FARMASÖTİK AMAÇ İÇİN KULLANILACAK MİKRO- VE NANOPARTİKÜLLERE ANTİKOR BAĞLAMA VE ETKİNLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Seval GEZGİN

Yüksek Lisans Tezi

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Ağustos-2013

Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir. Proje No : 1207S121

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Seval Gezgin'in "**Farmasötik Amaç İçin Kullanılacak Mikro- Ve Nanopartiküllere Antikor Bağlama ve Etkinliklerinin Araştırılması"** başlıklı **İleri Teknolojiler** Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans Tezi 22.07.2013 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	**: Yard. Doç. Dr. GÜLAY BÜYÜKKÖROĞLU**	**……**
Üye	**: Prof. Dr. MERİH KIVANÇ**	**……**
Üye	**: Yard. Doç. Dr. EMEL ERGENE**	**……**

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun …… tarih ve …… sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET
Yüksek Lisans Tezi

FARMASÖTİK AMAÇ İÇİN KULLANILACAK MİKRO- VE NANOPARTİKÜLLERE ANTİKOR BAĞLAMA VE ETKİNLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Seval GEZGİN
Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
İleri Teknolojiler Anabilim Dalı
Danışman : Yard. Doç. Dr. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU
2013, 149 sayfa

Kanser hücreleri, yok edilmelerine neden olabilecek doğal ve yapay girişimleri, varlıklarının devamı için yönetebilirler. Tıbbın kanserle savaşma yöntemlerini elimine etmek ve hastanın immün sistemini kandırmak için çok çeşitli yollara giderler. Kanser en sofistike silah olan evrimi kullanarak tüm sorunların üstesinden gelir. Tedavi yöntemleri kanser hücrelerini yok edebilir, fakat etraftaki dokulara zarar vermeden bunu yapamaz. Tedavi başarılı olsa bile, kanserin yeniden güçlenmesi normaldir ve öncekinden daha da saldırgandır.

Son yıllarda gelişmekte olan anti-kanser ilaçları konvansiyonel yaklaşımların dışına çıkarak "hedefleme" tedavisi şeklinde olmaya başlamıştır. Etkin maddenin, vücutta istenen hedef bölgeye gönderilmesinde, taşıyıcı sistemler kullanılmaktadır. Bunun birincil yararı, hedeflenen bölgede, istenen hızda en uygun etkileşim sağlanmaktadır. İlaç hedeflemenin ikinci yararı ise, etken maddenin dozunun azaltılması ve etken maddenin sadece hedef organa dağılımıyla sınırlandırılmasıdır. Böylece oluşabilecek herhangi bir yan etki veya yan etkiler en aza indirilebilecektir.

Çeşitli hedef moleküllere yönelik monoklonal antikorlar kanser tedavisinde günümüzün en etkin araçları arasına girmiştir. Yüksek düzeyde seçicilik ve olumlu toksisite profilleri, yüksek maliyetlerine rağmen bu ajanların standart tedaviler içinde yer almalarını sağlamıştır. EGFR, hedef alınan moleküller arasında yer almaktadır. Bu çalışmada, HER2'yi inhibe eden monoklonal antikor anti-HER2'nin mikro- ve nano boyuttaki lipofilik ilaç taşıyıcı sistemlere birleştirilmesi hedeflenmiştir. Bu sistemlerin oluşturulması ve antikoru birleştirme çalışmalarındaki ortam koşullarının -organik çözücü ile muamele, yüksek hızda karıştırma ya da ultrasonikasyon, ısıtma ya da dondurma gibi işlemlerinin- anti-HER2 üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Sonikasyon yöntemiyle lipozom ve KLN formülasyonları hazırlanarak, antikorlar hapsedilmiştir.

Sonuç olarak, kimyasal bir reaksiyon veya pegilasyon gibi kaplama işlemlerine gerek duyulmadan bir hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı sistem hazırlanmaya çalışılmıştır. Elde edilen partiküller, nano boyutlu, homojen dağılım gösteren, transfeksiyon özelliği sağlayabilecek yüzey yüküne sahip ve partiküllerin sitotoksik etkileri düşük bulunmuştur. Uygulanan stres koşullarının antikor üzerinde belirgin bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler : Mikro- ve nanopartikül, Lipozom, KLN, HER2, Anti-HER2 antikoru, Hedeflendirilmiş ilaç salım sistemleri.

ABSTRACT
Master of Science Thesis

MICRO- AND NANOPARTICLES THAT WILL BE USED FOR PHARMACEUTICAL PURPOSE, ARE ATTACHED TO ANTIBODY AND RESEARCH OF THEIR EFFICIENCIES

Seval GEZGİN
Anadolu University, Graduate School of Sciences
Advanced Technologies Research Unit

Supervisor: Assistant Prof. Dr. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU
2013, 149 pages

To be able to survive, cancer cells can manage natural and artificial attempts which can cause their extermination. They do so through an incredible variety of pathways that continues to deceive both our immune system and our thought strategies to fight cancer. But this is just the beginning of cancer. Cancer accomplishes all of the above through the use of the most sophisticated weapon, evolution. Current therapies can destroy cancer cells, but not without destroying surrounding tissues. Even if the treatment is successful, resurgences are the norm, and in an even more aggressive form than before.

In recent years, enhanced anticancer drugs are out of conventional therapy and they are becoming a targeting therapy. Carier systems are used for drugs that are sent to target area in the body. First utility of this, drugs will be an appropriate interaction in target area and at required speed. Second utility of targeting therapy is decreasing of doses and drugs will be only in the target area. Thus, any side effects would decrased substantially.

Monoclonal antibodies (mAb) intended for several target molecules are quite effective tools for cancer therapy. Despite of their high costs, they are in conventional therapy because of their high selectivity and good toxicity profiles. EGFR is one of target molecules. In this study, mAb anti-HER2 that inhibite HER2, is intended to conjugate to micro and nanoparticles that are drug carier systems. Create of carier systems need certain conditions such as treatment with organic solvent, stirring in high speed or ultrasonication, heating or freezing. Effect of these conditions were researched. Liposome and solid lipid nanoparticles were prepared with sonication and antibodies were encapsulated them.

As a result, a drug carier system was revealed without needing a chemical reaction or pegilation. Obtained particles were found as nano-sized, showing homogeneous distribution, good surface charge for transfection ability and having low cytotoxic effects. Significant effects were not determined when the applied stress conditions of formulation on the antibody.

Key Words : Micro- and nanoparticle, Liposome, SLN, HER2, Anti-HER2 antibody, Targeting drug delivery systems.

TEŞEKKÜR

Bilgi ve birikimlerini benimle paylaşan, araştırmalarımda bana yol gösteren değerli danışman hocam Yard. Doç. Dr. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU'na,

Her ihtiyaç duyduğum anda yanımda olan, tecrübelerini benimle paylaşan, bir telefon kadar yakınımda olduğunu hissettiren Arş. Gör. Dr. Behiye ŞENEL'e, laboratuvarlarını kullandığım Yard. Doç. Dr. Sinem ILGIN'a (Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji ABD) ve Doç. Dr. Miriş DİKMEN'e (Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji ABD), SEM görüntülerini almamda bana yardımcı olan Arş. Gör. Mehtap TEMİZKAN'a (Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü), üzerinde çalıştığım MCF-7 kanser hücre hattını temin etmemi sağlayan Prof. Dr. İmran VURAL'a (Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Teknolojisi Bölümü) ve teknik cihaz kullanımı konusunda yardımlarını aldığım Yard. Doç. Dr. Volkan KILIÇ'a (Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü),

Çalışmalarım süresince manevi desteklerini benden esirgemeyen, Gamze ALPATEŞ'e, Burcugül ALTUĞ'a, Ece ALBAYRAK'a ve Yusuf OĞUZ'a,

Bütün eğitim hayatım boyunca gösterdikleri destek, sabır ve anlayışları için sevgili AİLEME

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Seval GEZGİN

Ağustos 2013

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET……i
ABSTRACT……...ii
TEŞEKKÜR……..iii
İÇİNDEKİLER……iv
ŞEKİLLER DİZİNİ……vii
ÇİZELGELER DİZİNİ……..xiv

1 GİRİŞ 1
1.1 HER2 Hedef Molekülünün Özellikleri ve Ligand Etkileşimi..... 8
1.2 İlaç Hedefleme Stratejileri……. 11
1.2.1 Pasif hedefleme..... 11
1.2.2 Aktif hedefleme 12
1.3 Bağışıklık Sistemi (İmmün Sistem) 15
1.3.1 Doğal (innate) bağışıklık sistemi 16
1.3.2 Geliştirilebilir (adaptif) bağışıklık sistemi..... ……17
1.3.2.1 Hücresel bağışıklık…….……17
1.3.2.2 Humoral bağışıklık…….……17
1.4 Monoklonal Antikor Teknolojisinin Evrimi ……..18
1.5 Antikorların (İmmünoglobulinlerin) Yapısı..... 20
1.5.1 Poliklonal (çok kolonili) antikorlar 23
1.5.2 Monoklonal (tek kolonili) antikorlar 23
1.6 Günümüzde Oluşturulabilen Antikorlar..... 24
1.7 Antikorların İlaç Taşıyıcı Sistemler ile Kullanımı..... 25
1.7.1 Reseptör seçiminde dikkat edilmesi gereken noktalar..... 26
1.7.2 Antikor taşıyıcı sisteme bağlanırken dikkat edilmesi gerekenler 26
1.8 İlaç Taşıyıcı Partiküler Sistemler..... 27
1.8.1 Lipozomlar..... 28
1.8.1.1 İmmünolipozomlar…….……32

1.8.2 Yağ emülsiyonları 34
1.8.3 Katı lipit nanopartiküller 34
1.8.4 Polimerik nanopartiküller 37
1.8.5 Miseller 38
1.8.6 Mikrokapsüller 41
1.8.7 Mikroküreler 41
1.8.8 Nanopartiküller 43
1.8.9 Sfingozomlar (sfingolipitler) 43
1.8.10 Mikrosüngerler 44
1.8.11 Niozomlar 44
1.9 Pegilasyon 45
2 MATERYAL VE METOD 47
2.1 Materyal 47
2.1.1 Çalışmada kullanılan maddeler 47
2.1.2 Çalışmada kullanılan cihazlar 48
2.1.3 Çalışmada kullanılan besi yerleri ve solüsyonlar 49
2.2 Metod 51
2.2.1 Lipozom formülasyonlarının hazırlanması 52
2.2.1.1 Lipozomlara katyonik özellik kazandırma 53
2.2.1.2 Lipozomlara antikorun enkapsülasyonu 53
2.2.1.3 Lipozomlara acridine orange (Akridin turuncusu, AO) ve FITC (Fluorescein Isothiocyanate Isomer I)'in enkapsülasyonu 55
2.2.2 KLN formülasyonlarının hazırlanması 56
2.2.2.1 KLN'lere katyonik özellik kazandırma 56
2.2.2.2 KLN'lere antikorun enkapsülasyonu 56
2.2.3 Formülasyonların karakterizasyonu 57
2.2.3.1 Parçacık boyutu ve dağılımı 57
2.2.3.2 Zeta potansiyel 57
2.2.3.3 Morfolojik inceleme 57
2.2.4 Enkapsüle antikorun formülasyonlardan ekstraksiyonu 59
2.2.5 Antikorun amonyum sülfat ile çöktürülmesi 59

2.2.5.1 Diyaliz işlemi 61
2.2.6 Hücre kültürü çalışmaları 61
2.2.6.1 Sitotoksisite çalışmaları..... 62
2.2.6.2 AO ve FITC yüklü nanopartiküllerin hücrelere uygulanması……64
2.2.7 SDS-PAGE yöntemi 64
3 BULGULAR 68
3.1 Lipozomlarla Yapılan Karakterizasyon Çalışmaları..... 68
3.1.1 Lipozomların parçacık boyutu ve dağılım bulguları 68
3.1.2 Lipozomların zeta potansiyel bulguları 70
3.2 KLN'lerle Yapılan Karakterizasyon Çalışmaları..... 71
3.2.1 KLN'lerin parçacık boyutu ve dağılım bulguları 71
3.2.2 KLN'lerin zeta potansiyeli değerlendirmeleri……...72
3.3 Formülasyonların TEM Görüntüleri ve Analizleri 73
3.4 Formülasyonların SEM (Taramalı Elektron Mikroskop) Görüntüleri ve Analizleri……...77
3.5 Hücre Kültürü Çalışmaları……..82
3.5.1 Sitotoksisite çalışmaları…….82
3.5.1.1 Lipozom formülasyonlarının sitotoksisite değerlendirmeleri..... 83
3.5.1.2 KLN formülasyonlarının sitotoksisite değerlendirmeleri..... 103
3.5.2 AO ve FITC yüklü nanopartiküllere ait mikroskobik bulgular 107
3.6 SDS-PAGE Yöntemine Ait Bulgular..... 120
4 TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER 124
KAYNAKLAR……133

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1. EPR-etkisi SEM (Scanning electron micrograms) görüntüsü (Maeda ve ark., 2009)……..…….....12
1.2. Hibridoma teknolojisi ile monoklonal antikor üretimi (http-2)……..19
1.3. Immünoglobulin yapısı (http-3)……..21
1.4. Immünoglobulin izotipleri (http-4)…….22
1.5. Günümüzde oluşturulabilen antikor tipleri (Çırakoğlu, 2002)……25
1.6. Lipozomun yapısı (Silindir, 2009)……..29
1.7. Lipozom hazırlama yöntemleri (Akman ve ark., 2013)……..32
1.8. Misel ve lipozom yapısı (http-6)…….38
1.9. Misel yapısı (http-7)……39
1.10. Blok kopolimer misellerin hazırlanmasında uygulanan iki temel yöntemin şematik gösterimi (Yüksel ve ark., 2003)……..……...40
1.11. L-PLA mikroküresinin morfolojik özelliklerine ait SEM (taramalı elektron mikroskobu) fotoğrafları (1-5 μm) (Peksoy ve ark., 2004)……..42
2.1. Tek tabakalı kültür ortamındaki MCF-7 hücrelerinin immunsitokimyasal yöntem ile boyanmış görüntüsü……52
2.2. Tek tabakalı kültür ortamında yeni bölünmüş olan MCF-7 hücrelerinin Taramalı Elektron Mikroskobu görüntüsü……...61
3.1. L1 Formülasyonu TEM görüntüsü (60000X büyütme)……..73
3.2. L1 Formülasyonu TEM görüntüsü (87000X büyütme)……..73
3.3. L7 Formülasyonu (Lipozom+ Trastuzumab +FITC) TEM görüntüsü (60000X büyütme)…….……..….74
3.4. L7 Formülasyonu (Lipozom+Trastuzumab+FITC) TEM görüntüsü (60000X büyütme)……..……..…..74
3.5. L7 Formülasyonu (Lipozom+ Trastuzumab +FITC) TEM görüntüsü (87000X büyütme)…….……...…….....75
3.6. L4 Formülasyonu (Lipozom+FITC) TEM görüntüsü (105000X büyütme)……...……..…...75
3.7. L4 Formülasyonu (Lipozom+FITC) TEM görüntüsü (87000X büyütme)….76

3.8. L8 Formülasyonu (Lipozom+Trastuzumab+Acridine Orange) TEM görüntüsü (2550X büyütme)…….....……...…...76
3.9. K1 formülasyonu TEM görüntüsü (43000X büyütme)…….……..77
3.10. Liyofilize L1 formülasyonu SEM görüntüsü…….…..….77
3.11. Liyofilize L1 formülasyonu SEM görüntüsü……78
3.12. Liyofilize L2 formülasyonu SEM görüntüsü……78
3.13. Liyofilize K1 formülasyonu SEM görüntüsü……..……..79
3.14. Liyofilize K1 formülasyonu SEM görüntüsü……....79
3.15. Liyofilize K2 formülasyonu SEM görüntüsü……....80
3.16. Liyofilize L0 formülasyonu SEM görüntüsü……..…..80
3.17. Liyofilize L0 formülasyonu SEM görüntüsü……..……..81
3.18. L1 formülasyonu havada kurutma sonrası çekilen SEM görüntüsü…….81
3.19. L1 formülasyonu havada kurutma sonrası çekilen SEM görüntüsü…….82
3.20. L1 formülasyonu havada kurutma sonrası çekilen SEM görüntüsü….....82
3.21. Hücrelere doğrudan uygulanan etkin madde Trastuzumab'ın (Anti-HER2 Antikoru) 24 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi…….84
3.22. Hücrelere doğrudan uygulanan etkin madde Trastuzumab'ın (Anti-HER2 Antikoru) 48 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi…….84
3.23. Amonyum sülfat çöktürmesi yapılan Trastuzumab'ın (Anti-HER2 Antikoru) 24 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi…….85
3.24. Amonyum sülfat çöktürmesi yapılan Trastuzumab'ın (Anti-HER2 Antikoru) 48 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi…….85
3.25. Hücrelere doğrudan uygulanan A.O. (Acridine Orange) boyasının 24 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi……...86
3.26. Hücrelere doğrudan uygulanan A.O. (Acridine Orange) boyasının 48 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi……...86
3.27. Hücrelere doğrudan uygulanan FITC'in (Fluorescein Isothiocyanate) 24 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi……..87
3.28. Hücrelere doğrudan uygulanan FITC'in (Fluorescein Isothiocyanate) 48 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi……...…..….87
3.29. Hücrelere uygulanan L0'ın 24 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi…….87

3.30. Hücrelere uygulanan L0'ın 48 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi…….88
3.31. Hücrelere uygulanan L1'in 24 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi…….....88
3.32. Hücrelere uygulanan L1'in 48 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi……...…..89
3.33. Hücrelere uygulanan L2'nin 24 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi……..…89
3.34. Hücrelere uygulanan L2'nin 48 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi…….90
3.35. Hücrelere uygulanan L3'ün 24 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi…….90
3.36. Hücrelere uygulanan L3'ün 48 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi…….91
3.37. Hücrelere uygulanan L4'ün 24 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi……..…91
3.38. Hücrelere uygulanan L4'ün 48 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi…….92
3.39. Hücrelere uygulanan L5'in 24 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi…….92
3.40. Hücrelere uygulanan L5'in 48 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi…….93
3.41. Hücrelere uygulanan L6'nın 24 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi…….93
3.42. Hücrelere uygulanan L6'nın 48 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi…….94
3.43. Hücrelere uygulanan L7'nin 24 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi…….94
3.44. Hücrelere uygulanan L7'nin 48 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi…….95
3.45. Hücrelere uygulanan L8'in 24 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi…….....95

3.46. Hücrelere uygulanan L8'in 48 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi…….96
3.47. Hücrelere uygulanan L9'un 24 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi…….96
3.48. Hücrelere uygulanan L9'un 48 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi…….97
3.49. Hücrelere uygulanan L10'un 24 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi…….97
3.50. Hücrelere uygulanan L10'un 48 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi…….98
3.51. Hücrelere uygulanan L11'in 24 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi……....98
3.52. Hücrelere uygulanan L11'in 48 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi……....99
3.53. Hücrelere uygulanan L12'nin 24 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi……....99
3.54. Hücrelere uygulanan L12'nin 48 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi……...100
3.55. Hücrelere uygulanan L13'ün 24 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi……...100
3.56. Hücrelere uygulanan L13'ün 48 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi……...101
3.57. Hücrelere uygulanan L14'ün 24 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi……...101
3.58. Hücrelere uygulanan L14'ün 48 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi……...101
3.59. Hücrelere uygulanan L15'in 24 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi ……..……102
3.60. Hücrelere uygulanan L15'in 48 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi ……..……102
3.61. Hücrelere uygulanan K1'in 24 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi……...104

3.62. Hücrelere uygulanan K1'in 48 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi……...104
3.63. Hücrelere uygulanan K2'nin 24 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi……...105
3.64. Hücrelere uygulanan K2'nin 48 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi……...105
3.65. Hücrelere uygulanan K3'ün 24 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi……...106
3.66. Hücrelere uygulanan K3'ün 48 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi……...106
3.67. Hücrelere uygulanan K4'ün 24 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi……...107
3.68. Hücrelere uygulanan K4'ün 48 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi……...107
3.69. MCF-7 hücrelerinin beyaz ışıkta çekilen floresan mikroskobu görüntüsü (10X)……...108
3.70. Akridin turuncusu uygulanmış MCF-7 hücrelerinin floresan mikroskobu görüntüsü (10X)…….….108
3.71. Akridin turuncusu uygulanmış MCF-7 hücrelerinin floresan mikroskobu görüntüsü (20X)……..109
3.72. Akridin turuncusu uygulanmış MCF-7 hücrelerinin floresan mikroskobu görüntüsü (20X)……..109
3.73. Akridin turuncusu uygulanmış MCF-7 hücrelerinin floresan mikroskobu görüntüsü (40X)……..……110
3.74. Akridin turuncusu uygulanmış MCF-7 hücrelerinin floresan mikroskobu görüntüsü (40X)……..110
3.75. FITC-bağlı anti-HER2 antikoru uygulanmış MCF-7 hücrelerinin floresan mikroskobu görüntüsü (10X)……..111
3.76. FITC-bağlı anti-HER2 antikoru uygulanmış MCF-7 hücrelerinin floresan mikroskobu görüntüsü (20X)…….….111
3.77. FITC-bağlı anti-HER2 antikoru uygulanmış MCF-7 hücrelerinin floresan mikroskobu görüntüsü (40X)…….112

3.78. L4 uygulanmış MCF-7 hücrelerinin floresan mikroskobu görüntüsü……...….112
3.79. L5 uygulanmış MCF-7 hücrelerinin floresan mikroskobu görüntüsü (10X)…….…..113
3.80. L8 uygulanmış MCF-7 hücrelerinin floresan mikroskobu görüntüsü (20X)……...113
3.81. L8 uygulanmış MCF-7 hücrelerinin floresan mikroskobu görüntüsü (40X)…….……..114
3.82. L11 uygulanmış MCF-7 hücrelerinin floresan mikroskobu görüntüsü (10X)……...114
3.83. L11 uygulanmış MCF-7 hücrelerinin floresan mikroskobu görüntüsü (20X)……...…115
3.84. L11 uygulanmış MCF-7 hücrelerinin floresan mikroskobu görüntüsü (40X)……...115
3.85. L12 uygulanmış MCF-7 hücrelerinin floresan mikroskobu görüntüsü (10X)……...….116
3.86. L12 uygulanmış MCF-7 hücrelerinin floresan mikroskobu görüntüsü (20X)……...116
3.87. L12 uygulanmış MCF-7 hücrelerinin floresan mikroskobu görüntüsü (40X)……...117
3.88. L13 uygulanmış MCF-7 hücrelerinin floresan mikroskobu görüntüsü…...117
3.89. L14 uygulanmış MCF-7 hücrelerinin floresan mikroskobu görüntüsü……118
3.90. L14 uygulanmış MCF-7 hücrelerinin floresan mikroskobu görüntüsü (10X)……...118
3.91. L15 uygulanmış MCF-7 hücrelerinin floresan mikroskobu görüntüsü (10X)……...…119
3.92. L15 uygulanmış MCF-7 hücrelerinin floresan mikroskobu görüntüsü (20X)……...119
3.93. L15 uygulanmış MCF-7 hücrelerinin floresan mikroskobu görüntüsü (20X)……...120

3.94. 1-20 dk. sonikasyonun antikorlar üzerine etkisinin SDS-PAGE görüntüsü……121
3.95. Çıplak antikorlara uygulanan ekstraksiyon yöntemi SDS-PAGE görüntüsü …….....….122
3.96. Boyar maddelerin ve ekstraksiyon yönteminin antikorlar üzerine etkisinin SDS-PAGE görüntüsü ……...……123

ÇİZELGELER DİZİNİ

1.1. Vezikül tipleri ve çapları (Akman ve ark., 2013)……...…….29
2.1. Formülasyon çalışmalarının tablosu……...54
2.2. Protein molekül ağırlıklarına göre hazırlanan ayırma jeli yüzdeleri tablosu (Laemmli, 1970)…….…....65
3.1. Lipozomların ortalama parçacık büyüklüğü ve polidispersite indisi……..….68
3.1. (Devam) Lipozomların ortalama parçacık büyüklüğü ve polidispersite indisi……..…….69
3.2. L2 ve L3 formülasyonlarının zamana bağlı boyut stabilite ölçümleri……...……..….69
3.3. L2 ve K2 formülasyonlarının liyofilizayon sonrası partikül boyutu değişimleri……...69
3.4. Lipozomların zeta potansiyel ölçüm değerleri……...70
3.5. L2 ve L3 formülasyonlarının zamana bağlı zeta potansiyeli (mV) stabilite ölçümleri……...……...70
3.6. L2 ve K2 formülasyonlarının liyofilizayon sonrası zeta potansiyeli değişimleri……...……....71
3.7. KLN'lerin ortalama parçacık büyüklüğü ve polidispersite indisi……...71
3.8. KLN'lerin diyaliz sonrası ortalama partikül boyutu ve polidispersite indisi……..….72
3.9. KLN'lerin zeta potansiyel değerleri……...……....72
3.10. Etkin madde içermeyen lipozom formülasyonlarının sitotoksisite çalışmasında kullanılan miktarları……..…..83
3.11. Etkin madde içeren lipozom formülasyonlarının, sitotoksisite çalışmalarında kullanılan yaklaşık trastuzumab (mAb) konsantrasyonları……..83
3.12. Etkin madde içermeyen K1'in sitotoksisite çalışmasında kullanılan formülasyon miktarları……...……103
3.13. Etkin madde içeren KLN formülasyonlarının, sitotoksisite çalışmalarında kullanılan yaklaşık trastuzumab (mAb) konsantrasyonları…….....…….103

3.14. 1-20 dk. aralığında antikora uygulanan sonikasyon süreleri……..….121

1 GİRİŞ

Kanser tedavisinde kullanılan ilaçların büyük bir kısmı kanserli ve normal hücreler üzerinde sitotoksik etki göstermektedir. Bu nedenle, günümüze kadar olan süreçte kanser ve virütik hastalıkların tedavisinde yer alan geleneksel ilaç kullanımı, artık yerini normal hücrelerde toksisiteyi en aza seviyeye düşürecek, dolaşımda daha uzun süre kalacak ve hücreye özel hedeflendirme yapabilecek akıllı ilaç taşıyıcı sistemler ile tedaviye bırakmaktadır. İlacın ulaşmasının istenildiği bölgelere taşınması, iyi hedeflendirme özelliğine sahip kontrollü ilaç taşıyıcı sistemlerle sağlanabilir (Yokoyama, 2005).

Nanopartiküllerin ilaç taşıyıcısı olarak kullanılmasında ortaya çıkan iki önemli problem vardır. Bunlardan biri, *in vivo* uygulamada nanopartiküllerin bütünlüklerini koruyamayıp, taşınan ilacın hedef bölgeye ulaşmadan kanda salınması; diğer problem ise, nanopartiküllerin retiküloendotelyal sistem (RES) hücrelerince tutularak hedef bölgeye ulaşamamasıdır (Kiwada ve ark., 2006; Chang ve ark., 2010). Bu problemleri önlemek amacıyla ilaç taşıyıcı veziküler sistemlere antikor bağlanarak belirlenen hücrelere hedeflendirilmesi çalışmaları yapılmaktadır. Bu hedef doğrultusunda, öncelikle antikorun bağlanması aşamasının sorunsuz gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Nanopartiküllerin hazırlanması ve antikorun enkapsülasyon/adsobsiyonu işlemleri sırasında uygulanan formülasyon koşullarında, protein yapıdaki antikorun yapısının korunması, sistemin düzgün çalışmasını sağlayacak en önemli noktadır. Yapılan çalışmada, nanopartiküllerin hazırlanması sırasında organik çözücü, sonikasyon gibi çeşitli fizikokimyasal koşulların kullanımı söz konusudur. Hazırlanan nano boyuttaki ilaç taşıyıcı sistemlere yüklendiği ya da adsorbe olduğu düşünülen antikor üzerinde yapılan çeşitli çalışmalarda, uygulanan işlemlerin antikorun yapısı üzerindeki etkileri araştırılmıştır ve antikorun yapısının korunduğu en uygun formülasyon koşulları belirlenmeye çalışılmıştır.

Lipozoma ve katı lipit nanopartiküllere enkapsüle ve adsorbe edilen antikorlar (anti-HER2 antikor, trastuzumab) kanser tedavisi için günümüzde bir taşıyıcı sisteme bağlanmadan serbest halde de kullanılmaktadır. Kan dolaşımına gönderilen bu antikorlar, kanser hücreleri üzerindeki reseptörlere bağlanarak

hücre bölünmesini engellemek amacıyla uygulanmaktadır. Amaç, kontrolsüz ve hızlı hücre gelişimini yavaşlatmaktır. Bu uygulamaya ek olarak kan dolaşımına ayrı bir sistem ile verilen kemoterapötik ilaçlar, bölünmesi ve gelişmesi yavaşlatılmış hücrelerin ölmesini sağlamaktadır.

Kanser tedavi üzerine yapılan son araştırma çalışmalarında geliştirilen nanopartiküllere antikor bağlanması işlemi, bu iki aşamalı tedavi yöntemlerinin tek aşamaya düşürülmesi ihtimalini güçlendirmiştir. Antikorun bağlandığı nanopartiküllere kemoterapötik ilaç yüklemesi yapılabilir ve hücrelere spesifik hedeflendirme ile yüksek dozda ilacın dolaşımda uzun süre kalması önlenebilir. Hem etkin maddenin burada salınması ve hücreler tarafından alınması sağlanabilir hem de antikorun tek başına gösterdiği etkilerle hücrenin karşı karşıya kalması ile çift etkili tedavi mümkün olabilir. Bu etkilerin mümkün olabileceği düşüncesi ancak antikorun sorunsuz ve hasarsız bir şekilde partiküllere bağlanması ve çalışması ile mümkündür.

Tümör en basit ifadeyle doku veya hücrelerin kontrolsüz olarak bölünmesi olarak tanımlanmaktadır ve malign ve benign olmak üzere iki türü mevcuttur. Malign tümörler, benignlerden farklı olarak; komşu dokulara saldırırlar, onları harap ederler ve genellikle metastaz yaparlar. Tümör tedavisinde kullanılan ilaçların en büyük problemi yüksek toksisiteleridir. Bunun yanında suda düşük çözünürlükleri, irritan özellikleri, stabilite problemleri, hızlı metabolize olabilmeleri ve seçici olmayan ilaç dağılımı diğer problemleridir. (Allen ve ark., 2005). Bu yüzden ilaç hedeflendirilmesi kanser tedavisinde kilit noktayı oluşturmaktadır.

İlaçların sistemik yolla vücuda uygulanmasında da birçok sorunla karşılaşılmaktadır. Bu sorunlardan biri, ilacın hızla dolaşımından uzaklaştırılıp vücuttan atılması, bir diğeri ise geniş dağılım hacmine sahip olmasıdır. Bu nedenle, teşhis veya tedavi amacıyla kullanılan ilacın, istenen dokuda yeterli derişime ulaşabilmesi için ilacın yüksek dozda veya tekrarlanan uygulamalarla ile sık olarak hastaya uygulanması gerekmektedir. Bu da beraberinde yüksek toksisite, düşük yarar/zarar oranı riskini getirmektedir. Sistemik uygulama nedeniyle ortaya çıkan bu sorunları ortadan kaldırmak için farklı taşıyıcı sistemler ile ilacın istenilen bölgeye ulaştırılması konusunda uzun yıllardır çalışmalar

yapılmaktadır. Lipozomların da aralarında bulunduğu bu taşıyıcı veziküller, ilacı istenen hedef bölgeye taşırken, aynı zamanda ilacı metabolize olmaktan korumakta, hızla vucüttan atılımını engellemekte, sağlıklı dokularda ilaç birikimini önleyerek ilacın toksisite riskini de azaltmaktadır. Bu yaklaşım ilaç hedeflendirme olarak adlandırılmaktadır (Marcucci ve Lefoulon, 2004; Silindir, 2009).

Son yıllarda gelişmekte olan anti-kanser ilaçları "hedefleme= targeting" tedavisi şeklindedir. İlaç hedeflendirilmesi, etkin maddenin etki veya absorbsiyon bölgesine seçici olarak yönlendirilmesidir. Bu yönlendirmede kullanılan koloidal sistem ise etkin maddeyi taşıyan özel bir yapıdır. Koloidal ilaç taşıyıcı sistemler farmasötik alanda yoğun araştırılan bir konudur. Bu sistemler, mikroküreleri, polimerik nanopartikülleri, lipozomları ve yağ emülsiyonlarını, niozomları, sfingozomları, miselleri, mikrokapsülleri, katı-lipit nanopartikülleri, mikrosüngerler gibi ilaç taşıyıcı yeni sistemleri içermektedir (Demirel ve Yazan, 2000; Silindir, 2009). İdeal koloidal sistem, içerdiği etkin maddeyi etki edeceği bölgeye taşımalı ve orada uygun bir hızda ve sürede kontrollü serbestleştirebilmelidir (Demirel ve Yazan, 2000).

Çeşitli hedef moleküllere yönelik monoklonal antikorlar kanser tedavisinde günümüzün en etkin araçları arasına girmiştir. Yüksek düzeyde seçicilik ve olumlu toksisite profilleri, yüksek maliyetlerine rağmen bu ajanların standart tedaviler içinde yer almalarını sağlamıştır (Neri ve Trachsel, 2006; Rosenblatt ve ark., 2006; Chames ve ark., 2009).

Elbayoumi ve Torchilin (2007) doksorubisin-yüklenmiş dolaşımda uzun süre kalan lipozomları nükleozoma-özel monoklonal antikor 2C5 (mAb 2C5) ile modifiye etmiştir ve bu lipozomların tümör hücre yüzeyine-bağlı nükleozomlar aracılığı ile birçok tümör hücre çeşitini tanıdığı görülmüştür. Bu mAb 2C5-modifiyeli PEGlenmiş lipozomların *in vitro* bağlanmayı 3-8 kat arttırdığı ve değişik kökenli (fare LLC, 4T1, C26 ve insan BT-20, MCF-7 ve PC3) çeşitli kanser hücre hatları tarafından alındığı, flow sitometri (FACS) ve *epi* ve konfokal mikroskopi ile gösterilmiştir. Sonuç olarak, mAb 2C5-modifiyeli Doxil^{TM}'in doksorubisine direnç gösteren kanser hücreleri de dahil çeşitli kanser hücrelerine

karşı tüm kontrol preperatlarından kayda değer derecede daha yüksek sitotoksisite gösterdiği kanıtlanmıştır.

Khawli ve arkadaşlarının (2002) yaptıkları çalışmada, monoklonal antikorlarda kimyasal modifikasyon ile tümörün nekrotik kısmına yönelimini göstermişlerdir. Bu yeni metot ile monoklonal antikorların klinik potansiyelini gelişerek normal hücrelere bağlanmasını en aza indirirken antikorun tümör içine alımı arttırılmak istenmiştir. Bu amacı başarmak için kimyasal modifikasyon kullanılmıştır. chTNT-1, chTNT- 2 ve chTNT-3 olarak, merkezi nekrotik çekirdek içinde bulunan antijenlere karşı, katı tümörü hedefleyen üç kimerik monoklonal antikor kullanılmıştır. Bu eşsiz monoklonal antikorların farmakokinetik özelliklerini geliştirmek için kimyasal modifikasyonun etkinliği gösterilmek istenmiştir. İdeal modifikasyon koşullarını tanımlamak için, TNT monoklonal antikorları çeşitli oranlarda biyotin ile reaksiyona sokulmuştur ve atılım ve biyodağılım analizleri test edilmiştir. Biyodağılım sonuçlarına göre, tümör alımında her monoklonal antikor başına düşen biyotin moleküllerinin sayısı chTNT-1 için 3:1, chTNT-2 için 5:1 ve chTNT-3 için 8:1 olduğu ortaya çıkmıştır. Biyotinlenen monoklonal antikorların tüm vücut atılımı süreleri daha hızlı ve modifiye edilmeyen antikorlarla karşılaştırıldığında biyodağılım profillerinin daha iyi olduğu bulunmuştur. chTNT-2'nin biyotinlenme sonrası biyodağılım sonuçları, tümörde en yüksek alıma sahip olduğunu göstermiştir. Antikor molekülünün yükünün azaltılmasıyla, farmakokinetiklerini ve TNT antikorlarının biyodağılımını katı tümörlerin nekrotik bölümüne yönlendirmeyi geliştirmek için kimyasal modifikasyonun kullanışlı bir yöntem gibi göründüğü ortaya konmuştur.

Pan ve arkadaşları (2008)'nin yaptığı çalışmada biyotinlenmiş kimerik chTNT-3 antikorunun Tümör Nekroz Tedavisinde kullanımı ile ilgili yeni bir yaklaşım geliştirilmeye çalışılmıştır. Biyotinlenmiş chTNT-3'ün immünoreaktivitesinin korunduğu ELISA tarafından doğrulanmıştır. En iyi antitümör etkisi H460 tümörleri taşıyan Balb/c çıplak farelerde ikinci tedaviden üç gün sonra gözlenmiştir. Sonuçlara göre, önerilen iki-basamaklı ön hedefleme yaklaşımının, tümör nekrotik bölgelerine antikanser ilaçların iletimi için yeni bir yöntem olabileceği düşünülmüştür.

Yukarıda bahsedilen örnek çalışmalarda, nanopartiküllerin yüzeyine monoklonal antikorlar kimyasal veya kimyasal olmayan yollarla bağlanarak, özel bir hedef bölgeye ilaç taşıyıcı sistemlerin yönlendirilebildiği ortaya konmuştur. Teşhis ve tedavide bu akıllı sistemlerin kullanılabilir olması hasta açısından büyük fayda sağlamaktadır.

Kanser hücrelerinin anatomileri ve protein ekspressiyon modelleri normal dokulardan faklıdır. Kanser hücreleri sıklıkla peptidler, hormonlar ve yaşamsal besinlerin hücreye alınabilmesi için reseptörleri aşırı ifade (overexpress) ederler (Yang ve ark., 2001; Ching-Li ve ark., 2007). Bu reseptörler koloidal ilaç taşıyıcıları için aktif ve spesifik hedeflendirmeye olanak sağlarlar.

Hedef, özel bir organ, hücresel bir yapı veya intraselüler bölge olabilmektedir. Bu nedenlerle "hedeflenmiş tedavilerin" kemoterapötik ajanlara karşı en önemli üstünlüğü ve avantajı "terapötik indeksleri"nin yüksek olmasıdır (Micol ve ark., 2010).

EGFR (epidermal growth factor receptor)'nin aşırı ifadesi pek çok kanser için ayırt edici bir özelliktir, ilaç iletimi ve terapi için ana hedef olmuştur. EGFR kendine özgü özelliklere sahip kanser hücrelerinde otokrin büyüme olaylarını, apoptozdan kaçınma, sınırsız replikasyon, angiogenez artışını yöneterek ve doku istilası ve metastaz için uygun koşulları sağlar (Hanahan ve ark., 2000). İntraselüler sinyalleşmenin normalden fazla aktivasyonu, onkogenlerin normal olmayan expresyonuyla ilgili olan malignant transformasyonuna neden olduğu düşünülmektedir. EGFR'nin, akciğer (Hendler ve ark., 1984), meme (Perez ve ark.,1984), ovaryum (Gullick ve ark., 1986), kolon (Lockhart, 2005), baş ve boyun (Dassonville ve ark., 1993), prostat (Liu ve ark., 1993; Zhau ve ark., 1996), mesane (Neal ve ark., 1985) ve pankreatik (Tan ve ark., 2004) tümörler gibi insan epitelyum tümörlerinde çok eksprese olduğu belirlenmiştir. Bu aşırı ekspresyon hastalığın kötü prognozuyla ilişkilidir (Nicholson ve ark., 2001) . Tümör istilasına açık olan kuvvetsiz hastaya EGFR yoğunluğunun da ortaklık etmesi, EGFR'nin metastaz üzerindeki rolünü ifade edebilir (Wells ve ark., 2000). Bu nedenlerle, EGFR'nin engellenmesinin kanser tedavisi için iyi bir hedef olduğu düşünülmektedir.

EGFR kanser tedavisinde “hedef=target” olarak seçilebilecek özelliklere ve öneme sahiptir. EGFR çok sayıda epitelyal tümörde hücre yüzeylerinde yüksek miktarlarda eksprese olur. EGFR’yi bloke eden monoklonal antikorlar ve tirozin kinaz aktivitesinin inhibitörleri, EGFR’yi aşırı ifade eden tümör hücrelerinin büyüme ve çoğalma potansiyelini engellemektedir (Zalipsky ve ark., 1997; Yang ve ark., 2001; Park ve ark., 2002; Kullberg ve ark., 2002; Langer ve ark., 2006; Bruin ve ark., 2007; Milano ve ark., 2007; Lin ve ark., 2007; Okamoto ve ark., 2008; Ferguson ve Schmitz, 2009; Hun ve Zhang, 2009; Chames ve ark., 2009; Micol ve ark., 2010; Greene ve ark., 2010; Caraglia ve ark., 2010; Talavera ve ark., 2011; Schiffelers ve ark., 2011; Mumper ve ark., 2011; Feijen ve ark., 2011).

Hun ve arkadaşlarının (2008) yaptıkları bir çalışmada yeni bir polimer floresan nanopatikül (PFNP) sentezlemişler ve mikroskobik floresan görüntüleme tekniğiyle yumurtalık kanserinin görüntülenmesinde kullanmışlardır. PFNP’ler çöktürme polimerizasyonu ile metakrilik asitin monomer olarak, trimetilpropan trimetakrilit’in (Trim) çapraz-bağlayıcı olarak, azobisisobutironitril’in (AIBN) radikal katılımcı olarak, butil rhodamine B’nin (BTRB) floresan boya olarak kullanılmasıyla elde edilmiştir. Floresan boya, polimer hazırlandıktan sonra polimerin 3 boyutlu ağının içine gömülmüştür. Bu yöntemle, PFNP’ler kolayca hazırlanıp daha sonra polimer Anti-Her-2 monoklonal antikoru ile başarılı bir şekilde modifiye edilmiştir. Deneysel sonuçlara göre, anti-Her2 monoklonal antikoru ile konjuge PFNP’ler yumurtalık kanser hücrelerini etkili bir biçimde tanımıştır, iyi duyarlılık ve kabul edilebilir fotokararlılık göstermiştir. Böylelikle yumurtalık kanser hücrelerinin teşhisinde ve tedavi etkinliğinin gözlenmesinde yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Bu çalışma ile kendine özgü optik özellikleri ile floresan nanopartiküller (FNPs) canlıda kanser hücrelerinin görüntülenmesi ve hedeflenmesi için biyosensörler gibi kullanılabileceği ortaya konmuştur. Antikor bağlanmış nanopartüküller aktif hedeflendirme ile kanser hücrelerini yüzey reseptörlerinden tanımıştır.

EGFR ailesinin engelleyici onkojenik üyelerinde bazı geliştirmeler yapılmıştır. Herceptin/trastzumab olarak bilinen HER2/ErbB-2 (human epidermal growth factor receptor 2/Neu) karşıtı insanlaştırılan monoklonal antikoru kemoterapötik ajanlar için hücreleri hassaslaştıran malzemelerdir

(chemosensitizer) ve anti-tümör ajanı gibi meme ve yumurtalık kanserinde genişçe kullanılmaktadır (Slamon ve ark., 2001). Bazı anti-HER2 aşıları klinik çalışmalarda test edilmiştir. Ajanların bir kısmı epitel kanserlerin kendinde EGFR hedeflemede geliştirilmiştir (Ramírez ve ark., 2008). Anti-EGFR ajanların bazılarıyla iyi klinik sonuçlar elde edilmiştir. Cetuximab, US Food Administration Drug (FDA) tarafından onaylı bir kimerik IgG1 monoklonal antikorudur (mAb), EGFR ekspresyonuyla ilerlemiş kalın bağırsak kanseri tedavisi için, eşsiz bir tedavi yöntemi gibidir (Santini ve ark., 2008). Bundan başka, hR3/Nimotuzumab (hR3) olarak bilinen insan anti-EGFR mAb'nin ilerlemiş baş ve boyun tümörlerinin tedavisi için kemoterapiyle birleştirilerek kullanımı Center for State Control of Medication Quality Cuban (CECMED) tarafından uygun görülmüştür (Crombet ve ark., 2004).

Son yıllarda, biyoparçalanabilen JP (jelatin partikül)'ler kontrollü ilaç taşıyıcı sistemler olarak dikkat çekmektedirler (Young ve ark., 2005). Geçen birkaç yılda hidrofilik veya hidrofobik ilaçlarla kaplanmış JP'ler, ilaç taşıyıcı sistem olarak veya gen tedavisinde kullanılan DNA vektörlerini taşımak amacıyla geliştirilmiştir (Leo ve ark., 1997; Truong-Le ve ark., 1999; Vandervoort ve ark., 2004). Jelatin biyouyumluluğu ve biyoparçalanabilir olması nedeniyle hammadde olarak seçilmeye uygundur (Vandervoort ve ark., 2004;). Ayrıca, jelatin üzerindeki amin ve karboksil grupları gibi pek çok fonksiyonel grup, jelatinin kanser-seçici maddelerle birleşmesinde, onu yüzey modifikasyonu için ideal bir aday yapmaktadır (Coester ve ark., 2000). JP (jelatin partikül)'lerin avidin ile konjuge olması temeline dayalı hücre-spesifik ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi sayesinde, biotin ile avidin moleküllerinin bağlanabileceği potansiyel dört bağlanma noktası mevcuttur (Green, 1963; Tseng ve ark., 2007). Dört çeşit farklı veya aynı biyotinlenmiş molekül, JP'lere bağlı avidinlerle, spesifik ve receptör-aracılı hücresel alımı sağlamak için kompleks oluşturabilir. Akciğer kanser hücrelerine EGF reseptör-aracılı endositoz sağlamak amacıyla biotinlenmiş EGF, avidin vasıtasıyla partikül yüzeyine eşleştirilmiştir. Çalışmadaki amaç JP temelli hücre-spesifik bir ilaç taşıyıcı geliştirmek olmuştur (Tseng ve ark., 2007).

Bu tez çalışmasında antikor olarak kullanılan trastuzumab, insan epidermal büyüme faktör reseptörü-2 (HER2)'nin hücre dışı etki alanına karşı yönelen insan kaynaklı bir IgG1 (immunoglobulin G 1) monoklonal antikordur. Trastuzumab kanser hücrelerine ilaç hedeflendirilmesi için mükemmel bir araçtır çünkü, HER2 hücre yüzeyinde kolay ulaşılabilen bir yüzey reseptörüdür ve metastatik alanlarda dahil olmak üzere primer tümörde de çok fazla bulunmaktadır (Tokuda ve ark., 2003). Aktif hedeflendirmede kullanılan ligand-reseptör etkileşiminden yararlanılarak, HER2 monoklonal antikoruyla kaplanmış lipozomların hücre yüzey reseptörlerini tanıyarak hedef hücre veya dokuya ulaşmasını sağlar. HER2, EGFR ailesinden dört EGF reseptörü içeren, EGFR (ErbB1), ErbB2 (Neu), ErbB3 ve ErbB4, reseptör tirozin-özel protein kinaz ailesine aittir. EGFR ailesi üyeleri bir sitoplazmik tirozin kinaz kısım, bir tek transmembran kısım ve bir reseptör dimerizasyonunu ve ligand bağlanmasını sağlayan extraselular kısımdan oluşurlar (Slamon ve ark., 1987). HER2 sinyalizasyonu, sinyallerin hızlı bir şekilde son bulmasını sağlayan normal bir inaktivasyon sürecini etkileyebilir. Bu yüzden HER2 fazlalığı, bozulmuş büyümeyi, onkogenezi, metastazı arttırıp, apoptozu tetikleyen terapötik ajanlara karşı direnci arttıran sinyallere dönüşecektir (Harari ve ark., 2000). HER2 fazlalığı insan meme, yumurtalık, akciğer ve mide gibi kanserlerde görülmektedir. Normal yetişkin dokusundaki bulunuşu düşük olmasına rağmen HER2 insan meme kanseri hücrelerinde %20-30 oranında arttırmaktadır. HER2 artışı hücre yenilenmesinin süresinin kısalmasına dolayısıyla hızlı bölünmeye ve ortalama hücre ömrünün azalmasına neden olur **(**Tokuda, 2003**).**

1.1 HER2 Hedef Molekülünün Özellikleri ve Ligand Etkileşimi

Reseptörlerin fonksiyonları (Aslan, 2013); ilaç ve diğer molekülleri spesifik olarak tanımaları ve ligandın bağlanması ile doğan kimyasal sinyali biyolojik nitelikte bir iş yapan, kendine özgü makromoleküllere (enzimler ve iyon kanalları gibi) "biyolojik sinyal" şeklinde aktarmalarıdır. Bu olaya sinyal transdüksiyonu adı verilir ve reseptörlerin dönüştürücü (transducer) işlevi yaptıkları söylenebilir. İşlem sırasında aynı zamanda sinyal amplifiye edilir.

Ligandın reseptörle bağlanabilmesi icin reseptöre bir affinite göstermesi gerekir. Hücrede her tipte ancak belirli sayıda reseptör bulunur. Reseptörun bağlanma alanlarının tümü mesaj molekülleri tarafından işgal edildiğinde, reseptörün doygunluğu (saturation) ve dolayısı ile hassasiyetinin azalması (desensitization) söz konusudur.

Reseptör molekülleri lokalizasyonlarına göre ikiye ayrılır;

1- Hücrenin sitoplazma membranının dış yüzünde (katekolaminlerin ve peptid yapılı etkin maddelerin reseptorleri gibi) bulunan, iyon kanallı reseptörler, enzim yapıda reseptörler, G proteinlere kenetli reseptörler olarak üç tiptir.

a. İyon Kanallı Reseptörler;

i. Voltaj bağımlı kanallar,

ii. İntraseluler kalsiyum, siklik adenozin monofosfat (cAMP) ya da siklik guanozin monofosfat (cGMP) konsantrasyonuna bağlı reseptörler.

b. Enzim Yapıda Reseptörler;

i. Tirozin kinaz tipi enzim reseptörleri,

ii. Guanilat siklaz tipi enzim reseptörleri,

c. G Proteinlere Kenetli Reseptörler.

2- Hücre sitoplazmasında ve/veya çekirdeğinde (steroid hormon, tiroid hormonu ve retinoid reseptorleri gibi) yerleşmiş protein veya glikoproteinlerdir.

Membran yerleşimli reseptör molekülleri genellikle tek başlarına bulunmaz, diğer makromoleküllerden oluşan birimlerle kombine şekilde bulunurlar. Ligand ile reseptör etkileşimi iki taraflıdır. Kovalent bağlar oluşmaksızın, fazla enerji gerektirmeyen bir şekilde ligand-reseptör etkileşimi olmaktadır. Bu etkileşim mesaj molekülü ile reseptörün yapısal ve elektrostatik uyumunun olmasını gerektirmektedir. Agonist (aynı yönde etki yapan) bir mesaj molekülü ile antagonist (aksi yönde) bir molekül arasında, reseptör affinitelerine göre bir yarışma (kompetisyon) olabilmektedir (Aslan, 2013).

