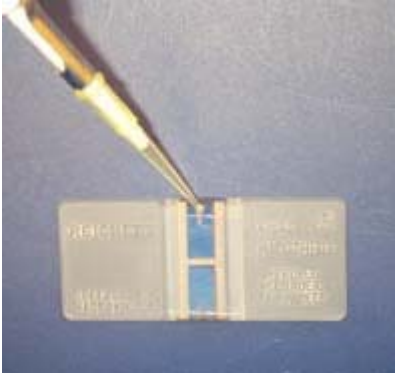
B: Seyreltme faktörü = 2 (Hücre süspansiyonu eşit hacim tripan mavisini çözeltisiyle karıştırıldığından 2 olarak alınır)

C: Düzeltme faktörü = 10^4

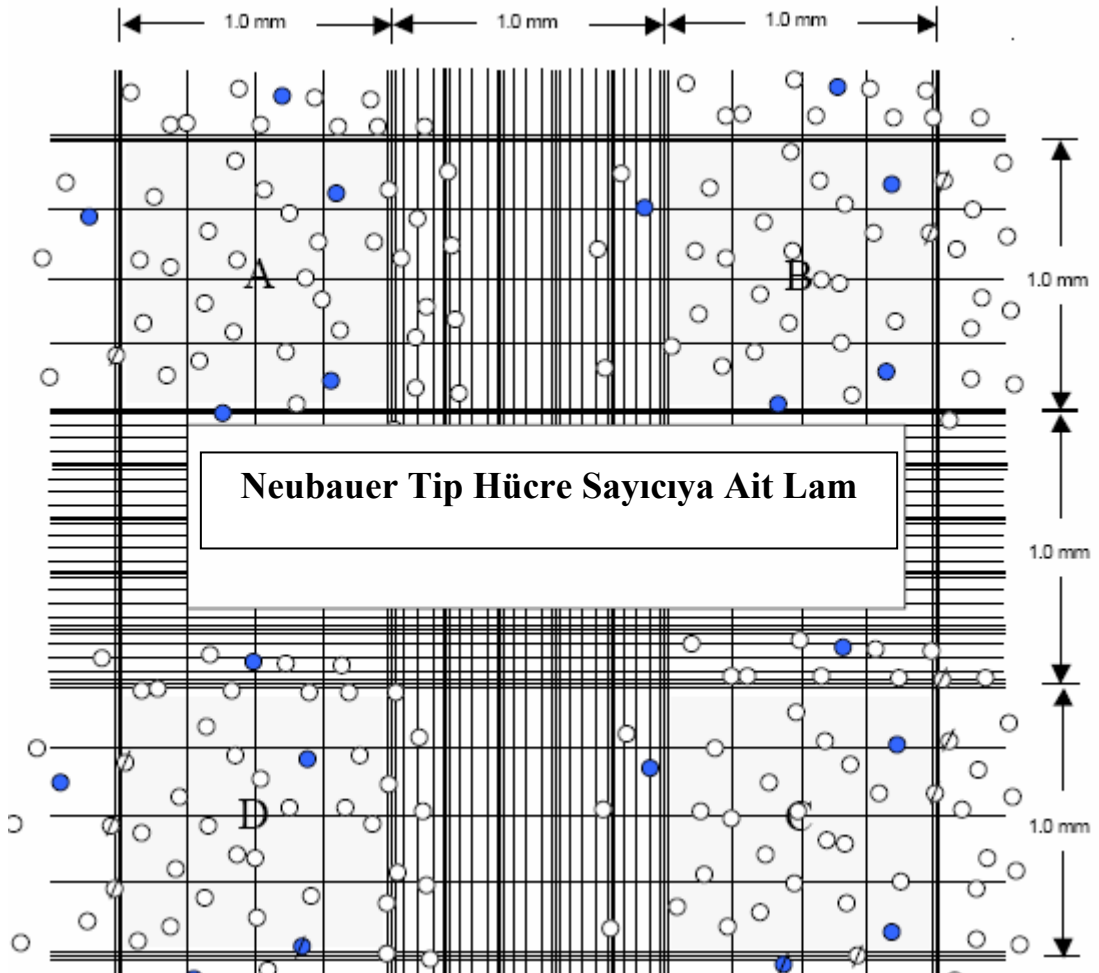
Yaşayan hücre konsantrasyonu hesaplandıktan sonra orijinal hücre süspansiyonu, hücre kültürü çalışmalarında istenilen konsantrasyonlara hücre kültürü çalışma besiyeri kullanılarak seyreltildi.



Şekil 8 : Hemasitometreye ait şekil



Şekil 9 : Hemasitometreye hücre kültürü süspansiyonunun uygulanmasına ait şekil



Şekil 10 : Neubauer tip hücre sayıcıya (hemasitometre) ait lam [A, B, C, D olarak işaretlenmiş 1 mm² lik dört adet kare üzerindeki parlak renksiz hücreler sayılır. Mavi renkteki daireler ölü hücreleri göstermektedir. Karelerin orta kenar çizgileri üzerine düşen hücreler de sayım işlemine tabi tutulurken diğer kenardakiler (Ø şeklinde gösterilen daireler) sayılmaz.]

4.3.Toksisite Çalışmaları

Toksisite çalışmalarında *in vitro*, 3-[4,5-Dimetiltiazol-2il]-2,5-difenil tetrazolyum bromid (MTT) yöntemi kullanıldı. Bu test, yaşayan hücrelerde mitokondriyal süksinat dehidrojenazın, sarı tetrazolyum tuzu MTT yi mor renkli formazana indirgemesine dayanan kolorimetrik bir yöntemdir. Hücre yaşayabilirliği, mitokondriyal dehidrojenaz aktivitesi ölçülerek tespit edilmektedir.

4.3.1. MTT Yönteminin Validasyonu

Doğru, kesin ve tekrar edilebilir sonuçlara ulaşmak amacıyla MTT yöntemi valide edildi. Absorbans ve yaşayan hücre sayısı arasındaki doğrusal ilişkiyi göstermek üzere Calu-3 ve A549 hücrelerine ait kalibrasyon eğrileri çizildi. Validasyon çalışması ile absorbanstaki artışın yaşayan hücre sayısı ile orantılı olduğu ispatlandı.

Hücre kültürü için işlem görmüş 96 kuyucuklu plakanın, plakanın kenarlarında yer alan kuyucuklar içindeki sıvının buharlaşma riskine karşı kenar kuyucukları hariç kalan 60 kuyucuğuna 100 µL besiyeri uygulandı. 5×10^5 hücre/mL konsantrasyonunda stok hücre süspansiyonu hazırlandı ve plakanın soldan uygulama yapılacak ilk kolonundaki kuyucukların her birine 200 µL hücre süspansiyonu uygulandı. Daha sonra plakanın ilk kolonundaki kuyucuklardaki hücre süspansiyonundan, çok uçlu pipet vasıtasıyla 100 µL alındı ve bir yan kolona aktararak mevcut besiyeri ile iyice karıştırıldı. İşleme plakanın sırayla kalan kolonlarındaki besiyerinin giderek seyreltilen hücre süspansiyonun ilave edilmesiyle devam edildi. Çok uçlu pipet yardımıyla yapılan seri seyreltmelerle plakanın son kolonuna (sadece besiyeri içeren kontrol kolonu) geldiğinde işleme son verildi. Plaka, % 5 CO₂ içeren inkübatörde 37°C de 24 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda, çalışma kabini altında daha önceden 0,2 µm por çaplı membran filtreden geçirilerek sterilize edilmiş MTT çözeltisinden (0,5 mg/mL) her bir kuyucuğa 50 µL ilave edildi ve 4 saat süreyle inkübatörde bekletildi. Plaka süre sonunda inkübatörden çıkarıldı ve hücre kaybına izin vermeden kuyucukların içindeki hücre süspansiyonu-MTT karışımı çok hassas bir şekilde uzaklaştırıldı. Herbir kuyucuğa, 1:1 oranındaki dimetilformamid: distile su içinde çözündürülmüş Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) çözeltisinden (%10 a/h) 100 µL ilave edildi. Plaka, % 5 CO₂ içeren inkübatörde 37°C de 24 saat inkübe edildi. Süre bitiminde spektrofotometreye (SpectraMax) yerleştirilen plakadan 570 nm dalga boyunda okuma yapıldı. Referans dalga boyu olarak 650 nm seçildi. Her bir noktaya ait absorbans değerleri yazıldı.

Bulunan değerlerden arka plan (background) absorbans değerleri çıkarılarak gerçek absorbans değerleri elde edildi. Grafikte hücre sayısına karşı gelen absorbans değerleri işaretlenerek kalibrasyon eğrisi çizildi. Herbir hücre grubu için deney dört farklı ve bağımsız plaka üzerinde, her bir konsantrasyon her plaka üzerinde altı kuyucuk üzerinde tekrarlandı (n=4x6).

4.3.2. MTT Yöntemi ile PVA ve PS Nanopartikül Formülasyonlarının Akciğer Hücreleri Yaşayabilirliği Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi

PVA nanopartikül formülasyonlarının (PVA-NC-UL, PVA-NC-L) ve PS nanopartikül formülasyonlarının (PS-C-50, PS-NC-51, PS-NC-250, PS-C-300), PVA nanopartiküllerinin hazırlanmasında kullanılan stabilite arttırıcı polimer karışımının ve toksik etkisi bilinen bakır nanopartiküllerinin Calu-3 ve A549 hücreleri yaşayabilirliği üzerine etkileri, MTT yöntemi ile incelendi. Test süspansiyonları olarak PVA ve PS nanopartikül formülasyonlarının 7 farklı konsantrasyonu (0,1 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL, 5 mg/mL, 10 mg/mL); PVA nanopartiküllerinin hazırlanmasında kullanılan stabilite arttırıcı polimer karışımının (polivinilalkol-polivinilpirolidon K15) 8 farklı konsantrasyonu (0,001 g/mL, 0,01 g/mL, 0,05 g/mL, 0,1 g/mL, 0,15 g/mL, 0,2 g/mL, 0,25 g/mL, 0,3 g/mL) ve toksik etkisi bilinen bakır nanopartiküllerinin 7 farklı konsantrasyonu (0,001 µg/mL, 0,01 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,5 µg/mL, 1 µg/mL, 10 µg/mL, 40 µg/mL) kullanıldı.

1×10^5 hücre/mL konsantrasyonunda stok hücre süspansiyonu hazırlandı ve hücre kültürü için işlem görmüş 96 kuyucuklu plakanın, buharlaşma riskine karşı kenar kuyucukları hariç kalan 60 kuyucuğunun her birine stok çözeltilerden seyreltilerek hazırlanan 1×10^4 hücre içeren 100 µL hücre süspansiyonu ekildi. Plaka, % 5 CO₂ içeren inkübatörde 37°C de 24 saat inkübe edildi. Tüm test edilecek formülasyonlar ve kontrol çözeltileri önceden 37 °C'ye getirilmiş %2 FBS içeren hücre kültürü çalışma besiyeri ile hazırlandı. 24 saat inkübasyondan sonra kuyucukların içindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve plakanın kuyucuklarına, 100 µL test süspansiyonu (n=6) veya negatif kontrol olarak 100 µL, %2 FBS içeren hücre kültürü çalışma besiyeri (n=6) ya da pozitif kontrol olarak 100 µL, %2 SDS çözeltisi (n=6) uygulandı. 37 °C de, %5 CO₂ ortamda 24 saat süreyle inkübe edildi. Süre sonunda her bir kuyucuğa, fosfat tamponlu tuz çözeltisi (pH=7,3) içindeki 50 µl MTT (0.5 mg/mL) ilave edildi ve 4 saat daha inkübe edildi. İnkübasyon sonunda oluşan formazan kristallerini yerlerinden

oyunmaksızın kuyucuklardaki çözelti dikkatlice uzaklaştırıldı ve her bir kuyucuğa , 1:1 oranındaki dimetilformamid: distile su içinde çözündürülmüş sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisinden (%10 a/h) 100 µL ilave edildi. Plaka, % 5 CO₂ içeren inkübatörde 37°C de 24 saat inkübe edildi (Şekil 11). Süre bitiminde spektrofotometreye (SpectraMax) yerleştirilen plakadan 570 nm dalga boyunda okuma yapıldı. Referans dalga boyu olarak 650 nm seçildi. Her bir noktaya ait absorbans değerleri yazıldı. Bulunan değerlerden arka plan (background) absorbans değerleri çıkarılarak gerçek absorbans değerleri elde edildi. Hiçbir test maddesi eklenmeyen kontrol kültürlerinden elde edilen absorbans değerlerinin ortalaması alınarak bu değer % 100 kabul edildi. Test maddesi uygulanmış olan kültürlerden elde edilen absorbans değerleri ve kontrol absorbans değerlerinden sırayla SDS çözeltisinin gösterdiği absorbans çıkarıldı. Bulunan değerler birbirine oranlandı ve onun yüzdesi % hücre yaşayabilirliği olarak hesaplandı. Her bir test grubu için deney üç farklı ve bağımsız plaka üzerinde, her bir konsantrasyon her plaka üzerinde altı kuyucuk üzerinde tekrarlandı (n=3x6).



Şekil 11 : MTT yönteminde SDS çözeltisi ilavesinden sonra 24 saat inkübe edilmiş 96 kuyucuklu plakaya ait fotoğraf

4.4. Transepitel Elektrik Direnci (TER: Transepithelial Electrical Resistance) Ölçümü

PVA ve PS nanopartikül formülasyonlarının (PVA-UL-F2, PVA-L,F2, PS-NC-51, PS-NC-250, PS-C-50, PS-C-300) transepitel elektrik direnci (TER) ölçümü ile hücre bütünlüğü üzerine etkileri araştırıldı.

TER ölçümü şerit şeklindeki gümüş klorür çubuk elektrodlar ve EVOM voltometre ile hava-sıvı arayüzey kültür koşullarında (air-liquid interfaced cell culture) 9-11 gün süreyle kültür edilmiş Calu-3 hücreleri üzerinde gerçekleştirildi (Şekil 12). Calu-3 hücreleri, $2,24 \times 10^5$ hücre/mL konsantrasyonda Transwell geçirgen hücre kültürü destek kabının apikal bölümüne ekildi. Ekimden 2 gün sonra hava-sıvı arayüzey koşullarını sağlamak üzere apikal bölümdeki besiyeri uzaklaştırıldı ve hücrelerin inkübasyon süresi boyunca sadece bazolateral bölümdeki besiyeri değiştirildi.

Test edilen nanopartikül formülasyonlarının HBBS içinde hazırlanan 4 farklı konsantrasyonunun (1 mg/mL, 5 mg/mL, 10 mg/mL) ve kontrol çözeltisi olarak HBSS in hücre üzerine etkisi incelendi. Her bir konsantrasyon 12 kuyucuklu Transwell geçirgen hücre kültürü destek kabının 3 kuyucuğunda test edildi (n=3). TER ölçümüne geçmeden önce, hücre kültürü destek kabının apikal ve bazolateral bölümleri sırasıyla 500 μ L ve 1500 μ L HBSS ile yıkandı ve denge halinin sağlanması için HBSS ile 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra HBSS uzaklaştırıldı ve apikal bölüme 510 μ L test örneği, bazolateral bölüme 1500 μ L taze HBSS ilave edildi. Hücrelerin gösterdiği transepitel elektrik direnci takip eden 4 saat boyunca aralıklarla (30. dakika, 60. dakika, 120. dakika, 180. dakika, 240. dakika) ölçüldü. TER ölçümünde voltometreye bağlı çubuk elektrodların kısa bacağı apikal bölüme daldırılırken, uzun bacağı bazolateral bölümde tutularak okuma yapıldı. TER, Transwell geçirgen hücre kültürü destek kabı yüzey alanına göre hesaplandı. TER hesaplamasında kullanılan formül aşağıda verildi:

A= t_0 anında okunan TER değeri – hücre ekilmemiş membran filtrenin elektrik direnci

B= t_1 anında okunan TER değeri – hücre ekilmemiş membran filtrenin elektrik direnci

C= kontrol (HBSS) TER değeri

D= t_1 anındaki gerçek TER değeri = $\frac{B}{A}$

C

% TER ($\Omega \cdot \text{cm}^2$)= D (Ω) x Alan (cm^2) x 100



Şekil 12 : Transepitel elektrik direncini ölçen çubuk elektrodla sahip EVOM voltmetreye ait şekil (STX-2 and Evom G, World Precision Instruments, Stevenage, UK)

4.5. İnsan Bronş Hücrelerinin [¹⁴C]- Mannitol Geçirgenliği

PVA ve PS nanopartikül formülasyonlarının (PVA-UL-F2, PVA-L,F2, PS-NC-51, PS-NC-250, PS-C-50, PS-C-300), [¹⁴C]-Mannitol geçirgenlik çalışmaları ile hücre bütünlüğü üzerine etkileri araştırıldı. [¹⁴C]-radyoaktif işaretlenmiş mannitol konsantresi, HBSS ile seyreltilerek $8.176 \times 10^{-3} \mu\text{mol/mL}$ (spesifik aktivitesi: 2.26 GBq / mmol) konsantrasyonda geçirgenlik çalışmasında kullanıldı.

Yöntem 4.4. de anlatıldığı şekilde Calu-3 hücreleri hava-sıvı arayüzey koşullarında $2,24 \times 10^5$ hücre/mL konsantrasyonda 9-11 gün süreyle kültür edildi.

Test edilen nanopartikül formülasyonlarının HBBS içinde hazırlanan 4 farklı konsantrasyonunun (1 mg/mL, 5 mg/mL, 10 mg/mL) ve kontrol çözeltisi olarak HBSS in hücre üzerine etkisi incelendi. Her bir konsantrasyon 12 kuyucuklu Transwell geçirgen hücre kültürü destek kabının 3 kuyucuğunda test edildi (n=3). [¹⁴C]- Mannitol geçirgenlik çalışmasında ilk olarak, hücre kültürü destek kabının apikal ve bazolateral bölümleri sırasıyla 500 μL ve 1500 μL HBSS ile yıkandı ve denge halinin sağlanması için HBSS ile 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra HBSS uzaklaştırıldı. Bazolateral bölüme 1500 μL taze HBSS ve apikal bölüme 510 μL test çözeltisinin $t=0$ 'da apikal bölüme uygulanmasıyla geçiş çalışması başlatıldı. Mannitol geçişi apikal yönden bazolateral bölüme doğru ölçüldü. İlk 1 dakika içinde herbir kuyucuğun apikal (donor) bölümünden 10 μL test çözelti örneği başlangıç apikal konsantrasyonunu (C_0) tespit etmek üzere alındı. Geçiş çalışmaları, 37 °C nemlendirilmiş %95 hava %5 CO₂ inkübatöründe karıştırma hareketi uygulanmaksızın gerçekleştirildi. 30. dakika, 60. dakika, 120. dakika, 180. dakika sonunda 500 μL örnek bazolateral bölümden alındı ve

yerine 37 °C'deki 500 µL HBSS ilave edildi. Takiben hücreler, 37 °C nemlendirilmiş %95 hava %5 CO₂ inkübatör ortamına döndürüldü. Son örnek alma zamanı olan 240. dakikada, Transwell geçirgen hücre kültürü destek kabının apikal ve bazolateral bölümlerinden sırasıyla 10 µL ve 500 µL örnek alındı. Alınan 10 µL örnek son apikal konsantrasyonunu hesaplamada kullanıldı. Hücrelerin TER değeri, şerit şeklindeki gümüş klorür çubuk elektrodlar ve EVOM voltmetre ile her örnek alma zamanında ve geçirgenlik çalışması bitiminde ölçüldü.

Toplanan radyoaktif işaretli örneklere (500 µL), 5 mL Ready Protein™ ışıma (sintilant) kokteyli ilave edildi ve sıvı ışıma (sintilasyon) sayacı (Şekil 13) ile analiz edildi.

P_{app} değerine ulaşmak amacıyla bazolateral bölümdeki kümülatif mannitol miktarı, nanopartikül konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak hesaplandı.

Calu-3 hücrelerinin mannitol geçirgenliği aşağıdaki formül (3-3) kullanılarak bulundu:

$$P_{app} = \frac{dQ/dt}{AC_0} \quad (3-3)$$

dQ/dt (mol.s⁻¹) geçiş hızıdır ve her bir örnek alma zamanında bazolateral bölümdeki ilaç (radyoaktif mannitol ile işaretlenmiş nanopartikül) artışının bir göstergesidir. A (cm²) Transwell geçirgen hücre kültürü destek kabının yüzey alanını, C_0 (mol.cm⁻³) ise apikal bölümdeki başlangıç konsantrasyonunu ifade eder.



Şekil 13 : Sıvı ışıma sayacına ait şekil (Multi-Purpose Liquid Scintillation Counter LS 6500) (Beckman Coulter, USA)

4.6.Nanopartiküllerin İnsan Bronş Epitel Hücrelerinden (Calu-3) Geçiş Çalışmaları

Ön nanopartikül geçiş çalışmalarında, Transwell geçirgen hücre kültürü destek kabı filtresinin oluşturabileceği bariyer etkisinin kaldırılması amacıyla farklı por büyüklüklerine (0,4 μm , 1 μm , 3 μm) sahip filtreler kullanılarak, aralarından nanopartikül geçişine etki etmeyen filtre seçildi. Bu şekilde geçişe etki eden diğer faktörler elimine edilerek, hücrenin nanopartikül geçişine etkisi tek başına değerlendirildi. Transwell geçirgen hücre kültürü destek kabının apikal-bazolateral bölümlerine uygulanan hacimler, 0,4 μm , 1 μm , 3 μm por büyüklüğüne sahip filtrelerle çalışırken sırasıyla, 500 μL -1500 μL , 100 μL -600 μL , 1500 μL -2600 μL olarak belirlendi. Ön çalışmalar neticesinde, 1 μm por büyüklüğüne sahip Transwell geçirgen hücre kültürü destek kabı filtresi nanopartikül geçiş çalışmaları için seçildi.

Yöntem 4.4. de anlatıldığı şekilde Calu-3 hücreleri hava-sıvı arayüzey koşullarında $2,24 \times 10^5$ hücre/mL konsantrasyonda 9-11 gün süreyle kültür edildi.

Nanopartiküllerin Calu-3 hücrelerinden geçiş çalışmasında, PVA ve PS nanopartiküllerinin (PVA-UL-F2, PVA-L,F2, PS-NC-51, PS-NC-250, PS-C-50, PS-C-300), HBBS içinde hazırlanan 5 mg/mL konsantrasyondaki süspansiyonlarının ve kontrol çözeltisi olarak HBSS in hücre üzerine etkisi incelendi. Her bir test örneği 12 kuyucuklu 1 μm por çapına sahip Transwell geçirgen hücre kültürü destek kabının 3

kuyucuğunda test edildi (n=3). Hücre kültürü destek kabının apikal ve bazolateral bölümleri sırasıyla 100 µL ve 600 µL HBSS ile yıkandı ve denge halinin sağlanması için HBSS ile 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra HBSS uzaklaştırıldı. Bazolateral bölüme 600 µL taze HBSS ve apikal bölüme 110 µl test çözeltisinin $t=0$ da apikal bölüme uygulanmasıyla nanopartikül geçiş çalışması başlatıldı (Şekil 14). Nanopartikül geçişi apikal yönden bazolateral bölüme doğru ölçüldü. İlk 1 dakika içinde herbir kuyucuğun apikal (donor) bölümünden 10 µl test çözelti örneği başlangıç apikal konsantrasyonunu (C_0) tespit etmek üzere alındı. Geçiş çalışmaları, 37 °C nemlendirilmiş %95 hava %5 CO₂ inkübatöründe 100 devir/dakika hızda karıştırma hareketi uygulanarak gerçekleştirildi. 4. saat ve 8. saat sonunda 100 µL örnek bazolateral bölümden alındı ve yerine 37 °C'deki 100 µL HBSS ilave edildi. Takiben hücreler, 37 °C nemlendirilmiş %95 hava %5 CO₂ inkübatör ortamına döndürüldü. Son örnek alma zamanı olan 24. saatte, Transwell geçirgen hücre kültürü destek kabının apikal ve bazolateral bölümlerinden sırasıyla 10 µL ve 100 µL örnek alındı. Alınan 10 µL örnek son apikal konsantrasyonunu hesaplamada kullanıldı. Hücrelerin TER değeri, şerit şeklindeki gümüş klorür çubuk elektrodlar ve EVOM voltmetre ile her örnek alma zamanında ve geçirgenlik çalışması bitiminde ölçüldü. Apikal ve bazolateral bölümden alınan örneklerin konsantrasyonunu saptamak amacıyla, örneklerin floresans şiddeti Cytofluor plaka okuyucuda ölçüldü. PVA-L-F2, PS-NC-51, PS-NC-250 ve PS-C-300 formülasyonlarının gösterdiği floresans 485/20 nm eksitasyon ve 530/25 nm emisyon dalga boylarında; PS-C-50 formülasyonunun gösterdiği floresans şiddeti ise 360/40 nm eksitasyon ve 420/50 nm emisyon dalga boylarında okundu. PVA ve PS nanopartikül formülasyonlarına ait Yöntem 3.3.1.1. de anlatıldığı şekilde elde edilen konsantrasyon- floresans şiddeti grafikleri kullanıldı. % Geri kazanım ve % nanopartikül geçişi aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplandı.

$A = t_1$ anında apikal nanopartikül konsantrasyonu + t_1 anında bazolateral nanopartikül konsantrasyonu

$B = t_0$ anında apikal nanopartikül konsantrasyonu

$C = t_1$ anında bazolateral nanopartikül konsantrasyonu

% Geri kazanım = $A / B \times 100$

% Nanopartikül geçişi = $C / A \times 100$



Şekil 14 : Floresanslı nanopartikül nanopartikül geçiş çalışmalarında kullanılan herbir kuyucuğu 12 mm çapında 1,12 cm² membran büyüme alanına sahip hücre kültürü çalışmaları için işlem görmüş 12 kuyucuklu Transwell geçirgen hücre kültürü destek kabına ait fotoğraf

4.7.Nanopartikül Akciğer Hücreleri İçine Alım Çalışmaları

PVA ve PS nanopartikül formülasyonlarının (PVA-UL-F2, PVA-L,F2, PS-NC-51, PS-NC-250, PS-C-50, PS-C-300), Calu-3 hücreleri ve A549 hücreleri nanopartikül hücre içi alım çalışmaları konfokal lazer taramalı mikroskop (Şekil 15) kullanılarak gerçekleştirildi .

Yöntem 4.4. de anlatıldığı şekilde Calu-3 hücreleri hava-sıvı arayüzey kültür koşullarında $2,24 \times 10^5$ hücre/mL konsantrasyonda kültür edildi. Ayrıca, Calu-3 ve A549 hücreleri, hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılmış (submerged) kültür koşullarında lamel üzerine $2,24 \times 10^5$ hücre/mL konsantrasyonda ekildi. Bu kültür koşulunda hücrelerin içinde bulunduğu besiyeri 2 günde bir değiştirildi. Hücre süspansiyonu, hava-sıvı arayüzey koşullarında Transwell geçirgen hücre kültürü destek kabının apikal bölümüne 500 μ L ve hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılmış kültür koşullarında lamel üzerine 2000 μ L olarak uygulandı. Her iki hücre grubu da 9 gün süreyle 37°C'de 5% CO₂ ortamında inkübe edildi.

Hücreler, HBSS ile 3 kez yıkandı ve 37°C'de 2 saat süreyle 5 mg/mL nanopartikül formülasyonu ile inkübe edildi. 2 saat inkübasyondan sonra serbest haldeki nanopartiküller HBSS ile 3 kez yıkanarak uzaklaştırıldı. Hücreler, 100 μ L formaldehit çözeltisiyle (% 3,7 h/h) 10 dakika 37 °C'de inkübasyonla sabitlendi . Hücreler HBSS ile

tekrar 3 kez yıkandı ve 100 µL Triton X-100 (% 0.01 h/h) ile 10 dakika süreyle muamele edildi. Calu-3 hücreleri ile çalışıldığında, Calu-3 hücrelerinin yüzeyinden mukus tabakasını uzaklaştırmak için hücreler 37 °C'de 500 µL HBSS ile 1 gece süreyle inkübe edildi. Hücreler bir kez daha HBSS ile yıkandıktan sonra, hücre çekirdeğini boyamak üzere 10 dakika 100 µL 4', 6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) (1 µg/mL) ya maruz bırakıldı. Takiben, hücre membranını boyamak üzere hücreler, 100 µL FM[®] 4-64 FX boyasıyla (kırmızı fluoresenanslı sabit lipofilik stilil boyası) (5 µg/mL) 10 dakika süreyle muamele edildi. HBSS ile son bir yıkamanın ardından hücre tabakasını içeren Transwell geçirgen hücre kültürü destek kabı filtresi, plastik tutucu kısımdan bir neşter yardımıyla kesilerek ayrıldı ve 2 damla FluorSave ajanı damlatılarak lamel üzerine yerleştirildi. Hücreler, besiyeri içine daldırılmış koşullarda ekildikleri ortam olan lamdan ise direk olarak FluorSave ajanı damlatılmış lamel üzere yerleştirildi.

Hücreler, 205 nm, 488 nm and 543 nm lazer eksitasyon dalga boyları kullanılarak konfokal lazer taramalı mikroskop ile görüntülendi. DAPI (emisyon dalga boyu $\lambda= 430-480$ nm), KF (emisyon dalga boyu $\lambda= 517$ nm) ve FM[®] 4-64FX (emisyon dalga boyu $\lambda= 565-744$ nm) floresans emisyonları farklı kanallarda toplandı ve görüntüler 63x büyütme faktörü kullanılarak elde edildi. Her bir taramadan elde edilen görüntü, yazılımda (LCS Lite, Leica Confocal Software, Leica GmbH, Germany) mavi (DAPI), yeşil (KF) ve kırmızı (FM[®] 4-64FX) renkler üst üste yerleştirilerek çok renkli görüntü elde etmek üzere renklendirildi.



Şekil 15 : Konfokal lazer taramalı mikroskoba ait fotoğraf

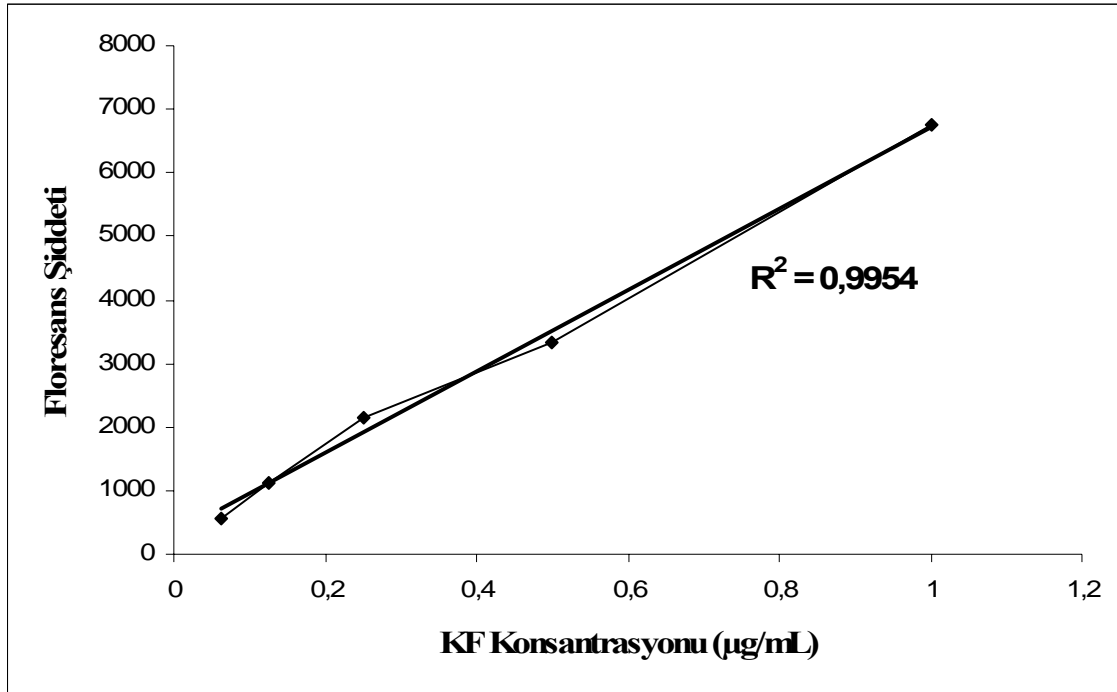
BULGULAR

1. 5(6)-Karboksifloressein Miktar Tayinine Ait Bulgular

1.1.Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu

1.1.1.Doğrusallık

KF Yöntem 1.1.1. de anlatıldığı şekilde çalışılarak elde edilen standart eğrisi (Şekil 16) ve bu eğriye ait doğru denklemi ile determinasyon katsayısı aşağıda verilmiştir. Tablo 4 de ise elde edilen ortalama floresans şiddeti değerleri (y), standart sapma (SD) ve % değişim katsayısı (%CV) sonuçları özetlenmiştir.



Şekil 16 : KF nin florometrik yöntemine ait standart eğrisi

$$y=64179 x + 299,99$$

x: Konsantrasyon y: Floresans Şiddeti

$$R^2= 0,9954$$

R²: Determinasyon katsayısı

Tablo 4 : KF standart eğrisine ait bulgular

Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Floresans	SD (\pm)	CV (%)
1	6742,73	159,29	2,36
0,5	3344,37	57,89	1,73
0,25	2156,18	27,98	1,30
0,125	1125,93	50,6	4,49
0,0625	565,37	16,58	2,93

1.1.2.Kesinlik

Yöntem 1.1.2. de açıklandığı gibi çalışılarak 3 farklı konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerin 3 gün süresince yapılan ölçümleri sonucu elde edilen değerlere ait gün içi değişim katsayısının (%CV) % 0,68 ve günler arası %CV nin % 1,57 olduğu saptandı.

1.1.3.Doğruluk

Farklı konsantrasyondaki KF miktar tayini için, yöntem 1.1.3. de anlatıldığı şekilde çalışılarak yöntemin doğruluğu saptandı. Her konsantrasyon için geri kazanma değeri (%), standart sapma (SD) ve değişim katsayısı (%CV) değerleri Tablo 5 de verilmiştir.

Tablo 5 : KF nin miktar tayininde kullanılan yöntemin doğruluğuna ait bulgular

Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Geri Kazanma (%)	SD (\pm)	CV (%)
1	100,64	23,51	0,35
0,5	95,95	30,16	0,89
0,125	106,43	16,89	1,46

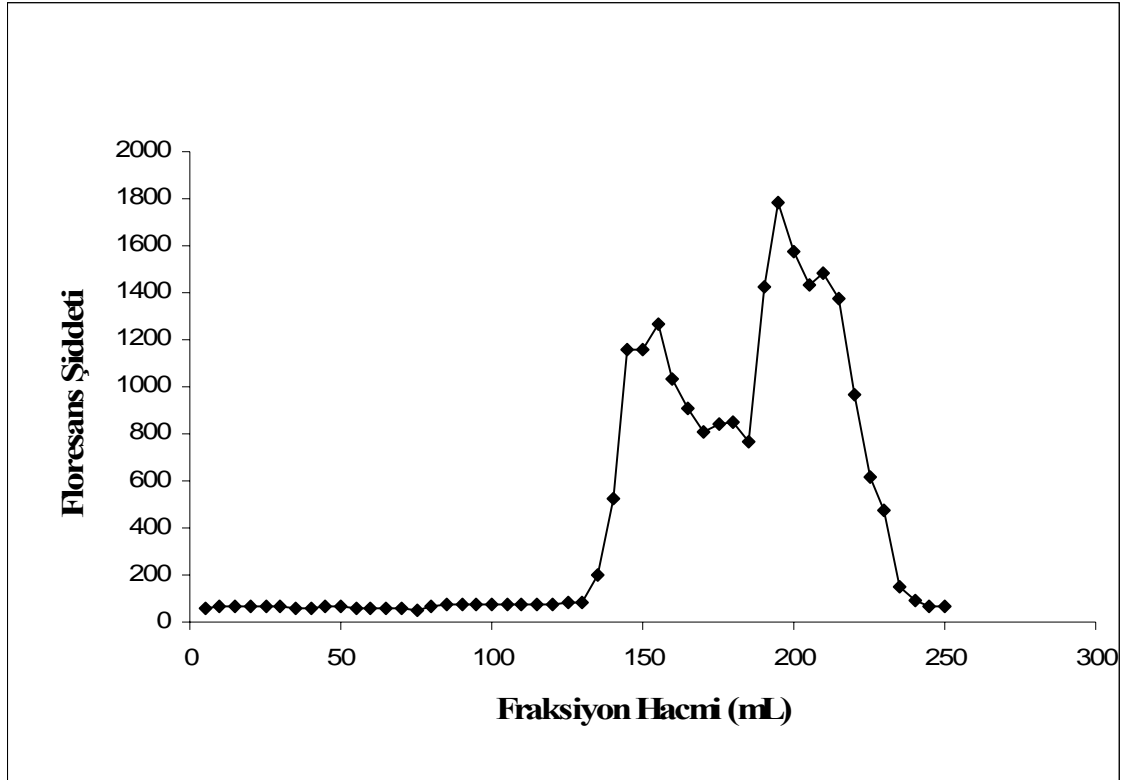
1.1.4.Seçicilik

Yöntem 1.1.4. de belirtildiği gibi çalışılarak PVA nanopartikül formülasyonlarında kullanılan maddelerin, KF nin, N-metil-2-pirolidon: HBSS ile 485/20 nm eksitasyon ve 530/25 nm emisyon dalga boylarında verdiği bir değer göstermedikleri saptandı.

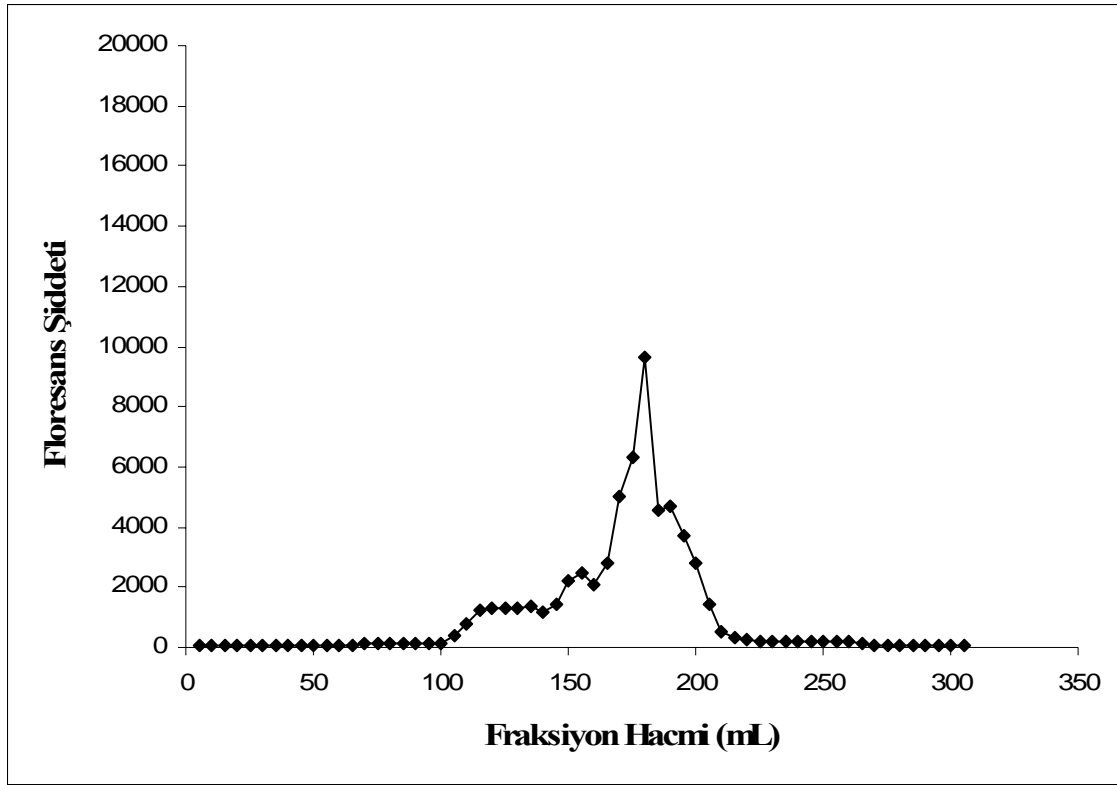
1.2.PVA nın KF ile İşaretlenmesine Ait Bulgular

KF ile kovalan bağla bağlanmış PVA nın etkin bir şekilde ayrılmasını sağlamak üzere ilk olarak ayırma kolonu Sephadex LH-20 den saf haldeki KF geçirilerek kolonda gösterdiği davranış araştırıldı. Bu incelemede, ayırma işleminde kullanılan çözücü karışımı olan 90:10 oranındaki metanol:su bir sonraki aşama ile aynı çalışma koşullarını sağlamak üzere sabit tutuldu. 90:10 metanol: su karışımı ile şişirilmiş Sephadex LH-20 kolondan geçirilen 0,5 mg/mL, 2 mg/mL, 4 mg/mL, 20 mg/mL saf KF, toplanan ilk 120 mL lik fraksiyonda anlamlı floresans göstermezken; 120 mL den sonraki fraksiyonların floresans değerleri artış gösterdi. Bu artış, saf haldeki KF nin, işaretlenmiş polimerden ilk 120 mL den sonra uzaklaştırılacağını ortaya çıkardı. Ayrıca farklı konsantrasyonlardaki KF nin kolondan geçirilmesi ile elde edilen grafiklerden,konsantrasyonun KF nin Sephadex LH-20 den ayrılması üzerinde etkili bir faktör olmadığı tespit edildi. Kolonda işaretli polimerin ayrılma işlemine geçmeden önce saf haldeki PVA da kolondan geçirildi. 90:10 metanol: su karışımında çözüldürülmüş 25 mg/mL ve 100 mg/mL PVA sırayla Sephadex LH-20 den geçirildi ve fraksiyon hacimlerine karşı elde edilen floresans değerlerini gösteren grafikteki pik dağılımlarındaki düzensizliklerden hareketle kolondan geçen miktarın arttırılmasıyla ayırma kalitesinin azaldığı kararına varıldı. Bu bağlamda, kolonu doyunluğa ulaştırmayacak şekilde her bir ayırmada yaklaşık 60 mg PVA nın uygulanmasının uygun olacağı sonucuna varıldı. Bu iki ön araştırma sayesinde işaretli polimer olan KF-PVA nın kolondan elde edilen ilk 80 mL lik fraksiyonda toplanacağı tespit edildi. Saf KF nin farklı konsantrasyonlardaki (0,5 mg/mL, 2 mg/mL, 4 mg/mL, 20 mg/mL) çözeltileri (Şekil 17-20) ve PVA nın farklı konsantrasyonlardaki (25 mg/mL, 100 mg/mL) çözeltilerinin (Şekil 21- 22) kolonda ayrıldıktan sonra elde edilen fraksiyonlarının hacmine karşı okunan floresans şiddeti değerlerini gösteren grafikler Şekil 17- 23 de verilmiştir.

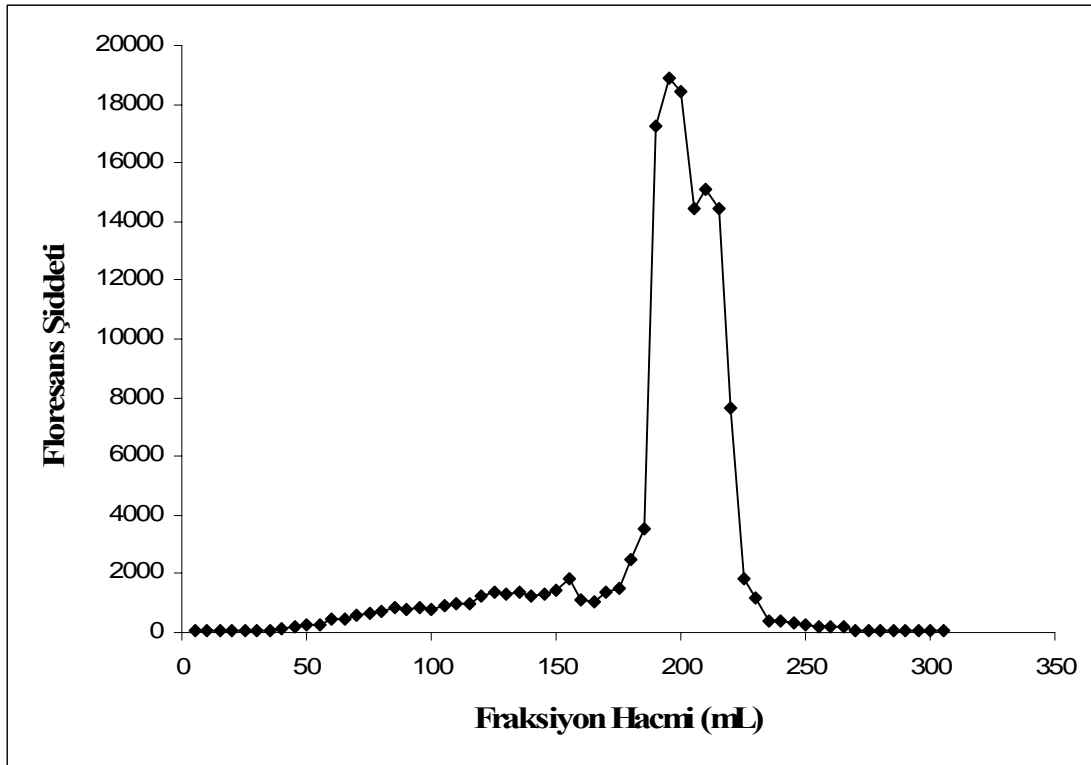
KF-PVA nın Sephadex LH-20 kolona uygulama işleminin etkinliğini tayin etmek üzere kolondan geçirilmiş işaretli polimerin ikinci kez ayırmaya tabi tutulmasından sonra elde edilen fraksiyon hacmine karşı ölçülen floresans şiddetini gösteren grafik Şekil 24 de verilmiştir. Kovalan bağlı KF-PVA nın kolondan ikinci kez geçirilmesinin ardından serbest KF nin tesbit edilmemesi işaretli polimerden saf KF nin uzaklaştırıldığını ve etkin şekilde PVA nın KF ye bağlandığını gösterdi.



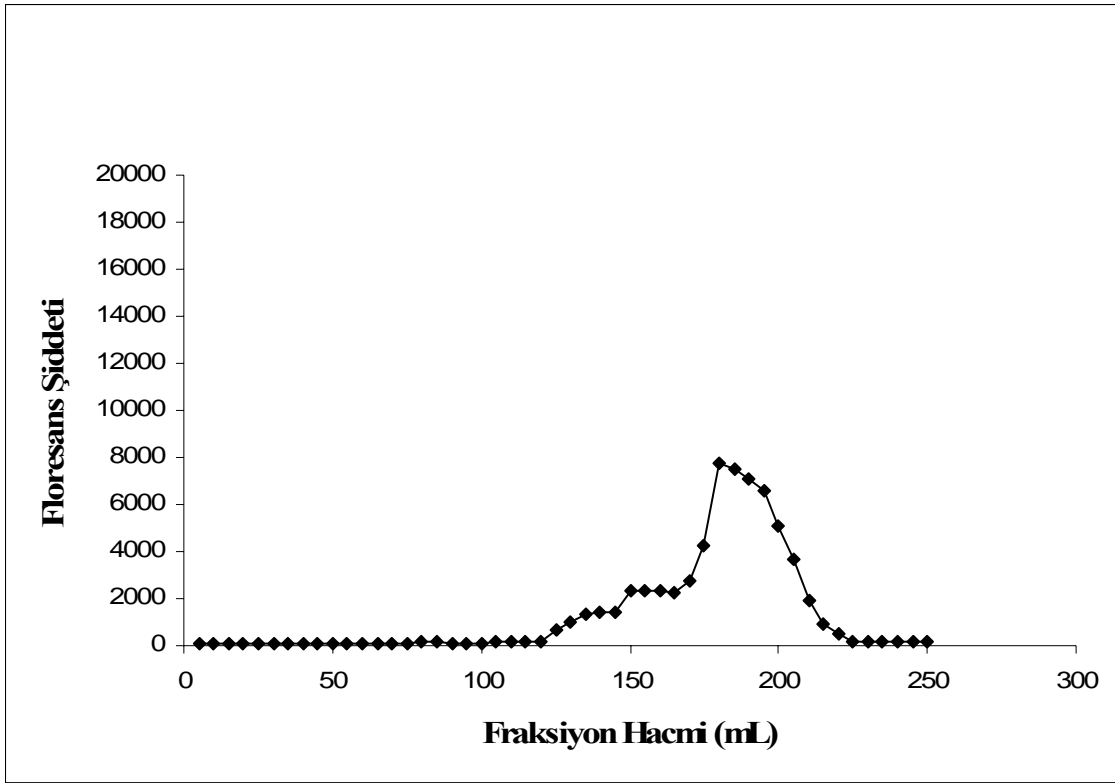
Şekil 17 : 0,5 mg/mL KF çözeltisinin gösterdiği floresans şiddeti



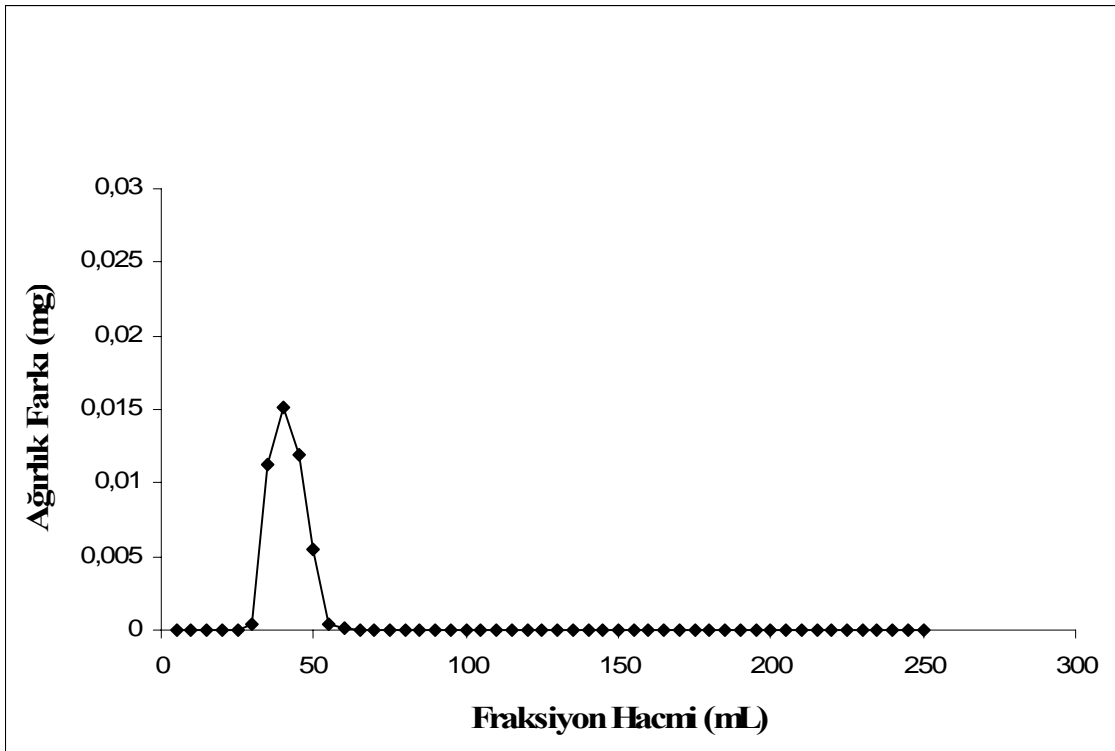
Şekil 18 : 2 mg/mL KF çözeltisinin gösterdiği floresans şiddeti



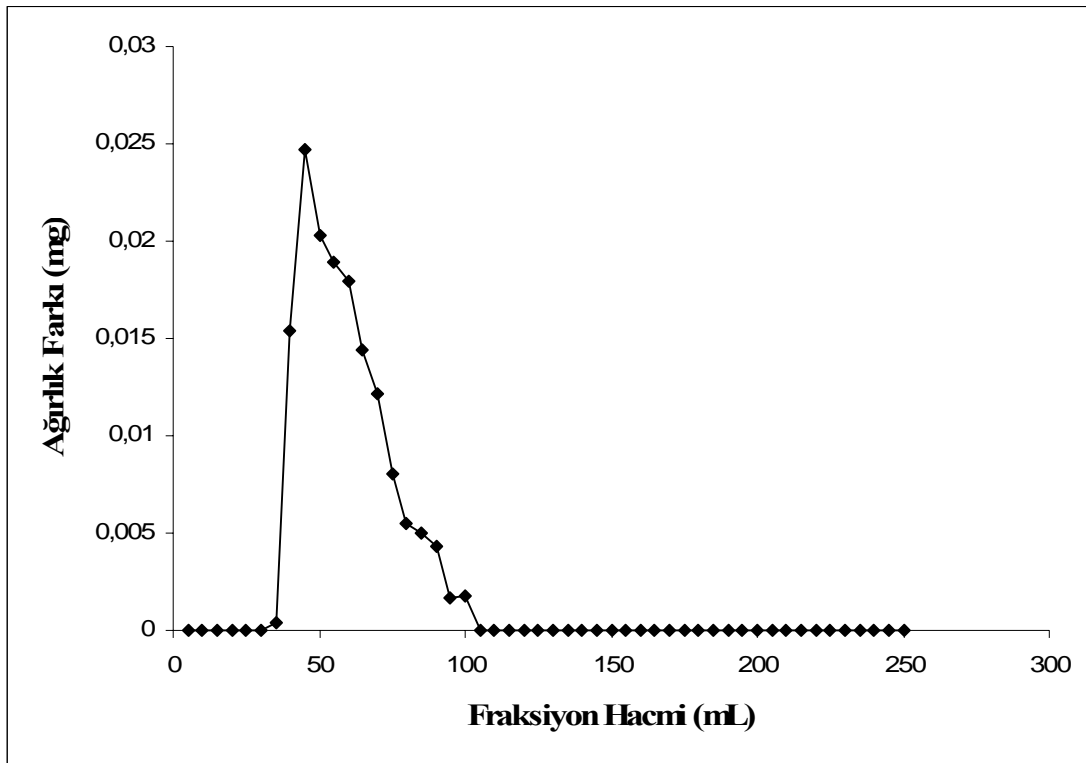
Şekil 19 : 4 mg/mL KF çözeltisinin gösterdiği floresans şiddeti



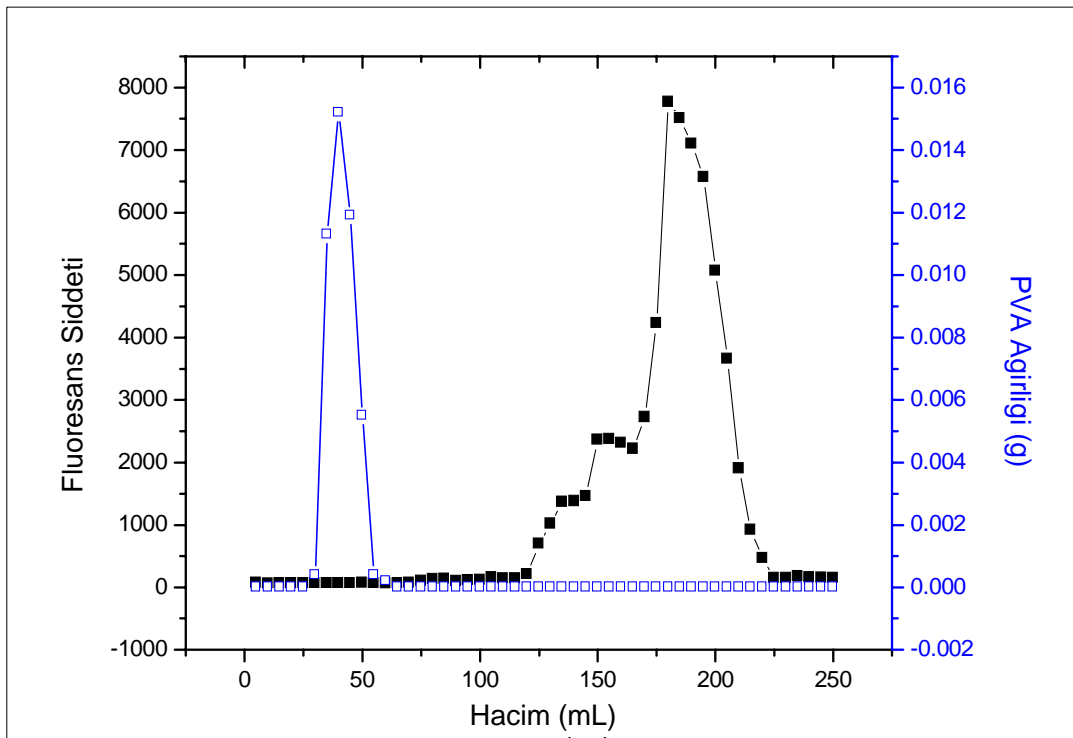
Şekil 20 : 20 mg/mL KF çözeltisinin gösterdiği floresans şiddeti



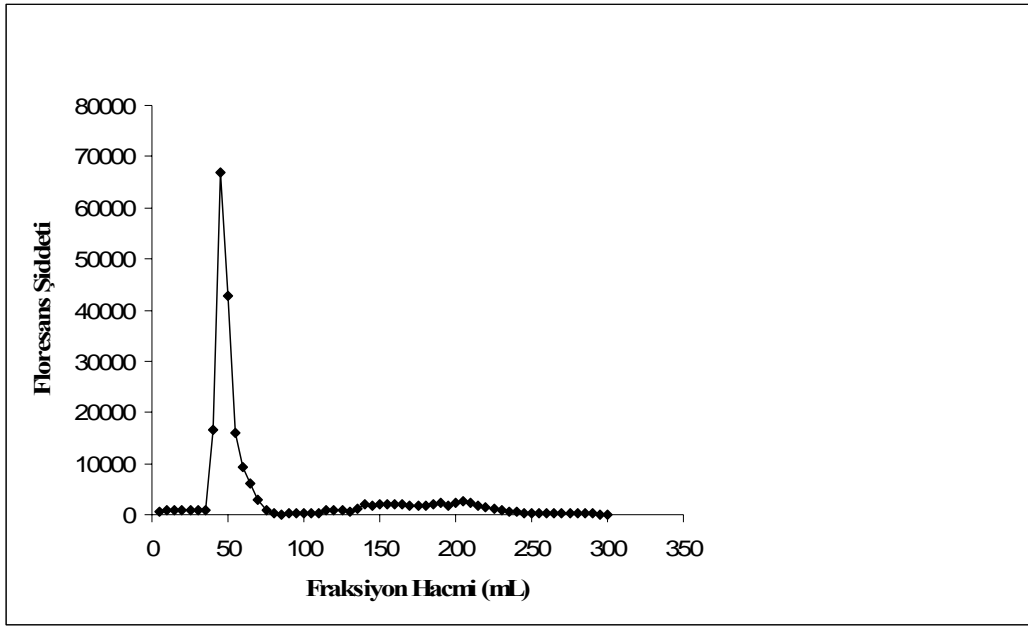
Şekil 21 : 25 mg/mL PVA çözeltisinin gösterdiği floresans şiddeti



Şekil 22 : 100 mg/mL PVA çözeltisinin gösterdiği floresans şiddeti

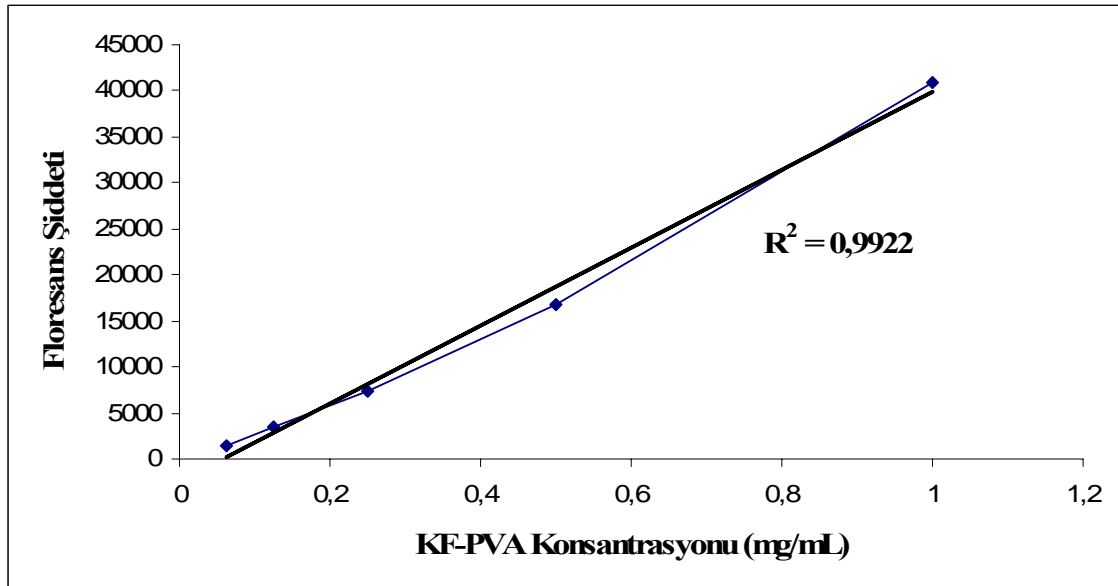


Şekil 23 : KF-PVA'nın Sephadex LH-20 kolonda ayrıldıktan sonra elde edilen fraksiyon hacimlerine karşı ölçülen ağırlık farkı ve floresans şiddeti değerlerini gösteren grafik



Şekil 24 : 2 mg/mL KF-PVA çözeltisinin ikinci kez Sephadex LH-20 kolona uygulanmasından sonra gösterdiği floresans şiddeti

KF-PVA'nın Yöntem 2 de anlatıldığı şekilde çalışılarak elde edilen standart eğrisi ve bu eğriye ait doğru denklemi ile determinasyon katsayısı Şekil 25 de verilmiştir. Tablo 6 da ise elde edilen ortalama floresans şiddeti değerleri (y), standart sapma (SD) ve % değişim katsayısı (%CV) sonuçları özetlenmiştir.



