

T.C.

AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**NANOLİPOZOMLAR İÇİNDE ENKAPSÜLE EDİLEN İNCİR
LATEKSİ VE FİSİN ENZİMİNİN HT-29 İNSAN KOLON
KANSER HÜCRE HATTINDA İNCELENMESİ**

SEÇİL TECİMEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Olcay BOYACIOĞLU

AYDIN-2021

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans hayatım boyunca bilgi ve tecrübesi ile bana yol gösteren, birikimleri ile beni yönlendiren değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Olcay BOYACIOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez kapsamında boyut analizleri için bana imkan sağlayan Prof. Dr. Hilal ŞAHİN NADEEM ve Arş. Gör. Dilara KONUK TAKMA'ya, laboratuvar imkânlarından yararlanmamı sağlayan Prof. Dr. Özge ÇEVİK'e ve Adnan Menderes Üniversitesi Bilim Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne teşekkürü borç bilirim.

Yüksek lisans çalışmalarım boyunca bana destek olan Betül KARA, Cansu ERGENÇ, Enis ÇETİN, Ezgi YILMAZ, Mehmet AKTAŞ ve Sena ANAKIZ'a teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman yanımda olan ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen annem Sema TECİMEN ve babam Suat TECİMEN'e en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Seçil TECİMEN

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xv
1.GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
2.1. İncir (<i>Ficus carica L.</i>).....	3
2.1.1 İncir Çeşitleri.....	4
2.1.1.1 Sarı Lop	4
2.1.1.2 Aydın Siyahı (Bursa Siyahı).....	5
2.1.2 İncir Lateksi (İncir Sütü).....	5
2.1.3 Fisin Enzimi	6
2.2. Nanoteknoloji ve Nanoenkapsülasyon.....	6
2.2.1. Nanolipozomlar	7
2.2.2. Nanolipozomların Oluşum Mekanizmaları	8
2.2.3. Nanolipozom Hazırlama Yöntemleri	8
2.2.4. Nanolipozomların Hazırlanmasında Kullanılan Malzemeler.....	9
2.2.4.1. Fosfolipitler	9
2.2.4.2. Kolesterol	9
2.2.5. Nanolipozomların Karakterizasyonu	10
2.2.5.1. Boyut	10

2.2.5.2. Zeta Potansiyeli	10
2.2.5.3. Enkapsülasyon Verimi.....	10
2.3. Kanser	11
2.3.1 Kolon Kanseri	12
2.3.2. HT-29 Kolon Kanser Hücre Hattı	13
2.4. Hücre Kültürü	13
2.4.1. Hücre Kültürü Bileşenleri	14
2.4.1.1. Hücre Kültürü Besiyeri.....	14
2.4.1.2. Serum.....	14
2.4.1.3. Substrat	15
2.4.1.4. Fiziki Ortam.....	15
2.4.2. In Vitro Sitotoksosite Testleri	15
2.4.2.1. Mtt Yöntemi	15
2.4.2.2. ATP Biyoluminesans Testi.....	16
2.4.3. Hücre Ölüm Mekanizmaları.....	16
2.4.3.1. Apoptoz	17
2.4.3.2. Nekroz	17
2.4.3.3. Otofaji ile İlişkili Hücre Ölümü	17
3. MATERYAL VE YÖNTEM	18
3.1. Materyal	18
3.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler	18
3.1.2.Kullanılan Cihazlar	19
3.2. Yöntem.....	20
3.2.1. İncir Lateksi Toplanması ve Liyofilizasyonu	20
3.2.2. Lipozom Yapımı	21
3.2.3. Lipozom Karakterizasyonu	21
3.2.3.1. Lipozomal Fisın Enzimi ve İncir Latekslerinin Boyut Analizi	21

3.2.3.2. İncir Lateksleri ve Fisin Enziminin Peroksidaz Benzeri Aktivitesi	21
3.2.3.3. Lipozomal İncir Lateksleri ve Fisinin Konsantrasyonu ve Enkapsülasyon Verimi	22
3.2.4 Hücre Kültürü.....	23
3.2.4.1 Hücre Pasajlama İşlemi	23
3.2.4.2 Fisin ve İncir Latekslerinin MTT ile Sitotoksosite Analizi.....	23
3.2.4.3 Lipozomal Fisin ve İncir Latekslerinin Lüminesans Yöntem ile Sitotoksosite Analizi	24
3.2.4.4. Lipozomal Fisin ve İncir Latekslerinin Apoptotik Etkisinin Analizi	25
3.2.5. İstatistik Analiz.....	25
4. BULGULAR	26
4.1. İncir Lateksleri ve Fisin Enziminin Peroksidaz Benzeri Aktivitesinin Belirlenmesi	26
4.1.1. Fisin Enziminin Farklı Konsantrasyonlarda Peroksidaz Benzeri Aktivitesi.....	26
4.1.2. Fisin Enziminin Farklı İnkübasyon Sürelerinde Peroksidaz Benzeri Aktivitesi.....	27
4.1.3. Fisin Enziminin Farklı Sıcaklık Değerlerinde Peroksidaz Benzeri Aktivitesi.....	29
4.1.4. PBS ile Hazırlanan Fisin Enziminin Farklı Konsantrasyonlarda Peroksidaz Benzeri Aktivitesi.....	31
4.1.5. İncir Latekslerinin Farklı Konsantrasyonlarda Peroksidaz Benzeri Aktivitesi.....	34
4.1.6. PBS ile Hazırlanan İncir Latekslerinin Farklı Konsantrasyonlarda Peroksidaz Benzeri Aktivitesi.....	37
4.2. Lipozomal İncir Lateksleri ve Fisin Enziminin Karakterizasyonu	40
4.2.1. Lipozomal İncir Lateksleri ve Fisinin Konsantrasyonu ve Enkapsülasyon Verimi	40
4.2.2. Lipozomal Fisin Enzimi ve İncir Latekslerinin Boyut Analizi.....	43
4.3. Fisin ve İncir Latekslerinin MTT ile Sitotoksosite Analizi	48
4.4. Lipozomal Fisin ve İncir Latekslerinin Lüminesans Yöntem Sitotoksosite Analizi	51
4.5. Lipozomal Fisin ve İncir Latekslerinin Apoptotik Etkisinin Analizi	55
5. TARTIŞMA.....	59
5.1. İncir Lateksleri ve Fisin Enziminin Peroksidaz Benzeri Aktivitesinin Belirlenmesi	59

5.2. Lipozom Yapımı	60
5.3. Lipozomal İncir Lateksleri ve Fisinin Karakterizasyonu	61
5.3.1. Lipozomal İncir Lateksleri ve Fisinin Konsantrasyonu ve Enkapsülasyon Verimi	61
5.3.2. Lipozomal Fisinin Enzimi ve İncir Latekslerinin Boyut Analizi	62
5.4. Fisinin ve İncir Latekslerinin MTT ile Sitotoksikite Analizi	63
5.5. Lipozomal Fisinin ve İncir Latekslerinin Lüminesans Yöntem Sitotoksikite Analizi	64
5.6. Lipozomal Fisinin ve İncir Latekslerinin Apoptotik Etkisinin Analizi	65
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	66
7. KAYNAKLAR.....	67
BİLİMSEL ETİK BEYANI	76
ÖZ GEÇMİŞ.....	77

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ANOVA	: Varyans analizi
CHO	: Kolesterol
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	:Dimetil Sülfoksit
DSPC	:Disteroil Fosfatidilkolin
ECM	:Ekstraselüler Matriks
%EE	: Enkapsülasyon Verimi
FAO	: Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
FBS	:Fetal Sığır Serumumu
g	: Gram
GCO	: Küresel Kansere Gözlemevi
HSFK	:Hidrojen Soya Fosfatidilkolin
IC50	:Hücrelerin %50'sinin Öldüğü İnhibitör Konsantrasyonu
kDa	:Kilodalton
keV	:Kiloelektronvolt
m	: Metre
mM	:Milimolar
M	:Molarite
M199	:Medium 199
MEB	:Milli Eğitim Bakanlığı
MEM	:Eagle's Minimum Essential Media
mg	:Miligram
ml	:Mililitre

μm	: Mikrometre
MTT	: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
mV	:Milivolt
nm	:Nanometre
OD	:Optik Yoğunluk
P	:İstatistiki anlamlılık seviyesi
PBS	:Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
PDI	:Polidispersite İndeksi
TMB	:3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
TÜİK	:Türkiye İstatistik Kurumu
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. 2019 Yılında Dünyada İncir Üretimi.....	4
Şekil 2.2. 2020 yılında dünyada en sık görülen kanser vakaları ve ölüm sayıları.....	11
Şekil 2.3. 2020 yılında Türkiye'de en sık görülen kanser vakaları ve ölüm sayıları.....	12
Şekil 3.1. Yöntem Basamakları.....	20
Şekil 4.1. Fisın enziminin farklı konsantrasyonlarda peroksidaz benzeri aktivitesi ile oluşan absorbands değeri.....	27
Şekil 4.2. Fisın enziminin farklı inkübasyon sürelerinde peroksidaz benzeri aktivitesi ile oluşan absorbands değeri.....	28
Şekil 4.3. Fisın enziminin farklı sıcaklık değerlerinde peroksidaz benzeri aktivitesi ile oluşan absorbands değeri.....	30
Şekil 4.4. Fisın konsantrasyonu artışı ile peroksidaz benzeri aktivitesine bağlı oluşan renk artışı.....	33
Şekil 4.5. PBS içerisinde seyreltilen fisın enziminin peroksidaz benzeri aktivitesi ile oluşan absorbands değeri.....	34
Şekil 4.6. Saf su ile hazırlanan ve seyreltilen Sarı Lop incir lateksinin peroksidaz benzeri aktivitesi ile oluşan absorbands değeri.....	35
Şekil 4.7. Saf su ile hazırlanan ve seyreltilen Aydın Siyahı incir lateksinin peroksidaz benzeri aktivitesi ile oluşan absorbands değeri.....	36
Şekil 4.8. PBS ile hazırlanan Sarı Lop incir lateksinin peroksidaz benzeri aktivitesi ile oluşan absorbands değeri.....	38
Şekil 4.9. PBS ile hazırlanan Aydın Siyahı incir lateksinin peroksidaz benzeri aktivitesi ile oluşan absorbands değeri.....	39
Şekil 4.10. Lipozomal fisının miktar, konsantrasyon ve verim hesaplamaları için yapılan ölçümler	42
Şekil 4.11. Kontrol için boyut analizi sonuçları.....	44
Şekil 4.12. Kontrol için zeta potansiyel sonuçları.....	44

Şekil 4.13. Lipozomal fisin enzimi boyut analizi sonuçları.....	45
Şekil 4.14. Lipozomal fisin enzimi zeta potansiyel sonuçları.....	45
Şekil 4.15. Lipozomal Sarı Lop lateksi boyut analizi sonuçları.....	46
Şekil 4.16. Lipozomal Sarı Lop lateksi zeta potansiyel sonuçları.....	46
Şekil 4.17. Lipozomal Aydın Siyahı lateksi boyut analizi sonuçları.....	47
Şekil 4.18. Lipozomal Aydın Siyahı lateksi zeta potansiyel sonuçları.....	47
Şekil 4.19. Fisin enziminin MTT ile sitotoksisite analizi.....	48
Şekil 4.20. Sarı Lop incir lateksinin MTT ile sitotoksisite analizi.....	49
Şekil 4.21. Aydın Siyahı incir lateksinin MTT ile sitotoksisite analizi.....	50
Şekil 4.22. Fisin ve lipozomal fisinin lüminesans yöntem sitotoksisite analizi.....	52
Şekil 4.23. Sarı Lop ve lipozomal Sarı Lop lüminesans yöntem sitotoksisite analizi.....	53
Şekil 4.24. Aydın Siyahı ve lipozomal Aydın Siyahı lüminesans yöntem sitotoksisite analizi.....	54
Şekil 4.25. Fisin ve lipozomal fisin uygulamalarında apoptoz seviyesi.....	56
Şekil 4.26. Sarı Lop incir lateksi ve lipozomal Sarı Lop incir lateksi uygulamalarında apoptoz seviyesi.....	57
Şekil 4.27. Aydın Siyahı incir lateksi ve lipozomal Aydın Siyahı incir lateksi uygulamalarında apoptoz seviyesi.....	58

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Nanolipozomların avantajları.....	7
Çizelge 4.1. Saf su içerisinde hazırlanan ve seyreltilen fisin enziminin peroksidaz benzeri aktivitesi ile oluşan absorbans değeri.....	26
Çizelge 4.2. Fisin enziminin 3,5 saat inkübasyon boyunca peroksidaz benzeri aktivitesi ile oluşan absorbans değeri.....	28
Çizelge 4.3. Fisin enziminin 30 °C inkübasyon sıcaklığında peroksidaz benzeri aktivitesi ile oluşan absorbans değeri.....	29
Çizelge 4.4. Fisin enziminin 35 °C inkübasyon sıcaklığında peroksidaz benzeri aktivitesi ile oluşan absorbans değeri.....	29
Çizelge 4.5. 30 °C ve 35 °C olmak üzere iki farklı inkübasyon sıcaklığının t testi ile karşılaştırılması.....	30
Çizelge 4.6. PBS ile hazırlanan ve saf su içerisinde seyreltme işlemi yapılan fisin enziminin peroksidaz benzeri aktivitesi ile oluşan absorbans değeri.....	31
Çizelge 4.7. PBS ile hazırlanan ve PBS içerisinde seyreltme işlemi yapılan fisin enziminin peroksidaz benzeri aktivitesi ile oluşan absorbans değeri.....	32
Çizelge 4.8. Saf su ve PBS olmak üzere iki farklı çözücünün t testi ile karşılaştırılması.....	33
Çizelge 4.9. Saf su ile hazırlanan ve saf su içerisinde seyreltme işlemi yapılan Sarı Lop incir lateksinin peroksidaz benzeri aktivitesi ile oluşan absorbans değeri	34
Çizelge 4.10. Saf su ile hazırlanan ve saf su içerisinde seyreltme işlemi yapılan Aydın Siyahı incir lateksinin peroksidaz benzeri aktivitesi ile oluşan absorbans değeri	35
Çizelge 4.11. Saf su ile hazırlanan ve seyreltilen Sarı Lop ve Aydın Siyahı incir latekslerinin peroksidaz benzeri aktivitesi ile oluşan absorbans değerlerinin t testi ile karşılaştırılması.....	36
Çizelge 4.12. PBS ile hazırlanan ve seyreltilen Sarı Lop incir lateksinin peroksidaz benzeri aktivitesi ile oluşan absorbans değeri.....	37
Çizelge 4.13. PBS ile hazırlanan ve seyreltilen Aydın Siyahı incir lateksinin peroksidaz benzeri aktivitesi ile oluşan absorbans değeri.....	38

Çizelge 4.14. Sarı Lop ve Aydın Siyahı olmak üzere iki farklı incir lateksinin peroksidaz benzeri aktivitelerinin t testi ile karşılaştırılması.....	39
Çizelge 4.15. Lipozomal incir lateksleri ve fisinin konsantrasyonu, miktarı ve enkapsülasyon verimi.....	41
Çizelge 4.16. Lipozomal fisin enzimi ve incir latekslerinin boyut analizi.....	43
Çizelge 4.17. Fisin enziminin HT-29 hücre hattı üzerinde muamele süresi ve konsantrasyona bağlı olarak değişen hücre canlılık sonuçları.....	48
Çizelge 4.18. Sarı Lop incir lateksinin HT-29 hücre hattı üzerinde muamele süresi ve konsantrasyona bağlı olarak değişen hücre canlılık sonuçları.....	49
Çizelge 4.19. Aydın Siyahı incir lateksinin HT-29 hücre hattı üzerinde muamele süresi ve konsantrasyona bağlı olarak değişen hücre canlılık sonuçları.....	50
Çizelge 4.20. Aydın Siyahı ve Sarı Lop incir latekslerinin sitotoksik etkilerinin t testi ile karşılaştırılması.....	51
Çizelge 4.21. Fisin ve lipozomal fisinin HT-29 hücre hattı üzerinde muamele süresi ve konsantrasyona bağlı olarak değişen hücre canlılık sonuçları.....	52
Çizelge 4.22. Sarı Lop incir lateksinin ve lipozomal Sarı Lop incir lateksinin HT-29 hücre hattı üzerinde muamele süresi ve konsantrasyona bağlı olarak değişen hücre canlılık sonuçları.....	53
Çizelge 4.23. Aydın Siyahı ve lipozomal Aydın Siyahı incir lateksinin HT-29 hücre hattı üzerinde muamele süresi ve konsantrasyona bağlı olarak değişen hücre canlılık sonuçları.....	54
Çizelge 4.24. Fisin ve lipozomal fisinin HT-29 hücre hattı üzerinde muamele süresi ve konsantrasyona bağlı olarak değişen apoptoz seviyesi.....	55
Çizelge 4.25. Sarı Lop incir lateksinin ve lipozomal Sarı Lop incir lateksinin HT-29 hücre hattı üzerinde muamele süresi ve konsantrasyona bağlı olarak değişen apoptoz seviyesi.....	56
Çizelge 4.26. Aydın Siyahı ve lipozomal Aydın Siyahı incir lateksinin HT-29 hücre hattı üzerinde muamele süresi ve konsantrasyona bağlı olarak değişen apoptoz seviyesi.....	57

ÖZET

NANOLİPOZOMLAR İÇİNDE ENKAPSÜLE EDİLEN İNCİR LATEKSİ VE FİSİN ENZİMİNİN HT-29 İNSAN KOLON KANSER HÜCRE HATTINDA İNCELENMESİ

Tecimen S. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2021.

Amaç: Bu çalışmanın amacı, nanolipozomlar içerisinde enkapsüle edilen incir lateksi ve fisin enziminin HT-29 insan kolon kanser hücre hattı üzerindeki antiproliferatif etkilerini incelemektir.

Materyal ve Yöntem: Araştırma, Sarı Lop ve Aydın Siyahı incir çeşitlerinden elde edilen lateksleri ve ticari olarak satın alınan fisin enzimi ile gerçekleştirilmiştir. İnce film hidrasyon yöntemi ile incir lateksleri ve fisin enzimi nanolipozomlar içerisinde enkapsüle edilmiş ve karakteristik özellikleri belirlenmiştir. Son olarak, hazırlanan lipozomların sitotoksik ve apoptik etkileri HT-29 insan kolon kanseri hücre hattı üzerinde incelenmiştir.

Bulgular: Boyut analizleri sonucunda istenilen boyut aralıklarında ve zeta potansiyel değerlerinde nanolipozomlar elde edilememiştir. Polidispersite indeksi literatürde belirtilen değerlere uygun olarak bulunmuştur. Fisin enzimi ve incir lateksleri HT-29 hücre hattı üzerinde sitotoksik etki göstermiştir. Lipozomal fisin ve incir latekslerinde yüksek oranda azatılmış sitotoksik etki görülmüştür. Fisin enzimi ve incir latekslerinde, kontrol grubu olarak kullanılan besiyeri ile kıyaslandığında artan apoptoz seviyesi gözlemlenmiştir. Lipozomal fisin ve incir latekslerinde ise apoptoz seviyelerinde önemli değişiklikler tespit edilmemiştir.

Sonuç: Lipozomal enkapsülasyonun hem fisin enzimi hem de incir latekslerinde toksik etkiyi yüksek oranda maskelediği tespit edilmiştir. Sağlık alanında yapılacak çalışmalarda incir lateksi, fisin enzimi ve lipozomal formülasyonlarının uygun adaylar olabileceği gözlemlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Enkapsülasyon, Fisin, İncir Lateksi, Lipozom, Sitotoksiste

ABSTRACT

INVESTIGATION OF FIG LATEX AND FICIN ENZYME ENCAPSULATED IN NANOLIPOSOMES ON HT-29 HUMAN COLON CANCER CELL LINE

Tecimen S.Aydın Adnan Menderes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences, Department of Food Engineering, Master Thesis, Aydın, 2021.

Objective: The aim of this study is to examine the antiproliferative effects of fig latex and ficin enzyme encapsulated in nanoliposomes on HT-29 human colon cancer cell line.

Material and Methods: The research was carried out with latex obtained from Sarı Lop and Aydın Siyahı fig cultivars and commercially purchased ficin enzyme. Fig latex and ficin enzyme were encapsulated in nanoliposomes by thin-film hydration method and their characteristics were determined. Finally, the cytotoxic and apoptic effects of the prepared liposomes were investigated on the HT-29 human colon cancer cell line.

Results: As a result of the size analysis, nanoliposomes could not be obtained in the desired size ranges and zeta potential values. Polydispersity index was found in accordance with the values stated in the literature. Ficin enzyme and fig latex showed cytotoxic effect on HT-29 cell line. A highly reduced cytotoxic effect was observed in liposomal ficin and fig latex. An increased level of apoptosis was observed in ficin enzyme and fig latex compared to the medium used as the control group. Significant changes in apoptosis levels were not detected in liposomal ficin and fig latex.

Conclusion: It was determined that liposomal encapsulation highly masked the toxic effect in both ficin enzyme and fig latex. It has been observed that fig latex, ficin enzyme and liposomal formulations may be suitable candidates in studies in the field of health.

Keywords: Encapsulation, Ficin, Fig Latex, Liposome, Cytotoxicity

1.GİRİŞ

Dünyadaki gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde en ciddi sağlık sorunlarından biri kanserdir (Uz vd., 2016). Küresel olarak, 6 ölümden 1'i kansere bağlıdır (Dünya Sağlık Örgütü [WHO], 2021). Kolorektal kanserler her yıl dünya üzerinde 700.000'den fazla ölümle sonuçlanan en sık görülen kanser türlerinden bir tanesidir. Bu hastalığın tedavisinde en önemli dezavantaj ise tedavide kullanılan ve tedavinin etkinliğini etkileyen, kemoterapötiklere karşı geliştirilmiş olan dirençtir (Soltana vd., 2019).

İnsan ve hayvan hücreleri üzerinde biyolojik faaliyet gösteren bitki ürünleri, eski tıbbi uygulamalarda gösterildiği gibi, hastalıkları tedavi etme konusundaki doğal potansiyelleri nedeniyle her zaman aranmaktadır (Uz vd., 2016). Günümüzde kanser ilaçları üzerine yapılan araştırmaların çoğu, bitki ve bitki kaynaklı doğal bileşiklere odaklanmaktadır (Shukla vd., 2018).

İncir, yiyecek ve ilaç olarak kullanılmak üzere ılıman bölgelerin güney kısımlarında yetiştirilmektedir (Raskovic ve Polovic, 2016). İncir ağacı lateks olarak bilinen bir madde üretmektedir (Lazreg Aref vd., 2011). İncir lateksi (incir sütü), kanser, enflamatuar hastalıklar, bakteriyel ve gastrointestinal nematod enfeksiyonları, siğiller ve cilt hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır (Raskovic ve Polovic, 2016). Lateks, apoptozun indüklenmesi ve hücre döngüsünün inhibisyonu gibi çeşitli mekanizmalarla kanser karşıtı etkiler sunmaktadır (Ghanbari vd., 2019). Ayrıca, incir ağacı lateksinden fisin olarak adlandırılan bir enzim izole edilebilmektedir. Bu enzim, hem proteaz hem de peroksidaz aktivitelerine sahiptir (Cho vd., 2019). Fisin enzimi bir sistein proteinazdır ve sistein proteinazlar, kanser hücrelerinin apoptozuna yol açan bir grup enzimdir (Hashemi vd., 2011).

Lateks salgısının yaralar, böcekler ve mikroorganizmalar gibi zararlılara karşı bir savunma mekanizması olduğu öne sürülmüştür (Raskovic ve Polovic, 2016). Yapılan bir çalışmada, incir ağacı lateksinin mide kanseri hücre hattına etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada incir lateksi, kanser hücre hattının çoğalmasını inhibe etmiş, ancak normal hücrelere karşı herhangi bir sitotoksik aktivite göstermemiştir. Kanser hücreleri bu latekse normal hücrelerden daha duyarlı iken *Ficus carica*'nın antikanser hücre aktivitesine sahip olabileceği sonucuna varılmıştır (Hashemi vd., 2011). Başka bir çalışmada, incir ağacı lateksinin 2,5, 5 ve 10 mg/ml olmak üzere üç farklı konsantrasyonda özofagus kanseri hattı üzerindeki çoğalmaya karşı etkisi incelenmiştir. İncir ağacı lateksinin kanserli hücre üremesinin inhibisyonu için potansiyel bir

ajan olabileceği ve klinik çalışmalarda aynı etkiye sahip olabileceği sonucuna varılmıştır (Hashemi ve Abediankenari, 2013). Bununla beraber Rubnov vd. (2001), incir lateksinin pek çok kanser türünün hücre hattında antiproliferatif etkinliğini tespit etmiştir (Rubnov vd., 2001). Son olarak bizim laboratuvarımızda yapılan çalışmalarda Aydın'da yetiştirilen Sapı Lop ve Aydın Siyahı (Bursa Siyahı) incir kültürlerinden toplanan incir latekslerinin iki farklı insan kanser hücre hattı üzerindeki doza ve zamana bağlı artış gösterir şekilde sitotoksik etkileri tespit edilmiştir. Aydın Siyahı incir lateksi Sarı Lop incir lateksine göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha fazla sitotoksikite göstermiştir. Hücre hatları arasında ise kolon (HT-29) kanser hücre hattının prostat (PC3) kanser hücre hattına göre incir lateksi uygulamasına karşı daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir (Boyacıoğlu vd., 2021).

Doğal kaynaklardan izole edilmiş antikanser ilaçlarda kısa yarılanma ömrü, yüksek metabolik kararsızlık, zayıf emilim ve düşük biyoyararlanıma sebep olan düşük çözünürlük gibi zorluklarla karşılaşmaktadır. Ayrıca, ilaç direnci, ilacın hızlı bozunması, yüksek dozaj gereksinimi ve istenmeyen toksisite de mevcut zorluklardandır. Nanofarmasötikler üzerine yapılan araştırmalar bu zorlukların üstesinden gelmeye yardımcı olmuştur (Nwokwu vd., 2017). Nanoenkapsülasyon yoluyla, bazı maddelerin hedeflenmesi ve etkilerinin güçlendirilmesi mümkündür (Santos vd., 2013). Hücre membranına olan yapısal benzerliği, lipozomları diğer nanoenkapsülasyon yöntemlerinden ayıran en önemli özelliğidir. Böylelikle, hücre içi çalışmalarda bazı biyoaktif ajanların vücutta spesifik alanlara dağıtımı ve salınımı gerçekleştirilebilmektedir (Kırtıl ve Öztop, 2014). Bu bilgiler ışığında bu çalışmada incir lateksi ve fisinin lipozomal formülasyonlarının HT-29 insan kolon kanseri hücre hattı üzerinde test edilmesine karar verilmiştir.

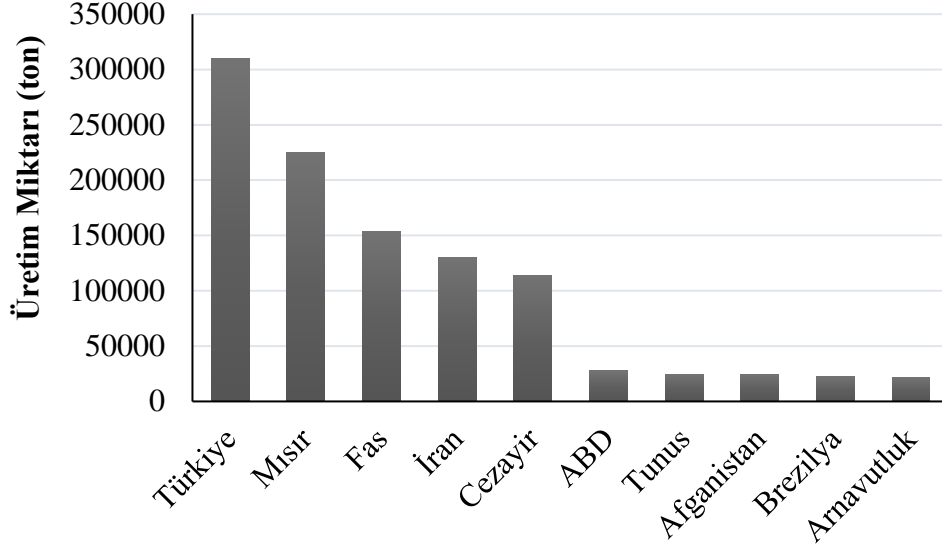
2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. İncir (*Ficus carica* L.)

Ficus (*Moraceae*) cinsi, dünya çapında tropikal ve alt tropikal bölgelerde 800'den fazla ağaç, epifit ve çalı türü ile en büyük kapalı tohumlu cinslerden birini oluşturur (Badgujar vd., 2014). *Ficus carica* L., yaklaşık 40 cinse ayrılmış 1400'den fazla tür içeren *Moraceae* ailesine ait diploid ($2n = 26$) bir türdür (Lazreg-Aref vd., 2018). *F. carica*, *Ficus* cinsinin en popüler üyesidir ve 135'den fazla isimle bilinir (Badgujar vd., 2014). Türkiye'de yaygın olarak incir olarak adlandırılır. İncir, dünyanın bilinen en eski meyve ağaçlarından biridir (Singh vd., 2015). Olgunluktaki incir ağacı yüksekliği tipik olarak 3 ile 10 m arasındadır (Stover vd., 2007). İncirin olgun meyvelerinin rengi, koyu mordan, yeşil-sarıya değişmektedir. Taze olarak tüketiminde ise kabuk kısmı soyulmakta sadece etli, iç kısmı tüketilmektedir (Akarca ve Tomar, 2019).