Reseptör-ligand etkileşimi enerji gerektirmezken hücre içinde meydana gelen, sekonder haberci sentezi, sinyalin amplifikasyonu gibi sinyal transdüksiyonunun tüm basamakları enerji gerektirmektedir.

Reseptörler organizmanın çeşitli kısımları arasındaki iletişim şebekesinin yapı taşları olarak kabul edilir. Bu moleküller ilaçların etkilemesi için değil,

vücutta doğal olarak oluşan hormonlar, nöromediatörler, otakoidler (lokal hormonlar, sitokinler, büyüme faktörleri) gibi bir çok endojen maddelerin hücreleri belirli bir düzene göre etkileyebilmeleri için bulunurlar. Reseptörler belirli bir grup oluşturan selektif kimyasal uyaranlara duyarlı olan, fakat başka uyaranlara yanıt vermeyen kimyasal nitelikli "anten" lerdir.

Reseptör afinitesi; Ligandın reseptöre olan ilgisidir. İlaçların aynı reseptör üzerinde aynı etkiyi oluşturmak için farklı konsantrasyonlarda kullanıldığını açıklar (Aslan, 2013).

HER2, epidermal büyüme faktörü reseptör ailesinin(erbB reseptörleri veya HER reseptörleri) dört üyesinden biridir, $p185^{her2/neu}$ ve Neu olarak da bilinir. Ailedeki diğer reseptörler EGFR (HER1), HER3 (erbB3) ve HER4 (erbB4)'tür (Park ve ark., 2001).

HER2 proteini 17. kromozomun uzun kolunda bulunan ve bir proto-onkogen olan c-erb-B2 geni tarafından sentezlenir. HER2, 185 kDa ağırlığında ve tirozin kinaz aktivitesine sahip bir transmembran glikoproteindir. Epidermal büyüme faktörü reseptör ailesine ait proteinler ligandın bağlanması sonucunda HER2 ile heterodimer yapıda reseptörler oluşturarak işlev görürler. HER2 reseptörleri aktif hale gelince hücre içindeki sinyal ileti yollarını etkinleştirerek hücrenin değişimine ve çoğalmasına neden olurlar (Greene ve ark., 2010).

Son yıllarda, HER2 reseptörünü hedefleyen ve işlevini engellemek için geliştirilen iki molekül mevcuttur. Bunlardan Trastuzumab; HER2 reseptörüne bağlanarak etki eder. Buna karşın, Lapatinib; küçük molekül yapısında olduğundan hücre içine girerek hem EGFR hem de HER2 reseptörüne bağlı tirozinkinaz aktivitesini inhibe eder. Bu molekülün kullanılmaya başlaması ile HER2 pozitif meme kanserinde metastazların tedavisinde ve adjuvan tedavide sağkalımı uzatmak mümkün olmuştur (Çiçin, 2009).

Herceptin® etkin madde olarak, insan yapısında bir monoklonal antikor olan Trastuzumabı içermektedir. Bu, vücudu virüsler ve bakterilerle oluşan enfeksiyonlara karşı koruyan, vücut tarafından doğal olarak üretilen antikorlar ile benzerdir. Trastuzumab, insan epidermal büyüme faktorü 2 (HER2) olarak adlandırılan antijene seçici olarak bağlanır. HER2, bazı kanser hücrelerinin yüzeylerinde büyük miktarlarda bulunarak hücre çoğalmasını tetikler. Herceptin

HER2'ye bağlandığı zaman, bu tür hücrelerin büyümesini durdurur (Park ve ark., 2001; Micol ve ark., 2010).

Lipozomların ve katı lipit nanopartiküllerin aralarında bulunduğu taşıyıcı veziküller, ilacı istenen hedef bölgeye taşırken, aynı zamanda ilacı metabolizasyondan korumakta, hızla vücuttan atılımını engellemekte, sağlıklı dokularda ilaç birikimini önleyerek ilacın toksisite riskini de azaltmaktadır. Bu tez çalışması ile, Trastuzumabın, lipit yapılı taşıyıcı sistemlere enkapsüle ve adsorbe edilerek, hedef bölgeye ilaç taşıyıcı patikülün oluşturulması ve antikoru bağlama çalışmalarındaki ortam koşullarının -organik çözücü ile muamele, ultrasonikasyon, ısıtma ya da dondurma gibi işlemlerinin- antikor üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

1.2 İlaç Hedefleme Stratejileri

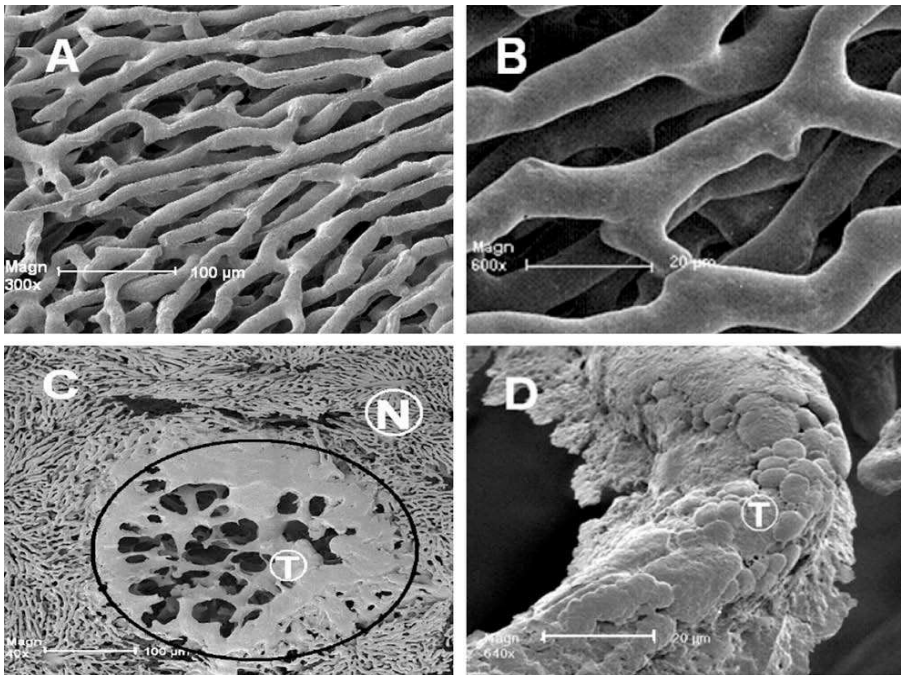
Hedeflendirme aktif ve pasif olarak iki şekilde yapılabilmektedir.

1.2.1 Pasif hedefleme

Tümöre hedeflendirilmiş ilaç iletiminde kötü huylu ve normal dokular arasındaki farkların avantajları kullanılır. Pasif hedeflendirme, katı tümörleri saran kan damarlarının geçirgenliğinin ve etkin maddeyi alıkoyma zamanının yüksek olması özelliği kullanılarak (EPR; Enhanced Permeability and Retention) (Maeda ve ark., 2009) ya da lokalize uygulamalarla sağlanabilir. Katı tümörlerde, tümör tipine göre değişmekle beraber endotelyal bağlantılar arası boşuk 300 nm kadardır. Bu aralık ilaç iletimi için kullanılabilinir. Bu fenomen EPR etkisidir (Şekil 1.1). Birçok koloidal ilaç taşıyıcı sistemleri, etkin maddelerin uzun süre kan sirkülasyonunda kalması ve küçük boyutlu olma özellikleri sayesinde bu etkinin avantajını ortaya çıkarır. İlaç iletim sistemlerinin koloidal yapısı iletimli geçiş ve lemfatik süzme sınırları ile iyi birleşirler (Torchilin, 2006).

Tümörün çevresi tümör büyümesiyle birlikte değişir. Metabolizmasının artmasıyla ve büyümeyle beraber, oksijen yetersiz gelmeye başlar ve tümör dokusunun pH değeri -glikozun metabolik bozulması ve laktat oluşumu ile- düşer. Oksijen yetersizliği (hipoksia) ve glikoz tükenmesi, tümör hücrelerinde çoğalmayı sağlamak amacıyla, göç etmelerine ve tümörün devam etmesi için çok önemli

olan yeni kan damarlarının (anjiyogenez) oluşumuna neden olurlar. Bu yeni damarlar düzensiz yapıda ve normal damar dokusuna göre eğri büğrü ve büyük gözenekli yapıya sahiptir bu nedenlerle geçirgenliği yüksektir (Maeda ve ark., 2009). Kanserli dokudaki damar sisteminindeki büyük gözeneklilik göstermesi ve lemfatik drenaj sızıntısı etkisiyle geçirgenlik ve tutulma etkisinin birleşmesi nanopartiküllerin pek çok katı tümörde tutulmasını kolaylaştırmaktadır (Kullberg ve ark., 2002).



Şekil 1.1. EPR-etkisi SEM (Scanning electron micrograms) görüntüsü (Maeda ve ark., 2009) [Normal dokudaki kılcal kan damarlarının görüntüsü [karaciğer] (A ve B) ve karaciğerdeki tümör nodüllerinin kan damarları (C ve D). A'daki kılcal damar ağı B'de genişletilmiş şekilde görülmektedir. Herhangi bir polimer sızıntısının olmadığı normal karaciğer görüntüsü (N), (T)'de ise tümör nodülündeki polimerin tümör-seçici olarak damardaki akışı görülmektedir (EPR-etkisi). (D) acrylic polimerin tümör damarındaki sızıntısı görülmektedir. Bu (C) ve (D)'de görüldüğü gibi polimerik ilacın seçici olarak iletimine öncülük edecektir]

1.2.2 Aktif hedefleme

Aktif hedeflendirmedeki stratejiler, lipozom yüzeyine hedefe özgü ligandın bağlanması ile (Park, 2002; Torchilin, 2006) ultrasonik dalgalarla (Ren ve ark., 2008; Hu ve ark., 2009) veya magnetik alanlarla (Dandamudi ve ark., 2009) stimüle edilen iletimi sağlayan fiziksel hedeflendirmedir (Lila ve ark., 2009).

Aktif hedeflendirme, ligandlar vasıtasıyla iletim sistemlerinin reseptörlere veya hedef moleküllere yönlendirilmesini içerir. Reseptör-aracılı nanopartikül-hedef hücre bağlanmasını sağlamak için, partikül yüzeyine özgü hedeflendirici ligandlar bağlanmaktadır. Hedeflemede bir ligand gibi kullanılan en popüler moleküller monoklonal antikorlardır (Altıntaş ve ark., 2011). Biyoparçalanabilir nanopartiküller, kanser hücrelerine ilaç taşınmasında olumlu sonuçlar vermiş sistemlerdir (Vasir ve ark., 2005). Diğer açıdan da aktif hedeflendirme ümit veren bir stratejidir.

Dolaşımda uzun kalacak partiküllerin intravenöz iletim sürecinde makrofajlar tarafından temizlenmemeleri için 100 nm ve daha küçük çaplarda ve hidrofilik bir yüzeye sahip olmaları istenir (Brannon-Peppas ve ark., 2004). Tseng ve arkadaşlarının (2007) yaptıkları çalışmadaki sistemde, biotinlenmiş epitelyal büyüme hormonu (EGF) molekülleri NeutrAvidin ile bağlandıktan sonra çekirdek yapı oluşarak (JP-Av-bEGF) jelatin partiküllere konjuge edilmiştir ve sonuçta boyutları dolaşımda uzun kalan lipozomlarla karşılaştırılabilir derecede bulunmuştur. Pek çok insan tümöründe etkin por çapının 200-600 nm aralığında olduğu kanıtlanmıştır (Tseng ve ark., 2007; Jain, 2001). Bu nanopartiküller akciğer adenokarsinomasını teşhis etmek için EGF reseptörü arayıcısı gibi uygulanabilmektedir (Tseng ve ark., 2007).

Feijen ve arkadaşlarının (2011) yaptıkları bir çalışmada, methoxy poly(-ethylene glycol) (mPEG) ve Gly-Phe-Leu-Gly-Phe (GFLGF) peptit zincirini içeren poly(D,L-lactide) (PDLLA)'dan oluşan biyolojik olarak yıkılabilen ve biyolojik olarak uyumlu bir blok kopolimer temelli polimersomlar (Ps) geliştirilmiştir. Lisosomal enzim cathepsin B (Cath B) ile peptit bağları koparılabilir. Ps zar kalınlığı geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile ölçülerek 15 nm bulunmuştur. Acridine orange (AO) bir model ilaç olarak Ps (pep) içine enkapsüle edilmiştir ve pH 5.5'te Ps'lerin Cath B tarafından yıkımı tetiklenerek AO'nun hızlıca uzaklaştığı gözlenmiştir. Hücresel alımı arttırabilmek amacı ile anti-epidermal büyüme faktörü reseptörü (anti-EGFR) antikoru (abEGFR) Ps(pep)'lerin yüzeyine bağlanmıştır. SKBR3 hücrelerini 3 gün maruz bıraktıktan sonra, abEGFR-bağlı Ps (pep) [abEGFR-Ps (pep)] doğrudan hücre membranına

bağlanmıştır ve abEGFR içermeyen Ps (pep) ile kıyaslandığında çok daha hızlı endositoz edildikleri gözlenmiştir.

Polietilenglikol (PEG)-kaplı lipozomlar retikülo-endotelyal sistem (RES) tarafından yüksek oranda tanınmazlar ve geleneksel lipozomlara göre kan dolaşımında daha uzun süre kaldığı belirtilmiştir (Ishida ve ark., 2001). Bu yaklaşımla, bFGFp-lipozomlarının (peptit-bağlı basit fibroblast büyüme faktörü lipozomlar) tasarlanmasında bFGFp'yi lipozomal PEG uçlarına konjuge etmek üzerine çalışılmıştır. Bu şekilde non-spesifik bağlanmayı azaltmak için etkili bir hedefleme yaklaşımı olarak düşünülmüştür (Hashida ve ark., 2007). Buna rağmen, Savva ve arkadaşları yaptıkları çalışma ile PEG terminallerinde genetiksel olarak modifiye edilmiş rekombinant tümör nekroz faktör-ά taşıyan PEG-kaplı lipozomların, hızlı plazma eleminasyonu gösterdiğini ve karaciğer ve dalakta yüksek oranda toplandığını saptamışlardır (Savva ve ark., 1999). bFGPp pek çok basit amino kalıntısı taşıdığından, bFGFp-lipozomları, lipozomal PEG terminalleri tarafından kapladığında bile lipozomal yüzeyde pozitif yük taşır. Pozitif yük, RES tarafından hızlı alıma ve intravenöz uygulamadan sonra eritrositler gibi beklenmeyen hücreler tarafından spesifik-olmayan bağlanmalara sebep olmaktadır (Terada ve ark., 2006).

Terada ve arkadaşlarının çalışmasında, bu problemi yenmek için mPEG-DSPE [1,2-distearoyl-sn-glycero-3- phosphoethanolamine-n-[methoxy (polyethyl-eneglycol)] içeren bFGFp-lipozomları hazırlanmıştır. Bu mPEG'in, RES ve diğer hedeflenmeyen hücrelerle etkileşimi kısıtlamasını beklenmiştir. Bu yüzden RES model hücreleri kullanarak makrofajların alımındaki inhibitör etkileri ve eritrositlerle *in vitro* etkileşimi değerlendirilmiştir (Terada ve ark., 2006).

Partiküler sistemler, ligandlar aracılığı ile reseptörlere veya hedef moleküllere yönlendirilmeye çalışılmıştır. Özellikle günümüzde, lipozomların aktif hedeflendirilmesi denildiğinde; hedef hücrenin yüzeyindeki reseptörlere spesifik bağlanmayı sağlamak için lipozom yüzeyine hedefe özgü ligandın konjuge edilmesi/bağlanması ifade edilmektedir. Monoklonal antikorlar, makromoleküler ilaç taşıyıcıları hedeflemede kullanılmaktadır (Altıntaş ve ark., 2011). Bunun dışında peptid-protein, sakkarit, folat ve bazı vitaminler de hedeflendirici molekül olarak kullanılmıştır (Sapra ve Allen, 2003).

Her antikor kendine özel bir reseptöre bağlanır, örneğin; insan IgG_1 monoklonal antikoru (mAb) insan EGF reseptörüne (epidermal growth factor receptor) özeldir (Yang ve ark., 2001). Özellikle, tümor teşhis ve tedavisinde mAb'lar yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Sapra ve Allen, 2003).

Monoklonal antikorların terapötik amaçlar için konjugasyonu yoğun bir araştırma ve geliştirme konusudur (Pietersz, 1998; Morrow, 2003). Bu araştırmalar sadece ilacın iletim yolunu değiştirmekle kalmamakta, zararlı yan etkilere yol açmadan etkinliği yakalamak için gerekli dozu önemli ölçüde azaltmaktadır. Monoklonal antikorlar ilaç veya izotop taşınması için kullanılabilir, fakat monoklonal antikorların biyolojik aktiviteleri yapıdaki küçük değişikliklere duyarlı olduğundan, anikorların saflaştırma ve karakterize edilmeleri oldukça zordur. Monoklonal antikorları çapraz bağlarken en sık kullanılan yöntem özel reaktifler kullanılmasıdır (Sesay, 2003).

1.3 Bağışıklık Sistemi (İmmün Sistem)

İmmünite sözcüğü Latince "immunis=vergiden muaf" sözcüğünden türetilmiş konağın hastalıklara karşı muafiyetini, yani direncini belirtmek için kullanılmıştır (http-1). Çok genel kapsamda bağışıklık (immünite); hastalıktan korunma, özellikle de infeksiyöz hastalıklardan korunma anlamına gelir. Bunun için vücudun yabancı etkenlere karşı gösterdiği tepkilerin tümüne kollektif olarak immun yanıt (bağışıklık yanıtı) denir. Mikroorganizma ve ürünleri, konak ile ilişki kurdukları zaman, canlılarda doğal olarak bulunan engellerle veya ilişki kuran antijenler tarafından konağın immun sisteminin aktivasyonu ile oluşan, aktarılabilen nitelikteki savunmasıyla karşılaşmaktadır. İmmün sistem dışarıdan gelen bakteri, virüs ve yabancı proteinlere karşı vücudu korur. İki tip bağışıklık vardır: doğal-doğuştan (innate) var olan ve adaptif (geliştirilebilir) bağışıklık (Tiselius ve Kabat, 1939; Shanker, 2010).

Kanser tedavisindeki kemoterapi ve radyasyon terapisi gibi geleneksel yöntemler sınırlı fayda sağlar. Bunun nedeninin bir kısmı kanserin yanlış anlaşılıyor olmasıyla alakalıdır: kanser bir sebep değildir fakat yaşayan sistemin zayıflığının sonucudur. Toksinlerin, mutajenlerin veya radyasyonun neden olduğu

hücresel stres, saldırı altındaki bu hücrelerin destek veya savunma yetersizliği, zayıflamış sistemik yanıt ile birleşince, hücrelerin eskiden kökeninde olduğu gibi, tek hücreli yaşam tarzı haline geri dönmelerine neden olur, dolayısıyla tüm organizmayı kapsayan kesilmiş hücresel bağlantılar, bu hücrelerin bireysel olarak yaşıyorlarmış gibi tedaviden kendilerini korumalarına yol açar (Sousa Antonio ve Schulze-Makuch, 2009).

Sousa Anto´nio ve Schulze-Makuch'un 2009'da yaptıkları çalışmada, organizmayı, özellikle de immün sistemi güçlendirmenin, kanser tedavisinde kanser hücrelerini yok etme girişiminden daha fazla umut vaat eden bir yaklaşım olduğu hipotezini öne sürmüşlerdir. Bu immün sistemi güçlendirme hipotezini deneylerle hem geleneksel anlamda (immün sistem aktivitesini arttırmak için meyveler, sebzeler ve ceviz gibi bilinen doğal besinlerle beslenmek) kanser hücrelerinin saldığı immün sistem inhibitörlerini (örn., TGF-β) azaltarak test etmişlerdir, hem de ısı ile öldürülmüş veya genetik olarak değiştirilmiş patojen bakterilerin enjeksiyonu ile etkilenen bölgede immün sistemin büyük bir cevap oluşturmasını (fever response) tetiklemişlerdir ve bu sonuçları geleneksel olarak kullanılan yöntemlerle kıyaslamışlardır (Sousa Anto´nio ve Makuch, 2009). Kanserin ileri safhasında hastalığın iyileşmesi için immün sistemin çalıştığı bilinmektedir, fakat kanserin başlangıç aşaması için bu geçerli değildir. Buna göre, ileri aşamadaki kanseri immün sistem tedavi edebilir. Çalışmalarında, tümörün çevresindeki hücrelere patojen enjeksiyonu yaparak immün sistemi aktifleştirmeyi önermişlerdir. Bu hücreler ısı ile öldürülmüş veya genetik olarak değiştirilmiş hücrelerdir sonuçta immün sistemi tetiklemenin mümkün olacağı sonucuna varmışlardır (Sousa Antonio ve Schulze-Makuch, 2009).

1.3.1 Doğal (innate) bağışıklık sistemi

Organizma bir patojene maruz kaldığında öncelikle geliştirilen immün sistem kısmını oluşturabilen üç hücre grubunun görev aldığı sistem doğal bağışıklık sistemidir. Bunlar; *Fagositik hücreler* (makrofajlar, mast hücreleri), direkt bakteri hücre membranı parçalayarak ya da bakteri hücre membranını kaplayarak fagositik ve diğer immün sistem hücrelerin bunlara atak yapmasına

aracılık eden *T-helper hücreler* ile özel tip lenfosit hücreleri olan, viral enfeksiyon ve bazı tümör hücrelerin yok edilmesinden sorumlu *Natural Killer* (NK, katil hücreler) hücreleridir. Olası ileri enfeksiyonlarla genellikle başedemez ve yerini daha karmaşık ve üstün olan adaptif bağışıklık sistemine terk eder (Sousa Anto´nio ve Schulze-Makuch, 2009).

1.3.2 Geliştirilebilir (adaptif) bağışıklık sistemi

Daha özel ve etkili immün yanıt oluşturmak üzere geliştirilen bağışıklıktır. Doğal bağışıklık sisteminin geliştirilmiş şekli olup sadece omurgalılarda mevcuttur. B ve T lenfositleri en önemli hücreleridir (Shanker, 2010). Hücresel ve humoral bağışıklık olarak iki şekilde gelişir.

1.3.2.1 Hücresel bağışıklık

T lenfosit hücrelerinin bakterileri önce duyarlılıkla tespit etmeleri ve sonrasında fagosite etmeleriyle yok edilmesine dayalı hücresel bağışıklık, adaptif bağışıklık sisteminin bir çeşitidir (Anonim, 2013).

1.3.2.2 Humoral bağışıklık

B lenfosit hücrelerinin sentezledikleri antikorlar aracılığı ile patojenleri, bakterileri yok eden humoral bağışıklık (salgısal bağışıklık), geliştirilebilir bağışıklık sisteminin bir diğer çeşitidir (Shanker, 2010).

Humoral Bağışıklıkta, antijen sunan hücreler (APC) yani fagositik makrofajlar ve dentritik hücreler, yardımcı T hücreleri, B lenfosit hücreleri, plazma hücreleri, sınıf II büyük doku uygunluk kompleksi [major histokompability compleks (MHC)] gibi hücre grupları ve sitokinler, immünoglobünler gibi moleküller görev almaktadır. Antijen vücuda girdiğinde, antijen sunan hücreler (APC) tarafından tanınır ve taşıdıkları MHC sınıf II antijenler aracılığı ile yardımcı T hücreler ile konjuge olmasını sağlar. Buna bağlı olarak yardımcı T lenfositler aktive olurlar ve bu hücrelerden sitokinler salınmaya başlar. Sitokinler ile B lenfosit hücrelerinin uyarılması sonucu B lenfositler antijen spesifik plazma hücrelerine dönüşürler ve matür hücrelerden immunoglobünlerin (Ig) salınması gerçekleşir. Böylece antijenler, üretilen bu

Ig'ler yani antikorlar tarafından sarılarak inaktive edilip parçalanarak yok edilir (Peelen ve ark., 2011; Anonim, 2013).

Kazanılmış immün yanıtta, antikorlar en geniş çeşitlilikte antijenik yapıyı tanıyabilen, farklı antijenik yapıları ayırt edebilen ve antijenlere güçlü bağlanabilen tek moleküldür. Antikorlar, salgısal immün yanıtın en etkili kolunu oluşturur. İmmün sistem çok sayıda farklı özgüllükte antikor üretebilir. İnsanda immün sistem 10^8'den fazla antijene özgül çeşitlilikte antikor üretebilir. Bu antikorlar yapı olarak birbirlerine yakın yapısal özellik gösterirler (Mazza ve Malissen, 2007).

1.4 Monoklonal Antikor Teknolojisinin Evrimi

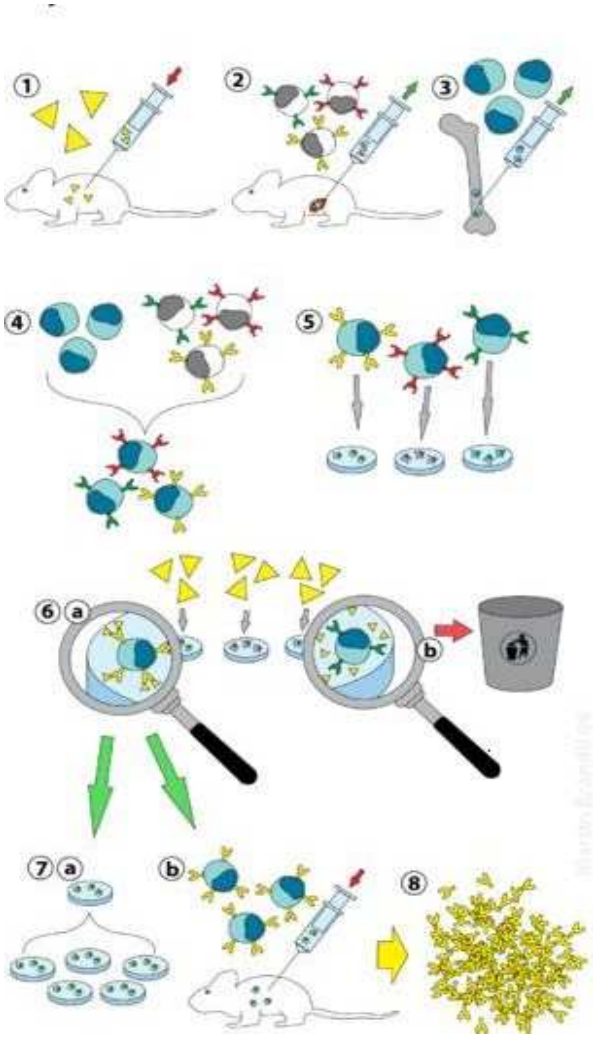
1975 yılında Cambridge Üniversitesi'nden G. Köhler ve C. Milstein'ın geliştirdikleri bir teknik, bir tek epitopa özgü (monoklonal) antikorların bol miktarlarda elde edilebilmelerine olanak sağlamıştır. Bu tekniğe Hibridoma Teknolojisi adı verilmiştir. Bu buluşlarıyla 1984 yılında Fizyoloji-Tıp Nobel Ödülüne layık görülmüşlerdir (Sambrook, 2001).

Hibridoma teknolojisinin geliştirilmesiyle, insan tedavisi için monoklonal antikorların (mAbs) gücü ve değeri anlaşmıştır, fakat fareden elde edilen monoklonal antikorların ilk üretiminde, insanlarda immunojenik etki göstermiştir. Bu durum, HAMA cevabı (insanda anti-fare antikorlarının oluşumu) oluşumuna neden olmuştur ve böylece sınırlı fayda sağlanmış ve uzun zaman alan uygulamalar tekrar edilmiştir (Sapra ve Allen, 2003).

Hibridoma teknolojisinin temelinde 3 bilgi bulunur:

- B-lenfositler tek bir epitopa özgü antikor üretip salgılayan, yaşam süreleri birkaç günle sınırlı kan hücreleridir.
- Tümör hücreleri bölünerek çoğalma kontrolünü kaybetmiş, hızla üreyen ölümsüz hücrelerdir.
- Belli koşullarda aynı organizmaya ait değişik hücreler birleştirilerek her iki hücrenin özelliklerini taşıyabilen melez hücreler (hibridoma) elde edilebilir (Cırakoğlu, 2002).

Monoklonal antikor elde etmek için kullanılan hibridoma tekniği, yararlı özelliklere sahip iki hücrenin birleştirilmesi ile gerçekleşir. Hücre kültüründe hızla çoğalabilen, ölümsüzlük özelliği kazanmış myeloma (kanser) hücreleri ile aktif olarak istediğimiz antikoru üreten bağışık bir hayvanın dalak lenfositleri birleştirilir. Sonuçta, kompleks bir antijenin tek bir belirleyici grubuna (epitop) karşı monoklonal antikor üreten ölümsüz hibrit hücreler elde edilir (Lodish ve ark., 2003).



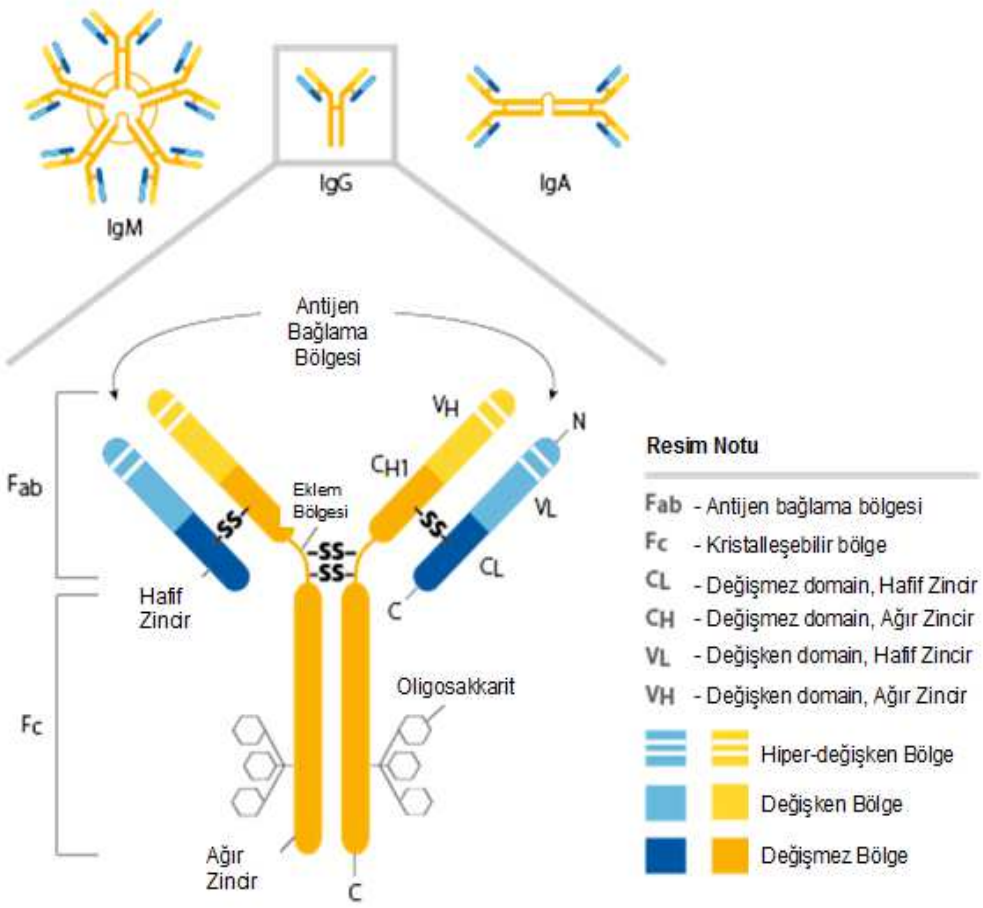
Şekil 1.2. Hibridoma teknolojisi ile monoklonal antikor üretimi (http-2) [1) Fare antijen ile immünize edilir, 2) Dalaktan B lenfositleri izole edilir, 3) insan kemik iliği kanser hücreleri toplanır, 4) hibridoma tekniği ile hücreler birleştirilir 5) hibridomalar kültür plaklarında bölünmeye bırakılır 6a) antikor sentezleyen klonlar belirlenir, 6b) hedeflenen antikoru sentezlemeyen klonlar atılır, 7a) hedeflenenen antikoru sentezleyen hücreler kültür plaklarında *in vitro* olarak çoğaltılır, 7b) hedeflenenen antikoru sentezleyen hücreler farelerde *in vivo* olarak çoğaltılır, 8) *in vitro* veya *in vivo* ortamdan antikorlar saflaştırılır]

Hibridoma teknolojisi ile antikor üretimi şu şekilde yapılır (Şekil 1.2); antijene karşı antikor üretimini ortaya çıkarmak için, fare ilgili antijen ile immünize edilir ve dalağından antikor üreten B lenfosit hücreleri izole edilir. İnsan kemik iliği kanser hücresi olan myeloma hücreleri toplanır. Hibridoma oluşturmak için PEG aracılığı ile insan ve fare hücreleri birleştirilir. Birleşmeyen hücreler ölür. Hibridomalar kültür plaklarında bölünmek üzere bırakılırlar. Antikor sentezleyen klonlar ELISA yöntemi ile belirlenir. Hibridomalar *in vitro* (hücre kültürü) veya *in vivo* (farede acid fluid oluşumu) koşullarda geniş ölçekte üretilir. Fareden veya kültür üst sıvılarından antikorlar saflaştırılır (Çırakoğlu, 2002; Lodish, 2003).

Ancak bu özel hibridomalar, insan bağışıklık sistemi tarafından "yabancı" (antijen) olarak algılanan fare kökenli antikorların oluşumuna neden olurlar. Fare antikoru aşılanan hastalarda genellikle, eklem bölgelerinde şişlik ve kızarıklıklarla kendini gösteren HAMA cevabı (insanda anti-fare antikorlarının oluşumu) görülür. Böbrek yetmezliğine de neden olan HAMA, yaşamsal tehlike oluşturmasının yanısıra, verilen antikorların vücut tarafından yok edilmesine de yol açmaktadır. Bu nedenle, hem HAMA cevabının oluşmasını hem de fare antikorlarının bağışıklık sistemi tarafından vakitsiz bir şekilde etkisizleştirilmesini önlemek amacıyla, fare antikorlarının "insanlaştırılması" için çeşitli teknikler geliştirilmiştir (Lazar ve ark., 2010). Fare monoklonal antikorlarının insanlaştırılması ve tamamen insansı olan monoklonal antikorların geliştirilmesi, immün cevap oluşturmamaları nedeniyle önemlidir. Bu nedenle ticari firmaların neredeyse tamamınca üretilen antikorların insanlaştırılması ya da tamamen insansı hale getirilmesi üzerinde yoğunlaşılmaktadır (Çırakoğlu, 2002; Sapra ve Allen, 2003).

1.5 Antikorların (İmmünoglobulinlerin) Yapısı

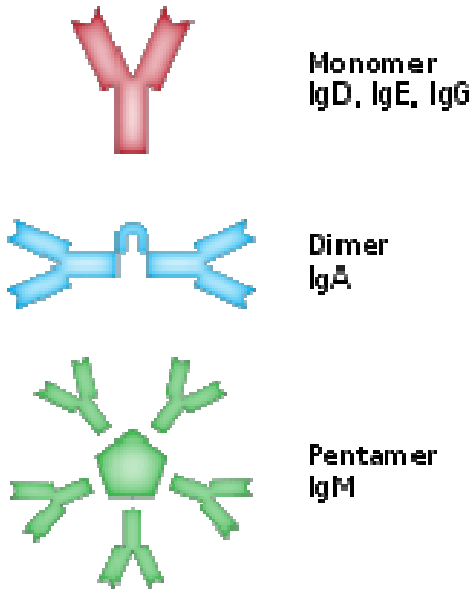
Antikorlar, antijenlere veya immünojenlere karşı oluşturulan ve epitoplar ile özgül olarak reaksiyona girebilen moleküllerdir. Kovalent olmayan, elektrostatik, hidrojen bağları, van der Waals kuvvetleri ve hidrofobik kuvvetler bağlanmada görev alır. Bağlanma gücü affinite olarak tanımlanmaktadır (Braden ve Poljak, 1997).



Şekil 1.3. Immünoglobulin yapısı (http-3)

Bütün immunoglobulinler (Şekil 1.3) izotipine bakılmaksızın dört polipeptit zincirinden meydana gelirler. Antikorlar, iki ağır (50 kDa) ve iki hafif zincirden (25 kDa) ibarettirler. Antikorlar heterodimerik, 150 kDa molekül ağırlıklı glikoprotein yapılı bileşiklerdir. Antikorun yapısını oluşturan hafif ve ağır zincirler disülfit bağlarla birarada tutulur. Disülfit bağlar, eklem bölgesi (hinge region, dayanak noktası) denilen bölegeden ağır zincirleri birbirine bağlar. Her iki zincirde birbirlerinden ayırtedilebilen variable (V-değişken), constant (C-sabit) olmak üzere iki farklı bölge bulunur. Ağır zincirin değişmez bölge ucuna Fc bölümü denir. Antikorun plesental taşıma veya antijen-bağımlı hücresel toksisite gibi etkili görevleri ağır zincirin değişmez bölgesi tarafından belirlenir. Antijen özgüllüğü her iki zincirin N-ucu domaininde bulunan değişken bölge tarafından sağlanır ve bu bölge CDR (complementarity determining region; komplementer belirleyici bölge) olarak tanımlanır. Ağır (H) ve hafif (L) zincirin değişken parçaları Fv kısmıdır ve antikorun en küçük antijen bağlama domainidir.

Antikorlar, hafif zincirlerin değişmez bölgelerindeki amino asit dizilimlerine göre kappa ve lamda (κ ve λ) olarak iki ana sınıfa ayrılmıştır. Bu zincirlerin oranı türler arasında değişir. Doğal olarak üretilen antikorlarda, hafif zincirler her zaman aynıdır, yani κ ve λ'nın her ikisi de aynıdır (Male ve ark., 2006) .



Şekil 1.4. Immünoglobulin izotipleri (http-4)

Antikorların IgG, IgA, IgD, IgM ve IgE olmak üzere memelilerde 5 izotipi bulunur (Şekil 1.4). Sadece IgM immatur B lenfositlerce sentezlenebilir. Diğerleri matür hücrelerce sentezlenirler. Tipik bir insan B hücresi, yüzeyine bağlı $5x10^4$-$1x10^5$ antikor içerir. Antikorlar iki fiziksel yapıda bulunur, hücrelerden salınan çözünebilir şekli ve B hücrelerinin yüzeyine bağlı olan membran-bağlı şekli ve bunlar B hücre reseptörleri (BCR) biçiminde anılır (http-4).

Antikorlar FAb (antijen bağlayıcı bölge) ile antijenlere bağlanır, Y şeklindeki molekülün boyun kısmında bulunan Fc almaç bölgesiyse immün sistemin hücreleriyle etkileşir ve bu şekilde antijenlerin yok edilmesini sağlarlar (Chames ve ark., 2009; Lee ve ark., 2011). Poliklonal ve monoklonal olarak iki çeşit antikor vardır.

1.5.1 Poliklonal (çok kolonili) antikorlar

Bir antijen (bakteri, virüs, hücre veya molekül) “epitop” adı verilen birçok antijenik bölge içerir. Her epitop ayrı bir antikor tipi tarafından tanınır. Bir antijen organizmaya girdiğinde her epitop için bir grup B-lenfosit hücresi özgül antikor üretmeye ve bölünerek çoğalmaya başlarlar. Böylece her epitop için özgül antikor üreten bir B-lenfosit kolonisi oluşur. Bir antijene karşı değişik B-lenfosit kolonileri oluştuğu için elde edilen antikora poliklonal (çok kolonili) antikor adı verilir (Çırakoğlu, 2002).

1.5.2 Monoklonal (tek kolonili) antikorlar

Tek bir antikor oluşturan B-lenfositten türevlenirler (Reichert ve ark., 2005). Monoklonal antikorlar tedavi, tanı ve araştırma amaçlı kullanılırlar. En yaygın kullanılan ligand olan antikorlar, vücut tarafından antijene karşı kolayca üretilirler ve genellikle belli bir antijene karşı yüksek özgünlük ve bağlanma kapasitesi gösterirler. Uygun antikor seçilirken göz önünde bulundurulması gereken en önemli parametre, bu antikorların immun sistemi uyarıcı özelliğinin (immunogenicity) olup olmamasıdır (Harding ve ark., 1997; Zhang ve ark., 1999).

G. Köhler ve C. Milstein’ın (1975) geliştirdikleri teknik ile, tek bir epitopa özgü (monoklonal) antikorların bol miktarlarda elde edilebilmelerine olanak sağlamıştır. Bu tekniğe hibridoma teknolojisi adı verilmiştir (Çırakoğlu, 2002).

Antikorların önemli iki özelliği, onları hastalıklarla savaşmada çok etkin kılar; ilki, her bir antikorun sadece tek bir antijene bağlanma özgüllüğü göstermesi, ikincisi, bazı antijenlerin bağışıklık sistemini bir kez uyarmaları sonrasında o hastalık için ömür boyu dayanıklılık sağlamasıdır (Örneğin; kızamık ve suçiçeği gibi çocuk hastalıklarına karşı vücudun ürettiği antikorlar, hayat boyu bu hastalıklara karşı vücutta direnç oluşmasını sağlar) (Çırakoğlu, 2002).

Monoklonal antikorların kullanım alanları;

1. Hastalıkların teşhisinde,

2.Hastalıkların tedavisinde,

3. Hastalıklardan korunmada (pasif bağışıklık),

4. Antijenlerin saflaştırılmasında,

5. Tanı kitlerinin hazırlanmasında,

6. Araştırma ve teşhis çalışmalarında,

7. Tümörle ilgili çalışmalarda,

8. Aşı suşlarının hazırlanmasında (http-5).

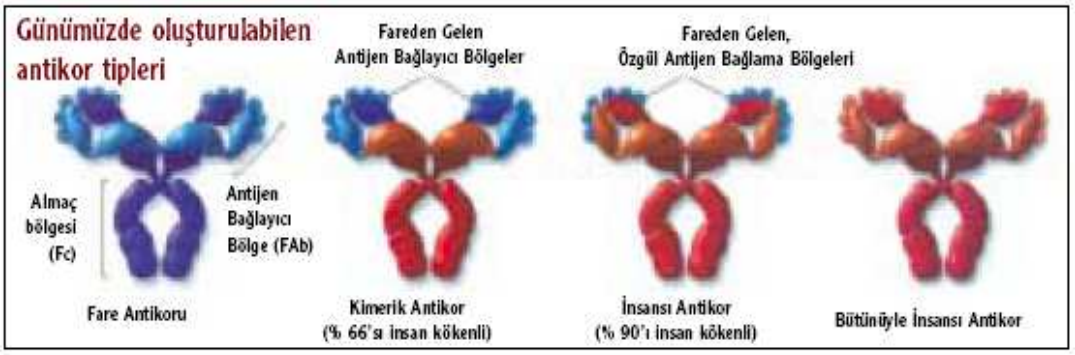
Monoklonal antikorlar, kanser immün tedavisi için çok amaçlı alt yapılardır ve kanser için önemli terapötik ajanlardır. Son yıllarda, antikorların etki mekanizmaları klinikle ilişkili olduğu açıkça görülmektedir. Birçok klinik olarak kullanılan antikorlar, tümör-ilişkili sinyalleşmeyi idare edebilmektedir. Ek olarak, antikorlar immun sistemin doğrudan aktive ettiği veya inhibe ettiği moleküller sayesinde çeşitli immünayarlama (immunomodulatory) özellikleri gösterir. Antikorlar, tümör karşıtı immün cevabı başlatmayı teşvik edebilir. Bu immünayarlama özellikleri yeni kanser tedavi stratejileri için temel oluşturabilir (Weiner ve ark., 2010).

Otoimmün, kardiyovasküler ve infektöz hastalıkları, kanser ve inflamasyonu içeren bazı hastalıkların tedavisinde ilginç sonuçlara rağmen, klinik denemelerde ve araştırmalarda kullanılır bilgi çoktur. Terapötik antikorların yetersiz farmakokinetikleri ve doku girişi gibi bazı işlevsel sınırlamaları ortaya çıkar ve bu noktada daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulur (Chames ve ark., 2009).

1.6 Günümüzde Oluşturulabilen Antikorlar

Fare (murine, mouse) antikorlarının (% 100 fare proteini) immunojenisitesini azaltmak ve HAMA problemlerinin üstesinden gelmek için kimerik monoklonal antikorlar (mAb) üretilmiştir. Bunların değişken bölümleri (Fv) fare kaynağından, değişmez bölümleri insan IgG domainlerinden alınıp genetik olarak birleştirilmesiyle oluşturulan antikorlardır (% 34 fare proteini). İnsanlaştırılmış monoklonal antikorlar (Humanized mAb), sadece antijen-bağlayıcı bölgesi (CDR, ‘complementarity-determining regions’) fareden, geri

kalan değişken ve sabit bölgeleri insan kaynağından oluşturulan antikorlar (% 5-10 fare proteini) genetik mühendisliği tarafından hazırlanmıştır (Reichert ve ark., 2005).



Şekil 1.5. Günümüzde oluşturulabilen antikor tipleri (Çırakoğlu, 2002)

Sonuçta kimerik antikor % 34 fare proteini içerir. Hümanize monoklonal antikorlar insan IgG iskeleti içine fare antikorunun komplementer-belirleme bölgelerinin (CDR) bölgelerinin eklenmesiyle düzenlenmiştir. Humanize antikor yaklaşık olarak % 5-10 fare proteini dizileri içermektedir. Kimerik ve hümanize rekombinant antikorların terapötik yararı geliştirilmesine rağmen hala immunojenik olabilmektedir. Bundan dolayı, monoklonal antikor teknolojisinin değerini tamamen kavramak gerekir, esas amaç kolayca üretilebilen, tamamen insan antikorları üretip, basit ve güçlü bir sistem ortaya çıkarmaktır. Human mAb, fare transgenik suşların-XenoMouse suşlarının, aktif fare immunoglobulin genlerini susturup, fareler içinde insan immunoglobulin genlerinin üretimiyle ortaya çıkarılmıştır. XenoMouse insan antikoru, fare proteini içermez (Yang ve ark., 2001) ve dolayısıyla insanda immün yanıt oluşturmaz. XenoMouse tekniği ile, tamamıyla insan kaynağından gelen antikorlar (Human mAb) üretilmiştir (Şekil 1.5) (Yang ve ark., 2001; Reichert ve ark., 2005; Lazar ve ark., 2010).

1.7 Antikorların İlaç Taşıyıcı Sistemler ile Kullanımı

Monoklonal antikorlar koloidal ilaç iletim sistemlerinin yüzeyine bağlanabilirler (Chames ve ark., 2009; Lee ve ark., 2011). İlaç hedefleme ligandları olarak kullanılan antikorlar ya içselleştirilir (internalizing) ya da içselleştirilemez (non-internalizing). Genellikle içselleştirilen tip ilaç yüklenmiş

taşıyıcı sistemin alımını kolaylaştırdığından ve intraselüler ilaç yoğunluğunu arttırdığından dolayı tercih edilir. Bununla beraber, içselleştirilemeyen (non-internalizing) antikorlar tümör hücrelerindeki difüzyon veya aktif transport gibi bilinen yollar aracılığı ile hücreler tarafından alınabilir ya da hücre dışı alanda (extracellular space) ilacı serbest bırakabilir. (Marcucci ve Lefoulon, 2004; Altıntaş ve ark., 2011).

Lipozomun yüzeyine bağlanan hedeflendirici ligandın, hedef reseptöre ilgisi de önemlidir**.** Hedef reseptöre bağlanma, lipozomun hedef hücre yüzeyinde kalmasını sağlamak için yeterince güçlü olmalıdır. Bununla birlikte, lipozom ile hedef hücre arasında çok güçlü bağlanmadan da kaçınılmalıdır, bu durum belli bir doku ve/veya hücreye hedeflendirilmiş lipozomun dağılımını engelleyebilir veya zorlaştırabilir (Allen ve ark., 1995; Silindir, 2009).

1.7.1 Reseptör seçiminde dikkat edilmesi gereken noktalar

Seçilen hedef reseptör hücre yüzeyinde yeterli miktarda bulunmalıdır, hedef reseptör özellik ve sayı olarak normal hücrelerden farklı olmalıdır (nadir de görülse, reseptörün sadece pataloji durumunda ortaya çıkması tercih edilen olmalıdır), bununla birlikte hedef reseptörün hastalıkla ilişkili olarak aşırı ekspresyonu görülebilir. Örneğin; enflamasyon dokularında adhezyon moleküllerinin, tümör dokularında büyüme faktörünün aşırı ekspre olduğu bilinmektedir ve son olarak da hedef reseptör ligand-bağlı lipozomun kolayca ulaşıp bağlanabilmesine uygun olmalıdır (Siwak ve ark., 2002).

1.7.2 Antikor taşıyıcı sisteme bağlanırken dikkat edilmesi gerekenler

Taşıyıcı sistemlere bağlanacak olan uygun antikor seçilirken göz önünde bulundurulması gereken en önemli parametre, bu antikorların immun sistemi uyarıcı özelliğinin olmamasıdır. İmmünojen özellikteki antikorların (fare antikorunun insana uygulanması gibi) kullanılması, kan dolaşımında uzun süre kalabilecek özellikteki taşıyıcı sistemlerin dolaşımdan hızla uzaklaştırılmalarına neden olabilir. Antikorun bütün olarak kulanıldığı durumlarda bu sorunun görülmesi daha olasıdır. Problemin üstesinden gelebilmek için antikorun tanıma

bölgelerini içeren kısımları (Fab′ ve scFv molekületeri) kullanılabilir. Bu sorunların yanı sıra, serbest haldeyken düşük immunolojik özellik gösteren antikor, lipozom yüzeyine bağlandığında kuvvetli immunolojik özellik gösterebilir. Çünkü birçok durumda, antikorun lipozom yüzeyine kovalan bağlanabilmesi için kimyasal bir modifikasyon işlemi gerekir ve bu da antikorun immunolojik özelliğinin artmasına neden olabilir (Harding ve ark., 1997; Zhang ve ark., 1999).

Antikor lipozoma bağlanırlen; antikorun özgünlüğü ve afinitesi değişmemelidir, yeterli miktarda transport molekül lipozom yüzeyine bağlanabilmelidir, lipozom bütünlüğü bozulmamalıdır ve bağlanma basit-yüksek verimli olmalıdır. Hedeflenmeyi sağlayan ligandın lipozom yüzeyine bağlanmasında değişik yöntemler mevcuttur. En çok kullanılanı ligandın PEG'in ucuna bağlanmasıdır (Silindir, 2009).

