

## Siklodekstrin Bağlı Poli(Laktid-Ko-Glikolid) Mikropartiküllerinin Sentezi, Karakterizasyonu, *In vitro* Kolesterol Gideriminde Kullanılabilirliği

Emine YALÇIN<sup>1</sup>, Figen ÇİÇEK<sup>2</sup>, Kültiğin ÇAVUŞOĞLU<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Giresun Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Giresun

<sup>2</sup>Giresun Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Giresun

Received: 25.12.2013; Accepted: 18.07.2014

**Özet.** Bu çalışmada siklodekstrin tutuklanmış poli (laktid-ko-glikolid) (PLGA) mikropartiküllerinin sentezi, karakterizasyonu ve *in vitro* kolesterol gideriminde kullanılması hedeflenmiştir. Biyobozunur özellikte PLGA mikropartiküllerinin canlı sistemlerde kullanılabilirliği oldukça yüksektir. Bu tür malzemelerin uygulama sonrası vücuttan alınması için cerrahi işleme ihtiyaç duyulmaması önemli bir avantajdır. Bu çalışmada PLGA partikülleri kopolimerizasyon yöntemi ile sentezlenmiş ve *in vitro* kolesterol gideriminde model biyomalzeme olarak seçilmiştir. Partikül sentezi, polilaktik asit (PLA) ve poligliserik asit (PGA) mol oranı 75/25, 50/50, 25/75 olacak şekilde 3 farklı monomer karışımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Siklodekstrin tutuklanarak partiküllerin kolesterole karşı afinitesi artırılmıştır. Siklodekstrin tutuklanmış PLGA mikropartiküllerinin biyoyuyluluk özellikleri hemoliz, kan proteinleri adezyonu, temas açısı ölçümleri ve kararlılık ile incelenmiştir. Karakterizasyon çalışmaları sonrasında mikropartiküller *in vitro* kolesterol uzaklaştırılmasında kullanılmıştır. Partikül bileşimi, ortam pH'sı ve sıcaklık parametrelerinin giderim performansı üzerine etkisi test edilmiştir. Tüm mikropartiküller yüksek biyoyuyluluk özelliği sergilemiştir. PGA oranının artması ile birlikte hemolitik aktivite ve protein adezyonunun azaldığı belirlenmiştir. Ayrıca partiküldeki poli laktik asit faz oranının azalmasıyla su ile temas açılarının da azaldığı belirlenmiştir. Ortam pH'sının ve sıcaklığının kolesterol giderimini önemli derecede etkilediği belirlenmiştir. En yüksek kolesterol giderimine pH 7.0 değerinde PLA/PGA: 25/75 mikropartikül bileşimi ile ulaşılmıştır. Ortam sıcaklığının 5°C'den 35°C'ye artırılması ile kolesterol gideriminin 1.36 kat arttığı gözlenmiştir. PLGA partiküllerinin kolesterol gideriminde etkili bir biyoyuylu materyal olduğu, siklodekstrin immobilizasyonunun kolesterol giderim performansını artırdığı belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Biyoyuyluluk, siklodekstrin, kolesterol, poli (laktid-ko-glikolid)

## Synthesis, Characterization and *In vitro* Cholesterol Removal Performance of Cyclodextrin Immobilized Poly (Lactide-Co-Glycolide)

**Abstract.** In this study, the synthesis, characterization and *in vitro* cholesterol removal performance of cyclodextrin immobilized poly (lactide-co-glycolide) (PLGA) was aimed. The biodegradable poly PLGA microspheres are widely used in humans. After treatment process, the removal of these materials from the body without an operational process is an important advantage. In this study, PLGA particles were synthesized by copolymerization method and used in cholesterol removal as a model biomaterial. Particle synthesis was performed with using different monomer mixtures as polylactic acid (PLA)/ polyglycolic acid (PGA) mol ratios of 75/25, 50/50, 25/75. The affinity of PLGA particles for cholesterol was increased with cyclodextrin immobilization. The biocompatibility of cyclodextrin immobilized PLGA particles were investigated by using hemolysis, blood protein adhesion, contact angle measurement and stability. Particles were used in cholesterol removal after characterization studies. The effects of particle composition, medium pH and temperature on removal performance were tested. High biocompatibility was observed in all compositions. Protein adhesion and hemolytic activity was decreased with increasing PGA ratio. And also contact angles with water were decreased with decreasing poly lactic acid phase ratio in compositions. Medium pH and temperature was affected importantly cholesterol removal. Maximum cholesterol removal was obtained with PLA/PGA:25/75 composition at pH 7.0. Cholesterol removal was increased 1.36 times with increasing medium temperature 5°C to 35°C. PLGA particles were an effective biocompatible material for cholesterol removal and cyclodextrin immobilization increased the cholesterol removal performance.

**Key Words:** Biocompatibility, cyclodextrin, cholesterol, poly (lactide-co-glycolide)

\* Corresponding author. *Email address:* emine.yalcin@giresun.edu.tr; Tel. +90(454)3101017

## GİRİŞ

Kolesterol beyin, sinir, kalp, bağırsak, kas, karaciğer başta olmak üzere tüm vücutta yaygın olarak bulunan ve yaşam için gerekli olan bir maddedir. Vücut kolesterolü kullanarak hormon, D vitamini ve yağları sindiren safra asitlerini üretmektedir. Kan kolesterol düzeyinin artması kan damarlarının sertleşmesine ve daralmasına yol açmaktadır. Yüksek kolesterolün kontrol altına alınması ile yaşam süresinin uzadığı, kalp ve damar hastalıklarına bağlı ölümlerin azaldığı ve kalıcı sakatlıkların önlendiği belirlenmiştir [1,2]. Hiperkolestrolemi hastalarında kolesterol düzeyini normal sınırlarda tutabilmek için ilaç ve diyet tedavisi uygulanmaktadır. İlaç tedavisinin etkili dozda tutulabilmesi için sık ilaç alınımına gereksinim duyulması aşılması gereken önemli problemlerdendir. Hiperkolestrolemi tedavisinde yaygın olarak kullanılan statin grubu ilaçlar düzenli alındığında kanda kolesterol seviyesini ancak %30-50 oranında azaltabilmektedir. Ayrıca bu ilaçlar ciddi sonuçlara varabilen akut böbrek yetmezliği, karaciğer enzim düzeylerinde bozulma gibi yan etkilere de sahiptir [3,4]. Bu nedenle yan etkisiz ve yaşam kalitesini arttıran alternatif yaklaşımların araştırılması gündeme gelmektedir.