İhracatta önemli yeri olan incirin ülke ekonomisine katkısı her geçen yıl artmaktadır (Milli Eğitim Bakanlığı [MEB], 2013). Türkiye, dünyada incir üretiminin en çok yapıldığı ülkedir. Ayrıca üretimin büyük bir çoğunluğu Aydın ilinde yapılmaktadır. Dünyada 2019 yılında 1.315.588 ton, Türkiye'de ise 310.000 ton incir üretilmiştir (Şekil 2.1). Dünyadaki incir üretiminin %26'sı Türkiye'de gerçekleşmiştir (Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü [FAO], 2021). 2019 yılında Aydın'da ise 190.445 ton incir üretimi gerçekleşmiştir. Türkiye'deki üretimin yaklaşık olarak %61'i Aydın ilinde yapılmaktadır (Türkiye İstatistik Kurumu [TÜİK], 2021).

İncirin taze bitki materyalleri, ham özleri ve izole edilmiş bileşenleri, kayda değer biyolojik aktivitelere sahiptir (Badgujar vd., 2014; Lazreg-Aref vd., 2018). Anemi, kanser, diyabet, karaciğer hastalıkları, felç, cilt hastalıkları ve ülserler gibi çeşitli rahatsızlıkların tedavisi için iyi bir geleneksel tıp kaynağı olarak ortaya çıkmıştır (Badgujar vd., 2014). Yıllar geçtikçe, bu tıbbi değerler ve biyolojik aktiviteler, flavonoidler, fenolik bileşikler, fitosteroller ve yağ asitleri gibi aktif ikincil metabolitlerin varlığı ile açıklanmıştır (Lazreg-Aref vd., 2018). Çoğunlukla bu fitokimyasallar latekste bulunmaktadır ve bunu yapraklar, meyveler ve kök izlemektedir (Badgujar vd., 2014).



Şekil 2.1. 2019 Yılında Dünyada İncir Üretimi (TÜİK, 2021)

2.1.1 İncir Çeşitleri

İncir çeşidi bakımından ülkemiz zengin bir çeşitliliğe sahiptir (Tarım ve Orman Bakanlığı, 2021). Ilıman kışlar ve sıcak, kurak yazlar ile Akdeniz iklimlerine iyi bir şekilde adapte olan incir, taze (sofralık) ve kurutmalık olarak ayrılmaktadır (Singh vd., 2015; Duman ve Yazıcı, 2018). Aydın Siyahı, Bardakçı, Sultan Selim, Morgüz, Yeşilgüz, Kavak ve Horasan ülkemizde üretilen taze incirlere örnek olarak verilebilir. Sarı Lop, Sarı Zeybek ve Halebi çeşidi ise ülkemizde üretilen kurutmalık çeşitlere örnek verilebilir (Tarım ve Orman Bakanlığı, 2021). Sarı Lop kurutmalık incir çeşidi olarak, Morgüz ve Aydın Siyahı sofralık incir çeşidi olarak en çok ihracatı yapılan incir çeşitleridir (Duman ve Yazıcı, 2018).

2.1.1.1 Sarı Lop

Sarı Lop incir çeşidi, iklim isteklerinden dolayı yoğun olarak Aydın ve İzmir yörelerinde yetiştirilmektedir (Tarım ve Orman Bakanlığı, 2021; Duman ve Yazıcı, 2018). İri meyvelere ve açık sarı renkli ince bir kabuğa sahiptir (Çatmadım, 2014). Temmuz sonu ağustos başı ilk olgunlaşma meydana gelirken, olgunlaşma eylül ayı sonunda tamamlanır. Yaklaşık olarak 40 ile 45 gün arasında hasat edilir (MEB, 2013). Bu incir çeşidi genellikle kurutmaya yönelik olarak yetiştirilir ve kuru incir olarak ticari açıdan büyük öneme sahiptir. Ege bölgesinde Büyük

ve Küçük Menderes havzalarında yaklaşık olarak 6 milyon Sarı Lop çeşidine ait incir ağacı olduğu bildirilmiştir (Çatmadım, 2014).

2.1.1.2 Aydın Siyahı (Bursa Siyahı)

Sarı Lop incir çeşidinden sonra en fazla üretim potansiyeline sahip incir çeşididir (Çatmadım, 2014). Bursa ve Aydın çevresinde yaygın olarak taze tüketim amacıyla üretilir. Ege bölgesinde ağustos başından ekim ayı ortalarına kadar olgunlaşma devam ederken, Bursa'da olgunlaşma daha geç tamamlanır. İri, yuvarlak meyvelere ve mor, morumsu siyah kabuk rengine sahiptir (MEB, 2013). Geç olgunlaşma dönemine ve nemli bölgelerde yetişmesine rağmen çatlama ve yarıma görülmez (Çatmadım, 2014; MEB, 2013).

2.1.2 İncir Lateksi (İncir Sütü)

Çeşitli bitkilerin özelleşmiş kanallarından hasar üzerine sızan yapışkan emülsiyonlar lateks olarak adlandırılır (Oliveira vd., 2010). İkincil metabolit olarak bitki lateksi, yaklaşık 12.000 bitki türünün latisifer hücrelerinden salgılanır. İncir lateksi, olgunlaşmamış incir meyvelerinden, yapraklarından, dallarından ve saplarından elde edilebilmektedir (Philip vd., 2011). Asidik özellikte, beyaz renkli viskoz bir sıvıdır (Akarca ve Tomar, 2019). Lateks, 6,5-8,5 pH aralığında aktif olan sistein proteinaz enzimine sahiptir (Hashemi vd., 2011). Ancak keratolitik ve korozif etkileri sebebiyle lateks direkt olarak tüketilememektedir. İnsanlar tarafından tüketimi, sadece düşük miktarlarda taze meyveler yoluyla olmaktadır (Oliveira vd., 2010).

Bitki lateksi, çeşitli miktarlarda alkaloidler, tanenler, proteinazlar, polifenoller ve hidrolitik enzimler içerir (Ghandehari ve Fatemi, 2018). Bitkilerde, bu bileşikler bitkiler, böcekler ve çevre arasındaki etkileşimde rol oynar. Ayrıca latekste bulunan bu bileşikler, küçük miktarlarda bile insan sağlığı açısından ilgi çekicidir (Oliveira vd., 2010). Lateks aktivitesinin ilk bilimsel araştırması 1940'larda Ullman ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Farelere enjekte edilen yüksek dozlarda incir lateksi öldürücü olarak bulunurken, sarkom taşıyan farelere enjekte edilen daha düşük dozlar, tümörün büyümesinin engellenmesine ve hatta küçük tümörlerin kaybolmasına neden olmuştur (Rubnov vd., 2001). Ayrıca, farklı bitki latekslerinin antiviral, antibakteriyel ve antifungal potansiyelleri doğrulanmıştır. Yapılan çalışmalarda, incir

lateksinin antikanser etkisi özofagus kanseri, glioblastoma, hepatosellüler karsinom, mide kanseri ve HeLa hücre hattına karşı kanıtlanmıştır (Ghandehari ve Fatemi, 2018).

2.1.3 Fisin Enzimi

Fisin, incir lateksi gibi incir bitkisinin önemli bir bileşenidir (Huang vd., 2008). Fisin, incir ağaçlarının (*F. glabrata* ve *F. carica* türleri) lateksinde bulunan proteolitik bir enzimdir (Raskovic & Polovic, 2016). Fisinin otolizi ile 14-18 kDa arasında moleküler ağırlıklarına sahip peptitler oluşur. Enzimin aktif merkezi, katalitik sistein ve histidin olmak üzere iki aminoasitten oluşur (Siar vd., 2017). Sistein proteinazlar, kanser hücrelerinin apoptozuna yol açan bir grup enzimdir (Hashemi vd., 2011).

İncir lateksinin etnofarmasötik kullanımlarının çoğu, fisin aktivitesine atfedilmektedir (Raskovic ve Polovic, 2016). Hem proteaz hem de peroksidaz aktivitelerine sahip olan enzim geniş bir sıcaklık ve pH aralığında aktivite göstermektedir (Cho vd., 2019; Huang vd., 2008). Fisin, 67-82 °C optimum sıcaklık aralığı ile yüksek bir termal stabiliteye sahiptir. Ayrıca yapılan çalışmalarda, 5,0-8,5 pH aralığında başarıyla kullanılmıştır (Siar vd., 2017).

2.2. Nanoteknoloji ve Nanoenkapsülasyon

Nanoteknoloji, nanometre ölçeğinde malzeme, cihaz veya sistemlerin oluşturulması, kullanılması ve manipülasyonu olarak tanımlanır. Nanoteknoloji; renk, tat, tekstür ve yapıyı iyileştirme, biyoyararlılığı artırma, yeni paketleme materyalleri geliştirme ve biyoaktif bileşenlerin enkapsülasyonu gibi amaçlarla kullanılmaktadır. Nanotaşıyıcılar, mikro boyutlu taşıyıcılara kıyasla daha fazla yüzey alanı sağlar ve çözünürlüğü artırma, biyoyararlanımı geliştirme ve kapsüllenmiş gıda bileşenlerinin kontrollü salımını ve hedeflenmesini iyileştirme potansiyeline sahiptir (Fathi vd., 2012). Mevcut yüzey alanı arttıkça, gıda bileşenlerinin biyoyararlanımı da önemli ölçüde artar. Bazı biyoaktif bileşikler, yutulduktan sonra hafifçe emilir ve hızla metabolize edilir ve bu nedenle yararlı etkilerini vermek için hedef organlara ulaşamazlar. Nano taşıyıcılar, sindirim sırasında onları koruyarak ve sindirim işlemi sırasında programlı bir salım uygulayarak besinlerin biyoyararlanımını artırabilirler (Mahdi Jafari, 2017). İlaç taşıyıcı olarak da potansiyel kullanımları sebebiyle kanser, enflamatuar ve nörodejeneratif hastalıkların tedavisi için de fırsatlar sunmaktadır (Dobrovolskaia vd. 2008).

Nanopartikül boyut aralığının çeşitli tanımları, gıda, ilaç ve kozmetik gibi farklı endüstrilerde sunulmaktadır. Gıda endüstrisinde, Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi, 100 nm'nin altındaki partikülleri nanopartiküller olarak adlandırmıştır. Ancak genel olarak boyutları 1000 nm'den küçük partiküller nanopartiküller olarak kabul edilmektedir (Esfanjani ve Jafari, 2017).

Nanokapsüllerin hazırlanması için proteinler, karbonhidratlar, lipitler, kimyasal polimerler, yüzey aktif maddeler gibi birçok materyal kullanılmaktadır. Hem hidrofilik hem de hidrofobik biyoaktif maddeleri kapsülleme kapasitesine sahip olduklarından, nanolipozomlar birçok çalışmada ve endüstriyel ürünlerde tercih edilmektedir (Jafari, 2017).

2.2.1. Nanolipozomlar

Lipitler doğada yaygın olarak bulunur ve aynı zamanda düşük toksisiteye ve emülsifikasyon sürecinde mükemmel işlevselliğe sahiptir (Rehman vd., 2020). Lipozomlar, sulu bir çekirdeği çevreleyen, başlıca fosfolipitler olmak üzere, polar lipit çift katmanlarından oluşan veziküllerdir. Lipozomların nano ölçekli versiyonuna nanolipozom adı verilir. Geleneksel lipozomlarla pek çok fizikokimyasal benzerliğe sahip olmalarına rağmen, nanolipozomlar, geniş yüzey alanı ve daha iyi penetrasyon potansiyeli gibi nanotaşıyıcıların tüm faydalarını beraberinde getirir (Jafari, 2017). Çizelge 2.1'de nanolipozomların bazı avantajları gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Nanolipozomların avantajları (Khorasani vd., 2018)

Nanolipozomların Avantajları	İyileştirilmiş kontrollü salınım
	Azalan yan etki ve toksisite
	Hedeflenmiş dağılım
	Artan yüzey alanı
	Artan çözünürlük
	Artan raf ömrü

Son uygulamaların çoğunda, nanolipozomların ortalama çapının 50-150 nm aralığında olduğu belirlenmiştir (Jafari, 2017). Genel olarak, parçacık boyutu, boyut dağılımı, yüzey alanı, şekil, çözünürlük ve kapsülleme verimliliği ve salma mekanizmaları gibi fizikokimyasal özelliklerin kapsülleme tekniği ve dağıtım sistemi tarafından değiştirildiği bildirilmiştir. Bu

nedenle, gerekli boyuta, fizikokimyasal özelliklere, çekirdek materyalin yapısına ve duvar materyaline dayalı olarak uygun kapsülleme tekniğini seçmek önemlidir (Ezhilarasi vd., 2013).

2.2.2. Nanolipozomların Oluşum Mekanizmaları

Nanolipozomların oluşum mekanizması, hidratlanmış fosfolipit moleküllerinin Van-der Waals ve hidrofobik/hidrofilik etkileşimler yoluyla oluşturduğu iki tabakalı veziküller şeklinde açıklanabilir (Khorasani vd., 2018). Suda çözünen fosfolipitler hidrofilik kısımlar dışarı hidrofobik kısımlar birbirine, bakacak şekilde ikili düz katmanlar oluştururlar. Lipozomlar oluşan ikili lipit katmanlarının parçalanıp kürecikler halinde kapanması ile oluşurlar (Kırtıl ve Öztop, 2014). Nanolipozom oluşumu kendiliğinden gerçekleşen bir süreç değildir ve bir enerji bariyerini aşmak için yeterli enerjinin sağlanması gerekir. Mekanik çalkalama, ısıtma, sonikasyon ve homojenizasyon gibi işlemler sisteme enerji sağlamak için kullanılabilir (Khorasani vd., 2018).

2.2.3. Nanolipozom Hazırlama Yöntemleri

Lipozom üretiminde yaygın olarak 4 farklı yöntem uygulanmaktadır. Bu yöntemler ince film hidrasyon, çözücü enjeksiyonu, deterjan uzaklaştırma ve zıt faz teknikleri olarak sıralanabilir (Tontul, 2019).

Üretim teknikleriyle ilgili olarak, ilk geleneksel protokol ince film hidrasyon yöntemidir. Öncelikle lipitler, kloroform veya kloroform / metanol gibi bir organik çözücü içinde çözdürülür. Bu organik çözelti daha sonra vakum altında kurutmaya tabi tutularak lipitlerin ince bir film haline gelmesini sağlar. Daha sonra, kurutulmuş film üzerine sulu çözelti (su veya tampon) eklenerek lipit hidrasyonuna izin verilir. İnce film yöntemiyle üretilen lipozomlar, geniş bir boyut dağılımına sahip çok katmanlı olarak kabul edilir ve boyutlandırma için ek bir adım gereklidir. Nihai uygulama küçük boyutlu veya düşük polidispersiteli lipozomlar gerektiriyorsa, ekstrüzyon, sonikasyon veya yüksek basınçlı homojenizasyon gibi aşamalar da lipozom hazırlama yöntemine eklenebilir. İnce film yönteminin ve ardından bir boyutlandırma protokolünün kullanılması, literatürde de kabul gören bir protokoldür. En büyük dezavantajı, gıda endüstrisinde izin verilmeyen kloroform ve metanol gibi toksik çözücülerin kullanılmasıdır (Hernández-Sánchez ve Gutiérrez-López, 2015).

2.2.4. Nanolipozomların Hazırlanmasında Kullanılan Malzemeler

Triaçilgliserol, kolesterol gibi polar olmayan lipitler ve fosfolipitler, monogliseritler gibi polar lipitler kapsülleme maddeleri olarak mükemmel adaylardır (Rehman vd., 2020).

2.2.4.1. Fosfolipitler

Fosfolipitler, mükemmel yüzey aktif özelliklere sahiptir ve son derece biyouyumludur. Birçok rapor, fosfolipitlerin hidrofobik ve hidrofilik bileşikleri kapsüllemek için benzersiz işlevlere sahip olduğunu ortaya koymuştur (Rehman vd., 2020). Lipozomal çift tabakaların lipit bileşimi, lipozomların partikül boyutunu etkilemektedir, bu da sırasıyla yüzey yükünü ve sonuç olarak sistemin stabilitesini değiştirebilmektedir. Lipozomların tasarımı için uygun fosfolipit kaynağının seçilmesi kritik öneme sahiptir (Jafari, 2017). Fosfatidilkolin (PC), lipozom yapımında en yaygın olan doğal fosfolipittir (Kırtıl ve Öztop, 2014).

2.2.4.2. Kolesterol

Kolesterol, birincil bileşen olarak nanolipozomlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Lipozomlara kolesterolün dahil edilmesi, membran sertliğini artırır ve lipozomal çift tabakadaki konformasyonel değişiklikleri sınırlar ve nihayetinde, özellikle hidrofilik bileşiklerde salım oranını azaltır (Jafari, 2017). Lipozom oluşumu sırasında kolesterol ilavesi, çift katmanın çevresel strese karşı yapısal stabilitesini doğrudan etkileyen anahtar bir faktördür. Kolesterolün dahil edilmesi ile iki tabakanın bütünlüğü mide koşulları altında korunabilir (Ruiz Canizales vd., 2019).

Kolesterol içeriğinin ve yağ asidi bileşiminin ayarlanması, membran akışkanlığını manipüle etmek için kanser hücreleri tarafından da kullanılan bir mekanizmadır (Demirci vd., 2017). Kolesterol kendi başına çift tabakalı veziküller oluşturmaz, ancak çok yüksek konsantrasyonlarda, örneğin kolesterol 1:1 veya 2:1 molar oranlarında bir fosfolipit molekülü ile karıştırılabilir. Kolesterol, fosfolipit çift tabakanın akışkanlığını modüle ederek iki tabakalı veziküllerin stabilitesini arttırmak için nanolipozom yapısında kullanılır (Khorasani vd., 2018).

2.2.5. Nanolipozomların Karakterizasyonu

Nanopartiküllerin tam ve doğru karakterizasyonu, biyolojik sistemlerde nanopartiküllerin hem olası faydalarını hem de potansiyel toksisitesini anlamının önemli bir parçasıdır (Ezhilarasi vd., 2013). Özellikle yeni bir teknik kullanıldığında, ürünün yeterli kalitesini sağlamak için karakterizasyon gereklidir. Karakterizasyon yöntemleri tercihen hızlı olmalıdır. Nanolipozom karakterizasyonunun en önemli parametreleri arasında görsel görünüm, boyut dağılımı, stabilite, zeta potansiyeli ve enkapsülasyon verimliliği yer alır (Mozafari, 2010).

2.2.5.1. Boyut

Kararlılık, görünüm, reoloji, fonksiyonel özellikler ve salınımı içeren nanokapsülleme sistemlerinin özelliklerinin çoğu, boyut ve boyut dağılımından etkilenir (Jafari vd., 2017). Uzun bir süre boyunca sabit bir boyut veya boyut dağılımının korunması lipozom stabilitesinin bir göstergesidir (Mozafari, 2010). Nanolipozomların boyutu hakkındaki bilgiler, parçacık boyutu dağılımı ve polidispersite indeksi (PDI) olarak sunulabilir (Jafari vd., 2017).

2.2.5.2. Zeta Potansiyeli

Zeta potansiyeli, partiküller ve özellikle de lipit veziküller arasındaki itme veya çekimin büyüklüğünün bir ölçüsüdür. Bir nanolipozom preparatının zeta potansiyelinin değerlendirilmesi, lipozomların stabilitesini ve *in vivo* kaderini tahmin etmeye yardımcı olabilir (Mozafari, 2010). Genellikle +30 mV'nin üstünde ve -30 mV'nin altında bir zeta potansiyeli, lipit veziküllerinin koloidal stabilitesi için uygun bir eşik değeri olarak kabul edilir (Khorasani vd., 2018).

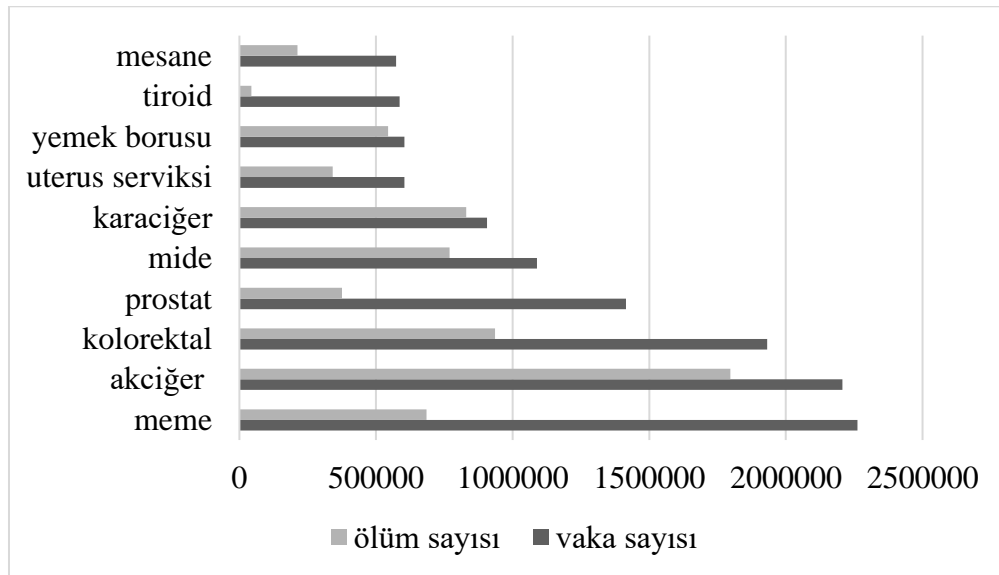
2.2.5.3. Enkapsülasyon Verimi

Kapsülleme etkinliği, lipozoma katılan ilaç miktarının bir ifadesidir ve normal olarak, ilacın toplam miktarına göre lipozomlara bağlanan ilaç yüzdesi olarak tanımlanır (Ong vd., 2016). Enkapsülasyon verimliliği spektrofotometrik yöntemler ile hesaplanabilir (Dai vd., 2017).

2.3. Kanser

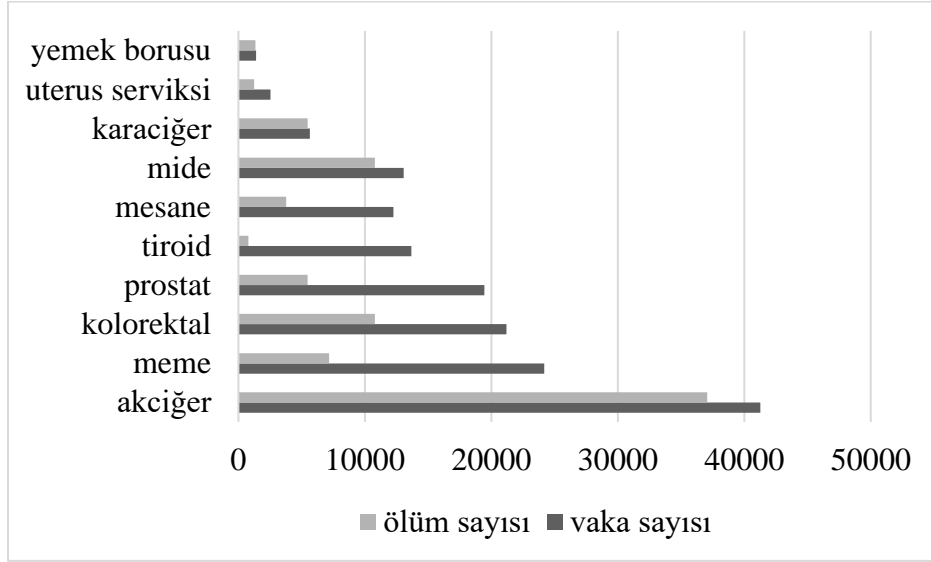
Kanser, vücutta ölüme neden olabilecek anormal hücrelerin büyümesidir ve genellikle bu hücreler normal hücrelerin sağlığını da tehdit ederler (Shukla vd., 2018). Kanser hücrelerinin yayılması kontrol edilmezse, metastaz meydana gelir ve ölüme sonuçlanabilir (Mathur vd., 2015). Kanser, transforme hücrelerdeki bazı mutasyonlardan ve duyarlı hücrelerdeki diğer kalıtsal varyasyonlardan kaynaklanmaktadır (Hashemi vd., 2011). Kansere tütün, kimyasallar, radyasyon ve bulaşıcı organizmalar gibi dış faktörler ve kalıtsal mutasyonlar, hormonlar, bağışıklık koşulları ve rastgele mutasyonlar gibi iç faktörler neden olmaktadır. Bununla birlikte, beslenme faktörleri, fiziksel aktivite eksikliği, obezite ve çevresel kirleticiler gibi birçok faktörün riski artırdığı bilinmektedir (Mathur vd., 2015).

2018'de kanser, dünyada yaklaşık olarak 9,6 milyon ölüme neden olmuştur ve ikinci büyük ölüm nedenidir. Akciğer, prostat, kolorektal, mide ve karaciğer kanserleri erkeklerde en sık görülen kanser türleri iken meme, kolorektal, akciğer, servikal ve tiroid kanserleri kadınlar arasında en yaygın olanlarıdır (WHO, 2021). Şekil 2.2'de 2020 yılında dünyada en sık görülen kanser vakaları ve ölüm sayıları gösterilmiştir.



Şekil 2.2. 2020 yılında dünyada en sık görülen kanser vakaları ve ölüm sayıları (Küresel Kanseri Gözlemevi [GCO], 2021).

Türkiye’de ise 2020 yılında 233.834 vaka kaydedilmiştir ve 126.335 vaka ölüm ile sonuçlanmıştır. Şekil 2.3’de 2020 yılında Türkiye’de en sık görülen kanser vakaları ve ölüm sayıları gösterilmiştir.



Şekil 2.3. 2020 yılında Türkiye’de en sık görülen kanser vakaları ve ölüm sayıları (GCO, 2021).

Dünyada ve Türkiye’de sıklıkla görülmesi ve ayrıca dünyada 6 ölümden 1’inin kansere bağlı olması sebebiyle kanser çok önemli bir sağlık sorunudur (WHO, 2021; Gedikli, 2013). Bununla birlikte, sosyal ve ekonomik açıdan da bir toplum sorunu olarak ortaya çıkmaktadır (Gedikli, 2013).

2.3.1 Kolon Kanseri

İnsanlar, ciddi hastalıkların gelişmesine yol açan kötü beslenme alışkanlıkları, kimyasal maddeler ve stres gibi birçok kritik faktöre maruz kalmaktadır. Kolorektal kanser, birçok ülkede en yaygın kanser türlerinden biridir. Hem kolon hem de rektum, sindirim sisteminin son bölümünün parçalarıdır ve bu da onları sürekli olarak akut iltihaplanma ve kronik hastalıklara daha duyarlı hale getirir (Santos vd., 2013).

Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre 2020 yılında Türkiye’de 21.191 kolorektal kanseri vakası kaydedilmiştir ve 10.798 vaka ölüm ile sonuçlanmıştır. Türkiye’de kolorektal kanser en sık görülen üçüncü kanser türüdür (GCO, 2021). Erken evre kolon kanseri, cerrahi ile başarılı

bir şekilde tedavi edilse de, ileri evre kolon kanseri kombine kemoterapi alan hastalarda bile sıklıkla tekrarlar ve ölümcül hale gelmektedir (Han vd., 2015).

Kolon kanseri genellikle sporadik olarak ortaya çıkmaktadır ve vakaların sadece % 5'i kalıtsaldır (Lbianca vd., 2010). Epidemiyolojik araştırmalar, beslenme alışkanlıkları ve yaşam tarzındaki iyileşmenin, uygun fiziksel aktivite ile birlikte kolon kanserinin önlenmesinde faydalı olabileceğini göstermektedir (Shafiee vd., 2016).

2.3.2. HT-29 Kolon Kanser Hücre Hattı

İnsan kolon kanser hücre hattı HT-29, 1964'te Fogh ve Trempe (1975) tarafından 44 yaşındaki Kafkas bir kadının birincil tümöründen izole edilmiştir. HT-29, yalnızca insan kolon kanserlerinin biyolojisini incelemek için kullanılmamakta, aynı zamanda olgun bağırsak hücrelerinin özelliklerini ifade etme yeteneği nedeniyle gıda sindirimi ve biyoyararlanıma odaklanan çalışmalarda özel ilgi görmektedir. Bu hücreler yüksek oranda glikoz tüketimi göstermektedir ve bu nedenle besi ortamında yüksek glikoz konsantrasyonu gerektirmektedir (Verhoeckx vd., 2015).