PEG'in lipozomun yüzeyini kaplaması dolaşımda kalım süresi için de önemlidir. Opsonin olarak adlandırılan plazma proteinleri, vücuda giren lipozomları yabancı madde olarak algılar ve lipozomun membranına bağlanırlar, bu bağlanma lipozomun RES (retikülo endotelyal sistem) hücreleri tarafından tutulup dolaşımdan uzaklaştırılması işlemini aktive eder (Bakker-Woudenberg ve ark., 1993; Kullberg ve ark., 2002). Bu süreç, immun sistemin lipozomlar dahil tüm yabancı materyal olarak algıladığı maddeleri, nonspesifik atılım (fagositoz) mekanizması ile uzaklaştırmasıdır. Lipozomların dolaşımda uzun süre kalmaları için yüzeyine PEG gibi hidrofilik bir polimer kaplanması ve belli bir partikül boyutuna sahip olmaları gerekmektedir (Terada ve ark., 2006; Steinhauser ve ark., 2006; Lila ve ark., 2009) (Bölüm 1.9).

1.8 İlaç Taşıyıcı Partiküler Sistemler

Bütün ilaç taşıyıcı sistemleri hazırlarken iki temel amaç söz konusudur. Sistem etkin maddeyi vücutta istenen organ veya dokuya taşıyarak, en kısa sürede istenen kan konsantrasyonunu sağlamalı ve bu konsantrasyonu öngörülen sürede devam ettirmelidir. İstenen doku veya organlara etkin maddeyi taşıyan sistemlere *hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı sistemler* denir. Etkin maddenin salım hızını kontrol eden sistemlere ise *ilaç taşıyıcı sistemler* denir (Gürsoy, 2002). Lipozomlar, niozomlar, sfingozomlar, miseller, mikrokapsüller, mikroküreler, nanopartiküller,

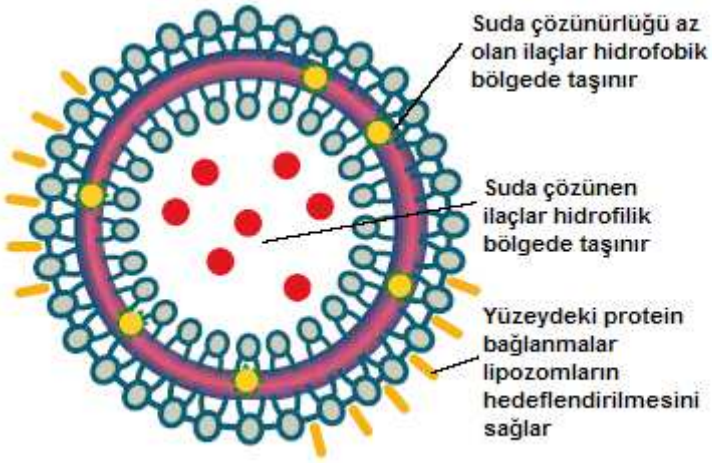
katı-lipit nanopartiküller, mikrosüngerler gibi ilaç taşıyıcı yeni sistemlerle ilgili günümüzde pek çok çalışma yapılmaktadır. İlaçların güvenlik ve etkinliğini, hasta uyuncunu, terapötik indeksini ve biyoyararlanımını arttırmak, yan ve istenmeyen etkilerini azaltmak partiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin çalışılmasındaki ana nedenlerdendir (Silindir, 2009).

Kontrollü salım sistemlerinin veriliş yolları; en fazla kullanılan yollar oral ve parental olup, son yıllarda transdermal yol da önem kazanmaktadır. Son zamanlarda biyoteknoloji ürünü pek çok terapötik peptit ve proteinin biyofiziksel ve biyokimyasal özellikleri, veriliş yolu ve ilaç tasarımında göz önünde tutulmalıdır.

Parental preparatlar intravenöz (i.v.) subkütan, intramüsküler, intraperitonal, intratekal ve intraventriküler yolla kullanılmaktadır. Parental yolla kullanılan kontrollü salım sistemlerinde, depo formülasyon, mikrokapsüllenmiş depo preparat, veya esterleştirmeyle hazırlanan depo preparat şeklinde olabilir. Biyoparçalanır mikroküreler özellikle peptit, protein gibi kolay bozunur yapıdaki ilaçları koruduğu için her geçen gün önem kazanmaktadır (Gürsoy, 2002; Mundargi ve ark., 2008; Hun ve Zhang, 2009).

1.8.1 Lipozomlar

Lipozomlar, yapı ve içerik bakımından hücre zarı ile benzerlik gösteren, fosfolipit yapıda, amfipatik veziküllerdir. Lipozomal yapı, hücre membranına model oluşturmak üzere ilk defa 1965'de Bangham ve arkadaşları tarafından hazırlanmışlardır. Lipozomların ilaç taşıyıcı olarak kullanımı son 15 yıla dayanmaktadır. İlaç taşıma aracı olarak lipozom kullanımının başlıca avantajları: Daha az yan etki, hedefe yönelik taşıma, yavaş ve uzun süreli ilaç salınımıdır. Sahip olduğu bu özellikler nedeni ile kanser tedavisinde kullanımı son yıllarda araştırmacıların dikkatini çeken bir konu haline gelmiştir (Park ve ark., 1997; Park ve ark., 2001; Lopez-Berestein ve ark., 2002; Storm ve ark., 2003; Micol ve ark., 2010).



Şekil 1.6. Lipozomun yapısı (Silindir, 2009)

Lipozomların, düşük fiziksel - kimyasal stabiliteye sahip olmaları ve büyük ölçekte üretimleri için uygun yöntemin bulunmaması gibi, piyasada az sayıda lipozomal ilaç formülasyonunun (Alveofact, AmBisome, Dounoxome, Doxil, Epaxal-Berna) yer almasına neden olan bazı dezavantajları vardır.

Lipozomlar (Şekil 1.6) fosfolipit yapıda olmaları, biyouyumlu ve biyoparçalanır özellikleri ile ilaçların hedeflendirilmesini sağlayabilmeleri avantajlarından dolayı ilaç taşıyıcı sistemler arasında üzerinde en çok araştırma yapılan sistemler olmuşlardır. Lipozomlar, zarları bir (unilamellar) veya daha fazla (oligolamellar, multilamellar) fosfatidilkolin çift katmanından oluşan küresel keseciklerdir (sferik veziküller) (Silindir, 2009). Veziküller farklı boyutlarda (25-3500 nm çapında, tek veya birleşik partiküller) olabilir.

Çizelge 1.1. Vezikül tipleri ve çapları (Akman ve ark., 2013)

VEZİKÜL TİPİ	VEZİKÜL ÇAPI (nm)
SUV (Küçük Tek Tabakalı Lipozom)	25 - 50
MLV (Çok Tabakalı Lipozom)	50 - 100
LUV (Büyük Tek Tabakalı Lipozom)	>100

Belirli bir kompozisyonda bu parametreler hazırlık sürecine çok bağlıdır. Lipozomlar genellikle kararlı değildirler. Zamanla tanecik boyutlarında farklılaşma görülmektedir. Örneğin küçük veziküller daha büyük olarak biçimlenmeye, büyük olanlar da küçülmeye eğilimli olurlar ancak bu kalite

açısından çok önemli değildir, çünkü veziküllerin bağlı olduğu fosfatidilkolinlerin özelliği genellikle değişmez kalır. Ancak kararlılığı en iyi 100 – 300 nm arasında olarak bildirilmiştir (Kshirsagar, 2000).

Deneysel koşullarda sentetik fosfolipitlerin değişik yöntemlerle sulu bir ortama yayılması sonucu oluşan lipozomlar, hazırlama aşamasında dışardan eklenen diğer maddeleri de enkapsüle edebilme özelliğine sahip oldukları için ilaç taşıma araçları olarak kullanılmaktadırlar. Ayrıca, belirli hedef hücrelere yönelebilen akıllı lipozomların geliştirilmesi ile birlikte bu veziküllerin tıpta kullanımı son yıllarda ivme kazanmıştır (Akman ve ark., 2013).

Lipozomların Avantajları

Diyagnostik ve/veya terapötik amaçla kullanılan lipozomlar;

• Lipozomlar hem lipofilik hem de hidrofilik ilaçların taşınmasında kullanılabilen biyouyumlu sistemlerdir. Lipozomlar vücudun temel yapı taşı olan fosfolipitlerden oluştukları için biyoparçalanırdırlar ve bu nedenle immünojenik ve toksik etki göstermezler.

• Oldukça farklı boyutlarda ve kimyasal bileşimlerde hazırlanabilirler.

• Düşük dozlarda terapötik etki gösterebilirler ve etkin madde plazma düzeyini istenilen süre terapötik değerde tutabilme yeteneğine sahiptirler.

• Dozlama aralığını ve ilaçların yarılanma ömrünü uzatırlarken, yan ve toksik etkileri çok azaltırlar veya ortadan kaldırırlar.

• Etkin maddeyi enzimatik etkilerden korurlar. Suda ve yağda çözünen etkin maddeleri taşıyarak ilaç hedeflendirmesi yapabilirler.

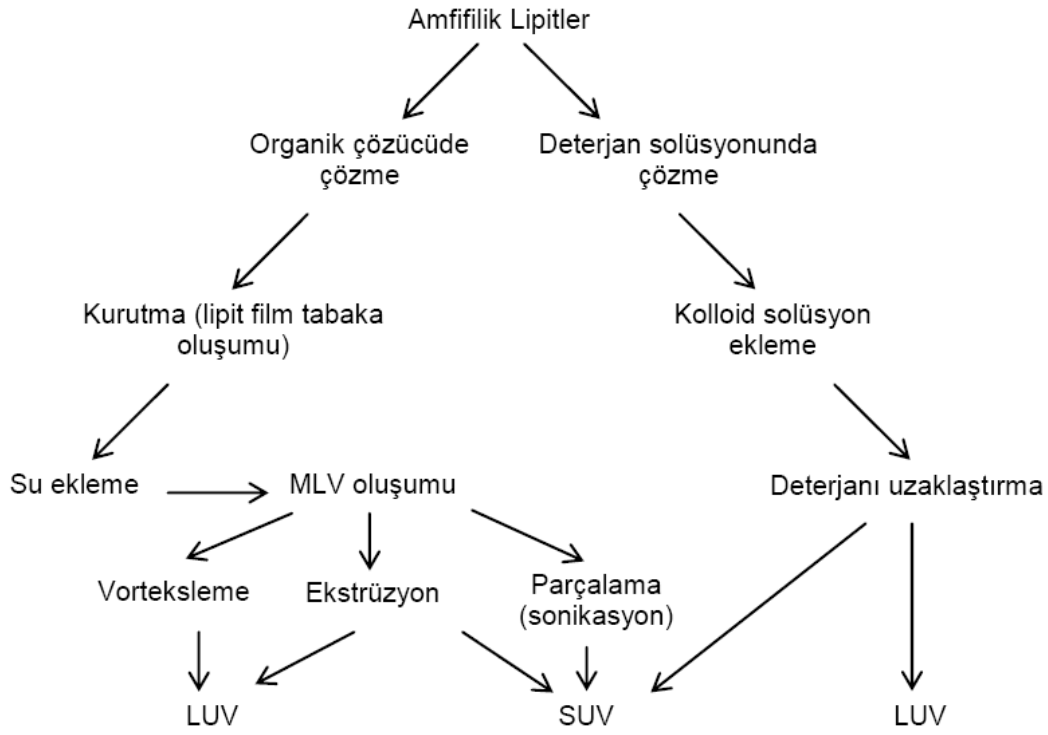
• Geniş spektrumlu kemoterapötikler, görüntüleme ajanları, antijenler, immunomodülatörler, şelasyon yapan bileşikler, hemoglobin ve kofaktörler, lipitler, genetik materyal gibi geniş yelpazedeki ilaçların taşınmasını sağlarlar.

• Lipozomlar ilaç deposu olarak davranırlar ve hapsedilen ilaç zaman içerisinde yavaşça salınır. Uzatılmış salım profili ile dolaşımda veya lokal uygulama yerinde etkin terapötik ancak nontoksik kan seviyelerini sürdürülebilmektedirler. (Klibanov ve ark., 1997; Storm ve Crommelin, 1998; Kshirsagar, 2000; Storm ve ark., 2003).

Peptit ve protein antikanser ajanlarının potansiyeli, onların tümörlü dokuya veya tümör hücrelerinin içine iletimleri hakkındaki çözülemeyen problemlerden dolayı henüz anlaşılamamıştır. Ancak, protein ve peptit ilaçların biyolojik kaderinin ve biyolojik dağılımının altında yatan mekanizmaları anlaşıldığı kadarıyla, bu mekanizmaların etkileri veya kullanımı geliştirilerek şimdilerde kullanıma uygun hale getirilmiştir. Kararlılığı, uzun süre dolaşımda kalması ve peptit ve proteinleri vücuda hedeflemenin geliştirilmesi konusunda farklı yaklaşımlar vardır, örneğin; çeşitli çözülebilir polimerlerle modifiye edilmeleri, mikropartiküler ilaç taşıyıcılar ile birleştirilmeleri, EPR temelli hedefleme ve hedefleme kısımlarının kullanımı gibi. Ayrıca, proteinlerin ve peptitlerin uyumlu kullanımını içeren intraselüler ilaç iletimi hakkında yeni yaklaşımlar geliştirilmiştir. Bu gelişmeler, yeni nesil antikanser ilaçlarının iletiminde gelecek vaat etmektedir (Torchilin ve Lukyanov, 2003).

Lipozom hazırlamak için kullanılan yöntemler genel olarak 3 temel basamak içerir;

- Organik çözücüde çözdürülen lipitlerin kurutulması
- Sulu ortamda lipozomların oluşturulması
- Sonuçta elde edilen lipozomların analizi.



Şekil 1.7. Lipozom hazırlama yöntemleri (Akman ve ark., 2013)

Yapılan çalışmada, fosfolipit olarak soya tohumu lesitini olan Phospholipon 85G® lipozom yapımında kullanılmıştır.

Lipit, cam balon içerisinde koroform:metanol karışımında çözülerek, vakum ile organik çözücünün uçurulması sağlanarak balon çeperinde ince film oluşması sağlanmıştır. Sonikasyon ile sulu ortamda tek ve çok tabakalı veziküller elde edilmiştir (Şekil 1.7).

1.8.1.1 İmmünolipozomlar

Antikor bağlanmış lipozomlar (immunolipozomlar) ilk olarak 1980'lerin başlarında tanımlandılar (Dinauer ve ark., 2005). Toksik ve immunojenik değillerdir. Suda ve yağda çözünen etkin maddeleri taşıyabilen lipozomlar, etkin maddeleri kontrollü olarak serbestleştirebilirler, hedef bölgeye taşıyabilirler ve biyolojik olarak yıkılırlar (Gürsoy, 1989).

Monoklonal antikorların terapötik amaçlar için konjugasyonu şu anda yoğun bir araştırma ve geliştirme konusudur (Pietersz, 1990; Morrow, 2003). Bu araştırmalar sadece ilacın iletim yolunu değiştirmekle kalmamakta, zararlı yan etkilere yol açmadan etkinliği yakalamak için gerekli dozu önemli ölçüde

azaltmaktadır. Monoklonal antikorlar ilaç veya izotop taşınması için kullanılabilir, fakat monoklonal antikorların biyolojik aktiviteleri yapıdaki küçük değişikliklere duyarlı olduğundan, anikorların saflaştırma ve karakterize edilmeleri oldukça zordur. Monoklonal antikorları çapraz bağlarken en sık kullanılan yöntem özel reaktifler kullanılmasıdır (Sesay, 2003).

Hatakeyama ve arkadaşlarının (2007) immunolipozomların hasta hücrelere terapötik ilaçların özel hedeflenmesi için etkili taşıyıcılar olduğu sonucunu buldukları çalışmaları şu şekildedir: Membran tip-1 matrix metalloproteinaz (MT1-MMP), anjiogenezde önemli rol oynamaktadır, tümör hücrelerinin yanı sıra anjiogenik endotelyum hücrelerinde ekspresedir. Böylece, MT1-MMP tümör ve neovaskülarite için hedef molekül gibi kullanılabileceği düşünülmüştür. Son yapılan çalışmalarda, lipozomal antikanser ilaçların bir hedefleme ligandı gibi MT1-MMP'ye karşı antikorların yararı gösterilmektedir. MT1-MMP'ye karşı antikorun Fab-fragmentleri doxorubicin (DXR)-kapsüllenmiş lipozomların polyethylene glycol (PEG)'nun merkeze uzak uçlarına modifiye edilmiştir, DXR-sterik olarak kararlı lipozomlardır (DXR-SIL[anti-MT1-MMP(Fab-)]). Antikorla modifikasyon HT1080 hücreleri içinde (DXR-SIL[anti-MT1-MMP(Fab-)])'ın hücresel alımını önemli derecede arttırdığı görülmüştür, MT1-MMP'de yüksek düzeyde ekspresedir, hedeflendirilmemiş lipozomlarla (DXR-stealthliposomes (DXR-SL)) karşılaştırılmıştır, MT1-MMP antikorunun (Fab-) MT1-MMP ekspresse eden hücreler için etkili hedefleme ligandı olduğu önerilmektedir. Tümör taşıyan farelerde DXR-SIL[anti-MT1-MMP(Fab-)]'ın *in vivo* sistemik uygulaması DXR-SL ile karşılaştırıldığında tümör büyümesini önemli derecede önlediği gösterilmiştir. Bu sonucun tümör ve neovaskülarite için immünolipozomların aktif hedeflenmesinden kaynaklanmış olduğu tahmin edilmiştir. Bununla beraber, DXR-SIL[anti-MT1-MMP(Fab-)] ve DXR-SL'nin tümör birikimi kıyaslanabilmektedir, enhanced permeation and retention (EPR) etkisi aracılığı ile tümörde her iki formülasyonun da toplandığı önerilmektedir, fakat endotel ve tümör hücrelerinin her ikisinde de MT1-MMP'yi aktif hedefleme aracılığı ile değildir. DXR-SIL[anti-MT1-MMP(Fab-)]'nin geliştirilmiş antitümör aktivitesi tümördeki kılcal damarlardan ekstravazasyon (damarlardan dışarıya

akma) sonrası lipozomlarla birleştirilen antikor sayesinde hücresel alımını hızlandırmasından kaynaklandığı görülmüştür.

1.8.2 Yağ emülsiyonları

Emülsiyonlar, en basit tanımla birbiri ile karışmayan en az iki sıvının, birbiri içinde damlacıklar halinde dağıldığı heterojen sistemlerdir. Farmasötik ve kozmetik alanda, birbiri ile geçimsiz iki maddeyi tek bir formülasyonda bulundurmak ve çevresel etkenlerden maddeleri korumak fikri ile ortaya çıkan emülsiyonlar, günümüzde, diğer taşıyıcı sistemlere olan üstünlüğünü korumaktadır. Büyük ölçekli üretimleri için uygun yöntemler bulunmasına ve düşük sistemik toksisitelerine rağmen, taşıyıcı sistem olarak yağ emülsiyonları kullanıldığında, birçok etkin maddenin sıvı yağ damlacıkları ve kan arasındaki dağılımının yüksek olması nedeniyle bu sistemlerden salım çok hızlı olmaktadır (Schwarz ve Mehnert, 1994). Lipit sistemlerle ilgili diğer bir sorun da, etkin maddenin saklama sırasında dışarı ve özellikle vücut sıvılarına sızmasıdır (Numanoğlu ve Tarımcı, 2006).

Emülsiyon sistemlerde en az iki faz bulunur; yağlı ve sulu faz. Emülsiyonun iç fazını oluşturan damlacıkların polidispersliği değişkendir. Damlacıkların ortalama boyutu ise ümülsiyonların sınıflandırılması açısından önem taşır. Ortalama çapı 10 nm'den küçük sistemler miseller emülsiyon; 10-100 nm olanlar mikroemülsiyon; daha büyük çapa sahip olanlar ise makroemülsiyon olarak adlandırılmaktadır (Jayakrishnan ve ark., 1998).

1.8.3 Katı lipit nanopartiküller

Oda ve vücut sıcaklığında katı olan lipitlerin taşıyıcı matris olarak kullanıldığı katı lipid nanopartiküller (SLN), emülgatörler ile stabilize edilen, nanometre boyutundaki partiküler sistemlerdir (Numanoğlu ve Tarımcı, 2006). Lipid terimi geniş anlamda kullanılmaktadır ve trigliseridleri (tristearin vb.), kısmi gliseridleri (Imwitor vb.), yağ asitlerini (stearik asit vb.), steroidleri (kolesterol vb.) ve mumları (setil palmitat vb.) içermektedir. Lipidler genellikle, GRAS (Generally Recognized As Safe) özelliğine sahip fizyolojik bileşiklerdir. Lipid dispersiyonu stabilize etmek için, yüklerine ve molekül ağırlıklarına bağlı olarak

bütün emülgatör tipleri kullanılabilmektedir. %1-5 emülgatör veya emülgatör/yardımcı emülgatör kompleksi ile stabilizasyon sağlanmaktadır. Emülgatörün seçimi, uygulama yoluna bağlıdır. Parenteral uygulamalar için kullanılabilecek emülgatörler oldukça sınırlıdır. Emülgatör amaçlı kullanılan maddelere örnek olarak lesitinler, poloksamerler, etoksillenmiş monogliseridler ve polisorbatlar verilebilir (Numanoğlu ve Tarımcı, 2006).

SLN'ler (solid lipid nanoparticles) sıcak ve soğuk homojenizasyon yöntemi olarak iki şekilde hazırlanır. Hidrofilik etkin maddeler için soğuk, lipofilik etkin maddeler için sıcak homojenizasyon yöntemi kullanılmaktadır. Katı lipit nanopartüküler sistemler otoklav sterilizasyonunu mümkün kılmasının yanında, formülasyonlarına bağlı olarak gama ışınları ve filtrasyona da imkan tanımaktadır. SLN, sözü edilen üstünlükleri ile, etkin maddelerin topikal, ofalmik, oral ve parenteral verilişleri için uygulama alanı bulmuştur. Suda güç çözünen birçok etkin madde için yeterli biyoyararlanıma yol açacağı düşüncesi, bu taşıyıcı sistemin gelecek vaat eden ilaç taşıyıcılardan olduğunu göstermektedir (Demirel ve Yazan, 2000).

Tez çalışması kapsamında, nanopartiküllerle terapötik peptitler (monoklonal antikorlar) birleştirilmiştir. Katı lipit partikül sistemleri (LM;lipid mikropartiküller, KLN;katı lipit nanopartiküller ve liposferler) arasında yer alan KLN'ler, bu biyolojik moleküller için alternatif taşıyıcı sistemlerdir (Almeida ve Souto, 2007).

Katı partiküller; polimerik nanopartiküller ve mikrokürelere, lipozomlara ve yağ emülsüyonlarına karşı birçok avantaja sahiptir (Freitas ve Müller, 1998).

- Katı matris, etkin madde salımında modifikasyon sağlar,
- Uzun salım zamanlarında nispeten yavaş bozunma görülür,
- Kimyasal bozunmaya karşı içerdikleri bileşikler korunur,
- Fizyolojik lipitlerden oluşur,
- Farmasötik dozajların kararlılığını arttırabilmesi,
- Kan düzeyinde ani yükselmeleri önleyerek; verilişten sonra etkin maddenin yan etkilerinin azalmasına yol açar (Müller ve ark., 2000)
- Koloidal büyüklüktedir,

- Sulu dispersiyonları uzun süre stabil kalabilir; alternatif olarak, dondurarak veya püskürterek kurutma uygulanabilir,
- Lipofilik ve hidrofilik etkin maddeler hapsedilebilir,
- Otoklav veya gama ışınları ile sterilizasyon sağlanabilir,
- Hazırlama sırasında fizyolojik bileşiklerin kullanılması nedeniyle toksikolojik olarak kabul edilebilirdir,
- Üretimde organik çözücü kullanılmaması nedeniyle, organik çözücü kalıntısı içermez,
- Geniş uygulama alanına sahip olması (dermal, rektal, oftalmik, intravenöz),
- Mükemmel derecede biyouyumlu olması,
- Küçük parçacık boyutu, geniş yüzey alanı,
- Endüstriyel ölçekte üretimleri mümkündür,
- Etkin maddenin kontrollü salımı sağlanabilir,
- Yüzey özelliklerinin modifikasyonu ile belirli dokulara ilaç hedeflemesi yapılabilir,
- Etkin madde çevresel etkenlerden korunur ve stabilitesi artırılır,
- Ekonomik olarak kabul edilebilir bir taşıyıcı sistemdir (Yazan ve Demirel, 2000; Numanoğlu ve Tarımcı, 2006; Şenel, 2012).

KLN'in dezavantajları;

Parçacık boyutunun zamanla büyümesi,

Jelleşme eğiliminin olması,

Saklama süresince polimorfik geçişler nedeniyle ilaç sızıntısı,

Kristal yapısı nedeniyle zayıf ilaç yüklemesidir (Yazan ve Demirel, 2000; Gürsoy, 2002; Şenel, 2012).

Farklı kolloidal taşıyıcıların avantajlarını bir arada barındıran ve dezavantajlarını ortadan kaldıran KLN'lerin, kolloidal taşıyıcı sistem olarak kullanımları giderek artan bir ilgi görmektedir (Venkateswarlu ve Manjunath, 2004; Hu ve ark., 2004; Kim ve ark., 2005).

Katı lipit nanopartiküller, kontrollü hedefleme ve belli bir bölgeye ilaç iletimi için büyük gelecek vaat etmektedir ve bu yüzden araştırmacıların çok ilgisini çekmektedir. KLN'lerin karakterizasyon çalışmaları için, foton kolerasyon spektroskopisi, taramalı elektron mikroskopisi (SEM), diferansiyel taramalı

kalorimetre gibi analitik tekniklerin uygun olduğu vurgulanır (Abdul Hasan Sathali ve Ekambaram, 2011).

1.8.4 Polimerik nanopartiküller

Polimer sistemler arasında en fazla dikkati çeken polietilenimin (PEI), Poly(L-lisin) (PLL), jelatin ve kitosan gibi katyonik polimerler kullanılarak hazırlanmış nano boyutlarda partiküler sistemlerdir.

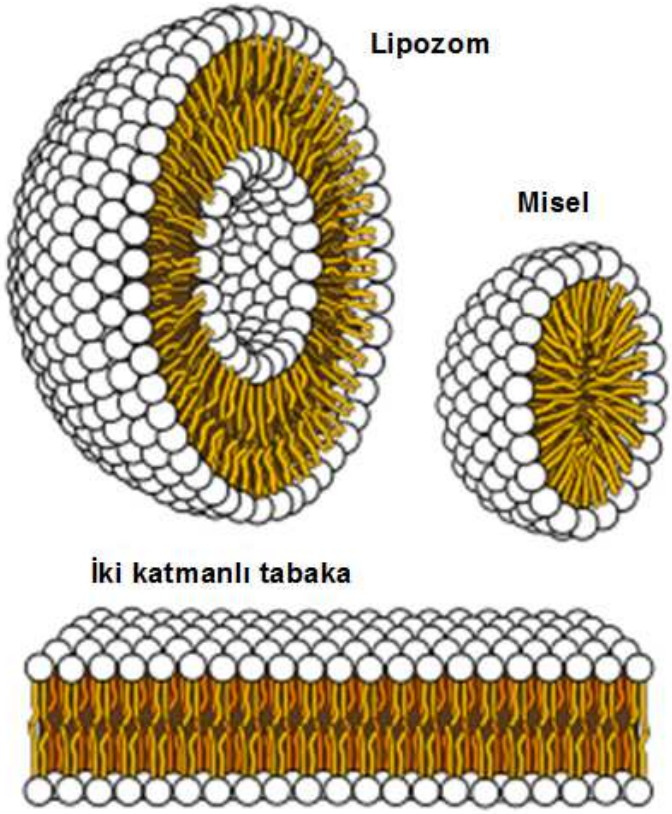
Nispeten yavaş degradasyona uğramaları, üretimlerinden gelen toksik organik çözücü kalıntıları, endüstriyel ölçekte üretimleri için bir yöntemin bulunmaması ve otoklav ile sterilizasyonlarının mümkün olmaması gibi dezavantajlara sahipken (Numanoğlu ve Tarımcı, 2006), bir avantajlı özellikleri katyonik lipidlerden daha stabil olmaları nedeniyle DNA'yı nükleaz degredasyonuna karşı daha çok korumalarıdır (Kataoka ve ark., 2005; Li ve ark., 2006).

Emülsiyon polimerizasyonu ve çözücü uçurulması teknikleri ile hazırlanan polimerik nanopartiküller ve mikrokürelerin, üretim işleminden gelen organik çözücü atıkları, toksik monomer ve toksik bozunma ürünleri ile kontaminasyon riski vardır. Bu polimerik partiküllerde, katı matrisin, birkaç günden uzun süre kontrollü etkin madde salımına izin vermesine karşın spesifik dezavantajları şunlardır:

- Dört haftaya ulaşan düşük parçalanma ile RES'i (retikülo endotelyal sistem) bozarak sistemik toksik etkilere neden olabilirler;
- Polilaktit (PLA) ve polilaktit/glikolit (PLA/GA) partiküllerinin insan granülositleri ve makrofajları tarafından fagosite edildikten sonra sitotoksit etkiler gözlenebilir;
- Üretim kaynaklı toksik artıklar olabilir;
- Endüstriyel ölçekte üretim için yöntem mevcut değildir;
- Otoklav ile sterilize etmek mümkün değildir. Gama ışını ile sterilizasyon sonrası tooksik reaksiyon ürünlerinin ve radikallerin oluşma olasılığı vardır (Demirel ve Yazan, 2000).

1.8.5 Miseller

Etkin madde parçalanmasını ve kaybını en aza indirmek, zararlı yan etkilerini önlemek, biyoyararlanım ve etki yerlerinde bulunan oranlarını artırmak için, çeşitli etkin madde salım sistemleri ve hedefleme sistemleri geliştirilmiştir. Sulu ortamda polimerik miseller oluşturan amfifil blok kopolimerler (rasgele, di-blok, tri-blok ve graft kopolimerler gibi) üzerinde ilaç taşıyıcılar olarak çalışılmaktadır (Yasugi ve ark., 1999; Yao ve ark., 2011). Amfifilik blok kopolimerler, hidrofilik ve hidrofobik monomer ünitelerinden oluşmuşlardır ve sulu çözeltilerde yüksek çözündürme kapasiteli ve dayanıklı yapıda küresel miseller oluştururlar (Şekil 1.8 ve Şekil 1.9).

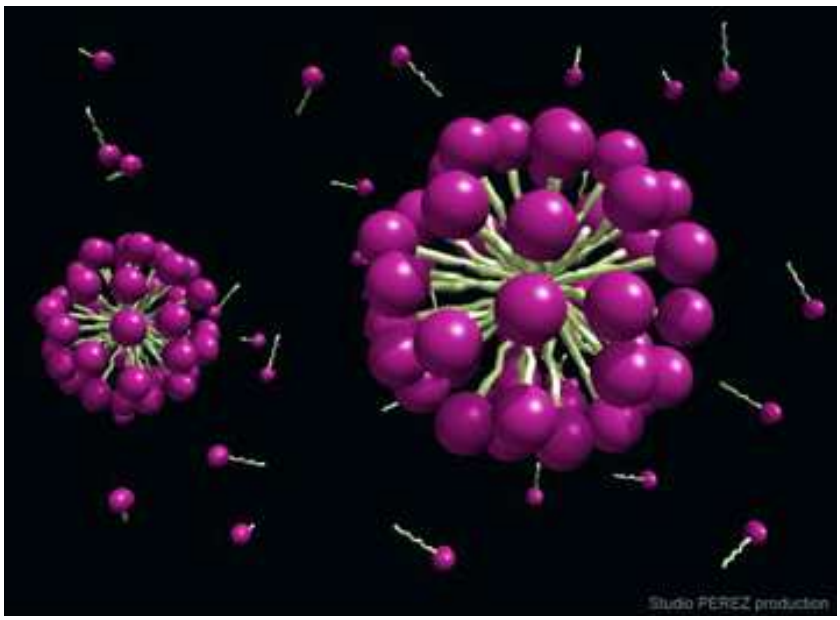


Şekil 1.8. Misel ve lipozom yapısı (http-6)

İlaç taşıyıcı sistemler olarak miseller şu avantajları sağlamaktadırlar (Torchilin, 2001):

- Çözünürlüğü düşük etkin maddeleri çözünür hale getirmekte ve böylece biyoyararlanımlarını artırmaktadırlar.
- Gerekli bölgede etkin maddenin toplanabilmesini sağlamak için vücutta yeterli derecede uzun bir süre kalabilmektedirler.

- Nanometre boyutlarında büyüklüğe sahip olmaları, onların zayıf damarlanmanın olduğu bölgelerde birikmelerine olanak sağlamaktadır.
- Spesifik ligandlar bağlanarak hedeflendirilebilmektedirler.
- Büyük miktarlarda, kolaylıkla ve tekrarlanabilir bir şekilde üretilebilmektedirler.
- İçlerindeki etkin maddeyi biyolojik ortamda inaktivasyondan koruyabilmektedirler ve istenmeyen yan etkiler gözlenmemektedir (Yüksel ve ark., 2003).



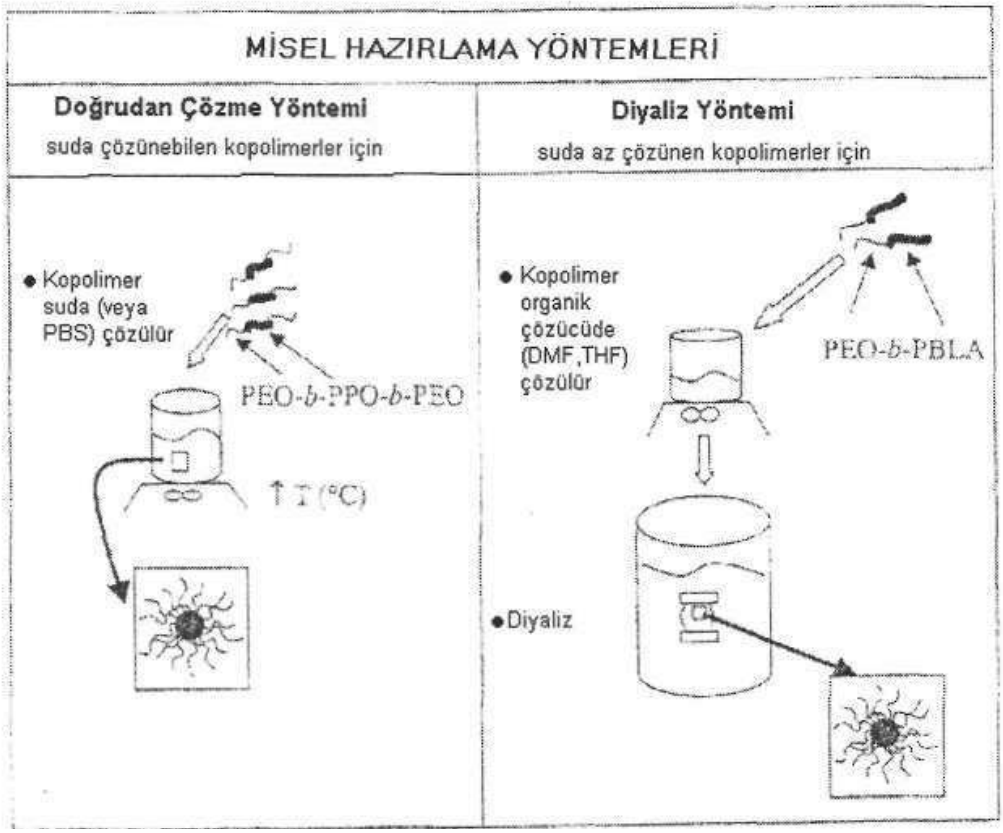
Şekil 1.9. Misel yapısı (http-7)

Araştırmalar, blok kopolimerlerden oluşan agregatların küreler, çubuklar, veziküller, lamel yapılar, hekzagonal olarak yerleşim gösteren içi boş halkalar gibi çok sayıda farklı misel benzeri şekiller halinde bulunabileceğini göstermektedir. Misel oluşumu başlıca iki kuvvetin sonucu olarak meydana gelmektedir; moleküllerin bileşimine neden olan çekim kuvveti ve misellerin ayrı bir makroskobik faz halinde sınırsız büyümelerini önleyen itici kuvvet. Pekçok çalışmada polietilenoksit (PEO yani PEG) hidrofılik bloğu oluştururken hidrofobik blok olarak çok sayıda farklı materyal kullanılmaktadır. Aşağıda çekirdek oluşturucu blok olarak kullanılan biyolojik olarak geçimli hidrofobik polimerlerden bazıları verilmiştir (Yüksel ve ark., 2003):

- Poli(aspartik asit)
- Poli(beta-benzil-L-aspartat)

- Polikaprolakton
- Poli(gama-benzil-L-glutamat)
- Poli(D,L-laktid)
- Poliakrilik asit
- Poli(oksi propilen)
- Oligo(metil metakrilat)
- Polistiren

Başlıca iki hazırlama yöntemi vardır: doğrudan çözme yöntemi ve diyaliz yöntemi (Şekil 1.10).



Şekil 1.10. Blok kopolimer misellerin hazırlanmasında uygulanan iki temel yöntemin şematik gösterimi (Yüksel ve ark., 2003)

Yöntemin seçimi, büyük ölçüde blok kopolimerlerin su içindeki çözünürlüğüne bağlıdır. Eğer kopolimer suda çözünebiliyorsa doğrudan çözme yöntemi; kopolimer suda çok az miktarda çözünüyorsa diyaliz yöntemi uygulanmaktadır.

1.8.6 Mikrokapsüller

Mikropartiküler sistemlerden biri olarak kabul edilen mikrokapsüller, bir çekirdeğin bir çeperle kaplanması sonucu oluşan dozaj şeklidir. Genelde etkin madde ‘çekirdek’, kaplama maddesi de çeper adını alır. Çekirdek maddeler: Farklı etkin maddeler, örneğin, antibiyotikler, analjezikler, vitaminler, sedatifler; proteinler, peptitler, hormonlar, enzimler, bakteriler, antikorlar, hücreler, boyalar, pigmentler, fotoğrafçılık maddeleri ve besin maddleri kapsüllenebilmektedir (Dong ve ark., 2011).

Çeper maddeleri: doğal (agar, albumin, arap zamkı, dektran, jelatin, kitozan, kollajen, nişasta, mum, pektin, zein) ve sentetik (akrilik polimerler, PEG, poli üretanlar, poli amitler, polistiren, PVA, PVP, selüloz ve türevleri, slikonlar, şellak) hidrofilik ya da hidrofobik polimerlerden seçilebilmektedir (Öner, 2004).

Mikroenkapsülasyon teknolojisinde kullanılan kaplama materyalleri çok çesitli olup, organik veya inorganik esaslı olabilir. Mikrokapsülasyonun amacı, geçimsizliği gidermek, atmosfer koşullarından korumak, stabiliteyi arttırmak, etki süresini uzatmak ve kontrollü salım sistemleri üretmektir. Mikroenkapsülasyon tekniğinin kimya, ziraat, gıda ve yem, tıp, eczacılık, veterinerlik, biyoteknoloji, çevre ve tüketici ihtiyaçları gibi çok genis kullanım alanları vardır (Aloğlu ve Öner, 2010).

Mikrokapsüllerde incelenmesi gereken fizikokimyasal özellikler, çeper kalınlığı, geçirgenlik, zeta potansiyel, partikül büyüklüğü, salım, mekanik ve akış özellikleridir (Dong ve ark., 2011).

1.8.7 Mikroküreler

Çapları birkaç μm’den birkaç yüz μm’ye değişebilen, monolitik yapıda, miro taşıyıcılardır (Şekil 1.11). Mikrokürelerden beklenen temel özellikler; etkin maddeyi kontrollü salması ve yapısını değiştirmemesi, hedefe taşıması, in-vitro ve in-vivo koşullara dayanıklılık, biyolojik sistemlere uyumlu olması, biyolojik olarak parçalanabilmesi ve parçalanma ürünlerinin toksik olmamasıdır (Peksoy ve ark., 2004).

Hazırlanmasında doğal ve sentetik polimerler kullanılır. Hazırlama yöntemleri; polimerizasyon yöntemi, koaservasyon yöntemi, emülsiyon oluşturma, in-situ yöntem, polikondenzasyon, püskürterek dondurma, püskürterek kurutma, orifis yöntemi, dispers fazda jelleşme ve çapraz bağlama yöntemi (Gürsoy, 2002).

Kısaca mikroküre lerin klinik uygulamalarından bahsedecek olursak; 5-FU, BCNU, sisplatin, doksorubisin, mitomisin-C, adriamisin gibi antikanserojen ilaçlar mikroküre şeklinde uygulanarak, hem toksik etkileri azaltılmakta, hem kontrollü salımları sağlanmaktadır. Antienflamatuar ilaçlar (naproksen sodyum, diklofenak sodyum, deksametazon, siklofosfamit mikroküreleri, sinovial sıvıdan hızla uzaklaşan antienflamatuar ilaçların daha uzun süre eklemde kalması amacıyla kullanılmıştır (Bozdağ ve ark., 2001; Gürsoy, 2002). Lokal anesteziklerin etki sürelerinin uzatılması amacıyla da mikroküreler hazırlanmıştır. Tc-99m poli (l-laktik) asit (PLA) mikroküreleri lökositleri fagositik yolla işaretleyebilmek için hazırlanmış ve monositlerin daha belirgin işaretlenmesi nedeniyle özellikle kronik inflamasyonda kullanılabilir olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Peksoy ve ark., 2004).

Şekil 1.11. L-PLA mikrokürelerinin morfolojik özelliklerine ait SEM (taramalı elektron mikroskobu) fotoğrafları (1-5 µm) (Peksoy ve ark., 2004)

Mikroküreler, lokal anesteziklerin etki sürelerinin uzatılması amacıyla, beyine implantasyon (Şengel-Türk ve ark., 2007), hedefleme amacıyla kullanılır. Peptit ve proteinlerin stabilitesi artırılıp salım profilleri mikrokürelerle ayarlanabilir. Mikroküre şeklinde formüle edilen aşılarla uzatılmış etki ve kuvvetli immünizasyon elde edilmiştir. Daha çok biyolojik olarak parçalanan

polimerlerden PLA/PGA ve PLGA kullanılarak tetanoz ve difteri toksoitlerinin mükroküreleri yapılmıştır (Gürsoy, 2002).

1.8.8 Nanopartiküller

Büyüklüğü 10-1000 nm arasında değişen, etkin maddeyi çözünmüş, hapsedilmiş veya adsorbe şekilde kontrollü olarak salan katı koloidal partiküllerdir. Nanoküre ve nanokapsül olarak da isimlendirilirler. Nanokapsülde etkin madde polimerik bir membranla çevrilidir, nanokürede ise matriks sistem içinde etkin madde homojen dağılmış şekildedir. Nanopartükülden istenen özellikler, ilacı kontrollü salması, etki etmeleri istenen bölgede toplanması, kararlı olması, taşıyıcının biyoparçalanabilir olması, parçalanma ürünlerinin toksik olmaması, sterilize edilebilir olması şeklinde sıralanabilir (Gürsoy, 2002).

Doğal ve sentetik polimerler hazırlanmalarında kullanılır. Doğal polimerler proteinler (albumin ve jelatin) ve polisakkaritler (aljinat, kitozan, dekstran) olarak iki gruptur. Sentetik polimerler arasında da önceden sentezlenen (polianhidrit, polikaprolakton-PECL, poli(laktik asit)-PLA, poli(laktik-ko-glikolik asit)-PLGA) veya hazırlama sırasında sentezlenen polimerlerden (poli(siyanoakrilat)-PAGA) yararlanılır. Peptit, protein ve nükleik asitlerin nanopartiküller ile taşınmasında polisakkaritler kullanılmaktadır (Gürsoy, 2002).

1.8.9 Sfingozomlar (sfingolipitler)

Sfingolipitler temel olarak tüm hayvanlarda, bitkilerde, ve mantarlarda ve bazı prokaryotik organizmalarda ve virüslerde bulunur. Sfingoid iskeletine amid zinciri boyunca bir yağ asiti bağlı olabilir ve/veya birincil hidroksilde baş grubu bağlı olabilir. Baş grupları basit bir hidrojenden daha karmaşık türlere değişebilir, örneğin; sfingomiyelinin (SM) fosfokolin kısmı ve glikosfingolipitlerin basitten karmaşık glikanlarına kadar (Kolter, 2011).

Sfingolipitler membran, lipoprotein, deri ve diğer biyomateryallerin bileşenleri olarak işlev görür ve hücre haberleşmesinde modulatör ve mediatörler olarak işlevleri vardır. Glikosfingolipitler hücrelerin ekstaselüler matriksinden protein ve karbonhidratlara bağlanarak ayrıca hücre adhezyonu ve hücre-hücre etkileşiminde yer alırlar (Merrill, 2008). Bu sadece yapısal ve düzenlemeyi

sağlamaz, aynı zamanda komşu hücrelerin memebran reseptörlerinin veya aynı membranın aktivitesini ayarlayabilir. Örneğin, gangliosit GM3 epidermal büyüme faktörü reseptörü tirozin kinaz aktivasyonunu inhibe eder (Yoon ve ark., 2006). Bazı sfingolipitler mikroorganizmalar, mikrobiyal toksinler (örneğin, GM1in kolera toksini tarafından tanınması) ve virüsler tarafından bağlanma bölgesi olarak kullanılır (Hanada ve ark., 2006). Sfingolipitler proteinlere kovalent olarak bağlanabilir (Merrill, 2008).

1.8.10 Mikrosüngerler

Polimer esaslı, genellikle tropikal uygulanan, gözenekli mikropartiküler taşıyıcılardır. Büyüklükleri 5-300 μm arasındadır. Bir gram mikrosüngerin yüzey alanı 200-500 m^2, gözenek hacmi 0.6-4.0 cm^2, etkin madde kapsülleme kapasitesi ise %50-60 arasındadır. Mikrosüngerler, ilacın toksisitesini ve yan etkilerini azaltır, etkinliğini uzatır, programlanabilir ve kontrollü salım sağlayarak sık dozlama zorunluluğunu ortadan kaldırırlar. Biyolojik olarak parçalanmayan sistemlerdir. Gözenek yapılarının küçük olması nedeniyle, bakterilerin giremediği yapılar olarak bilinirler. Partikül büyüklüğü nedeniyle, deri yüzeyinde kalıp, etkin maddeyi zamanla salarak, epidermiste aşırı birikimi önlenerek lokal etkili ilaçların güvenilirliği sağlanmış olur. pH'sı 1-11 arasındaki ortamlarda, 130^0C'ye varan sıcaklıklara dayanıklıdırlar (Kaş, 2002).

1.8.11 Niozomlar

Tek zincirli amfifillerin niozom oluşturabileceği ilk kez Hargreaves ve Damer (1978) tarafından gözlenmiştir. Oktadesil sülfat ve oktadesil fosfat gibi uzun zincirli deterjanlara; asit sabunlar, sabun/yağ alkolleri, oleat/kolesterol gibi moleküller beraberliklerinden de faz geçiş sıcaklığı üzerinde ve oldukça yüksek konsantrasyonlarda vezikül oluşturabildiklerini rapor etmişlerdir. Pazara sunulan ürünün stabilitesi önemlidir. Lipozomların stabilitesi ile ilgili çalışılırken fosfolipitlere alternatiflerin aranması çalışmaları araştırıcıları, non-fosfolipit veziküller noktasına getirmiştir. Non-iyonik yüzey etkin maddelerin kullanıldığı veziküllerle ilgili ilk patent 1975'te L'Oreal tarafından alınmıştır (Özer, 2002).

Sonuç olarak, non-iyonik yüzey etkin maddelerin ana bileşen olarak bulunduğu; yük verici madde ve kolestrolden oluşan bu veziküllerin fiziksel yapı ve kimyasal bileşim açısından aktif ve uygun olduğu ispatlanmış ve ilaç taşıyıcı sistemler arasında yerini almıştır (Özer, 2002).

1.9 Pegilasyon

Pegilasyon, peptit ve proteinlerin biyoteknolojik ve terapötik potansiyellerini geliştirmek için çok ilgi duyulan bir yöntemdir. Poly(ethylene glycol) (PEG)'in, bir polipeptite düzgün bir şekilde bağlandığında, temel biyolojik fonksiyonların- enzimatik aktivite veya reseptör tanıma gibi- özelliklerinin çoğunu korurken modifiye eder. PEG-bağlanması, proteinlerin yüzeyini maskeler ve polipeptitin molekül boyutunu arttırır, böylece böbrek süzülümünü azaltır, antikorların veya antijen uygulanmış hücrelerin korunması ve proteolitik enzimler tarafından yıkımı azaltır. Son olarak, PEG, kendi fiziko-kimyasal özelliklerini moleküllere iletir ve böylece peptit ve peptit-olmayan ilaçların biyodağılım ve çözünebilirliğini de modifiye eder (Veronese, 2001).

Terapötik proteinlerin (antikorlar gibi) sistemik yolla vücuda uygulanmasında karşılaşılan en büyük sorunlardan biri, ilacın hızla dolaşımından uzaklaştırılıp vücuttan atılması, bir diğeri ise geniş dağılım hacmine sahip olmasıdır. Pegilasyon yöntemiyle biyodağılım ve çözünebilirlikleri değiştirilebilinir.

İlaç taşıyıcı koloidal sistemlerin sistemik dolaşıma intravenöz yolla uygulanmasından sonra, başta karaciğer olarak RES (retikülo endotelyal sistem) tarafından tutulumunu (~30 dakika) engellemek amacıyla, partiküller üzerine PEG denilen hidrofilik bir polimer eklenerek/bağlanarak dolaşımda daha uzun süre kalan stealth lipozomlar (veya sterically stabilized) üzerine çalışmalar yapılmaktadır (Zalipsky ve ark., 1997; Storm ve Crommelin, 1998; Park ve ark., 2001; Kiwada ve ark., 2006; Maeda ve ark., 2009; Silindir, 2009).

Opsonin olarak adlandırılan plazma proteinleri, vücuda giren lipozomları yabancı madde olarak algılar ve lipozomun membranına bağlanırlar, bu bağlanma lipozomun RES hücreleri tarafından tutulup dolaşımdan uzaklaştırılması işlemini aktive eder (Bakker-Woudenberg ve ark., 1993; Kullberg ve ark., 2002). Bu süreç,

immun sistemin lipozomlar dahil tüm yabancı materyal olarak algıladığı maddeleri, nonspesifik atılım (fagositoz) mekanizması ile uzaklaştırmasıdır. Lipozomların PEG [poly(ethylene glycol)] ile kaplanması RES hücrelerinin lipozomları tanımasını güçleştirir ve böylelikle lipozomlar dolaşımda daha uzun süre kalabilirler. (Terada ve ark., 2006; Steinhauser ve ark., 2006).

Dolaşımda uzun kalacak partiküllerin intravenöz iletim sürecinde makrofajlar tarafından temizlenmemeleri için 100 nm ve daha küçük çaplarda ve hidrofilik bir yüzeye sahip olmaları istenir (Brannon-Peppas ve ark., 2004). PEG hidrofilik bir polimerdir, bu nedenle partiküllerin yüzeyini kaplamada kullanılır (Zalipsky ve ark., 1997; Kiwada ve ark., 2006; Harashima ve ark., 2007).

