

Rutin yüklü PLGA Nanopartiküller; Farklı Yöntemler Kullanılarak Sentezi ve Karakterizasyonu

Tuğçe KİRİK¹, Kadriye KIZILBEY^{1*}

ÖZET: Bazı bitkiler ile özellikle turuncgiller gibi meyvelerde ve kabuklarında bulunan bir flavonol glikozit olan Rutin molekülünün zayıf çözünürlüğü nedeniyle canlı sistemde biyoyararlanımı oldukça düşüktür. Bu çalışmada, Rutin molekülünün biyoyararlanımı arttırmak için tekli emülsiyon solvent buharlaştırma (o/w), nano çöktürme ve tuz etkisi ile çöktürme gibi farklı yöntemler kullanılarak Rutin yüklü PLGA nanopartikülleri sentezlenmiştir. Bu nanopartiküller % enkapsülasyon etkinliği, ortalama parçacık boyutu, çoklu dağılım indisi, Zeta potansiyel, Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi ve taramalı elektron mikroskobu analizleri ile karakterize edilmiştir. NP3 ve NP5'in in vitro ortamda Rutin salımı incelenmiştir. NP5'den % Rutin salımı 48 saatte %41 oranına ulaşmıştır. Yapılan bu çalışmada sentezlenen Rutin-yüklü nanopartiküllerin, ileride nanotıp alanında gelişmiş ve çok yönlü çalışmalar için uygun bir aday olması hedeflenmektedir.

Anahtar Kelimeler: Rutin, PLGA, Emülsiyon, Nanoçöktürme, Biyoyararlanım

Rutin Loaded PLGA Nanoparticles; Synthesis by using Different Methods and Characterization

ABSTRACT: Due to the poor solubility of the Rutin molecule, which is a flavonol glycoside found in some plants and especially in citrus fruits and shells, its bioavailability is quite low. In this study, Rutin-loaded-PLGA nanoparticles were synthesized by using different methods such as single emulsion solvent evaporation, nanoprecipitation and salting out, in order to increase the bioavailability of Rutin. These nanoparticles were characterized by their encapsulation efficiency %, average particle size, polydispersity index, Zeta potential, Fourier transform infrared spectroscopy and scanning electron microscopy analysis. In vitro Rutin release studies of NP3 and NP5 were investigated. Rutin release from NP5 reached 41% in 48 hours. It is aimed that the Rutin-loaded nanoparticles synthesized in this work will be suitable candidates for future multidisciplinary studies developed in nanomedicine.

Keywords: Rutin, PLGA, Emulsion, Nanoprecipitation, Bioavailability

¹ Tuğçe KİRİK (Orcid ID: 0000-0001-7995-5093), Kadriye KIZILBEY (Orcid ID: 0000-0002-0297-0057), İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi, Mühendislik Mimarlık Fakültesi, Biyomedikal Mühendisliği Bölümü, İstanbul, Türkiye

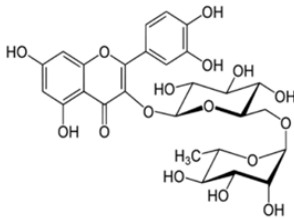
*Sorumlu Yazar: Kadriye KIZILBEY, e-mail: kadriyekizilbey@gmail.com

* Bu çalışma TUĞÇE KİRİK'in Yüksek Lisans Tezinin bir bölümüdür.

GİRİŞ

Flavonoidler, kimyasal yapıya göre flavonoller, flavonlar, flavanonlar, izoflavonlar, kateşinler, antosiyanidinler ve kalkonlar olarak sınıflandırılmaktadır (Manach ve ark., 1997). Rutin molekülü (3, 3', 4', 5, 7-pentahidroksiflavon-3-ramnoglukosid) (Şekil 1), bitkilerde, meyve ve meyve kabuklarında yaygın olarak bulunan bir flavonol glikozittir (Hooresfand ve ark., 2015). Rutin bakımından zengin bitkiler yıllardır içecek ve gıda malzemesi olarak, günümüzde ise; rutin birçok ilaç preparatında kullanılmaktadır (Chua 2013). Molekülün anti-allerjik (de Oliveira ve ark., 2006), anti-oksidan (Yang ve ark., 2008), anti-inflamatuar, anti-tümör, anti-bakteriyel, anti-viral (Calabro ve ark., 2005), anti-diyabetik anti-kanser (Webster ve ark., 1996), kardiyovasküler ve nöroprotektif etkiler gösterdiği belirlenmiştir (Al-Dhabi ve ark., 2015). Yapılan klinik çalışmalarda, rutin molekülünün iyi tolere edildiği ve toksik açıdan güvenilir olduğu gösterilmiştir (Stuard ve ark., 2008).

Pasif difüzyon yoluyla absorbe edilmelerini zorlaştıran büyük molekül ağırlıkları nedeniyle flavonoidler canlı sistemde az absorbe edilmektedir. Bu nedenle biyoyararlanımları düşüktür. Zayıf absorpsiyonun bir diğer sebebi de, bu moleküllerin fenol parçasının bakteriyel olarak bozulması ve gastrointestinal sistemdeki emilimlerini engelleyen diğer maddelerle kompleks oluşmasıdır (Cherbi ve ark., 2016).