2.4. Hücre Kültürü

Hücre kültürü, hücrelerin *in vitro* davranışlarının temelde çok hücreli bir organizmanın bir organı içindeki bir dokunun parçası olarak davranışlarına benzer olduğu varsayımına dayanır (McKee ve Komarova, 2017). Tümörlerden elde edilen hücre hatları basitleştirilmiş ve kontrollü bir ortamda tümör hücrelerinin araştırılmasına izin verir. Hayvan modellerine göre kanser hücre hatlarını kullanmanın belirli avantajları vardır. İlk olarak, hücre kültürü çalışmalarının maliyeti, hayvan deneylerine göre daha azdır. Hemen kullanılabilirler ve yapılan araştırmalar nispeten hızlı bir şekilde uygulanabilir (Kapupara vd., 2011). Hücrelerin kültürde gelişmesi için çeşitli koşulların karşılanması gerekmektedir. *In vivo* ortamda olduğu gibi, hücre sağlığı için beslenme ve çevresel koşullar çok önemlidir. Beslenme, serum ilavesiyle veya eklenmeden ortamla sağlanır. Yapışan hücreler için, uygun bir substrata bağlanma önemlidir. Ayrıca karbondioksit ve oksijen seviyelerinin belirli sınırlar içinde tutulması gerekmektedir (Langdon, 2004).

2.4.1. Hücre Kültürü Bileşenleri

2.4.1.1. Hücre Kültürü Besiyeri

In vitro deneylerin başarısı, büyük ölçüde hücre kültürü ortamının kalitesine bağlıdır (McKee ve Komarova, 2017). Besiyeri ihtiyacı birçok faktöre bağlıdır. Hücre kaynağı organizmanın türüne, hücrelerin tipine ve adaptasyon kabiliyetine göre besiyeri ihtiyacı değişmektedir. Hücrelerin farklı besiyerlerinde farklı davranışlar sergilemesi sebebiyle çalışmanın amacına göre hücrenin besiyeri ihtiyaçları belirlenir (Yücel, 2010). Modern kültür ortamı, 1950'de Medium 199 (M199) ve 1959'da Eagle's Minimum Essential Media (MEM) ile başlayarak yaklaşık olarak 70 yıl önce geliştirilmiştir. Yayınlanan *in vitro* çalışmaların yaklaşık olarak %90'ında dört farklı sentetik ortam formülasyonu kullanılmaktadır. Bu formülasyonlar Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Roswell Park Memorial Institute-1640 (RPMI-1640), Minimum Essential Media ve Medium 199 (M199) olarak adlandırılır (McKee ve Komarova, 2017).

2.4.1.2. Serum

Besiyeri, büyüme için gerekli olan temel besin maddelerinin çoğunu içerse de, ek temel unsurlar serum tarafından sağlanmaktadır (Langdon, 2004). Çoğu hücre kültürü ortamına temel taşıma proteinleri, yağ asitleri, büyüme faktörleri ve hormonları sağlamak için serum eklenmektedir (Verhoeckx vd., 2015). Serum bileşenlerinin konsantrasyonları, kaynak hayvanların yaşı ve sağlık durumuna göre değişmektedir (Langdon, 2004). İnsan ve at serumları kullanılsa da, çoğu kanser kültürü çalışmasında genellikle fetal sığır serumu (FBS) tercih edilmektedir (Langdon, 2004; Verhoeckx vd., 2015). Fetal serumu seçmenin ana nedenlerinden biri, mevcut antikor içeriğinin düşük olmasıdır. Serum tamamlayıcısı ile birlikte antikorlar, hücre canlılığı üzerinde olumsuz etkilere sahip olabilmektedir. Bu nedenle, genellikle FBS inaktive edilmektedir, kısaca ısıya dayanıksız kompleman proteinlerini yok etmek için 56 ° C'de 30 dakika inkübe edilmektedir (Verhoeckx vd., 2015). Tipik olarak, ortamdaki %5–20 serum konsantrasyonları, hücre tipine bağlı olarak optimal kabul edilmektedir (Langdon, 2004).

2.4.1.3. Substrat

Kültürde büyüme ve farklılaşma için çoğu kanser hücresi bir substrat ile etkileşim gerektirmektedir. Çoğu kanser hücresi türü, tek katmanlı olarak plastik veya cam üzerinde büyümektedir. Hücre yapışması, substratın ekstraselüler matriks (ECM) bileşenleri ile kaplanmasıyla sağlanabilmektedir. Yaygın olarak kullanılan ECM proteinleri kolajen, fibronektin ve laminindir (Langdon, 2004).

2.4.1.4. Fiziki Ortam

Çoğu memeli kültürü için, tercih edilen sıcaklık $36,5 \pm 1$ °C'dir. Hücreler daha düşük sıcaklıklarda büyüebilmektedir, ancak 40 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda hızlı bir şekilde ölmektedirler. Kültür ortamı, genellikle %5 CO₂ atmosferi gerektiren tamponlama sistemleri içermektedir. Çoğu kanser hücresi yaklaşık olarak 7,2–7,4 arasında bir pH değerine ihtiyaç duymaktadır. Hücre büyümesi ortamı asitleştiren solunum yan ürünleri ürettiğinden dolayı ortam düzenli olarak değiştirilmektedir (Langdon, 2004).

2.4.2. *In Vitro* Sitotoksisite Testleri

In vitro toksisite yöntemleri ilk olarak kimyasal maddelerin moleküler ve hücresel düzeylerdeki etki mekanizmalarını incelemek için geliştirilmiştir. Giderek artan bir şekilde *in vitro* yöntemler, kanser biyolojisi, ilaç keşfi ve toksikoloji gibi birçok alanda uygulanmaktadır (Marx ve Sandig, 2007). Sitotoksisite, uygulanan maddenin dozuna ve uygulama süresine bağlı olarak hücrelere değişik oranlarda zarar veren olaylar olarak tanımlanabilir. Sitotoksisite testlerinde canlı veya ölü hücre miktarının belirlenmesi amaçlanmaktadır (Tokur ve Aksoy, 2017).

2.4.2.1. MTT Yöntemi

MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide] testinin prensibi, çoğu canlı hücre için mitokondriyal aktivitenin sabit olması ve dolayısıyla canlı hücrelerin sayısındaki artışın veya azalmanın mitokondriyal aktivite ile doğrusal olarak ilişkili olmasıdır.

Bu yöntem ile farklı konsantrasyonlarda birkaç ilacın sitotoksitesi belirlenebilmektedir. Hücrelerin mitokondriyal aktivitesi, tetrazolyum tuzu MTT'nin homojen ölçüm için çözümlenebilen formazan kristallerine dönüştürülmesiyle yansıtılır. Bu nedenle, canlı hücre sayısındaki herhangi bir artış veya azalma, plaka okuyucu kullanılarak formazan konsantrasyonunun ölçülmesiyle tespit edilebilir. İlaç duyarlılığı ölçümleri için, ilaçlarla inkübe edilmiş hücrelerin bulunduğu kuyuların optik yoğunluk (OD) değerleri, ilaçlara maruz kalmayan hücrelerin bulunduğu oyukların değerleri ile karşılaştırılır. Muamele sonunda hücrelerin %50'sinin öldüğü inhibitör konsantrasyona (IC50) ulaşmak için gereken ilaç konsantrasyonu belirlenir. Formazan kristallerini çözmek için metanol, etanol ve DMSO (dimetil sülfoksit) gibi farklı solüsyonlar kullanılabilir (Purdie vd., 2011).

2.4.2.2. ATP Biyoluminesans Testi

ATP bioluminesans testi, lusiferin-lusiferaz reaksiyonu kullanılarak kültürlenmiş hücre sayısı ile ölçülen ışıltama arasında doğrusal bir ilişki olup olmadığını belirlemek için geliştirilmiştir. İntrasellüler ATP, hücre canlılığının geçerli bir göstergesidir (Kamiloglu vd., 2020). Hücre ölümüyle birlikte, hücrenin ATP sentez yeteneği kaybolur. Buna ek olarak, endojen ATPazlar mevcut ATP'nin yıkımına sebep olurlar. Ateş böceklerinde meydana gelen bioluminesans reaksiyonunun prensibine dayanan bioluminesans testinde, lusiferaz enzimi ve lusiferin kullanılarak hücrelerde bulunan ATP aracılığıyla lüminesans oluşumu sağlanır (Tokur ve Aksoy, 2017). Bu deneylerde, öncelikle lusiferaz enzimi ve hücre içi ATP'nin etkileşime girmesi sağlanır. Daha sonra hücre içi ATPazlar inaktive edilir ve son olarak ışık, hücre içi ATP seviyelerini belirlemek için luminometre aracılığıyla ölçülür (Kamiloglu vd., 2020). Lüminesans sinyal yoğunluğu ve sürdürülebilirliği, hücre sayısına ve hücre tipine özgüdür (Alvero ve Mor, 2021). Sinyal oldukça karardır ve sinyal yaklaşık olarak 50 hücreyi bile ölçülebildiği için çok spesifiktir (Kamiloglu vd., 2020).

2.4.3. Hücre Ölüm Mekanizmaları

Hücre ölümü, büyüme, bölünme gibi hücre fonksiyonlarının geri döndürülemez şekilde sonlanmasına neden olur (Choi vd., 2019). Hücre ölümünün düzenlenmesindeki anormalliklerle karakterize edilen kanser ve diğer hastalıklar için etkili tedaviler geliştirmek için, hücrelerin yaşayabilirliğini kaybedip sonunda ölebileceği farklı yolların anlaşılması

gereklidir (D'Arcy, 2019). Hücre ölümünün apoptoz, otofaji ile ilişkili hücre ölümü ve nekroz olmak üzere üç ana morfolojisi tanımlanmıştır (Krysko vd., 2008).

2.4.3.1. Apoptoz

Apoptoz, hasara uğramış veya organizmada görevini tamamlamış hücrelerin, başka hücrelere zarar vermeden ortadan kaldırıldığı bir süreçtir (Gedikli, 2013). Apoptoz, programlanmış hücre ölümü olarak da adlandırılır (D'Arcy, 2019). Apoptoz, gelişim, yaşlanma ve dokulardaki hücrelerin devamlılığını sağlamak için homeostatik bir mekanizma olarak karşımıza çıkar (Gedikli, 2013). Apoptoz, hücre zarında kabarcık oluşumu, hücre büzüşmesi, nükleer parçalanma, kromatin kondensasyonu ve kromozomal DNA parçalanması ile karakterize edilir (Su vd., 2012). Apoptozun başlaması, kaspazlar olarak bilinen bir dizi sistein proteazın aktivasyonuna bağlıdır (D'Arcy, 2019). Kaspazlar, aktif olmayan pro-kaspazlar olarak sentezlenir ve bir dizi bölünme reaksiyonu ile aktive edilir. Aktif kaspazlar hücrel substratları ayırır ve bu nedenle apoptotik hücre ölüm yolunu etkilerler (Alvero ve Mor, 2021). Apoptoz, ATP gerektiren bir süreçtir ve enflamasyona sebep olmaz (Coşkun ve Özgür, 2011).

2.4.3.2. Nekroz

Bir başka hücre ölüm mekanizması olan nekroz ise genler tarafından kontrol edilemeyen bir süreçtir (Coşkun ve Özgür, 2011). Hücrede şişme meydana gelir ve bu süreç plazma zarının yırtılması ve organel yıkımı ile sonuçlanır. Bu koşullarda stresin hücre üzerindeki doğrudan etkisi nedeniyle hücre ölümü hızlı bir şekilde gerçekleşir ve bu nedenle hücre ölümü kontrolsüz olarak tanımlanmıştır (Krysko vd., 2008). Nekroz, ATP gerektiren bir süreç değildir ve enflamasyona neden olur (Coşkun ve Özgür, 2011).

2.4.3.3. Otofaji ile İlişkili Hücre Ölümü

Otofaji, hücrelerin kendi organellerini ve makromoleküllerini sindirerek enerji ve metabolitler ürettiği bir süreçtir. Otofaji, büyüme faktörlerinden yoksun bir hücrenin hayatta kalmasını sağlar. Bununla birlikte, uzun süreler boyunca besin almayan hücreler, nihayetinde mevcut tüm substratları sindirir ve ölür (Hotchkiss vd., 2009).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

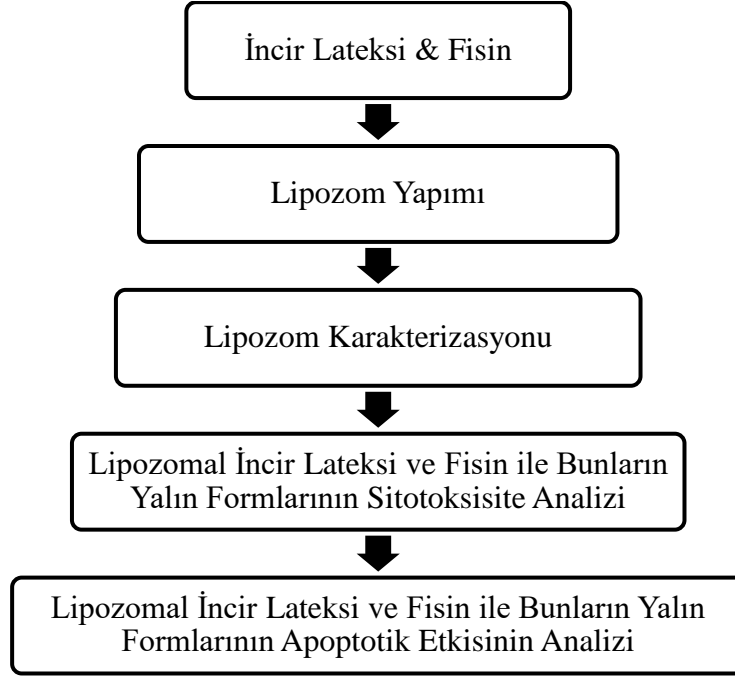
Caspase-Glo® 3/7 Assay kiti	Promega
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay kiti	Promega
DMSO	Merck
Disodyum Fosfat	Merck
Fetal Bovine Serumu (FBS)	Sigma
Fisin	Sigma
Hidrojen Peroksit	Tekkim
Hidrojene Soya Fosfatidilkolin (HSFK)	Avanti
Kloroform	Isolab
Kolesterol	Sigma
Metanol	Isolab
Mono Potasyum Fosfat	Sigma
Potasyum Klorür	Merck
RPMI-1640 Medium	Sigma
Sodyum Klorür	Tekkim
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB)	Sigma
MTT	Sigma
Tripan mavisi	Sigma
Tripsin	Sigma

3.1.2.Kullanılan Cihazlar

FreeZone Freeze Dryer	Labconco, Missouri, ABD
İnvert Mikroskop	Euromex, Hollanda
CO ₂ İnkübatör	Nüve, Türkiye
Kuru Blok Isıtıcı	Eppendorf, Almanya
LuMate 4400 Luminometre	Awareness Technology, Florida, ABD
Sınıf 2 Biyogüvenlik Kabini	Nüve, Türkiye
Mikroplaka Spektrofotometresi	Biotek, ABD
Otoklav	Nüve, Türkiye
Partikül Analizör	Anton Paar, Avusturya
Saf Su Cihazı	Nüve, Türkiye
Santrifüj Cihazı	Hettich, Almanya
Santrifüj Cihazı	Eppendorf, Almanya
Sonikatör	Bandelin, Almanya
Su banyosu	Nüve, Türkiye
Vakumlu Kurutucu	Heto, Danimarka

3.2. Yöntem

Tez çalışması boyunca gerçekleştirilen yöntem basamakları şekil 3.1’de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Yöntem Basamakları

3.2.1. İncir Lateksi Toplanması ve Liyofilizasyonu

İncir lateksinin toplanması, Ghanbari vd. (2019) çalışmasında tarif edildiği şekilde yapılmıştır. Kısaca, incir lateksleri Erbeyli İncir Araştırma Enstitüsü’nden Aydın’da en fazla yetiştirilen *F. carica* cv. Sarı Lop ve cv. Aydın Siyahı (Bursa Siyahı) kültürvarlarında genç dalların, yaprak saplarının ve olgunlaşmamış incir saplarının yüzeysel olarak kesilmesi ile damla damla toplanmıştır. Toplanan incir lateksleri hızlı bir şekilde laboratuvara getirilip toz ve bitki parçacıkları gibi fiziksel safsızlıklardan arındırılması için Whatman filtre kağıdından süzülerek -20°C’de dondurulmuştur. Labconco FreeZone freeze dryer (Missouri, ABD) ile dondurularak kurutma işlemi uygulanmıştır. Kurutulmuş incir lateks tozları -20°C’de depolanmış ve kullanımdan önce pH 7,2 fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile çözülerek 0,22 µm şırınga filtresi kullanılarak filtre sterilizasyon işlemi yapılmıştır. Fisın ise liyofilize halde ticari olarak satın alınmıştır. Daha sonra örnekler steril pH 7,2 PBS ile fisin ve incir lateksleri kullanılarak 20 mg/ml konsantrasyonlarında hazırlanmıştır.

3.2.2. Lipozom Yapımı

Lipozom yapımı için ince film hidrasyon yöntemi kullanılmıştır. Lipozom sentezi, literatürde verilen yöntemde küçük değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir (Stuart vd., 2016). Kolesterol ve hidrojenlenmiş soya fosfatidilkolin (HSFK) kimyasalları 3:1 kloroform:metanol içinde çözündürülerek -20°C'de depolanmıştır. Hazırlanan HSFK ve kolesterol lipitleri 2:1 molar oranlarında karıştırılmıştır. Kloroform ve metanol vakumlu kurutucuda uzaklaştırıldıktan sonra ortaya çıkan lipit film tabakası azot gaz akışı altında oksidasyonu önlemek için 10 dakika bekletilerek son kuruma ve oksijenden koruma gerçekleştirilmiştir. Lipit filmler 55°C'de 20 mg/ml incir lateksi veya fisin içeren 1 ml pH 7,2 PBS ile yeniden çözündürülmüştür. Karışımı homojenize etmek için 37°C'de 10 dakika sonikasyon işlemi uygulanmıştır. Daha sonra ekstrüzyon işlemi yapılmıştır. Kısaca, nanometre boyutunda lipozomların oluşturulması ve sterilite için 0,2 µm gözenekli şırınga filtreden geçirilmiştir. Son aşamada, 100 kDa Amicon santrifüj filtresi ile 10 dakika boyunca 2000 ×g'de santrifüj işlemi yapılmıştır. Bu işlem ile oluşan lipozomlar, enkapsüle olmayan lateks ve fisinden ayrılmıştır. Lipozomların elde edilebilmesi için 2 dakika 1000 ×g'de ters santrifüj yapılmıştır. Kontrol olarak kullanılmak üzere sadece pH 7,2 PBS kullanılarak boş lipozomlar oluşturulmuştur.

3.2.3. Lipozom Karakterizasyonu

3.2.3.1. Lipozomal Fisin Enzimi ve İncir Latekslerinin Boyut Analizi

Lipozom boyutu bir partikül analizör (Litesizer 500, Anton Paar, Avusturya) ile ölçülmüştür. Lipozomlar 1/1500 oranında seyreltilerek ölçümler gerçekleştirilmiştir. Her örnek için yapılan ölçümler iki kez tekrarlanmıştır.

3.2.3.2. İncir Lateksleri ve Fisin Enziminin Peroksidaz Benzeri Aktivitesi

Lipozomlara yüklenen fisin veya incir lateksi miktarları, 652 nm'de standart bir absorbans eğrisi hazırlanarak belirlenmiştir. Absorbans eğrisinin belirlenmesi için farklı konsantrasyonlar, tampon çözeltiler, sıcaklık değerleri ve inkübasyon süreleri kullanılmıştır. Fisin enzimi için

0,01, 0,05, 0,1, 0,25, 0,33, 0,5, 0,75 ve 1 µg/ml konsantrasyonları kullanılırken incir lateksleri için 0,25, 0,5, 1 ve 1,5 µg/ml konsantrasyonları kullanılmıştır. Tampon çözelti olarak ise pH 5,0 ve pH 7,2 olmak üzere iki farklı PBS analiz edilmiştir. Ayrıca 30 °C ve 35 °C olmak üzere iki farklı inkübasyon sıcaklığı belirlenmiştir. İnkübasyon süresi 3,5 saate kadar analiz edilerek inkübasyon öncesi, 1 saat, 2 saat, 3 saat ve 3,5 olmak üzere farklı sürelerde absorbans değerleri ölçülmüştür.

Analizler sonucunda optimum değerler belirlenmiş ve fisinin peroksidaz-benzeri aktivitesi ile mavi rengin gelişmesine izin vermek için 0,25, 0,5, 1 ve 1,5 µg/ml konsantrasyonlarında incir lateksleri ve 0,01, 0,05, 0,1 0,25 ve 0,33 µg/ml konsantrasyonlarında fisin enzimi, 0,40 mM 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), 0,80 mM H₂O₂ ve 0,2 M PBS tamponu (pH 5,0) içerisinde 2 saat 30°C'de inkübe edilmiştir. 1 saat ve 2 saat inkübasyon sonrasında gelişen mavi rengin absorbans değeri 652 nm'de mikropilaka okuyucu ile ölçülmüş ve kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur (Pan vd., 2018).

Enkapsüle edilen fisin ve incir lateksleri için ise Stuart vd. (2016) çalışmasında belirtildiği gibi lipozomlar metanol içinde 1:10 oranında seyreltilmiş ve 5 dakika sonikasyona tabi tutulmuştur. Sonrasında seyreltmeler yapılarak analiz edilmiştir. Aynı zamanda lipozomlara işlem uygulanmadan direkt olarak seyreltilerek peroksidaz benzeri aktivitesi ölçülmüştür. Denemeler sonucunda peroksidaz benzeri aktivitenin belirlenmesi için yapılan analizin lipozomların açılması için yeterli olduğu tespit edilmiştir. Bu yüzden lipozomal enkapsüle fisin veya incir lateksi konsantrasyon ve miktarlarının belirlenmesinde örnekler seyreltilerek direkt olarak analiz edilmiştir. Analiz sırasında sonuçları doğrulamak adına Amicon sanrifüj filtresi kullanılarak lipozomlardan ayrılan filtratlar, ekstrüzyon öncesi ve sonrası örnekler de aynı şekilde analiz edilmiştir.

3.2.3.3. Lipozomal İncir Lateksleri ve Fisin Enziminin Enkapsülasyon Verimi

Lipozomal fisin ve incir lateksinin peroksidaz benzeri aktivitesi spektrofometrik olarak ölçülmüş ve elde edilen veriler kullanılarak aşağıdaki formül ile enkapsülasyon verimi (%EE) hesaplanmıştır (Dai vd., 2017).

$$\%EE = \frac{\text{lipozomlarda paketlenildiği hesaplanan fisin veya incir lateksi miktarı}}{\text{lipozom yapımı için kullanılan fisin veya incir lateksi miktarı}} \times 100$$

3.2.4 Hücre Kültürü

HT-29 kolon kanseri hücreleri, %10 FBS içeren RPMI-1640 besiyeri içerisinde 25 cm²'lik flasklar içerisinde steril şartlarda yetiştirilmiştir. %5 CO₂ içeren, 37 °C sıcaklıkta inkübe edilmiştir. Hücreler yaklaşık % 80 doluluğa ulaştığında pasajlama işlemi yapılmıştır (Han vd., 2015). Hücrelere yaklaşık olarak 72 saat aralıklarla pasajlama işlemi yapılmıştır.

3.2.4.1 Hücre Pasajlama İşlemi

Hücreler, sıkışık duruma gelince pasajlanmaları gerekmektedir. Aksi takdirde, birleşik hücrelerin sürekli kültürü, mitotik aktivitenin azalmasına, varyant hücrelerin seçimine ve hatta hücre ölümüne neden olabilmektedir.

İlk olarak, %80 doluluğa ulaşan hücreler kabine alınmış ve besiyeri dökülerek uzaklaştırılmıştır. 2 ml tripsin eklenmiş ve yüzeye yapışık olan hücrelerin kaldırılması amacıyla yaklaşık olarak 37 °C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. 25 cm²'lik flask hafifçe vurularak hücrelerin yuvarlandığından ve yüzeyden ayrıldığından emin olmak için hücreler mikroskopta incelenmiştir. İnkübasyon işlemi sonunda 2 ml RPMI-1640 eklenerek santrifüj işlemi yapılmıştır. Santrifüj öncesi içerisinden 50 µl örnek alınarak 50 µl tripan mavisi ile karıştırılmış ve ışık mikroskobu altında görsel olarak incelenmiştir. Canlı bir hücre berrak bir sitoplazmaya sahipken, cansız bir hücre mavi bir sitoplazmaya sahip olduğu gözlemlenmiştir. Canlı hücre sayımı yapılmış, istenen hücre yoğunluğuna bağlı olarak yeni besiyeri eklenmiş ve uygun koşullarda hücrelerin kültürde gelişmesi sağlanmıştır (Kamiloglu vd. 2020; Verhoeckx vd., 2015).

3.2.4.2 Fisın ve İncir Latekslerinin MTT ile Sitotoksosite Analizi

MTT testi, Han vd. (2015) çalışmasında verilen yöntemde küçük değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir. Öncelikle, HT-29 insan kolon kanser hücreleri pasajlanmış ve ekim işlemi 96 kuyulu şeffaf plakalar içerisine 5000 hücre/kuyu olacak şekilde yapılmıştır. Hücreler, 37°C'de %5 CO₂ altında inkübe edilmiştir. Ertesi gün hücreler, fisin ve incir lateksleri ile 72 saate kadar muamele edilmiştir. Fisın enzimi için kontrol olarak sadece besiyeri kullanılmıştır. Fisın enzimi konsantrasyonları besiyeri içerisinde 60, 70, 80, 100 µg/ml olarak hazırlanmıştır.

Öncelikle liyofilize halde depolanan 20 mg fisin, 1 ml PBS (pH 7,2) içerisinde çözülmüştür. Ardından belirlenen konsantrasyonlarda besiyeri içerisinde seyreltilmiştir. Hazırlanan ilaçlar muamele süresi boyunca -20 °C'de depolanmıştır. İncir lateksleri için de kontrol olarak besiyeri kullanılmıştır. Besiyeri içerisinde incir lateksleri 10, 20, 30, 40 µg/ml olarak hazırlanmıştır. Öncelikle liyofilize halde depolanan 20 mg incir lateksi, 1 ml PBS (pH 7,2) içerisinde çözülmüştür. Ardından belirlenen konsantrasyonlarda besiyeri içerisinde seyreltilmiştir. Hazırlanan ilaçlar muamele süresi boyunca -20 °C'de depolanmıştır. Muamele süresi sonunda kuyulara besiyeri içeren MTT kimyasalı eklenerek 3 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda DMSO eklenerek mikropłaka okuyucu ile 570 nm'de ölçüm yapılmıştır (Han vd., 2015).

3.2.4.3 Lipozomal Fisin ve İncir Latekslerinin Lüminesans Yöntem ile Sitotoksite Analizi

HT-29 insan kolon kanser hücreleri pasajlanmış ancak son aşamada ekim 96 kuyulu siyah mat duvarlı plakalar içerisine yapılmıştır. Hücreler 10.000 hücre/kuyu olacak şekilde ekilmiş ve 37°C'de %5 CO₂ altında inkübe edilmiştir. Ertesi gün hücreler, lipozomal fisin, lipozomal incir lateksi ve karşılaştırma amaçlı aynı konsantrasyonlarda fisin, incir lateksi ile 48 saate kadar muamele edilmiştir. Kontrol olarak 10.000 hücre/kuyu içeren kuyularda sadece besiyeri ve boş lipozomlar kullanılmıştır. Lipozomal incir lateksleri ve fisin enzimi, oluşturulduktan sonra yapılan karakterizasyon analizleri sonrasında sitotoksik olarak analiz edilmiştir. Hazırlanan örnekler 10 gün boyunca +4 °C'de depolandıktan sonra analiz edilmiştir. Ayrıca karşılaştırma amaçlı analiz edilen incir lateksleri ve fisin aynı şartlar altında depolanmıştır. Muamele süresi sonunda HT-29 hücrelerinin canlılık seviyeleri CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay kiti (Promega) ile ATP seviyelerinin ölçülmesi yoluyla dolaylı olarak ölçülüp değerlendirilmiştir. Analiz, üretici firmanın (Promega) protokolü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ölçümler için bir LuMate 4400 luminometre kullanılmıştır (Awareness Technology, Florida, ABD).

3.2.4.4. Lipozomal Fisin ve İncir Latekslerinin Apoptotik Etkisinin Analizi

HT-29 insan kolon kanser hücreleri pasajlanmış ancak son aşamada ekim 96 kuyulu siyah mat duvarlı plakalar içerisine yapılmıştır. Hücreler 10.000 hücre/kuyu olacak şekilde ekilmiş ve 37°C'de %5 CO₂ altında inkübe edilmiştir. Ertesi gün hücreler, lipozomal fisin, lipozomal incir lateksi ve karşılaştırma amaçlı aynı konsantrasyonlarda fisin, incir lateksi ile 48 saate kadar muamele edilmiştir. Kontrol olarak 10.000 hücre/kuyu içeren kuyularda sadece besiyeri ve boş lipozomlar kullanılmıştır. Lipozomal incir lateksleri ve fisin enzimi, oluşturulduktan sonra yapılan sitotoksosite ve karakterizasyon analizleri sonrasında apoptik olarak analiz edilmiştir. Hazırlanan örnekler 14 gün boyunca +4 °C'de depolandıktan sonra analiz edilmiştir. Ayrıca karşılaştırma amaçlı analiz edilen incir lateksleri ve fisin aynı şartlar altında depolanmıştır. Muamele süresi sonunda hücrelerdeki apoptoz seviyesi Caspase-Glo® 3/7 Assay kiti (Promega) ile ölçülmüştür. Analiz, üretici firmanın (Promega) protokolü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay kiti analiz sonuçları kullanılarak normalize edildikten sonra değerlendirilmiştir.