Bu polimer, lipozom yüzeyinde koruyucu bir tabaka oluşturur ve plazma proteinleri tarafından tanınmasını geciktirir, dolayısıyla lipozomların dolaşımdan uzaklaştırılmaları yavaşlar ve sistemik dolaşımda daha uzun kalırlar. Günümüzde PEG kaplı “long-circulating” lipozomların, *in vitro* ve *in vivo* biyomedikal alanda yaygın kullanımları vardır, hatta PEG kaplı lipozomlar klinikte de kullanılmaktadırlar (Immordino ve ark., 2006).

2 MATERYAL VE METOD

2.1 Materyal

2.1.1 Çalışmada kullanılan maddeler

Acridine Orange hemi(zinc chloride) salt	Santa Cruz Biotechnology USA
Akrilamit/Bisakrilamit (% 30, 29:1)	Applichem Almanya
Amonyum persülfat (% 99)	Applichem Almanya
Amonyum sülfat	Sigma-Aldrich USA
Anti-HER2 Antibody	Sigma-Aldrich Çin
Brillant Blue G	Amresco Amerika
DAPI (4′,6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride)	Sigma-Aldrich İsrail
DKM (Diklorometan)	Sigma-Aldrich Almanya
DMSO (Dimetilsülfoksit)	Applichem Almanya
DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)	Biological Ind. İsrail
EDTA (Etilen Diamin Tetraasetik Asit)	Sigma-Aldrich Almanya
Etanol	Merck Almanya
FITC (Fluorescein Isothiocyanate Isomer I)	Sigma-Aldrich Amerika
FITC-conjugated Anti-HER2 Antibody (Neu)	Santa Cruz Biotechnology Amerika
Fötal sığır serumu	Sigma-Aldrich Almanya
Formaldehit (%37)	Riedel de Haen Amerika
Glasiyel asetik asit	Sigma-Aldrich Almanya
Gelucire® 50/13 (Gliserol makragol stearat)	Gattefose Fransa
Glisin	Merck Almanya
İzopropanol	Merck Almanya
Kloroform	Carlo Erba Fransa
Lipofectamin® 2000 transfeksiyon ajanı	Invitrogen İngiltere
Marker mix	Thermo Scientific Amerika
Metanol	Merck Almanya
MTT boyası	Applichem Almanya
Penisilin/streptomisin	GIBCO İngiltere
Phospholipon 85G®	Phospholipid GmbH Almanya
Potasyum klorür	Sigma-Aldrich Almanya

SDS (Sodyum Dodesil Sülfat)	Merck Almanya
SDS örnek indirgeme tamponu (Laemmli 2X concentrate)	Sigma-Aldrich Amerika
Span® 85 (Sorbitane trioleate)	Fluka İspanya
Sodyum bikarbonat	Merck Almanya
Sodyum hidroksit	Sigma-Aldrich Almanya
Sodyum klorür	Merck Almanya
Trastuzumab (Herceptin)	Roche İsviçre
Tween® 80	Merck Almanya (Polioksietilen sorbitan monooleat)
TEMED (Tetrametiletilendiamin**)**	Applichem Almanya
Trizma baz	Sigma-Aldrich Almanya
Tripsin/EDTA	Biological Ind. İsrail
Triton ™ X-100	Sigma-Aldrich Amerika

2.1.2 Çalışmada kullanılan cihazlar

Büyük kapasiteli santrifüj	Hettich Zentrifugen (Rotina 420R) Almanya
CO2'li etüv	BINDER Almanya
Çoklu okuyucu	Perkin Elmer İngiltere (Victor X 5)
Dikey elektroforez	Cleaver Scientific İngiltere
Distile su cihazı	Millipore Amerika
Dondurucu (-20°C)	Liebherr MEDline Almanya
Dondurucu (-80°C)	New Brunswick Sci. Amerika
Floresan mikroskop	Leica 400DMI Almanya
TEM- Geçirimli elektron mikroskobu (G2 Spirit)	FEI Tecnai™ Amerika
Güç kaynağı	Consort E861 Belçika
İletkenlik ölçer	Hanna Instruments HI8820 Almanya
İnvert mikroskop	Leica DMIL Almanya
Jel dokümantasyon görüntüleme cihazı	Kodak 440CF Amerika

Laminar akış kabini	BIOWIZARD XtraLINE-130 Blue Series Finlandiya
Liyofilizatör	SCANVAC (Cool Safe 110-4 Pro Labocene) Danimarka
Manyetik karıştırıcı	Heidolph Almanya
Mikrosantrifüj	Eppendorf Almanya
Orbital Karıştırıcı	BioCote (stuart®) UK
Otoklav	Hirayama Japonya
Otomatik mikropipetler	Eppendorf Almanya
pH-metre	ThermoScientific Amerika
Rotavapor	Buchi (R-205) İsviçre
SEM (taramalı elektron mikroskobu)	Zeiss-Ultraplus Amerika
Sıvı azot tankı	Arpege 110 (Air Liquide) Fransa
Sonikatör	Sonics Amerika
Spektrofotometre (Protein miktar tayin cihazı)	Shimadzu Biotech (BioSpec-Nano) Amerika
Su banyosu	JEIO TECH (BW-10H) Kore
Vorteks karıştırıcı	Jeıo Tech Co. Çin
Zeta potansiyel ve parçacık boyutu ölçer (Malvern)	Nano Zetasizer ZS İngiltere

2.1.3 Çalışmada kullanılan besi yerleri ve solüsyonlar

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan besi yeri

DMEM ……..1,34 g.

$NaHCO_3$ (Sodyum bikarbonat)…..0,37 g.

Fetal Bovine Serum (% 10 FBS)...10 mL

% 1 penisilin-streptomisin……..1 mL

% 1 L-glutamin……1 mL

90 ml otoklavlanmış distile suda DMEM ve $NaHCO_3$ çözüldükten sonra, serum, antikor ve amino asit eklenerek, karıştırılıp filtreden geçirilir. pH 7.4'e ayarlanır. +4^{o}C'de saklanır.

PBS 10X

NaCl……80 g.

Na2HPO4.7H2O…….11.5 g.

KCl……..2 g.

KH2PO4…… …2 g.

Distile su ile 1 litreye tamamlanır, pH 7.2 ye ayarlanır. 121^{o}C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir ve +4 C'de saklanır (Sambrook ve Russell, 2001).

SDS-PAGE 5X yürütme tamponu (Running buffer)

Tris baz…….. 15 g.

Glisin……..72 g.

SDS ……5 g.

0,8 L distile suda çözülerek hacim 1 Litreye tamamlanır. pH 8.1-8.5 olması gerekir. Asit ya da baz eklenerek pH ayarı yapılmaz. Tampon +4^{o}C'de saklanır (Gomes,2010).

1.5 M Tris-HCl, pH 8.8 (Ayırma jel tamponu)

Tris bazı moleküler ağırlığı 121.1 g/mol'dür. 18.165 g Tris bazı 80 ml distile suda çözündükten sonra, 6N HCl kullanarak pH 8.8'e ayarlanır. Hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanır. 121^{o}C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilir.

0.5 M Tris-HCl, pH 6.8 (Yükleme jel tamponu)

Tris bazı moleküler ağırlığı 121.1 g/mol'dür. 6.055 g. Tris bazı 80 ml distile suda çözündükten sonra, 6N HCl kullanarak pH 6.8'e ayarlanır. Hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanır. 121^{o}C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilir.

%10 (w/v) SDS (Sodyum dodesil sülfat)

1 g SDS 10 ml distile suda çözülür. Oda ısısında saklanır.

%10 (w/v) APS (Amonyum persülfat)

1 g amonyum persülfat 10 ml distile suda çözülerek, daha küçük hacimlere bölünerek, -20^{o}C'de saklanır. Taze olarak kullanılır.

SDS-PAGE protein indirgeme tamponu

SDS örnek indirgeme tamponu (Laemmli 2X concentrate), Sigma-Aldrich, USA. Hazır kullanılmıştır.

***Coomassie Brillant Blue* jel boyama solüsyonu (500 ml)**

% 0.2 (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250 % 45 (v/v) etanol ve % 10 (v/v) asetik asit içerisinde çözdürülür. %45 hacimde distile su eklenir. Çözünmeyen parçacıkların kalması durumunda filtreden geçirilerek oda sıcaklığında saklanır.

Coomassie Brillant Blue jel yıkama solüsyonu

300 mL suya 500 mL metanol eklenir. 100 mL asetik asit eklenerek, son hacim 1 L'ye distile su ile tamamlanır. Son oranlar, distile su içinde %50 (v/v) metanol, %10 (v/v) asetik asit bulunur.

50 µS/cm iletkenliğe sahip NaCI çözeltisi

Derişik NaCl çözeltisi hazırlanır. Behere distile su koyularak manyetik karıştırıcı üzerine alınır, iletkenlik ölçen cihazın probu behere daldırılarak, elektronik ekranda 50 µS değerine ulaşana kadar sodyum klorür çözeltisi eklenmeye devam edilir. Bu sırada magnet ile sodyum klorürün homojen dağılımı sağlanır. İletkenlik 50 µS'ye ayarlanmış olunur (Olbrich ve ark., 2004).

DAPI boyama

Stok Solüsyonu (50µg/ml)

500 µg 4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride (DAPI), 10 mL metanol içinde çözülür. -20°C'de saklanır.

Boyama solüsyonu

24.5 mL Methanol

24.5 mL PBS

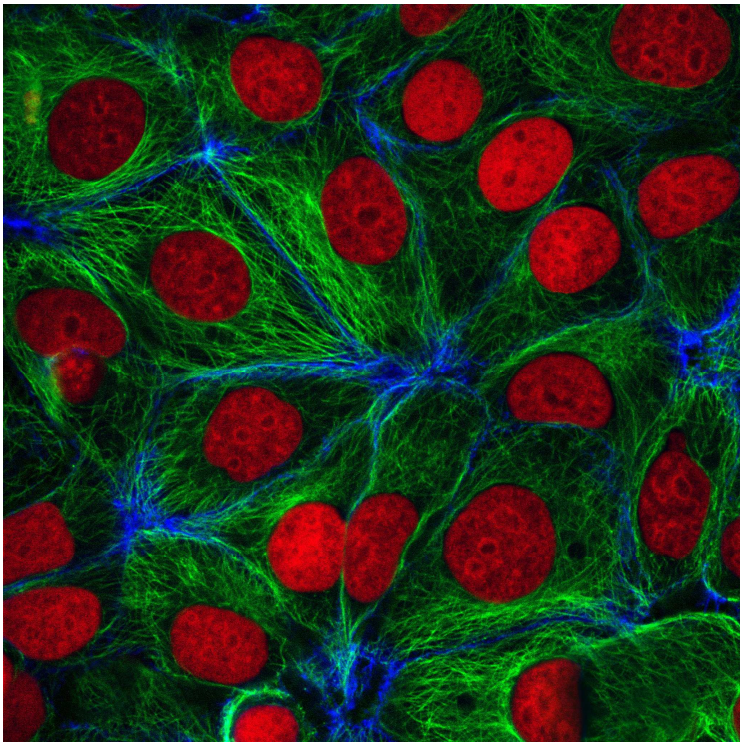
1 mL DAPI stok solüsyonundan alınarak hazırlanır.

DAPI, son konsantrasyon 0.1-1µg/ml olarak kullanılır. Tek ve çift zincirli DNA'yı boyar. DAPI uyarılma maksimum dalga boyu 340 nm, ışıma dalga boyu 588 nm'dir (http-11).

2.2 Metod

Tez çalışmasında, hazırlanan lipozom ve katı lipit nanopartiküllere trastuzumabın (Anti-HER2 antikoru) enkapsülasyonu ve adsorbsiyonun sağlanmayası çalışmaları yapılmış ve bu işlemler aşamasında kullanılan tüm fiziksel ve kimyasal koşulların genetik materyale olan etkisi araştırılması

amaçlanmıştır. Ayrıca, bu formülasyonlar kanser hücrelerine uygulanarak, sitotoksik etkilerinin ve hücrelere bağlanma özelliklerinin değerlendirilmesi yapılmıştır. Hücre olarak, metastatik insan meme kanseri hücreleri olmaları ve antikorumuzun bağlanmasında hedef olarak kullanılabilen epidermal büyüme faktörü reseptörünü (EGFR) yüzeylerinde eksprese edebilmeleri nedeniyle MCF-7 hücreleri (**Şekil 2.1**) kullanılmıştır.



Şekil 2.1. Tek tabakalı kültür ortamındaki MCF-7 hücrelerinin immunsitokimyasal yöntem ile boyanmış görüntüsü [Herhangi bir renklendirme yapılmamıştır. Yeşil: Mikrotübül, Mavi: Aktin, Kırmızı: Çekirdek yapılarını göstermektedir. Zeiss LSM 510 Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop (Prof. Dr. Alp Can ve Hakan Coşkun, Ankara Üniversitesi)]

2.2.1 Lipozom formülasyonlarının hazırlanması

Lipozomların formülasyonlarının hazırlanmasında sonikasyon yöntemi kullanılmıştır. Hazırlanan formülasyonların, bileşimleri, hazırlama ve genetik materyalin yüklenmesi yöntemleri **Çizelge 2.1**'de belirtilmiştir.

Lipit olarak, fosfolipit yapılı soya tohumu lesitini olan Phospholipon 85G® seçilmiş ve Lasıc ve Templeton (2000)'un tanımladığı yöntem kullanılmıştır. Buna göre;

- Lipit cam balon içerisinde koroform:metanol (2:1 v/v) organik faz karışımında çözündürülmüştür. Rotavaporda 41 ^{0}C su banyosu üzerinde, 90-100 rpm'de döndürülerek, yaklaşık 250 mbar basınç altında, 5 mL'lik cam balonun iç yüzeyinde lipit film tabaka oluşturulacak şekilde organik çözücünün uzaklaştırılması sağlanmıştır.
- Lipit film tabakası oluşturulan balon içine, sulu faz eklenmiş ve sonikatör yardımıyla 1.5 dakika süre ile % 20 güçte sonike edilmiştir. Süre sonunda hidrate edilen lipit film tabakadan, boş lipozom veziküllerin oluşması sağlanmıştır.

2.2.1.1 Lipozomlara katyonik özellik kazandırma

Genetik materyal-taşıyıcı sistem bileşimlerinin negatif yüklü hücre zarları ile etkileşim sağlayabilmesi için net pozitif değer taşıması gerekmektedir (Uddin, 2007). Bu amaçla, katyonik özellik taşıyan lipidik oktadesilamin, lipozom formülasyonlarına belirli oranda eklenmiştir (**Çizelge 2.1**). Lipozom formülasyonları hazırlanırken, oktadesilamin, lipit ile birlikte çözündürüldükten sonra, sonikasyon işlemine tabii tutulmuşlardır.

2.2.1.2 Lipozomlara antikorun enkapsülasyonu

Daha önce iç yüzeyinde lipit film tabaka oluşturulan 5 mL'lik cam balona, 1 mL serum fizyolojik içinde dispers edilen antikorlar **Çizelge 2.1**'de belirtilen oranlarda eklenerek ve sonikatör yardımı ile %20 güçle 1.5 dakika boyunca hidrate edilmiştir. Sonikasyon ile lipozom formülasyonu oluşturulurken, enkapsülasyon (yükleme) işlemi de gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2.1. Formülasyon çalışmalarının tablosu [K:M, kloroform:metanol; DKM, diklorometan; AO, acridine orange; FITC, Fluorescein Isothiocyanate]

	Lipitler		Yüzey Etkin Maddeler		Katyonik Ajan	Genetik Materyal	Organik Çözücü		Boyar Madde		Uygulanan Yöntemler	
Formülasyon	Phospholipon 85G® (g/2mL)	Gelucire® 50/13 (g/mL)	Tween® 80 (% g/g)	Span® 85 (% g/g)	Oktadesil amin® (g/2 mL)	Herceptin	K:M (v/v)	DKM	AO (500 µL)	FITC (500 µL)	Sonikasyon %20 Güç	Diyaliz
L0	0,02				-	-	2:1				+	
L1	0,02				0,0012	-	2:1				+	
L2	0,02				0,0012	21mg/2mL	2:1				+	
L3	0,02				0,0012	42mg/2mL	2:1				+	
L4	0,02				0,0012	-	2:1			+	+	
L5	0,02				0,0012	-	2:1		+		+	+
L6	0,02				0,0012	FITC-bağlı Anti-HER2 (680 µg)	2:1				+	
L7	0,02				0,0012	680 µg	2:1			+	+	
L8	0,02				0,0012	680 µg	2:1		+		+	+
L9	0,04				0,0012	-	2:1				+	
L10	0,04				0,0012	680 µg	2:1				+	
L11	0,04				0,0012	680 µg	2:1		+		+	+
L12	0,04				0,0012	FITC-bağlı Anti-HER2 (680 µg)	2:1				+	
L13	0,04				0,0012	680 µg				+	+	
L14	0,02				-	-			+		+	+
L15	0,02				-	680 µg			+		+	+
K1	-	0,02	1,8	1,2	0,0012	-		+			+	
K2	-	0,02	1,8	1,2	0,0012	680 µg		+			+	+
K3	-	0,02	1,8	1,2	0,0012	680 µg		+		+	+	
K4	-	0,02	1,8	1,2	0,0012	FITC-bağlı Anti-HER2 (680 µg)		+			+	Filtrasyondan sonra +

2.2.1.3 Lipozomlara acridine orange (Akridin turuncusu, AO) ve FITC (Fluorescein Isothiocyanate Isomer I)'in enkapsülasyonu

AO boyası genellikle membranlar arası pH gradiyentini belirlemede kullanılır (Barenholz, 2012). Clerc ve Barenholz'un (1998) yaptıkları bir çalışmada, lipozomlarla inkübe edilen akridin turuncusu çözeltisinin floresan yoğunluğunun, gradiyent büyüklüğünden, veziküllerin hacminden ve sıcaklıktan etkilendiği bildirilmiştir. Deneysel veriler, veziküllerin içindeki akridin turuncusu monomerlerinin birikimini ve akridin turuncusu katyonlarının sandiviç-benzeri yapısının intraveziküler şeklini tanımlamak için teorik modelle kıyaslanmıştır.

1940'lardan beri, AO sitokimyasal boya olarak kullanılmıştır. Asidik bölmeler içindeki varlığı veya asidik yapılara, nükleik asitler, kromatin ve lizozomlara bağlandığındaki karakteristik spektral değişimleri histoloji için çok kullanışlı olmuştur. Transmembran proton gradiyentleri de AO ile araştırılabilinir. 9-Aminoacridine (9-AA) de floresan spektroskopisiyle pH gradiyentini hesaplamak için prob olarak tanımlanmıştır. 9-AA'nın floresan yoğunluğu kloroplast membran veziküllerinin varlığı içinde veya transmembran pH gradiyentleriyle lipozomların içinde bastırılır (Clerc ve Barenholz, 1998).

Akridin turuncusunun floresan ışıma şiddeti 525 nm'de, uyarılım dalga boyu 490 nm'de hesaplanmıştır. AO, DNA ve RNA boyamada yıllarca kullanılmıştır, ethidium bromide'den daha kuvvetli sinyal verir fakat jelin çok yıkanması gerekir. (Azevedo ve ark., 2010).

Acridine orange (1 mg/1 mL) boyası distile suda dağıtılmıştır. Lipozom formülasyonu aşamasında, AO çözeltisinden 500 µl alınarak sulu faza eklenmiş ve % 20 güçle 1.5 dk. süresince sonikasyon ile enkapsülasyon gerçekleştirilmiştir.

FITC 1 mg/1 mL konsantrasyonda, pH'sı 8-9 arasında ayarlanmış olan distile suda dağıtılarak aynı işlemle enkapsüle edilmiştir.

AO'nun pozitif ve negatif yüklü lipozom formülasyonlarına yüklenmesindeki amaç, oluşturulan nano boyutlu lipit yapıdaki lipozom veziküllerin hücreye endositozla alınıp alınmadığının tespit edilmesidir. Hücre yüzeyi negatif olduğundan dolayı, pozitif yüzey yüküne sahip lipozomların endositoz edilmesi beklenmiştir.

2.2.2 KLN formülasyonlarının hazırlanması

KLN formülasyonlarının hazırlanmasında da sonikasyon tekniği kullanılmıştır. Hazırlanan formülasyonlarda katı lipit olarak % 2 oranında Gelucire® 50/13 ve yüzey etkin madde olarak Tween®80 ve Span®85 karışımı kullanılmıştır (Çizelge 2.1). Gelucire® 50/13 katı lipiti 5 mL'lik balon içerisinde 500 µL DKM içinde çözündürülmüştür. Yüzey etkin madde karışımı bir mikrotüp içinde 1 mL distile su içinde dağıtılmıştır. Daha sonra yağlı ve sulu faz sonikatör yardımıyla 1.5 dakika süre ile % 20 güçte sonike edilmiştir. Süre sonunda oluşan süspansiyonlar rotavapora aktarılmış ve yaklaşık 250 mbar basınçta, 30 dakika kadar ve 41°C su banyosu üzerinde 60 rpm'de karıştırılarak organik çözücünün uzaklaşması sağlanmıştır. Oluşan dispersiyon 0.22 µm filtreden geçirilmiş ve diyaliz membranına (*Medicell İnt. Ltd., 12-1400 Da, 15.9 mm:30M*) aktarılarak 2 gün distile su içerisinde manyetik karıştırıcıda diyalizedilmiştir.

2.2.2.1 KLN'lere katyonik özellik kazandırma

Gelucire® 50/13 lipitleri anyonik özelliktedir (Chen ve ark., 2010). Genetik materyalin bu maddelere elektrostatik olarak tutunmasının sağlanması ve negatif yüzey yüküne sahip olan hücrelere aynı etkileşim ile tutunması için katyonik özellik kazandırılması gerekmektedir (Uddin, 2007). Bu amaçla, katyonik özellik taşıyan lipidik oktadesilamin DKM içinde lipit ile birlikte çözündürülerek KLN formülasyonu hazırlanmıştır.

2.2.2.2 KLN'lere antikorun enkapsülasyonu

Katı lipit nanopartiküllere antikor enkapsülasyonu için, % 2 Gelucire® 50/13 katı lipiti 500 µL DKM içerisinde çözündürülmüş ve Çizelge 2.1'de belirtilen oranlarda yüzey etkin madde içeren ve 680 µg antikor eklenmiş sulu faza % 20 güç uygulanarak 1.5 dakika sonikasyon işlemi uygulanmıştır. Oluşturulan dispersiyonlar rotavapora aktarılmış ve organik çözücünün uzaklaştırması için yaklaşık 250 mbar'da 30 dakika kadar ve 41^0C su banyosu üzerinde 60 rpm'de karıştırılarak bekletilmiştir.

Oluşan dispersiyon 0.22 μm filtreden süzülerek diyaliz membranına aktarılmıştır. Distile su içerisinde ve manyetik karıştırıcıda organik çözücü kalıntılarının giderilmesi için 2 gün diyalize bırakılmıştır.

2.2.3 Formülasyonların karakterizasyonu

Bu bölümde hazırlanan formülasyonların parçacık büyüklüğü ve dağılımı, yüzey özelliği ve zeta potansiyeli gibi fizikokimyasal özellikleri belirlenmiştir.

2.2.3.1 Parçacık boyutu ve dağılımı

Hazırlanan formülasyonlarda parçacık boyutu ve dağılımı foton korelasyon spektroskopisi kullanılarak ölçülmüştür. Ölçümlerde pH 7.4 ve 50 μS iletkenliğe sahip 0.22 μm filtreden geçirilmiş distile su kullanılmıştır. 100 μL formülasyon örneği 1 mL distile su içerisinde dağıtılmış ve 25^{o}C'de gerçekleştirilen 100 ölçümün ortalaması alınacak şekilde ayarlanmış *Zetasizer cihazı* ile ölçümler 3 kez tekrarlanmıştır.

2.2.3.2 Zeta potansiyel

Zeta potansiyel ölçümü *Zetasizer cihazı* kullanılarak yapılmıştır. Elektrostatik hareketliliğin zeta potansiyeline dönüştürülmesinde *Helmholtz-Smulochowski* eşitliği kullanılmıştır. 20 ölçümün ortalaması alınacak şekilde ayarlanan cihazda ölçümler 3 kez tekrarlanmıştır. Distile sudaki iletkenliğin neden olabileceği küçük değişimlerin ölçüm sonuçlarını etkilememesi için kullanılan distile su ölçümden önce 50 μS iletkenliğe NaCI ile ayarlanmış ve formülasyon bu su ile seyreltilmiştir (1:10) (Olbrich ve ark., 2004).

2.2.3.3 Morfolojik inceleme

Nanopartiküllerin morfolojik değerlendirmeleri taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile mümkündür (Ekambaram ve ark., 2012; Feijen ve ark., 2011). Tez çalışmasında elde edilen formülasyonların morfolojik incelemesi TEM ve SEM yardımıyla yapılmıştır.

TEM analizi için, 5 mL distile su içerisinde ultrasonik banyoda disperse edilen örnekler 300 mesh'lik karbon grid üzerine damlatılarak havada kurutulmuş ve çeşitli büyütmelerde incelenmiştir. TEM analizi Anadolu Üniversitesi Bitki, İlaç ve Bilimsel Araştırma Merkezi'nde (AÜBİBAM) yapılmıştır.

Taramalı Elektron Mikroskobunda (SEM) görüntü, yüksek voltaj ile hızlandırılmış elektronların numune üzerine odaklanması, bu elektron demetinin numune yüzeyinde taratılması sırasında elektron ve numune atomları arasında olusan çeşitli girişimler sonucunda meydana gelen etkilerin uygun algılayıcılarda toplanması ve sinyal güçlendiricilerinden geçirildikten sonra bir katot ışınları tüpünün ekranına aktarılmasıyla elde edilir. Modern sistemlerde bu algılayıcılardan gelen sinyaller dijital sinyallere çevrilip bilgisayar monitörüne verilmektedir. Gerek ayırım gücü (resolution), gerek odak derinliği (depth of focus) gerekse görüntü ve analizi birleştirebilme özelliği, taramalı elektron mikroskobunun kullanım alanını genişletmektedir. Örnegin 1000X büyütmede optik mikroskobun odak derinliği yalnızca 0.1 μm iken taramalı elektron mikroskobunun odak derinliği 30 μm'dir. Günümüzde modern taramalı elektron mikroskoplarının ayırım gücü 0,05 nm'ye kadar inmiştir.

Büyütme miktarı ise 5X-300000X arasında değişmektedir (http-9).

Tez çalışmasında elde edilen formülasyonların SEM görüntülemesi, Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü'nde yapılmıştır.

Taramalı elektron mikroskopta, katı numune yüzeyi raster düzeninde yüksek enerjili bir elektron demeti ile taranır. Bu teknikte yüzeyden çeşitli tür sinyaller oluşturulur. Bunlar geri saçılmış elektronlar, ikincil elektronlar, Auger elektronları, X-ışını floresans fotonları ve değişik enerjili diğer fotonlardır.

Emülsifikasyon tekniği ile elde edilen katı lipit nanopartiküllerin ve lipozomların etken madde yüklenmemiş şekilde ve etken madde yüklenmiş şekilde, yüzey morfolojisi Zeiss-Ultraplus taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak belirlenmiştir. Sentezlenen nanopartiküller -110 ^{0}C'de 24 saat liyofilizatörde kurutularak liyofilize toz haline dönüştürülmüştür ve örnek haznesine yerleştirildikten sonra vakum altında yaklaşık 100 Å kalınlığında altın tabakası ile kaplanmıştır. Daha sonra taramalı elektron mikroskobu ile görüntüleri

alınmıştır. Ayrıca oluşturulan nano boyutlu partiküller, oda ısısında havada kurutularak aynı yöntemle SEM görüntüleri alınmıştır.

2.2.4 Enkapsüle antikorun formülasyonlardan ekstraksiyonu

Sonikasyon işleminin genetik materyalin kırılmasına neden olduğu belirtilmiştir (Gvili ve ark., 2006). Sonikasyon yöntemiyle lipozom ve KLN'lere antikor yüklenmesi çalışması sırasında antikorlarda oluşabilecek hasarın ve kaybın belirlenmesi amacıyla *Ekstraksiyon yöntemi* geliştirilmiştir.

Lipozom formülasyonundan izolasyon: Dispersiyon ile eşit hacimde Kloroform organik çözücüsü mikro tüpe eklenerek, yavaşça alt üst edilerek karıştırılmıştır. 12.000 rpm'de, 15 dk. süre ile + 4 ^{0}C'de santrifüj edilmiştir. Farklı santrifüj hızlarında (1000-14000 rpm) ve farklı sürelerde (2-30 dk.) denemeler yapılarak, optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Tüpün üst kısmında bulunan sulu faz farklı bir mikro tüpe alınarak, organik fazdan uzaklaştırılmıştır.

Katı lipit nanopartikül formülasyonundan izolasyon: Dispersiyon ile eşit hacimde diklorometan (DKM) organik çözücüsü mikro tüpe eklenerek, yavaşça alt üst edilerek karıştırılmıştır. 12.000 rpm'de, 20 dk. süre ile + 4 ^{0}C'de santrifüj edilmiştir ve sulu faz farklı bir mikro tüpe alınarak, organik faz atılmıştır.

Her iki ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen sulu faz protein miktar tayini için kullanılan Spektrofotometre (Shimadzu Biotech, BioSpec-Nano) cihazında, 280 nm dalga boyunda ve 0.7 mm pathlength ile ölçülerek protein antikor (protein) miktarı belirlenmiştir.

Aynı yöntemler çıplak antikora da uygulanarak ekstraksiyon işlemlerinin antikor üzerinde etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır.

2.2.5 Antikorun amonyum sülfat ile çöktürülmesi

Amonyum sülfat çöktürmesinin yapılış amacı, trastuzumab (mAb) etken maddesini içeren ve ticari satış adı Herceptin olan ilacın içeriğindeki yardımcı maddelerden (L-histidin hidroklorur, L-histidin, α,α trehaloz dihidrat, polisorbat 20) ayrıştırarak, monoklonal antikoru saflaştırmaktır.

Ortama eklenecek nötral bir tuz, genellikle denatürasyona yol açmadan, proteinlerin agregasyonuna (biraraya gelmelerine) ve çözeltiden ayrılarak

çökmelerine yol açar. Amonyum sülfat, belirli doygunluk derecelerine göre belirli proteinlerin çökelmesini sağlayan 2 değerlikli, çok kullanılan bir tuzdur.

Farklı proteinler farklı tuz konsantrasyonlarında çökerler. Etkinliği ve çözünürlüğü yüksek, pH'yı fazla etkilemeyen, çözeltide fazla ısınmaya yol açmayan, ucuz ve etkin bir tuz olan amonyum sülfat kullanılır.

Çözeltinin istenilen konsantrasyona (% doygunluğa) ulaşması için eklenmesi gereken tuz miktarı hesap yoluyla ya da bu amaçla hazırlanmış bir Tablodan yararlanılarak kolaylıkla bulunabilir.

Bir çok protein % 55 amonyum sülfat doygunluğunda çöker.

4 M derişimde amonyum sülfat [$(NH_4)_2SO_4$] çözeltisi hazırlanışı:

$(NH_4)_2SO_4$ molekül ağırlığı (MA);

N: 14 g/mol

H: 1 g/mol

S: 32 g/mol

O: 16 g/mol

$MA_{(NH4)2SO4}$ =(2x14)+(8x1)+32+(4x16)=132 g/mol.

Moleküler ağırlığı hesaplanan amonyum sülfatın 100 mL çözeltisini hazırlamak için kullanılması gereken miktar belirlenir.

$$\text{Molarite} = \frac{\text{m(gram)/MA(g/mol)}}{\text{Hacim (Litre)}} \qquad (2.1)$$

$$4\ \text{M} = \frac{\text{m/ 132 (g/mol)}}{\text{0,01 L}}\ ,\ \text{m} = 5{,}28\ \text{gram} \qquad (2.2)$$

Denklem (2.1)'de formüldeki birimler gösterilmiştir. Buna göre, (2.2)'de miktar belirlemek için rakamlar yerine konarak sonuç hesaplanır. 5,28 g. amonyum sülfat tartılarak, hacim 100 mL'ye tamamlanıp 38 ^{0}C'de manyetik karıştırıcıda iyice karıştırılarak çözelti doymuş hale getirilir. 0-30 ^{0}C arasında amonyum sülfatın çözünürlüğü değişmemektedir.

Derişik amonyum sülfat çözeltisi ve serum fizyolojikte dağıtılan trastuzumab eşit hacimlerde mikro tüpte karıştırılarak, 14.000 rpm'de 30 dk.

boyunca santrifüj edilmiştir. Üst faz uzaklaştırılarak elde edilen antikor pelleti istenilen tamponda dağıtılmıştır.

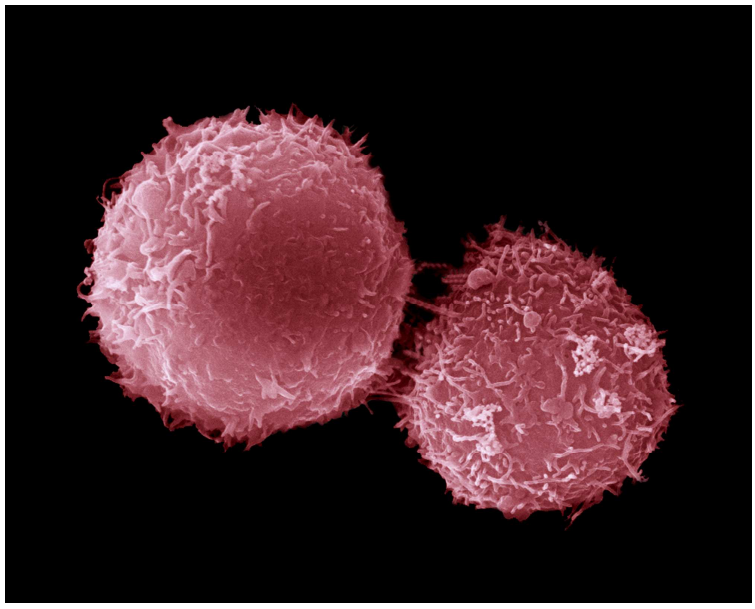
2.2.5.1 Diyaliz işlemi

Amonyum sülfat çöktürmesinden sonra saf olarak elde edilen trastuzumab (mAb), tuzdan arındırmak amacı ile diyaliz membrana alınarak 2 gün boyunca saf suda diyaliz edilmiştir. Daha sonra formülasyonlara yükleme işlemi gerçekleştirilmiştir.

2.2.6 Hücre kültürü çalışmaları

Seçilen kanser hücresinin (MCF-7, human breast cancer cell line) üretiminde ve formülasyonların uygulanmasında hücre kültür tekniğinden yararlanılmıştır.

Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Teknolojisi Bölümü, Prof. Dr. İmran Vural'dan alınan MCF-7 hücrelerinin, DAPI boyama ile mikoplazma kontrolü yapılmıştır. Yapılan kontrol neticesinde hücrelerde kontaminasyona rastlanmamıştır.



Şekil 2.2. Tek tabakalı kültür ortamında yeni bölünmüş olan MCF-7 hücrelerinin Taramalı Elektron Mikroskobu görüntüsü [Mikrograf, Adobe CS5 programı ile işlenip, renklendirme yapılmıştır. LEO 438 VP (Prof. Dr. Alp Can ve Hakan Coşkun, Ankara Üniversitesi)]

Hücre kültürü tekniği

1. Hücreler % 10 FBS, % 1 penisilin-streptomisin ve % 1 L-glutamin içeren DMEM'de kültüre edilmiştir.
2. Hücre kültürü 37°C'de % 5 CO_2 ve % 95 hava içeren atmosfer ortamında yapılmıştır.
3. Hücreler hızlı büyüme fazına ulaştıktan sonra 1X Tripsin/EDTA çözeltisi ile muamele edilip alt kültürlere (1:3 oranında) ayrılmıştır.
4. Kullanılmayan alt kültürler hücre stoğu olarak -196 °C'de sıvı azot tankında uzun süre için saklanmıştır.

Alt kültüre ayırma tekniği (75 cm^2 flasklar için)

1. Kültür mediumu uzaklaştırılır,
2. Kısa süre için 0.25% (w/v) Trypsin - 0.53 mM EDTA solüsyonu ile hücre tabakası hafifçe yıkanır, tripsin inhibitörü içeren serumun tümü uzaklaştırılır,
3. 2-3 mL Trypsin-EDTA solüsyonu flaska eklenir ve invert mikroskopta hücre tabakası kalkana kadar gözlenir (5-10 dk.),

Not: hücreleri kaldırmak için vurmaktan ve karıştırmaktan kaçınılmalıdır.

4. 6-8 mL büyütme mediumu eklenir ve kibarca pipetlenerek hücreler çekilir,
5. Hücre süspansiyonu santrifüj tüpüne aktarılır ve yaklaşık 125xg'de 5-10 dakika santrifüj edilir. Süpernatant dökülür,
6. Hücre peleti taze besi yeriyle tekrar süspanse hale getirilir. Uygun miktarlarda hücre süspansiyonu yeni kültür flasklarına eklenir.
7. 37°C'de inkübe edilir.

Altkültür oranı: 1:3 – 1:6 oranı önerilmektedir.

Besiyeri yenilenmesi: her hafta 2-3 kez önerilmektedir (http-10).

Saklama için; büyütme mediumu, %5 (v/v) DMSO ile tamamlanır.

Stok ısısı: sıvı nitrojen buhar fazıdır.

2.2.6.1 Sitotoksisite çalışmaları

Günümüzde MTT olarak bilinen 3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromür yöntemi ilk olarak Mosmann tarafından tanımlanmış ve daha sonra Alley ve ark. tarafından geliştirilmiştir. Hücre biyolojisinde

sitotoksisite, hücre canlılığı ve proliferasyonun değerlendirilmesinde en çok kullanılan yöntemdir (Olbrich ve ark., 2004; Stockert ve ark., 2012).

MTT, hücrelere aktif olarak absorbe olan ve mitokondriye bağlı reaksiyon ile renk veren, suda çözünmeyen formazana indirgenen bir maddedir. Bu yöntem canlı hücrelerde mitokondrinin, MTT boyasının tetrazolyum halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır. Parçalanma sonucu soluk sarı renkli MTT boyası koyu mavi-mor formazana indirgenmektedir. Canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renkte boyanırken, ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler boyanmamaktadır. Hücrelerin MTT indirgeme özelliği hücre canlılığının bir ölçütü olarak değerlendirilir ve MTT analizi sonucunda elde edilen boya yoğunluğu canlı hücre sayısı ile doğru orantı gösterir (Yao ve ark., 2011; Uchida ve ark., 2009).

Hazırlanan formülasyonların hücre canlılığına etkisi MCF-7 insan göğüs kanseri hücrelerinde tetrazolyum tuzu testi (MTT) ile araştırılmıştır.

1. Hücreler kültüre edildikten sonra % 10 FBS içeren DMEM besiyerinde süspansiyon haline getirilmiş ve *Thoma* lamı ile hücre sayımı yapılmıştır. Hücre süspansiyonu 96 kuyucuklu hücre kültür plakalarının her kuyucuğuna 8000 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiştir.
2. 1-günlük üreme periyodunun ardından sitotoksik etkiyi incelemek için hücre süspansiyonunun üzerine farklı konsantrasyonlarda formülasyon 2. gün eklenmiş ve formülasyon ile muamele edilmeyen kontrol hücreleri ile birlikte 37°C'de % 5 CO2 ve % 95 hava içeren atmosfer ortamında 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır.
3. 24-48 saatlik inkübasyon süresi sonunda her bir kuyucuğa 25 µL (5 mg/mL) MTT boyası eklenmiş ve MTT boyasının canlı hücreler tarafından formazan tuzu haline dönüştürülebilmesi için 37°C de 2 saat inkübe edilmiştir.
4. Bu sürenin sonunda formülasyon MTT kuyucuklardan uzaklaştırılmış ve her bir kuyucuğa 150 µL DMSO eklenerek plaka okuyucuda (ELISA) 570 nm dalga boyunda renk değişimi belirlenmiştir (Yao ve ark., 2011).
5. Deney her bir derişim için 8 kuyuda yapılmış ve 3 kez tekrar edilmiştir.

2.2.6.2 AO ve FITC yüklü nanopartiküllerin hücrelere uygulanması

Formülasyonların hücrelere geçiş özelliğinin belirlenmesinde geniş alanda gözlem yapmak amacıyla $5x10^5$ hücre/kuyu olacak şekilde 6'lı plakalara ekim yapılmıştır. L4, L5, L7, L8, L11, L13, L14 ve L15 formülasyonlarının, daha önce 96'lı plakalarda yapılan hücre kültürü çalışmaları ile %50 canlılık içeren konsantrasyonları 1,5 mL %10 serum içeren besi yerinde dağıtılmış ve hücrelere uygulanmıştır. İnkübasyon 24 ve 48 saat olarak belirlenmiş ve hücrelere geçiş etkileri floresan mikroskobu görüntüleme yöntemi ile tespit edilmiştir.

2.2.7 SDS-PAGE yöntemi

Bu çalışmada antikorların yapısal değişimlerini belirlemek için en popüler PAGE (*Polyacrilamide Gel Electrophoresis*) yöntemlerinden birisi olan sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforezi (SDS-PAGE) kullanılmıştır.

Proteinlerin elektroforetik ayrımında nişasta, agaroz ve selüloz asetat gibi çeşitli jeller kullanılmakla birlikte, genelde en iyi ayrışımın sağlandığı poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) tekniği uygulanır.

PAGE'de destek matrisi olan poliakrilamid, akrilamid monomerlerinin çapraz bağlayıcı ("cross-linker") moleküller (N,N'-metilen-bis-akrilamid, kısaca bis) yardımıyla kovalent olarak bağlanmasından oluşan bir polimerdir.

Bu yöntem proteinlerin saflığının kontrolü ve moleküler ağırlıklarının saptanması amacıyla kullanılır (Göçmen ve ark., 2008). Akrilamit ve N-N'-metilen bis-akrilamit monomerlerinin polimerleşmesiyle oluşan jel matrisde elektrik akımı yardımıyla proteinler büyüklüklerine göre ayrılır. Polimerizasyon başlatıcı/katalizör (amonyum persülfat ve TEMED) sistemi yardımıyla gerçekleşir. SDS elektroforezde diğer sistemlerden farklı olarak örnek hazırlama tamponuna bir miktar SDS eklenir. SDS örnekteki protein molekülünün etrafında boşluk kalmayacak şekilde katman oluşturarak negatif yüklenmesini sağlar. Böylece ayrışma, moleküllerin kendi yüklerinden bağımsız bir şekilde, molekül ağırlıklarına göre gerçekleşir. Akım geçirildiğinde jel matrisi içinde bulunan proteinler farklı büyüklükteki porlardan büyüklüklerine göre farklı geçiş hızları

gösterir (Çizelge 2.2). Buna göre küçük proteinler jelde hızlı, büyük proteinler ise yavaş ilerler (Wenk ve Fernandis, 2007).

Çizelge 2.2. Protein molekül ağırlıklarına göre hazırlanan ayırma jeli yüzdeleri tablosu (Laemmli, 1970)

Jel Yüzdesi	%7	%10	%12	%15
Molekül Ağırlık Aralığı (kDa)	50 kDa - 500 kDa	20 kDa - 300 kDa	10 kDa - 200 kDa	3 kDa - 100 kDa

SDS-PAGE yöntemi (Laemmli, 1970)

Kullanılan çözeltiler

Ayırma jeli (%12 Acrylamide, 30 mL)

Distile su 10.2 mL

% 30 Akrilamit/bisakrilamit 12 mL

1.5 M Trizma baz 7.5 mL

% 20 SDS (w/v) 0.15 mL

% 10 APS 0.15 mL

TEMED 0.02 mL

Yükleme jeli (%4 Acrylamide, 10 mL)

Distile su 6.15 mL

% 30 Akrilamit/bisakrilamit 1.34 mL

0.5 M Tris-HCl 2.5 mL

% 20 SDS 0.05 mL

% 10 APS 0.05 mL

TEMED 0.01 mL

10X Yürütme tamponu (Running buffer, pH 8.5)

200 mM Glisin 144 g

25 mM Tris baz 30.2 g

% 0.1 SDS (w/v) 1 g

Tris bazı ve glisin tartılarak üzerine 1 L'ye yakın bir hacimde distile su eklenir. Daha sonra SDS eklenerek yaklaşık 10 dk. karıştırılır. Hacim 1 L'ye tamamlanarak 2-3 dak. daha karıştırılır. SDS bir deterjandır, bu nedenle, koruyucu önlem alınarak tartım yapılmalıdır ve havaya karışması önlenmelidir. pH kontrol

edilmelidir, pH 8.1-8.5 arasında olmalıdır, asit veya baz eklenmemelidir (Gomes, 2010).

Brillant Blue çözeltisi (jel boyama solüsyonu)

% 0.2 (w/v) Coomassie Brilliant Blue, % 45 (v/v) etanol/metanol ve % 10 (v/v) asetik asit içerisinde çözdürülür. Çözünmeyen parçacıkların kalması durumunda filtreden geçirilerek oda sıcaklığında saklanır (Ergen, 2013).

Brillant blue	0.002 g
Metanol:Distile su (1:1)	90 mL
Glasiyel asetik asit	10 mL

Jel yıkama solüsyonu

300 mL suya 500 mL metanol eklenir. 100 mL asetik asit eklenerek, son hacim 1 L'ye distile su ile tamamlanır. Son oranlar, distile su içinde %50 (v/v) metanol, %10 (v/v) asetik asit bulunur. Jel boyandıktan sonra, ayırma jeli boyama solüsyonundan çıkartılıp, yıkama solüsyonuna aktarılır ve arka plandaki renk açılana ve protein bantları ayırt edilene kadar yıkama solüsyonu yenilenerek 3D orbital çeviricide yıkamaya devam edilir.

SDS için protein örneklerinin ve işaretleyicinin (marker) hazırlanması

1. Mikrotüp içerisine yaklaşık 10 μg protein konulmuş ve üzerine 2 X yükleme tamponundan 20 μL eklenmiştir.
2. Tüpler yaklaşık 90^{o}C'de 4 dakika bekletilmiştir.
3. Oda ısısına gelene kadar yüklemeden önce bekletilmiştir.
4. Diğer bir tüpe 10 μL distile su ile karıştırılan işaretleyici (marker) konulmuştur.

Hazırlanan örnekler, son hacimde 40 μL olacak şekilde ayarlanmıştır.

SDS-PAGE'in uygulanması;

1. Jel hazırlanmadan önce cam plakalar distile su ile yıkanmış ve kurulanmıştır. Camlar jel kasetine yerleştirilmiş ve sıkıca tutturulmuştur. Herhangi bir sızıntı olup olmadığı distile su ile kontrol edilmiştir.
2. Sırasıyla, distile su, SDS, Tris ve akrilamit tüpe konularak iyice karışmaları sağlanmıştır. En son APS ve TEMED eklenerek ayırma jeli hazırlanmıştır.
3. Ayırma jeli (%12'lik) plakalar arasına pipet yardımı ile hiç hava kabarcığı kalmayacak şekilde dökülmüştür.

4. Tarakların yaklaşık 1 cm altına kadar ayırma jeli doldurulduktan sonra üzerine izopropanol eklenerek hava ile temas kesilmiş ve polimerleşme için 1 saat beklenmiştir.
5. Ayırma jeli polimerize olduktan sonra kaset eğilerek izopropanol dökülür. Ayırma jelinin üst tarafı distile su ile dikkatlice yıkanarak alkol kalıntılarından temizlenir ve kurutma kağıdı yardımı ile dikkatlice kurutulur.
6. Yükleme jeli (%4'lük) için karışım üstteki sırayla hazırlandıktan sonra yine mikropipet yardımıyla dökülmüş ve taraklar dikkatlice yerleştirilmiştir. Polimerleşme için 1 saat beklenmiştir.
7. Daha sonra kaset tank içerisine yerleştirilmiş ve tank yürütme tamponu ile doldurulmuştur. Taraklar dikkatlice çıkarılmıştır.
8. Örnekler mikropipet yardımı ile kuyulara yüklenmiştir.
9. Örnekler önce 90 V ve 25 mA'de (bromofenol mavisi yürütme jelinin en altına gelinceye kadar) jelde yaklaşık 30 dk. yürütülmüştür. Daha sonra 150 V'a çıkarılarak 3 saat yürütme yapılmıştır.
10. Yürütme işlemi bittikten sonra jel dikkatlice tanktan çıkarılmış ve tarak kısmı koparılarak atılmıştır.
11. Yürütme işlemi sonunda jel *brillant blue* ile boyanmıştır.

Jelin Brillant Blue G ile boyanması

1. Jel elektroforezden çıkarıldıktan sonra doğrudan plastik kap içerisine alınmıştır.
2. Kabın içine hazırlanan *Brillant Blue* çözeltisi konulup kap çalkalayıcı üzerine alınmıştır.
3. Çalkalayıcı üzerinde bantlar görülünceye kadar yaklaşık 1 saat çalkalanmıştır.

3 BULGULAR

3.1 Lipozomlarla Yapılan Karakterizasyon Çalışmaları

Bu bölümde lipozomlara ait partikül boyutu ve dağılımları ve zeta potansiyellerine ait bulgular verilmiştir.

3.1.1 Lipozomların parçacık boyutu ve dağılım bulguları

Lipozomlar genellikle kararlı değildirler. Zamanla tanecik boyutlarında farklılaşma görülmektedir. Örneğin küçük veziküller daha büyük olarak biçimlenmeye, büyük olanlar da küçülmeye eğilimli olurlar ancak bu kalite açısından çok önemli değildir, çünkü veziküllerin bağlı olduğu fosfotidilkolinlerin özelliği genellikle değişmez kalır. Ancak kararlılığı en iyi 100–300 nm arasında gibi görünmektedir (Kshirsagar, 2000).

Bu bölümde elde edilen bulgulara **Bölüm 2.2.3.1**'de anlatılan yöntem uygulanılarak ulaşılmıştır.

Çizelge 3.1. Lipozomların ortalama parçacık büyüklüğü ve polidispersite indisi

	L0	L1	L2	L3	L4
Ortalama Parçacık Boyutu (nm) ±SH	236,3 nm ±36.4	143 nm ±13.4	158,4 nm ±13.41	151,7 nm ±17.82	687,2 nm ±24.3
PDI ±SH	0,395 ±0.01	0,368 ±0.01	0,421 ±0.01	0,386 ±0.01	0,674 ±0.02

	L5	L6	L7	L8	L9
Ortalama Parçacık Boyutu (nm) ±SH	146 nm ±16.87	143,5 nm ±5.35	1724,00 nm ±4.2	125,5 nm ±9.45	186,6 nm ±23.1
PDI ±SH	0,393 ±0.02	0,431 ±0.01	1,000 ±0.02	0,336 ±0.01	0,490 ±0.01

Çizelge 3.1. (Devam) Lipozomların ortalama parçacık büyüklüğü ve polidispersite indisi

	L10	L11	L12	L13
Ortalama Parçacık Boyutu (nm) ±SH	185 nm ±13.5	131,9 nm ±12.45	223 nm ±24.1	560,9 nm ±13.12
PDI ±SH	0,412 ±0.01	0,375 ±0.01	0,421 ±0.01	0,567 ±0.01

	L14	L15
Partikül Boyutu (nm) ±SH	159,4 nm ± 7.33	531,3 nm ±15.38
PDI ±SH	0,484 ±0.01	0,556 ±0.02

SH: Standart Hata, PDI: Polidispersite İndisi, n=3

L2 ve L3 formülasyonları için stabilite gözlemleri yapılmıştır. Aşağıdaki tabloda değerler verilmiştir.