Şekil 25 : KF-PVA'nın florometrik yöntemine ait standart eğrisi

$$y = 423029x - 2406,8 \quad x: \text{Konsantrasyon} \quad y: \text{Floresans}$$

$$R^2 = 0,9922 \quad R^2: \text{Determinasyon katsayısı}$$

Tablo 6 : KF-PVA nın standart eğrisine ait bulgular

Konsantrasyon (mg/mL)	KF Ağırlığı (µg)	Floresans Şiddeti	SD (±)	CV (%)
1	100	40995,33	79,57	1,17
0,5	50	16681,67	30,63	0,91
0,25	25	7269,33	28,59	1,33
0,125	12,50	3531,33	15,20	1,32
0,0625	6,25	1450	17,92	3,14

İşaretleme etkinliğinin (labeling efficiency) belirlenmesi için literatürde kayıtlı konsantrasyon-ağırlık dönüştürme prensibi kullanılmıştır (221). İşaretleme yüzdesi KF ağırlık yüzdesinin KF-PVA ağırlık yüzdesine bölünmesi suretiyle hesaplanmıştır. İşaretleme etkinliği hesaplanırken ağırlık/ağırlık prensibine göre çalışıldığından kolaylık sağlaması bakımından kalibrasyon eğrileri x değerleri konsantrasyondan (mg/mL) ağırlığa (mg) çevrilmiştir. Bu çevirmede, floremetrede okunan plakanın her bir kuyucuğuna 100 µL uygulandığından hesaplanan konsantrasyon değerleri (1 mg/1 mL= 1 mg/1000 µL) 1/10 a bölünmek suretiyle mg cinsinden ağırlık değerlerine geçilmiştir.

Ön çalışmalarda, 1:10 (a/a) KF:PVA oranı kullanılarak hazırlanan ilk formülasyonun düşük floresansla işaretleme etkinliği (Floresansla İşaretleme Etkinliği= % 0,07 ± 0,02) göstermesi sebebiyle PVA nın daha yüksek miktarda kullanıldığı 1:1 oranındaki (a/a) KF-PVA formülasyonu seçildi. 1:1 oranındaki KF-PVA, 1:10 oranındaki KF:PVA ya göre anlamlı derecede daha yüksek işaretleme etkinliğine sahip olduğu bulundu (p<0,05).

Tablo 7 de, KF-PVA nın işaretleme etkinliğine ait hesaplama özetlenmiştir.

Tablo 7 : KF-PVA nın floresansla işaretlenme etkinliği

KF-PVA Ağırlığı (µg)	KF Ağırlığı (µg)	KF Ağırlığı / KF-PVA Ağırlığı (µg/µg)	Floresansla İşaretlenme Etkinliği (%)	Ortalama Floresansla İşaretlenme Etkinliği (%)
50	0,2552	0,005104	0,5104	0,45 ± 0,06
25	0,1086	0,004344	0,4344	
12,5	0,0503	0,004024	0,4024	

2.Nanopartiküller Üzerinde Yapılan Çalışmalara Ait Bulgular

2.1.PVA Nanopartikülleri Ön Formülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

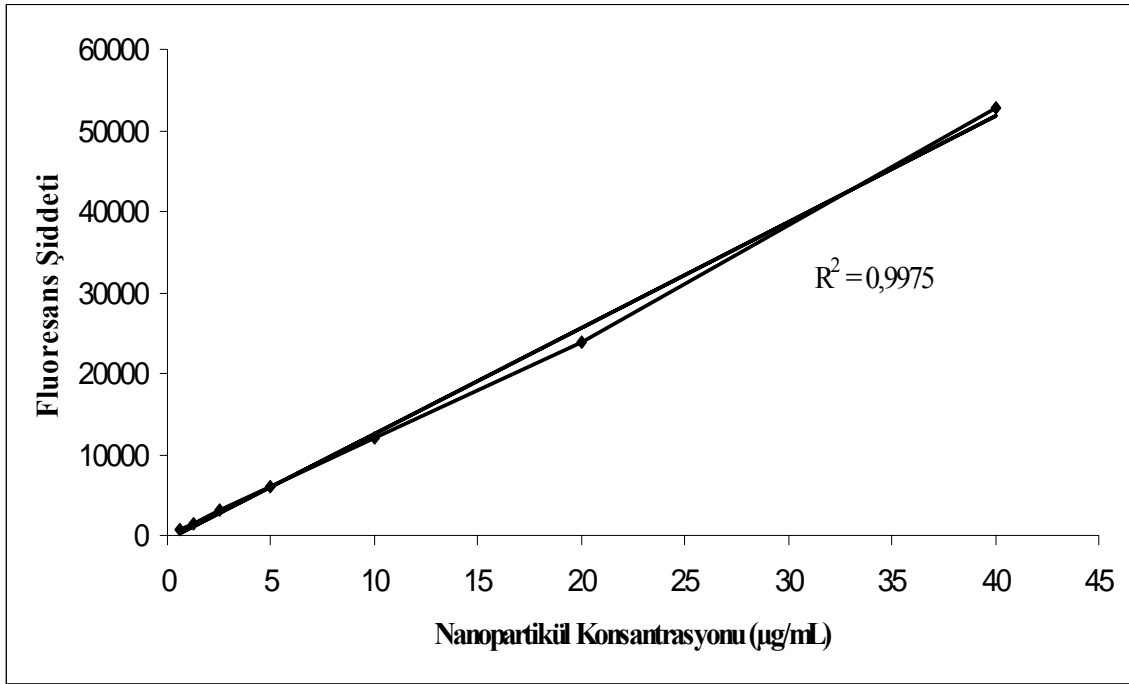
Ön formülasyon çalışmaları sonucunda, iç fazı oluşturan PVA çözelti konsantrasyonu olarak % 1 ve dış faza eklenen PVA çözelti hacmi olarak 3 mL en uygun parametreler (PVA-UL-F2) olarak tespit edildi.

2.2.Floresans İçeren PVA ve PS Nanopartiküllerinin Miktar Tayininin Ait Bulgular

2.2.1.Floresans İçeren PVA ve PS Nanopartiküllerinin Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu

2.2.1.1.Doğrusallık

PS nanopartikül formülasyonlarının (PS-NC-51, PS-NC-250, PS-C-50, PS-C-300) Yöntem 3.3.1.1. de anlatıldığı şekilde çalışılarak elde edilen standart eğrileri (Şekil 26-30) ve bu eğrilere ait doğru denklemleri ile determinasyon katsayıları aşağıda verilmiştir. Tablo 8-12 de ise elde edilen ortalama floresans şiddeti değerleri (y), standart sapma (SD) ve % değişim katsayısı (%CV) sonuçları özetlenmiştir.



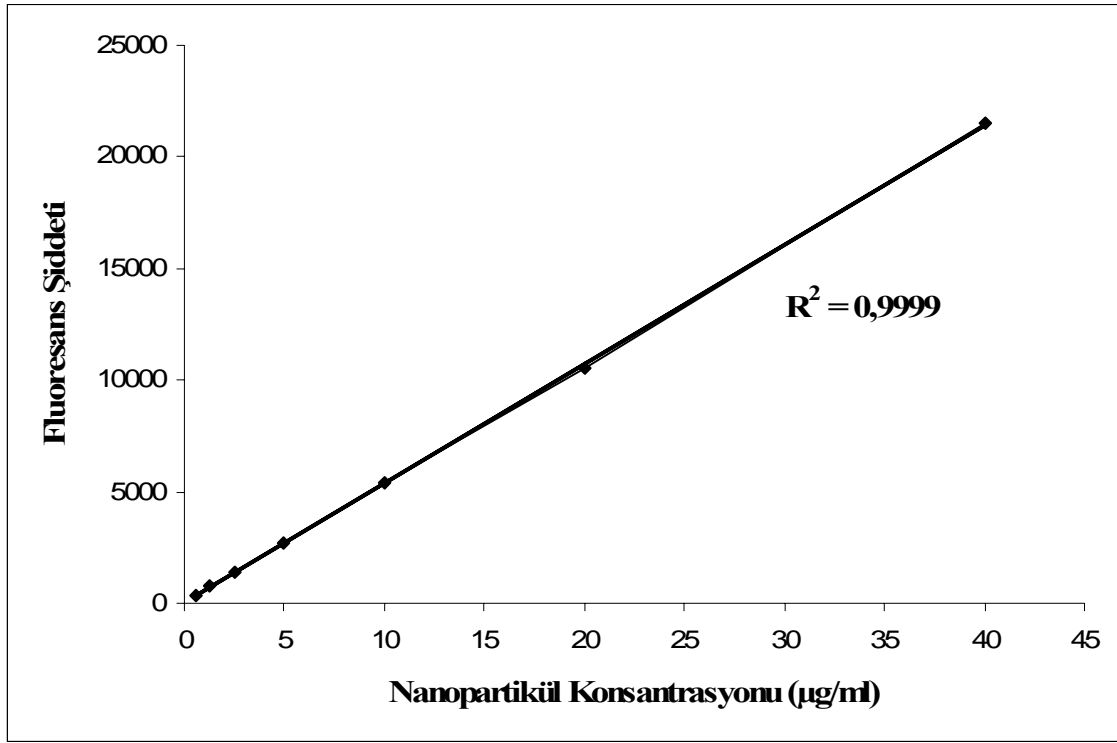
Şekil 26 : PS-NC-51 nanopartiküllerinin fluorometrik yöntemine ait standart eğrisi

$$y=1308,9x - 556,98 \quad x: \text{Konsantrasyon} \quad y: \text{Floresans Şiddeti}$$

$$R^2= 0,9975 \quad R^2: \text{Determinasyon katsayısı}$$

Tablo 8 : PS-NC-51 nanopartiküllerinin standart eğrisine ait bulgular

Konsantrasyon (µg/mL)	Floresans Şiddeti	SD (±)	CV (%)
40	52806,30	1013,27	1,92
20	23779,70	315,59	1,33
10	11943,40	293,21	2,46
5	6100,87	227,42	3,73
2,5	3057,33	71,76	2,35
1,25	1545,47	34,95	2,26
0,625	758,07	12,67	1,67



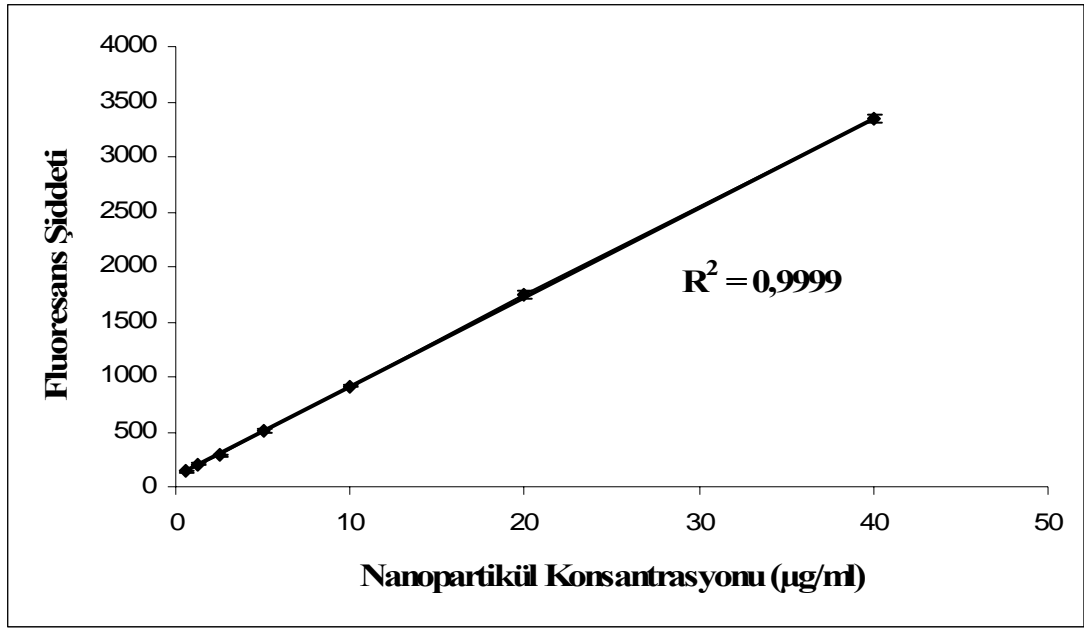
Şekil 27 : PS-NC-250 nanopartiküllerinin florometrik yöntemine ait standart eğrisi

$$y=535,66x + 22,384 \quad x: \text{Konsantrasyon} \quad y: \text{Floresans Şiddeti}$$

$$R^2= 0,9999 \quad R^2: \text{Determinasyon katsayısı}$$

Tablo 9 : PS-NC-250 nanopartiküllerinin standart eğrisine ait bulgular

Konsantrasyon (µg/mL)	Floresans Şiddeti	SD (±)	CV (%)
40	21524,77	226,68	1,05
20	10566,07	394,55	3,73
10	5412,80	246,64	4,56
5	2674,83	111,14	4,15
2,5	1391,57	26,24	1,89
1,25	750,73	17,39	2,32
0,625	354,10	9,30	2,63



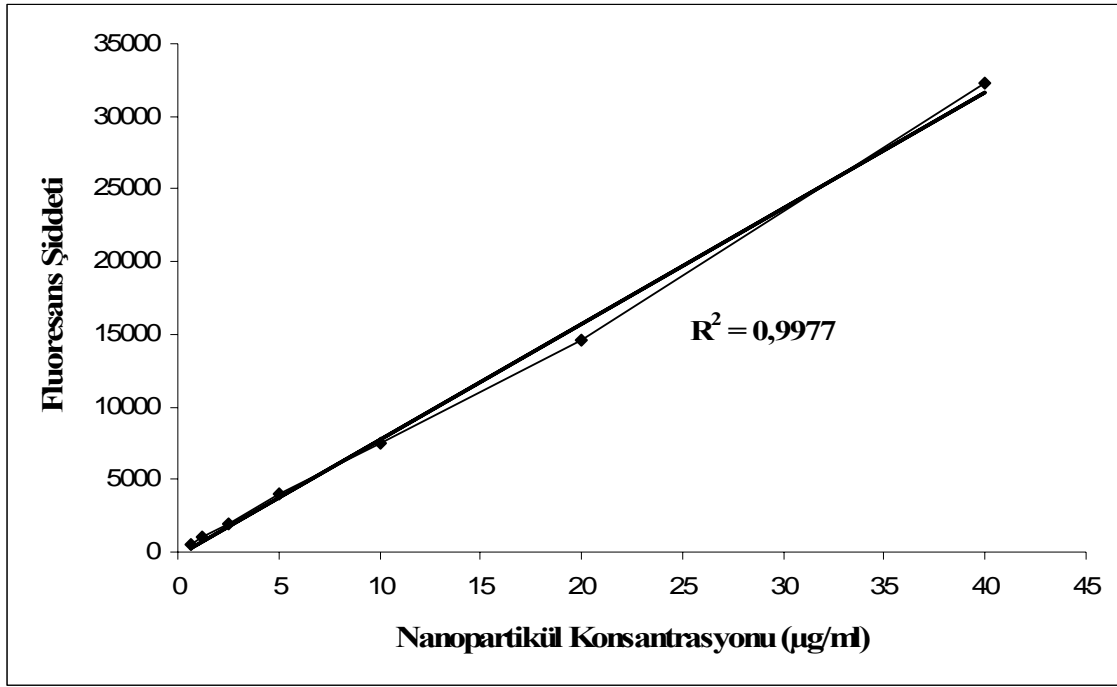
Şekil 28 : PS-C-50 nanopartiküllerinin florometrik yöntemine ait standart eğrisi

$$y=81,429x + 96,643 \quad x: \text{Konsantrasyon} \quad y: \text{Floresans Şiddeti}$$

$$R^2= 0,9999 \quad R^2: \text{Determinasyon katsayısı}$$

Tablo 10 : PS-C-50 nanopartiküllerinin standart eğrisine ait bulgular

Konsantrasyon (µg/mL)	Floresans Şiddeti	SD (±)	CV (%)
40	3342,50	38,85	1,16
20	1745,40	34,21	1,96
10	917,97	17,54	1,91
5	506,53	22,26	4,40
2,5	286,80	5,79	2,01
1,25	202,13	8,84	3,70
0,625	138,63	4,34	3,13



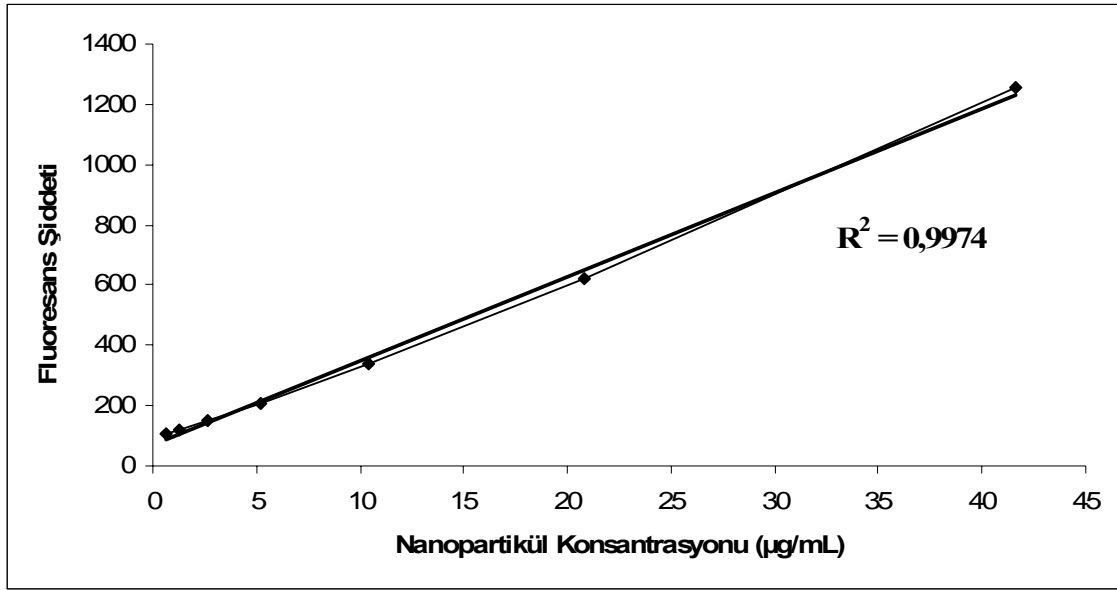
Şekil 29 : PS-C-300 nanopartiküllerinin florometrik yöntemine ait standart eğrisi

$$y=796,42x - 186,69 \quad x: \text{Konsantrasyon} \quad y: \text{Floresans Şiddeti}$$

$$R^2= 0,9977 \quad R^2: \text{Determinasyon katsayısı}$$

Tablo 11 : PS-C-300 nanopartiküllerinin standart eğrisine ait bulgular

Konsantrasyon (µg/mL)	Floresans Şiddeti	SD (±)	CV (%)
40	32244,20	307,86	0,95
20	14634,73	624,37	4,27
10	7507,57	369,60	4,92
5	4042,83	44,07	1,09
2,5	1898,17	10,19	0,54
1,25	1003,10	4,39	0,44
0,625	578,63	9,52	1,64



Şekil 30 : PVA-L-F2 nanopartiküllerinin florometrik yöntemine ait standart eğrisi

$$y=27,931x + 69,768 \quad x: \text{Konsantrasyon} \quad y: \text{Floresans Şiddeti}$$

$$R^2= 0,9974$$

R^2 : Determinasyon katsayısı

Tablo 12 : PVA-L-F2 nanopartiküllerinin standart eğrisine ait bulgular

Konsantrasyon (µg/mL)	Floresans Şiddeti	SD (±)	CV (%)
41,65	1254,87	20,87	1,66
20,83	619,07	14,94	2,41
10,41	336,37	7,79	2,32
5,21	208,77	8,22	3,94
2,6	150,70	4,15	2,76
1,3	122,17	5,78	4,73
0,65	104,93	2,43	2,32

2.2.1.2.Kesinlik

Yöntem 3.3.1.2. de açıklandığı gibi çalışılarak 3 farklı konsantrasyonda hazırlanan PS-NC-51, PS-NC-250, PS-C-50, PS-C-300, PS-L-F2 nanopartiküllerinin 3 gün süresince yapılan ölçümleri sonucu elde edilen değerlere ait gün içi değişim katsayısının sırasıyla (%CV) % 0,86, % 2,08, % 1,9, % 0,95, % 2,31 ve günler arası %CV nin % 2,62, % 3,1, % 2,62, % 2,18, % 3,06 olduğu saptandı.

2.2.1.3.Doğruluk

Farklı konsantrasyondaki KF miktar tayini için, yöntem 3.3.1.3. de anlatıldığı şekilde çalışılarak yöntemin doğruluğu saptandı. Her konsantrasyon için geri kazanma değeri (%), standart sapma (SD) ve değişim katsayısı (%CV) değerleri Tablo 13-17 de verilmiştir.

Tablo 13 : PS-NC-51 nanopartiküllerinin miktar tayininde kullanılan yöntemin doğruluğuna ait bulgular

Konsantrasyon (µg/mL)	Geri Kazanma (%)	SD (±)	CV (%)
40	98,15	42,93	0,08
20	94,49	295,98	1,22
10	99,61	154,88	1,24

Tablo 14 : PS-NC-250 nanopartiküllerinin miktar tayininde kullanılan yöntemin doğruluğuna ait bulgular

Konsantrasyon (µg/mL)	Geri Kazanma (%)	SD (±)	CV (%)
40	99,3	95,67	0,45
20	94,31	59,36	0,59
10	94,19	106,13	2,09

Tablo 15 : PS-C-50 nanopartiküllerinin miktar tayininde kullanılan yöntemin doğruluğuna ait bulgular

Konsantrasyon (µg/mL)	Geri Kazanma (%)	SD (±)	CV (%)
40	98,66	11,15	0,34
20	98,41	6,38	0,38
10	98	9,37	1,05

Tablo 16 : PS-C-300 nanopartiküllerinin miktar tayininde kullanılan yöntemin doğruluğuna ait bulgular

Konsantrasyon (µg/mL)	Geri Kazanma (%)	SD (±)	CV (%)
40	101,32	256,68	0,8
20	100,16	136,26	0,86
10	87,59	56,36	0,83

Tablo 17 : PVA-L-F2 nanopartiküllerinin miktar tayininde kullanılan yöntemin doğruluğuna ait bulgular

Konsantrasyon (µg/mL)	Geri Kazanma (%)	SD (±)	CV (%)
41,65	102,61	11,88	0,94
20,83	95,43	12,93	2,07
10,41	92,88	7,28	2,14

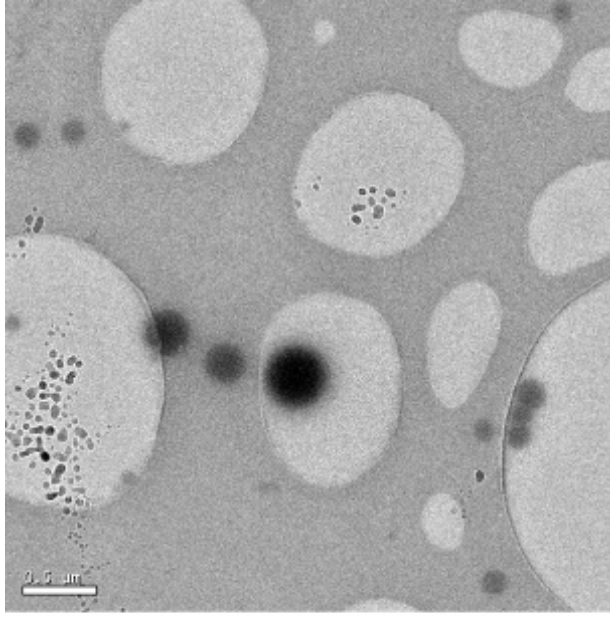
2.2.1.4. Seçicilik

Yöntem 3.3.1.4. de belirtildiği gibi çalışılarak PVA nanopartikül formülasyonlarının, KF nin N-metil-2-pirolidon: HBSS ile 485/20 nm eksitasyon ve 530/25 nm emisyon dalga boylarında verdiği bir değer göstermedikleri saptandı.

2.3. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu ile İlgili Yapılan Çalışmalar

2.3.1. Nanopartiküllerin Yüzey Özelliklerinin İncelenmesine Ait Bulgular

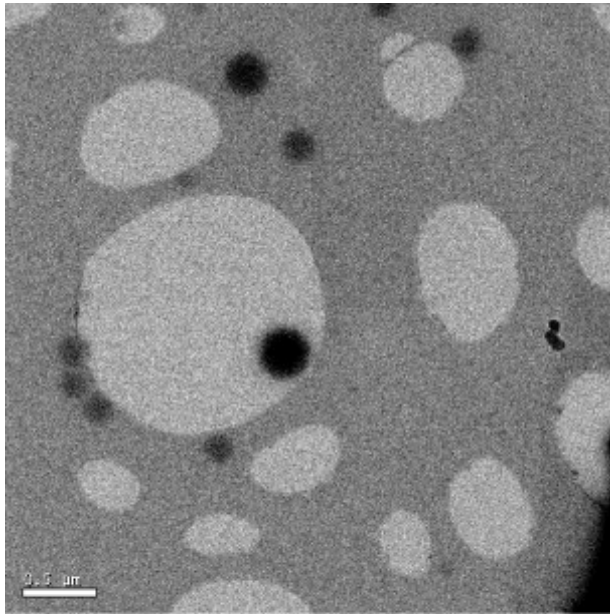
KF ile işaretlenmemiş PVA-UL-F2 nin kriyojenik transmisyon elektron mikroskobu (cryo-TEM) ile çekilen fotoğrafları Şekil 31 – 36 de verilmiştir.



Specimen : 1
 Operator : Mine
 Voltage : 200 kV
 Microscope Name : T20
 Name : UltraScan
 Total Magnification : X45600
 Indicated Magnification : X5000

Image Name : 1_1
 Resolution : 2048 x 2048 pixels
 Acquisition Date : 5/25/2006
 Acquisition Time : 1:27:52 PM
 Collection Number : 1
 Exposure Time : 3.0 s

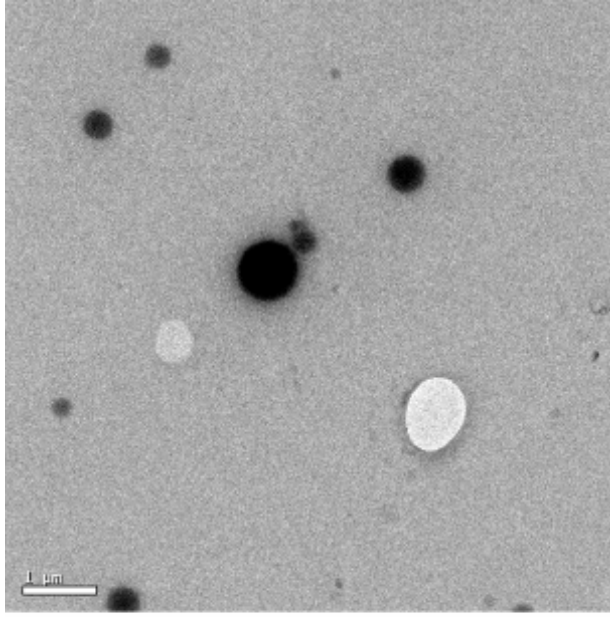
Şekil 31: PVA-UL-F2 nin kriyojenik transmisyon elektron mikroskobu fotoğrafı-I



Specimen : 1
 Operator : Mine
 Voltage : 200 kV
 Microscope Name : T20
 Name : UltraScan
 Total Magnification : X45600
 Indicated Magnification : X5000

Image Name : 1_2
 Resolution : 2048 x 2048 pixels
 Acquisition Date : 5/25/2006
 Acquisition Time : 1:19:58 PM
 Collection Number : 2
 Exposure Time : 4.0 s

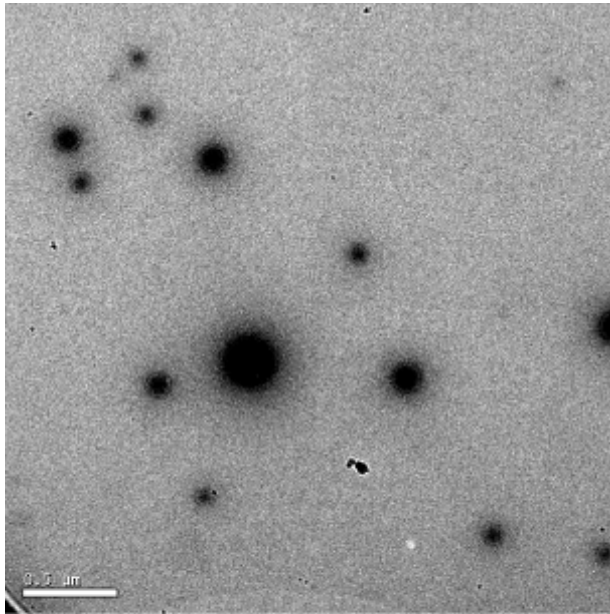
Şekil 32: PVA-UL-F2 nin kriyojenik transmisyon elektron mikroskobu fotoğrafı-II



Specimen : 5%
 Operator : Mine
 Voltage : 200 kV
 Microscope Name : T20
 Name : UltraScan
 Total Magnification : X22800
 Indicated Magnification : X2500

Image Name : 1_4
 Resolution : 2048 x 2048 pixels
 Acquisition Date : 5/25/2006
 Acquisition Time : 1:55:28 PM
 Collection Number : 4
 Exposure Time : 3.0 s

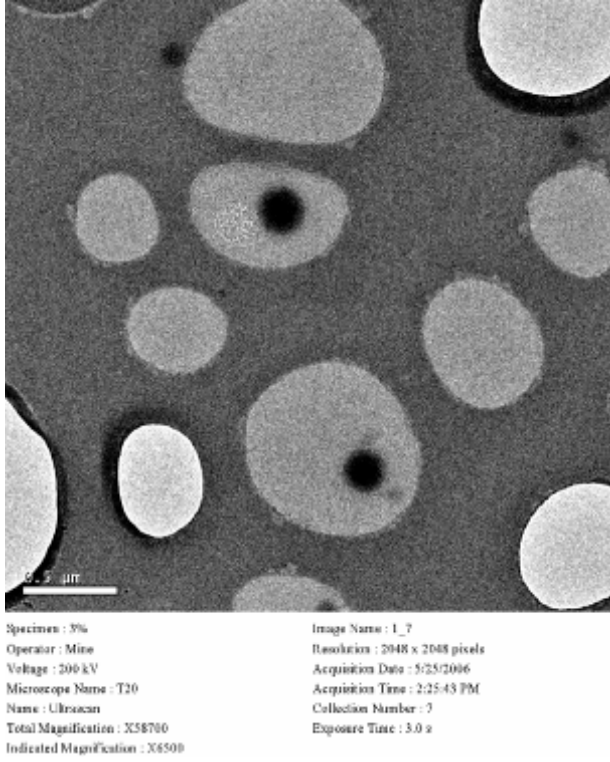
Şekil 33: PVA-UL-F2 nin kriyojenik transmisyon elektron mikroskobu fotoğrafı-III



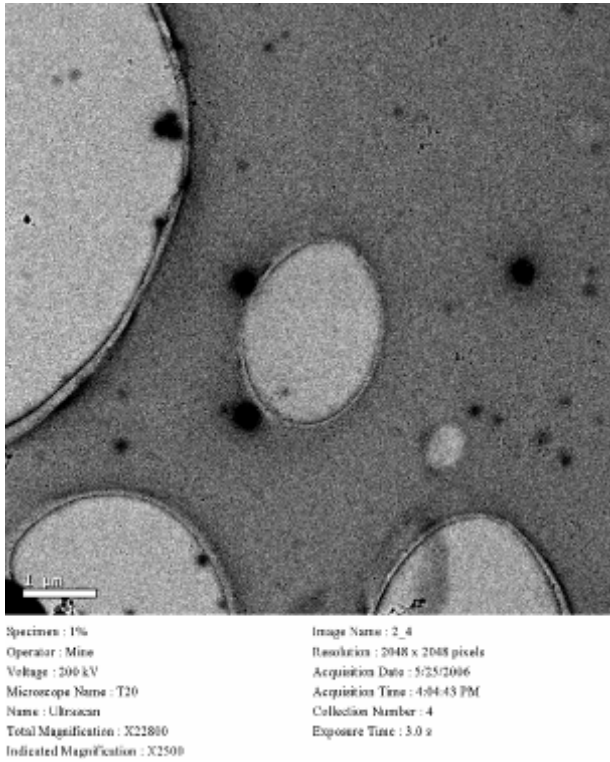
Specimen : 5%
 Operator : Mine
 Voltage : 200 kV
 Microscope Name : T20
 Name : UltraScan
 Total Magnification : X58700
 Indicated Magnification : X6500

Image Name : 1_8
 Resolution : 2048 x 2048 pixels
 Acquisition Date : 5/25/2006
 Acquisition Time : 2:33:19 PM
 Collection Number : 8
 Exposure Time : 3.0 s

Şekil 34: PVA-UL-F2 nin kriyojenik transmisyon elektron mikroskobu fotoğrafı-IV



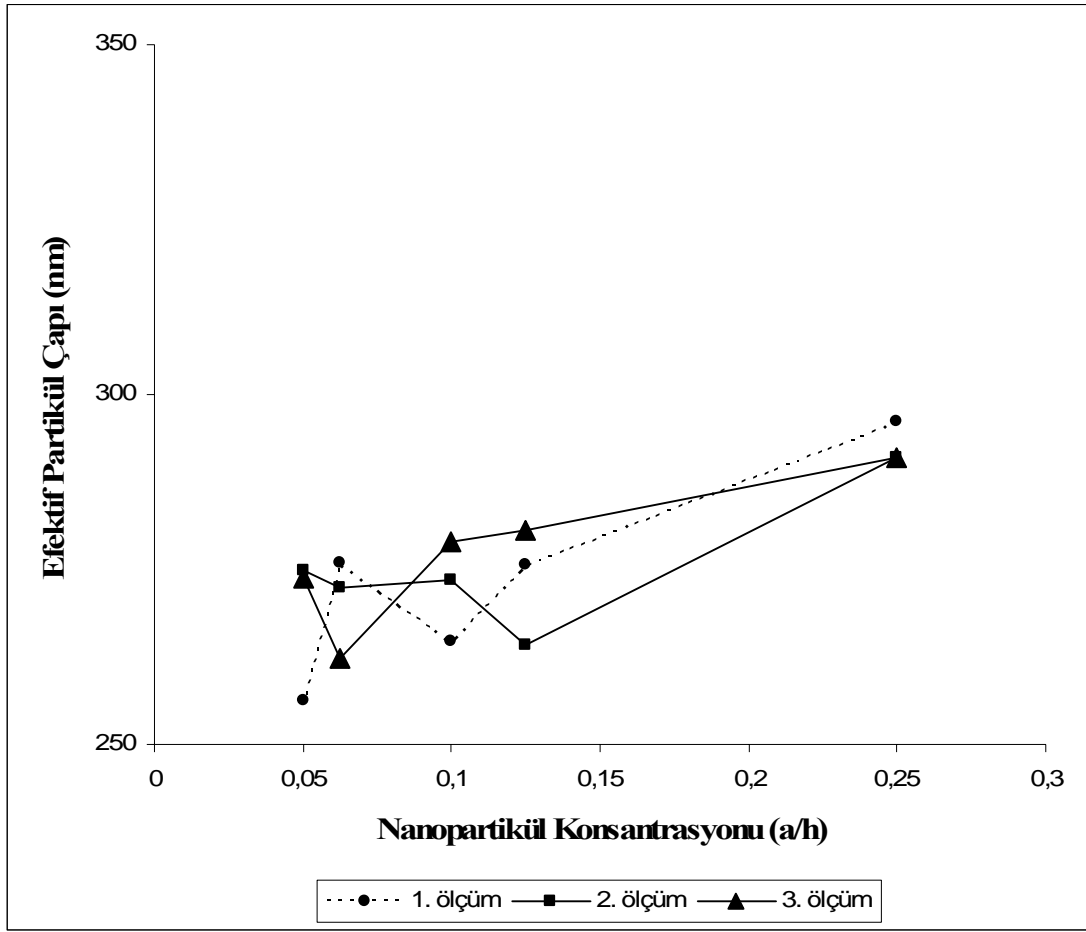
Şekil 35: PVA-UL-F2 nin kriyojenik transmisyon elektron mikroskobu fotoğrafı-V



Şekil 36: PVA-UL-F2 nin kriyojenik transmisyon elektron mikroskobu fotoğrafı-VI

2.3.2.Partikül Büyüklüğü Dağılım Analizi ve Nanopartikül Verimine Ait Bulgular

Yöntem 3.1. de anlatıldığı şekilde hazırlanan PVA nanopartikül formülasyonları (PVA-UL-F1, PVA-UL-F2, PVA-UL-F3, PVA-UL-F4, PVA-UL-F5, PVA-UL-F6, PVA-L-F2) için foton korelasyon spektroskopisi (PCS) kullanılarak yapılan partikül büyüklüğü ölçümlerine ait bulgular Tablo 18 de gösterilmiştir. PVA nanopartiküllerinin hazırlanmasında kullanılan organik faz: sulu faz oranı 1:10 dan (PVA-UL-F3) 1:6 ya (PVA-UL-F4) değiştirildiğinde partikül büyüklüğü bulguları arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$). KF-PVA polimeri kullanılarak hazırlanan nanopartikül formülasyonu (PVA-L-F2), saf PVA kullanılarak hazırlanan formülasyonla (PVA-UL-F2) karşılaştırıldığında partikül büyüklüğü olarak anlamlı bir farklılık göstermemiştir ($p>0,05$).PVA nanopartikül konsantrasyonuna karşılık gelen efektif partikül çapı grafikleri ise Şekil 37-57 de verilmiştir.

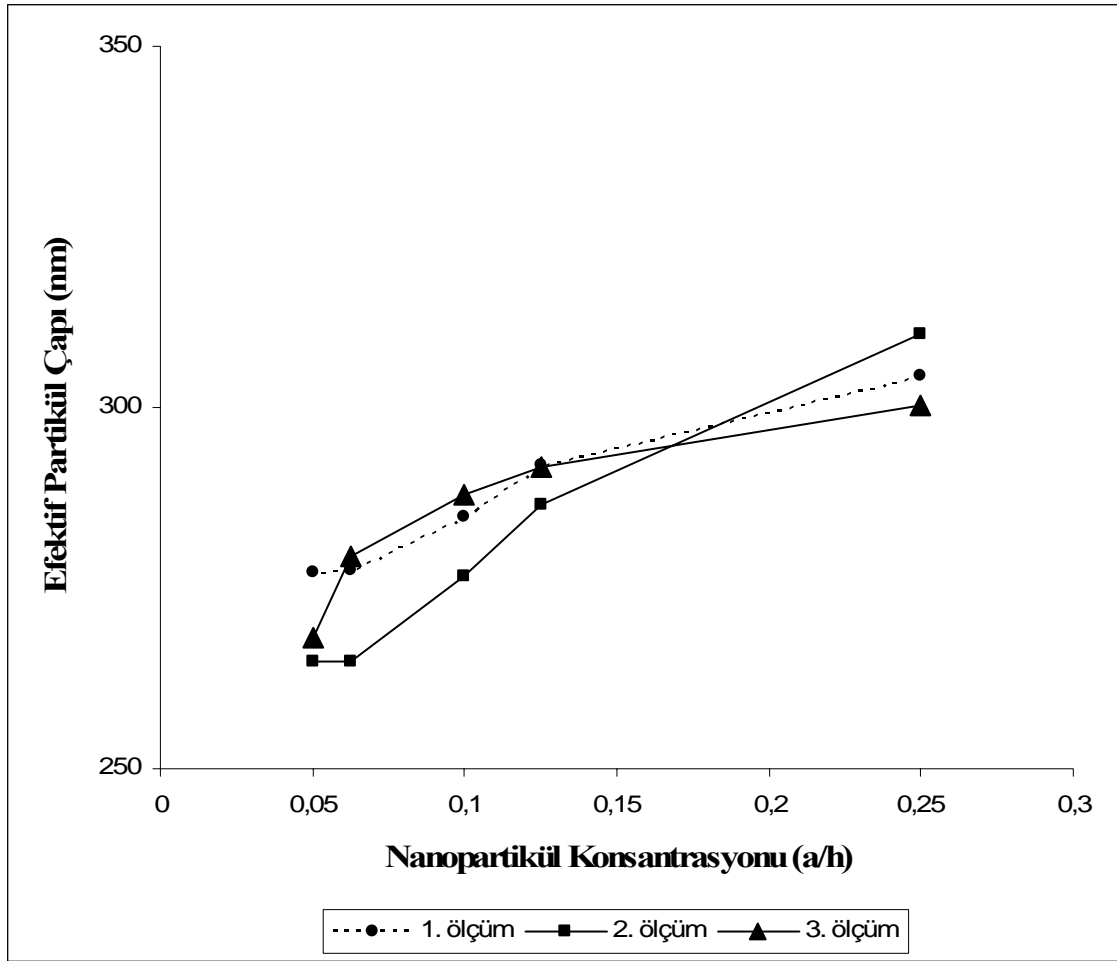


Şekil 37: PVA-UL-F1 formülasyonun 1. serisinin partikül büyüklüğü ölçümüne ait grafik

1. ölçüm = 254,34 nm

2. ölçüm = 264,99 nm

3. ölçüm = 264,13 nm

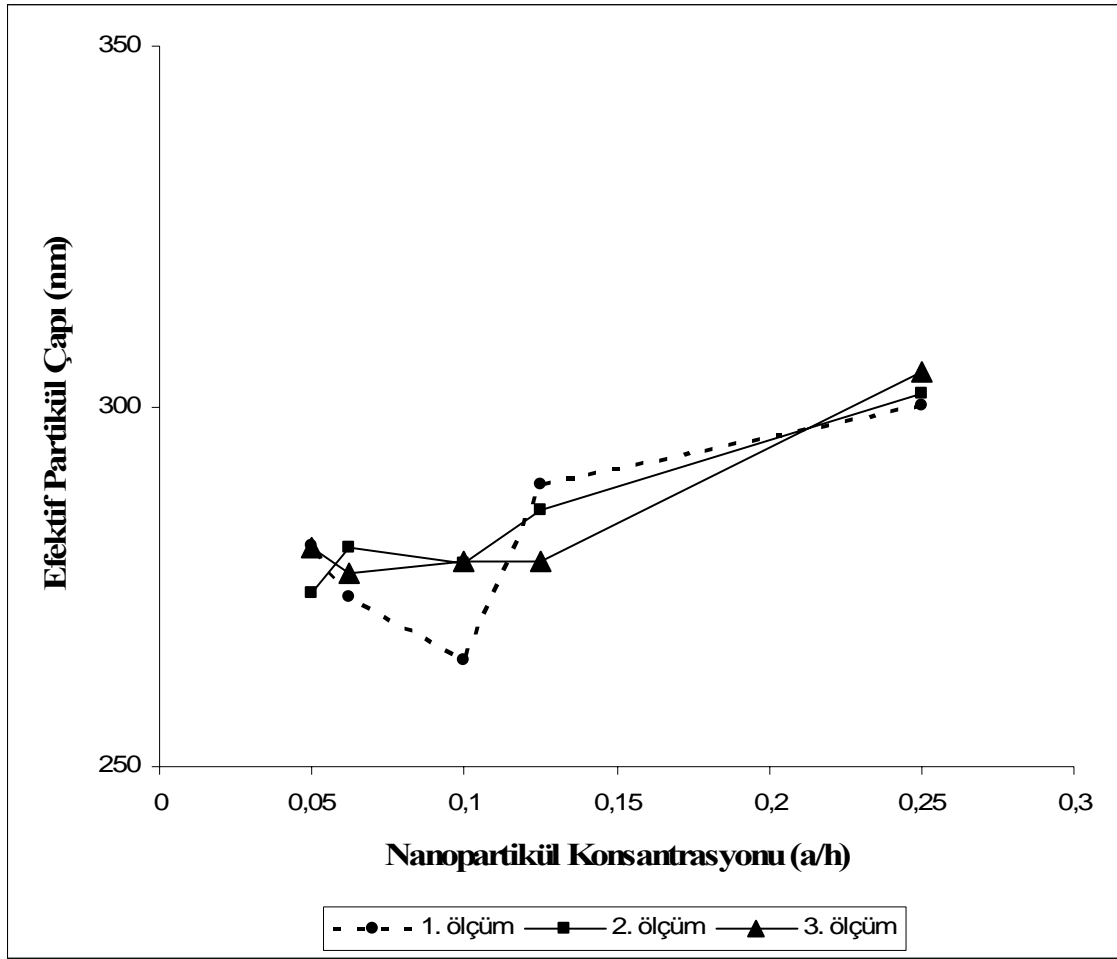


Şekil 38 : PVA-UL-F1 formülasyonun 2. serisinin partikül büyüklüğü ölçümüne ait grafik

1. ölçüm = 270,79 nm

2. ölçüm = 253,07 nm

3. ölçüm = 269,52 nm

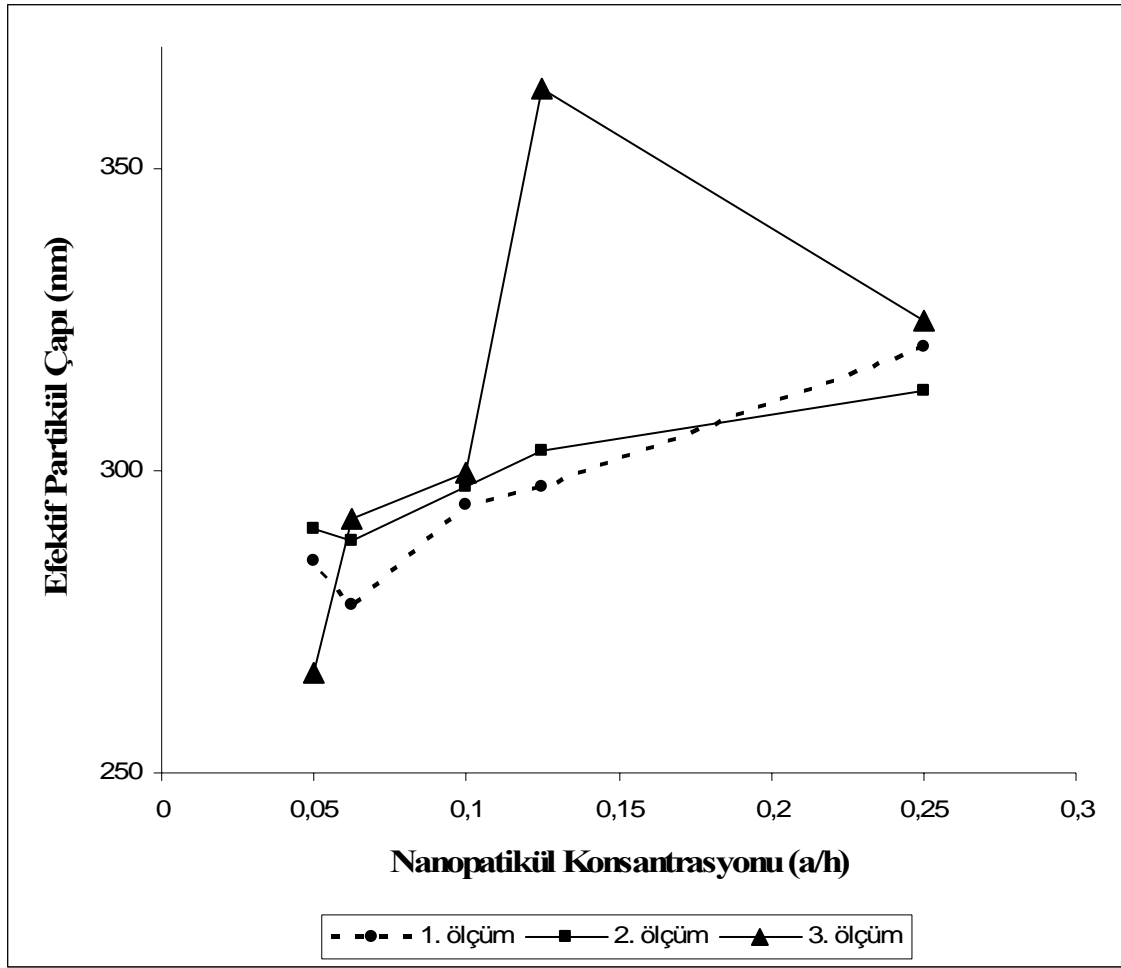


Şekil 39 : PVA-UL-F1 formülasyonun 3. serisinin partikül büyüklüğü ölçümüne ait grafik

1. ölçüm = 266,39 nm

2. ölçüm = 268,55 nm

3. ölçüm = 267,94 nm

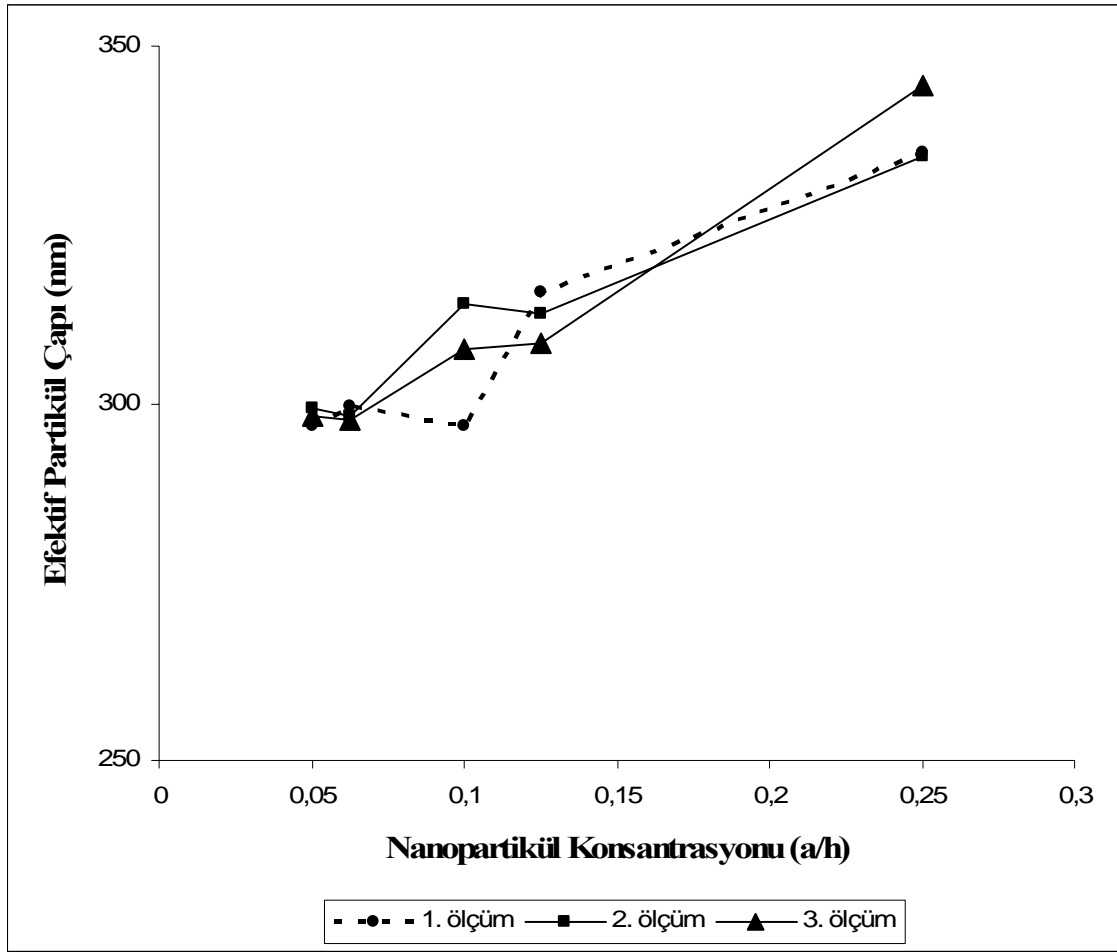


Şekil 40 : PVA-UL-F2 formülasyonun 1. serisinin partikül büyüklüğü ölçümüne ait grafik

1. ölçüm = 271,81 nm

2. ölçüm = 284,1 nm

3. ölçüm = 279,44 nm

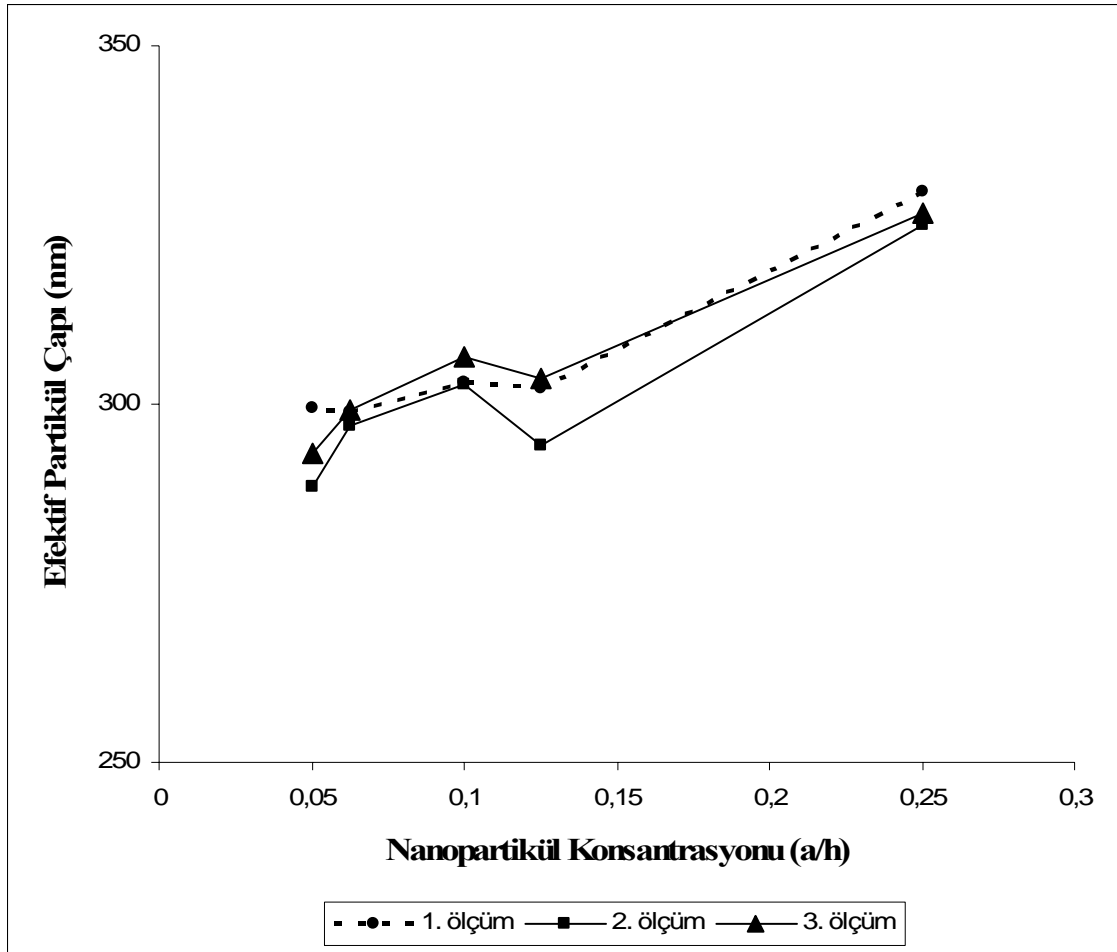


Şekil 41 : PVA-UL-F2 formülasyonun 2. serisinin partikül büyüklüğü ölçümüne ait grafik

1. ölçüm = 285,44 nm

2. ölçüm = 290,65 nm

3. ölçüm = 283,26 nm

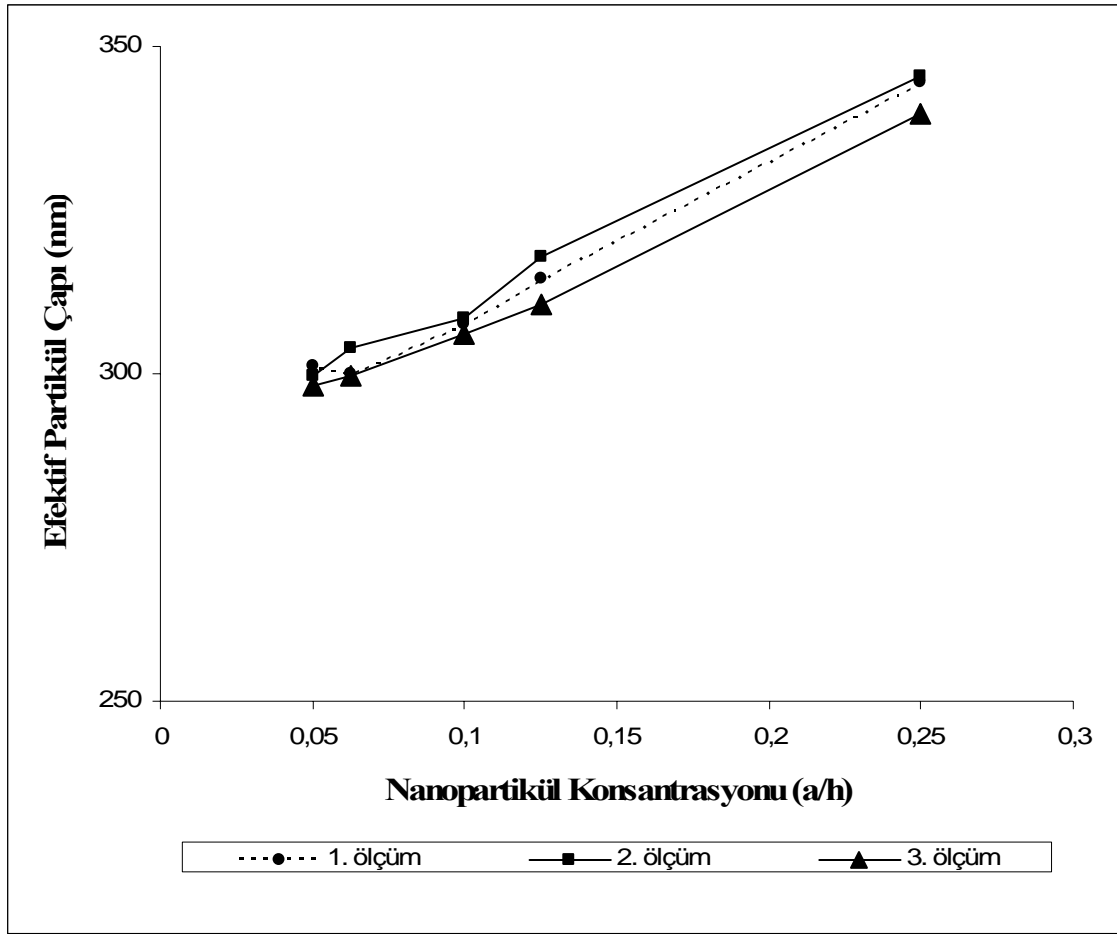


Şekil 42 : PVA-UL-F2 formülasyonun 3. serisinin partikül büyüklüğü ölçümüne ait grafik

1. ölçüm = 288,22 nm

2. ölçüm = 282,26 nm

3. ölçüm = 287,68 nm

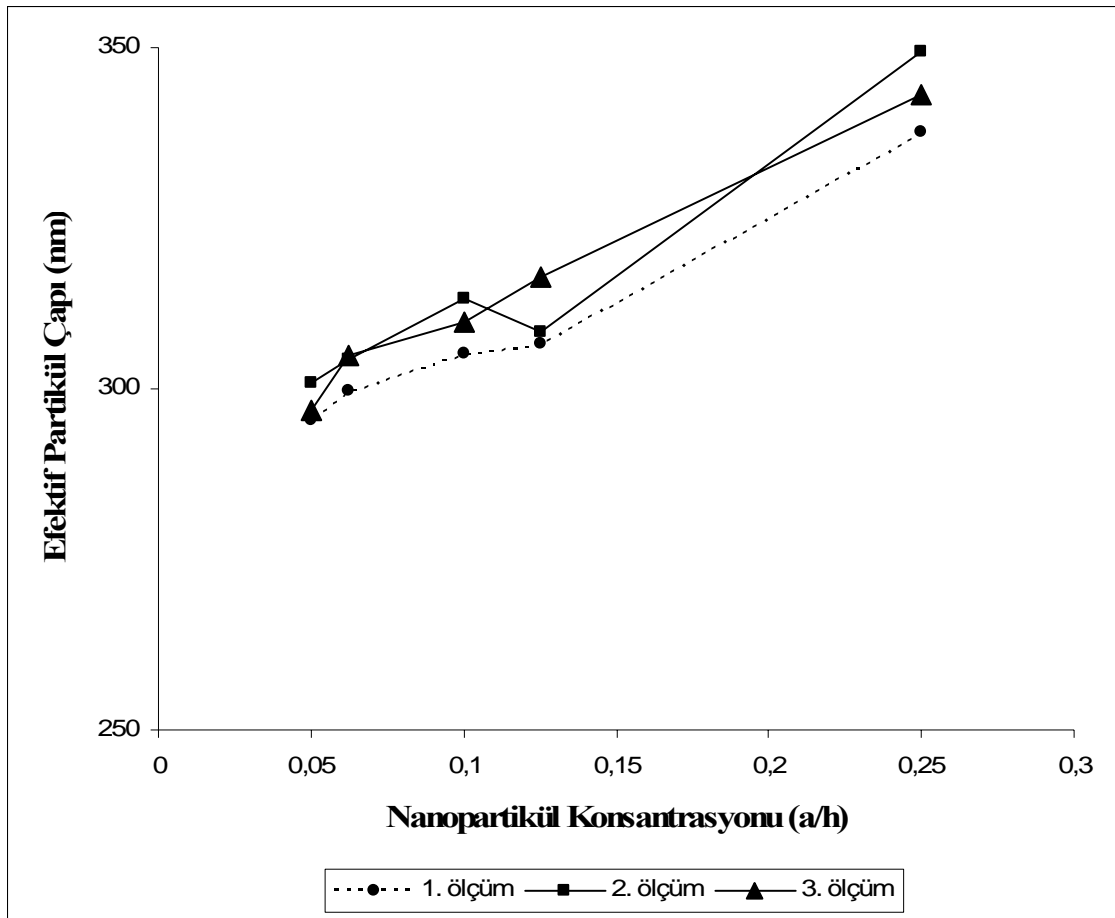


Şekil 43 : PVA-UL-F3 formülasyonunun 1. serisinin partikül büyüklüğü ölçümüne ait grafik