Poli (laktid-ko-glikolid) (PLGA), biyoyumlu ve biyobozunur özelliklere sahip bir biyomalzemedir. Biyobozunur olmayan implantların *in vivo* kullanım sonrasında geri alım gerekliliği, vücut ile uyumlu ve kendi kendine parçalanan implantların geliştirilmesini gündeme getirmiştir. Başlıca kullanılan biyoyumlu sentetik polimerler; poliamid, poliaminoasit, polianhidrit, poliester, poliüretan, poliortoester, poliakrilamidlerdir. Bunların arasında polilaktik asit (PLA), poliglikolik asit (PGA) ve PLGA kopolimer malzemelerin mükemmel bir biyoyum ve biyobozunur özellik gösterdiği bilinmektedir. Bu malzemeler zaman içinde bozularak toksik olmayan laktik asit ve glikolik asite hidrolize olarak metabolize olurlar ve vücuttan atılırlar. PLGA kopolimerlerinin vücutla mükemmel bir biyoyum ve biyobozunurluk göstermesi bu yapıdaki malzemeleri popüler hale getirmiştir [5-8]. Biyomalzemeler medikal uygulamalarda membran, film veya partikül formda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Mikropartikül uygulamaları diğer biyomalzeme uygulamalarına kıyasla çeşitli avantajlar sunmaktadır. Nükleaz/proteaz sindiriminden korunmaları, düşük hücre toksisitesi, düşük maliyet, çeşitli hücre tiplerine uygulanabilirlik bu avantajlardan bazılarıdır. Bu bilgiler ışığında çalışmamızda biyoyumlu PLGA mikropartiküllerinin sentezi, karakterizasyonu ve kolesterol gideriminde kullanılabilirliği araştırılmıştır. PLGA partiküllerinin kolesterole olan afinitesinin artırılması amacıyla partikül yüzeyine siklodekstrin kalıpları yerleştirilmiştir. Siklodekstrinler, 1,4-glukozların ( $\alpha$ ), ( $\beta$ ) ve ( $\gamma$ ) üniteleri içeren halkalı oligo-amilozlardır. Hidrofobik boşluk ve hidrofilik dış gruplarından dolayı, kendisinden daha küçük hidrofobik molekülleri boşluğu

## Siklodekstrin Bağlı Poli(Laktid-Ko-Glikolid) Mikropartiküllerinin Sentezi

içerisine alma özelliğine sahiptirler [2]. Bu yolla kolesterole karşı yüksek özgünlüğe sahip PLGA mikropartikülleri, çok bileşenli kanda sadece kolesterole karşı afinite göstermektedir.

Biyomedikal alanda kullanılan malzemelerin uzun süreli kullanımlarında, kan ile temas sonucu çok sayıda biyolojik tepkimeler oluşmaktadır. Bu tür tepkimeler ilk olarak malzeme yüzeyinde meydana gelmektedir [9]. Bu nedenle geliştirilerin mikropartiküllerin kan uyumluluk testleri yüzey özellikleri ile incelenmiştir. Siklodekstrin tutuklanmış PLGA mikropartiküllerinin kan uyumluluk özellikleri hemoliz, plazma proteinleri adezyonu ve temas açısı ölçümleri ile belirlenmiştir. Karakterizasyon çalışmaları sonrasında mikropartiküller ile *in vitro* kolesterol uzaklaştırılması çalışılmıştır. Mikropartikül bileşimi, pH ve sıcaklık parametrelerinin kolesterol giderimi üzerine etkisi incelenmiştir.

## MATERYAL VE METOT

### Siklodekstrin bağlı PLGA Mikropartiküllerinin Sentezi

PLGA kopolimer partiküller, PLA ve PGA monomerlerinin kopolimerizasyonu ile sentezlenmiştir [10]. Partikül sentezi, PLA/PGA mol oranı 75/25, 50/50, 25/75 olacak şekilde 3 farklı monomer karışımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla etil asetat içerisinde çözünen farklı oranlarda (mol:mol; 75/25, 50/50, 25/75) PLA ve PGA monomerleri reaksiyon tüpüne aktarılmıştır. Reaksiyon tüpü silikon banyo içerisine yerleştirilerek 24 saat süre ile 115°C'de sabit hızda karıştırılmıştır. Süre sonunda çözücü faz evaporatörde buharlaştırılmış, tüpte oluşan partikül yapıdaki çökelti siklodekstrin immobilizasyonunda kullanılmıştır. Mikropartiküller 24 saat süre ile 100 mL dimetilsulfoksit içerisinde çözülmüş, 50 mM  $\beta$ -siklodekstrin çözeltisi ile 55°C'de 6 saat süre ile inkübe edilmiştir. Sentez çalışmaları sonrasında üç farklı bileşimde PLGA partiküllerinin sentezi gerçekleştirilmiştir. 75/25, 50/50 ve 25/75 PLA/PGA oranına sahip partiküller sırası ile PLGA-1, PLGA-2 ve PLGA-3 olarak kodlanmıştır. Her bir partikül ile karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiş ve partiküllerin *in vitro* kolesterol giderim performansı araştırılmıştır.

