

**T.C.**  
**AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**MOLEKÜLER BİYOTEKNOLOJİ**  
**YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**  
**MBTK-2021-0004**

**HÜCRE MEMBRANINDAN GEÇEMEYEN AJANLARIN**  
**ANTİPROLİFERATİF ETKİLERİNİN**  
**NANOENKAPSÜLASYON İLE MODİFİKASYONU**

**BETÜL KARA**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**  
**Dr. Öğr. Üyesi Olcay BOYACIOĞLU**

Bu tez TÜBİTAK 1001 programı tarafından 118S675 proje numarası ile desteklenmiştir.

**AYDIN-2021**

## KABUL VE ONAY

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoteknoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Betül KARA tarafından hazırlanan “Hücre Membranından Geçemeyen Ajanların Antiproliferatif Etkilerinin Nanoenkapsülasyon ile Modifikasyonu” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 02/07/2021

Üye (T.D.)	: Dr. Öğr. Üyesi Olcay BOYACIOĞLU	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi	.....
Üye	: Prof. Dr. Bülent BOZDOĞAN	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi	.....
Üye	: Prof. Dr. Hatice GÜNEŞ	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	.....

### ONAY:

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsünün ..... tarih ve ..... sayılı oturumunda alınan ..... nolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Süleyman AYPAK  
Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez çalışmamda ilgi, yardım ve desteğini esirgemeyen saygıdeğer danışmanlarım Dr. Öğr. Üyesi Olcay BOYACIOĞLU'na ve Doç. Dr. Seda ÖRENAY BOYACIOĞLU'na çok teşekkür ederim. Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde bana katkı sağlayan Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilim Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi ve ADÜ Gıda Mühendisliği Laboratuvarı'na, 1001 programı kapsamında burs desteği sağlayan TÜBİTAK'a, elektron mikroskobu kullanımında İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi'ne ve burada bana değerli vaktini ayıran Defne ÖZTÜRK'e teşekkürümü bir borç bilirim.

Tez dönemimde yanımda olan ve laboratuvardaki çalışmalarına yardımcı olan arkadaşlarım Seçil TECİMEN, Ecem AYDIN ve özellikle Hasan Hüseyin BAYIRLI'ya teşekkür ederim.

Her daim yanımda olan ve tez çalışmam süresince de desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, göstermiş oldukları sabır ve özveri için aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY .....	i
TEŞEKKÜR .....	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
TABLolar DİZİNİ .....	viii
ÖZET.....	ix
ABSTRACT .....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Prostat Kanseri .....	3
2.2. Reaktif Oksijen Türlerinin Kanserle İlişkisi .....	4
2.3. Normal Prostat Hücrelerinde Çinkonun Rolü .....	5
2.4. Çinko Şelatlayıcı Ajanlar .....	5
2.5. İlaç Taşıma Sisteminde/Kanser Çalışmalarında Nanoenkapsülasyon.....	7
2.6. Hücre Membranı ve Özellikleri .....	9
2.7. Lipozom .....	10
2.8. Lipozomların Sınıflandırılması .....	12
2.8.1. Lipozomların Stabİlİtesİ.....	13
2.8.2. Lipozom Karakterizasyonu .....	13
2.9. Lipozomların Terapötik Uygulamaları .....	16
2.10. Lipozomlara İlaç Yükleme .....	17
2.11. Lipozom Sentezleme Metodları .....	17
2.12. Antikanser Terapide Lipozomlar .....	19
2.13. Lipozomal Antikanser İlaç Formülasyonları .....	19
2.14. Lipozomların Hücreseİ Cevabı .....	22
2.15. Literatür Taraması .....	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	25
3.1. Lipozom Yapımı .....	25
3.2. Lipozom Karakterizasyonu ve Optimizasyonu .....	25
3.3. TPEN Referans Grafiğİnin Çıkarılması.....	26
3.4. DTPA Şelasyonu .....	26

3.5. DTPA yüklü lipozomların Konsantrasyonlarının Belirlenmesi.....	27
3.6. Hücre Kültürü .....	27
4. BULGULAR.....	30
4.1. TPEN ve DTPA Referans Grafikleri .....	30
4.2. TPEN Yüklü ve Boş Lipozomların TEM Altında Morfolojik Görüntüsü.....	31
4.3. DTPA Yüklü Lipozomların TEM Altında Morfolojik Ggörüntüsü.....	33
4.4. Kontrol ve TPEN Yüklü Lipozomların Partikül Analizi ve Zeta Potansiyeli Ölçümü .....	35
4.5. Kontrol ve DTPA Yüklü Lipozomların Zeta Ölçümü ve Partikül Analizi.....	37
4.6. DTPA'nın PC3 Hücreleri Üzerine Etkisi .....	39
4.7. TPEN'in PC3 Hücreleri Üzerine Etkisi.....	40
4.8. Lipozomal DTPA'nın PC3 Hücreleri Üzerine Etkisi.....	42
4.9. Lipozomal TPEN'in PC3 Hücreleri Üzerine Etkisi .....	43
5. TARTIŞMA .....	44
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	50
KAYNAKLAR .....	52
BİLİMSEL ETİK BEYANI.....	62
ÖZ GEÇMİŞ .....	63

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>AFM</b>	: Atomik Kuvvet Mikroskoku
<b>DOX</b>	: Doksorubisin
<b>DLS</b>	: Dinamik Işık Saçılımı
<b>DTPA</b>	: Dietilentriaminpentaasetikasit
<b>EM</b>	: Elektron Mikroskobu
<b>EDTA</b>	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
<b>EDDS</b>	: Etilendiamin-N,N'-Disüksinik Asit
<b>FDA</b>	: Food and Drug Administration
<b>HPLC</b>	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
<b>MTT</b>	: 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-Yl)-2,5 Difenil Tetrazolyum Bromür
<b>NTA</b>	: Nitrilotriasetik Asit
<b>PC3</b>	: İnsan Prostat Kanseri Hücre Hattı
<b>PCX</b>	: Paklitaksel
<b>PI</b>	: Polidispersite İndeksi
<b>RPMI</b>	: Roswell Park Memorial Institute
<b>ROS</b>	: Reaktif Oksijen Türleri
<b>TEM</b>	: Geçirimli Elektron Mikroskobu
<b>TPEN</b>	: N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridinylmethyl)-1,2-ethanediamine
<b>TÜİK</b>	: Türkiye İstatistik Kurumu

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Erkeklerde en sık görülen kanser türlerinin tüm yaş gruplarında görülme sıklığı ....	3
Şekil 2. Aminopolikarboksilik şelasyon ajanlarının moleküler yapıları .....	6
Şekil 3. TPEN'in moleküler yapısı .....	7
Şekil 4. Lipozom (a) ve hücre zarının (b) yapılarının benzerliği .....	10
Şekil 5. Lipozomun basit yapısı ve kompozisyonları .....	11
Şekil 6. Boyut ve katmana göre lipozomların sınıflandırılması .....	14
Şekil 7. TPEN referans grafiği .....	30
Şekil 8. DTPA referans grafiği .....	31
Şekil 9. Boş lipozomların TEM altında görüntüleri .....	31
Şekil 10. Boş lipozomların TEM de boyutlarının işaretlenmesi .....	32
Şekil 11. TPEN yüklü lipozomların TEM de görüntüleri .....	32
Şekil 12. TPEN yüklü lipozomların TEM de boyutlarının işaretlenmesi .....	33
Şekil 13. Boş lipozomların TEM altında görüntüleri.....	33
Şekil 14. Boş lipozomların TEM altında boyutlarının işaretlenmesi.....	34
Şekil 15. DTPA yüklü lipozomların TEM altında görüntüleri.....	34
Şekil 16. DTPA yüklü lipozomların TEM'de boyutlarının işaretlenmesi .....	35
Şekil 17. TPEN'in kontrol lipozomunun zetasizer ile partikül analizi .....	35
Şekil 18. TPEN'in kontrol lipozomunun zetasizer ile zeta potansiyel ölçümü .....	36
Şekil 19. TPEN yüklü lipozomların zetasizer ile partikül analizi .....	36
Şekil 20. TPEN yüklü lipozomların zetasizer ile zeta potansiyel ölçümü .....	37
Şekil 21. DTPA'nın kontrol lipozomunun zetasizer ile partikül boyut analizi .....	37
Şekil 22. DTPA'nın kontrol lipozomunun zetasizer ile zeta potansiyel ölçüm .....	38
Şekil 23. DTPA yüklü lipozomların zetasizer ile partikül boyut analizi .....	38

<b>Şekil 24.</b> DTPA yüklü lipozomların zetasizer ile zeta potansiyel ölçümü.....	39
<b>Şekil 25.</b> DTPA'nın PC3 hücreleri üzerine 24-48-72 saat muameleye ait MTT sitotoksosite deneyi .....	40
<b>Şekil 26.</b> TPEN'in PC3 hücreleri üzerine 24-48-72 saat muameleye ait MTT sitotoksosite deneyi .....	42
<b>Şekil 27.</b> Lipozomal DTPA'nın PC3 hücreleri üzerinde 24-48-72 saat muameleye ait cell titer glo lüminesan hücre canlılığı testi .....	42
<b>Şekil 28.</b> Lipozomal TPEN'in PC3 hücreleri üzerinde 24-48-72 saat muameleye ait cell titer glo lüminesan hücre canlılığı testi .....	43



## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b> Türkiye’de iyi ve kötü huylu tümörlerden kaynaklı ilk 3 ölüm nedenlerinin yıllara göre % dağılımı (TUIK, 2019). .....	1
<b>Tablo 2.</b> Normal ve prostat kanserli hücrelerde sitrat çinko karşılaştırılması (Franklin, 2013).....	5
<b>Tablo 3.</b> Kanser tedavisinde kullanılan lipozomal formülasyonları geliştirilen ilaçlar (Olusanya, 2018).....	21
<b>Tablo 4.</b> Onaylanmış lipozomal antikanser ajanlar (Hofheinz ve diğerleri., 2005). .....	21
<b>Tablo 5.</b> Yaygın kullanılan antikanser ajanların içeriği, hazırlanması ve uygulama alanları (Ahmed ve diğerleri, 2019) .....	21
<b>Tablo 6.</b> Yaygın kullanılan lipozomal antikanser ajanlar ve etkileri (Hofheinz ve diğerleri., 2005).....	22
<b>Tablo 7.</b> DTPA şelasyonu için hazırlanan tüp içerikleri .....	26
<b>Tablo 8.</b> DTPA’nın PC3 hücreleri üzerinde 24-48-72 saat muameleye ait yüzde hücre canlılığı spektrofotometre sonuçları ± standart sapmaları.....	40
<b>Tablo 9.</b> TPEN’in PC3 hücreleri üzerinde 24-48-72 saat muameleye ait yüzde hücre canlılığı spektrofotometre sonuçları ± standart sapmaları.....	41
<b>Tablo 10.</b> Lipozomal DTPA'nın PC3 hücreleri üzerinde 24-48-72 saat muameleye ait yüzde hücre canlılığı spektrofotometre sonuçları ± standart sapmaları .....	42
<b>Tablo 11.</b> Lipozomal TPEN'in PC3 hücreleri üzerinde 24-48-72 saat muameleye ait yüzde hücre canlılığı spektrofotometre sonuçları ± standart sapmaları .....	43

## ÖZET

### HÜCRE MEMBRANINDAN GEÇEMEYEN AJANLARIN ANTİPROLİFERATİF ETKİLERİNİN NANOENKAPSÜLASYON İLE MODİFİKASYONU

**Kara B. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoteknoloji Programı, Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2021.**

**Amaç:** Bu çalışmada amaç hücre membranından geçemeyen ajanların düşük dozlarda nanoenkapsülasyonla hücreye girmesini sağlamaktır.

**Gereç ve Yöntem:** Bunun için araştırma materyali olarak hidrojen soy fosfatidilkolin ve kolesterol lipitleri toz halinde satın alınmıştır. Bu tozlar 3:1 kloroform/metanol içinde çözündürüldükten sonra vakum altında kloroform/metanol uzaklaştırılmıştır. Elde edilen lipit tabakası sitrat tamponu içinde lipozom enkapsüle edilecek toksik kimyasallar ile homojen hale getirilip filtreden geçirilerek lipozom elde edilmiştir. Son aşamada bu karışım kolondan geçirilerek lipozom enkapsüle olmayan kimyasallardan arındırılmış ve lipozomlar saf halde elde edilmiştir.

**Bulgular:** Elde edilen lipozomların boyutları yaklaşık 200-300 nanometre boyutundadır. DTPA ve TPEN ile yüklenen lipozomların enkapsülasyon verimi hesaplanmıştır. DTPA'nın paketlenme verimi %43,8, TPEN'in paketlenme verimi %1,45 bulunmuştur. DTPA'nın PC3 hücreleri üzerinde IC50 değeri 48 saatte 50 µM olarak bulunmuştur. TPEN'in PC3 hücreleri üzerinde IC50 değeri 24 saatte 4-6 µM arasında olduğu saptanmıştır.

**Sonuç:** Lipozomal DTPA'nın PC3 hücreleri üzerinde IC50 değeri 72 saatte 50-60 µM olarak değerlendirilmektedir. Lipozomal TPEN'de ise bu değer 72 saatte 6-8 µM arasında olduğu sonucuna varılmıştır. Yalnız DTPA ya da TPEN'in toksik etkisinin lipozomal formülasyonlarından daha fazla olduğu sonucu elde edilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Antikanser ajan, Nanoenkapsülasyon, Sitotoksosite.

## ABSTRACT

### MODIFICATION OF ANTIPROLIFERATIVE EFFECTS OF CELL MEMBRANE-IMPERMEABLE AGENTS BY NANOENCAPSULATION

**Kara B. Aydin Adnan Menderes University Health Sciences Institute of Molecular Biotechnology Program, Master's Thesis, Aydin, 2021.**

**Objective:** The aim of this study is to ensure that agents that cannot pass through the cell membrane enter the cell with low doses of nanoencapsulation.

**Material and Methods:** For this, hydrogen soy phosphatidylcholine and cholesterol lipids in powder form were purchased as research material. After dissolving these powders in 3: 1 chloroform / methanol, chloroform / methanol was removed under vacuum. Liposome was obtained by homogenizing the toxic chemicals to be encapsulated in the liposome in the obtained lipid layer citrate buffer and passing through the filter. In the last step, this mixture was passed through the column and the liposome was purified from non-encapsulated chemicals and obtained in pure form.

**Results:** The sizes of the resulting liposomes are approximately 200-300 nanometers. The encapsulation efficiency of liposomes loaded with DTPA and TPEN was calculated. The packaging efficiency of DTPA was found to be 43.8%, and the packaging efficiency of TPEN was 1.45%. The IC<sub>50</sub> value of DTPA on PC3 cells was 50  $\mu$ M in 48 hours. The IC<sub>50</sub> value of TPEN on PC3 cells was found to be between 4-6  $\mu$ M in 24 hours.

**Conclusion:** The IC<sub>50</sub> value of liposomal DTPA on PC3 cells is evaluated as 50-60  $\mu$ M in 72 hours. In liposomal TPEN, it was concluded that this value was between 6-8  $\mu$ M in 72 hours. It was concluded that the toxic effect of free DTPA or TPEN is more than that of the liposomal formulations.

**Keywords:** Anticancer agent, Nanoencapsulation, Cytotoxicity.

# 1. GİRİŞ

Kanser, ölüm nedenlerine bakıldığında, dolaşım sistemi hastalıklarından sonra ikinci sırada gelen bulaşıcı olmayan hastalıklar grubunda yer almaktadır. Küresel olarak her 6 ölümden biri, ülkemizde ise her 5 ölümden biri kanser nedenlidir (T.C. Halk Sağlığı Kurumu, 2018). Tablo 1'e bakıldığında Türkiye'de iyi ve kötü huylu tümörlerden kaynaklı ölümler bazı alt ölüm nedenleri ile birlikte gösterilmiştir (Tablo 1).

**Tablo 1.** Türkiye'de iyi ve kötü huylu tümörlerden kaynaklı ilk 3 ölüm nedenlerinin yıllara göre % dağılımı (TUIK, 2019).

<b>Türkiye'de alt ölüm nedenleri (%)</b>	<b>2018</b>	<b>2019</b>
<b>Gırtlak/soluk borusu/akciğerin</b>	%30,2	%30,2
<b>Lenfoid ve hemopoetik</b>	%7,8	%7,9
<b>Mide</b>	%8,0	%8,1

Kanser, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması, bölünmesi olarak tanımlanmaktadır. Tek bir organa etkisi olduğu gibi birçok organa da yayılarak etki göstermektedir (Baykara, 2016). Kan damarları ve lenfatik akımlar yoluyla insan vücudunun etrafına yayılır ve ikincil bir tümör oluşturarak metastaza neden olabilmektedir (Olusanya, 2018).

Kanser, genlerle ilişkilendirilmektedir. Bütün kanser çeşitleri DNA dizisindeki anormallikler sonucunda ortaya çıkmaktadır. Bunların %10-15'i kalıtsal, %85-90'ı da canlı hücrelerin yaşam boyunca maruz kaldığı mutasyonlar, replikasyon hataları gibi durumlardan kaynaklandığı bilinmektedir (Yokuş ve Çakır, 2012). Bu hasarın düzelmesi için bazı DNA tamir sistemleri işlev görür ama bu her zaman mümkün olmamaktadır. Bunun sonucunda eksik veya hatalı üretilen genlerin ürünü olan proteinler, hücresel işlevin bozulmasına yol açmaktadır (Baykara, 2016).

Çeşitli mekanizmalara sahip olan kanser aslında bir patolojidir ve son 10 yılda bu hastalıkların tedavisinde birçok farklı yöntem geliştirilmiştir. Bir tedavi şekli olan kemoterapi de, birçok etkili kemoterapötik ajanın varlığına rağmen, antikanser ilaçların

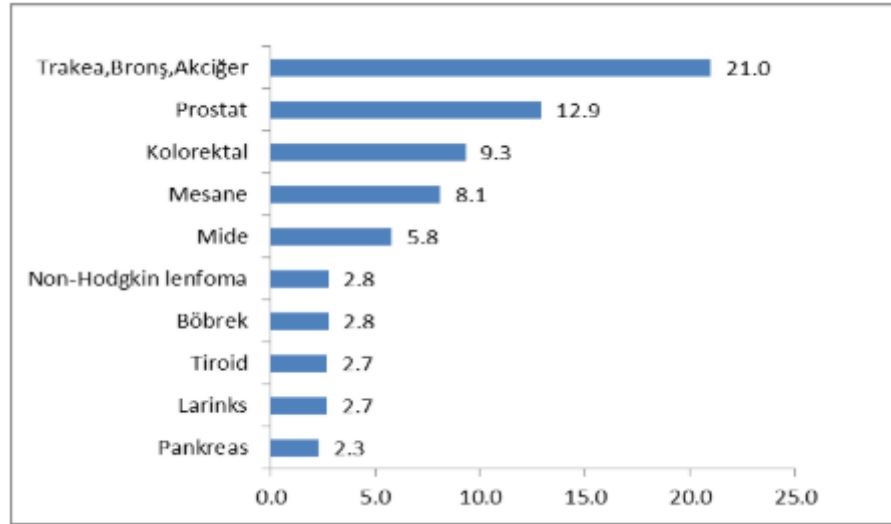
ideal olmayan farmasötik ve farmakolojik özellikleri mevcuttur. Bu ilaçların suda çözünürlüğünün düşük olması, stabilite eksikliği, hızlı metabolize edilmeleri, olumsuz farmakokinetik özellikleri ve seçici olmayan ilaç dağılımı gibi birçok olumsuz yanları bulunmaktadır (Tila ve diğerleri, 2015).

Kanserin bu denli önemli sorunlara yol açması beraberinde tanı ve tedavisinde çeşitli yöntemleri de getirmiştir. Kanser tedavisinde kullanılan geleneksel yöntemlere bakıldığında cerrahi girişimler, radyoterapi, kemoterapi ve immunoterapi önemli rol oynamaktadır. Cerrahi girişimler, tek başına kullanılmasının yanı sıra kemoterapi ile birlikte de kullanılan bilinen en eski tedavi yöntemlerinden biridir. Bu tedavi yöntemi sayesinde tümörlü bölgenin iyi ya da kötü huylu olup olmadığının tanısı konulmakta ve kötü huylu olan dokunun diğer organlara sıçramadan uzaklaştırılması işlemi gerçekleştirilmektedir. Tümörlü dokuya bu işlemle tamamen müdahale edilip çıkartılmadığı durumlarda kemoterapi ve radyoterapiye ihtiyaç duyulmaktadır (Baykara, 2016). Radyoterapi, x ışınları, gama ışınları, elektron veya protonlar gibi yüksek enerjili parçacıklar kullanılarak tek bir bölgeye uygulanmanın yanında tüm vüdüde de uygulanabilmektedir (Tuncer, 2014). İmmunoterapi; bağışıklık sisteminin çeşitli uyaranlara karşı yaptığı savunma mekanizmasına bağlıdır ve bu yöntemde sitokinler, antikorlar, hücreler kanser tedavisinde kullanılmaktadır (Baykara, 2016). Kemoterapi, kimyasal ajanlar varlığında kanserli hücrelerin çoğalmasını engellemek amacıyla kullanılmaktadır. Sadece kanserli hücelere değil aynı zamanda sağlıklı hücelere de zarar verebilmektedir (Albayatı, 2018).

## 2. GENEL BİLGİLE

### 2.1. Prostat Kanseri

Prostat kanseri, dünya çapında erkeklerde önemli bir sağlık sorunu oluşturmaktadır. Aynı zamanda %13,5 oranı ile ikinci en yaygın kanser türü ve beşinci ölüm nedeni olarak kabul edilmektedir (Song ve diğerleri, 2020). Şekil 1’de görüldüğü üzere erkeklerde görülen en sık 10 kanserin tüm yaş gruplarında görülme oranları mevcuttur (Şekil 1).



**Şekil 1.** Erkeklerde en sık görülen kanser türlerinin tüm yaş gruplarında görülme sıklığı (T.C. Halk Sağlığı Kurumu, 2018).

Prostat kanseri sağlıklı hücelere nazaran daha düşük çinko konsantrasyonuna sahip olması ile bilinmektedir. Çinko konsantrasyonunun bu düşük seviyesi sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir ve hücre içi  $Zn^{2+}$  konsantrasyonunun artırılmasına veya daha da azaltılmasına yol açan uygulamalar kanser hücrelerinin apoptoz yolu ile ölümüne sebebiyet vermektedirler (Stuart ve diğerleri, 2016).

Bazı çalışmalar çinkonun prostat kanser hücrelerinde büyümeyi baskıladığını, tümör hücre istilasının inhibisyonunu sağladığını bildirmiştir (Ishii ve diğerleri., 2001). Ayrıca yüksek oranda prostat içi çinko seviyesi prostat karsinomasına karşı koruyabilir. Bazı çalışmalar da bunun tam tersini söylemektedir. Yüksek oranda prostat içi çinko konsantrasyonu prostat kanser riskine ters etki yapmaktadır (Leitzmann ve diğerleri., 2003).

Örneğin çinko telomeraz aktivitesini geliştiren ve tümör hücrelerinin sınırsız çoğalmasından sorumlu olan bu enzimin prostat kanseri riskini artırdığı bilinmektedir (Nemoto ve diğerleri., 2000).

## 2.2. Reaktif Oksijen Türlerinin Kansere İlişkisi

Reaktif oksijen türleri (ROS) ve onların uyarlanabilir antidotlarının arasındaki denge tümör hücrelerinin apoptozu, proliferasyonu ve metabolik proseslerinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (D'Autréaux ve Toledano, 2007). ROS, tek oksijen, peroksit, süperoksit ve hidroksil radikali içeren yüksek kimyasal reaktiviteye sahip ve serbest radikaller içeren oksijen elementi olarak tanımlanmaktadır (Flannagan, Cosío, ve Grinstein, 2009). Serbest radikallerin oluşturduğu oksidatif stresi ortadan kaldırmaya yarayan savunma sistemleri antioksidanlardır. İnsan vücudu için zararlı olan reaktif oksijen türlerinin oluşumunu engellemek ve onların toksik etkilerini ortadan kaldırmaya yardımcı olmaktadır (Karabulut ve Gülay, 2016). Antioksidanlar, bir substratın oksidasyonunu önlemeye yardımcı olur ya da geciktirebilir. Oksidatif stresle ilişkili olup, temel biyomolekülleri oksidatif hasara karşı korur (Godić ve diğerleri, 2014).

Normal fizyolojik koşullar altında, ROS'un hücre içi seviyesi hücrelerin zarar görmesini önlemek amacıyla sürekli olarak korunmaktadır. Reaktif oksijen türlerinin detoksifikasyonu, glutatyon, flavonoid, A, C, E vitaminleri gibi enzimatik olmayan moleküller veya bunları temizleyen bazı antioksidan enzimler aracılığıyla gerçekleşmektedir (Liou ve Storz, 2010).