Şekil 1. Rutin molekülünün kimyasal yapısı

Bileşenlerin düşük biyoyararlanımını gidermek için polimer ve ya lipid tabanlı sistemler olarak genellikle iki gruba ayrılabilen

nano boyutlu (10-1000 nm boyut aralığında) ilaç taşıyıcılarının geliştirilmesi gelecek vaat eden bir yaklaşımdır. Nano boyutlu ilaç taşıyıcı sistemler yüklü moleküllerin emilim profilini önemli ölçüde etkilemektedir. Çünkü nanoparçacıkların partikül boyutu, şekli ve yüzey özellikleri etken maddelerin gastrointestinal mukozadaki alımında çok önemli bir rol oynamaktadır (Bilia ve ark., 2014). Polimerik partiküllerin hazırlanmasında doğal ya da sentetik polimerler kullanılmaktadır. Albumin, aljinat, jelatin, kitozan sıklıkla kullanılan doğal polimerlerdir. Sentetik polimerler ise poliakrilatlar, polikaprolaktonlar, polilaktitler ve kopolimerleri, poligliseroller olarak sınıflandırılabilir. Polimerik nanopartiküller; yüksek etkin madde yükleme kapasitesine sahip olma, matris içine hapsedilen etkin maddeyi bozunmadan koruma, yüzey özelliklerinin modifikasyonu ile nanopartiküllerin ve etkin maddenin hedef bölgeye ulaşabilirliğinin artırma, biyolojik doku ve selüler membranlardan geçiş üstünlüğü, dar kapilerlerden geçebilme ve tümöral hücre içine penetrasyon, küçük hacmi sayesinde fagositlerden kaçabilme özelliği ile dolaşımında daha uzun süre kalabilme ve ilaç molekülünün kontrollü salımını sağlamaları gibi üstün özelliklere sahiptir (Derman ve ark., 2013).

Etkin madde nanoparçacıklar içine gömülmüş, yüzeye adsorbe edilmiş veya bağlanmış olabilir. Fonksiyonel etken maddeler taşıyıcı sistemlerden çözülme; yüzeye bağlı veya adsorbe edilmiş işlevsel maddenin desorpsiyonu; matriste difüzyon ve matris erozyonu ya da bu süreçlerin kombinasyonu şeklinde salınmaktadırlar (Soppimath ve ark., 2001). Flavonoid yüklü çeşitli polimerik nanotaşıyıcı sistemlerden literatürde bahsedilmektedir. Bu amaçla, kontrollü salım sistemlerinde toksik olmayan polimerler tercih edilmektedir (Heim ve ark., 2002). Sahip oldukları avantajlarından dolayı nanopartikül (NP) üretiminde biyobozunur alifatik poliesterler olan Polilaktik asit (PLA), Poligliserollerik asit (PGA) ve bunların

kopolimeri olan Poli(d,l-laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) (Kumar ve ark., 2012) yaygın olarak kullanılmaktadır. PLGA kopolimeri, monomerlerinin oranları değiştirilerek, farklı molekül ağırlığı, farklı fiziksel, kimyasal ve fizikokimyasal özelliklerde sentezlenebilir. Polimerik matriks olarak kullanılan PLGA'ların özelliklerine bağlı olarak, ilaç salımının uzatılması ve kontrolü gerçekleştirilebilmektedir (Makadia ve Siegel 2011). Bunun yanısıra PLGA, fizyolojik ortamda inert, biyolojik olarak parçalanabilen, biyoyumlu, toksik olmayan ürünlere parçalanabilen ve ilaç taşıyıcı sistemlerde yaygın olarak kullanılan FDA (The Food and Drug Administration) onaylı bir biyopolimerdir (Derman ve ark., 2013).

Bu çalışmada Rutin molekülünün biyoyararlanımı arttırmak için farklı yöntemler kullanılarak Rutin-yüklü-PLGA nanopartikülleri sentezlenmiş, sentezlenen NP'ler % enkapsülasyon etkinliği (%EE), ortalama parçacık boyutu (Z-Ave), çoklu dağılım indisi (PDI), Zeta potansiyel, Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektroskopisi ve taramalı

elektron mikroskobu (SEM) analizleri ile karakterize edilmiştir. Bazı NP'lerin in vitro ortamda % kümülatif Rutin salımı incelenmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

PLGA (laktit:glikolit=50:50; viskozite: 0.45–0.60 dL/g, $M_w \sim 38\text{--}54$ kDa), rutin, polivinil alkol, aseton ve etanol Sigma Aldrich'den (St. Louis, USA), diklorometan (DCM) ise Ridel de Haen firmasından tedarik edilmiştir. Tüm kimyasallar ve çözücüler analitik saflıktadır ve daha fazla saflaştırılmadan kullanılmıştır. Ultra saf su, laboratuvarında bulunan Millipore MilliQ gradient sisteminden kullanılmıştır. Sentezlenen nanopartiküllerin karakterizasyonunda UV-VIS Spektrofotometre (Jasco V-530), Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, İngiltere), IR-Prestige 21 FTIR Spektrofotometre (Shimadzu, Japonya) ve SEM (Zeiss EVO LS 10, Almanya) kullanılmıştır. In vitro salım deneyleri 37 °C'de fosfat tampon çözeltisi (PBS) içinde pH=7.4'de gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 1. Rutin yüklü nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan yöntem parametreleri

