



**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
BYF-DR-2014-0001**

**PROTOPORFİRİN YÜKLÜ MANYETOLİPOZOMLARIN
BİYOFİZİKSEL KARAKTERİZASYONU**

Harun BAŞOĞLU

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Mehmet Dinçer BİLGİN**

AYDIN-2014

**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
BYF-DR-2014-0001**

**PROTOPORFİRİN YÜKLÜ MANYETOLİPOZOMLARIN
BİYOFİZİKSEL KARAKTERİZASYONU**

Harun BAŞOĞLU

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Mehmet Dinçer BİLGİN**

AYDIN-2014

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Biyofizik Anabilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Harun BAŞOĞLU tarafından hazırlanan “Protoporfirin Yüklü Manyetolipozomların Biyofiziksel Karakterizasyonu” başlıklı tez, 28/05/2014 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

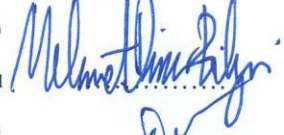
Unvanı, Adı ve Soyadı :

Üniversitesi :

İmzası:

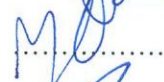
Prof. Dr. Mehmet Dinçer BİLGİN

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp
Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı



Prof. Dr. Yelda Ö. DAYANIR

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp
Fakültesi Radyoloji Anabilim Dalı



Doç. Dr. Murat PEHLİVAN

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyofizik Anabilim Dalı



Doç. Dr. Yüksel YILDIZ

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp
Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı



Yrd. Doç. Dr. Özlem BOZKURT

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp
Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı



Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Doktora tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun
..... Sayılı kararıyla tarihinde onaylanmıştır.

Unvanı, Adı Soyadı
Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Sacide KARAKAŞ

ÖNSÖZ

Fotodinamik terapi 1980'li yıllardan bu yana Kanada, ABD, Avrupa ve Japonya'ya kadar yayılmış, klinikte değişik kanser türlerinin tedavisinde kullanılan alternatif bir yöntemdir. FDT'de fotosensitif bir ajan vücuda verildikten belli bir süre sonra (24-72 saat) hedeflenen bölge o ajanı uyaran dalga boyundaki ışığa maruz bırakılması sonucu oluşan singlet oksijen kanserli hücrelerde apoptozis ve nekroza yol açan reaksiyonları başlatmaktadır. Terapinin vücutta kalan ilaca bağlı olarak gelişen, ilacın çeşidine göre 6 hafta kadar sürebilen yan etkisi zaten kanser nedeniyle maddi ve manevi olarak rahatsız olan hastanın yaşam kalitesini belli düzeyde etkileyebilmektedir. Manyetolipozomlar ise fotosensitif ajanları hedeflenen dokuya taşıma, MR ile görüntüleme ve terapi sonrası vücuttan atılmasını kolaylaştıracak kapasiteye sahip yapılardır. Bu çalışmanın amacı Protoporfirin IX (PpIX) taşıyan manyetolipozomlar üretmek, karakterize etmek, ısı ve manyetik alana bağlı olarak yapının ilaç serbestlemesini incelemektir. Yapının ısıya bağlı olarak ilaç serbestlemesi incelenmiş ve alternatif akımla oluşturulan manyetik alandaki sıcaklık artışı araştırılmıştır. Bütün bu karakterizasyon incelemelerinden sonra da PpIX yüklü manyetolipozomların meme kanseri hücre hattı olan MCF7 hücre hattında toksisite ve in-vitro fotodinamik etkisi incelenmiştir.

Bu çalışma Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından TPF-13014 kodlu proje ve TÜBİTAK tarafından 112S958 kodlu proje olarak desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

| | Sayfa |
|---|-------|
| | No |
| KABUL ve ONAY..... | i |
| ÖNSÖZ..... | ii |
| İÇİNDEKİLER..... | iii |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ..... | vi |
| TABLolar DİZİNİ..... | viii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ..... | ix |
| 1. GİRİŞ..... | 1 |
| 1.1. Nanoteknoloji..... | 4 |
| 1.1.1. Kanser ve Nanoteknoloji..... | 5 |
| 1.1.2. Nanotoksikoloji..... | 7 |
| 1.1.3. Nanomateryallerin Kanser Bölgelerine Dağılımı..... | 7 |
| 1.1.4. Pasif Hedefleme | 9 |
| 1.1.5. Aktif Hedefleme | 16 |
| 1.2. Lipozomlar..... | 21 |
| 1.2.1. Lipozomlara Tarihsel Bakış..... | 21 |
| 1.2.2. Lipozomun Yapısal Özellikleri..... | 22 |
| 1.2.3. Yapı Bileşenleri..... | 24 |
| 1.2.4. Moleküler Paketleme Parametreleri..... | 25 |
| 1.2.5. Lipozomların Avantajları..... | 27 |
| 1.2.6. Lipozomların Dezavantajları..... | 28 |
| 1.2.7. Lipozom ve Nanopartikül Karışım Sistemlerinin İncelenmesi..... | 29 |
| 1.2.7.1. Desteklenmiş Lipit Çift Tabaka..... | 29 |
| 1.2.7.2. Dekorasyon ve Agrega Oluşumu..... | 36 |
| 1.2.7.3. Nanopartikül Membran Etkileşimi..... | 39 |
| 1.3. Manyetolipozomlar..... | 42 |
| 1.4. Fotodinamik Terapi..... | 45 |
| 1.4.1. Fotosensitif Ajanlar ve Etki Mekanizmaları..... | 46 |
| 1.4.2. Protoporfirin | 51 |
| 1.4.2.1. Levulan | 52 |

| | |
|---|----|
| 1.4.2.2. Metvix..... | 53 |
| 1.5. Fotodinamik Teşhis..... | 54 |
| 1.6. Meme Kanseri..... | 55 |
| 1.7. Zeta Potansiyel..... | 57 |
| 2. GEREÇ VE YÖNTEM..... | 59 |
| 2.1. Gereç..... | 59 |
| 2.2. Yöntem..... | 60 |
| 2.2.1. PpIX stok solüsyonunun hazırlanışı..... | 60 |
| 2.2.2. PpIX yüklü manyetolipozomların hazırlanışı..... | 60 |
| 2.2.3. Manyetolipozom Hazırlanışı..... | 61 |
| 2.2.4. Lipozom Hazırlama..... | 61 |
| 2.2.5. Boyut ve Zeta Potansiyel Ölçümü..... | 62 |
| 2.2.6. Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM)..... | 62 |
| 2.2.7. Manyetolipozomların PpIX Bulundurma Miktarı ve Manyetolipozomlardan Sıcaklığa Bağlı PpIX Serbestlenmesinin Belirlenmesi..... | 62 |
| 2.2.8. Elektromanyetik Alanda PpIX yüklü Manyetolipozomların Sıcaklık Değişimi..... | 64 |
| 2.2.9. Türbidite Ölçümü..... | 64 |
| 2.2.10. ICP-MS (Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometer) Analizi..... | 65 |
| 2.2.11. Toksikite Çalışması..... | 65 |
| 2.2.12. In-Vitro FDT Deneyi..... | 65 |
| 2.2.13. X-Işın Kırınımı (XRD) Analizi..... | 66 |
| 2.2.14. İstatistiksel Analiz..... | 66 |
| 3. BULGULAR..... | 67 |
| 3.1. PpIX Yüklü Manyetolipozomların Karakterizasyonu ve Optimizasyonu..... | 67 |
| 3.2. PpIX Yüklü Manyetolipozomların Demir İçeriği..... | 68 |
| 3.3. PpIX Bulundurma Etkinliği..... | 69 |
| 3.4. Elektromanyetik Alanda PpIX yüklü Manyetolipozomların Sıcaklık Değişimi..... | 72 |
| 3.5. Türbidite Ölçümü..... | 72 |
| 3.6. TEM Görüntülemesi..... | 73 |
| 3.7. XRD Analizi..... | 74 |
| 3.8. Toksikite Çalışması..... | 74 |
| 3.9. In-Vitro FDT Deneyi..... | 76 |
| 4. TARTIŞMA..... | 78 |

| | |
|----------------|-----|
| 5. SONUÇ..... | 82 |
| ÖZET..... | 84 |
| SUMMARY..... | 85 |
| KAYNAKLAR..... | 86 |
| ÖZGEÇMİŞ..... | 105 |
| TEŞEKKÜR..... | 106 |

SİMGELER VE KISALTMALAR

AC: Alternatif akım

ALA: Aminolevulinik asit

CdSe: Kadmiyum selenit

DLÇT : Desteklenmiş Lipit Çift Tabaka

DOPC: 1,2-Diolil-*sn*-glisero-3-fosfokolin

DPPC: Dipalmitol fosfotidilkolin (1,2-diheksadesanoil-*sn*-glisero-3-fosfokolin)

DSPE-PEG2000: 1,2-dipalmitl-*sn*-glisero-3-fosfoetanolamin-N [metoksi(poli(etilen glikol)-2000] (amonyum tuz)

GGT: Gelişmiş geçirgenlik ve tutma

FDA: Amerikan gıda ve ilaç dairesi

FDT: Fotodinamik terapi

Fe: Demir

Fe₃O₄: Demir oksit nanopartikül

FWHM: Full width at half maximum (tepenin yarı yükseklikteki genişliği)

HpD: Hematoporfirin Türevi

ICP-MS: İndüktif olarak eşleştirilmiş plazma-kütle spektrometresi

κ : Bükülme modülü

LDH: Laktat dehidrogenaz

MA: Manyetik alan

ML: Manyetolipozomlar

MR: Manyetik rezonans

MTT: 3-[4,5-dimetiltizol-2-yl]-2,5- difeniltetrazolyum bromit; thiazol mavi

NP: Nanopartikül

PBS: Fosfat tampon solüsyon

PpIX: Protoporfirin IX

R_C : Partikül kritik çapı

R_h : Hidrodinamik yarıçap

R_{NP} : Nanopartikül yarıçapı

R_{ves} : Vezikül yarıçapı

RF: Radyo frekansı

SPIO: Süperparamanyetik demir oksit nanopartiküller

T_m : Geçiş sıcaklığı

TEM: Transmisyon elektron mikroskobu

USPIO: Ultra küçük süperparamanyetik demir oksit nanopartiküller

XRD: X-ışını kırınımı

YA: Yüzey alanı

ZnS: Çinko sülfid

TABLULAR

| | Sayfa |
|---|--------------|
| Tablo 1.1. Kanser hedeflemede prelinik çalışmalar ve geliştirilmesi devam eden nanomateryaller..... | 13 |
| Tablo 1.2. Klinik deneme aşamasındaki nanoilaçlar..... | 18 |
| Tablo 1.3. FDA onaylı antikanser ilaçlar..... | 20 |
| Tablo 1.4. Meme Korsinomlarının Moleküler Sınıflandırması | 56 |
| Tablo 3.1. PpIX miktarı sabit (20 µM), fakat değişik miktarlarda (0,175; 0,35 ve 0,5 mg) Fe ₃ O ₄ nanopartikülleri eklenerek elde edilen PpIX yüklü ML'ların hidrodinamik çap ve zeta potansiyelleri..... | 67 |
| Tablo 3.2. Fe ₃ O ₄ nanopartikül miktarı sabit (0,5 mg), fakat değişik konsantrasyonlarda PpIX (20; 40 ve 60 µM) kullanılarak üretilen PpIX yüklü ML'ların hidrodinamik çap ve zeta potansiyelleri..... | 68 |
| Tablo 3.3. Değişik miktarlarda (0,175; 0,35 ve 0,5 mg) Fe ₃ O ₄ nanopartikülleri eklenerek elde edilen PpIX yüklü ML'ların diyaliz edilen ve edilmeyen örneklerdeki demir içerik miktarları..... | 68 |
| Tablo 3.4. PpIX yüklü ML'ların % Fe kapsüllenme oranı. | 69 |

ŞEKİLLER

| | Sayfa |
|---|--------------|
| Şekil 1.1. Nanoskalanın temsili gösterimi. | 5 |
| Şekil 1.2. Kanserde nanoteknolojiden yararlanma alanları..... | 6 |
| Şekil 1.3. Şekilde antikanser terapide klinikle en çok ilişkili hedefleme stratejileri görülmektedir: Aktif ve pasif hedefleme. | 8 |
| Şekil 1.4. Pasif Hedeflemede nanopartiküllerin kan damarlarından kanserli bölgeye geçişini..... | 10 |
| Şekil 1.5. İki farklı fenomen nedeniyle oluşan gelişmiş geçirgenlik ve tutma etkisi: kan damarlarından kolloidlerin ekstrasvazasyonu ve difüzyon ve konveksiyon yoluyla tümör ekstraselular matrisin daha sonraki hareketi... | 12 |
| Şekil 1.6. Aktif ve pasif hedefleme ile nanopartiküllerin tümör dokusuna geçişi | 17 |
| Şekil 1.7. Lipozom, Çok tabakalı vezikül, Büyük tek tabakalı vezikül, Küçük tek tabakalı vezikül ve lipit çift tabakanın çizim şekli gösterilmiştir..... | 24 |
| Şekil 1.8. Paketleme parametreleri ve bununla ilişkili şekil değişiklikleri | 27 |
| Şekil 1.9. Hidrofilik partiküller ve akışkan lipozom fazında Lipozom/nanopartikül karışık sistemlerinde oluşan muhtemel mekanizmanın çizimi. Membran ve nanopartiküller arasında yeterli derecede çekici kuvvetlerin olduğu kabul edilmektedir..... | 32 |
| Şekil 1.10. Küçük nanopartikül ile desteklenen fosfolipit çift tabakanın dış ve iç yaprakları arasında kenetlenmenin şematik çizimi..... | 34 |
| Şekil 1.11. DOPC lipidiyle oluşturulan LUV'larda yerleşen silika nanopartiküllerin Kryo-TEM görüntüleri. Siyah oklar DLÇT içindeki nanopartikülleri, yıldız işareti ise serbest nanopartikülü göstermektedir. Bar 50 nm uzunluğunu temsili etmektedir..... | 35 |
| Şekil 1.12. Vezikül dekorasyonunun şematik çizimi ve partikül adsorpsiyonu nedeniyle lokal membran bükülmesi (A). Yüklü nanopartiküllerin elektrostatik itme etkisi (siyah oklar) nedeniyle lipozom dağılımında koloidal kararlılık..... | 37 |
| Şekil 1.13. Hidrodinamik yarıçapı ($R_h \approx 40$ nm) olan DPPC vezikülünün su içinde farklı miktarlarda silika nanopartiküller ($R_h \approx 8$ nm) ile etkileşiminin dekore edilen veziküllerin ortalama yarıçapındaki değişim..... | 37 |

| | |
|--|----|
| Şekil 1.14. DLPC (dilaurolyfosfotidilkolin) lipozom süspansiyonunun nanopartiküllerle kararlı hale getirilmesinin şematik gösterimi. Çerçeve içinde zwitterionic lipidin dipolar baş gurubu şematik diyagramı gösterilmektedir..... | 38 |
| Şekil 1.15. Membran İnternalizasyonu. (A)-Küçük tek tabakalı veziküllerle çevrelenmiş vezikül-nanopartikül hibrit yapısının CryoTEM görüntüsü. (B)-Janus veziküllerin CryoTEM görüntüsü. (C)-Membranda hidrofobik nanopartiküllerin internalize oluşunun şematik gösterimi..... | 41 |
| Şekil 1.16. Jablonski Diyagramı: Elektronik olarak temel durumdan enerji soğurarak uyarılmış duruma geçen moleküllerde enerji geçişini göstermektedir | 47 |
| Şekil 1.17 FDT’de reaksiyonlar..... | 48 |
| Şekil 1.18 Fotosensitif ajanların sınıflandırılması; A) porfirin tabanlı olanlar, B) porfirin tabanlı olmayanlar | 50 |
| Şekil 1.19. Protoporfirin IX molekül yapısı..... | 51 |
| Şekil 1.20. Dışarıdan ALA uygulanmasıyla dokuda PpIX oluşumunun indüklenmesinin şematik gösterimi. | 52 |
| Şekil 1.21. Zeta Potansiyelin şematik gösterimi..... | 57 |
| Şekil 2.1. Çalışmada kullanılan fosfolipitlerin molekül yapılarının gösterimi. (A) DPPC, (B) DSPE-PEG2000 lipitlerini göstermektedir..... | 59 |
| Şekil 3.1. (A) Floresans yoğunluğuna bağlı olarak PpIX yüklü manyetolipozomların % PpIX taşıma kapasitesi. (B) PpIX yüklü manyetolipozomlarda kapsüllenen PpIX miktarının konsantrasyon olarak ifadesi..... | 70 |
| Şekil 3.2. 37 ve 42 °C sıcaklıklarda değişik miktarlarda PpIX yüklü manyetolipozomlardan sıcaklığa bağlı PpIX serbestleme oranları..... | 71 |
| Şekil 3.3. PpIX yüklü ML’ların ve Nanopartiküllerin sabit manyetik alan etkisindeki manyetik cevaplarının spektrofotometrik görüntüsü..... | 72 |
| Şekil 3.4. Fe ₃ O ₄ nanopartikülleri, Manyetolipozmlar ve PpIX yüklü manyetolipozomların TEM görüntüleri..... | 73 |
| Şekil 3.5. Fe ₃ O ₄ nanopartikülünün XRD grafiği..... | 74 |

| | |
|---|----|
| Şekil 3.6. MCF-7 hücre hattına 25 ile 350 nM aralığında, değişik konsantrasyonlarda PpIX yüklü manyetolipozom, lipozom ve manyetolipozom eklenmesinin 24 saat sonraki hücre canlılığı sonuçları gösterilmiştir..... | 75 |
| Şekil 3.7. MCF-7 hücre hattına 25 ile 350 nM aralığında, değişik konsantrasyonlarda PpIX-ML, lipozom ve ML eklenmesinin 48 saat sonraki hücre canlılığı sonuçları gösterilmiştir..... | 76 |
| Şekil 3.8. Değişik konsantrasyonlarda PpIX-ML içeren MCF-7 hücrelerine 1, 3 ve 5 dk süresince ışık uygulanması sonucundaki 24 saat sonraki hücre canlılığı gösterilmiştir..... | 77 |

1. GİRİŞ

Kanser normal hücre çoğalmasında etkin olan homeostatik mekanizmalarda genetik değişikliklerin aşamalı birikimi sonucu neoplastik hücrelerin oluşmasıyla kendini gösteren kompleks bir hastalıktır (Hahn ve Weinberg 2002). Mevcut teşhis ve prognoz sınıflandırması tümörlerin bütün klinik farklılığını yansıtmamaktadır, bu nedenle tedavi yaklaşımı ve test sonuçlarındaki başarı her zaman istenilen seviyede değildir (Petricoin ve ark 2002). Mevcut antikanser ajanların büyük çoğunluğu kanserli ve sağlıklı hücreleri ayırt edememektedir; bu nedenle sistemik toksisite ve yan etkiler ortaya çıkmaktadır. Buna ek olarak kanser hücreleri vücudun diğer bölümlerine yayıldığında yani metastaz gösterdiğinde tanı ve tedavi için gecikilmiş olunur. Klinik verilere göre hastaların %60'ından fazlasında meme, akciğer, kolon, prostat ve ovaryum kanserleri gizlenmiş veya açıkça görülen metastatik koloniler şeklinde ortaya çıktığı bildirilmektedir (Menon ve Jacobs 2000). Bu safhada terapötik yaklaşımın etkinliği kısıtlıdır. Bu problemlerden dolayı ABD'de kanserden ölen yetişkinlerin sayısı kalp hastalıklarından ölenlere yetişmiştir (Renee Twombly 2005). Türkiye'de kalp hastalıklarından ölenlerin sayısı kanserden ölenlerin sayısından iki kat daha fazladır (Gültekin 27/04/2014).

Kanser bilim insanlarının üzerinde uzun yıllardır çalıştıkları fakat kesin tedavisi bulunamamış bir hastalıktır. Ancak tedavi amaçlı cerrahi operasyon, radyoterapi ve kemoterapi gibi yöntemler geliştirilmektedir. Bu terapi yöntemleri hasta ömrünü uzatmış fakat her kanser türü için tam bir tedavi sağlayamamıştır. Fotodinamik terapi (FDT) ilk kez 1993 yılında Kanada'da resmi olarak uygulanmaya başlanan ve sonrasında sırasıyla ABD, Avrupa, Japonya ve Avustralya'da uygulamaya konulan, özellikle kanser tedavisi için kullanılan bir alternatif tedavi yöntemidir. Türkiye'de FDT henüz kanser tedavisi için Sağlık Bakanlığından onay almamıştır (Dolmans ve ark 2003).

Kanada Sağlık Bakanlığı 1993 yılında hematoporfirin türevi olan Photofrin® [Axcan Pharma, Kanada] isimli ilacın FDT yöntemiyle kanser tedavisinde kullanımına onay vermiştir. Takiben ABD'de Amerikan gıda ve ilaç dairesi (FDA) kurumu özafagus kanserinde ve küçük hücreli dışı akciğer kanserinde Photofrin® isimli ajanın FDT'de kullanılmasını onaylamıştır. 2003 yılında FDA Kurumu prekanseröz olarak isimlendirilen

Barret özafaguslu hastalarda Photofrin kullanımına izin vermiştir. Sonuçta, 1993 yılından bu yana Protoporfirin IX (PpIX) öncülü olan Levulan® [ABD], Benzoporfirin türevi olan Vertofrin® [Kanada], mTHPC türevi olan Foscan® [Almanya], Lutesyum teksafirin türevi olan Lutrin® [ABD], Klorin-e₆ türevi olan NPe6® [Japonya] isimli fotosensitif ajanlar klinikte FDT ajanları olarak kullanılmaya başlanmıştır (O'Conner 2009).

Fotosensitif ajanlar özafagus, akciğer, mide, serviks ve mesane kanserlerinin tedavisi için kan dolaşımına enjekte edilmektedir ve fotosensitif ajanların kanserli hücrelerde birikimi çevresindeki normal hücrelere göre belirgin olarak fazladır (NCI, 13/04/2014). Kanserli ve normal hücrelerde birikim oranı fotosensitif ajanın türüne, kanserli bölgenin damarlanmasına, ajanın kandaki konsantrasyonuna ve kişisel farklılıklara göre değişiklik gösterebilmektedir. FDT'de ilaç uygulamasından yaklaşık 48 saat sonra (24-72 saat aralığında) kanserli bölge fotosensitif ajanı uyaracak dalga boyuna sahip görünür ışığa maruz bırakılır. Işığın soğurulması, fotosensitif ajanın moleküllerinin enerji düzeyinin temel düzeyden singlet uyarılmış enerji düzeyine yükseltir. Bu durumdaki molekül temel düzeye dönerken enerjisini ortamdaki moleküler oksijene vermesiyle burada yüksek oranda aktif bir oksijen türü olan singlet oksijen veya reaktif oksijen türleri oluşur (Bilgin 1999). Oksijenin bu aktif formu etrafındaki hücrelerin ölümüne neden olacak kimyasal olayları başlatmaktadır. FDT'nin en büyük yan etkisi vücutta kalan ajan miktarına bağlı olarak gelişen değişik derecelerde yanma, eritem, ödem ve bül oluşumuyla klinikte kendini gösteren ışığa aşırı duyarlılık reaksiyonlarıdır. Hastaların güneş ışığına veya kuvvetli beyaz ışığa maruz kalınması sonucu klinikte kendini ikinci veya üçüncü derece yanıklarla gösterebilecek bir tablo ortaya çıkabilmektedir. Kullanılan fotosensitif ajanın vücuttan tam anlamıyla atılması zaman aldığı için hastalar güneş ışığına ve evlerde kullanılan kuvvetli beyaz ışığa hassasiyet göstermektedirler. Bu süre içinde kişi gündüz dışarı çıkarken elleri dahil bütün vücudunu kapatacak elbiseler giymelidir aksi takdirde güneş ışığı vücuttaki fotosensitif ajanı aktif hale getirerek ciddi güneş yanıklarına neden olabilmektedir. Gözler, koyu güneş gözlükleri kullanılarak korunmalı, aksi takdirde gözlerde ciddi zararlar oluşabilmektedir. Bununla beraber uygulamada klinik duruma bağlı olarak öksürük, yutkunmada zorlanma, mide ağrısı, nefes alırken ağrı ve kısa aralıklarla nefes alma gibi geçici yan etkilerde görülebilmektedir (NCI 13/04/2014, O'Conner 2009). FDT gelecek vadede oldukça etkili bir terapi yöntemi olsa da terapi sonrası uzun süren yan etkileri, oluşabilecek komplikasyonlar sonucu hastanede

kalma süresine bağılı olarak değişen ekonomik kayıplar ve dikkatsizce ışığa çıkma sonucu vücutta ciddi yanıklara neden olabilme gibi çözüm bekleyen sorunları da bulunmaktadır.

Lipozomlar en çok çalışılan ilaç dağıtım sistemlerindedir ve bugün biyoilaç nanoteknoloji araştırmalarında belirgin oranda göze çarpmaktadırlar. Lipozomlar hem topikal hem de sistemik ilaç uygulamalarında ilaç dağıtıcı araçlar olarak yoğun bir şekilde kullanılmaktadır ve FDT’de fotosensitif ajanların dağıtımında yüksek potansiyele sahiptirler. Lipozomların lipit çift tabakası yüksek hidrofobik fotosensitif ajanlar ile birleşebilmekte ve saflaştırılmış porfirinler ve Zn (II)-fitalosiyanin gibi monomer şeklinde fotosensitif ajanlar bu çift tabaka arasında birikebilmektedir (Postigo ve ark 2004, Junior ve ark 2006). Fotosensitif moleküllerin büyük çoğunluğu hidrofobiktir ve sulu ortamlarda toplanma eğilimi göstermektedirler. Bu durum fotosensitif ajanın fotofiziksel (singlet oksijen oluşumunda azalma), kimyasal (düşük çözünme) ve biyolojik özelliklerini etkilemektedir (Bechet ve ark 2008). Lipozomlar sistemik dağılım yoluyla uygulandığında, lipozom içeren yapılar fotosensitif ajanlar için kararlı bir formülasyon göstermekte ve kan dolaşımı sırasında fotosensitif ajanları metabolize olmaktan korumaktadır ve plazmada aktifliğini kaybetmesini önlemektedir (Jin ve Zheng 2011). Lipozom hazırlamada kullanılacak fosfolipitlerin ve lipozom hazırlama metodunun seçiminde; lipozomların büyüklüğü, yüzey yük yoğunluğu ve membran sarımı kısıtlamaları gibi lipozomların fiziksel ve kimyasal karakterizasyonu hayati önem taşır. Bu lipozomal membran özellikleri kan dolaşımını, ilaç yükleme ve serbest bırakma kapasitesi gibi farmakokinetik özelliklerini etkilemekte ve bu nedenle de lipozomların terapötik etkinliği etkilenmektedir (Drummond ve ark 1999, Nagayasu ve ark 1999).

Manyetolipozomlar kanserli dokuların MR görüntüleme tekniğiyle görüntülenmesi için geliştirilen fakat ilaç dağıtım özelliği de bulunan son yıllarda üzerinde araştırmaların arttığı bir konudur. Bu çalışmada kanserli dokularda kontrollü ilaç salımı yaparak fotodinamik terapiyi gerçekleştirebilecek manyetolipozomların üretimi ve karakterizasyonunun yapılması amaçlanmıştır.

Bu çalışmada amacımız:

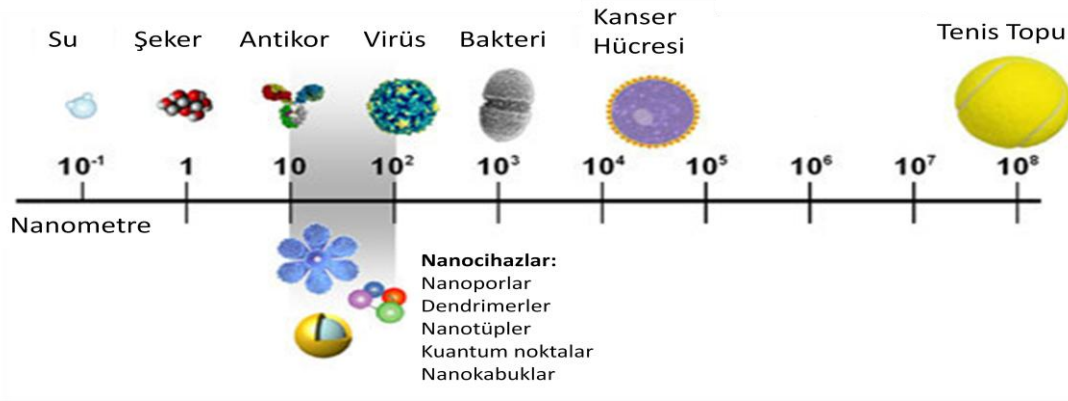
(1) fotosensitif bir ajan olan protoporfirin IX (PpIX)’u manyetik lipozomlara yüklemek,

- (2) manyetolipozomların zeta potansiyel, manyetik türbidite, lipozom boyutu ve ne kadar ilaç taşıdığı gibi özelliklerinin karakterizasyonlarını yapmak,
- (3) lipozomların sıcaklığa bağlı ilaç serbestleme düzeylerini belirlemek,
- (4) lipozomların selonoid içinde 50Hz frekansında alternatif akım ile oluşturulan elektromanyetik alan altındaki ısı değişimini incelemek,
- (5) hücre kültüründe PpIX taşıyan ve taşımayan manyetolipozomların değişik konsantrasyonlarda toksisitesini ölçmek,
- (6) hücrelerin PpIX taşıyan ve taşımayan manyetolipozomlarla inkübe edilmesi ve sonrasında ışığa maruz bırakılması sonucu hücre toksisitesindeki değişimi incelemektir.

1.1. Nanoteknoloji

Nanoteknoloji moleküler çizelgede ölçülebilen çok küçük cihazların mühendisliği ve geliştirilmesidir. Bu yeni gelişmekte olan alan fizik, kimya, mühendislik, enformasyon teknolojisi, malzeme bilimi ve biyoloji gibi farklı disiplinlerden bilim insanlarını içermektedir. Nanoteknoloji, elektronik, manyetik, optik, enformasyon teknolojisi, malzeme geliştirme ve biyotıp gibi hayal edebildiğiniz hemen her alanda uygulama alanı bulabilmektedir (National Cancer Institute 21/04/2014).

Nano skaladaki aletler insan hücrelerinden 100-1000 defa daha küçüktür (Şekil 1.1). Enzim ve reseptör gibi büyük biyomoleküllere yakın büyüklükte dirler. Örneğin hemoglobin 5 nm çapındadır. 50 nm den küçük cihazlar birçok hücreye rahatlıkla girebilmektedirler, 20 nm den küçük olanlar ise kan dolaşımı sırasında damarların dışına çıkabilmektedirler (National Cancer Institute 21/04/2014).



Şekil 1.1. Nanoskalanın temsili gösterimi (National Cancer Institute 21/04/2014).

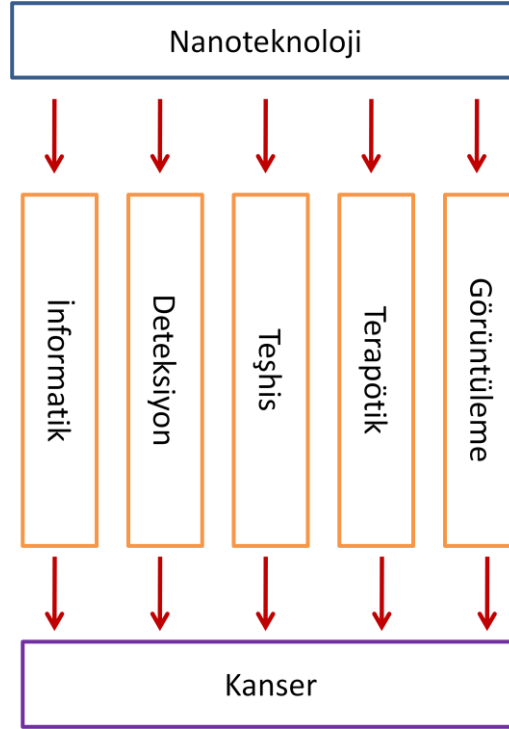
Küçük boyutlarından dolayı nano cihazlar biyomoleküllerle hücre yüzeyinde veya hücre içinde kolaylıkla etkileşime geçebilmektedir. Vücudun birçok alanına girebilmelerinden dolayı hastalıkların teşhisinde ve daha önce hayal edilemeyen tedavi edici yolların geliştirilmesinde potansiyel rolleri bulunmaktadır.

1.1.1. Kanser ve Nanoteknoloji

Kanser nanoteknolojisine bağlı olarak nanomateryaller geniş çapta incelenmekte ve geliştirilmektedir. Bunlar polimerler, dendrimerler, lipidler, organometalik ve karbon tabanlı materyallerdir (Alexis ve ark 2008, Cho ve ark 2008). Kanserde nanoteknoloji uygulamaları için spesifik nanomateryallerin seçimi düşünüldüğünde biyouyumluluk, toksisite, boyut, yüzey kimyası ve biyolojik sistemler için gerekli olan başka özelliklerin göz önünde bulundurulması gerekmektedir (National Cancer Institute 21/04/2014).

Nanopartikülleri diğer kanser terapötiklerinden ayıran kendilerine özgü dört özelliği bulunmaktadır (Heat ve Davis, 2008). Bunlar; 1-) Nanopartiküllerin kendileri terapötik veya teşhis özelliği nedeniyle terapötikler taşıyabilecek şekilde tasarlanabilir. 2-) Nanopartiküller multivalent hedef liganda bağlanabilir, bu hedef hücre için yüksek afinite ve spesiflik ürünüdür. 3-) Nanopartiküller çoklu ilaç moleküllerini üzerlerinde taşıyabilir şekilde getirilebilir; bu eşzamanlı olarak kombine kanser terapisi anlamına da gelmektedir. 4-) Nanopartiküller geleneksel ilaç direnç mekanizmalarını bypass edebilirler. (Şekil 1.2)

Nanopartiküller ve nanopartikül formunda hazırlanan terapötikler, kanser terapötiklerine ve devam eden klinik araştırmalara uyum sağlayabilmektedirler (Peer ve ark 2007). Bu formülasyonlar mevcut terapötiklere göre nanopartiküllerin etkinliğini artırmakta ve toksikliğini düşürmektedir.



Şekil 1.2. Kanserde nanoteknolojiden yararlanma alanları

Nanoteknolojinin terapötik ve teşhis amaçlı ajanların güvenli ve daha etkili bir şekilde vücuda dağılımının gerçekleştirilmesinde kullanımının temelleri 40 yıldan daha uzun süre önce atılmıştır. Son yıllarda nanoterapötik ve nanoteşhis alanlarında ticarileşmeye başlamış ürünlerin ortaya çıkması veya klinik aşamaya geçmesiyle bu vizyonun gerçekleştirilmesi, daha gerçekçi bir hal almaya başlamıştır (Bertrand ve ark 2014). İlk klinik kanıt gen susturma işleminin 2010 yılında siRNA'ların nanopartikül aracılığıyla sistemik olarak uygulanması sonrası hedef bölgede gerçekleştirilmesiyle gösterilmiştir (Davis ve ark 2010). Buna paralel olarak aktif olarak hedeflenen ilk polimerik nanopartiküllerin klinik araştırmaları, küçük bir ilaç molekülü olan dosetaksel için yayınlanmıştır. Şu ana kadar az sayıda nano boyutta ilaç taşıyıcıların, insanlar için kullanımı onaylanmış olsa da, nanoteknolojinin gelecek yıllarda onkolojistlerin yaygın şekilde kullanacakları terapötik bir silah olacağı kabul edilmektedir (Bertrand ve ark 2014).

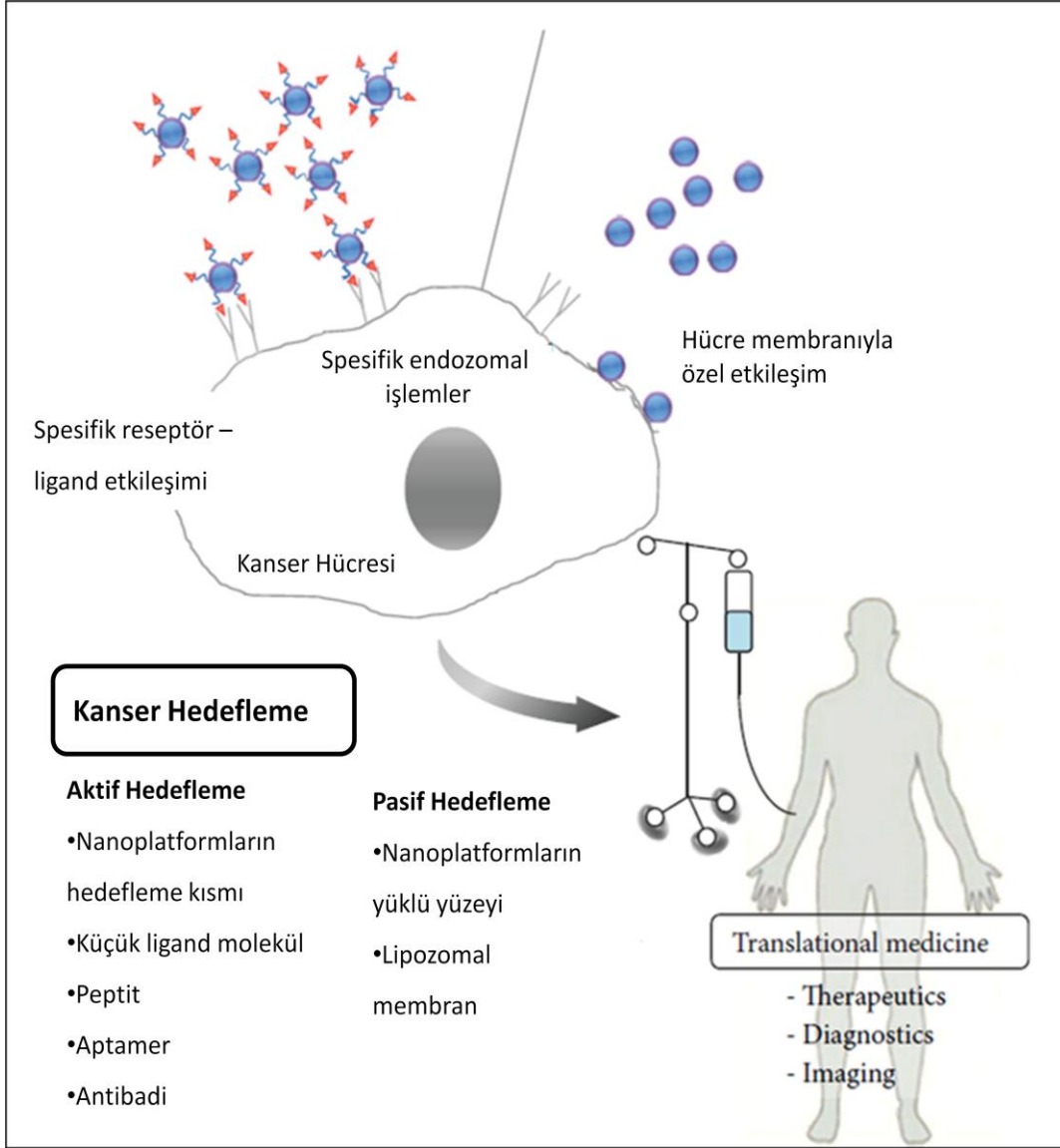
Nanopartiküller düşük çözünürlük özelliğine sahip ilaçların kapsüllenmesine olanak sağlarlar (Kipp 2004), terapötik molekülleri korur ve onların kan dolaşımındaki kararlılığına ve doku dağılımına katkıda bulunurlar (Bertrand ve Leroux 2012). Bu özellikler, geniş kapsamlı toksisite ve fizikokimyasal etkileşim sergileyen, sitotoksik özellik gösteren moleküllerin kapsüllenecek şekilde onkolojide kullanılmasında ilgi çekici olmaktadır. Örneğin doksorubisin lipozom içinde kapsüllenecek şekilde sitotoksik olan bu ilacın kardiyak toksisitesi düşürülürken (O'Brien ve ark 2004), albuminle kararlaştırılmış paklitaksel, hastaların ilaç dozlarını yüksek oranda tolere edebilmesini sağlamıştır (Cortes ve Saura 2010).