1. ölçüm = 286,87 nm

2. ölçüm = 288,28 nm

3. ölçüm = 286,18 nm

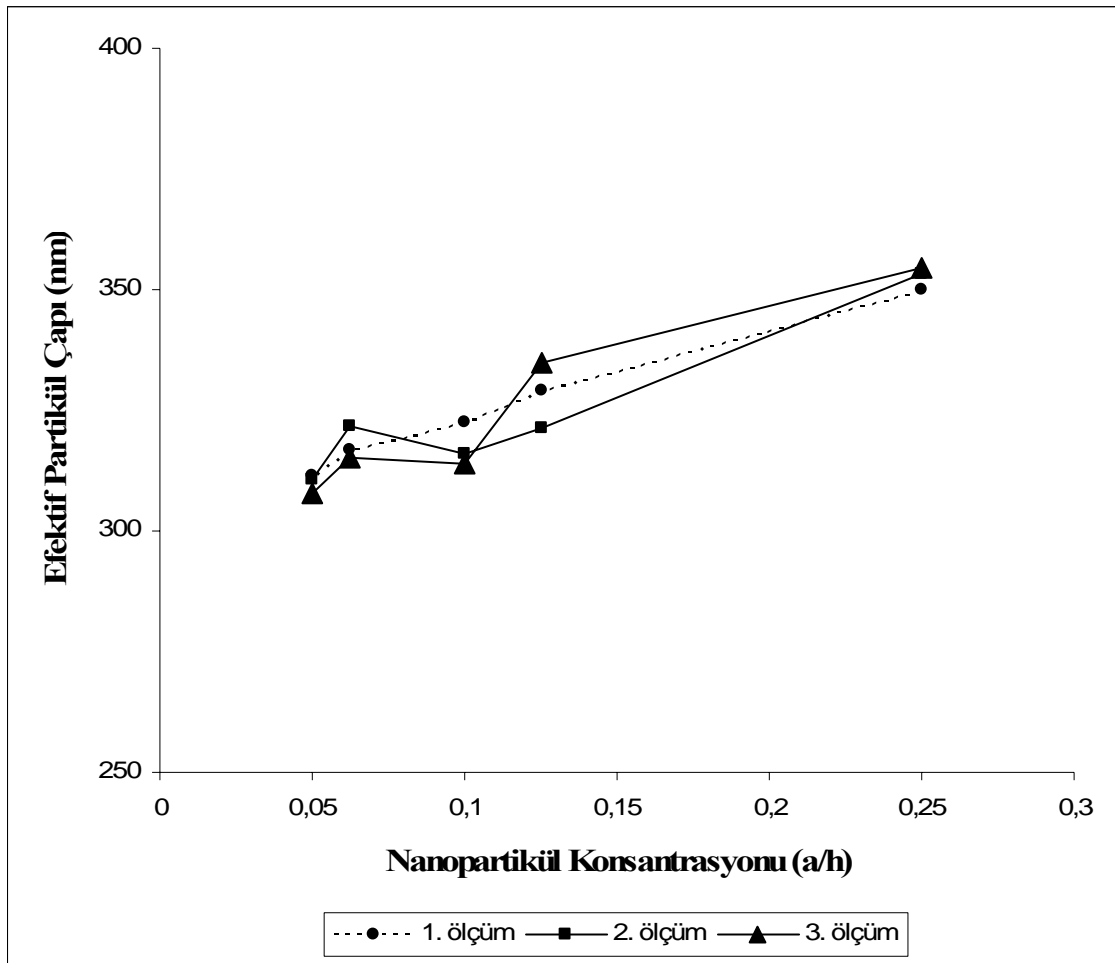


Şekil 44 : PVA-UL-F3 formülasyonun 2. serisinin partikül büyüklüğü ölçümüne ait grafik

1. ölçüm = 284,58 nm

2. ölçüm = 287,23 nm

3. ölçüm = 288,4 nm

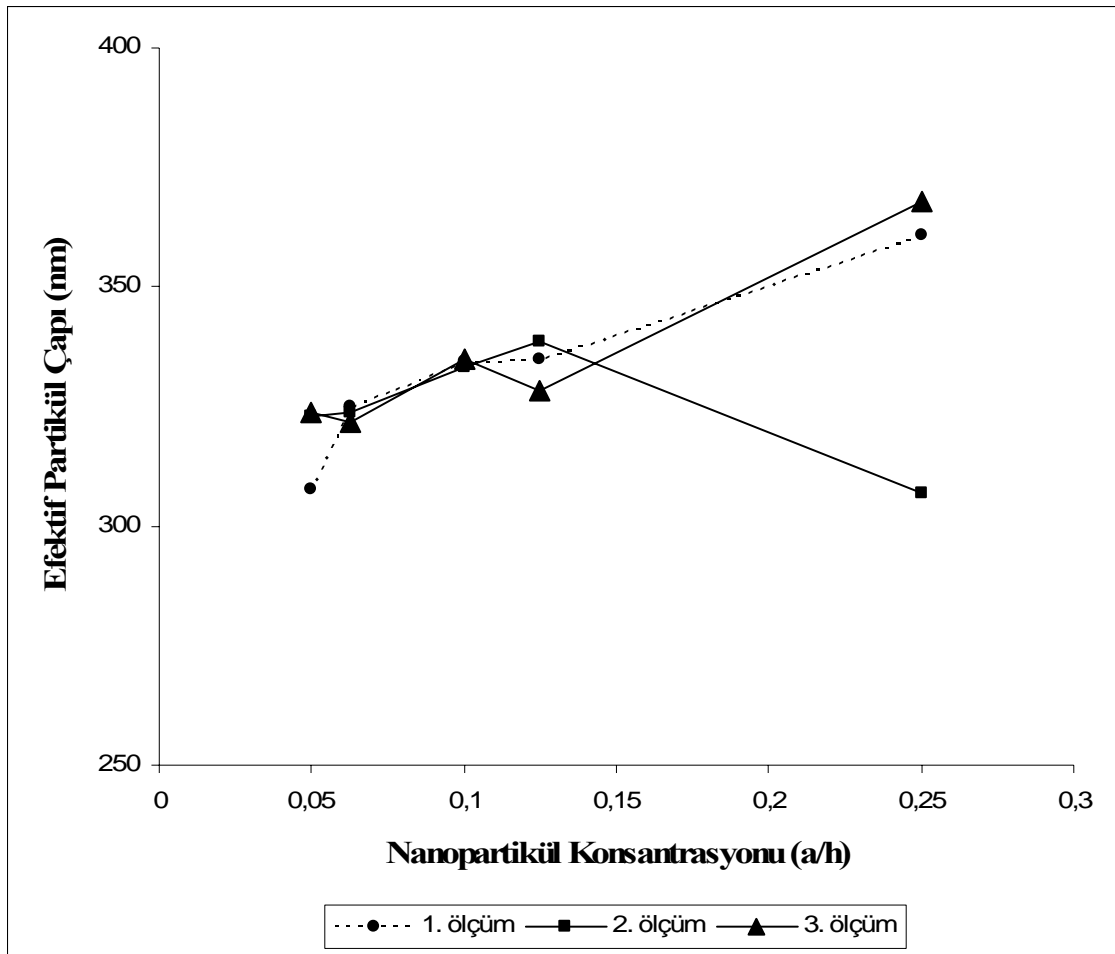


Şekil 45 : PVA-UL-F3 formülasyonun 3. serisinin partikül büyüklüğü ölçümüne ait grafik

1. ölçüm = 304,13 nm

2. ölçüm = 301,49 nm

3. ölçüm = 298,12 nm

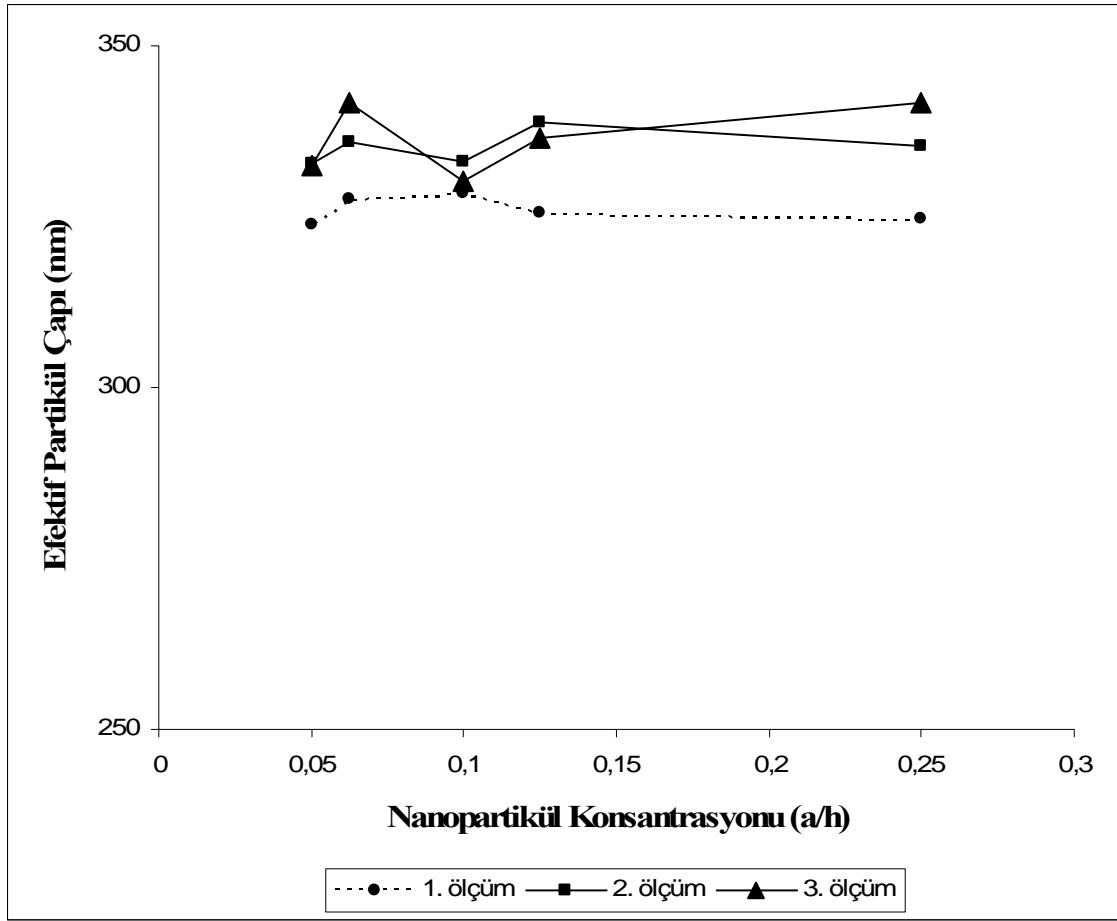


Şekil 46 : PVA-UL-F4 formülasyonun 1. serisinin partikül büyüklüğü ölçümüne ait grafik

1. ölçüm = 305,68 nm

2. ölçüm = 335,33 nm

3. ölçüm = 308,48 nm

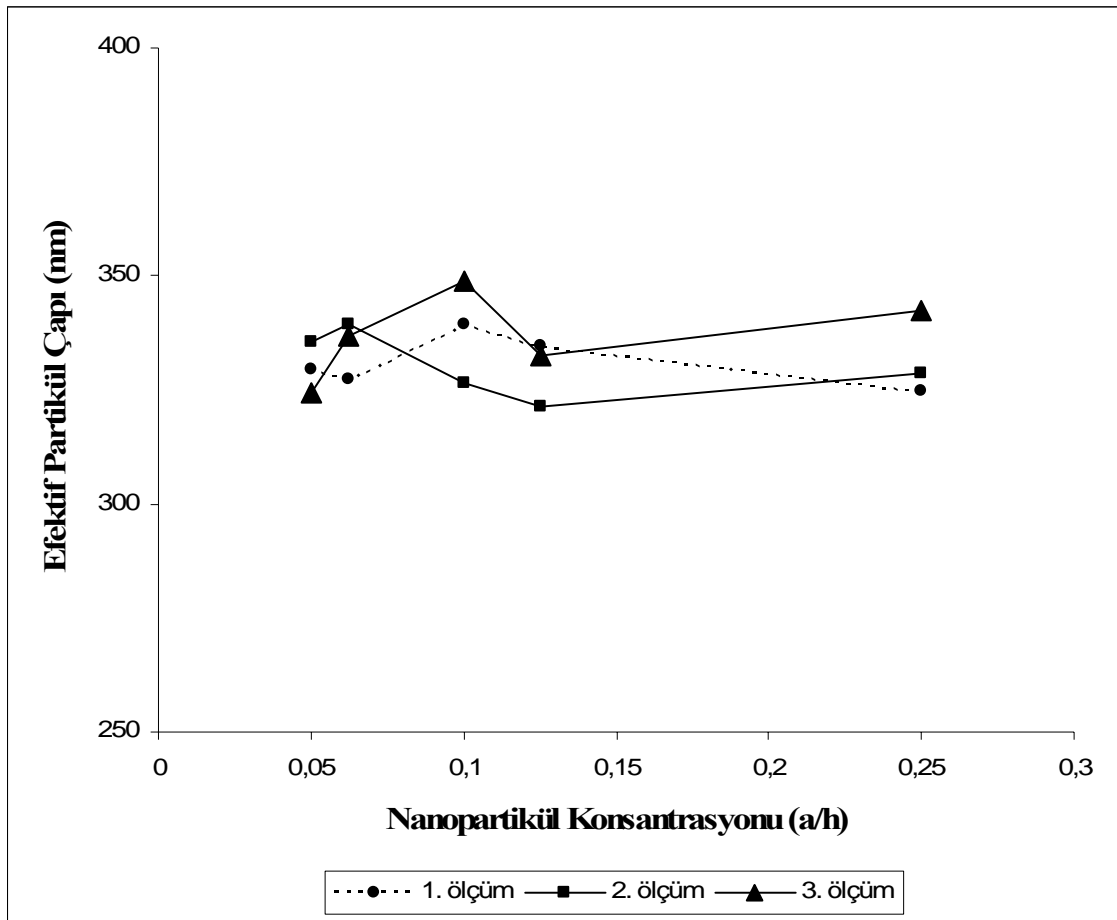


Şekil 47 : PVA-UL-F4 formülasyonun 2. serisinin partikül büyüklüğü ölçümüne ait grafik

1. ölçüm = 326,77 nm

2. ölçüm = 334,12 nm

3. ölçüm = 332,89 nm

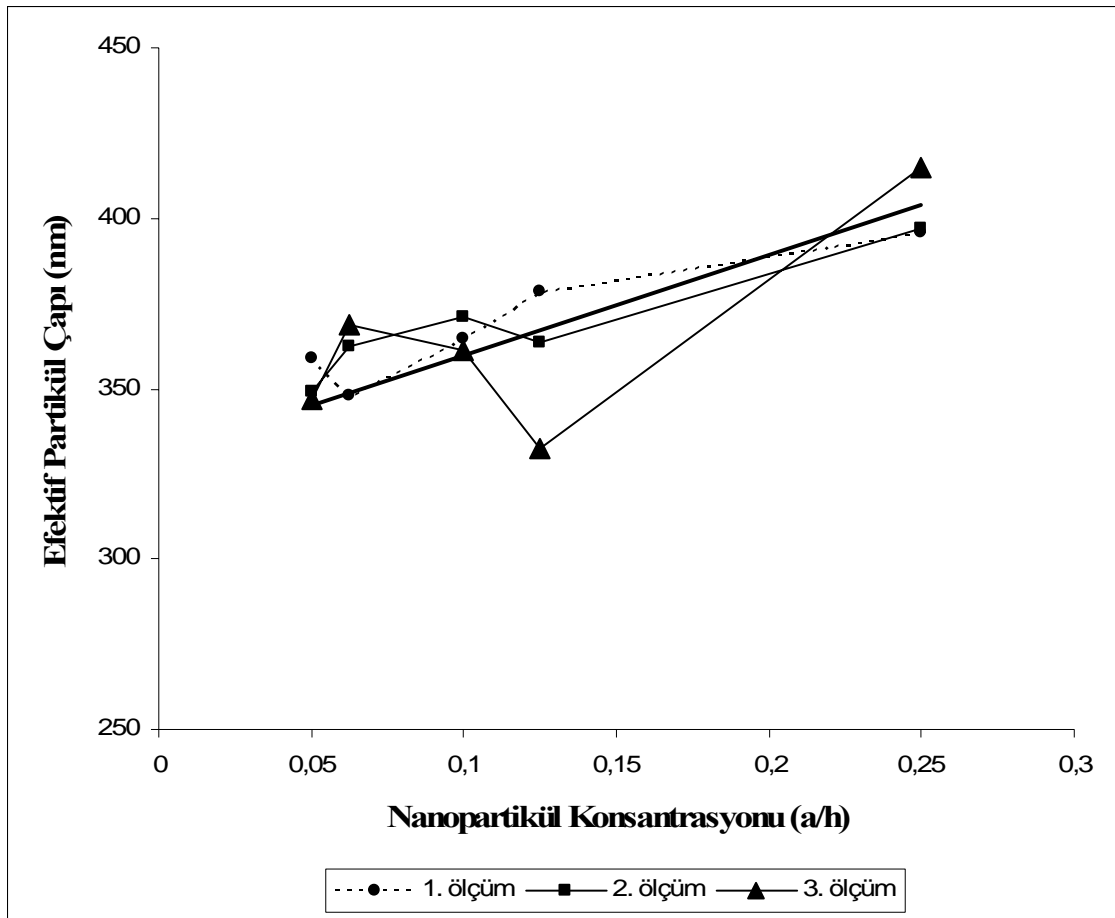


Şekil 48 : PVA-UL-F4 formülasyonun 3. serisinin partikül büyüklüğü ölçümüne ait grafik

1. ölçüm = 334,09 nm

2. ölçüm = 335,2 nm

3. ölçüm = 330,82 nm

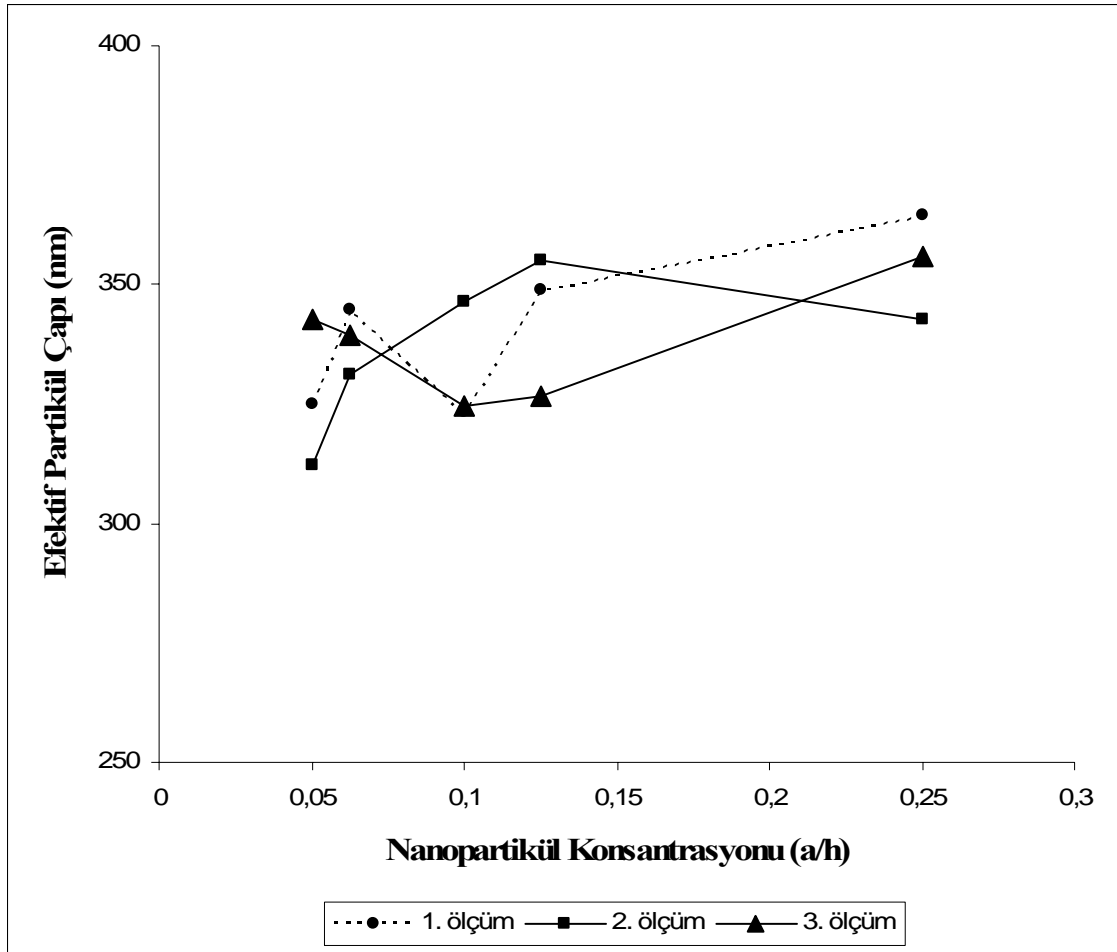


Şekil 49 : PVA-UL-F5 formülasyonun 1. serisinin partikül büyüklüğü ölçümüne ait grafik

1. ölçüm = 343,55 nm

2. ölçüm = 344,01 nm

3. ölçüm = 330,24 nm

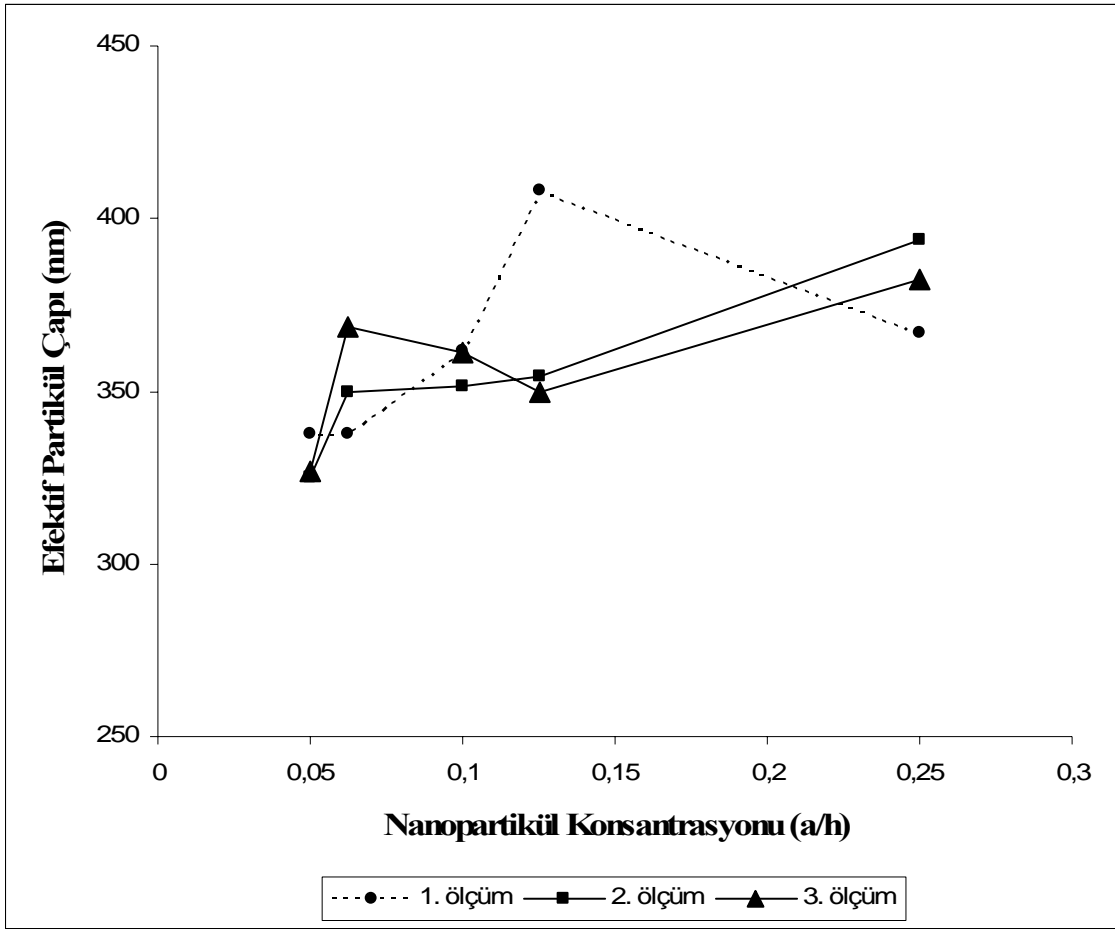


Şekil 50 : PVA-UL-F5 formülasyonun 2. serisinin partikül büyüklüğü ölçümüne ait grafik

1. ölçüm = 321,18 nm

2. ölçüm = 325,02 nm

3. ölçüm = 327,91 nm

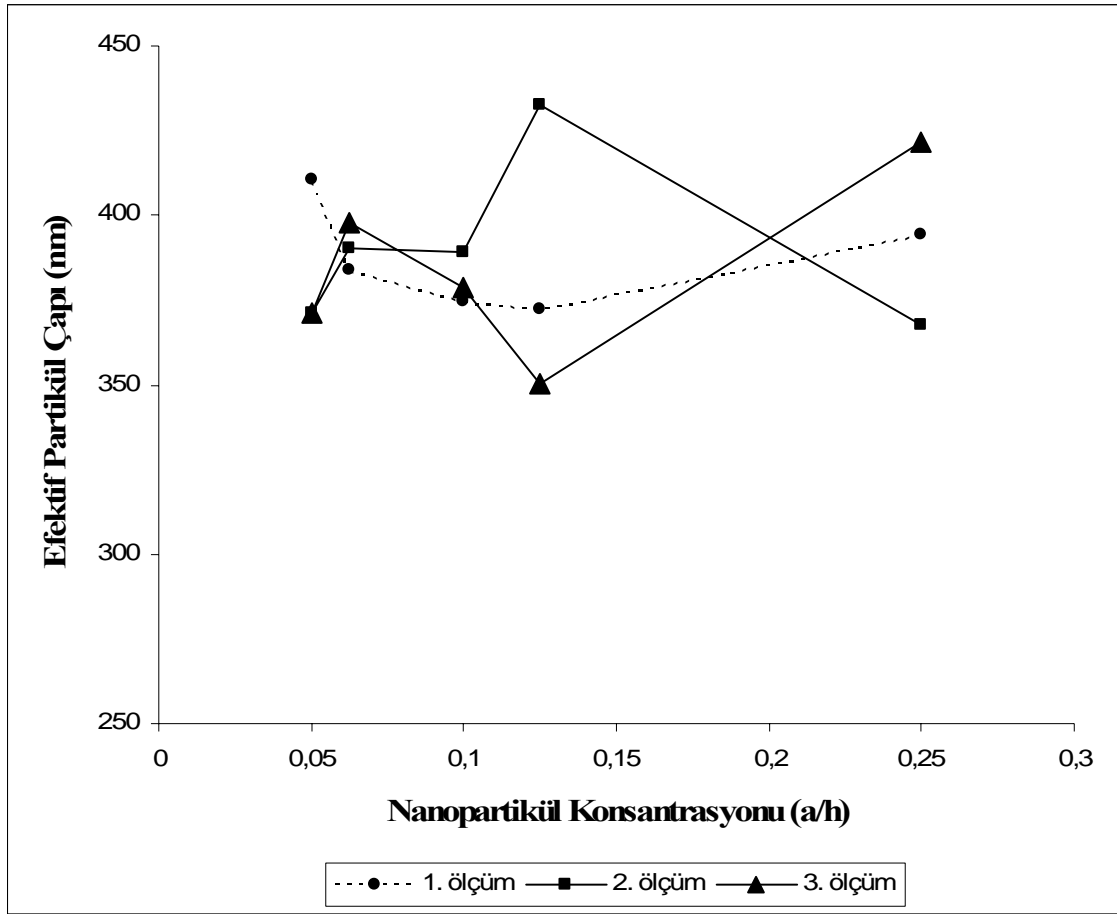


Şekil 51 : PVA-UL-F5 formülasyonun 3. serisinin partikül büyüklüğü ölçümüne ait grafik

1. ölçüm = 343,94 nm

2. ölçüm = 320,12 nm

3. ölçüm = 336,48 nm

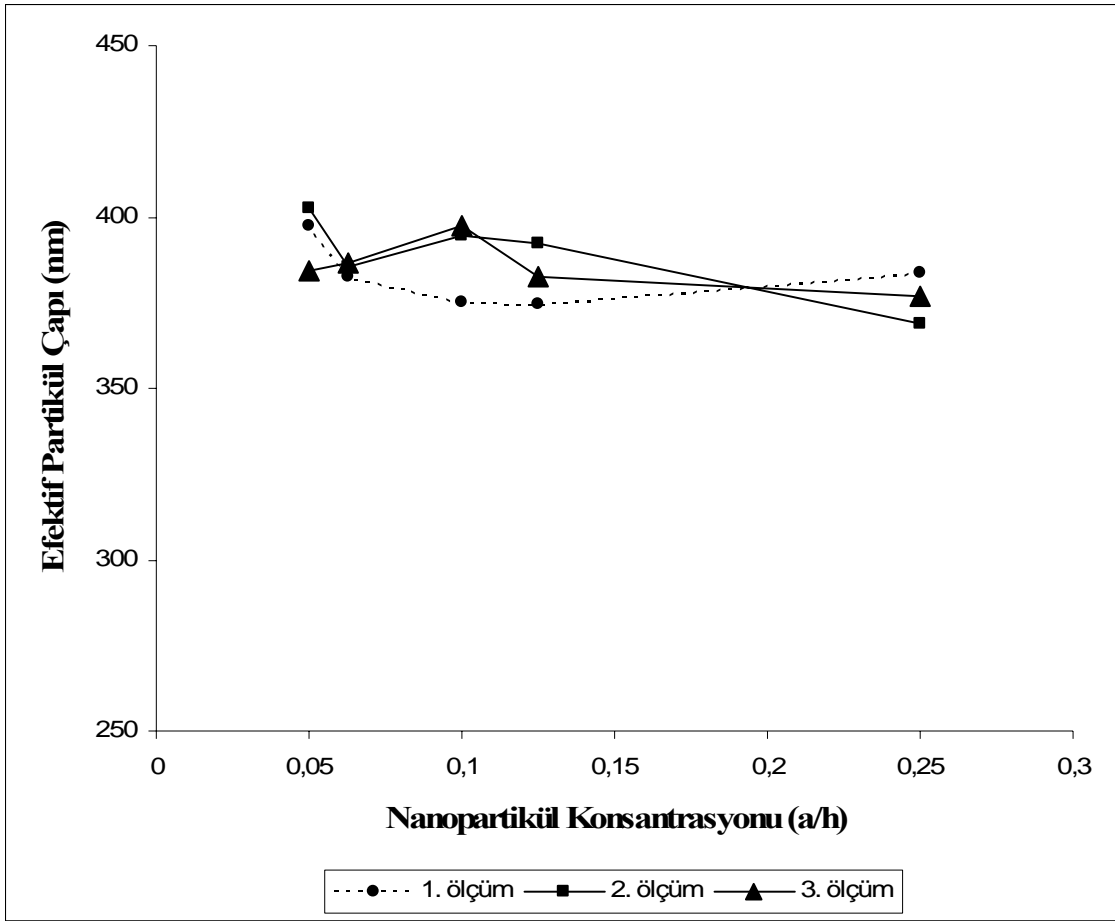


Şekil 52 : PVA-UL-F6 formülasyonun 1. serisinin partikül büyüklüğü ölçümüne ait grafik

1. ölçüm = 388,67 nm

2. ölçüm = 396,69nm

3. ölçüm = 361,42 nm

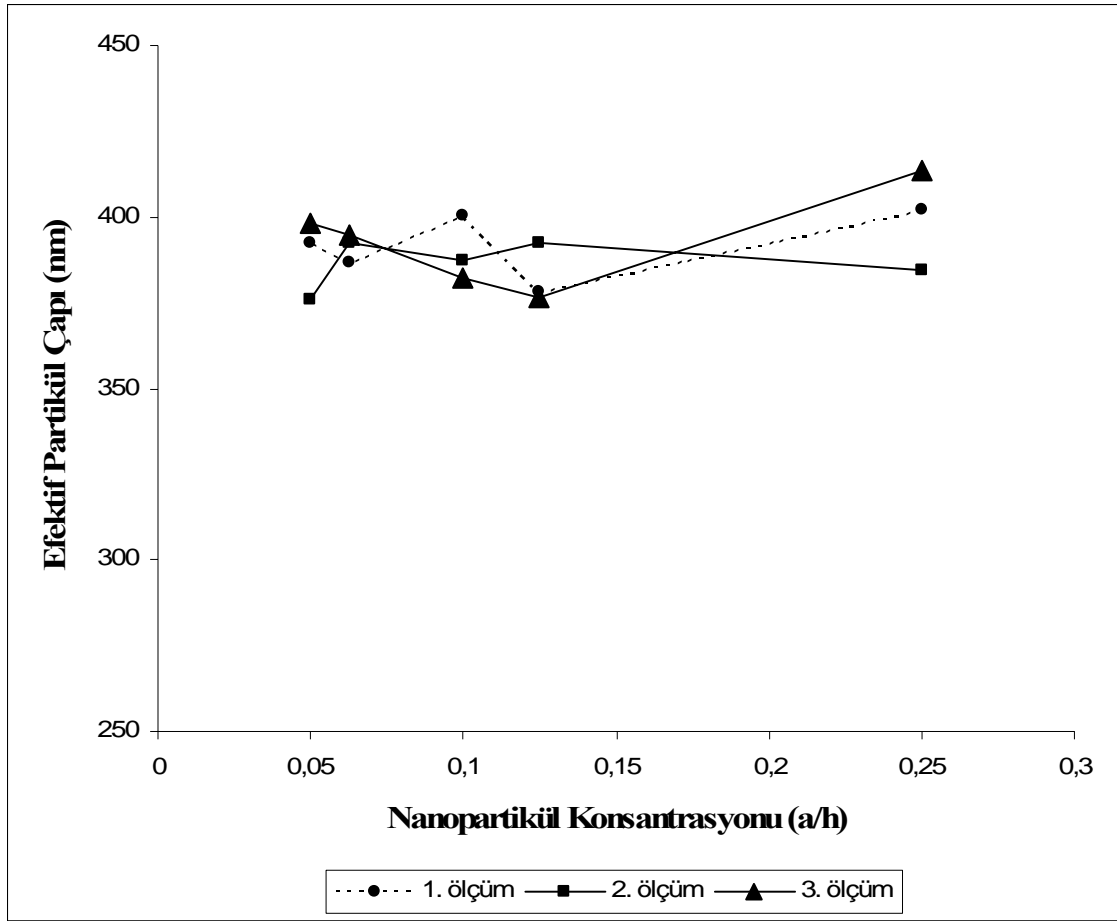


Şekil 53 : PVA-UL-F6 formülasyonun 2. serisinin partikül büyüklüğü ölçümüne ait grafik

1. ölçüm = 386,25 nm

2. ölçüm = 404,65 nm

3. ölçüm = 391,64 nm

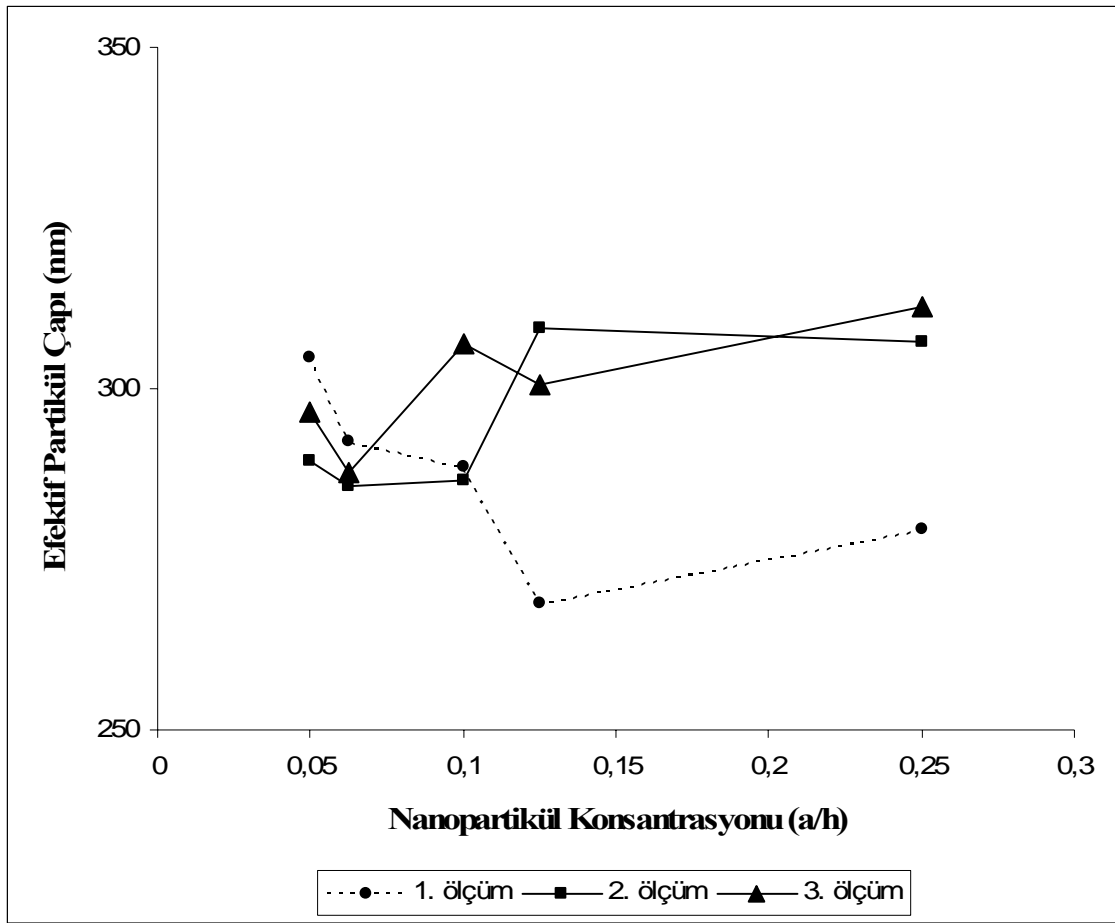


Şekil 54 : PVA-UL-F6 formülasyonun 3. serisinin partikül büyüklüğü ölçümüne ait grafik

1. ölçüm = 385,57 nm

2. ölçüm = 385,95 nm

3. ölçüm = 382,3 nm

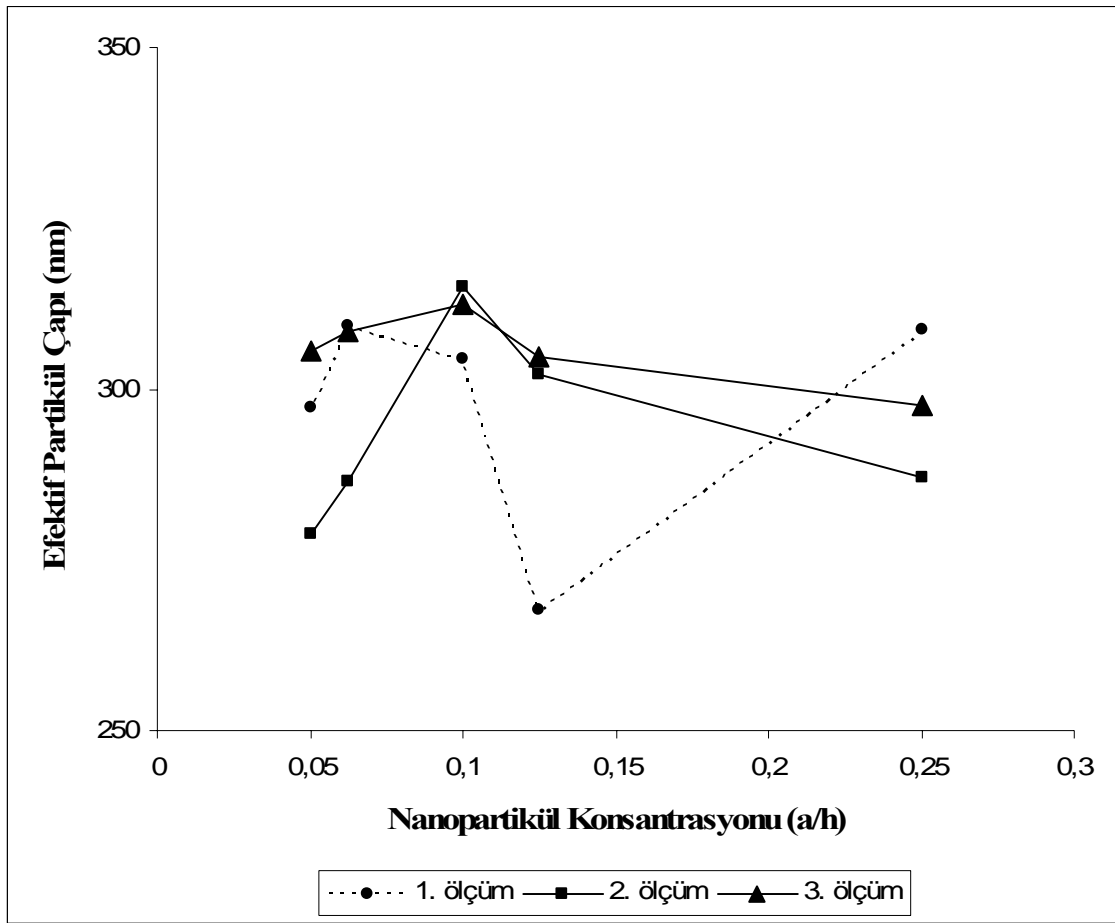


Şekil 55 : PVA-L-F2 formülasyonun 1. serisinin partikül büyüklüğü ölçümüne ait grafik

1. ölçüm = 298,93 nm

2. ölçüm = 283,07 nm

3. ölçüm = 289,69 nm

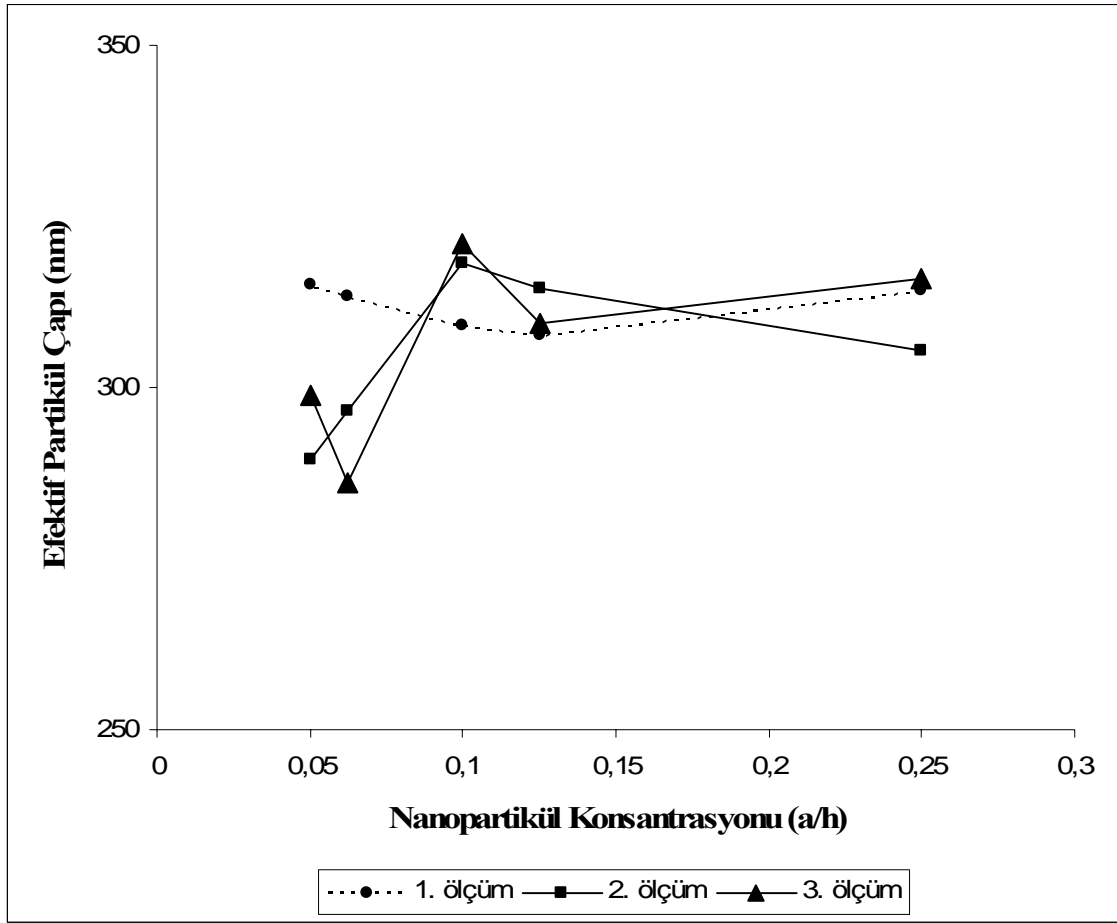


Şekil 56 : PVA-L-F2 formülasyonun 2. serisinin partikül büyüklüğü ölçümüne ait grafik

1. ölçüm = 295,21 nm

2. ölçüm = 292,94 nm

3. ölçüm = 311,94 nm



Şekil 57 : PVA-L-F2 formülasyonun 3. serisinin partikül büyüklüğü ölçümüne ait grafik

1. ölçüm = 311,71 nm

2. ölçüm = 298,44 nm

3. ölçüm = 294,01 nm

Tablo 18 : Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının partikül büyüklüğüne ait bulgular

Formülasyon Kodu	Seri Numarası	Ortalama Partikül Büyüklüğü (nm) ± SD	Polidispersite	Verim
PVA-UL-F1	1	261,15 ± 5,92	0,14	%98,40
	2	264,46 ± 9,88	0,15	%98,50
	3	267,63 ± 1,11	0,13	%97,80
PVA-UL-F2	1	278,45 ± 6,20	0,15	% 96
	2	286,45 ± 3,80	0,13	% 98,51
	3	286,05 ± 3,30	0,13	% 97,70
PVA-UL-F3	1	287,11 ± 1,07	0,11	%97,70
	2	286,74 ± 1,96	0,15	%97,60
	3	301,25 ± 3,01	0,14	%96,40
PVA-UL-F4	1	316,5 ± 16,37	0,17	%97,50
	2	331,26 ± 3,94	0,15	% 97
	3	333,37 ± 2,28	0,15	% 97,50
PVA-UL-F5	1	339,27 ± 7,82	0,12	%99
	2	333,51 ± 12,18	0,12	%98,10
	3	324,7 ± 3,38	0,11	%97,80
PVA-UL-F6	1	382,26 ± 18,49	0,12	% 98,20
	2	394,18 ± 9,46	0,11	% 98
	3	384,61 ± 2,01	0,12	%97,90
PVA-L-F2	1	290,56 ± 7,97	0,14	%97,20
	2	300,03 ± 10,38	0,10	% 98,20
	3	301,39 ± 9,21	0,12	%98,40

2.3.3.Nanopartiküllerin Yüzey Yüklerinin (Zeta Potansiyel) Tayin Edilmesine Ait Bulgular

PVA nanopartikül formülasyonlarına (PVA-UL-F2, PVA-L-F2) ait zeta potansiyel değerleri Tablo 19 ve PS nanopartikül formülasyonlarına (PS-NC-51, PS-C-250, PS-C-50, PS-C-300) ait zeta potansiyel değerleri Tablo 20 de verilmiştir.

Tablo 19 : PVA ile hazırlanan nanopartiküllerin zeta potansiyel değerlerine ait bulgular

Formülasyon Kodu	HBSS	Hücre Kültürü Çalışma Besiyeri
PVA-UL-F2	1,89 ± 0,95	- 0,47 ± 0,53
PVA-L-F2	1,92 ± 3,76	0,23 ± 0,40

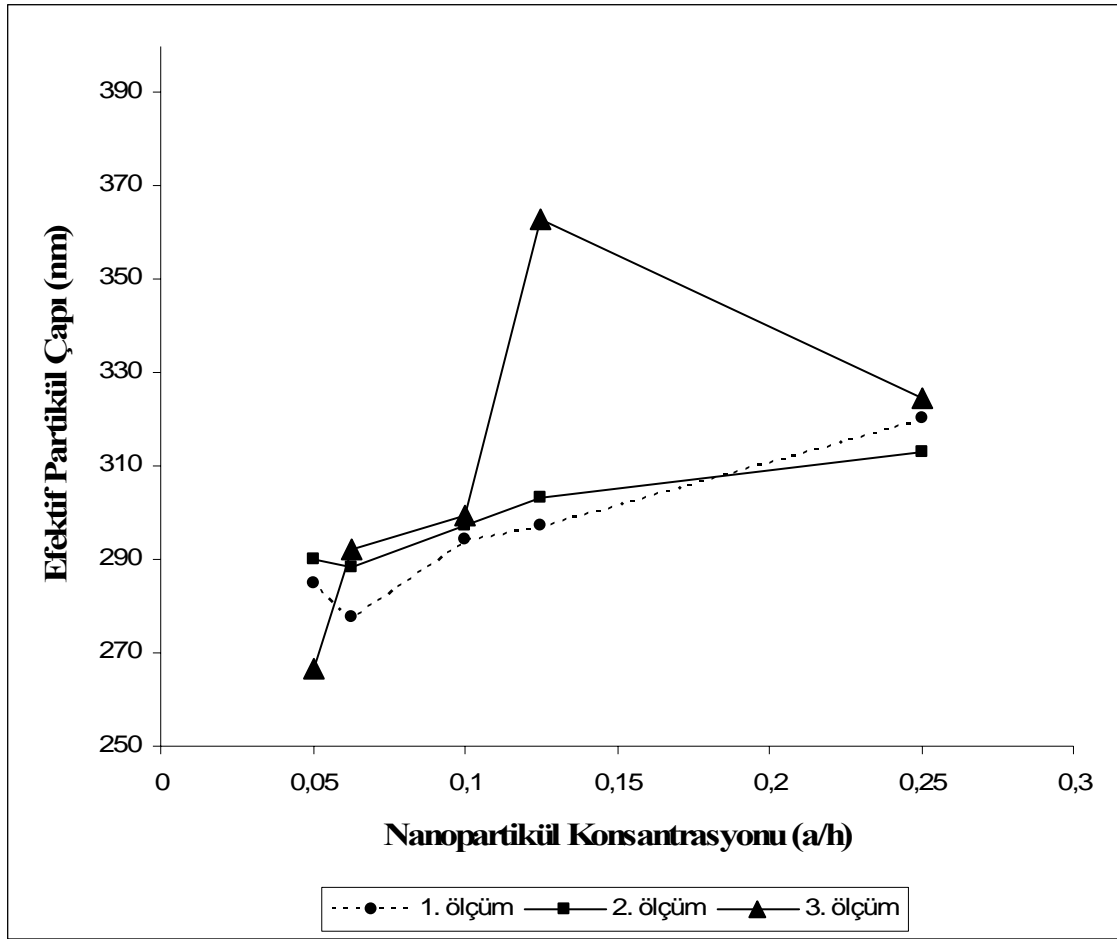
Tablo 20 : PS ile hazırlanan nanopartiküllerin zeta potansiyel değerlerine ait bulgular

Formülasyon Kodu	HBSS	Hücre Kültürü Çalışma Besiyeri
PS-NC-51	-12,01 ± 5,78	4,14 ± 5,00
PS-NC-250	-13,3 ± 1,83	1,83 ± 2,05
PS-C-50	-17,96 ± 5,76	-1,87 ± 2,24
PS-C-300	-18,94 ± 7,19	7,45 ± 6,17

2.3.4.Nanopartiküllerinin Stabilitésinin İncelenmesine Ait Bulgular

PVA-UL-F2 nanopartiküllerinin distile su içindeki dispersiyonlarının (% 0,05 a/h) oda sıcaklığındaki stabilite testine ait partikül büyüklüğü ölçümleri Şekil 58-62 de ve Tablo 21 de verilmiştir.

PVA-L-F2 ve PS nanopartikül dipersiyonlarının (PS-NC-51, PS-NC-250, PS-C-50, PS-C-300) Calu-3 hücre kültürü çalışma besiyeri ve HBSS içindeki stabilitesiyle ilgili bulgular Tablo 22 ve 23 de gösterilmiştir. PVA nanopartikül formülasyonlarının stabilite değerleri 48 saat süreyle hücre kültürü çalışma besiyeri ve HBSS içinde anlamlı farklılık göstermezken ($p>0,05$), PS nanopartikül formülasyonları için bu farklılık anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

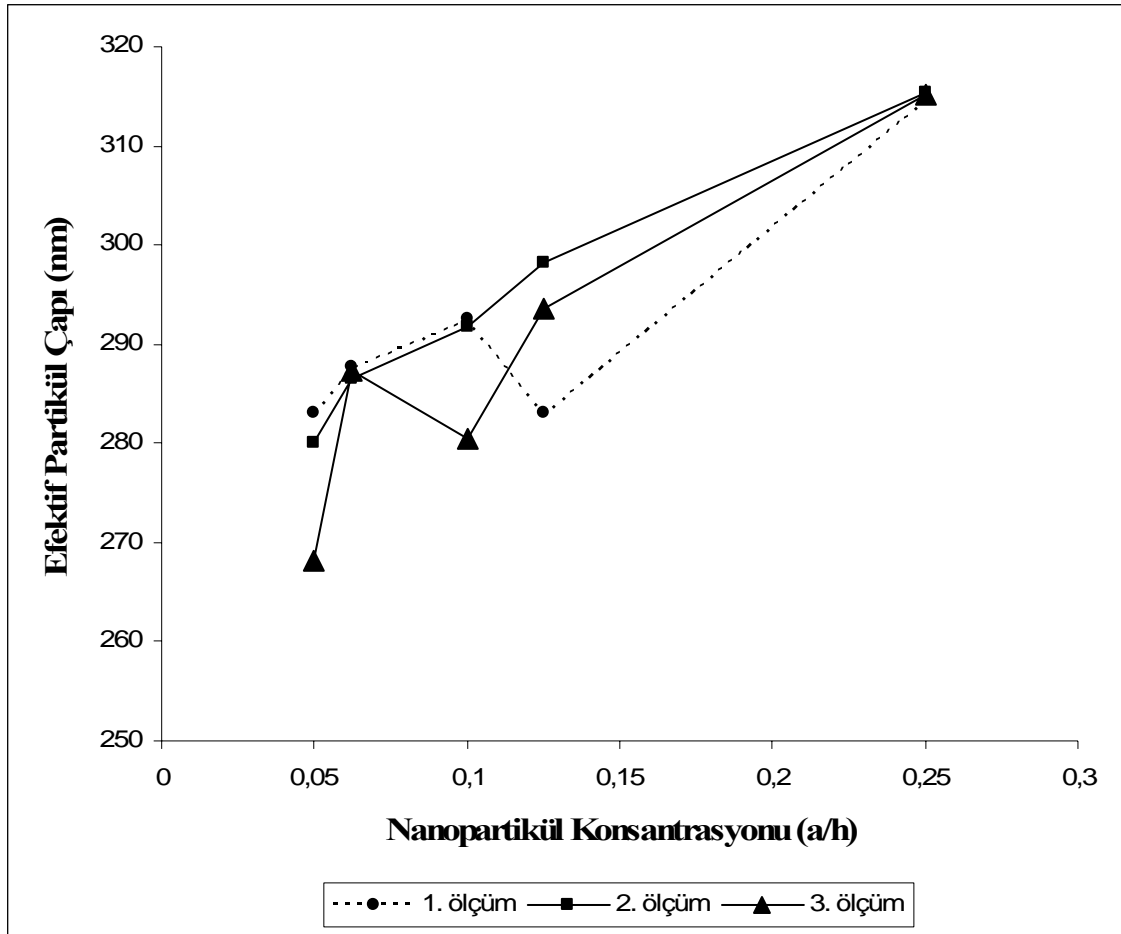


Şekil 58 : PVA-UL-F2 formülasyonun 1. gün büyüklüğü ölçümüne ait grafik

1. ölçüm = 271,81 nm

2. ölçüm = 284,1 nm

3. ölçüm = 279,44 nm

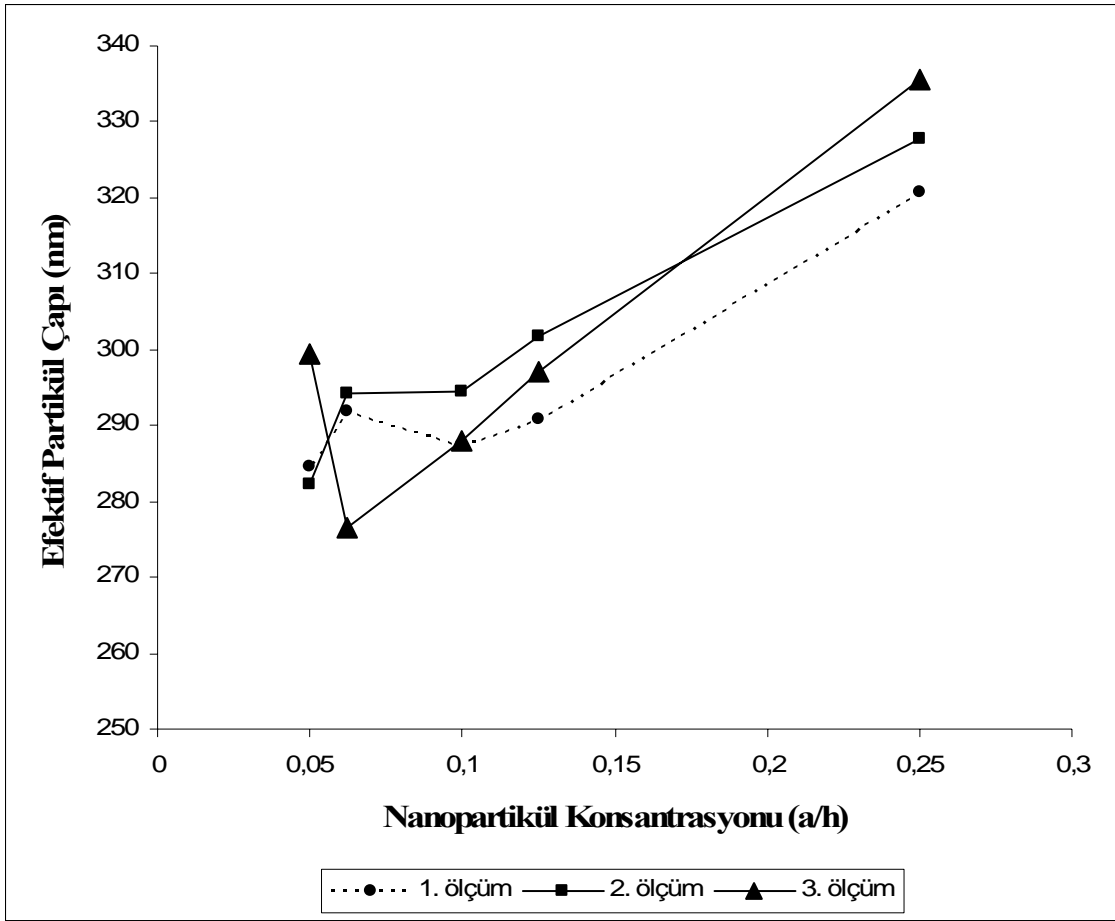


Şekil 59 : PVA-UL-F2 formülasyonun 3. gün büyüklüğü ölçümüne ait grafik

1. ölçüm = 274,88 nm

2. ölçüm = 274,79 nm

3. ölçüm = 265,21 nm

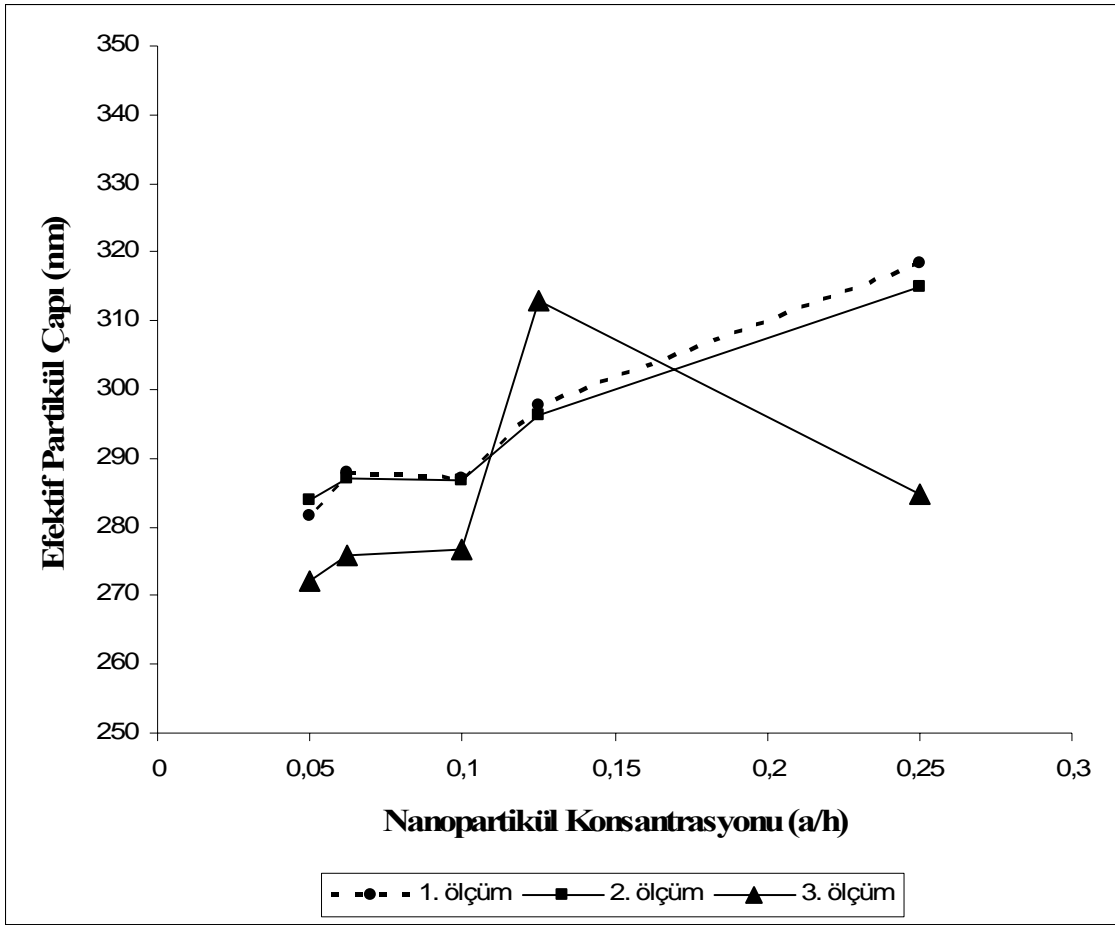


Şekil 60 : PVA-UL-F2 formülasyonun 7. gün büyüklüğü ölçümüne ait grafik

1. ölçüm = 274,9 nm

2. ölçüm = 275,67 nm

3. ölçüm = 270,66 nm

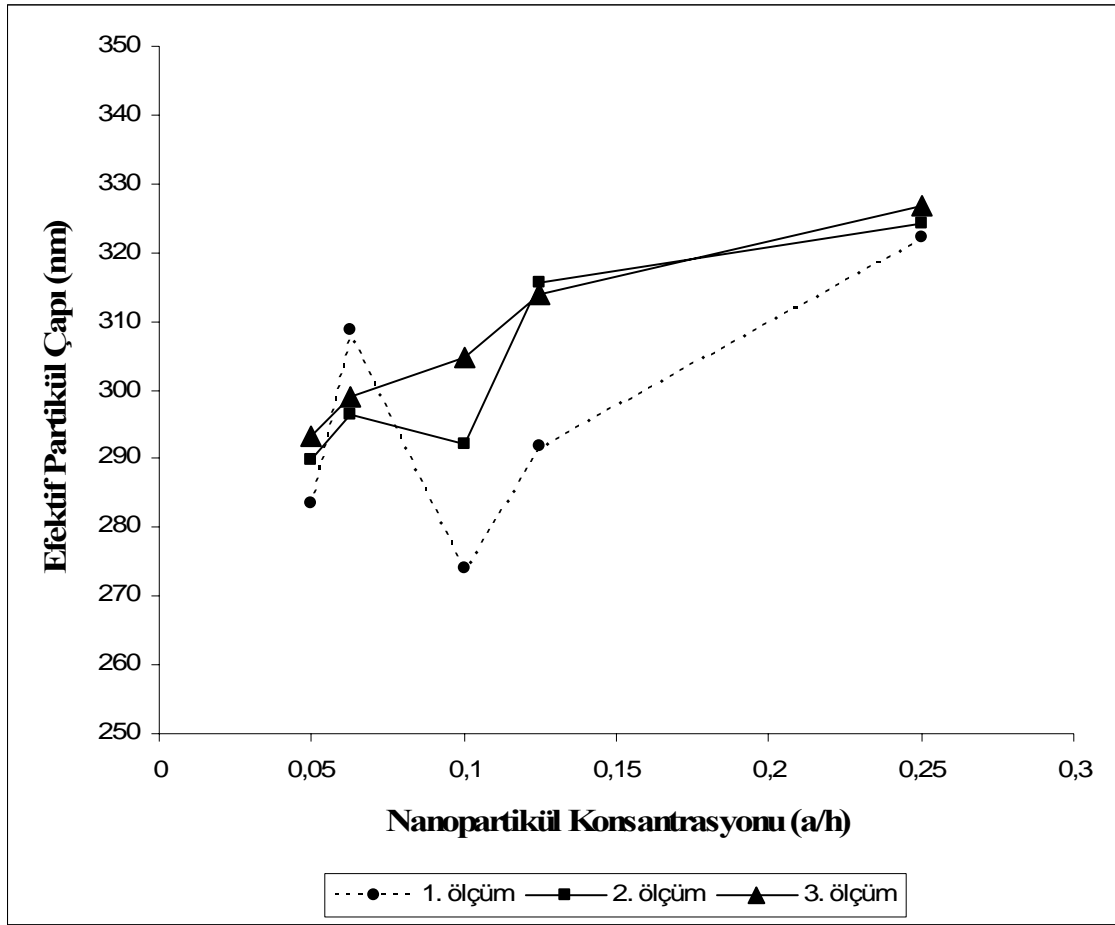


Şekil 61 : PVA-UL-F2 formülasyonun 14. gün büyüklüğü ölçümüne ait grafik

1. ölçüm = 273,52 nm

2. ölçüm = 275,53 nm

3. ölçüm = 276,62 nm



Şekil 62 : PVA-UL-F2 formülasyonunun 30. gün büyüklüğü ölçümüne ait grafik

1. ölçüm = 277,82 nm

2. ölçüm = 283,69 nm

3. ölçüm = 288,77 nm

Tablo 21 : PVA-UL-F2 nin distile sudaki stabilite değerleri

Formülasyon Kodu	<u>1.gün</u> Partikül Büyüklüğü ± SD	<u>3.gün</u> Partikül Büyüklüğü ± SD	<u>7.gün</u> Partikül Büyüklüğü ± SD	<u>14.gün</u> Partikül Büyüklüğü ± SD	<u>30.gün</u> Partikül Büyüklüğü ± SD
PVA-UL-F2	278,45 ± 6,2	271,63±5,56	273,74±2,7	275,22±1,57	283,43±5,48