### PLGA Mikropartiküllerinin Karakterizasyonu

#### Hemoliz Testi

Projede geliştirilen mikropartiküller ( $20 \text{ mg.L}^{-1}$ ) ile 5 ml kan örneği 37°C'de 120 dakika süre ile karıştırılmıştır. Kontrol grubu için mikropartikül içermeyen kan örnekleri aynı işleme tabii tutulmuştur. İnkübasyon sonrasında kan örnekleri 1000 rpm'de 5 dakika süre ile

santrifüjlenmiş (Sigma 1-4 Sartorius) ve elde edilen süpernatantta hemoglobin analizi Heco (Hemotology Analyzer Abx-Micros 60) ile gerçekleştirilmiştir.

### **Kan Proteinleri Adezyonu**

PLGA (20 mg) partikülleri albumin, globulin ve fibrinojen proteinleri ile 12 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında albumin düzeyi 630 nm'de (Teco Diagnostics, Anaheim, CA), globulin düzeyi 450 nm'de (Abcam, UK), fibrinojen düzeyi 450 nm'de (Alpco Diagnostics, NH 03079) ticari kitler kullanılarak spektrofotometrik (UVmini-1240, Shimadzu, Japan) olarak belirlenmiştir. Sıvı çözeltiden partikül yüzeyine adeze olan protein miktarı ( $Q_m$ ) aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$Q_m = (C_i - C_t) V_t / w$$

Bu eşitlikte;  $Q_m$ , maksimum adezyon kapasitesini ( $\text{mg.ml}^{-1}$ );  $C_i$ , başlangıç protein derişimini;  $C_t$ , adsorpsiyon sonrası protein derişimini ( $\text{mg.ml}^{-1}$ );  $V_t$ : toplam çözelti hacmini;  $w$ , partikül miktarını ifade etmektedir (mg).

### **Temas Açısı Ölçümleri**

PLGA partikülleri sıvı ortamdan uzaklaştırılarak ince bir tabaka halinde kurutulmuş ve farklı test sıvılarına (su ve diiyodometan) karşı temas açısı değerleri, 25°C'de durgun damla yöntemiyle, dijital optik temas açısı ölçer cihazı CAM 200 (KSV Instruments Ltd., Helsinki, Finlandiya) kullanılarak belirlenmiştir. Yüzeyde, mikro şırınga yardımı ile bir damla oluşturularak sağ ve sol temas açıları ve damla boyut parametreleri dijital görüntüden otomatik olarak hesaplanmıştır. Ölçümler, en az 15 temas açısının ortalaması alınarak değerlendirilmiştir.

### **Sitotoksosite testi**

Çalışma kapsamında sentezlenen partiküllerin sitotoksik etkisi hücrelerin tetrazolium tuzunu, formazan boyasına dönüştürebilmesi prensibine dayanan MTT (4,5-dimethyl-thiazol)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) testi ile belirlenmiştir. Bu amaçla 96 kuyucuklu kültür kaplarının her bir kuyucuğunda RPMI-1640 besiyerinde hazırlanmış 20000 hücre ile 100  $\mu\text{g}$  PLGA-3 partikülleri 24 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. Uygulama süresi sonunda kuyucuklara 200  $\mu\text{L}$  Dimetil sülfoksit (DMSO) ilave edilmiş ve canlılık değerleri 570 nm'de spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Kontrol olarak partikül enjekte edilmeyen kuyucuklarda tüm deneysel süreç tekrar edilmiştir. Zamana bağlı sitotoksik etkiyi araştırmak amacıyla 48 saat ve 72 saatlik inkübasyon süreleri ile MTT testi tekrar edilmiştir. Hücre canlılığı aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

## Siklodekstrin Bağlı Poli(Laktid-Ko-Glikolid) Mikropartiküllerinin Sentezi

Hücre canlılığı:  $[ABS_{\text{örnek}}/ABS_{\text{kontrol}}] \times 100$

### ***In vitro* Kolesterol Giderimi**

Geliştirilen PLGA partiküllerin *in vitro* kolesterol uzaklaştırma çalışmaları için gerekli olan optimum koşullar kesikli sistem ile çalışmaları ile belirlenmiştir. Kesikli sistem çalışmaları 6 saat süre ile partiküller (20 mg) ve kolesterol çözeltisinin ( $50\text{mg.L}^{-1}$ , 100 mL) inkübasyonu ile gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonunda santrifüjlenerek ayrılan sulu fazda, kolesterol tayini yapılmıştır. Kolesterol tayini ticari kit kullanarak (Teco Diagnostics, Anaheim, CA 92807) spektrofotometrik olarak 520 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Kolesterol giderim performansı üzerine mikropartikül bileşimi, pH (3.0-8.0) ve sıcaklık ( $5^{\circ}\text{C}$ - $40^{\circ}\text{C}$ ) gibi sistem parametrelerinin etkileri de incelenmiştir.

Kolesterol uzaklaştırma kapasitesi Eşitlik 2 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$Q_m = [(C_o - C) V_s] / m$$

Eşitlikte  $Q_m$ , adsorplanan kolesterol miktarını (g);  $C_o$ , çözültideki başlangıç kolesterol konsantrasyonunu ( $\text{mg.ml}^{-1}$ );  $C$ , adsorpsiyon sonrası çözültideki kolesterol konsantrasyonunu ( $\text{mg.ml}^{-1}$ ),  $V_s$ , çözülti hacmini (ml);  $m$ , partikül miktarını (mg) ifade etmektedir.

### **Tekrar Kullanılabilirlik**

Partiküllerin yeniden kullanılabilirliği ve kararlılık testleri maksimum kolesterol uzaklaştırma performansı gösteren PLGA-3 partikülleri ile gerçekleştirilmiştir. Tekrar kullanılabilirlik testi için aynı partiküller kullanılarak kolesterol adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü 5 kez tekrar edilmiştir. Kolesterol yüklü partiküller 0.1 M NaCl'den başlayarak artan iyonik şiddet ile rejenere edilmiş ve tekrar kullanılmıştır.