NP no	Yöntem	Yöntemin özellikleri	Rutin (mg)	PLGA (mg)	PVA (w/v)(%)	PVA (ml)
NP1	Tekli emülsiyon solvent buharlaştırma (y/s)	Rutin çözücüsü: etanol	20	100	3	4
NP2	Nano çöktürme	Sonikasyon uygulanmadı	20	100	1	80
NP3		Sonikasyon uygulandı	20	100	1	80
NP4	Tuz etkisi ile çöktürme	Sonikasyon uygulanmadı	20	100	2	24
NP5		Sonikasyon uygulandı	20	100	2	24
NP6	Tekli emülsiyon solvent buharlaştırma (y/s)	Boş nanopartikül	-	100	3	4

Rutin-PLGA Nanopartiküllerini Hazırlama Yöntemleri

Su içinde yağ (y/s) tekli emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi: Rutin yüklü PLGA NP'lerin formülasyonunda (NP1) 20 mg rutin ve 100 mg PLGA sırasıyla 1 ml etanol ve 2 ml diklorometan (DCM) (Song ve ark., 2008) içinde çözünmüştür. Organik fazlar bir buz banyosu üzerinde sonikatör (çıkış gücü 70 W, güç %80)

kullanılarak 4 ml %3'lük PVA (w/v) içinde emülsiyon haline getirilmiştir. Emülsiyonlar karışmakta olan 35 ml %0.1'lik PVA sürekli fazı içerisine damla damla eklenmiştir. Boş NP6, rutin etkeni kullanılmadan aynı yöntemle hazırlanmıştır.

Nanoçöktürme yöntemi: İkinci (NP2) ve üçüncü formülasyon (NP3), nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanmıştır (Budhian ve ark.,

2007). 20 mg rutin ve 100 mg PLGA, 8 ml aseton da çözülmüştür. NP2'de, organik faz, bir manyetik karıştırıcıda 80 ml %1'lik (w/v) PVA içerisine damla damla ilave edilmiştir. Fakat NP3'te, organik faz, sonikatör ile (çıkış gücü 70 W, güç %80) 80 ml %1'lik (w/v) PVA'da emülsiyon haline getirilmiştir.

Tuz etkisi ile çöktürme yöntemi: Bu yöntemde (Sah ve Sah 2015), 20 mg rutin ve 100 mg PLGA, 8 ml aseton içinde çözülmüştür. Aseton karışımları NP4 ve NP5 formülasyonları için %60 MgCl₂ içeren 24 ml PVA çözeltisine (%2 w/v) sırasıyla manyetik karıştırıcıda karıştırılırken 90 saniye boyunca sonikasyon uygulanarak (70W çıkış gücü, %80 güç) ilave edilmiştir.

3 farklı yöntem kullanılarak hazırlanan tüm emülsiyonlar, çözücü buharlaştırma için oda sıcaklığında manyetik bir karıştırıcıda gece boyunca karıştırılarak bırakılmıştır. Daha sonra süspansiyon edilen NP'ler, 4°C'de 40 dakika

boyunca 9.000 dev/dk'da ultra-santrifüj (Hettich-Universal 32 R) ile toplanmıştır. NP'ler, ultra saf su ile üç kez yıkanmış ve sonra dondurularak kurutulmuştur. Bu çalışmada, uygulanan farklı yöntemlerin %EE, Z-Ave, PDI ve zeta potansiyeli üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

Rutin Yüklü PLGA Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu

Enkapsülasyon etkinliğinin hesaplanması: Toplam rutin miktarı (mg) nanopartikül hazırlanmasında kullanılan rutin miktarıdır. Serbest rutin miktarı ise nanopartikül üretimi sonrası üst faz kullanılarak tespit edilmiştir. Konsantrasyonu bilinen bir seri standart rutin çözeltisi hazırlanarak 354 nm'deki (Zvezdanović ve ark., 2012) absorpsiyon değerlerinden standart rutin UV kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Santrifüj sonrası toplanan üst fazlardaki rutin miktarı bu kalibrasyon eğrisi kullanılarak belirlenmiştir. %EE, Eşitlik 1 kullanılarak hesaplanmıştır (Derman 2015).

$$\%EE = \frac{\text{Toplam Rutin miktarı (mg)} - \text{Serbest Rutin miktarı (mg)}}{\text{Toplam Rutin miktarı (mg)}} \times 100 \quad (\text{Eşitlik 1})$$

Ortalama parçacık boyutu, çoklu dağılım indisi ve Zeta potansiyel analizi: NP'lerin Z-Ave, PDI ve zeta potansiyelleri 4.0 mV He-Ne lazerle (633 nm) donatılmış bir Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, İngiltere) kullanılarak foton korelasyon spektroskopisi ile belirlendi. 25 ± 0.1 °C'de ultra saf su içerisinde hazırlanmış taze NP solüsyonu ölçümler için kullanılmış ve her ölçüm 3 defa tekrarlanmıştır. 79; f (ka), dielektrik sabiti olan çözeltiler için 0.8872 cP viskozite ve 1.330 refraktif (kırılma) indeksi kullanılmıştır, (Smoluchowski değeri;1.50). Tüm örnekler ölçüm öncesinde 0.20 µm RC-membrandan (Sartorius) filtre edilmiştir. Hidrodinamik çap (*d_H*) Eşitlik 2 kullanılarak Stokes-Einstein eşitliğindeki difüzyon katsayısından (*D*) hesaplanmıştır. Eşitlik 2'de yer alan *k*