3.2.5. İstatistik Analiz

İstatiksel olarak değerlendirmeler için SPSS Statistics 20.0 paket programı kullanılmıştır. Gruplar arasındaki fark varyans analizi (ANOVA) ile tespit edilmiş ve farklılığın önem derecesinin (P<0,05) tespit edilebilmesi için Duncan çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır. İki farklı grubun karşılaştırılması için ise bağımsız örneklem t testi uygulanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. İncir Lateksleri ve Fisın Enziminin Peroksidaz Benzeri Aktivitesinin Belirlenmesi

Fisın ve incir lateksleri, standart bir absorbands eğrisi hazırlamak için farklı konsantrasyonlar, tampon çözeltiler, sıcaklık değerleri ve inkübasyon sürelerinde analiz edilmiştir. Fisın için 0,01, 0,05, 0,1, 0,25, 0,33, 0,5, 0,75 ve 1 µg/ml, incir lateksleri için 0,25, 0,5, 1 ve 1,5 µg/ml konsantrasyonları kullanılmıştır. Tampon çözelti olarak ise pH 5,0 ve pH 7,2 olmak üzere iki farklı PBS analiz edilmiştir. Ayrıca 30 °C ve 35 °C olmak üzere iki farklı inkübasyon sıcaklığı belirlenmiştir. İnkübasyon süresi 3,5 saate kadar analiz edilerek inkübasyon öncesi, 1 saat, 2 saat, 3 saat ve 3,5 olmak üzere farklı sürelerde absorbands değerleri ölçülmüştür.

4.1.1. Fisın Enziminin Farklı Konsantrasyonlarda Peroksidaz Benzeri Aktivitesi

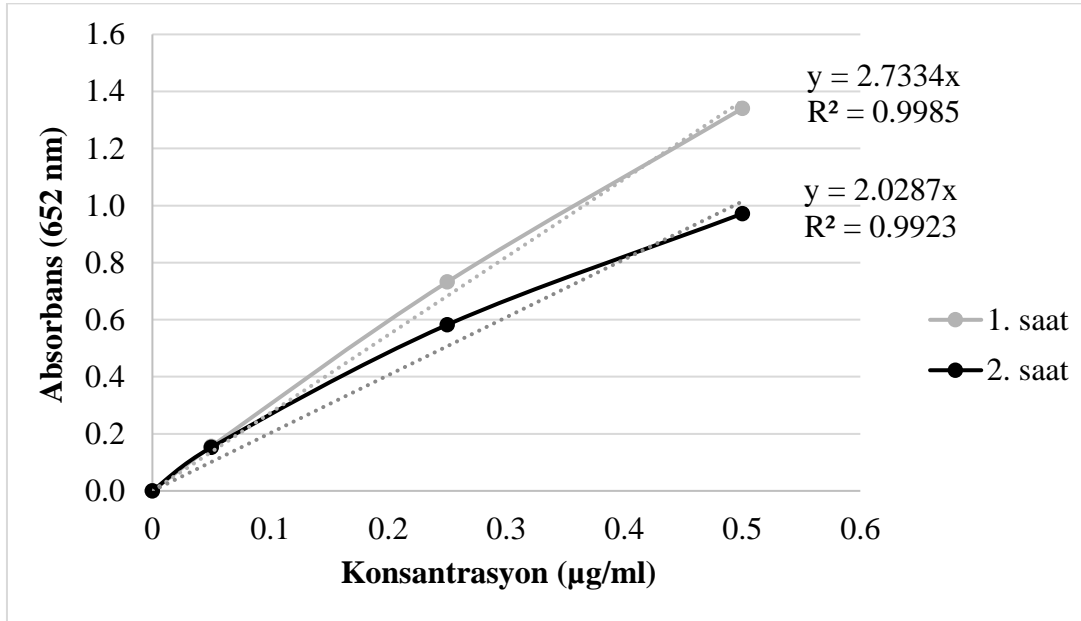
Fisın aktivitesi ile mavi rengin gelişmesine izin vermek için farklı konsantrasyonlarda saf su içerisinde hazırlanan fisın enzimi, saf su ile seyreltme işlemi yapılarak 2 saat boyunca 30 °C'de 652 nm'de spektrofotometrik olarak analiz edilmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Saf su içerisinde hazırlanan ve seyreltilen fisın enziminin peroksidaz benzeri aktivitesi ile oluşan absorbands değeri

Konsantrasyon	Absorbans (652 nm)	
	1 saat	2 saat
0 µg/ml	0,000 ± 0,002 ^a	0,000 ± 0,002 ^a
0,05 µg/ml	0,156 ± 0,024 ^b	0,152 ± 0,025 ^b
0,25 µg/ml	0,732 ± 0,034 ^c	0,582 ± 0,043 ^c
0,5 µg/ml	1,340 ± 0,044 ^d	0,972 ± 0,023 ^d

Analizlerin sonuçları ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. Aynı sütundaki farklı harfler P<0,05 seviyesinde farklılık olduğunu göstermektedir.

Şekil 4.1’de fisin enziminin 0,05 ile 0,5 µg/ml konsantrasyonları arasında 1 saat ve 2 saat inkübasyon sonucunda ölçülen absorbans değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Fisine enziminin farklı konsantrasyonlarda peroksidaz benzeri aktivitesi ile oluşan absorbans değeri

4.1.2. Fisine Enziminin Farklı İnkübasyon Sürelerinde Peroksidaz Benzeri Aktivitesi

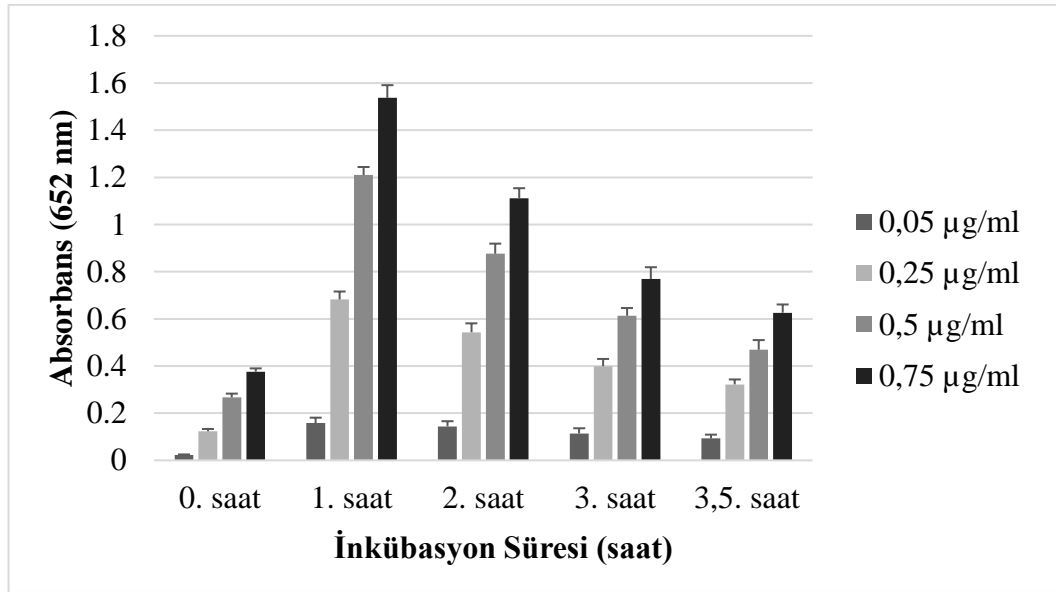
Fisine enziminin peroksidaz benzeri aktivitesine inkübasyon süresinin etkisi incelenmiştir. Fisine enzimi 0,05, 0,25, 0,5 ve 0,75 µg/ml konsantrasyonlarında saf su içerisinde hazırlanmış ve saf su ile seyreltilmiştir. Ardından 3,5 saat boyunca 30°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi boyunca absorbans değerlerindeki azalış veya artışı tespit etmek için inkübasyon öncesi, 1 saat, 2 saat, 3 saat ve 3,5 saat olmak üzere 652 nm’de absorbans değerleri ölçülmüştür. Çizelge 4.2’de. fisine enziminin 3,5 saat inkübasyon boyunca peroksidaz benzeri aktivitesi ile oluşan absorbans değerleri gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. Fisın enziminin 3,5 saat inkübasyon boyunca peroksidaz benzeri aktivitesi ile oluşan absorbans değeri

	Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)			
	0,05	0,25	0,5	0,75
0 saat	0,023 \pm 0,020 ^a	0,123 \pm 0,010 ^a	0,267 \pm 0,016 ^a	0,376 \pm 0,014 ^a
1 saat	0,158 \pm 0,023 ^d	0,682 \pm 0,034 ^e	1,21 \pm 0,034 ^e	1,537 \pm 0,054 ^e
2 saat	0,144 \pm 0,022 ^{cd}	0,543 \pm 0,038 ^d	0,876 \pm 0,043 ^d	1,111 \pm 0,043 ^d
3 saat	0,114 \pm 0,022 ^{bc}	0,399 \pm 0,031 ^c	0,613 \pm 0,033 ^c	0,769 \pm 0,050 ^c
3,5 saat	0,093 \pm 0,016 ^b	0,322 \pm 0,021 ^b	0,469 \pm 0,041 ^b	0,626 \pm 0,035 ^b

Analizlerin sonuçları ortalama \pm standart sapma şeklinde verilmiştir. Aynı sütundaki farklı harfler $P < 0,05$ seviyesinde farklılık olduğunu göstermektedir.

Şekil 4.2’de inkübasyon öncesi, 1 saat, 2 saat, 3 saat ve 3,5 saat olmak üzere yapılan absorbans ölçümleri gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Fisın enziminin farklı inkübasyon sürelerinde peroksidaz benzeri aktivitesi ile oluşan absorbans değeri

4.1.3. Fisin Enziminin Farklı Sıcaklık Değerlerinde Peroksidaz Benzeri Aktivitesi

Farklı konsantrasyonlarda saf su içerisinde hazırlanan fisin enzimi, saf su ile seyreltme işlemi yapılarak 3 saat boyunca 30 °C ve 35 °C 'de inkübe edilmiştir. 3 saat boyunca 652 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüm yapılmıştır. Çizelge 4.3'te 30 °C inkübasyon sıcaklığında fisin enziminin peroksidaz benzeri aktivitesi ile oluşan absorban değerleri gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. Fisin enziminin 30 °C inkübasyon sıcaklığında peroksidaz benzeri aktivitesi ile oluşan absorban değeri

Absorbans (652 nm)				
Konsantrasyon	0 saat	1 saat	2 saat	3 saat
0,05 µg/ml	0,023 ± 0,002 ^a	0,158 ± 0,023 ^a	0,144 ± 0,022 ^a	0,114 ± 0,022 ^a
0,5 µg/ml	0,267 ± 0,016 ^b	1,210 ± 0,034 ^b	0,876 ± 0,043 ^b	0,613 ± 0,033 ^b
0,75 µg/ml	0,376 ± 0,014 ^c	1,537 ± 0,054 ^c	1,111 ± 0,043 ^c	0,769 ± 0,050 ^c

Analizlerin sonuçları ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. Aynı sütundaki farklı harfler P<0,05 seviyesinde farklılık olduğunu göstermektedir.

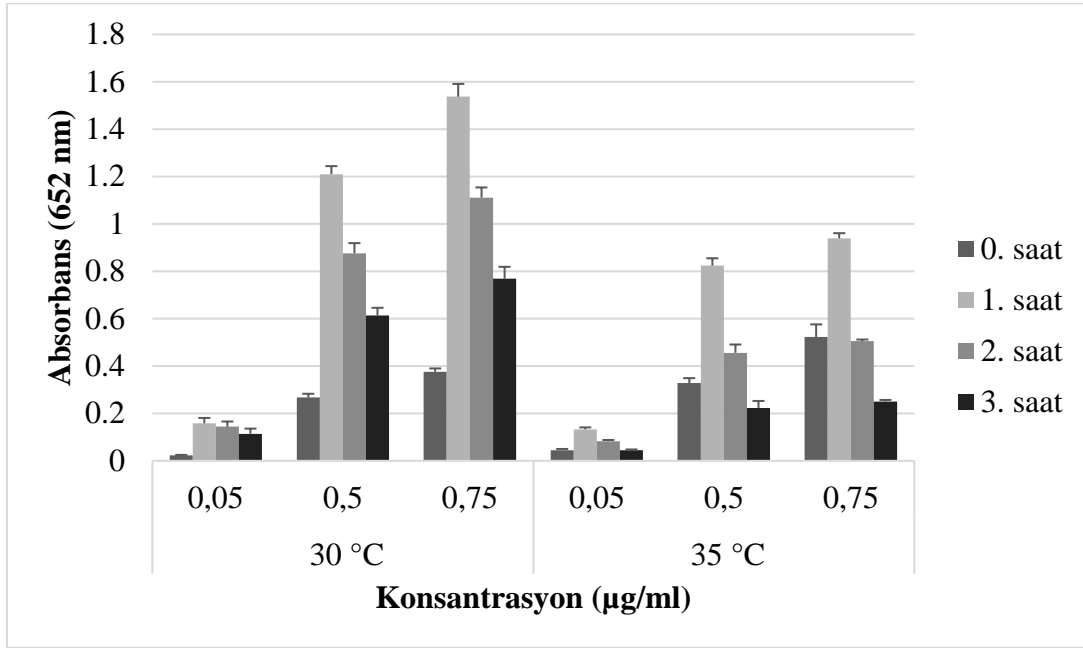
Çizelge 4.4'te 35 °C inkübasyon sıcaklığında fisin enziminin peroksidaz benzeri aktivitesi ile oluşan absorban değeri gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. Fisin enziminin 35 °C inkübasyon sıcaklığında peroksidaz benzeri aktivitesi ile oluşan absorban değeri

Absorbans (652 nm)				
Konsantrasyon	0 saat	1 saat	2 saat	3 saat
0,05 µg/ml	0,045 ± 0,005 ^a	0,133 ± 0,008 ^a	0,083 ± 0,005 ^a	0,045 ± 0,003 ^a
0,5 µg/ml	0,328 ± 0,021 ^b	0,824 ± 0,031 ^b	0,456 ± 0,035 ^b	0,223 ± 0,030 ^b
0,75 µg/ml	0,523 ± 0,053 ^c	0,939 ± 0,022 ^c	0,505 ± 0,007 ^c	0,250 ± 0,007 ^b

Analizlerin sonuçları ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. Aynı sütundaki farklı harfler P<0,05 seviyesinde farklılık olduğunu göstermektedir.

Şekil 4.3’de 30 °C ve 35 °C inkübasyon sıcaklığında inkübasyon öncesi, 1 saat, 2 saat, 3 saat inkübasyon sürelerinde ölçülen absorbans değerleri karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Fisine enziminin farklı sıcaklık değerlerinde peroksidaz benzeri aktivitesi ile oluşan absorbans değeri

3 saat inkübasyon sonucunda elde edilen veriler kullanılarak 0,05, 0,5, 0,75 µg/ml olmak üzere 3 farklı konsantrasyon için t testi gerçekleştirilmiş ve 30 °C ve 35 °C olmak üzere iki inkübasyon sıcaklığı karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.5). 3 grup için de $P < 0,05$ olarak bulunmuş ve istatistiksel olarak önemli düzeyde fark saptanmıştır.

Çizelge 4.5. 30 °C ve 35 °C olmak üzere iki farklı inkübasyon sıcaklığının t testi ile karşılaştırılması

	P değeri
0,05 µg/ml fisine konsantrasyonu - 30 °C & 35 °C	0,006
0,50 µg/ml fisine konsantrasyonu - 30 °C & 35 °C	0,000
0,75 µg/ml fisine konsantrasyonu - 30 °C & 35 °C	0,000

4.1.4. PBS ile Hazırlanan Fisın Enziminin Farklı Konsantrasyonlarda Peroksidaz Benzeri Aktivitesi

Seyreltme için su ve PBS olmak üzere iki farklı çözücü kullanılarak fisin enzimi, 0,40 mM 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), 0,80 mM H₂O₂ ve 0,2 M PBS tamponu (pH 5,0) içerisinde analiz edilmiştir.

İlk olarak, fisin enzimi PBS (pH 7,2) içerisinde çözülmüştür. Ardından saf su ile seyreltme işlemi yapılarak farklı konsantrasyonlarda analiz edilmiştir. 2 saat boyunca 30 °C 'de inkübe edilmiş ve 652 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüm yapılmıştır (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. PBS ile hazırlanan ve saf su içerisinde seyreltme işlemi yapılan fisin enziminin peroksidaz benzeri aktivitesi ile oluşan absorbans değeri

Konsantrasyon	Absorbans (652 nm)	
	1 saat	2 saat
0 µg/ml	0,000 ± 0,019 ^a	0,000 ± 0,029 ^a
0,01 µg/ml	0,012 ± 0,017 ^a	0,017 ± 0,029 ^a
0,05 µg/ml	0,164 ± 0,007 ^b	0,193 ± 0,012 ^b
0,1 µg/ml	0,338 ± 0,044 ^c	0,389 ± 0,044 ^c
0,25 µg/ml	0,867 ± 0,057 ^d	0,899 ± 0,050 ^d
0,33 µg/ml	1,146 ± 0,043 ^e	1,135 ± 0,017 ^e
0,5 µg/ml	1,220 ± 0,026 ^f	1,188 ± 0,014 ^e
0,75 µg/ml	1,889 ± 0,040 ^g	1,543 ± 0,030 ^f
1 µg/ml	2,085 ± 0,056 ^h	1,564 ± 0,041 ^f

Analizlerin sonuçları ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. Aynı sütundaki farklı harfler P<0,05 seviyesinde farklılık olduğunu göstermektedir.

Fisin enzimi PBS (pH 7,2) içerisinde çözülmüş ve aynı PBS ile seyreltme işlemi yapılarak farklı konsantrasyonlarda analiz edilmiştir. Ardından saf su ile seyreltme işlemi yapılarak farklı konsantrasyonlarda analiz edilmiştir. 2 saat boyunca 30 °C 'de inkübe edilmiş ve 652 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüm yapılmıştır (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7. PBS ile hazırlanan ve PBS içerisinde seyreltme işlemi yapılan fisin enziminin peroksidaz benzeri aktivitesi ile oluşan absorbans değeri

Konsantrasyon	Absorbans (652 nm)	
	1 saat	2 saat
0 µg/ml	0,000±0,014 ^a	0,000±0,026 ^a
0,01 µg/ml	0,001±0,003 ^a	0,002±0,005 ^a
0,05 µg/ml	0,090±0,003 ^{ab}	0,105±0,006 ^b
0,1 µg/ml	0,191±0,028 ^b	0,218±0,041 ^c
0,25 µg/ml	0,513±0,008 ^c	0,472±0,022 ^d
0,33 µg/ml	0,722±0,074 ^d	0,693±0,043 ^e
0,5 µg/ml	0,677±0,161 ^d	0,615±0,083 ^f
0,75 µg/ml	1,384±0,047 ^e	1,003±0,012 ^g
1 µg/ml	1,636±0,059 ^f	1,072±0,048 ^h

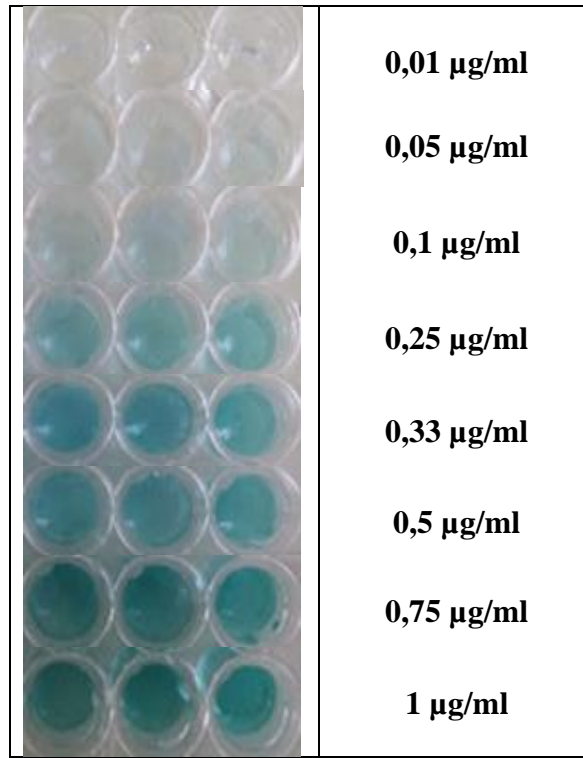
Analizlerin sonuçları ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. Aynı sütundaki farklı harfler P<0,05 seviyesinde farklılık olduğunu göstermektedir.

2 saat inkübasyon sonucunda elde edilen veriler kullanılarak 0,05, 0,1, 0,25, 0,33 µg/ml olmak üzere 4 farklı konsantrasyon için t testi gerçekleştirilmiş ve seyreltme için saf su ve PBS olmak üzere iki farklı çözücü kullanılarak karşılaştırma yapılmıştır (Çizelge 4.8). 4 grup için de P<0,05 olarak bulunmuş ve istatistiksel olarak önemli düzeyde fark saptanmıştır.

Çizelge 4.8. Saf su ve PBS olmak üzere iki farklı çözücünün t testi ile karşılaştırılması

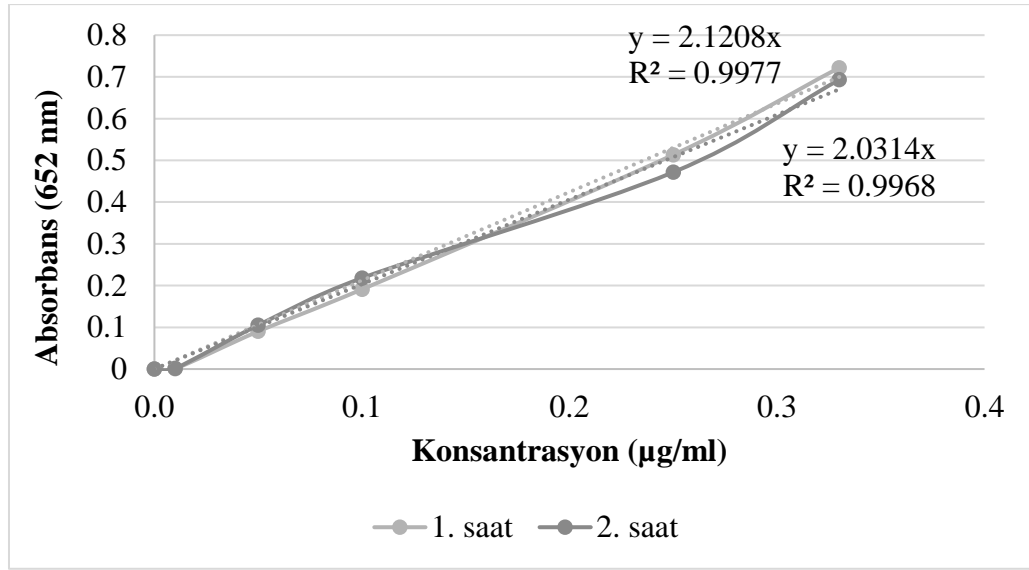
	P değeri
0,05 µg/ml fisin konsantrasyonu - Saf su & PBS	0,000
0,10 µg/ml fisin konsantrasyonu - Saf su & PBS	0,008
0,25 µg/ml fisin konsantrasyonu - Saf su & PBS	0,000
0,33 µg/ml fisin konsantrasyonu - Saf su & PBS	0,000

Şekil 4.4.'de 2 saat inkübasyon sonucunda 96 kuyulu plakadaki kuyularda fisin konsantrasyonu değişimi ile oluşan renk artışı gösterilmiştir.



Şekil 4.4. Fisin konsantrasyonu artışı ile peroksidaz benzeri aktivitesine bağlı oluşan renk artışı

Lipozomal formülasyonlara uygulanabilirliği açısından PBS ile hazırlanan ve PBS içerisinde seyreltme işlemi yapılan fisin enziminin peroksidaz benzeri aktivitesi kalibrasyon eğrisi olarak kullanılmıştır. Şekil 4.5'de PBS içerisinde seyreltilen fisin enziminin 0,01 ile 0,33 µg/ml konsantrasyonları arasında ölçülen değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4.5. PBS içerisinde seyreltilen fisin enziminin peroksidaz benzeri aktivitesi ile oluşan absorbans değeri

4.1.5. İncir Latekslerinin Farklı Konsantrasyonlarda Peroksidaz Benzeri Aktivitesi

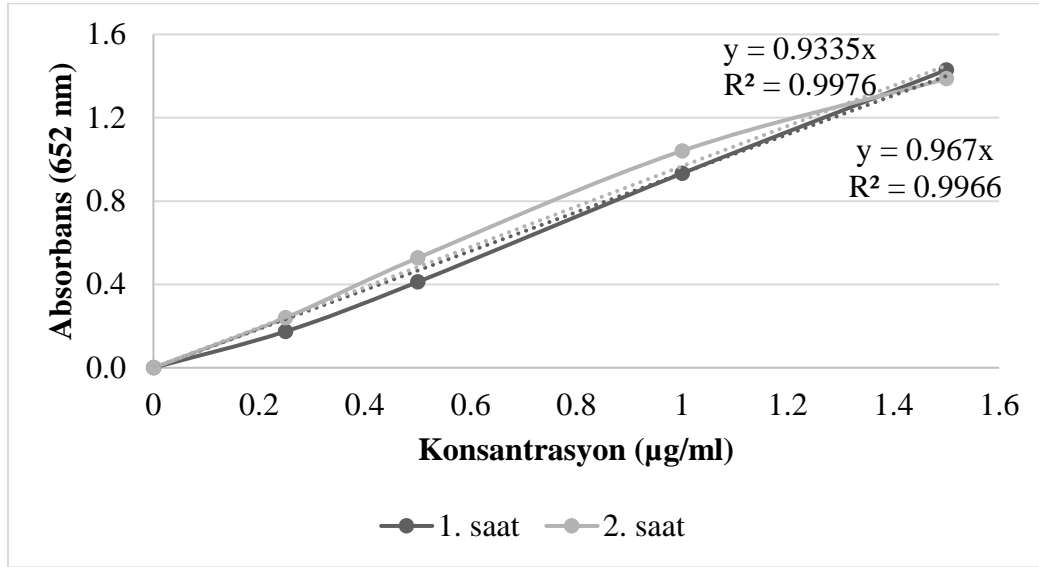
Farklı konsantrasyonlarda Sarı Lop incir lateksi, saf su kullanılarak hazırlanmış ve aynı şekilde saf su ile seyreltilmiştir. 30 °C’de 2 saat boyunca 652 nm’de spektrofotometrik olarak ölçüm yapılmıştır (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9. Saf su ile hazırlanan ve saf su içerisinde seyreltme işlemi yapılan Sarı Lop incir lateksinin peroksidaz benzeri aktivitesi ile oluşan absorbans değeri

Konsantrasyon	0 saat	1 saat	2 saat
0 µg/ml	0,000 ± 0,001 ^a	0,000 ± 0,001 ^a	0,000 ± 0,001 ^a
0,25 µg/ml	0,021 ± 0,008 ^a	0,174 ± 0,066 ^b	0,240 ± 0,081 ^b
0,5 µg/ml	0,055 ± 0,007 ^b	0,412 ± 0,030 ^c	0,527 ± 0,032 ^c
1 µg/ml	0,148 ± 0,029 ^c	0,933 ± 0,127 ^d	1,041 ± 0,114 ^d
1,5 µg/ml	0,270 ± 0,008 ^d	1,429 ± 0,033 ^e	1,387 ± 0,035 ^e

Analizlerin sonuçları ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. Aynı sütundaki farklı harfler P<0,05 seviyesinde farklılık olduğunu göstermektedir.

Şekil 4.6’da saf su içerisinde hazırlanan ve seyreltilen Sarı Lop incir lateksi ile hazırlanan kalibrasyon eğrisi gösterilmiştir.