Tablo 22 : PVA-L-F2 ve PS nanopartikül formülasyonlarına ait hücre kültürü çalışma besiyerindeki stabilite değerleri

Formülasyon Kodu	Hücre Kültürü Çalışma Besiyeri (%2 FBS içeren DMEM)		
	0 h	24 h	48 h
PVA-UL-F2	238,30 ± 6,90	224,90 ± 5,60	233,30 ± 8,30
PVA-L-F2	213,10 ± 7,80	249,30 ± 5,0	230,80 ± 14,70
PS-NC-51	494,50 ± 31,80	787,40 ± 76,90	> 1 µm
PS-NC-250	383,10 ± 24,10	394,70 ± 21,40	694,50 ± 100,0
PS-C-50	209,70 ± 15,20	600,20 ± 21,90	768,40 ± 11,70
PS-C-300	468,20 ± 42,60	479,10 ± 15,10	697,30 ± 53,70

Tablo 23 : PVA ve PS nanopartikül formülasyonlarına ait HBSS deki stabilite değerleri

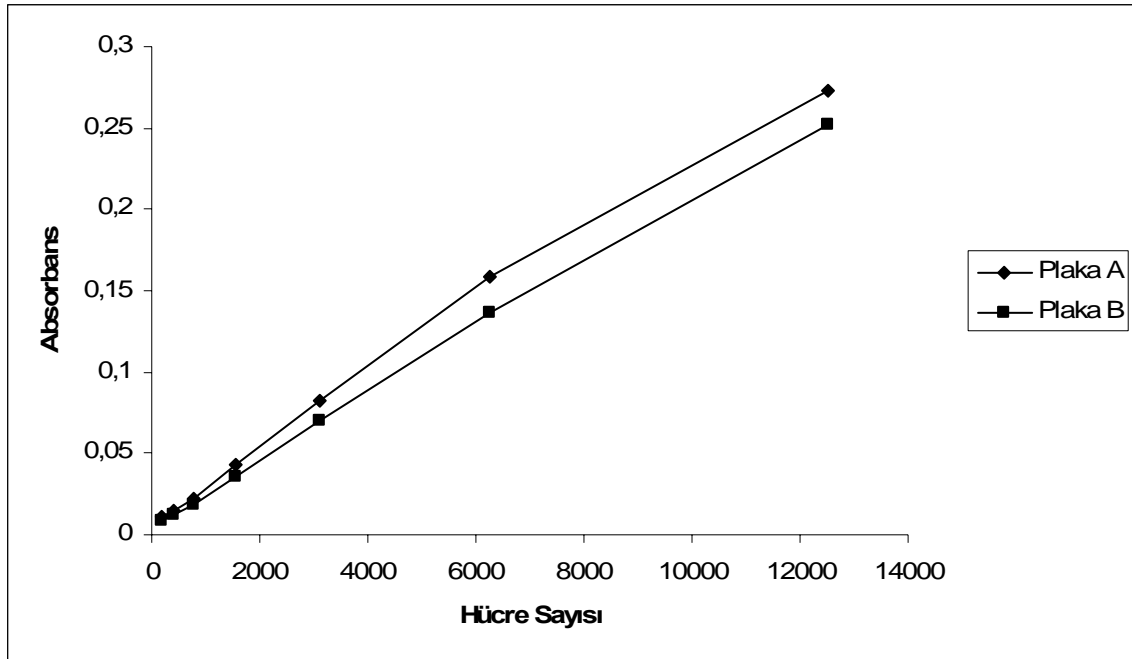
Formülasyon Kodu	HBSS		
	0 h	24 h	48 h
PVA-UL-F2	255,20 ± 6,20	230,60 ± 19,70	221,40 ± 22,60
PVA-L-F2	237,80 ± 2,60	214,30 ± 21,90	215,40 ± 16,10
PS-NC-51	63,20 ± 0,30	80,70 ± 3,10	123,60 ± 15,40
PS-NC-250	293,20 ± 29,00	305,50 ± 18,20	323,10 ± 14,70
PS-C-50	374,90 ± 9,40	> 1 µm	> 1 µm
PS-C-300	> 1 µm	> 1 µm	> 1 µm

3.Hücre Kültürü Çalışmalarına Ait Bulgular

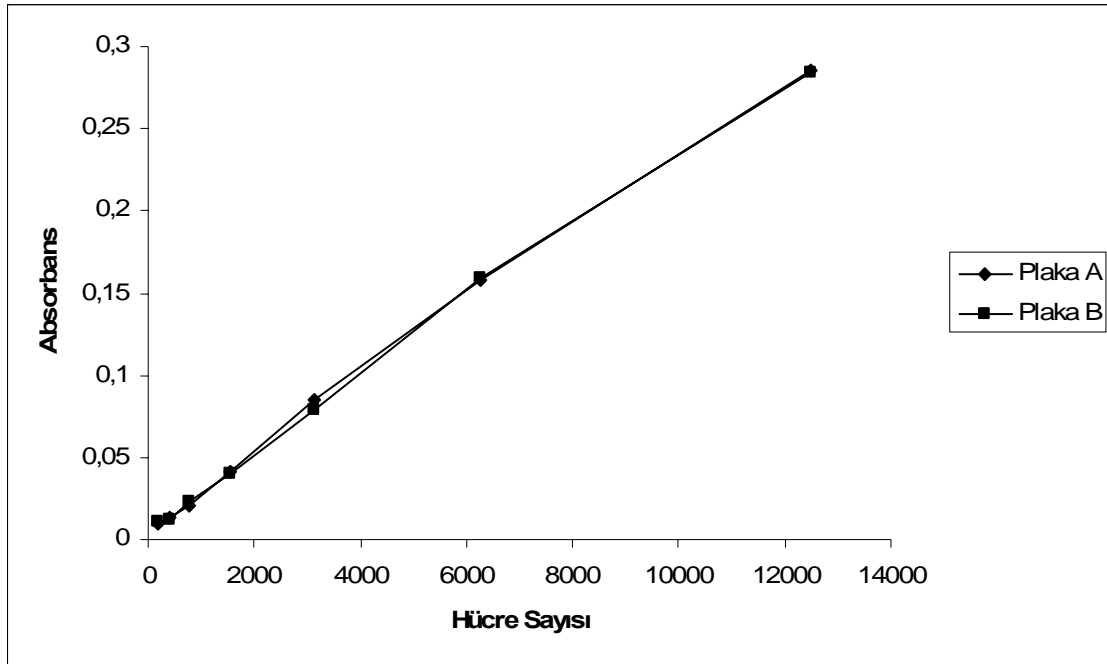
3.1.Toksisite Çalışmalarına Ait Bulgular

2.1.1.MTT Yönteminin Validasyonuna Ait Bulgular

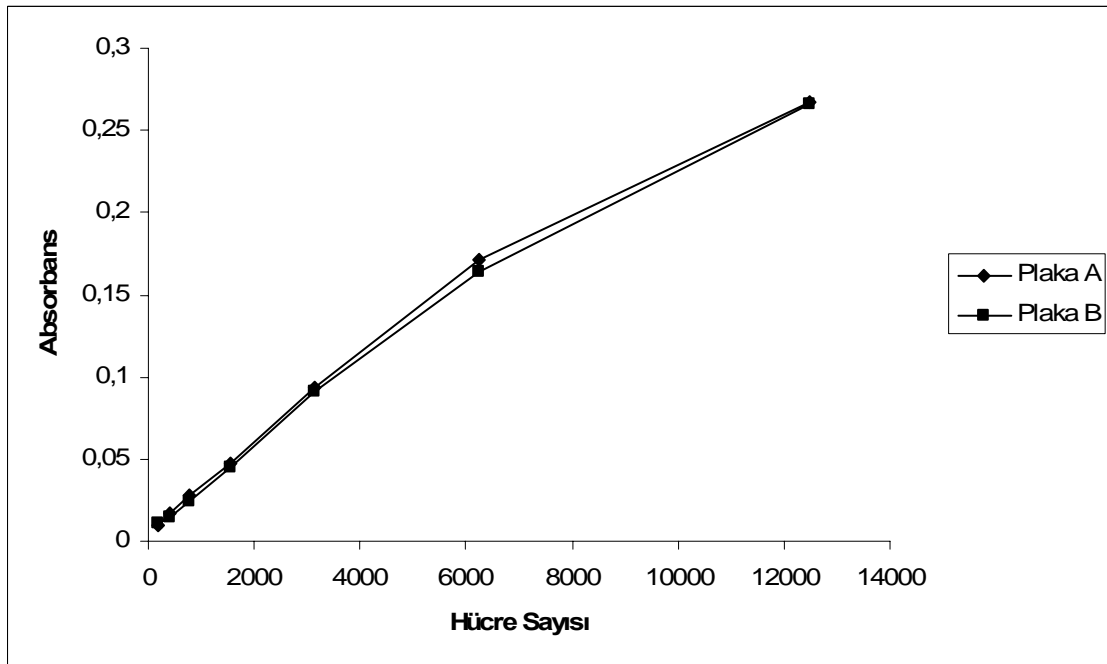
Yöntem 4.3.1. de anlatıldığı şekilde, %2 FBS içeren DMEM hücre kültürü çalışma besiyeri ile inkübasyona bırakılan Calu-3 hücrelerinin yaşayabilirliği ile ilgili deney sonuçlarına ait bulgular Şekil 63-68 de ve %2 FBS içeren MEM hücre kültürü çalışma besiyeri ile inkübasyona bırakılan A549 hücrelerinin yaşayabilirliği ile ilgili deney sonuçlarına ait bulgular Şekil 69-74 da gösterilmiştir. Calu-3 hücrelerinin MTT testi ile elde edilen kalibrasyon eğrilerine ait absorbans değerleri Tablo 24 de, A549 hücrelerinin MTT testi ile elde edilen kalibrasyon eğrilerine ait absorbans değerleri Tablo da 25 de verilmiştir.



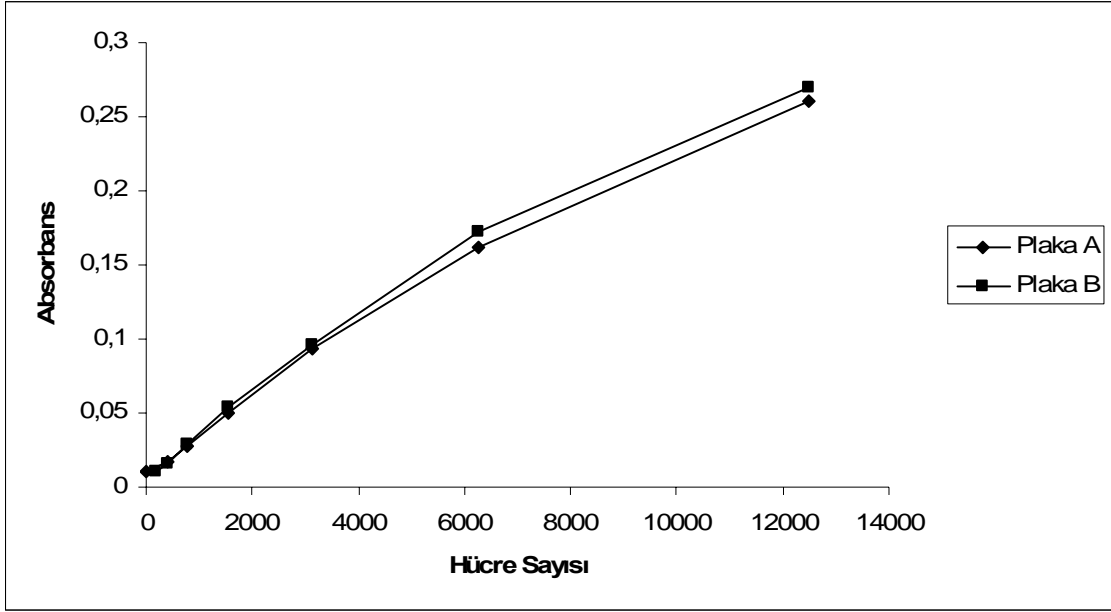
Şekil 63 : %2 FBS içeren DMEM hücre kültürü çalışma besiyeri ile inkübasyona bırakılan Calu-3 hücrelerinin MTT yöntemi ile elde edilen 1. kalibrasyon eğrisi



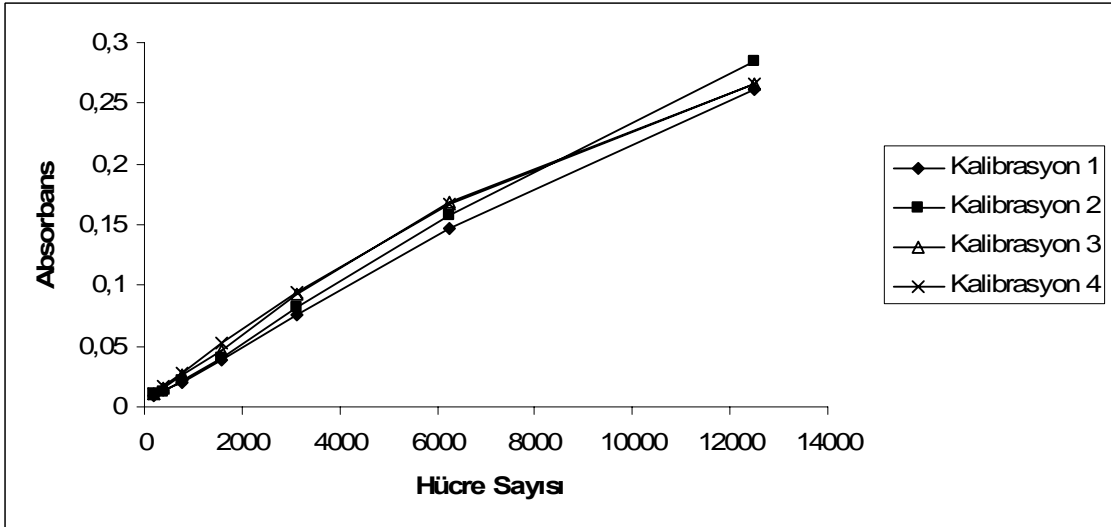
Şekil 64 : %2 FBS içeren DMEM hücre kültürü çalışma besiyeri ile inkübasyona bırakılan Calu-3 hücrelerinin MTT yöntemi ile elde edilen 2. kalibrasyon eğrisi



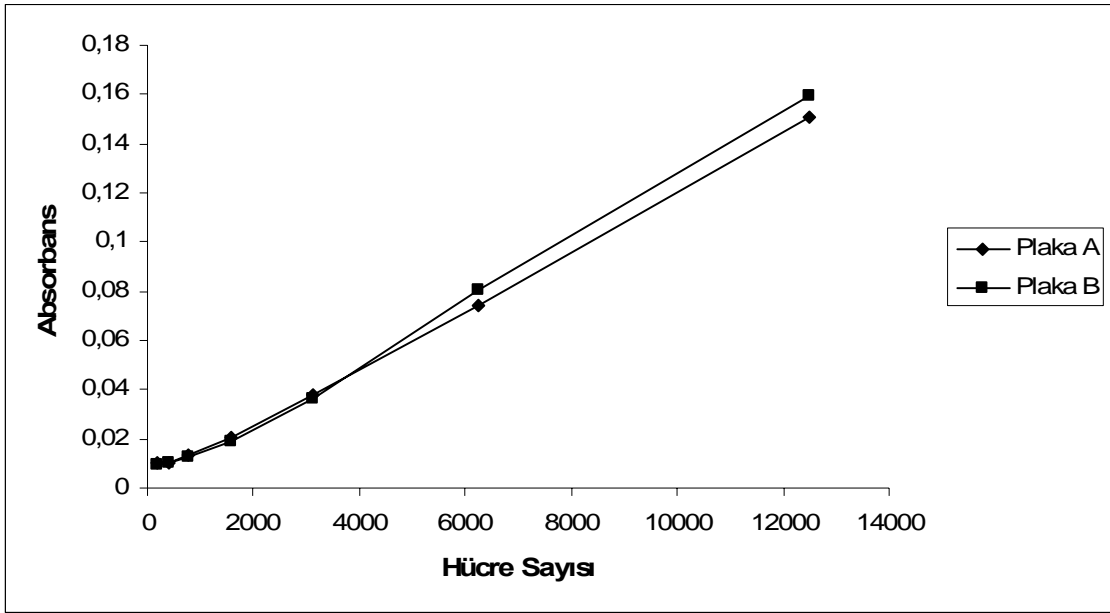
Şekil 65 : %2 FBS içeren DMEM hücre kültürü çalışma besiyeri ile inkübasyona bırakılan Calu-3 hücrelerinin MTT yöntemi ile elde edilen 3. kalibrasyon eğrisi



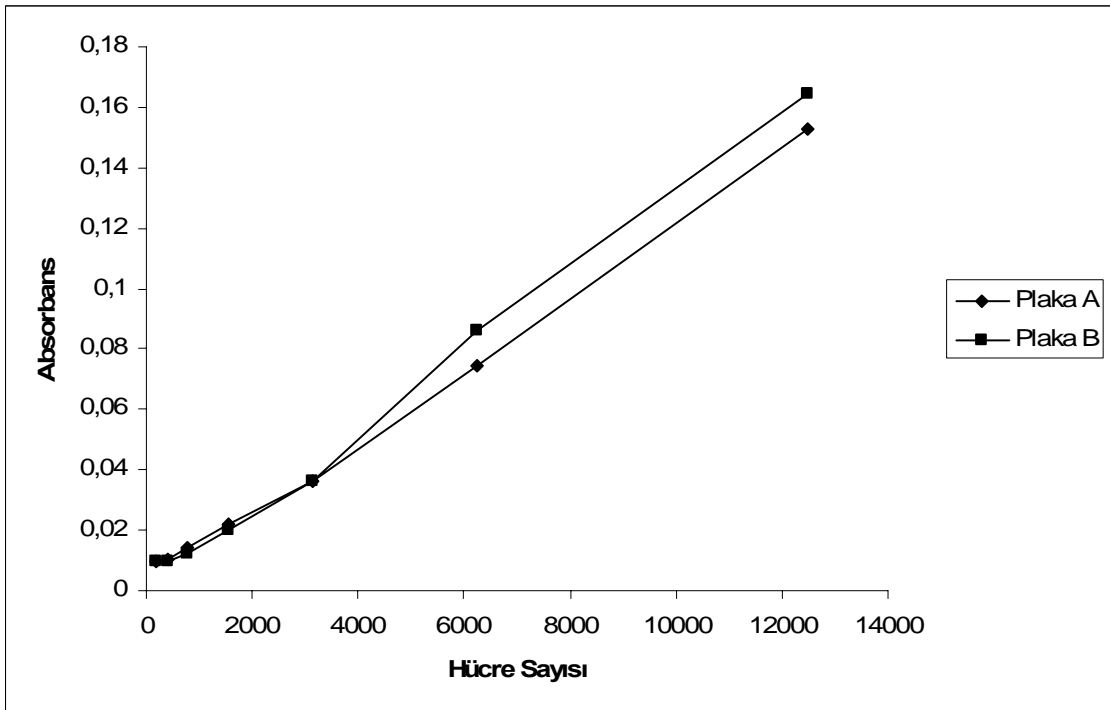
Şekil 66 : %2 FBS içeren DMEM hücre kültürü çalışma besiyeri ile inkübasyona bırakılan Calu-3 hücrelerinin MTT yöntemi ile elde edilen 4. kalibrasyon eğrisi



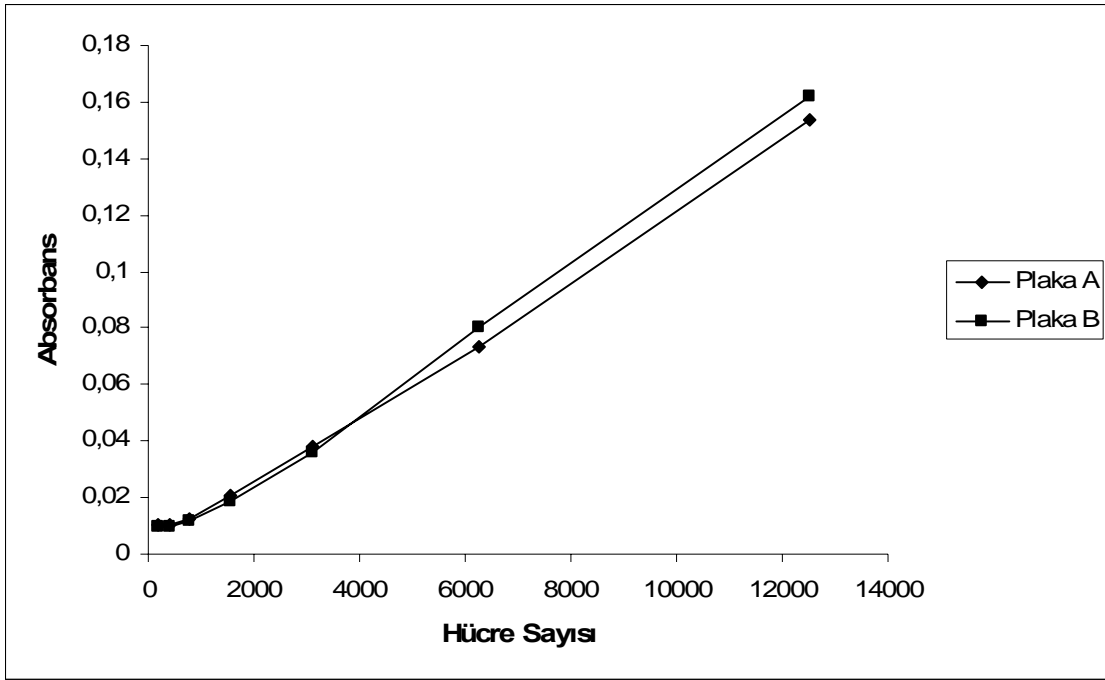
Şekil 67 %2 FBS içeren DMEM hücre kültürü çalışma besiyeri ile inkübasyona bırakılan Calu-3 hücrelerinin MTT yöntemi ile elde edilen genel kalibrasyon eğrileri



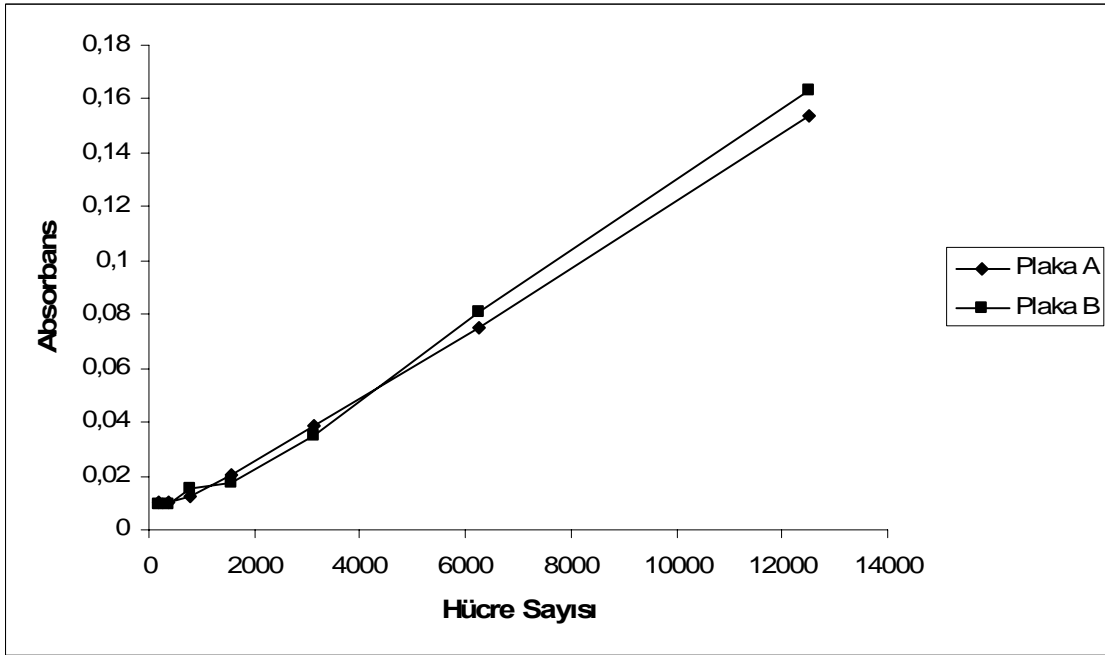
Şekil 69 : %2 FBS içeren MEM hücre kültürü çalışma besiyeri ile inkübasyona bırakılan A549 hücrelerinin MTT yöntemi ile elde edilen 1. kalibrasyon eğrisi



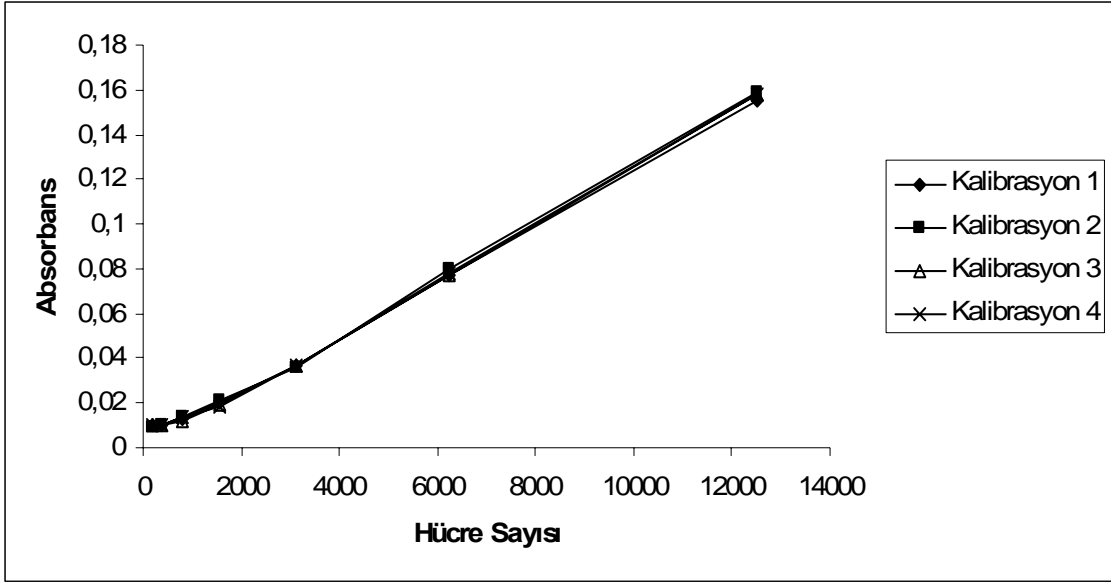
Şekil 70 : %2 FBS içeren MEM hücre kültürü çalışma besiyeri ile inkübasyona bırakılan A549 hücrelerinin MTT yöntemi ile elde edilen 2. kalibrasyon eğrisi



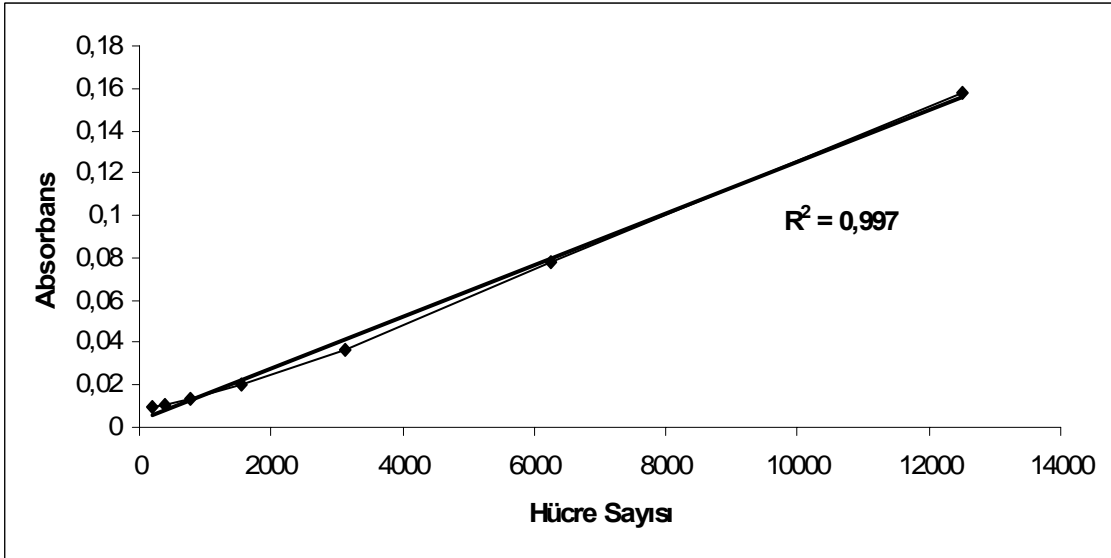
Şekil 71 : %2 FBS içeren MEM hücre kültürü çalışma besiyeri ile inkübasyona bırakılan A549 hücrelerinin MTT yöntemi ile elde edilen 3. kalibrasyon eğrisi



Şekil 72 : %2 FBS içeren MEM hücre kültürü çalışma besiyeri ile inkübasyona bırakılan A549 hücrelerinin MTT yöntemi ile elde edilen 4. kalibrasyon eğrisi



Şekil 73 : %2 FBS içeren MEM hücre kültürü çalışma besiyeri ile inkübasyona bırakılan A549 hücrelerinin MTT yöntemi ile elde edilen genel kalibrasyon eğrileri



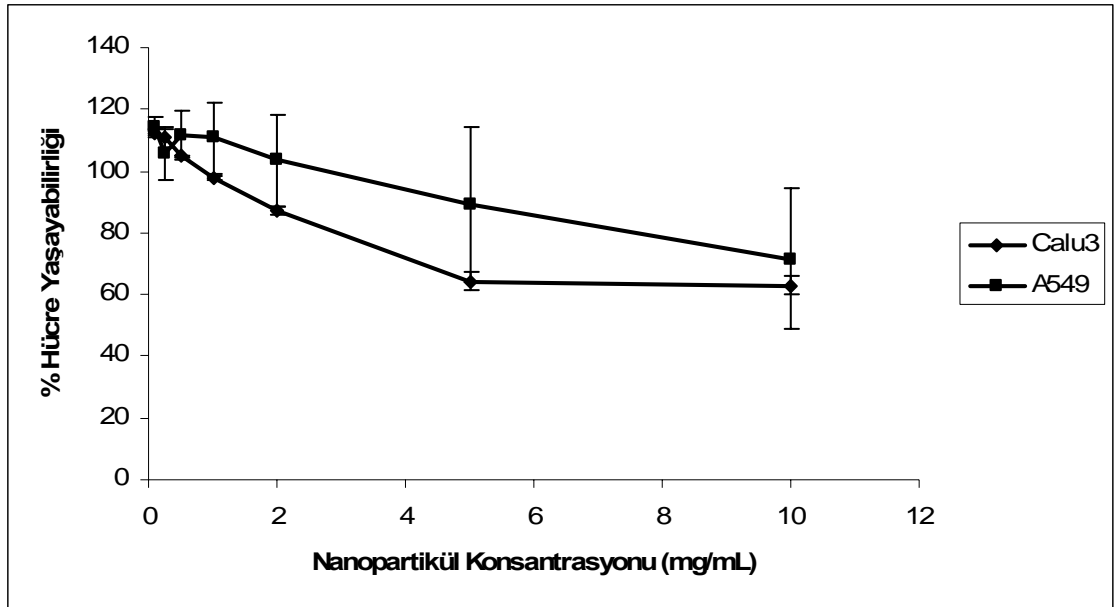
Şekil 74 : %2 FBS içeren MEM hücre kültürü çalışma besiyeri ile inkübasyona bırakılan A549 hücrelerinin MTT yöntemi ile elde edilen genel kalibrasyon eğrisi

Tablo 25 : A549 hücrelerinin MTT yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrilerine ait absorbands değerlerine ait bulgular

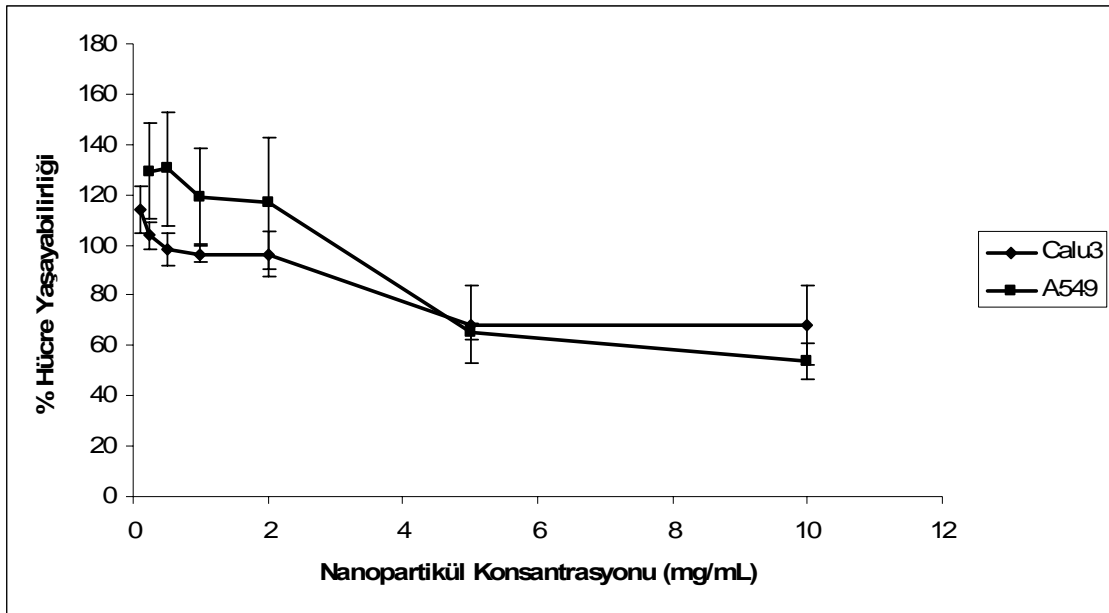
Hücre Sayısı	Kalibrasyon 1	Kalibrasyon 2	Kalibrasyon 3	Kalibrasyon 4	Ortalama Absorbans	SD
50000	0,45	0,45	0,46	0,45	0,45	0,00
25000	0,26	0,26	0,26	0,26	0,26	0,00
12500	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,00
6250	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,00
3125	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,00
1562,5	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,00
781,25	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00
390,625	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00
195,3125	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00

2.1.2.MTT Yöntemi ile PVA ve PS Nanopartikül Formülasyonlarının Akciğer Hücreleri Yaşayabilirliği Üzerindeki Etkisinin İncelenmesine Ait Bulgular

Yöntem 4.3.2. de anlatıldığı üzere PVA-UL-F2 ve PVA-L-F2 ile inkübasyona bırakılan Calu-3 ve A549 hücrelerinin yaşayabilirliği ile ilgili deney sonuçlarına ait bulgular Şekil 75,76 da verilmiştir. 0,1 mg/mL - 10 mg/mL konsantrasyon aralığındaki nanopartiküllerin MTT testi ile gösterdikleri Calu-3 hücrelerindeki absorbandslar ve A549 hücrelerindeki absorbandslar Tablo 26, 27 de gösterilmiştir.



Şekil 75 : PVA-UL-F2 formülasyonu ile inkübe edilmiş Calu-3 ve A549 hücrelerinin yaşayabilirliğine ait grafik



Şekil 76 : PVA-L-F2 formülasyonu ile inkübe edilmiş Calu-3 ve A549 hücrelerinin yaşayabilirliğine ait grafik

Tablo 26 : PVA-UL-F2 formülasyonu ile inkübe edilmiş Calu-3 ve A549 hücrelerinin yaşayabilirlik değerlerine ait bulgular

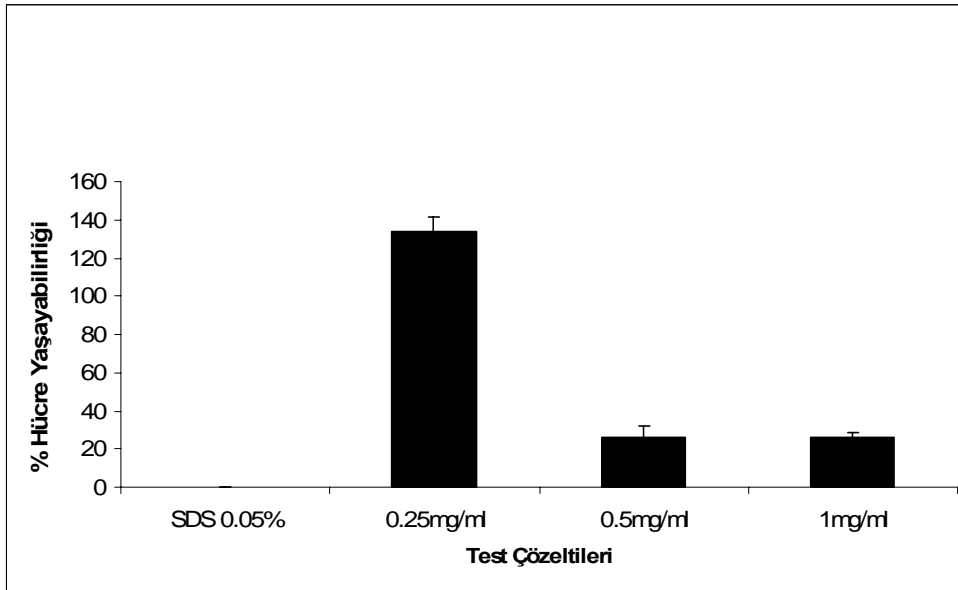
Nanopartikel Konsantrasyonu (mg/mL)	Calu-3		A549	
	(%) Hücre Yaşayabilirliği	SD ±	(%) Hücre Yaşayabilirliği	SD ±
10	62,85	2,96	71,63	23,03
5	64,31	2,92	89,31	24,98
2	87,18	1,58	103,37	15,06
1	98,01	0,64	110,65	11,69
0,5	104,89	0,31	111,36	8,00
0,25	110,75	3,24	105,35	8,52
0,1	112,36	1,41	114,36	3,04

Tablo 27 :PVA-L-F2 formülasyonu ile inkübe edilmiş Calu-3 ve A549 hücrelerinin yaşayabilirlik değerlerine ait bulgular

Nanopartikül Konsantrasyonu (mg/mL)	Calu-3		A549	
	% Hücre Yaşayabilirliği	SD ±	% Hücre Yaşayabilirliği	SD ±
10	68,11	15,86	53,78	6,88
5	68,40	15,15	65,59	3,52
2	96,36	8,75	116,67	26,00
1	96,45	3,44	119,23	19,00
0,5	98,24	6,46	130,30	22,64
0,25	103,72	5,30	129,44	19,19
0,1	114,03	9,57	130,35	20,26

PS-NC-250 ve PS-C-50 formülasyonları ilk olarak saflaştırılmadan hücreler üzerine uygulanmıştır. Ancak süspansiyonların bileşimindeki SDS in toksik etki göstermesi sebebiyle distile su ile 40000 devir dakika hızda distile su ile 3 kez ultrasantrifüj edildikten sonra hücrelerin yaşayabilirliği üzerine etkileri araştırılmıştır. Saflaştırılmamış PS-NC-250 ve PS-C-50 ile inkübasyona bırakılan Calu-3 hücrelerinin yaşayabilirliği ile ilgili deney sonuçlarına ait bulgular Şekil 77 de ve Tablo 28,29 da verilmiştir.

Yöntem 4.3.2. de anlatıldığı üzere saflaştırılmış PS-NC-250 ve PS-C-50 ile inkübasyona bırakılan Calu-3 ve A549 hücrelerinin yaşayabilirliği ile ilgili deney sonuçlarına ait bulgular Şekil 78,79 de verilmiştir. 0,1 mg/mL - 10 mg/mL konsantrasyon aralığındaki nanopartiküllerin MTT testi ile gösterdikleri Calu-3 ve A549 hücrelerindeki absorbanlar ise Tablo 30-31 de gösterilmiştir.



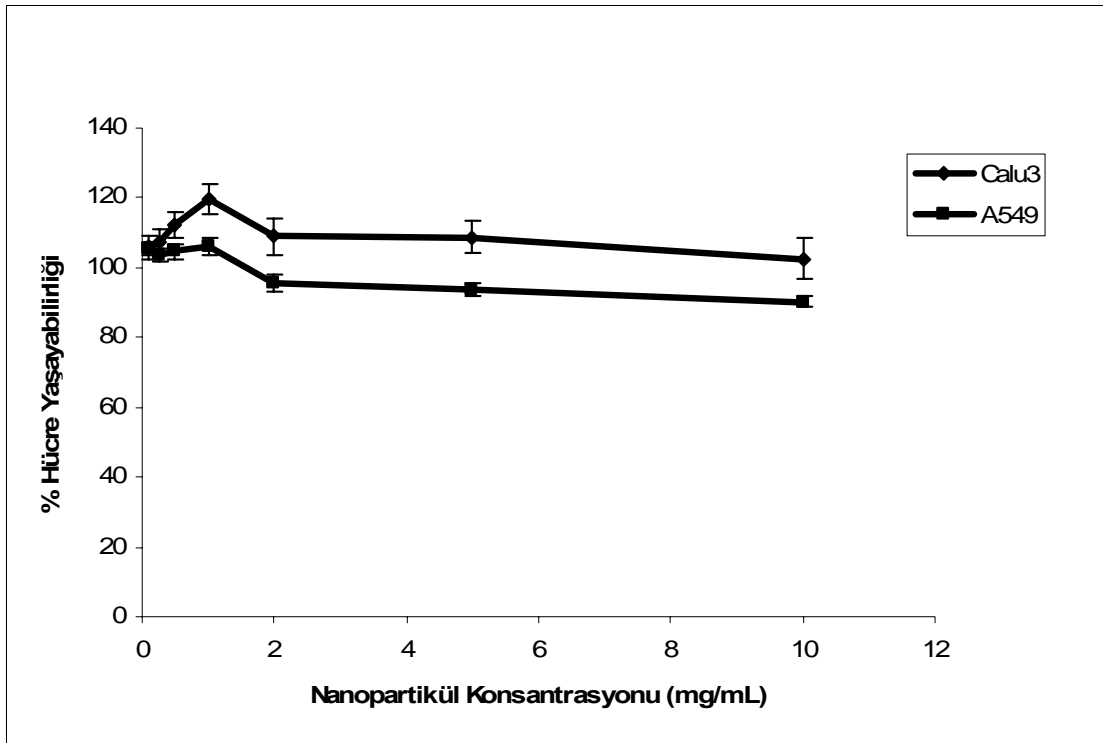
Şekil 77 : Saflaştırılmamış PS-NC-250 karışımı ile inkübe edilmiş Calu-3 hücrelerinin yaşayabilirliğine ait grafik

Tablo 28 : Saflaştırılmamış PS-NC-250 formülasyonu ile inkübe edilmiş Calu-3 ve hücrelerinin yaşayabilirlik değerlerine ait bulgular

Nanopartikül Konsantrasyonu (mg/mL)	Calu-3	
	% Hücre Yaşayabilirliği	SD ±
1	25,79	2,63
0,5	26,04	5,63
0,25	133,52	7,79

Tablo 29: SDS %0,05 ile inkübe edilmiş Calu-3 hücrelerinin yaşayabilirlik değerlerine ait bulgular

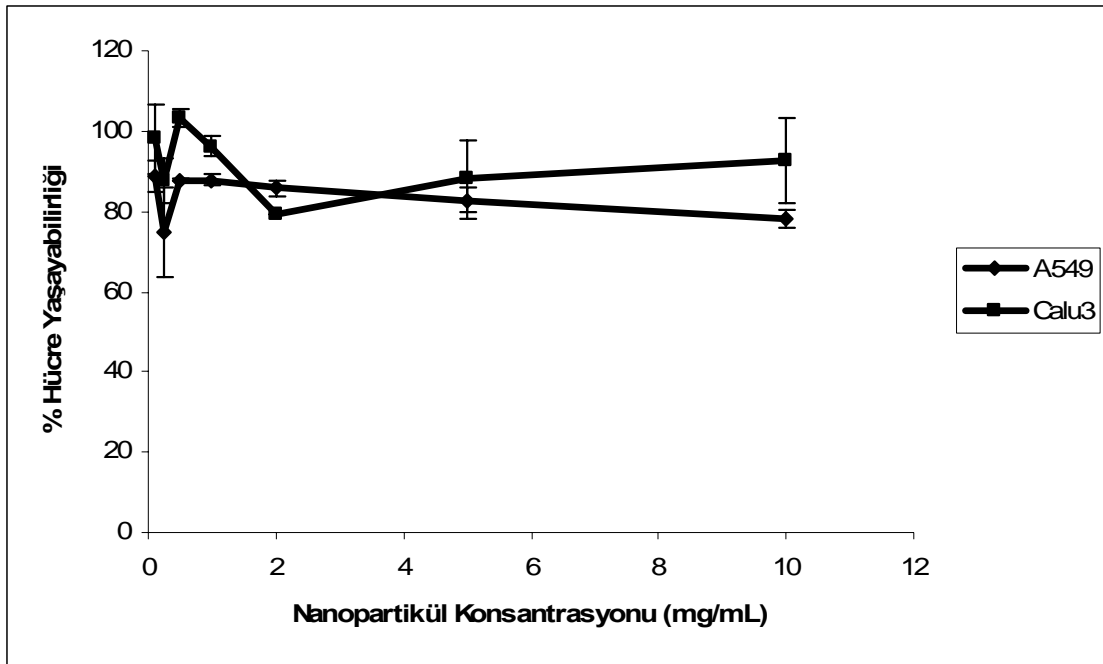
	Calu-3	
	% Hücre Yaşayabilirliği	SD ±
SDS %0,05	0,20	0,05



Şekil 78 : Saflaştırılmış PS-NC-250 karışımı ile inkübe edilmiş Calu-3 ve A549 hücrelerinin yaşayabilirliğine ait grafik

Tablo 30 : Saflaştırılmış PS-NC-250 formülasyonu ile inkübe edilmiş Calu-3 ve A549 hücrelerinin yaşayabilirlik değerlerine ait bulgular

Nanopartikel Konsantrasyonu (mg/mL)	Calu-3		A549	
	% Hücre Yaşayabilirliği	SD ±	% Hücre Yaşayabilirliği	SD ±
10	102,65	5,61	90,17	1,45
5	108,82	4,35	93,78	1,94
2	108,95	5,03	95,37	2,55
1	119,54	4,17	106,24	2,57
0,5	112,14	3,87	104,62	2,09
0,25	107,27	3,96	103,42	1,84
0,1	105,94	3,35	105,63	1,92

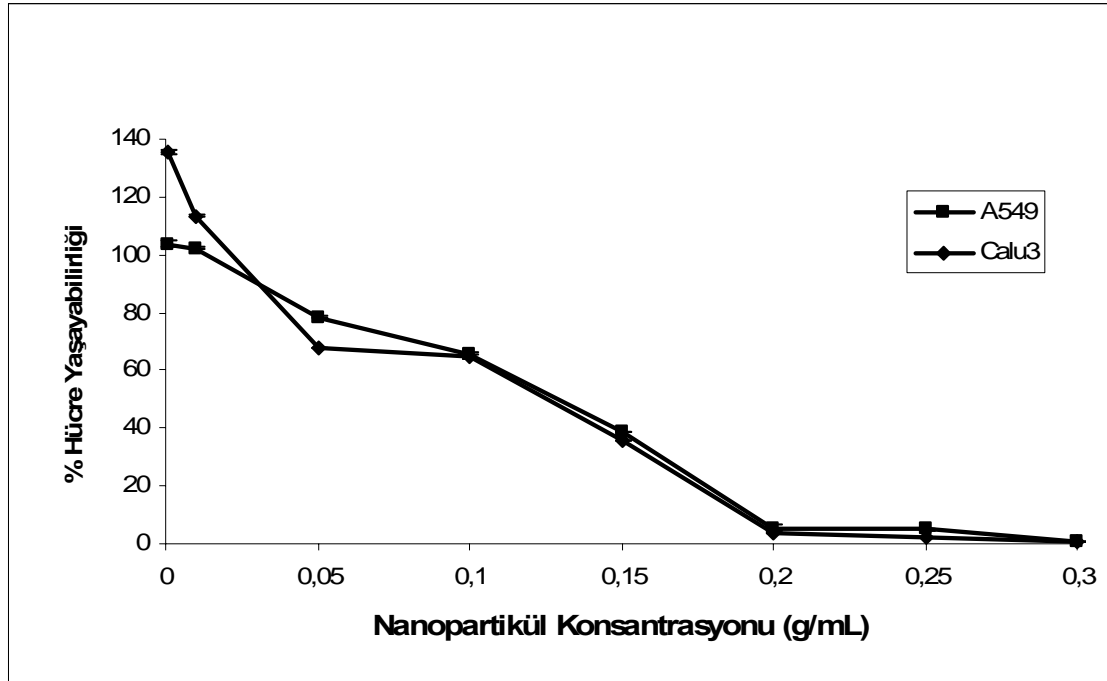


Şekil 79 : Saflaştırılmış PS-C-50 karışımı ile inkübe edilmiş Calu-3 ve A549 hücrelerinin yaşayabilirliğine ait grafik

Tablo 31 : Saflaştırılmış PS-C-50 formülasyonu ile inkübe edilmiş Calu-3 ve A549 hücrelerinin yaşayabilirlik değerlerine ait bulgular

Nanopartikül Konsantrasyonu (mg/mL)	Calu-3		A549	
	% Hücre Yaşayabilirliği	SD ±	% Hücre Yaşayabilirliği	SD ±
10	92,64	10,42	78,09	2,31
5	87,97	9,57	82,88	2,92
2	79,35	0,08	85,72	1,80
1	96,22	2,54	87,87	1,53
0,5	103,40	2,34	87,91	0,12
0,25	87,55	5,72	74,80	11,42
0,1	98,05	8,65	88,81	4,00

Yöntem 4.3.2. de anlatıldığı üzere PVA-UL-F2 ve PVA-L-F2 hazırlanmasında kullanılan Polivinilalkol ve Polivinilpirolidon K15 karışımı ile inkübasyona bırakılan Calu-3 ve A549 hücrelerinin yaşayabilirliği ile ilgili deney sonuçlarına ait bulgular Şekil 80 de verilmiştir. 0,001 g/mL – 0,3 g/mL konsantrasyon aralığındaki nanopartiküllerin MTT testi ile gösterdikleri Calu-3 hücrelerinde absorbanlar ise Tablo 32 de gösterilmiştir.

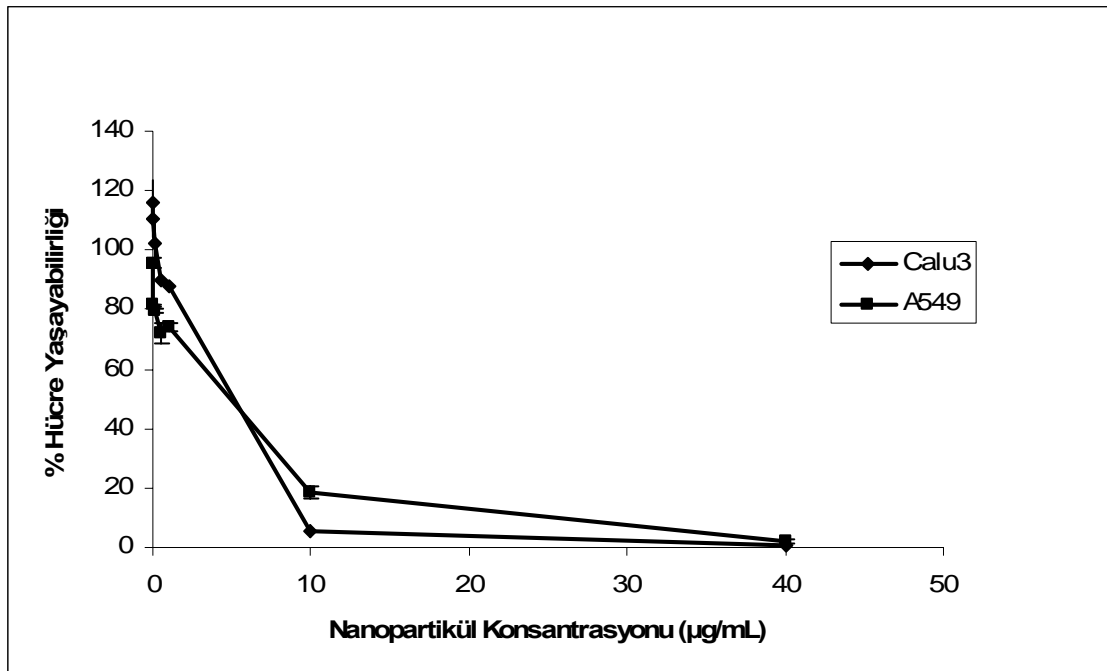


Şekil 80 : Polivinilalkol ve Polivinilpirolidon K15 karışımı ile inkübe edilmiş Calu-3 ve A549 hücrelerinin yaşayabilirliğine ait grafik

Tablo 32 : Polivinilalkol ve Polivinilpirolidon K15 karışımı ile inkübe edilmiş Calu-3 ve A549 hücrelerinin yaşayabilirlik değerlerine ait bulgular

Polivinilalkol ve Polivinilpirolidon K15 Karışımı Konsantrasyonu (g/mL)	Calu-3		A549	
	% Hücre Yaşayabilirliği	SD ±	% Hücre Yaşayabilirliği	SD ±
0,001	135,56	1,05	103,84	1,39
0,01	113,34	0,25	102,13	0,45
0,05	67,72	0,27	78,43	0,34
0,1	65,03	0,75	65,17	0,77
0,15	35,75	0,09	38,76	0,21
0,2	3,96	0,27	5,03	1,48
0,25	2,39	0,07	4,88	0,18
0,3	0,82	0,20	0,84	0,07

Yöntem 4.3.2 de anlatıldığı üzere bakır nanopartikülleri ile inkübasyona bırakılan Calu-3 ve A549 hücrelerinin yaşayabilirliği ile ilgili deney sonuçlarına ait bulgular Şekil 81 de verilmiştir. 0,001 µg/mL – 40 µg/mL konsantrasyon aralığındaki nanopartiküllerin MTT testi ile gösterdikleri Calu-3 hücrelerinde absorbanlar ise Tablo 33 de gösterilmiştir.



Şekil 81 : Bakır nanopartikülleri ile inkübe edilmiş Calu-3 ve A549 hücrelerinin yaşayabilirliğine ait grafik

Tablo 33 Bakır nanopartikülleri ile inkübe edilmiş Calu-3 ve A549 hücrelerinin yaşayabilirlik değerlerine ait bulgular

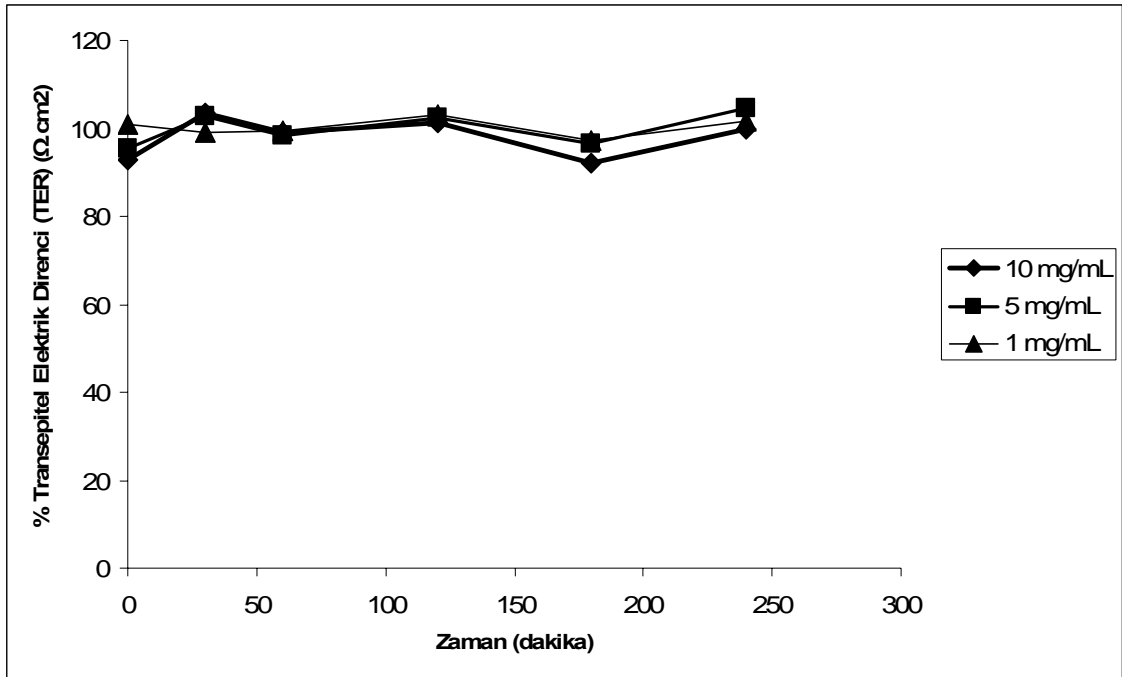
Nanopartikel Konsantrasyonu (µg/mL)	Calu-3		A549	
	% Hücre Yaşayabilirliği	SD ±	% Hücre Yaşayabilirliği	SD ±
40	0,45	0,07	1,81	0,60
10	5,50	2,11	18,49	2,16
1	87,95	0,91	73,94	1,31
0,5	89,80	2,22	72,21	3,25
0,1	102,21	7,86	79,65	0,95
0,01	110,56	6,30	81,38	0,11
0,001	115,83	7,53	95,60	1,66

2.2. Transepitel Elektrik Direnci Ölçümüne Ait Bulgular

Yöntem 4.4 de anlatıldığı şekilde Calu-3 hücrelerinin TER ölçüm değerlerine ait profil Şekil 82-87 de verilmiştir. 9. günden sonra hücre farklılaşması gerçekleştiği ve hücrelerin Transwell membranların yüzeyini tamamen kaplaması nedeniyle TER ölçümlerine 9.-11. günde geçilmiştir.