Süperoksit dismutazlar, ökaryot ve prokaryotlarda bulunan süperoksit anyonunun oksijen ve hidrojen peroksit ayrışmasını katalizleyen ve kofaktör olarak  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  gibi metal iyonları kullanan metaloenzimler olarak bilinmektedir (Liou ve Storz, 2010). Farklı SOD enzimleri, hücrenin farklı bölümlerinde yer alarak biyolojik proseslerin düzenlenmesinde rol oynar (Copin ve diğerleri, 2000). Glutatyonun, sitoplazmik proteinlerin sisteinlere olan disülfid bağlarını azaltarak hücreleri oksidatif stresten koruduğu bilinmektedir (Liou ve Storz, 2010).

Hücre içindeki düzensiz ROS artışı, kanser hücre döngüsünün durması, yaşlanma ve apoptoza neden olabilmektedir. Bu durum da, bağışıklık hücreleri tarafından ROS üretilmesi ile sağlanabilmektedir (Cadenas, 2004). Apoptoz ise, kaspaz aktivasyonuna yol açan, ve mitokondriyal oksidatif stres artışıyla bağlantılı hücre ölümü olarak tanımlanmaktadır (Simon, 2000).

### 2.3. Normal Prostat Hücrelerinde Çinkonun Rolü

İnsan prostat bezesi, farklı embriyolojik orjin, hücresel iletişim, fonksiyon ve farklı hastalıklara sahiptir. %70'i periferel bölge, %25'i merkezi bölge ve %5'i de geçiş bölgesi olarak tanımlanmaktadır. Periferel zon prostat sıvısının üretimi ve salgısından sorumludur. Prostatik sıvı yüksek konsantrasyonda sitrat içerir. Çinko seviyesi bu sitrat sayesinde periferel zonda birikir (Franklin, 2013). Tablo 2'de normal ve prostat kanserli hücrelerde sitrat ve çinko birikiminin değerleri nmol cinsinden verilmektedir (Tablo 2).

**Tablo 2.** Normal ve prostat kanserli hücrelerde sitrat çinko karşılaştırılması (Franklin, 2013).

	Sitrat nanomolar	Çinko nanomolar
Normal çevresel bölge	12,000-14,000	3,000-4,500
Malign çevresel bölge	200-2000	400-800
Diğer dokular	250-450	200-400
Normal prostat sıvısı	40,000-150,000	8,000-10,000
Prostat sıvısı	500-3000	800-2000
Kan Plazması	100-200	15

Yüksek oranda çinko seviyesi aynı oranda sitrat üretimi ve salgısını da sağlar. Bunun sonucunda çinko mitokondrial akonitaz aktivitesini inhibe eder bu da Krebs döngüsü aracılığıyla sitrat oksidasyonunu önler. Böylelikle normal periferel zonda özel olarak çinko birikir ve sitrat üretilir (Franklin, 2013).

Prostat kanseri dokusunda  $Zn^{2+}$  konsantrasyonları malignite ilerledikçe daha da azalmaktadır (Costello ve Franklin, 2006). Buna ek olarak, prostat kanser hücrelerine  $Zn^{2+}$  muamelesi apoptozu indüklemektedir (Stuart ve diğerleri., 2016).

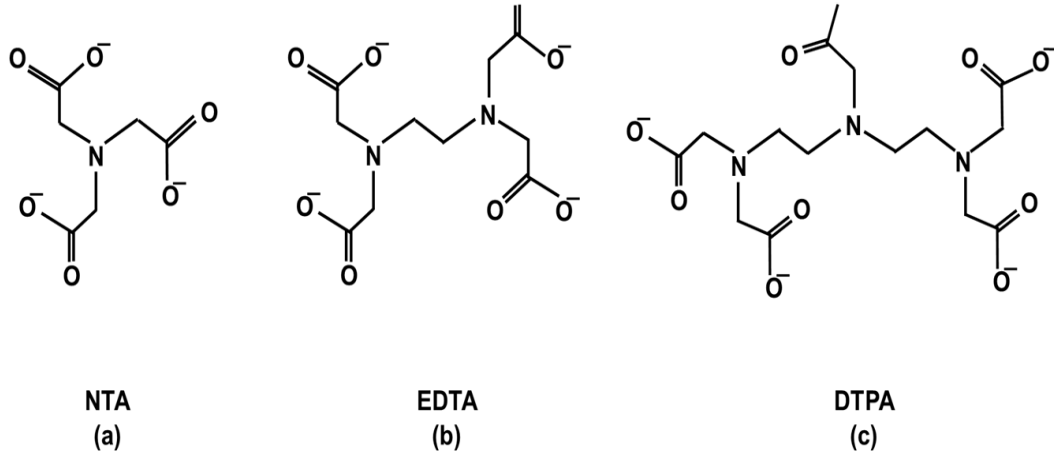
### 2.4. Çinko Şelatlayıcı Ajanlar

#### DTPA

Aminokarboksilat şelasyon ajanları metallerle olan etkileşimleri, hareketleri ve çevredeki dayanıklılıkları sayesinde önemli sayılmaktadır. Etilendiamintetraasetik asit (EDTA), dietilentriaminpentaasetik asit (DTPA) ve etilendiamin-N,N'-disüksinik asit



(EDDS) gibi aminokarboksilatların Fe(III) ve Bakır(II) ile kompleksleri çok hızlı fotodegradasyona uğrarlar (Nowack, 2002). Şekil 2’de nitrilotriasetik asit (NTA), EDTA ve DTPA yapıları görülmektedir.



**Şekil 2.** Aminopolikarboksilik şelasyon ajanlarının moleküler yapıları (soldan sağa sırasıyla) (a) NTA (b) EDTA (c) DTPA (Eivazihollagh, Edlund, Norgren, ve Bäckström, 2018)

DTPA ve EDTA güçlü metal kompleks oluşturma yeteneğine sahip olmalarıyla bilinmektedir (Metsärinne, Rantanen, Aksela, ve Tuhkanen, 2004). Her biri bağımsız olarak var olabilen iki ya da daha fazla türün birleşmesiyle oluşan yapıya kompleks yapı, bu türlerden birinin metal iyonu olması durumunda metal kompleksi adını almaktadır (Eivazihollagh ve diğerleri., 2018). Burada merkezi metal atomu, ligandların koordine edici atomlarına bağlıdır ve bazı ligandlar birden fazla atomla koordine olup heterosiklik bir halka oluşturmaktadır. Ligand burada şelatlama maddesi olarak bilinmektedir (Dwyer ve Mellor, 1964).

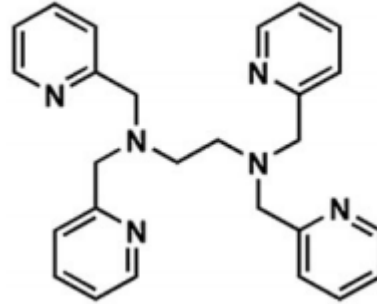
DTPA, beş karboksimetil grubu ile dietilentriamin omurga yapısını içeren organik bir maddedir ve hücre membranından geçemeyen bir yapıya sahiptir (Mashayekhi ve diğerleri., 2013). Bakır, çinko, demir gibi metal katyonlarla yüksek afinite sağlayarak kompleksler oluşturmaktadır. DTPA iyi bilinen bir şelasyon ve birçok radyoaktif ve zehirler için dekontaminasyon ajanıdır (Kamboj ve diğerleri., 2011). DTPA’nın en büyük dezavantajı, hücreler tarafından DTPA alımını artırmak için hücre alımını azaltılmasıdır (Haririan ve diğerleri., 2010). Bunun için farklı türevler sentezlenir ve kompleksler hücre alımını artırmak için kullanılmaktadır (Ardestani ve diğerleri., 2011). DTPA miktarının

belirlenmesinde HPLC ve diğer kromatografik yöntemler vardır fakat bunlar uzun zaman alan ve maliyetli çalışmalardır.

## TPEN

Bir diğer çinko şelatörü olan hücre membranından geçebilen TPEN (Şekil 3), apoptotik yollarla hücre canlılığını azaltmaktadır (Makhov ve diğerleri., 2008). Daha önceden yapılan bir çalışmada farklı ajanlar tarafından apoptozu indüklediği belirtilmiştir (Hashemi ve diğerleri, 2007a). TPEN, *in vitro* kanser hücreleri için sitotoksik olmasına rağmen, farelerde sistemik olarak uygulandığında bazen ölümcül olan nörotoksositeye de neden olabilmektedir (Stuart ve diğerleri., 2016).

Reaktif oksijen türlerinin detoksifikasyonunun düzensizliği TPEN için olası bir mekanizmadır (Stuart ve diğerleri., 2016). Aynı zamanda mitokondrial membran potansiyelini azaltır ve meme kanseri, lösemi gibi hücre hatlarında süperoksit konsantrasyonlarını artırmaktadır (Mendivil-Perez ve diğerleri, 2012).



Şekil 3. TPEN'in moleküler yapısı (Huang ve diğerleri., 2017)

## 2.5. İlaç Taşıma Sisteminde/Kanser Çalışmalarında Nanoenkapsülasyon

Nanoenkapsülasyon, katı, sıvı, gaz nanopartiküllerinin paketlenme teknolojisi olarak tanımlanmaktadır. Çekirdek, ikincil bir materyal (matriks veya kabuk) içeriğiyle bir nanokapsül oluşturmasıyla bilinir. Çekirdek kısmı ilaç, biyositler, vitaminler gibi aktif bileşenleri içerir, kabuk kısmı dış çevreyi izole eder ve korur. Bu koruma kalıcı veya geçici olabilir (Cano-sarabia ve Maspoeh, 2015).

Çok çeşitli nanosistemler, biyoaktif bileşenlerin fonksiyonlarını geliştirir ve yeni yapılar meydana getirir. Bunlar, nanolipozomlar, nanoemülsiyon, nanofiber ve farklı kaynakların nanokapsülleri olarak örneklendirilebilir. Sadece gıda alanında değil

mühendislik materyalleri de gıda ürünlerinde kullanılır. Tasarlanmış nanomateryaller gümüş, demir, titanyum dioksit, kalsiyum, magnezyum, selenyum ve silikat olarak örneklendirilebilir ve gıda paketlenmesinde önemli rol oynamaktadırlar (Sharma ve diğerleri, 2017). Nanogümüş, antimikrobiyal aktiviteye sahip olup gıda paketlemesinde kullanılmaktadır (Bhupinder, 2010). Amorf nanosilika, gıdaların yüzeyle temaslarında ve gıda paketlemesinde etkilidir. Nanoselenyum ise yeşil çaylarda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır (Bhupinder, 2010). Enkapsülasyon özellikle eczacılık ve gıda alanında sabit bir artış kazanmaktadır (Magdalena ve diğerleri, 2018).

Nanokapsüller 1 ila 1000 nm aralığında olabilirler. Hazırladıkları materyal ve metodlara bağlı olarak farklı şekillerde olabilmektedirler (Cano-sarabia ve Maspoch, 2015). Nanoenkapsülasyonda polimerler kullanılmaktadır. Toksik olmamaları ve biyoyumlu olmalarından dolayı enkapsülasyonda tercih edilmektedir (Ghosh, 2000). Kitosan, jelatin, sodyum aljinat ve albümin enkapsülasyonda kullanılan doğal polimerlerdir. Polilaktidler (PLA), Poliglükolat (PGA) ve polilaktid ko-glükolat (PLGA), polianhidritler, poli glutamik asit ve poliortoesterler, enkapsülasyonda kullanılan bazı sentetik polimerlerdir (Nagavarma ve diğerleri, 2012).

Polimerik nanopartiküllerin birçok avantajı bulunmaktadır. Farklı yöntemlerle kolay ve ucuza imal edilen uçucu farmasötik maddenin stabilitesini artırma, hedefli bölgeye yüksek konsantrasyonda madde sağlama ve polimerik nanopartiküllerin ilaç salınımını değiştirme yeteneği sayesinde kanser, aşı gibi alanlarda önemli bir hale gelmiştir (Kayser ve diğerleri, 2016).

Nanoenkapsülasyon da aktif farmasötik ilaçlar degradasyondan korunur. Aynı zamanda yüzey kaplama ya da konjügasyonla hedefli ilaç dağıtımına yardımcı olmaktadır. Yüzey yükündeki değişiklik sayesinde hücre girişi sağlanabilmektedir. Uzun sirkülasyon süresi için PEGilasyon gerçekleştirir (Suganya ve Anuradha, 2017).

Birçok farklı materyal enkapsüle edilebilir. Bunlar; proteinler (lesitin, albümin), polisakkaritler (nişasta, dekstrin), yağlar, lipozomlar ve biyopolimerler olarak örneklendirilebilir. Gıda, eczacılık, tarım, tekstil gibi birçok alanda nanoenkapsülasyon uygulamaları mevcuttur (Cano-sarabia ve Maspoch, 2015).

Proteinler, nükleik asitler, antikarsinogenik ve diğer ilaçlar gibi terapötik ajanlar düşük biyoyararlanım, yüksek toksisite gibi olumsuz özelliklere sahiptir (Li ve diğerleri., 2015). Terapötik ajanların nanoenkapsülasyonları, bu ajanların etkilerini, özgüllüklerini ve

hedefleme yeteneklerini artırır. Nanotaşıyıcılar taşıma kapasitelerini biyolojik çevredeki erken degradasyondan korurlar. Birçok farklı metolla bu nanotaşıyıcılar elde edilmektedir. Sentetik metodların seçilmesi, terapötik ajanın kimyasal yapısı, uygulamanın türü ve vücutta kalma süresine bağlıdır. Nanotaşıyıcıların boyutları hücreye alım ve biyolojik bariyere karşı nüfuz etmesinin kararı açısından önemlidir. *In vivo* çalışmaların belirlenmesinde yüzey kimyası ve boyutu öne çıkan özelliklerdendir (Kumari, ve diğerleri., 2014).

Konvensiyonel nanotaşıyıcılar, mononükleer fagositik sistem tarafından vücuttan temizlenirler. Bu sistem nanotaşıyıcıları yabancı parçacık olarak tanır ve sistemik dolaşımdan hızla uzaklaştırır (Kumari ve diğerleri., 2014). Geleneksel ilaç taşıma sistemleri düşük verimlilik göstermelerinden dolayı daha gelişmiş ilaç taşıyıcı sistemler üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Terapötik ajanların vücuttaki spesifik hastalık bölgelerinde birikmesine yardımcı olmak için lipozomal ilaç verme sistemleri gibi lipit bazlı yapılar araştırılmıştır (Tila ve diğerleri., 2015). Lipozomlar dahil olmak üzere nanopartikül bazlı ilaç dağıtım sistemleri, antikanser ilaçların tümörlere hedeflenmesine yardımcı olmaktadır. Antikanser ilaçların lipozomlarda kapsüllenmesi, antitümör etkinliğini artırarak ve yan etkilerini azaltarak terapötik yaklaşımı iyileştirmektedir (Hamano ve diğerleri., 2013). Farmasötik, biyofarmasötik ve aşular gibi bir çok ilacın terapötik sonuçlarını geliştirmeye yarayan lipozomlar, aynı zamanda doğal hücrelere benzer çift katmanlı küresel yapıları sayesinde ilaçları hem sulu çekirdek kısma hem de lipidik çift tabakalarına dahil edebilirler (Dimov, ve diğerleri., 2017).

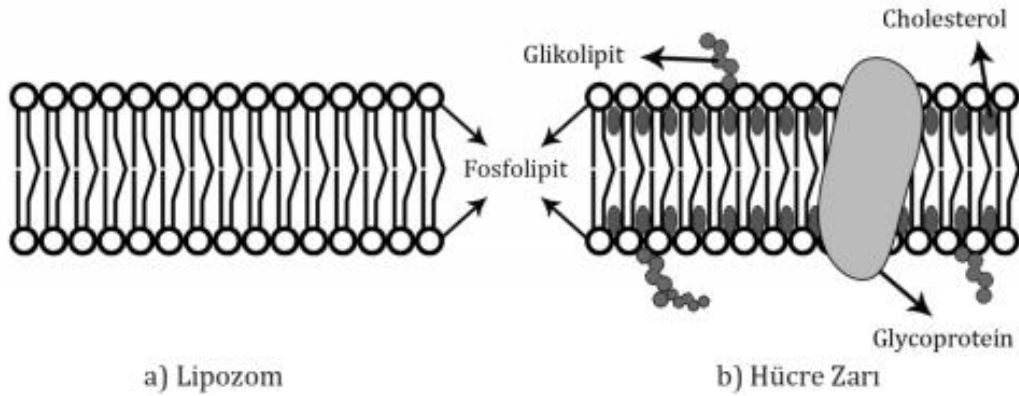
## **2.6. Hücre Membranı ve Özellikleri**

Hücre zarı, hücreleri koruyan ve onları düzenleyen bir yapı olarak tanımlanmaktadır. Tüm hücrelerde, hücreye sadece herhangi bir maddenin girişinden değil aynı zamanda maddenin ne kadarının hücre içine girdiğini de düzenleyen bir dış plazma membranı bulunmaktadır. Prokaryotik hücrelerin aksine ökaryotik hücrelerde organelleri çevreleyen bir iç zar mevcuttur (Augustyn ve diğerleri,2019).

Hücre zarları, gliserofosfolipit, gliserol, bir fosfat grubu ve iki yağ asidi zincirlerinden oluşan moleküllerden meydana gelmektedir. Hücresel zarın ana bileşenleri olan fosfolipitler amfifilik yapıya sahiptir (Li ve diğerleri., 2015). Sulu ortama girdiklerinde, fosfolipitlerin kendiliğinden birleşmesiyle farklı süper moleküller meydana getirmektedir (Li ve diğerleri., 2015). Suda çözünmeyen yapıya sahip gliserofosfolipitler hücre zarında en fazla bulunan lipidlerdir. Hidrofilik fosfat başlıkları ve hidrofobik hidrokarbon kuyruklarına sahip çift

tarafli yapıdadırlar. Şekil 4'te lipozom (a) ve hücre membranının yapısı (b) arasındaki benzerlik gösterilmektedir. Lipozomlar fosfolipit tabakalarından oluşmakta, hücre zarında ise glikolipit, kolesterol, glikoprotein bulunmaktadır (Şekil 4).

Hücre zarında gliserofosfolipitlerden daha az bulunan kolesterol molekülleri, zarın sertliğini düzenleme de rol oynarlar (Briuglia ve diğerleri, 2015). Lipitlerle birlikte hücre zarında bol miktarda protein de bulunmaktadır. Hücre zarının yapısının yarısı lipitler, yarısı da proteinlerden oluşmaktadır (Augustyn ve diğerleri., 2019).

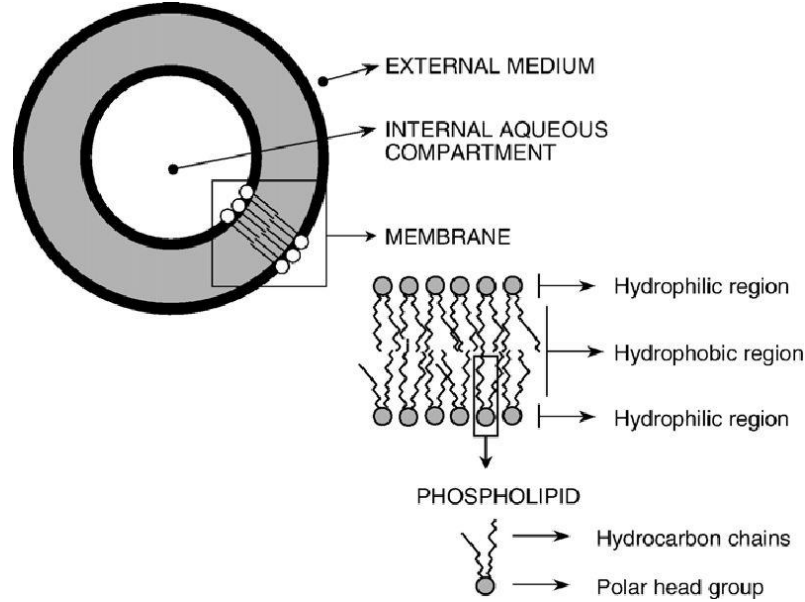


Şekil 4. Lipozom (a) ve hücre zarının (b) yapılarının benzerliği  
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9898/>)

## 2.7. Lipozom

Lipozomlar kolesterol ve fosfolipitlerden meydana gelen küçük küresel veziküllerdir. (Akbarzadeh ve diğerleri, 2013). Hidrofobik ve hidrofilik yapıları sayesinde ilaç taşıma sisteminde önemli rol oynamaktadırlar (Akbarzadeh ve diğerleri., 2013). Lipitler, baş kısmı polar kuyruk kısmı yağ asitleri içeren apolar yapıya sahiptir (Silverstein ve Williamson, 2019). Fosfolipitler, biyolojik zarları oluşturmalarının yanı sıra lipozomların ana yapı taşları olarak da bilinmektedirler. Suda çözünen hidroksi grupları ve çözünmeyen omurgadan oluşan amfifilik moleküllerdir. Çift yüklü ya da yüksüz olabilmektedir. (Olusanya, 2018). Lipit molekülleri, su moleküllerini çeken hidrofilik baş kısmına, su moleküllerini iten hidrofobik yapıda hidrakerbon kuyruk kısmına sahiptir (Caldeira ve diğerleri, 2013). Lipozomal formülasyonlarda kullanılan en bilinen lipitler fosfatidilkolin (çift yüklü), fosfatidilgliserol (negatif yüklü), fosfatidik asit, fosfatidiletanolamin (zwitteriyonik) ve fosfatidilserindir (negatif yüklü) (Olusanya, 2018). Fosfolipitler dışında lipozomlar kolesterol ve polietilen glikol (PEG) de içermektedir (Olusanya, 2018). Şekil 5'de

görüldüğü üzere lipozomlar küre şeklinde olup birçok lipit tabakası ve sıvı bileşenlerden meydana gelmektedir (Şekil 5).



**Şekil 5.** Lipozomun basit yapısı ve kompozisyonları (Caldeira ve diğerleri., 2013).

Kolesterol, lipozomların diğer bir önemli bileşenidir. Kolesterol, lipit zincirleri arasındaki etkileşimi inhibe ederek stabilite sağlar (Lee ve diğerleri, 2005). Ticari satılan Doxil®, Marqibo®, DaunoXome®, AmBisome® gibi lipozomal anti-kanserojenik ilaçlar da bulunmaktadır (Kapoor ve diğerleri, 2017). PEG molekülleri, su benzeri yapıları taklit ederek lipozomlara gizli bir etki sağlar ve böylece hızlı lipozom temizlenmesine yardımcı olan mononükleer fagositik sistem tarafından tanınmayı önler (Kapoor ve diğerleri., 2017). Uygun büyüklükte lipozom partiküllerine PEG kaplamasına bağlı uzun sirkülasyon, katı tümör bölgelerinde ilaç birikimi olasılığını artırır (Maeda, 2012).

Lipozomların özellikleri, lipit bileşenleri, yüzey yükleri, boyutları ve hazırlanma metotlarına göre farklılık göstermektedir. Örneğin, doğal kaynaklardan elde edilen doymamış fosfatidilkolin türleri çok daha kalıcı ve daha az dayanıklı iken, uzun açıl zincirlerine sahip doymuş fosfolipitler sert bir tabaka oluşturur (Akbarzadeh ve diğerleri., 2013).

Nanotaşıyıcıların yüzeyleri, ilacın hedeflenen bölgeye verilmesi ve hedefleme yeteneğinin artırılması için değiştirilir. Bu modifikasyon ligandın etiketlenmesi ya da hidrofilik polimerler ile gerçekleştirilir (Kumari ve diğerleri., 2014).

Yüzey yükü hücresel cevabın verilmesi için nanotaşıyıcılar açısından bir diğer önemli özelliktir. Katyonik yüke sahip nanotaşıyıcılar, negatif yükleri etkili bir şekilde alırlar (Kumari ve diğerleri., 2014).

Lipozomların hücreye alımı endositoz yolla gerçekleşmektedir. Ligand reseptörler ya da hücrenin ekstrasellüler matriksi sayesinde lipozomun yüzeyine tutunmaktadır (Kumari ve diğerleri., 2014).

Lipozomların birçok avantajı mevcuttur. Bunlar ilaçların terapötik etkisini artırma, enkapsülasyon aracılığıyla dayanıklılık sağlama, biyouyumlu olma, toksik özellikte olmama ve toksik ilaçlara karşı hassas dokuların zararının azaltılması olarak örneklendirilmektedir (Akbarzadeh ve diğerleri., 2013).

Lipozomların düşük çözünürlük, kısa yarılanma ömrü, fosfolipitlerin oksidasyona uğraması gibi dezavantajları da bulunmaktadır (Akbarzadeh ve diğerleri., 2013).

## **2.8. Lipozomların Sınıflandırılması**

Lipozomların boyutları, 0,025-2,5 µm aralığında olabilmektedir (Akbarzadeh ve diğerleri., 2013). Birkaç katmadan da oluşabilen lipozomların yarı ömrünün belirlenmesinde vezikül boyutu önemlidir. Tabakanın sayısı ve boyutu lipozomlardaki ilaç enkapsülasyonunun miktarını etkiler (Akbarzadeh ve diğerleri., 2013). Boyutlarına ve morfolojilerine göre lipozomlar 3 gruba ayrılmaktadır. Bunlar çok lamelli (katmanlı) veziküller (MLV), büyük tek lamelli lipozomlar (LUV) ve küçük tek lamelli veziküller (SUV) olarak sınıflandırılabilir (Rudokas ve diğerleri, 2016) (Şekil 6).