1.1.2. Nanotoksikoloji

Nanomateriyallerin insan uygulamalarına yönelik toksikolojik etkileri göz önünde bulundurulması gerekmektedir. Materyallerin yapı, boyut, boyut dağılımı, topaklanma, şekil, yüzey yükü, yüzey kimyası ve yüzeyde tutunan türleri önemlidir ve bu karakteristiklerin her birinin etkileri sadece biyo uyumluluk açısından değil aynı zamanda hedef organdaki toksik etkisi ve temizlenme pateni göz önünde bulundurularak değerlendirilmesi gerektiği bildirilmektedir (Powers ve ark 2006). Nanotoksikoloji açısından nanomateriyalin in vivo uygulamalarının immün sistemi tetiklemesi veya baskılaması durumları da dikkate alınması gerekmektedir.

1.1.3. Nanomateriyallerin Kanser Bölgelerine Dağılımı

In vivo kanser nanoteknolojilerinin görüntüleme ve terapötik uygulamalarında başarı sağlamak için nanomateriyal kanser bölgelerine dağılmalıdır (Lammers ve ark 2008). İlaç hedefli kanser terapilerinde birçok nanobiyomateriyal tabanlı platformlar üretilmiştir (Şekil 1.3). Bu platformların büyük çoğunluğu “pasif hedefleme” adı verilen lipozom, polimer, misel ve nanopartikül gibi platformlara konjuge ve/veya kapsüllenmiş terapötik ilacın uzun süreli dolaşımında kalmasına bağlıdır (Jin ve ark 2014). Birçok görüntüleme ve terapötik uygulamalarında kanser bölgelerini seçici ve dağıtıcı nanomateriyallerin miktarı, en uygun seviyelerde olmalıdır (toksik etkiden kaçınmak için). Antikanser ilaçların kanser tedavilerinde etkili olabilmelerinde ideal olanı ilacın istenen tümör dokusuna en kısa sürede en az hacimsel ve aktivite kaybı ile ulaşmasıdır (Bertrand ve ark 2014).



Şekil 1.3. Şekilde antikanser terapide klinikle en çok ilişkili hedefleme stratejileri görülmektedir: Aktif ve pasif hedefleme. (Jin ve ark 2014)

İlacın hedef tümör dokusuna etkin bir şekilde dağılması, nanopartikülün kan dolaşımında uzaklaştırılmadan yeterli süre kalmasına bağlıdır. Yüzeyi modifiye edilmemiş nanopartiküller genellikle dolaşım sırasında retikuloendotelial sistem (karaciğer ve dalak gibi) tarafından boyut ve yüzey karakteristiğine göre yakalanmaktadır (Moghimi ve ark 2001).

Tümör dokusuna ulaştıktan sonra ilaç aktif formunun kontrollü salınımla tümör hücrelerini seçici olarak öldürürken normal hücreleri etkilememesi beklenmektedir. Bu iki

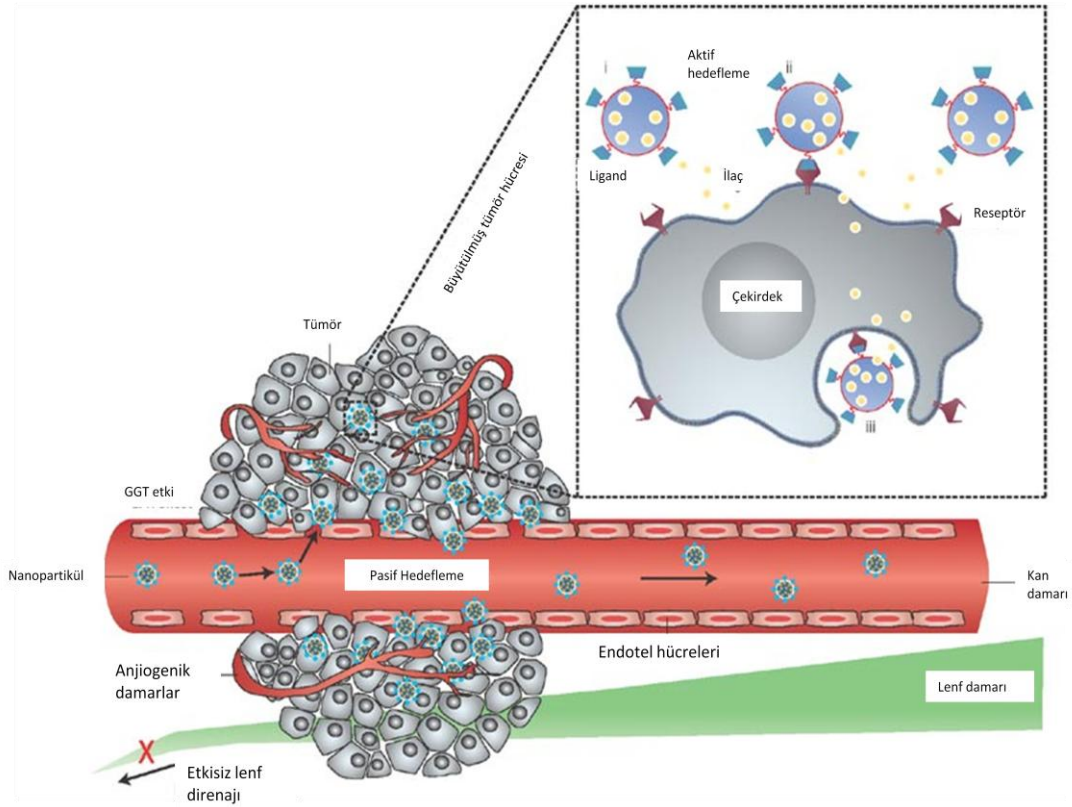
temel strateji ilacın intraselular konsantrasyonunu artırırken doza bağı toksisitesini düşürerek hastanın yaşam kalitesini artırmaktadır. Nanopartiküller bu iki gereksinimi de sağlayabilecek potansiyele sahiptir (Jin ve ark 2014). Bu konuda iki genel yaklaşımdan istifade edilmektedir. Bunlar pasif ve aktif hedeflemedir.

1.1.4. Pasif Hedefleme

Nanopartiküllerde pasif hedefleme, tümörlerde nanopartiküllerin toplanması için tümör kan damarlarının endotelleri içinde oluşan 100-600 nm boyutlarında normal olmayan oluklu bağlantılara (abnormal gap junctionlara) bağlıdır (Maeda ve Matsumura 1989). Nanopartiküllerin pasif hedeflemesinde başarılı olabilmek için yarı ömürlerinde uzun sirkülasyonlar yapabilen partiküllerin geliştirilmesi (partiküllerin hidrofilik polimer, polietilen glikol (PEG) ile kaplanması gibi) en çok istenen şeklidir ve bu tip yapılar partiküllerin tümörlerde pasif toplanmasında tercih edilmektedir (Cho ve ark 2008, Lammers ve ark 2008). Tümör dokularının kendine özgü patofizyolojik karakteri makromolekül ve nanopartiküllerin tümör dokularında birikimini sağlamaktadır. Tümör dokusu belli bir büyüklüğe ulaştığında sahip olduğu normal damar yapısı ihtiyacı olan oksijeni sağlayamaz. Hücreler ölmeye başladığında büyüme faktörleri salınımı başlar ve böylece çevredeki kapillerlerden yeni kan damarlarının tomurcaklanmasını tetiklenir (Bates ve ark 2002). Hızlı gelişen kanser hücreleri yeni damar oluşumlarına (neovaskülarizasyon) gereksinim duymakta ya da tümör kütesinin yakınındaki damarları yeniden yönlendirerek kendisine besin ve oksijen sağlamaktadır (Şekil 1.4.) (Cho ve ark 2008). Kapillerlerde oluşan bu yeni pencerelerin büyüklüğü 200 ile 1200 nm arasında olmakta hatta 2000 nm'ye kadar değişmektedir. Pencerelerdeki büyüklük farklılığı tümörün çeşidine, çevresine ve lokalizasyonuna göre değişiklik göstermektedir (Hobbs ve ark 1998). Büyüme faktörleri ve matriks metaloproteinaz gibi anjiyojenik düzenleyicilerdeki dengesizlik tümör damarlarının yüksek oranda düzensiz olmasına ve damar endotel hücreleri ile lenfatik drenajlar arasında çok sayıda por oluşumuna neden olmaktadır. Bu özelliğe gelişmiş geçirgenlik ve tutma etkisi (GGT etki) adı verilmektedir; moleküler ağırlığı 50 kDa'dan az olan makromolekül ve nanopartiküller tümör dokuları arasında seçici olarak toplanabilmektedirler (Cho ve ark 2008).

Normal dokularda ekstraselular sıvı sürekli olarak lenfatik damarlara yaklaşık 0,1-2 µm/s hızla boşalmaktadır (Swartz ve Fleury 2007). Bu sürekli boşalma ve interstisyel sıvının

yenilenmesi sayesinde ekstravaze olmuş çözünen maddeler ve kolloidler dolaşıma geçerek geri dönüşüm sağlanmaktadır. Tümörlerde lenfatik işlev arızalıdır ve bu nedenle interstisyel sıvının geri alımı çok az olmaktadır (Padera ve ark 2004). Sonuç olarak kolloidlerin konvektif (taşınımlı) güçlerle dolaşıma geçişi sağlanmaz. Dört nm'den küçük moleküller kan dolaşımına geçip tekrar emilebilirken, büyük hidrodinamik çapa sahip makromoleküller ve nanopartiküllerin kan dolaşımına difüzyonu engellenmektedir. Bu nedenle perivasküler boşluğa ulaşan nanopartiküller etkili olarak temizlenemezler ve tümör interstisyumunda birikirler. Bu özellik gelişmiş geçirgenlik ve tutma etkisinin tutma bileşenini temsil etmektedir (Bertrand ve ark 2014).

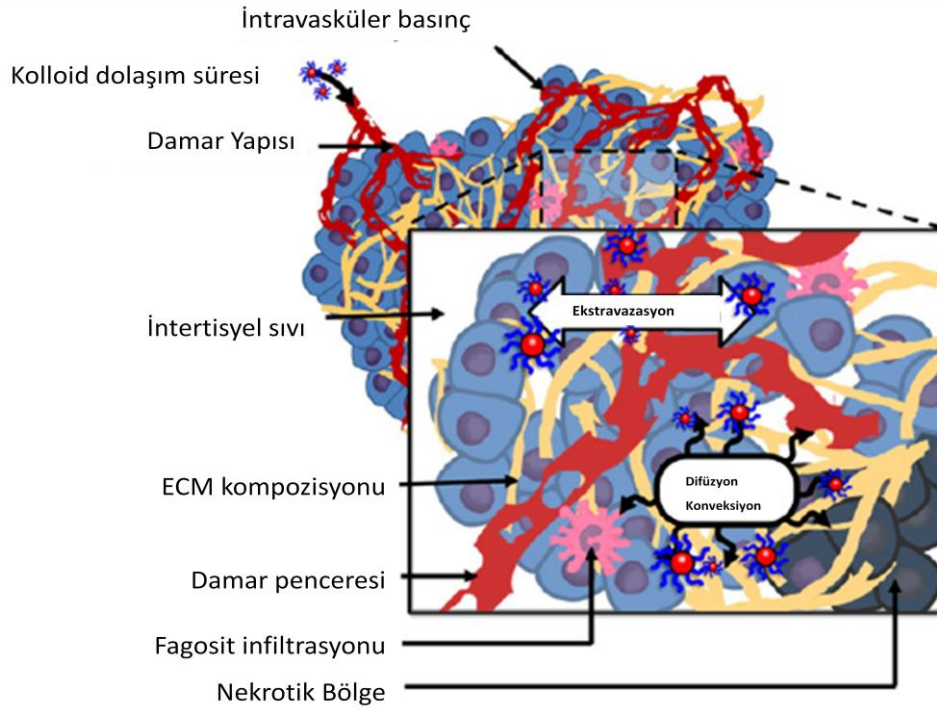


Şekil 1.4. Pasif Hedeflemede nanopartiküllerin kan damarlarından kanserli bölgeye geçişi. Polimerik nanopartiküllerin temsili çizimi (daire şeklinde) gösterilmektedir. Pasif doku hedefleme tümör damar sisteminin artan geçirgenliği ve etkisiz lenfatik drenajı etkisiyle nanopartiküllerin ekstravazasyonu elde edilir (GGT etki). Aktif hücre hedefleme nanopartikül yüzeyinin ligandlar ile fonksiyonel hale getirilerek hücreye özgü tanıma ve bağlanma özelliklerinin geliştirilmesiyle elde edilir. Nanopartiküller (i) hedef hücreye yakın bölgede içeriklerini serbest bırakabilir; (ii) hücre membranına bağlanarak bu bölgeye sürekli ilaç salan

depo gibi davranabilir; (iii) hücre içine geçerek ilacı hücre içinde serbestleyebilirler. (Peer ve ark 2007)

Değişmiş lenf drenajları tümörlerin karakteristiklerindedir ve nanopatiküllerin tümör içinde tutulmasında önemlidir. Genelde küçük boyutta partiküllerin tümör içine ekstrasvazasyonda uygun olduğu düşünülmektedir (Yuan ve ark 1995, Kong ve ark 2000). Partikül bileşimi ve şekli partikül alımını belirleyen faktörlerdendir fakat bu ilişki iyi karakterize edilememiştir (De Jong ve Borm 2008). Lenfatik drenajın kanserli kitle genelinde homojen olmadığı kabul edilmektedir. Mekanik stresin daha düşük olduğu düşünülen tümör sınırındaki fonksiyonel lenfatik damarların, açık lenfatik kısımlarının intratümöral bölgede bulunanlardan daha fazla olduğu bulunmuştur. Bu nedenle tümörde nanopatikül birikiminde tümördeki lenfatik fonksiyonların heterojenliği de rol oynamaktadır (Padera ve ark 2004).

Katı bir tümörde, moleküllerin tümöre dağılımı en az üç ayrı fakat ilişkili fenomen tarafından yönetilmektedir; kan damarlarından koloitlerin ekstrasvazasyonu, ekstrasvasküler doku yoluyla daha fazla difüzyon ve tümör ortamı içinde hücre içi ve/veya hücre dışı hedefler ile etkileşimdir (Şekil 1.5). İlk ikisi difüz ve konvektif kuvvetlerin sonucudur ve tümör biyolojisi ve difüzyon türlerinin özelliklerine göre eş zamanlı etki gösterebilirler. Üçüncü parametre daha karmaşık ve daha az anlaşılırdır. Bu koloitlerin tümör ile etkileşiminin adsorbsiyon, hücre içine alımı ya da bozulma ve metabolizma yoluyla olup olmadığını göstermektedir. Bu faktörler tümör içindeki birikim dengesini etkileyebilir; bu da malzemenin doğasına, doku ve tümör kompozisyonunun tüm bileşenlerindeki (ekstraselular matrisin doğası, hücrelerin çeşidi gibi.) benzerlik ve ilgisine bağlıdır. Bu etkileşimleri tam anlamıyla değerlendirmek için yeterli bilgimiz henüz bulunmamaktadır (Bertrand ve ark 2014).



Şekil 1.5. İki farklı fenomen nedeniyle oluşan gelişmiş geçirgenlik ve tutma etkisi: kan damarlarından kolloidlerin ekstravazasyonu ve difüzyon ve konveksiyon yoluyla tümör ekstraselular matrisin (ECM) daha sonraki hareketi (Bertrand ve ark 2014).

Gelişmiş geçirgenlik ve tutma etkisi katı tümörlerin anatomik ve patofizyolojik farklılıkları nedeniyle antikanser ilaçların tümör hedef bölgesine dağılımı ve geliştirilmesinde büyük önem arz etmektedir. Pasif hedefleme yöntemi göz önünde bulundurularak geliştirilen ve klinik kullanımı onaylanmış ilaçlara Doxil® (Avrupada Caelyx®; lipozomal doksorubisin), DaunoXome® (lipozomal daunorubisin), DepoCyt® (lipozomal sitarabine), Myocet® (pegile olmamış lipozomal doksorubisin), Oncaspar® (pegile L-asparaginaz), Abraxane® (albumin tabanlı paklitaksel), Gnexol-PM (paklitaksel içeren polimerik misel, Kore’de onaylı) örnek olarak verilebilir (Jin ve ark 2014). Klinik araştırmaları devam eden, pasif hedeflemede kullanılan bazı diğer nanoilaçlar Tablo 1.1’de gösterilmiştir.

Tablo 1.1. Kanser hedeflemede prelinik çalışmalar ve geliştirilmesi devam eden nanomateryaller (Jin ve ark 2014).

| Nanomateriyal | İlaç | Ortalama Büyüklik (nm) | Ligad/hedef | Açıklamalar | Uygulama Alanı | Referans |
|---|---|------------------------------|---|---|--|-------------------------------------|
| Lipozom | Doksorubisin | 108 | Cyclic Asn-Gly-Arg (cNGR) peptit/CD13 ve aminopeptidaz N | cNGR bezenmiş lysolipit içeren sıcaklığa hassas lipozom | İnsan fibrosarkoma (HT-1080), in vitro bağlanma çalışmaları | Negussie ve ark (2010) |
| Lipozom inorganik nanopartikül (altın nanopartikül, demiroksit nanoworms) | Doksorubisin | 55 | Ucu kesilmiş, tümör hedefli insan protein doku faktörü (tTFRGD) anjijojenik $\alpha_v\beta_3$ reseptörlerine bağlanarak pıhtılaşmayı indükleme, tümörlerde sıcaklığa özgü pıhtılaşma kaskatları aktivasyonu | Sinyal modülleri (PEG ile dekore altın nanoçubuklar, tümör hedefli ucu kesilmiş doku faktör proteini) tümörü hedefler ve sonra lokal pıhtılaşma kaskatlarını aktive ederek dolaşımdaki teşhis ve terapötik amaçlı nanopartiküller (demir oksit nanoworms, Doksorubisin yüklü lipozom) tümör bölgesinde pıhtı hedefli toplanır. | In vivo MDA-MB-435 xenograft tümör, i.v. enjeksiyon | Von Maltzhan ve ark (2011) |
| Lipozom karbon nanotüp | Paklitaksel | 164 | Anti-Erb2 (Her2) mAb | Nanomateriyalin herbiri PEG ile oluşturulmuş bir immunolipozom içinde kapsüllenmekte ve termal kararlı, pH duyarlı ve uzun süreli paklitaksel salınımı yapan pH duyarlı fosfolipitlerden oluşmaktadır. | SK-BR-3 ve BT-20 meme kanseri hücre hattı, in vitro sitotoksisite. | Huang ve ark (2013) |
| Polimerik nanopartikül | siRNA | 80x320 | - | Katyonik lipitle kaplanmış PLGA nanopartikülleri, özel yumuşak litografi partikül kalıplama işlemi | İn vitro prostat kanser hücre hattı | Hasan ve ark (2012) |
| Polimerik micell | 1,2 Diaminosikloheksan platin (II) (DACHPt) (oksaliplatin ana kompleksi) | 30 | - | Uzun süreli dolaşımda kalan, ilaç yüklü polimerik micell (TGF β inhibitörü ile geliştirilmiş tümör geçirgenliği) | Geçirgenliğizayf pankreatc tümör fare modeli (C26 veya BxPC3 tümörü) i.v. enjeksiyon A375/GFP | Cabral ve ark (2011) |
| Nanoconjugates | Splice-switching oligonucleotides (SSOs) (fosfordiaminat morfolino oligomer (PMO)) | 13 | RGD/integrin $\alpha_1\beta_3$, hücre yüzey proteini, tercihen anjijojenik endotelde üretilmiş. | Floresan etiketli, Albumin tabanlı nanokonjugat (küçük, yüksek oranda spesifik ve sitotoksik değil) | hücrelerinin küremsi tümörleri, üç boyutlu hücre kültüründe nanokonjugatların alımı ve geçişi. | Ming ve ark (2013) |

Tablo 1.1. devamı

| Nanomateriyal | İlaç | Ortalama Büyüklük (nm) | Ligad/hedef | Açıklamalar | Uygulama Alanı | Referans |
|--|---|------------------------|--------------------------------------|---|--|--------------------------|
| | Paklitaksel | 2-3 | Ultraküçük hyaluronik asit (HA)/CD44 | Paclitaxel ultraküçük HA (3-5 kDa) nanokonjugat, kanser hücrelerinin yüzeyinde paclitaxelin P-glukoprotein varlığındaki dışa akımı bypass ederek, CD44 reseptör varlığında endositozla hücre içine alınır. | MDA-MB-213Br meme kanseri kullanılarak, meme kanserinin beyin metastazı, i.v. enjeksiyon | Mittapalli ve ark (2013) |
| Altın nanopartikül | Altın nanopartiküllerinin patern tanıma yöntemiyle Kemiresistor olarak işlevselleştirilmesi | 5 | - | Akciğer kanseri olan hastaların nefes vermelerinin sensor dizisiyle nefes testi. | Akciğer kanserinin non-invaziv teşhisi, in vitro | Peng ve ark (2009) |
| Altın nanopartikül, Manyetik mikropartikül | PSA özgü ABS ve kısa DNA dizileriyle (barkot) altın nanopartikül kullanılarak PSA tespiti çalışması | 30 | Prostat spesifik antijen | PSA spesifik antikörlerle birleşmiş manyetik mikropartiküller hastaların serumunda PSA ayırma ve bu analitlerin tespiti için PSA spesifik anibodileri içeren altın nanopartiküller ve kısa DNA zincirleri bağlanması. | Ultrahassas protat kanser çalışması, in vitro barkot çalışması | Taxton (2009) |
| | Tek duvarlı karbon nanotüp ve floresan etiketleme | | 200-300 | Biyodağılım ve böbreklerde glomerular filtrasyonun tetkiki | NIR floresans görüntüleme, dinamik PET görüntüleme, in vitro (transwell'deki HK-2 hücreleri), in vivo (fare), i.v. enjeksiyon | Ruggiero ve ark (2010) |
| Karbon Nanotüp | Suda çözünen karbon nanotüpler (PEG, radio labeled ve RGD peptit ile işlevselleştirilmiş) | | 1-5 (çap) 100-300 (boy) | RGD-pegylated single-wall karbon nanotüp, radio labeled single-wall karbon nanotüp | U87 insan glioblastoma ve HT-29 insan kolarektal kanser hücre hattı, U87MG ve HT-29 tümör xenograft modelleri (biyodağılım için - PET), i.v. enjeksiyon. | Liu ve ark (2007) |

Tablo 1.1. devamı

| Nanomaterial | İlaç | Ortalama Büyüklik (nm) | Ligand/hedef | Açıklamalar | Uygulama Alanı | Referans |
|--------------|--|------------------------------|---|--|--|--------------------------|
| Grafen | Nanografen yaprak fototermal terapi amaçlı | 10-50 | - | Floresan etiket ile altı kollu PEG- Nanografen yaprak | 4T1 taşıyan Balb/c fareleri, KB ve U87MG xenograft model, fototermal terapi, i.v. enjeksiyon Farelerde teranostik ajan olarak tümör damarlanmasının hedefleme ve görüntülenmesi, in vitro (4T1 murin mem kanseri, MCF7 insan meme kanseri, insan karın veni endotel hücreleri), in vivo (4T1 mem kanser modeli), i.v. enjeksiyon. | Shi ve ark (2013) |
| | Fototermal terapi için indirgenmiş grafen oksit | 20-80 | Human/murine chimeric IgG1 mAb (TRC105)/both human and murine CD105 | RGO conjugated to the anti-CD105 antibody TRC105 | | Yang ve ark (2010) |

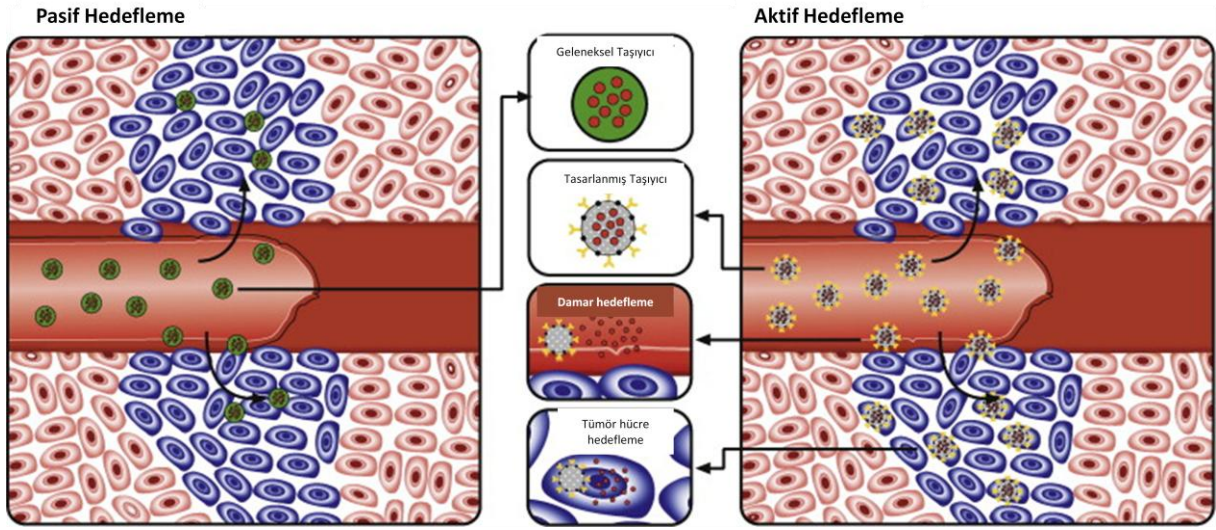
mAb: monoklonal antikor, PEG: polietilen glikol, PLGA: poli (laktik-co-glikolik) asit, RGD, arginine, glycine ve aspartic asit (Arg, Gly, Asp)

1.1.5. Aktif Hedefleme:

Nanopartiküllerde aktif hedefleme nanopartiküllerin tümör hücrelerindeki spesifik reseptör bölgelerine bağlanabilecek antikör veya peptitlerin ilaç taşıyan nanopartiküller üzerine bağlanarak uygulanması prensibine dayanmaktadır (Şekil 1.6) (Black ve ark 2008). Hedeflenmiş kısımlar antikörler, peptitler, hücre yüzey ligandları ve aptamerleri içerebilmektedir (Lammers ve ark 2008, Cho ve ark 2008). Ligand ve antikörlerle aktif hedefleme sistemlerinde öncelikli olarak nanopartiküller hedef bölgede gelişmiş geçirgenlik ve tutma etkisi sayesinde toplanması gerekmektedir. Bundan sonra aktif hedefleme gerçekleşir. Aktif hedeflenmiş nanoilaçların hedef ligandları folat, galaktosamin, transferin gibi yüzey reseptör meyilli endositoz yoluyla hücre içine alınımı gerçekleştirir (Jin ve ark 2014). Aktif hedefleme prelinik çalışmalarda avantajını göstermiş olsa da sadece antikör temelli nanoilaçlar klinik kullanımda onaylanmıştır (Tablo 1.2 ve 1.3). Zevalin (Y-90)® (CD20-hedefli Yttrium-90 ibritumomab tiuksetan), Bexxar® (CD20-hedefli iodine-131 tositumomab), Ontak® (CD25-hedefli difteri toksini-IL- 2 fusion protein), ve Mylotarg® (CD33-hedefli gemtuzumab ozoogamisini), non-Hodgkin's lenfoma, T-hücre lenfoma ve akut myeloid lösemide başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Jin ve ark 2014). Buna ek olarak kanser ilaçlarının hücre içine alınabilmesi için hücre içine işleyen peptitler, protein transduksiyon domaini, oligoarjinin gibi peptitlerin kullanılması gerekmektedir (Gupta ve ark 2005). Anjiyogenik endotel hücrelerinden eksprese edilen reseptörlere aktif hedefleme sayesinde, tümörlere kan tedarigi düşürülür, böylece katı tümörü oksijen ve besin kaynağından mahrum bırakılır.

Antikanser terapötikleri geliştirmede aktif hedefleme sistemi oldukça çalışılıyor olsa da, klinikte kullanılan örnekleri pasif hedeflemeye göre daha azdır. Aktif hedeflemede kullanılan nanoplatformlar kan dolaşımında fizikokimyasal olarak daha az kararlı ve formülasyonlarındaki konjuge hedef ligandlarından kaynaklanan boyutları nedeniyle tümör dokusunda birikimi zor olmaktadır (Matsumura ve Kataoka 2009).

Kansere karşı nanopartiküller için yeni spesifik hedefleme stratejilerinin geliştirilmesi aktif araştırmalardaki önemini korumaktadır.



Şekil 1.6. Aktif ve pasif hedefleme ile nanopartiküllerin tümör dokusuna geçişi
(Nanotechnology in Medicine 20/04/2014)

Tablo 1.2. Klinik deneme aşamasındaki nanoilaçlar (Jin ve ark 2014)

| Nanomateriyal | İlaç | Mevcut Durumu | Dağıtım Yöntemi | Ligand/Hedef | Ortalama Boyut (nm) | Açıklama | Kanser Tipi |
|---------------|---|--|-----------------|--|---------------------|---|--|
| Lipozom | Doksorubusin (Myocet®) | Faz III | PH | - | 100-230 | IRR yok, yüksek oranda yanıt ve azaltılmış kardiyotoksisite | Kaposi sarkoma ve metastatik meme kanseri (faz I/II) |
| | Vinkristin sülfat (Marqibo®) | FDA onaylı (Ph-yetişkin ALL), Faz II (NHL), Faz I (pediyatrik ALL) | PH | - | 115 | Genişletilmiş FK | ALL ve non-Hodking Lenfoma (NHL) |
| | Sitarabin | Faz III | PH | - | 100 | Genişletilmiş FK, yüksek oranda yanıt | Akut myeloid Lösemi (AML) |
| | Daunorubisin (CPX-351) | Faz III | PH | - | 160-180 | Katyonik Lipozom Formülasyonu | Çeşitli katı tümörler. |
| | Paklitaksel (EndoTAG-1) | Faz II (bitti) | PH | - | 150 | Miyelosüpresyonda azalma ve yüksek oranda yanıt | Yumurtalık kanseri |
| | Lurtotekan (OSI-211/NX211) | Faz II (bitti) | PH | - | 150 | IRR yok ve yüksek oranda yanıt | Metastatik meme kanseri |
| | Paklitaksel (LEP-ETU) | Faz I/II | PH | - | 100 | Pegylated liposomal camptotecin ve genişletilmiş FK | İleri katı tümörler |
| | Kamptotesin (S-CKD-602) | Faz I/II | PH | - | 100 | Pegylated liposomal camptotecin ve genişletilmiş FK | İleri/metastatik katı tümör |
| | Oksaliplatin (MBP-426) | Faz I | AH | Transferin/transferin reseptör | 180 | El-ayak sendromu veya kardiyotoksisite yok | Metastatik mide kanseri |
| | Doksorubusin (MCC-465) | Faz I (sonlandırıldı) | AH | F(ab') ₂ fragment of human mAb GAH veyatümör spesifik antijen | 140 | Geliştirilmiş Cevap | Katı Tümör |
| | p53 gen (SGT53-01) | Faz I | AH | scFv/transferrin reseptör | 108 | Geliştirilmiş Cevap | Katı Tümör |
| | RB94 plasmid DNA (SGT-94) | Faz I | AH | scFv/transferrin reseptör | 108 | Geliştirilmiş Cevap | Katı Tümör |
| | Doksorubusin (MM-302) | Faz I | AH | scFv/ErbB2 (HER2) | 75-110 | Kararlı ve güvenli | Melanoma aşısı |
| | Melanoma antijenleri ve IFN γ (Lipovaxin-MM) | Faz I | AH | Single domain antibody (dAb) fragment (VH)/DC-SIGN | | Kararlı ve güvenli | Melanoma aşısı |
| Polimerler | Paklitaksel (Genexol-PM®) | Korede onaylı ABD'de Faz II/III | PH | - | < 50 | Polimerik micell, yükseltilmiş paclitaxel MTD | Metastatik mem kanseri ve ürotelyal karsinom |

Tablo 1.2 devamı

| Nanomateriyal | İlaç | Mevcut Durumu | Dağıtım Yöntemi | Ligand/Hedef | Ortalama Boyut (nm) | Açıklama | Kanser Tipi |
|---------------|---------------------------------|-----------------|-----------------|---|---------------------|--|--|
| | Paklitaksel (NK105) | Faz III | PH | - | 85 | Çekirdek-kabuk-tip polimerik micell, geliştirilmiş FK, yüksek cevap, azaltılmış hipersensivite | Metastatik/yinelenen meme kanseri |
| | Doksorubisin (SP1049C) | Faz I bitti | PH | - | 30 | Polimerik micell, yüksek oranda cevap, ve el-ayak sendromu yok | Özofagus ileri adenokarsinom ve gastroözofagal sistem. |
| | Doksorubisin (NK911) | Faz II (Asya) | PH | - | 40 | polimerik micell, geliştirilmiş FK | Metastatik/yinelenen katı tümör |
| | Paklitaksel-poliglumek (Opaxio) | Faz III | PH | - | 10-150 | polimerik micell, geliştirilmiş FK | Yumurtalık Kanseri |
| | Kamptotesin (CRLX101) | Faz Ib/IIa | PH | - | 20-50 | Kanser hücrelerini asidik ortamında pH duyarlı polimerik nanotaşıyıcılardan camphotecin salınımı, geliştirilmiş FK, yüksek cevap | İleri katı tümör |
| Polimerler | Irinotekan (SN-38, NK012) | Faz I/II | PH | - | 20 | Polimerik micell tabanlı camphotecin türevi aktif metabolitler, geliştirilmiş FK | Katı tümör |
| | Sisplatin (NC-6004, Nanoplatin) | Faz I/II (Asya) | PH | - | 30 | Polimerik Micell ve geliştirilmiş FK (tek başına cisplatin ile karşılaştırıldığında böbrek toksisitesini düşürmek amaçlı) | İleri/metastatik pankreas kanseri |
| | Doketaksel (BIND-014) | Faz I bitti | AH | Peptid/PSMA (katı veya metastatik prostat kanserine prostat spesifik membran antijenleriyle bağlanarak) | 100 | Geliştirilmiş terapötik etkinlik | Katı tümör |
| | RRM2 siRNA (CALAA-01) | Faz I | AH | Transferrin/transferrin reseptör | 70 | Cyclodextrin tabanlı nanopartikül içerenanti RRM2 siRNA ve DLT yok | |

PH: Pasif Hedefleme, IRR: infüzyon ilişkili reaksiyonlar, Ph-: Fildelfiya kromozom negatif, ALL: Akut Lenfatik Lösemi, FK: farmakokinetik, AH: Aktif Hedefleme, MTD: maksimum tolere dozu, DLT: doz limitli toksisite, DC: Dendritik hücre

Tablo 1.3. FDA onaylı antikanser ilaçlar

| Nanoplatform | İlaç | Şirket | Özellikler | İçerik | Uygulama Yöntemi |
|--------------|----------------------------------|---|---|---|------------------------|
| Lipozom | Abelcet | Enzon | Lipozomal amfoterisin B | Fungal enfeksiyon | i.v. |
| | AmBisome | Gilead Sciences | Lipozomal amfoterisin B | Fungal ve protozoal enfeksiyon | i.v. |
| | Amphotec | Three Rivers Pharmaceuticals | Kolesterol sulfat tabanlı amfoterisinB | Fungal enfeksiyon | i.v. |
| | DepoCyt | Skye Pharma | Lipozomal siterabin | Kötü huylu lenfatik menenjit | i.t. |
| | DaunoXome | Gilead Sciences | Liposomal daunorubisin | HIV ilişkili Kaposi's sarcoma | i.v. |
| | Doxil/Caelyx | Ortho Biotech, Schering-Plough | Lipozom-PEG doksorubisin | HIV ilişkili Kaposi's sarcoma, metastatic mem kanseri, metastatik yumurtalık kanseri | i.m. |
| | Myocet | Zeneus | Lipozomal doksorubisin | Siklofosamid ile kombine metastatik meme kanseri | i.v. |
| | Visudyne | QLT, Novartis | Lipozomal vertoporfin | Yaşla ilişkili makular dejenerasyonda fotodinamik terapi, patolojik miyopi ve okular histoplasmosis | i.v. |
| Polimerler | Adagen | Enzon | PEG-adenozin deaminaz (ADA) | ADA eksikliğiyle ilişkili ciddi immün yetersizliği | i.m. |
| | Copaxone | TEVA Pharmocceuticals | L-Glutamik asit, L-alanin, L-lizin, and L-tirozin kopolimer | Multipl Skleroz | s.c. |
| | Genexol-PM | Samyang | Methoksi-PEG-poli(D, L-lactide) paklitaksel | Metastatik meme kanseri | i.v. |
| | Macugen | OSI Pharmmoceuticals | PEG-anti-VEGF aptamer | Yaşla ilişkili makuler dejenerasyon | i.r. |
| | Neulasta | Amgen | PEG-GCSF | Nötropeni ilişkili kanser | s.c. |
| | Oncaspar | Enzon | Pegaspargaz (PEG-L-asparaginaz) | Akut lenfoblastik lösemi | i.v., i.m. |
| | Renagal | Genzyme | Poli(allilamine hidroklorür) | Son aşamadaki renal hastalık | oral |
| Diğerleri | Somavert | Nektar, Pfizer | PEG-HGF | Akromegali | s.c. |
| | Abraxane | Abraxis BioScience, AstraZeneca | Albumine bağlı Paklitaksel | Metastatik mem kanseri | i.v. |
| | Estrasorb | Novavax | Östradiyol emulsiyon | Menapozla ilişkili vazomotor semptomlar | Topikal ve transdermal |
| | Emend | Elan, Merck | Nanokristalin apreptant | Antiemetik (Kusmayı önleyici) | Oral |
| | Megace ES | Strativa Pharmaceuticals, subsidiary of Par Pharmaceutical.Inc. | Nanokristalin megestrol asetat | Anoraksia, kaşeksi, veya AIDS hastalarının açıklanamayan kilo kaybında | Oral |
| | Rapamune | Elan, Wyeth Pharmaceuticals | Nanokristalin sirolimus | İmmünosüpresan | Oral |
| | TriCor | Elan, Abbott | Nanokristalin fenofibrat | Antihiperlipidemik | Oral |
| Feridex | Bayer Healthcare Pharmaceuticals | Femmoxides solyONU (superparamagnetic iron oxide) | MRI kontrast maddesi | i.v. | |

ADA: adenzin deaminaz; GCSF: granülosit koloni uyarıcı faktör; HGF: hepatosit büyüme faktörü; HIV: insan immün yetmezlik virüsü; i.m.: intramusküler; i.r.: intravitöz; i.t.: intratekal; i.v.: intravenöz; PEG: polietilenglikol; s.c.: subkutanöz; VEGF: vasküler endotelial büyüme faktörü.