Şekil 4.6. Saf su ile hazırlanan ve seyreltilen Sarı Lop incir lateksinin peroksidaz benzeri aktivitesi ile oluşan absorbans değeri

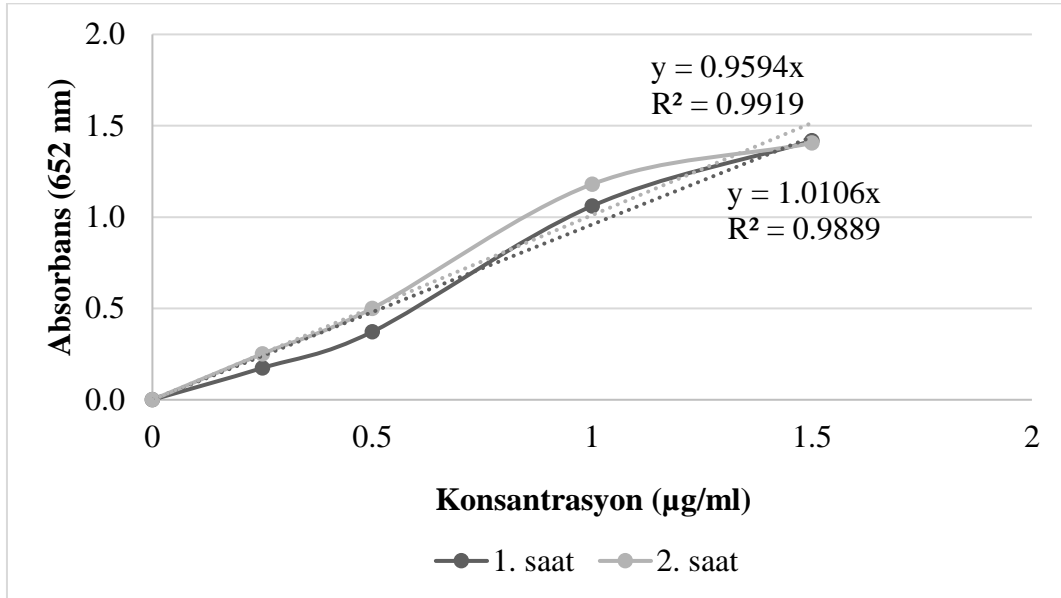
Aydın Siyahı incir lateksi de saf su kullanılarak hazırlanmış ve aynı şekilde saf su ile seyreltilmiştir. Son olarak 30 °C’de 2 saat boyunca 652 nm’de spektrofotometrik olarak ölçüm yapılmıştır (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10. Saf su ile hazırlanan ve saf su içerisinde seyreltme işlemi yapılan Aydın Siyahı incir lateksinin peroksidaz benzeri aktivitesi ile oluşan absorbans değeri

Konsantrasyon	0 saat	1 saat	2 saat
0 µg/ml	0,000 ± 0,001 ^a	0,000 ± 0,001 ^a	0,000 ± 0,001 ^a
0,25 µg/ml	0,018 ± 0,012 ^b	0,174 ± 0,102 ^b	0,251 ± 0,135 ^b
0,5 µg/ml	0,041 ± 0,006 ^c	0,372 ± 0,045 ^c	0,500 ± 0,058 ^c
1 µg/ml	0,156 ± 0,006 ^d	1,061 ± 0,009 ^d	1,180 ± 0,034 ^d
1,5 µg/ml	0,260 ± 0,010 ^e	1,418 ± 0,024 ^e	1,405 ± 0,026 ^e

Analizlerin sonuçları ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. Aynı sütundaki farklı harfler P<0,05 seviyesinde farklılık olduğunu göstermektedir.

Şekil 4.7’de saf su içerisinde hazırlanan ve seyreltilen Aydın Siyahı incir lateksi ile hazırlanan kalibrasyon eğrisi gösterilmiştir.



Şekil 4.7. Saf su ile hazırlanan ve seyreltilen Aydın Siyahı incir lateksinin peroksidaz benzeri aktivitesi ile oluşan absorbans değeri

2 saat inkübasyon sonucunda elde edilen veriler kullanılarak 0,25, 0,5, 1, 1,5 µg/ml olmak üzere 4 farklı konsantrasyon için t testi gerçekleştirilmiş ve Sarı Lop ve Aydın Siyahı olmak üzere iki farklı incir lateksi kullanılarak karşılaştırma yapılmıştır (Çizelge 4.11). 4 grup için de $P > 0,05$ olarak bulunmuş ve istatistiksel olarak fark görülmemiştir.

Çizelge 4.11. Saf su ile hazırlanan ve seyreltilen Sarı Lop ve Aydın Siyahı incir latekslerinin peroksidaz benzeri aktivitesi ile oluşan absorbans değerlerinin t testi ile karşılaştırılması

	P değeri
0,25 µg/ml konsantrasyon - Sarı Lop & Aydın Siyahı	0,910
0,5 µg/ml konsantrasyon - Sarı Lop & Aydın Siyahı	0,527
1 µg/ml konsantrasyon - Sarı Lop & Aydın Siyahı	0,113
1,5 µg/ml konsantrasyon - Sarı Lop & Aydın Siyahı	0,514

4.1.6. PBS ile Hazırlanan İncir Latekslerinin Farklı Konsantrasyonlarda Peroksidaz Benzeri Aktivitesi

Sarı Lop ve Aydın Siyahı incir lateksleri, PBS (pH 7,2) içerisinde çözülmüş ve aynı PBS ile seyreltme işlemi yapılmıştır. İncir lateksleri farklı konsantrasyonlarda 0,40 mM 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), 0,80 mM H₂O₂ ve 0,2 M PBS tamponu (pH 5,0) içerisinde analiz edilmiştir. 2 saat boyunca 30 °C 'de inkübe edilmiş ve 652 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüm yapılmıştır. Lipozomal formülasyonlar için elde edilen veriler kalibrasyon eğrisi olarak kullanılmıştır.

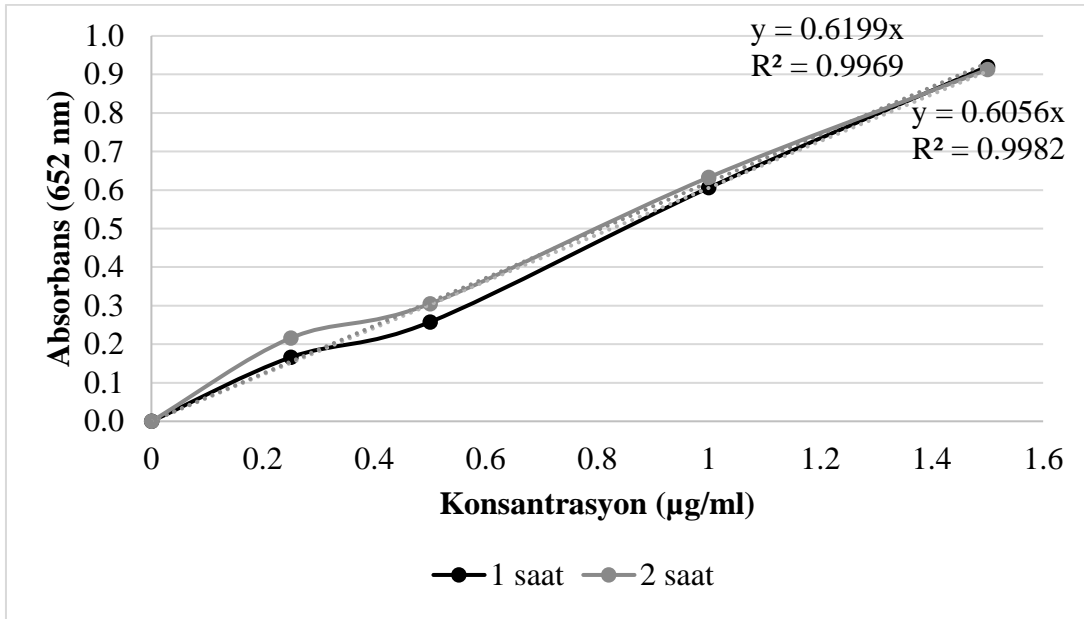
Çizelge 4.12'de PBS ile hazırlanan ve PBS içerisinde seyreltme işlemi yapılan Sarı Lop incir lateksinin peroksidaz benzeri aktivitesi ile oluşan absorbans değeri gösterilmiştir.

Çizelge 4.12. PBS ile hazırlanan ve seyreltilen Sarı Lop incir lateksinin peroksidaz benzeri aktivitesi ile oluşan absorbans değeri

Konsantrasyon	0 saat	1 saat	2 saat
0 µg/ml	0,000 ± 0,012 ^a	0,000 ± 0,020 ^a	0,000 ± 0,023 ^a
0,25 µg/ml	0,019 ± 0,040 ^{ab}	0,166 ± 0,031 ^b	0,216 ± 0,046 ^b
0,5 µg/ml	0,022 ± 0,080 ^b	0,258 ± 0,032 ^b	0,305 ± 0,036 ^b
1 µg/ml	0,052 ± 0,010 ^c	0,606 ± 0,047 ^c	0,633 ± 0,070 ^c
1,5 µg/ml	0,098 ± 0,015 ^d	0,921 ± 0,105 ^d	0,913 ± 0,119 ^d

Analizlerin sonuçları ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. Aynı sütundaki farklı harfler P<0,05 seviyesinde farklılık olduğunu göstermektedir.

Şekil 4.8’de PBS içerisinde hazırlanan ve seyreltilen Sarı Lop incir lateksi ile hazırlanan kalibrasyon eğrisi gösterilmiştir.



Şekil 4.8. PBS ile hazırlanan Sarı Lop incir lateksinin peroksidaz benzeri aktivitesi ile oluşan absorbanans değeri

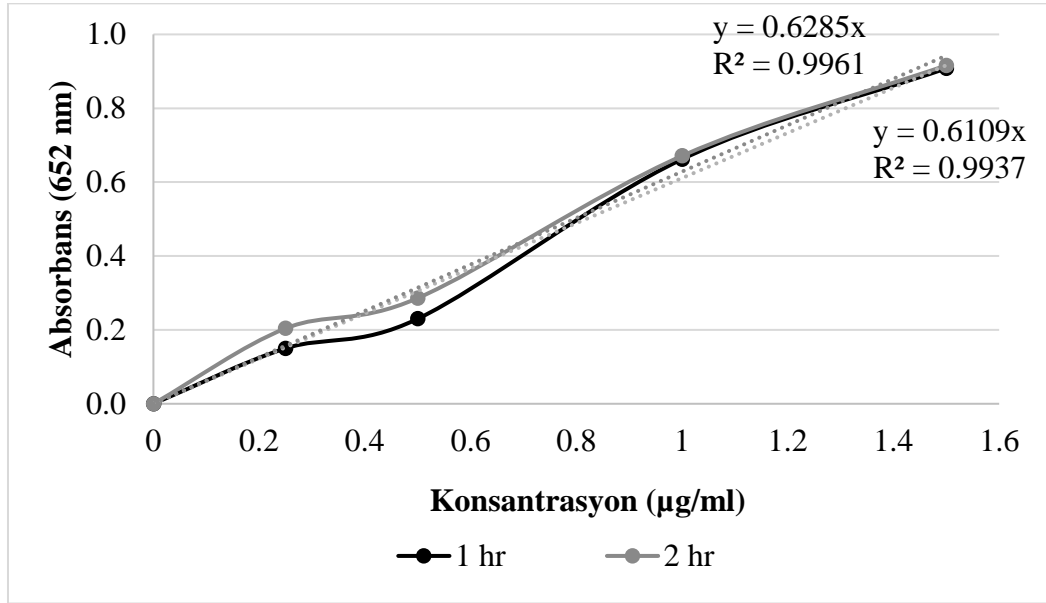
Çizelge 4.13’de PBS ile hazırlanan ve PBS içerisinde seyreltme işlemi yapılan Aydın Siyahı incir lateksinin peroksidaz benzeri aktivitesi ile oluşan absorbanans değeri gösterilmiştir.

Çizelge 4.13. PBS ile hazırlanan ve seyreltilen Aydın Siyahı incir lateksinin peroksidaz benzeri aktivitesi ile oluşan absorbanans değeri

Konsantrasyon	0 saat	1 saat	2 saat
0 µg/ml	0,000 ± 0,025 ^a	0,000 ± 0,025 ^a	0,000 ± 0,038 ^a
0,25 µg/ml	0,006 ± 0,090 ^{ab}	0,150 ± 0,035 ^b	0,204 ± 0,012 ^b
0,5 µg/ml	0,009 ± 0,016 ^{ab}	0,230 ± 0,016 ^c	0,286 ± 0,019 ^c
1 µg/ml	0,049 ± 0,012 ^{ab}	0,662 ± 0,015 ^d	0,671 ± 0,026 ^d
1,5 µg/ml	0,090 ± 0,030 ^b	0,908 ± 0,012 ^e	0,916 ± 0,036 ^e

Analizlerin sonuçları ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. Aynı sütundaki farklı harfler P<0,05 seviyesinde farklılık olduğunu göstermektedir.

Şekil 4.9’de PBS içerisinde hazırlanan ve seyreltilen Aydın Siyahı incir lateksi ile hazırlanan kalibrasyon eğrisi gösterilmiştir.



Şekil 4.9. PBS ile hazırlanan Aydın Siyahı incir lateksinin peroksidaz benzeri aktivitesi ile oluşan absorbans değeri

2 saat inkübasyon sonucunda elde edilen veriler kullanılarak 0,25, 0,5, 1, 1,5 µg/ml olmak üzere 4 farklı konsantrasyon için t testi analizi gerçekleştirilmiş ve Sarı Lop ve Aydın Siyahı olmak üzere iki farklı incir lateksi kullanılarak karşılaştırma yapılmıştır (Çizelge 4.14). 4 grup için de $P > 0,05$ olarak bulunmuş ve istatistiksel olarak fark görülmemiştir.

Çizelge 4.14. Sarı Lop ve Aydın Siyahı olmak üzere iki farklı incir lateksinin peroksidaz benzeri aktivitelerinin t testi ile karşılaştırılması

	P değeri
0,25 µg/ml konsantrasyon - Sarı Lop & Aydın Siyahı	0,685
0,5 µg/ml konsantrasyon - Sarı Lop & Aydın Siyahı	0,464
1,0 µg/ml konsantrasyon - Sarı Lop & Aydın Siyahı	0,428
1,5 µg/ml konsantrasyon - Sarı Lop & Aydın Siyahı	0,969

4.2. Lipozomal İncir Lateksleri ve Fisın Enziminin Karakterizasyonu

Fisın ve incir latekslerinin karakterizasyonunu belirlemek için peroksidaz benzeri aktiviteleri ölçülerek lipozom içerisindeki konsantrasyonlar, enkapsüle edilen miktar ve enkapsülasyon verimi hesaplanmıştır. Ayrıca boyut analizleri ile partiküllerin boyutu, PDI değeri ve zeta potansiyelleri ölçülmüştür.

4.2.1. Lipozomal İncir Lateksleri ve Fisının Konsantrasyonu ve Enkapsülasyon Verimi

Enkapsüle edilen fisın ve incir latekslerinin lipozomlarının analiz sırasında açılabilirliği tespit edilmiştir. İlk olarak, lipozomlar metanol içinde 1:10 oranında seyreltilmiş ve 5 dakika sonikasyona tabi tutulmuştur. Sonrasında seyreltmeler yapılarak analiz edilmiştir. Aynı zamanda lipozomlara işlem uygulanmadan direkt olarak seyreltilerek peroksidaz benzeri aktivitesi ölçülmüştür.

Denemeler sonucunda peroksidaz benzeri aktivitenin belirlenmesi için yapılan analizin lipozomların açılması için yeterli olduğu tespit edilmiştir. Bu yüzden lipozomal enkapsüle fisın veya incir lateksi konsantrasyon ve miktarlarının belirlenmesinde örnekler seyreltilerek direkt olarak analiz edilmiştir.

Analiz sırasında sonuçları doğrulamak adına Amicon sanrifüj filtresi kullanılarak lipozomlardan ayrılan filtratlar, ekstrüzyon öncesi ve sonrası örnekler de aynı şekilde analiz edilmiştir. Lipozomların peroksidaz benzeri aktiviteleri 2 saat boyunca 652 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Hazırlanan kalibrasyon eğrisi kullanılarak oluşturulan lipozomların konsantrasyonları, miktarları ve verimleri hesaplanmıştır

Çizelge 4.15'te lipozomal incir lateksleri ve fisin enziminin konsantrasyonları, miktarları ve enkapsülasyon verimleri gösterilmiştir.

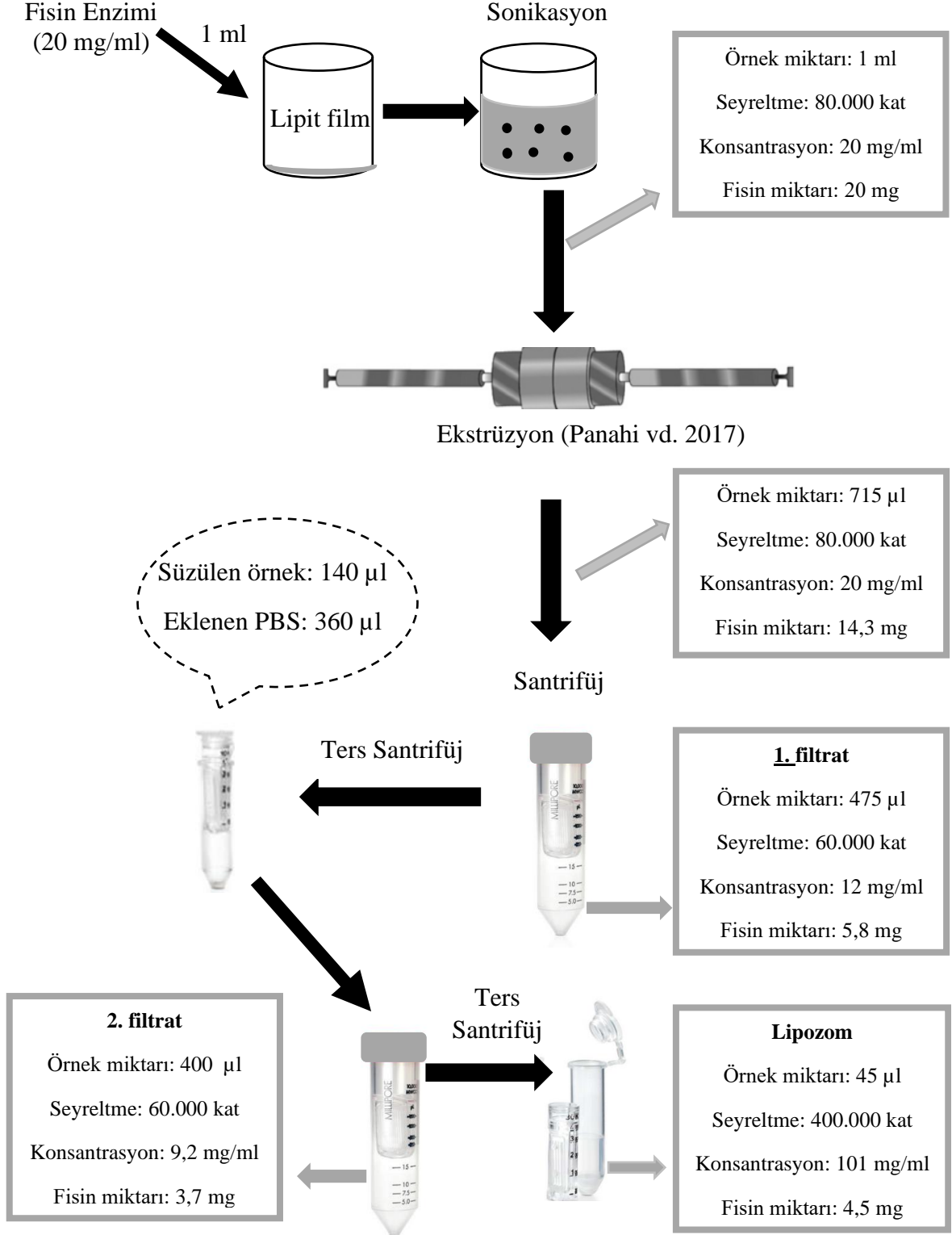
Çizelge 4.15. Lipozomal incir lateksleri ve fisinin konsantrasyonu, miktarı ve enkapsülasyon verimi

	Konsantrasyon (mg/ml)	Miktar (mg)	Verim (%)
Fisin	101,3 ± 4,8 ^c	4,6 ± 0,2 ^b	23,0 ± 1,0 ^b
Sarı Lop	37,5 ± 4,2 ^b	4,0 ± 0,3 ^b	20,1 ± 1,7 ^b
Aydın Siyahı	28,9 ± 3,4 ^a	3,1 ± 0,4 ^a	15,5 ± 1,8 ^a

Analizlerin sonuçları ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. Aynı sütundaki farklı harfler P<0,05 seviyesinde farklılık olduğunu göstermektedir.

Fisin, Sarı Lop incir lateksi ve Aydın Siyahı incir lateksi kullanılarak lipozomlar oluşturulmuş ve ANOVA ile karşılaştırma yapılmıştır. Tüm örnekler konsantrasyon, miktar ve verim açısından karşılaştırılmıştır. Analiz sonucunda konsantrasyon, miktar ve verim değerleri için P değeri sırasıyla 0,000, 0,003 ve 0,003 olarak bulunmuş ve istatistiksel olarak önemli düzeyde fark saptanmıştır.

Şekil 4.10'da lipozomal fisin için yapılan ölçümler gösterilmiştir. İncir lateksleri için de aynı prosedür uygulanmıştır.



Şekil 4.10. Lipozomal fisinin miktar, konsantrasyon ve verim hesaplamaları için yapılan ölçümler

4.2.2. Lipozomal Fisın Enzimi ve İncir Latekslerinin Boyut Analizi

Lipozom boyutu bir partikül analizör ile ölçülmüştür. Çizelge 4.16'da parçacık boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel değerleri gösterilmiştir. Analiz sırasında örnekler, 1500 kat seyreltilmiştir.

Çizelge 4.16. Lipozomal fisin enzimi ve incir latekslerinin boyut analizi

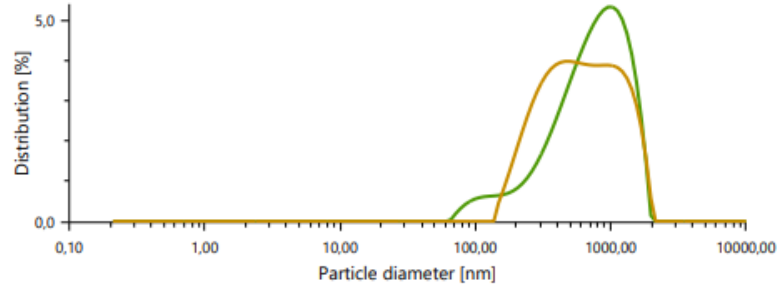
	Boyut (nm)	PDI (%)	Zeta Potansiyel (mV)
Kontrol	821,3 ± 197,6 ^a	28,6 ± 2,3 ^a	-15,2 ± 0,2 ^a
Fisin	1803,4 ± 936,9 ^a	38,1 ± 6,5 ^b	-10,2 ± 0,4 ^b
Sarı Lop	1169,8 ± 186,3 ^a	35,7 ± 3,2 ^b	-10,0 ± 1,0 ^b
Aydın Siyahı	1372,8 ± 951,3 ^a	36,3 ± 2,7 ^b	-10,0 ± 1,0 ^b

Analizlerin sonuçları ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. Aynı sütundaki farklı harfler P<0,05 seviyesinde farklılık olduğunu göstermektedir.

Çalışma kapsamında kontrol, fisin enzimi, Sarı Lop ve Aydın Siyahı incir lateksleri analiz edilmiştir. Kontrol grubu olarak oluşturulan lipozomların boyut analizi ve zeta potansiyel sonuçları sırasıyla şekil 4.11 ve şekil 4.12'de gösterilmiştir. Fisın enzimi için boyut analizi ve zeta potansiyel sonuçları şekil 4.13 ve şekil 4.14'de verilmiştir. Sarı Lop incir lateksi için ise boyut analizi ve zeta potansiyel sonuçları şekil 4.15 ve şekil 4.16'da gösterilmiştir. Son olarak Aydın Siyahı incir lateksi boyut analizi ve zeta potansiyel sonuçları şekil 4.17 ve şekil 4.18'de verilmiştir.

Fisin enzimi, Sarı Lop ve Aydın Siyahı incir lateksleri lipozomlar oluşturulmuş ve ANOVA ile karşılaştırma yapılmıştır. Tüm örnekler boyut, PDI ve zeta potansiyel açısından karşılaştırılmıştır. Analiz sonucunda PDI ve zeta potansiyel değerleri için P değeri sırasıyla, 0,029 ve 0,000 olarak bulunmuş ve istatistiksel olarak önemli düzeyde fark saptanmıştır. Boyut analizi sonuçları için ise P değeri 0,277 olarak bulunmuş ve istatistiksel olarak önemli düzeyde fark saptanmamıştır.

Particle size distribution (intensity)

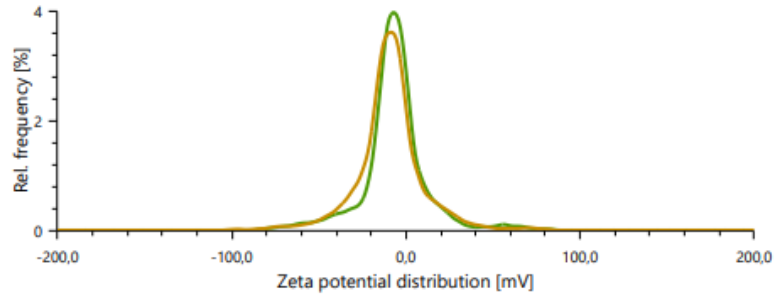


Measurements

Index	Color	Repetition	Hydrodyn. diam. [nm]	Polydisp. index [%]	Peak 1 intensity [nm]	Peak 2 intensity [nm]	Peak 3 intensity [nm]	Transmittance [%]
1	—	0h 00m 10s	1041,5	28,2	796,7	-	-	0,9
2	—	0h 00m 10s	930,1	28,9	429,3	1203,5	-	0,9

Şekil 4.11. Kontrol için boyut analizi sonuçları

Zeta potential distribution

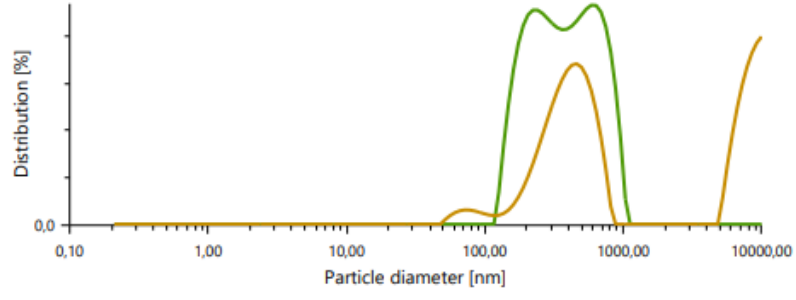


Measurements

Index	Color	Repetition	Mean zeta pot. [mV]	Electroph. mobil. [$\mu\text{m}^2\text{cm}/\text{Vs}$]	Conductivity [mS/cm]	Adjusted voltage [V]	Processed runs
1	—	0h 00m 10s	-15,0	-1,1677	22,846	50,5	1000
2	—	0h 00m 10s	-15,3	-1,1921	24,028	49,0	1000

Şekil 4.12. Kontrol için zeta potansiyel sonuçları

Particle size distribution (intensity)

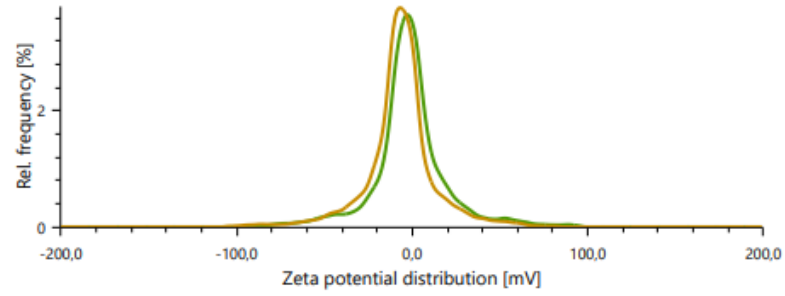


Measurements

Index	Color	Repetition	Hydrodyn. diam. [nm]	Polydisp. index [%]	Peak 1 intensity [nm]	Peak 2 intensity [nm]	Peak 3 intensity [nm]	Transmittance [%]
1	—	0h 00m 10s	2845	37,0	593,9	229,4	-	0,9
2	—	0h 00m 10s	688,5	34,0	11486	419,0	77,47	0,9

Şekil 4.13. Lipozomal fisin enzimi boyut analizi sonuçları

Zeta potential distribution

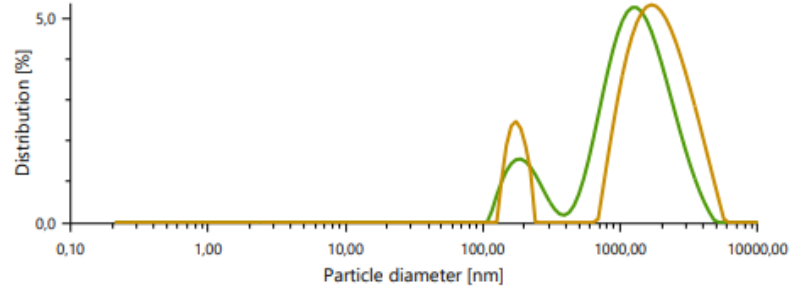


Measurements

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	—	0h 00m 10s	-9,9	-0,7744	23,137	49,6	980
2	—	0h 00m 10s	-10,4	-0,8130	23,030	49,6	620

Şekil 4.14. Lipozomal fisin enzimi zeta potansiyel sonuçları

Particle size distribution (intensity)