Çok katmanlı lipozomlar, genellikle 0,1–20 µm boyutları arasındadır (Rudokas ve diğerleri., 2016). Kolesterol içeren ya da içermeyen fosfolipid bileşenlerinin, kloroform metanol içinde çözülmesi ve ardından döner buharlaştırıcı yardımıyla organik çözücülerin uzaklaşması işlemine dayalı ince film hidrasyon metoduyla yapılmaktadır (Rudokas ve diğerleri., 2016).

Büyük tek katmanlı lipozomlar, 100 nm'den daha büyük boyutlarda elde edilen lipozomlar iken küçük tek katmanlı lipozomlar 20 ila 100 nm boyutları aralığında olabilmektedir (Laouini ve diğerleri., 2012).

### 2.8.1. Lipozomların Stabilitesi

Lipozomların boyut dağılımı, hapsetme verimliliği ve lipozomal aparat (araç) ların minimum degradasyonu açısından fiziksel ve kimyasal stabilitesi bu sistemi kullanarak ilaç iletimi için önemli bir kısımdır (Olusanya, 2018). Lipozomların kimyasal bozunması, yağ asitleri-gliserol arasındaki ester bağın hidrolizi ve herhangi bir doymamış açil zincirinin peroksidasyonu sonucu meydana gelmektedir. Bunlar kısa zincirli lipitlerin gelişmesine, membranda lipozomal sistemin kalitesini ve stabilitesini önemli ölçüde azaltacak çözünebilir türevlerin ortaya çıkmasına neden olabilmektedir (Yadav ve diğerleri, 2011).

Fiziksel degradasyon ise, lipozomların küresel boyutu değişebilmekte ve kapsüllenen aktif farmasötik ilacın kaybına neden olabilmektedir. Lipozomların raf ömrünü etkileyen agregasyon/flokülasyon ve füzyona uğrayabilmektedir (Briuglia ve diğerleri., 2015). Agregasyon, ayrı ayrı olan lipozomlardan daha büyük lipozom oluşumu olarak tanımlanmaktadır (Yadav ve diğerleri., 2011).

Lipozomların biyolojik stabilitesi ise deneğe uygulandığında lipozomlar ile etkileşime giren proteinler gibi ajanların varlığına bağlıdır. *In vivo* lipozom aracılı ilaç dağıtım ve kan dolaşım süresini artırma biyolojik lipozom stabilitesini artırmak için önemlidir (Simões ve diğerleri, 2004).

Sulu lipozom dispersiyonlarında, kapsüllemiş ilaç fosfolipit çift tabakalarından sızabilmektedir. Bu yüzden bazı çalışmalarda lipozomal formülasyonları stabilize etmek için liyofilizasyon, püskürtmeyle kurutma ve süper kritik akışkan gibi yöntemler kullanıldığı bilinmektedir (Karn ve diğerleri, 2013; Patil-Gadheve diğerleri, 2014; Lball ve diğerleri, 2017).

Lipozomal sistem stabilitesini etkileyen bir çok faktör mevcuttur. Örneğin yüksek faz geçiş sıcaklığına sahip fosfolipid-lipid bileşimleri, yağ asidi yan zincirleri, polar baş kısım, zincir uzunluğu, doymamışlık derecesi bunlara örnek verilebilir (Čeh ve Lasic, 1997).

### 2.8.2. Lipozom Karakterizasyonu

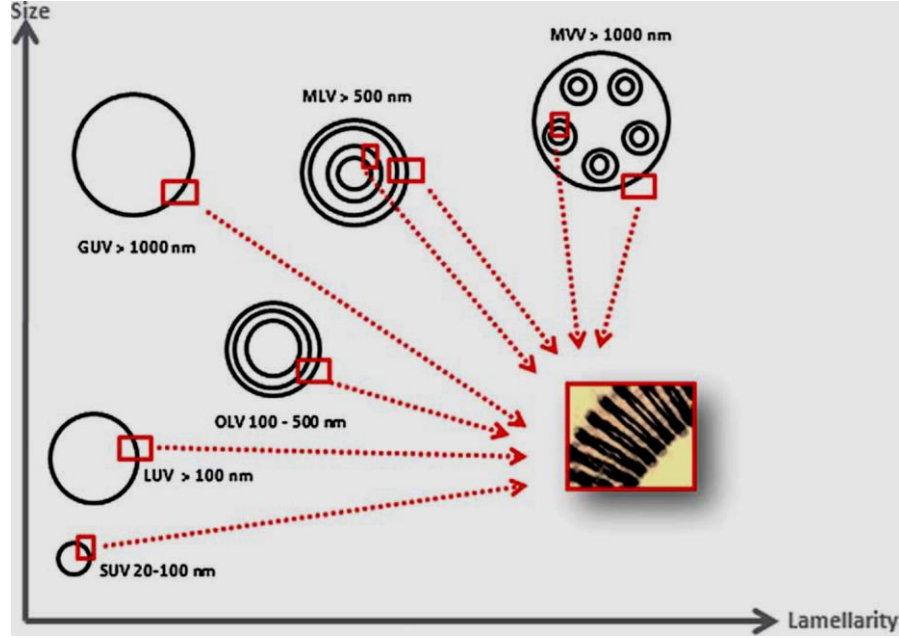
#### Boyut Analizi

Lipozomların ortalama boyutu ve dağılımı terapötik kullanımındaki yeri için önemli bir parametredir.

Elektron mikroskopunda negatif boyama, geçirimli elektron mikroskobu (TEM), cryo elektron mikroskobu (EM) gibi çeşitli yöntemlerle lipozom morfolojisinin verimi ve farklı



boyutlarda oluşumlarıyla ilgili bilgiler sağlanmaktadır. Bu tekniklerde bazı yapı olarak uygun olmayan lipozomlar, büzüşmeler ve zamandan kayıp olduğu için son yıllarda mikroskopik teknik olarak bilinen atomik kuvvet mikroskopisi (AFM) geliştirilmiştir (Laouini ve diğerleri., 2012).



**Şekil 6.** Boyut ve katmana göre lipozomların sınıflandırılması (SUV: 20-100 nm boyutlu ve tek katmanlı, LUV: 100 nm'den büyük ve tek katmanlı, GUV: 1000 nm'den büyük ve tek katmanlı, OLV: 100-500 nm boyutları ve birden fazla katmanlı, MLV: 500 nm'den büyük ve çok katmanlı, MV: 1000 nm'den büyük lipozomları ifade etmektedir (Laouini ve diğerleri., 2012).

AFM, yaklaşık 0,1 nm'de boyut çözünürlüğünü taramalı olarak ölçmektedir. Sonuçta 3 boyutlu yüksek çözünürlükte görüntüler elde edilmektedir. Burada lipozomun doğal formunda bir değişiklik olmamaktadır. Yüzeyinin hareketsiz olması örneği olumsuz etkilememektedir. Proben kuvveti veziküllere bir zarar vermemektedir (Laouini ve diğerleri., 2012).

### Zeta Potansiyeli

Katı, sıvı ve gazlardan herhangi birinin diğerinin içinde dağılmasıyla kolloid sistemler meydana gelmektedir. Ve bunlar sulu ortamda dağıldıklarında elektrik yükü taşırlar. Birçok önemli mekanizma vardır. Bunlar; yüzey gruplarının iyonizasyonu, yüklü türlerin adsorpsiyonu olarak sınıflandırılabilir (Laouini ve diğerleri., 2012).

Zeta potansiyeli, hareketli parçacıkların elektrik çift tabakası ile kayma düzleminde bunların etrafındaki dağıtıcı tabakası arasındaki potansiyel farkı ifade etmektedir (Ahmed ve diğerleri, 2019). Zeta potansiyeli parçacıklardaki yüzey yükünü göstermektedir (Grumezescu, 2016).

Partikül yüzey şarj değeri nanosüspansiyon stabilitesini yansıtmaktadır (Agrawal ve Patel, 2011). Zeta potansiyelini ölçmek için bir elektrik alanı uygulanır ve parçacıkların elektroforetik hareketliliği gelen lazerin saçılmasına bağlı olarak ölçülmektedir (Ahmed ve diğerleri., 2019). Birçok faktör zeta potansiyel değerini etkilemektedir. Bunlar; pH, iyonik kuvvet, parçacık konsantrasyonu olarak örneklendirilebilir (Bhattacharjee, 2016). Bunun yanında lipozomların fosfolipit bileşimi (pozitif ve negatif yüklü fosfolipitler), lipozomun toplam yüzey yükünü etkileyen ana faktörlerden biridir (Li ve diğerleri., 2015).

Partikülün zeta potansiyeli tüm yüklerle ilişkilendirilen fiziksel bir özelliktir. Zeta potansiyel ölçümü koloidal sistemin dayanıklılığının tahmininde kullanılır. Eğer süspansiyondaki tüm partiküller geniş negatif ve pozitif zeta potansiyel içeriyorsa birbirinden ayrılmaya eğilimlidirler ve agregasyon oluşumu gözlenmez (Laouini ve diğerleri., 2012).

Zeta potansiyeli ölçülürken, ışık kaynağı olarak lazer kullanılır. Lazer ışınları örneğin merkezinden geçer ve 13 derece açıyla saçılır. Hücreye elektrik alan uygulandığında saçılan ışık dalgalanır ve partikül hızıyla doğru orantılı olarak hacim ölçülür. Partikül süspansiyonunun zeta potansiyeli  $>+30\text{mV}$  ya da  $<-30\text{mV}$  aralıklarında normal olarak değerlendirilmektedir (Laouini ve diğerleri., 2012).

Dinamik Işık Saçılımı (DLS), foton korelasyon spektroskopisi (Digman ve Gratton, 2011) veya kuasielastik ışık saçılımı (Dzakpasu ve Axelrod, 2004) olarak da bilinmektedir. Bu teknik asılı partikül ve solvent molekülleri arasındaki Brownian hareketine maruz kalarak partiküller tarafından saçılan ışığın yoğunluğu ile zamanın bir fonksiyonu olarak nitelendirilebilmektedir. Tekrarlanabilir, doğru ve güvenilir boyut analizi, yüksek konsantrasyon ve bulanık numunelerin doğrudan ölçülebilmesine yardımcı olmaktadır. Aynı zamanda düşük numune hacmi ile çok küçük boyutlu ölçümler yapabilmektedir (Kaszuba ve diğerleri, 2008).

Polidispersite İndeksi (PI)

Bir numunenin boyuta bağılı olarak heterojenliğinin belirlenmesi olarak tanımlanmaktadır. Örneğin aglomerasyonu nedeniyle oluşabilen polidispersite dinamik ışık saçılımı kullanan cihazlar ile ölçülmektedir. Uluslararası Standart Örgütü'ne göre, PI değeri  $< 0,05$  monodispers örneklerin daha yaygın olduğunu belirtirken  $>0,7$  değerinin daha geniş boyutlu partikül dağılımının olduğunu belirtmişlerdir (Mudalige ve diğerleri., 2018).

Terapötik bileşiklerin etkinliği ve güvenliği hedef dokuya yetersiz ilaç iletimi veya sağlıklı doku ve organlarda önemli toksisiteler gibi istenmeyen yan etkilerle sınırlıdır. Bu durumda lipidik nano taşıyıcılar içine kapsüllenen ilaçların minimum yan etki maksimum biyoyararlanım sağlayacağı düşünülmektedir (Danaei ve diğerleri., 2018).

### Enkapsülasyon Verimliliği

Lipozom hazırlığı kapsüllenen ve kapsüllemeyen ilaçlardan oluşmaktadır. Enkapsülasyon verimliliğinin belirlenmesi için kapsüllemiş ilaç ve serbest ilaç arasındaki fark önemli bir noktadır. Bunun belirlenmesinde mini kolon santrifüjü kullanılmaktadır. Bu, ilaç yüklü lipozomların serbest ilaç ile arasındaki boyut farkına dayalı olan bir ayırma yöntemidir (Laouini ve diğerleri., 2012).

Serbest ilacın kapsüllenen ilaçtan ayrılması diyaliz membranının kullanılmasıyla da gerçekleşebilir. Bu yöntemde, lipozom 2 saat süreyle tampon çözeltisine karşı diyaliz edilir (Berger ve diğerleri, 2001). Ultrasantrifügasyon tekniği ile de ilaç yüklü lipozomlar  $4^{\circ}\text{C}$ 'de 50 dakika 50000 rpm'de santifüjlenerek ayırma işlemi gerçekleştirilmektedir (Laouini ve diğerleri, 2011).

İlaç yüklü lipozomlar ortamlarından (medyumlarından) ayrıldıktan sonra lipid çift katman, metanol ya da Triton X-100 ile bozulmakta ve daha sonra salınan materyal ölçülmektedir (Laouini ve diğerleri., 2012). Kapsülleme verimliliğinin belirlenmesinde spektrofotometri, floresans spektroskopisi, enzim bazlı yöntemler, HPLC gibi yöntemler kullanılmaktadır (Laouini ve diğerleri., 2012).

## 2.9. Lipozomların Terapötik Uygulamaları

Lipozomlar sürekli ve kontrollü ilaç salınımı yaparak ve ilaç çözünürlüğünü geliştirerek ilaç ve protein taşınımında bir araç olarak görev almaktadır. Antifungal, antimikrobiyal ve antiviral terapide kullanılmaktadır. Tümör terapisinde küçük sitotoksik molekülleri taşıma da rol oynamaktadırlar. Enzimi bağlama, biyoreaktör teknolojisinde

kullanılmaktadırlar. Radyofarmasötik ve radyodiagnostik taşıyıcı olarak görevleri de bulunmaktadır (Mansoori ve diğerleri, 2012).

## **2.10. Lipozomlara İlaç Yükleme**

İlaç yükleme pasif ve aktif yükleme olmak üzere 2'ye ayrılmaktadır. Pasif yükleme, farklı prensipler üzerinde çalışan mekanik ayrılma, solvent ayırma ve deterjan çözündürülmesini içermektedir (Yadav ve diğerleri., 2011). İlacı kapsüllemek için kullanılan bu yöntemde, hidrofilik ilaçlar, ince lipit film ile karıştırılıp lipozomun çekirdeğine yüklenmektedir. Lipofilik ilaçlar ise, lipit film hazırlanırken diğer lipozom bileşenleriyle karıştırılarak lipozoma yüklenmektedir (Pandey ve diğerleri, 2016). Lipozomla enkapsüle edilemeyen ilaç molekülleri diyaliz veya jel filtrasyon yöntemiyle uzaklaştırılmaktadır (Tyagi ve diğerleri, 2013).

Aktif yükleme de ise pH gradiyentini ve lipozomal membranlar arasındaki potansiyel farkı kullanarak ilaç moleküllerini önceden oluşturulmuş veziküllere yüklenir (Yadav ve diğerleri., 2011). Aktif yükleme, bazı zayıf asidik veya alkali ilaçların yüklenmesi lipit çift katman boyunca tampon kullanılarak oluşturulan iyon gradyanları tarafından elektrokimyasal potansiyele bağlı olarak yapılmaktadır (Bozzuto ve Molinari, 2015). Lipozomların pH değeri farklı bir pH değerine sahip tampon kullanılarak değiştirilebileceği gibi diyalizle iyon konsantrasyonu veya boyut kromatografisi ile değiştirilmektedir. Oluşturulan bu pH gradyanının ardından, ilaç lipitlerin faz geçiş sıcaklığının üzerindeki bir sıcaklıkta lipozomlarla karıştırılır ve ilaç molekülleri lipozom iyonlarıyla etkileşime girerek yüklenme gerçekleşir. Yüklenen ilaç molekülleri lipozom içine hapsolmuş bir şekilde kalır (Pandey ve diğerleri., 2016).

## **2.11. Lipozom Sentezleme Metodları**

Lipozom yapımında kullanılan 5 farklı metod vardır. Bunlar mekanik, çözgen ayırma ve füzyon ya da boyut transformasyon olarak sıralanabilir.

### **Mekanik Metodlar**

İnce film hidrasyon metodunda lipit organik çözgen olarak kloroform ya da kloroform metanol karışımı içinde çözündürülerek hazırlanır. Organik çözgen film kalıntısından vakum altında uzaklaştırılır. Daha sonra lipit üzerine sıvı tampon eklenir ve lipitler aniden şişer ve lipozomları oluşturur (Ahmed ve diğerleri., 2019).

## Solvent Ayırma Metodları

Eter enjeksiyon metodu, lipitlerin dietil eter ya da metanol eter karışımında çözüldürülmesi tekniğidir. Bu karışım düşük basınç altında ya da 55-65 °C sıvı forma yavaş bir şekilde enjekte edilir. Burada önemli olan homojen veziküller oluşmasıdır (Ahmed ve diğerleri, 2019).

Etanol enjeksiyon metodu, fosfolipit ve kolesterolün çözünmesinde etanol kullanılması tekniğidir. Şırınga yardımıyla belli bir hacimdeki sıvı solüsyona karışım altında enjekte edilir ve lipozomlar sıvı fazla temas ettiğinde aniden lipozom oluşumları görülür (Ahmed ve diğerleri, 2019). Oda sıcaklığında 15 dakika boyunca bu işlem gerçekleştirilir. Hızlı, basit ve üretilebilirliğinden dolayı avantajları fazla bir tekniktir. Oksidasyona ve degradasyona neden olmamaktadır. Ekstrüzyon ve sonikasyon kullanmadan küçük tek katmanlı veziküllerin oluşmasını sağlar (Charcosset ve diğerleri, 2015).

## Füzyon ve Boyut Transformasyonu Metodu

Dondur-çöz ekstrüzyon metodu, lipozomal yapının tutma kapasitesinin artmasına olanak sağlar. Enkapsülasyon verimliliğinin artmasıyla ilişkilendirilir. Dondurma işlemi sırasında buz kristallerinin oluşumuyla fiziksel parçalanmayı ortaya çıkarır (Supaporn, 2011). Lipozomlar, film metodu ile hazırlanır ve oluşan veziküller ılık suda ve vortekslenerek dondurulur. Daha sonra iki dondur-çöz ve vorteks döngüsünden sonra üç kere ekstrüzyon uygulanır. 6 dondur-çöz ve 8 ekstrüzyon şeklinde işlem devam ettirilir (Ahmed ve diğerleri, 2019).

## Dehidrasyon ve Rehidrasyon Metodu

Makrolid ve aminoglikosid antibiyotik lipozomlarının düşük enkapsülasyon verimliliğine sahip olmasından dolayı bu yöntemle kapsülleme verimliliği, stabilitesi artırılabilir (Mugabe ve diğerleri, 2006). Küçük tek katmanlı veziküller içeren tamponun boşaltılması ve sulu çözelti içeren bileşiğin rehidrasyonundan sonra tekrar kurutulması işlemi gerçekleştirilmektedir. Bu da küçük formlarda katı lipit yayılımına neden olur. Sonucunda oligokatmanlı veziküller meydana gelmektedir (Gregoriadis ve diğerleri, 1990).

## Süperkritik Anti-Çözgen metodu

Fosfolipit materyallerinin homojen dağılım üretimi için kullanılan bir yöntemdir. Kolesterol ve diğer lipit maddeleri organik çözücülerde çözünmektedir. Kapiler tüpten CO<sub>2</sub> gazı geçirilir ve yüksek basınçta çökeltme meydana gelir. Ani sıcaklık ve basınç değişimiyle CO<sub>2</sub> gazı süperkritik faza dönüşür. Organik çözücü buharlaşır ve lipitler süperkritik fazdan ekstrakte edilir (Ahmed ve diğerleri, 2019).

Süperkritik fazda lipitler doygunluğa ulaşır ve lipitler çöker. Organik çözücü uygun lipitler elde edilene kadar CO<sub>2</sub> ilavesiyle uçurulmaya devam eder. Sonunda da sulu çözelti lipozom oluşumu için eklenir (Ahmed ve diğerleri, 2019).

## **2.12. Antikanser Terapide Lipozomlar**

Kanserin birinci basamak tedavisi katı tümörlerin cerrahi olarak çıkarılması, radyasyon tedavisi ve kemoterapidir. Tümör bölgesine sınırlı ilaç konsantrasyonu ulaştığı için, serbest ilacın sistemik uygulaması, kanser tedavisinde kemoterapinin temel sorunu olarak kabul edilir. Ek olarak kemoterapide kullanılan aktif farmasötik bileşenlerin çoğu, hem kanser hem de normal hücreler için oldukça sitotoksiktir (Olusanya, 2018).

## **2.13. Lipozomal Antikanser İlaç Formülasyonları**

Lipozomal formülasyonlar, geleneksel sitostatik ilaçların etkinliğini engellemeden toksik yan etkilerini azaltmayı amaçlamaktadır. Bu durum kapsüllenmiş ilacın sağlıklı dokuya ulaşmasının engellenmesi veya hedefli olarak neoplastik dokuya ilacın verilmesi şeklinde gerçekleşmektedir (Hofheinz ve diğerleri, 2005).

Lipozomal ilaç ürünleri iki ana bileşenden oluşmaktadır. Bunlar; ilaç molekülü ve ilaç molekülünü kapsülleyen, taşıyıcı görev gören lipozomdur. Ticari lipozomal ürünler iki ya da daha fazla fosfolipitten meydana gelir. Fosfolipitler dışında lipozomlar kolesterol ve polietilen glikol (PEG) de içermektedir. Kolesterol, lipit zincirleri arasındaki etkileşimi inhibe ederek stabilite sağlar. Ticari satılan Doxil®, Marqibo®, DaunoXome®, AmBisome® gibi lipozomal anti-kanserojenik ilaçlar da bulunmaktadır (Tablo 4). PEG molekülleri, su benzeri yapıları taklit ederek lipozomlara gizli bir etki sağlar ve böylece hızlı lipozom temizlenmesine yardımcı olan mononükleer fagositik sistem tarafından tanınmayı önler. Uygun büyüklükte lipozom partiküllerine sahip PEG kaplamasına bağlı uzun sirkülasyon, katı tümör bölgelerinde ilaç birikimi olasılığını artırır (Olusanya, 2018).

PEGillenmiş bir lipozomal formülasyon olan Doxil, AIDS hastalarında Kaposi sarkoma tedavisinde kullanılan ve FDA tarafından onaylanan ilk lipozomal ürün olarak bilinmektedir (Tablo 3) (Barenholz, 2012). Doxil ya da Caelyx bir antikanser ilaç olan doksorubisini kapsülleyen, Johnson ve Johnson tarafından ticarileştirilen PEGillenmiş lipozomal formülasyondur (Tablo 4) (Pandey ve diğerleri., 2016).

Daunorubisin, antikanser aktiviteye sahip antrasiklin bir antibiyotiktir ve lipozomal formülasyonu Daunoxome, AIDS ile ilişkili Kaposi sarkoma tedavisi için FDA tarafından 1996 yılında onaylanmıştır (Tablo 3) (Petre ve Dittmer, 2007; Cooley ve diğerleri, 2007).

Myocet, doksorubisinin PEGile olmayan lipozomal formülasyonudur (Pandey ve diğerleri., 2016). Siklofosfamid ile kombinasyonu Avrupa'da metastatik meme kanseri tedavisinde onaylanmıştır (Tablo 4) (Batist ve diğerleri., 2001).

Mitoksantron, genellikle lenfomalar, meme, prostat gibi çeşitli kanser türlerinin tedavisinde kullanılırken lenfoma ve göğüs kanseri tedavisine yönelik MXT lipozomları ileri evre kanserlerin tedavisinde kullanılmaktadır (Tablo 6).

Vinkristinin lipozomal formülasyonu olan Marqibo, akut lenfoblastik lösemi tedavisi için FDA tarafından onaylanan bir ilaçtır (Tablo 6) (Rodriguez ve diğerleri., 2009).

Taxol (paklitaksel), aşırı agresif HER2 pozitif metastatik meme kanseri tedavisinde kullanılmıştır (Tablo 3) (Baselga ve diğerleri., 2014). Paklitaksel dirençli over, meme ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, mide kanseri ve prostat kanseri gibi birçok kansere karşı antikanser aktiviteye sahiptir (Tablo 6) (Xu ve diğerleri., 2013).

Lipoplatin, cisplatinin lipozomal formülasyonudur ve küçük hücreli akciğer kanseri olan hastalar için kullanılmaktadır (Tablo 6) (Caldeira ve diğerleri., 2013).

Tretinoin, all-trans retinoik asit (ATRA) olarak da bilinen çeşitli kanser hücrelerine karşı anti-tümör ajandır (Cristiano ve diğerleri., 2017). Sistemik uygulamadan sonra cildin yanması, halsizlik gibi yan etkileri ve değişken bir biyoyararlanıma sahip olması nedeniyle alternatif bir farmasötik formülasyona ihtiyaç duyulmuş ve negatif yükle yüklenen ATRA lipozomları insan tiroid karsinom hücre hattı üzerinde araştırılmıştır (Olusanya, 2018).