Çizelge 3.2. L2 ve L3 formülasyonlarının zamana bağlı boyut stabilite ölçümleri

Tarih	22.01.2013	13.05.2013	03.07.2013
L2 boyut ±SH	155,1 nm ±2.74	140,7 nm ±3.55	167,5 nm ±1.32
L3 boyut ±SH	190,5 nm ±12.8	158,4 nm ±3.35	161 nm ±3.51

SH, standart sapma n=3

Çizelge 3.3. L2 ve K2 formülasyonlarının liyofilizayon sonrası partikül boyutu değişimleri

	Liyofilizasyon öncesi boyut (nm)	Liyofilizayon sonrası boyut (nm)
L2 ±SH	155,1 nm ±13.41	961,3 nm ±39.72
K2 ±SH	188,1 nm ±6.08	160,6 nm ±17.34

SH, standart sapma n=3

Lipozom formülasyonunun liyofilizasyon sonrası boyutunun büyüdüğü gözlenirken, katı lipit nanopartikül formülasyonunun liyofilizasyon sonrası boyutunun küçüldüğü gözlenmiştir.

3.1.2 Lipozomların zeta potansiyel bulguları

Hazırlanan formülasyonların zeta potansiyeli değerlendirmeleri Çizelge 3.4'de verilmiştir. Zeta potansiyel ölçümleri elektriksel alan içerisindeki elektroforetik hareketlerden yararlanılarak Bölüm 2.2.3.2'de anlatıldığı gibi ölçülmüştür ve birimi milivolttur (mV) (Çelebi, 2002; Öner, 2004).

Çizelge 3.4. Lipozomların zeta potansiyel ölçüm değerleri

	L0	L1	L2	L3	L4
Zeta potansiyel (mV) ±SH	-34,4 mV ±1.20	84,1 mV ±0.67	59,2 mV ±1.69	53,2 mV ±2.49	7,38 mV ±2.2
	L5	L6	L7	L8	L9
Zeta potansiyel (mV) ±SH	83,2 mV ±1.34	49,2 mV ±1.2	1,42 mV ±0.79	53,7 mV ±0.76	46,6 mV ±0.90

	L10	L11	L12	L13	L14	L15
Zeta potansiyel (mV) ±SH	47,1 mV ±1.19	55,2 mV ±1.03	28,5 mV ±0.94	3,06 mV ±1.09	-26,1 mV ±2.34	3,86 mV ±2.48

SH: Standart Hata, PDI: Polidispersite İndisi, n=3

Çizelge 3.5. L2 ve L3 formülasyonlarının zamana bağlı zeta potansiyeli (mV) stabilite ölçümleri

Tarih	22.01.2013	13.05.2013	03.07.2013
L2 ±SH	50,9 mV ±0.88	55,5 mV ±1.60	53 mV ±2.00
L3 ±SH	54,8 mV ±0.65	59,2 mV ±3.00	49,9 mV ±1.48

SH, standart sapma, n=3

Çizelge 3.6. L2 ve K2 formülasyonlarının liyofilizayon sonrası zeta potansiyeli değişimleri

	Liyofilizasyon öncesi zeta potansiyeli (mV)	Liyofilizayon sonrası zeta potansiyeli (mV)
L2 ±SH	53 mV ±1.69	61,4 mV ±2.12
K2 ±SH	14,1 mV ±2.6	27,2 mV ±1.21

SH, standart sapma, n=3

L2 ve K2 formülasyonlarının liyofilizayon sonrası zeta potansiyellerinin yükseldiği gözlenmiştir.

3.2 KLN'lerle Yapılan Karakterizasyon Çalışmaları

Bu bölümde lipozomlara ait partikül boyutu ve dağılımları ile zeta potansiyellerine ait bulgulara yer verilmiştir.

3.2.1 KLN'lerin parçacık boyutu ve dağılım bulguları

Sonikasyon ile nanopartikül hazırlama tekniğinde oktadesilamin miktarının parçacık boyutunun büyümesinde etkili olmadığı, oktadesilamin miktarının artması ile yüzey yükünün arttığı bilinmektedir (Şenel, 2012). Oktadesilamin miktarı sabit tutularak, KLN'ler hazırlanmıştır.

Çizelge 3.7. KLN'lerin ortalama parçacık büyüklüğü ve polidispersite indisi

	K1	K2	K3	K4
Ortalama Parçacık Boyutu (nm) ±SH	347,1 nm ±30.8	299 nm ±6.08	216,2 nm ±7.4	303,5 nm ±13.2
PDI ±SH	0,551 ±0.01	0,370 ±0.01	0,307 ±0.01	0,457 ±0.01

SH: Standart Hata, PDI: Polidispersite İndisi, n=3

Literatürde diyaliz işleminin polidispersite indisini etkilediği rapor edilmiştir (Legrand ve ark., 2007). Bu çalışmada, katı lipit nanopartiküllerden K2 ve K4'e uygulanan diyaliz işleminden sonra, polidispersite indisinin düştüğü

saptanmıştır. Diyaliz işleminin, organik çözücü ile hazırlanan formülasyonda ortamda organik çözücü artığının kalmasının sitotoksisiteyi arttırdığı (Legrand ve ark., 2007; Almeida ve Souto, 2007) bilgisinden yola çıkılarak yapılması gerekli görülmüştür.

Partikül boyutu ve zeta potansiyeli uygun aralıkta bulunan formülasyonlar için diyaliz sonrası ortalama partikül boyutu ve polidispersite indisi Çizelge 3.10 verilmiştir.

Çizelge 3.8. KLN'lerin diyaliz sonrası ortalama partikül boyutu ve polidispersite indisi

	Ortalama partikül boyutu (diyalizden önce) ±SH	Ortalama partikül boyutu (diyalizden sonra) ±SH	Polidispersite indisi (diyalizden önce) ±SH	Polidispersite indisi (diyalizden sonra) ±SH
K2	188,1 nm ±12.2	299 nm ±8.2	0,389 ±0.01	0,370 ±0.01
K4	287,3 nm ±4.2	303,5 nm ±3.6	0,513 ±0.01	0,457 ±0.01

SH: Standart Hata, n=3

3.2.2 KLN'lerin zeta potansiyeli değerlendirmeleri

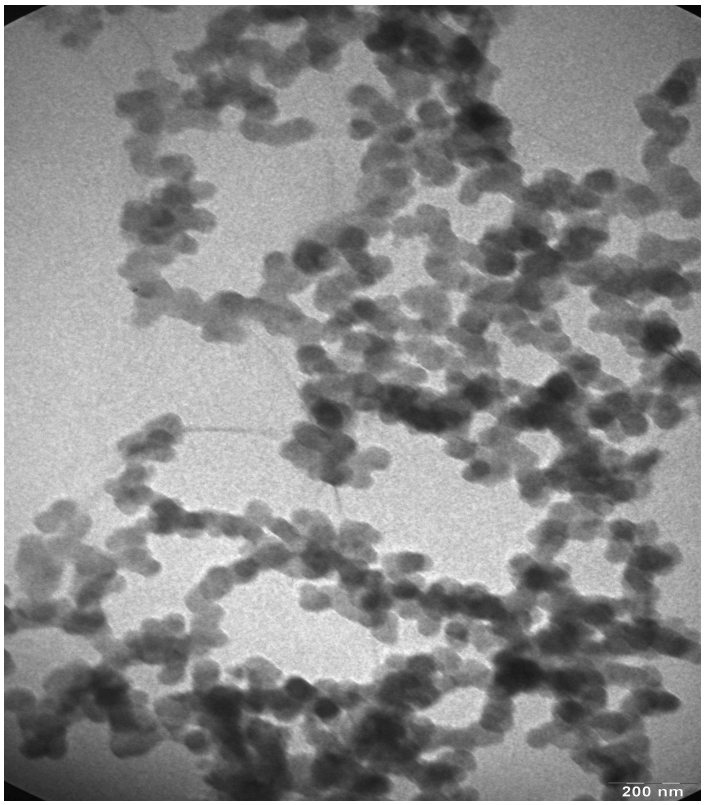
KLN'lerin zeta potansiyelleri **Bölüm 2.2.3.2**'de belirtilen yöntemle belirlenmiş ve sonuçları Çizelge 3.11'de verilmiştir.

Çizelge 3.9. KLN'lerin zeta potansiyel değerleri

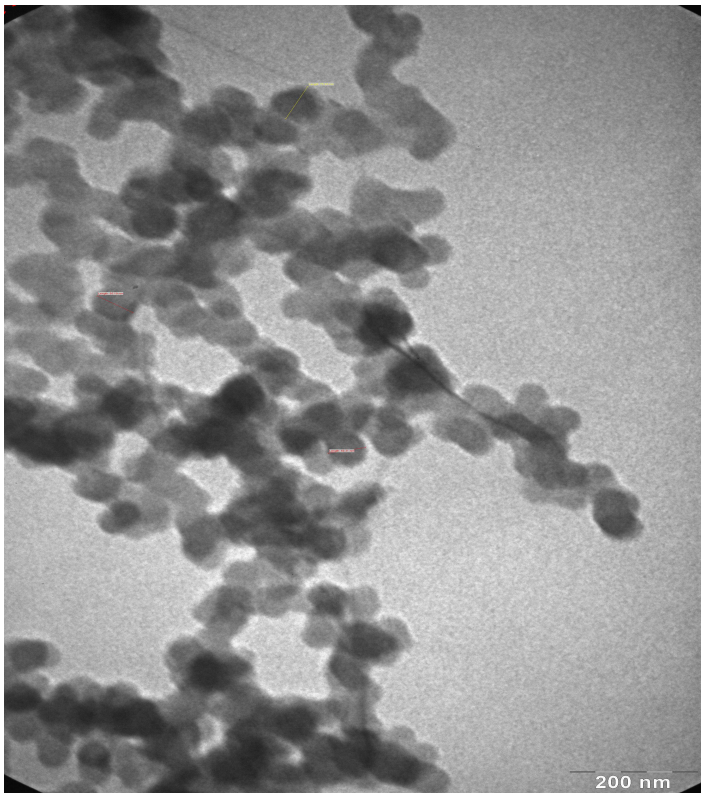
	K1	K2	K3	K4
Zeta potansiyel (mV) ±SH	18 mV ±0.8	14,1 mV ±2.6	3,1 mV ±0.6	30 mV ±1.4

SH: Standart Hata, n=3

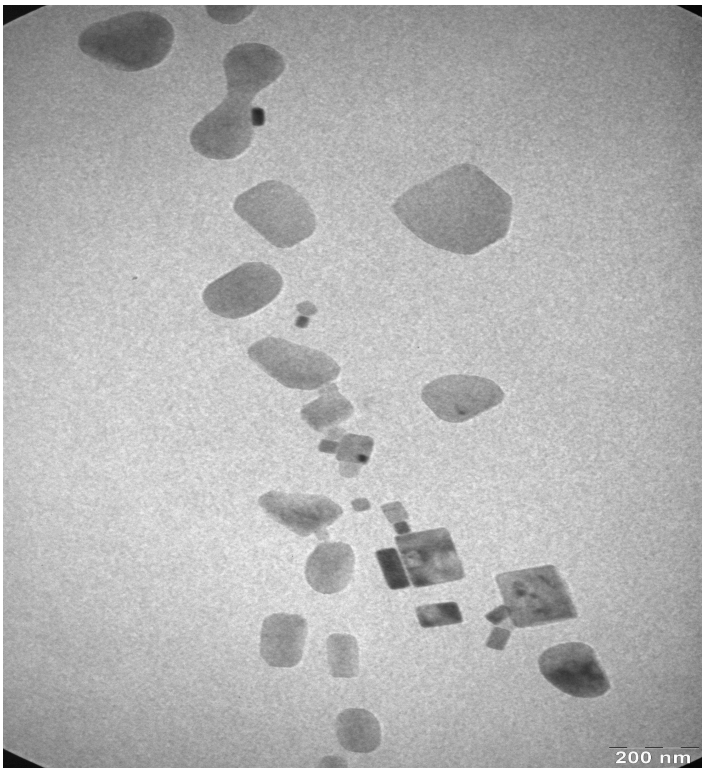
3.3 Formülasyonların TEM Görüntüleri ve Analizleri



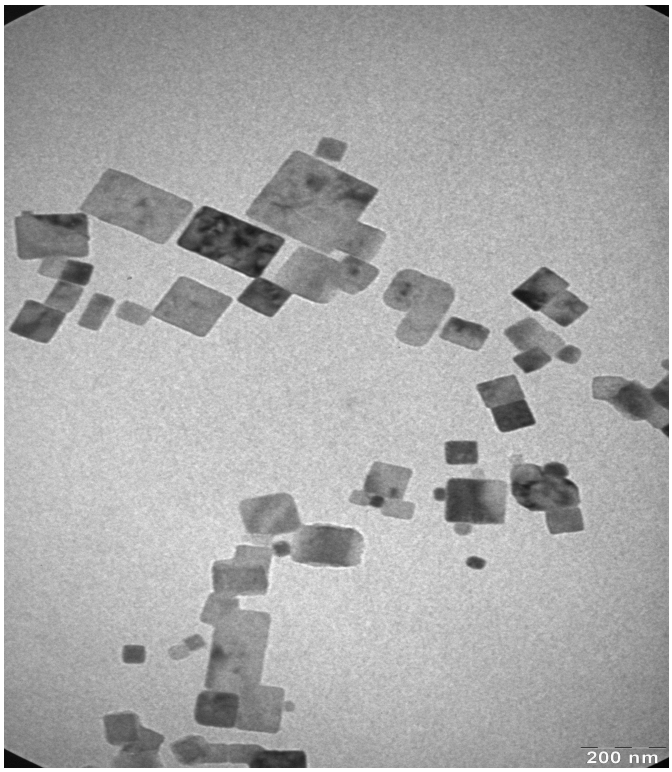
Şekil 3.1. L1 Formülasyonu TEM görüntüsü (60000X büyütme)



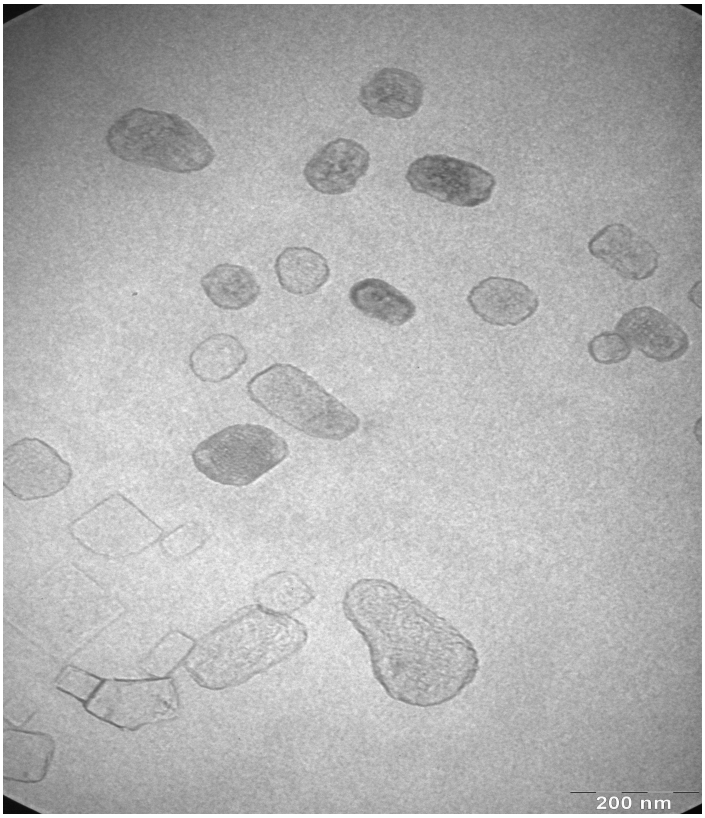
Şekil 3.2. L1 Formülasyonu TEM görüntüsü (87000X büyütme)



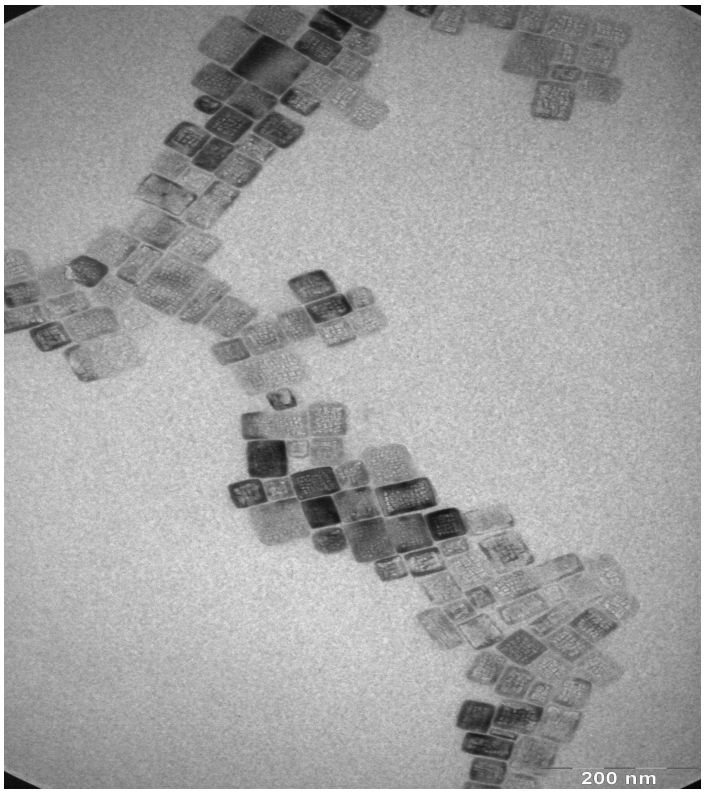
Şekil 3.3. L7 Formülasyonu (Lipozom+ Trastuzumab +FITC) TEM görüntüsü (60000X büyütme)



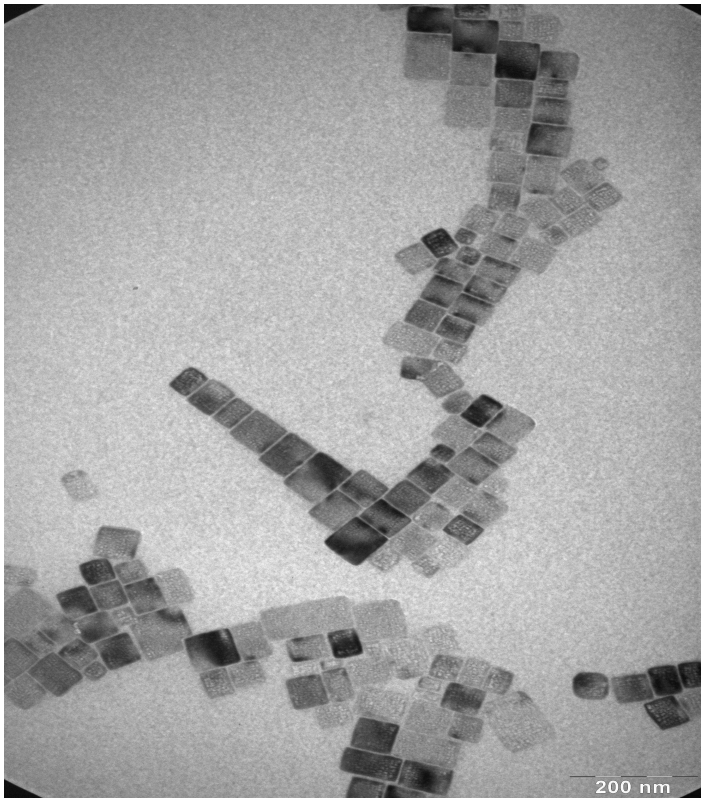
Şekil 3.4. L7 Formülasyonu (Lipozom+Trastuzumab+FITC) TEM görüntüsü (60000X büyütme)



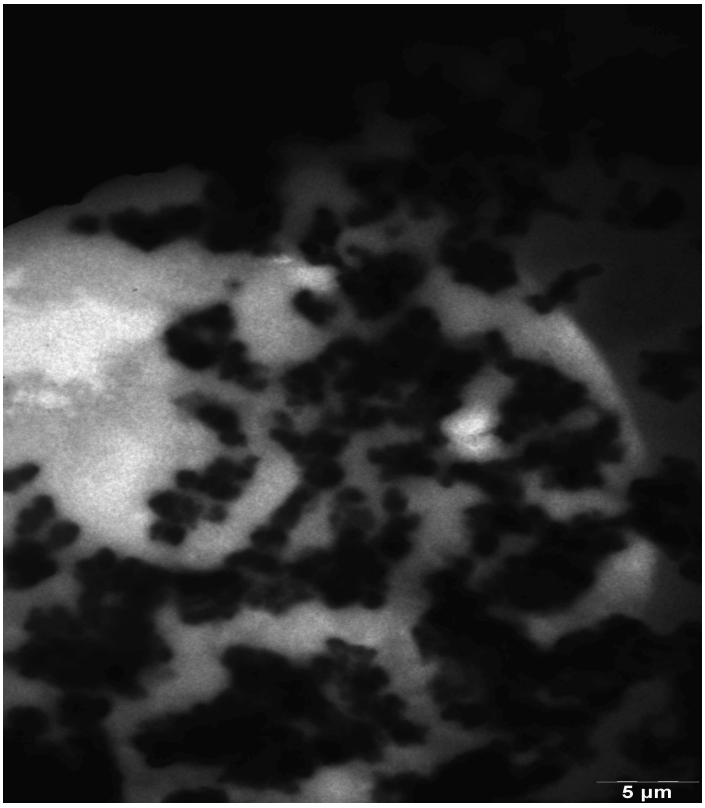
Şekil 3.5. L7 Formülasyonu (Lipozom+ Trastuzumab +FITC) TEM görüntüsü (87000X büyütme)



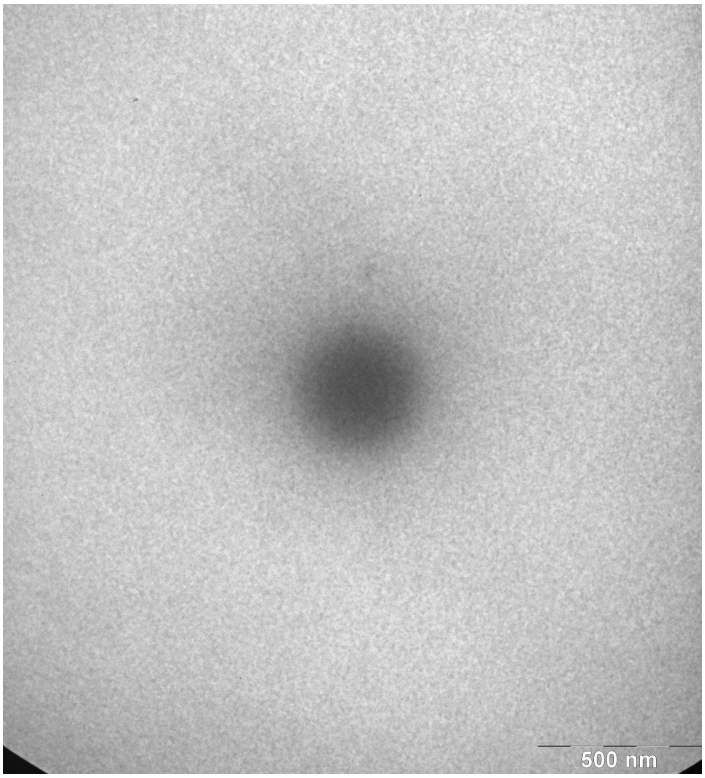
Şekil 3.6. L4 Formülasyonu (Lipozom+FITC) TEM görüntüsü (105000X büyütme)



Şekil 3.7. L4 Formülasyonu (Lipozom+FITC) TEM görüntüsü (87000X büyütme)

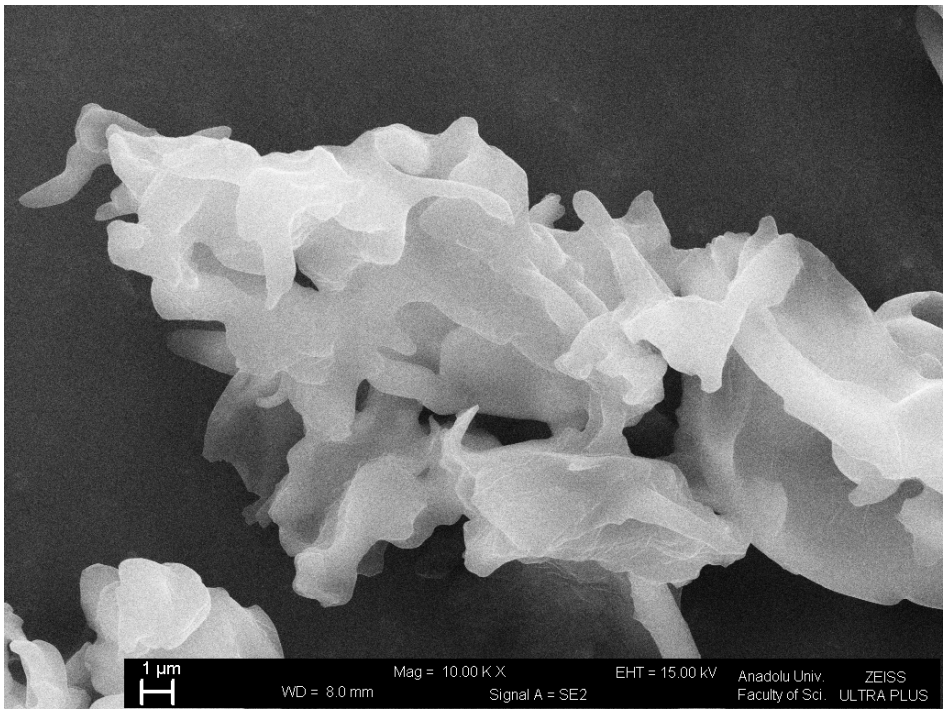


Şekil 3.8. L8 Formülasyonu (Lipozom+Trastuzumab+Acridine Orange) TEM görüntüsü (2550X büyütme)

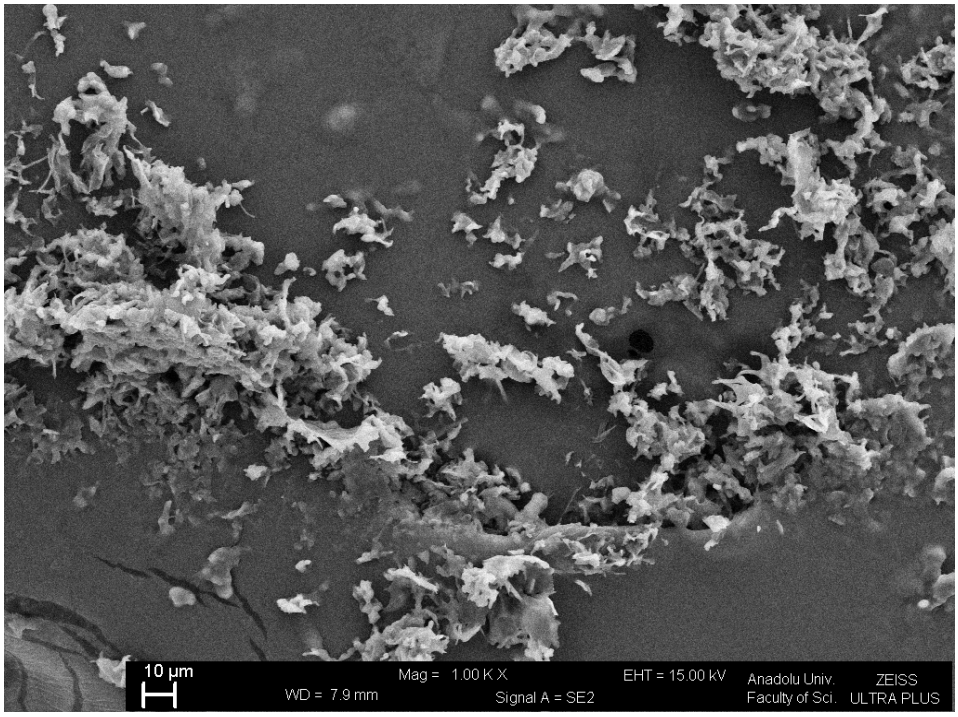


Şekil 3.9. K1 formülasyonu TEM görüntüsü (43000X büyütme)

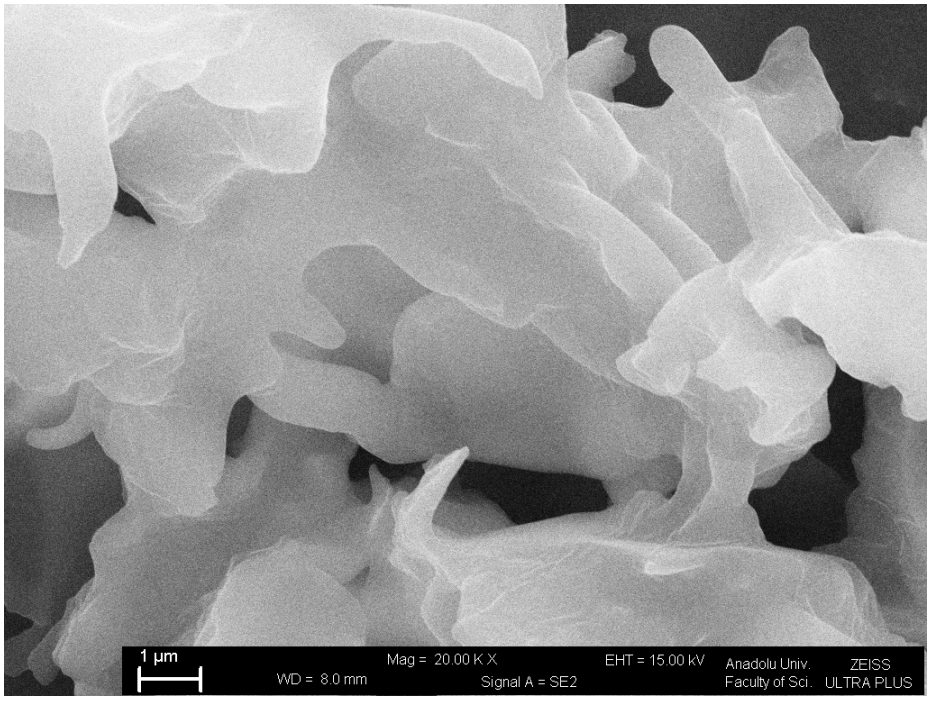
3.4 Formülasyonların SEM (Taramalı Elektron Mikroskop) Görüntüleri ve Analizleri



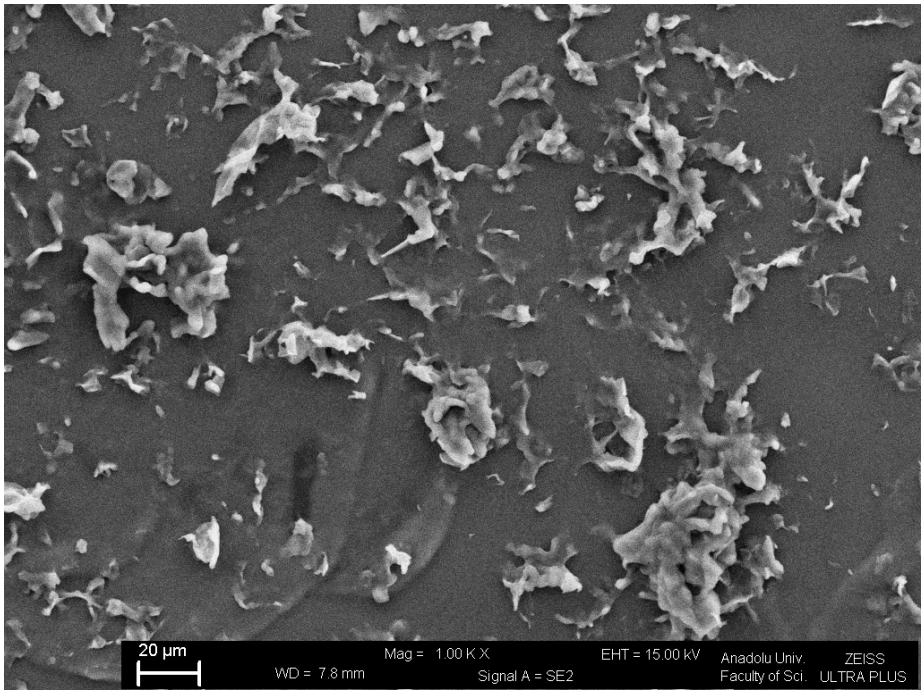
Şekil 3.10. Liyofilize L1 formülasyonu SEM görüntüsü



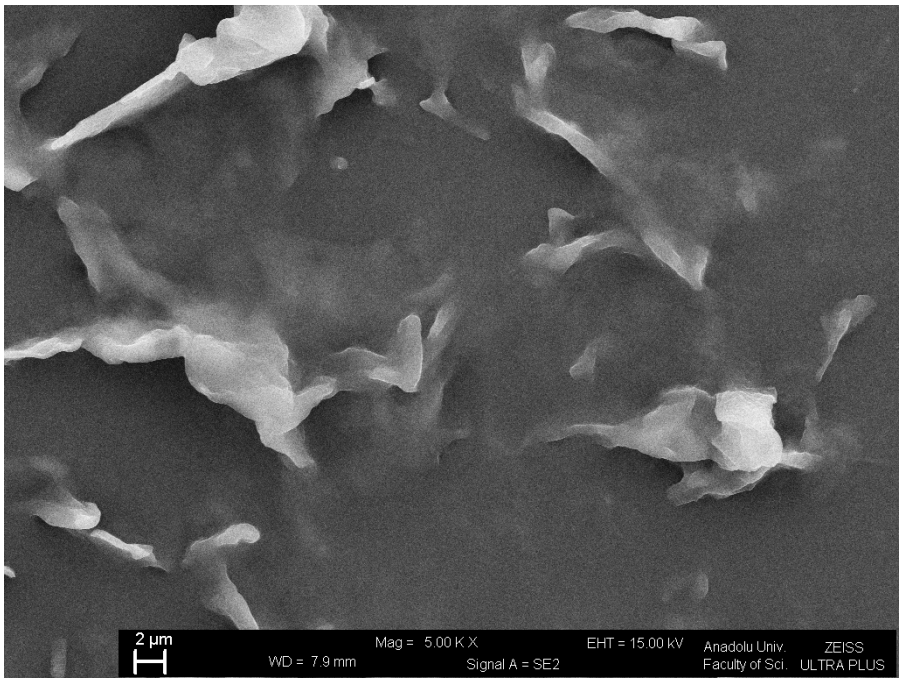
Şekil 3.11. Liyofilize L1 formülasyonu SEM görüntüsü



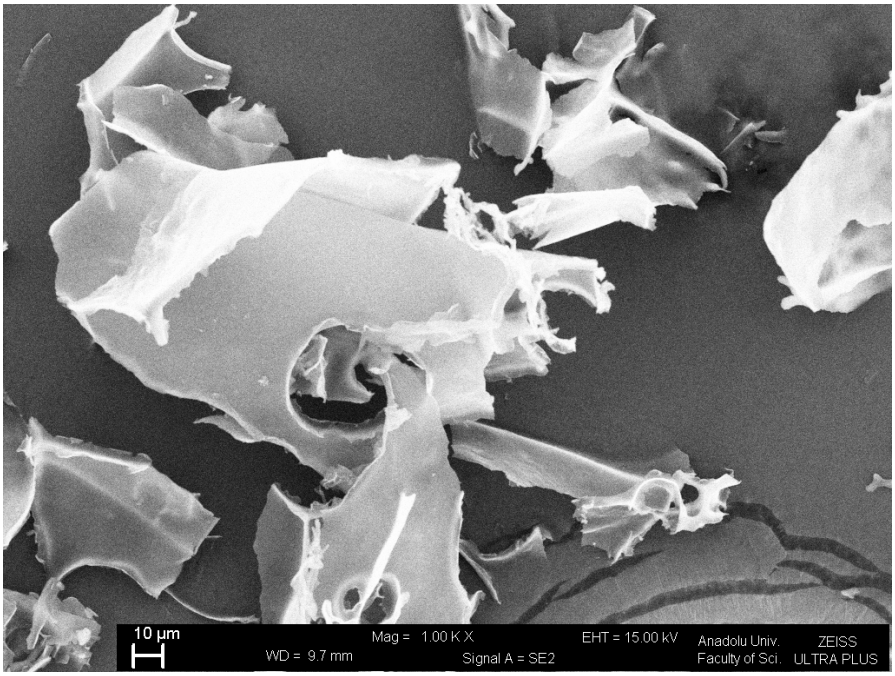
Şekil 3.12. Liyofilize L2 formülasyonu SEM görüntüsü



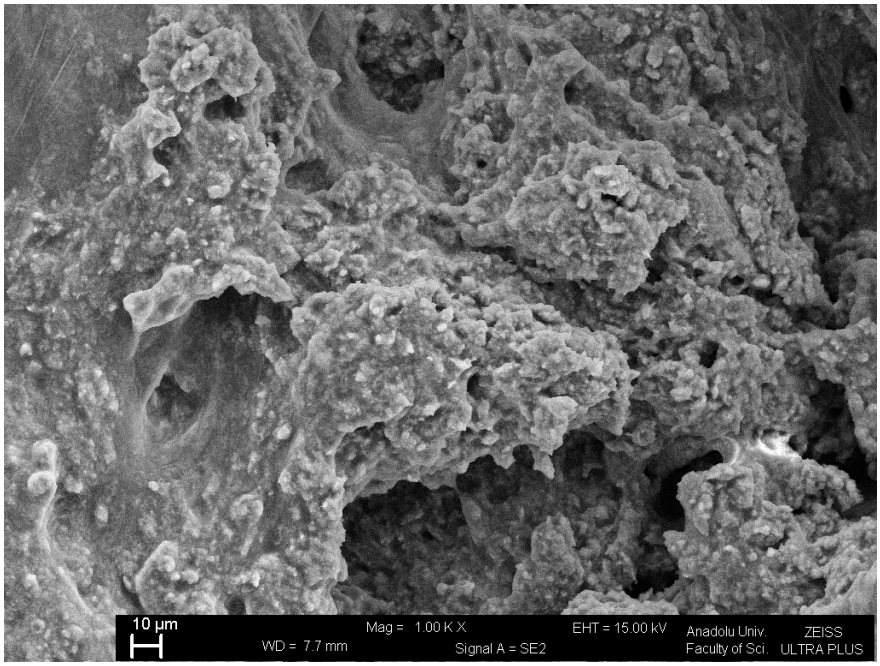
Şekil 3.13. Liyofilize K1 formülasyonu SEM görüntüsü



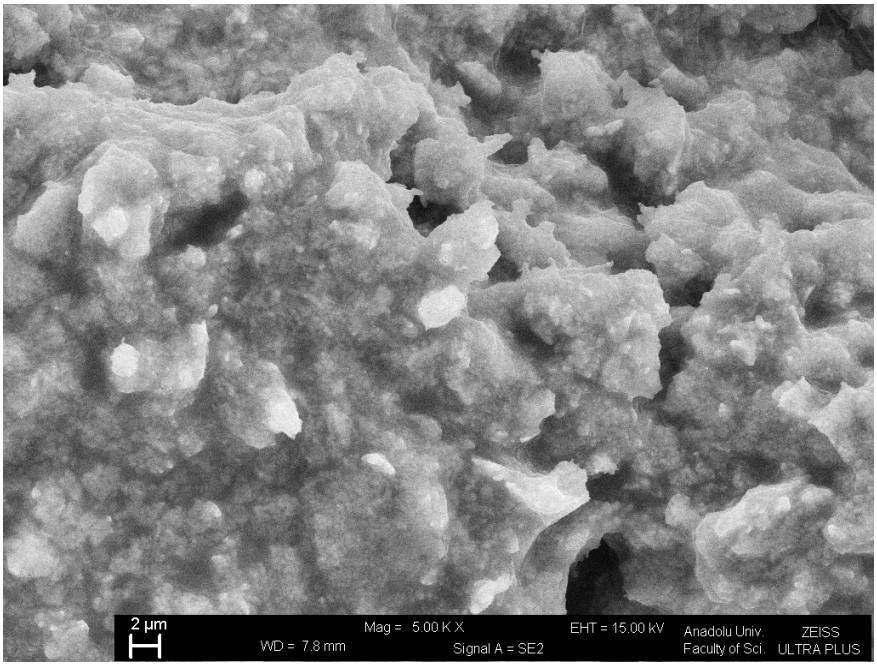
Şekil 3.14. Liyofilize K1 formülasyonu SEM görüntüsü



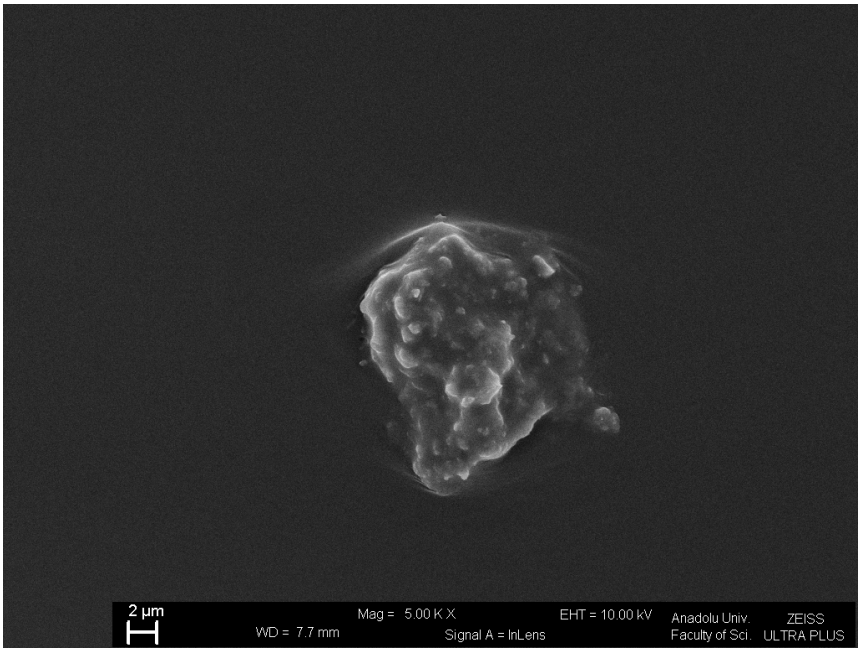
Şekil 3.15. Liyofilize K2 formülasyonu SEM görüntüsü



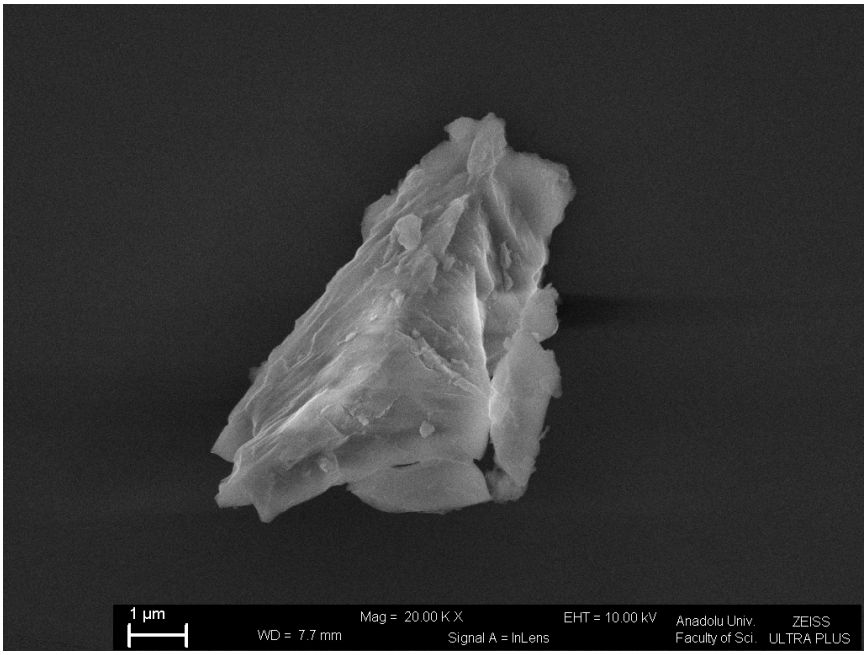
Şekil 3.16. Liyofilize L0 formülasyonu SEM görüntüsü



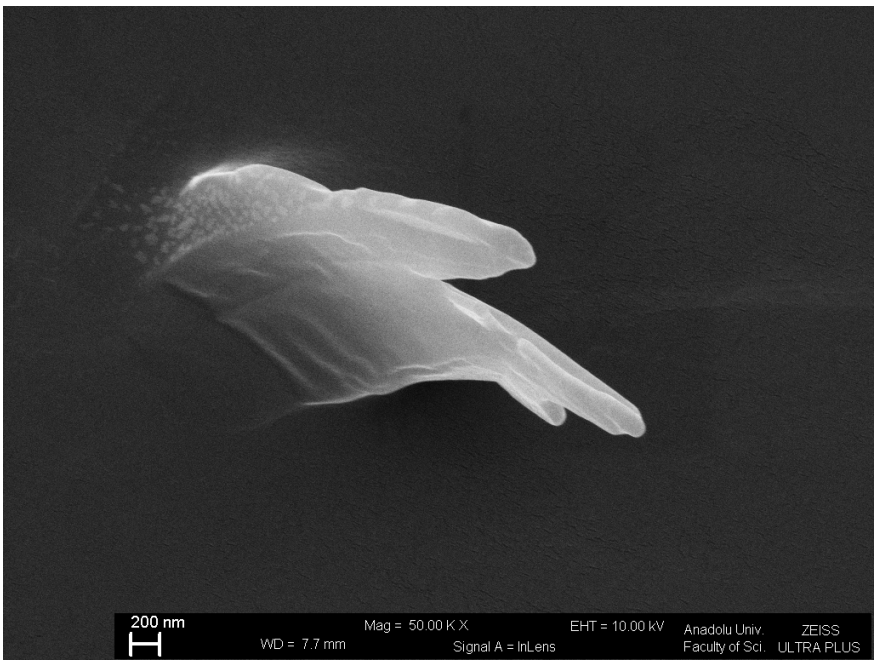
Şekil 3.17. Liyofilize L0 formülasyonu SEM görüntüsü



Şekil 3.18. L1 formülasyonu havada kurutma sonrası çekilen SEM görüntüsü



Şekil 3.19. L1 formülasyonu havada kurutma sonrası çekilen SEM görüntüsü



Şekil 3.20. L1 formülasyonu havada kurutma sonrası çekilen SEM görüntüsü

3.5 Hücre Kültürü Çalışmaları

3.5.1 Sitotoksisite çalışmaları

Hazırlanan tüm formülasyonlara ait sitotoksisitelerinin belirlenmesi için Bölüm 2.2.6.1'de belirlenen yöntemler uygulanmıştır.