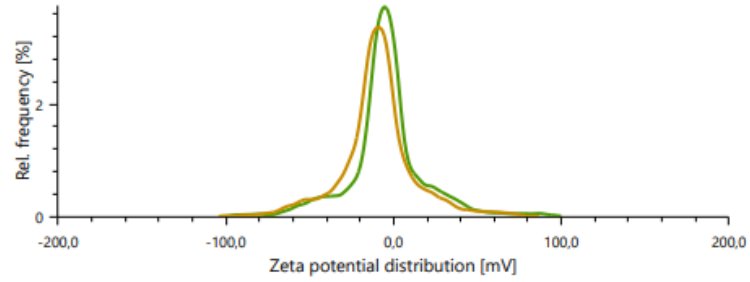


Measurements

Index	Color	Repetition	Hydrodyn. diam. [nm]	Polydisp. index [%]	Peak 1 intensity [nm]	Peak 2 intensity [nm]	Peak 3 intensity [nm]	Transmittance [%]
1	—	0h 00m 10s	1258,3	32,7	1508,4	201,1	-	0,9
2	—	0h 00m 10s	933,1	40,1	2060	176,48	-	0,9

Şekil 4.15. Lipozomal Sarı Lop lateksi boyut analizi sonuçları

Zeta potential distribution

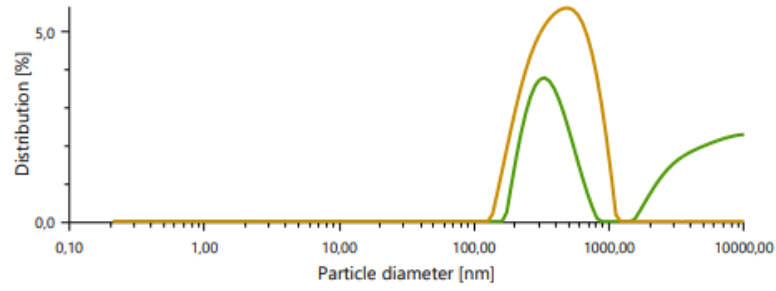


Measurements

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	—	0h 00m 10s	-9,3	-0,7246	23,795	49,0	680
2	—	0h 00m 10s	-10,7	-0,8310	23,763	48,9	1000

Şekil 4.16. Lipozomal Sarı Lop lateksi zeta potansiyel sonuçları

Particle size distribution (intensity)

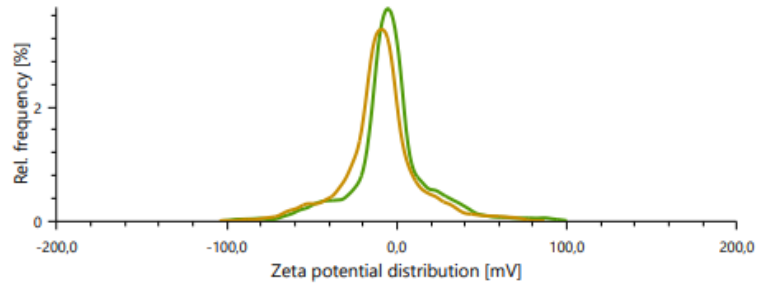


Measurements

Index	Color	Repetition	Hydrodyn. diam. [nm]	Polydisp. Index [%]	Peak 1 intensity [nm]	Peak 2 intensity [nm]	Peak 3 intensity [nm]	Transmittance [%]
1	—	0h 00m 10s	2761	33,9	368,3	8359	-	0,9
2	—	0h 00m 10s	642,7	35,9	465,7	-	-	0,9

Şekil 4.17. Lipozomal Aydın Siyahı lateksi boyut analizi sonuçları

Zeta potential distribution



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	—	0h 00m 10s	-9,3	-0,7246	23,795	49,0	680
2	—	0h 00m 10s	-10,7	-0,8310	23,763	48,9	1000

Şekil 4.18. Lipozomal Aydın Siyahı lateksi zeta potansiyel sonuçları

4.3. Fisin ve İncir Latekslerinin MTT ile Sitotoksosite Analizi

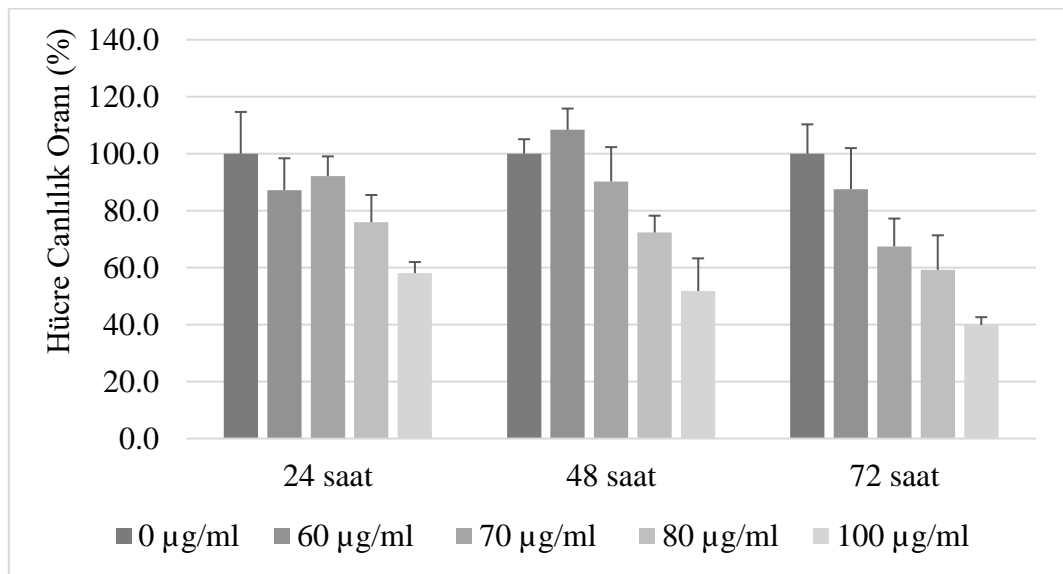
Çizelge 4.17’de MTT ile sitotoksosite analizi sonucunda fisin enziminin muamele süresi ve konsantrasyona bağlı olarak değişen hücre canlılık oranı gösterilmiştir.

Çizelge 4.17. Fisin enziminin HT-29 hücre hattı üzerinde muamele süresi ve konsantrasyona bağlı olarak değişen hücre canlılık sonuçları

Fisin konsantrasyonu	Hücre Canlılık Oranı (%)		
	24 saat	48 saat	72 saat
0 µg/ml	100,0 ± 14,6 ^c	100,0 ± 5,1 ^b	100,0 ± 10,3 ^c
60 µg/ml	87,2 ± 11,2 ^{bc}	108,4 ± 7,5 ^b	87,5 ± 14,4 ^c
70 µg/ml	92,2 ± 6,9 ^{bc}	90,3 ± 12,0 ^b	67,5 ± 9,8 ^d
80 µg/ml	75,9 ± 9,6 ^{ab}	72,3 ± 5,9 ^a	59,2 ± 12,1 ^b
100 µg/ml	58,1 ± 3,9 ^a	51,8 ± 11,5 ^a	39,8 ± 2,8 ^a

Analizlerin sonuçları ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. Aynı sütundaki farklı harfler P<0,05 seviyesinde farklılık olduğunu göstermektedir.

Şekil 4.19’da fisinin 24, 48 ve 72 saatlik muamele sürelerini sonunda konsantrasyon artışıyla birlikte azalan hücre canlılık oranı gösterilmiştir.



Şekil 4.19. Fisin enziminin MTT ile sitotoksosite analizi

Fisin enzimi, HT-29 kolon kanseri hücre hattı üzerinde 24, 48 ve 72 saat boyunca muamele edilmiş ve 100 µg/ml fisin konsantrasyonu için muamele süresinin etkisi ANOVA kullanılarak karşılaştırılmıştır. Analiz sonucunda P değeri 0,053 olarak bulunmuş ve istatistiksel olarak önemli düzeyde fark saptanmamıştır

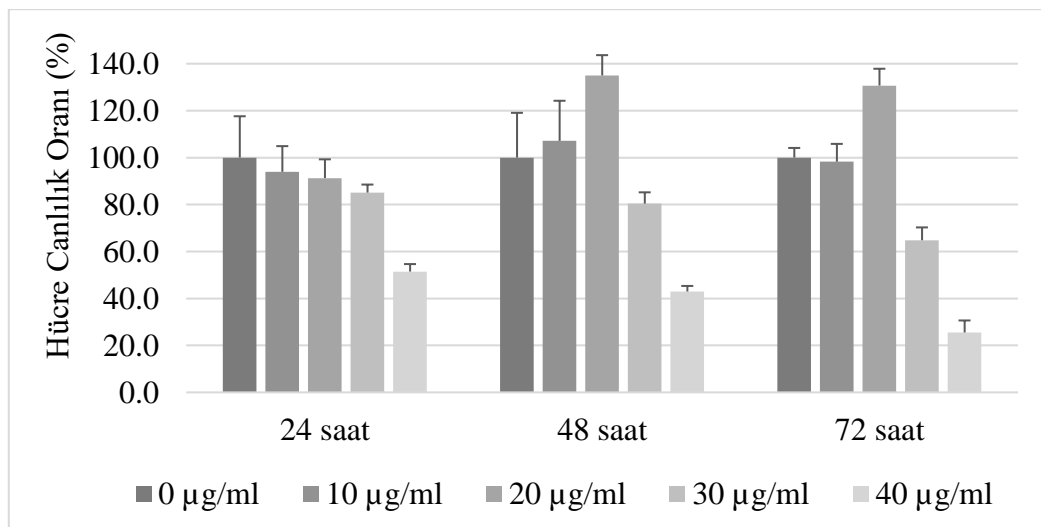
Çizelge 4.18’de Sarı Lop incir lateksinin muamele süresi ve konsantrasyona bağlı olarak değişen hücre canlılık oranı gösterilmiştir.

Çizelge 4.18. Sarı Lop incir lateksinin HT-29 hücre hattı üzerinde muamele süresi ve konsantrasyona bağlı olarak değişen hücre canlılık sonuçları

Sarı Lop İncir Lateksi Konsantrasyonu	Hücre Canlılık Oranı (%)		
	24 saat	48 saat	72 saat
0 µg/ml	100,0 ± 17,6 ^b	100,0 ± 19,1 ^{bc}	100,0 ± 4,1 ^c
10 µg/ml	94,0 ± 13,4 ^b	107,1 ± 6,6 ^c	98,3 ± 11,2 ^c
20 µg/ml	91,3 ± 5,3 ^b	135,0 ± 6,6 ^d	130,7 ± 4,2 ^d
30 µg/ml	85,1 ± 11,2 ^b	80,4 ± 14,3 ^b	64,8 ± 8,0 ^b
40 µg/ml	51,5 ± 15,2 ^a	43,0 ± 10,6 ^a	25,5 ± 14,1 ^a

Analizlerin sonuçları ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. Aynı sütundaki farklı harfler P<0,05 seviyesinde farklılık olduğunu göstermektedir.

Şekil 4.20’de Sarı Lop incir latekslerinin 24, 48 ve 72 saatlik muamele sürelerini sonunda konsantrasyon artışıyla birlikte azalan hücre canlılık oranı gösterilmiştir.



Şekil 4.20. Sarı Lop incir lateksinin MTT ile sitotoksosite analizi

Sarı Lop, HT-29 kolon kanseri hücre hattı üzerinde 24, 48 ve 72 saat boyunca muamele edilmiş ve 40 µg/ml incir lateksi konsantrasyonu için muamele süresinin etkisi ANOVA kullanılarak karşılaştırılmıştır. Analiz sonucunda P değeri 0,131 olarak bulunmuş ve istatistiksel olarak önemli düzeyde fark saptanmamıştır

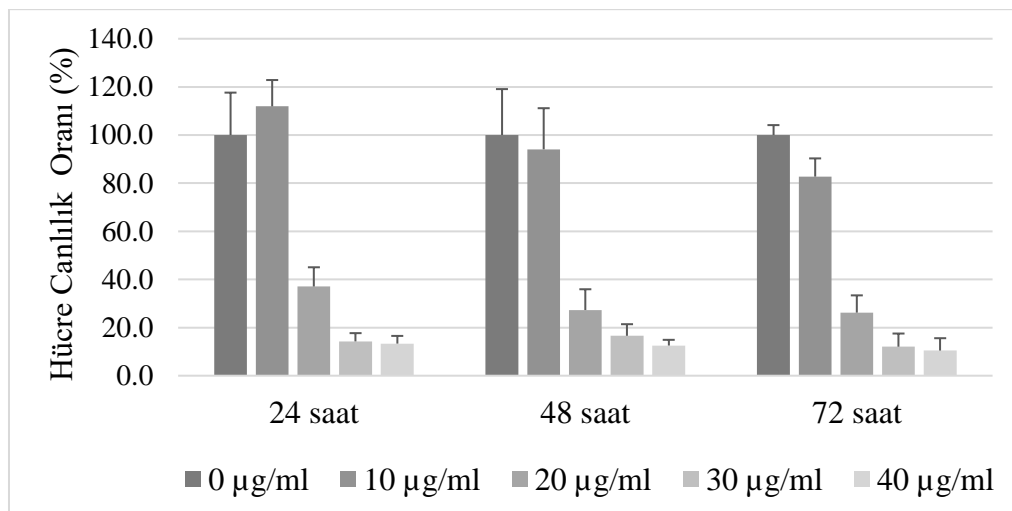
Çizelge 4.19’de Aydın Siyahı incir lateksinin muamele süresi ve konsantrasyona bağlı olarak değişen hücre canlılık oranı gösterilmiştir.

Çizelge 4.19. Aydın Siyahı incir lateksinin HT-29 hücre hattı üzerinde muamele süresi ve konsantrasyona bağlı olarak değişen hücre canlılık sonuçları

Aydın Siyahı İncir Lateksi Konsantrasyonu	Hücre Canlılık Oranı (%)		
	24 saat	48 saat	72 saat
0 µg/ml	100,0 ± 17,6 ^c	100,0 ± 19,1 ^b	100,0 ± 4,1 ^d
10 µg/ml	111,9 ± 10,9 ^c	94,1 ± 17,1 ^b	82,7 ± 7,6 ^c
20 µg/ml	37,1 ± 8,0 ^b	27,3 ± 8,7 ^a	26,2 ± 7,2 ^b
30 µg/ml	14,3 ± 3,4 ^a	16,6 ± 4,8 ^a	12,1 ± 5,5 ^a
40 µg/ml	13,3 ± 3,2 ^a	12,5 ± 2,4 ^a	10,5 ± 5,1 ^a

Analizlerin sonuçları ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. Aynı sütundaki farklı harfler P<0,05 seviyesinde farklılık olduğunu göstermektedir.

Şekil 4.21’de Aydın Siyahı incir lateksinin 24, 48 ve 72 saatlik muamele sürelerini sonunda konsantrasyon artışıyla birlikte azalan hücre canlılık oranı gösterilmiştir.



Şekil 4.21. Aydın Siyahı incir lateksinin MTT ile sitotoksosite analizi

Aydın Siyahı, HT-29 kolon kanseri hücre hattı üzerinde 24, 48 ve 72 saat boyunca muamele edilmiş ve 40 µg/ml incir lateksi konsantrasyonu için muamele süresinin etkisi ANOVA kullanılarak karşılaştırılmıştır. Analiz sonucunda P değeri 0,647 olarak bulunmuş ve istatistiksel olarak önemli düzeyde fark saptanmamıştır.

Ayrıca 24, 48 ve 72 saat muamele sonucunda elde edilen veriler kullanılarak 40 µg/ml konsantrasyon için t testi analizi gerçekleştirilmiş ve Sarı Lop ve Aydın Siyahı olmak üzere iki farklı incir lateksi kullanılarak karşılaştırma yapılmıştır (Çizelge 4.20). 24 ve 48 saat muamele için P<0,05 olarak bulunmuş ve istatistiksel olarak önemli düzeyde fark görülmüştür. 72 saat muamele sonuçları için ise P değeri 0,157 olarak bulunmuş ve istatistiksel olarak önemli düzeyde fark saptanmamıştır.

Çizelge 4.20. Aydın Siyahı ve Sarı Lop incir latekslerinin sitotoksik etkilerinin t testi ile karşılaştırılması

	P değeri
40 µg/ml - 24 saat - Sarı Lop & Aydın Siyahı	0,013
40 µg/ml – 48 saat - Sarı Lop & Aydın Siyahı	0,008
40 µg/ml – 72 saat - Sarı Lop & Aydın Siyahı	0,157

4.4. Lipozomal Fisın ve İncir Latekslerinin Lüminesans Yöntem Sitotoksosite Analizi

Hücreler 10000 hücre/kuyu olacak şekilde 0, 90, 120, 150 µg/ml konsantrasyonlarında fisin ve lipozomal fisin içeren besiyerleri ve 0, 15, 25, 35 µg/ml konsantrasyonlarında incir lateksi ve lipozomal incir lateksi içeren besiyerleri kullanılarak kanser hücreleri üzerinde 48 saate kadar muamele edilmiştir. Muamele süresi sonunda HT-29 hücrelerinin canlılık seviyeleri CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay kiti ile ölçülmüştür.

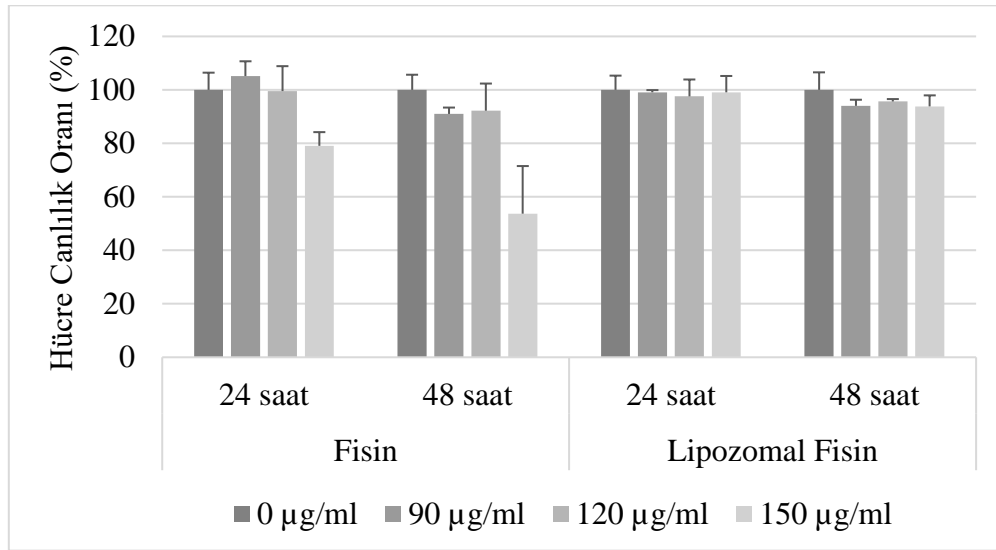
Çizelge 4.21’de fisin ve lipozomal fisinin HT-29 hücre hattı üzerinde muamele süresi ve konsantrasyona bağlı olarak değişen hücre canlılık sonuçları gösterilmiştir.

Çizelge 4.21. Fisin ve lipozomal fisinin HT-29 hücre hattı üzerinde muamele süresi ve konsantrasyona bağlı olarak değişen hücre canlılık sonuçları

Hücre Canlılık Oranı (%)				
Fisin Konsantrasyonu	Fisin		Lipozomal Fisin	
	24 saat	48 saat	24 saat	48 saat
0 µg/ml	100,0 ± 6,4 ^b	100,0 ± 5,7 ^b	100,0 ± 5,3 ^a	100,0 ± 6,6 ^a
90 µg/ml	105,1 ± 5,7 ^b	91,0 ± 2,4 ^b	99,1 ± 0,8 ^a	94,0 ± 2,3 ^a
120 µg/ml	99,5 ± 9,3 ^b	92,2 ± 10,2 ^b	97,6 ± 6,3 ^a	95,7 ± 0,9 ^a
150 µg/ml	79,1 ± 5,1 ^a	53,7 ± 27,8 ^a	99,1 ± 6,1 ^a	93,8 ± 4,1 ^a

Analizlerin sonuçları ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. Aynı sütundaki farklı harfler P<0,05 seviyesinde farklılık olduğunu göstermektedir.

Şekil 4.22’de fisinin ve lipozomal fisinin 24 ve 48 saatlik muamele sürelerini sonunda konsantrasyon artışıyla birlikte azalan hücre canlılık oranı gösterilmiştir.



Şekil 4.22. Fisin ve lipozomal fisinin lüminesans yöntem sitotoksosite analizi

24 ve 48 saat muamele sonucunda elde edilen veriler kullanılarak 150 µg/ml konsantrasyon için t testi gerçekleştirilmiş ve fisin ve lipozomal fisin karşılaştırılmıştır. 24 ve 48 saat muamele için P değerleri sırasıyla 0,012 ve 0,019 olarak bulunmuş ve istatistiksel olarak önemli düzeyde fark saptanmıştır.

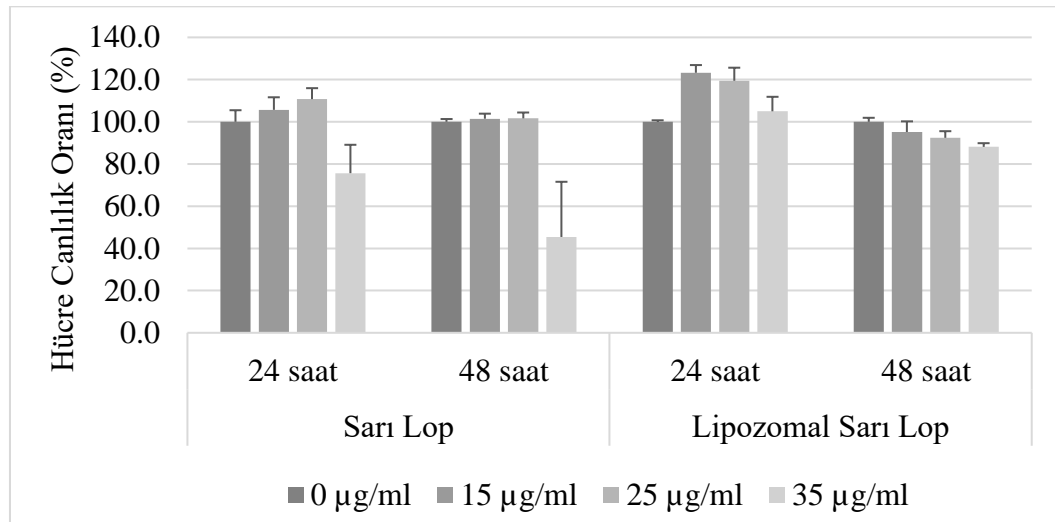
Çizelge 4.22’de Sarı Lop incir lateksinin ve lipozomal Sarı Lop incir lateksinin muamele süresi ve konsantrasyona bağlı olarak değişen hücre canlılık oranı gösterilmiştir.

Çizelge 4.22. Sarı Lop incir lateksinin ve lipozomal Sarı Lop incir lateksinin HT-29 hücre hattı üzerinde muamele süresi ve konsantrasyona bağlı olarak değişen hücre canlılık sonuçları

Hücre Canlılık Oranı (%)				
Sarı Lop Konsantrasyonu	Sarı Lop		Lipozomal Sarı Lop	
	24 saat	48 saat	24 saat	48 saat
0 µg/ml	100,0 ± 5,5 ^b	100,0 ± 1,3 ^b	100,0 ± 0,7 ^a	100,0 ± 1,9 ^c
15 µg/ml	105,7 ± 5,9 ^b	101,4 ± 2,4 ^b	123,2 ± 3,7 ^b	95,2 ± 5,0 ^{bc}
25 µg/ml	110,7 ± 5,2 ^b	101,6 ± 2,8 ^b	119,4 ± 6,2 ^b	92,4 ± 3,1 ^{ab}
35 µg/ml	75,6 ± 13,5 ^a	45,4 ± 26,2 ^a	105,0 ± 6,9 ^a	88,1 ± 1,7 ^a

Analizlerin sonuçları ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. Aynı sütundaki farklı harfler P<0,05 seviyesinde farklılık olduğunu göstermektedir.

Şekil 4.23’de Sarı Lop ve lipozomal Sarı Lop incir lateksinin 24 ve 48 saatlik muamele sürelerini sonunda konsantrasyon artışıyla birlikte azalan hücre canlılık oranı gösterilmiştir.



Şekil 4.23. Sarı Lop ve lipozomal Sarı Lop lüminesans yöntem sitotoksisite analizi

24 ve 48 saat muamele sonucunda elde edilen veriler kullanılarak 35 µg/ml konsantrasyon için t testi gerçekleştirilmiş ve Sarı Lop ve lipozomal Sarı Lop karşılaştırılmıştır. 24 ve 48 saat

muamele için P değerleri sırasıyla 0,028 ve 0,048 olarak bulunmuş ve istatistiksel olarak önemli düzeyde fark saptanmıştır.

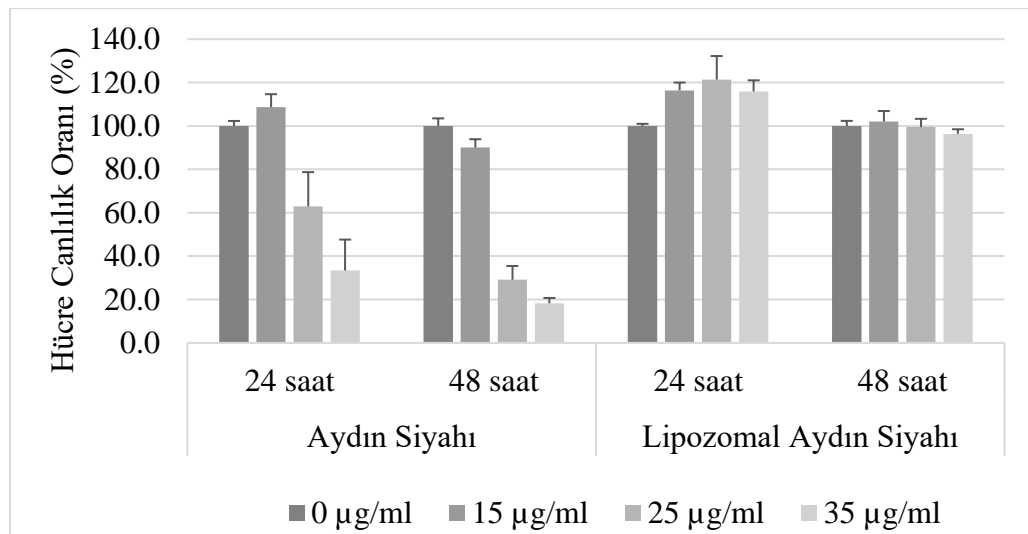
Çizelge 4.23’de Aydın Siyahı incir lateksinin ve lipozomal Aydın siyahı incir lateksinin muamele süresi ve konsantrasyona bağlı olarak değişen hücre canlılık oranı gösterilmiştir.

Çizelge 4.23. Aydın Siyahı ve lipozomal Aydın Siyahı incir lateksinin HT-29 hücre hattı üzerinde muamele süresi ve konsantrasyona bağlı olarak değişen hücre canlılık sonuçları

Hücre Canlılık Oranı (%)				
Aydın Siyahı Konsantrasyonu	Aydın Siyahı		Lipozomal Aydın Siyahı	
	24 saat	48 saat	24 saat	48 saat
0 µg/ml	100,0 ± 2,3 ^c	100,0 ± 3,5 ^d	100,0 ± 1,0 ^a	100,0 ± 2,4 ^a
15 µg/ml	108,7 ± 6,0 ^c	90,0 ± 3,9 ^c	116,4 ± 3,6 ^b	102,1 ± 4,8 ^a
25 µg/ml	62,9 ± 15,8 ^b	29,1 ± 6,3 ^b	121,4 ± 10,9 ^b	99,5 ± 3,8 ^a
35 µg/ml	33,4 ± 14,2 ^a	18,3 ± 2,5 ^a	115,9 ± 5,2 ^b	96,3 ± 2,2 ^a

Analizlerin sonuçları ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. Aynı sütundaki farklı harfler P<0,05 seviyesinde farklılık olduğunu göstermektedir.

Şekil 4.24’de Aydın Siyahı ve lipozomal Aydın Siyahı incir lateksinin 24 ve 48 saatlik muamele sonunda konsantrasyon artışıyla birlikte azalan hücre canlılık oranı gösterilmiştir.



Şekil 4.24. Aydın Siyahı ve lipozomal Aydın Siyahı lüminesans yöntem sitotoksosite analizi

24 ve 48 saat muamele sonucunda elde edilen veriler kullanılarak 35 µg/ml konstrasyon için t testi gerçekleştirilmiş ve Aydın Siyahı ve lipozomal Aydın Siyahı karşılaştırılmıştır. 24 ve 48 saat muamele için P değerleri sırasıyla 0,001 ve 0,000 olarak bulunmuş ve istatistiksel olarak önemli düzeyde fark saptanmıştır.

4.5. Lipozomal Fisin ve İncir Latekslerinin Apoptotik Etkisinin Analizi

Hücreler 5000 hücre/kuyu olacak şekilde 0, 90, 120, 150 µg/ml konsantrasyonlarında fisin ve lipozomal fisin içeren besiyerleri ve 0, 15, 25, 35 µg/ml konsantrasyonlarında incir lateksi ve lipozomal incir lateksi içeren besiyerleri kullanılarak kanser hücreleri üzerinde 48 saate kadar muamele edilmiştir. Muamele süresi sonunda hücrelerdeki apoptoz seviyesi Caspase-Glo® 3/7 Assay kiti (Promega) ile ölçülmüştür.