**Tablo 3.** Kanser tedavisinde kullanılan lipozomal formülasyonları geliştirilen ilaçlar (Olusanya, 2018).

Aktif İlaç	Kanser Türü
Doksorubisin	Kolorektal ( <i>in vitro</i> ), Prostat ( <i>in vivo, in vitro</i> ), metastatik (klinik denemeler)
Daunorubisin	Kaposi sarkoma
Paklitaksel	Akciğer kanseri
İrinotekan	Pankreas duktal adenokarsinomu

**Tablo 4.** Onaylanmış lipozomal antikanser ajanlar (Hofheinz ve diğerleri., 2005).

Enkapsüle edilen ilaç	Etkisi	Durum
PLD (Doxil, Caelyx)	Over, meme kanseri	Onaylanmış
NPLD ( Myocet)	Meme kanseri	Onaylanmış
DNX (DaunoXome)	Kaposi sarkoma	Onaylanmış

**Tablo 5.** Yaygın kullanılan antikanser ajanların içeriği, hazırlanması ve uygulama alanları (Ahmed ve diğerleri, 2019)

Antikanser Ajan	Lipit bileşimi	Hazırlanma Metodu	Uygulamaları
Metotreksat	PC,CH, PEG2000-PE	Ters faz evaporasyonu, ince film hidrasyonu	Lenfoblastik hücre hattı K562 üremesinin azalması
Doksorubisin	DSPC, DSPE-PEG	Etanol enjeksiyon metodu	Uzun süre depolama ve yarı ömrünün uzun olması (PoP lipozom)
Doksorubisin	EPC, DOPE, PEG, Rodamin folik asit, transferin	Rotary Evaporasyon-Freeze- dry	İnsan servikal karsinoma da tümör büyümesinin engellenmesi



**Tablo 6.** Yaygın kullanılan lipozomal antikanser ajanlar ve etkileri (Hofheinz ve diğeri., 2005).

<b>Enkapsüle edilen ilaç</b>	<b>Etkisi</b>
Cisplatin (Lipoplatin)	Akciğer kanseri
Paklitaksel	Göğüs, akciğer, prostat kanseri
Mitoksantron	İleri evre kanserler
Pegile lipozomal cisplatin	İleri evre kanserler
İrinotekan	Kolorektal, akciğer kanseri
Topotekan	İleri evre kanserler
Vinkristin (Marqibo)	Akut lenfoblastik lösemi

#### **2.14. Lipozomların Hücresel Cevabı**

Lipozomların hücreye alımı endositoz yolla gerçekleşmektedir. Ligand reseptörler ya da hücrenin ekstrasellüler matriksi sayesinde lipozomun yüzeyine tutunur (Kumari ve diğeri., 2014). 2008'de yapılan bir çalışma da basit bir adhezyonla, PEGillenmiş ve konkanavalin membrana lipozomlarla aşılmıştır. Sade lipozom, lipit membrana spesifik olmayan bir yapışma durumu sergilemiştir. Bu lipozom lektinle birlikte aşılandığında membran etkisi arttırılmıştır (Bakowsky ve diğeri., 2008).

2007 de yapılan bir çalışmada, N-asetilglukozamin-lipozom konjugatı kalp kas hücrelerindeki etkileşimi arttırmıştır (Kumari ve diğeri., 2014).

#### **2.15. Literatür Taraması**

Çinko modülasyonunun apoptoza etkisi ve çinko şelatlayan DTPA üzerine yapılan çalışmalara bakacak olursak:

Kamboj ve diğeri., (2011) yaptığı bir çalışmada, DTPA'nın spektrofotometrik olarak topikal jel formülasyonunda inceleme yapmışlardır. 1 mg/ml DTPA stok çözeltisi 1 M NaOH içinde hazırlanmıştır. Bu stok çözelti 10 ml flask içinde 1 ml FeCl<sub>3</sub> (500 µg/ml) olacak şekilde 5-50 µg/ml konsantrasyonlar içeren tüpler halinde elde

edilmiştir. Tüp içeriğindeki hacmin tamamlanması için 0,1 N HCl kullanılmıştır. Bu sonuçlara göre, DTPA'nın demir(III) klorürle şelasyonunu gerçekleştirmiş ve grafik üzerinde belirli doz aralıklarını belirlemişlerdir. DTPA'nın  $\lambda_{max}$  değerini 272 nm'de bulmuşlardır. Lineer aralığın ise 5-50  $\mu\text{g/ml}$ 'de  $R^2$  değeri 0,9998 olarak belirtilmiştir. Aynı zamanda çalışmada deteksiyon limitinin (LOD) 0,8701  $\mu\text{g/ml}$ , miktar belirleme/nicelik sınırının (LOQ) 2,6366  $\mu\text{g/ml}$  olduğu çalışma sonucunda elde edilmiştir.

2004 yılında yapılan bir çalışmada, HT29/219 ve SW742 kolon kanseri hücreleri %10 fetal dana serumu, penisilin ve streptomisin içeren RPMI 1640 besiyeri içinde 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub> bulunduran kültür ortamında inkübe edilmiştir. Nötrofillerin sitozolünde bol miktarda bulunan bir protein kompleksi olan ve apoptozu indükleyen S100A8/A9 ve DTPA'nın bu hücre hatları üzerinde sitotoksik etkisinin değerlendirilmesi için MTT testi uygulanmıştır. Mililitrede  $1.5 \cdot 10^4$  hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu kültür plakalarına ekim yapıp 24 saat inkübe edilmiştir. Belli dozlarda belli zaman aralıklarında muamele yapılmıştır. Sonuç olarak S100A8/A9 veya DTPA ile tedavi de önemli ölçüde ölüme yol açtığı gözlemlenmiştir. Her iki hücre hattı da zaman ve dozlarda her iki maddeye karşı da farklılık göstermiştir. Aynı zamanda HT29/219 hücrelerinin S100A8/A9 ile muamelesi, 12 saat içinde 120  $\mu\text{g/ml}$ 'den daha yüksek konsantrasyonlarda hücre canlılığını önemli ölçüde düşürürken, 30 saatte 120  $\mu\text{g/ml}$ 'den yüksek konsantrasyonlarda %50 canlılık değeri belirlenmiştir. DTPA muamelesinde ise HT29/219 hücrelerinde 12 ve 24 saatte bir değişiklik gözlenmezken 36 saatte 40  $\mu\text{M}$ 'dan yüksek konsantrasyonlarda %50 canlılık değeri belirlenmiştir (Ghavami ve diğerleri., 2004).

SW742 hücreleri üzerinde ise S100A8/A9 ile muamele de tüm zaman aralıklarında önemli ölçüde hücre canlılığında azalma gözlemlenmiştir. 12 saatte 120  $\mu\text{g/ml}$ 'den yüksek konsantrasyonlarda %50 canlılık değeri belirlenmiştir. DTPA muamelesinde ise 36 saatte 60  $\mu\text{M}$ 'dan yüksek konsantrasyonlarda önemli ölçüde hücre ölümü olmuş fakat 20-100  $\mu\text{M}$  zaman aralığında DTPA için %50 canlılık değeri belirlenmemiştir (Ghavami ve diğerleri., 2004).

2007 yılında yapılan çalışmada, MCF-7 ve MDA-468 insan meme kanseri hücre hatlarında hücre içi ve hücre dışı çinko modülasyonunun apoptozu indüklediği bulunmuştur (Hashemi, Ghavami, Eshraghi, Booy, ve Los, 2007b). 0-100  $\mu\text{M}$  aralığında her iki hücre hattına da uygulanan DTPA konsantrasyonunun zamana bağlı olarak hücre apoptozu artırdığı gözlemlenmiştir. İki hücre hattında da hem zamana hem de doza bağlı hücre ölümünün olduğu gözlemlenmiştir. (Hashemi ve diğerleri., 2007b).

2014 yılında Mosayebnia ve arkadaşları vücuttaki fazla demirin toksik özellikte olmasıyla ilgili DTPA aracılığıyla bu etkiyi azaltacak yönde çalışma yapmışlardır (Mosayebnia, Ardestani, Pasalar, Mashayekhi, ve Amanlou, 2014). HEPG2 (Human Hepatocellular Carcinoma) hücre hattında çalışma yapılmıştır. Hücre kültürü çalışmasında fazla demir yüklenmesi için 1 mM demir sülfat eklenmiştir. Sonuç olarak, içerdeki serbest demir içeriği azalmıştır.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Lipozom Yapımı

Araştırma materyali olan hidrojene soya fosfatidilkolin (Avanti Lipids, ABD), kolesterol (C8667-500MG, Sigma) lipitleri toz halde satın alınmıştır. Lipozom yapımı Stuart ve diğerleri ve diğerleri'nin (2016) tarif ettiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Kısaca, toz haldeki bu lipitler 3:1 kloroform/metanol içinde çözdürülmüştür. Hidrojene soya fosfatidilkolin ve kolesterol 2:1 molar oranlarında karıştırılmış ve vakum altında kloroform/metanol uzaklaştırılmıştır (MAXI DRY PLUS, Heto, Almanya). Oluşan lipit tabakasının okside olmasının önlenmesi için azot gaz akışı altında 15 dakika kurutulmuştur. Lipit film 55 °C' de %5 dekstroz ve 1 mg/ml DTPA ve 10 mM TPEN içeren 1,5 ml 50 mM pH 5,5 sitrat tamponu ile yeniden çözdürülmüş ve lipozomlar elde edilmiştir. Bu karışım 37 °C' de 5 dakika sonikasyona bırakılmıştır. Karışımda şeffaflaşma gözlenene kadar sonikasyon yapılmıştır. Sonikasyonun ardından lipit filmin süspansiyona homojen karışımının sağlanması ve partiküllerin birbirinden ayrılması için vorteks işlemi uygulanmıştır. Karışım hem sterilite hem de birbirine yakın boyutların elde edilmesi için 0,2 µm gözenekli şırınga filtre kullanılarak en az 20 kez ekstrüzyona tabi tutulmuştur. Elde edilen lipozomlar 500 µl örnek içerecek şekilde 100 kDa Amicon santrifüj filtresi kullanılarak 2000 ×g'de 10 dakika santrifüj yapılmıştır. Kolonda kalan örnek 1000 ×g'de 2 dakika santrifüj yapılarak toplama tüpünde lipozomlar elde edilmiştir. Tüm örnekler kolondan geçirildikten sonra geçen filtrat %5 dekstroz içeren pH 5,5 50 mM sitrat tamponu ile yeniden 500 µl'ye tamamlanıp çözdürülerek ikinci filtrasyon gerçekleştirilmiştir. Elde edilen filtrat ve lipozom hacimleri kullanılarak verim hesaplanmıştır.

#### 3.2. Lipozom Karakterizasyonu ve Optimizasyonu

Elde edilen lipozomların zeta sizer ölçümü (Litesizer 500, Antoon Paar, Avusturya) ile boyut analizleri yapılmıştır (Şekil 13, 18). Tek katmanlı, 200-300 nm boyutları arasında lipozomlar elde edilmiştir. Geçirimli Elektron mikroskopunda (TEM) lipozomların morfolojisinin görüntüleri İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi'nde alınmıştır.

### 3.3. TPEN Referans Grafiğinin Çıkarılması

Lipozomlarda paketlenecek TPEN'in (AB 142247, ABCR) stok konsantrasyonu 10 mM olarak belirlendi. Seri seyreltmeler yapılarak 1000 µM, 100 µM, 10 µM ve 1 µM olacak şekilde tüp kompozisyonları hazırlandı. Hazırlanan bu süspansiyonlar 96 kuyucuklu plakaya 200 ul olacak şekilde yüklendi ve ardından 260 nm' de ölçüm alındı. Alınan sonuçlara göre TPEN'in referans grafiği elde edildi (Şekil 7). Konsantrasyonu belirlenen lipozomal TPEN'in toplam örneğe oranı ile enkapsülasyon verimi yüzde olarak hesaplandı.

### 3.4. DTPA Şelasyonu

Ana stok konsantrasyonu 1 mg/ml olacak şekilde DTPA (32319-100G-F, Sigma) ana çözelti konsantrasyonu hazırlandı. Öncelikle 50 ml hacimli flaska 40 µl 1 M NaOH çözeltisi koyuldu. Toz formunda olan DTPA'dan 50 mg tartılarak flaska eklendi. Homojen bir karışım haline gelmesi için manyetik karıştırıcı yardımıyla tüm DTPA partikülleri çözünene kadar işlem devam ettirildi. Bu karışım üzerine 40-45 ml saf su ilave edildi. Tekrar karıştırma işlemi yapıldı ve süspansiyon hazırlandı. Kamboj ve arkadaşlarının yaptığı 2011'deki çalışma referans alınarak lipozomlardaki DTPA miktarı bulundu. Buna bağlı olarak DTPA şelasyonu yapıp referans grafiği elde edildi (Şekil 8). Aşağıdaki Tablo 7'de DTPA şelasyonu için hazırlanan tüp içerikleri yer almaktadır.

**Tablo 7.** DTPA şelasyonu için hazırlanan tüp içerikleri

Konsantrasyon (µg/ml)	DTPA (µl)	FeCl <sub>3</sub> (µl)	0,1 N HCl (µl)
0	0	100	900
1,5	1,5	100	898,5
3	3	100	897
5	5	100	895
6	6	100	894
12	12	100	888
25	25	100	875
50	50	100	850
60	60	100	840
70	70	100	830
80	80	100	820
90	90	100	810
100	100	100	800

**Not:** Kullanılan DTPA Konsantrasyonu (1000 µg/ml), Kullanılan FeCl<sub>3</sub> Konsantrasyonu (0,5 mg/ml).

### 3.5. DTPA yüklü lipozomların Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Aşağıda DTPA şelasyonunda tüp kompozisyonlarının hazırlanışı verilmiştir.

1. Tüp: 1 µl Lps Ctrl + 9 µl MeOH>>5 dk sonike+65 µl FeCl<sub>3</sub>+575 µl 0,1 N HCl
2. Tüp: 1 µl Lps DTPA+ 9 µl MeOH>>5 dk sonike+65 µl FeCl<sub>3</sub>+575 µl 0,1 N HCl

(Lps Ctrl: Boş lipozom, Lps DTPA: DTPA yüklü lipozom)

Yukarıdaki şekilde hazırlanan tüpler oda sıcaklığında 1 saat bekletildikten sonra 272 nm'de spektrofotometre de ölçüldü. Ardından referans eğrisinde elde edilen denklemde gerekli hesaplamalar yapılarak lipozomlardaki DTPA miktarı bulundu. Bulunan bu miktara göre lipozomdaki DTPA miktarının toplam örneğe oranı ile DTPA'nın lipozomda ne kadar paketlenmiş olduğu yüzde olarak hesaplandı.

### 3.6. Hücre Kültürü

Hücre Hattı ve Rutin Pasaj

PC3 hücre hattı Prof. Dr. William H. Gmeiner (Wake Forest Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kuzey Karolayna, ABD) tarafından sağlanmıştır. Hücreler %10 fetal sıgır serumu (FBS) (Biowest, S181H, Fransa) ile zenginleştirilmiş RPMI-1640 besiyeri (tam besiyeri) içinde 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde kültüre edilmiştir. Rutin pasaj işlemi için hücre kültürü flaskında %85-90 yoğunluğa ulaşan hücrelerin üzerindeki kullanılmış besiyeri uzaklaştırılıp 2 ml tripsin (Sigma-Aldrich, T4049, Almanya) flask tabanına tutunan hücreleri kaldırmak için flaska eklenmiş ve 5 dk boyunca 37°C'de inkübatörde bırakılmıştır. Hücrelerin zeminden ayrıldıkları mikroskop altında incelendikten sonra tripsini nötralize etmek için 2 ml tam besiyeri hücreler üzerine eklenmiştir. Pipetaj yapıldıktan sonra hücre sayımı için bir miktar ayrılmıştır. Hücre sayımı için 50 µl %0,4'lük tripan mavisi ve 50 µl hücre süspansiyonu endorff tüpünde karıştırıldı ve Thoma lamına hücre sayımı için yükleme yapıldı. Hücreler mikroskopta sayılarak hücre konsantrasyonu hesaplandı. Sayım için ayrılan hacimden geri kalan hücre süspansiyonu 5 dk 4°C'de 110 ×g ile santrifüj (Hettich, UNIVERSAL 320R, Almanya) yapılarak tripsin içeren süpernatant uzaklaştırılmıştır. Geri kalan hücre pelleti tam besiyeri içinde süspansiyon edilerek istenilen miktarda hücre yeni bir flaska aktarılmıştır.

## MTT Hazırlama

MTT, 5 mg/ml olacak şekilde steril PBS içinde hazırlanmıştır ve son MTT konsantrasyonu 0,5 mg/ml olacak şekilde RPMI tam besiyeri içinde seyreltilmiştir. Hazırlanan kontrol ve lipozomal formülasyonların muamele süresi sonunda hücreler üzerindeki eski besiyeri dökülerek her bir kuyucuğa 120 µl hazırlanan MTT çözeltisi eklenmiştir. Minimum 2 saat inkübasyon sonunda hücreler içinde mor renkli formazan kristallerinin olduğu mikroskop altında gözlemlendikten sonra MTT çözeltisi uzaklaştırılarak her kuyucuğa 100 µl DMSO eklenmiştir. Formazan kristallerinin tam olarak çözülmesi için 10-15 dakika çalkalayıcıya bırakıldıktan sonra spektrofotometrede (EPOCH, BioTek, ABD) 570 nm'de sonuçlar elde edilmiştir.

## 24-72 Saatlik IC-50 Değerlerinin Hesaplanması

Hücreler 96 kuyulu plaka içinde kuyucuk başına 3000 hücre/200 µl olacak şekilde ekildi. 0, 2, 4, 6 µM olacak şekilde TPEN konsantrasyonları belirlendi. Hesaplamalara göre tüp kompozisyonlarına belirlenen miktarlarda RPMI tam besiyeri ve TPEN eklendi. Pipetaj yaparak homojen karışım sağlandı. Bir gün önceden 96 kuyucuklu plakaya ekilen hücreler inkübatörden alınarak eski besiyeri uzaklaştırıldı. Tüm kuyucuklara 100 µl RPMI tam besiyeri eklendi. Referans (kör) kuyucuklarına ise sadece 200 µl tam besiyeri koyuldu. Önceden elde edilen TPEN miktarı sonuçlarına göre her bir kuyucuğa 100 µl bu solüsyondan eklendi. Bu işlem 24-48 ve 72 saat için ayrı ayrı gerçekleştirildi.

DTPA için 0, 20, 40, 60, 80 µM olacak şekilde konsantrasyonlar belirlendi. Hesaplamalara göre tüp kompozisyonlarına belirlenen miktarlarda RPMI tam besiyeri ve DTPA eklendi. Pipetaj yaparak homojen karışım sağlandı. Bir gün önceden 96 kuyucuklu plakaya ekilen hücreler inkübatörden alınarak eski besiyeri uzaklaştırıldı. Tüm kuyucuklara 100 µl RPMI tam besiyeri eklendi. Referans kuyucuklarına ise sadece 200 µl tam besiyeri koyuldu. Önceden elde edilen DTPA miktarı sonuçlarına göre her bir kuyucuğa 100 µl bu solüsyondan eklendi. Bu işlem 24-48 ve 72 saat için ayrı ayrı gerçekleştirildi.

## Cell Titer Glo Lüminesan Hücre Canlılığı Testi

50 µl %0,4'lük tripan mavisi ve 50 µl hücre süspansiyonu ependorf tüpünde karıştırıldı ve Thoma lamına hücre sayımı için yükleme yapıldı. Hücre konsantrasyonu mikroskopta sayılarak belirlendi. Belirlenen hücre yoğunluğuna göre kuyucuk başına 2500

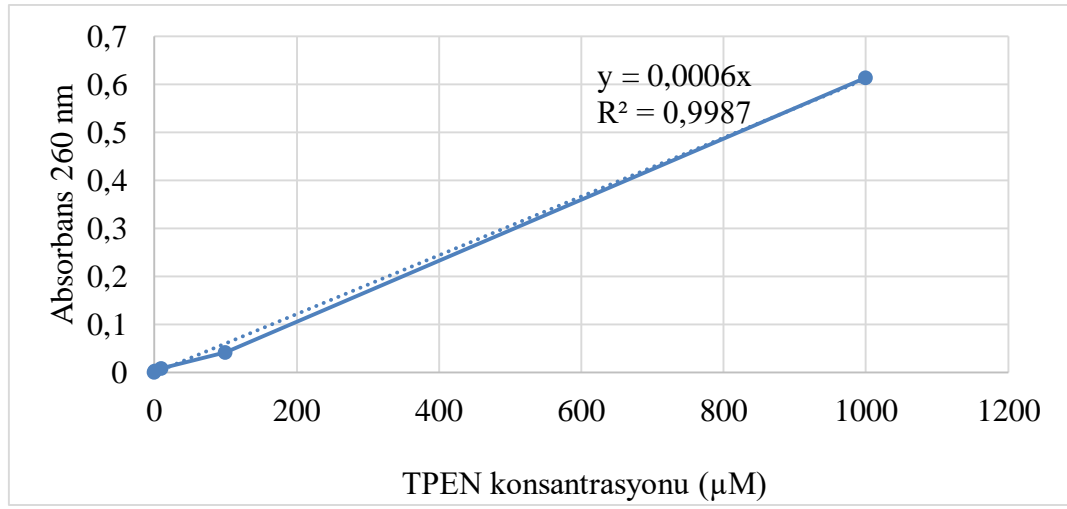
hücre olacak şekilde hücre süspansiyonu hazırlandı. Önceden elde edilen TPEN VE DTPA içeren lipozomların konsantrasyon hesaplamaları yapıldı. TPEN içeren lipozomun konsantrasyonuna bağlı olarak kuyucuktaki son konsantrasyon 0-4-6  $\mu$ M olacak şekilde tüp kompozisyonları hazırlandı. Bir gün önceden 96'lık yarı alanlı beyaz plakaya ekilen hücreler inkübatörden alınarak 72 saat muamele için gerekli kuyucuklardan eski besiyeri uzaklaştırılıp üzerine 50  $\mu$ l tam besiyeri ardından 50  $\mu$ l lipozomal TPEN içeren tüp kompozisyonlarından eklendi. Tüm bu işlemler 24 ve 48 saat muameleleri için tekrarlandı. Muamele süreleri dolduktan sonra tüm kuyucuklardan eski besiyerleri uzaklaştırılıp 12,5  $\mu$ l Cell Titer Glo Substrate (Promega, 0000344061, ABD) eklendi. Ardından plaka karanlıkta yarım saat bekletilip luminometre (LUMATE 4400, Awareness, ABD) ile ölçüm alındı.



## 4. BULGULAR

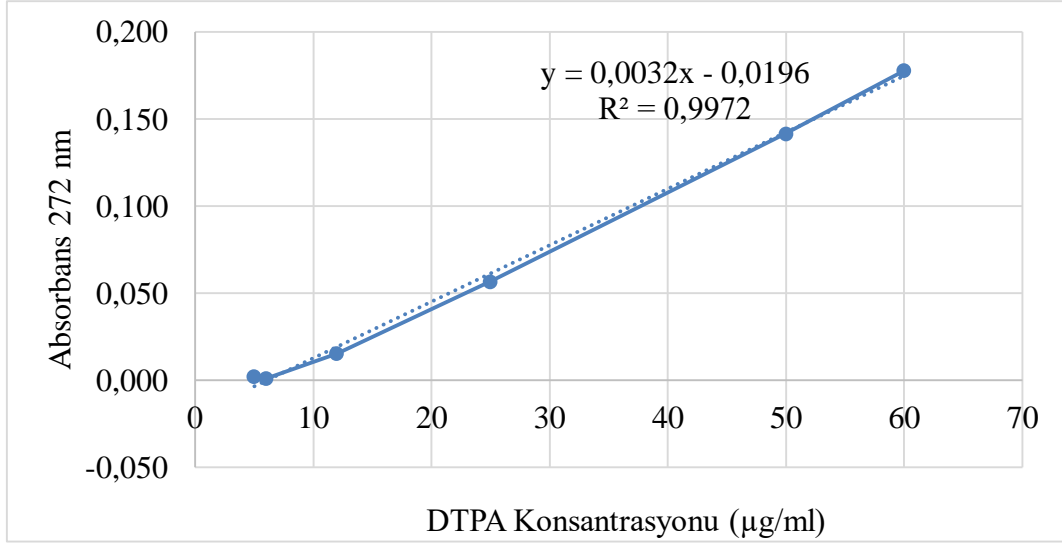
### 4.1. TPEN ve DTPA Referans Grafikleri

Şekil 7’de görüldüğü gibi, TPEN’in 0-1000  $\mu\text{M}$  arasında konsantrasyonları hazırlanarak 260 nm’de referans eğrisi elde edilmiştir. Elde edilen grafikte konsantrasyon ve absorbans doğrusaldır. Konsantrasyonun artmasına bağlı olarak absorbans değeri de artış göstermektedir.  $R^2$  değeri 0,9987 olarak bulunmuştur.