Boltzmann sabiti (1.38 x 10⁻²³ N.m.K⁻¹), *T* mutlak sıcaklık (°K) ve *η* ise çözücünün viskozitesidir (Kızılbey 2012).

$$d_H = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (\text{Eşitlik 2}) \quad (\text{Kızılbey 2012})$$

Örneklerin çözelti içerisindeki Zeta Potansiyelleri (*ζ*), Eşitlik 3 kullanılarak Henry denklemindeki elektroforetik hareketlilik (*U_E*) ile hesaplanmıştır. Eşitlik 3'deki *ε* is ortamın dielektrik sabitini, *f(ka)* Henry fonksiyonunu, *η* ise ortamın viskozitesini göstermektedir (Manual, Z.N.S.U., 2003, Malvern Instruments Ltd. Worcestershire).

$$U_E = \frac{2\varepsilon\zeta \cdot f(ka)}{3\eta} \quad (\text{Eşitlik 3}) \quad (\text{Kızılbey 2012})$$

FTIR spektroskopisi analizi: Fonksiyonel grupların kimyasal analizi için IR-Prestige 21 FTIR Spektrofotometre (Shimadzu, Japonya) kullanılmıştır. Ölçümler PLGA, Rutin ve NP'ler için ATR (attenuated total reflectance) modunda gerçekleştirilmiştir. FT-IR spektrumu, örnek başına 4000 ila 600 cm^{-1} dalga boyu aralığında ve 4 cm^{-1} çözünürlükte 16 tarama ile gerçekleştirilmiştir.

SEM analizi: Nanoparçacıkların yüzey morfolojileri ve şekilleri taramalı elektron mikroskobu (Zeiss EVO LS 10, Almanya) kullanılarak görüntülenmiştir. SEM analizi için toz NP'ler örnekler çift taraflı yapışkan bant ile metal yüzeye sabitlenmiştir. Altın-Paladyum (Au/Pd) kaplanan numuneler 5kV'da vakum altında analiz edilmiştir.

In-vitro ortamda Rutin salımının incelenmesi: Nanopartiküllerin *in vitro* rutin salımı, pH 7.4 fosfat tampon çözeltisinde incelenmiştir. 7.4 pH değeri, fizyolojik pH'yı simüle etmek için seçilmiştir (Derman 2015). Deneyde, NP3'den 2.5 mg ve NP5'den 5 mg tartılarak, % 0.01 sodyum azid içeren 5 ml PBS (pH 7.4) içinde süspansiyon edilerek 37°C' de çalkalamalı inkübatörde (60 dev/dk) inkübasyona bırakılmıştır. 1., 2. ve 3. saatler ile 1., 2., 3., 4., 7. ve 8. günlerde, 9000 dev/dk. 20 dakika santrifüjlenerek süpernatantlar toplanmış ve pelet 5 ml taze PBS ile tekrar süspansiyon edilmiştir. Süpernatant içindeki Rutin konsantrasyonu, UV-Vis Spektroskopisi kullanılarak 354 nm dalga boyunda daha önce konsantrasyonu bilinen bir seri örnek kullanılarak çizilmiş olan standart kalibrasyon eğrisi ile karşılaştırılarak belirlenmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

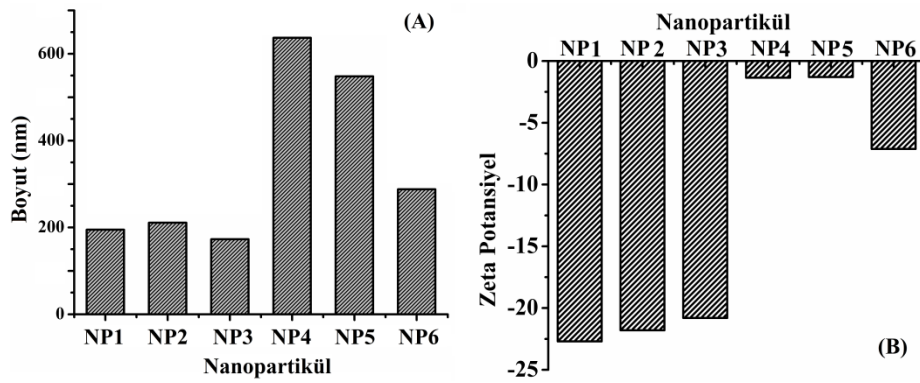
Yöntemlerin %EE üzerine etkisi: Yüksek verimli nanopartikül hazırlama yöntemleri malzeme kaybını önemli ölçüde önlemekte,