Nanopartikül formülasyonlarının uygulanmasını takiben Calu-3 hücrelerin transepitel elektrik dirençleri ölçülerek nanopartiküllerin hücre bütünlüğü üzerine herhangi bir olumsuz etkisinin olup olmadığı incelenmiştir. PVA-UL-F2, PVA-L-F2 formülasyonlarının Calu-3 hücrelerine uygulanmasının ardından hesaplanan %TER değerleri Şekil 82, 83 de ve PS-NC-51, PS-NC-250, PS-C-50, PS-C-300 formülasyonlarının Calu-3 hücrelerine uygulanmasının ardından hesaplanan %TER değerleri ise Şekil 84-87 de verilmiştir. Herbir formülasyonun uygulanmasının ardından Calu-3 hücrelerinin % TER değerleri ise Tablo 34-39 da gösterilmiştir.

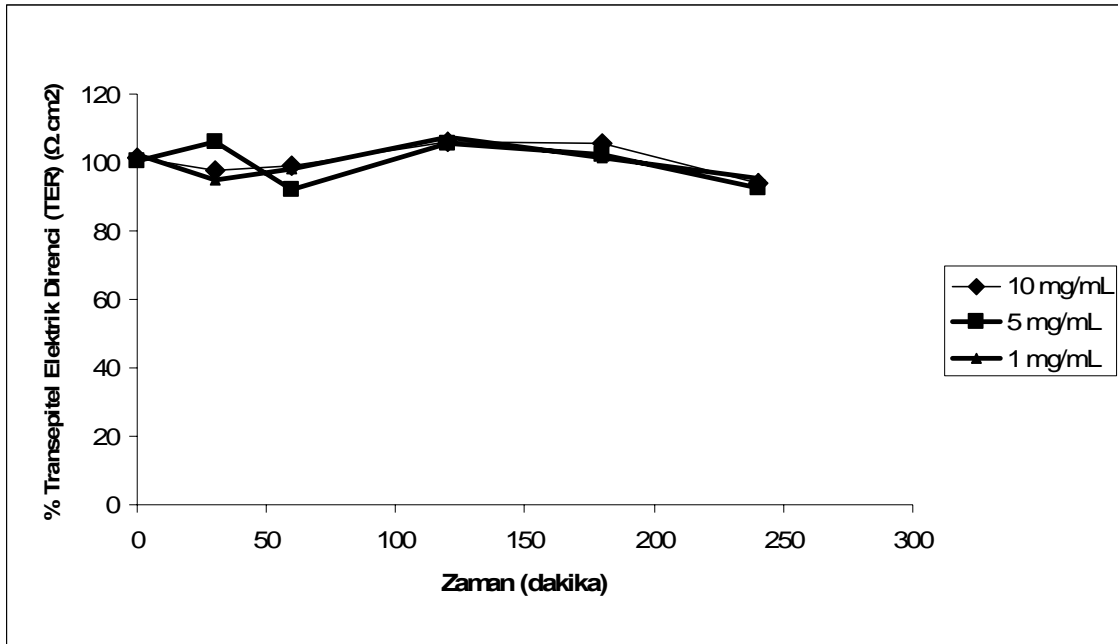
Transwell membran filtrenin gösterdiği elektriksel direnç, Calu-3 hücrelerinin gösterdiği elektriksel dirençten çıkartılmak suretiyle % TER hesaplanmaktadır. Bu nedenle, Calu-3 hücreleri ekilmeden, nanopartikül formülasyonu uygulandığında membran filtrenin elektriksel direnci ölçülmüştür. PS-NC-250 formülasyonu uygulandığında Calu-3 hücreleri ekilmemiş Transwell membran filtrenin elektriksel direnci Tablo 40,41 de gösterilmiştir.



Şekil 82 : PVA-UL-F2 formülasyonunun uygulanmasından sonra ölçülen Calu-3 hücrelerinin % TER değerlerine ait zamana bağlı profil

Tablo 34 : PVA-UL-F2 formülasyonunun uygulanmasından sonra ölçülen Calu-3 hücrelerinin TER değerleri

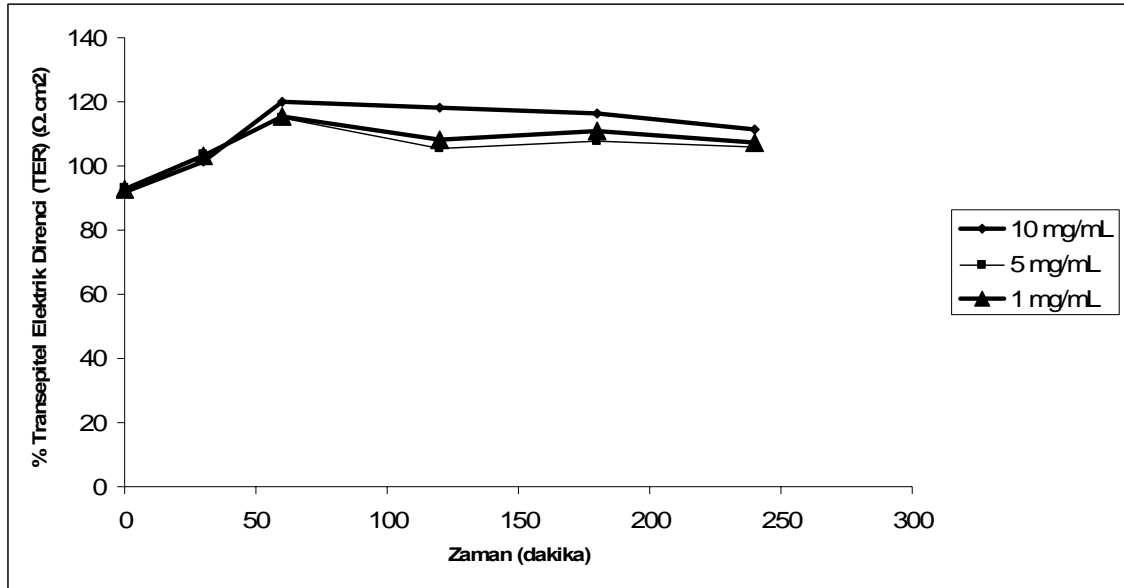
Nanopartikül Konsantrasyonu (mg/mL)	TER ($\Omega.cm^2$)					
	Zaman (0.dak)	Zaman (30.dak)	Zaman (60.dak)	Zaman (120.dak)	Zaman (180.dak)	Zaman (240.dak)
10	760	703	699	695	634	633
5	719	661	652	655	622	645
1	753	670	668	674	645	653
Kontrol (HBSS)	765	687	688	677	662	662



Şekil 83 : PVA-L-F2 formülasyonunun uygulanmasından sonra ölçülen Calu-3 hücrelerinin % TER değerlerine ait zamana bağlı profil

Tablo 35 : PVA-L-F2 formülasyonunun uygulanmasından sonra ölçülen Calu-3 hücrelerinin TER değerleri

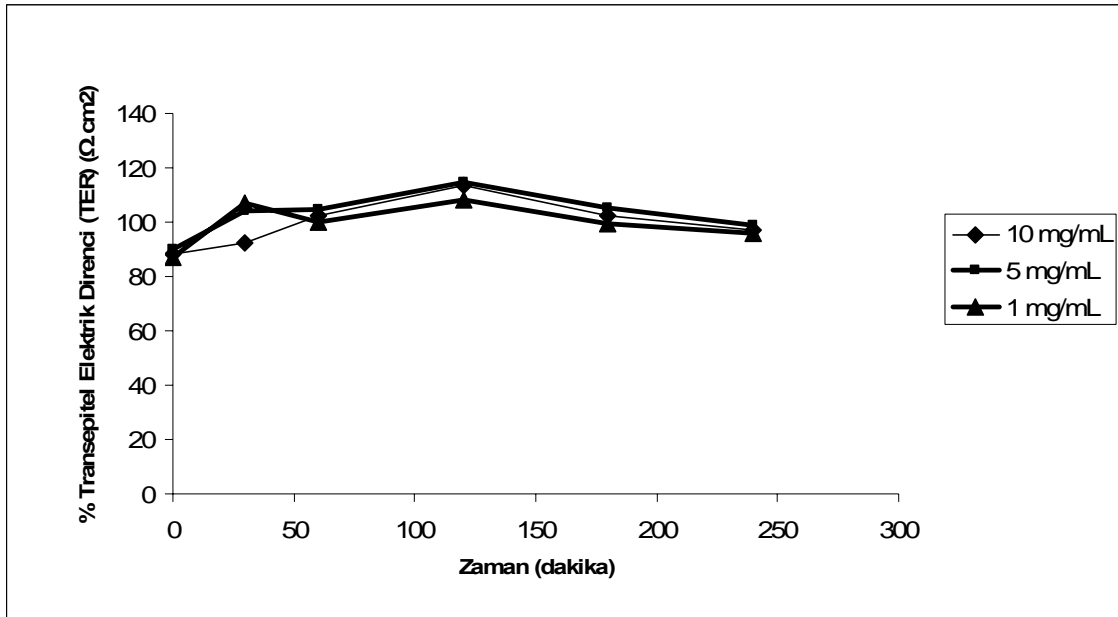
Nanopartikül Konsantrasyonu (mg/mL)	TER ($\Omega.cm^2$)					
	Zaman (0.dak)	Zaman (30.dak)	Zaman (60.dak)	Zaman (120.dak)	Zaman (180.dak)	Zaman (240.dak)
10	828	631	626	608	604	624
5	845	690	643	621	601	614
1	866	642	632	622	598	627
Kontrol (HBSS)	861	668	667	617	586	640



Şekil 84 : PS-NC-51 formülasyonunun uygulanmasından sonra ölçülen Calu-3 hücrelerinin % TER değerlerine ait zamana bağlı profil

Tablo 36 : PS-NC-51 formülasyonunun uygulanmasından sonra ölçülen Calu-3 hücrelerinin TER değerleri

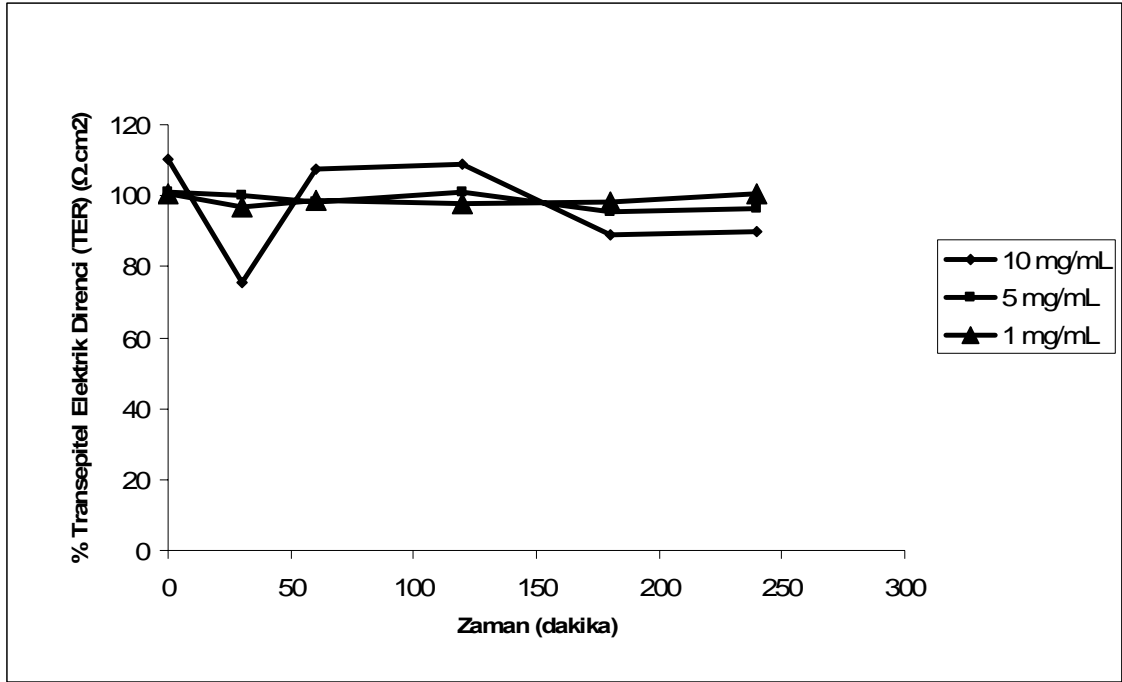
Nanopartikül Konsantrasyonu (mg/mL)	TER ($\Omega.cm^2$)					
	Zaman (0.dak)	Zaman (30.dak)	Zaman (60.dak)	Zaman (120.dak)	Zaman (180.dak)	Zaman (240.dak)
10	1248	1163	1143	988	952	914
5	1317	1260	1241	1038	955	953
1	1326	1301	1241	1068	1009	1005
Kontrol (HBSS)	1315	1274	1263	1075	1037	1045



Şekil 85 : PS-NC-250 formülasyonunun uygulanmasından sonra ölçülen Calu-3 hücrelerinin % TER değerlerine ait zamana bağlı profil

Tablo 37 : PS-NC-250 formülasyonunun uygulanmasından sonra ölçülen Calu-3 hücrelerinin TER değerleri

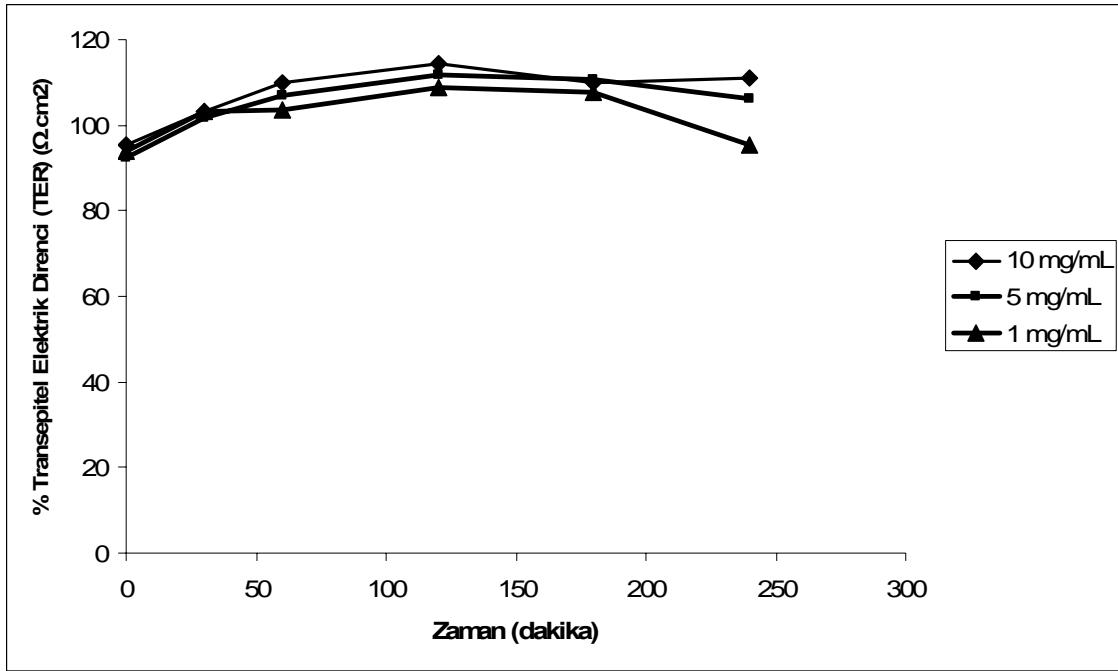
Nanopartikül Konsantrasyonu (mg/mL)	TER ($\Omega.cm^2$)					
	Zaman (0.dak)	Zaman (30.dak)	Zaman (60.dak)	Zaman (120.dak)	Zaman (180.dak)	Zaman (240.dak)
10	752	615	643	567	589	614
5	775	687	663	578	608	630
1	741	695	631	546	573	606
Kontrol (HBSS)	784	615	592	482	542	591



Şekil 86 : PS-C-50 formülasyonunun uygulanmasından sonra ölçülen Calu-3 hücrelerinin % TER değerlerine ait zamana bağlı profil

Tablo 38 : PS-C-50 formülasyonunun uygulanmasından sonra ölçülen Calu-3 hücrelerinin TER değerleri

Nanopartikül Konsantrasyonu (mg/mL)	TER ($\Omega.cm^2$)					
	Zaman (0.dak)	Zaman (30.dak)	Zaman (60.dak)	Zaman (120.dak)	Zaman (180.dak)	Zaman (240.dak)
10	888	553	603	560	506	491
5	846	669	677	590	563	577
1	875	674	685	580	569	605
Kontrol (HBSS)	871	689	709	611	607	642



Şekil 87 : PS-C-300 formülasyonunun uygulanmasından sonra ölçülen Calu-3 hücrelerinin % TER değerlerine ait zamana bağlı profil

Tablo 39 : PS-C-300 formülasyonunun uygulanmasından sonra ölçülen Calu-3 hücrelerinin TER değerleri

Nanopartikül Konsantrasyonu (mg/mL)	TER ($\Omega \cdot \text{cm}^2$)					
	Zaman (0.dak)	Zaman (30.dak)	Zaman (60.dak)	Zaman (120.dak)	Zaman (180.dak)	Zaman (240.dak)
10	1542	1300	1308	1308	1316	1419
5	1519	1323	1291	1324	1335	1391
1	1524	1309	1324	1340	1359	1228
Kontrol (HBSS)	1522	1346	1341	1290	1299	1212

Tablo 40 : Transwell hücre membranının TER değerleri

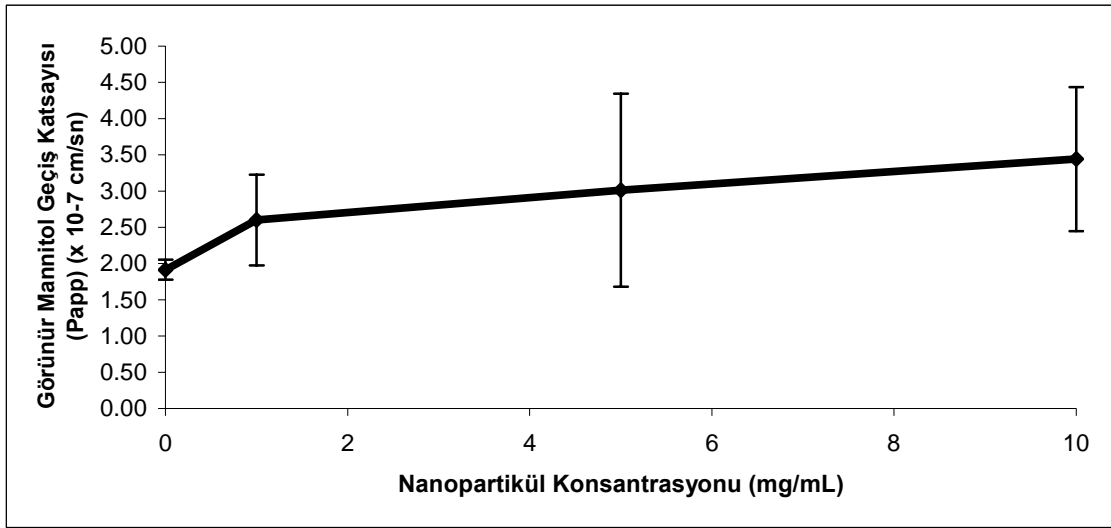
Nanopartikül Konsantrasyonu (mg/mL)	TER ($\Omega \cdot \text{cm}^2$)					
	Zaman (0.dak)	Zaman (30.dak)	Zaman (60.dak)	Zaman (120.dak)	Zaman (180.dak)	Zaman (240.dak)
10	130	117	108	97	98	104
5	118	100	99	108	97	113
1	118	103	109	97	97	100
Kontrol (HBSS)	122	111	104	96	98	1051

Tablo 41 : 240 dakikalık geçiş çalışması süresince Transwell hücre membranının TER değerindeki genel değişim

	TER (%)		
	10 mg/mL	5 mg/mL	1 mg/mL
PS-C-50	81,46	95,5	100,24
PS-NC-51	120,82	113,66	115,52
PS-NC-250	109,73	109,42	110,13
PS-C-300	116,63	115,21	101,77
PVA-NC-UL	107,64	109,54	100,31
PVA-NC-L	92,34	91,82	93,16

2.3.[¹⁴C]- Mannitol Geçirgenliği Ölçümüne Ait Bulgular

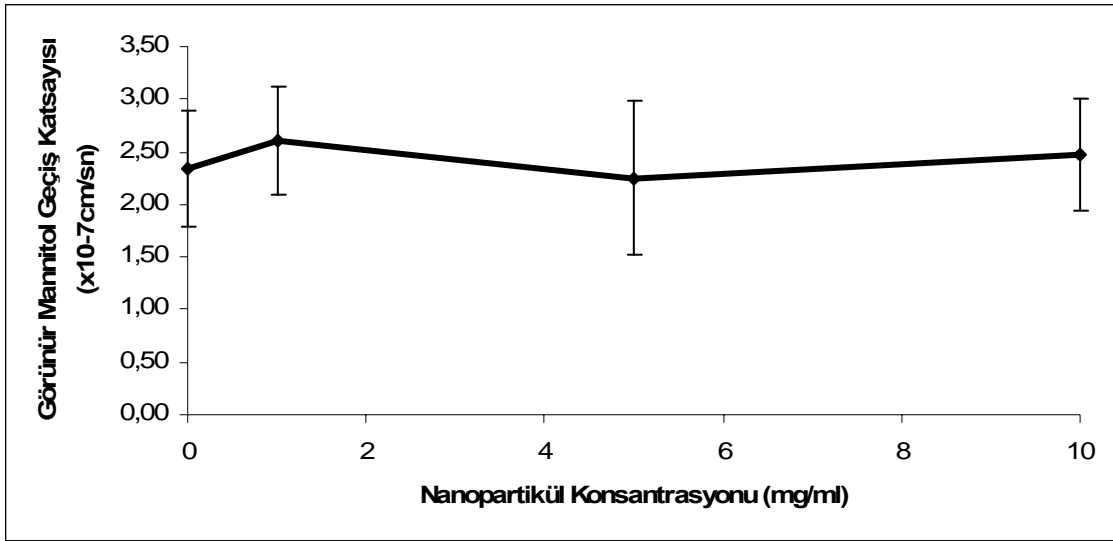
Yöntem 4.5 de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilen PVA-UL-F2 (Şekil 88), PVA-L-F2 (Şekil 89) ve PS-NC-51 (Şekil 90), PS-NC-250 (Şekil 91), PS-C-50 (Şekil 92), PS-C-300 (Şekil 93) nanopartikül formülasyonlarının insan bronş epitel hücrelerine uygulanmasından sonra nanopartikül konsantrasyonuna karşı hesaplanan görünen mannitol geçirgenlik katsayı değerlerine ait bulgular Şekil 88-93 de verilmiştir. Herbir formülasyonun uygulanmasının ardından Calu-3 hücrelerinin P_{app} değerleri Tablo 42-48 de gösterilmiştir.



Şekil 88 : PVA-UL-F2 formülasyonun uygulanmasından sonra ölçülen Calu-3 hücrelerinin P_{app} değerlerine ait nanopartikel konsantrasyonuna bağlı profili

Tablo 42 : PVA-UL-F2 formülasyonun uygulanmasından sonra ölçülen Calu-3 hücrelerinin P_{app} değerleri ve kütle dengesi bulguları

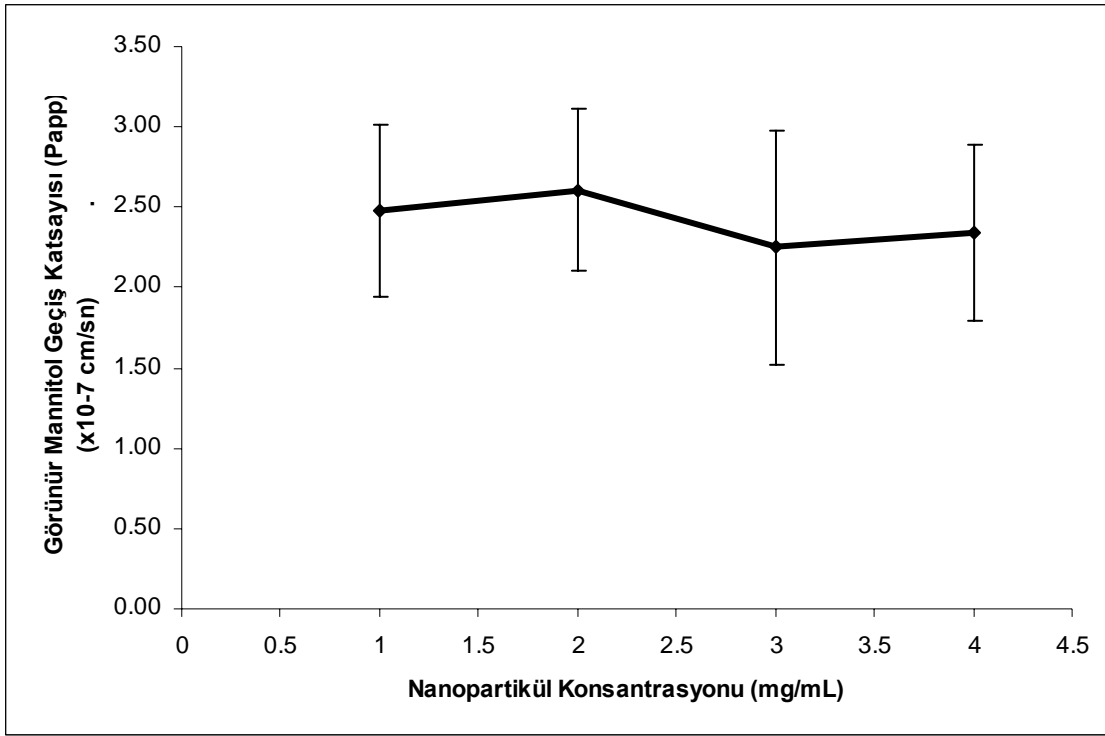
Nanopartikel Konsantrasyonu (mg/mL)	Ortalama P_{app} (cm/sn)	SD \pm
10	$3,44 \times 10^{-7}$	$9,94 \times 10^{-8}$
5	$3,01 \times 10^{-7}$	$1,33 \times 10^{-7}$
1	$2,60 \times 10^{-7}$	$6,25 \times 10^{-8}$
Kontrol (HBSS)	$1,91 \times 10^{-7}$	$1,39 \times 10^{-8}$



Şekil 89 : PVA-L-F2 formülasyonun uygulanmasından sonra ölçülen Calu-3 hücrelerinin P_{app} değerlerine ait nanopartikel konsantrasyonuna bağlı profili

Tablo 43 : PVA-L-F2 formülasyonun uygulanmasından sonra ölçülen Calu-3 hücrelerinin P_{app} değerleri ve kütle dengesi bulguları

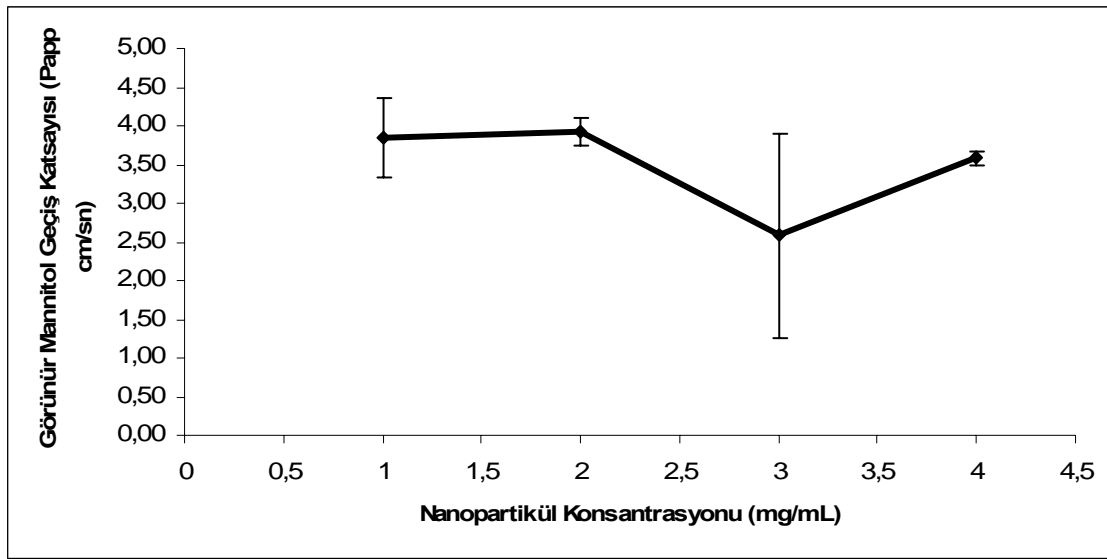
Nanopartikel Konsantrasyonu (mg/mL)	Ortalama P_{app} (cm/sn)	SD \pm
10	$2,47 \times 10^{-7}$	$5,36 \times 10^{-7}$
5	$2,25 \times 10^{-7}$	$7,28 \times 10^{-7}$
1	$2,61 \times 10^{-7}$	$5,06 \times 10^{-7}$
Kontrol (HBSS)	$2,34 \times 10^{-7}$	$5,53 \times 10^{-7}$



Şekil 90 : PS-NC-51 formülasyonun uygulanmasından sonra ölçülen Calu-3 hücrelerinin P_{app} değerlerine ait nanopartikel konsantrasyonuna bağlı profili

Tablo 44 : PS-NC-51 formülasyonun uygulanmasından sonra ölçülen Calu-3 hücrelerinin P_{app} değerleri ve kütle dengesi bulguları

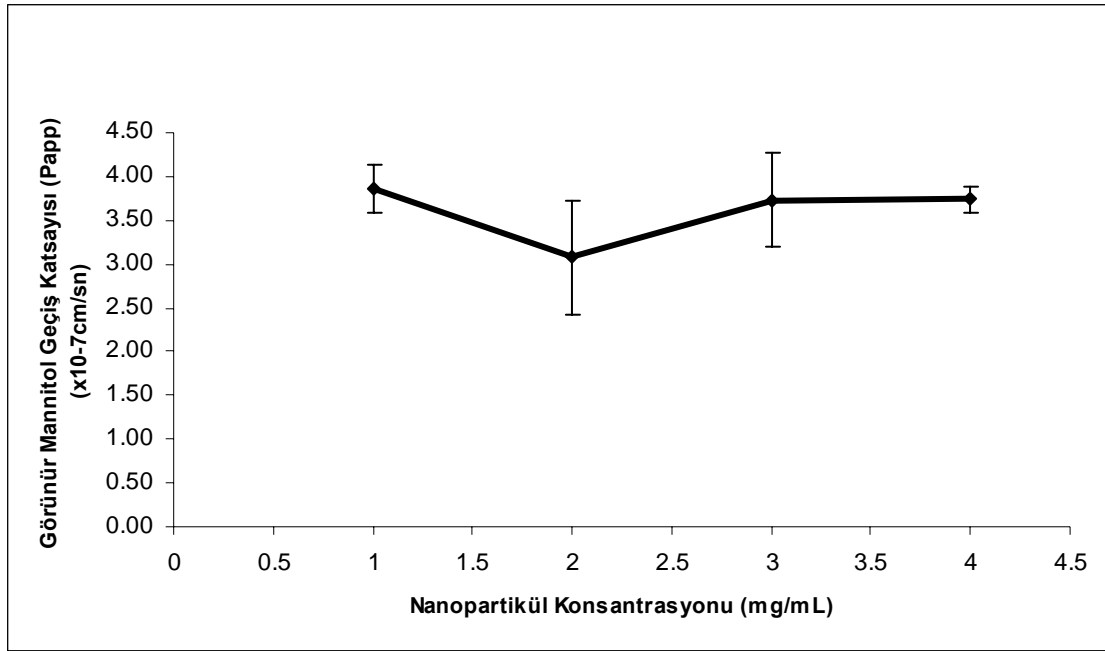
Nanopartikel Konsantrasyonu (mg/mL)	Ortalama P_{app} (cm/sn)	SD \pm
10	$2,34 \times 10^{-7}$	$5,53 \times 10^{-8}$
5	$2,25 \times 10^{-7}$	$7,28 \times 10^{-8}$
1	$2,61 \times 10^{-7}$	$5,07 \times 10^{-7}$
Kontrol (HBSS)	$2,47 \times 10^{-7}$	$5,36 \times 10^{-7}$



Şekil 91 : PS-NC-250 formülasyonun uygulanmasından sonra ölçülen Calu-3 hücrelerinin P_{app} değerlerine ait nanopartikel konsantrasyonuna bağlı profili

Tablo 45 : PS-NC-250 formülasyonun uygulanmasından sonra ölçülen Calu-3 hücrelerinin P_{app} değerleri ve kütle dengesi bulguları

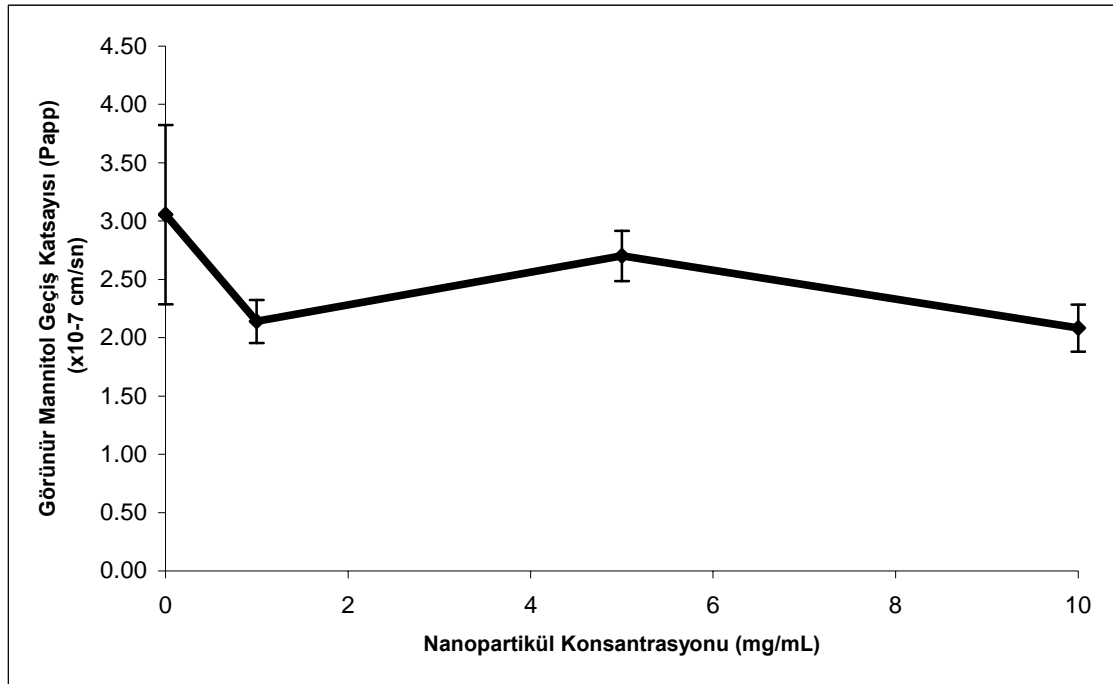
Nanopartikel Konsantrasyonu (mg/mL)	Ortalama P_{app} (cm/sn)	SD \pm
10	$3,58 \times 10^{-7}$	$8,41 \times 10^{-9}$
5	$2,58 \times 10^{-7}$	$1,32 \times 10^{-7}$
1	$3,92 \times 10^{-7}$	$1,84 \times 10^{-8}$
Kontrol (HBSS)	$3,83 \times 10^{-7}$	$5,13 \times 10^{-8}$



Şekil 92 : PS-C-50 formülasyonun uygulanmasından sonra ölçülen Calu-3 hücrelerinin P_{app} değerlerine ait nanopartikül konsantrasyonuna bağlı profili

Tablo 46 : PS-C-50 formülasyonun uygulanmasından sonra ölçülen Calu-3 hücrelerinin P_{app} değerleri ve kütle dengesi bulguları

Nanopartikül Konsantrasyonu (mg/mL)	Ortalama P_{app} (cm/sn)	SD \pm
10	$3,74 \times 10^{-7}$	$1,51 \times 10^{-8}$
5	$3,73 \times 10^{-7}$	$5,44 \times 10^{-8}$
1	$3,07 \times 10^{-7}$	$6,57 \times 10^{-8}$
Kontrol (HBSS)	$3,86 \times 10^{-7}$	$2,66 \times 10^{-8}$



Şekil 93 : PS-C-300 formülasyonun uygulanmasından sonra ölçülen Calu-3 hücrelerinin P_{app} değerlerine ait nanopartikül konsantrasyonuna bağlı profili

Tablo 47 : PS-C-300 formülasyonun uygulanmasından sonra ölçülen Calu-3 hücrelerinin P_{app} değerleri ve kütle dengesi bulguları

Nanopartikül Konsantrasyonu (mg/mL)	Ortalama P_{app} (cm/sn)	SD \pm
10	$2,08 \times 10^{-7}$	$2,01 \times 10^{-8}$
5	$2,70 \times 10^{-7}$	$2,15 \times 10^{-7}$
1	$2,14 \times 10^{-7}$	$1,85 \times 10^{-7}$
Kontrol (HBSS)	$3,05 \times 10^{-7}$	$7,68 \times 10^{-7}$

Tablo 48 : PVA ve PS nanopartikül formülasyonlarının uygulanmasından sonra ölçülen Calu-3 hücrelerinin P_{app} deki değişime ait bulgular

	<i>Papp deki Değişim (%)</i>		
	1 mg/mL	5 mg/mL	10 mg/mL
PS-C-50	79.5 ± 16.9	96.6 ± 14.1	96.9 ± 4.0
PS-NC-51	105.6 ± 20.4	91.1 ± 29.5	94.7 ± 22.3
PS-NC-250	102.3 ± 4.9	67.4 ± 3.7	93.5 ± 2.1
PS-C-300	70.2 ± 6.1	88.5 ± 7.0	68.2 ± 6.5
PVA-L-F2	111.5 ± 21.5	96.2 ± 31.1	105.6 ± 22.9

2.4.Nanopartiküllerin İnsan Bronş Epitel Hücrelerinden (Calu-3) Geçiş Çalışmalarına Ait Bulgular

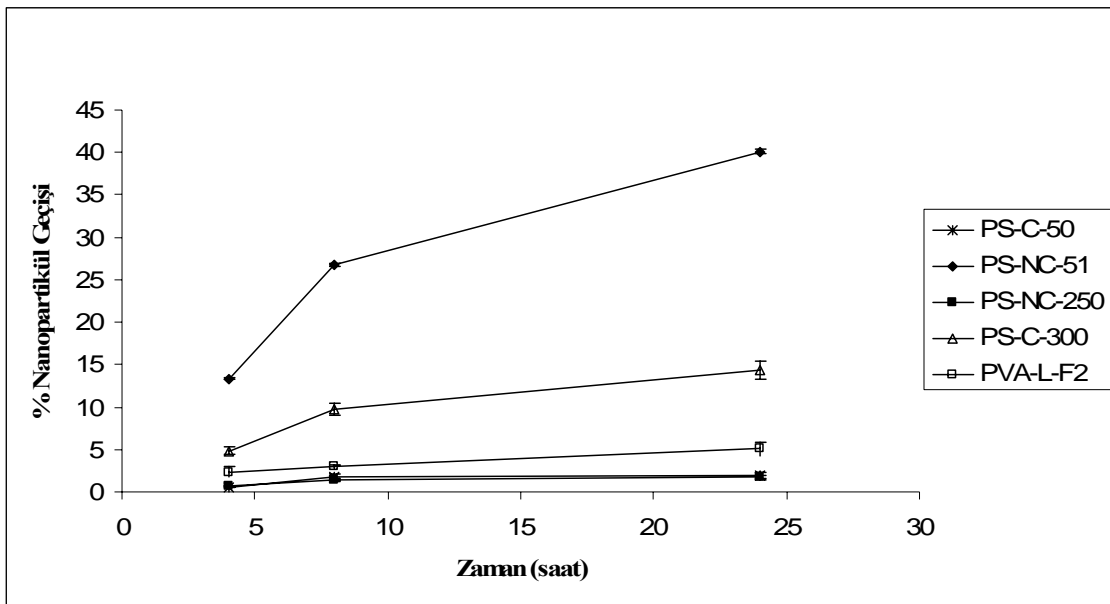
Nanopartikül formülasyonları uygulanmadan önce nanopartikül geçiş çalışmasında kullanılmak üzere optimum por çapına sahip Transwell membran filtrenin tespit edilmesi amacıyla Calu-3 hücreleri ekilmemiş Transwell membranlarda nanopartikül geçiş çalışması gerçekleştirilmiştir. Nanopartiküllerin, 0.4 µm Transwell membran filtreye uygulanmasının ardından ölçülen % nanopartikül geçişi ve geri kazanım değerleri Tablo 49 da, 1 µm Transwell membran filtreye uygulanmasının ardından ölçülen % nanopartikül geçişi ve geri kazanım değerleri Tablo 50 de ve 3 µm Transwell membran filtreye uygulanmasının ardından ölçülen % nanopartikül geçişi ve geri kazanım değerleri Tablo 51 de verilmiştir. PS nanopartikül formülasyonlarının 0,4 µm, 1 µm ve 3 µm Transwell membran filtreye uygulanmasından sonra ölçülen nanopartikül geçiş değerlerinin zamana bağlı profili sirasiyla Şekil 94-96 de verilmiştir.

Yöntem 4.6 da anlatıldığı şekilde gerçekleştirilen PVA-L-F2 ve PS-NC-51, PS-NC-250, PS-C-50, PS-C-300 nanopartikül formülasyonlarının insan bronş epitel hücrelerine uygulanmasından sonra hücrelerdeki nanopartikül geçiş değerlerine ait bulgular Şekil 97 de verilmiştir. Herbir formülasyonun uygulanmasının ardından Calu-3 hücrelerinin yüzde nanopartikül geçişi ve geri kazanım değerleri ise Tablo 52 de gösterilmiştir. PVA-L-F2 ve PS-NC-51 formülasyonlarının Calu-3 hücre tabakalarından

geçişleri, diğer PS nanopartikül formülasyonları ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede farklılık göstermiştir ($p < 0,05$).

Tablo 49 : PS nanopartikül formülasyonlarının 0.4 µm Transwell membran filtreye uygulanmasından sonra ölçülen yüzde geçiş ve geri kazanım değerlerine ait bulgular

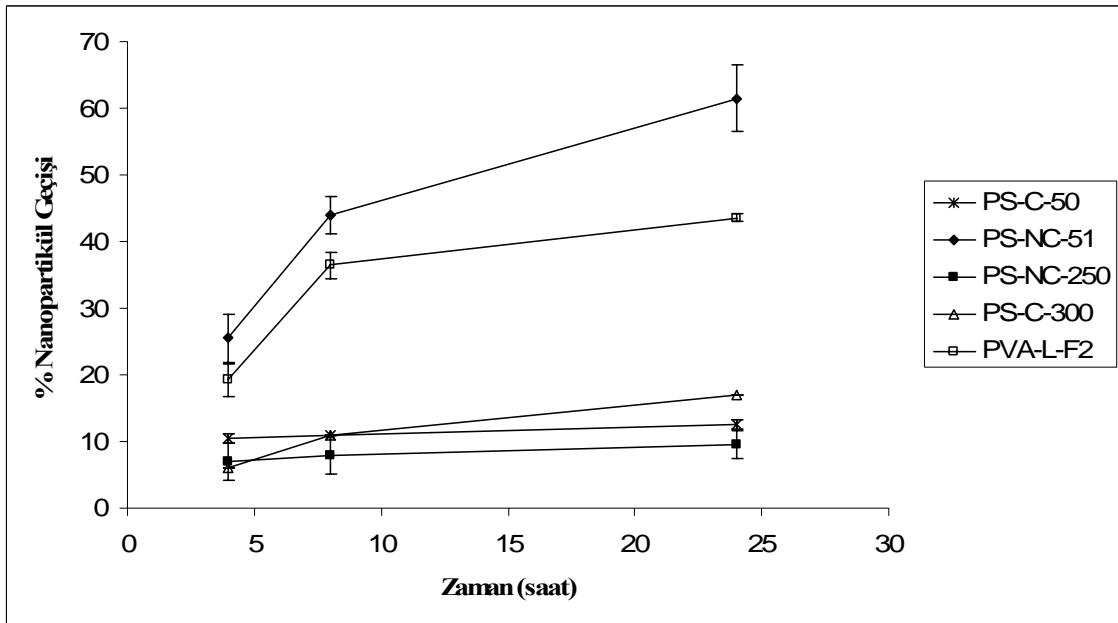
Nanopartikül Formülasyonu	Deney	%Geçiş (4.saat)	%Geçiş (8.saat)	%Geçiş (24.saat)	Geri Kazanım
PS-NC-51	1	% 13,39	% 26,88	% 40,24	% 89
	2	% 13,25	% 26,63	% 39,92	% 82
PS-NC-250	1	% 0,65	% 1,52	% 1,95	% 86
	2	% 0,64	% 1,30	% 1,55	% 77
PS-C-50	1	% 0,48	% 2,09	% 2,19	% 88
	2	% 0,65	% 1,49	% 1,75	% 78
PS-C-300	1	% 5,12	% 10,28	% 15,08	% 87
	2	% 4,54	% 9,23	% 13,62	% 86
PVA-L-F2	1	% 1,98	% 2,72	% 5,67	% 92
	2	% 2,79	% 3,18	% 4,45	% 87



Şekil 94 : PS nanopartikül formülasyonlarının 0,4 µm Transwell membran filtreye uygulanmasından sonra ölçülen nanopartikül geçiş değerlerinin zamana bağlı profili

Tablo 50 : PS nanopartikül formülasyonlarının 1 µm Transwell membran filtreye uygulanmasından sonra ölçülen yüzde nanopartikül geçişi ve geri kazanım değerlerine ait bulgular

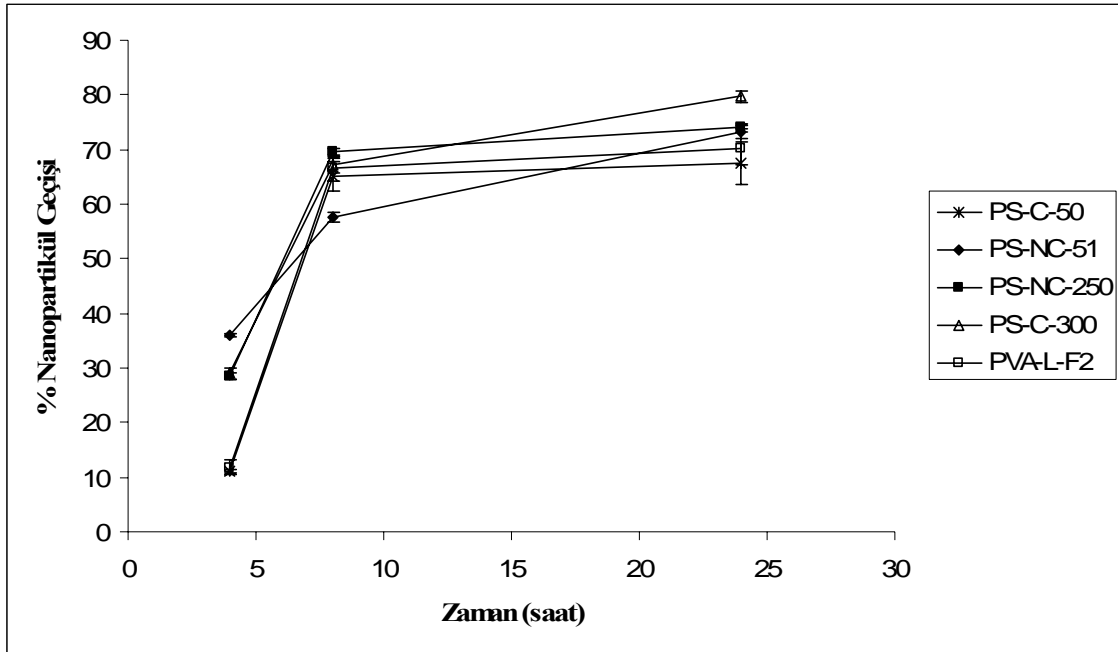
Nanopartikül Formülasyonu	Deney	% Geçiş (4.saat)	% Geçiş (8.saat)	% Geçiş (24.saat)	Geri Kazanım
PS-NC-51	1	% 23	% 42	% 58	% 93
	2	% 28	% 46	% 65	% 93
PS-NC-250	1	% 5	% 6	% 8	% 89
	2	% 9	% 10	% 11	% 81
PS-C-50	1	% 11	% 11	% 12	% 92
	2	% 10	% 11	% 13	% 97
PS-C-300	1	% 6	% 11	% 17	% 88
	2	% 6	% 11	% 17	% 91
PVA-L-F2	1	% 17,5	% 37,8	% 43,1	% 92
	2	% 21	% 35	% 44	% 89



Şekil 95 : PS nanopartikül formülasyonlarının 1 µm Transwell membran filtreye uygulanmasından sonra ölçülen nanopartikül geçiş değerlerinin zamana bağlı profili

Tablo 51 : PS nanopartikül formülasyonlarının 3 µm Transwell membran filtreye uygulanmasından sonra ölçülen yüzde nanopartikül geçişi ve geri kazanım değerlerine ait bulgular

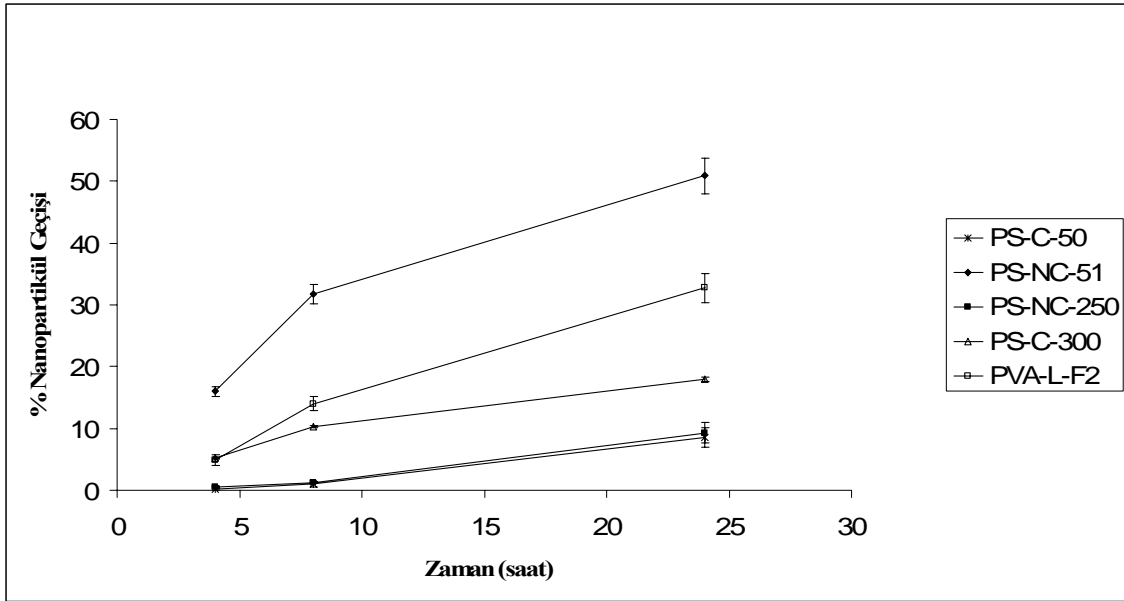
Nanopartikül Formülasyonu	Deney	% Geçiş (4.saat)	% Geçiş (8.saat)	% Geçiş (24.saat)	Geri Kazanım
PS-NC-51	1	% 35,90	% 56,87	% 72,41	% 87
	2	% 36,25	% 58,10	% 74,04	% 88
PS-NC-250	1	% 28,08	% 68,89	% 73,91	% 98
	2	% 28,85	% 70,06	% 74,46	% 98
PS-C-50	1	% 10,88	% 63,17	% 64,81	% 79
	2	% 11,39	% 67,11	% 70,25	% 83
PS-C-300	1	% 28,26	% 66,22	% 78,85	% 96
	2	% 29,71	% 68,14	% 80,50	% 97
PVA-L-F2	1	% 11	% 65	% 68	% 88
	2	% 12,7	% 68,2	% 72,2	% 90



Şekil 96 : PS nanopartikül formülasyonlarının 3 µm Transwell membran filtreye uygulanmasından sonra ölçülen nanopartikül geçiş değerlerinin zamana bağlı profili

Tablo 52 : PS nanopartikül formülasyonlarının 1 µm Transwell membran filtreye uygulanmasından sonra ölçülen Calu-3 hücrelerinin yüzde nanopartikül geçişi ve geri kazanım değerlerine ait bulgular

Nanopartikül Formülasyonu	Deney	% Geçiş (4.saat)	% Geçiş (8.saat)	% Geçiş (24.saat)	Geri Kazanım
PS-NC-51	1	15	29,96	47,59	% 91
	2	16,54	32,77	52,45	% 87
	3	16,35	32,67	52,53	% 87
PS-NC-250	1	0,57	1,20	7,62	% 97
	2	0,62	1,30	10,85	% 91
	3	0,62	1,24	9,52	% 87
PS-C-50	1	0,35	1,49	10,18	% 77
	2	0,07	0,79	7,04	% 78
	3	0,07	0,69	8,25	% 79
PS-C-300	1	5,26	10,56	18,42	% 84
	2	5,12	10,24	17,56	% 84
	3	5,08	10,15	17,92	% 80
PVA-L-F2A	1	4,06	13,06	33,95	% 83
	2	5,75	15,28	34,23	% 79
	3	4,90	13,65	30,08	% 72



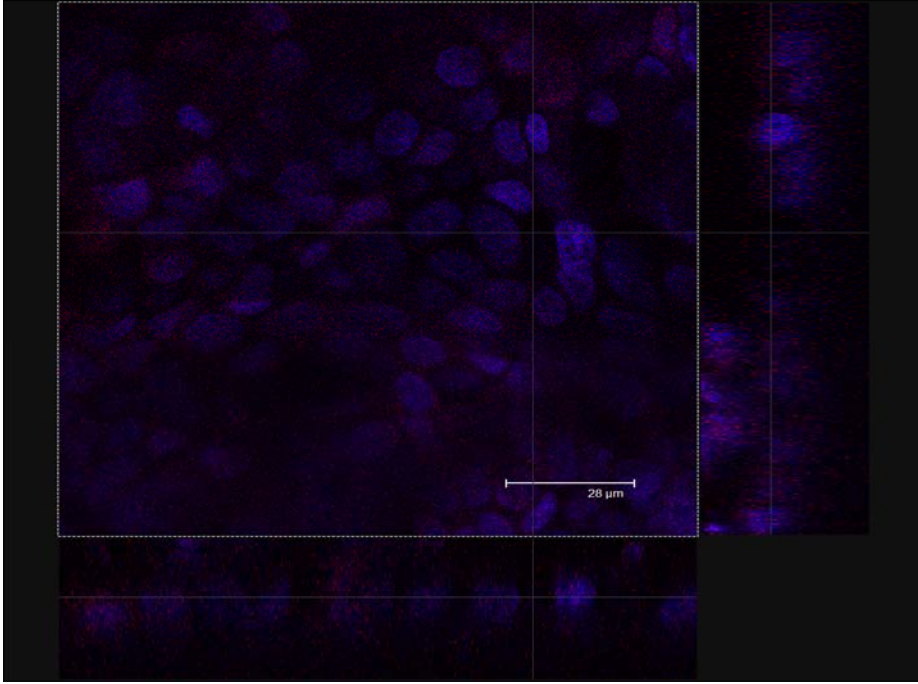
Şekil 97 : PVA ve PS nanopartikül formülasyonlarının 1 µm Transwell membran filtreye uygulanmasından sonra ölçülen nanopartikül geçiş değerlerinin zamana bağlı profili

2.5.Nanopartikül Akciğer Hücreleri İçine Alım Çalışmalarına Ait Bulgular

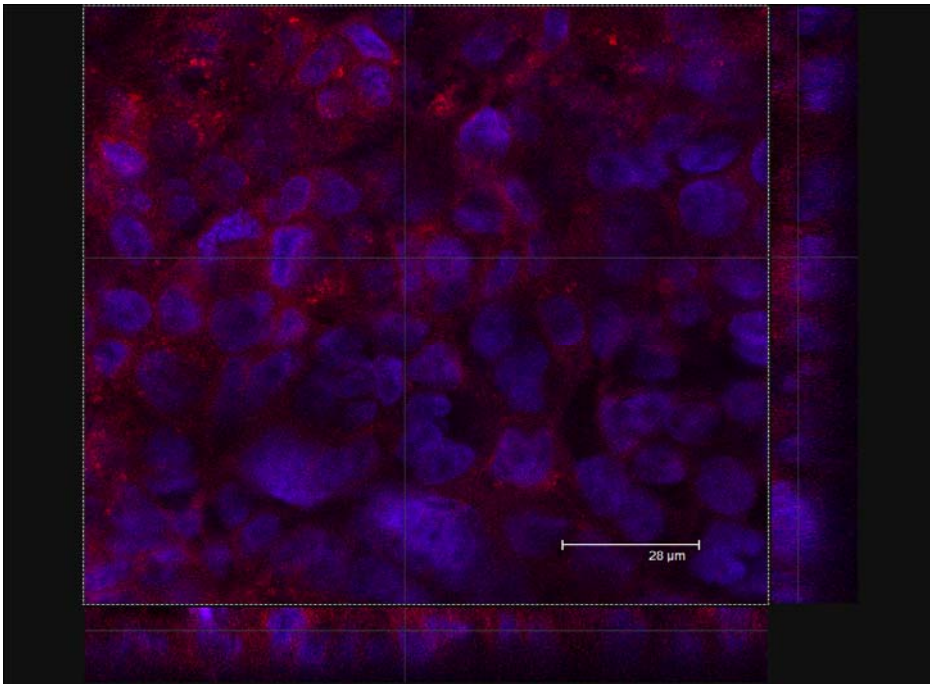
PVA nanopartikül formülasyonu ile inkubasyona bırakılmamış, mukus taşıyan, yaşayan Calu-3 hücreleri konfokal mikroskop görüntüsü Şekil 98 de ve mukus taşımayan, yaşayan Calu-3 hücreleri konfokal mikroskop görüntüsü Şekil 99 de verilmiştir.

A549 hücrelerinin PVA ve PS nanopartikül formülasyonlarıyla hücre kültürü çalışma besiyeri içine daldırılmış koşulda 2 saat süreyle inkübe edilmesini takiben elde edilen konfokal görüntüleri Şekil 100-112 de verilmiştir.

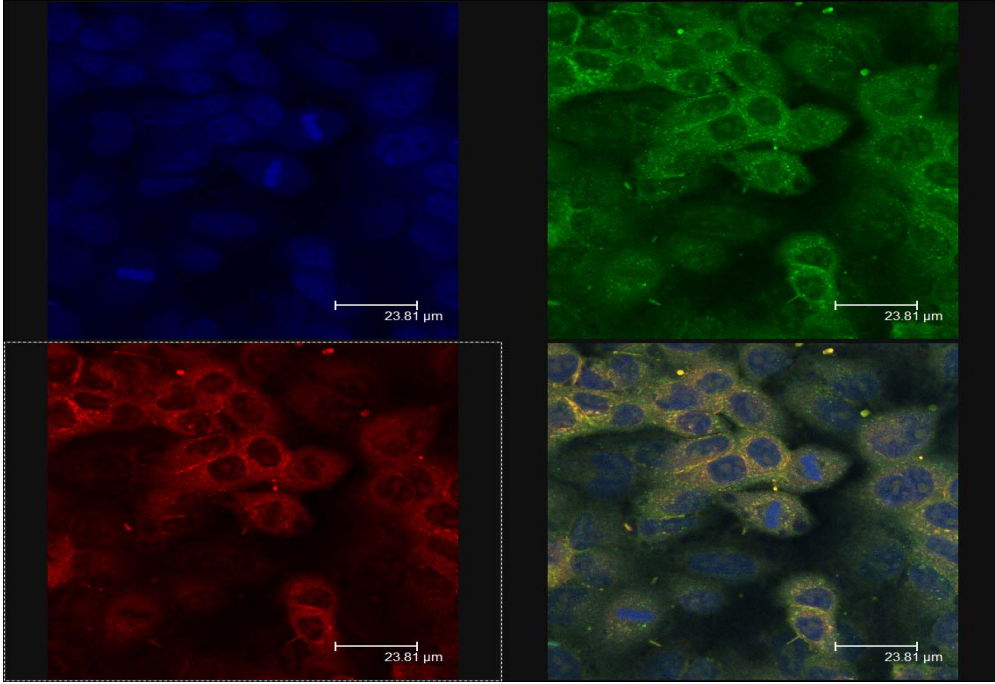
Calu-3 hücrelerinin PVA ve PS nanopartikül formülasyonlarıyla hücre kültürü çalışma besiyeri içine daldırılmış koşulda (Şekil 113-130) ve hava-sıvı arayüzey koşullarında (Şekil 131-142) 2 saat süreyle inkübe edilmesini takiben elde edilen konfokal görüntüleri Şekil 113-142 de gösterilmiştir.