Şekil 7. TPEN referans grafiği

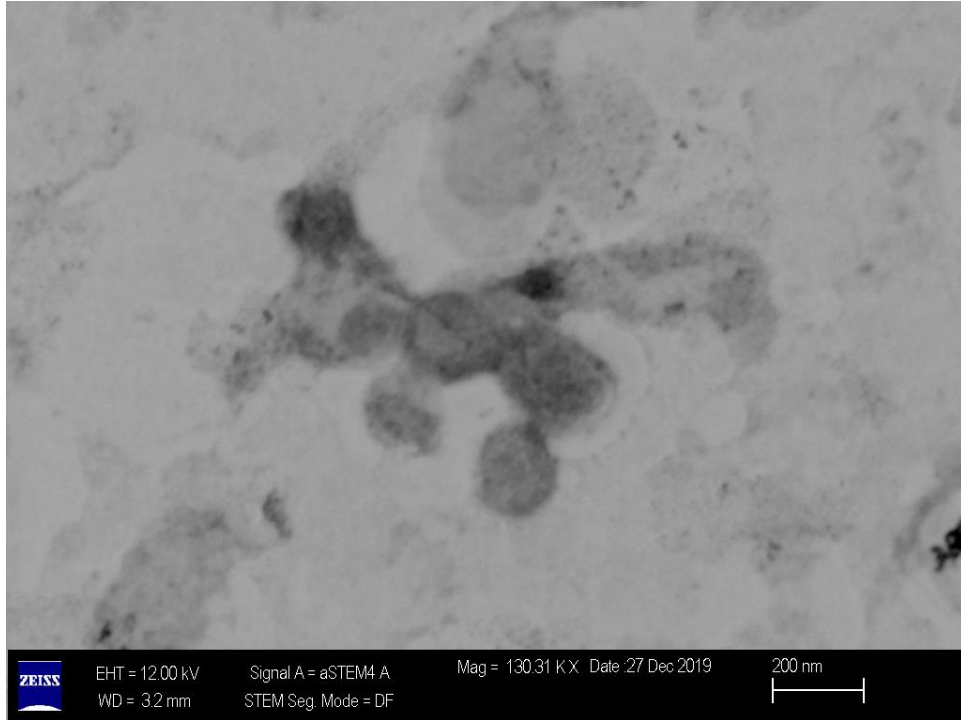
DTPA referans eğrisinde 0-60  $\mu\text{M}$  arasında ölçüm alınmış, kesim noktası 5  $\mu\text{M}$ 'ye göre belirlenmiştir. Konsantrasyona bağlı olarak absorbans değeri doğrusal olarak artmaktadır.  $R^2$  değeri 0,9972 olarak bulunmuştur (Şekil 8).



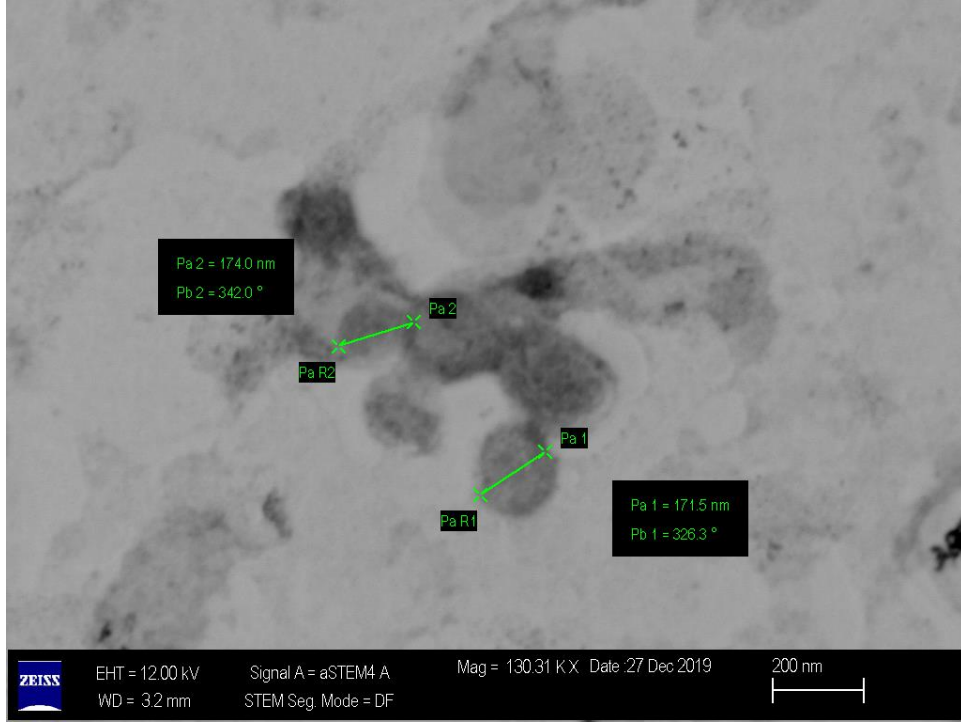
**Şekil 8.** DTPA referans grafiği

#### 4.2. TPEN Yüklü ve Boş Lipozomların TEM Altında Morfolojik Görüntüsü

Şekil 9’da TPEN’in kontrol lipozomlarının görüntüleri yer almaktadır. Küre şeklinde olan lipozomların 171,5 nm ila 174 nm boyutlarında olduğu görülmektedir (Şekil 10).

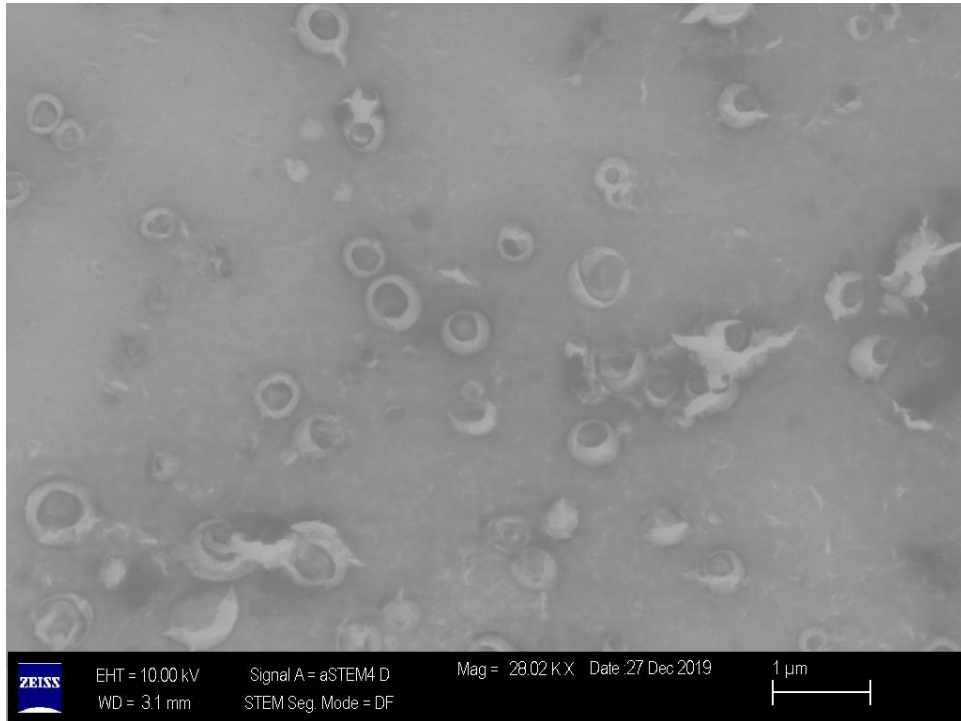


**Şekil 9.** Boş lipozomların TEM altında görüntüleri

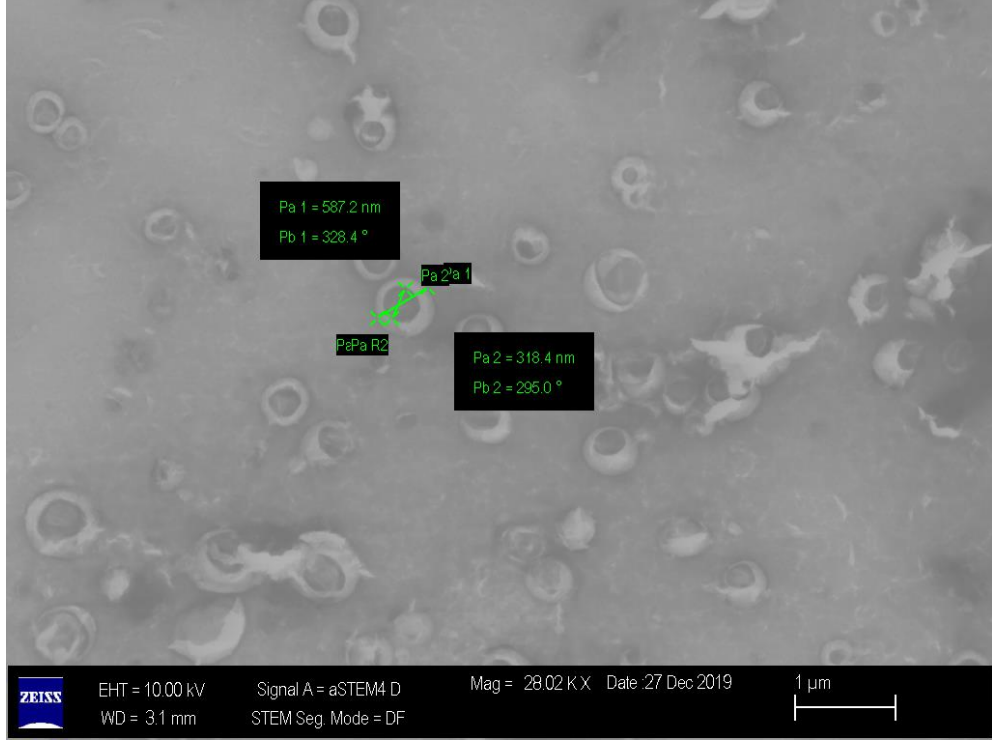


**Şekil 10.** Boş lipozomların TEM de boyutlarının işaretlenmesi

Şekil 11’de TPEN yüklü lipozomların küre şeklinde olduğu görülmektedir. Alınan görüntülerde lipozomların yaklaşık 300 ila 500 nm arasında olduğu saptanmıştır (Şekil 12).



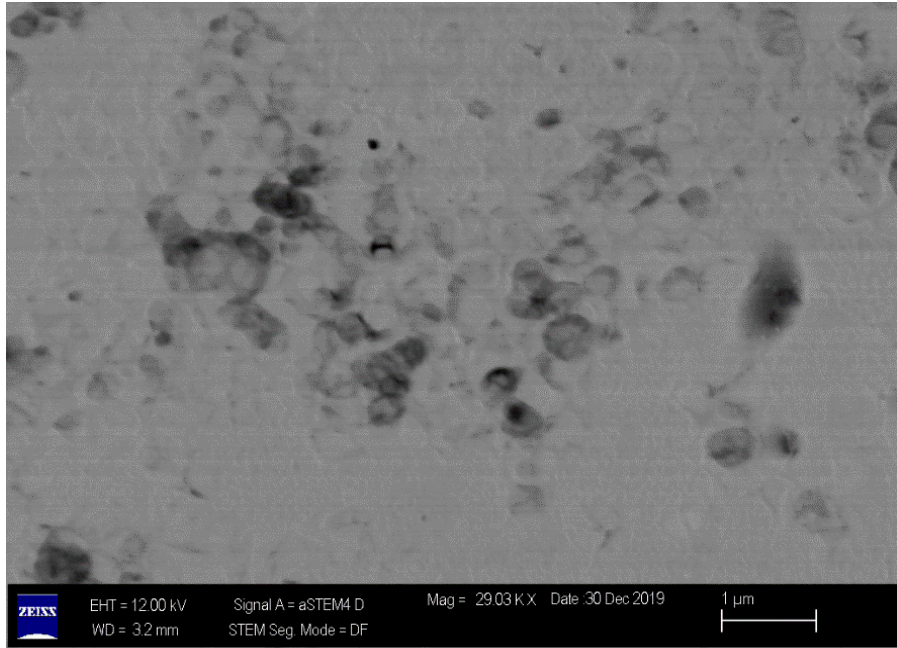
**Şekil 11.** TPEN yüklü lipozomların TEM de görüntüleri



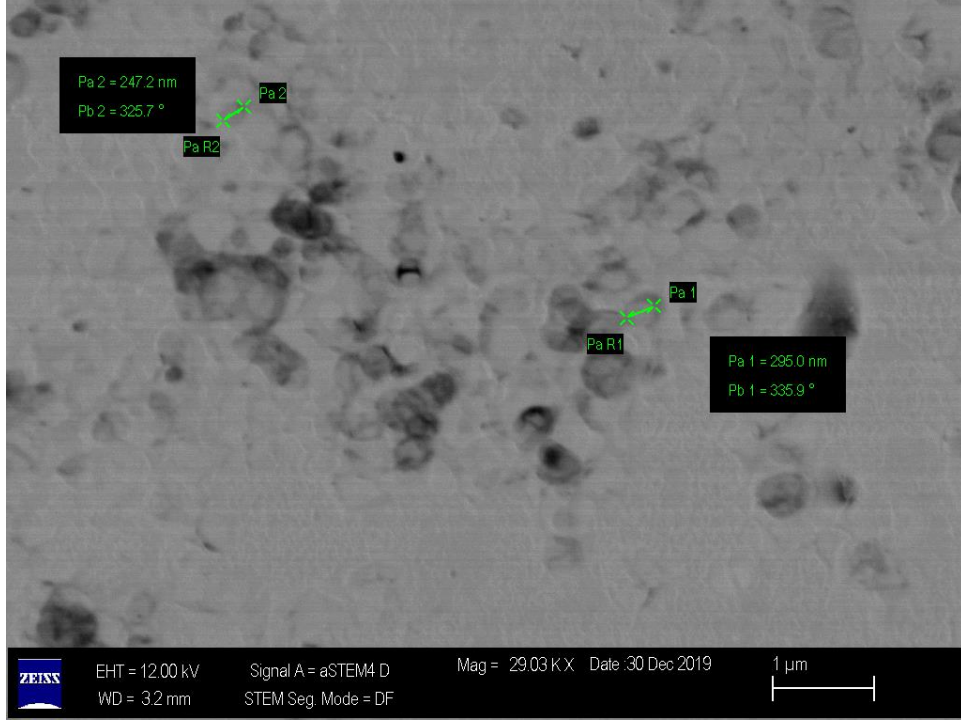
**Şekil 12.** TPEN yüklü lipozomların TEM de boyutlarının işaretlenmesi

#### **4.3. DTPA Yüklü Lipozomların TEM Altında Morfolojik Görüntüsü**

Şekil 13’de DTPA’ya kontrol olarak elde edilen boş lipozomlar yer almaktadır. Küre şeklinde olan lipozomların boyutları 247 nm ile 295 nm arasında olduğu görülmektedir (Şekil 14).

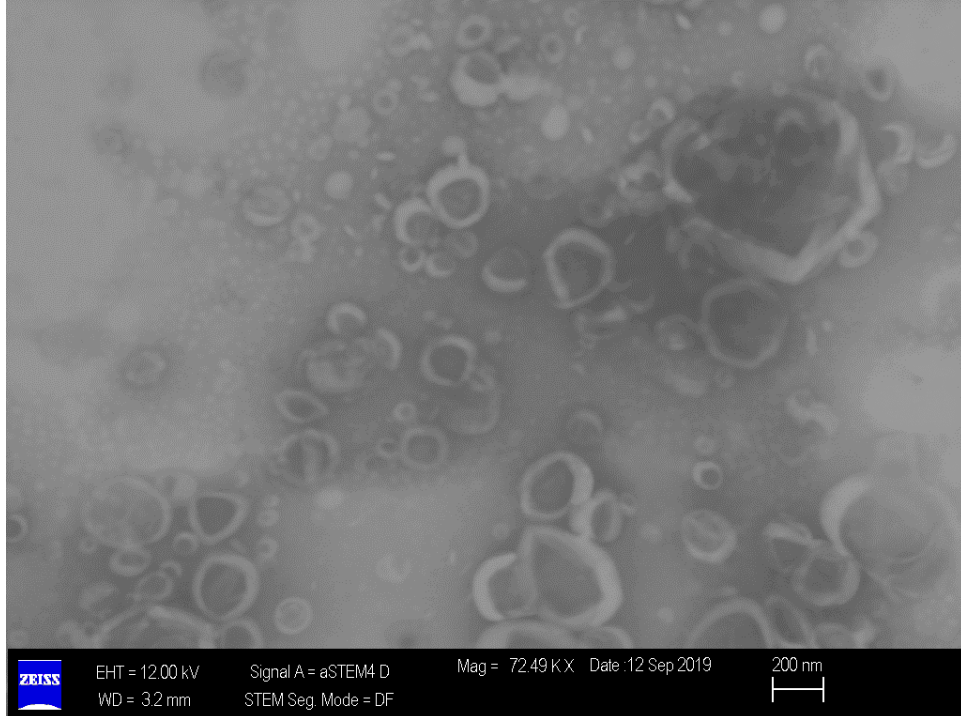


**Şekil 13.** Boş lipozomların TEM altında görüntüleri

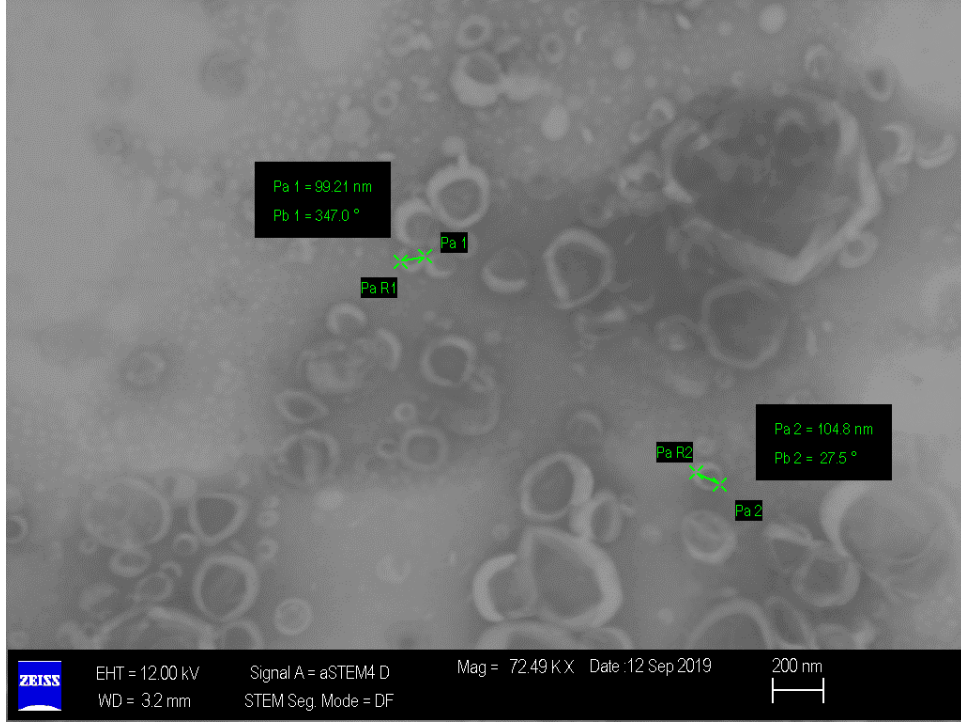


**Şekil 14.** Boş lipozomların TEM altında boyutlarının işaretlenmesi

Şekil 15’de DTPA yüklü lipozomların küre şeklinde olduğu görülmektedir. Boyutlarının ise yaklaşık 100 nm civarında olduğu saptanmıştır (Şekil 16).



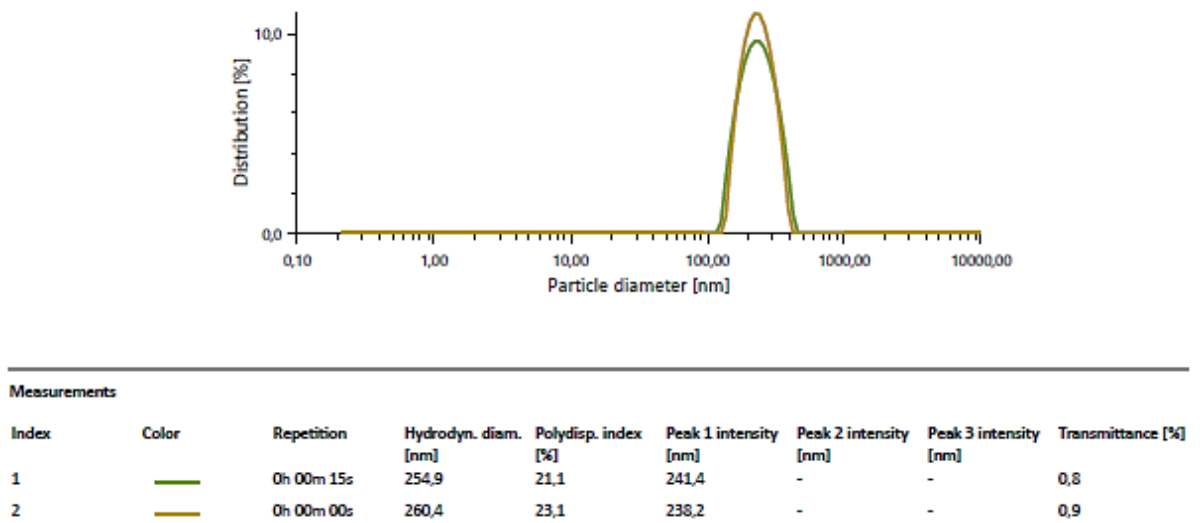
**Şekil 15.** DTPA yüklü lipozomların TEM altında görüntüleri



Şekil 16. DTPA yüklü lipozomların TEM'de boyutlarının işaretlenmesi

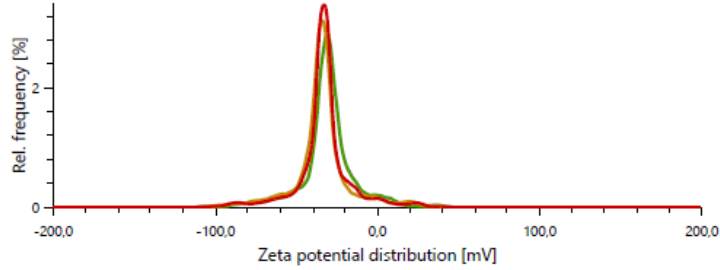
#### 4.4. Kontrol ve TPEN Yüklü Lipozomların Partikül Analizi ve Zeta Potansiyeli Ölçümü

TPEN'in kontrolü olarak elde edilen boş lipozomların zetasizer ile ölçüm sonucu partikül boyut analizi gösterilmiştir (Şekil 17). PI değerleri  $>0.05$  olarak bulunmuş ve monodispers partikül dağılımının yaygın olmadığı sonucuna varılmıştır. 100-500 nm arasındaki boyutlarda lipozomların varlığına rastlanmış ama 238-241 nm boyutlarının yoğunluğunun daha fazla olduğu saptanmıştır.



Şekil 17. TPEN'in kontrol lipozomunun zetasizer ile partikül analizi

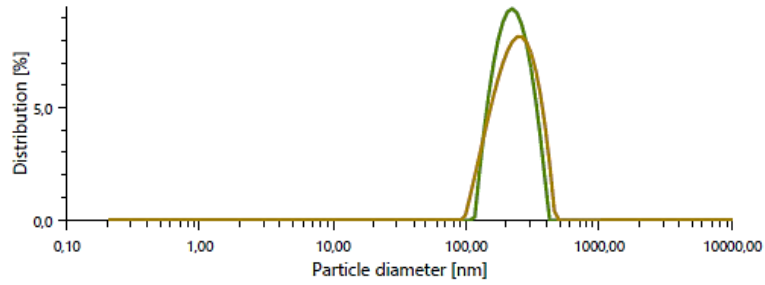
Boş lipozomların zeta potansiyel dağılımı (Şekil 18) gösterilmiştir. Geniş negatif ve pozitif zeta potansiyel içerdiğinden dolayı bu lipozomlarda agregasyon oluşumu gözlenmeyeceği bulgusuna ulaşılmıştır. Ortalama zeta potansiyel değerinin ise -30'lara yakın olması partikül süspansiyonunun normal değerlere yakın olduğunu belirtmektedir.



Measurements							
Index	Color	Repetition	Mean zeta pot. [mV]	Electroph. mobil. [ $\mu\text{m}^2\text{cm/Vs}$ ]	Conductivity [mS/cm]	Adjusted voltage [V]	Processed runs
1	Green	0h 00m 00s	-32,9	-2,5631	0,013	200,0	100
2	Yellow	0h 00m 00s	-31,8	-2,4812	0,013	200,0	100
3	Red	0h 00m 00s	-32,5	-2,5294	0,013	200,0	100

Şekil 18. TPEN'in kontrol lipozomunun zetasizer ile zeta potansiyel ölçümü

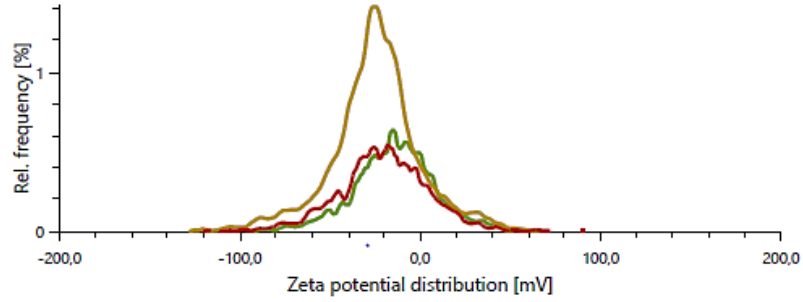
TPEN yüklü lipozomların zetasizer ile analizi sonucu partikül boyut analizi gösterilmiştir (Şekil 19). PI değeri  $>0,05$  elde edilmiş ve monodispers partiküllerin daha az yaygın olarak bulunduğu sonucuna varılmıştır. 229-243 nm boyutlarının solüsyon içerisinde daha yoğun bulunduğu saptanmıştır.