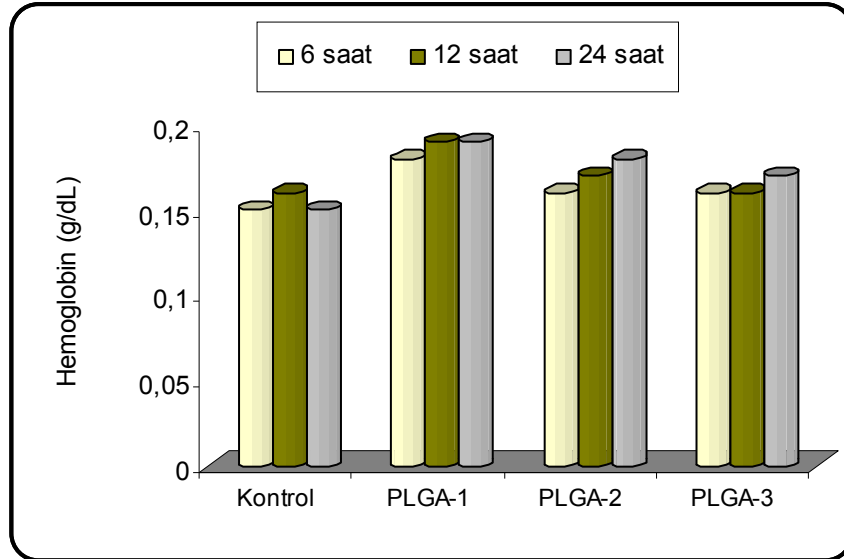
### **İstatistiksel Analiz**

İstatistiksel analiz için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılmıştır. Elde edilen veriler  $\pm$  standart sapma (SD) olarak gösterilmiş ve  $p < 0.05$  olasılık değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

## ARAŞTIRMA BULGULARI

### Karakterizasyon Çalışmaları

PLGA partiküllerinin zamana bağlı hemoliz aktiviteleri Şekil 1’de verilmiştir. PLGA-1, PLGA-2 ve PLGA-3 partiküllerinin düşük hemolitik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Polimerik partikül içermeyen kültürasyon süresince çok düşük miktarda hemoglobinin ( $0.16\text{g.dL}^{-1}$ ) seruma geçtiği gözlenmiştir. PLGA-1, PLGA-2 ve PLGA-3 mikropartikülleri içeren kan kültürlerinde  $0.17\text{-}0.19\text{ g.dL}^{-1}$  aralığında hemoglobin moleküllerinin seruma geçtiği belirlenmiştir. Bu değerlerin kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak önemsiz olduğu görülmüştür ( $p>0.05$ ). En yüksek hemolitik aktivite PLGA-1 ( $0.19\text{ g.dL}^{-1}$ ) partikülleri ile elde edilmiştir. İnkübasyon süresinin artması ile hemolitik aktivitenin de arttığı belirlenmiştir.



Şekil 1. PLGA1-3 kompozisyonlarının hemolitik aktiviteleri

Çalışma kapsamında geliştirilen PLGA partikülleri ile plazma proteinleri adezyonu testi gerçekleştirilmiş ve elde edilen bulgular Tablo 1’de verilmiştir. Tüm mikropartiküllerde düşük protein adezyonu gerçekleştiği ve kimyasal yapıda PLA içeriğinin artması ile protein adezyonunun azaldığı belirlenmiştir. Kan proteinleri içerisinde en yüksek adezyon fibrinojen proteini ile elde edilmiştir. Maksimum albumin adsorpsiyonu PLGA-3 ile  $2.62\text{ mg.g}^{-1}$  olarak, minimum albumin adsorpsiyonu PLGA-1 ile  $1.50\text{ mg.g}^{-1}$  olarak bulunmuştur. Benzer şekilde globulin ve fibrinojen çalışmalarında da maksimum adsorpsiyon PLGA-3 ile, minimum adsorpsiyon PLGA-1 ile elde edilmiştir.

## Siklodekstrin Bağlı Poli(Laktid-Ko-Glikolid) Mikropartiküllerinin Sentezi

**Tablo 1.** Kompozisyonlara ait plazma proteinleri adezyonu ve temas açısı ölçüm değerleri

|         | Albumin<br>mg.dl <sup>-1</sup> | Qm<br>mg.g <sup>-1</sup> | Globulin<br>mg.dl <sup>-1</sup> | Qm<br>mg.g <sup>-1</sup> | Fibrinojen<br>mg.dl <sup>-1</sup> | Qm<br>mg.g <sup>-1</sup> |
|---------|--------------------------------|--------------------------|---------------------------------|--------------------------|-----------------------------------|--------------------------|
| Kontrol | 4.3±1.1 <sup>a</sup>           | --                       | 3.6±1.8 <sup>c</sup>            | --                       | 185.6±51.7 <sup>d</sup>           | --                       |
| PLGA-1  | 3.9±1.6 <sup>a</sup>           | 1.50                     | 3.4±1.0 <sup>c</sup>            | 0.75                     | 184.1±31.6 <sup>d</sup>           | 5.6                      |
| PLGA-2  | 3.7±1.4 <sup>a</sup>           | 2.25                     | 3.3±1.2 <sup>c</sup>            | 1.12                     | 183.9±51.8 <sup>d</sup>           | 6.37                     |
| PLGA-3  | 3.6±1.1 <sup>b</sup>           | 2.62                     | 3.1±0.9 <sup>c</sup>            | 1.87                     | 183.7±21.8 <sup>e</sup>           | 7.12                     |

\* Aynı sütun içerisinde farklı harfler ile gösterilen ortalamalar istatistiksel açıdan önemlidir (P<0.05).