1.2. Lipozomlar

1.2.1. Lipozomlara Tarihsel Bakış

Lipozomların keşfi 1961 yılında kan ve kan pıhtılaşması üzerine araştırma yapan A.D.Bangham'ın özellikle lesitin ve diğer fosfolipitlerin kolloid davranışı üzerindeki araştırmalarına atfedilir. Bangham ve Horne (1964) seyreltilmiş sulu çözeltiler içinde fosfolipitlerin küre şeklini aldığını bulmuştur ve lipozomları toksik olmayan doğal fosfolipit ve kolesterolden üretilen küre şeklindeki en küçük yapay veziküller şeklinde tanımlamaktadır (Segota ve Tezak 2006). Lipit veziküller 1960'ların başlarında Bangham tarafından keşfedilse de, lesitin ve diğer fosfolipitlerin kolloid davranışıyla ilgili daha erken dönemde yazılmış makaleler bulunmaktadır. 1811 yılında Vauquelin sıcak etanol kullanılarak beyinden izole edilen malzeme içinde, yağ asitleri üzerinde fosfor bağlarını tarif etmiştir (Lasic 2000). Amfifilik özellikler ve lipit çift tabakanın yapısı ve biyomembranın özellikleri lipit dispersiyonlarının koloid davranışlarının incelenmesi sırasında 1920'lerde bulunmuştur (Gorter ve Grendel 1925). 1970'lerde lipozomların paketleme potansiyeli ve ilaç dağılımında ilaçların kapsül içine yerleştirilerek gönderilmesinin önemi anlaşılmaya başlanmıştır. 1980'lerde araştırmalar lipozomların kan dolaşımı içine enjeksiyonu ve spesifik bölgelere iletilmesini gerektiren uygulamalar üzerine odaklanmıştır (Cohen 1986, Grant ve ark 1989). Lipozomlar sistemik olarak verildiği zaman dolaşım sisteminde dağılır ve karaciğer tarafından hızlı bir şekilde ortamdaki uzaklaştırılır. Sonraki on yılda ise lipozom teknolojisinin gen teşhis ve terapisi uygulamalarındaki karakterizasyonu üzerine çalışmalar artmıştır (Hangstrom ve ark 1996, Tseng ve ark 1999, Lasic 1998). Bugün lipozomlar; matematik ve teorik fiziği (üç boyutlu süreklilik içinde yüzen iki boyutlu yüzeyler topolojisi), biyofizik (hücre kanalları ve zarların özellikleri), biyoloji (biyomembran ve hücrelerin iç kısımlarından atılım, hücre fonksiyonu, iletim ve sinyal, gen aktarımı ve fonksiyonu), biyokimya (membran protein fonksiyonu), kimya (kataliz, enerji dönüşümü, fotosentez) ve koloid kimya (kararlılık ve termodinamik) gibi alanları içeren çok kullanışlı modeller, belirteçler ve çeşitli bilimsel alanlardaki araçlardır (Segota ve Tezak 2006).

1.2.2. Lipozomun Yapısal Özellikleri

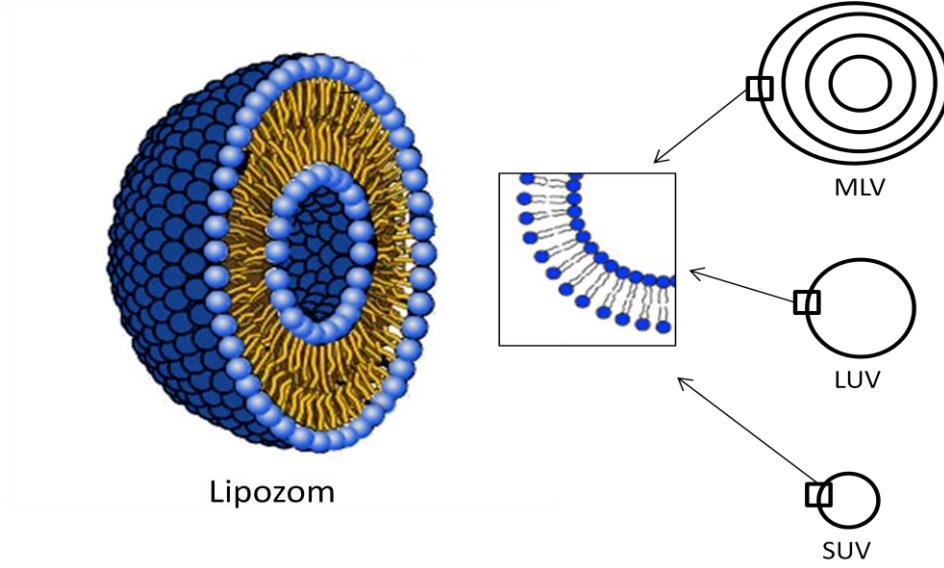
Lipozomlar fosfolipit çift tabakanın yapay olarak kapsül şeklinde oluşturulmasıyla meydana gelen ve ilaç taşıma amaçlı oluşturulmuş yapılardır (Şekil 1.7) (Wilczewska ve ark 2012, Akbarzadeh ve ark 2013). Sıklıkla kozmetik ve farmasötikal formülasyonlarda kullanılırlar. Birbirleriyle birleşmesi engellenerek kararlı bir yapı haline getirilebilirse oldukça kullanışlı olabilmektedirler. Öncelikli olarak lipozomlar biyolojik olarak son derece işlevseldir; antikolar, protein reseptörleri ve biyosensör moleküller lipozomlara tutunabilirler (Vamvakaki ve ark 2005, Oja ve ark 2000). İkinci olarak çeşitli ilaçlar, enzim, protein ve DNA gibi çeşitli kargoları taşımada kullanılacak bölümlerden oluşabilmektedirler (Dos Santos ve ark 2005, Pantos ve ark 2005). Lipozomların küçük ve kontrol edilebilen boyutları, on ile bin nanometre arasında değişebilen çapları, bu nano taşıyıcıların zeptolitre (10^{-21} L) ile femtolitre (10^{-15} L) aralığındaki hacimlerde madde taşıyabilmelerini sağlamaktadır. Biyomoleküller veya diğer kimyasal reaktantlar bu biyo-uyumlu taşıyıcılara yüklenebileceği gibi protein ekspresyonu, mRNA transkripsiyonu ve enzimatik kataliz reaksiyonlarını da içeren hücresel işlemler ve kimyasal reaksiyonlar da lipozom içinde gerçekleşebilir (Yoshimoto ve ark 2004, Rhoades ve ark 2003). Bu genellikle hidrofobik bileşiklerde çözünme kabiliyetlerine ve formülasyondaki reolojik kontrolüne bağlıdır (Lasic 1998). Hidrofobik moleküller lipit çift tabakanın içinde kalırken hidrofilik moleküller veziküllerde en dışta ve membran tabakasının ortasında kalmaktadır ve bu nedenle oldukça esnek bir yapıya sahiptir. Buna ek olarak hücre membranını taklit eden bir yüzeye sahip olmaları, sitotoksik etki göstermeden membran transportunu kolaylaştırır ve hücre membranı üzerine deneysel ve teorik çalışmalarda model olarak kullanılabilirler (Michel ve Gradzielski 2012).

Lipozomların özellikleri onları oluşturan lipit çeşitlerine, yüzey yüküne, boyutuna ve hazırlama metoduna göre değişiklik gösterebilmektedir. Lipit çift tabakayı oluşturan bileşenler lipozomun sertliğini veya akışkanlığını ve çift tabakanın yükünü belirleyebilmektedir. Mesala doğal kaynaklardan elde edilen (yumurta veya soya fasulyesi fosfotilkolin) doymamış fosfotilkolin türleri, lipozomu daha geçirgen ve daha az kararlı yaparken büyük açil zincirli doymuş fosfolipitler (dipalmitilfosfotidilkolin gibi) kararlı fakat daha az geçirgen bir lipit çift tabaka oluşmasını sağlar (Akbarzadeh ve ark 2013).

Saf fosfolipit çift tabaka membranlar, keskin ana faz geçişleri sergilemektedirler, bu durum lipide özgü ve hidrokarbon zincirin erimesiyle ilişkilidir (Mabrey ve Sturtevant 1976).

Zincir erime sıcaklığının (T_m) altında, fosfolipit moleküller bir yerde kenetlenirler, hidrokarbon zincirleri arasında oluşan van der Waals kuvvetlerince birbirine sıkıca bağlanırlar, bu nedenle çift tabaka katı halde (jel fazında) veziküller halinde karakteristik açısız şeklini gösterir. Bunun tersine T_m sıcaklığının üzerindeki lipitler lateral ve tabakalar arası hareketlilik gösterebilmektedir (flip-flop) ve membran akışkanlığını etkilerler. Faz geçişleri sırasında çift tabaka vezikül membranların geçici geçirgenliği moleküllerin vezikül içinden serbestlenmesini sağlar. Bu özellik lipozomların nano-taşıyıcılar olarak akıllı ilaç dağıtım teknolojisinde tercih edilmesini sağlamaktadır, çünkü faz geçiş sıcaklığının aşılmasıyla kapsül içine yerleştirilen moleküllerin isteğe bağlı serbestlenmesi sağlanabilir (Michel ve Gradzielski 2012).

Lipitler sulu ortamlarda amfipatikler (hem hidrofobik hem de hidrofilik) ve termodinamik faz özellikleri ve hidrofobik bölümlerinin bir araya gelerek kendi kendine karakteristik küresel çift tabaka oluşturabilirler. Bu tabakalara lameller denir (Akbarzadeh ve ark 2013). Büyüklüğüne ve çift tabakanın sayısına göre lipozomlar iki kategoride sınıflandırılmaktadır: (1) Çok tabakalı vezikül (MLV) ve (2) Tek tabakalı vezikül (Şekil 1.7). Tek tabakalı vezikülde iki kategoride sınıflandırılır: (a) Büyük tek tabakalı vezikül (LUV) ve (b) Küçük tek tabakalı vezikül (SUV). Tek tabakalı lipozomlarda vezikül bir tek fosfolipit çift tabakaya sahiptir. MLV, fosfolipitlerin su içinde kendiliğinden dağılarak çoklu lipit çift tabakaların birbiri üzerine kaplanmasıyla oluşan oldukça büyük vezikül yapılarıdır ve şekil olarak iç içe soğan halkalarını andırmaktadır. Bir veya birkaç farklı tekniğin beraber kullanılmasıyla MLV süspansiyonundan spesifik bileşim, boyut ve dağılıma sahip küçük tek tabakalı veziküller elde etmek mümkündür. Bu teknikler sonikasyon, lipit filmin rehidrasyonu, filtre ile kalıptan geçirme gibi tekniklerdir (Gradzielski 2003, Akbarzadeh ve ark 2013). Bu hazırlama prosedürleri gereklidir çünkü fosfolipitlerin normal denge durumları tabakalar şeklindedir ve yüksek kinetik kararlılığı ile (termodinamik kararlılığı değil) veziküller yarı kararlı yapılarıdır, çünkü vezikül yapısının oluşabilmesi için enerji girdisine ihtiyaç vardır (Laughlin 1997, Segota ve Tezak 2006). Bazı sürfaktan sistemlerinde (özellikle katyonik sürfaktanlar ve sürfaktan karışımları gibi) kendiliğinden vezikül oluşması ve termodinamik kararlılık olsa da, fosfolipit veziküllerin kararsızlığı vezikül uygulamalarında sınırlayıcı bir faktördür (Michel ve Gradzielski 2012).



Şekil 1.7. Lipozom, Çok tabakalı vezikül (MLV), Büyük tek tabakalı vezikül (LUV), Küçük tek tabakalı vezikül (SUV) ve lipit çift tabakanın çizim şekli gösterilmiştir.

1.2.3. Yapı Bileşenleri;

a) Fosfolipitler:

Lipozom formülasyonunda genel olarak gliserol içeren fosfolipitler kullanılmaktadır ve biyolojik membranların lipit ağırlığının %50'sinden fazlasını oluşturmaktadırlar. Fosfotidik asit kullanılarak elde edilirler. Molekülün omurga kısmını gliserol oluşturmaktadır. C₃ 'deki OH grubu fosforik asitle esterleşir. C₁ ve C₂ 'deki OH uzun zincirle esterleşir. Yağ asitleride lipidik özellik kazanmasına neden olur. Fosforik asitin kalan OH grubu yüksek ölçüde gliserol, kolin, etanolamine, serin ve inositol içeren organik alkollerle esterleşebilir. Bu tür fosfolipitlere örnek olarak; fosfotidil kolin (lesitin) (PC), fosfotidil etanolamin (sefalin) (PE), fosfotidil serin (PS), fosfotidil inositol (PI), fosfotidil gliserol (PG) verilebilir. Kararlı lipozomlar yapmak için doymuş yağ asitleri kullanılır. Doymamış yağ asitleri genelde lipozom oluşturmada kullanılmamaktadır (Mansoori ve ark 2012).

b) Sfingolipitler:

Sfingolipitler gliserol yerine bir uzun zincirli amino alkol olan sfingozin içeren bileşik lipitlerdir. Bitki ve hayvan hücreleri için önemli bir bileşendir. Baş grubu kolin gibi basit

alkolden çok daha kompleks karbonhidratlara kadar değişik büyüklükte yapılardan oluşabilir. Sfingolipitlere örnek olarak sfingomiyelin, serebrositler ve gangliositler verilebilir. Gangliositler, gri madde de bulunmaktadır ve lipozom üretiminin minör bileşeni olarak kullanılmaktadır (Mansoori ve ark 2012).

c) Steroller:

Kolesterol ve onun türevleri lipozom üretiminde sıklıkla kullanılmaktadır. Lipit çift tabakanın akışkanlığını azaltmaktadır. Suda çözünen moleküllerin membrandan geçişini azaltmaktadır. Plazma gibi biyolojik sıvıların bulunduğu ortamda membran kararlılığını sağlar. Bu etki lipozomun intravenöz uygulamalarında kullanılır (Mansoori ve ark 2012).

d) Sentetik fosfolipitler

Burada doymuş fosfolipitlere örnek olarak; Dipalmitol fosfotidil kolin (DPPC), Disterol fosfotidil kolin (DSPC), Dipalmitol fosfotidil ethanolamine (DPPE), Dipalmitol fosfotidil serin (DPPS), Dipalmitol fosfotidik asit (DPPA), Dipalmitol fosfotidil gliserol (DPPG) verilebilir. Doymamış fosfolipitlere örnek olarak; Dioleoyl fosfotidil kolin (DOPC) ve Dioleoyl fosfotidil gliserol (DOPG) verilebilir (Mansoori ve ark 2012).

1.2.4. Moleküler Paketleme Parametreleri

Amfifillerin solüsyon içinde organize olması moleküler yapılarına bağlı olmak üzere termodinamik olarak sürdürülmekte ve kendiliğinden oluşmaktadır. Bu durum Israelachvili ve ark tarafından amfifillerin denge durumuyla ilişkili olarak şekil, boyut gibi geometrik durumları göz önünde bulundurularak moleküler paketleme parametreleri adıyla tanımlanmıştır (Israelachvili ve ark 1976).

Sümfaktan moleküller kolloidlerle ilişkili olarak kümelenerek misel, sıvı kristal, çift tabaka lamel, vezikül, lipozom şeklini alabilmektedir (Nagarajan 2002). Hava/su ara yüzünde sümfaktan tek tabaka formunu almaktadır. Sümfaktanın sulu solüsyonları koloit formu olarak moleküllerin fiziksel olarak etkileşmesini sağlar, burada kimyasal etkileşim olmaz. Amfifilik moleküllerin yürütücü kuvveti hidrofobik bölümlerin su ile etkileşimini en aza indirme eğilimindedir ve buna hidrofobik etki denir. Misellerin yüzeyindeki her bir sümfaktan










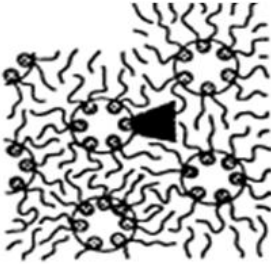
molekölün yüzey alanı birkaç faktöre bağlıdır; bazıları baş grup alanını artırırken bazıları da azaltıcı etki gösterme eğilimindedir. İki zıt kuvvet baş gruplardan meydana gelen optimal alanı belirler. Bu kuvvetler hidrokarbon-su ara yüzündeki hidrokarbon zincir birimlerinin hidrofobik çekici etkisinden kaynaklanan çekici kuvvet ile hidrofilik, sterik ve iyonik iticiliğe bağlı komşu baş gruplar arası itici kuvvetlerdir (Segota ve Tezak 2006).

Moleküler paketlemenin nasıl gerçekleştiği lipid yapısına bağlıdır ve “p” değeri ile ifade edilmektedir.

$$p = v/al ;$$

Burada “v”- hidrofobik zincir hacmini, “a”- lipidin baş grup kısmının alanını ve “l”- ise hidrokarbon kuyruğun etkin uzunluğunu göstermektedir.

Fosfolipitler, hidrofilik baş (fosfat) ve iki hidrokarbon zincirden oluşan amfifilik molekülüdür dolayısıyla paketleme parametre değeri olarak (p) 0,5 ve 1 arasında yer alır buda ucu kesilmiş koni şeklinde bir yapı kazanmasını sağlar. Bu nedenle fosfolipitler çift tabaka oluşturma eğilimindedirler, dahası veziküller gibi kapalı çift tabaka oluşturma eğilimindedirler (Michel ve Gradzielski 2012, Segota ve Tezak 2006). Paketleme parametresi lipidlerin bir araya geldiğinde oluşturacağı şekli belirler. Buna göre $p < 1/3$ ise küresel bir yapı, $1/3 < p < 1/2$ ise çubuk gibi bir partikül ve $1/2 > p$ ise çift tabaka yapısının oluşması beklenir ve vezikül oluşabilir (Şekil 1.8) (Gradzielski 2003). Buna ek olarak sıcaklık, iyonik kuvvetler, hidrokarbon zincir uzunluğu ve pH da yapının şeklini belirlemede etkindirler (Segota ve Tezak 2006).

| Kritik paketleme parametreleri | Kritik paketleme şekli | Yapı formu |
|--------------------------------|--|--|
| $<1/3$ | Koni  | Küresel misel  |
| $1/3-1/2$ | Kesikli Koni  | Silindirik misel  |
| $1/2-1$ | Kesikli Koni  | Esnek çift tabakalı vezikül  |
| ~ 1 | Silindir  | Düzlemsel çift tabaka  |
| >1 | Ters kesikli koni veya kama  | Ters misel  |

Şekil 1.8. Paketleme parametreleri ve bununla ilişkili şekil değişiklikleri (Hiemenz 1997)

1.2.5. Lipozomların Avantajları

- Lipozomlar ilaçların yararlılığını ve terapötik etkinliğini artırır.
- Lipozomlar çoğunlukla toksik değildir, esnektir ve hem hidrofilik hem de hidrofobik bileşikleri taşıyabilecek özelliğe sahiptir.
- Lipozomlar biyolojik olarak uyumlu ve biyobozunabilir olması nedeniyle sistemik veya sistemik olmayan uygulamalarda immünojenik değildir.
- Lipozomlar kapsüllenen ajanın toksisitesini düşürür.
- Lipozomlar çeşitli şekillerde uygulanabilir. (intravenöz, topikal vs.)
- Lipozomlar spesifik ligandlarla etkileşime geçebilecek şekilde dizayn edilerek aktif hedefleme yapılabilir. (Mansoori ve ark 2012, Akbarzadeh ve ark 2013)

1.2.6. Lipozomların Dezavantajları

- Çözünürlükleri düşüktür.
- Yarı ömürleri kısadır.
- Fosfolipitler bazen oksidasyon ve hidroliz reaksiyonları geçirebilirler.
- Kapsüllenen ilaç veya molekül sızabilir veya lipozomlarla kaynaşabilir. (Mansoori ve ark 2012, Akbarzadeh ve ark 2013)

Klinikte Onaylanmış Lipozomal İlaçlar (Mansoori ve ark 2012)

| İsim | Ticari İsim | Şirket | Endikasyon |
|-------------------------|-------------|-----------------|---|
| Lipozomal amfoterisin B | Abelcet® | Enzon | Fungal enfeksiyonlar |
| Lipozomal amfoterisin B | Ambisome® | Gilead Sciences | Fungal ve protozoal enfeksiyonlar |
| Lipozomal sitarabin | Depocyt® | Pacira | Kötü huylu lenfomatöz menenjit |
| Lipozomal daunorubisin | DaunoXome® | Gilead Sciences | HIV-ilişkili Kaposi's sarkoma |
| Lipozomal Doksorubisin | Myocet® | Zeneus | Metastatik meme kanserinde siklofosfamid ile kombine terapi |

| | | | |
|--------------------------|----------------|---------------------------------|---|
| Lipozom-PEG doksorubisin | Doxil®/Caelyx® | Ortho Biotech, Scherring-Plough | HIV-ilişkili Kaposi's sarkoma, metastatik meme kanseri, metastatik yumurtalık kanseri |
| Lipozomal Aşı | Epaxal® | Berna Biotech | Hepatitis A |
| Lipozomal Aşı | Inflexal V® | Berna Biotech | Influenza |
| Lipozomal morfin | DepoDur® | SkyePharma, Endo | Cerrahi sonrası ağrı |
| Lipozomal Vertoporfion | Visudyne® | QLT, Novartis | Yaşa bağlı makular dejenerasyon, patolojik, okular histoplazmoz |
| Miseller Östrodiyol | Estrasorb® | Novavax | Menopozal Terapi |

1.2.7. Lipozom ve Nanopartikül Karışım Sistemlerinin İncelenmesi

Aşağıda membran/nanopartikül sistemleri ile oluşturulan ve yapının biçim ve dengesinden sorumlu kuvvetlerin farklı yapılarıdaki etkisinden bahsedilmektedir.

1.2.7.1. Desteklenmiş Lipit Çift Tabaka

Desteklenmiş Lipit Çift Tabaka (DLÇT) akışkan lipit membranın katı bir yüzeye tutunması ve bu katı yüzeyle arasında ince su tabakasının (1-3 nm) bulunmasıyla oluşur. DLÇT'nin oluşması için sıvı fazda çift tabaka (membranın yeterince düşük elastikliğe sahip olması) ve hidrofilik alt tabakaya (destekleyici su tabakasına bağlanmak için) ihtiyaç vardır. DLÇT yapısı yenilikçi katalitik yüzeyler veya hareketsiz protein dizileri üretmek için önce düzlemsel yüzeylerde (cam, silika, mika) çalışılmıştır (Anderson ve ark 2009, Goksu ve ark 2009). Şimdilerde bu alandaki çalışmalar nanovektör oluşturmak için nanopartiküllerin yüzeyine tutunan lipit çift tabakanın biyo-uyumlu olarak üretilmesi amacıyla nanopartiküller üzerine kaydırılmıştır (Moura ve Carmona-Ribeiro 2005, Savarala ve ark 2010). Bu çalışmalarda etkileşimleri kontrol etmek ve böylece dağılım sistemini tasarımılamak için iyi tanımlanmış membranlar önemlidir.

Lipozomların solüsyon içinde katı yüzeylerde yapışması, kaynaşması ve dağılması üzerine düzlemsel yüzeylerde ve nanopartiküllerde çalışıldığından, DLÇT yapısı solüsyonlarda

veziküller oluşturulmasıyla başarılı olunabilir (Richter ve ark 2003, 2006, Savarala ve ark 2010). Veziküllerin yüzeye tutunması hakkında birçok çalışma olmasına rağmen, katı yüzeylerdeki lipozomların yapışma, kaynaşma ve bozunmasından sorumlu kuvvetler tam anlamıyla açığa çıkarılamamıştır. Bununla birlikte DLÇT yapısının 3 çeşit etkileşim ile kontrol edildiği düşünülmektedir(Richter ve ark 2003, Seantier ve Kasemo 2009):

- Vezikül yüzey etkileşimi
- Vezikül-vezikül etkileşimi, komşu veziküllerle lateral etkileşim
- Vezikülün kendi bağlayıcı kuvveti (vezikül kararlılığı)

Deneyisel olarak, bu 3 farklı etkileşimin kuvvetliliği incelendiğinde her birinin birçok parametrede (iyonik güç, spesifik iyonların eklenmesi, pH, alt tabakanın yüzey özellikleri, kullanılan fosfolipitlerin doğası) rol oynadığını görülmektedir (Michel ve Gradzielski 2012).

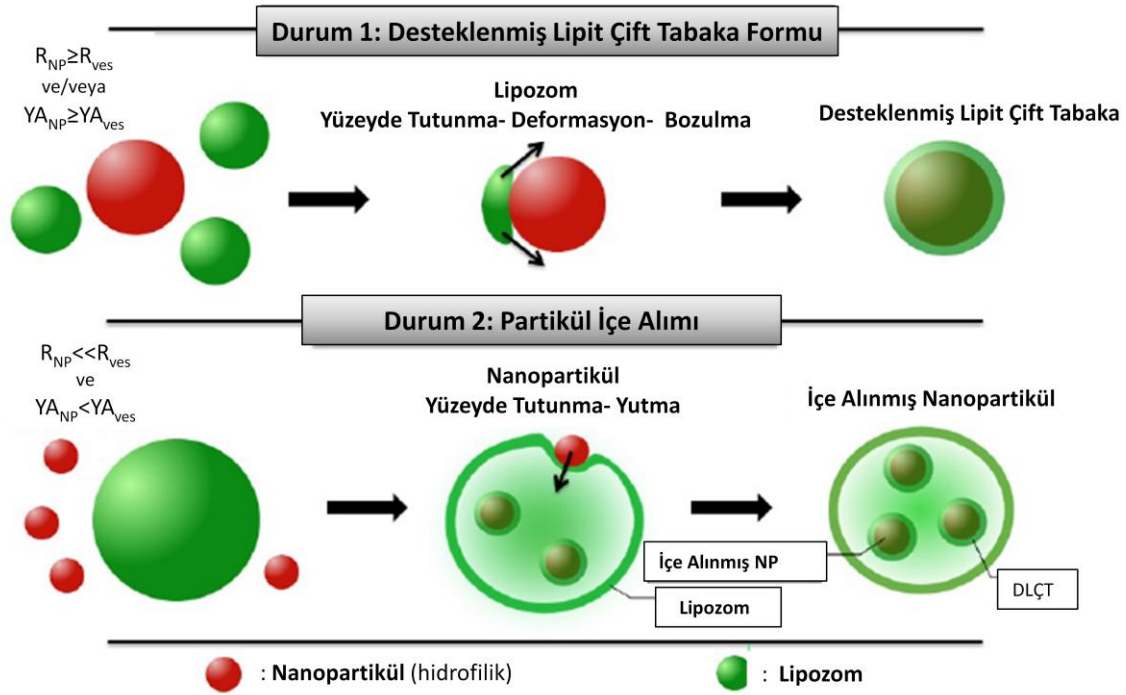
İyonik kuvvetlerin değişimi ve/veya pH, alt katmanda elektrostatik özellikleri değiştiren bir yol olduğu gibi fosfolipitlerin net yükünü değiştirir. Bu da alt tabakanın doğasına ve kullanılan lipit çeşidine bağlı olarak farklı tutunma özelliklerinin oluşmasına neden olur (Cho ve ark 2011, Savarala ve ark 2010). Negatif yüklü veya zwitteriyonik lipitlerin negatif yüklü alt tabaka ile oluşturulan etkileşiminde spesifik iyonların kullanımının (özellikle divalent katyonlar) DLÇT yapısında kuvvetli etki gösterdiği bulunmuştur (Seantiar ve Kasemo 2009, Reviakine ve Brisson 2000). Zwitteriyonik fosfolipitlerin ilginç durumu ise, katyonların baş grubu dipolden tek kutuplu pozitif dönebilmektedir, bu nedenle negatif yüklü alt tabaka ile kuvvetli olarak etkileşime girer (Şekil 1.9).(Savarala ve ark 2010, Seantiar ve Kasemo 2009).

Bununla birlikte üretim mekanizmasının vezikül membranıyla alt tabaka yüzeyi arasında elektrostatik kuvvetlerin etkisinde oluştuğuna inanılsa da diğer kuvvetler de göz ardı edilemezler. Örneğin, DLÇT yapısı veya vezikül tutunma sisteminde elektrostatik etkileşimin açıkça uzaklaştırıcı etki gösterdiği veya deneysel ortamın minimize edilmesiyle (pH, alt tabaka yüzey özellikleri) başarılı olduğu bildirilmiştir. Bu da van der Waals çekici kuvvetlerin önemini gösterdiği gibi oluşum mekanizmasındaki hidrasyon ve yapısal kuvvetlerin de önemli olduğunu göstermektedir (Anderson ve ark 2009, Ahmed ve ark 2011, Michel ve Gradzielski 2012).

Önceki çalışmalarda sert nanopartiküller üzerinde DLÇT yapısı iki grupta incelenmiştir;

1. Lipozomların nanopartiküller üzerine tutunarak partikül yüzeyinin lipit çift tabakayla kaplanması partikül yüzeyinde sürekli DLÇT yapısının oluşmasına neden olmaktadır (Şekil 1.9). Bu durum partikül yarı çapının (R_{NP}) vezikül yarıçapından (R_{Ves}) daha büyük olduğu veya bütün partiküllerin yüzey alanlarının DLÇT yapısının muhtemel yüzey alanına (YA) eşit yada daha büyük olduğu durumlarda gerçekleşir ($YA_{NP} \geq YA_{Ves}$). Bununla birlikte $YA_{NP} \gg YA_{Ves}$ olduğu durumlarda nanopartiküllerin kısmi olarak lipit çift tabaka ile kaplanabileceği de göz önünde bulundurulmalıdır (Savarala ve ark 2011).

2. DLÇT ile kaplanmış partiküllerin lipozom ile sarmalanarak kaplanması bu mekanizmanın ara basamağını oluşturmaktadır (Le Bihan ve ark 2009). Bu durum (R_{Ves})'in (R_{NP})'den oldukça büyük olduğunda geçerli olmaktadır (Şekil 1.9). Nanopartiküller öncelikli olarak membran ve nanopartiküller arasında çekici etkileşimle harekete başlar fakat bu süreçte vezikül içinden su salınmasıyla termodinamik sürücü kuvvet açığa çıkarken bununla beraber entropi kazanılır (Michel ve Gradzielski 2012).



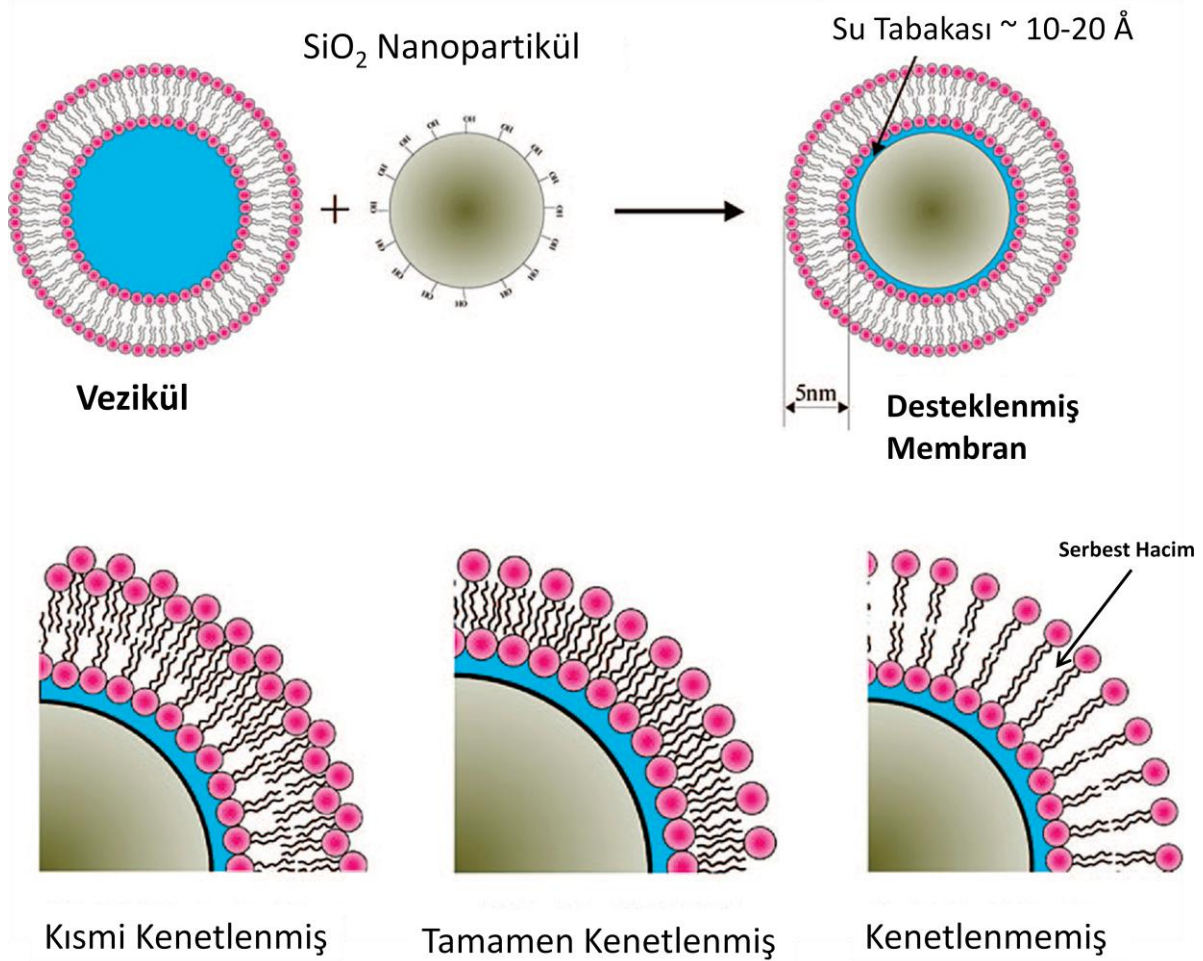
Şekil 1.9. Hidrofilik partiküller ve akışkan lipozom fazında Lipozom/nanopartikül karışık sistemlerinde oluşan muhtemel mekanizmanın çizimi. Membran ve nanopartiküller arasında yeterli derecede çekici kuvvetlerin olduğu kabul edilmektedir (Michel ve Gradzielski 2012).

Şekil 1.9'daki birinci olayda bahsedilen DLÇT yapı mekanizması düz yüzeylerdeki olaylara benzer şekilde (Anderson ve ark 2009, Richter ve ark 2003) lipozomun nanopartikül yüzeyinde yüzeye tutunma, deformasyon ve bozunması ile devam etmektedir (Mornet ve ark 2005). Lipozomun tutunmasıyla adezyon kuvvetlerine bağlı olarak veziküllerde biçimlenme üst sınıra ulaşır, yani bozunma meydana gelene kadar lipid yüzeyle alt tabaka arasındaki temas alanı artar ve sonuçta partikül yüzeyinde yama oluşmasıyla sonuçlanır (Michel ve Gradzielski 2012). Fakat bu yama oluşumu lipidin jel veya daha sıvı fazda olmasının da etkisiyle bölgeden bölgeye farklılık göstermektedir (Wang ve ark 2008). Yüzeye tutunan veziküllerin etrafında lipid yamaların olmasına bağlı ya da bağımsız olarak bu işlem meydana gelebilmektedir. Aslında çift tabaka yamanın kenarı, tutunan vezikülün büyük ihtimalle bozunumunu aktive eder (Richter ve ark 2003). Bu nedenle DLÇT yapısı bütün partikülleri kaplayabilmekte sıklıkla komşu lipozom yamalarının aktif kenarlarının etkisiyle kaynaşmaktadır (Seantier ve ark 2009). Nanopartiküller çift tabakaya bağlandığı durumlarda çift tabakanın dalgalanmasını baskılayarak membranın konfigürasyonel entropisini kaybetmesine yol açacaktır. Bununla birlikte DLÇT yapısı yüksek oranda membranın

partikül etrafında küresel bir şekil oluşmasına ve bu şekle adapte olmasına bağlıdır (Roiter ve ark 2008, 2009). Lipit çift tabakanın kavisliliği literatürde, membran ve alt tabaka arasında adezyon enerjisi ve çift tabakanın partikül etrafında bükülmesi için gerekli elastik enerji (veya eğrilme enerjisi) etkileşimleri sonucunda olduğu bildirilmiştir (Seantier ve Kasemo 2009, Roiter ve ark 2008, 2009). İlgili teorik çalışmalar, tamamen kaplanmış, kısmi sarılmış veya dağınık kolloid bölgelerin sınırlarını belirleyerek yapısal faz diyagramını açığa çıkarmıştır (Deserno ve Gelbart 2002, Fleck ve Netz 2004). Sarılmış ve serbest partiküller arasında geçiş basamaklarının keşfedilmesi partikülün kritik çapının (R_C) belirlenmesini sağlamıştır, yani DLÇT yapısı enerjik olarak kritik değerin üzerindeki yarıçapa sahip partikülleri tercih etmektedir. Gerimi olmayan membranlarda, R_C değeri, adezyon enerjisi ve bükülme enerjisi tarafından kompanse edildiğinde, ortaya çıkan enerjetik dengenin ifadesiyle elde edilir (Dobereiner ve Lipowsky 1998, Deserno ve Bickel 2003)

$$R_C \equiv \sqrt{2\kappa/|W|}$$

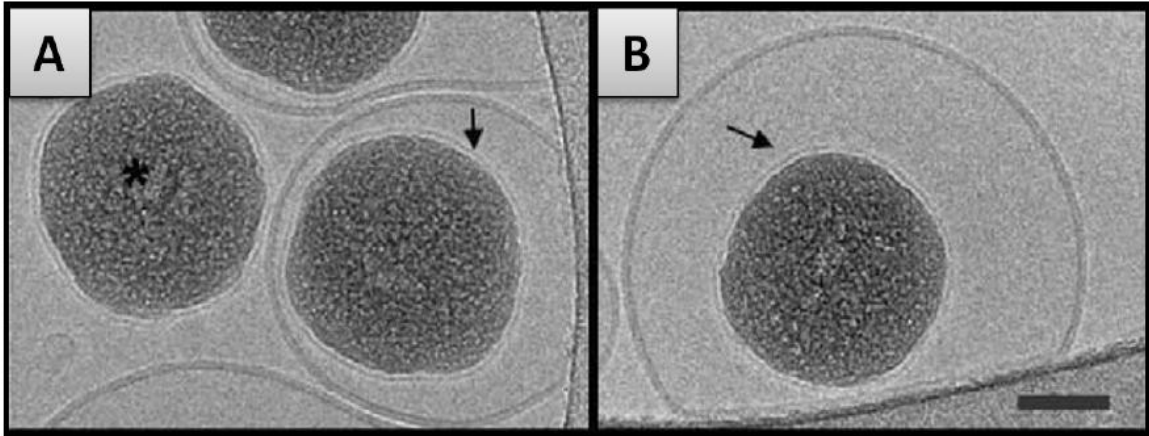
Burada " R_C ", adezyon enerjisinin birim alandaki (W) kuvvetine ve çift tabakanın ortalama bükülme modülüne (κ) bağlıdır, bu nedenle hem partikülün hem de lipit çift tabakanın doğasına bağlıdır. Sonuçta lipitlerin doğası, alt tabakaların özellikleri (Savarala ve ark 2011), pH gibi ortam özellikleri (Moura ve Carmona-Ribeiro 2005), iyonik özellikler (Savarala ve ark 2010) gibi deneysel ortamdaki değişimler bu kritik değeri değiştirebilir. Mesela bükülme modülü (κ) çift tabakanın kalınlığının üçüncü kuvvetiyle orantılıdır (Michel ve Gradzielski 2012). Bu nedenle R_C değeri deneysel olarak sistemin doğasıyla değişiklik göstermektedir. Silika partiküllerin zwitteriyonik lipit çift tabakayla etkileşimi olayında, yapıştırıcı gücün (W) birkaç mJ/m^2 olduğu durumlarda kritik yarıçap 10 nm olarak belirlenmiştir (Le Bihan ve ark 2009, Roiter ve ark 2008, 2009).



Şekil 1.10. Küçük nanopartikül ile desteklenen fosfolipit çift tabakanın dış ve iç yaprakları arasında kenetlenmenin şematik çizimi (Ahmed ve ark 2009).