Measurements								
Index	Color	Repetition	Hydrodyn. diam. [nm]	Polydisp. index [%]	Peak 1 intensity [nm]	Peak 2 intensity [nm]	Peak 3 intensity [nm]	Transmittance [%]
1	Green	0h 00m 15s	261,6	18,9	229,5	-	-	0,9
2	Yellow	0h 00m 00s	269,9	23,9	243,1	-	-	0,9

Şekil 19. TPEN yüklü lipozomların zetasizer ile partikül analizi

TPEN yüklü lipozomların zeta potansiyel dağılımı (Şekil 20) gösterilmiştir. Ortalama zeta potansiyel değerinin -30 mV'den daha küçük olmaması partikül süspansiyonunun normal değer aralığında olduğu bulgusuna varılmıştır.



#### Measurements

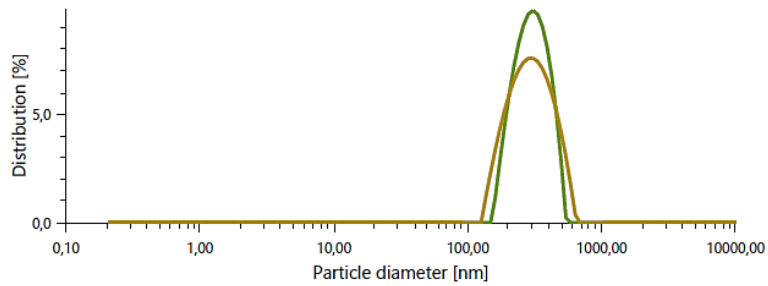
Index	Color	Repetition	Mean zeta pot. [mV]	Electroph. mobil. [ $\mu\text{m}^2\text{cm/Vs}$ ]	Conductivity [mS/cm]	Adjusted voltage [V]	Processed runs
1	Green	0h 00m 00s	-18,2	-1,4172	0,008	200,0	280
2	Yellow	0h 00m 00s	-24,7	-1,9217	0,008	200,0	100
3	Red	0h 00m 00s	-19,5	-1,5197	0,008	200,0	340

Şekil 20. TPEN yüklü lipozomların zetasizer ile zeta potansiyel ölçümü

#### 4.5. Kontrol ve DTPA Yüklü Lipozomların Zeta Ölçümü ve Partikül Analizi

DTPA yüklü olmayan ve kontrol olarak üretilen edilen boş lipozomların partikül boyut analizi (Şekil 21) gösterilmiştir. Partikül boyut yoğunluğu 307-310 nm olarak ölçülmüştür. PI değeri <0,05 olduğu için monodispers bir dağılımın yaygın olduğu bulgusuna varılmıştır.

#### Particle size distribution (intensity)



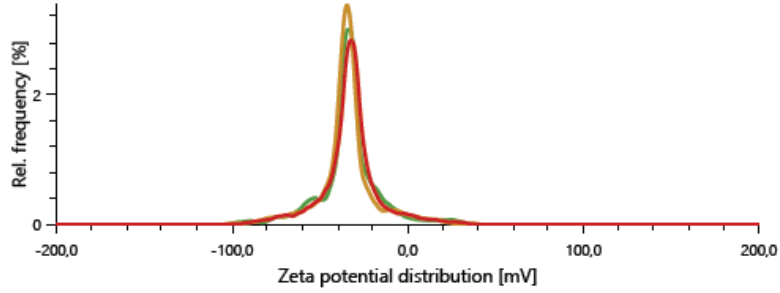
#### Measurements

Index	Color	Repetition	Hydrodyn. diam. [nm]	Polydisp. index [%]	Peak 1 intensity [nm]	Peak 2 intensity [nm]	Peak 3 intensity [nm]	Transmittance [%]
1	Green	0h 00m 15s	319,9	20,2	307,6	-	-	0,8
2	Yellow	0h 00m 00s	314,1	20,0	310,3	-	-	0,8

Şekil 21. DTPA'nın kontrol lipozomunun zetasizer ile partikül boyut analizi



DTPA yüklü olmayan boş lipozomların zeta potansiyeli zetasizer yardımıyla ölçülmüştür (Şekil 22). Ortalama zeta potansiyeli -33,2 mV değerindedir. Bu da zeta potansiyeli için normal değeri içermektedir. Geniş negatif ve pozitif aralıkta zeta potansiyeli içerdiğinden dolayı lipozomların agregasyona uğramayacağı ya da toplanıp bir araya gelmeyeceği saptanmıştır.

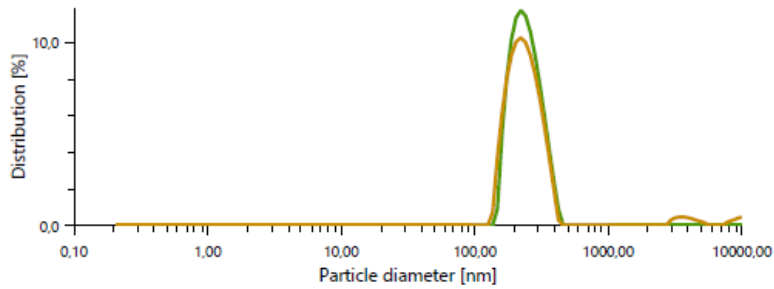


#### Measurements

Index	Color	Repetition	Mean zeta pot. [mV]	Electroph. mobil. [ $\mu\text{m}^2\text{cm/Vs}$ ]	Conductivity [mS/cm]	Adjusted voltage [V]	Processed runs
1	Green	0h 00m 10s	-32,6	-2,5380	0,016	200,0	100
2	Yellow	0h 00m 00s	-34,3	-2,6769	0,016	200,0	100
3	Red	0h 00m 00s	-32,8	-2,5542	0,016	200,0	100

Şekil 22. DTPA'nın kontrol lipozomunun zetasizer ile zeta potansiyel ölçüm

Lipozomların DTPA ile yüklenmesiyle elde edilen boyut analizi şeması Şekil 23'de gösterilmektedir. Bu süspansiyon, yaklaşık 238-246 nm boyutları yoğunluğunda lipozom içermektedir. PI değerine bakıldığında %20,8 değeri <0.05 iken %9,4 değeri 0.7'den büyüktür. Bu durumda lipozomların agregasyon ihtimalinin gözlemlenmesi bulgusuna ulaşılmıştır.

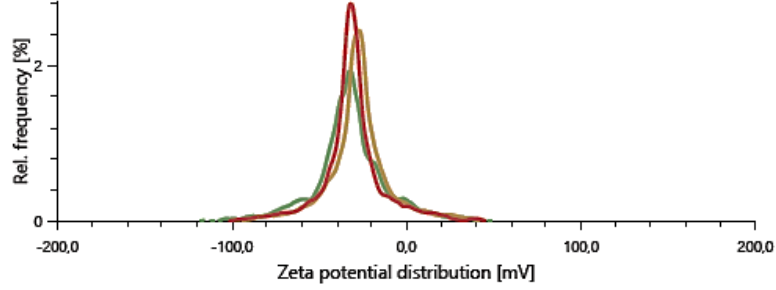


#### Measurements

Index	Color	Repetition	Hydrodyn. diam. [nm]	Polydisp. index [%]	Peak 1 intensity [nm]	Peak 2 intensity [nm]	Peak 3 intensity [nm]	Transmittance [%]
1	Green	0h 00m 15s	310,2	20,8	246,1	-	-	0,8
2	Yellow	0h 00m 00s	290,4	9,4	238,8	11201	3830	0,8

Şekil 23. DTPA yüklü lipozomların zetasizer ile partikül boyut analizi

DTPA yüklü lipozomların zeta potansiyeli ölçüm analizi gösterilmektedir (Şekil 24). Ortalama -28,8 mV olan zeta potansiyel değeri lipozomlar için normal parçacık yüküne işaret etmektedir.



Measurements							
Index	Color	Repetition	Mean zeta pot. [mV]	Electroph. mobil. [ $\mu\text{m}^2\text{cm/Vs}$ ]	Conductivity [mS/cm]	Adjusted voltage [V]	Processed runs
1	Green	0h 00m 10s	-27,2	-2,1205	0,018	200,0	100
2	Yellow	0h 00m 00s	-28,7	-2,2350	0,018	200,0	100
3	Red	0h 00m 00s	-30,5	-2,3754	0,018	200,0	100

Şekil 24. DTPA yüklü lipozomların zetasizer ile zeta potansiyel ölçümü

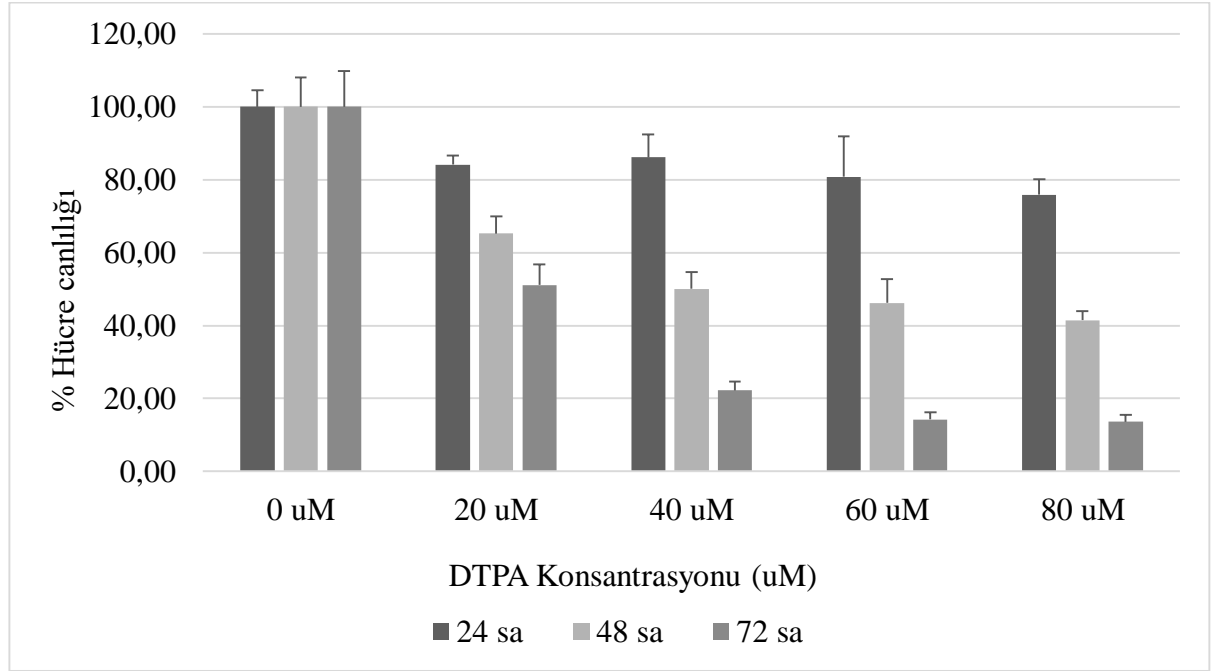
#### 4.6. DTPA'nın PC3 Hücreleri Üzerine Etkisi

Aşağıdaki şekilde 0-20-40-60-80  $\mu\text{M}$  konsantrasyon aralığında yalın halde DTPA, 24, 48 ve 72 saat olmak üzere PC3 prostat kanseri hücreleri üzerine uygulanmıştır (Şekil 21). Kontrol grubuna göre kıyaslama yapıldığında, 24 saat muamelede hücre canlılığı en yüksek doz olan 80  $\mu\text{M}$ 'da %75,83 oranında iken en düşük doz olan 20  $\mu\text{M}$  konsantrasyonunda bu oran %84,12 oranında olduğu görülmektedir (Tablo 8). 48 saat muamele incelendiğinde, kontrol grubuna göre 20  $\mu\text{M}$ 'da %65,29 olan hücre canlılığı uygulanan en yüksek doz olan 80  $\mu\text{M}$ 'da %41,42'ye düştüğü görülmektedir. 72 saat muamele için 20  $\mu\text{M}$ 'da %51,14 olan hücre canlılığı 80  $\mu\text{M}$ 'da %13,60'a kadar düşmüştür.

**Tablo 8.** DTPA'nın PC3 hücreleri üzerinde 24-48-72 saat muameleye ait yüzde hücre canlılığı spektrofotometre sonuçları  $\pm$  standart sapmaları

DTPA konsantrasyonu (uM)	24 saat	48 saat	72 saat
0 $\mu$ M	100 $\pm$ 4,5	100 $\pm$ 8,0	100 $\pm$ 9,8
20 $\mu$ M	84,12 $\pm$ 2,5	65,29 $\pm$ 4,6	51,14 $\pm$ 5,6
40 $\mu$ M	86,16 $\pm$ 6,3	50,09 $\pm$ 4,6	22,19 $\pm$ 2,4
60 $\mu$ M	80,79 $\pm$ 11,1	46,18 $\pm$ 6,6	14,26 $\pm$ 2,0
80 $\mu$ M	75,83 $\pm$ 4,3	41,42 $\pm$ 2,6	13,60 $\pm$ 1,9

Şekil 25'e bakıldığında DTPA'nın 48 saatlik IC50 değerinin 40  $\mu$ M olduğu bulgusuna varılmıştır.



**Şekil 25.** DTPA'nın PC3 hücreleri üzerine 24-48-72 saat muameleye ait MTT sitotoksitesite deneyi

#### 4.7. TPEN'in PC3 Hücreleri Üzerine Etkisi

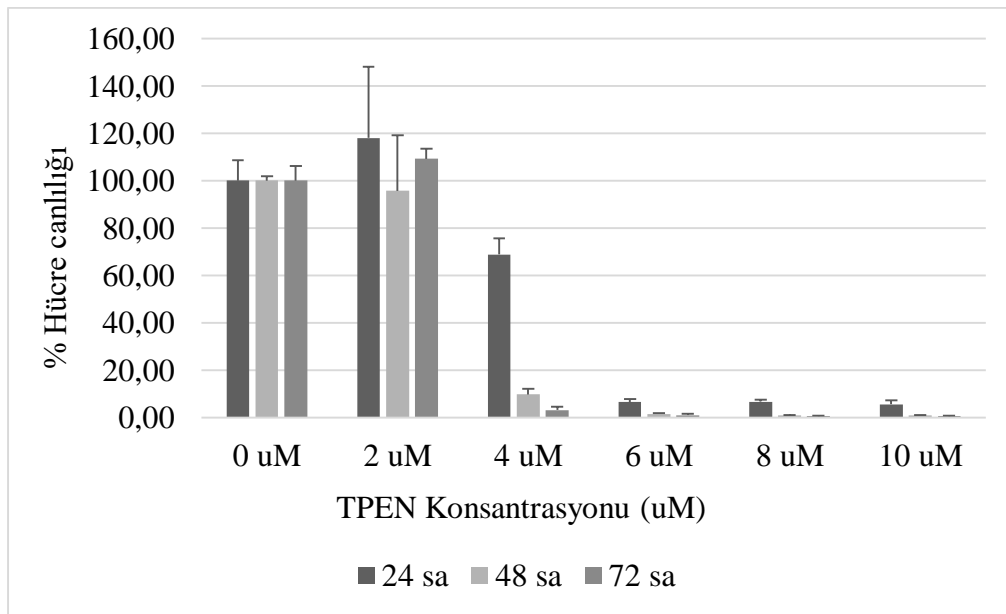
TPEN'in PC3 prostat kanseri hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi farklı dozlarda muamele edilerek (Tablo 9) gerçekleştirilmiştir.

**Tablo 9.** TPEN'in PC3 hücreleri üzerinde 24-48-72 saat muameleye ait yüzde hücre canlılığı spektrofotometre sonuçları  $\pm$  standart sapmaları

TPEN konsantrasyonu (uM)	24 saat	48 saat	72 saat
0 $\mu$ M	100 $\pm$ 8,6	100 $\pm$ 1,8	100 $\pm$ 6,2
2 $\mu$ M	118,10 $\pm$ 30,1	95,71 $\pm$ 23,5	109,24 $\pm$ 4,2
4 $\mu$ M	68,86 $\pm$ 6,7	9,65 $\pm$ 2,4	3,04 $\pm$ 1,5
6 $\mu$ M	6,42 $\pm$ 1,3	1,39 $\pm$ 0,4	0,88 $\pm$ 0,6
8 $\mu$ M	6,53 $\pm$ 0,8	0,85 $\pm$ 0,2	0,52 $\pm$ 0,1
10 $\mu$ M	5,48 $\pm$ 1,6	0,72 $\pm$ 0,2	0,52 $\pm$ 0,1

Tablo 9'a bakıldığında, 24 saatlik muamelede kontrol grubu 0  $\mu$ M'a göre kıyaslandığında özellikle 4  $\mu$ M' dan 10  $\mu$ M'a kadar hücre canlılığında önemli ölçüde düşüş olmuş ve bu oran %5,48'e kadar azalmıştır. 48 saatlik muamele sonucunda 2  $\mu$ M'da %95,71 olan hücre canlılığı 4  $\mu$ M konsantrasyonda %9,65'e kadar düştüğü görülmektedir (Tablo 9). 72 saatlik muamele sonucunda ise, 4  $\mu$ M'da %3,04 iken 10  $\mu$ M'a bakıldığında hücre canlılığının %0,52 olduğu görülmektedir (Şekil 26).

Şekil 26'ye bakıldığında TPEN'in 24 saatlik IC50 değerinin 4-6  $\mu$ M arasında olduğu bulgusuna ulaşılmıştır.



**Şekil 26.** TPEN'in PC3 hücreleri üzerine 24-48-72 saat muameleye ait MTT sitotoksosite deneyi

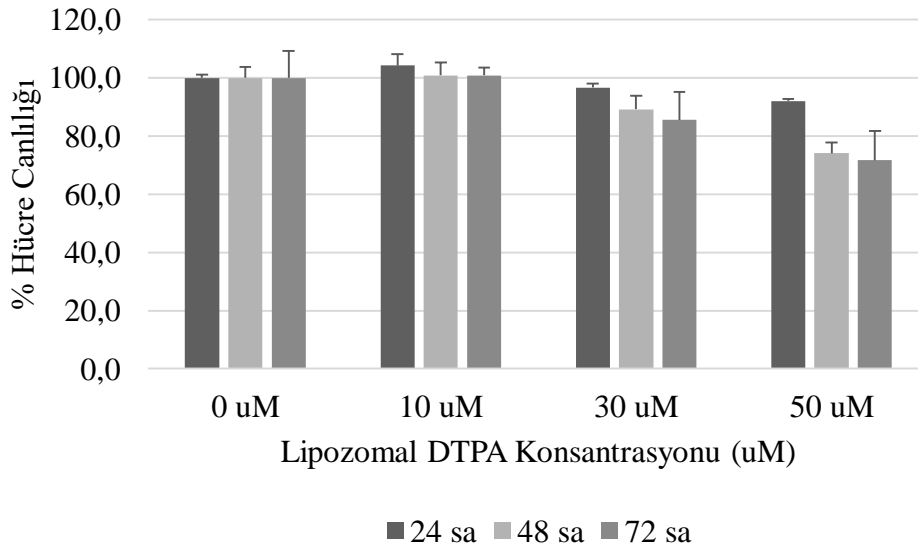
#### 4.8. Lipozomal DTPA'nın PC3 Hücreleri Üzerine Etkisi

PC3 hücreleri üzerine farklı dozlarda ve sürelerde lipozomal DTPA muamelesi yapılmıştır. Lipozomal DTPA'nın gösterdiği sitotoksik etki Tablo 10'da görülmektedir.

**Tablo 10.** Lipozomal DTPA'nın PC3 hücreleri üzerinde 24-48-72 saat muameleye ait yüzde hücre canlılığı spektrofotometre sonuçları  $\pm$  standart sapmaları

Lipozomal DTPA konsantrasyonu	24 saat	48 saat	72 saat
0 $\mu$ M	100 $\pm$ 1,1	100 $\pm$ 3,6	100 $\pm$ 9,2
10 $\mu$ M	104,3 $\pm$ 4,0	100,8 $\pm$ 4,4	100,9 $\pm$ 2,5
30 $\mu$ M	96,6 $\pm$ 1,5	89,2 $\pm$ 4,6	85,5 $\pm$ 9,7
50 $\mu$ M	92,0 $\pm$ 0,7	74,1 $\pm$ 3,8	71,7 $\pm$ 9,9

Aşağıdaki grafikte tüm zamanlara bakıldığında kontrol grubuna kıyasla 10  $\mu$ M konsantrasyonda hücre canlılığında bir değişim gözlemlenmemiştir. 30  $\mu$ M doz muamelesi 24 saatte hücre canlılığında yaklaşık olarak %4, 48 saatte %10, 72 saatte ise %15 azalma göstermektedir. 50  $\mu$ M 24 saat muamele sonucunda %92, 48 saatte %74,1 72 saatte ise %71,7 hücre canlılığı gözlemlenmektedir (Şekil 27).



**Şekil 27.** Lipozomal DTPA'nın PC3 hücreleri üzerinde 24-48-72 saat muameleye ait cell titer glo lüminesan hücre canlılığı testi

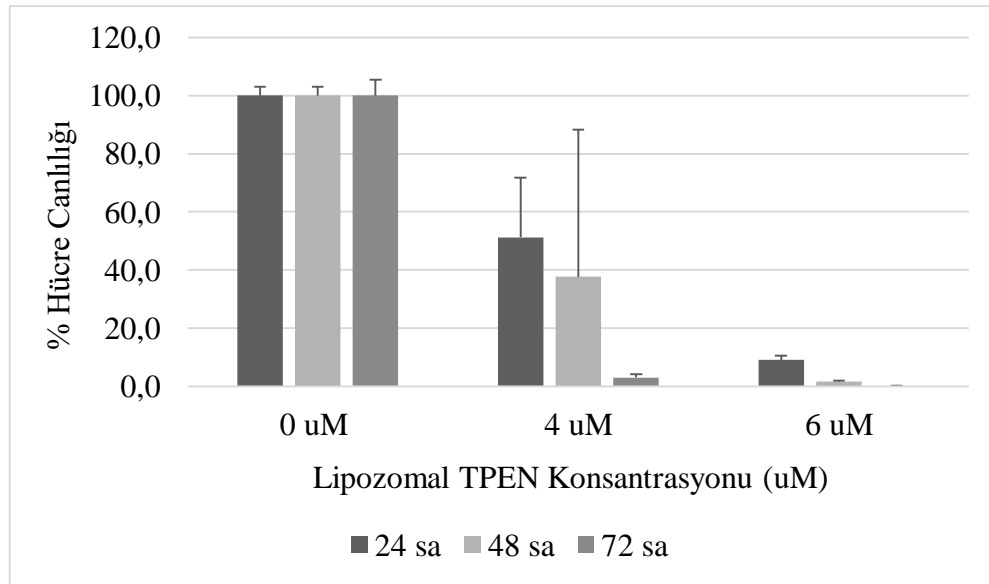
#### 4.9. Lipozomal TPEN'in PC3 Hücreleri Üzerine Etkisi

Lipozomal TPEN'in PC3 hücreleri üzerinde 24-48-72 saat muameleye ait yüzde hücre canlılığı sonuçları (Tablo 11) gösterilmiştir.

**Tablo 11.** Lipozomal TPEN'in PC3 hücreleri üzerinde 24-48-72 saat muameleye ait yüzde hücre canlılığı spektrofotometre sonuçları  $\pm$  standart sapmaları

Lipozomal TPEN konsantrasyonu	24 saat	48 saat	72 saat
0 $\mu$ M	100 $\pm$ 3,02	100 $\pm$ 2,9	100 $\pm$ 5,4
4 $\mu$ M	51,3 $\pm$ 20,44	37,7 $\pm$ 50,6	3,1 $\pm$ 1,0
6 $\mu$ M	9,1 $\pm$ 1,4	1,8 $\pm$ 0,3	0,2 $\pm$ 0,1

Kontrol grubuna kıyasla, 24 saat muamelede 4  $\mu$ M doz uygulamasında hücre canlılığında %50 azalma görülmüş ve canlılık %51,3'e düşmüştür. 24 saat muamelenin 6  $\mu$ M doz uygulaması sonucunda ise canlılık %9,1'e kadar düşmüştür. 4  $\mu$ M ve 6  $\mu$ M dozun 48 saat uygulamasında ise hücre canlılığı sırasıyla %37,7 ve %1,8 olarak bulunmuştur. 72 saat muamelede ise 4  $\mu$ M'de %3,1 olan hücre canlılığı 6  $\mu$ M'de %0,2 olduğu gösterilmiştir (Şekil 28).