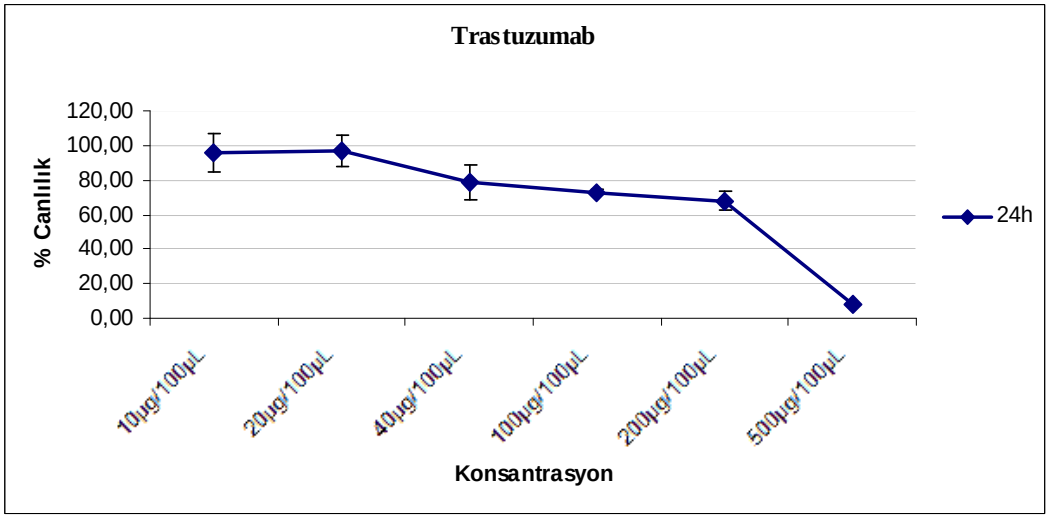
3.5.1.1 Lipozom formülasyonlarının sitotoksisite değerlendirmeleri

Çizelge 3.10. Etkin madde içermeyen lipozom formülasyonlarının sitotoksisite çalışmasında kullanılan miktarları

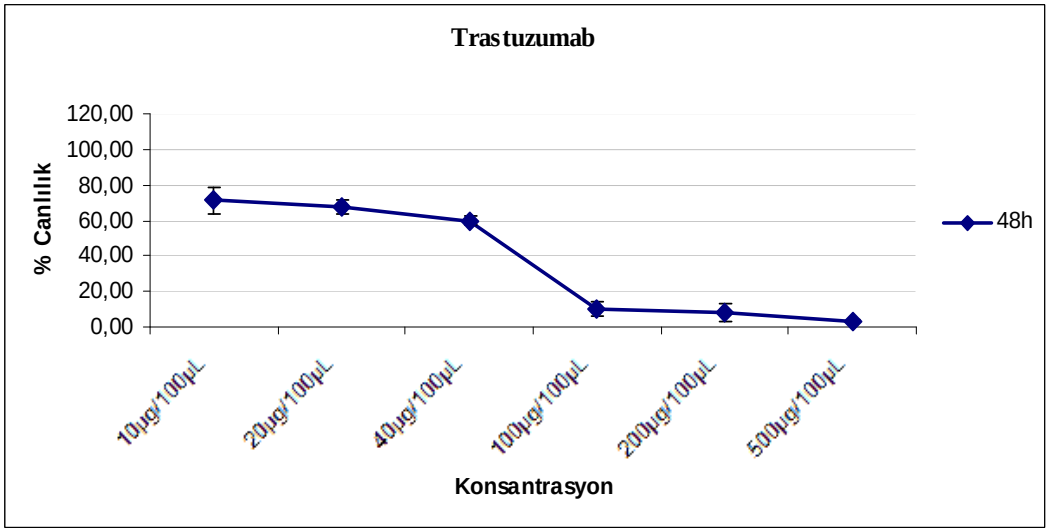
L0, L1, L4, L5, L9, L14
0,25µl/100µL
0,5µl/100µL
0,75µl/100µL
1 µl/100µL
1,25µl/100µL
2,5µl/100µL

Çizelge 3.11. Etkin madde içeren lipozom formülasyonlarının, sitotoksisite çalışmalarında kullanılan yaklaşık trastuzumab (mAb) konsantrasyonları

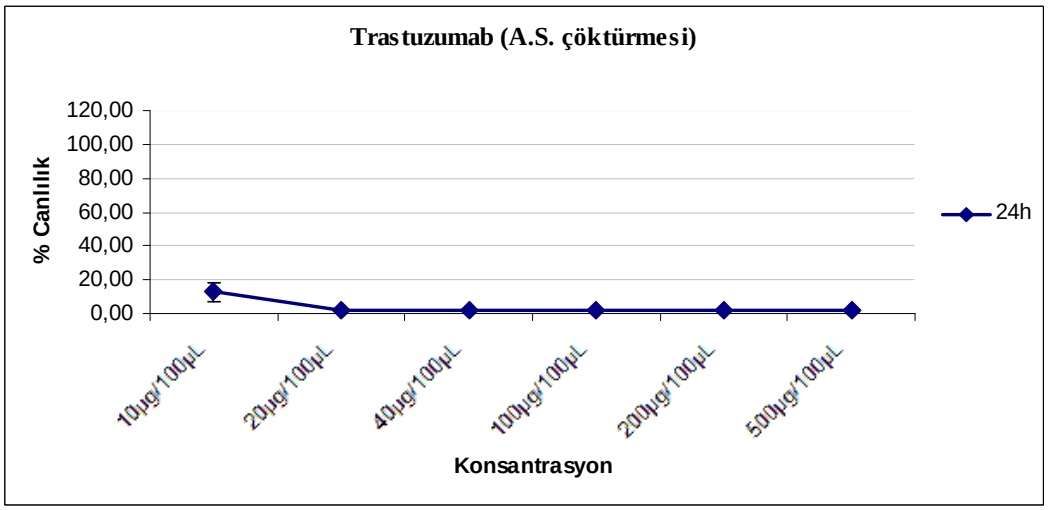
L2		L3	
0,2µl/kuyu	~2,1 µg/100µL	0,25µl/kuyu	~5,25 µg/100µL
0,5µl/kuyu	~5,25 µg/100µL	0,75µl/kuyu	~15,75 µg/100µL
0,75µl/kuyu	~7,875 µg/100µL	1,5µl/kuyu	~31,5 µg/100µL
1 µl/kuyu	~10,5 µg/100µL	2 µl/kuyu	~42 µg/100µL
1,5µl/kuyu	~15,75 µg/100µL	2,5µl/kuyu	~52,5 µg/100µL
3 µl/kuyu	~31,5 µg/100µL	3 µl/kuyu	~63 µg/100µL
L6, L7, L8, L10, L12, L13,L15		L11	
0,25µl/kuyu	~0,17 µg/100µL	0,25µl/kuyu	~0,17 µg/100µL
0,5 µl/kuyu	~0,34 µg/100µL	0,5 µl/kuyu	~0,34 µg/100µL
0,75µl/kuyu	~0,51 µg/100µL	1,25µl/kuyu	~0,85 µg/100µL
1 µl/kuyu	~0,68 µg/100µL	1,5 µl/kuyu	~1,02 µg/100µL
1,25 µl/kuyu	~0,85 µg/100µL	2,5 µl/kuyu	~1,7 µg/100µL
2,5 µl/kuyu	~1,7 µg/100µL	3,5 µl/kuyu	~2,38 µg/100µL



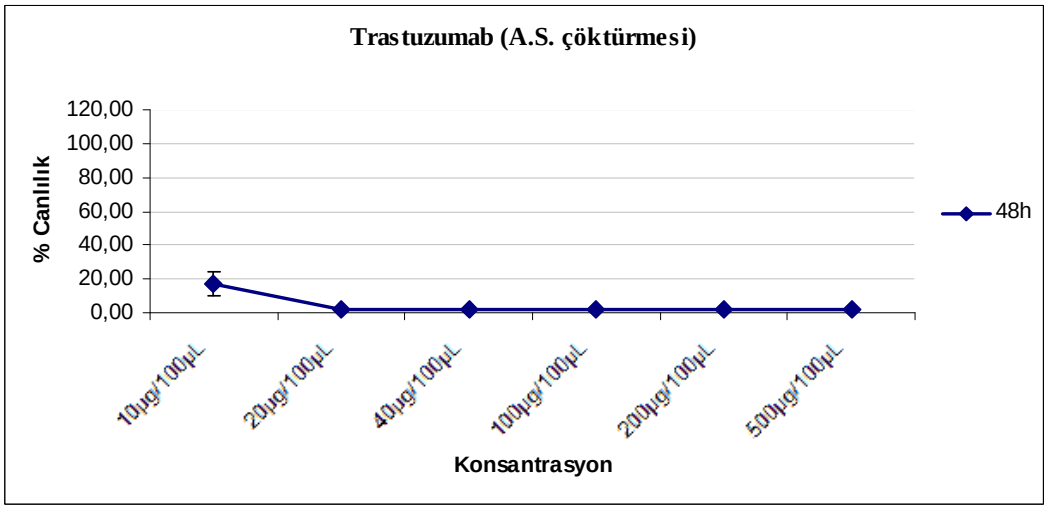
Şekil 3.21. Hücrelere doğrudan uygulanan etkin madde Trastuzumab'ın (Anti-HER2 Antikoru) 24 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi (IC_{50}: ~275 µg/100 µL) (n=3)



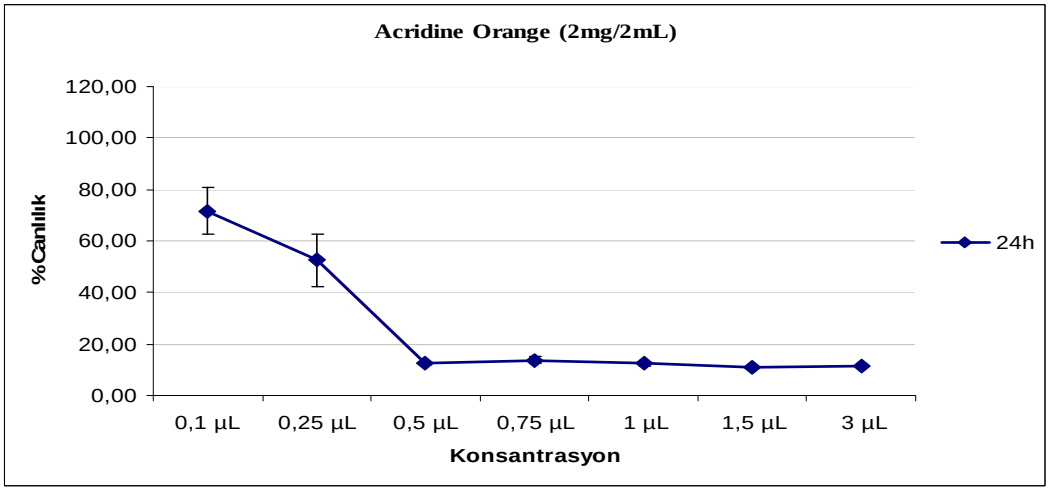
Şekil 3.22. Hücrelere doğrudan uygulanan etkin madde Trastuzumab'ın (Anti-HER2 Antikoru) 48 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi (IC_{50}: ~65 µg/100 µL) (n=3)



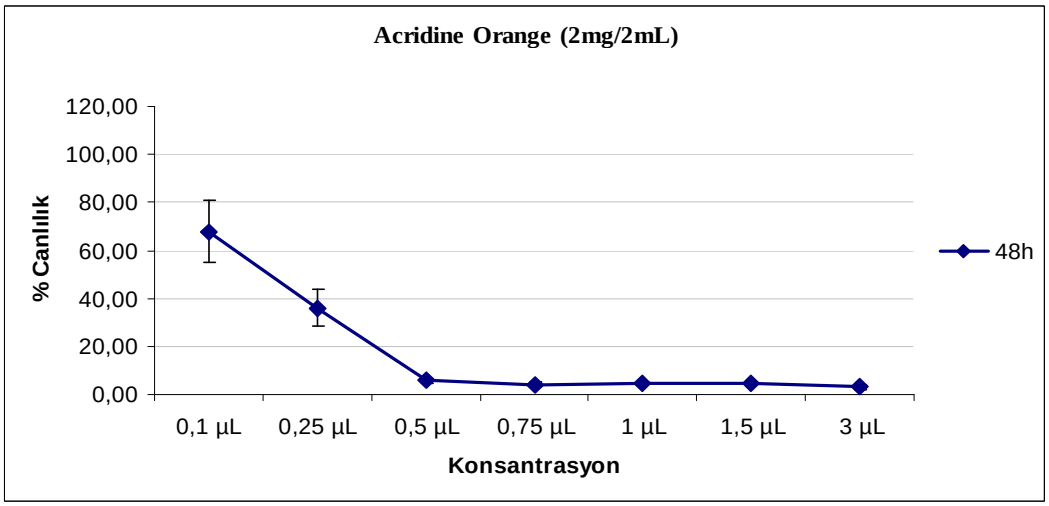
Şekil 3.23. Amonyum sülfat çöktürmesi yapılan Trastuzumab'ın (Anti-HER2 Antikoru) 24 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi (n=3)



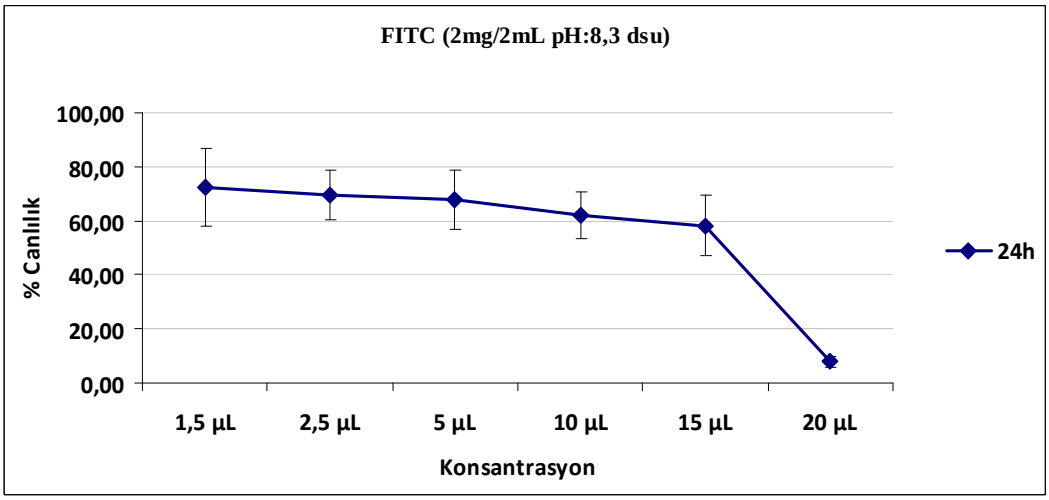
Şekil 3.24. Amonyum sülfat çöktürmesi yapılan Trastuzumab'ın (Anti-HER2 Antikoru) 48 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi (n=3)



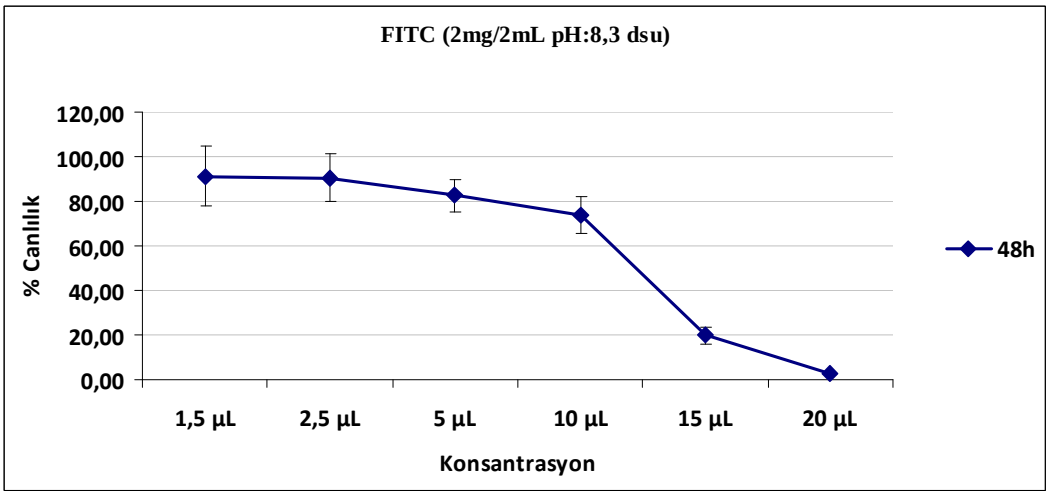
Şekil 3.25. Hücrelere doğrudan uygulanan A.O. (Acridine Orange) boyasının 24 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi (IC_{50}: ~0,25 µL/100 µL) (n=3)



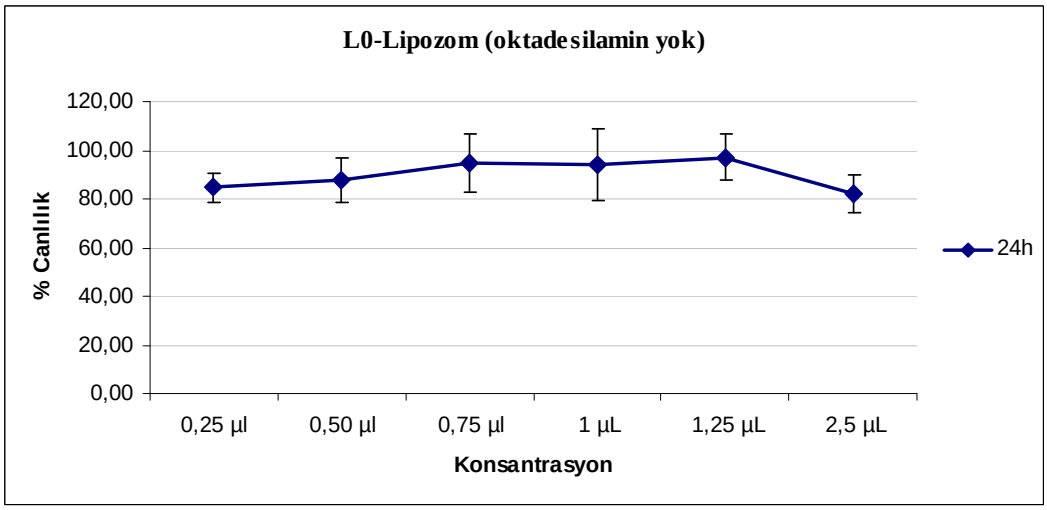
Şekil 3.26. Hücrelere doğrudan uygulanan A.O. (Acridine Orange) boyasının 48 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi (IC_{50}: ~0,15 µL/100 µL) (n=3)



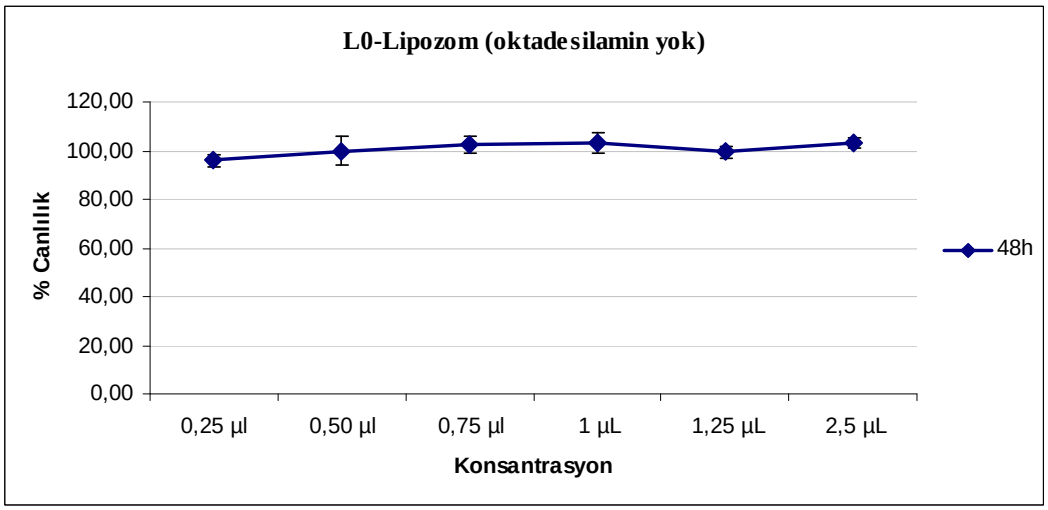
Şekil 3.27. Hücrelere doğrudan uygulanan FITC'in (Fluorescein Isothiocyanate) 24 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi (IC_{50}: ~17,5 µL/100 µL) (n=3)



Şekil 3.28. Hücrelere doğrudan uygulanan FITC'in (Fluorescein Isothiocyanate) 48 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi (IC_{50}:~ 12,5 µL/100 µL) (n=3)

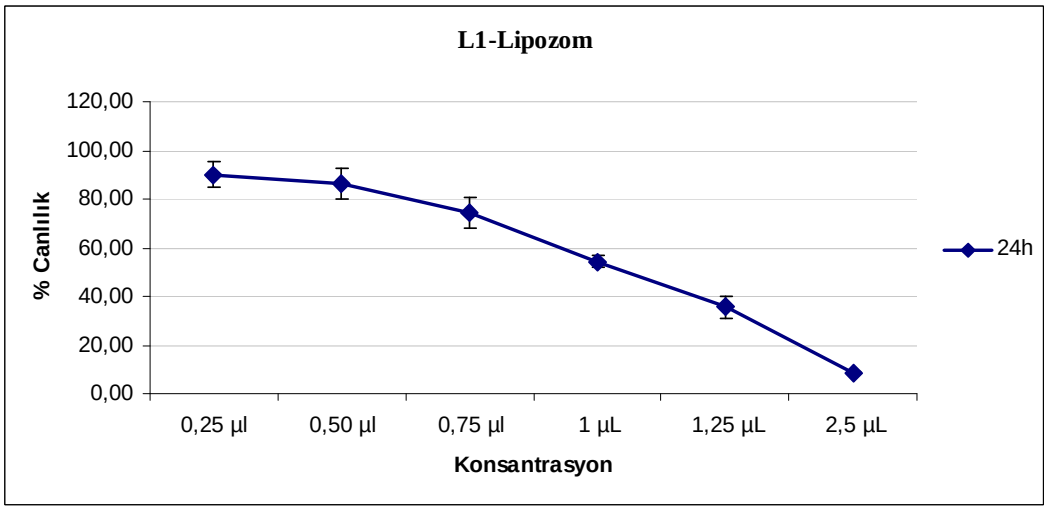


Şekil 3.29. Hücrelere uygulanan L0'ın 24 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi (n=3)

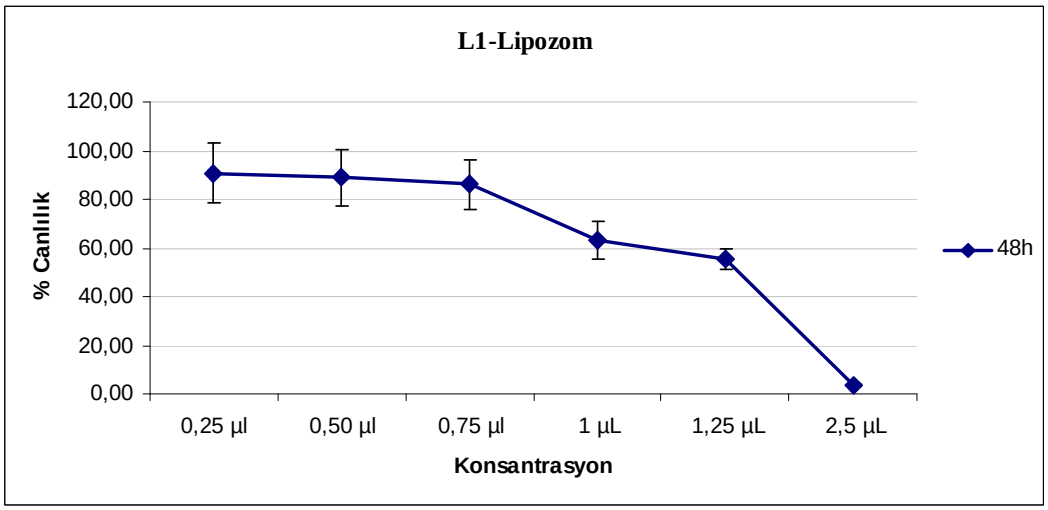


Şekil 3.30. Hücrelere uygulanan L0'ın 48 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi (n=3)

L0 formülasyonu, katyonik ajan olan oktadesilamini içermemektedir. Sitotoksisite profilinde gözlendiği gibi hücrelere toksik etki göstermemiştir.

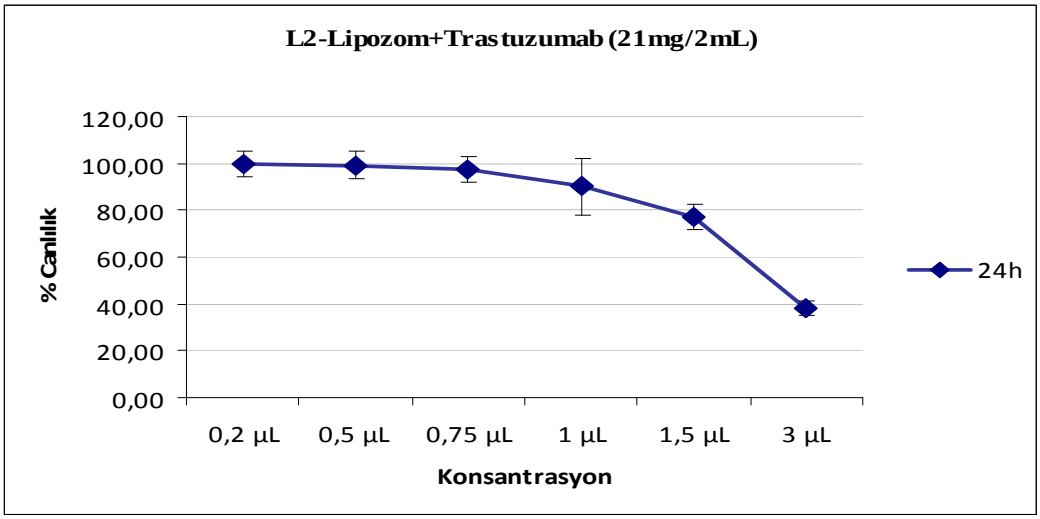


Şekil 3.31. Hücrelere uygulanan L1'in 24 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi (IC_{50}: ~1,05 µL/100 µL) (n=3)

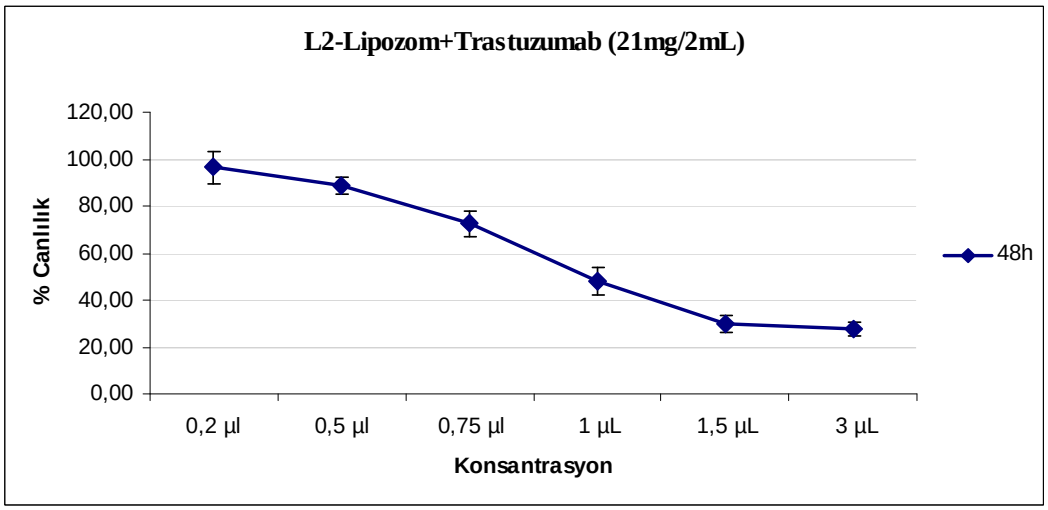


Şekil 3.32. Hücrelere uygulanan L1'in 48 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi (IC_{50}: ~1,3 µL/100 µL) (n=3)

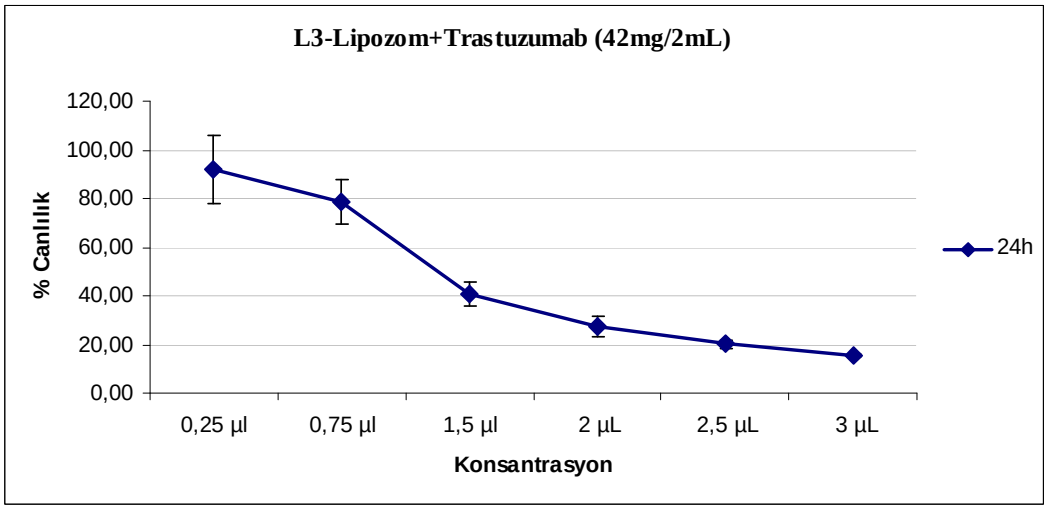
L1 formülasyonunun 48 saatlik inkübasyonu sonucu, 24 saatlik inkübasyon sonucundan daha toksik olduğu görülmüştür. Hücrelerin daha uzun süre nanopartiküllerle temas etmesi toksik etkiyi arttırmıştır.



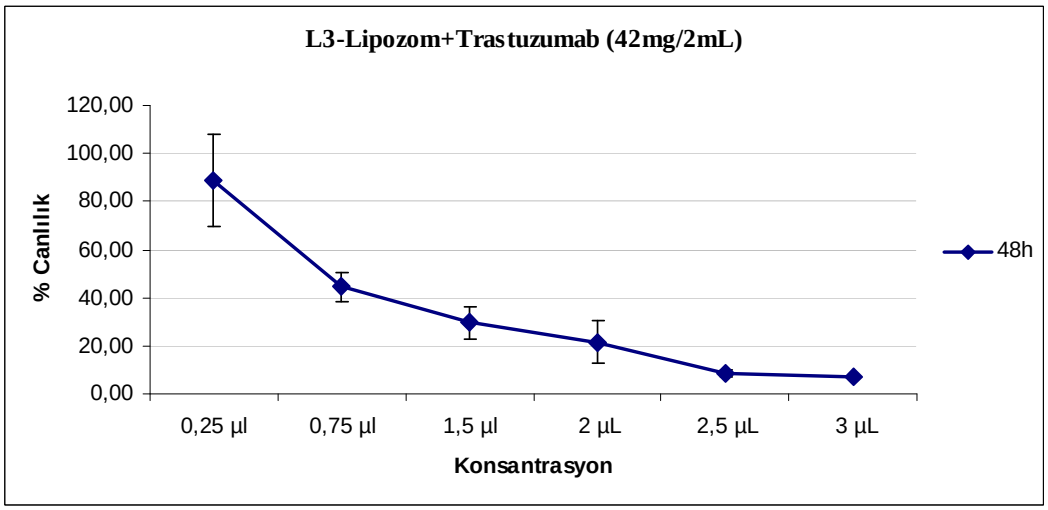
Şekil 3.33. Hücrelere uygulanan L2'nin 24 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi (IC_{50}: ~2,5 µL/100 µL) (n=3)



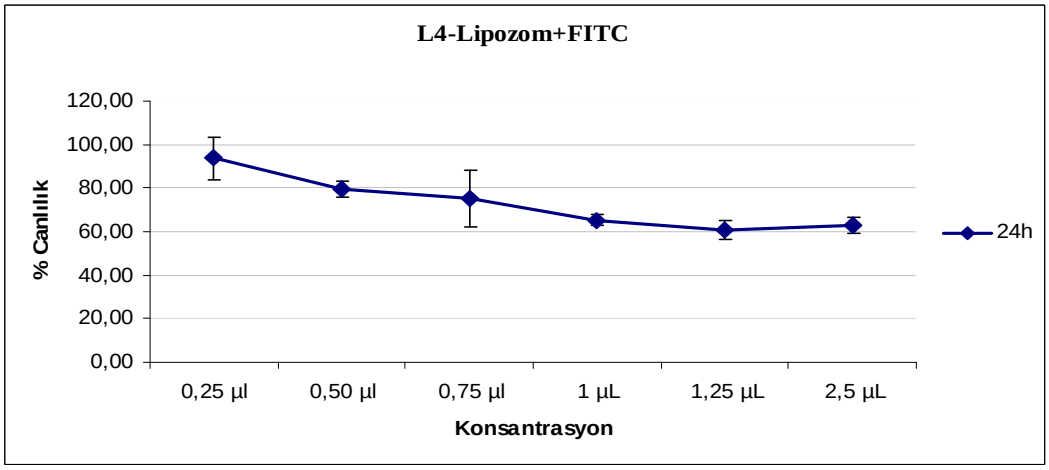
Şekil 3.34. Hücrelere uygulanan L2'nin 48 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi (IC_{50}: ~1 µL/100 µL) (n=3)



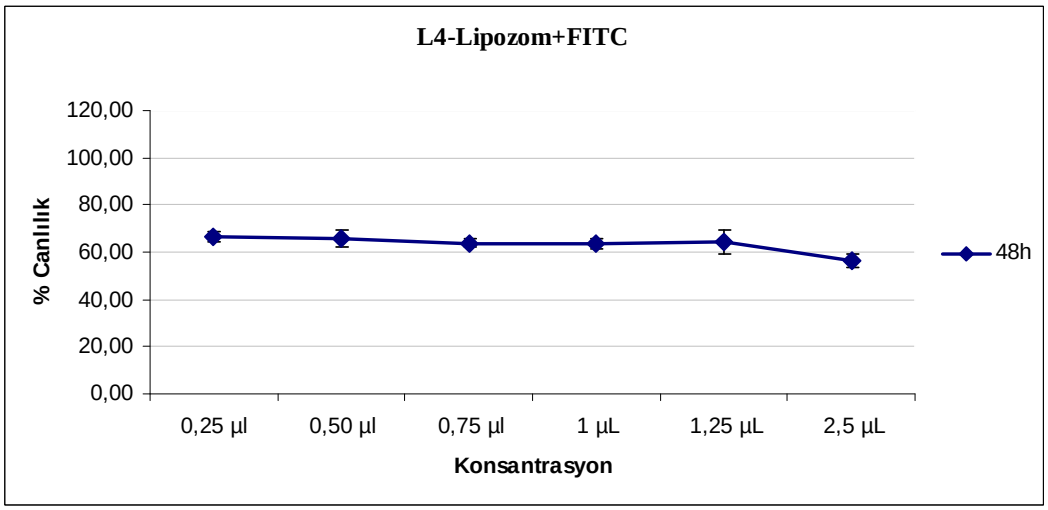
Şekil 3.35. Hücrelere uygulanan L3'ün 24 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi (IC_{50}: ~1,2 µL/100 µL) (n=3)



Şekil 3.36. Hücrelere uygulanan L3'ün 48 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi (IC_{50}: ~0,6 µL/100 µL) (n=3)

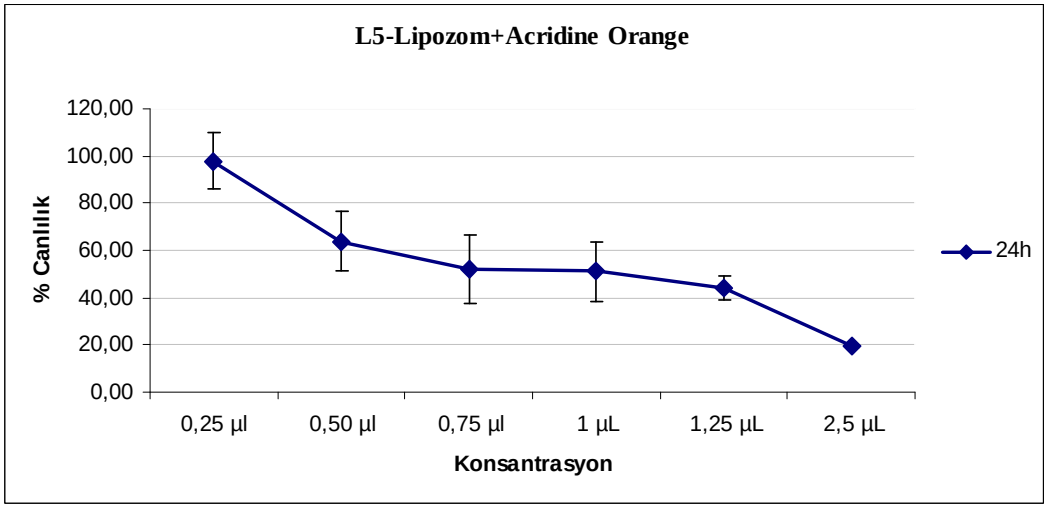


Şekil 3.37. Hücrelere uygulanan L4'ün 24 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi (n=3)

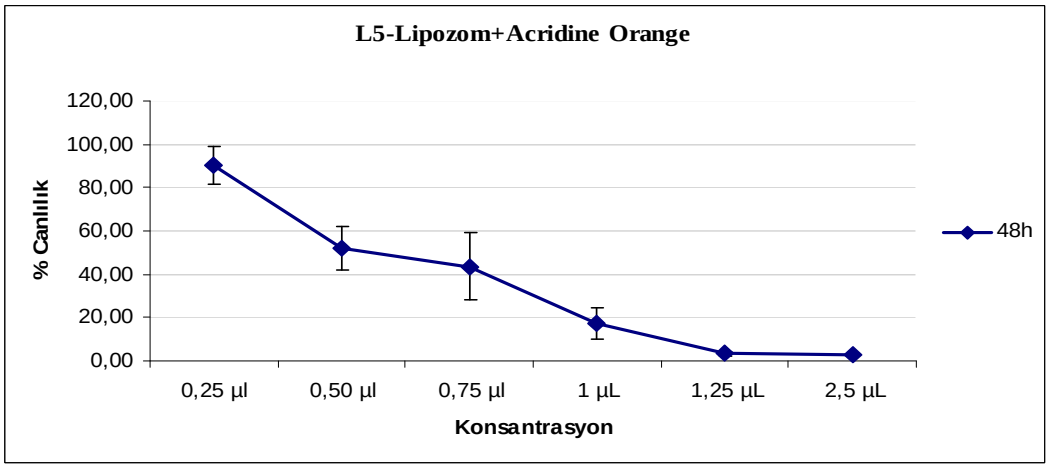


Şekil 3.38 Hücrelere uygulanan L4'ün 48 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi (n=3)

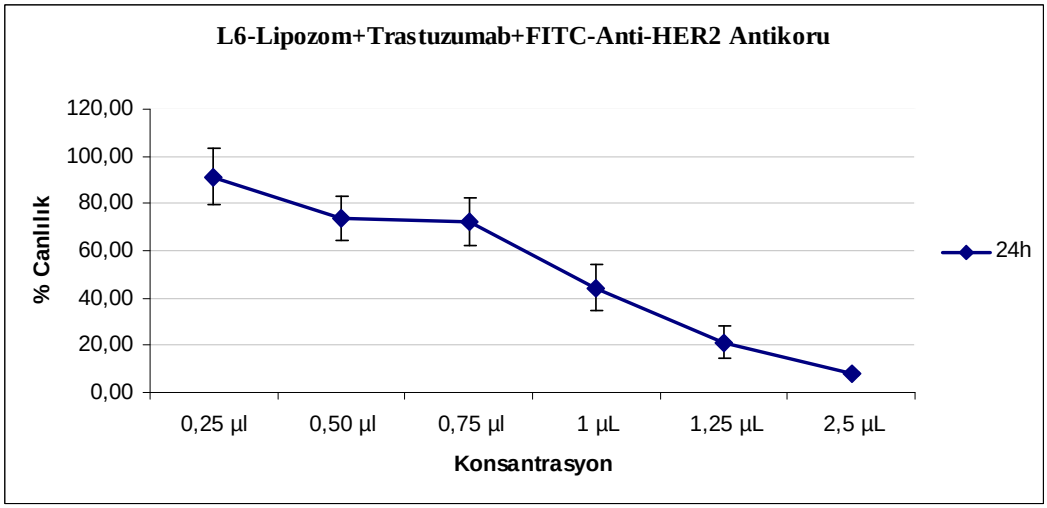
FITC (Fluorescein Isothiocyanate) molekülünün, hücre kültürü çalışmalarında kullanılan konsantrasyon oranlarında toksik etkisinin gözlenmediği değerlendirmesi yapılmıştır.



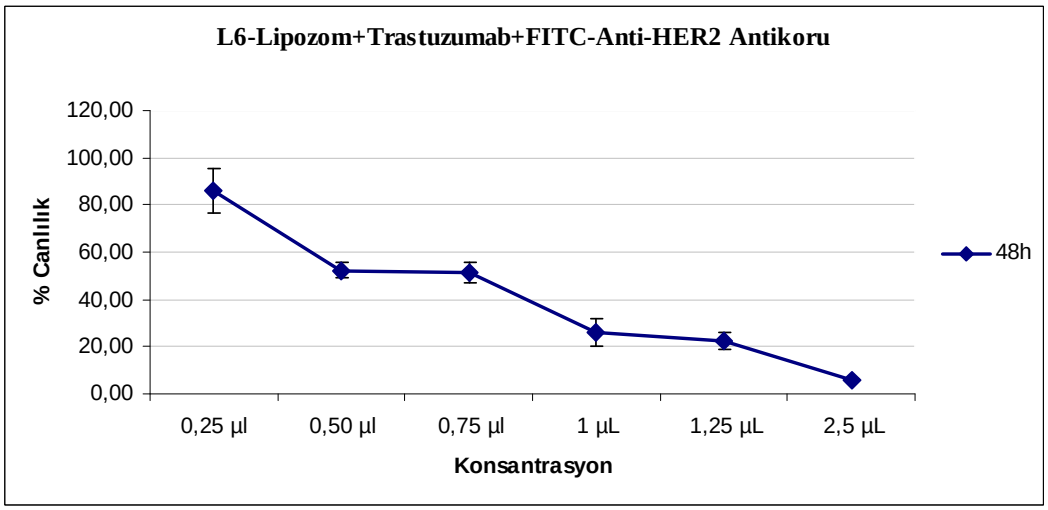
Şekil 3.39 Hücrelere uygulanan L5'in 24 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi (IC_{50}: ~0,75 µL/100 µL) (n=3)



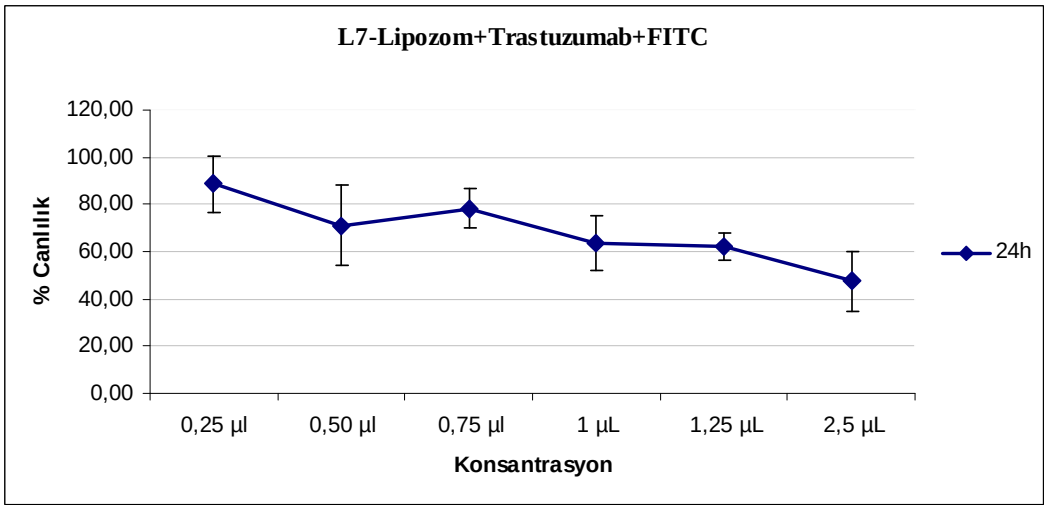
Şekil 3.40. Hücrelere uygulanan L5'in 48 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi (IC_{50}: ~0,5 µL/100 µL) (n=3)



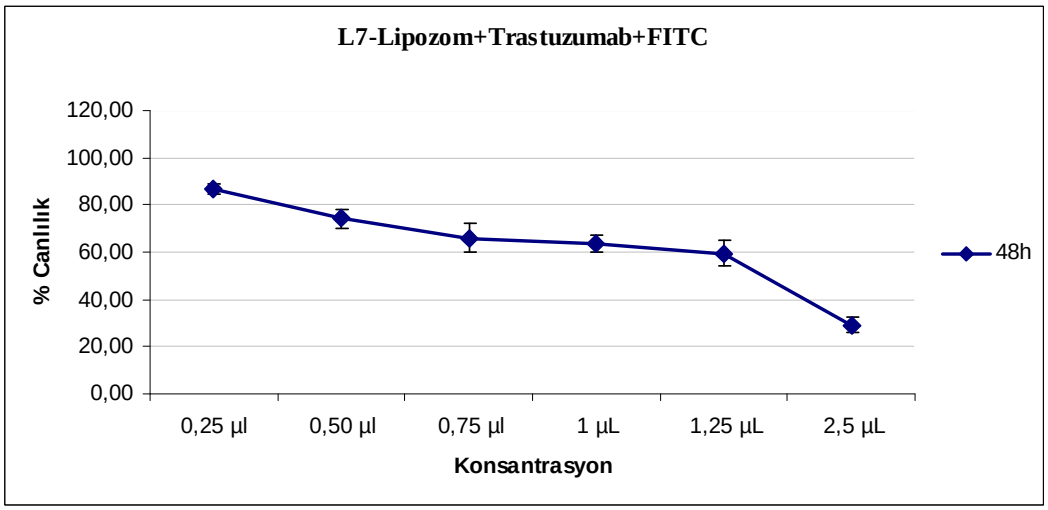
Şekil 3.41. Hücrelere uygulanan L6'nın 24 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi (IC_{50}: ~0,95 µL/100 µL) (n=3)



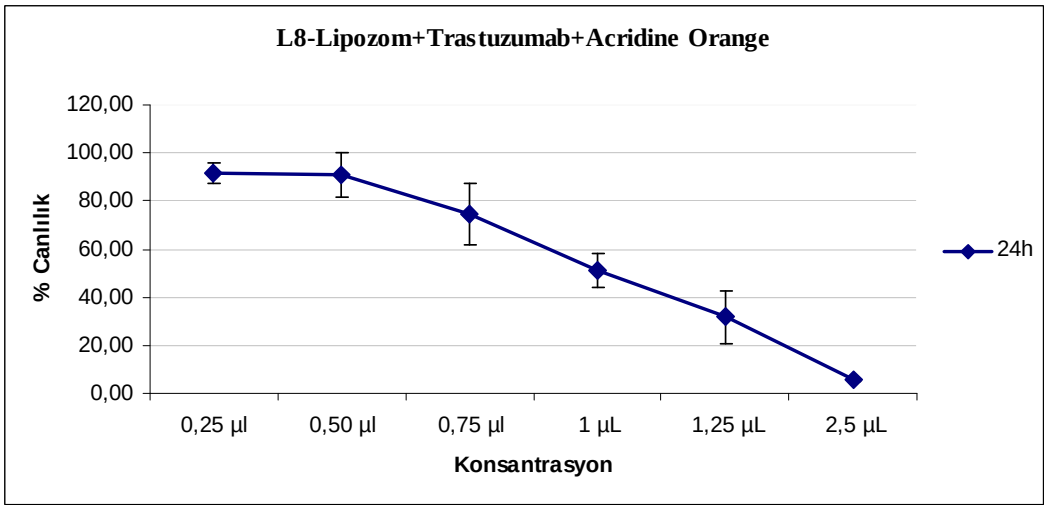
Şekil 3.42. Hücrelere uygulanan L6'nın 48 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi (IC_{50}: ~0,5 µL/100 µL) (n=3)



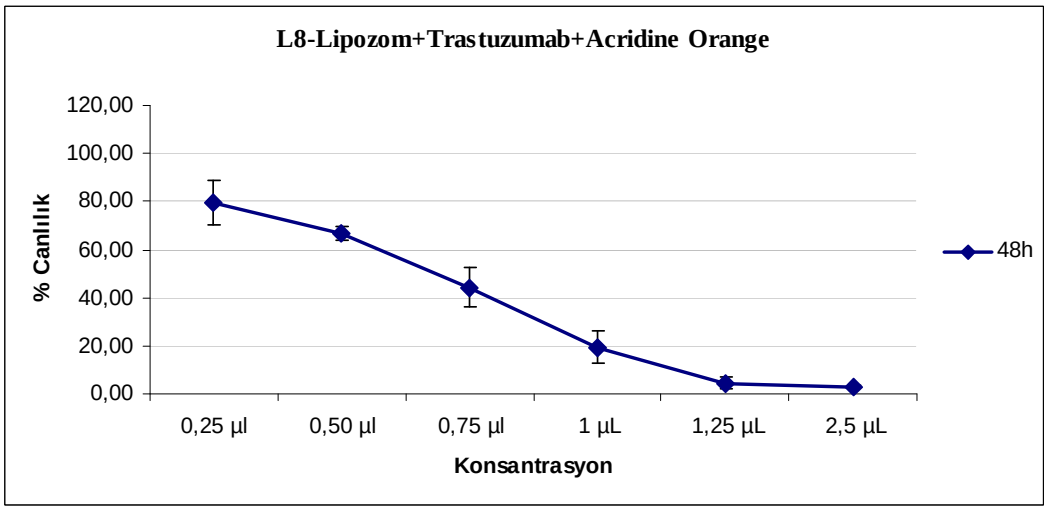
Şekil 3.43. Hücrelere uygulanan L7'nin 24 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi (IC_{50}: ~2,4 µL/100 µL) (n=3)



Şekil 3.44. Hücrelere uygulanan L7'nin 48 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi (IC_{50}: ~1,3 µL/100 µL) (n=3)

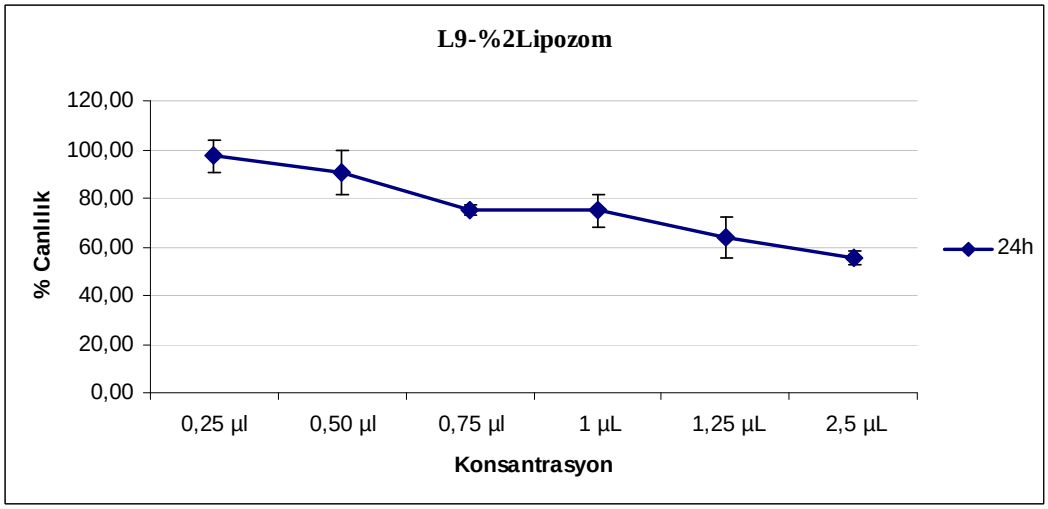


Şekil 3.45. Hücrelere uygulanan L8'in 24 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi (IC_{50}: ~1 µL/100 µL) (n=3)

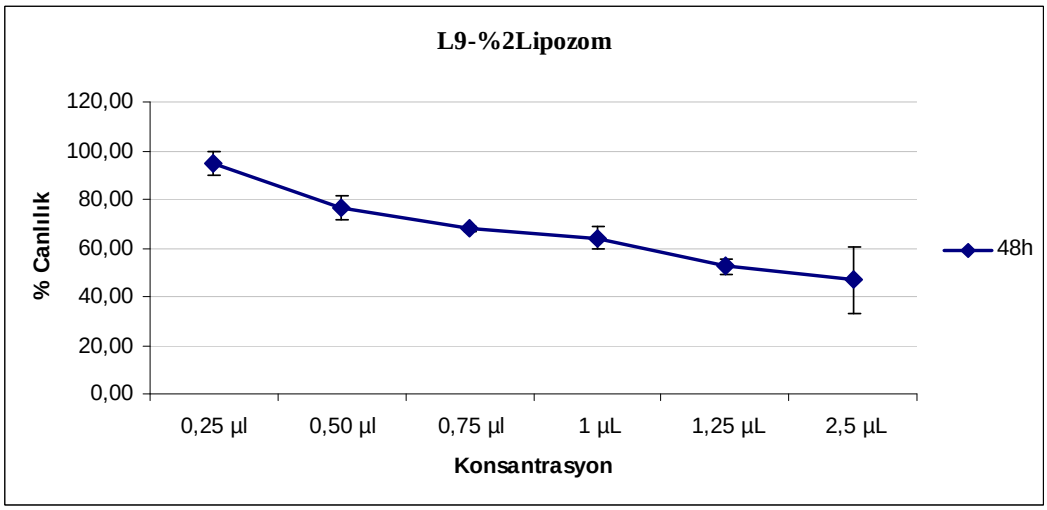


Şekil 3.46. Hücrelere uygulanan L8'in 48 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi (IC_{50}: ~0,65 µL/100 µL) (n=3)

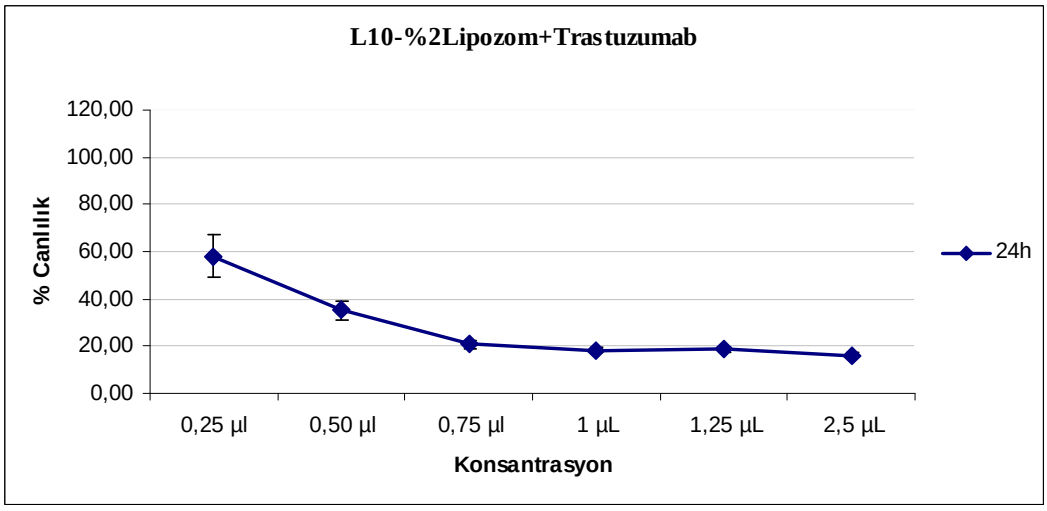
L8 formülasyonu, hücrelerin floresan görüntülenmesi amacıyla kullanılmıştır.