Küçük partiküller üzerine tutunmuş desteklenmiş lipit çift tabaka ($R_C < 100$ nm) karşılaştıkları yüksek eğrilik nedeniyle morfolojik değişimler ortaya koymaktadır. Diferansiyal taramalı kalorimetre ile yapılan incelemede T_m değerinde kayma, bunun yanı sıra genişleme ve/veya geçiş tepe değerinin ikiye ayrılması (Ahmed ve ark 2009), SUV'larda da gözlemlenen çift tabakanın iç ve dış yaprağı arasında bağlantısının kesilmesine bağlı olarak oluşan eğriliği düşündürmektedir (Brocca ve ark 2006). Aşırı-uç olaylarda ($R_C \leq 10$ nm) yüksek eğrilik lipit çift tabakanın açıl zincirleri arasında geniş serbest hacimler oluşmasına neden olmaktadır (Ahmed ve ark 2009, 2011) (Şekil 1.10). Bu durumda hidrofobik zincirlerin sulu ortamla maruziyetten kaçınması nedeniyle, hidrofobik etkileşimleri en uygun hale getirmek için, açıl zincirleri arasında kenetlenme meydana gelmektedir (Michel ve Gradzielski 2012)(Şekil 1.10).

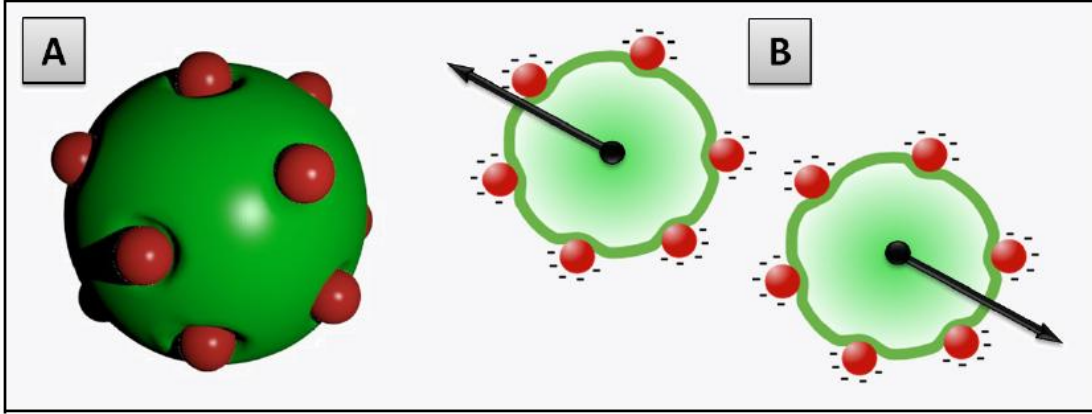
Daha önce bahsedilen ikinci olayda, küçük partiküllerin yüzeyindeki DLÇT yapısı, nanopartikülün vezikül içine yerleşmesiyle oluşur. Buna örnek olarak silika nanopartiküllerin DOPC vezikülleriyle etkileşimi verilebilir (Şekil 1.11). Le Bihan ve ark (2009) partiküllerin lipozomların dış yüzeyine tutulmasıyla ilgili olarak, membranın partikül etrafına yayılmasıyla devam eden ve nanopartikülün içeri çekilerek tamamen vezikül içine yerleşmesiyle son bulan invajinasyon mekanizmasını önermişlerdir. Bu nanopartikül göçü hücredeki endositoza benzemektedir (Michel ve Gradzielski 2012). Benzer sistemlerin simülasyonunun yukarıda açıklanan invajinasyon mekanizmasıyla tutarlı olduğu bildirilmiştir (Vacha ve ark 2011). İnvajinasyon mekanizması DLÇT yapısı bölümünde tartışıldığı gibi aynı enerji dengesi ile kontrol edilmektedir (Daillant ve ark 2005, Fleck 2004). Sonuçta partikülün lipozomun dış yüzeyinde tutunmasındaki aynı ifade (R_C) partikülün kritik çap değerinin hesaplanması için de kullanılabilir. Bu durumda toplam adezyon enerjisi, membran bükülmesiyle ilgili enerji ihtiyacını karşılamaz, bu nedenle daha fazla devam edebilmek için invajinasyon mekanizmasının önlenmesi gerekmektedir. Buna rağmen deneysel bulguların (Le Bihan ve ark 2009), teorik çalışmalarda belirtilen büyük lipozomlarla ($R_{ves} > 300$ nm) çalışma gerekliliği gibi bazı gereksinimleri desteklemediği görülmektedir (Deserno ve Gelbart 2002).



Şekil 1.11. DOPC lipidiyle oluşturulan LUV'larda yerleşen silika nanopartiküllerin Kriyo-TEM görüntüleri. Siyah oklar DLÇT içindeki nanopartikülleri, yıldız işareti ise serbest nanopartikülü göstermektedir. Bar 50 nm uzunluğunu temsil etmektedir (Le Bihan ve ark 2009).

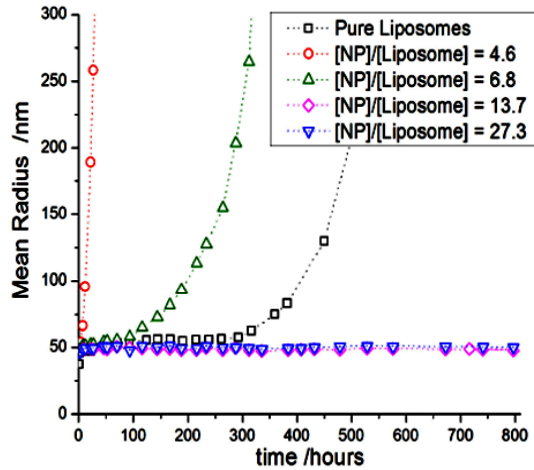
1.2.7.2. Dekorasyon ve Topaklanma Oluşumu

Vezikül dekorasyonu, lipozom membran yüzeyine hidrofilik nanopartiküllerin tutunmasıyla nanopartikül yarıçapının kritik değerden (R_C) düşük olduğu (bu değer in solüsyonun pH veya iyonik kuvvet gibi diğer parametrelerin ayarlanmasıyla kontrol edilebileceği göz önünde bulundurulmalıdır) sistemlerde oluşur (Savarala ve ark 2011, Yu ve ark 2007). Bu durumda, yapışma ve bükülme enerjisi arasındaki denge invajinasyon sürecinde olumsuz olan aralıkta kayar. Böylece membran, partikülün içe alınmasında yetersiz olur ve kendi dış yüzeyi üzerinde bırakır (Şekil 1.12A). Membran ve nanopartiküller arası çekici etkileşime bağlı olarak membran yüzeyinde nanopartiküller içe doğru girintiler yapabilir. Sadece yüzeyde girinti yapacak şekilde kalması, kısmi sarma için gerekli olan çekici etkileşim ve bükülme enerjisi arasında dengeye bağlıdır. Bu durum yalnızca membranda deformasyona yol açmakla kalmaz aynı zamanda bölgesel sertliğini de etkiler ve dahası yüzeye tutunmuş farklı nanopartiküller arasında ek bir etkileşim gücüne neden olacaktır. Buna ek olarak partikül yarıçapının kritik değere yakın olduğu bu gibi durumlarda invajinasyon sürecinin kinetiği yavaşlamaktadır ve sadece ara yapılarda dekore vezikül yapılar gözlemlenebilmektedir (Michel ve Gradzielski 2012). Yüklü nanopartiküller diğer partiküllerle (zwitterionic lipitler/yüklü nanopartiküller) lipozom dekorasyonunda, lipozom yüzeyinin elektriksel yüklenmesini sağlayarak mutlak zeta (ζ) potansiyel değer dağılımını değiştirir (Savarala ve ark 2011). Vezikül yüzeyinde elektriksel yüklerin görülmesi, dekore vezikül yapıları arasında elektrostatik itme kuvvetini açığa çıkarır ve böylece vezikül yayılımı dengelenir (Zhang ve Granick 2006, Savarala ve ark 2011). Bu itme kuvveti ζ -potansiyel ölçümü ile ölçülebilir ve beraberinde kararlılık artar, nanopartikül boyutu arttıkça potansiyel değişim daha da büyür (Savarala ve ark 2011). Bu sonuç birçok lipozomun yarı kararlı doğası göz önüne alındığında büyük bir ilgi çekmektedir (Laughlin 1997) ve genellikle hızlı bir faz ayrılmasına neden olur, bu da potansiyel uygulamaları için önemli bir dezavantaj oluşturabilir. Buna göre elektriksel yüklü silika nanopartiküllerin eklenmesi lipozomların kararlılığını düzenlemek için bir yöntemdir.



Şekil 1.12. Vezikül dekorasyonunun şematik çizimi ve partikül adsorpsiyonu nedeniyle lokal membran bükülmesi (A). Yüklü nanopartiküllerin elektrostatik itme etkisi (siyah oklar) nedeniyle lipozom dağılımında koloidal kararlılık (B) (Michel ve Gradzielski 2012).

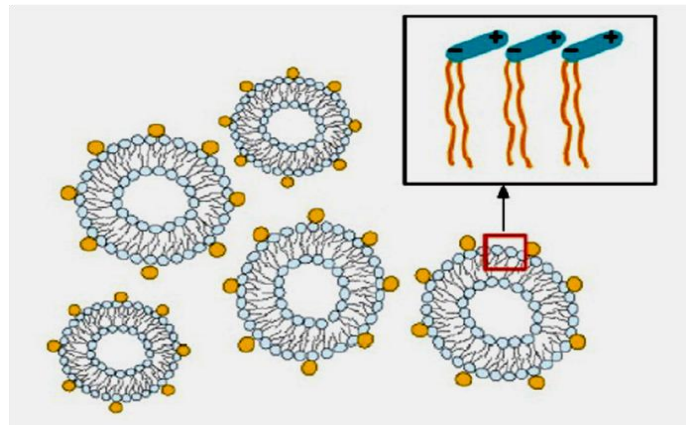
Bununla birlikte bu sistemlerde koloidal kararlılık sadece en az nanopartikülün yüzeye tutunmasıyla gerçekleşebilir, bu da dekore edilen vezikül yapılarının birbirini itmesini sağlamak için lipozomların yüzeyini yeterince kaplanmasıyla elde edilmektedir (Şekil 1.12B)(Zhang ve Granick 2006). Michel ve Gradzielski (2012) çalışmalarında partikül boyutunun değişiminin zamana bağlı fonksiyon olarak belirtildiği benzer sonuçları bildirmişlerdir (Şekil 1.13).



Şekil 1.13. Hidrodinamik yarıçapı ($R_h \approx 40$ nm) olan DPPC (dipalmitol fosfotidilkolin) vezikülünün su içinde farklı miktarlarda silika nanopartiküller ($R_h \approx 8$ nm) ile etkileşiminin dekore edilen veziküllerin ortalama yarıçapındaki değişim (Michel ve Gradzielski 2012).

Dinamik ışık saçılımı vasıtasıyla faz geçiş sıcaklığının altında tek tabakalı DPPC veziküllerinin ($R \sim 50\text{nm}$) kararlılığı üzerine yapılan çalışmada küçük miktarlarda küçük silika nanopartiküllerinin ($R_h \approx 8\text{ nm}$) eklenmesinin vezikül dağılımında hızlı bir kararsızlığa yol açtığı gösterilmiştir. Lipozom yüzeyinde yeterince yüksek miktarda silika partiküller tutulduğunda -yaklaşık olarak vezikül başına 14 nanopartikül- komşu lipozomlarla birleşmesini engelleyerek koloidal kararlılığını birkaç ay korumasını sağlamaktadır. Bu durum modifiye edilmemiş veziküllerin durumuyla karşılaştırıldığında muazzam bir gelişmedir ve böyle uzun süreli kararlılığı lipozom dağılımının saklanması ve kontrollü salınım özellikleri için çok önemlidir (Michel ve Gradzielski 2012).

Bunun aksine nanopartikül-mikroküre sistemlerinde gözlemlendiği gibi (Tohver ve ark 2011) eğer nanopartikül konsantrasyonu çok düşükse nanopartikül komşu lipozomlarla köprü kurabilir, dolayısıyla etkileşimleri başlatmış olur ve böylece birleşmelerini hızlandırır (Zhang ve Granick 2006). Bu etkinin büyüklüğünü sınırlandırmak için partikül yükünün işareti ve büyüklüğü değişmelidir. PC (fosfotidilkolin) lipozomlarında bulunduğu gibi katyonik partiküllerin kullanımı anyoniklere göre alt yüzey kaplamasında koloidal kararlılığa neden olur (Yu ve ark 2007). Aslında katyonik partiküllerin lesitin baş grubundaki $P^- - N^+$ dipolün geometrisine bağlı olarak membran yüzeyinde yapışması zayıftır (Şekil 1.14) ve sonuçta komşu lipozomlar arasında köprü kurulmasına daha az eğilimli olmaktadır. Bu sonuçlar analog sistemlerin bilgisayar simülasyonunda yapılan tahminleri doğrulamaktadır (Michel ve Gradzielski 2012).



Şekil 1.14. DLPC (dilaurolyfosfotidilkolin) lipozom süspansiyonunun nanopartiküllerle kararlı hale getirilmesinin şematik gösterimi. Çerçeve içinde zwitteriyonik lipidin dipolar baş gurubu şematik diyagramı gösterilmektedir (Yu ve ark 2007).

Nanopartiküllerle desteklenmiş lipozomlar üzerine yapılan spesifik çalışmalar da bu yapıların ilginç özelliklere sahip oldukları bulunmuştur. Örneğin DLÇT ile oluşturulan dekore veziküllerde, nanopartiküllerin PEG ile kaplanması (Bartucci ve ark 2002), nanopartiküllerin yüzeyde tutunmasını, lipozom sabit ligandı (biotin) ve serbest reseptör proteinleri (streptavidin) arasındaki bağı ne engeller ne de düşürür. Ayrıca dekore lipozomların dış yüzeyi nanopartikül varlığına rağmen daha ulaşılabilir ve biyofonksiyoneldir (Zhang ve ark 2007). Dekore lipozomların partikül dekorasyonu lipozomların geçirgenliğini (içindeki molekülün serbestlemesini) engelliyor gibi görünmektedir; fakat bunun aksine lipozomların sulu iç yapısına yüklenmiş moleküllerin (protein) salınımı lipozomun dış yüzeyinde hidrofilik nanopartikül tabakanın uygun bir şekilde düzenlenmesiyle daha iyi bir şekilde kontrol edilebilmektedir (Mohanraj ve ark 2010). Bu potansiyel uygulamalar için önemlidir çünkü lipozomun diğer biyolojik fonksiyonlarını korurken aynı zamanda kararlı olmasını sağlamaktadır. Buna ek olarak dekore veziküller düz yüzeylerde kolaylıkla hareketsiz kalabilmektedir. Bu düz yüzey ile lipozom yüzeyinde tutunan nanopartiküllerin çekici elektrostatik etkileşimin ayarlanmasıyla sağlanmaktadır (Zhang ve ark 2006). Böyle sabit lipozomların biyomolekül çalışmalarında nano-taşıyıcı olarak kullanılma potansiyeli bulunmaktadır çünkü içlerine yüklenen moleküllerin uzun süreli gözlemlenmesinde daha az yüzey karışıklığına neden olmaktadır (Michel ve Gradzielski 2012).

1.2.7.3. Nanopartikül Membran Etkileşimi

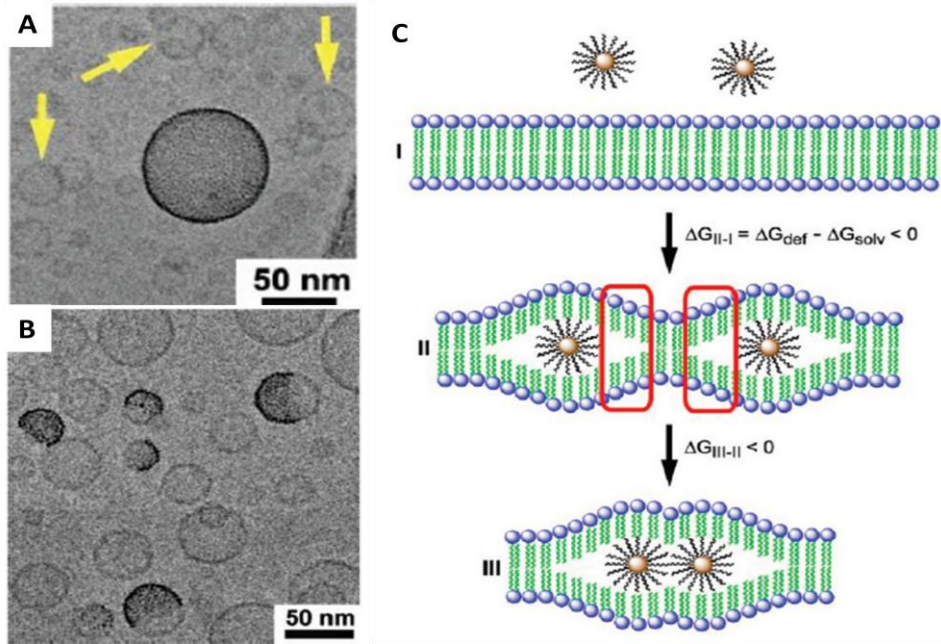
Fosfolipit çift tabakadaki hidrofobik iç yapının içinde sınırlanmış halde bulunan açıl zincirlerine yüksek ilgisi olan hidrofobik nanopartiküller kullanıldığında çift tabakadan oluşan membran içinde nanopartiküllerde birleşme meydana gelir. Bu tür vezikül-nanopartikül hibritleri oluşturmak için en yaygın hazırlama yolu kloroform içindeki fosfolipit MLV ve hidrofobik partikül karışımını kurutarak nanopartikül-lipit film elde etmek, sonra sulandırarak daha ileri işlemler yapmak veya sonikasyon ile nihai vezikül-nanopartikül hibrit dağılımı elde etmektir (Jang ve ark 2003).

Veziküllerde altın (Rasch ve ark 2010, Park ve ark 2006, Paasonen ve ark 2010), gümüş (Bothun ve ark 2009, Park ve ark 2005), silikon (Jang ve ark 2003), Fe₃O₄ (Krack ve ark 2008, Amstad ve ark 2011) ve kuantum nokta (CdSe, ZnS) (Bothun ve ark 2009, Al-Jamal ve ark 2008, Gopalakrishnan ve ark 2006) gibi farklı hidrofobik nanopartiküller kullanılarak

birçok çalışma yapılmıştır. Lipozomlarda demir-oksit nanopartikül gömülmesinin lipozom boyutunu azalttığı belirtilmiş ve bunun nedeni olarak lipozom üretimi sırasında lipitlerin filtreden geçirilmesi aşamasında nanopartiküllerin porları tıkanması olduğu ileri sürülmüştür (Amstad ve ark 2011). Fakat birçok çalışmada, nanopartiküllerin birleşmesinin vezikül boyutu ve kararlılığı üzerine önemli bir etkisi görülmemiştir (Jang ve ark 2003, Park ve ark 2006). Bununla birlikte, internalize nanopartiküller lipit çift tabaka yapısında lokal bozulmaya sebep olurken, lipit düzenlenmeyi azalttığı ve böylece membran için daha yüksek bir akışkanlık oluşurken (Park ve ark 2006,2005, Bothun 2008) aynı zamanda lipit çift tabakanın faz geçiş termodinamiğini değiştirmektedir. Burada ana faz geçişi ile geçiş öncesi- düzenli jelden (L_{β}) düzensiz jele (P_{β}) geçişi- birbirine yaklaştırır ve erime bölgesi genişletilerek T_m değerini değiştirdiği bildirilmektedir (Bothun ve ark 2009, Bothun 2008, Chen ve ark 2010).

Teorik çalışmalar, partikül gömme mekanizmasını hidrofobik küreciklerin saf sudan hidrofobik membran içine hareket etmesi nedeniyle oluşan serbest enerji değişiminin baskınlığı sonucuna dayanarak açıklamaktadır (Ginzburg ve ark 2007, Wi ve ark 2008). Bu bağlamda arayüz enerjisindeki kazanç ($\Delta\lambda \cdot A$) 4 nm çapındaki nanopartiküllerde (20 mN/m ara yüzey gerilimini değiştirmek için) yaklaşık 1000 kT'dir (Michel ve Gradzielski 2012). Bununla birlikte, eğer parçacık boyutu kullanılan lipit türüne bağlı olarak kritik boyutun altında ve membran kalınlığına yakın ise membran içindeki etkileşimin sadece enerjetik olarak uyumlu olduğu belirtilebilir (Rasch ve ark 2010, Wi ve ark 2008). Daha büyük partiküller yüksek elastik enerji kaybına ve membranla çevrili olmanın gerektirdiği geometrik zorluklara bağlı olarak lipit çift tabaka içinde yer alamamaktadır ve böylece membran dalgalanmaları baskılanmaktadır. Büyük ve çok hidrofobik partiküller ile lipozomların ya da fosfolipit molekülleri arasındaki etkileşim sonucunda hidrofobik yüzeylerde fosfolipit tek tabaka oluşumuna yol açtığı bildirilmiştir (Chibowski ve ark 2011, Park JW 2011, Fang ve ark 2010). Sonuç olarak ortaya çıkan yapı ilaç dağılımı için biyolojik olarak uyumlu partiküllerden oluşmaktadır (Lukacova ve ark 2007, Wean ve ark 2011, Zhang ve ark 2008) ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi için kolon materyalleri ya da hareketsiz durumlardaki membran benzeri yapıların araştırılmasında da kullanılabilir (Chibowski ve ark 2011, Park JW 2011). Bununla birlikte, fosfolipit çift tabakanın hidrofobik iç bölgesine küçük nanopartiküllerin yerleşmesi durumunda, fosfolipit membran her iki tabakanın açılma zincirlerini birbirinden ayrılmasıyla fermuar gibi açılmaktadır (Şekil 1.15C) (Rasch ve ark 2010). Fermuar gibi açılma birleşik nanopartiküller etrafında boşluklar ortaya çıkarmaktadır. Bu

boşluk hacmini ve deformasyon serbest enerjisini en düşük seviyede tutarak birleşik nanopartiküller çift tabaka içinde tespit edilebilmektedir (Şekil 1.15C). Sonuçta membran içinde nanopartikül içermeyen veziküllerin “normal” SUV dağılımı içinde tamamen yüklü birkaç lipozom (merkezdeki vezikülün koyu kenarları) (Şekil 1.15A) gözlenmektedir. Başka bir özel durum ise Janus tip vezikül yapısıdır; burada içe alınan nanopartiküller veziküllerin bir tarafında odaklanmaktadır (Şekil 1.15B) (Rasch ve ark 2010). Bu fenomen hakkındaki son çalışmalarda partikül agregasyonu sürecinde çift tabakanın faz davranışının önemi üzerinde durulmuştur. Nanopartikül kümelenmesi lipit erimesi sırasında gözlenmiştir ve bunun sıvı fazda gömülü partiküllerin lipit aracılı kuvvetler eşliğinde lateral kılcallıkla ilerleyerek daha büyük hidrofobik uyumsuzluk oluşturmasıyla gerçekleştiğine inanılmaktadır (Michel ve Gradzielski 2012). Bununla beraber, lipozom dağılımı içinde bazı veziküllerde partiküllerin gömülme tercihi veya vezikülün bir tarafında toplanması (Janus veziküllerindeki gibi) diğer benzer çalışmalarda bildirilmemiştir (Bothun ve ark 2009, Amstad ve ark 2011, Gopalakrishnan ve ark 2006) ve bu nedenle hala tartışmaya açık bir konudur.



Şekil 1.15. Membran İnternalizasyonu. (A)-Küçük tek tabaka veziküllerle çevrelenmiş vezikül-nanopartikül hibrit yapısının Kriyo-TEM görüntüsü. (B)-Janus veziküllerin Kriyo-TEM görüntüsü. (C)-Membranda hidrofobik nanopartiküllerin internalize oluşunun şematik gösterimi (Rasch ve ark 2010).

Böyle nanopartikül-vezikül hibritleri nanobiyoteknolojide umut verici araçlardır. Örneğin kuantum dot veziküllerin kullanımı hücre yüzeyleriyle veziküllerin birleşmesinin kontrolüne izin verirken, aynı zamanda hücre membranı üzerinde oluşabilecek yamaların floresans yardımıyla görüntülenmesini de sağlamaktadır (Gopalakrishnan ve ark 2006). Gömülü paramanyetik nanopartiküller elektromanyetik alan kullanılarak ısıtıldığında çift tabaka faz geçişini uyararak lipozom membran geçirgenliğinin kontrol edilmesinde yararlı olmaktadır (Amstad ve ark 2011, Chen ve ark 2010, Bothun ve Preiss 2011). Bu tekniğin önemli bir zorluğu da ortam sıcaklığını değiştirmeden lokal faz geçişi sağlanabilirken, in vivo olarak nanopartikül yüklü lipozomlar, çevresindeki biyolojik yapılara zarar verebilmektedir. Bu nedenle her biri stabilize edilmiş demir oksit partiküllerin kullanımının kendi çevresi etrafında önemli bir etkisi olmadan membranın lokal olarak ısıtılmasına olanak sağladığı bildirilmiştir (Amstad ve ark 2011, Chen ve ark 2010). Bu şekilde vezikül sistemlerindeki aktif ajanların kontrollü dağılımı ve yönlendirilmesine olanak sağlanmaktadır. Buna ek olarak potansiyel tıbbi uygulamalar göz önüne alındığında bu yaklaşımın istenildiği gibi çok daha düşük ve kontrollü bir enerji girişi sağladığı görülmektedir.

1.3. Manyetolipozomlar

Manyetolipozomlar, lipozom ve manyetik nanopartikül içeren, biyoteknoloji ve biyotıp alanlarında ilaç dağılımı üzerine yapılan çalışmalar için geliştirilmiş umut verici yapılardır (Qiu ve ark 2012). Lipozom/nanopartikül hibrit yapısı manyetolipozomlara çok fonksiyonluluk kazandırdığından ilaç dağılımının yanı sıra manyetik rezonans (MR) görüntüleme (Soenen ve ark 2011, Frascione ve ark 2012), manyetik hedefleme ve ısıtma ile kontrollü ilaç serbestleme (Pradhan ve ark 2010, Kulshrestha ve ark 2012) gibi alanlarda da kullanılabilme özelliği kazandırmaktadır. Manyetolipozom tasarımında genel strateji, büyük süperparamanyetik demir oksit nanopartiküllerin yüzeyine lipidlerin tutunması veya küçük süperparamanyetik demir oksit nanopartiküllerin birçoğunun sulu ortamlarda lipozomlar içine yerleşmesi şeklinde olmaktadır (Chen ve ark 2010). Eğer manyetolipozomlar hedef noktaya ulaşabilirse, radyo frekansıyla (RF) oluşturulan elektromanyetik alan ile lokal hipertermi sağlanabilir. RF enerjisinin avantajı dokuya kolaylıkla nüfuz etmesi ve Hf değerinin $4,85 \times 10^5$ kA/m.s altında olması durumunda 1 saat boyunca non-invaziv olmasıdır ($H = \text{akım} \times \text{birim uzunluktaki sargı sayısı}$, f: frekans) (Brezovich 1988, Chen ve ark 2010).

MR ile görüntüleme manyetolipozomlarda yerleşen demir oksit nanopartiküller rol almaktadır (Soenen ve ark 2011, Soenen ve De Cuyper 2009, Skouras ve ark 2011). Demir oksit nanopartiküller MR görüntüleme T2/T2* kontrast ajan olarak kullanılmaktadır (Soenen ve ark 2011). Süperparamanyetik demir oksit nanopartiküller (SPIO: çapları-70 ile 150nm arasında) T2 kontrast ajanlar olarak kullanılırken, ultra küçük süperparamanyetik demir oksit nanopartiküller (USPIO: çapları 50 nm'den küçük) uygun konsantrasyonlarda uygulandığında T1 kontrast özellik gösterebilmektedirler (Fracione ve ark 2012). Demiroksit nanopartiküllerin çözünürlüğünü ve fiziksel kararlılığını artırmak için nanopartiküller sitrat, dekstran veya oleik asit ile kaplanmaktadır (Geraldès ve Laurent 2009, Soenen ve De Cuyper 2009, Fracione ve ark 2012). Örneğin, FDA onaylı Endorem® (ABD'de Feridex®), Resovist® veya Sinerem® değişik büyüklüklerde ve dekstran kaplı partiküllerden oluşmaktadır (Soenen ve ark 2011, Soenen ve De Cuyper 2009, Geraldès ve Laurent 2009). USPIO'lar yakınındaki suyun protonlarının relaksivitesini, nanomolar konsantrasyonlarda T1 ve T2 relaksasyon zamanını düşürerek etkiler. Bu da T1 ağırlıklı dizi uygulamasında sinyal yoğunluğunu artırırken (hiperintense T1 etki) ve T2 ağırlıklı dizi uygulamasında sinyal yoğunluğunu düşürür (hipointense T2 etki) (Fracione ve ark 2012). Bununla birlikte USPIO'lar sulu solüsyonlarda toplanma ve çökme eğilimindedirler, bu da kararlı olmayan bir solüsyon oluşturur. Manyetik çekirdeğin yeterince etkili kaplanamaması magnetitlerin (Fe₃O₄) ve maghemitelerin (Fe₂O₃) yüzeyinde oksitlenmeye neden olarak partiküllerin fizikokimyasal ve manyetik özelliklerini oldukça değiştirebilmektedir (Plaza ve ark 2002, Fracione ve ark 2012). USPIO'ların lipozomlar içine gömülmesiyle bu gibi problemler yüksek oranda ortadan kalkacak ve oluşan manyetolipozom yapısında yeterli miktarda manyetik nanopartiküllerin bulunmasıyla manyetik dipol moment artacak ve tek manyetik çekirdeğe oranla çok daha kuvvetli MR görüntü sinyali elde edilebilecektir (Fracione ve ark 2012).

Nanopartiküllerin pozitif yüklü moleküllerle kaplanması hücre fizyolojisini değiştirebilmektedir. Örneğin katyonik manyetolipozomlarda demir oksit çekirdek belli oranda katyonik lipid içeren fosfolipit çift tabaka ile kaplanır ve bu katyonik amfil plazma membranına transfer olarak transmembran porların yapısını indükleyebilmektedir. Böylece membran potansiyeli veya hücre sinyal iletimini, protein kinaz C'yi inhibe ederek veya Ca²⁺ alımına neden olarak değiştirebilmekte ve böylece hücre ölümüne neden olmaktadır (Soenen ve De Cuyper 2009, Soenen ve ark 2007). Manyetolipozomlarda nanopartikül

konsantrasyonunun artışına bağı olarak 3T3 (fibroblast) hücrelerinde yapılan sitotoksisite testlerinde laktat dehidrogenaz (LDH) ve mitokondriyal metabolizma (MTT) tahlilleri 100 ve 3500 µg Fe/ml içeren hücrelerde 24 saat inkübasyon sonrasında denenmiştir. Düşük konsantrasyon nanopartikül içeren hücrelerde canlılık yüzdesi, LDH ve MTT tahlillerinde birbirine ve kontrol grubuna yakın sonuçlar verirken, yüksek konsantrasyonda nanopartikül içeren hücrelerde canlılık yüzdesi LDH denemesi sonucu küçük bir düşme göstermiş fakat MTT denemesi sonucu canlılıkta artış görülmüştür. MTT analizlerinde formazan kristalleri rol oynamaktadır ve bu artış nedeni olarak da reaktif oksijen türlerinin hücrenin redoks denge durumunu değiştirmesi ve daha sonrasında mitokondriyal enzim aktivitesini artırarak formazan kristallerini indüklediği bildirilmiştir. Bununla birlikte toksisite nanopartikül boyutuna, lipozom potansiyeline ve farklı hücre türlerine göre değişiklik göstermektedir (Soenen ve De Cuyper 2009). Bu nedenle nanopartikül konsantrasyonunun uygun miktarlara düşürülmesi ve hücrel hedefleme önem arz etmektedir fakat görüntüleme yeterli kontrastın sağlanması, hipertermi ve manyetik yönlendirme için yüksek nanopartikül konsantrasyonuna ihtiyaç vardır (Samadikhah ve ark 2011).

Manyetolipozomlara ilaç yükleme ve manyetik alan altında ilaç serbestleme üzerine çalışmalar giderek artan bir araştırma konusudur. Nappini ve ark (2010) karboksiflorasein yüklü manyetolipozomlarda düşük frekanslı alternatif manyetik alan uygulayarak frekans artışına bağı olarak ilaç serbestlemede artış gördüklerini aynı zamanda uygulama süresinin 15 dakikanın üzerine çıkarılmasıyla da %60 civarında ilaç serbestlemede başarı sağladıklarını bildirmişlerdir. Ding ve ark (2012) DSPE-PEG 2000 lipidini ve Fe₃O₄ nanopartikülleriyle oluşturduğu manyetolipozomların içine karboksiflorasein ve doksorubisin yükleyerek manyetolipozomların 42 °C'de ilaç serbestleme yüzdeleri araştırılmıştır. Sonuçta 42 °C'de 1 saat inkübasyon sonrasında karboksifloraseinin %68 ve doksorubisinin %90 serbestlendiğini bildirmiştir. Yoshida ve ark (2012) farelerde mide kanseri modeli oluşturarak kemohipertermi çalışmasında Doseksel yüklü manyetolipozomlar kullanmıştır. Doseksel yüklü manyetolipozomlar dışarıdan elektromanyetik alan altında termal etki ile 7 gün sonunda tümör hacminde istatistiksel olarak anlamlı azalma göstermiştir.

Zhang ve ark (2005) negatif yüzey yüküne sahip paklitaksel içeren manyetolipozomları ve piyasada bulunan paklitakselin başka formuyla karşılaştırmalı olarak meme kanseri oluşturulmuş BALB/C farelerinde intravenöz uygulamayla denemişler ve 24 saat sonunda tümörde paklitaksel birikiminin manyetolipozom grubunda diğerlerine oranla 4

kat daha fazla olduğunu göstermişlerdir. 24 saat sonunda plazma, kalp ve karaciğerdeki ilaç miktarı bütün gruplar çok düşük bulunmuştur. Dışarıdan manyetik alan etkisinde ise kısa sürede ilaç miktarının tümörde tepe değerine ulaştığını, manyetik alan uygulanan 2 saat boyunca ilaç miktarının bu tepe değerinde kaldığını ve manyetik alan uzaklaştırıldığında ise ilacın zamanla ortamda azaldığını bildirmişlerdir.

Manyetik hedeflemenin organ spesifikliğı içermemesi ve manyetolipozomların manyetik hedefleme ve ilaç dağıtıcı platform olarak kullanışlı olması nedeniyle manyetolipozom çalışmalarının yakın bir zamanda faz denemelerinin başlayabileceğı sonucunu düşündürmektedir.

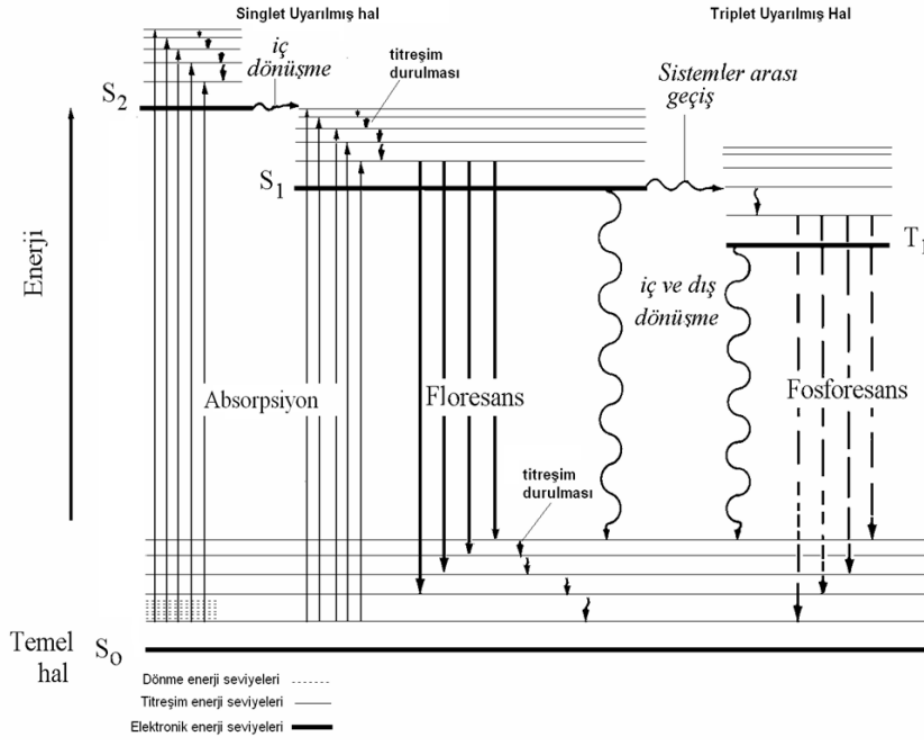
1.4. Fotodinamik Terapi

Fotodinamik terapi (FDT) akciğer, özafagus, mide, serviks, mesane gibi çeşitli kanser tiplerinin ve ateroskleroz, psoriasis, aktinik keratöz, yaşlanmaya bağı makular dejenerasyon gibi kötü huylu olmayan hastalıkların tedavisinde fotosensitif ajanlar ve görünür ışığın beraber kullanılmasına dayanan alternatif bir tedavi yöntemidir (Bilgin ve ark 2005). Fotodinamik terapinin etki mekanizması fotosensitif bir maddenin ışık etkisi ile aktive olması ve enerjisini ortamdaki moleküler oksijene vermesiyle açığa çıkan oksijen radikallerinin hücre yıkımı oluşturmaya dayanmaktadır. Tedavinin etkinliğı uygulanan fotosensitif ajana, ışık kaynağına ve tedavi şekline bağı olarak değışiklik göstermektedir (Shackley ve ark 1999, Li ve ark 2006, Lilge ve ark 1997). Hedeflenen dokuda FDT'ye cevap olarak dokuya etki eden parametreler lokal optik ışık dozu, oksijen bulunabilirliğı ve fotosensitif ajan konsantrasyonudur. Fotosensitif ajanın dokuda tutulması, doku türüne, fotosensitif ajanın kimyasal bileşimine, ilacı dağıtıcı araca (uygulanabilirse), uygulama şekline (rotasının tayini) ve uygulamadan sonra geçen süreye bağıdır (Lilge ve ark 1997). Tümörlü hayvanlar ile sistematik çalışmalar ilk defa 1972 yılında Diamond ve arkadaşları tarafından yayınlanmıştır. Araştırmacı deneysel olarak hematoporfirin (HPD) ışık aktivasyon etkisini sıçan glioma hücrelerinde *in vivo* ve *in vitro* olarak çalışmış ve her iki durumda da anlamlı sonuçlar elde etmiştir. Tedavinin *in vitro* olarak %100 hücre ölümüne ve *in vivo* olarak ise tümör nekrozuna yol açtığı ve tümörde büyümeyi önlediğı gösterilmiştir (Soumya 2004, Ackroyd ve ark 2001). Kanser tedavisinde fotosensitif ajan çoğunlukla kan dolaşımına enjekte edilmektedir ve ajan vücuttaki bütün hücreler tarafından alınmaktadır fakat kanser hücrelerinde birikimi ve kalma süresi normal hücrelere göre daha uzundur. Enjeksiyondan yaklaşık 24-72 saat sonra

normal hücrelerde kalan ajan miktarı kanserli hücrelerdekine göre daha azalmaktadır. Bu kanserli hücreler ışığa maruz bırakıldığında fotosensitif ajan oksijenin aktif formu olan singlet oksijenin açığa çıkmasına neden olmakta ve kanserli hücrelerde nekroza kadar giden olayları başlatmaktadır (NCI 13/04/2014). FDT'nin gerektiğinde tekrarlanabilir ve cerrahi, radyasyon ve kemoterapi gibi terapilerle beraber kullanılabilir olması klinikte büyük avantaj sağlamaktadır (Wilson ve ark 2002). Bu terapinin en büyük yan etkisi fotosensitif ajana bağlı olarak terapiden yaklaşık 6 hafta sonraya kadar deri ve gözlerde ışığa karşı hassasiyetin devam etmesi bildirilmektedir. Bu nedenle hastalar direk güneş ışığına ve kapalı alanlarda kullanılan şiddetli beyaz ışığa maruz kalmaktan bu süre zarfında korunmalıdırlar. FDT sonucunda sağlıklı dokuların harabiyeti minimum düzeyde olsa bile FDT, yakındaki sağlıklı dokularda yanma, eritem, ödem hatta çok nadiren nekroz oluşumuna neden olabilmektedir. Bununla beraber uygulamada klinik duruma bağlı olarak öksürük, yutkunmada zorlanma, mide ağrısı, nefes alırken ağrı, kısa aralıklarla nefes alma gibi geçici yan etkilerde görülebilmektedir. Bu nedenle ajanların hedef dokuya taşınması üzerine araştırmalar devam etmektedir (NCI 13/04/2014).