**Şekil 28.** Lipozomal TPEN'in PC3 hücreleri üzerinde 24-48-72 saat muameleye ait cell titer glo lüminesan hücre canlılığı testi

## 5. TARTIŞMA

Dünya ölüm nedenlerine bakıldığında, her 6 ölümden birinin kanser kaynaklı olduğu görülmektedir. Ülkemizde ise bu durum daha ciddi olup, her 5 ölümden birine kanser sebep olmaktadır. Oldukça önemli bir konu olması dolayısıyla geçmişten günümüze özellikle prostat kanseri son yıllarda artan vakalar sebebiyle birçok çalışmayı beraberinde getirmektedir. Kanser teşhis ve tedavisinde kullanılan cerrahi girişimler, radyoterapi, kemoterapi gibi farklı yöntemler bu çalışmaların konusu haline gelmiştir.

Kanserin erken teşhis ve tedavisinde kullanılan yöntemlerle birlikte kemoterapiye duyulan ihtiyaç artmaktadır. Uygun terapötik aktivite eksikliği ve doza bağlı yan etkiler de kanser tedavisinde önemli bir problem olmaktadır. Kanseri yenmek için birçok strateji geliştirilmiş olsa da, hala dünya genelinde önde gelen ölüm nedenleri arasında sayılmaktadır. Tümör bölgesine sınırlı ilaç konsantrasyonu ulaştığı için, serbest ilacın sistemik uygulaması, kanser tedavisinde kemoterapinin temel sorunu olarak kabul edilir. Özellikle kemoterapinin sağlıklı hücrelere olan olumsuz etkisi ve insan vücudunda meydana getirdiği yan etkilerden dolayı kanser üzerine yapılan çalışmalar giderek artmaktadır. Ek olarak kemoterapide kullanılan aktif farmasötik bileşenlerin çoğu, hem kanser hem de normal hücreler için oldukça sitotoksiktir (Olusanya, 2018). Çözünürlük, stabilite, çözücü ile uyumluluk, ilaç katkı maddesi, fotostabilite gibi bir takım parametreler ilaçların formülasyonunda önemli bir rol oynar (Agrawal ve Patel, 2011). Bugüne kadar ilaç üzerine yapılan çalışmalarda, kimyasalların %40'dan fazlasının lipofilik yapıda ya da suda çözünürlüğünün az olması gibi sonuçlar elde edilmiştir (Agrawal ve Patel, 2011). İlaçların bu düşük çözünürlük ve biyoyararlanım gibi sorunlarını çözmek için birçok formülasyonu mevcuttur ama bunların da kullanımı sınırlı kalmaktadır (Agrawal ve Patel, 2011).

Bu amaçla nano malzemeleri *in vivo* olarak tümör bölgelerine hedeflemek, kanser tedavisinin erken tedavi ve teşhisinde önemli bir potansiyele sahiptir (Lei ve diğerleri, 2019). Bunun sonucunda kemoterapiye alternatif olarak ilaçların nanoenkapsülasyonu çalışmalar açısından ilgi çekici bir noktaya gelmiştir. Fakat ilaçların çözünürlük, stabilite, fotostabilite gibi parametrelerden etkilenmesi ilaç formülasyonlarında bazı problemleri de beraberinde getirmektedir. İlaçların düşük çözünürlük ve biyoyararlanım gibi sorunları çözmek için birçok formülasyonu mevcuttur ama bunların da kullanımı sınırlı kalmaktadır (Agrawal ve Patel, 2011). Bu yüzden ilaç formülasyonlarının nanoenkapsülasyonu tercih

edilen bir yöntem haline gelmiştir. Nanoenkapsülasyonda ise hücre membranına benzer yapıları sayesinde hücreye girişleri kolay olan lipozomlar antikanser ajanların paketlenmesinde kullanılmaktadır. Birçok farklı metodla elde edilebilen bu lipozomlar, boyutlarının küçük olması ve yapım maliyetinin az olmasından kaynaklı olarak tercih sebebi olmaktadır. Aynı zamanda hidrofilik ve hidrofobik yapıları dolayısıyla birçok ilacın enkapsüle edilmesinde rol oynamaktadır. Hücre için toksik olan ve sağlıklı hücrelere de zarar veren ilaçların toksisitesinin azaltılması ve daha az dozlarda kullanılması gibi önemli avantajları bulunmaktadır. 2010 yılında Wang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, serbest mitoksantron ve lipozomal mitoksantronun hayvanlar üzerinde çalışmaları yapılmıştır. Mitoksantron yüklü lipozomların tümör büyümesini engellediği, ilacın terapötik etkisini önemli ölçüde artırdığı, aynı dozdaki serbest mitoksantron ile kıyaslandığında lipozomal formülasyonunun daha uzun dolaşım sistemine sahip ve olduğu ve mitoksantron yüklü lipozomların normal dokuların dışında tümörlü bölgelerde biriktiği sonuçlarına varılmıştır (Wang ve diğerleri, 2010).

Gupta ve diğerleri, (2019) mikrobiyal enfeksiyon ve kanser tedavisinde kullanılan riboflavinin lipozoma enkapsülasyonu ve insan mesane karsinoma hücreleri olan HT-1376 hattına uygulanmasıyla ilgili bir çalışma yürütmüşlerdir. Sonuç olarak, lipozomlardaki Riboflavin-5-fosfat konsantrasyonunun artmasıyla kanser hücrelerinin inhibisyon oranının doğrusal olarak arttığı saptanmıştır.

2013'de yapılan bir çalışmada, serbest paklitaksel (PCX) ile lipozomal formülasyonunun mide kanseri üzerine etkisi incelenmiştir. Hastalar kemoterapide tegafur (5-florourasil) ve oksaliptin gibi mide kanserinde kullanılan ilaçları da kullanmıştır. Her iki formülasyonda da hastalar üzerinde aynı nörolojik toksisiteler görülürken, lipozomal formülasyon PCX alan hastalarda bulantı, kusma gibi yan etkilerde önemli ölçüde azalma gözlemlenmiştir (Xu ve diğerleri., 2013).

Yapılan literatür taramalarına bakıldığında, çalışmalarda ilaçların, serbest halde hücrelere verilmesinin değil lipozomal formülasyonlarının hücreyle ya da tümör dokusuyla muamelesi sonucunda etkisinin daha fazla olduğu, yan etkisinin ise az olduğu kanısına varılmıştır. 2010 yılında Wang ve ark. yaptığı bir çalışmada, serbest ilaca göre daha az dozu kullanılarak enkapsüle edilen ilacın etkisinin fazla olduğu gösterilmektedir (Wang ve diğerleri., 2010). Bu çalışmalarda da az doz kullanılarak ve daha az yan etki sağlanması dolayısıyla lipozomal ilaç formülasyonlarının önemi bir kere daha kanıtlanmış olmaktadır.



Bugüne kadar yürütülen birçok çalışma incelendiğinde, lipozomal ilaç formülasyonlarının ticari olarak kullanılan antikanser ilaçlardan elde edildiği görülmüştür. Bizim çalışmamız da, hücre için çinko homeostazının önemini göstermek, çinkonun hücrede fazla ya da eksik olması durumunda hücrenin apoptoza gideceğini gösteren çalışmalar kapsamındadır. DTPA'nın çinkoyu bağlayan özelliği dışında demir, mangan, kurşun gibi diğer +2 değerlikli (divalent katyon) elementlerle de şelasyon yapma özelliği bulunmaktadır. Bununla ilgili 2015 yılında Laine ve arkadaşlarının DTPA'nın da aralarında bulunduğu aminopolikarboksilik asit grubundan olan EDTA, NTA gibi şelasyon ajanlarından oluşan bir çalışması mevcuttur. Bu çalışmada UV-Vis spektrofotometri ve HPLC kullanılarak bulaşık deterjanlarının ve doğal sulardaki miktar analizi yapılmıştır. DTPA ile yapılan diğer bir çalışma 2011 yılında Kamboj ve arkadaşları topikal jel formülasyonlarında DTPA tahmini için basit, duyarlı, ekonomik ve tekrarlanabilir bir UV spektrofotometrik yöntem geliştirilmesi üzerine olmuştur. Bizim de bu çalışmaya benzer olarak Tablo 7'de gösterildiği gibi DTPA şelasyonu için farklı tüp kompozisyonları hazırlanmıştır. İki çalışmada da DTPA konsantrasyonunun 0-50  $\mu\text{M}$  arasında olduğu gösterilmiş ve sonuçlar birbirine benzer ve lineer bir grafik elde edilmiştir. Aynı şekilde 2015 yılında Laine ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada DTPA'nın fotodegradasyona uğradığı fikri öne sürülmüş ve buna bağlı olarak çalışmamızda şelasyon aşamasında bu özellik dikkate alınmıştır. Kamboj ve ark., 272 nm olarak buldukları maksimum absorpsiyon değerine göre ölçüm sonuçları bulunmuş ve çalışmamızda da sonuçlar bu absorpsiyon değerine bağlı olarak elde edilmiştir.

DTPA'nın farklı moleküllerle kompleks oluşturarak yapısındaki farklılığın meydana getirdiği değişiklikler üzerine de çalışmalar mevcuttur. 2014 yılında Mosayebnia ve ark., DTPA-DG (Dietilentriamin pentaasetik asit - D-deoksi glikozamin) kompleksinin hücre içi serbest demiri artırıp artırmayacağını bulmak için bir çalışma yürütmüşlerdir. HEPG2 (insan hepatoselüler karsinoma) hücreleri üzerine yapılan bu çalışmada, hücrelere eklenen demir kaynağı demir sülfat yardımıyla sağlanmıştır. Vücuttaki fazla demirin toksik özellikte olmasıyla ilgili DTPA aracılığıyla bu etkiyi azaltacak yönde çalışma yapmışlardır.

Yapılan literatür çalışmalarında çinko şelatörü olan DTPA'nın lipozomal formülasyonu mevcut değildir. Genel olarak araştırmaların hepsi yalnız DTPA'nın hücre kültürü üzerinde sitotoksikite çalışmaları olarak ön plana çıkmaktadır. DTPA'nın PC3 ve C4-2 prostat kanseri hücrelerinde toksik olduğunu 2015 yılında Gmeiner ve arkadaşları kanıtlamıştır. Gmeiner ve diğerleri, (2015) yaptığı bu çalışmada, eksojen çinkonun

uygulamasının prostat kanseri hücre canlılığını azalttığı, hücre membranından geçemeyen çinko şelatörü DTPA ile çinkonun şelasyonunun ise kültür ortamındaki serbest  $Zn^{2+}$  varlığına bağlı olarak canlılığı azalttığı görüşüne varılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, çinko şelatlanmasına bağlı hücre canlılığındaki azalma, eksojen çinko muamelesinden kaynaklanan etkilerden daha yavaş olduğu bulunmuştur. 24 saatte canlılıkta herhangi bir değişiklik gözlemlenmezken 72 saatte önemli ölçüde hücre ölümü rapor edilmiştir (Gmeiner ve diğerleri, 2015).

DTPA'nın yalın olarak spektroskopisi ile saptanabilecek sinyal vermediği ancak çinko, demir, kurşun gibi +2 değerlikli iyonlarla bağ oluşturarak şelasyon yaptığı araştırmalar yardımıyla bulunmuştur. DTPA şelasyonu ile absorbans grafiği elde edilirken farklı dozlarda denemeler yapılmıştır. DTPA'nın 50  $\mu\text{g/ml}$  konsantrasyondan 100  $\mu\text{g/ml}$  konsantrasyona kadar birçok farklı tüp içeriği hazırlanmıştır. Fakat DTPA'da 60  $\mu\text{g/ml}$ 'den sonraki değerlerde lineer bir grafik elde edilmediği görülmüş buna bağlı olarak doz aralığı bu değer altında seçilmiştir. Bu yüzden grafikte eşik değeri 50  $\mu\text{g/ml}$  olarak kabul edilmiştir (Şekil 8).

Bizim çalışmamızda da buna benzer olarak, DTPA'nın şelasyon yolu ile kuantifikasyonu için çinko değil bir başka +2 değerlikli element olan demir ile şelasyon gerçekleştirilmiştir. Gmeiner ve arkadaşlarının çalışmasında PC3 ve C4-2 prostat kanseri hücre hatları üzerine 50  $\mu\text{M}$  DTPA uygulanmıştır. Bu tez çalışmasında da PC3 prostat kanseri hücre hattı üzerine 0, 20, 40, 60 ve 80  $\mu\text{M}$  dozlarda DTPA uygulaması gerçekleştirilmiştir. 24 saat uygulamada dozlar arasında hücre canlılığında önemli fark gözlemlenmezken, 48 ve 72 saat muamelede canlılıkta önemli ölçüde düşüş yaşanmıştır. Özellikle 72 saatte hücre canlılığı 20  $\mu\text{M}$ 'da %50 oranında azalırken, 40, 60 ve 80  $\mu\text{M}$ 'da hücre canlılığında %80-90 aralığında azalma olmuştur. 80  $\mu\text{M}$  dozda 24 saat muameleye ait hücre canlılığının en fazla, 72 saatte ise en az olduğu sonucuna varılmıştır. Tüm dozlarda canlılıkta azalma gözlenmiş olup %50'sinin inhibe olduğu doz aralığı 40-60  $\mu\text{M}$  arasında bulunmuştur (Şekil 25). Yine aynı çalışmada diğer bir çinko şelatörü olan TPEN'in PC3 ve C4-2 prostat kanseri hücre hattı üzerine uygulaması gerçekleştirilmiştir. 4  $\mu\text{M}$  ile 5,75  $\mu\text{M}$  aralığında yakın dozlar denenmiş ve hücre canlılığının bu dozlar aralığında azaldığı görülmüştür. C4-2 hücre hattı için 4,75  $\mu\text{M}$ 'nin hücre canlılığını %50 azalttığı PC3'de ise bu dozun 5,25-5,50  $\mu\text{M}$  aralığında olduğu bulunmuştur. Benzer olarak bizim çalışmamız da öncelikle 0, 2, 4, 6, 8 ve 10  $\mu\text{M}$  aralığı belirlenmiş fakat deney sonucunda 4  $\mu\text{M}$

uygulamaya kadar tüm muamelelerde canlılık gözlemlendiği 6, 8 ve 10  $\mu\text{M}$ 'da 24 saatte çok az görülen canlılık 48 ve 72 saatte gözlemlenmemiştir (Şekil 26).

Yapılan önceki çalışmaların ışığında antikanser ilaçların serbest halde hücrelere verilmesinin toksik olduğu saptanmıştır. Buna bağlı olarak çalışmamızda enkapsülasyon materyali olarak lipozom kullanılmış ve optimizasyon/karakterizasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Elektron mikroskop görüntüleri incelendiğinde lipozomların dağılımlarının yaklaşık 100-500 nm boyutlarında oldukları gözlemlenmiştir (Şekil 10-16).

Stuart ve diğerleri 2016 yılında, TPEN'in lipozomal formülasyonunu kullanarak prostat kanseri tedavisi için potansiyel çinko şelasyon kullanımı üzerine çalışma yürütmüşlerdir. TPEN, oksidatif strese neden olan ve prostat kanseri hücreleri için oldukça toksik olmasından kaynaklı olarak lipozomal formülasyonunun çinko şelasyonu ile bir fayda sağlayabileceği ve etkisinin azalacağı görüşü üzerinde durulmuştur. Sonuçta lipozomal TPEN'in normal TPEN'e göre uygulamalarında hücrelerde daha az ölüme neden olduğu sonucuna varılmıştır. Aynı çalışmada enkapsüle edilen TPEN'in miktarı lipozomların metanol varlığında sonikasyonla parçalanarak ve 260 nm'de ölçüm alınarak bulunmuştur. Benzer olarak bu çalışmada da TPEN'in ve lipozomal formülasyonunun PC3 prostat kanseri hücrelerinde etkisi gözlemlenmiştir. TPEN tek başına 0, 2, 4 ve 6  $\mu\text{M}$  dozlarda uygulandığında 24 saatte 4  $\mu\text{M}$  dozda %77 olan hücre canlılığı lipozomal formülasyonu uygulandığında aynı doz ve saatte %51'e kadar düşmüştür. Yine TPEN'in tek başına 48 saatte 4  $\mu\text{M}$  dozda %51 olan canlılık, lipozomal TPEN'in aynı doz ve muamele saatinde %37 olduğu saptanmıştır (Şekil 28). 6  $\mu\text{M}$  dozda tüm muamele süresinde hücre canlılığının neredeyse varlığından söz edilmemektedir. 2016'da yapılan Stuart ve diğerleri'nin çalışmalarının ışığında TPEN'in lipozomal formülasyonu sayesinde toksik özelliğinin azaltılması sağlanmış ve bizim de çalışmamız da daha az doz kullanarak hücre canlılığının önemli ölçüde azalmış olduğu gösterilmiştir.

Lipozomal formülasyonların genellikle antikanser ajanlar üzerine kullanıldığı ve toksisitenin azaltılması üzerine çalışmaların olduğu tartışma bölümünde örneklerle anlatılmıştır. Çinko ( $\text{Zn}^{2+}$ ) seviyesinin prostat kanseri hücrelerinde düşük olduğu saptanmıştır (Stuart ve diğerleri, 2016). Bu çinko seviyesinin artması ya da azalması durumunda hücrelerin apoptozunun gerçekleşmesi söz konusudur. Bundan yola çıkarak TPEN ile birlikte bir başka çinko şelatörü olan DTPA'nın lipozomal formülasyonu üzerine çalışmamız yürütülmüştür. Çalışmamızda çinko şelatörü olan, hücre membranından geçen TPEN ile bir diğer çinko şelatörü olan ve hücre membranından geçemeyen DTPA'nın

nanoenkapsülasyon ile formülasyonu elde edilmiş ve PC3 hücreleri üzerindeki etkinlikleri gözlemlenmiştir. TPEN'in lipozomal formülasyonu üzerine 2016'da bir çalışma gerçekleştirilmiş ama DTPA üzerine böyle bir çalışma yürütülmemiştir. Bu çalışmada hücre membranından geçemeyen DTPA enkapsülasyonla paketlemek suretiyle farklı dozlarda PC3 hücre hattı üzerinde uygulanmıştır. Öncelikle DTPA yalın halde hücrelere uygulanarak PC3 hücreleri üzerinde IC50 değerinin 48 saatte 40 µM olduğu tespit edilmiştir. Bu değer Gmeiner ve arkadaşlarının çalışmasında 50 µM olarak bildirilmiştir. Lipozomal DTPA üzerine yapılan deney sonucunda (Tablo 10); 24 ve 48 saat muameleler arasında anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir ( $P>0,05$ ). Kontrol grubuna kıyasla 24 saat muamelede en yüksek doz olarak belirlenen 50 µM'de hücre inhibisyonu yaklaşık %8 iken 48 saat muamelede bu oran %26 olarak bulunmuştur (Şekil 27). Yalın DTPA'da aynı sürelerdeki uygulamalarda hücre inhibisyonunun daha fazla olduğu saptanmıştır (Tablo 8). Çalışmada lipozomal formülasyonunu elde ettiğimiz DTPA'nın hücreleri yalın DTPA'ya göre daha az öldürdüğü görülmüştür. Bu sonuç lipozomal TPEN ve yalın TPEN'in sitotoksiteleri arasındaki ilişkiden farklıdır. Bu farklılığın DTPA'nın hücre membranından geçememesi, spektroskopik olarak saptanabilmesi için TPEN'e göre ekstra bir şelasyon gerektirmesi ve dozun ayarlanması kısımlarındaki farklılıklardan kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca TPEN ile DTPA'nın lipozomda paketlenen konsantrasyonları birbirinden farklıdır. Enkapsülasyon oranı DTPA için %43 iken TPEN'de bu oran %1,45 olarak hesaplanmıştır.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Ülkemizde hatta dünyada sağlık konusu büyük önem taşımakta ve hastalıklarla tanı ve tedavide sağlık üzerine birçok çalışma yürütülmektedir. Bu hastalıkların en yaygın olanları başta dolaşım sistemi hastalıkları ve kanserdir. Kanserın dünyada ölüm nedenlerine bakıldığında her 6 ölümden birine sebebiyet verdiği bilinmektedir. Globocan (2012), dünyada yıllık 1,1 milyon erkeğin prostat kanseri tanısı aldığını bildirmiştir. Bu da prostat kanseri üzerine yapılan çalışmaların artmasında büyük rol oynamıştır. Özellikle son yıllarda kanser tedavisinde kullanılan kemoterapinin artan yan etkilerinin verdiği olumsuz sonuçlar çalışmaların da seyrini değiştirmiştir. Kemoterapinin sadece tümör dokusuna değil tüm vücuda verdiği zararlardan dolayı bu etkiyi azaltma yönünde farklı çalışmalar yapılmıştır. Bu konuda yapılan çalışmalar geleneksel kemoterapinin etkisiz olduğu yerlerde ilerlemiş kastrasyona dirençli prostat kanseri için tedavi amaçlı olarak kullanılabilme potansiyeli göstermektedir.

Prostat kanserine karşı geleneksel tedavi yöntemlerine alternatif birçok çalışma denenmektedir. Bu tedavi yöntemlerinde kemoterapinin vücutta oluşturduğu olumsuzlukların önüne geçmesinin yanında, kanser hücrelerine karşı başarıda ümitvar sonuçlar içerebilmektedir. Bu tedavi yöntemlerinden biri de antikanser ilaçların nanoenkapsülasyonu olarak örneklendirilmektedir.

İlaçların toksisitesini azaltma ya da daha az doz kullanma yönteminin tercih edilmesi ilaçların nanoenkapsülasyonunu ve transportunun sağlanmasını yaygın hale getirmiştir. İlaç taşıma sistemlerinin amacının, en iyi terapötik etkiyi elde etmek için en az dozu kullanmak olduğu özetlenmiştir. (Li ve diğerleri., 2015).

Sonuç olarak bu çalışmada TPEN ve lipozomal TPEN'in sitotoksik etkinliklerinin Stuart ve arkadaşlarının (2016) yaptıkları çalışmaya benzer sonuçlarda olduğu sonucuna varılmıştır. Aynı zamanda daha önce lipozomal formülasyonu üzerine deneme yapılmayan DTPA'nın hücreleri öldürmede etkisinin az olduğu, yalın halde DTPA uygulamasında hücrelerin canlılığındaki azalmanın daha çok olduğu sonucuna varılmıştır. Buradan yola çıkarak paketlenen DTPA'nın hücreye verdiği zararın daha az olduğu gözlemlenmektedir. Bu çalışmada enkapsüle edilen DTPA konsantrasyonu 1 mg/ml olup bu konsantrasyonun

modifikasyonunun enkapsüle DTPA'nın hücre canlılığı üzerindeki etkilerinin değişmesine yol açabilme ihtimali bulunmaktadır.