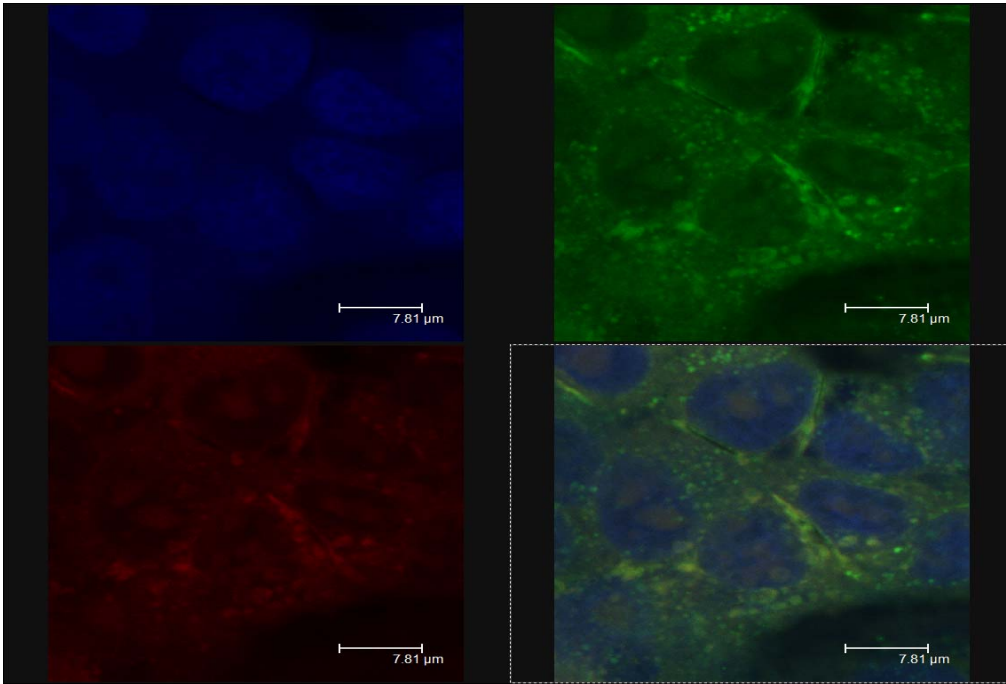
Şekil 98 : Nanopartikül formülasyonu ile inkubasyona bırakılmamış, mukus taşıyan, yaşayan Calu-3 hücreleri konfokal mikroskop görüntüsü



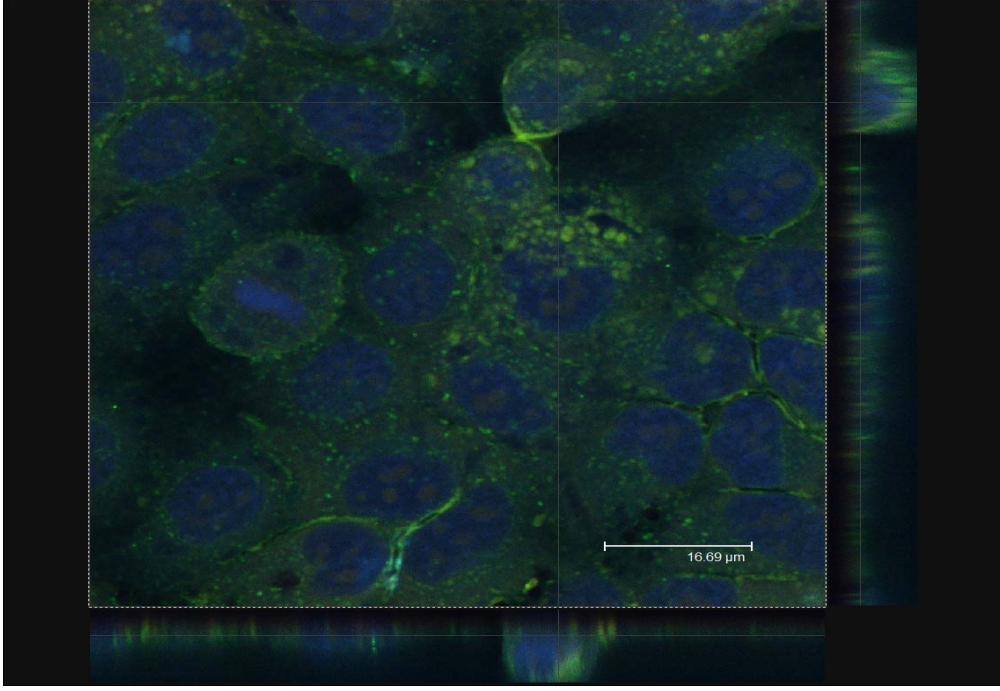
Şekil 99 : Nanopartikül formülasyonu ile inkubasyona bırakılmamış, mukus tabakası uzaklaştırılmış, yaşayan Calu-3 hücreleri konfokal mikroskop görüntüsü



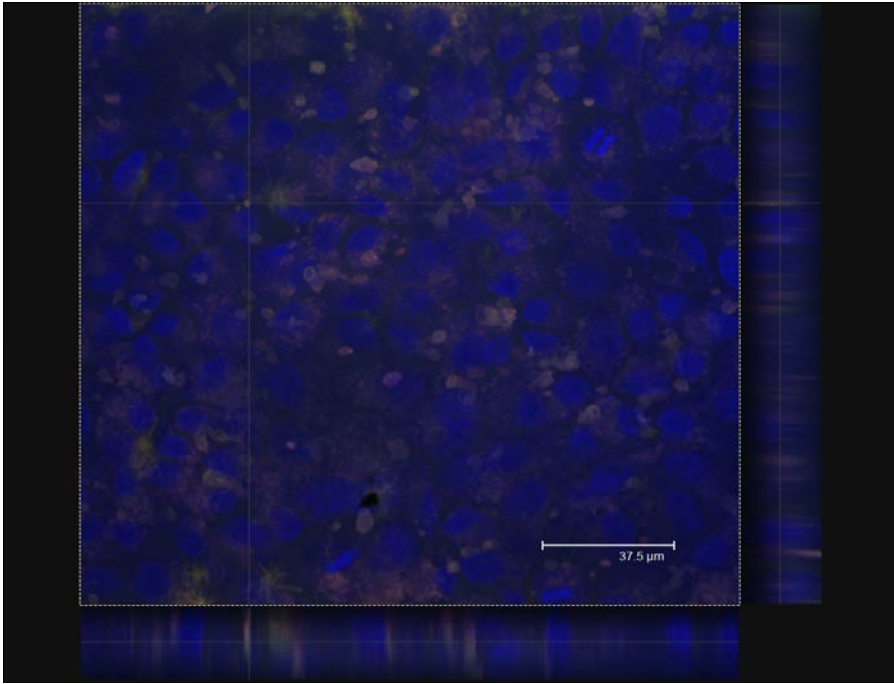
Şekil 100 : PS-C-50 formülasyonunun hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılarak kültür edilen A549 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-I



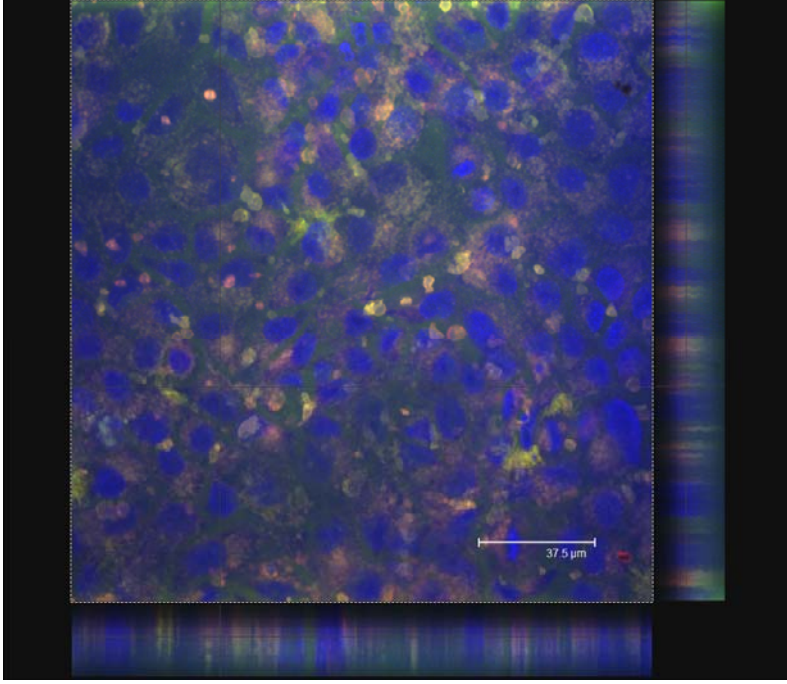
Şekil 101 : PS-C-50 formülasyonunun hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılarak kültür edilen A549 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-II



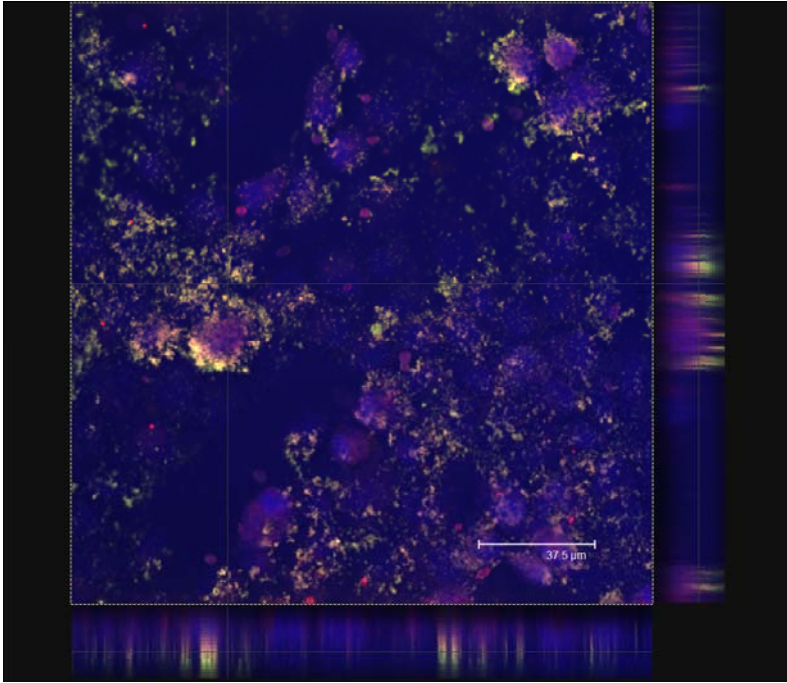
Şekil 102 : PS-C-50 formülasyonunun hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılarak kültür edilen A549 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-III



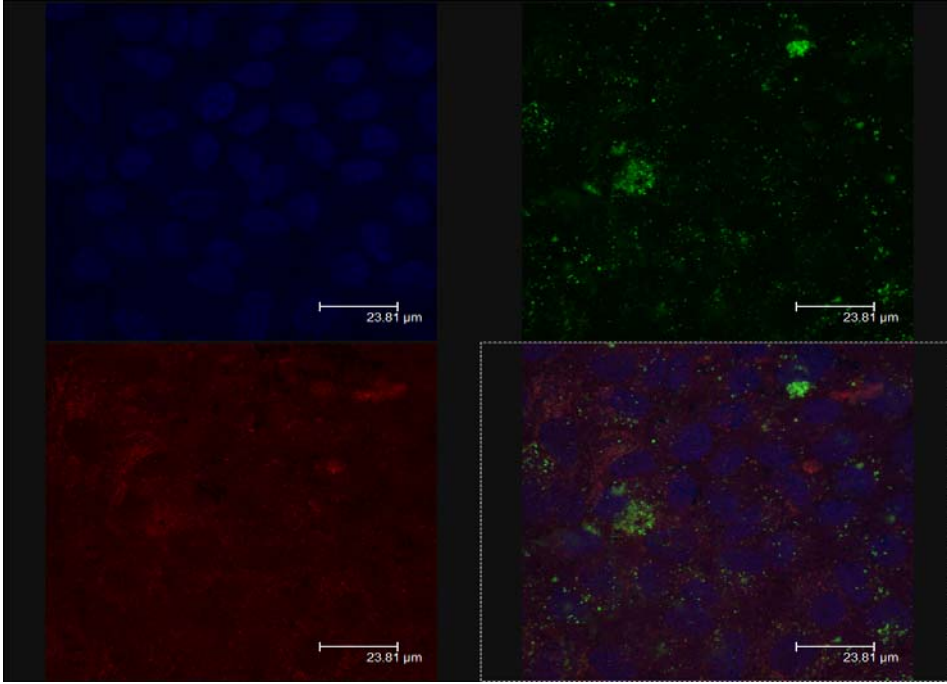
Şekil 103 : PS-NC-51 formülasyonunun hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılarak kültür edilen A549 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-I



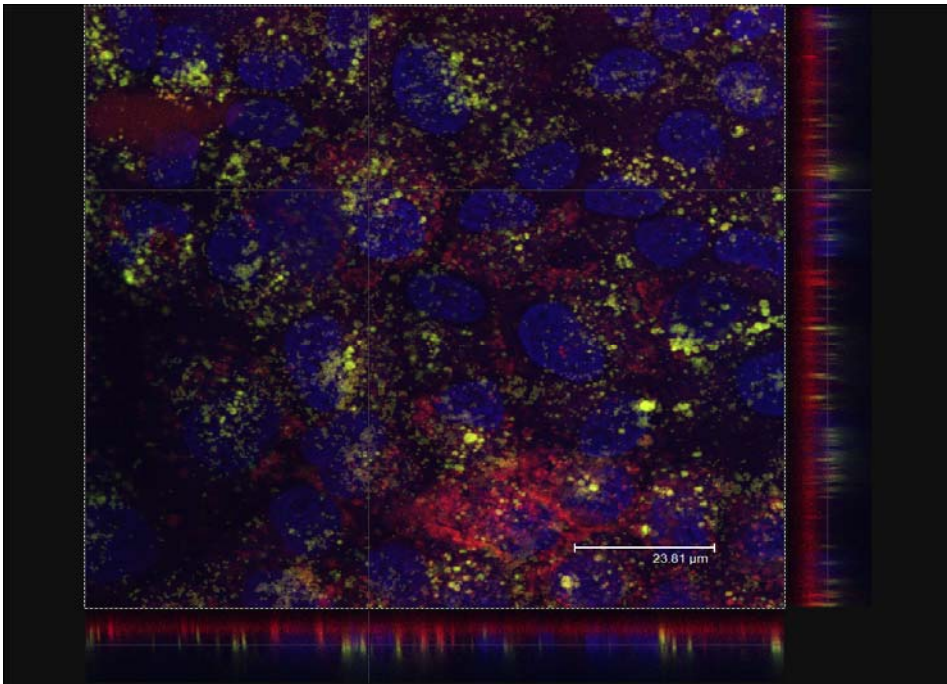
Şekil 104 : PS-NC-51 formülasyonunun hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılarak kültür edilen A549 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-II



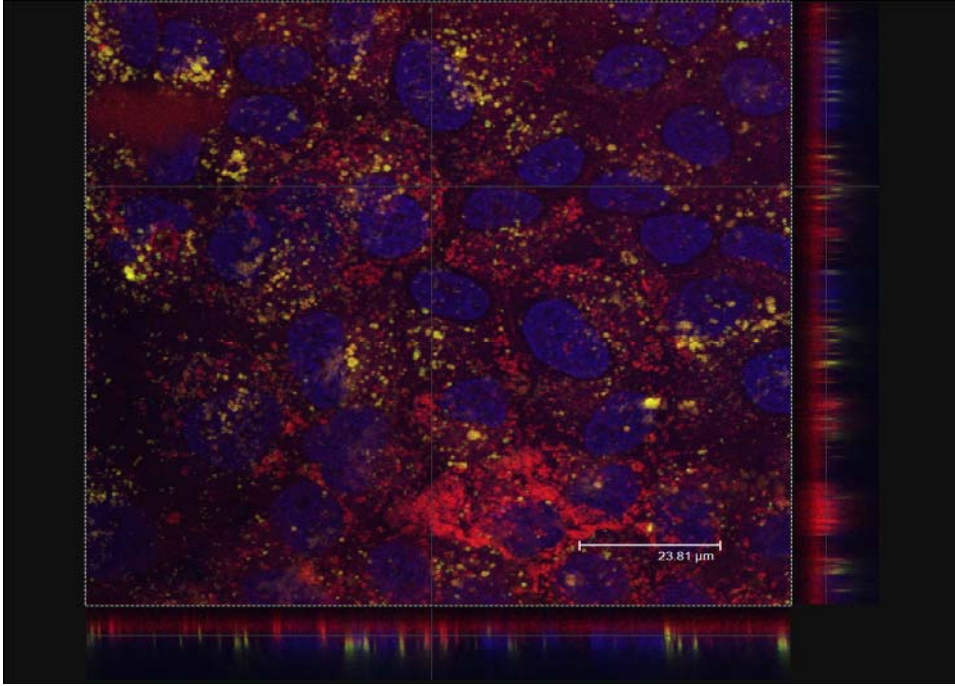
Şekil 105 : PS-NC-250 formülasyonunun hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılarak kültür edilen A549 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü



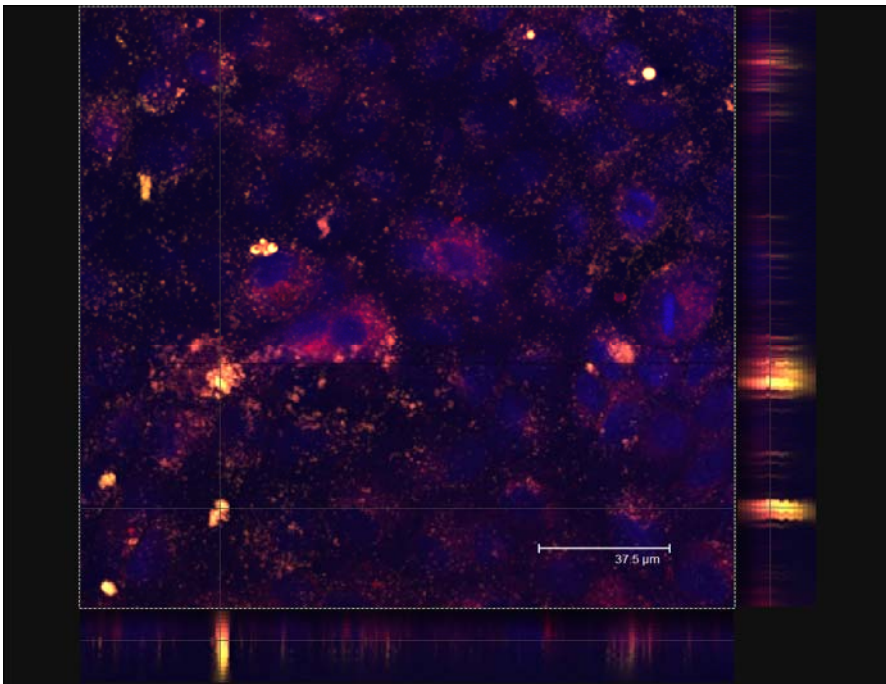
Şekil 106 : PS-C-300 formülasyonunun hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılarak kültür edilen A549 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-I



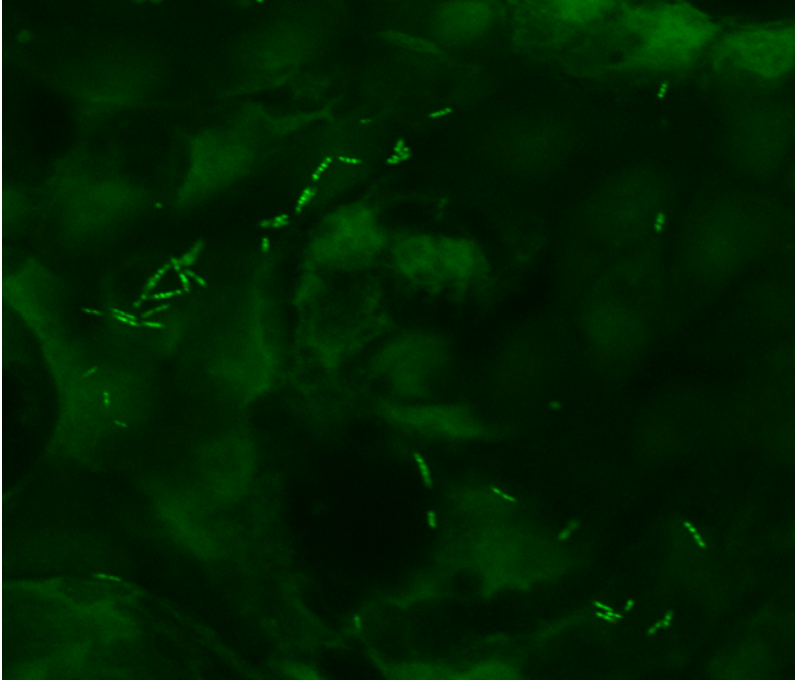
Şekil 107 : PS-C-300 formülasyonunun hücre kültürü besiyerine daldırılarak kültür edilen A549 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-II



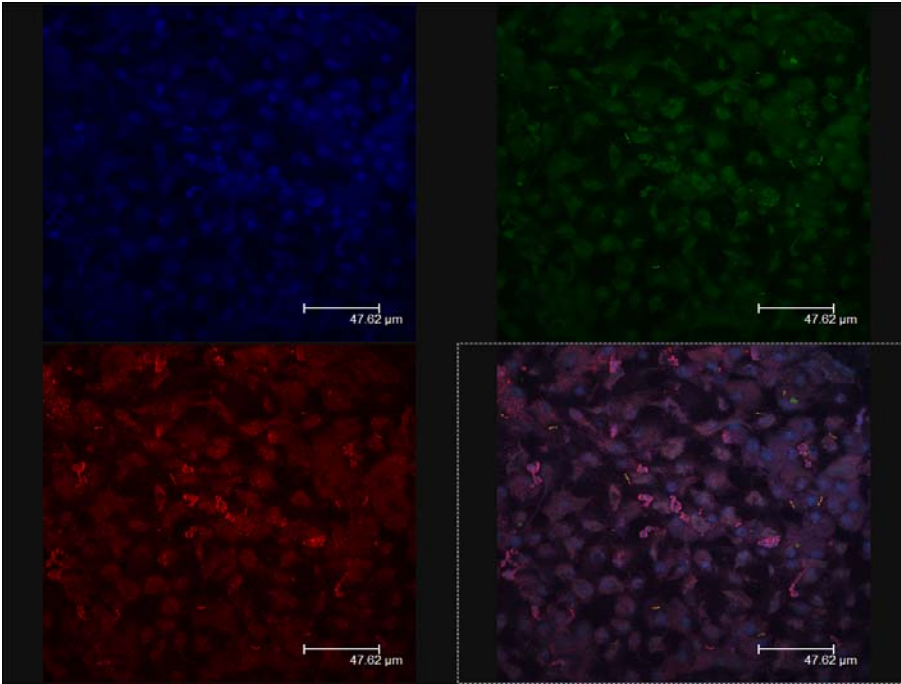
Şekil 108 : PS-C-300 formülasyonunun hücre kültürü besiyerine daldırılarak kültür edilen A549 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-III



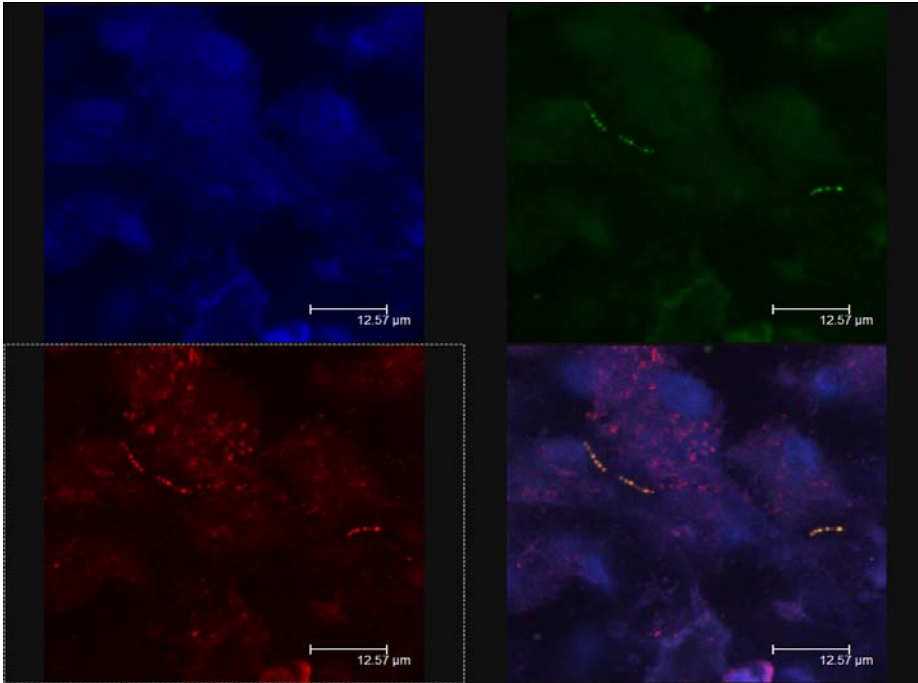
Şekil 109 : PS-C-300 formülasyonunun hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılarak kültür edilen A549 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-IV



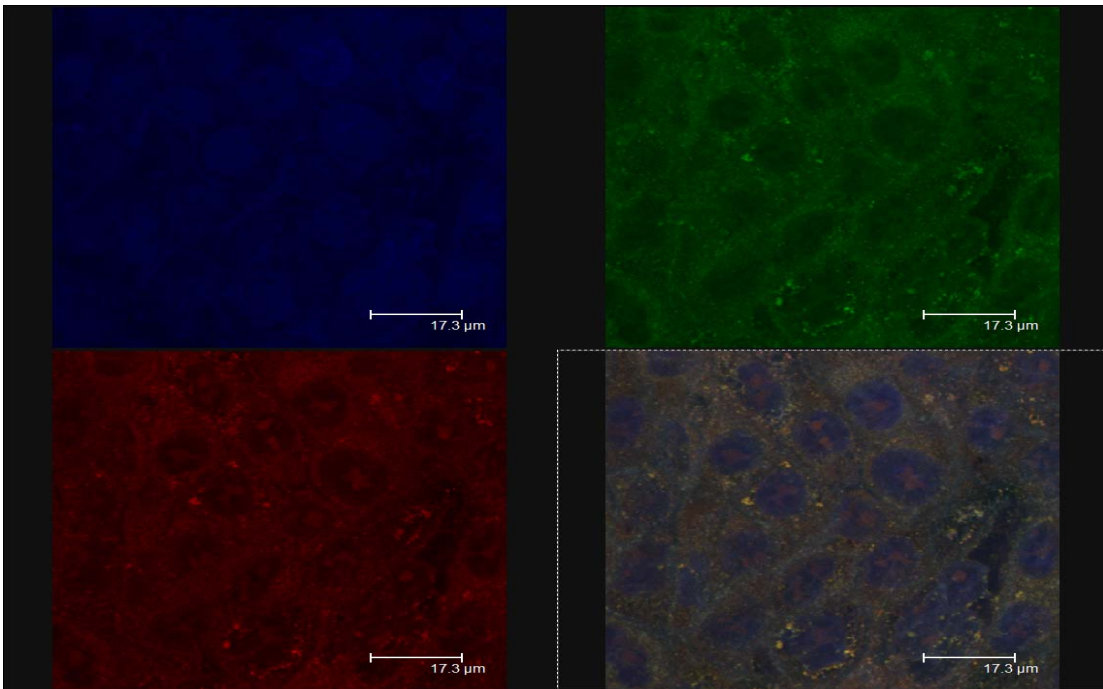
Şekil 110 : PVA-L-F2A formülasyonunun hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılarak kültür edilen A549 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-I



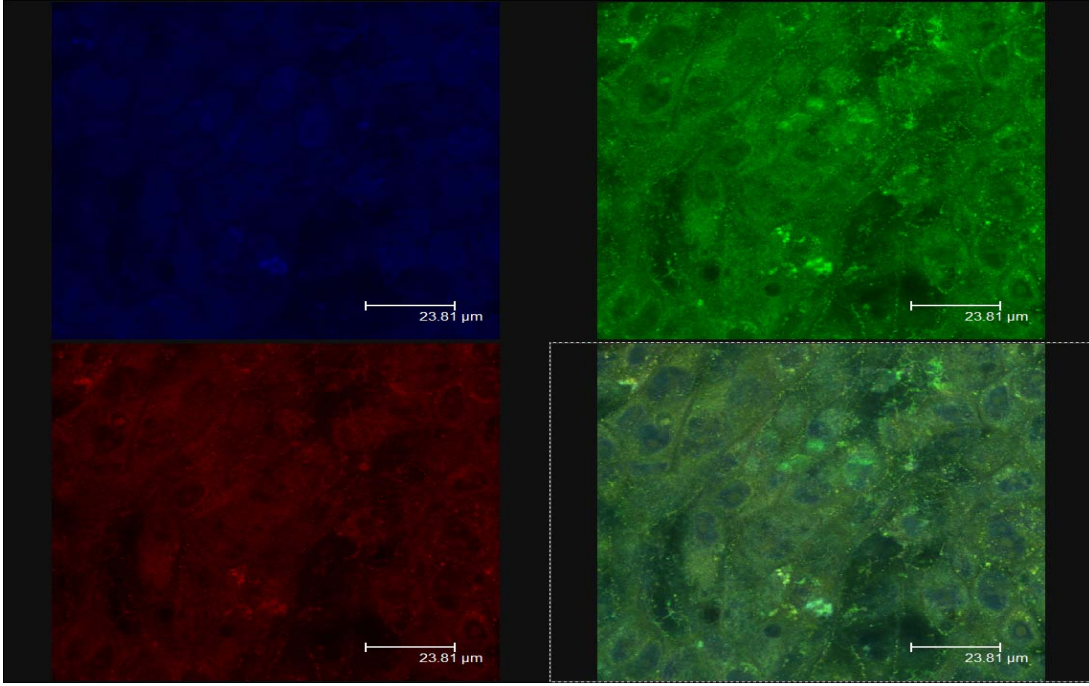
Şekil 111 : PVA-L-F2A formülasyonunun hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılarak kültür edilen A549 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-II



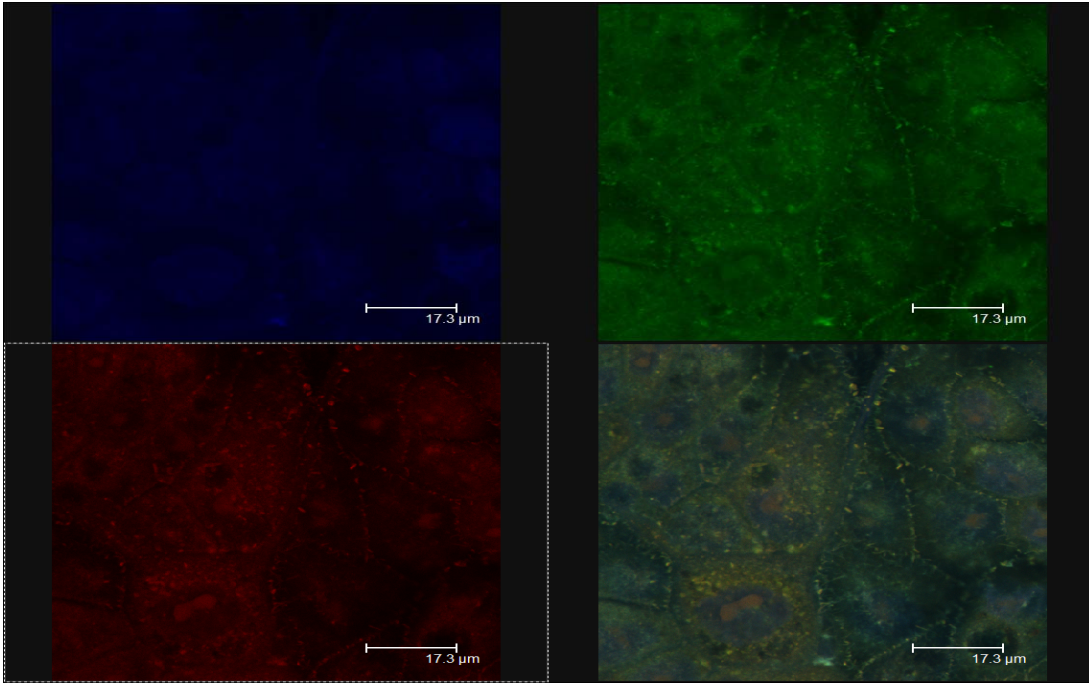
Şekil 112 : PVA-L-F2A formülasyonunun hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılarak kültür edilen A549 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-III



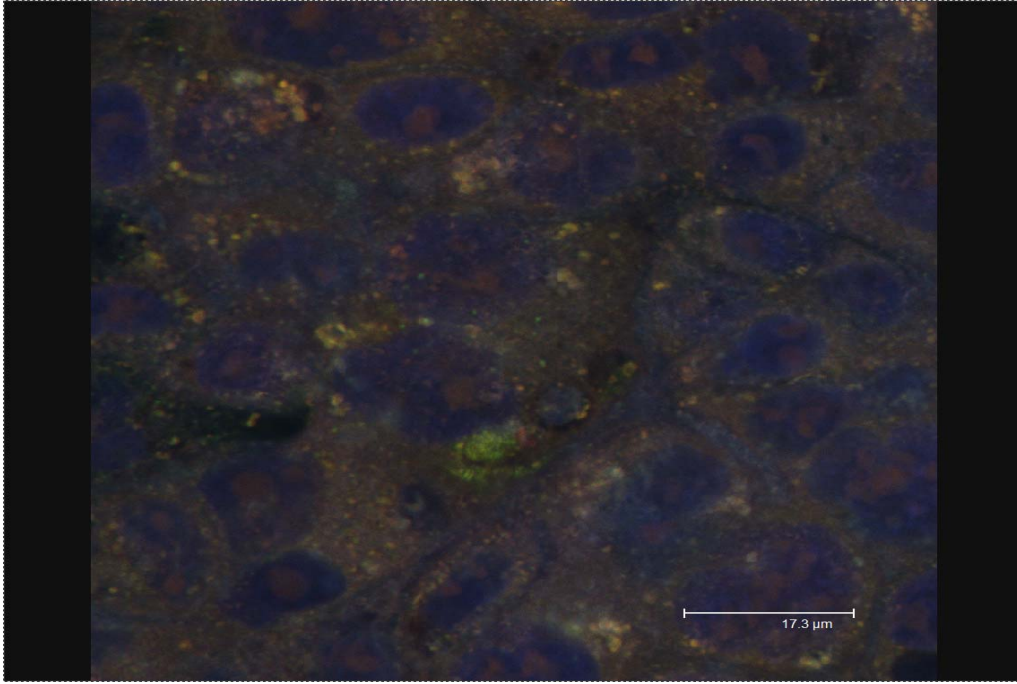
Şekil 113 : PS-C-50 formülasyonunun hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılarak kültür edilen Calu-3 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-I



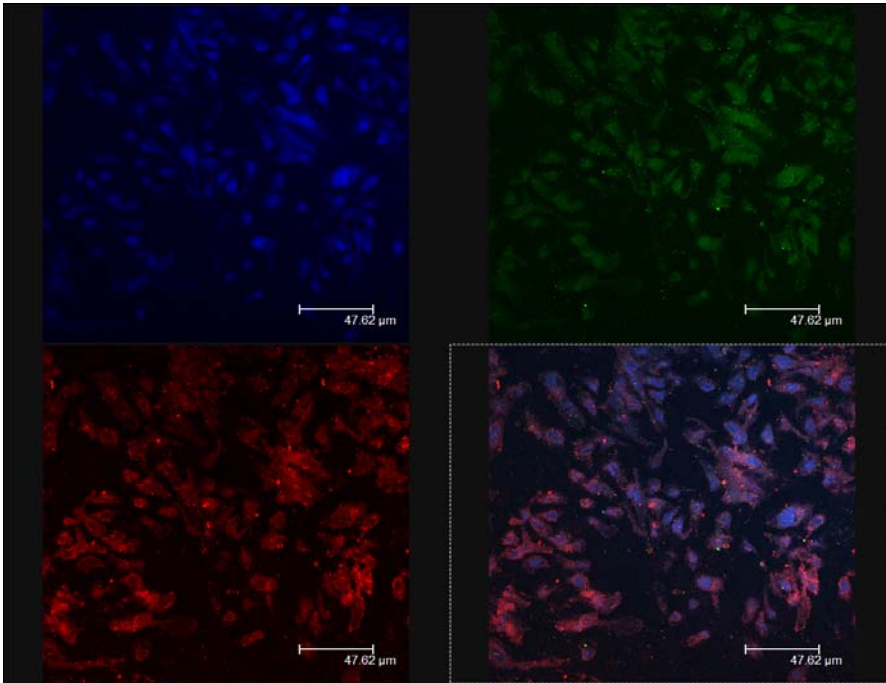
Şekil 114 : PS-C-50 formülasyonunun hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılarak kültür edilen Calu-3 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-II



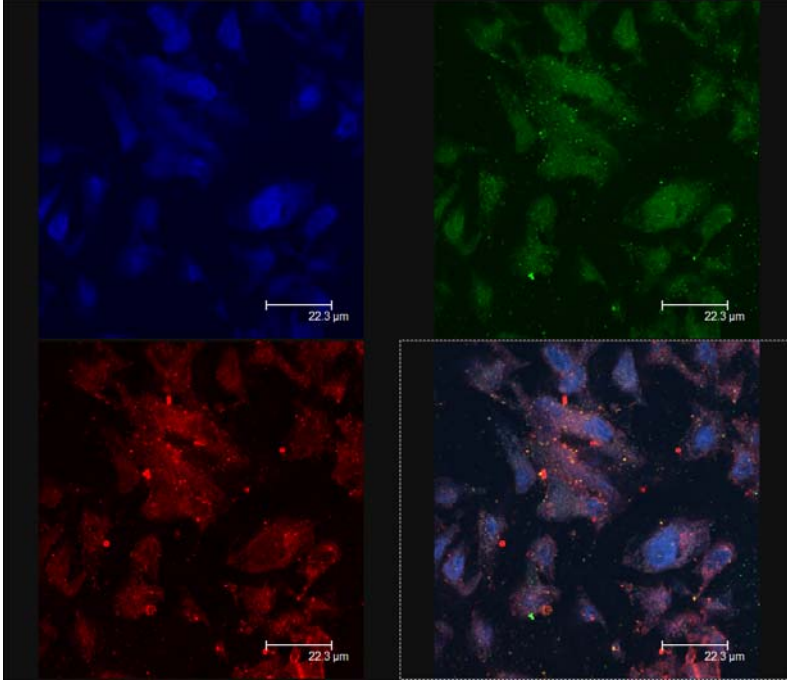
Şekil 115 : PS-C-50 formülasyonunun hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılarak kültür edilen Calu-3 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-III



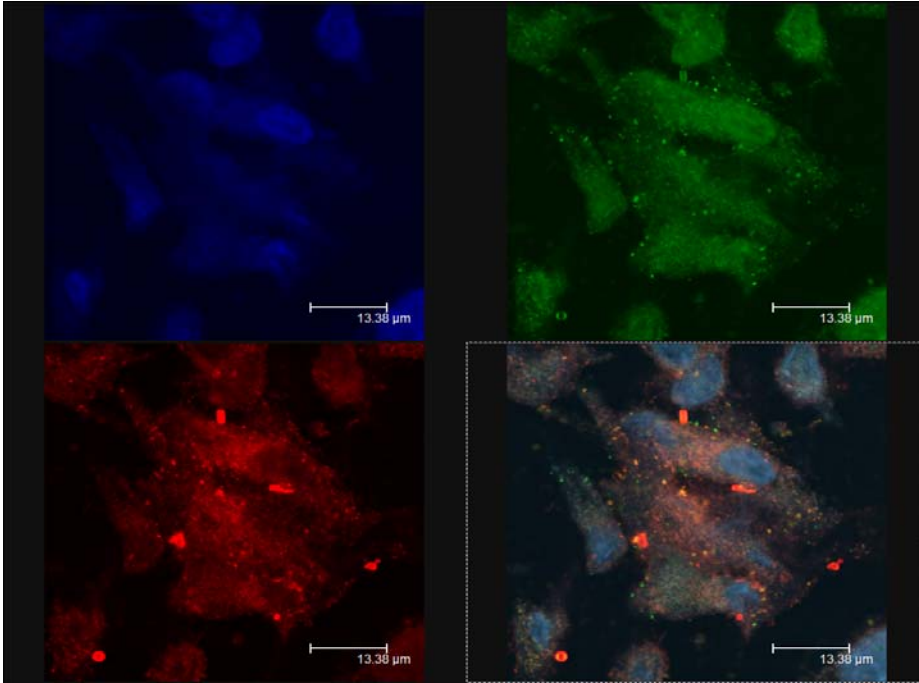
Şekil 116 : PS-C-50 formülasyonunun hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılarak kültür edilen Calu-3 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-IV



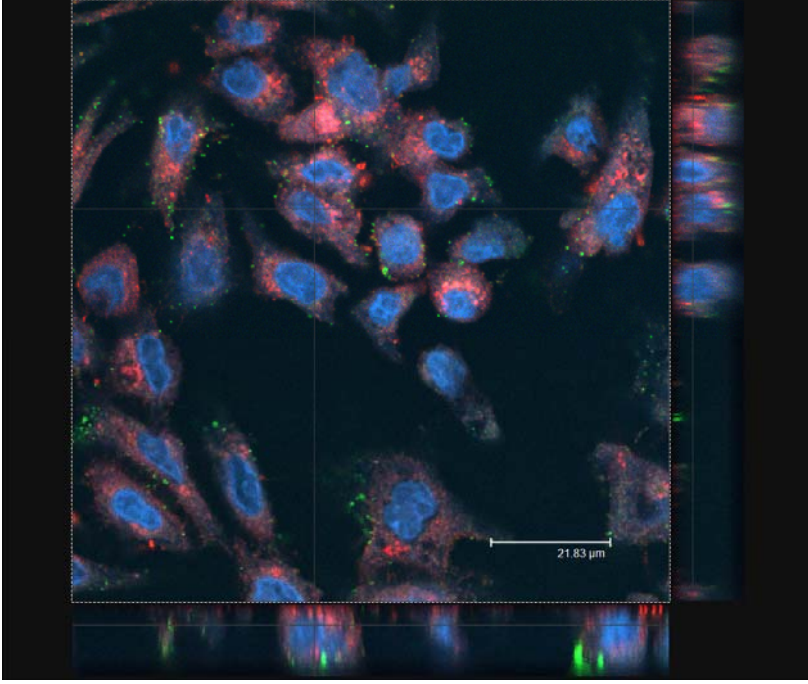
Şekil 117 : PS-NC-250 formülasyonunun hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılarak kültür edilen Calu-3 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-I



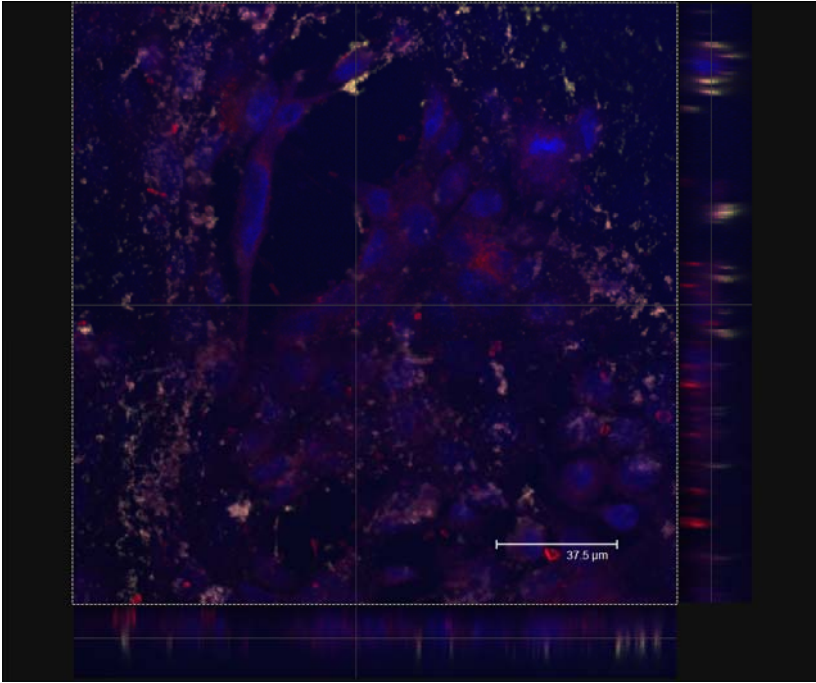
Şekil 118 : PS-NC-250 formülasyonunun hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılarak kültür edilen Calu-3 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-II



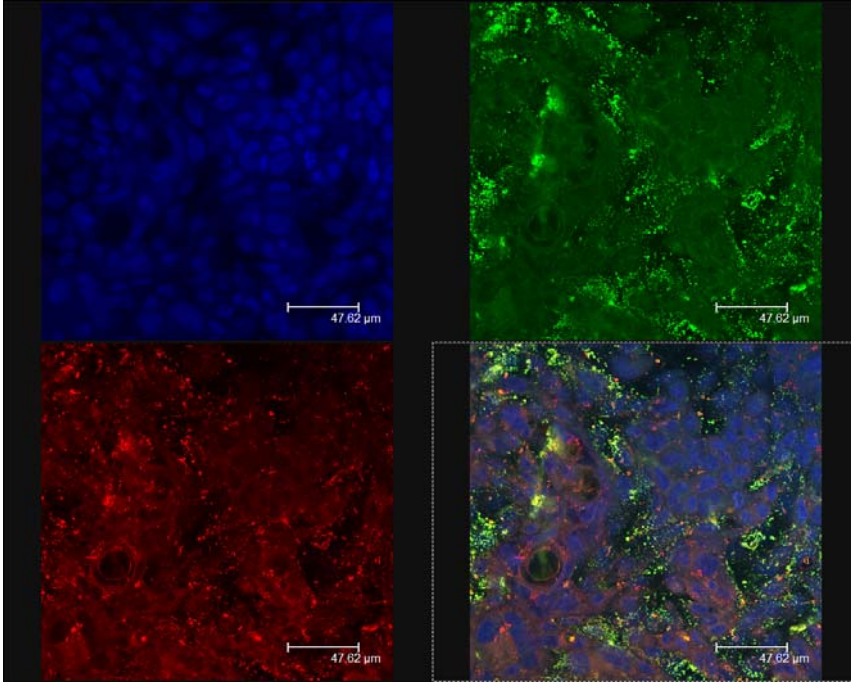
Şekil 119 : PS-NC-250 formülasyonunun hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılarak kültür edilen Calu-3 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-III



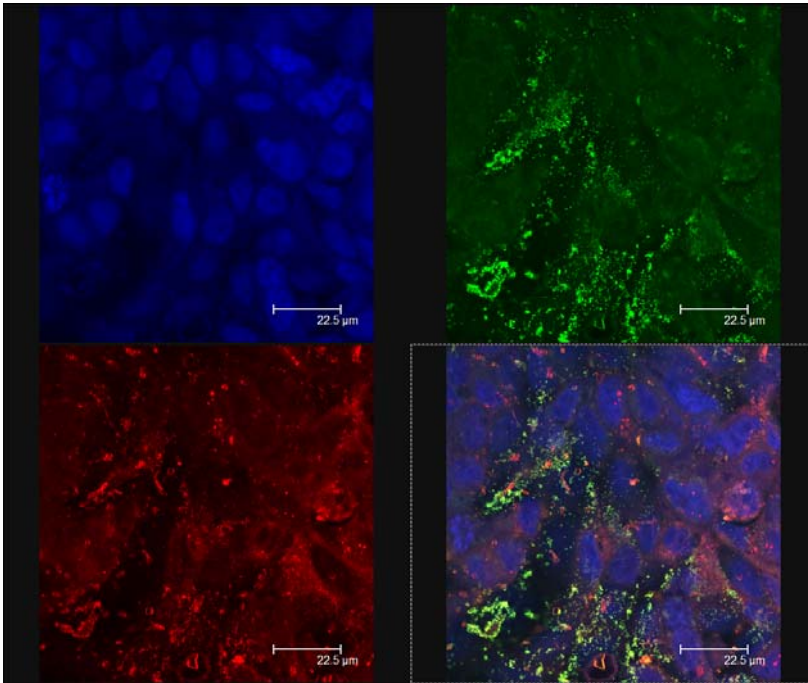
Şekil 120 : PS-NC-250 formülasyonunun hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılarak kültür edilen Calu-3 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-IV



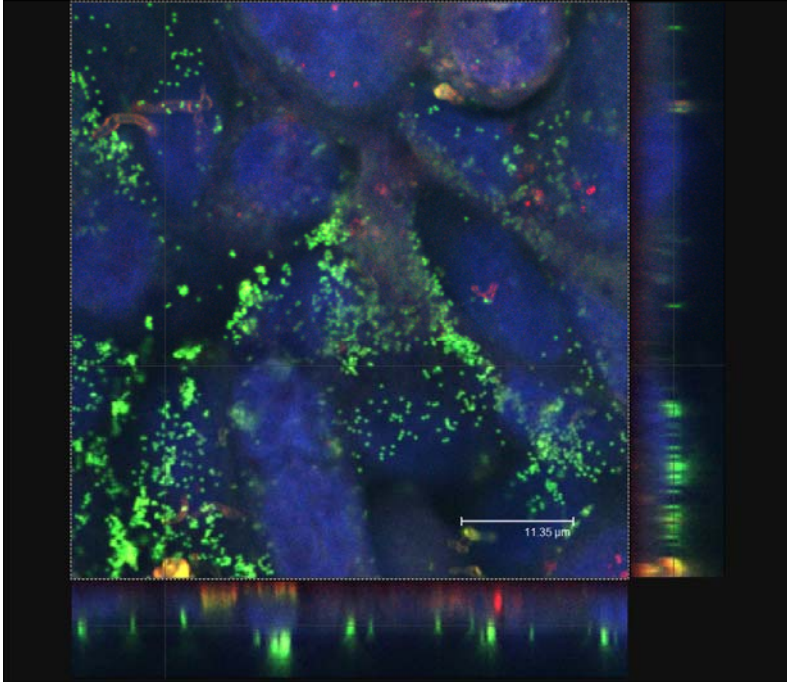
Şekil 121 : PS-NC-250 formülasyonunun hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılarak kültür edilen Calu-3 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-V



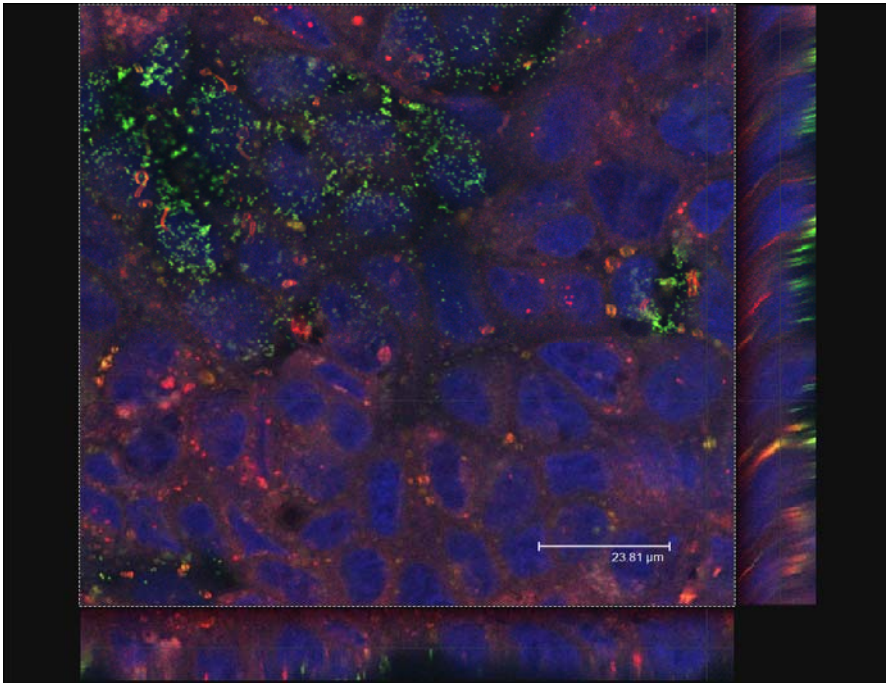
Şekil 122 : PS-C-300 formülasyonunun hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılarak kültür edilen Calu-3 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-I



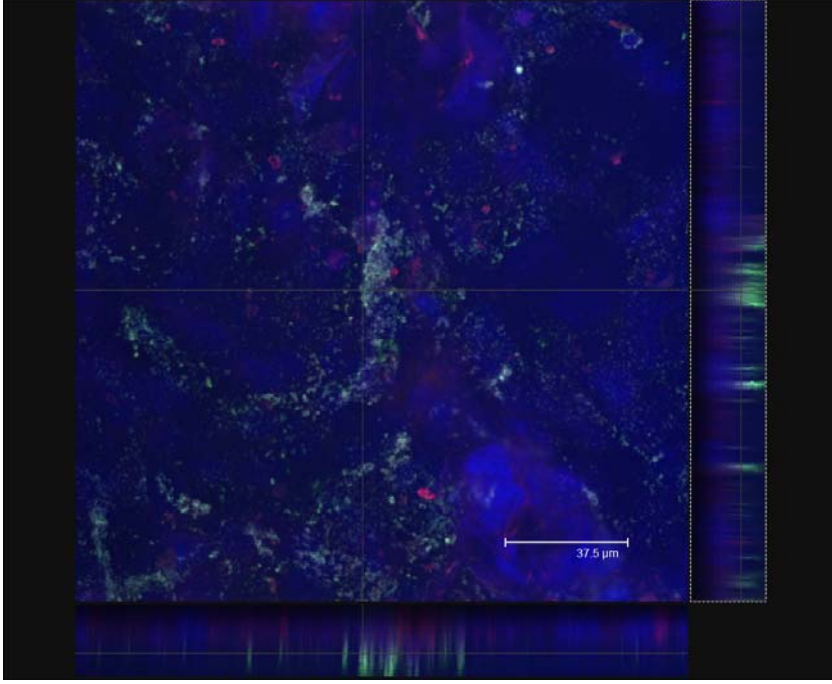
Şekil 123 : PS-C-300 formülasyonunun hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılarak kültür edilen Calu-3 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-II



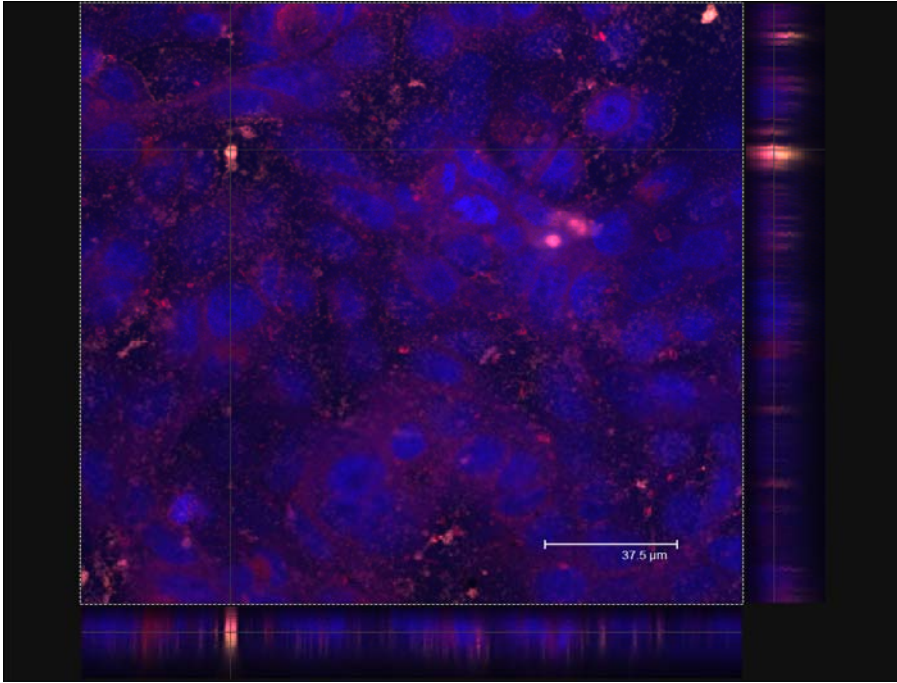
Şekil 124 : PS-C-300 formülasyonunun hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılarak kültür edilen Calu-3 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-III



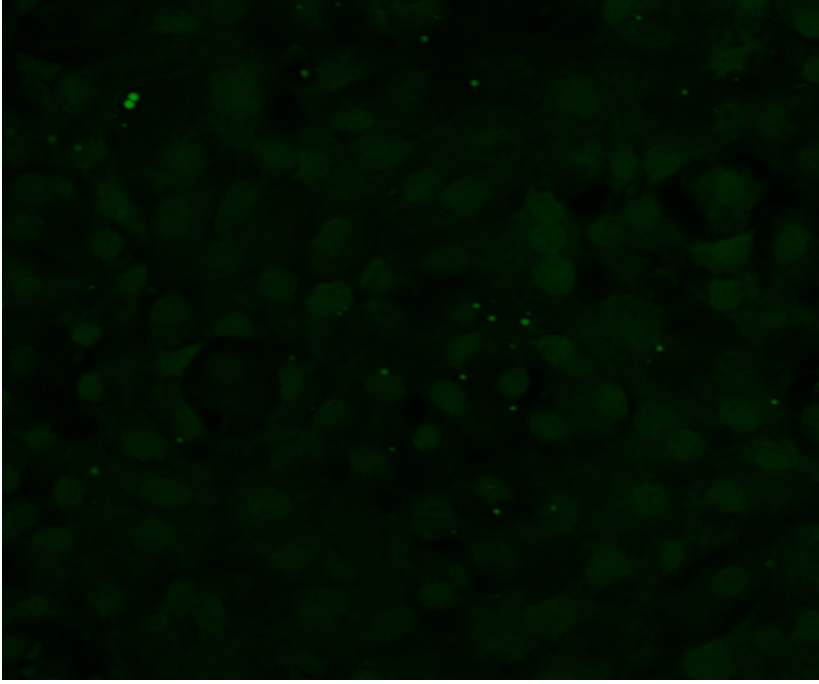
Şekil 125 : PS-C-300 formülasyonunun hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılarak kültür edilen Calu-3 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-IV



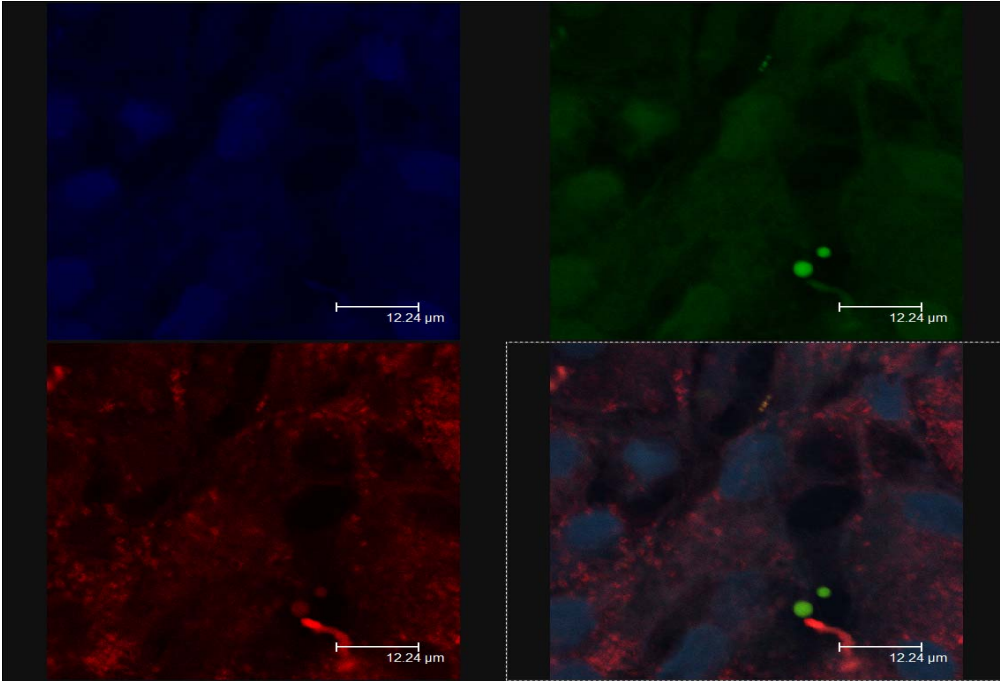
Şekil 126 : PS-C-300 formülasyonunun hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılarak kültür edilen Calu-3 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-V



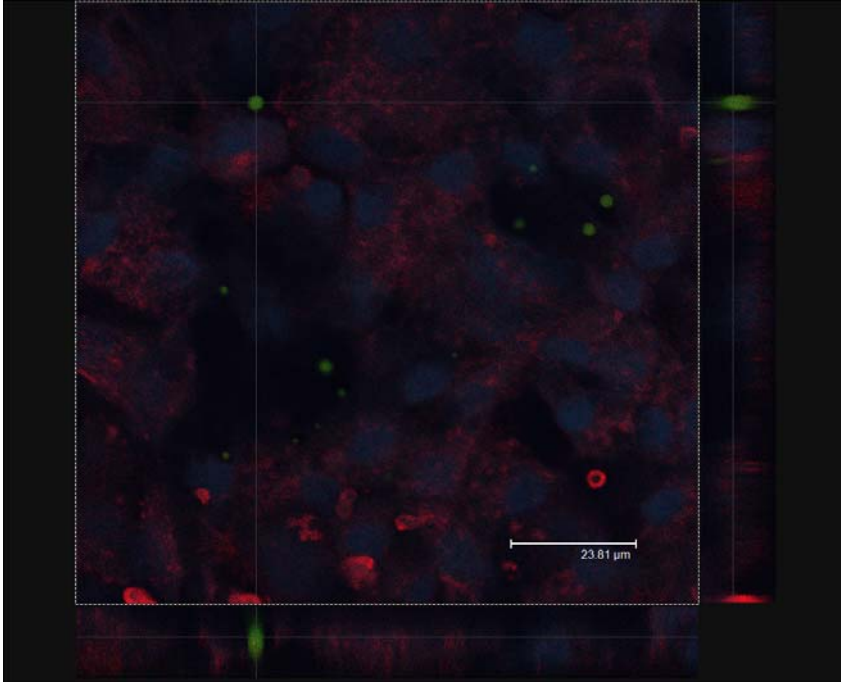
Şekil 127 : PS-C-300 formülasyonunun hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılarak kültür edilen Calu-3 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-VI