1.4.1. Fotosensitif Ajanlar ve Etki Mekanizmaları

Fotosensitif ajanlar ışığa duyarlı kimyasal maddelerdir. Fotodinamik terapide bu ajanlar uygun dalga boyundaki ışıkla uyarıldığında yüksek reaktif hidroksil radikal türlerini (Tip-1) veya singlet oksijen üretirler (Tip-2). Bu reaktif türlerin her ikisi de kaskatlar halinde seyreden biyokimyasal olayları başlatarak hücre ölümüne neden olmaktadır (Juarranz ve ark 2008). Genel olarak temel durumdaki fotosensitif bir ajan uygun dalga boyundaki ışığı soğurduğunda elektronu birinci uyarılmış singlet enerji düzeyine geçer (Şekil 1.16).

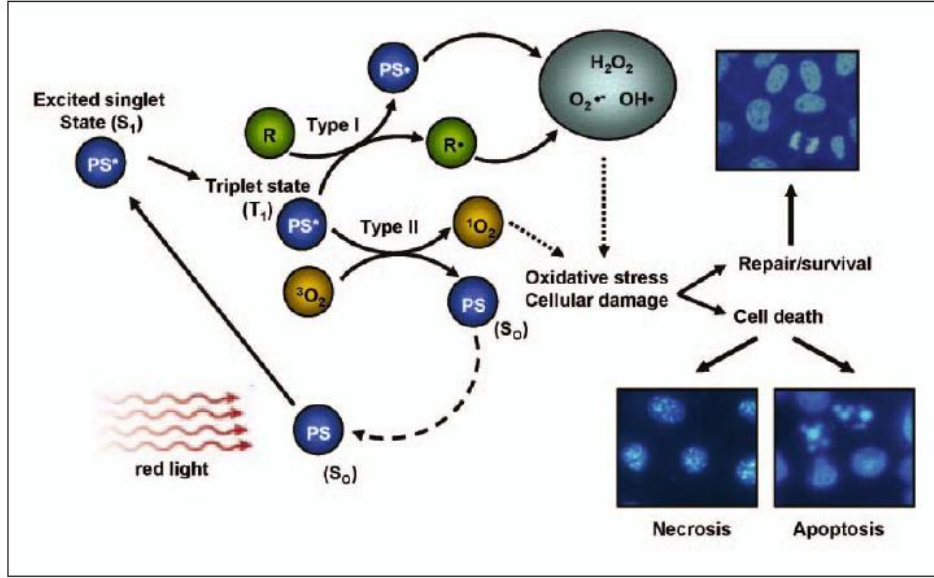


Şekil 1.16. Jablonski Diyagramı: Elektronik olarak temel durumdan enerji soğurarak uyarılmış duruma geçen moleküllerde enerji geçişini göstermektedir (Grossweiner ve ark 2005).

Uyarılmış düzeyde atom kararsızdır ve uzun süre kalamaz ve floresans ve/veya fosforesans ışınması yaparak veya etrafa ısı vererek tekrar temel düzeye dönmektedir. Bununla birlikte uyarılmış singlet düzeyden sistemler arası geçişle singlet düzeye oranla daha kararlı triplet seviyesine geçebilir. Triplet düzeyinde fotosensitif ajan iki farklı reaksiyon oluşturabilir (Şekil 1.17):

(1) oksijen veya biyomoleküller ile (lipitler, proteinler, nükleik asitler vb.) elektron veya hidrojen atomu transferi yaparak serbest radikaller ve reaktif oksijen türlerini açığa çıkarırlar (süperoksit anyon (O_2^-), hidroksil radikal (OH^*), hidrojen peroksit (H_2O_2)); (2) enerjisini temel düzeyde triplet oksijene (3O_2) aktararak radikal olmayan fakat yüksek oranda reaktif uyarılmış düzeyde singlet oksijen (1O_2) oluşumunu sağlar. Birinci reaksiyon işlemlerine Tip-1 fotosensitizasyon reaksiyonu ve ikincisine de Tip-2 fotosensitizasyon reaksiyonu adı verilir. Bu nedenle fotodinamik terapinin etkinliği ortamdaki oksijen varlığına bağlıdır ve hipoksik durumlarda bu etkinliğin azaldığı bildirilmektedir (Muehlmann ve ark 2011, Juarranz ve ark 2008, Mroz ve ark 2011). Singlet oksijenin hücreler arasındaki ömrü yaklaşık 3 μs olarak

bildirilmiştir (O’conner ve ark 2009). FDT etki mekanizması hücre genotipine (Almeida ve ark 2004), FDT dozuna (Vantieghem ve ark 1998), intrasellüler adenosin trifosfat (ATP) seviyesine (Plaetzer ve ark 2002) ve fotosensitif ajanın yerleşimi gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Fotosensitif ajanların mitokondrial yerleşimi apoptozisi indüklerken plazma membranında yerleşimi genelde nekroza neden olmaktadır(Dougherty ve ark 1998).

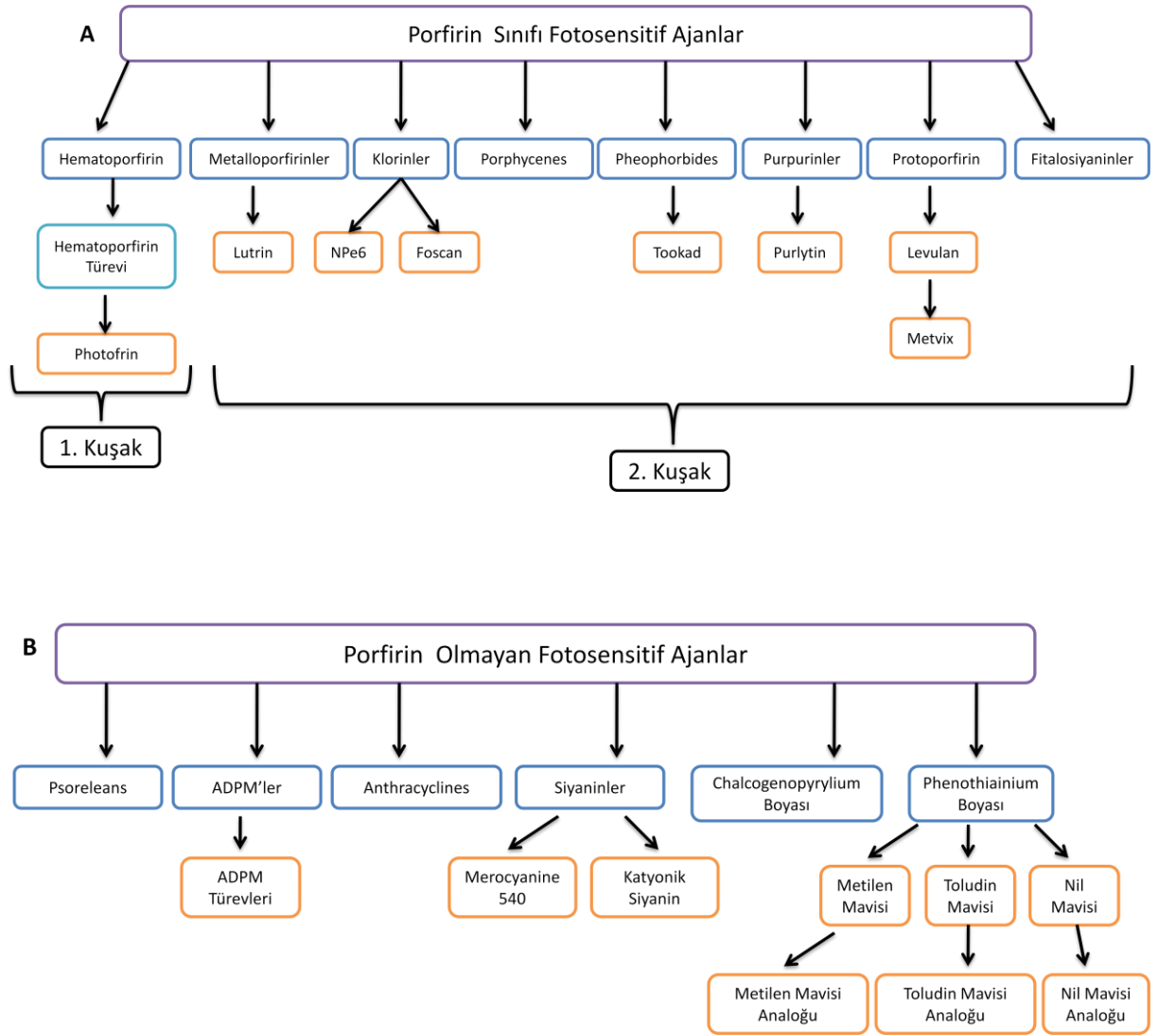


Şekil 1.17 FDT’de reaksiyonlar. FDT üç elementi gerektirir: Bunlar fotosensitif ajan (PS), ışık ve oksijen. PS spesifik dalga boyundaki ışığa maruz kaldığında temel singlet düzeyden (S_0) uyarılmış singlet düzeye geçerek (S_1) aktive olur. Daha sonra sistemler arası geçişle uyarılmış triplet düzeyine geçer (T_1). T_1 düzeyindeki enerjisini biyolojik ortama ve moleküler oksijene aktarır ve Tip1 ve Tip2 fotosensitizasyon reaksiyonlarıyla reaktif oksijen türleri (1O_2 , H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$, OH^*) açığa çıkarır. Buda ya hücreyi tamir eder ya da nekroz veya apoptoz yoluyla hücrelerin ölümüne yol açar (Juarranz ve ark 2008).

Bugün kanserde terapi amaçlı birçok fotosensitif ajan kullanılmaktadır. Kanada Sağlık Bakanlığı 1993 yılında hematoporfirin türevi olan Photofrin® [Axcan Pharma, Kanada] isimli ilacın FDT yöntemiyle kanser tedavisinde kullanımına onay vermiştir. Takiben Amerika Birleşik Devletlerinde FDA Kurumu Photofrin® isimli ajanın özafagus kanseri ve küçük hücreli dışı akciğer kanserinde FDT ajanı olarak kullanılmasını onaylamıştır. 2003 yılında FDA Kurumu prekanseröz olarak isimlendirilen Barret özafaguslu hastalarda Photofrin® kullanımına izin vermiştir. Sonuçta, 1993 yılından bu yana Protoporfirin IX (PpIX) öncülü olan Levulan® [ABD], Benzoporfirin türevi olan Vertofrin® [Kanada], mTHPC türevi olan

Foscan® [Almanya], Lutesyum teksafirin türevi olan Lutrin® [ABD], Klorin-e₆ türevi olan NPe6® [Japonya] isimli fotosensitif ajanlar klinikte FDT ajanları olarak kullanılmaya başlanmıştır (NCI 13/04/2014, Wilson 2002).

Fotosensitif ajanlar genelde porfirin ve porfirin olmayanlar şeklinde sınıflandırılırlar. Porfirin türevi fotosensitif ajanlar birinci, ikinci ve üçüncü kuşak fotosensitif ajanlar şeklinde sınıflandırılırlar. Birinci kuşak fotosensitif ajanlar hematoporfirin (HpD) türevi olan Photofrin®'dir (O'conner ve ark 2009). Deride uzun süreli ışık hassasiyeti, yetersiz doku penetrasyonu gibi bazı problemleri çözmek için ikinci kuşak fotosensitif ajanlar geliştirilmiştir (Nayak ve ark 2005). Bu ikinci nesil ajanlar kimyasal olarak birinci nesile göre daha saf, daha uzun dalga boylarında ışığı soğurmakta ve tedavi sonrası deride daha az ışık hassasiyeti oluşturmaktadır. Bununla birlikte bu ikinci nesil ajanlar FDT'de altın standart olan Photofrin'in tümördeki etkinliği kadar etkili olması gerekmektedir (Schuitmaker ve ark 1996, O'Conner ve ark 2009). İkinci nesil fotosensitif ajanların antikorlar veya lipozomlar gibi taşıyıcılara bağlanmasıyla tümör dokusundaki seçici birikimi üçüncü nesil fotosensitif ajanlar olarak isimlendirilmektedir ve son yıllarda bu ajanlar üzerine çalışmalar yoğunlaşmıştır (Juzeniene vd. 2007). Araştırmalarda kullanılan fotosensitif ajanların Şekil 1.18'de gösterildiği gibi büyük çoğunluğu porfirin türevi ajanlar olmasına rağmen çeşitli porfirin olmayan fotosensitif ajanlarda mevcuttur (O'Conner ve ark 2009).

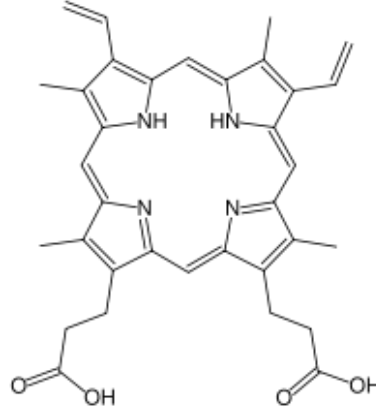


Şekil 1.18 Fotosensitif ajanların sınıflandırılması; A) porfirin tabanlı olanlar, B) porfirin tabanlı olmayanlar (O'Conner ve ark 2009).

Porfirinler bütün yaşayan organizmaların biyolojik aktivitelerinde gerekli olan bir maddedir. Bu moleküller yüksek oranda bileşik yapıya sahip, heterosiklik moleküllerdir ve merkezinde genelde metalik atom bulundururlar. Çeşitli porfirin türevleri bulunmaktadır ve bunlar yükseltgenme ve indirgenme reaksiyonlarının kontrolünde görev alırlar. Hematoporfirin türevi ajanlar onkolojide FDT ilacı olarak başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (O'Conner ve ark 2009).

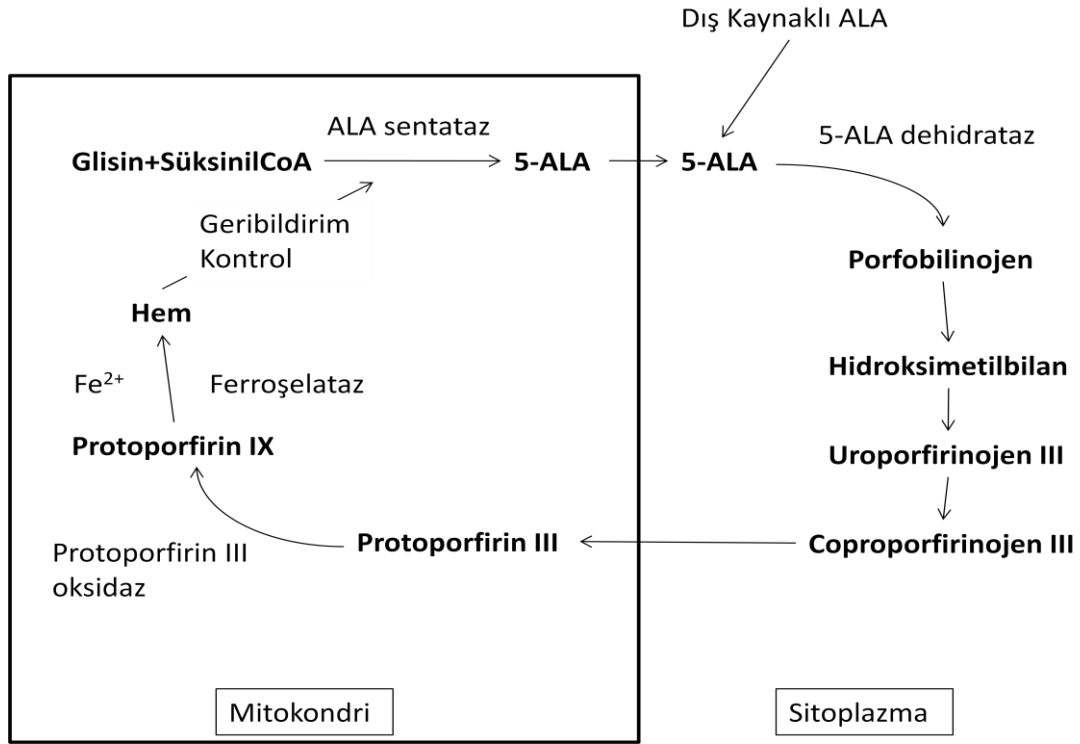
1.4.2. Protoporfirin

Protoporfirin IX (PpIX) hemoglobin, sitokrom c ve diğer biyolojik olarak ilişkili moleküllerde doğal olarak oluşan porfirin bileşenidir (Şekil 1.19).



Şekil 1.19. Protoporfirin IX molekül yapısı (Wikipedia 27/04/2004).

Fotodinamik terapide ilaç olarak kullanılmakta fakat fizyolojik ortamlardaki düşük çözünürlüğü ve topaklanması nedeniyle doğrudan uygulaması çok kısıtlı olmaktadır (Rossi ve ark 2008). Bunun nedeni PpIX, pH 0-3 aralığında monomer, pH 3-7 aralığında yüksek oranda topaklanma ve pH 8'den büyük olduğu koşullarda dimer olarak bulunmasıdır (Scolaro ve ark 2002). Bununla birlikte dolaylı yoldan PpIX uygulaması hidroklorik asit solüsyonu içinde aminolevulinik asit (ALA.HCL) üzerinden mümkündür. ALA bütün in-vivo porfirinlerin öncül maddesidir ve dokuda PpIX oluşumunu uyarmaktadır (Rossi ve ark 2008). Vücutta veya hedef dokuda PpIX konsantrasyonunun geçici süre yükselmesi vücuda dışarıdan ALA uygulamasıyla elde edilebilir. ALA uygulaması Hem biyosentetik yolağında metabolik öncül olması nedeniyle ALA sentezinin enzimatik basamağındaki Hem ile uyarılan negatif geri bildirim kontrol mekanizmasını atlayarak vücutta PpIX konsantrasyonunun artmasını sağlamaktadır (Şekil 1.20) (Uehlinger ve ark 2000) .



Şekil 1.20. Dışarıdan ALA uygulanmasıyla dokuda PpIX oluşumunun indüklenmesinin şematik gösterimi.

1.4.2.1. Levulan

Levulan® (protoporfirin IX, 5- aminolevulinik asit) ikinci nesil fotosensitif ajandır ve tümörde sitotoksik etki gösterir. FDA 1999 yılında Levulan®'ın aktinik kerotoz hastalığında yüz ve kafa derisinde kullanımına onay vermiştir (Braathen ve ark 2007). Levulan®-FDT biyosentetik heme yolağında porfirin öncülü olan doğal olarak meydana gelen hidrofobik 5- aminolevulinic asit kullanımını sağlamaktadır. ALA mitokondride metabolize edilerek fotoaktif protoporfirin IX oluşmaktadır ve ALA'dan PpIX oluşumu PpIX'den heme oluşumundan fazla olduğunda bu bölgede PpIX birikimi meydana gelmektedir. Levulan® topikal olarak uygulandığında PpIX sadece malin dokularda değil aynı zamanda neoplastik lezyonlarda normal dokulara göre 2-10 kat daha fazla toplandığı bildirilmiştir (Kormeili ve ark 2004). Hem sentez enzim seviyelerindeki değişimler, kanser hücrelerindeki demir konsantrasyonunun azalması sonucu heme dönüşen PpIX oranındaki azalma, normal olmayan dokularda hasarlanmış stratum corneum varlığı, tümör dokusunun vasküler özelliği gibi faktörler bu seçici toplanmada etkili olmaktadır (Kormeili ve ark 2004, Schuitmaker ve ark

1996, Abels ve ark 1994). 5-ALA ile oluşturulan ışık duyarlılığı porfirin türevlerine benzer dalga boyunda 410 nm’de maksimum soğurulma değeri verirken, 510, 540, 580 ve 635nm dalga boylarında da küçük soğurulma tepeleri bulunduğu bildirilmiştir (Morton ve ark 2000). 635 nm dalga boyunda PpIX uyarılma sabiti $<5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ olarak bildirilmiştir (Sharman ve ark 1999). Lezyonda Levulan® uygulamasına bağlı olarak maksimal PpIX birikimi uygulama şekline bağlı olarak 1-8 saat sürmektedir ve iç kaynaklı üretilen PpIX vücuttan 24-48 saat içinde uzaklaştırılmaktadır (O’Conner ve ark 2009).

Levulan® -FDT’sinin aktinik keratoz tedavisindeki başarısı kanıtlanmıştır fakat hastalarda tedavi sırasında ağrı olmaktadır. Bu tedavideki en önemli dezavantaj ise tümör nekrozundaki etkinliğin 1mm derinliğe kadar olmasıdır (O’Conner ve ark 2009).

1.4.2.2. Metvix

Metvix® (metil aminolevülinik asit) Levulan®’nın metil ester öncülüdür. Yüksek oranda lipofilik olması derideki stratum corneum’dan penetrasyonuna izin vermektedir. Fotofiziksel, fotokimyasal, farmakolojik ve fotobiyolojik özellikleri Levulan® ile benzerlik göstermektedir. Metvix® hücre içine girdiğinde intrasellüler esteraz işlemi sırasında iki metil grubu bağlanarak ALA molekülüne dönüşür ve ALA ile ilgili olan standart biyokimyasal işlemler başlar (O’conner ve ark 2009). Bazal hücre kanser lezyonlarında 3 saatlik ilaç maruziyeti sonrasında Metvix® floresanının etki derinliği 2 mm olmaktadır (Peng ve ark 2001). Metvix® Avrupa’da bazal hücre karsinomu ve aktinik keratoz tedavileri için onaylanmıştır ve son zamanlarda kafa derisindeki aktinik keratozlar için Levulan® ile karşılaştırmalı çalışmalar yapılmaktadır (Moloney ve Collins 2007). Metvix® ve Levulan® ile yapılan FDT aktinik keratozun önemli derecede azalmasına neden olmuştur fakat bu iki ilaç arasında anlamlı bir fark elde edilememiştir. Bununla birlikte Levulan®’ın kullanımı ve sonrasında hastaların ağrı şiddeti Metvix® kullananlara oranla oldukça yüksek olduğu bildirilmiştir (O’Conner, 2009).

1.5. Fotodinamik Teşhis

Ultrasonagrafi, bilgisayarlı tomografi (BT) ve manyetik rezonans görüntüleme (MRG) gibi görüntüleme tekniklerinde ciddi gelişmeler olsada bu teknikler, yüksek çözünürlük gerektiren küçük tümörlerin görüntülenmesinde yetersiz kalabilmektedirler. Floresans özelliğine bağlı olarak görsel olarak belirlenebilen klinikteki tümör işaretleyicilerinin de hassaslık ve spesifiklik olarak eksiklikleri bulunmaktadır. Erken dönem lezyonları ve mikrometastaz gibi küçük lezyonların doğru bir şekilde belirlenebilmesi kötü huylu tümörlerin cerrahiyle alınması için uygun planlamanın yapılmasında gereklilik arz etmektedir.

Fotodinamik teşhis fotoaktif bir ilacın kötü huylu dokuda seçici olarak toplanmasını ve ilaçtan floresans salınımını gerektirmektedir. Bu yöntem normal doku ile tümör dokunun sınırlarının belirlenmesinde kullanılabilir. Fotodinamik Teşhiste floresans tanı, üroloji, dermatoloji ve nöroşirurjide kullanım amaçlı geliştirilmektedir (Inoue ve ark 2014). Floresans endoskopi veya başka optik filtreler ve cihazlar kullanılarak dokudan salınan floresans yoğunluğuna göre doku sınırları belirlenebilmektedir (Santos Cortes ve ark 2011).

Kutanöz skuamöz hücre kanserli hastaların Mohs mikroskopik cerrahi sonucu cerrahinin etkinliğini değerlendirmek için metil aminolevulinic asit denenmiştir. Sonuçta fotodinamik teşhis primer kutanöz skuamöz hücre kanserinin cerrahi etkinliğini artırmıştır. Bu nedenle cerrahi öncesi hastaların (3 ile 6 saat önce) metil-ALA veya ALA kullanması tavsiye edilmektedir. Bununla birlikte cerrahi derinliğin belirlenmesinde fotodinamik teşhis etkinliği henüz yeterli seviyede değildir (Jeaon ve ark 2013).

Asai ve ark (2013) skuamöz hücre kanser fare modelinde metastatik lenf düğümlerinin belirlenmesinde ALA ile indüklenen PpIX'in floresans özelliğinin kullanılabileceğinin bildirmişlerdir.

Mesane düz yüzeydeki lezyonların beyaz ışıkla fark edilmesi zor olmaktadır. Mesane kanserli hastalarda 5-ALA kullanılarak küçük papillar ve düz üroteryal lezyonların görülmesi anlamlı derecede artmıştır (Denzinger ve ark 2007).

1.6. Meme Kanseri

Meme kanseri, meme dokusundaki hücrelerden gelişen kanserlerdir. Meme dokusunun herhangi bir yerinden kaynaklanabilir. En sık görülen tipi; meme kanallarından kaynaklanan “duktal” kanserlerdir. Süt üreten bezlerden köken alan “lobüler” kanserler de sık görülür. Ayrıca diğer dokulardan kaynaklanan medüller, tübüler, müsinöz gibi kanserler daha nadir görülmektedir. Meme kanseri oluşumunda genetik değişiklikler çok önemlidir. Genetik yapıda çeşitli faktörlerin ve normal yaşlanmanın etkisiyle ortaya çıkan bozukluklar kansere neden olmaktadır. Ancak meme kanserlerinin sadece %7-9'luk bir kısmı ailesel geçişli olduğu bildirilmektedir. Burada özellikle anne tarafında genç yaşta meme kanseri ve erkek meme kanseri görülmesi ailesel bir geçişe işaret etmektedir (Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Kansere Daire Başkanlığı 27/04/2014).

Meme kanserlerinin ortaya çıkması ve gelişmesinde başta östrojen (E_2) olmak üzere bazı hormonların rol oynadığı ve hormonların etkisi olmadan meme kanseri olmayacağı bildirilmektedir. Bundan dolayı kadınlarda meme kanseri erkeklere oranla 100 kat daha sık görülmektedir (Koyunoğlu ve ark 2013).

Amerika Birleşik Devletlerinde 2014 yılında yeni meme kanseri vaka sayısı kadınlarda 232670, erkeklerde 2360 olarak bildirilmiştir. Ölümlü vaka sayısı ise kadınlarda 40000, erkeklerde 430 olarak açıklanmıştır (National Cancer Institute 22/04/2014). Türkiyede kanserden ölüm oranı %20.7 olarak bildirilmiştir (Gültekin, 27/04/2014).

İlk meme kanseri hücre hattı BT-20 1958 yılında elde edilmiştir (Lasfargues ve Ozzello 1958). Sonraki 20 yıl içinde MD Anderson (MDA) ve dünyada en çok yayılmış olan MCF7 hücre hattı 1973 yılında Dr Herbert Soule tarafından Michigan Kansere Vakfı, Detroitte geliştirilmiştir. MCF7 hücre hattının popüleritesinin yüksek olmasının nedeni yüksek hormon hassasiyetidir. Östrojen reseptör ekspresyonu MCF7'yi hormon çalışmaları için uygun model haline getirmiştir (Levenson ve Jordon 1997).

Bu erken başarıya rağmen, son zamanlarda göreceli olarak az sayıda meme kanseri hücre hattı geliştirilebilmiştir. Bunun nedeni olarak stromal kontaminasyon nedeniyle homojen kültür elde etmedeki zorluk ve insan dokularında çalışma yapabilmek için gerekli

olan sıkı etik kuralları söylenebilir (Holiday ve Speirs 2011). Bununla birlikte primer meme tümörü, plevral döküntü veya hastaların çeşitli metastatik bölgelerinden SUM serisinden 10 hücre hattı geliştirilmiştir (Either ve ark 1993). Bu hücreler ticari olarak hücre bankalarında mevcuttur.

Meme kanseri kompleks ve heterojen bir hastalıktır. Gen ekspresyon profili moleküler düzeyde bu heterojeniteyi anlamamızda önemli katkıda bulunmuştur. Histolojik tip, tümör derecesi, lenf nodlarının durumu gibi basit ölçümlerle kanser sınıflandırması yapılırken, östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) gibi akıllı belirteçler kullanılarak luminal A, luminal B, Her2-pozitif, bazal ve normal alt gruplarının da içeren daha karmaşık sınıflandırmalar yapılabilmektedir (Holiday ve Speirs 2011). Alt grupların moleküler karakterisitkleri Tablo 1.4. 'de gösterilmiştir.

Tablo 1.4. Meme Karsinomlarının Moleküler Sınıflandırması (Holiday ve Speirs 2011)

| Sınıflandırma | İmmün Profili | Diğer Karakterleri | Hücre Hattı Örnekleri |
|---------------|---|---|------------------------------------|
| Luminal A | ER ⁺ , PR ^{+/-} , HER2 ⁻ | Ki67 düşük, endokrin cevap, sıklıkla kemoterapiye cevap | MCF-7, T47D, SUM185 |
| Luminal B | ER ⁺ , PR ^{+/-} , HER2 ⁺ | Ki67 yüksek, genellikle endokrin cevap, kemoterapiye karşı çeşitlilik. HER2 ⁺ 'ye trustuzumab cevap | BT474, ZR-75 |
| Bazal | ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁻ | EGFR ⁺ ve/veyasitokeratin 5/6 ⁺ , Ki67 yüksek, endokrine cevap yok, sıklıkla kemoterapiye cevap | MDA-MB-468, SUM190 |
| Claudin-low | ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁻ | Ki67, E-cadherin, claudin-3, claudinin-4 ve claudinin-7 düşük. Kemoterapiye ortalama cevap. | BT549, MDA-MB-231, Hs578T, SUM1315 |
| HER2 | ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁺ | Ki67 yüksek, trustuzumab cevap, kemoterapiye cevap | SKBR3, MDA-MB-453 |

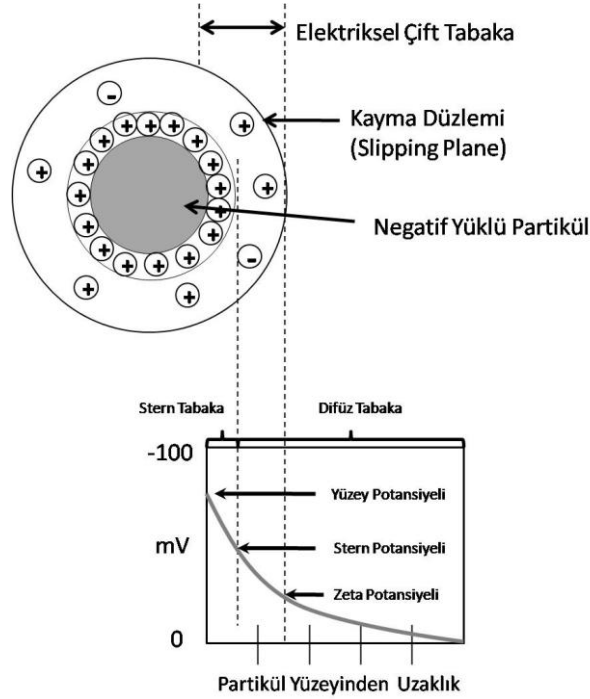
EGFE: Epidermal büyüme faktörü reseptörü; ER: östrojen reseptör; HER2: insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2; PR: Progesteron reseptör.

Bu alt grupların her birinde farklı prognoz ve tedavi şekilleri bulunmaktadır. Luminal A ve luminal B alt gruplarında hormon tedavisi için ER uygun bir terapötik hedefdir. Buna benzer olarak HER2 trustuzumab terapi için uygun bir adaydır. Bilinen terapötik tedaviler için bazal tümörler tedavisi güç olan bir türdür. Biyolojik olarak agresif olmakla beraber

prognozu zayıftır. Çünkü bazal fenotip, ER α , PR ve HER2 ekspresyon eksikliğiyle karakterizidir. Bu durum üçlü-negatif olarak da adlandırılmaktadır. Claudin-low, alt grubu sıklıkla insan ve kemirgen veri setleri sorgulamalarında tanımlanmıştır. Başlangıçta ER α , PR ve HER2 ekspresyon eksikliği ve zayıf prognoz nedeniyle bazal alt grubu ile ilişkilendirilmiştir. Fakat claudin-3 ve claudinin-4, proliferasyon belirteci Ki67'nin düşük ekspresyonu, epitelyal-mezenkimal geçiş ile ilişkili belirteçlerdeki artış ve meme kanseri kök hücreleri ile ilişkili özelliklerin ekspresyonu (örneğin CD44⁺CD24^{-/düşük} fenotip) gibi kendine özgü özellikler bu türün ayrı sınıflandırılmasını sağlamıştır (Herschkowitz ve ark 2007, Holiday ve Speirs 2011).

1.7. Zeta Potansiyel

Madde temel olarak katı, sıvı ve gaz olmak üzere üç halde bulunabilir. Bu durumlardan birindeki madde diğer durumdaki bir madde içinde düzgün dağılım göstermişse buna koloidal sistem denir. Katı bir yüzey sulu bir solüsyon ile etkileştiğinde yüzeyler arası yük düzeni, solüsyondaki lokal serbest iyonların tekrar düzenlenmesiyle arayüz yakınlığında ince bir bölgede sıfır olmayan net bir yük dağılımının oluşmasıyla (Şekil 1.21) sonuçlanmaktadır (Sze ve ark 2003).



Şekil 1.21. Zeta Potansiyelin şematik gösterimi.

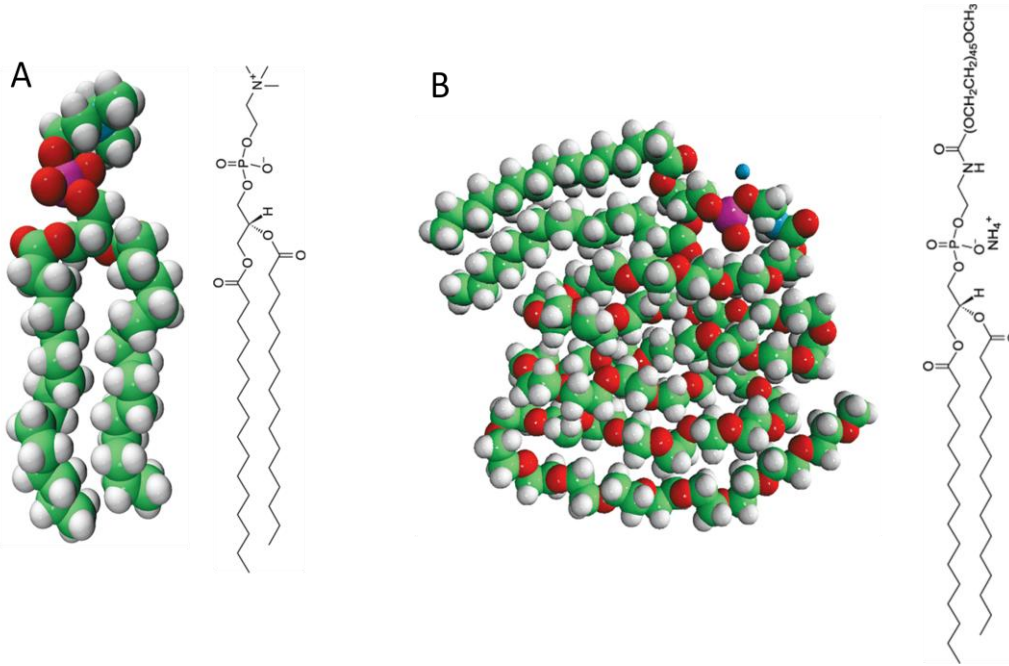
Partikül yüzeyindeki net yük partikülü çevreleyen katı-sıvı arayüzündeki yük dağılımını etkileyerek yüzeye yakın bölgede zıt iyon konsantrasyonunun yani partikül yüküne zıt yüklü iyonların artmasını neden olmaktadır. Bu nedenle her partikülde elektriksel çift tabaka oluşur. Partikülü çevreleyen sıvı tabaka iki bölümden oluşur; iyonların kuvvetlice bağlandığı iç bölge Stern tabaka olarak adlandırılırken, iyonların daha az kararlı bağlandığı dış bölge difüz tabaka olarak adlandırılır. Difüz tabakada iyonların ve partiküllerin varlıklarını kararlı olarak sürdürdükleri göreceli bir sınır bulunmaktadır. Partikül hareket ettiğinde (mesela yer çekimi etkisiyle) sınırlar içindeki iyonlarda onunla hareket ederler fakat bu sınır içinde olmayan diğer iyonlar partiküllerle birlikte hareket etmez. Bu sınıra kayma düzlemi (Slipping Plane) denir. Kayma düzlemindeki potansiyele Zeta Potansiyel adı verilmektedir (Malvern, 25/04/2014).

Zeta potansiyel değeri koloit sistemin potansiyel kararlılığını gösterir. Eğer süspansiyondaki bütün partiküller büyük negatif veya pozitif zeta potansiyel değerine sahipse birbirlerini itecek ve topaklanma eğiliminde olmayacaklardır. Eğer partiküllerin zeta potansiyeli düşükse partiküllerde bir araya gelme ve topaklanma eğilimi görülür (Malvern, 25/04/2014).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

Fosfolipitler (DPPC) (Şekil 2.1A), (DSPE-PEG2000) (Şekil 2.1B) ve mini ekstruder set 200nm PC membrane ile birlikte Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama, USA) firmasının ürününü kullandı. Ortalama 10 nm büyüklüğünde olan, su içindeki Fe₃O₄ nanopartikülleri ve diğer kimyasallar Sigma-Aldrich (Missouri, ABD)'den satın alındı. Kimyasallar analitik derecede saf olduğundan daha fazla saflaştırmaya gerek kalmadan kullanılmıştır.



Şekil 2.1. Çalışmada kullanılan fosfolipitlerin molekül yapılarının gösterimi. (A) DPPC, (B) DSPE-PEG2000 lipitlerini göstermektedir.

2.2. Yöntem

2.2.1. PpIX stok solüsyonunun hazırlanışı

1g PpIX, 5 ml kloroform-metanol (2:1 hacim:hacim) içinde falkon tüpte çözündürüldü. Vorteksle iyice karıştırıldıktan sonra sızdırmaya karşı tüp kapağının etrafı parafilmle kaplanarak +4 °C’de saklandı. Stok solüsyon 5 gün içinde kullanıldı.

2.2.2. PpIX yüklü manyetolipozomların hazırlanışı

PpIX yüklü manyetolipozomların hazırlanışında iki farklı metot denenmiştir.