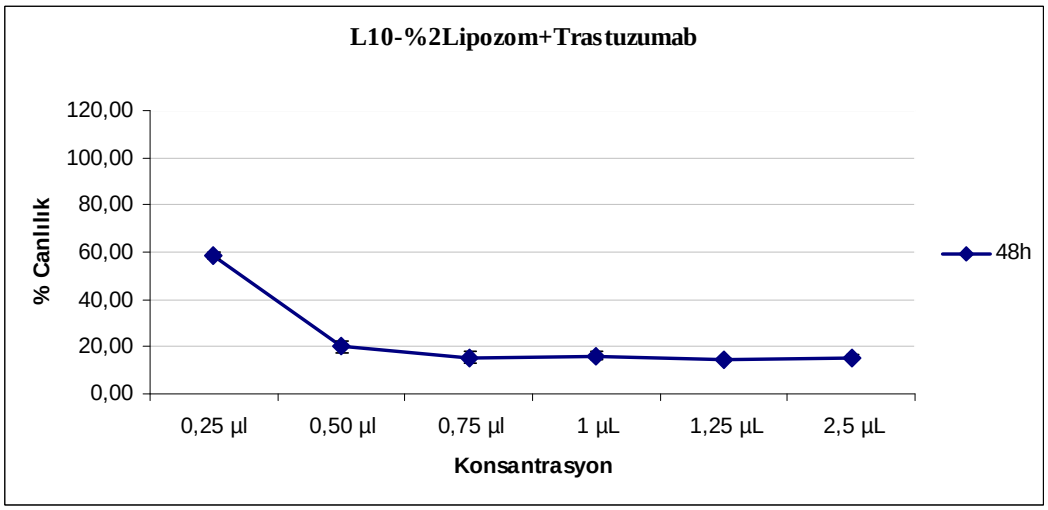
Şekil 3.47. Hücrelere uygulanan L9'un 24 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi (n=3)



Şekil 3.48. Hücrelere uygulanan L9'un 48 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi (IC_{50}: ~1,35 µL/100 µL) (n=3)

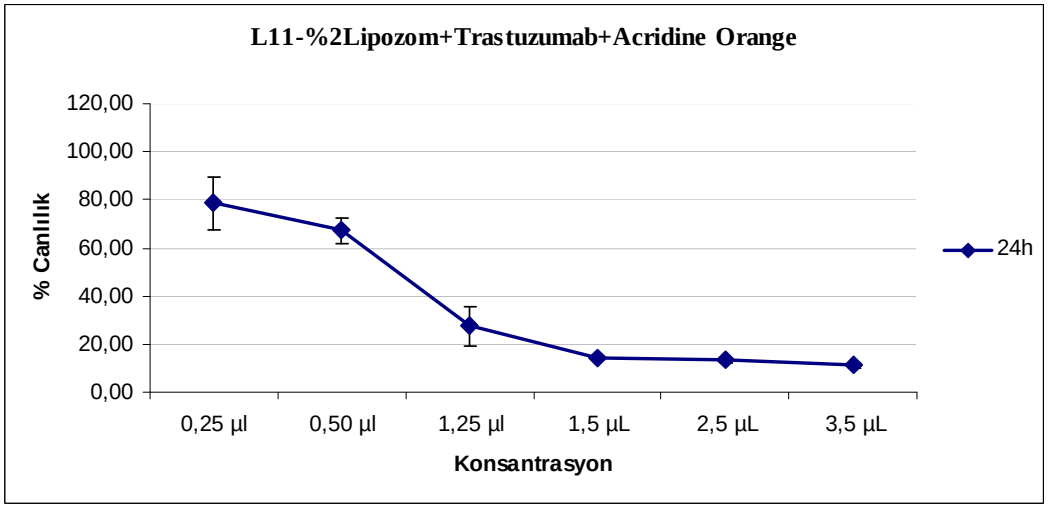


Şekil 3.49. Hücrelere uygulanan L10'un 24 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi (IC_{50}: ~0,3 µL/100 µL) (n=3)

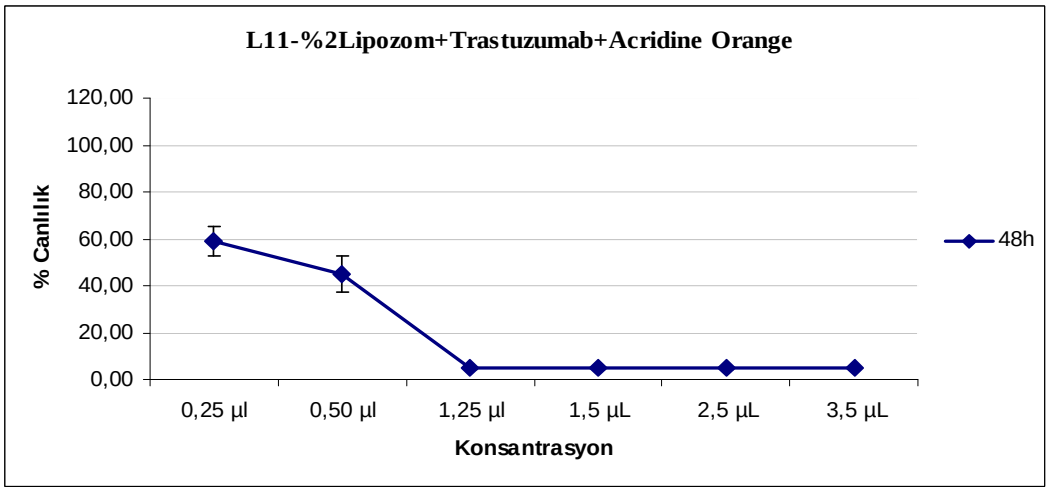


Şekil 3.50. Hücrelere uygulanan L10'un 48 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi (IC_{50}: ~0,3 µL/100 µL) (n=3)

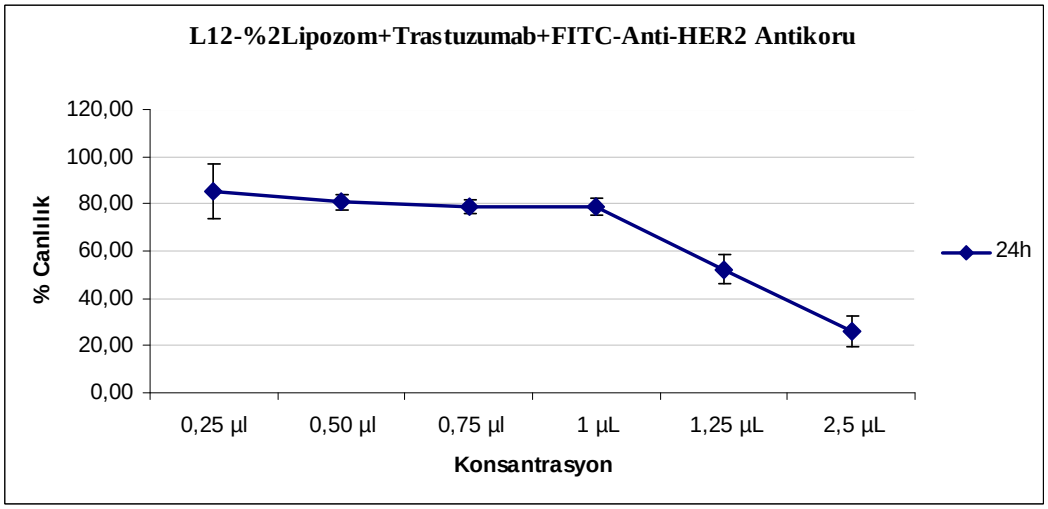
L9 ve L10 karşılaştırıldığında, etkin madde yüklenmiş olan L10'un sitotoksisitesinin fazla olduğu bulunmuştur. Buna göre, oluşturulan lipozom formülasyonlarına etkin madde yüklemesi yapılabilirliği gösterilmiştir.



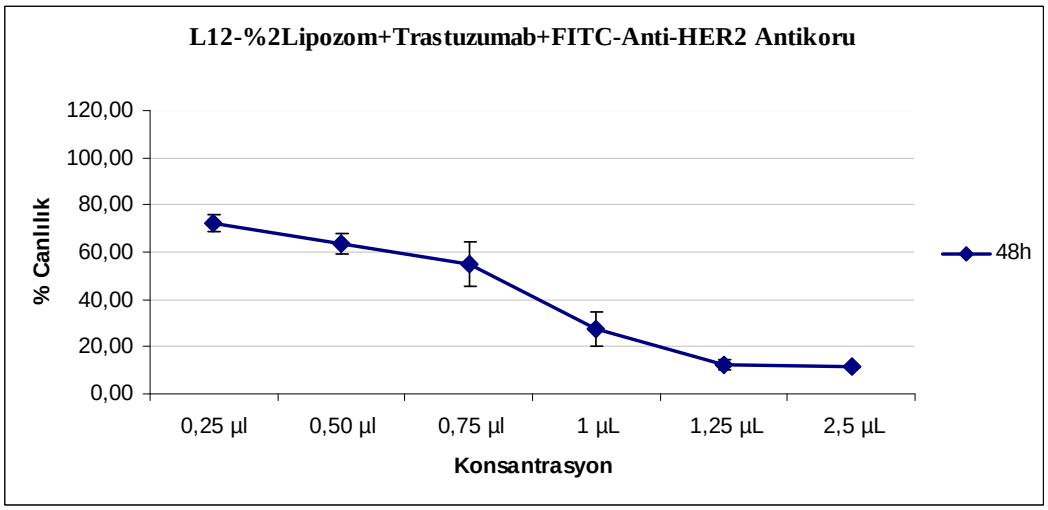
Şekil 3.51. Hücrelere uygulanan L11'in 24 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi (IC_{50}: 0,8 µL/100 µL) (n=3)



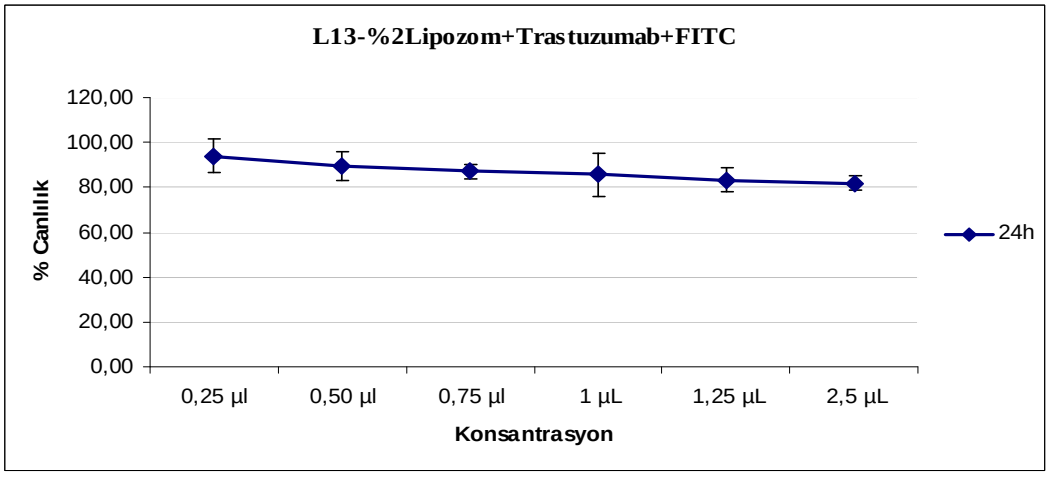
Şekil 3.52. Hücrelere uygulanan L11'in 48 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi (IC_{50}: 0,35 µL/100 µL) (n=3)



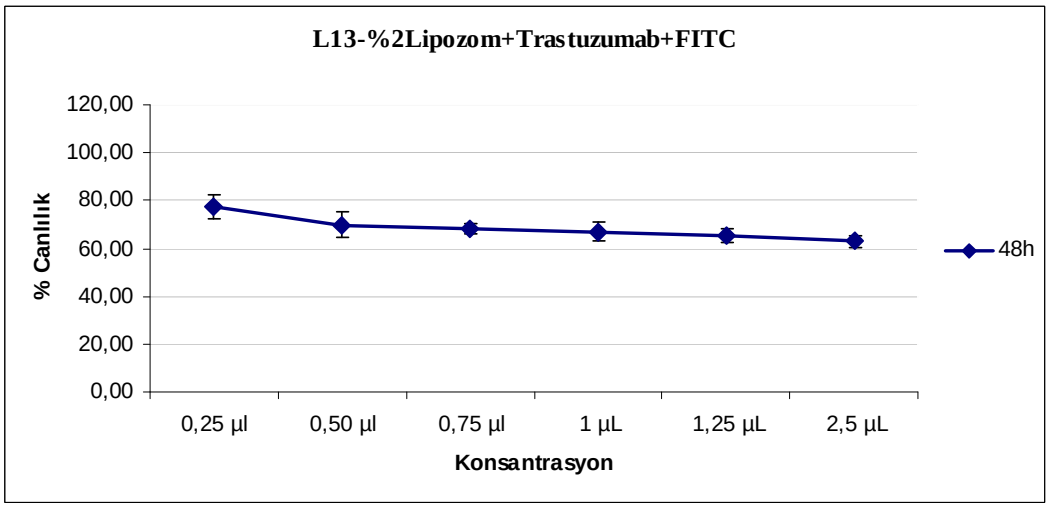
Şekil 3.53. Hücrelere uygulanan L12'nin 24 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi (IC_{50}: ~1,25 µL/100 µL) (n=3)



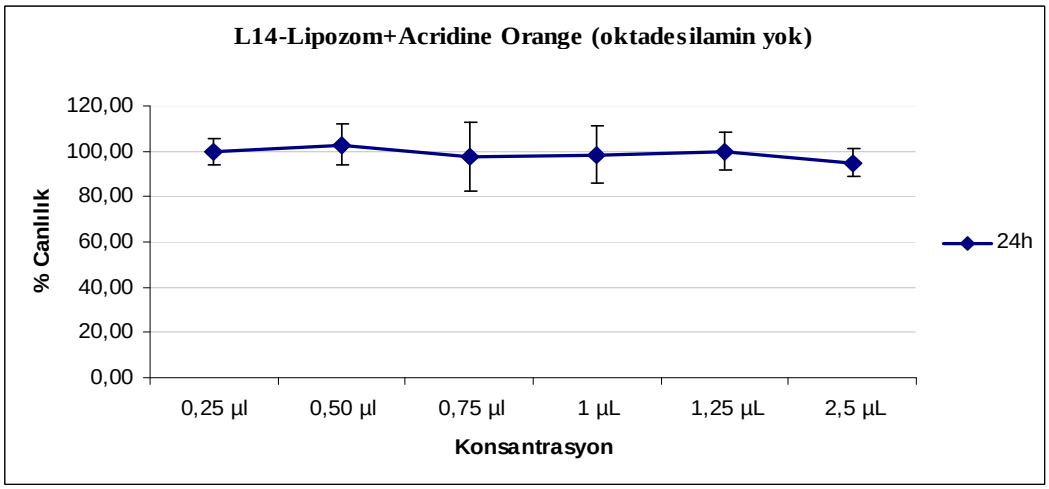
Şekil 3.54. Hücrelere uygulanan L12'nin 48 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi (IC_{50}: ~0,8 µL/100 µL) (n=3)



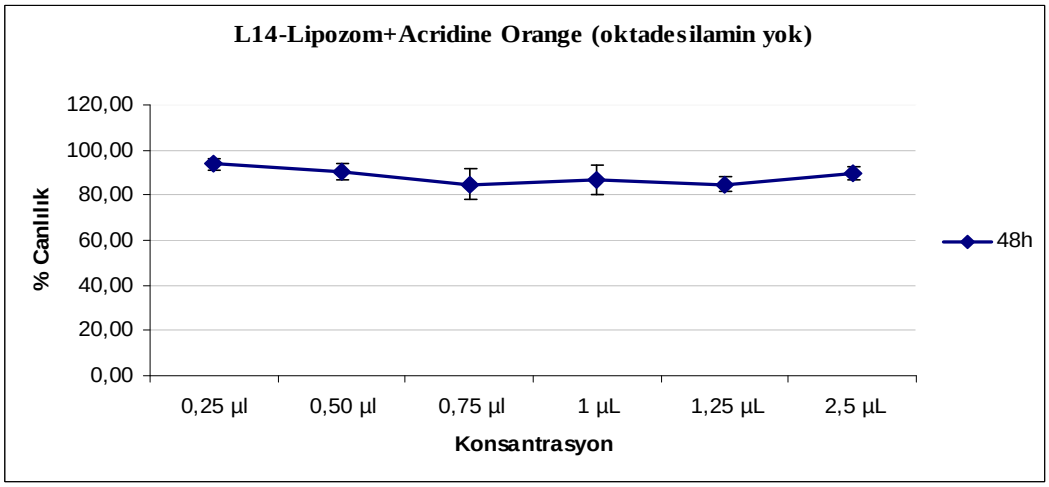
Şekil 3.55. Hücrelere uygulanan L13'ün 24 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi (n=3)



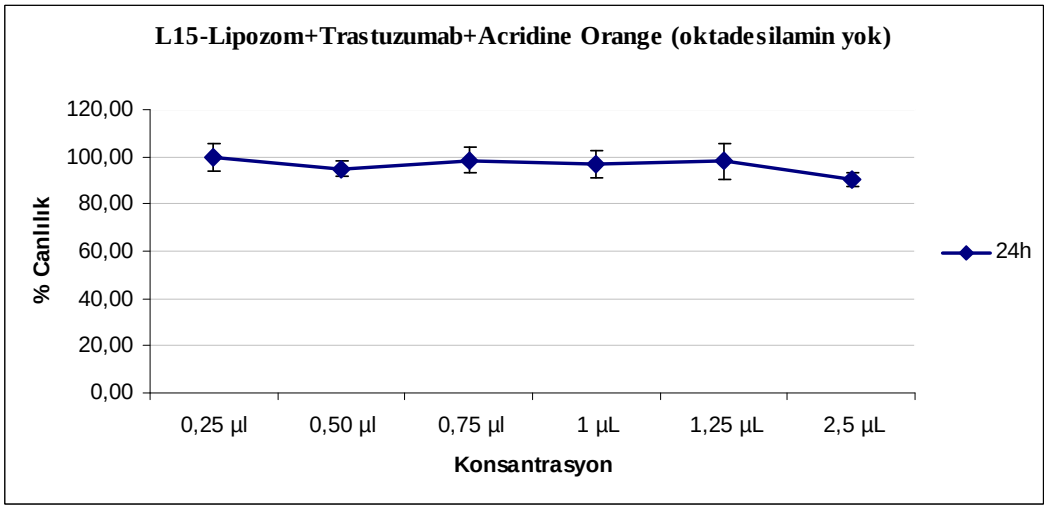
Şekil 3.56. Hücrelere uygulanan L13'ün 48 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi (n=3)



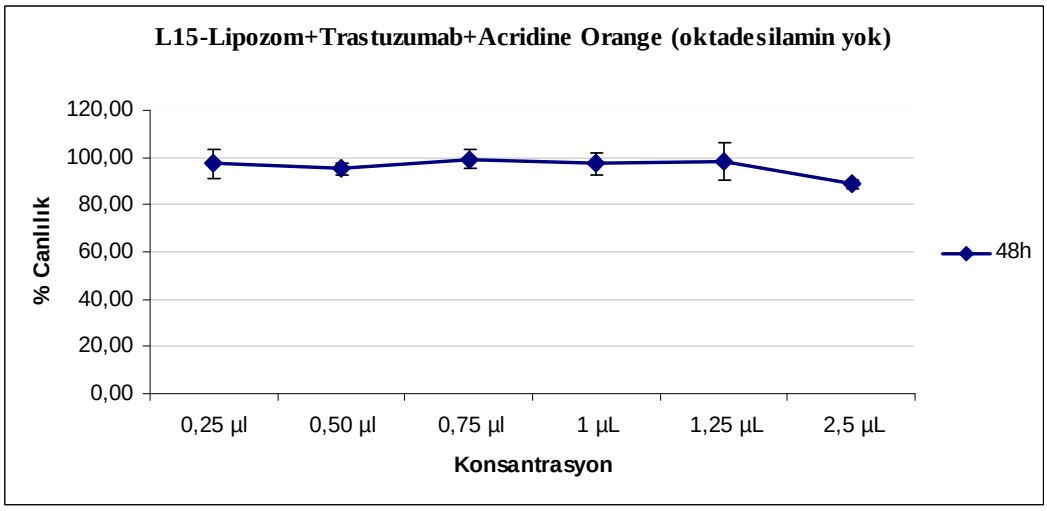
Şekil 3.57. Hücrelere uygulanan L14'ün 24 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi (n=3)



Şekil 3.58. Hücrelere uygulanan L14'ün 48 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi (n=3)



Şekil 3.59. Hücrelere uygulanan L15'in 24 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi (n=3)



Şekil 3.60. Hücrelere uygulanan L15'in 48 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi (n=3)

3.5.1.2 KLN formülasyonlarının sitotoksisite değerlendirmeleri

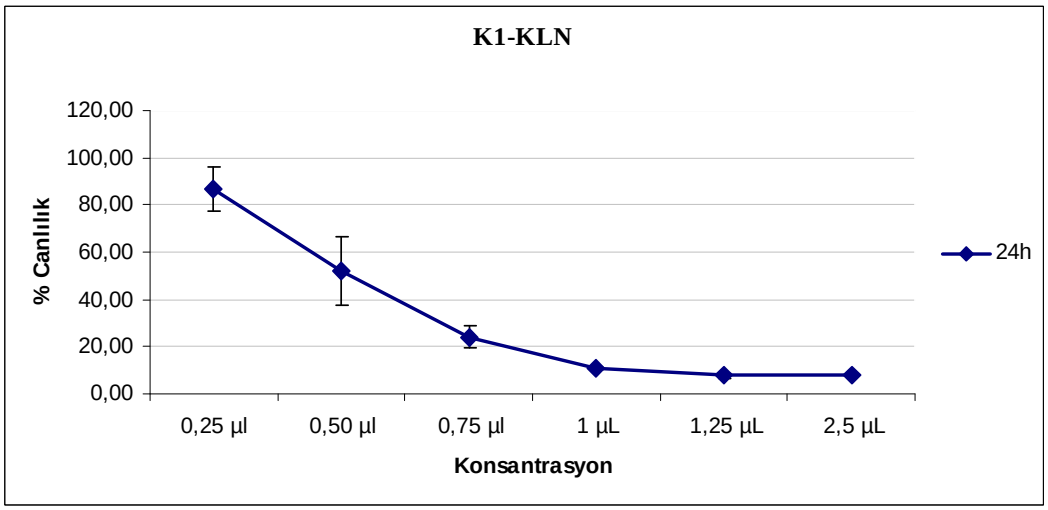
Çizelge 3.12. Etkin madde içermeyen K1'in sitotoksisite çalışmasında kullanılan formülasyon miktarları

Formülasyon	K1
Konsantrasyon Miktarları	0,25µl/100µL
	0,5µl/100µL
	0,75µl/100µL
	1 µl/100µL
	1,25µl/kuyu
	2,5µl/kuyu

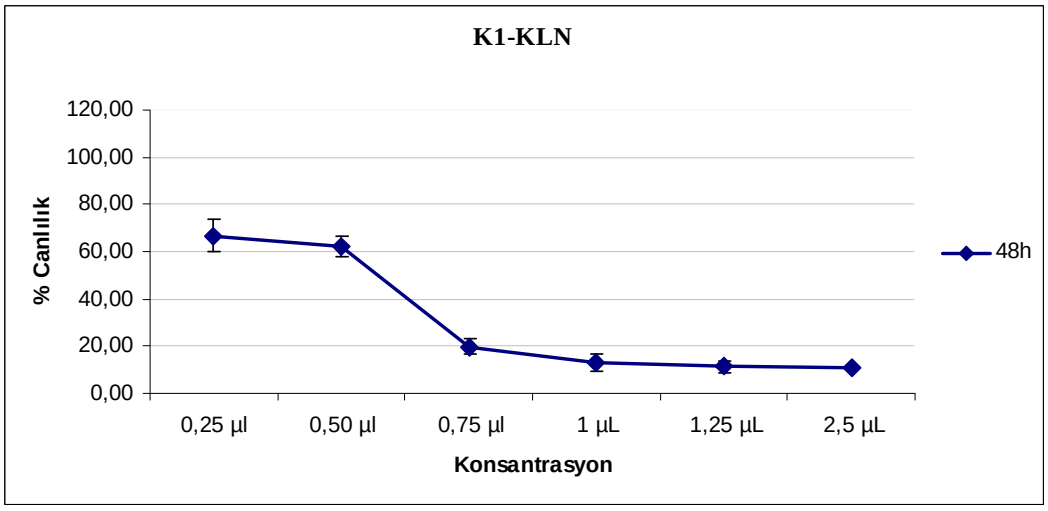
Çizelge 3.13. Etkin madde içeren KLN formülasyonlarının, sitotoksisite çalışmalarında kullanılan yaklaşık trastuzumab (mAb) konsantrasyonları

Formülasyonlar	K2, K3 ve K4	
Konsantrasyon Miktarları	0,25µl/100µL	~0,17 µg/100µL
	0,5µl/100µL	~0,34 µg/100µL
	0,75µl/100µL	~0,51 µg/100µL
	1 µl/100µL	~0,68 µg/100µL
	1,25µl/kuyu	~0,85 µg/100µL
	2,5µl/kuyu	~1,7 µg/100µL

Müller ve arkadaşları ile başlayan KLN çalışmalarının yoğun ilgi görmesinin nedeni sitotoksik olmamalarıdır (Yuan ve ark., 2008; Subedi ve ark., 2009).

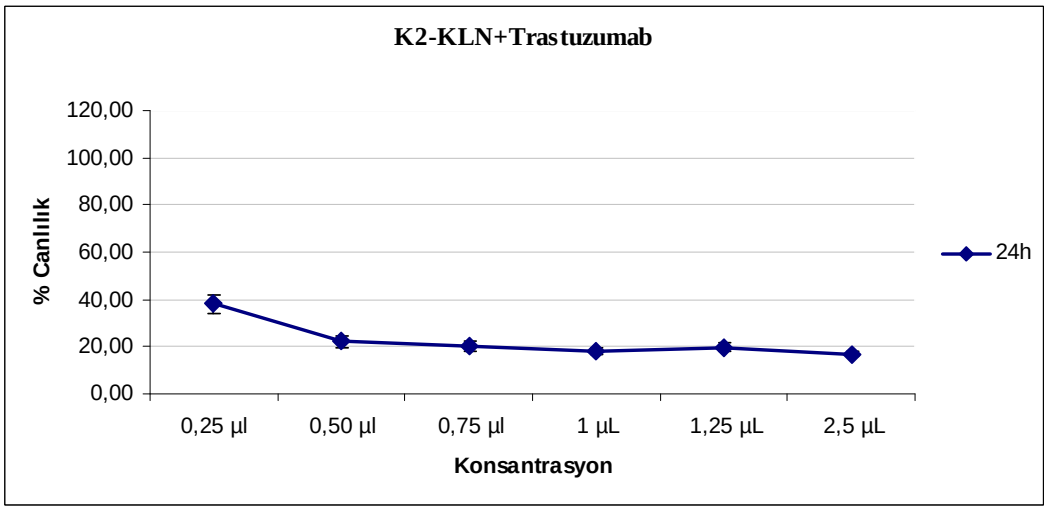


Şekil 3.61. Hücrelere uygulanan K1'in 24 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi (IC_{50}: ~0,55 µL/100 µL) (n=3)

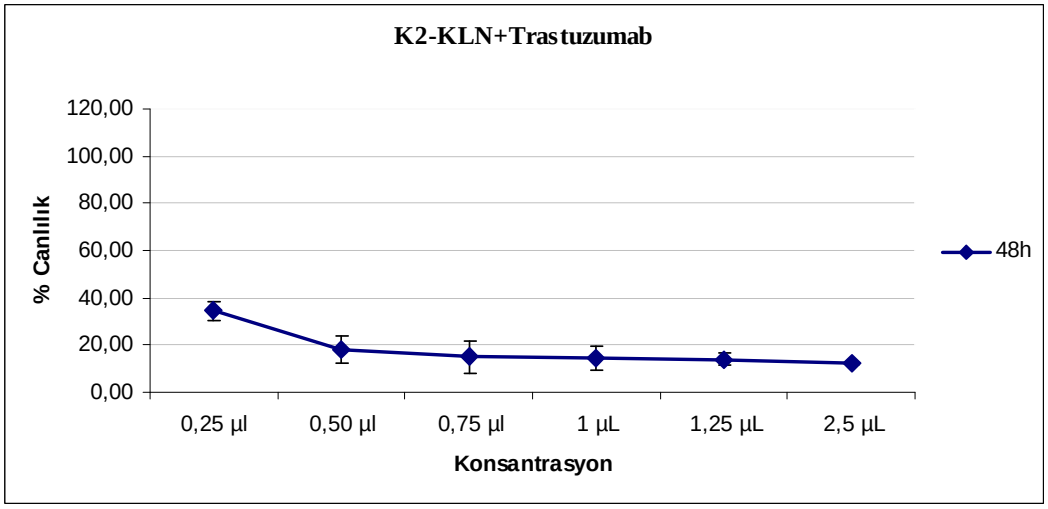


Şekil 3.62. Hücrelere uygulanan K1'in 48 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi (IC_{50}: ~0,55 µL/100 µL) (n=3)

Katı lipit nanopartiküllerin, peptit/protein moleküllerini bağlayarak hücrelere taşıyabildiği bilinmektedir (Almeida ve Souto, 2007). Bu tez çalışmasında lipozomlara alternatif olarak çalışılan, katı lipit nanopartiküllerinin sitotoksisite profilleri, literatürün (Subedi ve ark., 2009) aksine oldukça yüksek bulunmuştur.

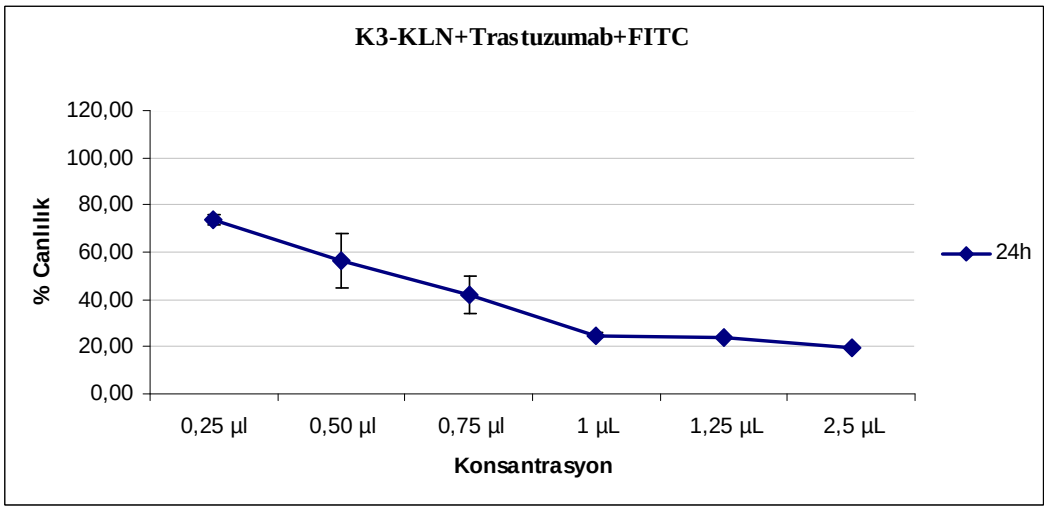


Şekil 3.63. Hücrelere uygulanan K2'nin 24 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi (n=3)

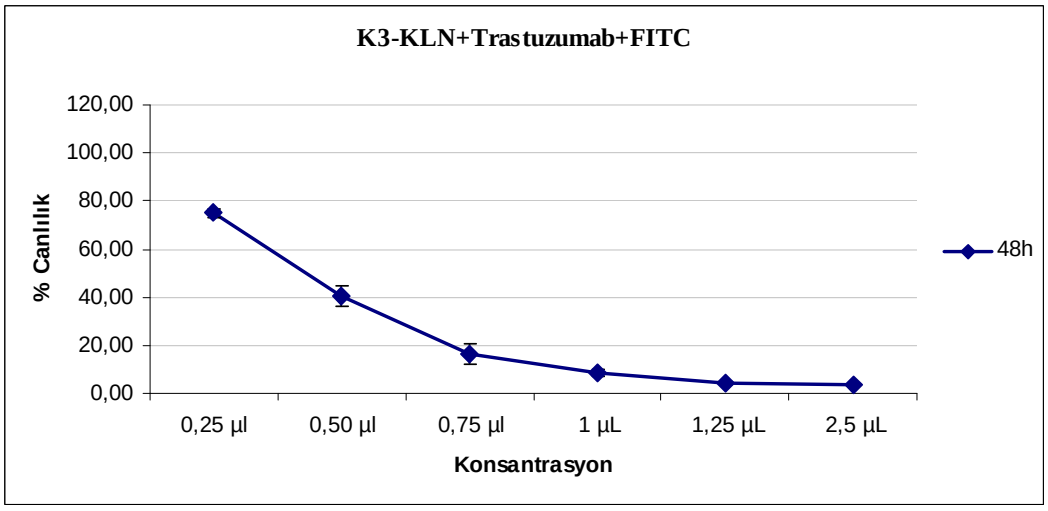


Şekil 3.64. Hücrelere uygulanan K2'nin 48 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi (n=3)

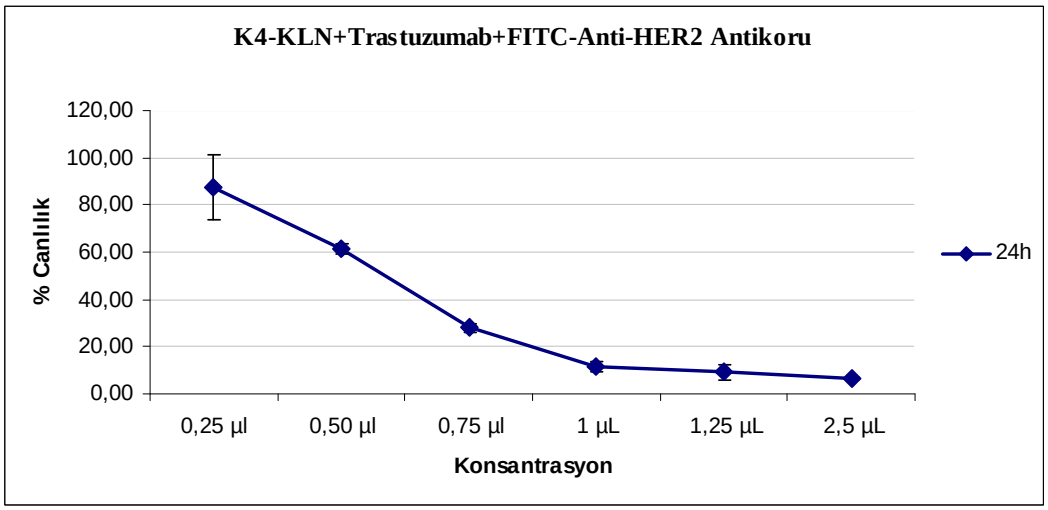
Glikoprotein yapılı anti-HER2 antikoru (trastuzumab), K2 formülasyonuna eklenerek sitotoksisite çalışmaları yapılmıştır.



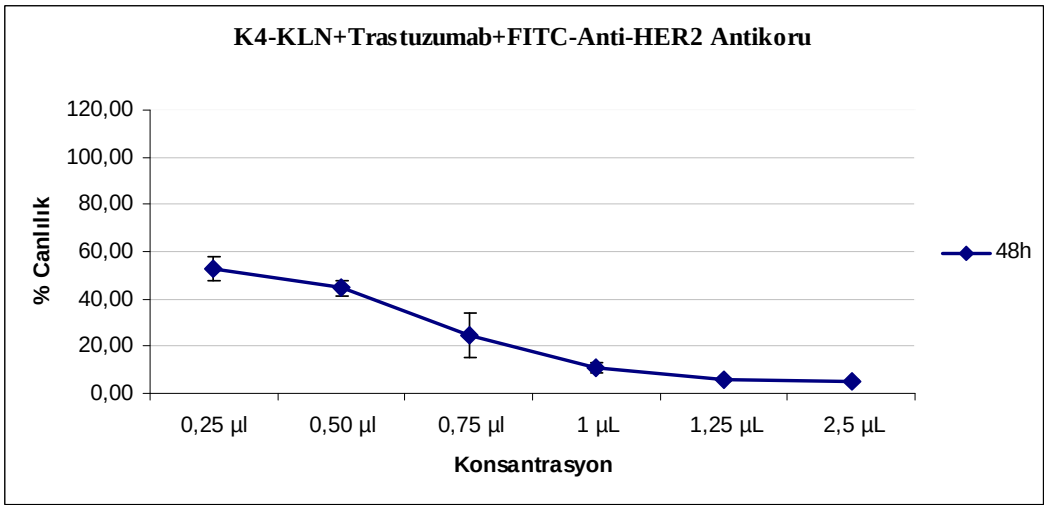
Şekil 3.65. Hücrelere uygulanan K3'ün 24 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi (IC50: ~0,5 µL/ 100 µL) (n=3)



Şekil 3.66. Hücrelere uygulanan K3'ün 48 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi (IC50: ~0,4 µL/ 100 µL) (n=3)



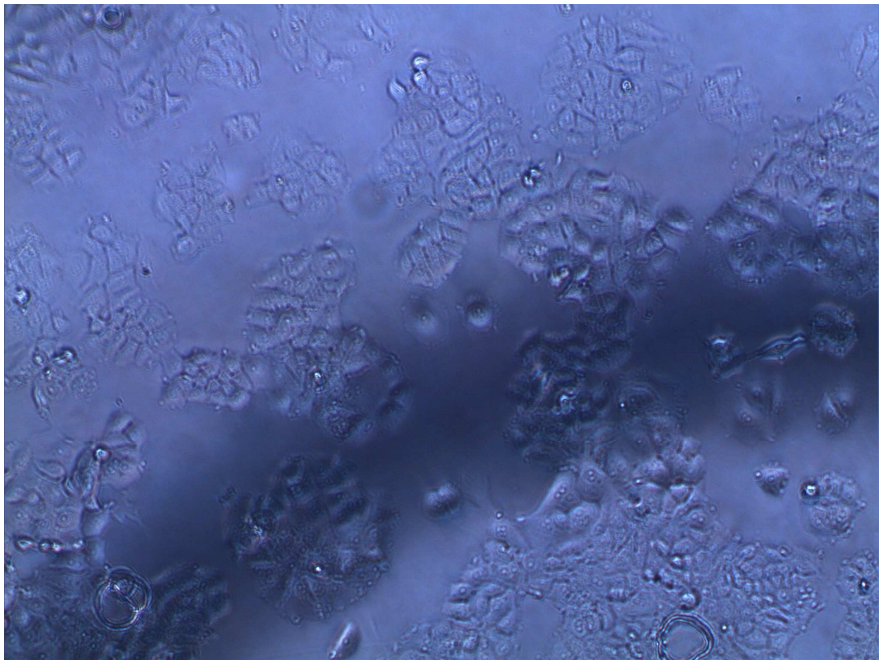
Şekil 3.67. Hücrelere uygulanan K4'ün 24 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi (IC50: ~0,6 µL/ 100 µL) (n=3)



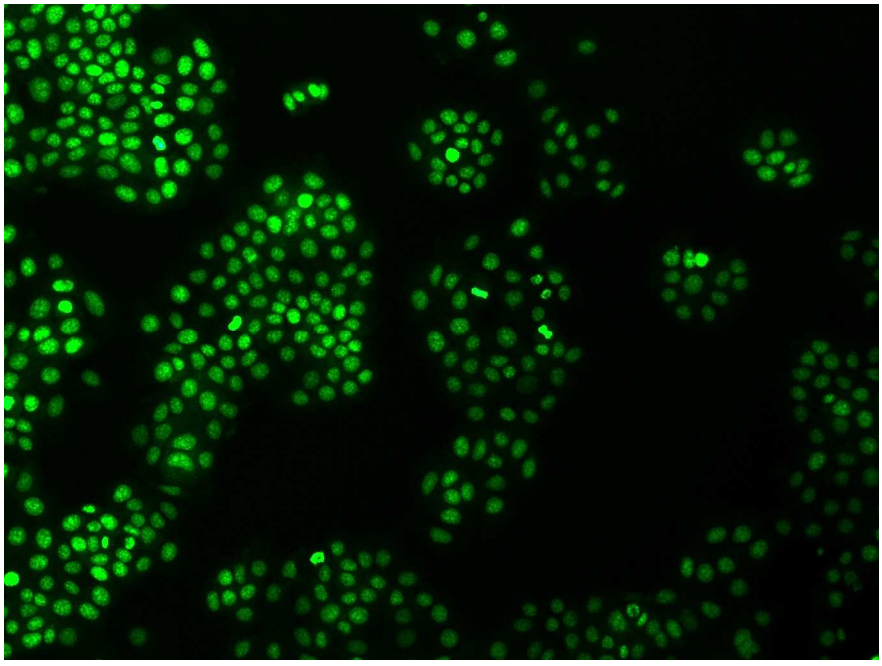
Şekil 3.68. Hücrelere uygulanan K4'ün 48 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksisitesi (IC50:~0,26 µL/ 100 µL) (n=3)

3.5.2 AO ve FITC yüklü nanopartiküllere ait mikroskobik bulgular

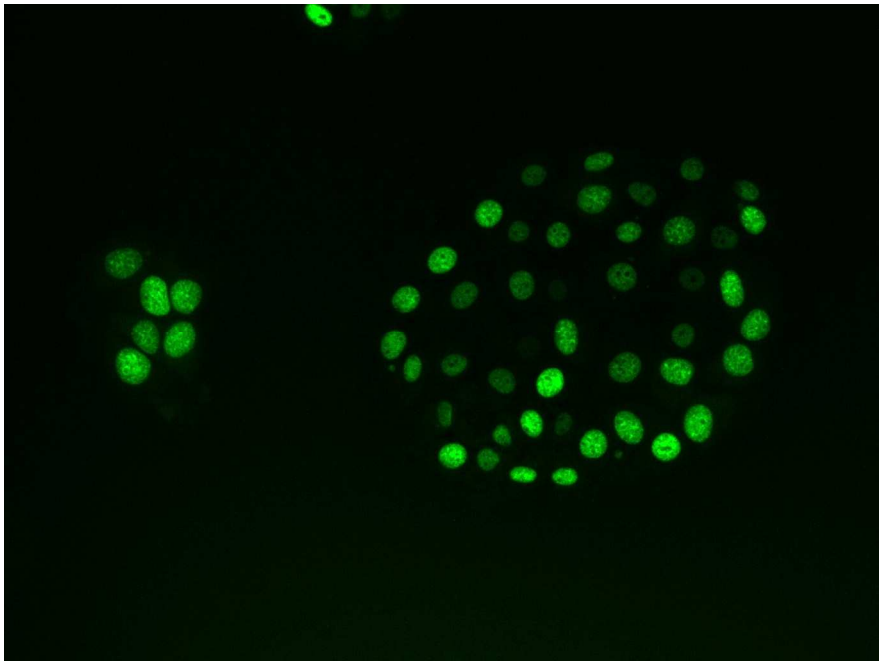
Bu bölümdeki çalışmalar AO ve FITC boyar maddelerinin doğrudan 100µg/1mL konsantrasyonda ve bölüm 2.2.1.3'de belirtildiği oranlarda enkapsüle edilmiş formülasyonlarının hücrelere uygulanması sonucunda alınan görüntüler floresan mikroskobu ile belirlenmiştir.