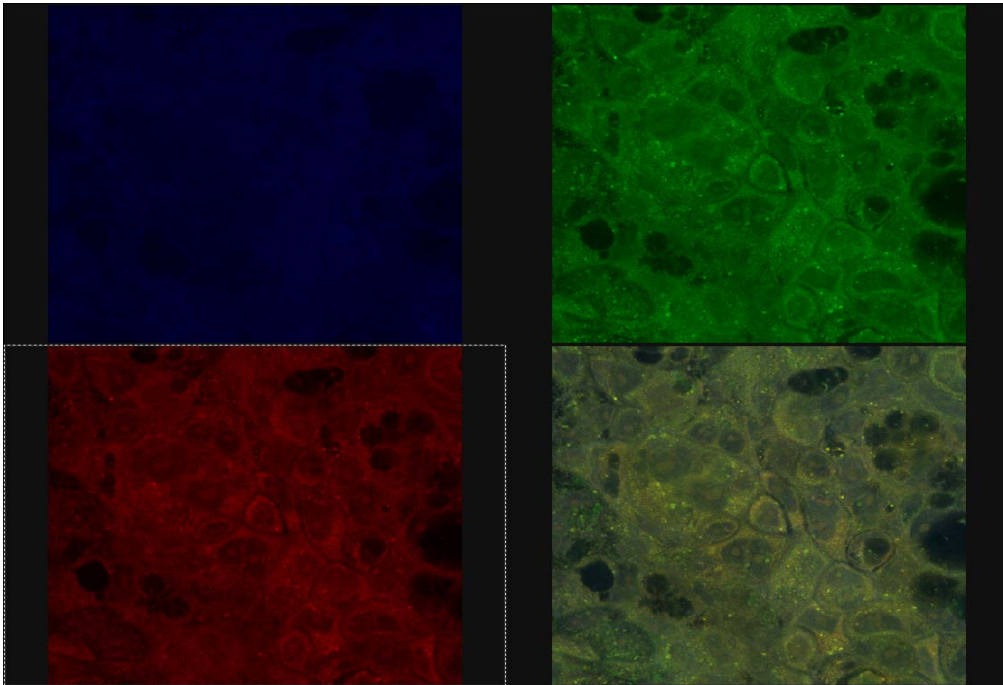
Şekil 128 : PVA-L-F2A formülasyonunun hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılarak kültür edilen Calu-3 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-I



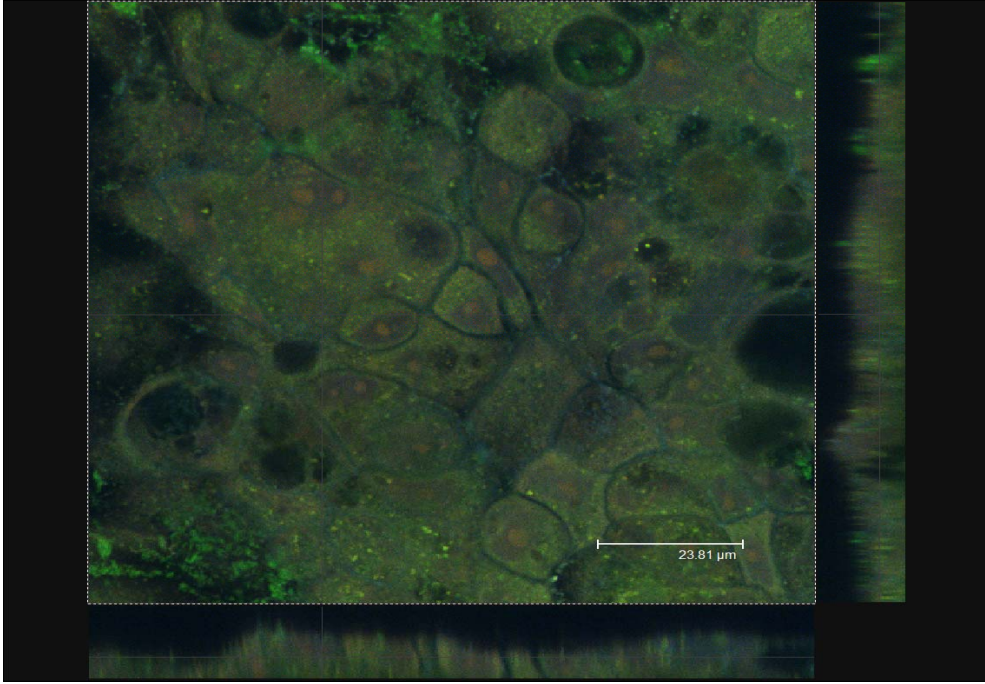
Şekil 129 : PVA-L-F2A formülasyonunun hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılarak kültür edilen Calu-3 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-II



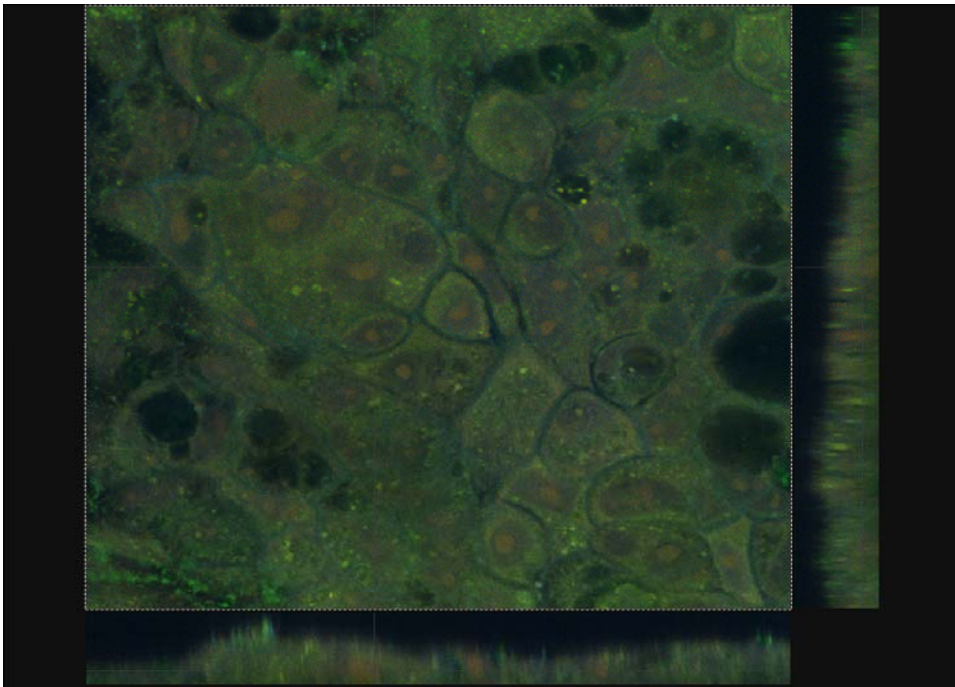
Şekil 130 : PVA-L-F2A formülasyonunun hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılarak kültür edilen Calu-3 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-III



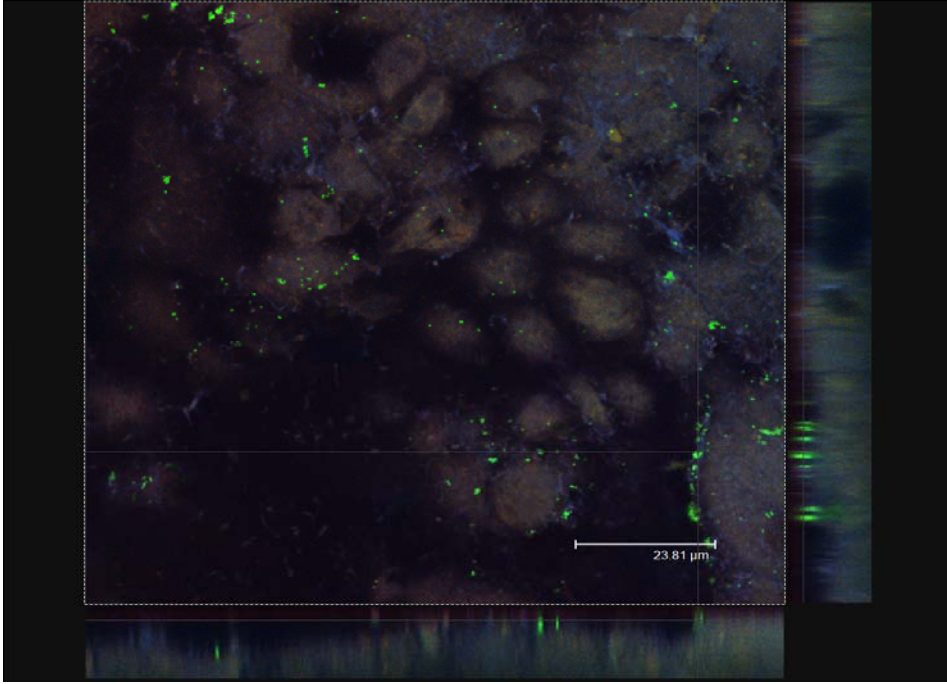
Şekil 131 : PS-NC-51 formülasyonunun hava-sıvı arayüzeyinde kültür edilen Calu-3 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-I



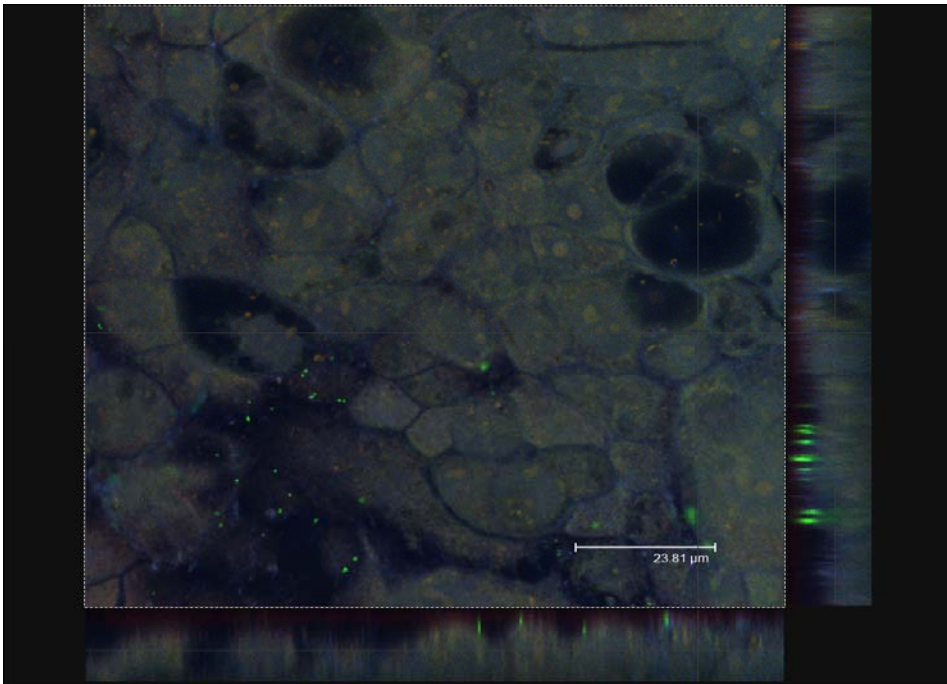
Şekil 132 : PS-NC-51 formülasyonunun hava-sıvı arayüzeyinde kültür edilen Calu-3 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-II



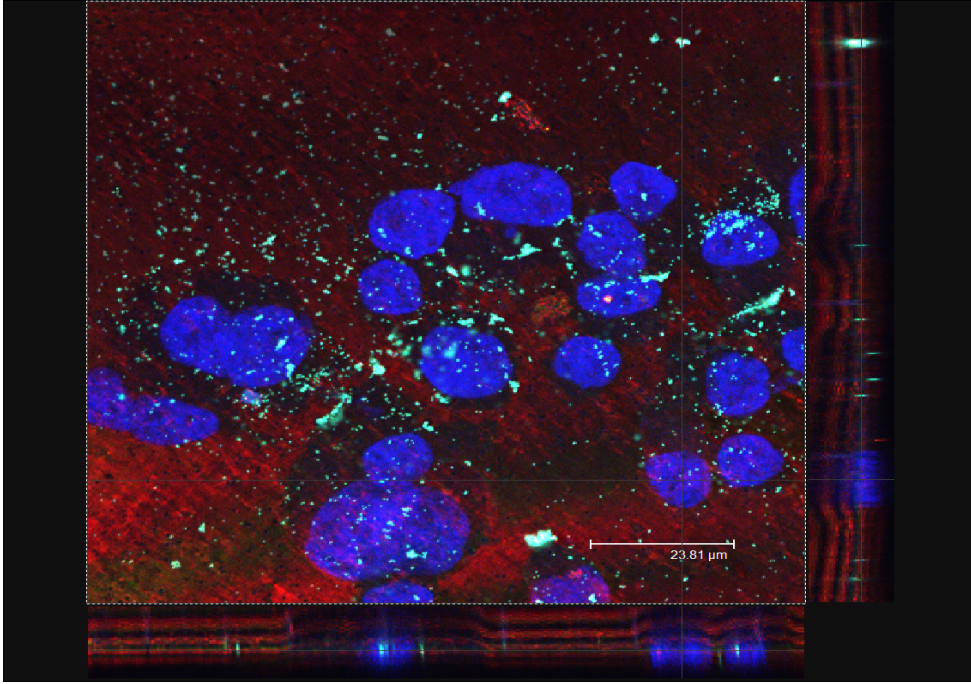
Şekil 133 : PS-NC-51 formülasyonunun hava-sıvı arayüzeyinde kültür edilen Calu-3 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-III



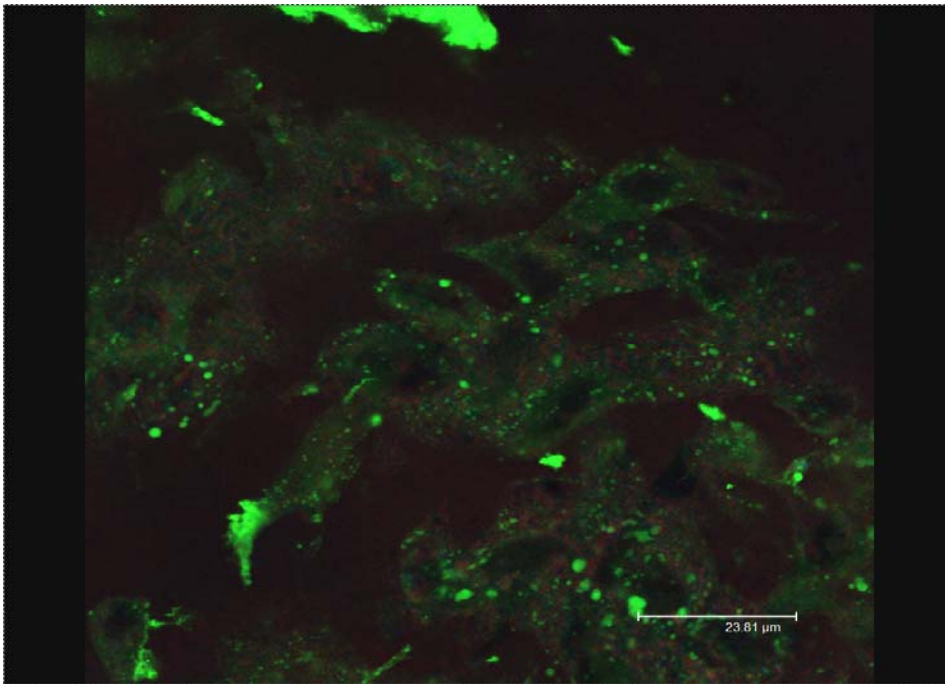
Şekil 134 : PS-C-300 formülasyonunun hava-sıvı arayüzeyinde kültür edilen Calu-3 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-I



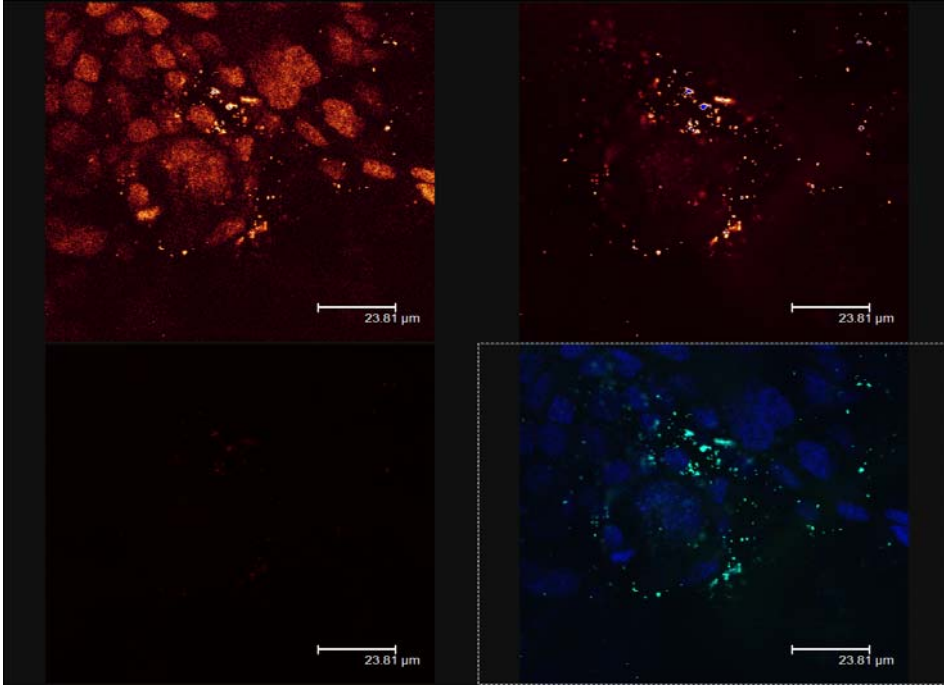
Şekil 135 : PS-C-300 formülasyonunun hava-sıvı arayüzeyinde kültür edilen Calu-3 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-II



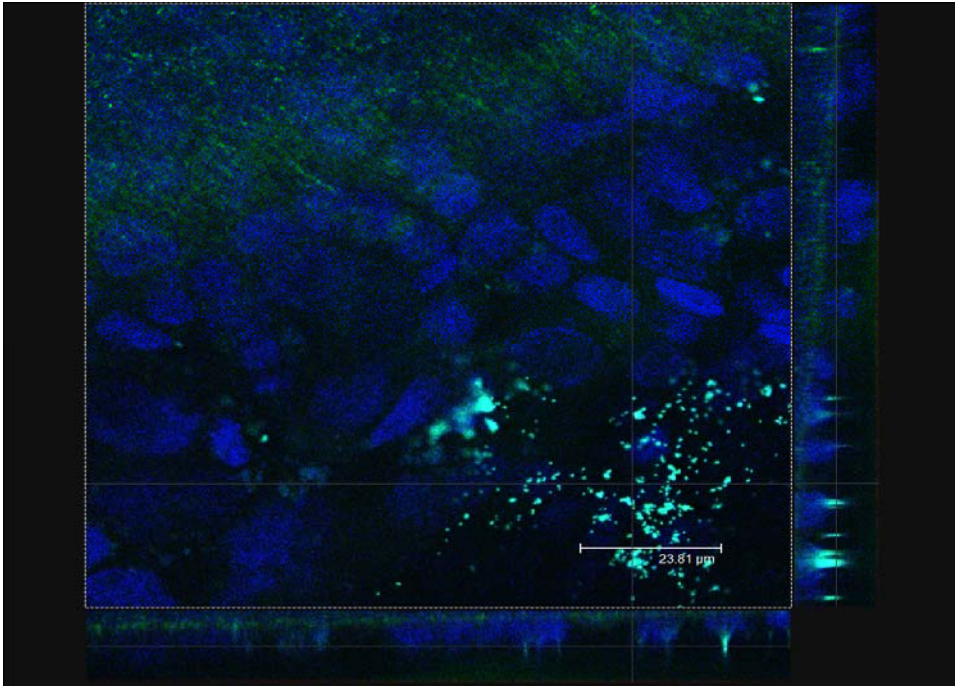
Şekil 136 : PS-NC-51 formülasyonunun hava-sıvı arayüzeyinde kültür edilen Calu-3 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-I



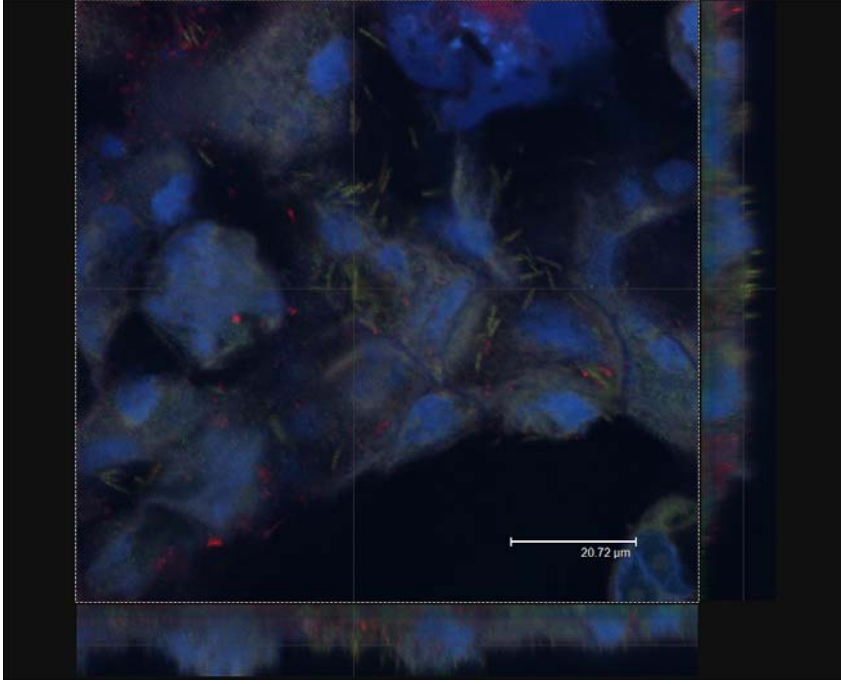
Şekil 137 : PS-NC-51 formülasyonunun hava-sıvı arayüzeyinde kültür edilen Calu-3 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-II



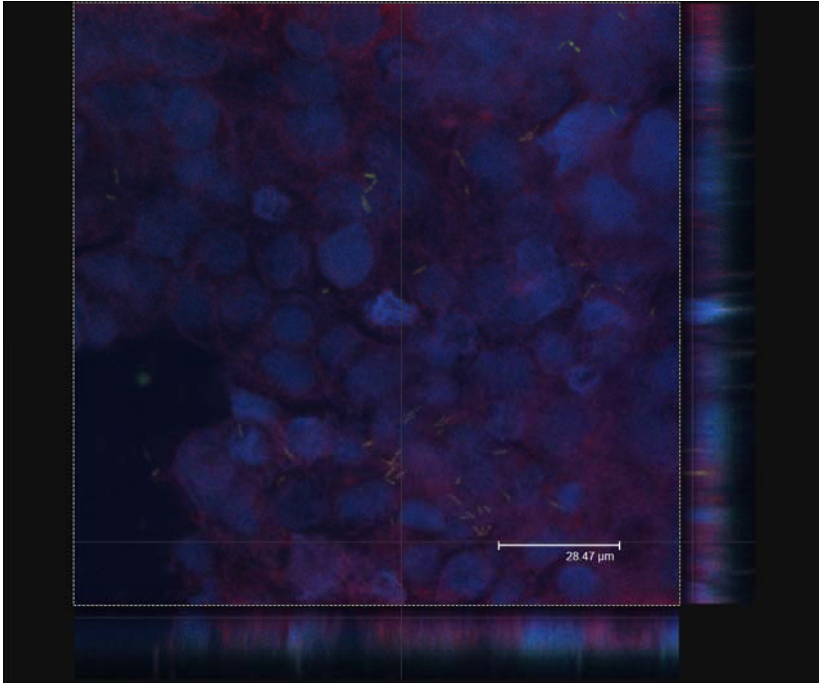
Şekil 138 : PS-C-300 formülasyonunun hava-sıvı arayüzeyinde kültür edilen Calu-3 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-III



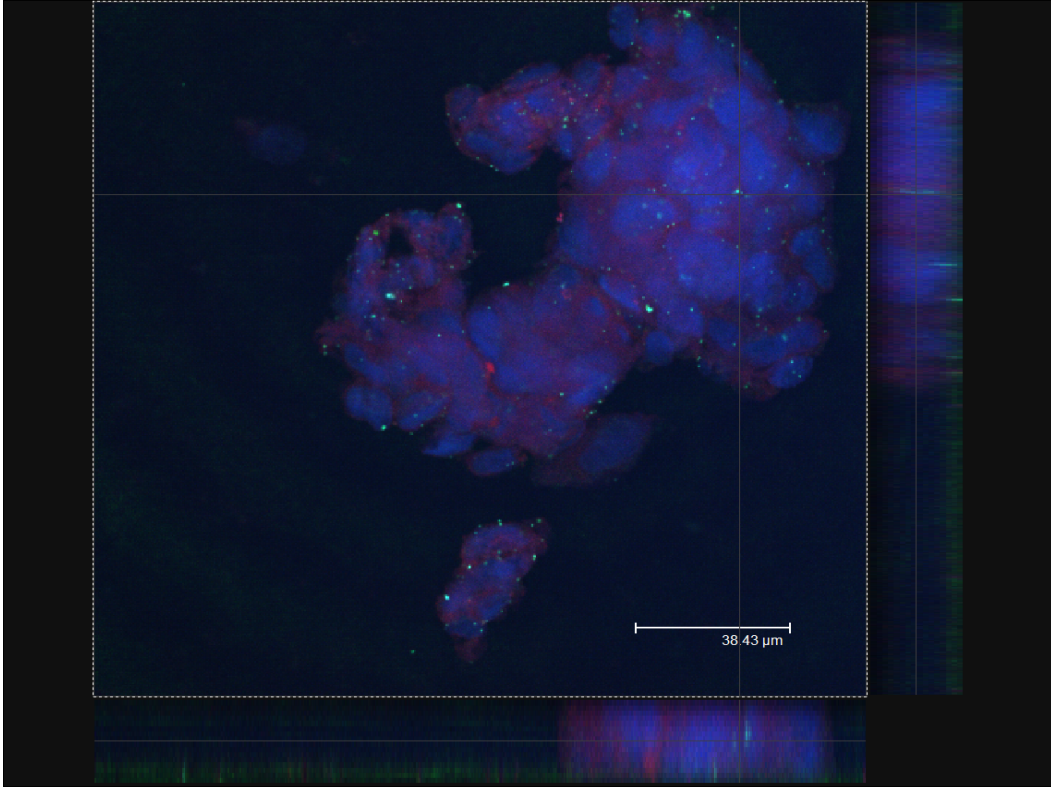
Şekil 139 : PS-C-300 formülasyonunun hava-sıvı arayüzeyinde kültür edilen Calu-3 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-IV



Şekil 140 : PVA-L-F2A formülasyonunun hava-sıvı arayüzeyinde kültür edilen Calu-3 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-I



Şekil 141 : PVA-L-F2A formülasyonunun hava-sıvı arayüzeyinde kültür edilen Calu-3 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-II



Şekil 142 : PVA-L-F2A formülasyonunun hava-sıvı arayüzeyinde kültür edilen Calu-3 hücreleriyle inkübasyona bırakılma koşullarındaki konfokal mikroskop görüntüsü-III

TARTIŞMA

Nanopartiküller, büyüklükleri 10-1000 nm arasında değişen, çözünmüş, hapsedilmiş veya adsorbe olan etkin maddeyi kontrollü olarak salan katı kolloidal partiküllerdir. Bu tip taşıyıcı sistemler ilaçların istenilen organda yoğunlaşmalarını ve salımlarının kontrolünü sağlar, transdermal uygulamalarda mikrozervuar görevi yaparak ilacı kan dolaşımına ulaştırır, peptid, protein ve nükleik asitler için iyi bir taşıyıcı görevi görür, antikor oluşumunu uzun süre devam ettirerek aşılardan etkinliğini artırır, akciğerlere hedeflemeye olanak tanır ve yapılarına floresans veya radyoaktif maddeler yüklenerek akciğer, karaciğer, dalak, kemik iliği gibi organların hücre bazda incelenmesine yardımcı olur. Pulmoner yolla uygulanan nanopartiküller ile daha düşük dozda, daha az yan etkiye sahip ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilebilir ve böylece terapötik etki azalmaksızın yüksek lokal veya sistemik etki sağlanır. Optimum terapötik etkinliğin sağlanması amacıyla kullanılan taşıyıcı sistemlerin (polielektrolit kompleks, viral vektör, lipozom, mikro-/nanopartikül) hücre içi davranış mekanizmaları çözümlenmeye çalışılmaktadır. Ancak partiküler sistemlerin akciğer hücreleri üzerindeki etki mekanizmasının aydınlatılabilmesi için hücre ortamında teşhis edilebilir olması gereklidir. Bu amaçla floresans ile işaretlenmiş özel maddeler (FITC-Dextran, FITC-BSA vb) partiküllerin içine yüklenir veya partiküllerin hazırlanmasında kullanılan polimer floresans gösteren bir boya (KF, rodamin izotiyosiyanat, floressein izotiyosiyanat) ile kovalanarak yolla işaretlenir (23, 223-227). Ancak floresans içeren madde enkapsüle edilmiş partiküller, hücre ortamında floresansı salmaya başlar ve mikroskopik incelemede sadece partiküller değil ortama yayılan tüm floresans gözlenir (228). Floresans bağlanmış polimerin ise ortamdaki stabilitesinden dolayı partiküler sistemden ayrılması engellenmekte ve partiküllerin hücre ortamında lokalizasyonu daha iyi görüntülenmektedir (23). Partiküllerin hücre içine alımını incelemek üzere radyoaktiviteyle işaretlenmeleri de diğer yaygın deneysel yaklaşımlardan biridir (229, 230). Ancak radyoaktif maddeye maruz kalmayı engellemek için floresansla işaretleme daha fazla tercih edilmektedir (23, 154, 231-233).

Partiküler sistemler ile hücre etkileşiminin incelenmesini sağlayan en ideal yöntem *in vitro* hücre kültürüdür. *In vitro* hücre kültürü çalışmaları ile *in vivo* hayvan deneylerinde karşılaşılan, insan vücudunu taklit etme, yüksek maliyet, etik kurallara

uyuma gibi bir takım güçlükler bertaraf edilerek sağlıklı ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edilebilmektedir. Bu çalışmada, floresans özellik gösteren 5(6)-karboksifloressein (KF) ile nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan polivinilasetat (PVA) kovalan yolla bağlanmıştır. KF, sulu ortamda yüksek floresans etkinliğine sahip olması ve hem eksitasyon hem de emisyon dalga boylarının görünür alanda olması nedeniyle tercih edilmiştir. Sentezlenen floresans işaretli polimer (KF-PVA) kullanılarak hazırlanan nanopartiküllerin akciğer epitel hücreleriyle biyolojik etkileşimleri incelenmiştir.

Polivinilasetat (PVA), vinil asetat monomerinin serbest radikal vinil polimerizasyonu sonucunda meydana gelen amfilik özellikte ve biyouyumlu bir polimerdir. Yapısındaki alkol grupları polimere hidrofilik özellik kazandırırken, asetat grupları ise hidrofobik özellik vermektedir. Çalışmamızda kullandığımız PVA (%40) nın yapısında % 40 oranında hidrofilik alkol grupları bulunmaktadır.

Floresans işaretli PVA (KF-PVA) ilk kez bu çalışmada sentezlenmiştir. PVA nın KF ile işaretlenme reaksiyonu, KF nin karboksil grubu ile PVA nın alkol grubu arasında gerçekleştirilmiştir (Şekil 7). Sentezlenen KF-PVA kolon kromatografisi yardımı ile Sephadex LH-20 kullanılarak saflaştırılmıştır. Sephadex LH-20 öncelikle yüksek molekül ağırlıklı bileşiklerin kolondan ayrılmasını sağlar. Molekül ağırlığı azaldıkça maddelerin ayrılma süreleri de uzar. Düzgün bir ayırma işeminin yapılabilmesi için sentezde kullanılan her bir madde Sephadex LH-20 kolonda farklı çözücü karışımları kullanılarak fraksiyonlandırılmış ve çözücü olarak metanol:su (90:10 h/h) karışımı kullanıldığında en iyi ayırmanın gerçekleştiği görülmüştür. Kolona uygulanan polimer miktarının da ayırma işlemini etkilediği görülmüştür ve her bir işlemde en fazla 60 mg polimer uygulanmasının uygun olacağı sonucuna varılmıştır. Ayrıca KF-PVA kolondan ikinci kez geçirildiğinde elde edilen fraksiyonlarda serbest KF nin tesbit edilememesi ayırma işleminin etkinliği kanıtlamaktadır.

PVA ya bağlanan KF miktarını tayin etmek amacıyla literatürde kayıtlı olan konsantrasyon-ağırlık dönüştürme yöntemi kullanılmıştır (23). Bu amaçla ilk olarak saf KF nin ve KF-PVA nın florometrik yöntemle miktar tayini geliştirilmiştir. Saf KF miktar tayini için, KF nin N-metil-2-pirolidon:HBSS (75:25 h/h) karışımındaki çözeltilisinin (pH 8.5) 485/20 nm eksitasyon ve 530/25 nm emisyon dalga boylarında gösterdiği floresans şiddeti ölçülmüştür. Validasyon çalışmaları ile yöntemin doğrusallığı, kesinliği, doğruluğu ve seçiciliği araştırılmıştır. Kullanılan yöntemin

doğrusallığının yüksek olduğu determinasyon katsayısının 0,99 dan yüksek olması ile tespit edilmiştir. Kesinlik için yapılan çalışmalarda elde edilen gün içi ve günler arası değişim katsayısı % 2 den küçük bulunarak yöntemin kesinliği ispat edilmiştir. Yöntemin doğruluğu için geri kazanma değerinin istenen sınırlar (95,95-106,42) içinde olduğu belirlenmiştir (Tablo 5). Yöntemin seçiciliği için yapılan çalışmalarda nanopartikül formülasyonlarına giren yardımcı maddelerin, KF nin maksimum floresans gösterdiği 485/20 nm eksitasyon ve 530/25 nm emisyon dalga boylarında floresans vermediği ve miktar tayinini etkilemeyecekleri saptanmıştır. KF-PVA nin miktar tayininde ise yukarıda saf KF için belirtilen yöntem kullanılmıştır.

Sentezde kullanılan KF miktarının artırılması ile KF-PVA nin işaretleme etkinliği anlamlı derecede artmıştır ($p < 0,05$). 1:10 (a/a) KF:PVA oranı kullanılarak sentezlenen polimerin işaretlenme etkinliği % $0,07 \pm 0,02$ a/a olarak bulunurken, KF:PVA oranı 10 kat artırıldığında (1:1 a/a) işaretleme etkinliği de % $0,45 \pm 0,06$ a/a ya yükselmiştir. KF-PVA nin floresans işaretleme etkinliği, diğer araştırmacıların farklı polimerler kullanarak elde ettikleri floresansla işaretleme etkinliğine ait bulgular ile uyumludur (23). Bulgular ışığında hücre kültürü çalışmalarında kullanılacak nanopartiküllerin floresans şiddetini en üst seviyeye getirmek için, partiküllerin hazırlanmasında 1:1 (a/a) KF:PVA oranı kullanılarak sentezlenen floresans işaretli PVA kullanılmıştır.

Çalışmamızda kullanılan nanopartiküller, nanoçöktürme yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır (234). Nanoçöktürme, tek aşamalı nanopartikül hazırlama yöntemi olup, hızlı ve uygulaması kolay bir tekniktir. Bu yöntemde karşıt çözücü olarak stabilite arttırıcı madde içeren sulu çözeltiler kullanılmış ve nanopartiküller çöktürme suretiyle hazırlanmıştır. Hazırlanan partiküllerin boyutu polimerin fizikokimyasal özelliklerine, çözücü yer değiştirme hızına ve formülasyonda kullanılan stabilite arttırıcı maddelerin özelliklerine bağlı olarak değişir. Nanopartiküllerin karakterizasyonuna ait bulgular Şekil 31-62 ve Tablo 18-23 de verilmiştir. Formülasyonların verimi % 96-99 arasında bulunmuştur (Tablo 18). Nanopartiküllerin yüzey özellikleri kriyojenik transmisyon elektron mikroskopunda incelenmiş ve partiküllerin düzgün, küresel yüzeye sahip oldukları tespit edilmiştir (Şekil 31-36).

Ön formülasyon çalışmalarında, çözeltideki polimer konsantrasyonunun yükseltilmesine bağlı olarak partikül büyüklüğünün ve agregasyonunun artış gösterdiği

saptanmıştır. Polimer konsantrasyonu %2 den %4 e çıkarıldığında nanopartiküllerin boyutu yaklaşık %20 artış göstermiştir (Tablo 18). Polimer konsantrasyonu %4 ün üzerine çıkarıldığında, çözeltinin yüksek viskozitesine bağlı olarak homojen partiküllerin hazırlanabilmesi mümkün olmamıştır. Yüksek polimer konsantrasyonunun nanopartikül oluşumunu engellediği literatürde de kayıtlıdır (235). Organik faz:sulu faz oranı 1:10 dan 1:6 ya çıkarıldığında nanopartikül boyutunda anlamlı bir artış görülmemiştir ($p>0,05$) (Tablo 18). Hazırlanan nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklüğü 261,15 - 394,18 nm aralığında bulunmuştur (Tablo 18). Tüm formülasyonların homojen partikül boyutu dağılımına (polidispersite: 0.10-0.17) sahip olması nanopartikül hazırlama yönteminin etkinliğini ispatlamaktadır (Tablo 18). Elde edilen bulgular ışığında, % 1 oranında PVA içeren PVA-UL-F2 formülasyonu en ideal formülasyon olarak seçilmiş ve aynı formülasyon floresans işaretli PVA ile hazırlanarak partikül boyutu ve dağılımı incelenmiştir. PVA-UL-F2 ve PVA-L-F2 formülasyonlarının ortalama partikül boyutu sırasıyla $283,65\pm 4,51$ nm ve $297,33\pm 5,9$ nm olarak bulunmuştur. KF-PVA ile hazırlanan nanopartiküllerin (PVA-L-F2) boyutunda artış gözlenmesine rağmen bu artışın anlamlı olmadığı saptanmıştır ($p>0,05$) (Tablo 18).

DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek) teorisi, bir dispersiyondaki partiküller üzerindeki kuvvetin, elektrostatik itme ve van der Waals çekme kuvvetlerinden ileri geldiğini öne sürmektedir (236, 237). Bu prensibe göre partikül yüzeyindeki yüksek elektrostatik yük, partiküllerin birbirinden ayrılmasını ve dispersiyonun fiziksel stabilitesini arttırırken, van der Waals çekme kuvvetleri agregasyona neden olmaktadır (236). Çalışmamızda kullanılan nanopartiküllerin yüzeyindeki bu elektriksel tabakanın değerlendirilmesi zeta potansiyel ölçümüyle yapılmıştır. Nanopartikül formülasyonlarının yüzey yükü ölçümüne ait bulgular (Tablo 19 ve 20) de verilmiştir. PVA-UL-F2 ve PVA-L-F2 formülasyonlarının HBSS içindeki yüzey yükleri sırasıyla $1,89\pm 0,95$ mV ve $1,92\pm 3,76$ mV bulunmuştur. Floresans işaretli polimerin kullanılmasının nanopartiküllerin yüzey yüklerini etkilemediği görülmüştür.

Hücre kültürü çalışmalarında PVA-L-F2 formülasyonu ile bu formülasyonun mukayesesini yapabilmek amacıyla farklı partikül boyutlarına sahip karboksil grubu içeren (PS-C-50 ve PS-C-300) ve içermeyen (PS-NC-51 ve PS-NC-250) polistiren nanopartikülleri kullanılmıştır.

Nanopartiküler sistemlerin en büyük dezavantajlarından biri fizyolojik sıvılar içindeki düşük stabilitelere bağlı olarak değişime uğramalarıdır (238-240) Partikül boyutundaki azalmanın çözünmenin bir sonucu olduğu, artışın ise şişmeye veya agregasyona bağlı olduğu kabul edilmektedir (241). Hücrelerden nanopartikül geçişinin incelenebilmesi için partiküllerin hücre kültürü çalışma besiyerinden etkilenmemesi, partikül boyutu ve dağılımını koruyabilmesi önem taşımaktadır. Ancak hücre kültürü çalışma besiyerleri hücre tipine ve partikül-hücre etkileşimini incelemek için kullanılan yöntemle ilgili olarak değişiklik gösterir. Partiküllerin stabilitesine hücre kültürü çalışma besiyerinin etkisini incelemeksizin hücre içine alım, geçiş ve toksisite çalışmalarının yapıldığı bir çok makale bulunmaktadır (17, 242, 243) ve bu durum elde edilen bulguların sağlıklı bir şekilde karşılaştırılmasını engellemektedir. Yapılan farklı araştırmalarda karboksillenmiş veya aminlenmiş polistiren partiküllerinin alveol epitel hücreleri tarafından alımı arasındaki farklılık bulunmazken (17), diğer bir çalışmada benzer aminlenmiş polistiren nanopartiküllerinin primer sıçan alveol epitel hücrelerinden 30 kat fazla geçtiği bildirilmiştir (244). Bu farklı sonuçlar hücre kültürü besiyerinde ve tamponunda gerçek partikül büyüklüğü ve yükünün incelenmemesinden kaynaklanmaktadır. Çalışmamızda hücre kültürü çalışmaları için seçilen PVA-L-F2 formülasyonunun ve polistiren nanopartiküllerinin HBSS ve hücre kültürü çalışma besiyerindeki (%2 FBS içeren DMEM) 48 saat boyunca stabiliteyi incelenmiştir. Bu süre sonunda PVA-L-F2 nanopartiküllerinin partikül boyutu her iki çözelti içinde de anlamlı bir değişiklik göstermezken ($p>0,05$), polistiren içeren formülasyonların partikül boyutlarında büyük artışlar gözlenmiştir ($p<0,05$) (Tablo 22 ve 23).

Normal polistiren partikülleri ile karşılaştırıldığında, karboksillenmiş polistiren partikülleri yüzeylerindeki negatif yüklü karboksil grupları nedeniyle HBSS çözeltisi içinde daha düşük yüzey yüküne sahiptir (Tablo 20). Ancak hücre kültürü çalışma besiyeri içinde tüm polistiren partiküllerin zeta potansiyelleri anlamlı derecede yükselmiştir (Tablo 20). Nötral tuzlardan oluşan HBSS çözeltisi polistiren partiküllerin yüzey yüklerini etkilemezken, hücre kültürü çalışma besiyerinde bulunan pozitif yüklü amino asitler ve L- glutaminin negatif yüklü polistiren partikülleri ile kompleks oluşturduğu ve böylece partiküllerin yüzey yüklerini düşürdüğü varsayılmaktadır.

Ancak, ortamda bulunan elektrolitler nanopartiküllerin zeta potansiyellerini değiştirmemekle birlikte partikül agregasyonuna neden olabilmektedirler (236, 237).

Ortamda bulunan Na^+ , K^+ gibi tek değerlikli elektrolitlerin, partiküller tarafından kritik elektrolit konsantrasyonunun üzerinde adsorpsiyonu, partiküllerin hidrasyonunu artırır ve bu da adeziv kuvvetleri güçlendirir (245). Negatif yüklü polisitiren nanopartiküllerin HBSS çözeltisi içindeki agregasyonun nedeni de bu şekilde açıklanabilir. Çalışmamızda hazırladığımız çok düşük yüklü PVA nanopartikülleri ise hem HBSS hem de hücre kültürü besiyeri içinde mükemmel fiziksel stabilite göstermiştir.

Nanopartikül geçiş çalışmalarında nanopartikül miktarının tespit edilmesi amacıyla floresans içeren PVA ve PS nanopartiküllerinin miktar tayini fluorometrik yöntem kullanılarak yapılmıştır. Bu yöntemin validasyonu yapılarak, yöntemin doğrusalılığı, kesinliği, doğruluğu ve seçiciliği kanıtlanmıştır. Kullanılan yöntemin doğrusalığının yüksek olduğu korelasyon katsayısının 0,99 dan yüksek olması ile tespit edilmiştir. Kesinlik için yapılan çalışmalarda elde edilen değişim katsayısı değerinin %2-3 arasında bulunmasına dayanarak, yöntemin kesinliği ispatlanmıştır. Yöntemin doğruluğu için, geri kazanma değeri 92,88 - 102,61 sınırları içinde bulunmuştur.

Pulmoner yolla uygulanacak partiküllerin boyutu ve dağılımı, hidrofobisitesi, yüzey yükü, inkübasyon süresi gibi faktörler partiküllerin hedeflendirilmesini, hücre içine alımını, degradasyonunu ve vücuttan atılımını etkileyen önemli faktörlerdendir (216, 246-250). 3 μm den küçük partiküller alveolar bölgede derin kısımlarda toplanırken, daha büyük partiküller üst havayollarında birikir (251). 500 nm den büyük partiküller makrofajlar tarafından fagositoz ile hücre içine alınırken, daha küçük partiküller endositoza uğramaktadır. Ancak makrofajlar tarafından fagositoz genellikle partiküllerin vücuttan atılmasına sebep olur ve tercih edilmeyen bir durumdur (252, 253). Akciğerlerde terapötik etkinliğin sağlanabilmesi için, uygulanan ilacın fagositik olmayan akciğer hücreleri tarafından alımı önem taşımaktadır. Pulmoner ilaç uygulaması ile ilgili son yıllarda yapılan araştırmalar, ilacın etkinliğini arttıran ve yan etkilerini azaltan yeni taşıyıcı sistemler ile bu taşıyıcı sistemlerin akciğer epiteline yerleşmelerini takiben organizmada neye maruz kalacağını gösteren *in vitro* hücre kültürü modelleri üzerinedir.

Günümüzde solunum sistemi *in vitro* hücre kültürü modeli olarak A549 (insan alveol epitel hücresi) ve Calu-3 (insan bronş epitel hücresi) modelleri kullanılmaktadır (65). A549 hücre dizini, fosfolipidlerin sentezi, lamellar yapıların ve mikrovillilerin varlığı gibi alveol tip II hücrelerine benzerlikler taşımaktadır (254, 255). A549 hücre

kültürü modeli, alveol epitelinin aksine, zonula occludens (ZO)-1 gibi sıkı bağlantı noktası proteinlerini düşük oranda taşıması nedeniyle bir bariyer oluşturamaması, düşük transepitel elektrik dirence sahip olması ve bunlara bağlı olarak hücreler arası boşluklardan hidrofilik maddelerin yüksek oranda geçirmesi gibi dezavantajlarından dolayı partikül geçiş çalışmaları için uygun özelliklere sahip değildir. Bu nedenle hücreden geçiş çalışmaları için Calu-3 hücre modeli tercih edilmektedir (256).

Çalışmamızda hücreler kültür erleninde 37°C de ve %95 hava-%5 CO₂ ortamında üretilmiştir. Hücreler erlenin tabanında % 85-90 doygunluğa ulaştığında Calu-3 hücreleri 30 dakika, A549 hücreleri için ise 20 dakika % 0,25 tripsin-EDTA karışımı ile muamele edilerek tabandan ayrılmıştır. Tripin mavisi hücrelerin canlılığı kontrol edildikten sonra Neubauer Hemositometre ile yaşayan hücre sayısı tespit edilmiştir. Hücre kültürü çalışma besiyeri içeriğinin ve bileşimine konulan serum (FBS) miktarının hücre farklılaşması üzerinde anlamlı etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (138, 257). Bu nedenle, daha önceki çalışmaların bulgularına dayanarak Calu-3 kültürü için Dulbecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12 Ham (DMEM) ve A549 kültürü için Minimum Essential Medium (MEM) tercih edilmiş ve her iki besiyerine de %10 oranında FBS ilave edilmiştir.

Çalışmamızda kullanılan nanopartikül formülasyonlarının akciğer hücrelerinin (Calu-3 ve A549) yaşayabilirliğine etkisini araştırmak için *in vitro* toksisite testi (MTT) yapılmıştır. Bu yöntemde hücre yaşayabilirliği, mitokondriyal dehidrojenaz aktivitesinin ölçülmesiyle hesaplanmaktadır. Hücre yaşayabilirliğinin tayininde 0.1 – 10 mg/mL konsantrasyonlarda nanopartikül kullanılmıştır. PVA-L-F2 ve PVA-UL-F2 formülasyonları 2 mg/mL (Tablo 26 ve 27), içeriğindeki SDS in uzaklaştırılmasının ardından PS-C-50 ve PS-NC-250 polistiren partikülleri ise 5 mg/mL konsantrasyona kadar her iki hücre grubunun yaşayabilirliğine etki etmemiştir (Tablo 30 ve 31). Hücre içi alım ve geçiş çalışmalarında uygulanan konsantrasyona eşdeğer miktarda nanopartikül (5 mg/mL) kullanıldığında ise, PVA-L-F2 formülasyonu ile inkübe edilen Calu-3 ve A549 hücrelerinin yaşayabilirliği sırasıyla %68,40 ve %65,59 a düşmüştür. Ancak bu değer hücrelerin LD₅₀ değerinin altındadır. MTT testi sonucunda, PVA nanopartiküllerinin hazırlanmasında kullanılan stabilite artırıcı maddelerin (polivilpirolidon ve polivinilalkol), formülasyona eklendikleri konsantrasyonda (0,001 mg/mL) her iki hücre grubunun yaşayabilirliğine etkisinin bulunmadığı kanıtlanmıştır

(Tablo 32). Yöntemin etkinliğini kanıtlamak amacıyla, toksisitesi bilinen bakır nanopartiküllerinin diğer formülasyonların test edildiği her iki hücre grubuna etkileri incelenmiş ve çok düşük konsantrasyonlarda (40 µg/mL) bile hücre yaşayabilirliğinde belirgin azalmaya sebep olmuştur (Calu-3 için %0,45, A549 için %1,81) (Tablo 33).

In vivo koşulları mümkün olduğu kadar yakın bir şekilde yansıtabilmek için *in vitro* kültür edilmiş hücre tabakalarının bütünlüğünü en yüksek seviyede tutmak büyük önem taşımaktadır. Partiküllerin hücre geçişinin test edilebilmesi için yaşayan ve bütünlüğünü koruyan hücre tabakalarının kullanılması gereklidir (17, 257). Aynı zamanda hücrelerin aktif ve pasif transport mekanizmaları *in vivo* koşullara yakın fonksiyonellik göstermelidir (14, 258, 259). Nanopartikül geçiş çalışmalarına başlamadan önce Calu-3 hücre tabakasının transepitel elektrik direnci ve bu hücre tabakasından radyoaktif mannitol geçişi test edilerek hücre bütünlüğü saptanmıştır. Calu-3 hücreleri havayolu epitelinden geçiş çalışmaları için çok uygun bir modeldir (260). Calu-3 hücre kültürü modeli, sıkı bağlantı bölgesi, yüksek TER ve mukus salgısı gibi normal havayolu epitelinin tüm özelliklerini göstermektedir (14).

Hücre içi ya da hücreler arası permeabilityyi ölçmek için kullanılan en uygun metodlardan biri transepitel elektrik direncin (TER) ölçülmesidir. Hücrelerarası sıkı bağlantıları bölgelerinin iyon akışına gösterdiği direnç, hücre tabakasının direncini belirler ve hücre kültürü modelinin bütünlüğünü göstergesidir (147). Hücre tabakasının bütünlüğü hakkındaki kapsamlı bilgi, radyoaktif işaretli mannitol (18) sodyum floressein (17, 242) veya FITC-dekstran (261) gibi hidrofilik işaretleyicilerin hücre tabakalarının bir tarafından diğer tarafına geçişinin ölçülmesiyle elde edilmektedir. Calu-3 hücrelerinde tipik P_{app} değeri 10^{-7} cm.sn⁻¹ civarındadır (9, 147). Son yıllarda Calu-3 hücreleri ile yapılan çalışmalarda, hava-sıvı arayüzeyinde kültürü yapılan hücrelerin diğer hücre kültürü yöntemleri ile üretilenlere göre *in vivo* koşulları daha iyi taklit ettiği bildirilmiştir (113, 262). Lee ve arkadaşları (152), hava-sıvı arayüzeyinde kültür edilen insan nazal epitel hücrelerinin iki hafta sonra oluşumunu tamamlamış silli bir yapı kazanırken, sıvı vasata daldırılan koşulda kültür edilen hücrelerin sağlıklı düz bir yapı oluşturduklarını bildirmişlerdir. Hava-sıvı arayüzey kültür koşulunda, *in vivo* koşullara benzer şekilde yüksek oksijen tüketimi imkanına bağlı olarak silli hücreler ile bazal ve goblet hücreleri aynı oranda oluşurken, sıvıya daldırılmış kültür koşullarında silli hücreler baskındır (263). Hava-sıvı arayüzey, mukus üreten glikoproteinlerin baskın

şekilde bulunduğu farklılaşmış bir hücre dizini elde edilmesini sağlayan bir kültür koşuludur (134). Hava-sıvı arayüzey koşulunda kültür ile oluşan yarı-kuru akciğer epitel hücreleri, partikül yerleşme ve geçiş çalışmaları için en ideal seçenektir (11). Bu üstünlükler nedeniyle, çalışmamızda Calu-3 hücreleri hava-sıvı ara yüzeyinde kültür edilmiştir.

Hücre ekim yoğunluğu da hücre bütünlüğünü etkileyen önemli faktörlerden biridir. Yüksek ekim yoğunluğu hücrelerin çoklu tabakalar oluşturmalarına neden olurken, düşük yoğunlukta ise hücreler arası sıkı bağlantı bölgelerinin oluşumu yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle kültürü yapılan hücrelerin ekim yoğunlunun optimize edilmesi önem taşımaktadır.

Havayolu epitel hücre dizinleri 10^5 - 10^6 hücre/mL yoğunluğunda ekildiklerinde ideal morfolojik özellikler göstermektedir (136, 138, 139). Çalışmamızda da 10^6 dan yüksek yoğunlukta ekim yapıldığında hücrelerin çoklu tabaka oluşturma eğiliminde olduğu gözlenmiş ve hücre kültürü 2.24×10^5 hücre/mL yoğunluğunda yapılmıştır.

Hücre tabakası morfolojisinin ve taşıyıcı protein ekspresyonunun hücre kültürü süresi tarafından etkilendiği bilinmektedir (135, 264, 265). Bu bağlamda, hücrelerin tam olarak farklılaşma sürecini tamamlaması için, radyoaktif mannitol geçiş ve nanopartikül geçiş çalışmaları Calu-3 hücrelerinin ekimini takiben 9-11 gün sonrasında yapılmıştır. Hücreler, bu süreni altında inkübe edildiğinde hücre dizini istenen doygunluğa ulaşmazken, bu süreni üstünde çok tabakalı bir oluşum gözlenmiştir.

Hücre epitelinin elektrik direncinin geriye dönüşümlü olması hücrenin tek bir tabaka olarak tüm yapısını koruduğunu kanıtlamaktadır. Bu nedenle, hücrelerin nanopartiküllerle ilk temasta gösterdiği TER değerlerinin deney sonunda da elde edilmesi önem taşımaktadır. Çalışmamızda, nanopartikül uygulanmasından 240 dakika sonra ölçülen Calu-3 TER değerleri, ilk uygulama esnasında alınan TER değerlerinin % 90 -100 üne ulaşmıştır (Tablo 41). Tüm nanopartikül formülasyonlarının uygulanmasını takiben Calu-3 TER değerlerinde belirgin bir değişiklik gözlenmemesi, partiküllerin hücre bütünlüğünü bozmadığını ispatlamıştır (Şekil 82-87; Tablo 34-38).

Hücre bütünlüğünün tayini için ayrıca hücreler arasından radyoaktif işaretli mannitol geçişi incelenmiştir. Çalışmamızda ölçülen ortalama görünen geçiş değeri (P_{app}) $2,08 \times 10^{-7}$ (cm/sn) – $3,92 \times 10^{-7}$ cm/sn arasında bulunmuştur (Şekil 88-93 ve

Tablo 42-47). Sadece PS-C-300 formülasyonunun manitol geçişi üzerine etkisi tespit edilmiştir. Formülasyon uygulandığında Calu-3 hücreleri manitol P_{app} değerini % 68,2 ye düşürmüştür (Tablo 48). Formülasyonun, manitol geçişini etkilerken TER değerini değiştirmemesi, PS-C-300 partiküllerinin hücre gelişimini etkilemediğini göstermiştir. Mannitol geçiş çalışmalarında kullanılan HBSS içinde yapılan partikül boyutu tayinleri sonucunda, PS-C-300 formülasyonunun yüksek oranda agregasyona uğradığı tespit edilmiştir (Tablo 23). Oluşan agregatların mannitole etkileşime girerek hücre tabakaları boyunca manitol akışını azalttığı sonucuna varılmıştır.

PVA ve PS içeren nanopartikül formülasyonları hücre yaşayabilirliğini önemli oranda etkilememiştir. Hücrelerin TER değerlerinin yüksek olması ve yüksek oranda radyoaktif manitol geçişine izin vermesi ise nanopartiküllerin muamele edildikleri hücrelerin bütünlüğünü değiştirmedeğini ispatlamıştır. Bu sonuçlar Calu-3 hücrelerinin nanopartikül geçiş çalışmaları için uygun olduğunu göstermiştir.

Nanopartikül geçiş çalışmaları için kullanılan Transwell hücre kültürü destek membranının partiküllerin geçişi için bir bariyer oluşturup oluşturmadığını test etmek amacıyla 0,4 μm , 1 μm ve 3 μm gözenek boyutuna sahip, üzerine hücre ekilmemiş Transwell lerden geçiş çalışmaları yapılmıştır. 3 μm gözenek boyutuna sahip Transwell lerden tüm formülasyonların geçişi yüksek bulunurken, 1 μm den sadece PS-NC-51 (% 61,5 \pm 4,95) ve PVA-L-F2A (%43,55 \pm 0,64) formülasyonları yüksek oranda geçiş yapmıştır. 0.4 μm Transwell membrandan partiküllerin geçişlerinin düşük olması, büyük porlara sahip 3 μm lik membranın ise hücre sızmasına yol açması (17) nedeniyle 1 μm lik membran, hücre kültürü destek membranı olarak seçilmiştir. Duff ve ark. (266) da, por büyüklüğü 3 μm ve daha büyük olan Transwell membranların üzerine ekilmiş Calu-3 hücrelerinin bazolateral kompartmana geçerek bu bölümde biriktiğini bildirmişlerdir.

Calu-3 hücrelerinden 4, 8 ve 24 saat sonunda nanopartiküllerin geçişleri incelenmiş ve 24 saat sonunda 51 nm partikül boyutuna sahip PS-NC-51 (%50,86 \pm 2,83) ve bu çalışmada hazırlanan ve 297,30 nm partikül boyutuna sahip PVA-L-F2A (%32,75 \pm 2,32) formülasyonları Calu-3 hücre tabakasından en yüksek geçiş gösteren formülasyonlar olmuştur. PVA-L-F2A ile benzer partikül boyutuna sahip karboksillenmiş (PS-C-300) ve karboksillenmemiş (PS-NC-250) polistiren nanopartiküllerinin geçişleri ise sırasıyla %17,97 \pm 0,43 ve %9,33 \pm 1,62 olarak

bulunmuştur ve bu değerler PVA-L-F2A formülasyonuna göre anlamlı derecede düşüktür ($p < 0,05$). *In vitro* hücre ortamından nanopartikül geçiş çalışmaları, PVA ile hazırlanan partiküllerin pulmoner yolla ilaç taşıyıcı olarak kullanılmasının aynı boyuta sahip polistiren partiküllere göre daha elverişli olduğunu göstermiştir.

Nanopartiküllerin akciğer hücrelerine alım çalışmaları konfokal lazer taramalı mikroskop ile yapıldı. Odak dışı sinyalleri red ederek yüksek çözünürlükte görüntü alınmasını, kalın tabakaların optik olarak dilimlenmesini ve üç boyutlu yapılandırılmasını sağlaması konfokal lazer mikroskopunun en önemli avantajlarıdır (232, 233). Konfokal numunelerini hazırlamak üzere hücrelerin iki farklı koşulda kültürü yapılmıştır. Calu-3 hücreleri hem hava-sıvı arayüzey hem de daldırılmış kültür koşullarında üretilirken, A549 hücrelerinin üretimi sadece daldırılmış kültür koşullarında yapılmıştır.

Hava-sıvı ara yüzeyi kültür koşulları kullanıldığında hücreler Transwell membranlar üzerinde üretilmiştir. Ancak bu yöntem hücre içi alım çalışmalarında bazı dezavantajlar getirmiştir. Konfokal hücre membran boyasının lipofilik karakterde olması nedeniyle aynı özellikteki Transwell membranını boyanması, mikroskop ile iyi görüntü alınmasını engellemiştir. Ayrıca hava-sıvı ara yüzeyinde çok fazla mukus üretimi nedeniyle floresans içeren nanopartiküllerin hücre ile temasını kesen bir bariyer oluşmuş ve mukusun giderilmesi için ek işlemler uygulanmıştır. Bu nedenle yukarıdaki olumsuzlukları gidermek için daldırılmış kültür koşullarında hücre üretiminin daha uygun olacağı düşünülmüştür. Bu yöntemde hücreler lipofilik boya ile etkileşmeyen cam lameller üzerinde üretilirken mukus üretimi de daha az görülmüştür. Daldırılmış kültür koşulları kullanılarak üretilen hücreler ile yapılan hücre içi alım çalışmaları sonucunda konfokal görüntülerinin çok daha anlaşılabilir olduğu görülmüştür.

Hava-sıvı ara yüzeyinde kültürü yapılan Calu-3 hücrelerinin ürettiği mukusun uzaklaştırılması için hücrelerin HBSS ile yıkanmış ancak başarılı olunamamıştır. Bunun üzerine hücrelerin üretildiği Transwell hücre destek membranının bir tarafından yıkama sıvısı olarak HBSS gönderilirken, karşı tarafta toplanan sıvı vakum yardımı ile hücre yüzeyine dokunmaksızın uzaklaştırılmıştır. Böylece hem mukus hem de membrana tutunamamış hücreler ortamdan uzaklaştırılmıştır. Daha sonra hücreler formaldehitte sabitlendikten sonra % 0,01 (h/h) Triton X-100 ile muamele edilmiş ve yıkama ile uzaklaştırmayan tüm mukus kalıntısı giderilmiştir.

Nanopartiküllerin floresans gösteren boyalar ile işaretlenerek hücre içine alımı, hücre içi davranışının incelenmesi mümkündür. Çalışmamızda, hücre içi bölgeyi, hücre dışı bölgeden ayırmak üzere membran boyası olarak kırmızı floresans gösteren FM[®] 4-64FX kullanılmıştır. FM boya hücreler üzerine toksik olmayan, sulu fazda floresans yaymadan hücre yüzey membranında floresans özellik gösteren maddelerdir. Hücre içinde gözlenen yeşil kümeler partiküllerin hücre içine alındıklarına işaret etmektedir. Hücre yüzeyinde biriken partiküller ise kırmızı boyalı hücre membranı ile yeşil renkli partiküllerin üst üste gelmesi nedeniyle sarı noktalar halinde görülür.