1. Metot: DPPC ve DSPE-PEG2000 %99:%1 (ağırlık:ağırlık) oranında alınarak oval tabanlı tüpe konuldu. Üzerine kloroform-metanol (2:1 hacim:hacim) karışımı eklenerek lipitler çözündürüldü. PpIX stok solüsyonundan farklı konsantrasyonlarda (20; 40 ve 60 µM) PpIX çözündürülen lipitlerin üzerine eklendi. Bu solüsyondaki kloroform-metanol 50 °C’de döner buharlaştırıcıda (Heidolph, Almanya), iyice buharlaştırılarak tüp yüzeyinde ince film tabaka elde edildi. İnce film 60 °C’ye ısıtılmış olan 1 ml PBS ile sulandırılarak döner buharlaştırıcıda atmosfer basıncında 60 °C’de 10 dk 120 rpm maruz bırakıldı. Sonra karışım 55-60 °C’de su banyosunda 10 dk sonikatörde (37 kHz, Elmasonic E 100H, Almanya) tutuldu. Elde edilen karışım 200 nm polikarbonat membran filtreden 15 defa geçirilerek PpIX yüklü lipozomlar elde edilmiş oldu. Farklı miktarlarda Fe₃O₄ nanopartikülleri (0,175; 0,35 ve 0,5 mg) 60 °C’de 1 ml PBS ile ependorf tüpte karıştırıldı ve PpIX yüklü lipozomların üzerine eklendi. Karışım 55-60 °C’de su banyosunda 15 dk sonikatörde tutularak nanopartiküllerin lipozom içine girmesi sağlandı ve PpIX yüklü manyetolipozomlar elde edilmiş oldu. PpIX yüklü manyetolipozomlar 20K Slide-A-Lyzer diyaliz kasetlerine (Thermo Scientific, IL, USA) aktarıldı ve bir gece boyunca 2 L steril saf su içinde diyaliz edildi. Böylece manyetolipozomlar içine yerleşmemiş PpIX ve nanopartiküllerin ortamdaki uzaklaşmaları sağlandı.

2. Metot: PpIX ve nanopartiküller kloroform-metanol içinde 1. Metotta anlatıldığı gibi hazırlanan lipit-polimer solüsyonunun içine eklendi ve ultrasonik su banyosunda 5 dk bekletildikten sonra döner buharlaştırıcıda 50 °C’de kloroform-metanol buharlaştırılarak falkon tüpün yüzeyinde ince film tabaka elde edildi. İnce film tabakası 60 °C’ye ısıtılmış olan

1 ml PBS ile sulandırılarak döner buharlaştırıcıda atmosfer basıncında 60 °C'de 10 dk 120 rpm maruz bırakıldı. Sonra karışım 55-60 °C'de su banyosunda 10 dk sonikatörde tutuldu.

Elde edilen karışım 200 nm polikarbonat membran filtreden geçirilmek istendi, fakat başarılı olmadı. Nanopartikül yüzeyinin ince bir lipid tabakayla kaplı olması ve kloroform-metanol içinde bu tabakanın kalkması sonucunda PpIX-nanopartikül arasında fiziksel bir etkileşim meydana geldi. Sonuçta PpIX ve nanopartiküllerin bir araya gelerek topaklandığı gözlemlendi. Aynı zamanda nanopartiküllerin 10 nm büyüklüğünde olmasına rağmen büyük çoğunluğunun filtreyi destekleyen yüzeyde takılarak 200 nm filtreden geçemedikleri görüldü. Bu nedenle deneye 1. Metotla devam edildi.

2.2.3. Manyetolipozom Hazırlanışı

DPPC ve DSPE-PEG2000 %99:%1 (ağırlık:ağırlık) oranında alınarak oval tabanlı tüpe konuldu. Üzerine kloroform-metanol (2:1 hacim:hacim) karışımı eklenerek lipitler çözdürüldü. Bu solüsyondaki kloroform-metanol 50 °C'de döner buharlaştırıcıda, iyice buharlaştırılarak tüpün yüzeyinde ince film tabaka elde edildi. Bu ince film tabakası 60 °C'ye ısıtılmış olan 1 ml PBS ile sulandırılarak döner buharlaştırıcıda atmosfer basıncında 60 °C'de 10 dk 120 rpm maruz bırakıldı. Sonra karışım 55-60 °C'de su banyosunda 10 dk sonikatörde tutuldu. Elde edilen karışım 200 nm polikarbonat membran filtreden 15 defa geçirildi ve lipozomlar elde edilmiş oldu. 0,5 mg Fe₃O₄ nanopartikülleri 60 °C'de 1 ml PBS ile ependorf tüpte karıştırıldı ve lipozomların üzerine eklendi. Burada 0,5 mg nanopartikül PpIX yüklü manyetolipozomların analizleri sonucu uygun olan miktar olarak belirlenmiştir. Karışım 55-60 °C'de su banyosunda 15 dk sonikatörde tutuldu ve manyetolipozomlar elde edilmiş oldu. Manyetolipozomlar 20K Slide-A-Lyzer diyaliz kasetlerine aktarıldı ve bir gece boyunca 2 L steril saf su içinde diyaliz edildi.

2.2.4. Lipozom Hazırlama

DPPC ve DSPE-PEG2000 %99:%1 (ağırlık:ağırlık) oranında alınarak oval tabanlı tüpe konuldu. Üzerine kloroform-metanol (2:1) karışımı eklenerek lipitler çözdürüldü. Döner buharlaştırıcıda, 50 °C'de kloroform-metanol iyice buharlaştırılarak tüpün yüzeyinde ince film tabaka elde edildi. İnce film tabakası 60 °C'ye ısıtılmış olan 1 ml PBS ile sulandırılarak

döner buharlaştırıcıda atmosfer basıncında 60 °C'de 10 dk 120 rpm maruz bırakıldı. Sonra karışım 55-60 °C'de su banyosunda 10 dk sonikatörde tutuldu. Elde edilen karışım 200 nm polikarbonat membran filtreden 15 defa geçirildi ve lipozomlar elde edilmiş oldu. 60 °C'de 1 ml PBS lipozomların üzerine eklendi ve karışım 55-60 °C'de su banyosunda 15 dk sonikatörde tutuldu. Lipozomlar 20K Slide-A-Lyzer diyaliz kasetlerine aktarıldı ve bir gece boyunca 2 L steril saf su içinde diyaliz edildi.

2.2.5. Boyut ve Zeta Potansiyel Ölçümü

Elde edilen örneklerin ortalama boyutu ve zeta potansiyelleri 25 °C'de Zetasizer Nano ZS (Malvern, İngiltere) ile ölçüldü. Örnekler üçer defa hazırlanarak ölçüm alınmıştır.

2.2.6. Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM)

Manyetolipozomların ve PpIX yüklü manyetolipozomların görüntülenmesi transmisyon elektron mikroskobu (FEI Tecnai G2 Spirit BioTwin (USA)) ile gerçekleştirildi. Örnekler TEM ile incelenmeden önce karbon film kaplı 200 gözlü bakır ızgaraların üzerine damlatıldı ve açık havada kurumaya bırakıldı. Daha sonra TEM ile görüntülendi.

2.2.7. Manyetolipozomların PpIX Bulundurma Miktarı ve Manyetolipozomlardan Sıcaklığa Bağlı PpIX Serbestlenmesinin Belirlenmesi

PpIX bulundurma miktarı, diyaliz edilen ve diyaliz edilmeyen PpIX yüklü manyetolipozomların floresans salınımına göre belirlendi. Başlangıçta eklenen PpIX miktarı yerine diyaliz edilen ve edilmeyen PpIX yüklü manyetolipozomların seçilmesinin nedeni başlangıçta eklenen PpIX kloroform-metanol karışımı içinde çözünmüştü fakat PpIX yüklü manyetolipozomların su içinde olması sebebiyle bu iki durumun karşılaştırılmasında güvenilir sonuç vermeyebileceği düşünüldü.

Floresans ölçümü için 300 µl PpIX yüklü manyetolipozom ependorfa alındı ve üzerine 900 µl PBS (fosfat tampon solüsyonu) eklenerek 3 saniye vorteks ile karıştırıldı. Hazırlanan karışımdan 150 µl alındı ve floresans yoğunluğu florometre (Varioskan Flash, Thermo Scientific, ABD) ile ölçüldü. Örnekler üçer defa hazırlanarak ölçümler yapıldı. Uyarılma dalga boyu 409 nm ve floresans salınım dalga boyu 633 nm olarak filtrelenerek floresans

ölçümü yapıldı. Elde edilen floresans ölçümü PpIX yüklü manyetolipozomların oda sıcaklığında başlangıç floresans salınımı (F_0) olarak adlandırıldı. %100 floresans salınımı için 300 μ l PpIX yüklü manyetolipozom alındı üzerine 900 μ l %1 Triton X-100 (PBS içinde) eklendi ve vorteks ile 1 dakika karıştırıldı ve 60 °C'de 30 dk bekletildi. Sonra karışımdan 150 μ l alınarak floresans yoğunluğu ölçüldü ve ölçülen değer F_{100} olarak adlandırıldı. Manyetolipozomların PpIX bulundurma kapasitesi aşağıdaki formülle hesaplandı:

$$\%PpIX \text{ bulundurma} = 100x \frac{\text{Diyaliz edilen PpIX yüklü ML için } F_{100}}{\text{Diyaliz edilmeyen PpIX yüklü ML için } F_{100}}$$

Yukarıdaki formül % PpIX bulundurma kapasitesini floresans yoğunluğuna bağlı olarak vermektedir. Bu formülle elde edilen sonuç ilk başta eklenen PpIX konsantrasyonu ile çarpılarak manyetolipozomların PpIX bulundurma miktarı molar konsantrasyon cinsinden elde edildi. Burada hesaplama yapılırken son hacim miktarı da göz önünde bulunduruldu.

Farklı sıcaklıklar ve zamanda PpIX serbestleme miktarını belirlemek için 300 μ l PpIX yüklü manyetolipozom ependorf tüpe alındı ve üzerine 900 μ l PBS eklenerek vorteks ile 3 saniye karıştırıldı. Sonra karışım 37 °C'ye konularak inkübe edildi ve her 15 dk'da 150 μ l örnek alınıp floresans ölçümü yapıldı. Örnekler üçer defa hazırlanarak ölçümler yapıldı. Örnek alımı 1 saat süresince gerçekleştirildi ve ölçülen floresans yoğunluğu F_t olarak adlandırıldı. Aynı işlemler 42 °C sıcaklık için de gerçekleştirildi. Örnekler üçer defa hazırlanarak ölçümler gerçekleştirildi. Her tüpten sadece bir defa örnek alındı. Manyetolipozomların sıcaklığa bağlı PpIX serbestleme %'si ve % floresans salınımı aşağıdaki formüller ile hesaplanarak karşılaştırıldı:

$$\%serbestleme = 100x \frac{(F_t - F_0)}{(F_{100} - F_0)}$$

$$\%floresans \text{ yoğunluğu} = 100x \frac{F_t}{F_{100}}$$

2.2.8. Elektromanyetik Alanda PpIX yüklü Manyetolipozomların Sıcaklık Değişimi:

PpIX yüklü manyetolipozomların elektromanyetik alan etkisindeki sıcaklık değişimi, solenoid içinde 50 Hz frekansında alternatif akımla (AC) oluşturulan $8,947 \pm \%2 \mu\text{T}$ elektromanyetik alan içinde gerçekleştirildi. Elektromanyetik alan şiddeti EMDEX II (CA, ABD) cihazıyla, sıcaklık değişimi ise Fluke 568 kızılötesi termometrenin (WA, ABD) kablo probuyla ölçüldü. Termometre -40°C ile 800°C sıcaklık aralığında $0,1^\circ\text{C}$ hassasiyetle ölçüm yapabilmektedir. PpIX yüklü manyetolipozomlar ependorf tüpe alınarak solenoid içine yerleştirildi. Aynı miktarda saf su ependorf tüp içinde solenoid içine konularak, AC manyetik alanın solenoidde oluşturduğu sıcaklık etkisi değerlendirildi. PpIX yüklü manyetolipozomların ve suyun sıcaklık değişimi 30 ve 60 dk'larda ölçüldü. PpIX yüklü manyetolipozomların gerçek sıcaklık değişimini bulmak için suyun sıcaklık değişimi PpIX yüklü manyetolipozomların sıcaklık değişiminden çıkarıldı.

2.2.9. Türbidite Ölçümü

Türbidite, bulanıklığın ölçümü esasına dayanan yöntemdir. Türbidite testinde çözeltiliye gelen ışık şiddetinde çözeltideki partiküllerin neden olduğu saçılmadan dolayı ortaya çıkan ışık kaybı ölçülür. Burada türbidite ölçümü ile PpIX yüklü Manyetolipozomların ve Fe_3O_4 nanopartiküllerin sedimentasyon kararlılığı ve manyetik cevapları optik küvet içinde spektrofotometrede ölçüldü (Vlaskou ve ark 2010). Nanopartiküllerin türbidite ölçümü için $0,5 \text{ mg Fe}_3\text{O}_4$ nanopartikülü 2 ml saf su ile seyreltildi ve cam küvete konularak spektrofotometre de ölçüm alındı. Kinetik ölçümler 650 nm dalga boyunda 5 saniyede bir ölçüm alınarak 45 dk süresince gerçekleştirildi ve buradan elde edilen değerler (A_{650}^0) olarak adlandırıldı. Ölçümler iki defa tekrarlandı. Sonra NE1816 mıknatısları (IBSmagnet, Berlin, Almanya) küvetin sağ ve sol tarafında simetrik olarak yerleştirildi ve kinetik ölçüm tekrarlandı. Buradan elde edilen sonuç (A_{650}) olarak adlandırıldı. Her bir taraf için 4 adet olmak üzere toplam 8 mıknatıs kullanıldı. Mıknatısların ortalama manyetik alan özelliği 4 T/m 'dir (Vlaskou ve ark 2010). Aynı spektrofotometrik ölçümler PpIX yüklü manyetolipozomlar için tekrarlandı ve zamana bağlı A_{650}/A_{650}^0 grafiği çizilerek sedimentasyon kararlılığı ve manyetik cevaplar analiz edildi. Ölçümler iki defa tekrarlandı.

2.2.10. ICP-MS (İndüktif Olarak Eşleştirilmiş Plazma-Kütle Spektrometresi)

Analizi

Diyaliz sonrası PpIX yüklü manyetolipozomlarda tutunan Fe₃O₄ miktarını belirlemek için ICP-MS ile Fe miktarı ölçüldü. Bunun için örneklere önce 6ml HNO₃ + 2ml H₂O₂ eklendi ve karışım mikrodalgada (CEM, MARS5) 15 dk'da 175 °C'ye çıkarıldı ve 15 dk aynı sıcaklıkta tutularak bozunduruldu. Sonra örnekler seyreltilerek ICP-MS (Agilent 7500ce) ile Fe miktarı ölçümü gerçekleştirildi. Her örnekten bir adet hazırlanarak analiz yapılmıştır.

Diyaliz edilmeyen örneklerde ICP-MS ile ölçülen demir miktarları ile ilk başta eklenen demir miktarı hesaplanarak karşılaştırıldı.

$$\text{Hesaplanan Fe miktarı} = [Fe]_{Fe_3O_4} \times \text{eklenen hacim}$$

2.2.11. Toksikite Çalışması

Lipozom, manyetolipozom ve PpIX yüklü manyetolipozomların toksisite testi in-vitro olarak MCF7 hücre hattında gerçekleştirildi. Hücreler %10 fetal bovin serum ve 1 mM sodyum piruvat ekli DMEM besi yeri ile 37 °C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde büyütüldü. Hücreler 96 kuyulu plate'lerde kuyu başına 10000 hücre olacak şekilde ekildi ve 24 saat sonra besi yeri ile karıştırılmış 25-350nM aralığında farklı konsantrasyonlarda PpIX yüklü manyetolipozom kuyulara eklendi. Kuyulara eklenen PpIX yüklü manyetolipozomlar ile eşit hacimde lipozom ve manyetolipozomlar da farklı kuyulara eklendi. Sonra hücreler farklı sürelerde (24 ve 48 saat) inkübe edildi ve hücre canlılığı MTT kit (Roche, Almanya) ile değerlendirildi. MTT testi uygulanmadan önce hücrelerdeki besi yeri uzaklaştırıldı, PBS ile yıkandı ve %10 MTT içeren besi yeri kuyucuklara eklendi. Formazan kristallerinin oluşması için hücreler 4 saat 37 °C inkübatörde bekletildi ve kristalleri çözmek için kit ile gelen çözücü solüsyon eklenerek bir gece bekletildi. Sonrasında 570 nm dalga boyunda soğrulma değerleri alınarak analiz edildi. Her konsantrasyon değeri 4 kuyuda denenmiştir.

2.2.12. In-Vitro FDT Deneyi

MCF7 hücre kültürü ve uygulanan lipozom, manyetolipozom ve PpIX yüklü manyetolipozom konsantrasyonları yukarıda Toksikite çalışması başlıklı bölümde anlatıldığı

şekliyle hazırlanarak uygulandı. Hücrelere lipozom, manyetolipozom ve PpIX yüklü manyetolipozom örnekleri eklendikten sonra hücreler 3 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücreler 1, 3 ve 5 dk beyaz diyot ışığa maruz bırakıldı. LED downlight (Epistar, Tayvan) ışık kaynağı (20W), 1650 lümen, 3000K beyaz ışık ve 17 cm uygulama çapına sahiptir. Bu ışık kaynağının seçilmesinin nedeni beyaz ışığın 400-700 nm dalga boylarında bütün görünür ışık spektrumunu içermesi ve PpIX'un spektrumunda en büyük soğurma bandının 409 nm'de gözlenmesi ile birlikte görünür ışık aralığında daha uzun dalga boylarında soğurma tepelerinin de bulunmasıdır (Scolaro, 2002). Aynı zamanda LED downlight büyüklüğü nedeniyle 96 kuyulu plate'in tamamına ışık verebilmekte ve LED olması nedeniyle çalışması sırasında çok az ısı açığa çıkarmaktadır. Böylece ışık kaynaklı ısı problemi oluşmamaktadır. Işık uygulamasından sonra hücreler tekrar 21 saat inkübe edildi ve hücre canlılığı MTT kiti ile değerlendirildi. Her konsantrasyon değeri 4 kuyuda denenmiştir.

2.2.13. X-Işın Kırınımı (XRD) Analizi

XRD analizi için nanopartiküllerin içinde bulunduğu su liyofilizatörde uzaklaştırılarak nanopartiküller kurutuldu. Toz nanopartikülleri radyasyon dalga boyu 1,54Å CuK α (Philips X'pert Pro, Hollanda) ile 25-80° aralığında 2 θ XRD ölçümü yapıldı. Ortalama kristalit büyüklüğü XRD grafiğinin 311 tepesinin Scherrer formülü ile hesaplanmasıyla elde edildi.

$$Scherrer\ Formülü = \frac{0,9 \times \lambda}{\beta \times \cos(\theta)}$$

Burada λ = x-ışın dalga boyu, β =FWHM değeri, θ = x-ışığın grafiğindeki açı değeri.

2.2.14. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler GraphPad Prism 5 (San Diego, CA, USA) programı kullanılarak yapıldı. Gruplara tek yön varyans analizi (ANOVA) Tukey testi uygulanarak örneklerin birbirleri arasındaki ilişki araştırıldı. Sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir. İstatistiksel olarak $p < 0,05$ ise gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu kabul edilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. PpIX Yüklü Manyetolipozomların Karakterizasyonu ve Optimizasyonu

PpIX yüklü manyetolipozomlar kahverengi bir renkte oluşmaktadır. Bu renk hem PpIX'den hem de Fe₃O₄ nanopartiküllerden kaynaklanmaktadır ve PpIX veya nanopartikül konsantrasyonu ne kadar artarsa renkteki koyulukta o kadar artmaktadır. Bütün deneylerde lipid konsantrasyonu ve miktarı sabit tutulmuştur. Bununla birlikte nanopartiküllerin etkisini incelemek için öncelikle PpIX konsantrasyonu 20 µM olarak sabit tutuldu ve değişik miktarlarda (0,175; 0,35 ve 0,5 mg) Fe₃O₄ nanopartikülleri eklenerek PpIX yüklü manyetolipozomlar hazırlandı ve hidrodinamik çap, polidispersite indeksi (PDI) ve zeta potansiyeli ölçüldü. Sonuçlar Tablo 3.1'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Sabit PpIX miktarı (20 µM) ve değişik miktarlarda (0,175; 0,35 ve 0,5 mg) Fe₃O₄ nanopartikülleri eklenerek elde edilen PpIX yüklü ML'ların hidrodinamik çap ve zeta potansiyelleri. Değerler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir. (n=3)

| Örnek Adı | Büyüklik (nm) | PDI | Zeta Potansiyel (mV) |
|---|---------------|---------------|----------------------|
| ML-PpIX ₍₂₀₎ - (0,175 mg Fe ₃ O ₄) | 169,1 ± 1,7 | 0,164 ± 0,008 | -5,3 ± 1,1 |
| ML-PpIX ₍₂₀₎ -(0,175 mg Fe ₃ O ₄)-Diyaliz | 178,4 ± 1,6 | 0,178 ± 0,008 | -8,1 ± 0,6 |
| ML-PpIX ₍₂₀₎ -(0,35 mg Fe ₃ O ₄) | 174,5 ± 4,8 | 0,188 ± 0,017 | -10,4 ± 0,8 |
| ML-PpIX ₍₂₀₎ -(0,35 mg Fe ₃ O ₄)- Diyaliz | 207,8 ± 3,2 | 0,323 ± 0,047 | -9,53 ± 0,4 |
| ML-PpIX ₍₂₀₎ -(0,5 mg Fe ₃ O ₄) | 166,0 ± 2,2 | 0,155 ± 0,019 | -11,1 ± 0,2 |
| ML-PpIX ₍₂₀₎ -(0,5 mg Fe ₃ O ₄)- Diyaliz | 211,0 ± 9,9 | 0,380 ± 0,023 | -10,8 ± 1,2 |

Yüksek zeta potansiyel (pozitif veya negatif) manyetolipozomların agregasyonunu önlemektedir. Bununla birlikte yüksek demir içeriği manyetolipozomların manyetik cevabını artırmaktadır dolayısıyla da manyetik hedefleme için de daha iyi olmaktadır. Bu nedenle 0,5 mg Fe₃O₄ nanopartikül miktarı ileriki çalışmalar için tercih edilmiştir. PpIX miktarının etkisini incelemek için 0,5 mg Fe₃O₄ nanopartikül miktarı sabit tutularak değişik konsantrasyonlarda PpIX (20; 40 ve 60 µM) kullanılarak PpIX yüklü manyetolipozomlar

üretildi. Hidrodinamik çap, polidispersite indeksi (PDI) ve zeta potansiyelindeki değişimler Tablo 3.2’de gösterilmiştir.

Tablo 3.2. Sabit Fe₃O₄ nanopartikül miktarı (0,5 mg) ve değişik konsantrasyonlarda PpIX (20; 40 ve 60 µM) kullanılarak üretilen PpIX yüklü ML’ların hidrodinamik çap ve zeta potansiyelleri. Değerler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir. (n=3)

| Örnek Adı | Büyüklik (nm) | PDI | Zeta Potansiyel (mV) |
|-----------------------------------|---------------|---------------|----------------------|
| ML- PpIX ₍₂₀₎ | 166,0 ± 2,2 | 0,155 ± 0,019 | -11,1 ± 0,2 |
| ML- PpIX ₍₂₀₎ -Diyaliz | 211,0 ± 9,9 | 0,380 ± 0,023 | -10,8 ± 1,2 |
| ML- PpIX ₍₄₀₎ | 166,1 ± 4,9 | 0,130 ± 0,025 | -11,9 ± 1,3 |
| ML- PpIX ₍₄₀₎ -Diyaliz | 221,8 ± 0,8 | 0,331 ± 0,040 | -10,8 ± 0,9 |
| ML- PpIX ₍₆₀₎ | 164,2 ± 1,4 | 0,200 ± 0,011 | -9,28 ± 0,5 |
| ML- PpIX ₍₆₀₎ -Diyaliz | 230,6 ± 16,7 | 0,394 ± 0,019 | -7,78 ± 0,3 |

3.2. PpIX Yüklü Manyetolipozomların Fe İçeriği

Lipid konsantrasyonu, miktarı ve PpIX₍₂₀₎ miktarı sabit tutulup değişik miktarlarda (0,175; 0,35 ve 0,5 mg) Fe₃O₄ nanopartikülleri eklenerek hazırlanan PpIX yüklü manyetolipozomların diyaliz edilen ve edilmeyen örnekler arasında, hesaplanan ve ICP-MS ölçümü ile elde edilen demir içeriği Tablo 3.3’de gösterilmiştir. Her örnekten bir adet hazırlanarak analiz yapılmıştır.

Tablo 3.3. Değişik miktarlarda (0,175; 0,35 ve 0,5 mg) Fe₃O₄ nanopartikülleri eklenerek elde edilen PpIX yüklü ML’ların diyaliz edilen ve edilmeyen örneklerdeki demir içerik miktarları.

| Örnek Adı | Hesaplanan Fe miktarı (µg/ml) | Ölçülen Fe miktarı (µg/ml) |
|---|-------------------------------|----------------------------|
| ML-PpIX ₍₂₀₎ - (0,175 mg Fe ₃ O ₄) | 42,2 | 25,20 |
| ML-PpIX ₍₂₀₎ -(0,175 mg Fe ₃ O ₄)-Diyaliz | - | 21,16 |
| ML-PpIX ₍₂₀₎ -(0,35 mg Fe ₃ O ₄) | 84,4 | 44,23 |
| ML-PpIX ₍₂₀₎ -(0,35 mg Fe ₃ O ₄)- Diyaliz | - | 40,55 |
| ML-PpIX ₍₂₀₎ -(0,5 mg Fe ₃ O ₄) | 120,6 | 69,12 |
| ML-PpIX ₍₂₀₎ -(0,5 mg Fe ₃ O ₄)- Diyaliz | - | 55,89 |

Hesaplanan ve ölçülen demir miktarları arasında yaklaşık 1,7 kat fark bulunmaktadır ve her ikisinde de nanopartikül içeriği ile doğru orantılı bir artış görülmektedir. Diyaliz sonrası PpIX yüklü manyetolipozomlarda tutunan % Fe_3O_4 nanopartikül miktarı, ICP-MS ile ölçülen demir miktarları kullanılarak diyaliz edilen ve edilmeyen PpIX yüklü manyetolipozomların % Fe içeriği hesaplanmış ve Tablo 3.4'de gösterilmiştir. % Fe kapsülleme oranı aynı zamanda % nanopartikül bulundurma oranı anlamına da gelmektedir.

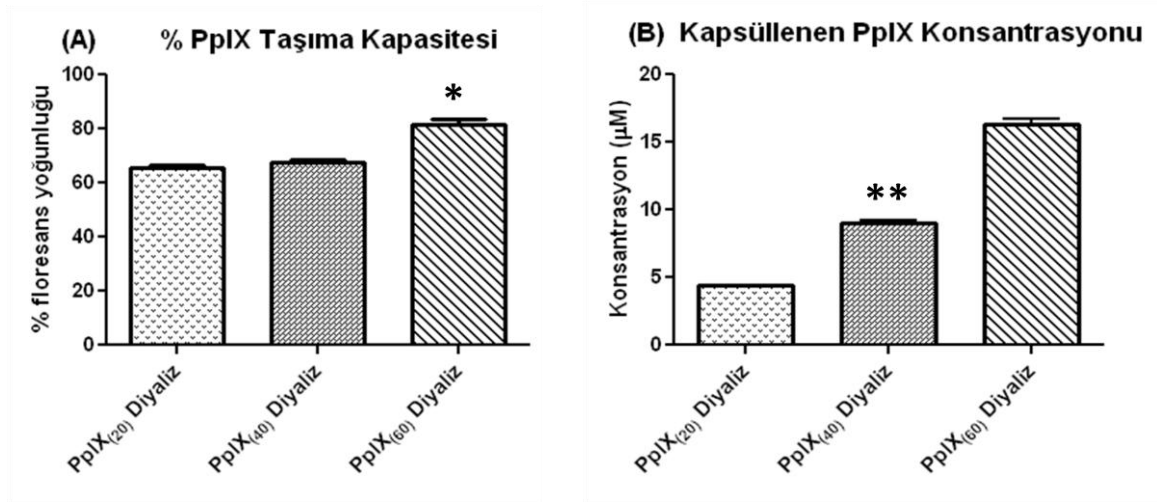
Tablo 3.4. PpIX yüklü ML'ların % Fe kapsülleme oranı.

| Örnek Adı | Ölçülen Fe miktarı ($\mu\text{g/ml}$) | % Fe_3O_4 Bulundurma |
|--|--|------------------------|
| ML-PpIX ₍₂₀₎ - (0,175 mg Fe_3O_4) | 25,20 | % 83,96 |
| ML-PpIX ₍₂₀₎ -(0,175 mg Fe_3O_4)-Diyaliz | 21,16 | |
| ML-PpIX ₍₂₀₎ -(0,35 mg Fe_3O_4) | 44,23 | % 91,67 |
| ML-PpIX ₍₂₀₎ -(0,35 mg Fe_3O_4)- Diyaliz | 40,55 | |
| ML-PpIX ₍₂₀₎ -(0,5 mg Fe_3O_4) | 69,12 | % 80,85 |
| ML-PpIX ₍₂₀₎ -(0,5 mg Fe_3O_4)- Diyaliz | 55,89 | |

3.3. PpIX Bulundurma Etkinliği

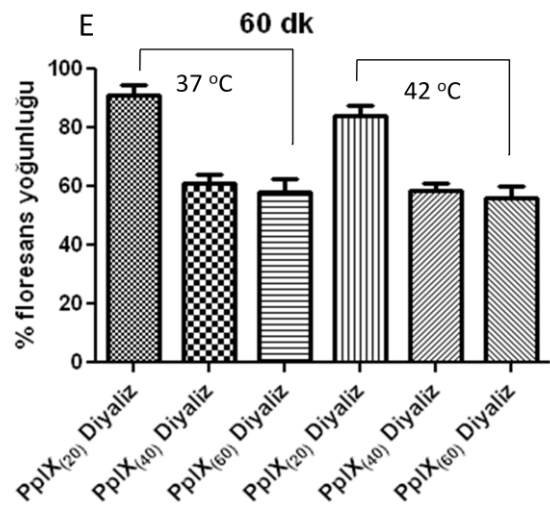
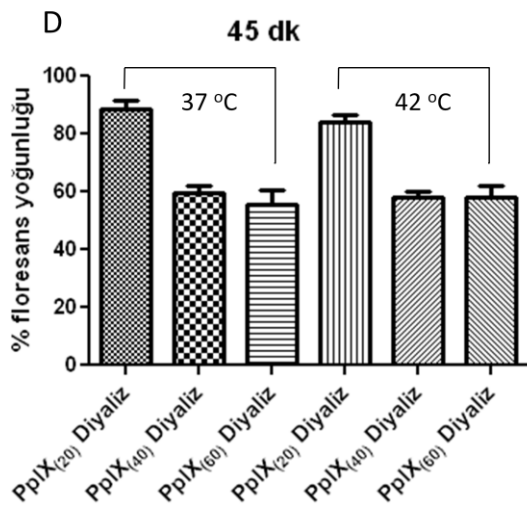
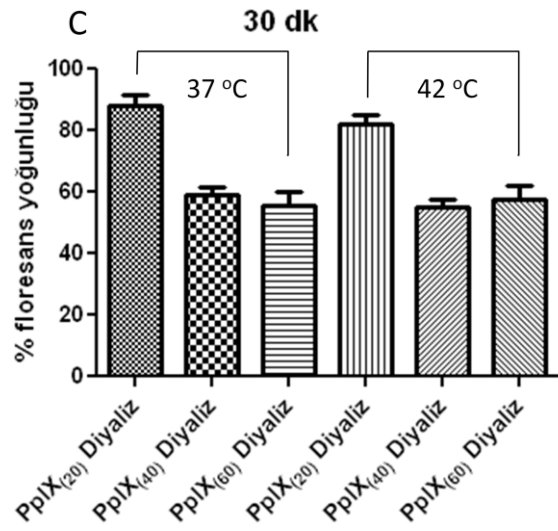
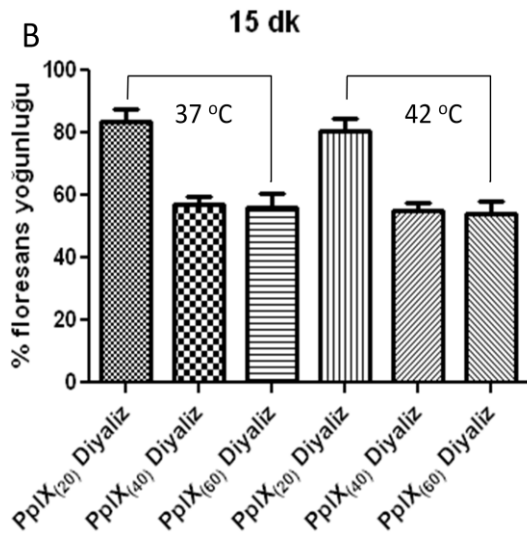
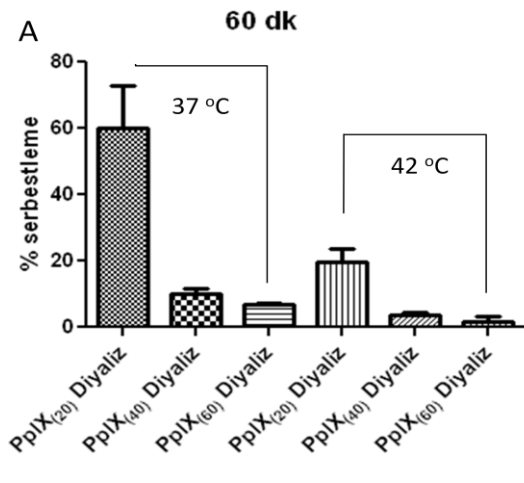
PpIX yüklü manyetolipozomlarda PpIX bulundurma miktarı diyaliz edilen ve edilmeyen örneklerin floresans ışıması değerleri kullanılarak hesaplandı. Böylece diyaliz edilen örneklerde PpIX bulundurma yüzdeleri elde edildi (Şekil 3.1). Ortalama yüzde floresans yoğunlukları PpIX₍₂₀₎ ve PpIX₍₄₀₎ için birbirine çok yakın değerler elde edilirken (sırasıyla %65,55 \pm 2,09 ve %67,65 \pm 1,93), PpIX₍₆₀₎ için floresans yoğunluğu %81,65 \pm 1,05 olarak elde edildi. Yüzde floresans yoğunlukları ilk başta eklenen PpIX konsantrasyonu ile çarpıldığında kapsüllenen PpIX konsantrasyonu elde edildi (Şekil 3.1B). Bu hesaplamada son hacim miktarı da göz önünde bulundurulmuştur. Ortalama floresans yoğunluklarının PpIX₍₂₀₎ ve PpIX₍₄₀₎ için birbirine çok yakın değerlerde olması nedeniyle istatistiksel olarak anlamlı fark görülmesi de ($p>0,05$), PpIX₍₄₀₎ iki kat daha fazla PpIX içermektedir ve konsantrasyon değerleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,001$). PpIX₍₆₀₎ örneklerinin diğerlerinden çok daha fazla yüzde floresans ışımaya yaptığı gözlemlendi ve bunun nedeninin ML'larda daha fazla PpIX kapsüllemesinden değil diyaliz membranından geçemeyecek kadar büyük miktarda topaklanmış PpIX moleküllerinden kaynaklanabileceği

düşünüldü. Boyut, zeta potansiyeli, floresans emisyonu gibi bütün bu sonuçlar ve hücre kültürüne uygulanacak PpIX yüklü manyetolipozomların hacmi göz önünde bulundurulduğunda ileriki çalışmalar için PpIX₍₄₀₎ seçildi.



Şekil 3.1. (A) Floresans yoğunluğuna bağlı olarak hesaplanan PpIX yüklü manyetolipozomların % PpIX taşıma kapasitesi. PpIX₍₂₀₎ ile PpIX₍₄₀₎ arasında anlamlı fark bulunmamaktadır ($p>0,05$). PpIX₍₆₀₎ ile diğerleri arasında anlamlı fark bulunmaktadır (* $p<0,05$). (B) PpIX yüklü manyetolipozomlarda kapsüllenen PpIX miktarının konsantrasyon olarak ifadesi. PpIX₍₂₀₎ ile PpIX₍₄₀₎ arasında anlamlı fark bulunmaktadır (** $p<0,001$). (n=3, ortalama±standart hata)

Farklı sıcaklıklarda (37 °C ve 42 °C) 1 saat süresince PpIX serbestlemesi incelendiğinde ilginç sonuçlar elde edildi. Floresans yoğunluğuna bağlı olarak 42 °C’de yüzde PpIX serbestlemesi değeri 37 °C’deki PpIX serbestlemesinden daha düşük olarak hesaplandı. Bu nedenle elde edilen % serbestleme grafiği 60 dk sonunda bile 37 °C’de daha yüksek bulundu (Şekil 3.2A). Bunun nedeni PpIX’un manyetolipozomlardan 42 °C’de daha az serbestlenmesi değil, 42 °C’de yüksek oranda serbestlenerek topaklanma olmasıdır. Çünkü 42 °C, çalışmada kullanılan lipidlerin erime sıcaklığından daha yüksek bir sıcaklıktır ve bu sıcaklıkta bütün PpIX moleküllerinin serbestlenmesi beklenir. Fakat floresans yoğunlukları üzerinden hesaplanan % PpIX serbestleme miktarı 37 °C’de 42 °C’den daha yüksek bulundu (Şekil 3.2A). Floresans yoğunluğunun % değerlendirmesiyle elde edilen sonuçlar Şekil 3.2 B, C, D, E’de gösterilmiştir.



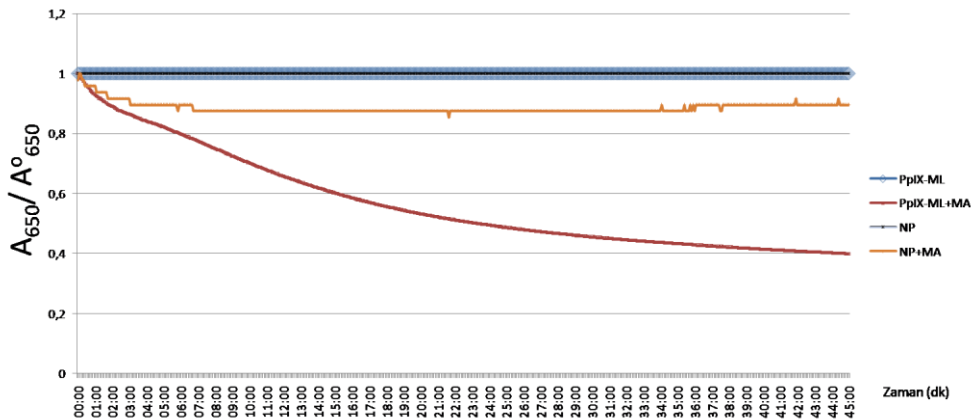
Şekil 3.2. 37 ve 42 °C sıcaklıklarda değişik miktarlarda PpIX yüklü manyetolipozomlardan sıcaklığa bağlı PpIX serbestleme oranları. (A) Pradhan ve ark (2010) yayınladığı %serbestleme formülüyle elde edilen PpIX serbestleme yüzdesi. (B) 15 dk sonunda % floresans yoğunluğuna bağlı PpIX serbestlenmesi. (C) 30 dk sonunda % floresans yoğunluğuna bağlı PpIX serbestlenmesi. (D) 45 dk sonunda % floresans yoğunluğuna bağlı PpIX serbestlenmesi. (E) 60 dk sonunda % floresans yoğunluğuna bağlı PpIX serbestlenmesi. (n=3, ortalama±standart hata)

3.4. Elektromanyetik Alanda PpIX yüklü Manyetolipozomların Sıcaklık Değişimi

Sıcaklık değişimi manyetik alan içine yerleştirilen suyun sıcaklığının PpIX yüklü manyetolipozomların sıcaklık değişiminden çıkarılmasıyla elde edildi. Böylece PpIX yüklü manyetolipozomlarda 30dk içinde $0,9\pm 0,01$ °C sıcaklık artışı görülürken 60 dk içinde $1,5\pm 0,03$ °C sıcaklık artışı görüldü. Deneyler 3 defa tekrarlanmıştır.