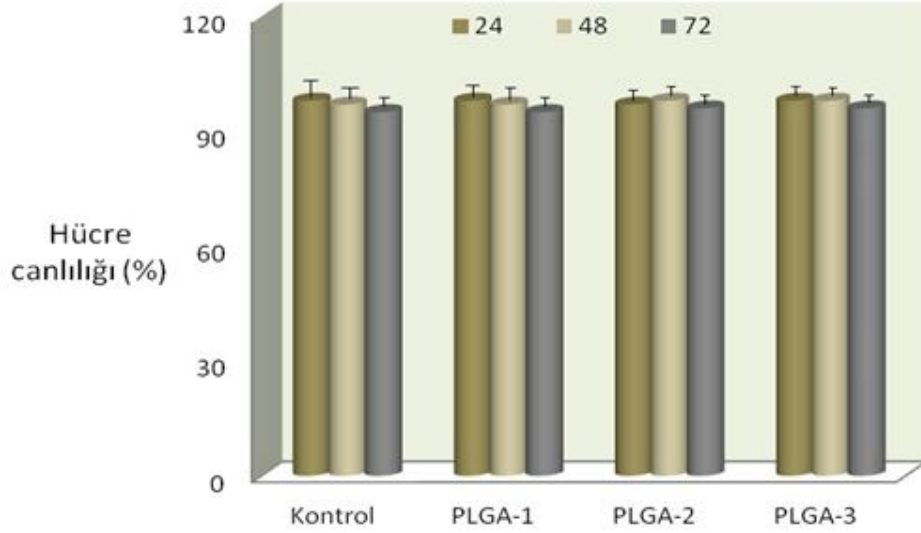
PLGA-1, PLGA-2 ve PLGA-3 partiküllerine ait su ve diiodometana karşı elde edilen temas açıları Tablo 1’de özetlenmiştir. Tüm mikropartiküller su ile yüksek temas açısı verirken, diiodometan ile daha düşük temas açısı verdiği belirlenmiştir. Bu durum partikül yüzeylerinin polar olduğunu göstermektedir. Mikropartiküldeki poli laktik asit fazının azalmasıyla su ile temas açılarında azaldığı belirlenmiştir. Temas açısı ölçümleri sonucunda tüm yüzeylerin su ile 90°’nin altında bir temas açısı verdiği belirlenmiştir.

**Tablo 2.** Temas açısı ölçümleri ve PLGA-3 kompozisyonuna ait tekrar kullanılabilirlik

|        | Su (°)   | Diiodometan (°) | Tekrar kullanım | Tekrar kullanılabilirlik (%) |
|--------|----------|-----------------|-----------------|------------------------------|
| PLGA-1 | 69.7±1.8 | 33.8±2.9        | 1               | 85                           |
| PLGA-2 | 65.6±2.2 | 35.6±2.1        | 2               | 86                           |
| PLGA-3 | 60.5±1.9 | 30.5±1.7        | 3               | 83                           |
|        |          |                 | 4               | 80                           |
|        |          |                 | 5               | 71                           |

PLGA-1, PLGA-2 ve PLGA-3 partiküllerinin zamana bağlı sitotoksik etkisi MTT testi ile araştırılmıştır. PLGA partiküllerinin kan hücreleri ile inkübe edildiği tüm zaman diliminde

kontrol grubuna göre anlamlı bir toksik etki göstermediği belirlenmiştir. 24 ve 48. saatlerde hücre canlılığı açısından kontrol grubuna kıyasla herhangi bir değişim gözlenmezken, 72. saate 1.03-1.02 aralığında bir azalma belirlenmiştir. Fakat bu azalmanın istatistiksel açıdan önemsiz olduğu ve kontrol grubunda da aynı azalmanın gözlemlendiği belirlenmiştir (Şekil 2).



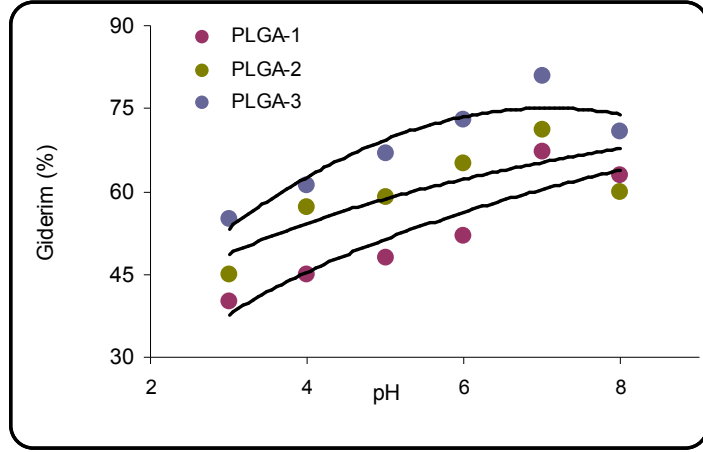
Şekil.2 PLGA partiküllerin zamana bağlı MTT testi

### ***In vitro* Kolesterol Giderimi**

Kolesterol uzaklaştırma çalışmaları için gerekli olan optimum koşullar *in vitro* da test edilen statik çalışmalar ile belirlenmiştir. Yapıda PGA içeriğinin artmasıyla kolesterol gideriminin arttığı belirlenmiştir. Maksimum kolesterol giderimi PLGA-3 ile %81 oranında elde edilmiştir. En iyi kolesterol gideriminin sağlandığı pH'ı belirlemek için tüm deneyler pH 3.0-8.0 aralığında test edilmiştir. Kolesterol giderimine ait pH profili Şekil 3'te verilmiştir. En yüksek kolesterol giderimine pH 7.0 değerinde PLGA-3 ile ulaşılmıştır. Ortam pH'sının 3.0'dan 7.0'a artırılması ile kolesterol gideriminin 1.47 kat arttığı gözlenmiştir. pH 7.0'ın üzerindeki değerlerde ise kolesterol gideriminin azaldığı belirlenmiştir.