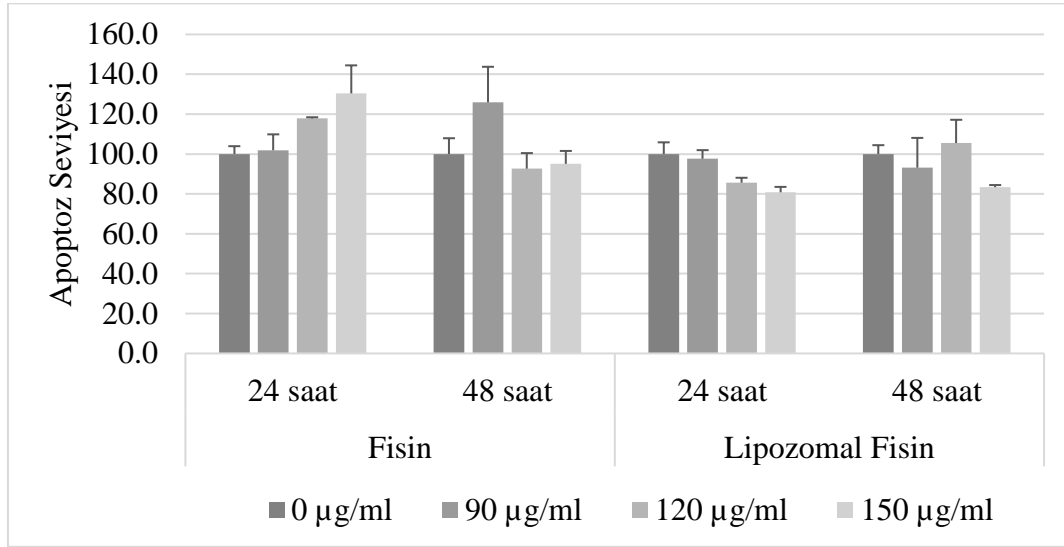
Çizelge 4.24’de fisin ve lipozomal fisinin muamele süresi ve konsantrasyona bağlı olarak değişen apoptoz seviyeleri gösterilmiştir.

Çizelge 4.24. Fisin ve lipozomal fisinin HT-29 hücre hattı üzerinde muamele süresi ve konsantrasyona bağlı olarak değişen apoptoz seviyesi

Fisin Konsantrasyonu	Apoptoz Seviyesi			
	Fisin		Lipozomal Fisin	
	24 saat	48 saat	24 saat	48 saat
0 µg/ml	100,0 ± 3,9 ^a	100,0 ± 7,9 ^a	100,0 ± 5,9 ^b	100,0 ± 4,4 ^{ab}
90 µg/ml	101,9 ± 8,0 ^a	125,9 ± 17,9 ^b	97,6 ± 4,3 ^b	93,2 ± 14,9 ^{ab}
120 µg/ml	117,9 ± 0,6 ^b	92,7 ± 7,8 ^a	85,6 ± 2,5 ^a	105,5 ± 11,7 ^b
150 µg/ml	130,4 ± 14,1 ^b	95,1 ± 6,5 ^a	80,8 ± 2,7 ^a	83,4 ± 1,1 ^a

Analizlerin sonuçları ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. Aynı sütundaki farklı harfler P<0,05 seviyesinde farklılık olduğunu göstermektedir.

Şekil 4.25’de fisinin ve lipozomal fisinin 24 ve 48 saatlik muamele sürelerini sonunda apoptoz seviyeleri gösterilmiştir.



Şekil 4.25. Fisinin ve lipozomal fisinin uygulamalarında apoptoz seviyesi

24 ve 48 saat sonunda elde edilen veriler kullanılarak 150 µg/ml konsantrasyon için t testi gerçekleştirilmiş ve fisine ve lipozomal fisine karşılaştırılmıştır. 24 ve 48 saat için P değerleri sırasıyla 0,004 ve 0,036 olarak bulunmuş ve istatistiksel olarak fark saptanmıştır.

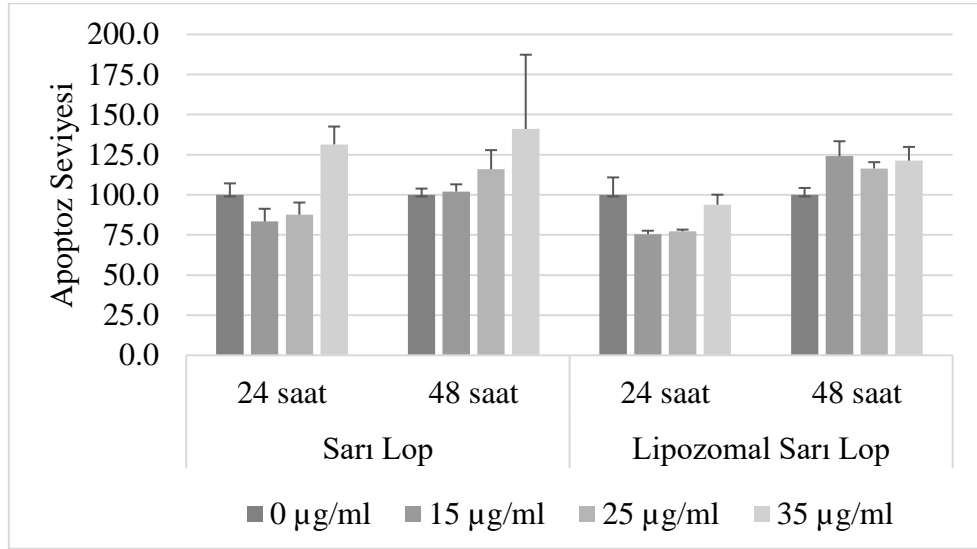
Çizelge 4.25’de Sarı Lop incir lateksinin ve lipozomal Sarı Lop incir lateksinin muamele süresi ve konsantrasyona bağlı olarak değişen apoptoz seviyeleri gösterilmiştir.

Çizelge 4.25. Sarı Lop incir lateksinin ve lipozomal Sarı Lop incir lateksinin HT-29 hücre hattı üzerinde muamele süresi ve konsantrasyona bağlı olarak değişen apoptoz seviyesi

Apoptoz Seviyesi				
Sarı Lop Konsantrasyonu	Sarı Lop		Lipozomal Sarı Lop	
	24 saat	48 saat	24 saat	48 saat
0 µg/ml	100,0 ± 7,2 ^a	100,0 ± 3,9 ^a	100,0 ± 10,9 ^b	100,0 ± 4,3 ^a
15 µg/ml	83,4 ± 8,0 ^a	102,1 ± 4,5 ^a	75,6 ± 2,1 ^a	124,1 ± 9,4 ^b
25 µg/ml	87,6 ± 7,6 ^a	115,9 ± 12,0 ^a	77,3 ± 1,0 ^a	116,4 ± 3,9 ^b
35 µg/ml	131,4 ± 11,1 ^b	141,0 ± 46,3 ^a	93,8 ± 6,3 ^b	121,4 ± 8,5 ^b

Analizlerin sonuçları ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. Aynı sütundaki farklı harfler P<0,05 seviyesinde farklılık olduğunu göstermektedir.

Şekil 4.26’da Sarı Lop incir lateksi ve lipozomal Sarı Lop incir lateksinin 24 ve 48 saatlik muamele sürelerini sonunda apoptoz seviyeleri gösterilmiştir.



Şekil 4.26. Sarı Lop incir lateksi ve lipozomal Sarı Lop incir lateksi uygulamalarında apoptoz seviyesi

24 ve 48 saat muamele sonucunda elde edilen veriler kullanılarak 35 µg/ml konsantrasyon için t testi gerçekleştirilmiş ve Sarı Lop ve lipozomal Sarı Lop karşılaştırılmıştır. 24 ve 48 saat muamele için P değerleri sırasıyla 0,007 ve 0,509 olarak bulunmuştur.

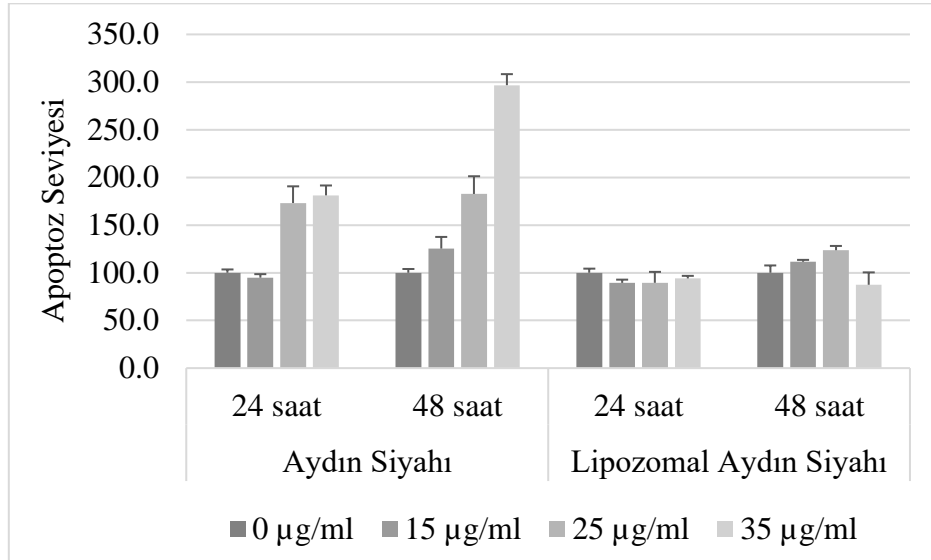
Çizelge 4.26’da Aydın Siyahı incir lateksinin ve lipozomal Aydın Siyahı incir lateksinin muamele süresi ve konsantrasyona bağlı olarak değişen apoptoz seviyeleri gösterilmiştir.

Çizelge 4.26. Aydın Siyahı ve lipozomal Aydın Siyahı incir lateksinin HT-29 hücre hattı üzerinde muamele süresi ve konsantrasyona bağlı olarak değişen apoptoz seviyesi

Aydın Siyahı Konsantrasyonu	Apoptoz Seviyesi			
	Aydın Siyahı		Lipozomal Aydın Siyahı	
	24 saat	48 saat	24 saat	48 saat
0 µg/ml	100,0 ± 3,5 ^a	100,0 ± 4,0 ^a	100,0 ± 4,3 ^a	100,0 ± 7,7 ^{ab}
15 µg/ml	94,8 ± 3,7 ^a	125,4 ± 12,2 ^a	89,4 ± 3,4 ^a	111,5 ± 2,0 ^{bc}
25 µg/ml	173,1 ± 17,5 ^b	182,6 ± 18,6 ^a	89,5 ± 11,5 ^a	123,6 ± 4,5 ^c
35 µg/ml	181,2 ± 10,4 ^b	296,7 ± 11,6 ^b	94,0 ± 2,7 ^a	87,4 ± 13,0 ^a

Analizlerin sonuçları ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. Aynı sütundaki farklı harfler P<0,05 seviyesinde farklılık olduğunu göstermektedir.

Şekil 4.27’de Aydın Siyahı incir lateksi ve lipozomal Aydın Siyahı incir lateksinin 24 ve 48 saatlik muamele sürelerini sonunda apoptoz seviyeleri gösterilmiştir.



Şekil 4.27. Aydın Siyahı incir lateksi ve lipozomal Aydın Siyahı incir lateksi uygulamalarında apoptoz seviyesi

24 ve 48 saat muamele sonucunda elde edilen veriler kullanılarak 35 µg/ml konstrasyon için t testi gerçekleştirilmiş ve Aydın Siyahı ve lipozomal Aydın Siyahı karşılaştırılmıştır. 24 ve 48 saat muamele için P değerleri sırasıyla 0,000 ve 0,012 olarak bulunmuş ve istatistiksel olarak önemli düzeyde fark saptanmıştır.

Buna ek olarak, 24 ve 48 saat muamele sonucunda elde edilen veriler kullanılarak 35 µg/ml konstrasyon için t testi gerçekleştirilmiş ve Aydın Siyahı ve Sarı Lop incir latekslerinin apoptoz seviyeleri karşılaştırılmıştır. 24 ve 48 saat muamele için P değerleri sırasıyla 0,005 ve 0,047 olarak bulunmuş ve istatistiksel olarak önemli düzeyde fark saptanmıştır.

5. TARTIŞMA

5.1. İncir Lateksleri ve Fisın Enziminin Peroksidaz Benzeri Aktivitesinin Belirlenmesi

Peroksidazlar, hücrel ortamdan zararlı metabolik yan ürünleri çıkarabilen ve hücrel bütünlüğün korunmasını sağlayan önemli bir enzim ailesidir. Peroksidazlar, hidrojen peroksite hidroksil radikallerine oksidasyonunu katalize ederler. Bu radikaller ayrıca oksidasyon üzerine renk üreten substratlarla elektron alışverişine katılırlar. Standart reaksiyonlarda, TMB ve benzeri kolorimetrik substratlar kullanılmaktadır (Chandra ve Prakash, 2020). Yapılan çalışmalarda, fisin enziminin peroksidaz benzeri aktivitesi araştırılmıştır. Peroksidaz benzeri aktivitenin sıcaklık, pH, zaman, hidrojen peroksit ve TMB miktarına bağlı olarak değiştiği gözlemlenmiştir (Zheng vd., 2019).

Zheng vd. (2019) çalışmalarında fisinin peroksidaz benzeri aktivitenin belirlenmesinde optimum pH değerini 5,0 olduğunu ve değer 7,0 ve üzerinde olduğu durumlarda aktivitenin ölçülemeyeceğini rapor etmişlerdir. Yaptığımız çalışmalarda ise pH 5,0 ve pH 7,2 olmak üzere iki farklı tampon çözelti kullanılmıştır. Ancak pH 7,2 olduğu durumda mavi renk oluşumu gözlemlenmezken, yapılan spektrofotometrik ölçümlerde herhangi bir sonuca ulaşamamıştır.

Pan vd. (2018) inkübasyon sıcaklığını 30 °C olarak belirlemişlerdir. Ancak Yang vd. (2017) tarafından yapılan çalışmada farklı sıcaklarda analiz gerçekleştirilmiş ve optimum inkübasyon sıcaklığı 35 °C olarak rapor edilmiştir. Yaptığımız çalışmalarda 0,05, 0,5, ve 0,75 µg/ml olmak üzere 3 farklı fisin konsantrasyonunda 30 °C ve 35 °C sıcaklık değerlerinde analiz gerçekleştirilmiştir. 30 °C inkübasyon sıcaklığının peroksidaz benzeri aktivitenin ölçülebilmesi için daha uygun olduğu sonucuna varılmıştır. Böylelikle yapılacak deneyler için uygun inkübasyon sıcaklığı 30 °C olarak belirlenmiştir.

Pan vd. (2018) inkübasyon süresini 210 dakika olarak belirlemişlerdir. Bununla birlikte 2 saate kadar peroksidaz benzeri aktivitesini arttığı ve sonrasında sabit olarak devam ettiği rapor edilmiştir. Yaptığımız çalışmalarda inkübasyon öncesi, 1 saat, 2 saat, 3 saat ve 3,5 olmak üzere farklı sürelerde absorbans değerleri ölçülmüştür. 1 saat inkübasyon sonucunda en yüksek absorbans değeri gözlemlenirken, 2 saat ve sonrasında düşüş gözlemlenmiştir.

Fisin enzimi için PBS ve su olmak üzere iki farklı çözücü kullanılmıştır. PBS kullanımı absorbans değerlerinde önemli derecede düşüşe sebep olmuştur. Bununla birlikte lipozomal

formüllere uygulanabilirliği açısından hazırlanacak kalibrasyon eğrisi için PBS kullanımı uygun görülmüştür.

Son olarak Zare vd. (2013) çalışmalarında incir lateksinin yaklaşık olarak %9 oranında fisin içerdiğini belirtmişlerdir. Fisin enzimi için belirlenen parametreler incir lateksleri için de kullanılmış ve iki farklı incir çeşidinden elde edilen latekslerin peroksidaz benzeri aktiviteleri başarıyla ölçülmüştür. Absorbans değerleri ve renk oluşumu açısından yapılan incelemeler sonucunda incir latekslerinin ölçümünde fisin enziminde gerçekleşen reaksiyonlardan farklı reaksiyonlar da meydana geldiği görülmüştür. Fisin ve incir latekslerinin kalibrasyon eğrisini oluşturmak için yapılan ölçümlerde mavi renk oluşumu gözlemlenmiştir. Ancak doğrusallığın sağlanamadığı yüksek dozlarda, fisin enzimi için mavi renk oluşumu gözlemlenirken, incir latekslerinde yeşilden sarıya değişen renk oluşumları görülmüştür.

5.2. Lipozom Yapımı

Lipozomlar ile enkapsülasyon, enzimleri denatürasyon ve proteolizden korumak ve onları stabilize etmek için uygun bir yöntemdir. Birçok lipozomal enkapsülasyon yöntemi mevcuttur. Chaize vd. (2004) uygun bir kapsülleme verimi elde etmek için çeşitli kapsülleme prosedürlerinin her adımında yer alan parametreleri analiz etmişlerdir. Kapsülleme verimi düşük olmasına rağmen protein denatürasyonunu önleyen tek kapsülleme yönteminin ince film hidrasyon tekniği olduğunu bildirmişlerdir (Chaize vd., 2004). Çalışmamızda hem fisin enzimi hem de incir lateksleri için ince film hidrasyon yöntemi kullanılmıştır. Stuart vd. (2016) çalışmasında yer alan yöntemde küçük değişiklikler yapılarak lipozom yapımı gerçekleştirilmiştir. Lipozom yapımı için HSFK ve kolesterol lipitleri kullanılmış ve 2:1 molar oranlarında karıştırılmıştır.

Lipozomların, lipit konsantrasyonu, kolesterol miktarı, hazırlama yöntemi, yüzeyde bulunan yük ve lipozom boyutunu değiştirilerek farklı özelliklere sahip olabilmektedir (Umbarkar vd., 2021). Yapılan literatür araştırmaları sonucunda uygun parametreler belirlenerek lipozom yapımı için çalışmalar yapılmıştır.

5.3. Lipozomal İncir Lateksleri ve Fisın Enziminin Karakterizasyonu

5.3.1. Lipozomal İncir Lateksleri ve Fisinin Konsantrasyonu ve Enkapsülasyon Verimi

Oluşturulan lipozomal incir lateksi ve fisin enzimi, PBS ile seyreltilmiş ve peroksidaz benzeri aktiviteleri ölçülmüştür. Ayrıca ekstrüzyon öncesi ve sonrası örnekler, Amicon sanrifüj filtresi kullanılarak lipozomlardan ayrılan filtratlar da aynı şekilde analiz edilmiştir. Hazırlanan kalibrasyon eğrileri kullanılarak lipozomların konsantrasyonları, fisin miktarları ve verimleri hesaplanmıştır. Lipozom yapımı için 20 mg/ml konsantrasyonunda incir lateksleri ve fisin enzimi kullanılmıştır. Oluşan lipozomlarda konsantrasyon değerlerinde artış görülmüştür. Lipozomal Sarı Lop, Aydın Siyahı ve fisin enzimi için konsantrasyon değerleri sırasıyla 37,5, 28,9 ve 101,3 mg/ml'ye yükselmiştir. Sarı Lop, Aydın Siyahı ve fisin enzimi için enkapsülasyon verimleri sırasıyla %20,1, %15,5 ve %23,0 olarak hesaplanmıştır. 3 grup için de aynı parametreler kullanılmış ancak kullanılan bileşene bağlı olarak enkapsülasyon veriminin değiştiği görülmüştür. Ayrıca laboratuvarımızda fisin enziminin konsantrasyonu 10 mg/ml olarak belirlenmiş ve aynı miktarlarda lipitler kullanılarak lipozom yapımı gerçekleştirilmiştir. Lipozomal fisinin konsantrasyonu yaklaşık olarak 40 mg/ml olarak belirlenmiş ve enkapsülasyon verimi %12,9 olarak hesaplanmıştır. Fisın konsantrasyonunun artışıyla birlikte enkapsülasyon veriminde de artış görülmüştür.

Yaman (2019) çalışmasında 5-Florourasil enkapsülasyon verimine ortam pH'sının etkisi de incelenmiş ve pH değeri 7'den 9'a ayarlandığında enkapsülasyon veriminin %21'den %45'e yükseldiği görülmüştür. Niu vd. (2012) kurkuminin düşük enkapsülasyon verimini lipozom hazırlamak için kullanılan tamponların farklı pH değerlerine bağlamışlardır. Ancak kanser hücrelerinin çoğu yaklaşık olarak 7,2–7,4 arasında bir pH değerine ihtiyaç duymaktadır. (Langdon, 2004). Hücreler için gerekli ortamı sağlamak adına çalışmamızda pH 7,2 PBS tampon çözeltisi kullanılmıştır ve farklı pH değerlerinde denemeler gerçekleştirilmemiştir. Ayrıca Chaize vd. (2014) çalışmalarında ince film hidrasyon yöntemi kullanılmasının düşük enkapsülasyon verimi ile sonuçlanabileceğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda enkapsüle edilen enzimin denatürasyonunu önlemek için ince film hidrasyon yöntemi kullanılmıştır. Buna göre düşük enkapsülasyon veriminin birçok sebebi bulunmaktadır. Parametrelerde yapılacak değişiklikler ile enkapsülasyon veriminde artış veya azalış görülebilmektedir.

5.3.2. Lipozomal Fisın Enzimi ve İncir Latekslerinin Boyut Analizi

Nanotaşıyıcı sistemlerin partikül boyutu ve PDI değeri, endositoza bağlı hücresel alımı etkileyen ana fizikokimyasal özelliklerdir (Danaei vd., 2018). Santos vd. (2013) çalışmalarında klinik uygulamalarda, emboli riskini önlemek için nanopartiküller 5 ile 200 nm arasında olması gerektiğini bildirmişlerdir. Gaumet vd. (2008) de kanser tedavisi için geliştirilen nanopartiküller için ideal boyutun 70 ile 200 nm arasında olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmamızda kontrol, fisin, Sarı Lop ve Aydın Siyahı için lipozom boyutları sırasıyla $821,3 \pm 197,6$, $1803,4 \pm 936,9$, $1169,8 \pm 186,3$ ve $1372,8 \pm 951,3$ olarak ölçülmüştür. Partikül boyutlarının hedeflenen değerlerin üzerinde oldukları belirlenmiştir.

Büyük partikül boyutlu lipozomun dezavantajları ve avantajları mevcuttur. Büyük partikül boyutlu lipozomlar, ilaç yüklenebilmesi için daha fazla alana sahiptir. Bununla birlikte daha yavaş salınım gösterirler (Umbarkar., 2021). Lipozom boyutu fosfolipit, kolesterol ve ilaç miktarına bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Umbarkar vd., 2021; Basavaraj ve Betageri, 2014). Basavaraj ve Betageri (2014) çalışmalarında farklı lipit oranları kullanarak lipozomal resveratrol yapımı gerçekleştirmişlerdir. Resveratrol miktarı 1 oranında sabit tutulmuş ve farklı oranlarda disteroil fosfatidilkolin (DSPC) ve kolesterol (CHO) eklemesi yapılmıştır. DSPC:CHO oranı 1:0, 0,5:0, 2:0 olarak belirlenen lipozomlarda kümelenme gözlemlenmiştir ve lipozom boyutları sırasıyla 1566, 907, 2041 nm olarak ölçülmüştür. Diğer gruplarda ise DSPC:CHO oranı 0,5:0,5, 0,25:0,25, 1:1 ve 0,75:0,25 olarak belirlenmiş ve lipozomlarda iyi bir dağılım gözlemlenmiştir. Bununla beraber lipozom boyutları sırasıyla 1184, 978, 688, 493 nm olarak ölçülmüştür. Umbarkar vd. (2021) çalışmalarında soya lesitini ve kolesterol kullanarak diklofenak sodyum içeren lipozomlar hazırlamışlardır. Soya lesitini ve kolesterol miktarı sabit tutulurken ilaç olarak kullanılan diklofenak sodyum 25, 50, 75 ve 100 mg olmak üzere farklı miktarlarda denenmiştir. Lipozomun partikül boyutu, ilacın konsantrasyonun artışıyla birlikte artmıştır. Partikül boyutu artan konsantrasyon ile 796,2'den 915 nm'ye

Partikül boyutunun yanı sıra, polidispersite indeksi (PDI) de dikkate alınmalıdır, çünkü dispersiyondaki partikül büyüklüğü dağılımının bir ölçüsüdür. (Isailović vd., 2013). Örnek çok geniş boyut dağılımına sahipse, dağılım değeri %70'den fazladır. Lipozom formülasyonu sırasında amaç en düşük PDI değerine ulaşmaktır (Umbarkar vd., 2021). Çalışmamızda kontrol, fisin, Sarı Lop ve Aydın Siyahı için PDI değerleri sırasıyla $28,6 \pm 2,3$, $38,1 \pm 6,5$, $35,7 \pm 3,2$ ve $36,3 \pm 2,7$ olarak ölçülmüştür. PDI değerlerinin literatürde belirtilen değere göre uygun olduğu görülmüştür.

Zeta potansiyeli, lipozomun yüzeyinde bulunan yükler anlamına gelir. Bu yük, üretim sırasında kullanılan bileşenlerden kaynaklanmaktadır. Formülasyonda bulunan tüm lipozomların yüzeyinde bir miktar yük olması gerekir, yükler nedeniyle lipozom partikülleri birbirini iter ve partiküllerin bir araya gelmesi önlenir (Umbarkar vd., 2021). Genellikle +30 mV'nin üstünde ve -30 mV'nin altında bir zeta potansiyeli, stabilite için uygun bir eşik değeri olarak kabul edilir (Khorasani vd., 2018).

Çalışmamızda kontrol, fisin enzimi, Sarı Lop ve Aydın Siyahı incir lateksleri için zeta potansiyel değerleri sırasıyla $-15,2 \pm 0,2$, $-10,2 \pm 0,4$, $-10,0 \pm 1,0$ ve $-10,0 \pm 1,0$ olarak ölçülmüştür. Örneklerin zeta potansiyellerinin literatürde verilen optimum değerler arasında olmadığı görülmüştür.

5.4. Fisın ve İncir Lateksinin MTT ile Sitotoksikite Analizi

Fisin enziminin HT-29 hattına etkisi MTT ile analiz edilmiştir. Fisın konsantrasyonları 0, 60, 70, 80, 100 $\mu\text{g/ml}$ olarak belirlenmiş ve 72 saate kadar analiz edilmiştir. Muamele süresinin artışıyla beraber hücre ölüm oranında artış gözlemlenmiştir. 100 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarda 24 saat için %58,1, 48 saat için %51,8 ve 72 saat için %39,8 hücre canlılık oranı görülmüştür. Bildiğimiz kadarıyla bu tez çalışması fisin enziminin HT-29 hücre hattı üzerine etkisini inceleyen ilk çalışmadır ve bu çalışma sonucunda fisin enziminin HT-29 hattı üzerinde sitotoksik etkisi tespit edilmiştir.

İncir lateksi konsantrasyonları da 0, 10, 20, 30, 40 $\mu\text{g/ml}$ olarak belirlenmiş ve Sarı Lop, Aydın Siyahı için MTT ile analiz edilmiştir. Muamele süresinin artışıyla beraber hücre ölüm oranında da artış gözlemlenmiştir. Sarı Lop için 40 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarda 24 saat için %51,5, 48 saat için %43,0 ve 72 saat için %25,5 hücre canlılık oranı görülmüştür. Aydın Siyahı için 40 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarda 24 saat için %13,3, 48 saat için %12,5 ve 72 saat için %10,5 hücre canlılık oranı görülmüştür. Aydın Siyahı, Sarı Lop incir lateksine göre daha yüksek oranlarda sitotoksik etki göstermiştir. Laboratuvarımız da önceki yıllarda yapılan çalışmalarda da Aydın Siyahı incir lateksi Sarı Lop incir lateksine göre HT-29 hücre hattında daha çok sitotoksik etki göstermiştir (Boyacıoğlu vd., 2021). Soltana vd. (2019), Kholi çeşidi incir lateksini HT-29 hücre hattında analiz etmişlerdir. 48 ve 24 saat için sırasıyla 182 ve 503 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonların hücrelerin %50'sini öldürdüğünü rapor etmişlerdir.

Çalışmalar sonucunda hem incir latekslerinin hem de fisin enziminin HT-29 hücre hattında sitotoksik etkiye sahip olduğu görülmüştür. Bununla beraber sitotoksik etkinin incir çeşidine göre değiştiği gözlemlenmiştir.

5.5. Lipozomal Fisin ve İncir Lateksinin Lüminesans Yöntem Sitotoksosite Analizi

Lipozomal fisin enziminin ve karşılaştırmalı olarak fisin enziminin HT-29 hattına etkisi lüminesans yöntem ile belirlenmiştir. Fisin konsantrasyonları 0, 90, 120, 150 µg/ml olarak belirlenmiş ve 48 saate kadar analiz edilmiştir. 150 µg/ml konsantrasyonlarda fisin enziminde 24 saat için %79,1, 48 saat için %53,7 hücre canlılık oranı görülmüştür. Lipozomal fisin enziminde ise 24 saat için %99,1, 48 saat için %93,8 hücre canlılık oranı görülmüştür.