3.5. Türbidite Ölçümü

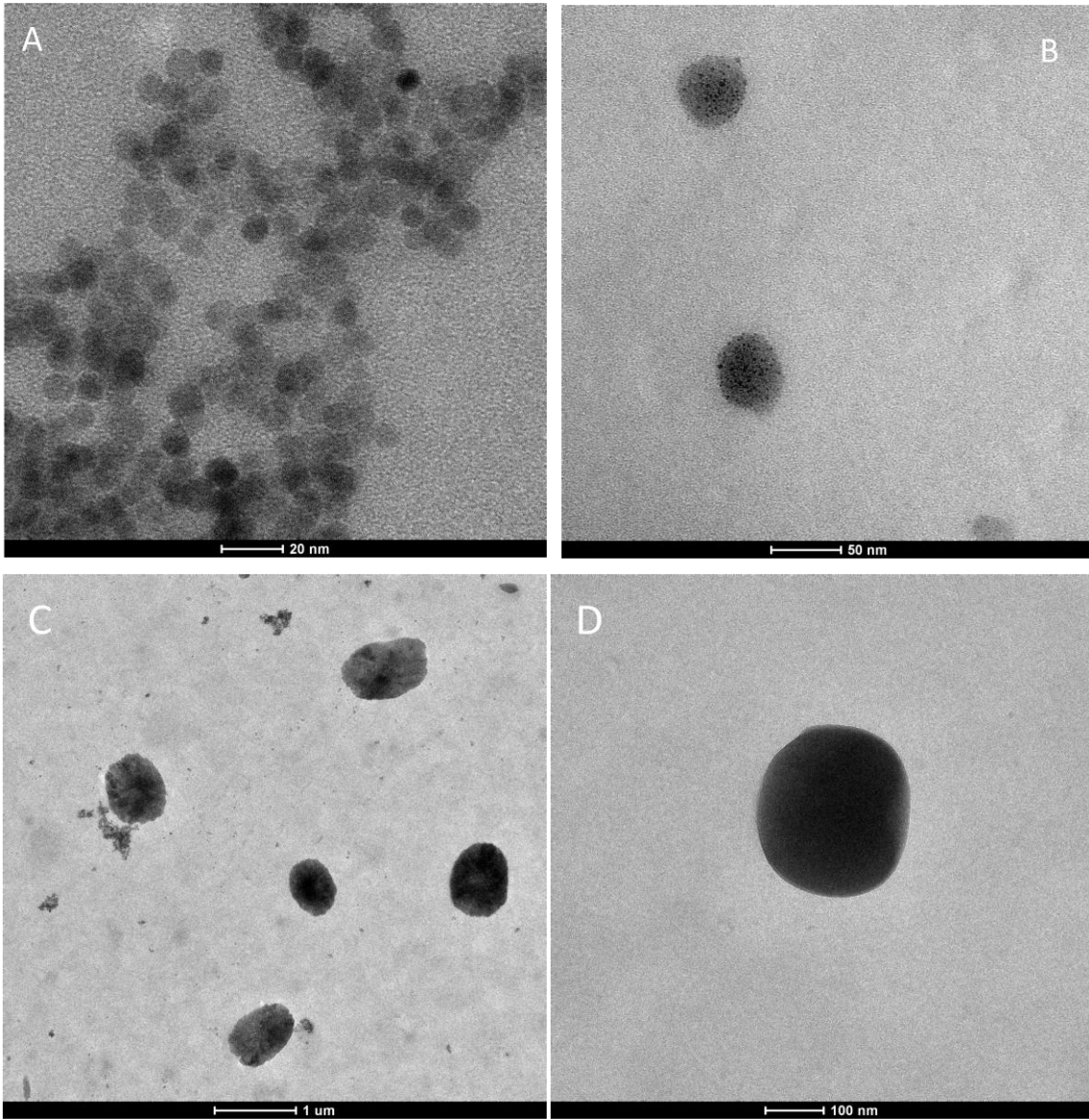
PpIX yüklü manyetolipozomların ve Fe_3O_4 nanopartiküllerin her ikisinde de 45 dk süresince sedimentasyon görülmedi. Küvet etrafına mıknatıs yerleştirildiğinde az miktarda nanopartikülün küvet duvarında mıknatısların yerleştirildiği yerde toplandığı görüldü. PpIX yüklü manyetolipozomların küvet duvarında toplanması ise çok daha fazla oldu. Bu nedenle soğurulma A_{650} değerleri düştü ve sonuçta A_{650}/A_{650}^0 oranı zamanla düştüğü görüldü (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. PpIX yüklü ML'ların (PpIX-ML) ve Nanopartiküllerin (NP) sabit manyetik alan (MA) etkisindeki manyetik cevaplarının zamanla değişiminin spektrofotometrik görüntüsü.

3.6. TEM Görüntülemesi

Tem görüntülemeleri örnekler boyanmadan gerçekleştirildi. Manyetolipozomların boyutları 200 nm'den daha küçük (Şekil 3.4B) bulunurken PpIX yüklü manyetolipozomların 166 ile 720 nm aralığında büyüklüklerde olduğu görüldü (Şekil 3.4C). PpIX yüklü manyetolipozomlar daha koyu renkte olduğu gözlemlendi, ayrıca büyüklükleri 200 nm ve daha küçük olduğunda renklerinin daha koyu ve şekillerinin çok iyi derecede küresel olduğu görüldü (Şekil 3.4D).

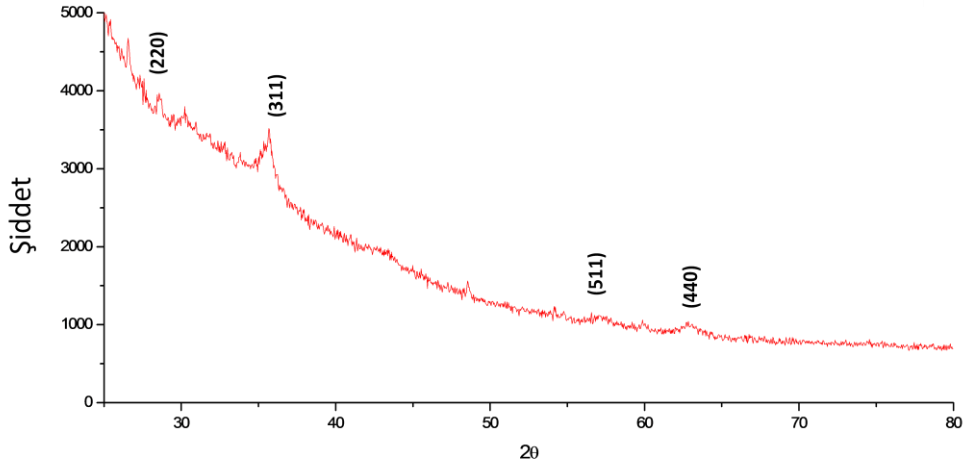


Şekil 3.4. Fe₃O₄ nanopartikülleri, Manyetolipozomlar ve PpIX yüklü manyetolipozomların TEM görüntüleri. (A) Kullanılan nanopartiküllerin elde edilen görüntülerinde 10 nm oldukları

görülmektedir. (B) Manyetolipozomlar 200 nm'den daha küçük olarak görünmektedir. Manyetolipozomların içinde bulunan siyah noktalar nanopartiküllerdir. (C) Farklı büyüklüklerde PpIX yüklü Manyetolipozomlar görünmektedir. (D) Yaklaşık 200 nm büyüklüğünde küresel şekilde PpIX yüklü manyetolipozom görünmektedir.

3.7. XRD Analizi

Kristalit boyutu için Fe_3O_4 nanopartiküllerin en belirgin ve belirleyici olan (311) dizilimindeki kristalin (Şekil 3.5) XRD grafiğinde gösterdiği tepe analiz edildi. Kristalit boyutu scherrer formülüyle 0,346 nm olarak hesaplandı.

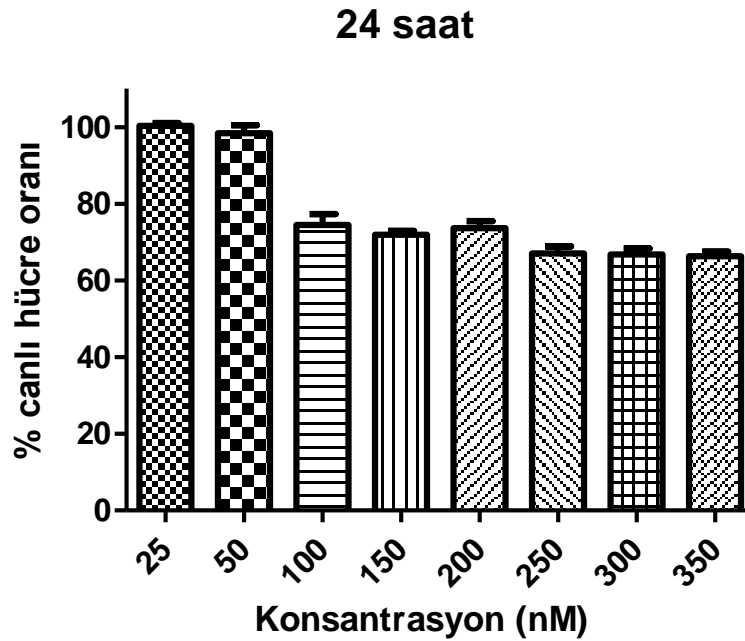


Şekil 3.5. Fe_3O_4 nanopartikülünün XRD grafiği.

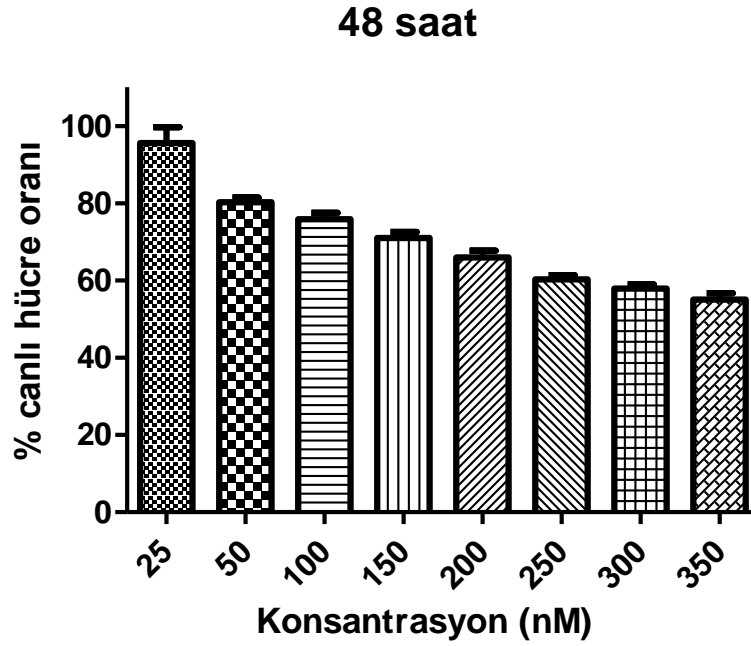
3.8. Toksikite Çalışması

Farklı konsantrasyonlarda PpIX yüklü ML içeren MCF7 hücre hatlarında 24 ve 48 saat inkübasyon süresi sonunda hücre canlılığı MTT ile değerlendirildiğinde 24 saat sonunda (Şekil 3.6) 25 nM konsantrasyonda PpIX yüklü ML eklenmiş hücrelerde hücre canlılığı %100 olarak bulunurken, 50 nM konsantrasyonda bütün guruplar için %100'e yakın hücre canlılığı gözlemlendi. Artan konsantrasyonların hücre canlılığı üzerindeki etkisi incelendi ve hücre ölümünün en yüksek konsantrasyonda fazla olduğu görüldü. En yüksek konsantrasyonda hücre canlılığı PpIX yüklü ML gurubunda ortalama % 66 olarak bulundu. PpIX yüklü ML

gruplarıyla eşit hacimde lipozom ve ML eklenmesinin 24 saat sonraki hücre canlılığına etkisi incelendiğinde uygulanan hacim arttıkça (konsantrasyonda artmaktadır) toksisitenin arttığı görülmüştür. En yüksek konsantrasyonda hücre canlılığı sırasıyla lipozom gurubunda ortalama % 63 ve manyetolipozom gurubunda ortalama % 71 olarak bulundu. Grupların 48 saat sonraki hücre canlılıkları incelendiğinde (Şekil 3.7) 25 nM konsantrasyonda hücre canlılığı PpIX yüklü ML için ortalama %95 olarak bulundu. En yüksek hücre ölümü yine en yüksek konsantrasyondaki uygulamalarda görüldü. 350 nM PpIX yüklü ML içeren grubun hücre canlılığı %55 olarak hesaplandı. PpIX yüklü ML gruplarıyla eşit hacimde lipozom ve ML eklenmesinin 48 saat sonraki hücre canlılığına etkisi incelendiğinde en düşük hacimde hücre canlılığı lipozom için ortalama %97 ve manyetolipozom için ortalama %89 olarak bulundu. En yüksek konsantrasyondaki uygulamalarda hücre canlılığı sırasıyla lipozom grubunda ortalama %55, PpIX yüklü ML grubunda ortalama % 55 ve ML grubunda ortalama % 63 olarak elde edildi. Sonuçta 24 saat sonunda hücre canlılığı bütün guruplar için %63'ün üzerinde ve 48 saat sonunda %55'in üzerinde bulundu.



Şekil 3.6. MCF-7 hücre hattına 25 ile 350 nM aralığında değişik konsantrasyonlarda PpIX yüklü manyetolipozom eklenmesinin 24 saat sonraki hücre canlılığı sonuçları gösterilmiştir. Değerler ortalama±standart hata olarak verilmiştir (n=4).

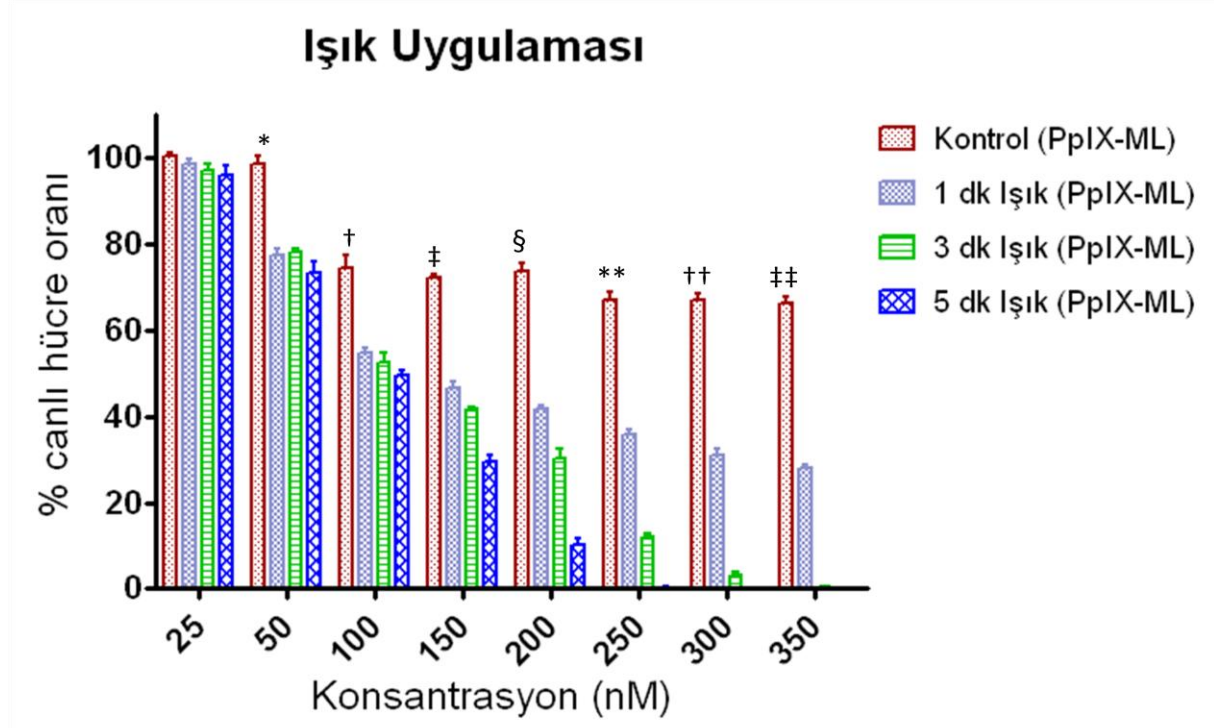


Şekil 3.7. MCF-7 hücre hattına 25 ile 350 nM aralığında değişik konsantrasyonlarda PpIX yüklü manyetolipozom eklenmesinin 48 saat sonraki hücre canlılığı sonuçları gösterilmiştir. Değerler ortalama±standart hata olarak verilmiştir (n=4).

3.9. In-Vitro Fotodinamik Terapi Deneyi

Lipozom ve ML eklenmiş MCF7 hücrelerinde 1, 3 ve 5 dk ışık uygulaması sonucu elde edilen hücre canlılığı, ışık uygulanmamış grupların 24 saat inkübasyon sonrası sonuçları ile benzer sonuçlar vermiştir. PpIX yüklü ML grubunda ise ışık uygulama süresi arttıkça hücre canlılığında azalma görülmüştür. 1, 3 ve 5 dk ışık uygulaması sonucunda 25 nM PpIX eklenen grupta hücre canlılığı % 96'nın üzerinde bulunurken ilerleyen konsantrasyonlarda ışık şiddetiyle orantılı olarak canlılık azalmıştır. 5 dk ışık uygulaması sonunda 250 nM ve üzeri konsantrasyonlarda hücre canlılığı % 0 olarak bulunurken, 3 dk ışık uygulaması sonucunda sadece 350 nM konsantrasyonda hücre canlılığı % 0 olarak bulunmuştur. Işık uygulaması 10 dk ve üzerine çıktığında ise 150 nM ve üzeri konsantrasyonlarda PpIX yüklü ML içeren hücrelerin tamamının öldüğü gözlenmiştir (veri gösterilmedi). İstatistiksel olarak her konsantrasyon grubu kendi içinde değerlendirilmiştir. 25 nM PpIX yüklü ML grubu hariç bütün gruplarda ışık uygulananlar ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0,001$). 150, 200 ve 250 nM PpIX yüklü ML içeren gruplara ışık

uygulanması ile 3 ve 5 dk ışık uygulanan gruplar arasında da anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,001$).



Şekil 3.8. Değişik konsantrasyonlarda PpIX yüklü ML (PpIX-ML) içeren MCF-7 hücrelerine 1, 3 ve 5 dk süresince ışık uygulanması sonucundaki 24 saat sonraki hücre canlılığı gösterilmiştir. Kontrol grubuna hiç ışık uygulanmamıştır. Değerler ortalama±standart hata olarak verilmiştir ($n=4$). Her konsantrasyon grubu kendi içinde değerlendirilerek kontrol ve ışık uygulanan gruplar arasında 50nM ve üzeri konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (*, †, ‡, §, **, ††, ††† için $p<0,001$).

4. TARTIŞMA

Kemoterapi ilaçlarının sistemik uygulanması ilacın hem normal hem de tümörlü dokularda birikimini sağlamakta bu da ciddi yan etkilerin açığa çıkmasına neden olmaktadır. Sistemik uygulamadaki açığa çıkan yan etkileri azaltmak amacıyla ilaçların lipozom, nanopartikül, manyetolipozom vb. gibi nanomateryaller kullanılarak hedef dokuya taşınması üzerine çalışmalar artarak devam etmektedir. Bu çalışmada FDT’de doğrudan kullanılmayan PpIX’un manyetolipozomlara yüklenmesi gerçekleştirilmiş ve biyofiziksel özellikleri araştırılmıştır. Böylece PpIX ‘un fizyolojik ortamda doğrudan kullanılabilmesi amaçlanmıştır.

Vücuttaki en küçük kapillerler 5-6 µm genişliğindedir ve bu nedenle ilaç hedeflemesi için kullanılan ve kan dolaşımına verilen lipozom veya partiküller 5 µm’den küçük olmalıdır, aksi takdirde kapiller çapı ile aynı veya daha büyük lipozom/parçacıklar embolizme neden olabilir (Ricci-Junior ve Marcletti 2006). Zetasizer ile elde edilen ölçümlerde diyaliz edilmiş olan ML- PpIX₍₄₀₎ örneklerinin $221,8 \pm 0,8$ nm büyüklüğünde ve 0,331 PDI değeri ile iyi kalitede boyut dağılımına sahip olduğunu, bu nedenle intravenöz uygulamalar için yeterince küçük olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte TEM görüntüleri ile PpIX yüklü ML’ların büyüklüklerinin 166 ile 720 nm aralığında olduğu tespit edilmiştir ve bunun muhtemel nedeninin PpIX yüklü ML’ların hazırlandıktan sonra bir kısmının topaklanma eğilimi göstermiş olabileceği düşünülmektedir. TEM görüntülerinde ML’ların büyüklüğünün 200 nm’den küçük olması PpIX yüklü ML’larda topaklanmanın nedeninin PpIX olabileceğini düşündürmektedir. Büyük boyutlu PpIX yüklü ML’ların gözlenmesinin bir başka nedeni de PpIX yüklü ML’ların TEM analizi için hazırlanırken gridlerde kurutulma basamağında birleşerek büyük boyutlara ulaşması da olabilir.

PpIX hidrofobik bir molekül olması nedeniyle büyük ihtimalle lipit çift tabakanın arasında yer alırken ve Fe₃O₄ nanopartikülleri de su içinde kararlı dağılım gösterecek yapıda olup hidrofilik özelliktedir ve vezikülün merkezinde yer almaktadır. PpIX yüklü ML’ların büyüklüğü 200 nm ve daha küçük olduğunda düzgün küre şeklini almaktadır, bu nedenle küre şekilli PpIX yüklü ML elde etmek için 200 nm’nin kritik çap değeri olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışma sonucu olarak PpIX ve nanopartiküllerin lipit çift tabakada yerleşimi ve PpIX yüklü ML’ların boyut ve şeklinin nasıl etkilendiğini anlamak için kriyo-TEM analizinin en uygun görüntüleme aracı olacağı önerilmektedir.

Sıcaklığa bağlı yüzde PpIX serbestlenmesi Pradhan ve ark (2010)'nın yaptığı çalışmada kullandığı formülle hesaplanamamaktadır, çünkü serbestlenen PpIX molekülleri bir araya gelerek topaklanma olmakta ve topaklanma olan moleküllerin sadece dış yüzeyindekiler uyarılarak floresans salımı yapabilmektedir. Bu da 42 °C'de 1 saat içinde herhangi bir zamandaki floresans yoğunluğunun t=0'daki floresans yoğunluğundan daha az bulunmasına neden olmaktadır. Bu durum $F_t - F_0$ değerinin negatif veya çok az pozitif çıkmasına neden olmaktadır ve sonuç olarak oda sıcaklığındaki PpIX serbestlenmesinin 42 °C'de PpIX serbestlenmesinden daha yüksek veya çok az bir fark olduğu gibi bir sonuç ortaya çıkmaktadır ve böyle bir sonucun oluşması beklenmemektedir. Çünkü 42 °C çalışmada kullanılan lipidlerin geçiş sıcaklığının üzerindedir ve bu sıcaklıkta manyetolipozomlar içine yüklenmiş moleküllerin hemen hepsinin serbestlenmesi beklenir. Diyaliz edilen PpIX yüklü manyetolipozomlardaki floresans yoğunluk yüzdesi hesaplandığında $PpIX_{(20)} > PpIX_{(40)} > PpIX_{(60)}$ olarak bulunmuştur, bu da floresans yoğunluğunun kapsüllenen PpIX miktarıyla orantılı olmadığını göstermiştir ve bu durum çelişki yaratmaktadır. Bütün bu sonuçlar PpIX molekülünün yüksek oranda serbestlendiğinde topaklanmanın meydana geldiğini göstermektedir. Yapılan çalışmadaki bu sonuçlar vücut sıcaklığında PpIX moleküllerinin yavaş salınmasının daha uygun olacağını göstermektedir.

PpIX yüklü ML'ların düşük frekansta AC manyetik alan altında sıcaklık artışı 30 dk içinde 0,9 °C olarak elde edilmiştir. Kulsrestha ve ark (2012) paklitaksel yüklü ML'ların 10 kA akım ve 423 kHz frekans ile oluşturulan elektromanyetik alanda 30 dk içinde sıcaklığın 25 °C'den 43 °C'ye yükseldiğini bildirmiştir. Pradhan ve ark (2010) yaptığı çalışmada ise folat hedefleme yapılmış ML'ların 12 kA akım ve 290 kHz frekans ile oluşturulan elektromanyetik alanda 15 dk içinde sıcaklığın 42,5 °C'ye yükseldiğini bildirmiştir. Bu çalışmalar ışığında, ML'larda kısa sürede yüksek sıcaklık değişimi için yüksek akım ve frekansa ihtiyaç olduğu görülmektedir. Bununla birlikte yüksek akım yüksek elektromanyetik alan oluşumuna neden olmaktadır ve Fe_3O_4 nanopartiküllerin süperparamanyetik olması nedeniyle böyle bir durumdan yüksek oranda etkilenmesi beklenebilir. Bu nedenle frekans veya elektromanyetik alan şiddetinin ML'lar üzerindeki etkisi birbirinden bağımsız olarak incelenmesi bu faktörlerin sıcaklık değişiminde tek başına ne derece etkin olduğunun açıklanması için yararlı olacaktır.

Türbidite deneyindeki ML'ların manyetik alana cevabı ML'ların ilaç dağılımında manyetik hedeflemede kullanılabilirliğinin incelemek amacıyla yapılmaktadır. ML'ların manyetik cevabı kapsüllenen manyetik nanopartikül miktarına ve nanopartiküllerin manyetik özelliklerine göre değişiklik göstermektedir. PpIX yüklü ML'lar bu deneyde manyetik alana 45 dk içinde %60 oranında cevap vermiş olsa da bu manyetik alan hedefleme için yeterince iyi değildir, çünkü Vlaskou ve ark (2010) manyetik hedefleme için manyetik cevabın % 90 ve üzeri olmasının uygun olacağını belirtmiştir. Nanopartiküller ise sadece %10 manyetik cevap göstermiş ve hem nanopartiküller hem de PpIX yüklü ML'lar 45 dk içinde sedimentasyon göstermemişlerdir burada partiküllerin hidrofilik özellik göstermesi ve zeta potansiyelinin dağılımdaki etkinliğinin sedimentasyonu engellediği düşünülmektedir. Yüklü nanopartiküller diğer partiküllerle (zwitterionic lipitler/yüklü nanopartiküller) lipozom dekorasyonunda, lipozom yüzeyinin elektriksel yüklenmesini sağlayarak mutlak zeta potansiyel değer dağılımını değiştirir (Savarala ve ark 2011). Vezikül yüzeyinde elektriksel yüklerin görülmesi, vezikül yapıları arasında elektrostatik itme kuvvetini açığa çıkarır ve böylece vezikül yayılımı dengelenir (Zhang ve Granick 2006, Savarala ve ark 2011).

ML'ların diyaliz sonrası Fe içirme etkinliğine bakıldığında en yüksek Fe içeriği 0,35 mg Fe₃O₄ eklenerek elde edilen ML'larda %91,67 olarak bulunmuştur. Bununla birlikte 0,5 mg Fe₃O₄ eklenen ML'larda % 80,85 Fe içirme etkinliği elde edilse de eklenen nanopartikül miktarının fazla olması nedeniyle ML'larda kapsüllenen demir kütle miktarının daha fazla olmasına neden olmaktadır. Frascione ve ark (2012) manyetik görüntüleme için ürettikleri ML'larda 0,5 mg/ml Fe eklenerek elde edilen ML'ların %92 ile en yüksek Fe içirme etkinliğine sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Soenen (2009) katyonik lipit kullanarak ürettiği ML'larda 3T3 hücrelerinde lipit konsantrasyonundaki artışın hücre canlılığını göreceli olarak düşürdüğünü bildirmiştir. Bizim çalışmamızda da buna benzer olarak 24 saat inkübasyon sonrası en yüksek konsantrasyonda dahi ML uygulanan hücrelerde hücre canlılığı lipozom uygulananlara göre biraz daha yüksek olarak bulunmuştur. 48 saat inkübasyon sonundaki hücre canlılığı analizinde ise lipozom toksisitesinin biraz daha yüksek olduğu açıkça görülmektedir. Bunun nedeni nanopartiküllerin ML yapısının daha kararlı olmasını sağlamasıdır (Soenen ve ark 2009).

Yoon ve ark (2012) PpIX öncülü olan heksenil ester ALA (ALA-hx)'nın fotodinamik terapideki sitotoksik etkisini MCF7 ve adriyamisine dirençli MCF7 (MCF7/ADR) hücre hatlarında denemiş ve ALA-hx FDT ile MCF7/ADR hücre hattındaki ölüm oranının MCF7'den daha fazla olduğunu bildirmiştir. ALA-hx FDT etkisiyle intraselular reaktif oksijen türlerinin miktarının MCF7/ADR hücre hattında MCF7 hücre hattına oranla anlamlı şekilde yüksek olduğunu bildirmişlerdir. 20µM ALA-hx ve 5 J/cm² kırmızı LED uygulaması 24 saat inkübasyon sonrasında MCF7/ADR hücrelerindeki canlılığı yaklaşık %0'a düşürürken, MCF7 hücre hattındaki canlılığın %80 civarında olduğunu bildirmişlerdir.

Bu çalışmanın in-vitro fotodinamik terapi basamağında ışık uygulama süresi arttıkça hücre canlılığında anlamlı azalmalar görülmektedir. Işık uygulaması 10 dk ve üzerine çıktığında ise 150 nM ve üzeri konsantrasyonlarda PpIX yüklü ML içeren hücrelerin tamamının ölmesi, ürettiğimiz PpIX yüklü ML'lar kullanılarak, FDT için pahalı ve zararlı olabilecek enerjiye sahip lazerlerin kullanımı yerine daha ucuz ve zararı olmayan beyaz ışık kullanılmasına olanak sağlamaktadır. Bununla birlikte nanomolar seviyede düşük konsantrasyonda PpIX kullanımı en azından MCF7 hücre hattı için FDT'de yeterli olmaktadır. Böylece yüksek konsantrasyonda ALA veya diğer fotosensitif ilaç kullanımına gerek olmamaktadır.

5. SONUÇ

FDT kanserli hastaların tedavisinde kemoterapi gibi vücudun her tarafında ağır etkileri olan bir tedavi yöntemi değildir. Aksine sadece ışık uygulanan bölgedeki hücrelerin ölümüne neden olmakta bu da hasta konforunu oldukça artırmaktadır. Bununla birlikte fotodinamik terapide en çok bilinen fakat vücut pH değerinde topaklanma olması nedeniyle kullanımı çok zorlaşan PpIX, manyetolipozomlar içinde kararlı bir yapı oluşturmakta ve vücut sıcaklığında ML'lerden yavaşça serbestlenmektedir. PpIX'in ML içinde meme kanserinin hızlı çoğalan bir formu olan MCF7 hücre hattında, beyaz LED ışıkla nanomolar düzeyinde düşük konsantrasyonlarda bile uyarılabilmesi, ilaç olarak kullanılabilmesi için umut vaat etmektedir. PpIX yüklü ML'lar in-vitro olarak kararlı bir yapı olsalar da fizyolojik ortamdaki durumları, davranışları ve etkileşimleri araştırılmalıdır. Buna ek olarak yapının daha detaylı analizi için kriyoTEM incelemelerinin yapılması gerekmektedir.

PpIX yüklü ML oluşturmada nanopartikül ve PpIX kloroform-metanol içinde fiziksel etkileşime girmektedir. Nanopartikül yüzeyinin ince bir lipid tabakayla kaplı olması ve kloroform-metanol içinde bu tabakanın kalkması sonucunda PpIX-nanopartikül arasında bu fiziksel etkileşim meydana gelmektedir. Sonuçta PpIX ve nanopartikül topaklanmaktadır. Aynı zamanda nanopartiküllerin 10 nm büyüklüğünde olmasına rağmen büyük çoğunluğunun filtreyi destekleyen yüzeyde takılarak 200 nm filtreden geçemediklerinin görülmesi nedeniyle PpIX yüklü ML oluşturmada PpIX ve nanopartiküllerin farklı sıvılar içinde ayrı ayrı eklendiği metodun daha uygun olduğu gözlenmiştir.

Bu çalışmada PpIX yüklü ML'ların in vitro fotodinamik terapi uygulamalarında nanomolar konsantrasyonda hücre canlılığını oldukça etkilediği gösterilmiştir. Yapı demir oksit nanopartikül içermesi nedeniyle pasif hedeflemeye bağlı olarak kanserli dokuların hem MR ile görüntülenmesinde hem de FDT'de kullanımını sağlayacak potansiyele de sahiptir. ML uygulaması ile hastaların PET ile görüntülenmesinde olduğu gibi nükleer maddeye maruz kalmadan kanserli dokuların görüntülenmesinin önü açılmış olacaktır. PpIX 'in manyetik lipozomlara yüklenmesi, boyut, zeta potansiyelleri ve manyetik etkisinin karakterizasyonu literatürde bulunmamaktadır ve bu çalışma bu alanda yapılan ilk çalışmadır. Bu çalışmada

elde edilen verilerin ışığında PpIX yüklü ML'in hayvan deneyleri yapılarak fizyolojik sonuçları araştırılmalıdır. Fizyolojik araştırma sonuçlarının olumlu cevap vermesi durumunda FDT'de kullanılabilir, terapi sonrası vücudun diğer bölgelerine dağılmış ilaç taşıyan manyetolipozomların vücuttan hızla uzaklaştırabilecek, hasta konforunu artıran bir yöntem geliştirilmiş olacaktır. Sonuç olarak PpIX yüklü manyetolipozomların dışarıdan uygulanan manyetik alan altında kanserli dokuda etkin dozda birikmesi de sağlanabilecektir.

ÖZET

BAŞOĞLU H. Protoporfirin Yüklü Manyetolipozomların Biyofiziksel Karakterizasyonu

Manyetolipozomlar, lipozom ve manyetik nanopartikül içeren, insan ve hayvanların terapötik uygulamalarında çeşitli biyoaktif moleküllerin dağıtılmasında yüksek potansiyeli olan yapılardır. Fotodinamik terapi çeşitli kanser tiplerinin tedavisinde fotosensitizer ve görünür ışık kullanımına dayanan bir metottur. Protoporfirin IX (PpIX) metal içermeyen porfirin yapıda bir fotosensitif ajandır ve nötral sulu ortamlarda ağırlaşması nedeniyle insan ve hayvan fizyolojisi çalışmalarında uygun olmamaktadır. Bu çalışmada amaç PpIX taşıyan manyetolipozomlar üretmek, karakterize etmek, ısı ve manyetik alana bağlı olarak yapının ilaç serbestleşmesini, MCF7 hücre hattında toksisite ve fotodinamik etkinliğini incelemektir.

PpIX'in fotodinamik terapide kullanılabilmesi için PpIX yüklü manyetolipozomlar üretilmiştir ve üretilen bu yapının biyofiziksel karakterizasyonu araştırılmıştır. Manyetolipozom üretmek için DPPC ve DSPE-PEG2000 lipidleri ve Fe₃O₄ nanopartikülleri kullanılmıştır. PpIX yüklü manyetolipozomların farklı konsantrasyonlarda toksisite ve in-vitro fotodinamik etkisi MCF7 hücre hattında araştırılmıştır.

PpIX yüklü manyetolipozomların hidrodinamik çapları yaklaşık 220 nm olarak ölçülmüştür, fakat TEM ölçümleri PpIX yüklü manyetolipozomların büyüklüklerinin 166-720 nm arasında değiştiğini göstermektedir. Her iki durumda da PpIX yüklü manyetolipozomların intravenöz uygulamalar için yeterince küçük olduğu belirlenmiştir. Manyetolipozomadaki demir içeriği hücre canlılığını demir içermeyen lipozomlardan daha az etkilemektedir. PpIX yüklü manyetolipozomların konsantrasyonu 350 nM olduğunda hücre canlılığı %66'ya kadar düşmektedir, fakat 5 dakika beyaz ışık uygulandığında 250 nM ve üzeri konsantrasyonda PpIX içeren hücrelerin tamamının öldüğü gözlenmiştir. Bu çalışma PpIX yüklü manyetolipozomların in vitro fotodinamik terapi uygulamalarında oldukça etkili olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Protoporfirin IX, Manyetolipozom, Fe₃O₄ nanopartikül, Fotodinamik Terapi

SUMMARY

BASOGLU H. Biophysical Characterization of Protoporphyrin Loaded Magnetoliposomes

Magnetoliposomes are composed of liposomes and magnetic nanoparticles which have high potentials as a delivery vehicle of various bioactive molecules that could be used for therapeutic applications in both humans and animals. Photodynamic therapy is a treatment method based on the use of photosensitizer and visible light for various types of cancer. Protoporphyrin IX (PpIX) is a metal free porphyrin which is a photosensitive agent and aggregation behavior of PpIX in neutral water makes it inappropriate for using in physiological studies of both human and animal. Purpose of this study is production and characterization of Protoporphyrin IX loaded magnetoliposomes, determination of the drug release rate from magnetoliposomes under the influence of external heat and magnetic field, and to investigate toxicity and photodynamic efficiency of PpIX loaded magnetoliposomes on MCF7 human breast cancer cell lines.

PpIX loaded magnetoliposomes were produced to make the PpIX useful for photodynamic therapy and investigated the biophysical properties of the structure. DPPC, DSPE-PEG2000 lipids and Fe_3O_4 nanoparticles were used to prepare magnetoliposomes. Toxicity and in-vitro photodynamic effects of PpIX loaded ML in various concentrations were performed on MCF7 cell lines.

Hydrodynamic diameter of PpIX loaded magnetoliposomes were measured as approximately 220 nm, however TEM measurement indicated that diameter of PpIX loaded magnetoliposomes change between 166 to 720 nm. PpIX loaded magnetoliposomes observed small enough for intravenous application in both cases. Iron content of magnetoliposomes affected the cell viability less than iron free liposomes. When the concentration of PpIX loaded magnetoliposomes were 350 nM, cell viability reduced to 66% but when white lights applied for 5 minutes, all cells died within 24 hours in 250 nM and higher concentrations. In-vitro results of this study show that PpIX loaded magnetoliposomes highly effective for photodynamic therapy application.

Key Words: Protoporphyrin IX, Magnetoliposomes, Fe_3O_4 nanoparticles, Photodynamic therapy

KAYNAKLAR

Abels C, Heil P, Dellian M, Kuhnle GE, Baumgartner R, Goetz AE. In vivo kinetics and spectra of 5-aminolaevulinic acid-induced fluorescence in an amelanotic melanoma of the hamster. *Br J Cancer*. 1994; 70: 826-33.

Ackroyd R, Kelty C, Brown N., Reed M. The History of Photodetection and Photodynamic Therapy. *Photochemistry and Photobiology*. 2001; 74: 656-669.

Ahmed S, Wunder SL. Effect of high surface curvature on the main phase transition of supported phospholipid bilayers on SiO(2) nanoparticles. *Langmuir*. 2009; 25: 3682–3691.