parçacık üretimini iyileştirmekte ve üretim maliyetini düşürmektedir. Bu çalışma ile formüle edilen tüm NP'ler için %6.43 ile %40.89 arasında reaksiyon verimi sağlanmıştır. Rutin-PLGA nanopartiküllerine ait % enkapsülasyon etkinliği sonuçları Çizelge 2'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlar tepkime veriminin reaksiyonların işlem parametrelerine büyük ölçüde bağlı olduğunu göstermektedir. Tekli emülsiyon-solvent buharlaştırma yöntemi kullanılarak yapılan NP1 nanopartiküllerini incelediğimizde enkapsülasyon verimi %28.31 olarak hesaplanmıştır. Nanoçöktürme yöntemi ile nanopartikül oluşumu (Çizelge 1) sırasında sonikatör kullanılmayan NP2'nin reaksiyon verimi %12.71 iken sonikasyon uygulanan NP3'ün %6.43 olarak hesaplanmıştır. Enkapsülasyon etkinliği %7.82'den %6.08'e düşmüştür. Nanoçöktürme yönteminde sonikasyon uygulamak enkapsülasyon etkinliğine belirsiz oranda etki etmiştir. Tuz etkisi ile çöktürme yöntemi ile nanopartikül oluşumu sırasında sonikatör kullanılmayan NP4'ün reaksiyon verimi %17.77 iken sonikasyon uygulanan NP5'in %11.5 olarak hesaplanmıştır. Enkapsülasyon etkinliği sonikasyon uygulandığında %30.21'den (NP4) %26.69'a (NP5) düşmüştür. Tuz etkisi ile çöktürme yönteminde sonikasyon uygulamak enkapsülasyon etkinliğini düşük oranda azaltmıştır.

Yöntemlerin DLS/ELS yoluyla belirlenen parçacık boyutu üzerine etkisi: Nanoparçacıkların boyutu ve zeta potansiyeli ölçümü için sırasıyla dinamik ve elektroforetik ışık saçılma teknikleri kullanılmıştır. Hazırlanan tüm NP'lere ait %EE, Z-Ave, PDI ve zeta potansiyel değerleri sırasıyla Çizelge 2'de verilmektedir. Boyut dağılımları Şekil 2(A)'da ve zeta potansiyeller ise Şekil 2(B)'de görülmektedir.

Çizelge 2. Nanopartiküllerin %EE, Z-Ave, PDI ve Zeta potansiyel verileri

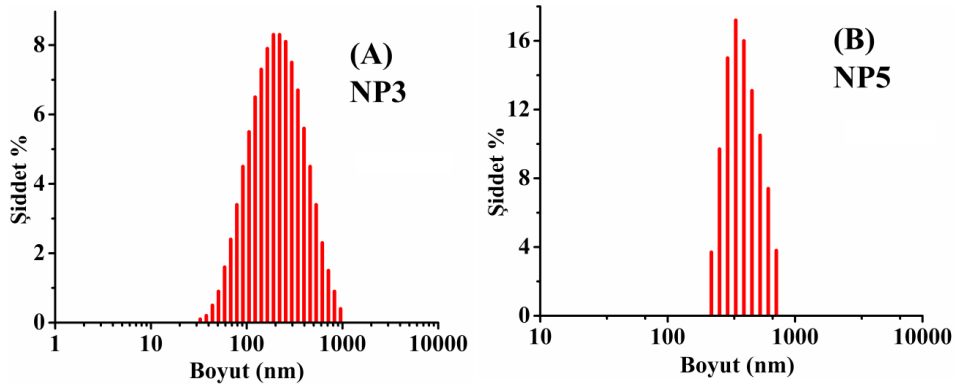
NP no	%EE	Z-Ave (nm)	PDI	Zeta Potansiyel
NP1	28.31	195.9±5.776	0.182±0.011	-22.7±0.321
NP2	7.82	211.0±0.322	0.263±0.020	-21.8±3.15
NP3	6.08	173.7±4.352	0.323±0.010	-20.8±1.36
NP4	30.21	637.4±5.541	0.566±0.026	-1.35±0.312
NP5	26.69	548.2±69.94	0.454±0.034	-1.30±0.196
NP6	Boş NP	288.3±10.69	0.259±0.005	-7.12±0.283



Şekil 2. Nanopartiküllere ait boyut dağılımları (A) ve zeta potansiyelleri (B)

Tekli emülsiyon-solvent buharlaştırma yöntemiyle ile sentezlenen NP1 nanopartiküllerinin boyut, çoklu dağılım indisi ve zeta potansiyel değerleri sırasıyla; 195.9±5.776 nm, PDI=0.182±0.011 ve -2.7±0.321 olarak bulunmuştur. Nanoçöktürme yöntemi ile nanopartikül sentezlemede sonikasyon kullanımı literatürle uyumlu olarak (Budhian ve ark., 2007) NP boyutunu 211±0.322 nm'den 173.7±4.352 nm'ye indirmiştir. Tuz etkisi ile çöktürme yönteminde sonikasyon uygulanması yine parçacık boyutunu 637.4±5.541 nm'den (NP4) 548.2±69.94 nm'ye (NP5) indirmiştir. Her iki yöntemde de güç ve/veya sonikasyon uygulanması veya