Lipozomal incir lateksleri ve karşılaştırmalı olarak incir latekslerinin de HT-29 hattına etkisi lüminesans yöntem ile belirlenmiştir. İncir lateksi konsantrasyonları 0, 15, 25, 35 µg/ml olarak belirlenmiş ve 48 saate kadar analiz edilmiştir. 35 µg/ml konsantrasyonlarda Sarı Lop incir lateksinde 24 saat için %75,6, 48 saat için %45,4 hücre canlılık oranı görülmüştür. Lipozomal Sarı Lop incir latekslerinde ise 24 saat için %105,0, 48 saat için %88,1 hücre canlılık oranı görülmüştür. 35 µg/ml konsantrasyonlarda Aydın Siyahı incir lateksinde 24 saat için %33,4, 48 saat için %18,3 hücre canlılık oranı görülmüştür. Lipozomal Aydın Siyahı incir latekslerinde ise 24 saat için %115,9, 48 saat için %96,3 hücre canlılık oranı görülmüştür.

İncir lateksleri ve fisin ile karşılaştırıldığında lipozomal olarak enkapsüle edilen incir lateksleri ve fisin enziminin çok düşük oranlarda sitotoksosite gösterdiği görülmüştür. Enkapsüle incir lateksleri ve fisin enziminin sitotoksik etkisi ile ilgili bilgi bulunmamaktadır. Ancak Zalba vd. (2012) HT-29 hücre hattında sitotoksik etki gösteren oksaliplatinin, lipozomal formülasyonlarda sitotoksitesinin azaldığını rapor etmişlerdir.

Ayrıca MTT testi ile karşılaştırıldığında hem incir lateksi hem de fisin enzimi için azalan sitotoksik etki ölçülmüştür. Bunun sebebinin sadece kullanılan yöntem ile ilgili olduğu düşünülmemektedir. MTT yönteminde liyofilize halde -20 °C'de depolanan incir lateksi ve fisin enzimi PBS ve besiyeri içerisinde hazırlandıktan sonra direkt olarak kullanılmış ve muamele süresi boyunca -20 °C'de depolanmıştır. Lipozomların dondurulması tavsiye edilmemektedir. Bu yüzden lüminesans yöntemde lipozomal formülasyonlarla aynı şartların sağlanması adına incir lateksleri ve fisin +4 °C'de 10 gün boyunca depolanmış ve muamele süresi boyunca

depolama sıcaklığı değiştirilmemiştir. Depolama sıcaklığı ve süresinin de sitotoksisite üzerinde etkili olabileceği düşünölmektedir.

5.6. Lipozomal Fisin ve İncir Lateksinin Apoptotik Etkisinin Analizi

Apoptoz, sistein proteazlarının kaspaz ailesinin üyeleri tarafından koordine edilen bir programlanmış hücre ölüm sürecidir (Walsh vd., 2008). Kaspazlar, başlatıcı kaspazlar ve efektör kaspazlar olarak ayrılırlar. Apoptozun gerçekleşebilmesi için başlatıcı kaspazlar efektör kaspazları aktifleştirirler. Kaspaz-3 ve kaspaz-7 efektör kaspazlardır (Dinçel ve Kul, 2016). Efektör kaspazlar, DNA parçalanması ve hücre büzüşmesi dahil olmak üzere apoptozun bozunma fazının ayırt edici özelliklerini başlatmaktan sorumludur (Brentnall vd. 2013).

Fisin enzimi ve incir latekslerinin HT-29 kolon kanseri hücre hattı üzerinde apoptotik etkileri kaspaz-3 ve kaspaz-7 aktiviteleri ile belirlenmiştir. Fisinin 24 saatlik uygulamalarında apoptoz seviyelerinde kontrol ile karşılaştırıldığında 1,3 kat artış gözlemlenmiştir. Lipozomal formölasyonlarında ise kontrol grubuna kıyasla düşüş görölmüştür. Sarı Lop incir lateksinde 24 ve 48 saatlik muamele süresi sonunda apoptoz seviyelerinde kontrol grubuna kıyasla sırasıyla 1,3 ve 1,4 kat artış saptanmıştır. Lipozomal formölasyonlarda ise 24 saatlik uygulamalarda düşüş gözlemlenirken, 48 saatlik muamele sonunda 1,21 kat artış görölmüştür. Aydın Siyahı incir lateksinde ise 24 ve 48 saatlik muamele süresi sonunda apoptoz seviyelerinde kontrol grubuna kıyasla sırasıyla 1,8 ve 3,0 kat artış saptanmıştır. Lipozomal formölasyonlarda ise 24 ve 48 saatlik uygulamalarda düşüş gözlemlenmiştir.

Kısaca, lipozomal formölasyonlarda apoptoz seviyelerinde yüksek oranlarda artış veya azalış görölmemiştir. Ancak lipozomal olmayan Aydın Siyahı incir lateksinin apoptoz seviyesinde belirgin bir artışa neden olduğu saptanmıştır. Laboratuvarımızda önceki yıllarda yapılan çalışmalarda Sarı Lop ve Aydın Siyahı incir latekslerinin apoptotik etkisi analiz edilmiştir. Aydın Siyahı incir lateksinde Sarı Lop çeşidine kıyasla belirgin bir artış görölmüştür (Boyacıoğlu vd., 2021). Önceki yıllarda yapılan analizlerde elde edilen sonuçlar, bu tezde yapılan çalışmaları desteklemektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışması kapsamında fisin enzimi ve incir lateksleri lipozomlar içerisinde enkapsüle edilmiş ve karakteristik özellikleri incelenmiştir. Ayrıca lipozomal fisin, lipozomal incir lateksleri ve karşılaştırma amaçlı aynı konsantrasyonlarda fisin ve incir latekslerinin sitotoksik ve apoptotik etkileri değerlendirilmiştir.

Fisin ve incir lateksleri için en uygun yöntem ince film hidrasyon yöntemi olarak belirlenmiş ve lipozomlar oluşturulmuştur. Oluşturulan lipozomların konsantrasyonları ve enkapsülasyon verimleri peroksidaz benzeri aktiviteleri ölçülerek dolaylı olarak belirlenmiştir. En yüksek konsantrasyon ve enkapsülasyon verimi lipozomal fisin için gözlemlenmiştir. Ayrıca lipozomların karakteristik özelliklerini belirlemek için boyut analizi gerçekleştirilmiştir. Nanolipozomlar için hedeflenen boyutlar ve zeta potansiyel değerleri elde edilememiştir. PDI değerleri üç örnek için de literatürde belirtilen değerlere uygun olarak bulunmuştur. İleriye yönelik çalışmalarda, parametrelerde yapılacak değişiklikler ile oluşturulan nanolipozomların geliştirilebileceği düşünülmektedir.

İncir latekslerinin HT-29 hücre hattındaki sitotoksik etkisi doğrulanmıştır. Ayrıca fisin enziminde de sitotoksik etki tespit edilmiştir. İncir lateksleri ve fisin ile karşılaştırıldığında lipozomal olarak enkapsüle edilen incir lateksleri ve fisin enziminin çok düşük oranlarda sitotoksikite gösterdiği görülmüştür. Apoptoz sonuçları lüminesans metot sitotoksikite analizi sonuçları kullanılarak normalize edildikten sonra değerlendirilmiştir. Lipozomal formülasyonlarda apoptoz seviyelerinde yüksek oranlarda değişim saptanmamıştır. Ancak lipozomal olmayan Aydın Siyahı incir lateksinin apoptoz seviyesinde belirgin bir artış gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak, lipozomal enkapsülasyonun hem fisin enzimi hem de incir latekslerinde toksik etkiyi yüksek oranda baskıladığı tespit edilmiştir. İleriye yönelik yapılacak çalışmalar ile incir lateksi ve fisin enziminin sağlık alanında kullanım için uygun olabileceği düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

- Akarca, G., & TOMAR, O. (2019). Siyah (*Ficus carica*) ve Beyaz (*Ficus alba*) İncirlerden Elde Edilen İncir Sütlerinin Antibakteriyel ve Antifungal Etkileri. *European Journal of Science and Technology*, (17), 1069–1074. <https://doi.org/10.31590/ejosat.652029>
- Alvero, A. B., & Mor, G. G. (2021). *Detection of Cell Death Mechanisms: Methods and Protocols*. Springer.
- Badgujar, S. B., Patel, V. V., Bandivdekar, A. H., & Mahajan, R. T. (2014). Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of *Ficus carica*: A review. *Pharmaceutical Biology*, 52(11), 1487–1503. <https://doi.org/10.3109/13880209.2014.892515>
- Basavaraj, S., & Betageri, G. V. (2014). Improved oral delivery of resveratrol using proliposomal formulation: investigation of various factors contributing to prolonged absorption of unmetabolized resveratrol. *Expert opinion on drug delivery*, 11(4), 493-503.
- Boyacıoğlu, O., Kara, B., Tecimen, S., Kılıç, M., Delibaş, M., Erdoğan, R., ... & Örenay-Boyacıoğlu, 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*, 101348.
- Brentnall, M., Rodriguez-Menocal, L., De Guevara, R. L., Cepero, E., & Boise, L. H. (2013). Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC cell biology*, 14(1), 1-9.
- Chandra, P., & Prakash, R. (2020). *Nanobiomaterial Engineering* (pp. 49-70). Singapore: Springer Singapore.
- Chaize, B., Colletier, J. P., Winterhalter, M., & Fournier, D. (2004). Encapsulation of enzymes in liposomes: high encapsulation efficiency and control of substrate permeability. *Artificial cells, blood substitutes, and biotechnology*, 32(1), 67-75.
- Cho, U. M., Choi, D. H., Yoo, D. S., Park, S. J., & Hwang, H. S. (2019). Inhibitory Effect of Ficin Derived from Fig Latex on Inflammation and Melanin Production in Skin Cells. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 24(2), 288–297. <https://doi.org/10.1007/s12257-019-0010-0>

- Choi, M. E., Price, D. R., Ryter, S. W., & Choi, A. M. (2019). Necroptosis: a crucial pathogenic mediator of human disease. *JCI insight*, 4(15).
- Coşkun, G., & Özgür, H. (2011). Apoptoz ve nekrozun moleküler mekanizması. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 20(3), 145-158.
- Çatmadım, G. (2014). Aydın İli Kuyucak İlçesinde (Büyük Menderes Ovası) Yetiştirilen Sarılop Ve Bursa Siyahı İncir Çeşitlerinde Meyve Gelişimlerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Ordu Üniversitesi, Ordu.
- D'Arcy, M. S. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International*, 43(6), 582–592. <https://doi.org/10.1002/cbin.11137>
- Dai, L., Sun, C., Li, R., Mao, L., Liu, F., & Gao, Y. (2017). Structural characterization, formation mechanism and stability of curcumin in zein-lecithin composite nanoparticles fabricated by antisolvent co-precipitation. *Food Chemistry*, 237, 1163–1171. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.134>
- 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), 57.
- Demirci, M., Caglar, M. Y., Cakir, B., & Gülseren, I. (2017). Encapsulation by nanoliposomes. *Nanoencapsulation Technologies for the Food and Nutraceutical Industries*, 74–113. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809436-5.00003-3>
- Dinçel, G. Ç., & Kul, O. (2016). Patolojik Apoptozis ve Tanı Yöntemleri. *Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 5(1), 86-108.
- Dobrovolskaia, M. A., Clogston, J. D., Neun, B. W., Hall, J. B., Patri, A. K., & McNeil, S. E. (2008). Method for analysis of nanoparticle hemolytic properties in vitro. *Nano letters*, 8(8), 2180-2187.
- Duman, E., & Yazıcı, A. (2018). Yaş İncir (Mor Güz - Sarı Lop) Çekirdek ve Çekirdek Yağlarının Fiziko-Kimyasal Özellikleri.pdf. 24(2), 69–76.
- Esfanjani, A. F., & Jafari, S. M. (2017). Nanoencapsulation of Phenolic Compounds and Antioxidants. İçinde *Nanoencapsulation of Food Bioactive Ingredients*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809740-3.00002-7>

- Ezhilarasi, P. N., Karthik, P., Chhanwal, N., & Anandharamakrishnan, C. (2013). Nanoencapsulation Techniques for Food Bioactive Components: A Review. *Food and Bioprocess Technology*, 6(3), 628–647. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0944-0>
- Fathi, M., Mozafari, M. R., & Mohebbi, M. (2012). Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. *Trends in Food Science and Technology*, 23(1), 13–27. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.08.003>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO]. (2021). Crops. Food and Agriculture Organization. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> [Erişim tarihi: 29/5/2021]
- Gaumet, M., Vargas, A., Gurny, R., & Delie, F. (2008). Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 69(1), 1-9.
- Gedikli, S. (2013). Melatoninin Mcf-7 Hücre Kültüründeki Apoptoz Aktivasyonunun Ve Sitotoksitesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Pcr), Mtt Hücre Canlılık Testi Ve İmmüsitokimya Yöntemleriyle Araştırılması. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Erzurum.
- Ghanbari, A., Le Gresley, A., Naughton, D., Kuhnert, N., Sirbu, D., & Ashrafi, G. H. (2019). Biological activities of *Ficus carica* latex for potential therapeutics in Human Papillomavirus (HPV) related cervical cancers. *Scientific Reports*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37665-6>
- Ghandehari, F., & Fatemi, M. (2018). The effect of *Ficus carica* latex on 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene-induced breast cancer in rats. *Avicenna journal of phytomedicine*, 8(4), 286–295. <https://doi.org/10.22038/ajp.2017.10014>
- Global Cancer Observatory [GCO]. (2021). Cancer Today. Global Cancer Observatory <https://gco.iarc.fr/today/home>. [Erişim tarihi: 4/4/2021]
- Han, Y. S., Lee, J. H., & Lee, S. H. (2015). Fucoidan inhibits the migration and proliferation of HT-29 human colon cancer cells via the phosphoinositide-3 kinase/Akt/mechanistic target of rapamycin pathways. *Molecular Medicine Reports*, 12(3), 3446–3452. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3804>
- Hashemi, S. A., & Abediankenari, S. (2013). Suppressive effect of fig (*ficus carica*) latex on esophageal cancer cell proliferation. *Acta Facultatis Medicae Naissensis*, 30(2), 93–96.

<https://doi.org/10.2478/v10283-012-0042-2>

- Hashemi, S. A., Abediankenari, S., Ghasemi, M., Azadbakht, M., Yousefzadeh, Y., & Dehpour, A. (2011). The Effect of Fig Tree Latex (*Ficus carica*) on Stomach Cancer Line. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 13(4), 272–275.
- Hernández-Sánchez, H., & Gutiérrez-López, G. F. (Eds.). (2015). *Food Nanoscience and Nanotechnology. Food Engineering Series*. doi:10.1007/978-3-319-13596-0
- Hotchkiss, R. S., Strasser, A., McDunn, J. E., & Swanson, P. E. (2009). Cell death. *New England Journal of Medicine*, 361(16), 1570-1583.
- Huang, L., QU, H. zhi, ZHANG, L., DU, S. shan, YANG, S., HAO, D. yun, & WANG, X. ping. (2008). Purification and Characterization of a Proteolytic Enzyme from Fig Latex. *Chemical Research in Chinese Universities*, 24(3), 348–352. [https://doi.org/10.1016/S1005-9040\(08\)60073-2](https://doi.org/10.1016/S1005-9040(08)60073-2)
- Isailović, B. D., Kostić, I. T., Zvonar, A., Đorđević, V. B., Gašperlin, M., Nedović, V. A., & Bugarski, B. M. (2013). Resveratrol loaded liposomes produced by different techniques. *Innovative food science & emerging technologies*, 19, 181-189.
- Jafari, S. M. (2017). An Introduction to Nanoencapsulation Techniques for the Food Bioactive Ingredients. İçinde *Nanoencapsulation of Food Bioactive Ingredients*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809740-3.00001-5>
- Jafari, S. M., Esfanjani, A. F., Katouzian, I., & Assadpour, E. (2017). Release, Characterization, and Safety of Nanoencapsulated Food Ingredients. İçinde *Nanoencapsulation of Food Bioactive Ingredients*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809740-3.00010-6>
- Kamiloglu, S., Sari, G., Ozdal, T., & Capanoglu, E. (2020). Guidelines for cell viability assays. *Food Frontiers*, C. 1, ss. 332–349. <https://doi.org/10.1002/fft2.44>
- Kapupara, P. P., Dholakia, S. P., Patel, V. P., & Suhagia, B. N. (2011). Journal of Chemical and Pharmaceutical Research preparations. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 3(4), 287–294.
- Khorasani, S., Danaei, M., & Mozafari, M. R. (2018). Nanoliposome technology for the food and nutraceutical industries. *Trends in Food Science and Technology*, 79(June), 106–115. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.009>
- Kırtıl, E., & Öztop, M. H. (2014). Enkapsülasyon Maddesi Olarak Lipozom ve Gıdalarda

Kullanımı : Yapısı, Karakterizasyonu, Üretimi ve Stabilitesi. *Akademik Gıda*, 12(4), 41–57.

- Krysko, D. V., Vanden Berghe, T., D’Herde, K., & Vandenabeele, P. (2008). Apoptosis and necrosis: Detection, discrimination and phagocytosis. *Methods*, 44(3), 205–221. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2007.12.001>
- Labianca, R., Beretta, G. D., Kildani, B., Milesi, L., Merlin, F., Mosconi, S., ... Wils, J. (2010). Colon cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 74(2), 106–133. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2010.01.010>
- Langdon, S. P. (2004). Cancer Cell Culture Methods and Protocols. İçinde *Methods in Molecular Medicine* (C. 88). https://doi.org/10.1007/978-1-61779-80-5_2
- Lazreg Aref, H., Gaaliche, B., Fekih, A., Mars, M., Aouni, M., Chaumon, J. P., & Said, K. (2011). In vitro cytotoxic and antiviral activities of *Ficus carica* latex extracts. *Natural Product Research*, 25(3), 310–319. <https://doi.org/10.1080/14786419.2010.528758>
- Lazreg-Aref, H., Gaaliche, B., Ladhari, A., Hammami, M., & Hammami, S. O. (2018). Co-evolution of enzyme activities and latex in fig (*Ficus carica* L.) during fruit maturity process. *South African Journal of Botany*, 115, 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.01.022>
- Mahdi Jafari, S. (2017). Nanoencapsulation Technologies for the Food and Nutraceutical Industries An overview of nanoencapsulation techniques and their classification. İçinde *Nanoencapsulation Technologies for the Food and Nutraceutical Industries*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809436-5/00001-X>
- Marx, U., & Sandig, V. (2007). Drug testing in vitro. *Wiley, Weinheim*, 4, 54.
- Mathur, G., Nain, S., & Sharma, P. K. (2015). Cancer : an overview Cancer : An Overview. *Academic J. Cancer Res*, 8(1), 1–9. <https://doi.org/10.5829/idosi.ajcr.2015.8.1.9336>
- McKee, T. J., & Komarova, S. V. (2017). Is it time to reinvent basic cell culture medium? *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 312(5), C624–C626. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00336.2016>
- Milli Eğitim Bakanlığı (MEB). (2013). İncir Yetiştiriciliği. Milli Eğitim Bakanlığı. <https://docplayer.biz.tr/11681281-T-c-milli-egitim-bakanligi-bahcecilik-incir-yetistiriciligi.html> [Erişim tarihi: 29/5/2021]

- Mozafari, M. R. (2010). Nanoliposomes: preparation and analysis. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 605, 29–50. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-360-2_2
- National Center for Biotechnology Information. (2021). PubChem Compound Summary for CID 129630591, Ficin. National Center for Biotechnology Information. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ficin>. [Erişim tarihi: 4/42021]
- Niu, Y., Ke, D., Yang, Q., Wang, X., Chen, Z., An, X., & Shen, W. (2012). Temperature-dependent stability and DPPH scavenging activity of liposomal curcumin at pH 7.0. *Food Chemistry*, 135(3), 1377-1382.
- Nwokwu, C. D. U., Samarakoon, S. R., Karunaratne, D. N., Katuvawila, N. P., Pamunuwa, G. K., Ediriweera, M. K., & Tennekoon, K. H. (2017). Induction of apoptosis in response to improved gedunin by liposomal nano-encapsulation in human non-small-cell lung cancer (NCI-H292) cell line. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 16(9), 2079–2087. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v16i9.6>
- Oliveira, A. P., Silva, L. R., Andrade, P. B., Valentao, P., Silva, B. M., Gonc-Alves, R. F., ... De Pinho, P. G. (2010). Further insight into the latex metabolite profile of ficus carica. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(20), 10855–10863. <https://doi.org/10.1021/jf1031185>
- Ong, S. G. M., Ming, L. C., Lee, K. S., & Yuen, K. H. (2016). Influence of the encapsulation efficiency and size of liposome on the oral bioavailability of griseofulvin-loaded liposomes. *Pharmaceutics*, C. 8. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics8030025>
- Pan, Y., Yang, Y., Pang, Y., Shi, Y., Long, Y., & Zheng, H. (2018). Enhancing the peroxidase-like activity of ficin via heme binding and colorimetric detection for uric acid. *Talanta*, 185, 433-438.
- Panahi, Y., Farshbaf, M., Mohammadhosseini, M., Mirahadi, M., Khalilov, R., Saghfi, S., & Akbarzadeh, A. (2017). Recent advances on liposomal nanoparticles: synthesis, characterization and biomedical applications. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 45(4), 788-799.
- Philip Lansky, E., & Maaria Paavilainen, H. (2011). *Traditional Herbal Medicines for Modern Times Figs*.
- Priprem, A., Watanatorn, J., Sutthiparinyanont, S., Phachonpai, W., & Muchimapura, S. (2008). Anxiety and cognitive effects of quercetin liposomes in rats. *Nanomedicine:*

nanotechnology, biology and medicine, 4(1), 70-78.

- Purdie, K. J., Pourreyron, C., & South, A. P. (2011). Isolation and culture of squamous cell carcinoma lines. İçinde *Methods in Molecular Biology* (C. 731). https://doi.org/10.1007/978-1-61779-80-5_14
- Raskovic, B. G., & Polovic, N. D. (2016). Collegenase activity in fig latex could contribute to its efficacy in ethnomedicinal preparations. *Journal of Herbal Medicine*, 6(2), 73–78. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2016.03.002>
- Raskovic, B. G., & Polovic, N. D. (2016). Collegenase activity in fig latex could contribute to its efficacy in ethnomedicinal preparations. *Journal of Herbal Medicine*, 6(2), 73–78. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2016.03.002>
- Rehman, A., Tong, Q., Jafari, S. M., Assadpour, E., Shehzad, Q., Aadil, R. M., ... Ashraf, W. (2020). Carotenoid-loaded nanocarriers: A comprehensive review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 275, 102048. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.102048>
- Rubnov, S., Kashman, Y., Rabinowitz, R., Schlesinger, M., & Mechoulam, R. (2001). Suppressors of cancer cell proliferation from fig (*Ficus carica*) resin: Isolation and structure elucidation. *Journal of Natural Products*, 64(7), 993–996. <https://doi.org/10.1021/np000592z>
- Ruiz Canizales, J., Velderrain Rodríguez, G. R., Domínguez Avila, J. A., Preciado Saldaña, A. M., Alvarez Parrilla, E., Villegas Ochoa, M. A., & González Aguilar, G. A. (2019). *Encapsulation to Protect Different Bioactives to Be Used as Nutraceuticals and Food Ingredients*. 2163–2182. https://doi.org/10.1007/978-3-319-78030-6_84
- Santos, I. S., Ponte, B. M., Boonme, P., Silva, A. M., & Souto, E. B. (2013). Nanoencapsulation of polyphenols for protective effect against colon-rectal cancer. *Biotechnology Advances*, 31(5), 514–523. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.08.005>
- Shafiee, G., Saidijam, M., Tavailani, H., Ghasemkhani, N., & Khodadadi, I. (2016). Genistein induces apoptosis and inhibits proliferation of HT29 colon cancer cells. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*, 5(3), 178–191. <https://doi.org/10.22088/acadpub.BUMS.5.3.178>
- Shukla, D., Rawal, R., & Jain, N. (2018). *A brief review on plant-derived natural compounds as an anti-cancer agents*. 6(5), 28–36.
- Siar, E. H., Zaak, H., Kornecki, J. F., Zidoune, M. N., Barbosa, O., & Fernandez-Lafuente, R.

- (2017). Stabilization of ficin extract by immobilization on glyoxyl agarose. Preliminary characterization of the biocatalyst performance in hydrolysis of proteins. *Process Biochemistry*, 58, 98–104. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.04.009>
- Singh, A., Prakash, J., Meghwal, P. R., & Ranpise, S. A. (2015). FIG (*Ficus carica*). Jaya Publishing House New Delhi.
- Soltana, H., Pinon, A., Limami, Y., Zaid, Y., Khalki, L., Zaid, N., ... Hammami, M. (2019). Antitumoral activity of *Ficus carica* L. on colorectal cancer cell lines. *Cellular and Molecular Biology*, 65(6), 6–11. <https://doi.org/10.14715/cmb/2019.65.6.2>
- Stover, E., Aradhya, M., Ferguson, L., & Crisosto, C. H. (2007). The fig: Overview of an ancient fruit. *HortScience*, 42(5), 1083–1087. <https://doi.org/10.21273/hortsci.42.5.1083>
- Stuart, C. H., Singh, R., Smith, T. L., D'Agostino, R., Caudell, D., Balaji, K. C., & Gmeiner, W. H. (2016). Prostate-specific membrane antigen-targeted liposomes specifically deliver the Zn²⁺ chelator TPEN inducing oxidative stress in prostate cancer cells. *Nanomedicine*, 11(10), 1207–1222. <https://doi.org/10.2217/nmm-2015-0017>
- Su, Z., Yang, Z., Xu, Y., Chen, Y., & Yu, Q. (2012). *MutS* homologue *hMSH5*: role in cisplatin-induced DNA damage response. <https://doi.org/10.1186/s12943-015-0321-5>
- Tarım ve Orman Bakanlığı. (2021). İncir. Tarım ve Orman Bakanlığı. <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/incir/Belgeler/GENEL%20PDF%20DOSYALARI/CES%C4%B0.pdf>. [Erişim tarihi: 29/5/2021]
- Tokur, O., & Aksoy, A. (2017). In Vitro Sitotoksosite Testleri. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 6(1), 112–118. <https://doi.org/10.31196/huvfd.325794>
- Tontul, İ. (2019). *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology Nanoencapsulation Techniques in Food Industry*. 7(2), 220–233.
- Türkiye İstatistik Kurumu [TÜİK]. (2021). Bitkisel Üretim İstatistikleri. Türkiye İstatistik Kurumu. <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr> [Erişim tarihi: 29/5/2021]
- Umbarkar, M., Thakare, S., Sureshe, T., Giri, A., & Chopade, V. (2021). Formulation and Evaluation of Liposome by Thin Film Hydration Method. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 11(1), 72-76.
- Uz, R. I., Hidayah, N., Bakar, A., Gk, S., Ja, M., Ibrahim, A., & My, G. (2016). *Inhibitory Effect of Various Solvent Extracts of Ficus Carica Fruit on Promyelocytic Leukemia Cell 2*.

Materials and Methods. (April), 176–180.

- Verhoeckx, K., Cotter, P., López-Expósito, I., Kleiveland, C., Lea, T., Mackie, A., ... & Wichers, H. (2015). *The impact of food bioactives on health: in vitro and ex vivo models* (p. 338). Springer Nature.
- Walsh, J. G., Cullen, S. P., Sheridan, C., Lüthi, A. U., Gerner, C., & Martin, S. J. (2008). Executioner caspase-3 and caspase-7 are functionally distinct proteases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(35), 12815-12819.
- World Health Organization [WHO]. (2021). Cancer. World Health Organization https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1. [Erişim tarihi: 4/4/2021]
- Yaman, Ü. (2019). İnatrütümöral Uygulamaya Yönelik Nanolipozom Formülasyonlarının Geliştirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara
- Yang, Y., Shen, D., Long, Y., Xie, Z., & Zheng, H. (2017). Intrinsic peroxidase-like activity of ficin. *Scientific reports*, 7(1), 1-8.
- Yücel, Ç. (2010). Doksisiklinin Lipozom Ve Nanopartikül Formülasyonlarının Geliştirilmesi Ve Hücre Kültüründen Geçişlerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara.
- Zalba, S., Navarro, I., Trocóniz, I. F., de Ilarduya, C. T., & Garrido, M. J. (2012). Application of different methods to formulate PEG-liposomes of oxaliplatin: evaluation in vitro and in vivo. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 81(2), 273-280.
- Zare, H., Moosavi-Movahedi, A. A., Salami, M., Mirzaei, M., Saboury, A. A., & Sheibani, N. (2013). Purification and autolysis of the ficin isoforms from fig (*Ficus carica* cv. Sabz) latex. *Phytochemistry*, 87, 16-22.
- Zheng, W., Shen, D., Pan, Y., Yi, D., Long, Y., & Zheng, H. (2019). Enhancing the peroxidase-like activity of ficin by rational blocking thiol groups for colorimetric detection of biothiols. *Talanta*, 204, 833-839.

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES
ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ

BİLİMSEL ETİK BEYANI

“Nanolipozomlar İçinde Enkapsüle Edilen İncir Lateksi Ve Fisın Enziminin Ht-29 İnsan Kolon Kanseri Hücre Hattında İncelenmesi” 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 atf yaptığımı bildiririm. İfade ettiklerimin aksi ortaya çıktığında ise her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Seçil TECİMEN

28 / 07 / 2021