PVA nanopartiküllerinin floresansla işaretlenmiş oldukları konfokal mikroskop görüntüleri ile kanıtlanmıştır (Şekil 110, 112, 128, 140, 142). Konfokal mikroskop görüntülerinin incelenmesinde, 50 nm büyüklükte negatif yüklü PS-C-50 nanopartiküllerin küçük bir kısmının hücre içine alındığı görülmüştür (Şekil 100-102 ve Şekil 113-116). Her iki hücre grubu ile yapılan çalışmalarda 250 nm boyutundaki polistiren nanopartikülleri büyük oranda hücre membranında birikirken, 300 nm büyüklüğündeki polistiren partiküllerin yüksek oranda agregasyona uğradığı gözlenmiştir. Floresans işaretli PVA nanopartiküllerinin A549 hücreleri üzerindeki birikimi Calu-3 hücrelerine göre daha fazladır. Ancak nanopartiküllerin hücre içine alımı ise çok düşük oranda gerçekleşmiştir (Şekil 112, 140, 142).

Çalışmamız, PVA dan farklı başka polimerler kullanılarak hazırlanan partiküler sistemlerin floresansla işaretleme suretiyle hücre kültürü ortamıyla biyolojik etkileşimlerinin değerlendirildiği diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında benzer bulgulara rastlanılmıştır. Kitozan nanopartiküllerinin, FITC ile % 2,7 (a/a) etkinlikte işaretlendiği bir çalışmada, partiküllerin serbest kitozan moleküllerine kıyasla A549 hücreleri içine daha yüksek oranda alındıkları bildirilmiştir (23). Grenha ve arkadaşları (242), FITC-BSA ile yüklenmiş, biyoyumlu, partikül büyüklüğü 300-380 nm olan kitozan nanopartiküllerinin, konfokal mikroskop incelemeleri sonucunda Calu-3 ve A549 hücre yüzey membranlarında yoğun olarak izlenmelerine bağlı olarak hücre membranı ile etkileştikleri ancak hücre içine alınmadıkları sonucuna varmışlardır. Floresan işaretli yüzeyinde katyonik fonksiyonel gruplar taşıyan nanopartiküllerin konfokal lazer taramalı mikroskop ve transmisyon elektron mikroskop ile incelendiği diğer bir çalışmada, hücre içine alımı etkileyen en önemli faktörün yüzey yükü olduğu bildirilmiştir (154).

Floresansla işaretli PVA polimerinin başarıyla sentezlenmesi, bu polimer kullanılarak nanopartiküllerin hazırlanması ve polistiren nanopartikülleri ile mukayeseli olarak akciğer hücrelerindeki davranışlarının araştırılmasına dayalı olan çalışmamız, ilaç yüklü PVA nanopartiküllerinin yaygın akciğer hastalıklarındaki (kronik obstrüktif akciğer hastalığı, sistik fibrozis, tüberküloz vb.) tedavi etkinliğinin incelenmesi için uygun bir zemin oluşturmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Kim S, Lim YS, Solyesz EG, De Grand AM, Lee J, Nakayama A. Near infrared fluorescent type II quantum dots for sentinel lymph node mapping. *Nat Biotechnol* 2004; **22**: 92-97.
2. Jani PU, Florence AT, Maccarthy DE. Further histological evidence of the gastrointestinal absorption of polystyrene NPs in the rat. *Int J Pharm* 1992; **84**: 245-252.
3. Oberdorster G, Finklestein JN, Johnston C, Gelein R, Cox C, Baggs RM. Acute pulmonary effects of ultrafine particles in rats and mice. *Res Rep Health Eff Inst* 2000; **96**: 5-74.
4. Brzoska M, Langer K, Coester C, Loitsch S, Wagner TOF, Mallinckrodt CV. Incorporation of biodegradable NPs into human airway epithelium cells-*in vitro* study of the suitability as a vehicle for drug or gene delivery in pulmonary diseases. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **318**: 562-570.
5. Pandit S, Martin C, Alpar HO. Positively charged rifampicin-loaded microspheres for lung delivery. *J Drug Del Sci Tech* 2005; **15**: 281-287.
6. Dailey LA, Schmehl T, Gessler T, Wittmar M, Grimminger F, Seeger W, Kissel T. Nebulization of biodegradable NPs: impact of nebulizer technology and NP characteristics on aerosol features. *J Control Rel* 2003; **86**: 131-144.
7. Farokhzad OC, Langer R. Nanomedicine: Developing smarter therapeutic and diagnostic modalities. *Adv Drug Del Rev* 2006; **58**: 1456-1459.
8. Gonda I. The ascent of pulmonary drug delivery. *J Pharm Sci* 2000; **89**: 940-945.
9. Steimer A, Haltner E, Lehr CM. Cell culture models of the respiratory tract relevant to pulmonary drug delivery. *J Aerosol Medicine* 2005; **18**: 137-182.
10. Mathias NR, Yamashita F, Lee VHL. Respiratory epithelial cell culture models for evaluation of ion and drug transport. *Adv Drug Del Rev*, 1996; **22**: 215-249.

11. Sakagami M. *In vivo*, *in vitro* and *ex-vivo* models to assess pulmonary absorption and disposition of inhaled therapeutics for systemic delivery. *Adv Drug Del Rev* 2006; **58**: 1030-1060.
12. Rogers AW, editor. *Cells and tissues: An introduction to histology and cell biology*. New York, NY: Academic Press; 1983.
13. Ehrhardt C, Kneuer C, Bies C, Lehr CM, Kim KJ, Bakowsky U. Salbutamol is actively absorbed across human bronchial epithelial cell layers. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 2005; **18**: 165-170.
14. Florea BI, Cassara ML, Junginger HE, Borchhard G. Drug transport and metabolism characteristics of the human airway epithelial cell line Calu-3 *J Control Rel* 2003; **87**: 131-138.
15. Foster KA, Avery ML, Yazdanian M, Audus KL. Characterization of the Calu-3 cell line as a tool to screen pulmonary drug delivery. *Int J Pharm* 2000; **208**: 1-11.
16. Grainger CL, Greenwell LL, Lockley DJ, Martin GP, Forbes B. Culture of Calu-3 cells at the air interface provides a representative model of the airway epithelial barrier. *Pharm Res* 2006; **23**: 1482-1490.
17. Geys J, Coenegrachts L, Vercammen J, Engelborghs Y, Nemmar A, Nemery B, Hoet PHM. *In vitro* study of the pulmonary translocation of NPs A preliminary study. *Toxicology Letters* 2006; **160**: 218-226.
18. Manford F, Tronde A, Jeppsson AB, Patel N, Johansson F, Forbes B. Drug permeability in 16HBE14o- airway cell layers correlates with absorption from the isolated perfused rat lung. *Eur J Pharm Biopharm* 2005; **26**: 414-420.
19. Nemmar A, Vanbilloen H, Hoylaerts MF, Hoet PH, Verbruggen A, Nemery B. Passage of intratracheally instilled ultrafine particles from the lung into the systemic circulation in hamster. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; **164**: 1665-1668.
20. Cartier, R, Kaufner, L, Paulke, BR, Wustneck, R, Pietschmann, S, Michel, R, Bruhn, H and Pison, U. Latex nanoparticles for multimodal imaging and detection *in vivo*. *Nanotechnology* 2007; **18**: 1-12.

21. Wang F, Tan WB, Zhang Y, Fan X, Wang M, Luminescent nanomaterials for biological labelling. *Nanotechnology* 2006; **17**: R1-R13.
22. Hiraku O, Yoshiharu M. Biodegradation and distribution of water-soluble chitosan in mice. *Biomaterials* 1999; **20**: 175-182.
23. Huang M, Ma Z, Khor E, Lim LY. Uptake of FITC-chitosan NPs by A549 cells. *Pharm Res* 2002; **19**: 1488-1494.
24. Elmas B, Tuncel M, Yalçın G, Şenel S, Tuncel A. Synthesis of uniform, fluorescent poly(glycidyl methacrylate) based particles and their characterization by confocal laser scanning microscopy. *Colloids and Surfaces A: Physicochem Eng Aspects* 2005; **269**: 125-134.
25. Hitzman CJ, Wattenberg LW, Wiedmann TS. Pharmacokinetics of 5-fluorouracil in the hamster following inhalation delivery of lipid-coated nanoparticles. *J Pharm Sci* 2006; **95**: 1196-1211.
26. Weiss B, Schaefer UF, Zapp J, Lamprecht A, Stallmach A, Lehr CM. Nanoparticles made of fluorescence-labelled poly(L-lactide-co-glycolide): preparation, stability and biocompatibility. *J Nanosci Nanotech* 2006; **6**: 3303-3309.
27. Health and Safety Executive, Health effects of particles produced for nanotechnologies; HSE Hazard assessment document EH75/6, December 2004
28. Reis CP, Neufeld, RJ, Ribeiro, AJ, Veiga, F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric NPs. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 2006; **2**: 8-21.
29. Rowe RC, Sheskey PJ, Weller PJ, editorler. Polyvinyl Alcohol, İçinde *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. Bath, Great Britain: Pharmaceutical Press (PhP); 2003. pp. 491-492.
30. Li JK, Wang N, Wu XS. Poly(vinyl alcohol) NPs prepared by freezing-thawing process for protein/peptide drug delivery. *J Control Rel* 1998; **56**: 117-126.
31. Hyon SH, Cha WI, Ikada Y, Kita M, Ogura Y, Honda Y. Poly(vinyl alcohol) hydrogels as soft contact lens material. *J Biomater Sci Polym Ed* 1994; **5**: 397-406.

32. Thanoo BC, Sunny MC, Jayakrishnan A. Controlled release of oral drugs from cross-linked polyvinyl alcohol microspheres. *J Pharm Pharmacol* 1993; **45**: 16-20.
33. Ficek BJ, Peppas NA. Novel preparation of poly(vinylalcohol) microparticles without crosslinking agent for controlled drug delivery of proteins. *J Control Rel* 1993; **27**: 259-264.
34. Yıldırım M. *İnsan Anatomisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 1997. pp. 169-184.
35. Thibodeau GA, Patton KT. *Anatomy & Physiology* St. Louis, US. Mosby; 2003. pp.695.
36. Taylor K. Pulmonary Drug Delivery. İçinde Aulton ME, editor. *Pharmaceutics the Science of Dosage Form Design*. London, UK: Churchill Livingstone; 2002. pp. 473-488.
37. Tyler NK, Hyde DM, Hendrickx, AG, Plopper CG. Cytodifferentiation of two epithelial populations of the respiratory bronchiole during fetal lung development in the rhesus monkey. *Anat Rec* 1989; **225**: 297-309.
38. Evans MJ, Van Winkle LS, Fanucchi MV, Plopper CG. Cellular and molecular characteristics of basal cells in airway epithelium. *Exp Lung Res*, 2001; **27**: 401-415.
39. Hickey AJ, Thompson DC. Physiology of the airways. İçinde Hickey AJ, editor. *Pharmaceutical Inhalation Aerosol Technology*. New York, NY: Marcel Dekker; 1992. pp 1-27.
40. Wan H, Winton HL, Soeller C, Stewart GA, Thompson PJ, Gruenert DC, Cannell MB, Garrod DR, Robinson C. Tight junction properties of the immortalized human bronchial epithelial cell lines Calu-3 and 16HBE14o-. *Eur Respir J* 2000; **15**: 1058-1068.
41. Ma J, Bhat M, Rojanasakul Y. Drug metabolism and enzyme kinetics in the lung. İçinde Hickey AJ, editor. *Inhalation Aerosols: Physical and Biological Basis for Therapy*. New York, NY: Marcel Dekker; 1996. pp 155-196.

42. Taylor G, Kellaway I. Pulmonary drug delivery. İçinde Hillery AM, Lloyd AW, Swarbrick J, editorler. *Drug Delivery and Drug Targeting*. London, UK: Taylor&Francis; 2001. pp 269-300.
43. Mobley C, Hochhaus G. Methods used to assess pulmonary deposition and absorption of drugs. *Drug Discov Today* 2001; **6**: 367-375.
44. Mason RJ, Crystal RG. Pulmonary cell biology. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; **157**: S72-S81.
45. Lansley AB. Mucociliary clearance and drug delivery via the respiratory tract. *Adv Drug Del Rev* 1993; **11**: 299-327.
46. Patton JS. Mechanisms of macromolecule absorption by the lungs. *Adv Drug Del Rev* 1996; **19**: 3-36.
47. Labiris NR, Dolovich MB. Pulmonary drug delivery. Part I: Physiological factors affecting therapeutic effectiveness of aerosolized medications. *Br J Clin Pharmacol* 2003; **56**: 588-599.
48. Samet JM, Cheng PW. The role of airway mucus in pulmonary toxicology. *Environ Health Perspect* 1994; **102** Suppl 2: 89-103.
49. Stone KC, Mercer RR, Gehr P, Stockstill B, Crapo JD. Allometric relationships of cell numbers and size in the mammalian lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992; **6**: 235-243
50. Taylor G. The absorption and metabolism of xenobiotics in the lung. *Adv Drug Del Rev* 1990; **5**: 37-61.
51. Yost GS. Sites of metabolism in the lung. İçinde Woolf TF, editor. *Handbook of Drug Metabolism*. New York, NY: Marcel Dekker; 1999. pp 263-278.
52. Roth RA, Wiersma DA. Role of the lung in total body clearance of circulating drugs. *Klin Pharmacokinet* 1979; **4**: 355-367.
53. Yang X, Ma JK, Malanga CJ, Rojanasakul Y. Characterization of proteolytic activities of pulmonar alveolar epithelium. *Int J Pharm* 2000; **195**: 93-101.
54. Wall DA, Lanutti AT. High levels of exopeptidase activity are present in rat and canine bronchoalveolar lavage fluid. *Int J Pharm* 1993; **97**: 171-181.

55. Gansslen M. Über Inhalation von Insulin. *Klin Wochenschrift* 1925; **4**: 71.
56. Brown RA, Jr. Schanker LS. Absorption of aerosolized drugs from the rat lung, *Drug Metab Dispos* 1983; **11**: 355-360.
57. Byron PR, Patton JS. Drug delivery via the respiratory tract. *J Aerosol Med* 1994; **7**: 49-75.
58. Dalby R, Suman J. Inhalation therapy: technological milestones in asthma treatment. *Adv Drug Del Rev* 2003; **55**: 779-791.
59. Byron PR, Sun Z, Katayama H, Ryapacek F. Solute absorption from the airways of the isolated rat lung. 4. mechanisms of absorption of fluorophore-labeled Poly-Alpha, Beta –[N(2-Hydroxyethyl)-D,L-Aspartamide]. *Pharm Res* 1994; **11**: 221-225.
60. Niven RW, Whitcomb KL, Shaner L, Ip AY, Kinstler OB. The pulmonary absorption of aerosolized and intratracheally instilled rhG-CSF and monoPEGylated rhG-CSF. *Pharm Res* 1993; **12**: 1343- 1349.
61. Rudolph C, Schillinger U, Ortiz A, Plank C, Golas MM, Sander B, Stark H, Rosenecker J, Aerosolized nanogram quantities of plasmid DNA mediate highly efficient gene delivery to mouse airway epithelium. *Mol Ther* 2005; **12**: 493-501.
62. Okuno Y, Ueda S, Hosai H, Kitawaki T, Nakamura K, Chiang TP, Okabe S, Onaka M, Toyoshima K, Studies on the combined use of killed and live measles vaccines II. Advantages of the inhalation method. *Biken J* 1965; **8**: 81-85.
63. Hosai H, Yamanishi K, Ueda S, Minekawa Y, Ogino T. Studies on live attenuated mumps virus vaccine.1. Attenuation of mumps virus by serial passage in the chorioallantoic cavity of developing chick embryos and field trials by the inhalation method. *Biken J, J Res Ins Microbial Diseases* 1970; **13**: 121-126.
64. Menzel M, Muellinger B, Weber N, Haeussinger K, Ziegler-Heitbrock L, Inhalative vaccination with pneumococcal polysaccharide in healthy volunteers. *Vaccine* 2005; **23**: 5113-5119.
65. Forbes B, Ehrhardt C. Human respiratory epithelial cell culture for drug delivery applications. *Eur J Pharm Biopharm* 2005; **60**: 193-205.

66. Artursson P, Palm K, Luthman K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical prediction of drug transport. *Adv Drug Deliv Rev* 1996; **22**: 67-84.
67. Wakefield ID, Pollard C, Redfern WS, Hammond TG, Valentin JP. The application of *in vitro* methods to safety pharmacology. *Fundam Clin Pharmacol* 2002; **16**:209-218.
68. Chander A. Regulation of lung surfactant secretion by intracellular pH. *Am J Physiol* 1989; **257**: L354-L360.
69. Berg MM, Kim KJ, Lubman RL. Hydrophilic solute transport across rat alveolar epithelium. *J Appl Physiol* 1989; **66**: 2320-2327.
70. Parpala-Sparman T, Paakko P, Kortteinen, P. Closed-circuit organ perfusion technique for gene transfer into the lungs. An experimental trial on farm pigs. *Eur J Clin Invest* 2001; **31**: 264-271.
71. Ehrhardt C, Kneuer C, Fiegel J. Influence of apical fluid volume on the development of functional intercellular junctions in the human epithelial cell line 16HBE14o-: implications for the use of this cell line as an *in vitro* model for bronchial drug absorption studies. *Cell Tissue Res* 2002; **308**: 391-400.
72. Hay RJ, Williams CD, Macy ML. Cultured cell lines for research on pulmonary physiology available through the American type culture collection. *Am Rev Respir Dis* 1982; **125**: 222-232.
73. Hidalgo IJ, Raub TJ, Borchartt RT. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* 1989; **96**: 736-749.
74. Artursson P. Epithelial transport of drugs in cell culture. I: A model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive (Caco-2) cells. *J Pharm Sci* 1990; **79**: 476-482.
75. Artursson P, Karlsson J. Correlation between oral-drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; **175**: 880-885.
76. Chantret I, Barbat A, Dussaulx E, Brattain MG, Zweibaum A. Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human

- colon carcinoma cells: a survey of twenty cell lines. *Cancer Res* 1998; **48**: 1936-194.
77. Grasset E, Pinto M, Dussaulx E, Zweibaum A, Desjeux JF. Epithelial properties of human colonic carcinoma cell line Caco-2: electrical parameters. *Am J Physiol* 1984; **247**: C260-C267.
78. Fogh J, Fogh JM, Orfeo T. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Instl* 1977; **59**: 221-226.
79. Pinto M, Robine-Leon S, Appay M, Kedinger M, Triadou N, Duassaulx E, Lacroix B, Simon-Assmann P, Haffen K, Fogh J, Zweibaum A. Enterocyte-like differentiation and polarisation of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol Cell* 1982; **54**: 89-92.
80. Quaroni A, Hochman J. Development of intestinal cell culture models for drug transport and metabolism studies. *Adv Drug Deliv Rev* 1996; **22**: 3-52.
81. Stormer E, Perloff MD, Von Moltke LL, Greenblatt DJ. Methadone inhibits rhodamine123 transport in Caco-2 cells. *Drug Metab Dispos* 2001; **29**: 954-956.
82. Tavelin S. New approaches to studies of paracellular drug transport in intestinal epithelial monolayers, PhD Thesis, Uppsala University, 2003.
83. Tronde A, Norden B, Jeppsson AB, Brunmark P, Nilsson E, Lennernas H, Bengtsson UH. Drug absorption from the isolated perfused rat lung-correlations with drug physicochemical properties and epithelial permeability. *J Drug Target* 2003; **11**: 61-74.
84. Tronde A, Norden B, Marchner H, Wendel AK, Lennernas H, Bengtsson UH. Pulmonary absorption rate and bioavailability of drugs *in vivo* in rats: Structure-absorption relationships and physicochemical profiling of inhaled drugs. *J Pharm Sci* 2003; **92**: 1216-1233.
85. Irvine JD, Takahashi L, Lockhart K, Cheong J, Tolan JW, Selick HE, Grove JR. MDCK (Madin-Darby canine kidney) cells: A tool for membrane permeability screening. *J Pharm Sci* 1999; **88**: 28-33.

86. Forbes B. Human airway epithelial cell lines for *in vitro* drug transport and metabolism studies. *Pharm Sci Technol Today* 2000; **3**: 18-27.
87. Schneeberger EE. Structural basis for some permeability properties of the air—blood barrier. *Fed Proc* 1978; **37**: 2471-2478.
88. Schneeberger EE, Hamelin M. Interaction of serum proteins with lung endothelial glycocalyx: its effect on endothelial permeability. *Am J Physiol* 1984; **247**: H206-H217.
89. Elbert KJ, Schafer UF, Schafers HJ, Kim KJ, Lee VHL, Lehr CM. Monolayers of human alveolar epithelial cells in primary culture for pulmonary absorption and transport studies. *Pharm Res* 1999; **16**: 601-608.
90. Crapo JD, Barry BE, Gehr P, Bachofen M, Weibel ER. Cell number and cell characteristics of the normal human lung. *Am Rev Respir Dis* 1982; **126**: 332-337.
91. Fehrenbach H. Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited. *Respir Res* 2001; **2**: 33-46
92. Kobayashi S, Kondo S, Juni K. Permeability of peptides and proteins in human cultured alveolar A549 cell monolayer. *Pharm Res* 1995; **12**: 1115-1119.
93. Wang Z, Zhang Q. Transport of proteins and peptides across human cultured alveolar A549 cell monolayer. *Int J Pharm* 2004; **269**: 451-456.
94. Kim KJ, Borok Z, Crandall ED. A useful *in vitro* model for transport studies of alveolar epithelial barrier. *Pharm Res* 2001; **18**: 253-255.
95. Kreda SM, Gynn MC, Fenstermacher DA, Boucher RC, Gabriel SE. Expression and localization of epithelial aquaporins in the adult human lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; **24**: 224-234.
96. Steimer A, Laue H, Haltner-Ukomado E, Lehr CM. Porcine alveolar epithelial cells in primary culture: morphological, bioelectrical and immunocytochemical characterization. *Pharm Res* 2006; **23**: 2078-2093.

97. Blickwede M, Borlak J. Isolation and characterization of metabolically competent pulmonary epithelial cells from pig lung tissue. *Xenobiotica* 2005; **35**: 927-941.
98. Steimer A, Franke H, Haltner-Ukomado E, Laue M, Ehrhardt C, Lehr CM. Monolayers of porcine alveolar epithelial cells in primary culture as an *in vitro* model for drug absorption studies. *Eur J Pharm Biopharm* 2007; **66**: 372-382.
99. Reddel RR, Ke Y, Gerwin BI, Mcmenamin MG, Lechner JF, Su RT, Brash DE, Park JB, Rhim JS, Harris CC. Transformation of human bronchial epithelial cells by infection with SV40 or adenovirus-12 SV40 hybrid virus, or transfection via strontium phosphate coprecipitation with a plasmid containing SV40 early region genes. *Cancer Res* 1988; **48**: 1904-1909.
100. Atsuta J, Sterbinsky SA, Plitt J, Schwiebert LM, Bochner BS, Schleimer RP. Phenotyping and cytokine regulation of the BEAS-2B human bronchial epithelial cell: Demonstration of inducible expression of the adhesion molecules VCAM-1 and ICAM-1. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; **17**: 571-582.
101. Mullol J, Baraniuk JN, Logun C, Benfield T, Picado C, Schelhamer JH. Endothelin-1 induces CM-CSF, IL-6 and IL-8 but not G-CSF release from a human bronchial epithelial cell line (BEAS-2B). *Neuropeptides* 1996; **30**: 551-556.
102. Verheggen MM, Vanhal PTW, AdriaansenSoeting PWC, Goense BJA, Hoogsteden HC, Brinkmann AO, Versnel MA. Modulation of glucocorticoid receptor expression in human bronchial epithelial cell lines by IL-1 beta, TNF-alpha and LPS. *Eur Respir J* 1996; **9**: 2036-2043.
103. Sun WM, Wu R, Last JA. Effects of exposure to environmental tobacco-smoke on a human tracheobronchial epithelial-cell line. *Toxicology* 1995; **100**: 163-174.
104. Steerenberger PA, Zonnenberg JAJ, Dormans JAMA, Joon PNT, Wouters IM, Van Bree L, Scheepers PTJ, Van Loveren H. Diesel exhaust particles induced release of interleukin 6 and 8 by (primed) human bronchial epithelial cells (BEAS 2B) *in vitro*. *Exp Lung Res* 1998; **24**: 85-100.

105. Pietarinen-Runtti P, Raivio KO, Saksela M, Asikainen TM, Kinnula VL. Antioxidant enzyme regulation and resistance to oxidants of human bronchial epithelial cells cultured under hyperoxic conditions. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; **19**: 286-292.
106. Wright DT, Fischer BM, Li CM, Rochelle LG, Akley NJ, Adler KB. Oxidant stress stimulates mucin secretion and PLG in airway epithelium via a nitric oxide-dependent mechanism. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1996; **15**: L854-L861.
107. Eaton EA, Walle UK, Wilson HM, Aberg G, Walle T. Stereoselective sulphate conjugation of salbutamol by human lung and bronchial epithelial cells. *Br J Clin Pharmacol* 1996; **41**: 210-206.
108. Proud D, Subauste MC, Ward PE. Glucocorticoids do not alter peptidase expression on a human bronchial epithelial-cell line. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994; **11**: 57-65.
109. Noah TL, Yankaskas JR, Carson JL, Gambling TM, Cazares LH, McKinnon KP, Devlin RB. Tight junctions and mucin mRNA in BEAS-2B cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1995; **31**: 738-740.
110. Li HL, Mathias N, Timoszyk J, Stouffer B, Wall D. Effect of delivery route on pulmonary response to oncostatin M. *J Drug Target* 2002; **10**: 55-62.
111. Shen BQ, Finkbeiner WE, Wine JJ, Mrsny RJ, Widdicombe JH. Calu-3: a human airway epithelial cell line that shows cAMP-dependent Cl⁻ secretion. *Am J Physiol* 1994; **266**: L493-L501.
112. Finkbeiner WE, Carrier SD, Teresi CE. Reverse transcription-polymerase chain-reaction (RT-PCR) phenotypic analysis of cell-cultures of human tracheal epithelium, tracheobronchial glands, and lung carcinomas. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993; **9**: 547-556.
113. Mathias NR, Timoszyk J, Stetsko PI, Megill JR, Smith RL, Wall DA. Permeability characteristics of Calu-3 human bronchial epithelial cells: *in vitro-in vivo* correlation to predict lung absorption in rats. *J Drug Target* 2002; **10**: 31-40.

114. Cavet ME, West M, Simmons NL. Transepithelial transport of the fluoroquinolone ciprofloxacin by human airway epithelial Calu-3 cells. *Antimicrob Agents Chemother*, 1997; 41: 2693-2698
115. Borchard G, Cassara ML, Roemele PEH, Florea BI, Junginger HE. Transport and local metabolism of budesonide and fluticasone propionate in a human bronchial epithelial cell line (Calu-3). *J Pharm Sci*, 2002; 91: 1561-1567
116. Florea BI, Van der Sandt IC, Schrier SM, Kooiman K, Deryckere K, De Boer AG, Junginger HE, Borchard G. Evidence of P-glycoprotein mediated apical to basolateral transport of flunisolide in human broncho-tracheal epithelial cells (Calu-3). *Br J Pharmacol* 2001; **134**: 1555-1563.
117. Singh M, Krouse M, Moon S, Wine JJ. Most basal I-sc in Calu-3 human airway cells is bicarbonate-dependent Cl⁻ secretion. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1997; **16**: L690-L698.
118. Hamilton KO, Topp E, Makagiansar I, Siahaan T, Yazdanian M, Audus KL. Multidrug resistance-associated protein-1 functional activity in Calu-3 cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; **298**: 1199-1205.
119. Hamilton KO, Backstrom G, Yazdanian MA, Audus KL. P-glycoprotein efflux pump expression and activity in Calu-3 cells. *J Pharm Sci* 2001; **90**: 647-658.
120. Hamilton KO, Yazdanian MA, Audus KL. Modulation of P-glycoprotein activity in Calu-3 cells using steroids and β -ligands). *Int J Pharm* 2001; **228**: 171-179.
121. Winton HL, Wan H, Cannell MB, Gruenert DC, Thompson PJ, Garrod DR, Stewart GA, Robinson C. Cell lines of pulmonary and non-pulmonary origin as tools to study the effects of house dust mite proteinases on the regulation of epithelial permeability. *Clin Exp Allergy* 1998; **28**: 1273-1285.
122. Berger JT, Voynow JA, Peters KW, Rose MC. Respiratory carcinoma cell lines. MUC genes and glycoconjugates. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; **20**: 500-510.
123. Cozens AL, Yezzi MJ, Kunzelmann K, Ohrui T, Chin L, Eng K, Finkbeiner WE, Widdicombe JH, Gruenert DC. CFTR expression chloride secretion in

- polarized immortal human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994; **10**:38-47.
124. Bonvallot V, Baeza-Squiban A, Baulig A, Brulant S, Boland S, Muzeau F, Barouki R, Marano F. Organic compounds from diesel exhaust particles elicit a proinflammatory response in human airway epithelial cells and induce cytochrome p450 1A1 expression. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; **25**: 515-521.
125. Hodge S, Hodge G, Holmes M, Flower R, Scicchitano R. Interleukin-4 and tumour necrosis factor-alpha inhibit transforming growth factor-beta production in a human bronchial epithelial cell line: possible relevance to inflammatory mechanisms in chronic obstructive pulmonary disease. *Respirology* 2001; **6**: 205-211.
126. Aoki Y, Qui D, Zhao GH, Kao PN. Leukotriene B4 mediates histamine induction of NF-kappaB and IL-8 in human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol* 1998; **274**: L1030-L1039.
127. Man Y, Hart VJ, Ring CJA, Sanjar S, West MR. Loss of epithelial integrity resulting from E-cadherin dysfunction predisposes airway epithelial cells to adenoviral infection. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; **23**: 610-617.
128. Salvi S, Sempr A, Blomberg A, Holloway J, Jaffar Z, Papi A, Teran L, Polosa R, Kelly F, Sandstrom T, Holgate S, Frew A. Interleukin-5 production by human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; **20**: 984-991.
129. Forbes B, Lansley AB. Transport characteristics of formoterol and salbutamol across a bronchial epithelial drug absorption model. *Eur J Pharm Sci* 1998; **6**: S24.
130. Pouton CW, Lucas P, Thomas BJ, Uduehi AN, Milroy DA, Moss SH. Polycation-DNA complexes for gene delivery: a comparison of the biopharmaceutical properties of cationic polypeptides and cationic lipids. *J Control Rel* 1998; **53**: 289-299.
131. Stern M, Caplen NJ, Browning JE, Griesenbach U, Sorgi F, Huang L, Gruenert DC, Marriott C, Crystal RG, Geddes DM, Alton EW. The effect of mucolytic

- agents on gene transfer across a CF sputum barrier *in vitro*. *Gene Ther* 1998; **5**: 91-98.
132. Rappeneau S, Baeza-Squiban A, Braut-Boucher F, Aubery M, Gendron MC, Marano F. Use of fluorescent probes to assess the early sulfhydryl depletion and oxidative stress induced by mechlorethamine human bronchial epithelial cells. *Toxicol in Vitro* 1999; **13**: 765-771.
133. Westmoreland C, Walker T, Matthews J, Murdock J. Preliminary investigations into the use of a human bronchial cell line (16HBE14o-) to screen for respiratory toxins *in vitro*. *Toxicol in Vitro* 1999; **13**: 761-764.
134. Fiegel J, Ehrhardt C, Schaefer UF, Lehr CM, Hanes J. Large porous particle impingement on lung epithelial cell monolayers – toward improved particle characterization in the lung. *Pharm Res* 2003; **20**: 788-796.
135. Forbes B, Shah A, Martin GP, Lansley AB. The human bronchial epithelial cell line 16HBE14o- as a model system of the airways for studying drug transport. *Int J Pharm* 2003; **257**: 161-167.
136. Yamaya M, Finkbeiner WE, Chun SY, Widdicombe JH. Differentiated structure and function of cultures from human tracheal epithelium. *Am J Physiol* 1992; **262**: L713-L724.
137. Mathias NR, Kim KJ, Robison TW, Lee VH. Development and characterization of rabbit tracheal epithelial cell monolayer models for drug transport studies. *Pharm Res* 1995; **12**: 1499-1505.
138. Sachs LA, Finkbeiner WE, Widdicombe JH. Effects of media on differentiation of cultured human tracheal epithelium. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2003; **39**: 56-62.
139. Widdicombe JH, Sachs LA, Finkbeiner WE. Effects of growth surface on differentiation of cultures of human tracheal epithelium. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2003; **39**: 51-55.
140. Forbes B, Lim S, Martin GP, Brown MB. An *in vitro* technique for evaluating inhaled nasal delivery systems. *STP Pharma Sciences* 2002; **12**: 75-79.

141. Lim ST, Forbes B, Martin GP, Brown MB. *In vivo* and *in vitro* characterization of novel microparticulates based on hyaluronan and chitosan hydroglutamate. *AAPS Pharmsci Tech* 2001; **2**: 20.
142. Safety Aspects of Cell Culture. & Design and Equipment for the Cell Culture Laboratory. Fundamental Techniques in Cell Culture Sigma &Aldrich, 2003. a Laboratory Handbook. Sigma Aldrich Co.
143. http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Life_Science/Cell_Culture/HelpfulResources/Cell_Culture_Handbook/Cell_Culture_Techniques_12.html#Basic
144. Campbell L, Gumbleton M Basic aspects of cell growth and cell cycle in culture İçinde Lehr CM, editor. *In vitro* test systems for drug absorption and delivery. London, UK: Taylor&Francis; 2002. pp. 3-19.
145. Fanning AS, Jameson BJ, Jesaitis LA. The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 1998; **273**: 29745-29753.
146. Itoh M, Furuse M, Morita K. Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J Cell Biol* 1999; **147**: 1351-1363.
147. Meaney C, Florea BI, Ehrhardt C, Schafer UF, Lehr CM, Junginger HE, Borchard G. Bronchial epithelial cell cultures. İçinde Lehr CM, editor. *In vitro* test systems for drug absorption and delivery. London, UK: Taylor&Francis; 2002. pp. 211-217.
148. Gardiner TH, Schanker LS. Active transport of phenol red by rat lung slices. *J Pharmacol Exp Ther* 1976; **196**: 455-462.
149. Groneberg DA, Nickolaus M, Springer J, Döring F, Daniel H, Fischer A. Localization of the peptide transporter PEPT2 in the lung. Implications for pulmonary oligopeptide uptake. *Am J Pathol* 2001; **158**: 707-714.
150. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; **65**: 55-63.

151. Kohli E, Han HY, Zeman AD, Vinogradov SV. Formulations of biodegradable Nanogel carriers with 5-triphosphates of nucleoside analogs that display a reduced cytotoxicity and enhanced drug activity. *J Control Rel* 2007; **121**: 19-27.
152. Lee MK, Yoo JW, Lin H, Kim YS, Kim DD, Choi YM, Park SK, Lee CH, Roh HJ. Air-liquid interface culture of serially passaged human nasal epithelial cell monolayer for *in vitro* drug transport studies. *Drug Deliv* 2005; **12**: 305-311.
153. Temizkan G, Arda N. *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2004. pp. 1-53.
154. Lorenz MR, Holzapfel V, Musyanovych A, Nothelfer K, Walther P, Frank H, Landfester K, Schrezenmeier H, Mailander V. Uptake of functionalized, fluorescent-labeled polymeric particles in different cell lines and stem cells, *Biomaterials* 2006; **27**: 2820-2828.
155. Vinogradov SV, Bronich TK, Kabanov AV. Nanosized cationic hydrogels for drug delivery: preparation, properties and interaction with cells. *Adv Drug Del Rev* 2002; **54**: 223-233.
156. Song C, Labhasetwar V, Cui X, Underwood T, Levy RJ. Arterial uptake of biodegradable nanoparticles for intravascular local drug delivery: results with an acute dog model. *J Control Rel* 1998; **54**: 201-211.
157. Panyam J, Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv Drug Del Rev* 2003; **55**: 329-347.
158. Desai MP, Labhasetwar V, Walter E, Levy RJ, Amidon GL. The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent. *Pharm Res* 1997; **14**: 1568-1573.
159. Jaeghere FD, Doelker E, Gurny R. Nanoparticles. İçinde Mathiowitz E, editor. *Encyclopedia of controlled drug delivery*. New York: Wiley; 1999, pp. 641-664.
160. Kaş HS. İlaç Taşıyıcı Partiküler Sistemler. İçinde Gürsoy AZ, editor. *Kontrollü Salım Sistemleri*. İstanbul: Kontrollü Salım Sistemleri Derneği; 2002. pp. 65-102.

161. Müller RH, Mader K, Gohla S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery-a review of the state of the art. *Eur J Pharm Biopharm* 2000; **50**: 161-177.
162. Freitas C, Müller RH. Spray-drying of solid lipid nanoparticles (SLNTM). *Eur J Pharm Biopharm* 1998; **46**: 145-151.
163. Siekmann B, Westesen K. Investigations on solid lipid nanoparticles prepared by precipitation in O/W emulsions. *Eur J Pharm Biopharm* 1996; **43**: 104-109.
164. Jores K, Mehnert W, Drechsler M, Bunjes H, Johann C, Mader K. Investigations on the structure of solid lipid nanoparticles (SLN) and oil-loaded solid lipid nanoparticles by photon correlation spectroscopy, field-flow fractionation and transmission electron microscopy. *J Control Rel* 2004; **95**: 217-227.
165. Tursilli R, Piel G, Delattre L, Scalia S. Solid lipid microparticles containing the sunscreen agent, octyl-dimethylaminobenzoate: Effect of the vehicle. *Eur J Pharm Biopharm* 2007; **66**: 483-487.
166. Zambaux MF, Bonneaux F, Gref R, Maincent P, Dellacherie E, Alonso MJ, Labrude P, Vigneron C. Influence of experimental parameters on the characteristics of poly(lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method. *J Control Rel* 1998; **50**: 31-40.
167. Kocbek P, Obermajer N, Cegnar M, Kos J, Kristl J. Targeting cancer cells using PLGA nanoparticles surface modified with monoclonal antibody. *J Control Rel* 2007; **120**: 18-26.
168. Cegnar M, Kos J, Kristl J. Cystain incorporated in poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: development and fundamental Studies on preservation of its activity. *Eur J Pharm Biopharm* 2004; **22**: 357-364.
169. Park K. Nanotechnology: What it can do for drug delivery. *J Control Rel* 2007; **120**: 1-3.
170. Tewes F, Munnier E, Antoon B, Ngaboni Okassa L, Cohen Jonathan S, Marchias H, Douziech-Eyrolles L, Souce M, Dubois P, Chourpa I. Comparative study of doxorubicin-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles prepared by single and double emulsion methods. *Eur J Pharm Biopharm* 2007; **66**: 488-492.

171. Kawashima Y, Niwa T, Handa T, Takeuchi H, Iwamoto T, Itoh K. Preparation of controlled release microspheres of ibuprofen with acrylic polymers by a novel quasi-emulsion solvent diffusion method. *J Pharm Sci* 1989; **78**: 68-72.
172. Murakami H, Kobayashi M, Takeuchi H, Kawashima Y. Further application of a modified spontaneous emulsification solvent diffusion method to various types of PLGA and PLA polymers for preparation of nanoparticles. *Powder Tech* 2000; **107**: 137-143.
173. Pignatello R, Bucolo C, Spedalieri G, Maltese A, Puglisi G. Flurbiprofen-loaded acrylate polymer nanosuspensions for ophthalmic application. *Biomaterials* 2002; **23**: 3247-3255.
174. Quintanar-Guerrero D, Tamayo-Esquivel D, Ganem-Quintanar A, Allemann E, Doelker E. Adaptation and optimization of the emulsification-diffusion technique to prepare lipidic nanospheres. *Eur J Pharm Sci* 2005; **26**: 211-218.
175. Ikkala O, Ten Brinke G. Hierarchical self-assembly in polymeric complexes: Towards functional materials. *Chem Commun* 2004; **10**: 2131-2137.
176. Tiyaboonchai W, Limpeanchob N. Formulation and characterization of amphotericin B-chitosan-dextran sulphate nanoparticles. *Int J Pharm* 2007; **329**: 142-149.
177. Sarmiento B, Ribeiro A, Veiga F, Sampaio P, Neufeld R, Ferreira D. Alginate / chitosan nanoparticles are effective for oral insulin delivery. *Pharm Res* 2007; **24**: 2198-2206.
178. Quintanar-Guerrero D, Allemann E, Fessi H, Doelker E. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug Dev Ind Pharm* 1998; **24**: 1113-1128.
179. Yazan Y. Emülsiyon Sistemler. İçinde Gürsoy AZ, editor. *Farmasötik Teknoloji-Temel Konular ve Dozaj Şekilleri*. İstanbul: Kontrollü Salım Sistemleri Derneği; 2004. pp. 273-286.
180. Govender T, Stolnik S, Garnett, MC, Illum L, Davis SS. PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. *J Control Rel* 1999; **57**: 171-185.

181. Bilati U, Allemann E, Doelker E. Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. *Eur J Pharm Sci* 2005; **24**: 67-75.
182. Yoo HS, Choi HK, Park TG. Protein-fatty acid complex for enhanced loading and stability within biodegradable nanoparticles. *J Pharm Sci* 2001; **90**: 194-201.
183. Chouinard F, Kan WK, Leroux JC, Foucher C, Lenaerts V. Preparation and purification of polyisohexylcyanoacrylate nanocapsules. *Int J Pharm* 1991; **72**: 211-217.
184. Allemann E, Doelker E, Gurny R. Drug-loaded nanoparticles-preparation methods and drug targeting issues. *Eur J Pharm Biopharm* 1993; **39**: 13-18.
185. Langer K, Seegmüller E, Zimmer A, Kreuter J. Characterization of polybutylcyanoacrylate nanoparticles: I. Quantification of PCBA polymer and dextrans. *Int J Pharm* 1994; **110**: 21-27.
186. Wang W. Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. *Int J Pharm* 2000; **203**: 1-60.
187. Kesisoglou F, Panmai S, Wu Y. Nanosizing- Oral formulation development and biopharmaceutical evaluation. *Adv Drug Del Rev* 2007; **59**: 631-644.
188. Pamujula S, Graves RA, Freeman T, Srinivasan V, Bostanian LA, Kishore V, Mandal TK. Oral delivery of spray dried PLGA/amifostine nanoparticles. *J Pharm Pharmacol* 2004; **56**: 1119-1125.
189. Okuyama K, Abdullah M, Lenggono IW, Iskandar F. Preparation of functional nanostructured particles by spray drying. *Adv Powder Tech* 2006; **17**: 587-611.
190. Cai X, Conley S, Naash M. Nanoparticle applications in ocular gene therapy. *Vision Research* 2007, 5.
191. Kang SW, Lim HW, Seo SW, Jeon O, Lee M, Kim BS. Nanosphere-mediated delivery of vascular endothelial growth factor gene for therapeutic angiogenesis in mouse ischemic limbs. *Biomaterials* 2008; **29**: 1109-1117.

192. Nie S, Xing Y, Kim GJ, Simons JW. Nanotechnology applications in cancer. *Annual Rev Biomed Engineer* 2007; **9**: 257-288.
193. Bharali DJ, Mousa SA, Thanavala Y. Micro- and nanoparticle-based vaccines for hepatitis B. *Adv In Exper Med Biol* 2007; **601**: 415-421.
194. Singh M, Chakrapani A, O'Hagan D. Nanoparticles and microparticles as vaccine-delivery systems. *Expert Rev Vaccine*. 2007; **6**: 797-808.
195. Soares AF, Carvalho RA, Veiga F. Oral administration of peptides and proteins: Nanoparticles and cyclodextrins as biocompatible delivery systems. *Nanomedicine* 2007; **2**: 183-202.
196. Manchester M, Singh P. Virus-based nanoparticles (VNPs): Platform technologies for diagnostic imaging. *Adv Drug Deliv Rev* 2006; **58**: 1505-1522.
197. Courrier HM, Butz N, Vandamme ThF. Pulmonary drug delivery systems: Recent developments and prospects. *Critical Rev Ther Drug Carrier Syst* 2002; **19**: 425-498.
198. Ely L, Roa W, Finlay WH, Löbenberg R. Effervescent dry powder for respiratory drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 2007; **65**: 346-353.
199. Grenha A, Seijo B, Remunan-Lopez C. Microencapsulated chitosan nanoparticles for lung protein delivery. *Eur J Pharm Sci* 2005; **25**: 427-437.
200. Yamamoto H, Kuno Y, Sugimoto S, Takeuchi H, Kawashima Y. Surface modified PLGA nanosphere with chitosan improved pulmonary delivery of calcitonin by mucoadhesion and opening of the intercellular tight junctions. *J Control Rel* 2005; **102**: 373-381.
201. Pandey R, Sharma S, Khuller GK. Oral solid lipid nanoparticle-based antitubercular chemotherapy. *Tuberculosis* 2005; **85**: 415-420.
202. Kimura T, Okuno A, Miyazaki K, Furuzono T, Ohya Y, Ouchi T, Mutsuo S, Yoshizawa H, Kitamura Y, Fujisato T, Kishida A. Novel PVA-DNA nanoparticles prepared by ultra high pressure technology for gene delivery. *Materials Sci Eng C* 2004; **24**: 797-801.

203. Chang Z, Liu G, Tian Y, Zhang Z. Preparation of micron-size monodisperse poly(vinyl acetate) microspheres with γ -rays-initiated dispersion polymerization in microreactor. *Materials Letters* 2004; **58**: 522-524.
204. Sa B. Studies on the release of theophylline from polyvinylacetate microspheres. *Drug Dev Ind Pharm* 1991; **17**: 893-900.
205. Donescu D, Corobea MC. Synthesis of polyvinylacetate-sodium montmorillonite hybrids by emulsion polymerization in the presence of anionic surfactants. *J Dispersion Sci Tech* 2007; **28**: 671-679.
206. Guthmann C, Lipp R, Wagner T, Kranz H. Development of a multiple unit pellet formulation for a weakly basic drug. *Drug Dev Industrial Pharm* 2007; **33**: 341-349.
207. Riis T, Bauer-Brandl A, Wagner T, Kranz H. pH-independent drug release of an extremely poorly soluble weakly acidic drug from multiparticulate extended release formulations. *Eur J Pharm Biopharm* 2007; **65**: 78-84.
208. Draganoiu E, Sakr A. Development and *in vitro in vivo* evaluation of extended release propranolol tablets. Part I: Development and *in vitro* evaluation. *Pharm Ind* 2006; **68**: 111-115.
209. Kranz H, Wagner T. Effects of formulation and process variables on the release of a weakly basic drug from single unit extended release formulations. *Eur J Pharm Biopharm* 2006; **62**: 70-76.
210. Phillips D, Shen C, Reed M, Patel M. Chewing gum base and chewing gum compositions. Patent US 06986907
211. Huang L, Wu YX, Liu YC, Qiu XX, Ran F, Wu GY. The cationic polymerization of isobutylene by grafting from PVAc and its copolymer. *Acta Polymerica Sinica* 2006; **3**: 467-473.
212. Kalfus J, Jancar J. Immobilization of polyvinylacetate macromolecules on hydroxyapatite nanoparticles. *Polymer* 2007; **48**: 3935-3937.
213. Mu L, Feng SS. Vitamin E TPGS used as emulsifier in the solvent evaporation/extraction technique for fabrication of polymeric nanospheres for controlled release of paclitaxel (Taxol). *J Control Rel* 2002; **80**: 129-144.

214. Mu L, Feng SS. A novel controlled release formulation for the anticancer drug paclitaxel (Taxol): PLGA nanoparticles containing vitamin E TPGS. *J Control Rel* 2003; **86**: 33-48.
215. Sahoo SK, Panyam J, Prabha S, Labhasetwar V. Residual polyvinyl alcohol associated with poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake. *J Control Rel* 2002; **82**: 105-114.
216. Panyam J, Dali MM, Sahoo SK, Ma WX, Chakravarthi SS, Amidon GL, Levy RJ, Labhasetwar V. Polymer degradation and *in vitro* release of a model protein from poly(D,L-lactide-co-glycolide) nano- and microparticles. *J Control Rel* 2003; **92**: 173-187.
217. Mainardes RM, Evangelista RC. PLGA nanoparticles containing praziquantel: effect of formulation variables on size distribution. *Int J Pharm* 2005; **290**: 137-144.
218. Win KY, Feng SS. Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. *Biomaterials* 2005; **26**: 2713-2722.
219. Jones SA, Martin GP, Brown MB. Stabilisation of deoxyribonuclease in hydrofluoroalkanes using miscible vinyl polymers. *J Control Rel* 2006; **115**: 1-8.
220. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: Methodology (CPMP/ICH/281/95), 1995
221. The United States Pharmacopeia. 24. Edition. United States Pharmacopeial Convention, Inc. 12601 Twinbrook Parkway, Rockville, 2000; 807-809
222. Green JM. A practical guide to analytical method validation. *Anal Chem* 1996; **68**: 305A-309A.
223. Blonk JCG, van de Pas JC, Visser A, Brouwn LF. Localisation of anchored polymers in lamellar liquid-crystalline dispersions by confocal microscopy. *Colloids and Surfaces A: Physicochem Eng Aspects* 1998; **144**: 287-294.
224. Kolodziejczyk E, Petkova V, Benattar JJ, Leser ME, Michel M. Effect of fluorescent labeling of β -lactoglobulin on film and interfacial properties in

- relation to confocal fluorescence microscopy. *Colloids and Surfaces A: Physicochem Eng Aspects* 2006; **279**: 159-166.
225. Wolff M, Wiedenmann J, Nienhaus GU, Valler M, Heilker R. Novel fluorescent proteins for high-content screening. *Drug Discov Today* 2006; **11**: 1054-1060.
226. Carvell M, Robb ID, Small PW. The influence of labelling mechanisms on the fluorescence behaviour of polymers bearing fluorescein labels. *Polymer* 1998; **39**: 393-398.
227. Brunner A, Minamitake Y, Göpferich A. Labelling peptides with fluorescent probes for incorporation into degradable polymers. *Eur J Pharm Biopharm* 1998; **45**: 265-273.
228. Suh K, Jeong B, Liu F, Kim SW. Cellular uptake study of biodegradable nanoparticles in muscular smooth cells. *Pharm Res* 1998; **12**: 1495-1498.
229. Nordberg E, Friedman M, Göstring L, Adams GP, Brismar H, Nilsson FY, Stahl S, Glimelius B, Carlsson J. Cellular studies of binding, internalization and retention of a radiolabeled EGFR-binding affibody molecule. *Nuclear Medicine Biol* 2007; **34**: 609-618.
230. Jones HA, Hamacher K, Clark JC, Schofield JB, Krausz T, Haslett C, Boobis AR. Positron emission tomography in the quantification of cellular and biochemical responses to intrapulmonary particulates. *Toxicol Applied Pharmacol* 2005; **207**: S230-S236.
231. Zauner W, Farrow NA, Haines AM. *In vitro* uptake of polystyrene microspheres: effect of particle size cell line and cell density. *J Control Rel* 2001; **71**: 39-51.
232. Yuan H, Chen J, Du YZ, Hu FQ, Zeng S. Studies on oral absorption of stearic acid SLN by a novel fluorometric method. *Colloids Surf B: Biointerfaces* 2007; **58**: 157-164.
233. Yuan H, Miao J, Du YZ, You J, Hu FQ, Zeng S. Cellular uptake of solid lipid nanoparticles and cytotoxicity of encapsulated paclitaxel in A549 cancer cells. *Int J Pharm* 2008; **348**: 137-145.

234. Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JP, Ammoury N, Benita S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int J Pharm* 1989; **55**: R1-R4.
235. Thioune O, Fessi H, Devissaguet JP, Puisieux F. Preparation of pseudolatex by nanoprecipitation: Influence of the solvent nature on intrinsic viscosity and interaction constant. *Int J Pharm*, 1997; **146**: 233-238.
236. Verwey EJW, Overbeek JTG. *Theory of stability of lyophilic colloids*. Amsterdam: Elsevier; 1948.
237. Derjaguin BV, Landau V. Theory of the stability of strongly charged lyophobic soils and the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. *Acta Physiochem. URS* 1941; **14**: 633-651.
238. Chen ZP, Zhang Y, Zhang S, Xia JG, Liu JW, Xu K, Gu N. Preparation and characterization of water-soluble monodisperse magnetic iron oxide nanoparticles via surface double-exchange with DMSA. *Colloids Surf A: Physicochem Eng Aspects* 2008 (Baskıda).
239. Hirsjarvi S, Peltonen L, Hirvonen J. Surface pressure measurements in particle interaction and stability studies of poly(lactic acid) nanoparticles. *Int J Pharm* 2008; **348**: 153-160.
240. Zimmermann E, Müller RH. Electrolyte- ph-stabilities of aqueous solid lipid nanoparticle (SLN™) dispersions in artificial gastrointestinal media. *Eur J Pharm Biopharm* 2001; **52**: 203-210.
241. Jones SA, Martin GP, Brown MB. High-pressure aerosol suspensions- a novel laser diffraction particle sizing system for hydrofluroalkane metered dose inhalers. *Int J Pharm* 2005; **302**: 154-165.
242. Grenha A, Grainger CI, Dailey LA, Seijo B, Martin GP, Lopez CR, Forbes B. Chitosan nanoparticles are compatible with respiratory epithelial cells *in vitro*. *Eur J Pharm Sci* 2007; **31**: 73-84.
243. Bivas-Benita M, Romeijn S, Junginger HE, Borchard G. PLGA-PEI nanoparticles for gene delivery to pulmonary epithelium. *Eur J Pharm Biopharm* 2004; **58**: 1-6.

244. Yacobi NR, Phuleria HC, Demaio L, Liang CH, Peng CA, Sioutas C, Borok Z, Kim KJ, Crandall ED. Nanoparticle effects on rat alveolar epithelial cell monolayer barrier properties. *Toxicology in Vitro* 2007; **21**: 1373-1381.
245. Pashley RM. DLVO and hydration forces between mica surfaces in Li^+ , Na^+ , K^+ , and Cs^+ electrolyte solutions: A correlation of double-layer and hydration forces with surface cation exchange properties *J Colloid Interface Sci* 1981; **83**: 531-546.
246. Stolnik S, Illum L, Davis SS. Long circulating microparticulate drug carriers. *Adv Drug Deliv Rev* 1995; **16**: 195-214.
247. Patil VRS, Campbell CJ, Yun YH, Slack SM, Goetz DJ. Particle diameter influences adhesion under flow. *Biophys J* 2001; **80**: 1733-1743.
248. Illum L, Davis SS, Wilson CG, Thomas NW, Frier M, Hardy JG. Blood clearance and organ deposition of intravenously administered colloidal particles—the effects of particle-size, nature and shape. *Int J Pharm* 1982; **12**: 135-146.
249. Tabata Y, Ikada Y. Phagocytosis of polymer microspheres by macrophages. *Adv Polym Sci* 1990; **94**: 107-141.
250. Hoet PHM, Brüske-Hohlfeld I, Salata OV. Nanoparticles-known and unknown health risks. *J Nanobiotech* 2004; **2**: 12-26.
251. Edwards, DA, Hanes J, Caponetti G, Hrkach J, BenJebria A, Eskew ML, Mintzes J, Deaver D, Lotan N, Langer R. Large porous particles for pulmonary drug delivery. *Science* 1997; **276**: 1868-1871.
252. Rejman J, Oberle V, Zuhorn IS, Hoekstra D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae- mediated endocytosis. *Biochem J* 2004; **377**: 159-169.
253. May RC, Machesky LM. Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* 2001; **114**: 1061-1077.
254. Rahman J, Bel A, Mulier B. Transcriptional regulation of gamma-glutamyl-cystein synthetase-heavy subunit by oxidants in human alveolar epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; **229**: 832-837.

255. Robbins RA, Barnes PJ. Expression of inducible nitric oxide in human lung epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; **2**: 209-218.
256. Ventura CA, Tommasini S, Crupi E, Giannone I, Cardile V, Musumeci T, Puglisi G. Chitosan microspheres for intrapulmonary administration of moxifloxacin: Interaction with biomembrane models and *in vitro* permeation studies. *Eur J Pharm Biopharm* 2007; Baskida
257. Geys J, Nemery B, Hoet PHM. Optimisation of culture conditions to develop an *in vitro* pulmonary permeability model. *Toxicology in Vitro* 2007; **21**: 1215-1219.
258. Schlatter P, Gutmann H, Drewe J. Primary porcine proximal tubular cells as a model for transepithelial drug transport in human kidney. *Eur J Pharm Sci* 2006; **28**: 141-154.
259. Padron JM, van der Wilt CL, Smid K, Smitskamp-Wilms E, Backus HHJ, Pizao PE, Giaccone G, Peters GJ. The multilayered postconfluent cell culture as a model for drug screening. *Crit Rev Oncology/Hematology* 2000; **36**: 141-157.
260. Florea BI, Thanou M, Junginger HE, Borchard G. Enhancement of bronchial octreotide absorption by chitosan and N-trimethyl chitosan shows linear *in vitro/in vivo* correlation. *J Control Rel* 2006; **110**: 353-361.
261. Diebel LN, Liberati DM, White MT, Diglio CA, Brown WJ. A comparative study of secretory immunoglobulin A and immunoglobulin G in host defense in an *in vitro* pneumonia model. *Am J Surgery* 2006; **191**: 386-390.
262. Yang JJ, Ueda H, Kim KJ, Lee VHL. Meeting future challenges in topical ocular drug delivery: development of an air-interfaced primary culture of rabbit conjunctival epithelial cells on a permeable support for drug transport studies. *J Control Rel* 2000; **65**:1-11.
263. Adler KB, Holden-Stauffer WJ, Repine JE. Oxygen metabolites stimulate release of higher release of high-molecular weight conjugates by cell and organ cultures of rodent-respiratory epithelium via an arachidonic acid-dependent mechanism. *J Clin Invest* 1990; **85**: 75-85.

264. Anderle P, Niederer E, Rubas W, Hilgendorf C, Spahn-Langguth H, Wunderli-Allenspach H, Merkle H, Languguth P. P-glycoprotein (P-gp) mediated efflux in Caco-2 cell monolayers: The influence of culturing conditions and drug exposure on P-gp expression levels. *J Pharm Sci* 1998; **87**: 757-762.
265. Behrens I, Kissel T. Do cell culture conditions influence the carrier-mediated transport of peptides in Caco-2 cell monolayers? *Eur J Pharm Sci* 2003; **19**: 433-442.
266. Duff C, Murphy PG, Callaghan M, McClean S. Differences in invasion and translocation of *Burkholderia cepacia* complex species in polarised lung epithelial cells *in vitro*. *Microbial Pathogenesis* 2006; **41**: 183-192.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Mine	Soyadı	Orlu Gül
Doğ.Yeri	İstanbul	Doğ.Tar.	01.03.1980
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	27814959072
Email	mineorlu80@yahoo.com	Tel	(0212)5850035

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	İ.Ü. Eczacılık Fakültesi	2003
Lisans	İ.Ü. Eczacılık Fakültesi	2001
Lise	İSTEK Vakfı Özel Kaşgarlı Mahmut Lisesi	1997

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Arş.Gör.	İ.Ü.Eczacılık Fakültesi	2001-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi	73.750	227(Computer Based TOEFL) 7.0 (IELTS Total Band Score)

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	56.565	57.982	
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Office programları	Çok iyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Yayımlar

- * E Cevher E, MAM Taha MAM, M Orlu , A Araman. “Evaluation of mechanical and mucoadhesive properties of clomiphene citrate gel formulations containing carbomers and their thiolated derivatives”. Drug Delivery, (2008); 15: 57-67.
- * M Orlu, E Cevher, A Araman. “Design and evaluation of colon specific drug delivery system containing flurbiprofen microsponges”. International Journal of Pharmaceutics, (2006); 318: 103-117.
- * S Gungor, M Orlu, Y Ozsoy, A Araman. “*In vitro* studies on sustained release suppository formulations of tiaprofenic acid with sucrose fatty acid ester”, Scientia Pharmaceutica, (2003); 71: 357-364.
- * M Orlu, E Cevher, A Araman. “Kolona ilaç taşıyan sistemler”, Güncel Eczacılık Dergisi, Sayı 122, Aralık 2003
- * M Orlu, D Gürcan, A Araman. “Blister ambalajlardaki yenilikler”, Güncel Eczacılık dergisi, Sayı 108, Ekim 2002
- * M Orlu, A Araman. “Transdermal ilaç salım sistemleri ve adezivlerin kullanımı”, Güncel Eczacılık Dergisi, Sayı 102, Mart 2002

Tebliğler

- * M Orlu, SA Jones, LA Dailey, A Araman, B Forbes. *In vitro* studies into the biological fate of PVA nanoparticles for pulmonary delivery. Pharmaceutical Sciences World Congress - PSWC2007, April 22-25, 2007, Amsterdam-Netherlands (sözlü tebliğ)
- * M Orlu, SA Jones, LA Dailey, A Araman, B Forbes. *In vitro* studies into the biological fate of PVA nanoparticles for pulmonary delivery. Pre-Satellite Session, PSWC2007, April 20-21, 2007, Amsterdam-Netherlands (poster tebliği).
- * M Orlu, SA Jones, LA Dailey, B Forbes. Fluorescent-labelling of PVA nanoparticles and their interaction with respiratory epithelial cells *in vitro*. APS-Inhalation, March 27-28, 2007. Bath-UK (poster tebliği)
- * M Orlu. Design, characterisation and biological fate of fluorescently labelled PVA nanoparticles for pulmonary delivery. 4th Thematic Workshop and Training Course on Galenos-Towards a European PhD in Advanced Drug Delivery” Cagliari University, September, 2006, Cagliari-Italy (sözlü tebliğ)

* M Orlu, MS Erdal, M Erdal, A Araman. E-health applications in the extent of E-Turkey project. International Postgraduate Research Symposium on Pharmaceutics - IPORSIP2004, September 20-22, 2004, Istanbul-Turkey (poster tebliği)

* M Orlu, A Araman, E Cevher. Microsponge formulations for colon specific drug delivery. Pharmaceutical Sciences World Congress - PSWC2004, May 29-June 3, 2004, Kyoto-Japan (sözlü ve poster tebliğleri)

* S Gungor, M Orlu, Y Ozsoy, A Araman. Preliminary studies on sustained release suppository formulations of tiaprofenic acid with sucrose ester, 11 th International Pharmaceutical Technology Symposium. IPTS2002, September 9-11, 2002, Istanbul-Turkey (poster tebliği)

Ödüller

Prof. Hans E. Junginger Award: International Postgraduate Research Symposium on Pharmaceutics 2004 (IPORSIP2004) sempozyum ödülü, İstanbul-Türkiye.