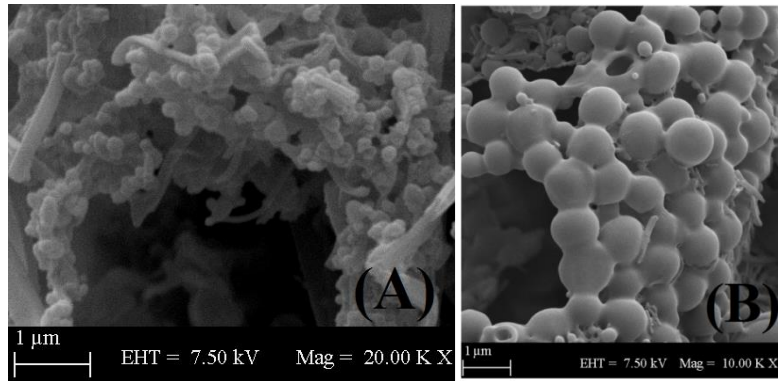
uygulanan gücün süresinin artırılmasının, damlaların parçalanmasına neden olan enerjinin arttırmasına neden olmasıdır. Bu durum, kesme gerilmesinin (shear stress) artması ve bunun sonucunda da parçacık boyutunun azalması şeklinde açıklanmaktadır (Mainardes ve Evangelista 2005). Nanoçöktürme ve tuz etkisi ile çöktürme yöntemlerinde sonikasyon kullanımının enkapsülasyon verimine düşük oranda bir etkisi olduğu gözlenmiştir (Song ve ark., 2008). %EE, parçacık boyutu ve zeta potansiyel değerleri incelendiğinde salım için seçilen NP3 ve NP5 için %boyut-şiddet grafikleri Şekil 3'de verilmiştir.



Şekil 3. NP3 (A) ve NP5'e (B) ait boyut-şiddet grafikleri

NP3 ve NP5 için SEM analizlerinin değerlendirilmesi: NP3 ve NP5 nanopartiküllerinin yüzey morfolojisi SEM ile belirlenmiştir. Şekil 4'te NP3 ve NP5'e ait düzgün ve küresel şekilli nanoparçacıkların eşit

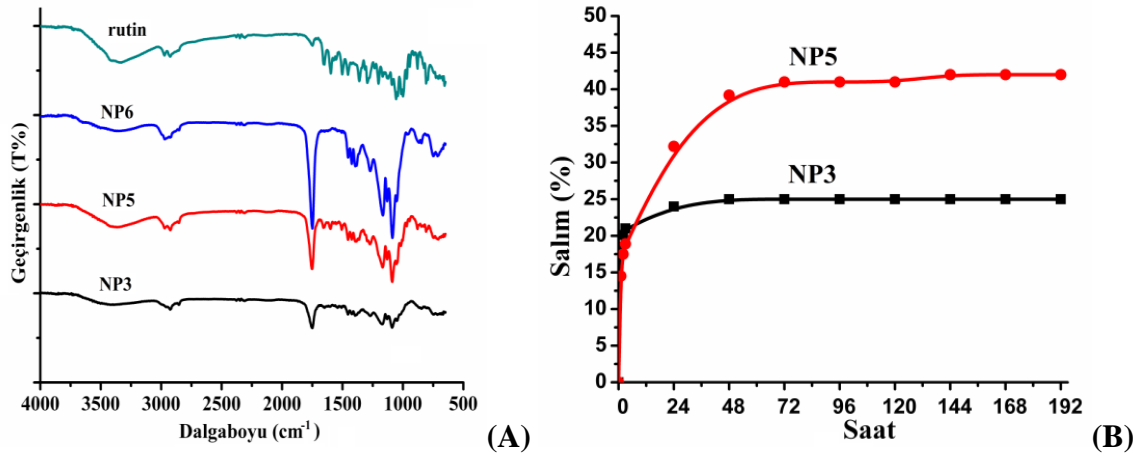
dağılımı görülmektedir. Rutin yüklü nanopartiküllere ait SEM sonuçları, DLS sonuçlarından elde edilen boyut dağılımları ile uyumludur.



Şekil 4. NP3 (A) ve NP5'e (B) ait SEM görüntüleri

NP3 ve NP5 için FTIR analizlerinin değerlendirilmesi: Şekil 5(A)'da boş PLGA ve rutin yüklü nanoparçacıkların FTIR spektrumunda, 1751 cm^{-1} 'deki bant, ester bağının C=O ester bağının (güçlü ve dar) gerilme titreşimine, $1165\text{-}1087\text{ cm}^{-1}$ ise C-O gerilmesine denk gelmektedir. Bu bantlar PLGA molekülünün karakteristik piklerine ait olduğu kabul edilmektedir (Wang ve ark., 2011). Rutin molekülünün IR spektrumunu incelendiğinde $3600\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ arasında görülen kuvvetli OH

gerilmesi 3327 cm^{-1} 'de, $2950\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$ arasında görülen zayıf C-H gerilmesi 2920 cm^{-1} ve 2974 cm^{-1} 'de, C=O kuvvetli keton bantı 1745 cm^{-1} 'de, $1600\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$ arasında görülen zayıf C=C aromatik bant, 1595 cm^{-1} de ve $1200\text{-}1020\text{ cm}^{-1}$ arasında kuvvetli C-OH gerilmesi ile kuvvetli C-O-C gerilmesine ait karakteristik piklerini göstermiştir (Hooresfand ve ark., 2015). Rutin yüklü nanopartiküller incelendiğinde, Rutin molekülünün polimer içerisine başarılı bir şekilde kapsüllendiği görülmektedir.