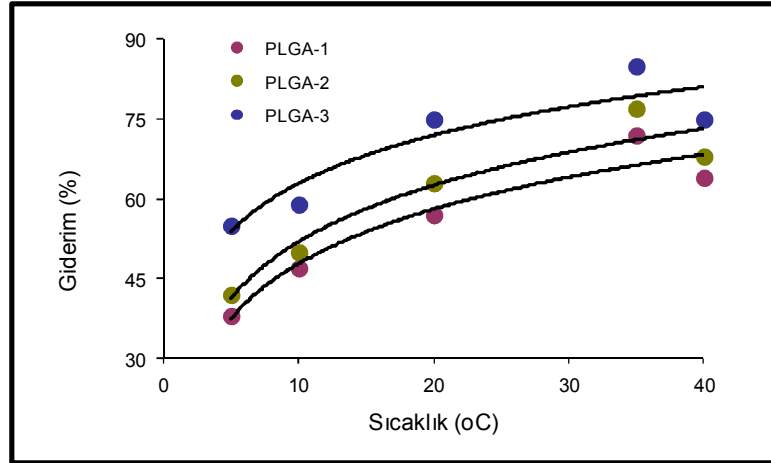


## Siklodekstrin Bağlı Poli(Laktid-Ko-Glikolid) Mikropartiküllerinin Sentezi



Şekil 2. Kolesterol giderimi üzerine pH etkisi

Kolesterol giderimi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek için tüm deneyler 5-40°C aralığında test edilmiştir. Kolesterol giderimine ait sıcaklık profili Şekil 4'te verilmiştir. En yüksek kolesterol giderimi 35°C'de PLGA-3 ile elde edilmiştir. Ortam sıcaklığının 5°C'den 35°C'ye artırılması ile kolesterol gideriminin 1.36 kat arttığı gözlenmiştir. 35°C'nin üzerindeki değerlerde ise kolesterol gideriminin azaldığı belirlenmiştir.



Şekil 4. Kolesterol giderimi üzerine sıcaklığın etkisi

### **Yeniden kullanılabilirlik ve Kararlılık**

PLGA partiküllerin yeniden kullanılabilirliğini test etmek amacıyla adsorpsiyon ve desorpsiyon döngüleri 5 kez tekrar edilmiş ve ilk 4 döngü süresince önemli bir performans kaybı gözlenmezken 5. döngü sonrasında PLGA-3 mikropartikülünün kolesterol uzaklaştırma performansında %16.4'lük bir azalma olduğu belirlenmiştir (Tablo 2).

### **TARTIŞMA VE SONUÇ**

PLGA mikropartikülleri literatürde pek çok çalışmada implant ve biyomalzeme olarak kullanılmıştır. Bu tür malzemelerin yaygın olarak kontrollü salım sistemlerinde kullanıldığı görülmektedir. Antibiyotikler, proteinler ve kanser ilaçları PLGA mikropartikülleri ile kontrollü salımı test edilen bazı biyoaktif maddelerdir. Shibusawa ve arkadaşları [7] bleomycin yüklü poli(laktik asit) mikropartiküllerini farelere enjekte etmişlerdir ve 7 günlük salım periyodu süresince deride kalınlaşma ve fibrosis oluşumunu rapor etmişlerdir. Çalışma sonucunda partiküllerin biyouyumlu, biyobozunur ve biyoadsorplanabilir olduğunu vurgulamışlardır. Nie ve arkadaşları [8] PLGA malzemelerinin kitosan ile kopolimerizasyonunu gerçekleştirerek DNA salımında kullandıklarını rapor etmişlerdir. Literatürde kolesterol giderimi konusunda çalışmalar bulunmasına rağmen siklodekstrin yüklü PLGA malzemeleri ile kolesterol giderimi konusundaki herhangi bir veri mevcut değildir. Tong ve arkadaşları [11] O,O-dipalmitoyl kitosan matrikslerine kolesterol adsorpsiyonu çalışmışlardır ve etkili bir kolesterol adsorpsiyonunu rapor etmişlerdir. Tahir ve Lee [12] cam yüzeye siklodekstrin immobilizasyonu ile bir destek materyal geliştirmiş ve bu materyal ile kolesterol gideriminde %68±2 performans elde ettiğini rapor etmiştir. Bereli ve arkadaşları [13] antibadi taşıyan poly(hidroksietil metakrilat) ile insan plazmasından kolesterol giderimini çalışmışlar ve 129 mg.g<sup>-1</sup> giderim kapasitesine ulaşmışlardır. Sieber ve arkadaşları [14] siklodekstrin tutuklanmış aktif karbon ile süten kolesterol gideriminde %90-95 aralığında bir performans rapor etmişlerdir.

Kanda bulunan bir molekülün çalışılacağı durumlarda biyomateryalin kan uyumluluğu mutlaka araştırılmalıdır. Bu nedenle çalışma kapsamında ilk olarak PLGA partiküllerinin biyouyumluluğu hemolitik aktivite, protein adezyonu ve temas açısı ölçümleri ile test edilmiştir. En yüksek hemolitik aktivite PLGA-1 kopolimerleri ile elde edilirken inkübasyon süresinin artması ile hemolitik aktivitenin de arttığı belirlenmiştir. Biyomalzemelerin kan hücreleri ile etkileşimi yapısal özellik ve konsantrasyon gibi çeşitli faktörler tarafından etkilenmektedir. Bu çalışmada da PLGA partiküllerin zamana bağlı hemoliz aktiviteleri test edilmiş ve düşük derecede hemolitik aktiviteye sahip oldukları gözlenmiştir. Biyomalzemeler hücre zarında

## Siklodekstrin Bağlı Poli(Laktid-Ko-Glikolid) Mikropartiküllerinin Sentezi

deformasyonlara yol açarak litik etki göstermektedir. Lipid yapıdaki biyomalzemeler membran yapısına katılarak membran büyüklüğünü arttırmakta ve bleb yapılarının oluşumuna neden olmaktadır. Hücre zarında oluşabilecek böyle bu tür değişiklik hücre zarı, iskeleti ve stoplazma bütünlüğünde bozulmalara neden olmaktadır [15]. Bu çalışmada geliştirdiğimiz mikropartiküllerin çok düşük hemolitik aktivite göstermesi biyouyumluluk özelliğinin yüksek oluşu ile açıklanabilir.