## KAYNAKLAR

- Agrawal, Y., ve Patel, V. (2011). Nanosuspension: An approach to enhance solubility of . *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology ve Research*, 2(2), 81. <https://doi.org/10.4103/2231-4040.82950>
- Ahmed, K. S., Hussein, S. A., Ali, A. H., Korma, S. A., Lipeng, Q., ve Jinghua, C. (2019). Liposome: composition, characterisation, preparation, and recent innovation in clinical applications. *Journal of Drug Targeting*, 27(7), 742–761. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2018.1527337>
- Ahmed, K. S., Hussein, S. A., Ali, A. H., Korma, S. A., Lipeng, Q., Jinghua, C., ... Korma, S. A. (2019). Liposome : composition , characterisation , preparation , and recent innovation in clinical applications. *Journal of Drug Targeting*, 27(7), 742–761. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2018.1527337>
- Akbarzadeh, A., Rezaei-sadabady, R., Davaran, S., Joo, S. W., ve Zarghami, N. (2013). Liposome : classification , preparation , and applications. *Nanoscale Research Letters*, 8:(102) 1–9.
- Albayatı, (2018). *Yeni Silika Tabanlı Akıllı İlaç Taşıyıcı Sistemin Geliştirilmesi ve İlaç Salım Özelliklerinin İncelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Ardestani, M. S., Amanlou, Siadat, S. D., Ebrahimi, S., Mehraei, Saffari, ... Abbasi. (2011). Gd<sup>3+</sup>-DTPA-DG: novel nanosized dual anticancer and molecular imaging agent. *International Journal of Nanomedicine*, 747. <https://doi.org/10.2147/ijn.s17648>
- Augustyn, A., Zeidan, A., Zelazko, A., ve Eldridge, A. (2019). *Cell Membrane*. *Britannica*. <https://www.britannica.com/science/cell-membrane> adresinden erişildi.
- Bakowsky, H., Richter, T., Kneuer, C., Hoekstra, D., Rothe, U., Bendas, G., ... Bakowsky, U. (2008). Adhesion characteristics and stability assessment of lectin-modified liposomes for site-specific drug delivery. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1778(1), 242–249. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.09.033>
- Barenholz, Y. (2012). Doxil® - The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. *Journal of Controlled Release*, 160(2), 117–134. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.03.020>

- Baselga, J., Manikhas, A., Cortés, J., Llombart, A., Roman, L., Semiglazov, V. F., Rozenzweig, M. (2014). Phase III trial of nonpegylated liposomal doxorubicin in combination with trastuzumab and paclitaxel in HER2-positive metastatic breast cancer. *Annals of Oncology*, 25(3), 592–598. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdt543>
- Batist, B. G., Ramakrishnan, G., Rao, C. S., Chandrasekharan, A., Gutheil, J., Guthrie, T., Lee, L. W. (2001). Reduced Cardiotoxicity and Preserved Antitumor Efficacy of Liposome-Encapsulated Doxorubicin and Multicenter Trial of Metastatic Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 19(5), 1444–1454.
- Baykara, O. (2016). Kanser tedavisinde güncel yaklaşımlar. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi* 5(3) 154–165. <https://doi.org/10.5505/bsbd.2016.93823>
- Berger, N., Sachse, A., Bender, J., Schubert, R., ve Brandl, M. (2001). Filter extrusion of liposomes using different devices: Comparison of liposome size, encapsulation efficiency, and process characteristics. *International Journal of Pharmaceutics*, 223(1–2), 55–68. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(01\)00721-9](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00721-9)
- Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, 235, 337–351. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>
- Bhupinder. (2010). Food Nanotechnology. *Dove press*, 3, 15.
- Bozzuto, G., ve Molinari, A. (2015). Liposomes as nanomedical devices. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 975–999. <https://doi.org/10.2147/IJN.S68861>
- Briuglia, M. L., Rotella, C., McFarlane, A., ve Lamprou, D. A. (2015). Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release. *Drug Delivery and Translational Research*, 5(3), 231–242. <https://doi.org/10.1007/s13346-015-0220-8>
- Cadenas, E. (2004). Mitochondrial free radical production and cell signaling. *Molecular Aspects of Medicine*, 25(1–2), 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2004.02.005>
- Caldeira, S.(2013). Liposomes as Carriers of Anticancer . *Cancer Treatment - Conventional and Innovative Approaches* içinde (pp 85-124).
- Cano-sarabia, M., ve MasPOCH, D. (2015). Nanoencapsulation. *Encyclopedia of Nanotechnology*. 1–16. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-6178-0>
- Čeh, B., ve Lasic, D. D. (1997). A rigorous theory of remote loading of into liposomes: Transmembrane potential and induced pH-gradient loading and leakage of liposomes. *Journal of Colloid and Interface Science*, 185(1), 9–18. <https://doi.org/10.1006/jcis.1996.4555>



- Charcosset, C., Juban, A., Valour, J. P., Urbaniak, S., ve Fessi, H. (2015). Preparation of liposomes at large scale using the ethanol injection method: Effect of scale-up and injection devices. *Chemical Engineering Research and Design*, 94(September), 508–515. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2014.09.008>
- Cooley, T., Henry, D., Tonda, M., Sun, S., O’Connell, M., ve Rackoff, W. (2007). A Randomized, Double-Blind Study of Pegylated Liposomal Doxorubicin for the Treatment of AIDS-Related Kaposi’s Sarcoma. *The Oncologist*, 12(1), 114–123. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.12-1-114>
- Copin, J. C., Gasche, Y., ve Chan, P. H. (2000). Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase does not prevent neonatal lethality in mutant mice that lack manganese superoxide dismutase. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(10), 1571–1576. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00280-X](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00280-X)
- Costello, L. C., ve Franklin, R. B. (2006). The clinical relevance of the metabolism of prostate cancer; zinc and tumor suppression: Connecting the dots. *Molecular Cancer*, 5, 1–13. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-5-17>
- Cristiano, M. C., Cosco, D., Celia, C., Tudose, A., Mare, R., Paolino, D., ve Fresta, M. (2017). Anticancer activity of all-trans retinoic acid-loaded liposomes on human thyroid carcinoma cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 150, 408–416. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.10.052>
- D’Autréaux, B., ve Toledano, M. B. (2007). ROS as signalling molecules: Mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(10), 813–824. <https://doi.org/10.1038/nrm2256>
- Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., ... Mozafari, M. R. (2018). Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics*, 10(2), 1–17. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>
- Digman, M. A., ve Gratton, E. (2011). Lessons in fluctuation correlation spectroscopy. *Annual Review of Physical Chemistry*, 62, 645–668. <https://doi.org/10.1146/annurev-physchem-032210-103424>
- Dimov, N., Kastner, E., Hussain, M., Perrie, Y., ve Szita, N. (2017). Formation and purification of tailored liposomes for drug delivery using a module-based micro continuous-flow system. *Scientific Reports*, 7(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11533-1>

- Olusanya, T. O. B., Rita Rushdi Haj Ahmad, Daniel M. Ibegbu, James R. Smith and Amal Ali Elkordy. (2018). Liposomal Drug Delivery Systems and Anticancer Drugs. *Molecules*. 23 (907) 1–17. <https://doi.org/10.3390/molecules23040907>
- Dwyer, F. P., ve Mellor, D. P. (1964). Chelating Agents and Metal Chelates. İçinde *Journal of Chemical Education* 41(12) <https://doi.org/10.1021/ed041pa974>
- Dzakpasu, R., ve Axelrod, D. (2004). Dynamic light scattering microscopy. A novel optical technique to image submicroscopic motions. I: Theory. *Biophysical Journal*, 87(2), 1279–1287. <https://doi.org/10.1529/biophysj.103.033837>
- Eivazihollagh, A., Edlund, H., Norgren, M., ve Bäckström, J. (2018). Metal-Chelate Complexes in Alkaline Solution: On Recovery Techniques and Cellulose-based Hybrid Material Synthesis. içinde *Mid Sweden University doctoral thesis* 282. <http://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:miun:diva-33975> adresinden erişildi.
- Flanagan, R. S., Cosío, G., ve Grinstein, S. (2009). Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nature Reviews Microbiology*, 7(5), 355–366. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2128>
- Franklin, R. B. (2013). Zinc is decreased in prostate cancer:an established relationship of prostate cancer! *I6*(1), 3–8. <https://doi.org/10.1007/s00775-010-0736-9>.
- Ghavami, S., Kerkhoff, C., Los, M., Hashemi, M., Sorg, C., ve Karami-Tehrani, F. (2004). Mechanism of apoptosis induced by S100A8/A9 in colon cancer cell lines: the role of ROS and the effect of metal ions. *Journal of Leukocyte Biology*, 76(1), 169–175. <https://doi.org/10.1189/jlb.0903435>
- Ghosh, P. K. (2000). Hydrophilic polymeric nanoparticles as drug carriers. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 37(5), 273–282.
- Godić, A., Pojšak, B., Adamič, M., ve Dahmane, R. G. (2014). Corrigendum to “The Role of Antioxidants in Skin Cancer Prevention and Treatment”. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 6. <https://doi.org/10.1155/2020/1969760>
- Gregoriadis, G., da Silva, H., ve Florence, A. T. (1990). A procedure for the efficient entrapment of in dehydration-rehydration liposomes (DRVs). *International Journal of Pharmaceutics*, 65(3), 235–242. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(90\)90148-W](https://doi.org/10.1016/0378-5173(90)90148-W)
- Grumezescu, A. M. (2016). *Nanotechnology in the Agri-Food Industry*, Volume 2 (C. 2; A. M. Grumezescu, Ed.). Nikki Levy.
- Hamano, N., Negishi, Y., Omata, D., Takahashi, Y., Manandhar, M., Suzuki, R., Aramaki, Y. (2013). Bubble Liposomes and Ultrasound Enhance the Antitumor Effects of AG73 Liposomes Encapsulating Antitumor Agents. *Molecular Pharmaceutics*. 10 22–

27. <https://doi.org/10.1021/mp300463h>

- Haririan, I., Alavidjeh, M. S., Khorramizadeh, M. R., Ardestani, M. S., Ghane, Z. Z., ve Namazi, H. (2010). Anionic linear-globular dendrimer-cis-platinum (II) conjugates promote cytotoxicity in vitro against different cancer cell lines. *International Journal of Nanomedicine*, 5(1), 63–75. <https://doi.org/10.2147/ijn.s8595>
- Hashemi, M., Ghavami, S., Eshraghi, M., Booy, E. P., ve Los, M. (2007a). Cytotoxic effects of intra and extracellular zinc chelation on human breast cancer cells. *European Journal of Pharmacology*, 557(1), 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.11.010>
- Hashemi, M., Ghavami, S., Eshraghi, M., Booy, E. P., ve Los, M. (2007b). Cytotoxic effects of intra and extracellular zinc chelation on human breast cancer cells. *European Journal of Pharmacology*, 557, 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.11.010>
- Hofheinz, R., Gnad-vogt, S. U., Beyer, U., ve Hochhaus, A. (2005). Liposomal encapsulated anti-cancer. *Anti cancer Drugs*. 16(7) 691–707.
- Huang, P., Wang, C., Wu, Q., Lan, J., Song, G., Chai, Z., ve Shi, W. (2017). Uncovering the impact of ‘capsule’ shaped amine-type ligands on Am(III)/Eu(III) separation. *Physical Chemistry Chemical Physics*, <https://doi.org/10.1039/c7cp05381a>
- Ishii, K., Usui, S., Sugimura, Y., Yoshida, S., Hioki, T., Tatematsu, M., ... Hirano, K. (2001). Aminopeptidase N regulated by zinc in human prostate participates in tumor cell invasion. *International Journal of Cancer*, 92(1), 49–54. [https://doi.org/10.1002/1097-0215\(200102\)9999:9999<::AID-IJC1161>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/1097-0215(200102)9999:9999<::AID-IJC1161>3.0.CO;2-S)
- Kamboj, S., Sharma, D., Nair, A. B., Bala, S., Sharma, R. K., Kumar, V., Ansari, S. H. (2011). A simple and sensitive spectrophotometric method for estimation of diethylene triamine penta acetic acid (DTPA) in topical gel formulations. *Der Pharmacia Lettre*, 3(3), 23–28.
- Kapoor, M., Lee, S. L., ve Tyner, K. M. (2017). Liposomal Drug Product Development and Quality: Current US Experience and Perspective. *AAPS Journal*, 19(3), 632–641. <https://doi.org/10.1208/s12248-017-0049-9>
- Karabulut, H., ve Gülay, M. Ş. (2016). Antioksidanlar. *MAE Vet Fak Dergisi* 1(1).
- Karn, P. R., Cho, W., Park, H. J., Park, J. S., ve Hwang, S. J. (2013). Characterization and stability studies of a novel liposomal cyclosporin a prepared using the supercritical fluid method: Comparison with the modified conventional Bangham method. *International Journal of Nanomedicine*, 8, 365–377. <https://doi.org/10.2147/IJN.S39025>
- Kaszuba, M., McKnight, D., Connah, M. T., McNeil-Watson, F. K., ve Nobbmann, U.

- (2008). Measuring sub nanometre sizes using dynamic light scattering. *Journal of Nanoparticle Research*, 10(5), 823–829. <https://doi.org/10.1007/s11051-007-9317-4>
- Kayser, O., Lemke, A., ve Hernandez-Trejo, N. (2016). The Impact of Nanobiotechnology on the Development of New Drug Delivery Systems. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 6(1), 3–5. <https://doi.org/10.2174/1389201053167158>
- Kumari, A., Singla, R., Guliani, A., ve Yadav, S. K. (2014). Nanoencapsulation for drug delivery. *EXCLI Journal*, 13, 265–286.
- Laouini, A., Jaafar-Maalej, C., Limayem-Blouza, I., Sfar, S., Charcosset, C., ve Fessi, H. (2012). Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art. *Journal of Colloid Science and Biotechnology*, 1(2), 147–168. <https://doi.org/10.1166/jcsb.2012.1020>
- Laouini, A., Jaafar-Maalej, C., Sfar, S., Charcosset, C., ve Fessi, H. (2011). Liposome preparation using a hollow fiber membrane contactor - Application to spironolactone encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 415(1–2), 53–61. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.05.034>
- Lball, R., Bajaj, P., ve Whitehead, K. A. (2017). Achieving long-term stability of lipid nanoparticles: Examining the effect of pH, temperature, and lyophilization. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 305–315. <https://doi.org/10.2147/IJN.S123062>
- Lee, S. C., Lee, K. E., Kim, J. J., ve Lim, S. H. (2005). The effect of cholesterol in the liposome bilayer on the stabilization of incorporated retinol. *Journal of Liposome Research*, 15(3–4), 157–166. <https://doi.org/10.1080/08982100500364131>
- Leitzmann, M. F., Meir, J., Wu, K., Graham, A., Willett, W. C., ve Giovannucci, E. L. (2003). *Zinc Supplement Use and Risk of Prostate Cancer*. 95(13), 2–5.
- Li, J., Wang, X., Zhang, T., Wang, C., Huang, Z., Luo, X., ve Deng, Y. (2015). A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10(2), 81–98. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2014.09.004>
- Liou, G. Y., ve Storz, P. (2010). Reactive oxygen species in cancer. *Free Radical Research*, 44(5), 479–496. <https://doi.org/10.3109/10715761003667554>
- Maeda, H. (2012). Macromolecular therapeutics in cancer treatment: The EPR effect and beyond. *Journal of Controlled Release*, 164(2), 138–144. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.04.038>
- Magdalena, A., Pop, A., Cimpeanu, C., ve Turcus, V. (2018). *European Journal of Medicinal Chemistry Nanoencapsulation techniques for compounds and products with*

- antioxidant and antimicrobial activity A critical view.* 157, 1326–1345.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.08.076>
- Makhov, P., Golovine, K., Uzzo, R. G., Rothman, J., Crispen, P. L., Shaw, T., ... Kolenko, V. M. (2008). Zinc chelation induces rapid depletion of the X-linked inhibitor of apoptosis and sensitizes prostate cancer cells to TRAIL-mediated apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 15(11), 1745–1751. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.106>
- Mansoori, M. A., Agrawal, S., Jawade, S., ve Khan, M. I. (2012). A review on liposome. *IJARPB* 2(4), 453–464.
- Mashayekhi, M., Amanlou, M., Sadeghi, K., Mosayebniya, M., Ardestani, M. S., ve Mehravi, B. (2013). Diethylenetriaminepentaacetic Acid-deoxyglucoseamine (DTPA-DG): Novel Nanosized Anti-Wilson s Disease Cell Model. *American Journal of Biomedical Sciences*, (June 2014), 34–46. <https://doi.org/10.5099/aj130100034>
- Mendivil-Perez, M., Velez-Pardo, C., ve Jimenez-Del-Rio, M. (2012). TPEN induces apoptosis independently of zinc chelator activity in a model of acute lymphoblastic leukemia and Ex vivo acute leukemia cells through oxidative stress and mitochondria caspase-3- and AIF-dependent pathways. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/313275>
- Metsärinne, S., Rantanen, P., Aksela, R., ve Tuhkanen, T. (2004). Biological and photochemical degradation rates of diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) in the presence and absence of Fe(III). *Chemosphere*, 55(3), 379–388. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2003.10.062>
- Mosayebnia, M., Ardestani, M. S., Pasalar, P., Mashayekhi, M., ve Amanlou, M. (2014). Diethylenetriaminepenta acetic acid glucose conjugates as a cell permeable iron chelator. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics* 5(1). <https://doi.org/10.4103/0976-500X.124416>
- Mudalige, T., Qu, H., Van Haute, D., Ansar, S. M., Paredes, A., ve Ingle, T. (2018). Characterization of Nanomaterials: Tools and Challenges. içinde *Nanomaterials for Food Applications*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814130-4.00011-7>
- Mugabe, C., Azghani, A. O., ve Omri, A. (2006). Preparation and characterization of dehydration-rehydration vesicles loaded with aminoglycoside and macrolide antibiotics. *International Journal of Pharmaceutics*, 307(2), 244–250. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.10.005>
- Nagavarma, B. V. N., Yadav, H. K. S., Ayaz, A., Vasudha, L. S., ve Shivakumar, H. G. (2012). Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles- A review.

- Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 5(SUPPL. 3), 16–23.
- Nemoto, K., Kondo, Y., Himeno, S., Suzuki, Y., Hara, S., Akimoto, M., ve Imura, N. (2000). Modulation of telomerase activity by zinc in human prostatic and renal cancer cells. *Biochemical Pharmacology*, 59(4), 401–405. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(99\)00334-2](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(99)00334-2)
- Nowack, B. (2002). Environmental chemistry of aminopolycarboxylate chelating agents. *Environmental Science and Technology*, 36(19), 4009–4016. <https://doi.org/10.1021/es025683s>
- Pandey, H., Rani, R., ve Agarwal, V. (2016). Liposome and their applications in cancer therapy. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 59(December), 1–10. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2016150477>
- Patil-Gadhe, A., ve Pokharkar, V. (2014). Single step spray drying method to develop proliposomes for inhalation: A systematic study based on quality by design approach. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*, 27(2), 197–207. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2013.07.006>
- Petre, C. E., ve Dittmer, D. P. (2007). Liposomal daunorubicin as treatment for Kaposi's sarcoma. *International Journal of Nanomedicine*, 2(3), 277–288.
- Rodriguez, M. A., Pytlik, R., Kozak, T., Chhanabhai, M., Gascoyne, R., Lu, B., ... Winter, J. N. (2009). Vincristine sulfate liposomes injection (Marqibo) in heavily pretreated patients with refractory aggressive non-Hodgkin lymphoma: Report of the pivotal phase 2 study. *Cancer*, 115(15), 3475–3482. <https://doi.org/10.1002/cncr.24359>
- Rudokas, M., Najlah, M., Alhnan, M. A., ve Elhissi, A. (2016). Liposome Delivery Systems for Inhalation: A Critical Review Highlighting Formulation Issues and Anticancer Applications. *Medical Principles and Practice*, 25(2), 60–72. <https://doi.org/10.1159/000445116>
- Sharma, C., Dhiman, R., Rokana, N., ve Panwar, H. (2017). *Nanotechnology: An Untapped Resource for Food Packaging*. 8(September). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01735>
- Silverstein, T. P., ve Williamson, J. C. (2019). Liposome permeability probed by laser light scattering. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 47(3), 239–246. <https://doi.org/10.1002/bmb.21226>
- Simões, S., Nuno Moreira, J., Fonseca, C., Düzgüneş, N., ve Pedroso De Lima, M. C. (2004). On the formulation of pH-sensitive liposomes with long circulation times. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56(7), 947–965.

<https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.10.038>

- Simon, H. (2000). Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction *Apoptosis* 5(5) 415–418.
- Song, Y., Yuan, Y., Shi, X., ve Che, Y. (2020). Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Improved drug delivery and anti-tumor efficacy of combinatorial liposomal formulation of genistein and plumbagin by targeting Glut1 and Akt3 proteins in mice bearing prostate tumor. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 190(1), 110966. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.110966>
- Stuart, C. H., Singh, R., Smith, T. L., D'Agostino, R., Caudell, D., Balaji, K. C., ve Gmeiner, W. H. (2016). Prostate-specific membrane antigen-targeted liposomes specifically deliver the Zn<sup>2+</sup> chelator TPEN inducing oxidative stress in prostate cancer cells. *Nanomedicine*, 11(10), 1207–1222. <https://doi.org/10.2217/nmm-2015-0017>
- Suganya, V., ve Anuradha, V. (2017). Microencapsulation and Nanoencapsulation: A Review. *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 9(3), 233–239. <https://doi.org/10.25258/ijpcr.v9i3.8324>
- Supaporn, S. (2011). Effect of Freeze-Thawing Process on the Size and Lamellarity of PEG-Lipid Liposomes. *The Open Colloid Science Journal*, 4(1), 1–8. <https://doi.org/10.2174/1876530001104010001>
- T.C. Halk Sağlığı Kurumu. (2018). Türkiye Kanser İstatistikleri 2015. *T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Müdürlüğü* [https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanserdb/istatistik/Turkiye\\_Kanser\\_Istatistikleri\\_2015.pdf](https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanserdb/istatistik/Turkiye_Kanser_Istatistikleri_2015.pdf). adresinden erişildi
- Tila, D., Ghasemi, S., ve Yazdani-arazi, S. N. (2015). Functional liposomes in the cancer-targeted drug delivery. *Journal of Biomaterials Applications* 30(1), 3–16. <https://doi.org/10.1177/0885328215578111>
- TUIK. (2019). Ölüm ve Ölüm Nedeni İstatistikleri. <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Olum-ve-Olum-Nedeni-Istatistikleri-2019-33710> adresinden erişildi
- Tuncer, S. (2014). *Çoklu İlaça Dirençli Kanser Hücre Hattına Nanopartiküllerle İlaç Aktarımı*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.
- Tyagi, N., Rathore, S., ve Ghosh, P. (2013). Efficacy of liposomal monensin on the enhancement of the antitumour activity of liposomal ricin in human epidermoid carcinoma (KB) cells. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 75(1), 16–22.

<https://doi.org/10.4103/0250-474X.113533>

Xu, X., Wang, L., Xu, H. Q., Huang, X. E., Qian, Y. D., ve Xiang, J. (2013). Clinical comparison between paclitaxel liposome (Lipusu®) and paclitaxel for treatment of patients with metastatic gastric cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 14(4), 2591–2594. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2013.14.4.2591>

Yadav, A. V., Murthy, M. S., Shete, A. S., ve Sakhare, S. (2011). Stability aspects of liposomes. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 45(4), 402–413.

Yokuş, B., ve Çakır, D. Ü. (2012). *Kanser Biyokimyası*. 1(2), 7–18.



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

**BİLİMSEL ETİK BEYANI**

“Hücre Membranından Geçemeyen Ajanların Antiproliferatif Etkilerinin Nanoenkapsülasyon ile Modifikasyonu” başlıklı Yüksek Lisans tezindeki bütün bilgileri etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada, bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiz atıf yaptığımı bildiririm. İfade ettiklerimin aksi ortaya çıktığında ise her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

.....  
Betül KARA  
02/07/21

## ÖZ GEÇMİŞ

<b>Soyadı, Adı</b>	: KARA Betül
<b>Uyruk</b>	: T.C.
<b>Doğum yeri ve tarihi</b>	: Bodrum / 02.01.1995
<b>E-mail</b>	: betulkaraa95@gmail.com
<b>Yabancı Dil</b>	: İngilizce

## EĞİTİM

<b>Y. Lisans</b>	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Moleküler Biyoteknoloji Programı	2018-2021
<b>Erasmus</b>	University of Life Sciences in Lublin (Poland)-Food Sciences and Biotechnology	2016-2017 (Güz Dönemi)
<b>Lisans</b>	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü	2013-2018

## BURSLAR ve ÖDÜLLER

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölüm Birinciliği

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Fakülte İkinciliği

## İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Ünvan
2017-2018	Manisa/La Lorraine Unlu Mamülleri	Stajyer

## AKADEMİK YAYINLAR

### 1. MAKALELER

Boyacıoğlu O. Kara B. Tecimen S. Kılıç M. Delibaş M. Erdoğan R. Özdemir E. Bahadır A. Boyacıoğlu Örenay S. (2021). Antiproliferative Effect of *Ficus carica* Latex on Cancer Cell Lines is not solely Linked to Peroxidase-like Activity of Ficin, *European Journal of Integrative Medicine*, 45, 101348.

Boyacıoğlu O. Kara B. Can H. Yerci Naile T. Yılmaz S. Boyacıoğlu Örenay S. (2019). Leaf Hexane Extracts of Two Turkish Fig (*Ficus carica L.*) Cultivars Show Cytotoxic Effects on a Human Prostate Cancer Cell Line, *Agriculture and Food Sciences Research*, 6(1), 66-70.

### 2. PROJELER

Aydın ilinde yetişen Sarı lop incir yaprağı uçucu yağının kanser hücreleri üzerine etkisi (Tübitak 2209-A Proje Yürütücüsü)

Prostat Kanser Hücrelerine Aptamer Aracılığı ile Hedefli Çinko Şelatlayıcı Dağıtımını (Tübitak 1001 Proje Bursiyerliği)

### 3. BİLDİRİLER

#### A) Uluslararası Kongrelerde Yapılan Bildiriler

**Sözlü Bildiri** Aydın İlinde Yetişen Farklı İncir Kültürvarlarının Yaprak Hekzan Özütlelerinin Prostat Kanser Hücreleri Üzerine Etkisinin Belirlenmesi (**Kara B.** Yerci Naile Tuğçe, Boyacıoğlu Örenay S. Boyacıoğlu O.) (2018)

**Sözlü Bildiri** Prostat kanser hücrelerine aptamer aracılı hedefli çinko şelatlayıcı dağıtımı (Boyacıoğlu O. **Kara B.**, Boyacıoğlu Örenay S. (2019)

**Sözlü Bildiri** Hücre Membrandan Geçemeyen Çinko Şelatlayıcı DTPA'nın Nanoenkapsülasyon İle Transportu (**Kara B.** Boyacıoğlu Örenay S. Boyacıoğlu O.) (2020)

**Sözlü Bildiri** Lipozomal Taşıyıcı Formülasyonlar Ve Anti-Kanserojenik İlaçlar (**Kara B.** Boyacıoğlu Örenay S. Boyacıoğlu O.) (2020)

**Poster Bildiri** *Ficus carica* Yaprak N-Hekzan Özütlelerinin Antimikrobiyal Etkisi (Can H. Yılmaz S. **Kara B.** Boyacıoğlu O.) (2018)

**Poster Bildiri** *Juglans regia* L. yaprak ve yeşil kabuk ekstraktlarının *Escherichia coli* ve *Bacillus cereus* üzerindeki antimikrobiyal etkileri (Boyacıoğlu O. Büyükkayhan Y., BİÇER E.H, **Kara B.** , Boyacıoğlu Örenay S. Seda ÖRENAY BOYACIOĞLU) (2019)