Şekil 5. Rutin, NP3, NP5 ve NP6 (Boş NP)'ye ait FTIR spektrumu (A); NP3 (0,5 mg/ml) ve NP5'in (1 mg/ml) in vitro ortamda pH 7.4'de Rutin salım grafiği (B)

NP3 ve NP5 için *in-vitro* ortamda Rutin salımının değerlendirilmesi: Şekil 5(B)'de farklı yöntemlerle hazırlanmış NP3 ve NP5 nanopartiküllerin Rutin molekülünün in vitro ortamdaki salımı verilmiştir. Salım çalışmasında NP3'den 0.5 mg/ml NP5'den ise 1mg/ml olacak şekilde hazırlanmıştır. Her iki nanopartikülün salımında da ilk etapta 24 saat içerisinde ani salım gerçekleşmiştir. Ani salımlarda değerler %18.9 ve %21'e ulaşmıştır. 2. Etapta ise polimer

zincirinin devam eden kırılması ve ilacın difüzyonu ile değerler NP3 ve NP5 için sırasıyla %25 ve %41'e ulaşmıştır. 3-8 gün aralığındaki son etapta ise salım bu değerlerde sabit olarak devam etmiştir. Flavanoid yüklü polimerik nanopartikül sistemlerle ilgili yapılan literatür taramalarında nanotaşıyıcıların genellikle flavanoidlerin özelliklerini olumlu yönde arttırdığı göstermektedir (Çizelge 3).

Çizelge 3 Literatürdeki bazı çalışmaların örnekleri

Etken madde	Polimer	NP oluşturma yöntemi	Çalışılan özellik	NP boyutu (nm)	% EE	İn-vitro ortamda kümülatif salım
Rutin	Çitosan	iyonik çapraz bağlama	antibakteriyel etki	133.4	36.72	(Patil ve Jobanputra 2015)
Kuarçetin	PLGA	çözücü değiştirme	antioksidan etki	399	79.84	%65 (Pool ve ark., 2012)
Kateşin	PLGA	çözücü değiştirme	antioksidan etki	410	76.14	%85 (Pool ve ark., 2012)
Kateşin	Çitosan	iyonik jelasyon yöntemi	oral biyoyararlanım	130	90	%32 (Dudhani ve Kosaraju 2010)
Kafeik Asit	PLGA	yağ/su tekli emülsiyon solvent uçurma	biyoyararlanım	208	76	% 42.65
				437	85	%46.26
				163	89	%83.08
						(Derman 2015)
Apigenin	PLGA	nanoçöktürme	anti-proliferasyon	100.2	87.7	%70 (Das ve ark., 2013)

SONUÇ

Bu çalışmada, sahip oldukları avantajlarından dolayı Rutin molekülünün biyoyararlanımı arttırmak için tekli emülsiyon-solvent buharlaştırma, nano-çöktürme ve tuz etkisi ile çöktürme yöntemleri kullanılarak Rutin yüklü PLGA nanopartikülleri başarıyla sentezlenmiş, karakterizasyonları yapılmış ve seçilmiş nanopartiküllerin in vitro ortamda % salım değerleri hesaplanmıştır. Nanoçöktürme yöntemiyle elde edilen NP2 ve NP3 nanopartiküllerinden daha düşük parçacık boyutuna sahip (173.7 ± 4.352 nm) NP3 molekülünün in vitro ortamda % salım değeri en fazla %25'e ulaşmıştır. Salım parametreleri göz önüne alındığında, nanoçöktürme yöntemine göre daha başarılı olduğu düşünülen tuz etkisi ile çöktürme yöntemi ile elde edilen NP5 molekülünün in vitro ortamda % salım değeri 3. gün %41 olarak belirlenmiştir. Analiz sonuçları değerlendirildiğinde, denenen yöntemler içerisinde en verimli, küçük boyutlu ve sürekli salımlı yüksek kapsülleme verimliliği olan Rutin yüklü nanopartiküllerin tespiti, ilerideki gelişmiş ve çok yönlü çalışmalar sonrasında nanotıp alanı için uygun bir aday olmasını sağlayacaktır.

TEŞEKKÜR

Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Zeynep MUSTAFAEVA AKDESTE ve Doç. Dr. Serap DERMAN'a deneysel çalışmalarım boyunca sağlamış oldukları laboratuvar olanaklarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

KAYNAKLAR

Al-Dhabi N A, Arasu M V, Park C H and Park S U, 2015. An up-to-date review of rutin and its biological and pharmacological activities. *Experimental and Clinical Science*, 14: 59-63.

Bilia A R, Isacchi B, Righeschi C, Guccione C and Bergonzi M C, 2014. Flavonoids loaded in nanocarriers: an opportunity to increase oral bioavailability and bioefficacy. *Food and Nutrition Sciences*, 5(13): 1212-1327.

Budhian A S, Siegel S J and Winey K I, 2007. Haloperidol-loaded PLGA nanoparticles: systematic study of particle size and drug content. *International Journal of Pharmaceutics*, 336(2): 367-375.

Calabro M, Tommasini S, Donato P, Stancanelli R, Raneri D, Catania S, Costa C, Villari V, Ficarra P and Ficarra R, 2005. The rutin/ β -cyclodextrin interactions in fully aqueous solution: spectroscopic studies and biological assays. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 36(5): 1019-1027.