Plazma proteinleri adezyonu testi biyomateryal yüzeylerinin biyouyumluluğunun belirlenmesinde önemli bir kriterdir. Doku/kanla etkileşen yüzeylerde ilk olarak protein adezyonu gözlenmekte ve bunu hücre adezyonu takip etmektedir. Plazma proteinleri adezyonu testi sonrasında PLGA partiküllerin yüzeylerine protein adezyonunun oldukça düşük olduğu belirlenmiştir. Bu adezyonun spesifik olmayan bir adsorpsiyon ile gerçekleştiği düşünülmektedir. Maksimum albumin adezyonu PLGA-3 ile  $2.62 \text{ mg.g}^{-1}$  olarak, minimum albumin adsorpsiyonu PLGA-1 ile  $1.50 \text{ mg.g}^{-1}$  olarak bulunmuştur. Benzer şekilde globulin ve fibrinojen çalışmalarında da maksimum adezyon PLGA-3 ile, minimum adsorpsiyon PLGA-1 ile elde edilmiştir. Partikül yapısında laktik asit içeriğinin artması ile protein adezyonunun azaldığı belirlenmiştir. Bu azalmanın yüzey polaritesi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Temas açısı ölçümlerinden de görüldüğü gibi yapıda laktik asit içeriğinin artması sonucu su ile temas açısı ölçümlerinin de arttığı belirlenmiştir. Su ile temas açısındaki azalma yüzey polaritesinin ve buna bağlı olarak hidrofiliğin artışı göstermektedir. Yapılarında çok fazla miktarda su içeren, yumuşak ve esnek yapılı malzemeler canlı dokularla büyük benzerlik göstermektedirler [16]. Bu noktadan hareketle yüzey karakterizasyonu sonrasında PLGA partiküllerinin poli laktik asit ve poliglikolik asit içeriklerinin farklı oranlarda kullanılması ile canlı dokulara uyumunun artırıldığı söylenebilir. Partikül yapısında laktik asitin artışı polarite ile birlikte su alma kapasitesini de arttırmaktadır. Bu durum yüzeyde mikroskopik bir su akışının oluşmasına sebep olmaktadır. Laktik asit oranının artması ile polarite ve buna bağlı olarak yüzeyde oluşan akış da artmaktadır. Bu akış ile partikül yüzeyindeki lokal durgunluk önlenmekte ve bu yolla plazma proteinlerinin yüzeye adezyonu da azalmaktadır [17]. En yüksek protein adezyonu fibrinojen proteininde gözlenmiştir. Birden fazla protein içeren karışımlarda, proteinlerin yüzeye adsorpsiyonu bakımından bir yarışma gerçekleşmektedir. Bu proteinlerin yapışmasında önemli faktörlerden biri molekül büyüklüğüne bağlı olarak gerçekleşen kütle transferidir [18]. Yüzeyde ilk olarak küçük moleküler ağırlığa sahip proteinlerinin adezyonu gerçekleşir ve genellikle ilk adezyona uğrayan proteinin fibrinojen olduğu belirtilmektedir [19]. Daha sonra albumin-globulin gibi büyük proteinler yüzeye yerleşmekte ve yüzeyle arasında oluşan kuvvetli bir çekim sonucu daha önce bağlanmış küçük proteinlerin yüzeyden kopmasını sağlamaktadır [20]. Bu olay Vroman ve Adams (1960) tarafından Vroman etkisi olarak

adlandırılmıştır [21]. Diğer proteinlere kıyasla fibrinojen adezyonunun yüksek olması bu etki ile açıklanabilir.

Materyallerin sitotoksitesinin değerlendirildiği MTT testi, biyouyumluluk testleri içerisinde, hızlı sonuç alınması ve çok hassas olmasının yanı sıra materyallerin çok düşük düzeydeki toksisitesinin dahi değerlendirilebilmesine olanak sağlaması nedeniyle güvenilir testlerden biri olarak kabul edilmektedir [22]. MTT analizinde canlı hücreler sarı renkli tetrazolyum tuzunu mitokondriyal bir dehidrogenaz ile mor formazon kristallerine dönüştürmektedir. Analiz süresince oluşan formazon kristalleri canlı hücre sayısı ile doğru orantılı olarak artmaktadır [23]. Bu çalışmada PLGA partiküllerinin sitotoksitesini MTT testi ile araştırılmış ve sitotoksik özellikte olmadığı belirlenmiştir.

Karakterizasyon çalışmaları sonrasında *in vitro* kolesterol giderim çalışmaları gerçekleştirilmiştir. *In vitro* çalışmalarda en yüksek kolesterol giderimine (%81) pH 7.0 değerinde PLGA-3 ile ulaşılmıştır. Hidronyum ve hidroksil iyonları kuvvetle adsorbe özelliğine sahip olduğu için, adsorpsiyon olayı çözelti pH'ından önemli derecede etkilenmektedir. Ayrıca asidik veya bazik bileşiklerin iyonizasyon derecesi de adsorpsiyonu etkiler. Hem kolesterol hem de PLGA yüzey yükleri ortam pH'sından etkileneceği için pH, kolesterol gideriminde önemli değişikliklere sebep olmuştur. Önemli sistem parametrelerinden olan sıcaklık, kolesterol gideriminde artışa yol açmıştır. En yüksek kolesterol giderimi pH 7.0'da, 35°C'de PLGA-3 ile %85 olarak elde edilmiştir. Sıcaklık adsorpsiyona etki eden önemli faktörlerden biridir. Aynı zamanda değişik sıcaklıklarda elde edilen değerler adsorpsiyon mekanizmasının anlaşılmasına katkıda bulunmaktadır. Moleküllerin hareketi sıcaklık artışına bağlı olarak artmaktadır. Bu çalışmada da kolesterol gideriminin sıcaklıkla artması, kolesterol molekülü ve adsorbent çarpışma oranının artması ile açıklanabilir.

Kolesterol giderimi konusunda literatürde pek çok çalışma mevcuttur. Bu çalışmada biyouyumlu özellikteki PLGA partiküllerinin kolesterole olan afinitesi siklodekstrin immobilizasyonu ile artırılmıştır ve partiküller kolesterol gideriminde kullanılmıştır. Optimizasyon çalışmaları sonucunda siklodekstrin tutuklu PLGA partikülleri ile %85 kolesterol giderimi sağlanmıştır. Yüksek biyouyumlu özelliği olduğu belirlenen PLGA partiküllerinin yüksek *in vitro* kolesterol giderim performansı, *in vivo* uygulamalar için oldukça ümit vericidir.