Ahmed S, Madathingal RR, Wunder SL, Chen YJ, Bothun G. Hydration repulsion effects on the formation of supported lipid bilayers. *Soft Matter*. 2011; 7: 1936–1947

Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, Joo SW, Zarghami N, Hanifehpour Y, Samiei M, Kouhi M, Nejati-Koshki K. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett*. 2013; 8(1):102.

Al-Jamal WT, Al-Jamal KT, Tian B, Lacerda L, Bornans PH, Frederik PM, Kostarelos K. Lipid-quantum dot bilayer vesicles enhance tumor cell uptake and retention *in vitro* and *in vivo*. *ACS Nano*. 2008; 2: 408–418.

Alexis F, Rhee JW, Richie JP, Radovic-Moreno AF, Langer R, Farokhzad OC. New frontiers in nanotechnology for cancer treatment. *Urol Oncol*. 2008; 26(1):74–85.

Almeida RD, Manadas BJ, Carvalho AP, Duarte CB. Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta*. 2004; 20: 59-86.

Amstad E, Kohlbrecher J, Muller E, Schweizer T, Textor M, Reimhult E. Triggered release from liposomes through magnetic actuation of iron oxide nanoparticle containing membranes. *Nano Lett*. 2011; 11: 1664–1670.

Anderson TH, Min YJ, Weirich KL, Zeng HB, Fygenson D, Israelachvili JN. Formation of supported bilayers on silica substrates. *Langmuir*. 2009; 25: 6997–7005.

Asai J, Harada Y, Beika M, Takenaka H, Katoh N, Takamatsu T. Photodynamic diagnosis of metastatic lymph nodes using 5-aminolevulinic acid in mouse squamous cell carcinoma. *J Dermatol Sci.* 2014; 74(2): 171-3.

Bangham AD, Horne RW. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *J Mol Biol.* 1964; 8: 660–8.

Bartucci R, Pantusa M, Marsh D, Sportelli L. Interaction of human serum albumin with membranes containing polymer-grafted lipids: Spin-label ESR studies in the mushroom and brush regimes. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 2002; 1564: 237–242.

Bates DO, Hillman NJ, Williams B, Neal CR, Pocock TM. Regulation of microvascular permeability by vascular endothelial growth factors. *J. Anat.* 2002; 200: 581-597.

Bechet D, Couleaud P, Frochot C, Viriot ML, Guillemin F, Heyob MB. Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents. *Trends in Biotechnology.* 2008; 26(11): 612-621.

Bertrand N, Jun W, Xu X, Kamaly N, Faroukhzad OC. Cancer nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2014; 66: 2-25.

Bertrand N, Leroux JC. The journey of a drug carrier in the body: An anatomo-physiological perspective. *Journal of controlled release.* 2012; 161: 152-163.

Bilgin MD. Biomedical applications of photosensitization. *Doktora Tezi.* Illinois Institute of Technology , Chicago, IL, ABD.

Bilgin MD, Elçin AE, Elçin YM. Topical use of liposomal copper palmitate formulation blocks porphyrin-induced photosensitivity in rats. *J. of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* 2005; 80: 107-114.

Black KC, Kirkpatrick ND, Troutman TS, Xu L, Vagner J, Gillies RJ, Barton JK, Utzinger U, Romanowski M. Gold nanorods targeted to delta opioid receptor: plasmon-resonant contrast and photothermal agents. *Mol Imaging.* 2008; 7(1): 50–57.

Bothun GD. Hydrophobic silver nanoparticles trapped in lipid bilayers: Size distribution, bilayer phase behavior, and optical properties. *J. Nanobiotechnol.* 2008; 6: 13.

Bothun GD, Rabideau AE, Stoner MA. Hepatoma cell uptake of cationic multifluorescent quantum dot liposomes. *J. Phys. Chem. B.* 2009; 113: 7725–7728.

Bothun GD, Preiss MR. Bilayer heating in magnetite nanoparticle-liposome dispersions via fluorescence anisotropy. *J. Colloid Interface Sci.* 2011; 357: 70–74.

Braathen LR, Szeimies RM, Basset-Seguin N, Bissonnette R, Foley P, Pariser D, Roelandts R, Wennberg AM, Morton CA. Guidelines on the use of photodynamic therapy for nonmelanoma skin cancer: an international consensus. *International Society for Photodynamic Therapy in Dermatology. J Am Acad Dermatol.* 2007; 56: 125-43.

Brezovich IA. 1988. Low frequency hyperthermia. *Med. Phys. Monography*, 16, 82-111.

Brocca P, Cantu L, Corti M, Del Favero E, Motta S, Nodari MC. Curved single-bilayers in the region of the anomalous swelling: Effect of curvature and chain length. *Colloid Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 2006; 291: 63–68.

Cabral H, Matsumoto Y, Mizuno K, Chen Q, Murakami M, Kimura M, Terada Y, Kano MR, Miyazono K, Uesaka M, Nishiyama N, Kataoka K. Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size. *Nat Nanotechnol.* 2011; 6(12): 815-23

Chen YJ, Bose A, Bothun GD. Controlled release from bilayer-decorated magnetoliposomes via electromagnetic heating. *ACS Nano.* 2010; 4: 3215–3221.

Chibowski E, Delgado AV, Rudzka K, Szczes A, Holysz L. Surface modification of glass plates and silica particles by phospholipid adsorption. *J. Colloid Interface Sci.* 2011; 353: 281–289.

Cho K, Wang X, Nie S, Chen ZG, Shin DM. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clin Cancer Res.* 2008; 14(5): 1310–1316.

Cho NJ, Jackman JA, Liu M, Frank CW. pH-Driven assembly of various supported lipid platforms: A comparative study on silicon oxide and titanium oxide. *Langmuir.* 2011; 27: 3739–3748.

Cohen BE. Concentration- and time-dependence of amphotericin-B induced permeability changes across ergosterol-containing liposomes. *Biochim Biophys Acta*. 1986; 857: 117–22.

Cortes J, Saura C. Nanoparticle albumin-bound (nab)- paclitaxel: improving efficacy and tolerability by targeted drug delivery in metastatic breast cancer. *European Journal of Cancer*. 2010; 8: 1-10.

Dailant J, Bellet-Amalric E, Braslau A, Charitat T, Fragneto G, Graner F, Mora S, Rieutord F, Stidder B. Structure and fluctuations of a single floating lipid bilayer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005; 102: 11639–11644.

Davis ME, Zuckerman JE, Choi CH, Seligson D, Tolcher A, Alabi CA, Yen Y, Heidel JD, Ribas A. Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. *Nature*. 2010; 464 (7291): 1067-1070.

De Jong WH, Borm PJ. Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. *Int J Nanomedicine*. 2008; 3(2): 133–149.

Denzinger S, Burger M, Walter B, Knuechel R, Roessler W, Wieland WF, Filbeck T. Clinically relevant reduction in risk of recurrence of superficial bladder cancer using 5-aminolevulinic acid-induced fluorescence diagnosis: 8-year results of prospective randomized study. *Urology*. 2007; 69(4): 675-9.

Deserno M, Gelbart WM. Adhesion and wrapping in colloid-vesicle complexes. *J. Phys. Chem. B*. 2002; 106: 5543–5552

Deserno M, Bickel T. Wrapping of a spherical colloid by a fluid membrane. *Europhys. Lett*. 2003; 62: 767–773.

Ding X, Cai K, Luo Z, Li J, Hu Y, Shen X. Biocompatible magnetic liposomes for temperature triggered drug delivery. *Nanoscale*. 2012; 4: 6289-6292.

Dobereiner HG, Lipowsky R. Vesicles in contact with nanoparticles and colloids. *Europhys. Lett*. 1998; 43: 219–225.

Dolmans DE, Fukumura D, Jain RK. Photodynamic therapy for cancer. *Nature*. 2003; 3: 380-387.

Dos Santos N, Waterhouse D, Masin D, Tardi PG, Karlsson G, Edwards K, Bally MB. Substantial increases in idarubicin plasma concentration by liposome encapsulation mediates improved antitumor activity. *J Control Release*. 2005;105(1-2): 89-105

Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbek M, Moan J, Peng Q. Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst*. 1998; 90: 889-905.

Drummond DC, Meyer O, Hong K, Kirpotin DB, Papahadjopoulos D. Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumor. *Pharmacol Rev*. 1999; 51(4): 691-743.

Ethier SP, Mahacek ML, Gullick WJ, Frank TS, Weber BL. Differential isolation of normal luminal mammary epithelial cells and breast cancer cells from primary and metastatic sites using selective media. *Cancer Res*. 1993; 53(3): 627-35.

Fang RH, Aryal S, Hu CMJ, Zhang LF. Quick synthesis of lipid-polymer hybrid nanoparticles with low polydispersity using a single-step sonication method. *Langmuir*. 2010; 26: 16958–16962.

Fleck CC, Netz RR. Electrostatic colloid-membrane binding. *Europhys. Lett*. 2004; 67: 314–320.

Frascione D, Diwoky C, Almer G, Opriessing P, Vonach C, Graduer K, Leitinger G, Mangge H, Stollberger R, Prassl R.. Ultrasmall superparamagnetic iron oxide (USPIO)- based liposomes as magnetic resonance imaging probes. *International Journal of Nanomedicine*. 2012; 7: 2349-2359.

Geraldes CF, Laurent S. Classification and basic properties of contrast agents for magnetic resonance imaging. *Contrast Media and Molecular Imaging*. 2009; 4: 1-23.

Ginzburg VV, Balijepailli S. Modeling the thermodynamics of the interaction of nanoparticles with cell membranes. *Nano Lett*. 2007; 7: 3716–3722.

Goksu EI, Vanegas JM, Blanchette CD, Lin WC, Longo ML. AFM for structure and dynamics of biomembranes. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr*. 2009; 1788: 254–266.

Gopalakrishnan G, Danelon C, Izewska P, Prummer M, Bolinger PY, Geissbuhler I, Demurtas D, Dubochet J, Vogel H. Multifunctional lipid/quantum dot hybrid nanocontainers for controlled targeting of live cells. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2006; 45: 5478–5483.

Gorter E, Grendel F. On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood. *J. Exp Med* 1925; 41: 439.

Gradzielski M. Vesicles and vesicle gels-structure and dynamics of formation. *J. Phys. Condes. Matter.* 2003; 15: R655–R697

Grant CWM, Hamilton KS, Hamilton KD, Barber KR. Physical biochemistry of a liposomal amphotericin B mixture used for patient treatment *Biochim Biophys Acta* 1989;984:11–20.

Grossweiner LI, Jones LR, Grossweiner JB, Rogers BHG. *The science of phototherapy: An Introduction*, Springer. 2005.

Gupta B, Levchenko TS, Torchilin VP. Intracellular delivery of large molecules and small particles by cell-penetrating proteins and peptides. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005;57(4):637-51

Gültekin Murat. <http://kanser.gov.tr/Dosya/Sunular/Turkey.pdf> (27/04/2014)

Hagstrom JE, Sebestyen MG, Budker V, Ludtke JJ, Fritz JD, Wolff JA. Concentration- and time dependence of amphotericin-B induced permeability changes across ergosterol-containing liposomes. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1284: 47–55

Hahn WC, Weinberg RA. Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 2002; 2: 331–41.

Hasan W, Chu K, Gullapalli A, Dunn SS, Enlow EM, Luft JC, Tian S, Napier ME, Pohlhaus PD, Rolland JP, DeSimone JM. Delivery of multiple siRNAs using lipid-coated PLGA nanoparticles for treatment of prostate cancer. *Nano Lett.* 2012; 12(1); 287-92.

Heath, J. R. and Davis, M. E. Nanotechnology and cancer. *Annu Rev Med.* 2008; 59: 251–265.

Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ, Mikaelian I, Usary J, Hu Z, Rasmussen KE, Jones LP, Assefnia S, Chandrasekharan S, Backlund MG, Yin Y, Khramtsov AI, Bastein R, Quackenbush J, Glazer RI, Brown PH, Green JE, Kopelovich L, Furth PA, Palazzo JP,

Olopade OI, Bernard PS, Churchill GA, Van Dyke T, Perou CM. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol.* 2007; 8(5): R76.

Hiemenz PC. Principles of colloid and surface chemistry. Third edition. Marcel Dekker Inc. 1997 page 371.

Hobbs SK, Monsky WL, Yuan F, Roberts WG, Griffith L, Torchilin VP, Jain RK. Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95(8): 4607-12.

Holliday DL, Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Research.* 2011; 13: 215-7

Huang W, Zhang J, Dorn HC, Zhang C. Assembly of bio-nanoparticles for double controlled drug release. *PLoS One.* 2013; 8(9): e74679.

Inoue Y, Tanaka R, Komeda K, Hirokawa F, Hayashi M, Uchiyama K. Fluorescence Detection of Malignant Liver Tumors using 5-Aminolevulinic Acid-Mediated Photodynamic Diagnosis: Principles, Technique, and Clinical Experience. *World J Surg.* 2014 DOI 10.1007/s00268-014-2463-9

Israelachvili JN, Mitchell DJ, Ninham BW. Theory of Self-Assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2 Mol. Chem. Phys.* 1976;72: 1525–1568

Jang H, Pell LE, Korgel BA, English DS. Photoluminescence quenching of silicon nanoparticles in phospholipid vesicle bilayers. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 2003;158:111–117.

Jeon SY, Kim KH, Song KH. Efficacy of photodynamic diagnosis-guided Mohs micrographic surgery in primary squamous cell carcinoma. *Dermatol Surg.* 2013; 39(12):1774-83

Jin CS, Zheng G. Liposomal nanostructures for Photosensitizer Delivery. *Lasers in Surgery and Medicine.* 2011; 43: 734-748.

- Jin SE, Jin HE, Hong SS. Targeted delivery system of nanobiomaterials in anticancer therapy: from cells to clinic. *BioMed Research International*. 2014; doi: 10.1155/2014/814208
- Juarranz A, Jaen P, Sanz-Rodriguez F, Cuevas J, Gonzalez S. Photodynamic therapy for cancer: Basic principles and applications. *Clin Trans Oncol*. 2008; 10: 148-154.
- Junior ER, Marchetti JM. Zinc (II) phthalocyanine loaded PLGA nanoparticles for photodynamic therapy use. *Int. Jour. of Pharmaceutics*. 2006; 310: 187-195.
- Juzeniene A, Peng Q, Moan J. Milestones in the development of photodynamic therapy and fluorescence diagnosis. *Photochem Photobiol Sci*. 2007; 12: 1234-45.
- Kipp JE. The role of solid nanoparticle technology in the paranteral delivery of poorly water soluble drugs. *Pharmaceutcal Nanotechnology*. 2004; 284: 109-122.
- Kong G, Braun RD, Dewhirst MW. Hyperthermia enables tumor-specific nanoparticle delivery: effect of particle size. *Cancer Res*. 2000; 60(16): 4440–4445.
- Kormeili T, Yamauchi PS, Lowe NJ. Topical photodynamic therapy in clinical dermatology. *Br. J. Dermatol*. 2004; 150: 1061–1069.
- Koyunoğlu F, Tekin S, Konar V, Sandal S. İnsan meme kanseri hücre serileri (MCF-7) üzerine Apelin-13'ün etkilerinin araştırılması: In vivo bir çalışma. *İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 2013; 1: 23-28.
- Krack M., Hohenberg H., Kornowski A., Lindner P., Weller H., Forster S. Nanoparticle-loaded magnetophoretic vesicles. *J. Am. Chem. Soc*. 2008; 130: 7315–7320.
- Kulsrestha P, Gogoi M, Bahadur D, Banerjee R. In vitro application of paclitaxel loaded magnetoliposomes for combined chemotherapy and hyperthermia. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2012; 96: 1-7.
- Lammers T, Hennink WE, Storm G. Tumour-targeted nanomedicines: principles and practice. *Br J Cancer*. 2008; 99(3): 392–397.
- Lasfargues EY, Ozzello L. Cultivation of human breast carcinomas. *J Natl Cancer Inst*. 1958; 21: 1131-1147.

- Lasic DD. Novel applications of liposomes. *Trends Biotechnol.* 1998; 16: 307–321.
- Lasic DD. Giant vesicles: a historical introduction. In: Luisi Pier Luigi, Walde Peter, editors. *Giant vesicles, perspectives in supramolecular chemistry*, vol. 6. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd. 2000.
- Laughlin RG. Equilibrium vesicles: Fact or fiction? *Colloid Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 1997; 128: 27–38.
- Levenson AS, Jordan VC. MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line. *Cancer Res.* 1997; 57(15): 3071-8
- Le Bihan O, Bonnafous P, Marak L, Bickel T, Trepout S, Mornet S, de Haas F, Talbot H, Taveau JC, Lambert O. Cryo-electron tomography of nanoparticle transmigration into liposome. *J. Struct. Biol.* 2009; 168: 419–425.
- Li P, Sun JG, Huang CR, Pan GY, Xu MJ, Li J, Wang GJ, Tao JN. Development and validation of a sensitive quantification method for hematoporphyrin monomethylether in plasma using high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Biomedical Chromatography.* 2006; 20: 1277-1282.
- Lilge L, O'Carroll C, Wilson BC. A solubilization technique for photosensitizer quantification in ex vivo tissue samples. *J. of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* 1997; 39: 229-235.
- Liu Z, Cai W, He L, Nakayama N, Chen K, Sun X, Chen X, Dai H. In vivo biodistribution and highly efficient tumour targeting of carbon nanotubes in mice. *Nat Nanotechnol.* 2007; 2(1): 47-52.
- Mabrey S, Sturtevant JM. Investigation of phase-transitions of lipids and lipid mixtures by high sensitivity differential scanning calorimetry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1976; 73: 3862–3866.
- Maeda H, Matsumura Y. Tumorotropic and lymphotropic principles of macromolecular drugs. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 1989; 6(3): 193–210.
- Malvern Inc. <http://www.malvern.com> (25/04/2014)

Mansoori M, Agrawal S, Jawade S, Khan MI. A review on liposome. *International Journal of Advanced Research in Pharmacy and Bio Sciences*. 2012; 2(4): 453-464

Matsumura Y, Kataoka K. Preclinical and clinical studies of anticancer agent-incorporating polymer micelles. *Cancer Sci*. 2009;100(4):572-9.

Menon U, Jacobs IJ. Recent developments in ovarian cancer screening. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol*. 2000; 12: 39–42

Michel R, Gradzielski M. Experimental Aspects of Colloidal Interactions in Mixed Systems of Liposome and Inorganic Nanoparticle and Their Applications. *Int J Mol Sci*. 2012; 13(9): 11610–11642.

Ming X, Carver K, Wu L. Albumin-based nanoconjugates for targeted delivery of therapeutic oligonucleotides. *Biomaterials*. 2013; 34(32): 7939-49.

Mittapalli RK, Liu X, Adkins CE, Nounou MI, Bohn KA, Terrell TB, Qhattal HS, Geldenhuys WJ, Palmieri D, Steeg PS, Smith QR, Lockman PR. Paclitaxel-hyaluronic nanoconjugates prolong overall survival in a preclinical brain metastases of breast cancer model. *Mol Cancer Ther*. 2013; 12(11): 2389-99

Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Long circulating and target specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacological Reviews*. 2001; 53; 283-318.

Moloney FJ, Collins P. Randomized, double blind, prospective study to compare topical 5-aminolevulinic acid methylester with topical 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy for extensive scalp actinic keratosis. *Dermatological Surgery and Lasers*. 2007; 87-91.

Mohanraj VJ, Barnes TJ, Prestidge CA. Silica nanoparticle coated liposomes: A new type of hybrid nanocapsule for proteins. *Int. J. Pharm*. 2010; 392: 285–293.

Mornet S, Lambert O, Duguet E, Brisson A. The formation of supported lipid bilayers on silica nanoparticles revealed by cryoelectron microscopy. *Nano Lett*. 2005; 5: 281–285.

Morton CA, Whitehurst C, Moore JV, MacKie RM. Comparison of red and green light in the treatment of Bowen's disease by photodynamic therapy. *Br J Dermatol*. 2000; 143: 767-72.

Moura SP, Carmona-Ribeiro AM. Biomimetic particles: Optimization of phospholipid bilayer coverage on silica and colloid stabilization. *Langmuir*. 2005; 21: 10160–10164.

Mroz P, Yaroslavsky A, Kharkwal G, Hamblin MR. Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer. *Cancers*. 2011; 3: 2516-2539.

Muehlmann LA, Joanitti GA, Silva JR, Longo JPF, Azevedo RB. Liposomal photosensitizers: potential platforms for anticancer photodynamic therapy. *Brazilian journal of Medical and Biological Research*. 2011; 44: 729-737.

Nagarajan R. Molecular Packing Parameter and Surfactant Self-Assembly: The Neglected Role of the Surfactant Tail. *Langmuir* 2002; 18: 31–8.

Nagayasu A., Uchiyama K., Kiwada H. The size of liposomes: a factor which affects their targeting efficiency to tumors and therapeutic activity of liposomal antitumor drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1999; 40: 75-87.

Nanotechnology in Medicine (<http://ts-1.eee.hku.hk/ccst9015sp13/p13/drug-delivery/cancer-3/>) (20/04/2014)

Nappini S, Bombelli FB, Bonini M, Norden B, Baglioni P. Magnetoliposomes for controlled drug release in the presence of low-frequency magnetic field. *Soft Matter*. 2010; 6: 154-162.

Nayak CS. Photodynamic therapy in dermatology. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol*. 2005; 71: 155–160.

Negussie AH, Miller JL, Reddy G, Drake SK, Wood BJ, Dreher MR. Synthesis and in vitro evaluation of cyclic NGR peptide targeted thermally sensitive liposome. *J Control Release*. 2010;143(2):265-73

NCI (National Cancer Institute). Photodynamic Therapy for Cancer. <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Therapy/photodynamic> (13/04/2014)

National Cancer Institute. <http://nano.cancer.gov/learn/understanding/> (21/04/2014)

National Cancer Institute. <http://www.cancer.gov/cancertopics/types/breast> (22/04/2014)

O'Brien ME, Wigler N, Inbar M, Rosso R, Grischke E, Santoro A, Catane R, Kieback DG, Tomczak P, Ackland SP, Orlandi F, Mellars L, Alland L, Tendler C. Reduced cardiotoxicity and comparable efficacy in a phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin HCl (CAELYX/Doxil) versus conventional doxorubicin for first-line treatment of metastatic breast cancer. *Annals of Oncology*. 2004; 15: 440-449.

O'Connor AE, Gallagher WM, Byrne AT. Porphrine and Nonporphyrine photosensitizers in Oncology: Preclinical and Clinical Advances in Photodynamic Therapy. 2009;85: 1053-1074.

Oja C, Tardi P, Schutze-Redelmeier M, Cullis PR. Doxorubicin entrapped within liposome-associated antigens results in a selective inhibition of the antibody response to the linked antigen. *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1468(1-2):31-40.

Paasonen L, Sipila T, Subrizi A, Laurinmaki P, Butcher SJ, Rappolt M, Yaghmur A, Urtti A, Yliperttula M. Gold-embedded photosensitive liposomes for drug delivery: Triggering mechanism and intracellular release. *J. Control. Release*. 2010; 147:136–143.

Padera TP, Stoll BR, Tooredman JB, Capen D, di Tomaso E, Jain RK. Pathology: cancer cells compress intratumour vessels. *Nature*. 2004; 427(6976):695.

Park JW. Curvature effect on nanometer-scale surface properties of phospholipid layers. *Colloid Surf. B Biointerfaces*. 2011; 86:166–168.

Park SH, Oh SG, Mun JY, Han SS. Effects of silver nanoparticles on the fluidity of bilayer in phospholipid liposome. *Colloid Surf. B Biointerfaces*. 2005; 44:117–122.

Park SH, Oh SG, Mun JY, Han SS. Loading of gold nanoparticles inside the DPPC bilayers of liposome and their effects on membrane fluidities. *Colloid Surf. B Biointerfaces*. 2006; 48: 112–118.

Pantos A, Tsiourvas D, Paleos CM, Nounesis G. Enhanced drug transport from unilamellar to multilamellar liposomes induced by molecular recognition of their lipid membranes. *Langmuir*. 2005; 21(15):6696-702.

Peer D, Karp JM, Hong S, Farokhzad OC, Margalit R, Langer R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat Nanotechnol*. 2007; 2(12):751-60.

Peng Q, Soler AM, Warloe T, Nesland JM, Giercksky KE. Selective distribution of porphyrins in skin thick basal cell carcinoma after topical application of methyl 5-aminolevulinate. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2001; 62: 140-145.

Peng G, Tisch U, Adams O, Hakim M, Shehada N, Broza YY, Billan S, Abdah-Bortnyak R, Kuten A, Haick H. Diagnosing lung cancer in exhaled breath using gold nanoparticles. *Nat Nanotechnol*. 2009; 4(10): 669-73.

Petricoin EF, Zoon KC, Kohn EC, Barrett JC, Liotta LA. Clinical proteomics: translating benchside promise into bedside reality. *Nat. Rev. Drug Discov*. 2002; 1: 683–95

Plaza RC, Arias JL, Espin M, Jimenez ML, Delgado A.V. Aging effects in the electrokinetics of colloidal iron oxide. *Journal of Colloid Interface Science*. 2002; 245: 86-90.

Plaetzer K, Kiesslich T, Krammer B, Hammerl P. Characterization of the cell death modes and the associated changes in cellular energy supply in response to AlPcS4-PDT. *Photochem Photobiol Sci*. 2002; 3: 172-7.

Powers KW, Brown SC, Krishna VB, Wasdo SC, Moudgil BM, Roberts SM. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials. Part VI. Characterization of nanoscale particles for toxicological evaluation. *Toxicol Sci*. 2006; 90(2): 296–303.

Postigo F, Mora M, De Madariaga MA, Nonell S, Sagrista ML. Incorporation of hydrophobic porphyrins into liposomes: Characterization and structural requirements. *Int J Pharm*. 2004; 278 (2): 239-254.

Pradhan P, Giri J, Rieken F, Koch C, Mykhylyk O, Döbliner M, Banerjee R, Bahadur D, Plank C. Targeted temperature sensitive magnetic liposomes for the rmo-chemotherapy. *Journal of Controlled Release*. 2010; 142: 108-121.

Qiu D, An X, Chen Z, Ma X.. Microstructure study of liposomes decorated by hydrophobic magnetic nanoparticles. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2012; 165: 563-570.

Rasch MR, Rossinyol E, Hueso JL, Goodfellow BW, Arbiol J, Korgel BA. Hydrophobic gold nanoparticle self-assembly with phosphatidylcholine lipid: Membrane-loaded and janus vesicles. *Nano Lett*. 2010;10:3733–3739.

Renee Twombly. Cancer surpasses heart diseases as leading cause of death for all but the very elderly. *J of the National Cancer Institute*. 2005; 97 (5): 330-331.

Rhoades E, Gussakovsky E, Haran G. Watching proteins fold one molecule at a time. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(6): 3197-202.

Ricci-Junior E, Marchetti JM. Zinc (II) phthalocyanine loaded PLGA nanoparticles for photodynamic therapy use. *International Journal of Pharmaceutics*. 2006; 310: 187-195.

Richter R, Mukhopadhyay A, Brisson A. Pathways of lipid vesicle deposition on solid surfaces: A combined QCM-D and AFM study. *Biophys. J*. 2003; 85: 3035–3047.

Richter RP, Berat R, Brisson AR. Formation of solid-supported lipid bilayers: An integrated view. *Langmuir*. 2006; 22: 3497–3505.

Roiter Y, Ornatska M, Rammohan AR, Balakrishnan J, Heine DR, Minko S. Interaction of nanoparticles with lipid membrane. *Nano Lett*. 2008; 8: 941–944.

Roiter Y, Ornatska M, Rammohan AR, Balakrishnan J, Heine DR, Minko S. Interaction of Lipid Membrane with Nanostructured Surfaces. *Langmuir*. 2009; 25:6287–6299.

Rossi LM, Silva PR, Vono LLR, Fernandes AU, Tada DB, Baptista MS. Protoporphyrin IX Nanoparticle carrier: preparation, optical properties and singlet oxygen generation. *Langmuir*. 2008; 24 (21): 12534-12538.

Ruggiero A, Villa CH, Bander E, Rey DA, Bergkvist M, Batt CA, Manova-Todorova K, Deen WM, Scheinberg DA, McDevitt MR. Paradoxical glomerular filtration of carbon nanotubes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107(27):12369-74

Samadikhah HR, Nikkhah M, Hosseinkhani S. Preparation, characterization and efficient transfection of cationic liposomes and nanomagnetic cationic liposomes. *Int J Nanomedicine*. 2011; 6: 2275-2283.

Santos Cortes JA, Gahan J, Soloway MS. Photodynamic diagnosis in urology: state of the art. *Arch Esp Urol*. 2011;64(1):18-31.

Savarala S, Ahmed S, Ilies MA, Wunder SL. Formation and colloidal stability of DMPC supported lipid bilayers on SiO₂ nanobeads. *Langmuir*. 2010; 26: 12081–12088.

Savarala S, Monson F, Ilies MA, Wunder SL. Supported lipid bilayer nanosystems: Stabilization by undulatory-protrusion forces and destabilization by lipid bridging. *Langmuir*. 2011;27:5850–5861.

Scolaro LM, Castriciano M, Romeo A, Patane S, Cefali E, Allegrini M. Aggregation behaviour of protoporphyrin IX in Aqueous Solutions: Clear Evidence of Vesicle Formation. *J. Phys. Chem. B*. 2002; 106: 2453-2459.

Schuitmaker JJ, Baas P, Van Leengoed HL, Van Der Meulen FW, Star WM, Van Zandwijk N. Photodynamic therapy: A promising new modality for the treatment of cancer. *J. Photochem. Photobiol. B*. 1996; 34: 3-12.

Seantier B, Kasemo B. Influence of mono- and divalent ions on the formation of supported phospholipid bilayers via vesicle adsorption. *Langmuir*. 2009; 25:5767–5772.

Segota S, Tezak D. Spontaneous formation of vesicles. *Adv. Colloid Interface Sci*. 2006; 121:51–75.

Seifert U. Configurations of fluid membranes and vesicles. *Adv. Phys*. 1997; 46:13–137

Shackley DC, Whitehurst C, Clarke NW, Betts C, Moore JV. Photodynamic therapy. *J. Of The Royal Society of Medicine*. 1999; 92: 562-565.

Sharman WM, Allen CM, van Lier JE. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *Drug Discov Today*. 1999; 4: 507-517.

Shi S, Yang K, Hong H, Valdovinos HF, Nayak TR, Zhang Y, Theuer CP, Barnhart TE, Liu Z, Cai W. Tumor vasculature targeting and imaging in living mice with reduced graphene oxide. *Biomaterials*. 2013; 34(12):3002-9.

Skouras A, Mourtas S, Markoutsas E, De Goltstein MC, Wallon C, Catoen S, Antimisiaris SG. Magnetoliposomes with high USPIO entrapping efficiency, stability and magnetic properties. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 2011; 7: 572-579.

Soenen JS, De Meyer SF, Dresselaers T, Velde GV, Pareyn IM, Braeckmans K, De Cuyper M, Himmelreich U, Vanhoorelbeke KI. MRI assesment of blood outgrowth endothelial cell homing using cationic magnetoliposomes. *Biomaterials*. 2011; 32: 4140-4150.

Soenen JS, De Cuyper M. Assessing cytotoxicity of (ironoxidebased) nanoparticles: an overview of different methods exemplified with cationic magnetoliposomes. *Contrast Media and Molecular Imaging*. 2009; 4: 207-219.

Soenen JS, Baert J, De Cuyper M. Optimal conditions for labelling of 3T3 fibroblast with magnetoliposomes without affecting cellular viability. *ChemBioChem*. 2007; 8: 2067-2077.

Soenen JS, Brisson AR, De Cuyper M. Addressing the problem of cationic lipid-mediated toxicity: The magnetoliposome model. *Biomaterials*. 2009; 30: 3691-3701.

Soumya M. Photodynamic Therapy: Biophysical Mechanisms and Molecular Responses., (PhD Thesis) Department of Biochemistry and Biophysics School of Medicine and Dentistry, University of Rochester, New York. 2004.

Swartz MA, Fleury ME. Interstitial flow and its effects in soft tissues. *Annu Rev Biomed Eng*. 2007; 9: 229-56.

Sze A, Erickson D, Ren L, Li D. Zeta potential measurement using the Smoluchowski equation and the slope of the current-time relation in electrosmotic flow. *Journal of Colloidal and Interface Science*. 2003; 261: 402-410.

Thaxton CS, Elghanian R, Thomas AD, Stoeva SI, Lee JS, Smith ND, Schaeffer AJ, Klocker H, Horninger W, Bartsch G, Mirkin CA. Nanoparticle-based bio-barcode assay redefines "undetectable" PSA and biochemical recurrence after radical prostatectomy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106(44): 18437-42.

Tohver V, Smay JE, Braem A, Braun PV, Lewis JA. Nanoparticle halos: A new colloid stabilization mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001; 98: 8950–8954.

Tseng WC, Haselton FR, Giorgio TD. Mitosis enhances transgene expression of plasmid delivered by cationic liposomes *Biochim Biophys Acta* 1999; 1445: 53–64.

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Kanser Daire Başkanlığı
<http://www.kanser.gov.tr/kanser/kanser-turleri/49-meme-kanseri.html>

Uehlinger P, Zellweger M, Wagneres G, Julierat-Jeanerret L, van den Bergh H, Lange N. 5-Aminolevulinic acid and its derivatives: physical chemical properties and protoporphyrin IX formation in cultered cells. *J.Photochem. Photobiol. B: Biol.* 2000; 54: 72-80.

Vacha R, Martinez-Veracoechea FJ, Frenkel D. Receptor-mediated endocytosis of nanoparticles of various shapes. *Nano Lett.* 2011; 11: 5391–5395.

Vamvakaki V, Fournier D, Chaniotakis NA. Fluorescence detection of enzymatic activity within a liposome based nano-biosensor. *Biosens Bioelectron.* 2005; 21(2): 384-8.

Vantieghem A, Assefa Z, Vandenabeele P, Declercq W, Courtois S, Vandenheede JR, Merlevede W, de Witte P, Agostinis P. Hypericin-induced photosensitization of HeLa cells leads to apoptosis or necrosis. Involvement of cytochrome c and procaspase-3 activation in the mechanism of apoptosis. *FEBS Lett.*, 1998; 440: 19-24.

Vlaskou D, Mykhaylyk O, Krotz F, Hellwig N, Renner R, Schillinger U, Gleich B, Heidsieck A, Schmitz G, Hansel K, Plank C. Magnetic and acoustically active lipospheres for magnetically targeted nucleic acid delivery. *Advanced Functional Materials.* 2010; 20: 3881-3894.

von Maltzahn G, Park JH, Lin KY, Singh N, Schwöppe C, Mesters R, Berdel WE, Ruoslahti E, Sailor MJ, Bhatia SN. Nanoparticles that communicate in vivo to amplify tumour targeting. *Nat Mater.* 2010;10(7):545-52

Wang B, Zhang LF, Bae SC, Granick S. Nanoparticle-induced surface reconstruction of phospholipid membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008;105:18171–18175.

Wean Sin C, Hadinoto K. Factors affecting drug encapsulation and stability of lipid-polymer hybrid nanoparticles. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 2011;85:214–220.

Wi HS, Lee K, Pak HK. Interfacial energy consideration in the organization of a quantum dot-lipid mixed system. *J. Phys. Condes. Matter.* 2008; 20:494211:1–494211:6.

Wikipedia, http://en.wikipedia.org/wiki/Protoporphyrin_IX (27/04/2004)

Wilczewska AZ, Niemirowicz K, Markiewicz KH, Car H. Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacol Rep.* 2012; 64(5):1020-37.

Wilson BC. Photodynamic therapy for cancer: principles. *Canadian Journal of Gastroenterology*. 2002; 16: 393–396.

Yang K, Zhang S, Zhang G, Sun X, Lee ST, Liu Z. Graphene in mice: ultrahigh in vivo tumor uptake and efficient photothermal therapy. *Nano Lett*. 2010; 10(9):3318-23.

Yoon JH, Yoon HE, Kim O, Kim SK, Ahn SG, Kang KW. The enhanced anticancer effect of hexenyl ester of 5-Aminolevulinic acid photodynamic therapy in adriamycin-resistant compared to non-resistant cancer cells. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2012; 44: 76-86.

Yoshida M, Sato M, Yamamoto Y, Maehara T, Naohara T, Aona H, Sugishita H, Sato K, Watanabe Y. Tumor local chemohyperthermia using docetaxel-embedded magnetoliposomes: Interaction of chemotherapy and hyperthermia. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2012; 27: 406-411.

Yoshimoto M, Wang S, Fukunaga K, Treyer M, Walde P, Kuboi R, Nakao K. Enhancement of apparent substrate selectivity of proteinase K encapsulated in liposomes through a cholate-induced alteration of the bilayer permeability. *Biotechnol Bioeng*. 2004; 85(2): 222-33

Yu Y, Anthony SM, Zhang LF, Bae SC, Granick S. Cationic nanoparticles stabilize zwitterionic liposomes better than anionic ones. *J. Phys. Chem. C*. 2007;111:8233–8236.

Yuan F, Dellian M, Fukumura D, Leunig M, Berk DA, Torchilin VP, Jain RK. Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size. *Cancer Res*. 1995; 55(17): 3752–3756.

Zhang JQ, Zhang ZR, Yang H, Tan QY, Qin SR, Qiu XL. Lyophilized paclitaxel magnetoliposomes as a potential drug delivery system for breast cancer via parenteral administration: in vitro and in vivo studies. *Pharmaceutical Research*. 2005; 22(4): 573-583.

Zhang LF, Granick S. How to stabilize phospholipid liposomes (using nanoparticles) *Nano Lett*. 2006; 6: 694–698.

Zhang LF, Dammann K, Bae SC, Granick S. Ligand-receptor binding on nanoparticle-stabilized liposome surfaces. *Soft Matter*. 2007; 3: 551–553.

Zhang LF, Chan JM, Gu FX, Rhee JW, Wang AZ, Radovic-Moreno AF, Alexis F, Langer R, Farokhzad OC. Self-assembled lipid-polymer hybrid nanoparticles: A robust drug delivery platform. *ACS Nano*. 2008; 2: 1696–1702.

ÖZGEÇMİŞ

27 Şubat 1981'de Karabük'te doğdum. İlköğrenimi Gökçebey/Zonguldak'ta tamamladıktan sonra Zonguldak Anadolu Öğretmen Lisesinde lise öğrenimimi tamamladım. Lisans eğitimimi İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Fizik Bölümünde başladım ve 2006 yılında mezun oldum. Aynı yıl Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimime başladım ve 2009 yılında bitirdim. Sonrasında Doktora eğitimime yine Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalında başladım.

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmamda ilgi, yardım ve hoşgörüsünü eksik etmeyen danışmanım Prof Dr M. Dinçer BİLGİN'e, çalışmalarım sırasında bilgi ve desteğiyle yardımcı olan, laboratuvarında çalışma imkanı sağlayan İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsünün Malzeme Mühendisliği Öğretim Üyesi Doç. Dr. Mustafa M. DEMİR'e, her türlü teknik desteklerinden dolayı İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Biyoteknoloji ve Biyomühendislik Uygulama ve Araştırma Merkezine, Adnan Menderes Üniversitesi, Bilim ve Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezine ve hücre kültürü çalışmalarımda yardımlarından dolayı Biyolog Necati GÜNAY'a teşekkür ederim.

Beni bu günlere getiren aileme sabır ve özverilerinden dolayı teşekkür ederim.

Bu çalışma TÜBİTAK tarafından 112S958 kodlu proje ve Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri ofisi tarafından TPF-13014 kodlu proje olarak desteklenmiştir. Desteğinden dolayı Adnan Menderes Üniversitesine ve TÜBİTAK'a teşekkür ederim.