Cherbi R, Saidi M, Yousfi M and Rahmani Z, 2016. Total phenols, total flavonoids contents and free radical scavenging activity of seeds extracts of *Lawsonia alba* (henna) from Algeria. *Der Pharma Chemica*, 8(11):216-221.

Chua L S, 2013. A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology*, 150(3): 805-817.

Das S, Das J, Samadder A, Paul A and Khuda-Bukhsh A R, 2013. Strategic formulation of apigenin-loaded PLGA nanoparticles for intracellular trafficking, DNA targeting and improved therapeutic effects in skin melanoma in vitro. *Toxicology letters*, 223(2): 124-138.

- de Oliveira I R, Fernandes W Z and Vieira I C, 2006. Development of a biosensor based on gilo peroxidase immobilized on chitosan chemically crosslinked with epichlorohydrin for determination of rutin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(2): 366-372.
- Derman S, 2015. Caffeic acid phenethyl ester loaded PLGA nanoparticles: effect of various process parameters on reaction yield, encapsulation efficiency, and particle size. *Journal of Nanomaterials*, 16(1): 318-330.
- Derman S, Kızılbey K and Akdeste Z M, 2013. Polymeric nanoparticles. *Sigma Journal of Engineering and Natural Sciences*, 31: 107-120.
- Dudhani A R and Kosaraju S L, 2010. Bioadhesive chitosan nanoparticles: Preparation and characterization. *Carbohydrate Polymers*, 81(2): 243-251.
- Heim K E, Tagliaferro A R and Bobilya D J, 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(10): 572-584.
- Hooresfand Z, Ghanbarzadeh S and Hamishehkar H, 2015. Preparation and characterization of rutin-loaded nanophytosomes. *Pharmaceutical Sciences*, 21(3): 145-151.
- Kızılbey K, 2012. Melanoma hastalığını oluşturan sentetik peptidlerin poliakrilikasit ve kopolimerleri ile konjugasyonu, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi (Basılmış).
- Kumar G, Shafiq N and Malhotra S, 2012. Drug-loaded PLGA nanoparticles for oral administration: fundamental issues and challenges ahead. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 29(2):149-182.
- Mainardes R M and Evangelista R C, 2005. PLGA nanoparticles containing praziquantel: effect of formulation variables on size distribution. *International Journal of Pharmaceutics*, 290(1-2): 137-144.
- Makadia H K and Siegel S J, 2011. Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers*, 3(3): 1377-1397.
- Manach C, Morand C, Demigné C, Texier O, Régéat F and Rémésy C, 1997. Bioavailability of rutin and quercetin in rats. *FEBS Letters*, 409(1): 12-16.
- Patil A G and Jobanputra A H, 2015. Rutin-chitosan nanoparticles: fabrication, characterization and application in dental disorders. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 54(2): 202-208.
- Pool H, Quintanar D, de Dios Figueroa J, Mano C M, Bechara J E H, Godínez L A and Mendoza S, 2012. Antioxidant effects of quercetin and catechin encapsulated into PLGA nanoparticles. *Journal of Nanomaterials*, 86-97.
- Sah E and Sah H, 2015. Recent trends in preparation of poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles by mixing polymeric organic solution with antisolvent. *Journal of Nanomaterials*, 16(1): 61.

- Song X, Zhao Y, Hou S, Xu F, Zhao R, He J, Cai Z, Li Y and Chen Q, 2008. Dual agents loaded PLGA nanoparticles: systematic study of particle size and drug entrapment efficiency. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 69(2): 445-453.
- Song X, Zhao Y, Wu W, Bi Y, Cai Z, Chen Q, Li Y and Hou S, 2008. PLGA nanoparticles simultaneously loaded with vincristine sulfate and verapamil hydrochloride: systematic study of particle size and drug entrapment efficiency. *International Journal of Pharmaceutics*, 350(1-2): 320-329.
- Soppimath K S, Aminabhavi T M, Kulkarni A R and Rudzinski W E, 2001. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release*, 70(1-2): 1-20.
- Stuard S, Cesarone M R, Belcaro G, Dugall M, Ledda A, Cacchio M, Ricci A, Ippolito E, Di Renzo A and Grossi M G, 2008. Five-year treatment of chronic venous insufficiency with O-(β -hydroxyethyl)-rutosides: Safety aspects. *International Journal of Angiology*, 17(03): 143-148.
- Wang H, Zhao Y, Wu Y, Hu Y, Nan K, Nie G and Chen H, 2011. Enhanced anti-tumor efficacy by co-delivery of doxorubicin and paclitaxel with amphiphilic methoxy PEG-PLGA copolymer nanoparticles. *Biomaterials*, 32(32): 8281-8290.
- Webster R, Gawde M and Bhattacharya R, 1996. Protective effect of rutin, a flavonol glycoside, on the carcinogen-induced DNA damage and repair enzymes in rats. *Cancer Letters*, 109(1-2): 185-191.
- Yang J, Guo J and Yuan J, 2008. In vitro antioxidant properties of rutin. *LWT-Food Science and Technology*, 41(6): 1060-1066.
- Zvezdanović J B, Stanojević J S, Marković D Z and Cvetković D J, 2012. Irreversible UV-induced quercetin and rutin degradation in solution, studied by UV-spectrophotometry and HPLC chromatography. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 77(3): 297-312.