## TEŞEKKÜR

Bu alışma Giresun Üniversitesi Rektörlüęü Bilimsel Araştırmalar Projeleri Birimi tarafından FEN-BAP–100510-05 kodlu proje ile desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı Giresun Üniversitesi BAP Birimine teşekkür ederiz.

## KAYNAKLAR

- [1] Bjorkegren J., Packard C.J., Hamsten A. Accumulation of large very low density lipoprotein in plasma during intravenous infusion of a chylomicron-like triglyceride emulsion reflects competition for a common lipolytic pathway. *J Lipid Res* 1996; 37:76–86.
- [2] Casper P., Glöckner P., Ritter H. Cyclodextrins in polymer synthesis: influence of acrylate side groups on the initial rate of radical polymerization of various acrylate/methylated  $\beta$ -cyclodextrin complexes in water. *Macromolecules* 2000; 33:4361-64.
- [3] Yazar M., Yur F. Hiperkolesterolemik insanlarda plazma lipoprotein ve fosfolipid seviyeleri. *YYU Vet Fak Derg* 2003; 14:83-85.
- [4] Gencosmanoęlu B., Alhan C., Bardak A., Turfan M., Yılmaz H., Hancı M. Evaluation of serum lipid levels as a risk factor for coronary artery disease in patients with spinal cord injury. *Turk. Fiz. Tip Rehab. Derg.* 2000; 3(2):57-63.
- [5] Zhu K.J., Jiang H.L., Du X.Y., Wang J., Xu W.X., Liu SF. Preparation and characterization of hCG-loaded polylactide or poly(lactide-co-glycolide) microspheres using a modified water in- oil-in-water (w/o/w) emulsion solvent evaporation technique. *J Microencapsul* 2001; 18:247–260.
- [6] Danhier F., Ansorena E., Silva J.M., Coco R., Le Breton A., Preat V. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *J Control Rel.* 2012; 161(2):505-22.
- [7] Shibusawa Y., Negishi I., Tabata Y., Ishikawa O. Mouse model of dermal fibrosis induced by one-time injection of bleomycin-poly(L-lactic acid) microspheres. *Rheumatology* 2008; 1:4-11.
- [8] Nie H., Lee L.Y., Tong H., Wang C. PLGA/chitosan composites from a combination of spray drying and supercritical fluid foaming techniques: New carriers for DNA delivery. *J. Control Rel.* 2008; 129: 207–214.
- [9] Niesman M.R. The use of liposomes as drug carriers in ophthalmology. *Drug Carr Syst* 1992; 9:1-38.
- [10] Eliaz R.E., Kost J. Characterization of a polymeric PLGA-injectable implant delivery system for the controlled release of proteins. *J Biomed Mater Res* 2000; 50:388–396.

- [11] Tong Y., Wang S., Xu J., Chua B., He C. Synthesis of O,O-dipalmitoyl chitosan and its amphiphilic properties and capability of cholesterol absorption. *Carbohydr Polym* 2005; 60: 229–233.
- [12] Tahir M.N., Lee Y. Immobilisation of  $\beta$ -cyclodextrin on glass: Characterisation and application for cholesterol reduction from milk. *Food Chem* 2013; 139:1-4
- [13] Bereli N., Şener G., Yavuz H., Denizli A. Oriented immobilized anti-LDL antibody carrying poly(hydroxyethyl methacrylate) cryogel for cholesterol removal from human plasma. *Mater Sci Eng* 2011; 31:1078-1083
- [14] Sieber R., Rehberger B.S., Walther B. Removal of cholesterol from dairy products. *Encyclopedia of Dairy Sciences* 2011; 2:734-740.
- [15] Carol McClure D., Schiller N.L. Effects of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids on human monocyte-derived macrophages. *Curr Microbiol* 1996, 33:109-117.
- [16] Tasdelen B., Kayaman N., Guven O., Baysal B.M. Investigation of drug release from thermo- and pH- sensitive poly(N-isopropylacrylamide/itaconic acid) copolymeric hydrogels. *Poly Adv Technol* 2004; 528:532-534.
- [17] Nagaoka S., Mori Y., Tanzawa H., Kikuchi Y., Inagaki F., Yokota Y., Noishiki Y. Hydrated dynamic surfaces. *ASAIO Journal* 1987; 10:76-78.
- [18] Fournier R.L. Solute transport in biological systems. In *Basic Transport Phenomena in Biomedical Engineering* 1999; pp. 27-28, Taylor & Francis: Philadelphia, PA.
- [19] Dee K.C., Puleo D.A., Bizios R. Protein– surface interactions. In *Tissue-Biomaterials Interactions* 2002; pp. 45-49, John Wiley & Sons Inc.: Hoboken, NJ.
- [20] Latour R.A., *Biomaterials: Protein–surface Interactions*. in: Wnek G, Bowlin G, editors. *The Encyclopedia of Biomaterials and Bioengineering* 2005; pp. 25-31, Taylor & Francis; New York.
- [21] Vroman L., Adams A.L. Findings with the recording ellipsometer suggesting rapid exchange of specific plasma proteins at liquid solid interfaces. *Surf Sci* 1969; 16:438–446.
- [22] Kılıç K., Kesim B., Sümer Z., Polat Z., Öztürk A, Tam seramik materyallerinin biyoyumluluğunun MTT testi ile incelenmesi. *Sağlık Bilimleri Dergisi* 2010;192:125-32.
- [23] Mondalek F.G., Ponnurangam S., Govind J., Houchen C., Anant S., Pantazis P., Ramanujam R. Inhibition of angiogenesis- and inflammation-inducing factors in human colon cancer cells in vitro and in ovo by free and nanoparticle-encapsulated redox dye. *J Nanobiotechnol* 2010; 8:17.