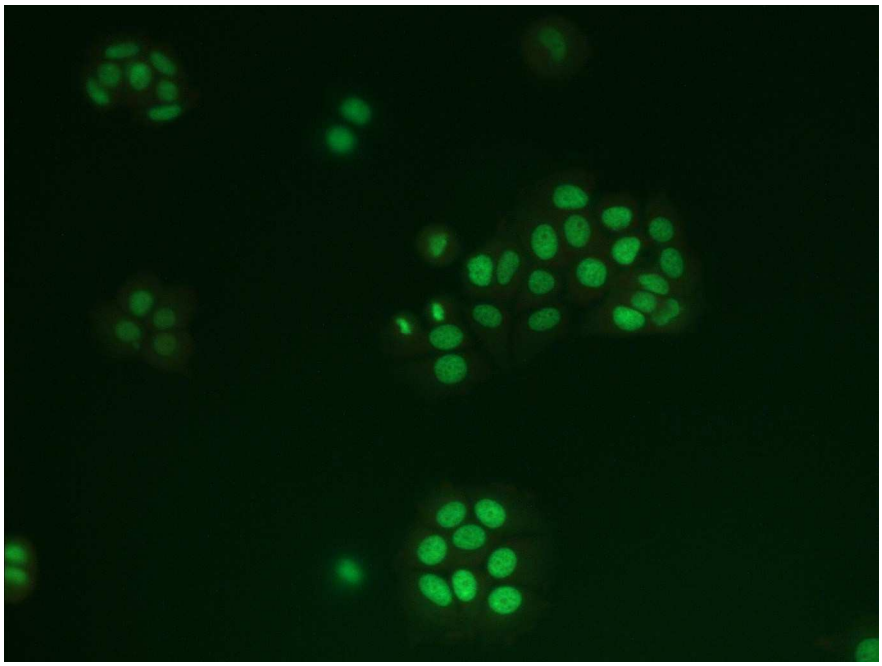
Şekil 3.69. MCF-7 hücrelerinin beyaz ışıkta çekilen floresan mikroskobu görüntüsü (10X)



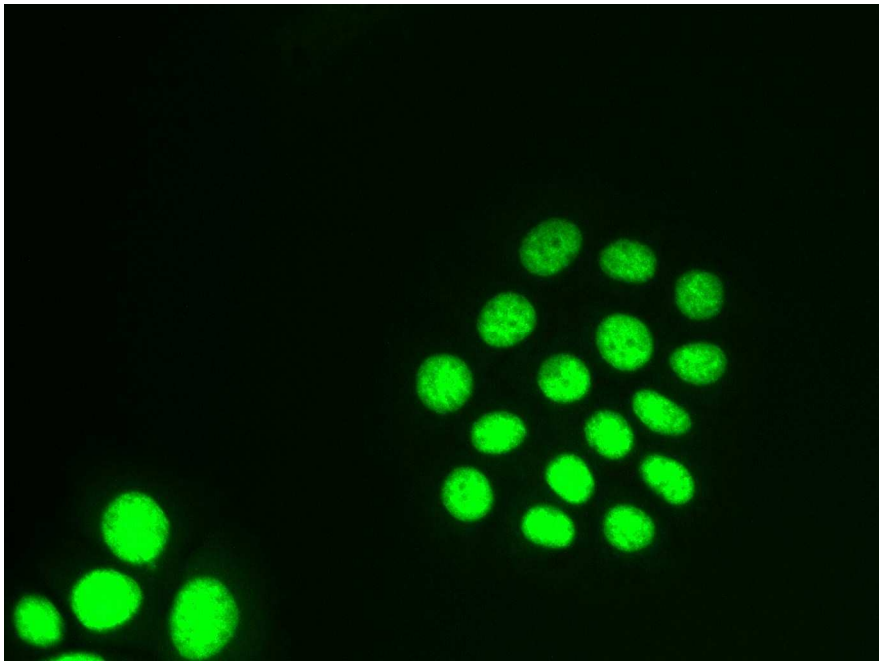
Şekil 3.70. Akridin turuncusu uygulanmış MCF-7 hücrelerinin floresan mikroskobu görüntüsü (10X) [nukleuslar yeşil floresan renkli görünmektedir]



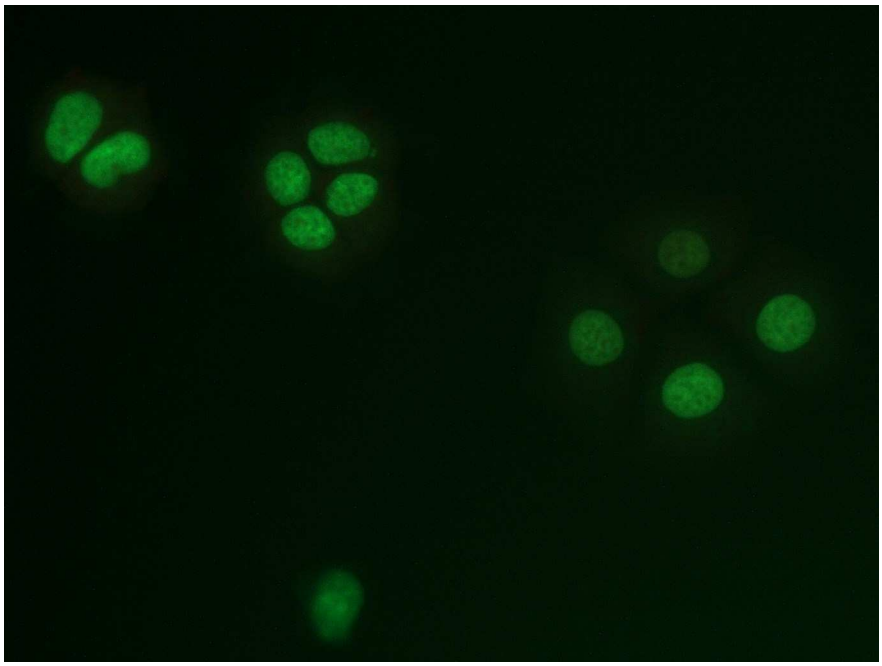
Şekil 3.71. Akridin turuncusu uygulanmış MCF-7 hücrelerinin floresan mikroskobu görüntüsü (20X) [nukleuslar yeşil floresan renkli görünmektedir]



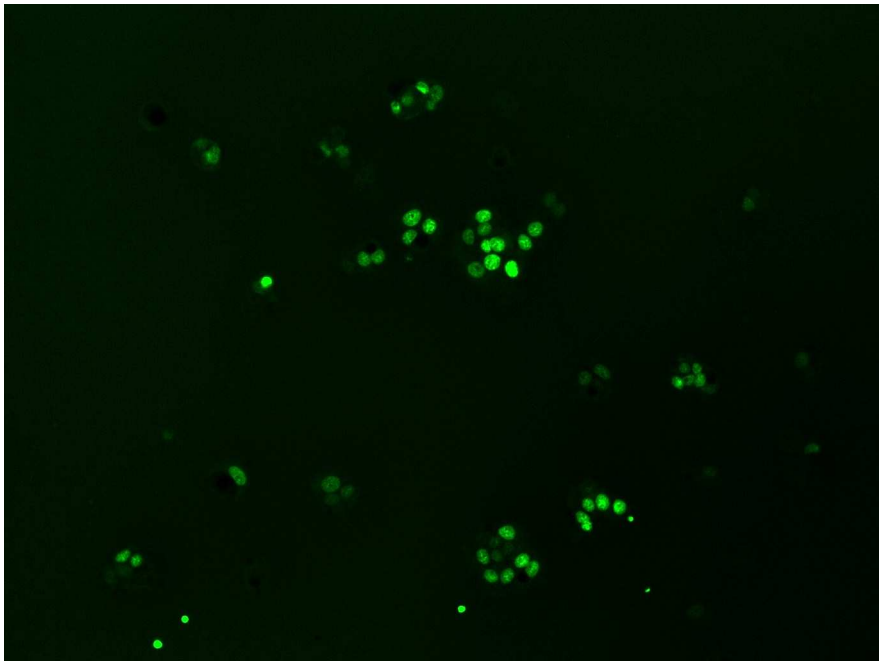
Şekil 3.72. Akridin turuncusu uygulanmış MCF-7 hücrelerinin floresan mikroskobu görüntüsü (20X) [nukleuslar yeşil floresan renkli görünmektedir]



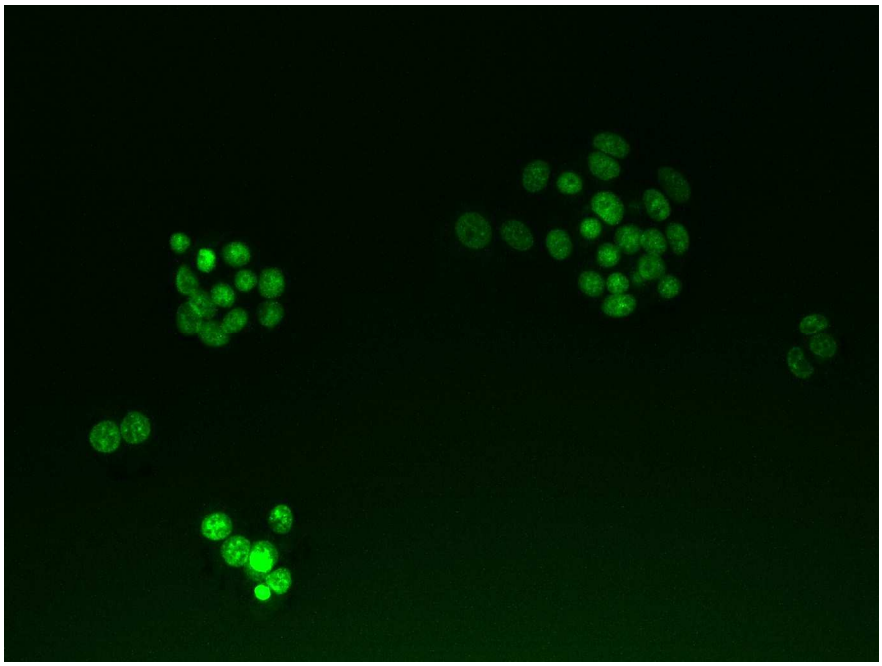
Şekil 3.73. Akridin turuncusu uygulanmış MCF-7 hücrelerinin floresan mikroskobu görüntüsü (40X) [nukleuslar yeşil floresan renkli görünmektedir]



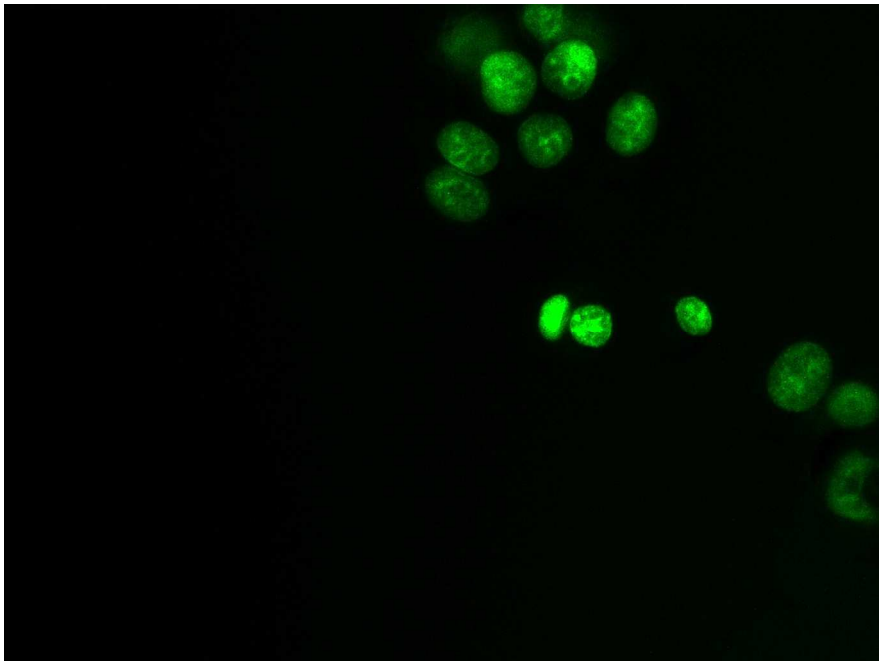
Şekil 3.74. Akridin turuncusu uygulanmış MCF-7 hücrelerinin floresan mikroskobu görüntüsü (40X) [nukleuslar yeşil floresan renkli görünmektedir]



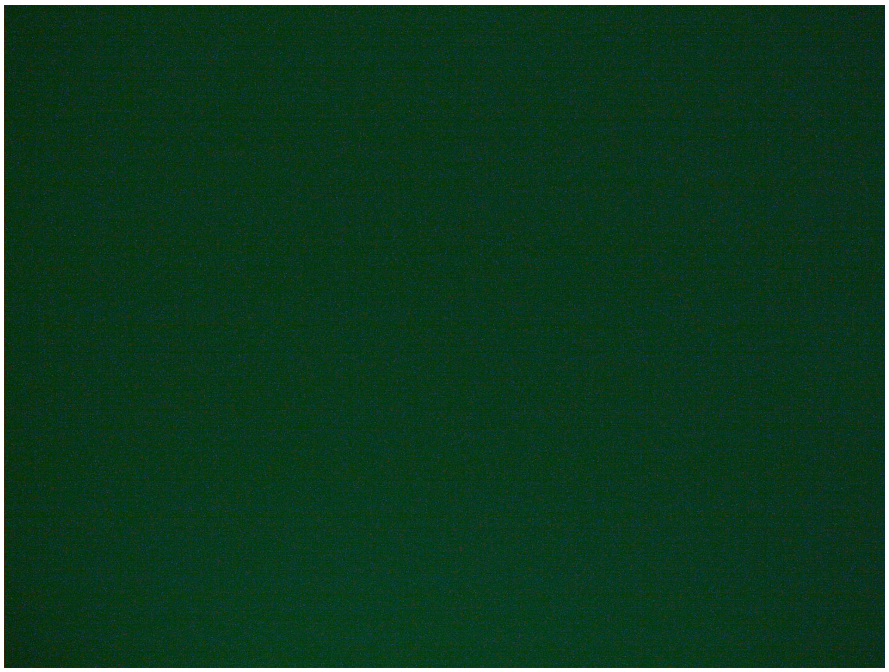
Şekil 3.75. FITC-bağlı anti-HER2 antikoru uygulanmış MCF-7 hücrelerinin floresan mikroskobu görüntüsü (10X) [nukleuslar yeşil floresan renkli görünmektedir]



Şekil 3.76. FITC-bağlı anti-HER2 antikoru uygulanmış MCF-7 hücrelerinin floresan mikroskobu görüntüsü (20X) [nukleuslar yeşil floresan renkli görünmektedir]

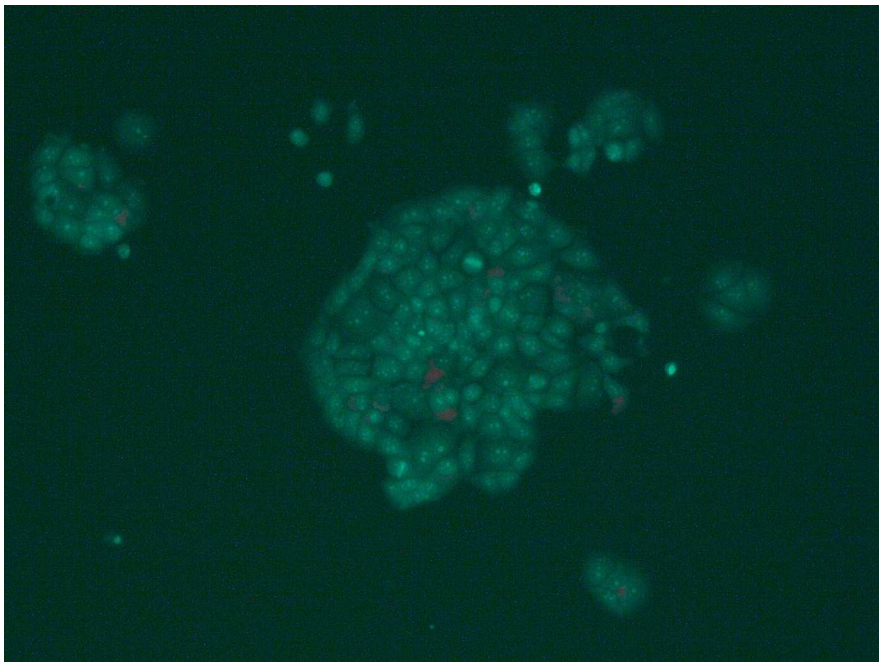


Şekil 3.77. FITC-bağlı anti-HER2 antikoru uygulanmış MCF-7 hücrelerinin floresan mikroskobu görüntüsü (40X) [nukleuslar yeşil floresan renkli görünmektedir]

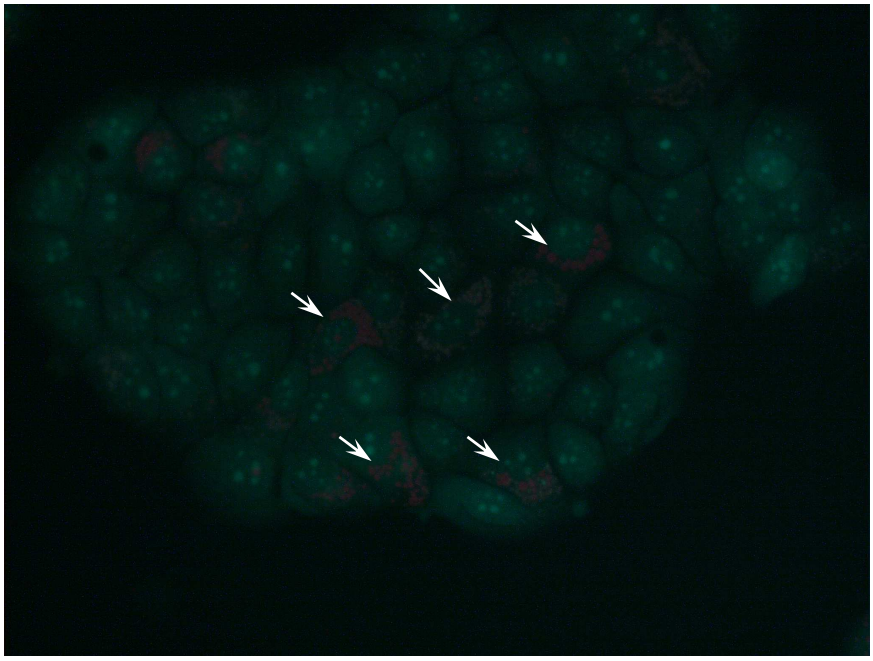


Şekil 3.78. L4 uygulanmış MCF-7 hücrelerinin floresan mikroskobu görüntüsü [zemin floresan renk görünmektedir]

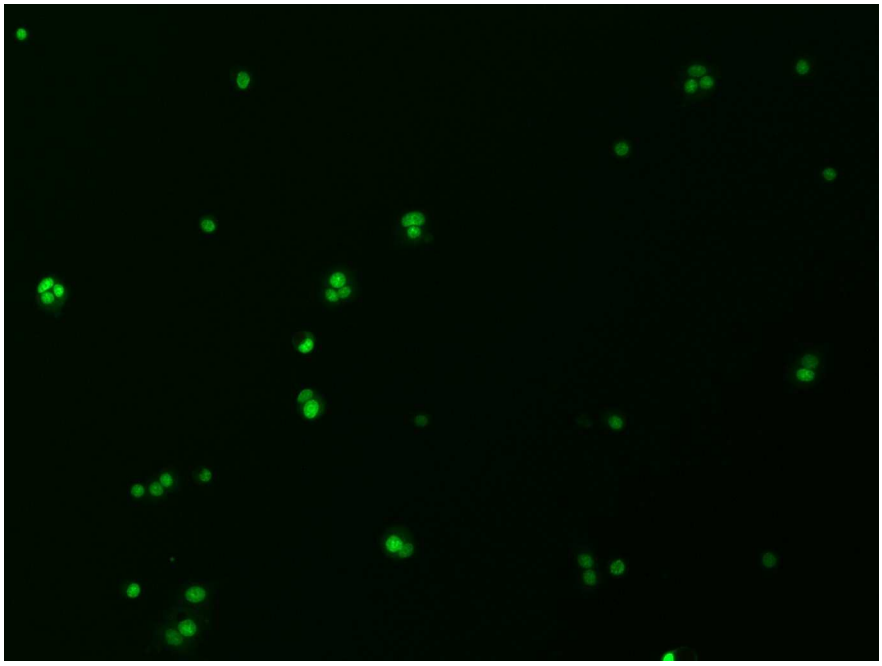
Şekil 3.79. L5 uygulanmış MCF-7 hücrelerinin floresan mikroskobu görüntüsü (10X) [yeşil floresan renkli hücre nükleusları beyaz oklarla gösterilmiştir]



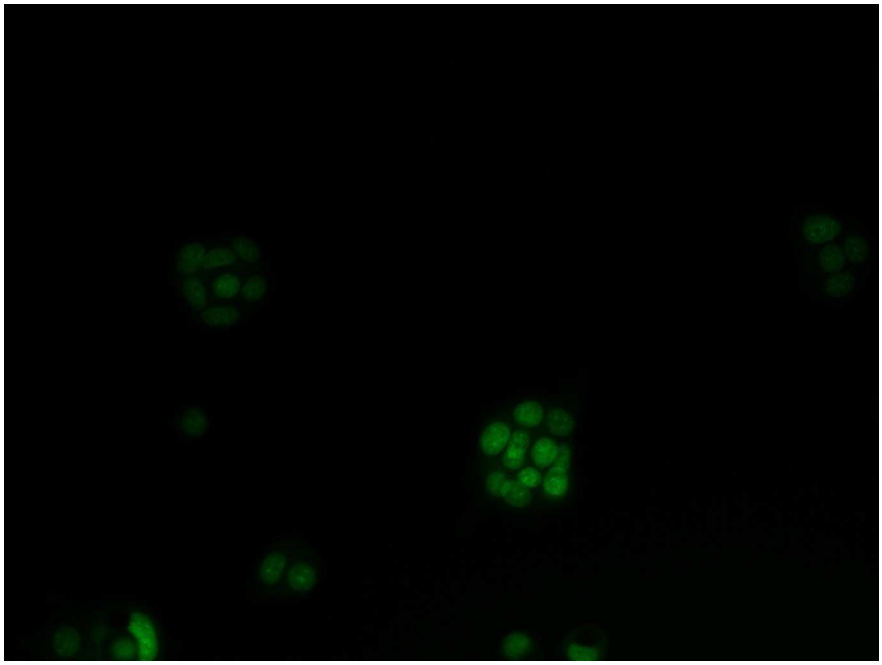
Şekil 3.80. L8 uygulanmış MCF-7 hücrelerinin floresan mikroskobu görüntüsü (20X)



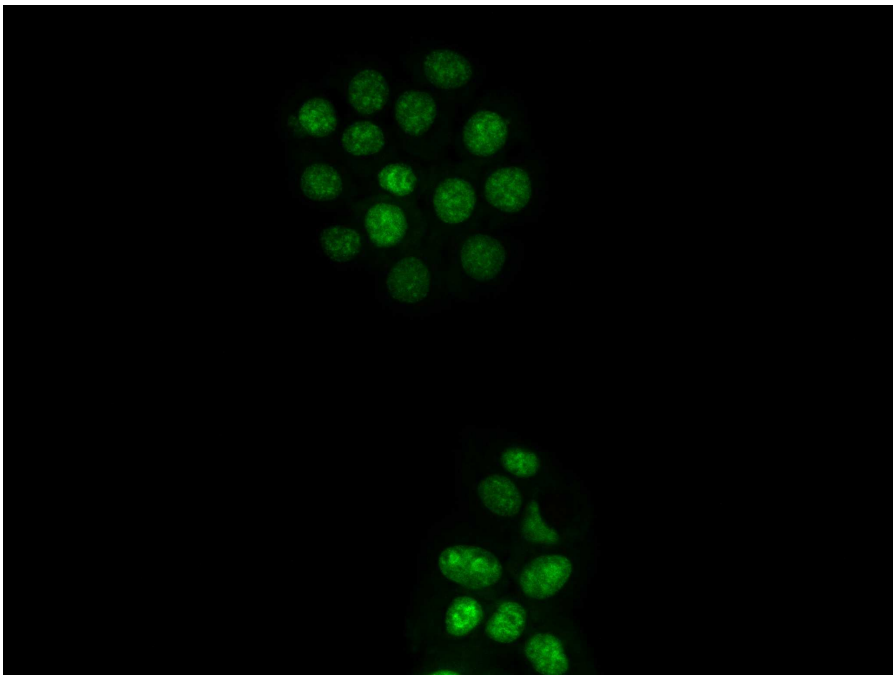
Şekil 3.81. L8 uygulanmış MCF-7 hücrelerinin floresan mikroskobu görüntüsü (40X) [kırmızı renkli gözlenen sitoplazmadaki RNA molekülleri beyaz oklarla gösterilmiştir, hücre nukleusları açık yeşil renkli görünmektedir]



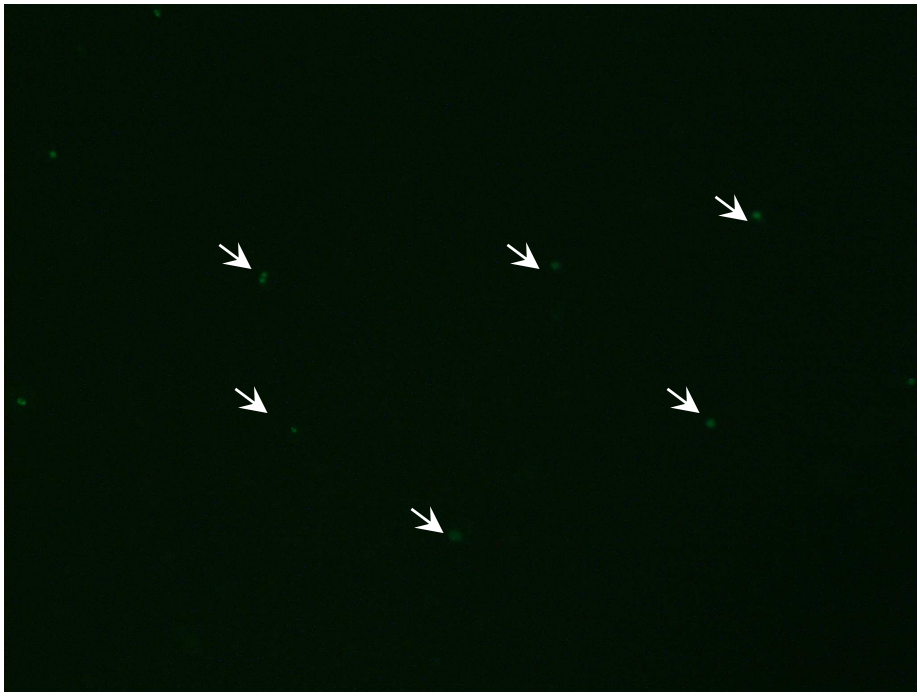
Şekil 3.82. L11 uygulanmış MCF-7 hücrelerinin floresan mikroskobu görüntüsü (10X) [hücre nukleusları yeşil floresan renkli görünmektedir]



Şekil 3.83. L11 uygulanmış MCF-7 hücrelerinin floresan mikroskobu görüntüsü (20X) [nukleuslar yeşil floresan renkli görünmektedir]

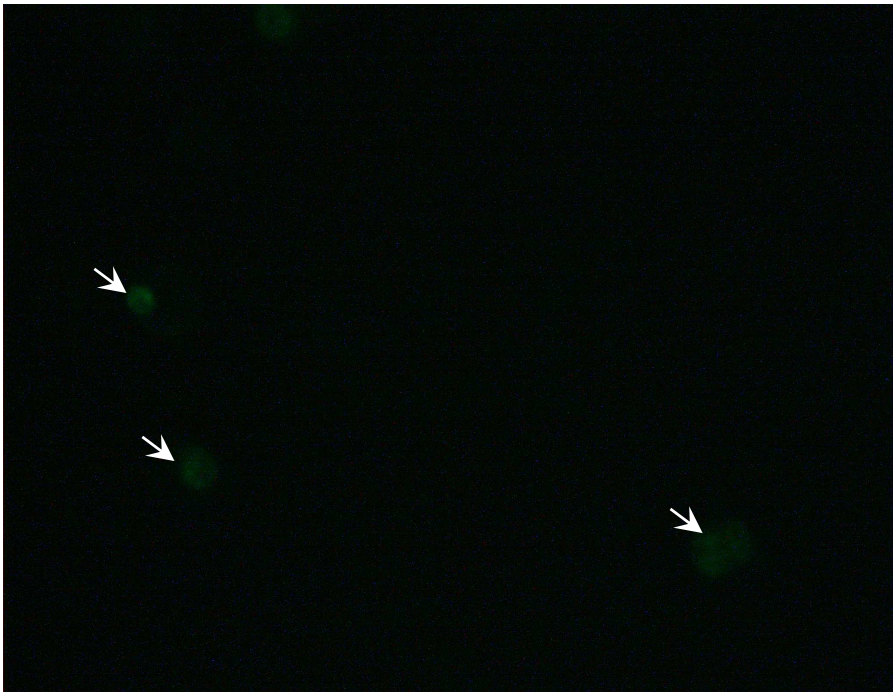


Şekil 3.84. L11 uygulanmış MCF-7 hücrelerinin floresan mikroskobu görüntüsü (40X) [nukleuslar yeşil floresan renkli görünmektedir]

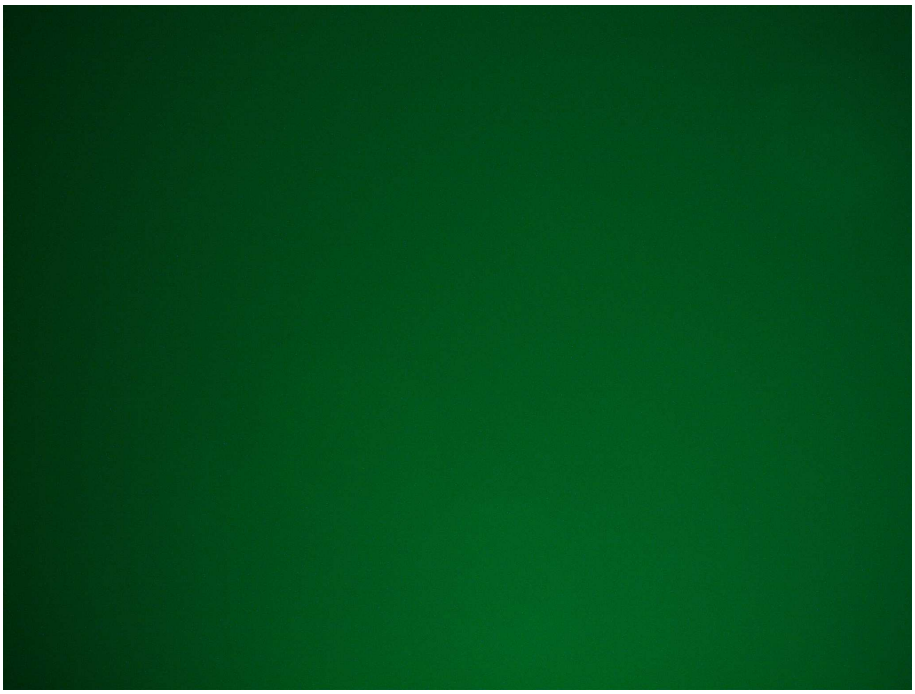


Şekil 3.85. L12 uygulanmış MCF-7 hücrelerinin floresan mikroskobu görüntüsü (10X) [yeşil floresan renkli nukleuslar beyaz oklarla gösterilmiştir]

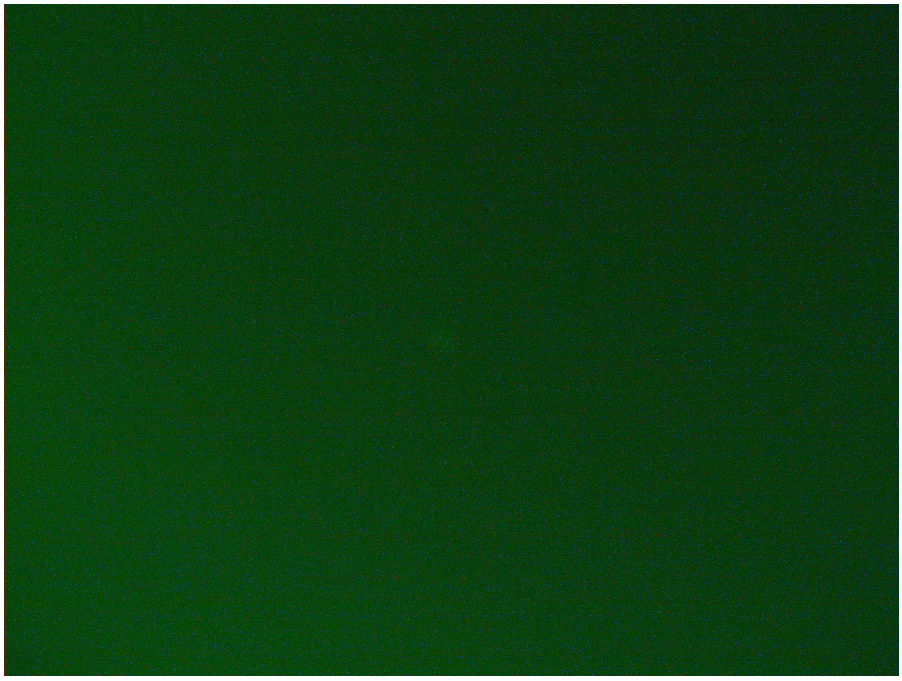
Şekil 3.86. L12 uygulanmış MCF-7 hücrelerinin floresan mikroskobu görüntüsü (20X) [yeşil floresan renkli nukleuslar beyaz oklarla gösterilmiştir]



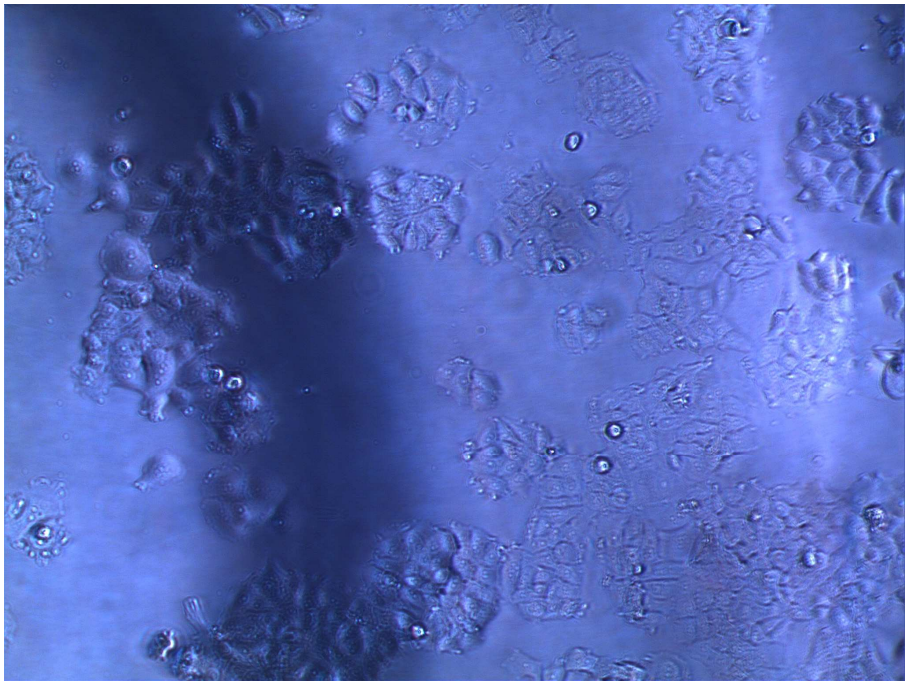
Şekil 3.87. L12 uygulanmış MCF-7 hücrelerinin floresan mikroskobu görüntüsü (40X) [yeşil floresan renkli nukleuslar beyaz oklarla gösterilmiştir]



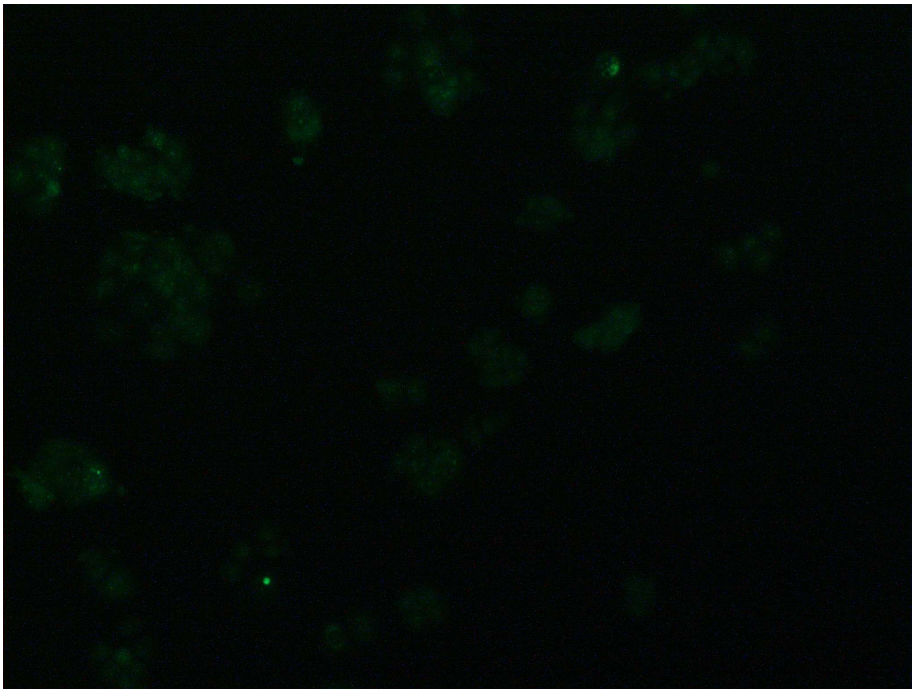
Şekil 3.88. L13 uygulanmış MCF-7 hücrelerinin floresan mikroskobu görüntüsü [zemin floresan renkli görünmektedir]



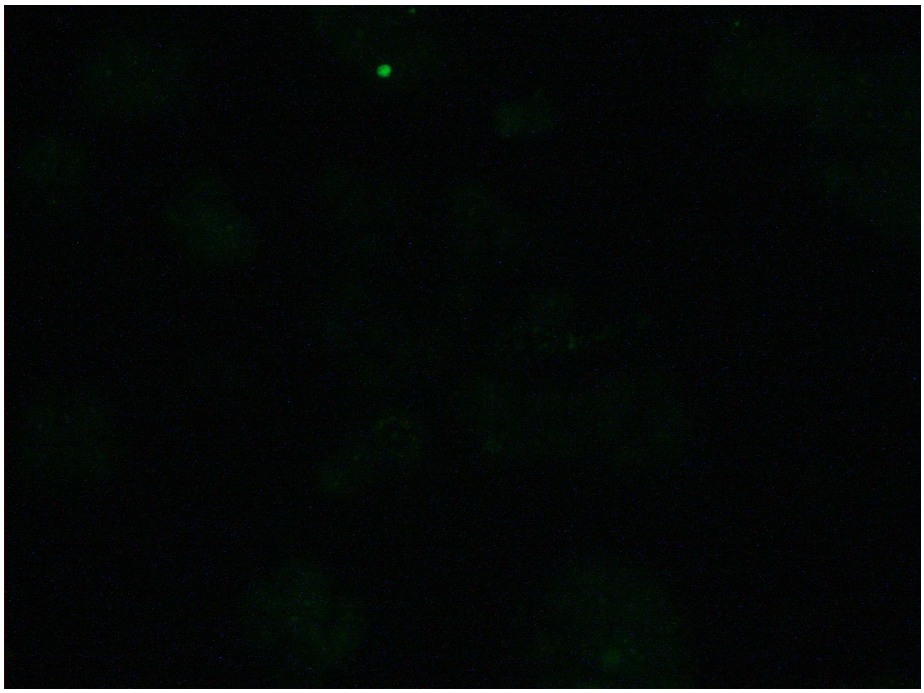
Şekil 3.89. L14 uygulanmış MCF-7 hücrelerinin floresan mikroskobu görüntüsü [zemin yeşil floresan renkli görünmektedir]



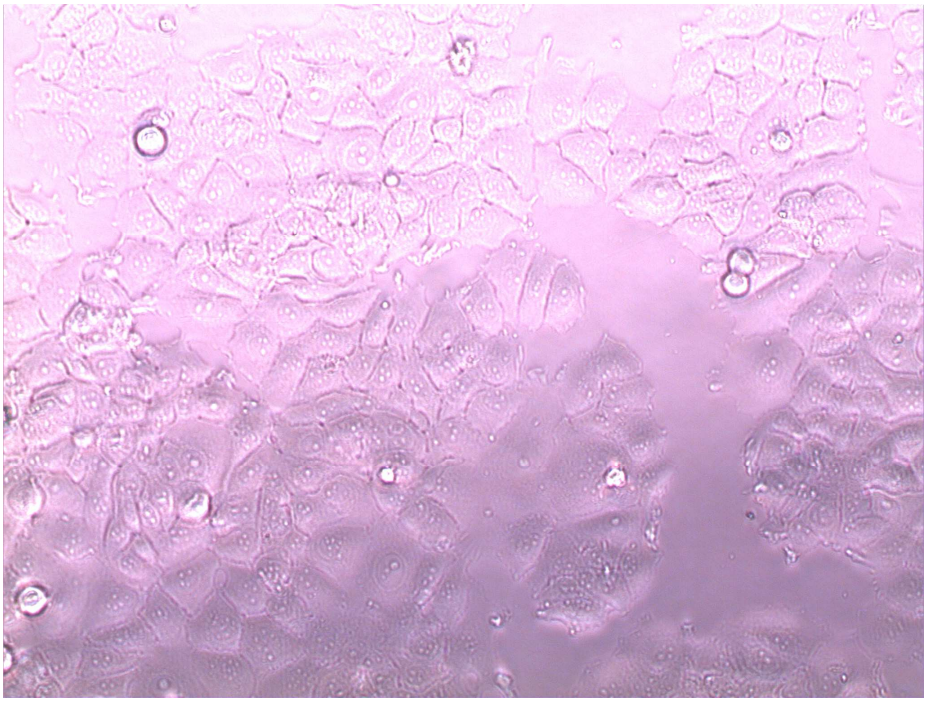
Şekil 3.90. L14 uygulanmış MCF-7 hücrelerinin floresan mikroskobu görüntüsü (10X) [şekil 3.89'daki aynı alanın beyaz ışıkta çekilen görüntüsü]



Şekil 3.91. L15 uygulanmış MCF-7 hücrelerinin floresan mikroskobu görüntüsü (10X)



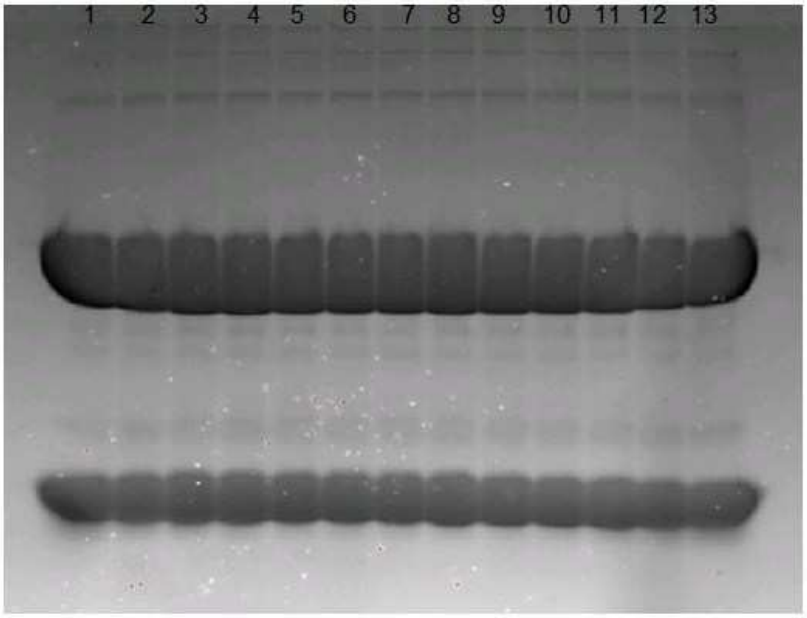
Şekil 3.92. L15 uygulanmış MCF-7 hücrelerinin floresan mikroskobu görüntüsü (20X)



Şekil 3.93. L15 uygulanmış MCF-7 hücrelerinin floresan mikroskobu görüntüsü (20X) [şekil 3.92'deki alanın beyaz ışıkta çekilen görüntüsü]

3.6 SDS-PAGE Yöntemine Ait Bulgular

Formülasyon hazırlama sırasında kullanılan sonikasyonun antikor üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amacıyla eşit oranlardaki antikorlara farklı sürelerde (1-20 dk) sonikasyon uygulanmıştır. Strese maruz kalan antikorlar Bölüm 2.2.7'de anlatıldığı gibi jele yüklenerek görüntülenmiştir.

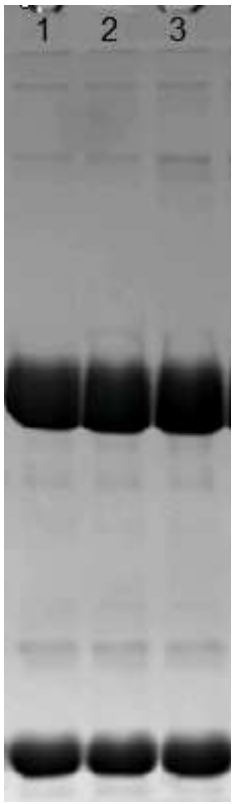


Şekil 3.94. 1-20 dk. sonikasyonun antikorlar üzerine etkisinin SDS-PAGE görüntüsü

Çizelge 3.14. 1-20 dk. aralığında antikora uygulanan sonikasyon süreleri

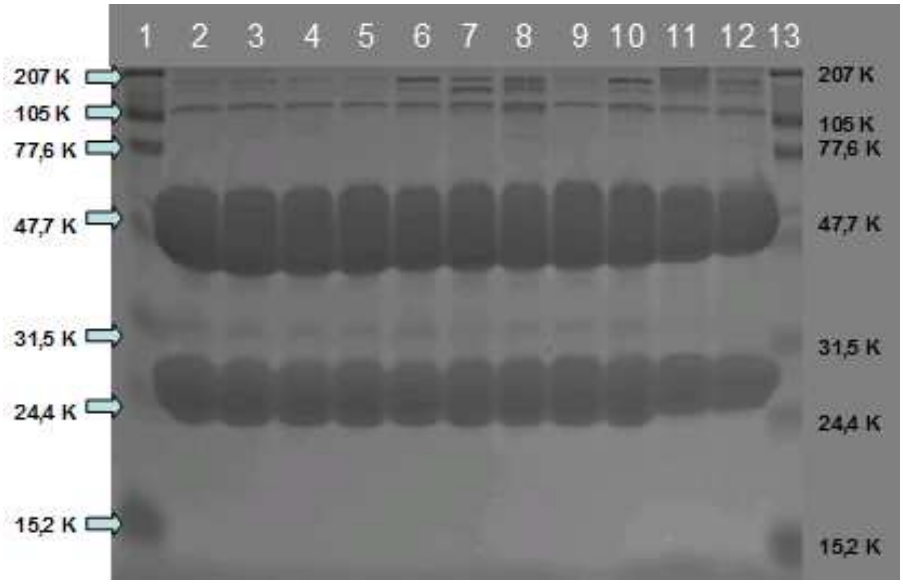
Kuyucuklar	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Sonikasyon süresi (dk.)	işlem görmemiş antikor	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	15	20

Ekstraksiyon işlemine tabii tutulmuş antikorların yapısal özelliklerinde farklılığın belirlenebilmesi için jel görüntüleme yöntemi kullanılmıştır.



Şekil 3.95. Çıplak antikorlara uygulanan ekstraksiyon yöntemi SDS-PAGE görüntüsü [1. kuyucukta işlem görmemiş antikor, 2. kuyucukta lipozomdan izolasyon için kullanılan ekstraksiyon yöntemi uygulanmış antikor, 3. kuyucukta KLN'den izolasyon için kullanılan ekstraksiyon yöntemi uygulanmış antikor vardır]

Çalışma süresince antikorun üzerine uygulanan formülasyon koşullarının (lipit varlığı, sonikasyon, liyofilizasyon) ve ekstraksiyonun etkilerinin belirlenmesi amacıyla SDS-PAGE yöntemi uygulanmış ve görüntülenmiştir.



Şekil 3.96. Boyar maddelerin ve ekstraksiyon yönteminin antikorlar üzerine etkisinin SDS-PAGE görüntüsü [1. kuyuda; marker (207 K; Myosin, 105 K; Phosphorylase B, 77,6 K; BSA, 47,7 K; Ovalbumin, 31,5 K; Carbonic Anhydrase, 24,4 K; Trypsin Inhibitor, 15,2 K; Lysozyme), 2. kuyuda; Herceptin ilacı (trastuzumab içeren)'nın distile suda dağıtılarak jele yüklenmiş formu, 3. kuyuda; Amonyum Sülfat çöktürmesi sonrasında diyaliz edilen trastuzumab, 4. kuyuda; Amonyum Sülfat çöktürmesi yapılmış olan trastuzumab, 5. kuyuda; L7'den ekstrakte edilmiş trastuzumab, 6. kuyuda; L8'den ekstrakte edilmiş trastuzumab, 7. kuyuda; L6'dan ekstrakte edilmiş trastuzumab, 8. kuyuda; L2 liyofilize edildikten sonra sulandırılarak ekstrakte edilmiş trastuzumab, 9. kuyuda; K3'ten ekstrakte edilmiş trastuzumab vardır. 10. kuyuda; KLN, trastuzumab ve AO ile yapılan formülasyondan ekstrakte edilen antikor, 11. kuyuda; K4'ten ekstrakte edilmiş trastuzumab, 12. kuyuda; K2 liyofilize edildikten sonra sulandırılarak ekstrakte edilmiş trastuzumab ve 13. kuyuda marker karışımı vardır]

4 TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER

Günümüzde, lipozomların aktif hedeflendirilmesi denildiğinde hedef hücrenin yüzeyindeki reseptörlere spesifik bağlanmayı sağlamak için lipozom yüzeyine hedefe özgü ligandın konjuge edilmesi-bağlanması ifade edilmektedir. Bu amaçla en yaygın kullanılan hedeflendirmeyi sağlayan ligand, antikorlardır. Özellikle, tümor teşhis ve tedavisinde mAb'lar (monoklonal antikorlar) yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Sapra ve Allen, 2003; Çiçin, 2008; Zhang ve ark., 2008; Micol ve ark., 2010; Piccart-Gebhart ve ark., 2005). Antikor lipozoma bağlanırken; antikorun özgünlüğü ve afinitesi değişmemelidir, yeterli miktarda molekül lipozom yüzeyine bağlanabilmelidir, lipozom bütünlüğü bozulmamalıdır ve bağlanma basit-yüksek verimli olmalıdır (Silindir, 2009).

Sistemik dolaşımda antikorun maruz kalacağı enzimatik yıkım, vücuttan hızla uzaklaştırılması gibi sorunlar taşıyıcı sistemlere enkapsülasyon ile ortadan kaldırılmaktadır. Terapötik proteinlerin hücrelere hedeflenip girebilmesi için iletim ve hedefleme sistemlerine gerek duyulmaktadır (Almeida ve Souto, 2007). Tez çalışmasında kullanılan monoklonal antikor terapötik bir proteindir, tek başına ilaç olarak meme kanserli hastalara uygulandığı bilinmektedir. Sistemik dolaşıma verilen ilaçların istenen bölgede yeterli derişime ulaşması için yüksek dozda uygulanması gerekmektedir ve yan etkilerinin gözlenmesi bu noktada kaçınılmazdır. Hedeflendirme, etkin maddenin vücutta istenen bölgeye, organa, dokuya veya hücreye gönderilebilmesidir. Böylece ilaç bütün vücuda dağılmadan sadece etki etmesi istenen yere gidebilmektedir. Bu durumda çok düşük ilaç miktarları ile etki sağlanabileceği için ilaçların yan etkileri önlenebilecektir (Gürsoy, 2004). Yapılan çalışmada, antikor nanopartiküllere hapsedilerek, düşük miktarda uygulama ile etki sağlanabileceği ortaya konmuştur.

Lipozomlar hem lipofilik hem de hidrofilik ilaçların taşınmasında kullanılabilen biyouyumlu sistemlerdir. Lipozomlar vücudun temel yapı taşı olan fosfolipitlerden oluştukları için biyoparçalanırdırlar ve bu nedenle immünojenik ve toksik etki göstermezler (Klibanov ve ark., 1997; Storm ve Crommelin, 1998; Kshirsagar, 2000; Storm ve ark., 2003).

Yapılan tez çalışmasında, elde edilen ilaç taşıyıcı sistemlerin boyutları ile polidispersite indisleri ve zeta potansiyelleri literatürlerle uyumlu bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda lipozomların yüzey yük oranının artışı hücreler için toksik özelliği göstermekte ancak tarnsfeksiyonu arttırdıkları belirtilmektedir (Mahato ve ark. 2009).

%1 lipit içeren lipozom formülasyonlarının boyutları yaklaşık olarak 125-235 nm aralığında bulunmuştur. Bu aralığa L4 ve L7 formülasyonları dahil edilmemiştir. Bunun nedeni, FITC molekülünün lipozom formülasyonlarının zeta potansiyelini düşürerek, hücreye alımını engellemesidir. Geçirimli elektron mikroskobu ile de görüntülenen bu formülasyonların (Şekil 3.3-3.4 ve 3.6-3.7) şekillerinde, vezikül yapılı lipozomlardan ziyade kübik şekilli FITC molekülleri tespit edilmiştir. %2 lipit içeren lipozom formülasyonlarının boyutları yaklaşık olarak 130-220 nm aralığında bulunmuştur. Literatürde lipozomların kararlılığı en iyi 100–300 nm arasında olarak bildirilmiştir (Kshirsagar, 2000) ve tez çalışmasında elde edilen lipozomların kararlı boyutta olduğu söylenebilir. L4, L13 ve L15 formülasyonları haricindeki diğer lipozom formülasyonların partikül boyutlarının 131-236 nm arasında olduğu tespit edilmiştir.

Katı lipit nanopartikül formülasyonlarının yaklaşık boyutları 220-350 nm aralığında bulunmuştur. Zeta potansiyelleri yaklaşık olarak 3-30 mV aralığında ölçülmüştür. Polidispersite indisleri 1'den küçük bulunmuştur.

Lipozomların yüzey yükleri KLN'ler le karşılaştırıldığında oldukça yüksek oldukları belirlenmiştir. Transfeksiyon çalışmalarında lipozomların hücre içine alımının daha iyi olmasının nedeni buna bağlanmıştır. Hücre yüzeyi negatif elektrik yüküne sahip olduğundan dolayı, pozitif yüklü parçacıkların hücreler tarafından endositoz edilmesi beklenmektedir (Behr, 1986; Lima ve ark., 2001). Bunun belirlenebilmesi için katyonik ajan eklenmiş ve eklenmemiş ancak AO boyası yüklenmiş lipozom formülasyonları hazırlanmış ve hücre içine partiküllerin alımı karşılaştırılmıştır. Hücrelere formülasyonların geçişinin belirlenmesi için akridin turuncusu boyasını bir model ilaç gibi kullanılarak, taşıyıcı sistemlere enkapsüle etme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Akridin

turuncusu boyası yüklenmiş olan pozitif yüklü lipozom veziküllerin hücre içine geçtiği floresan mikroskop görüntüleri ile belirlenmiştir.

AO'nun tek ve çift zincirli DNA ve RNA moleküllerini boyadığı bilinmektedir (Azevedo ve ark., 2010). Acridine orange boyası, hücrelere doğrudan uygulandığında (1 mg /1 mL) toksik bulunmuştur. Bu nedenle formülasyon aşamasında lipozomlara hapsedilirken bu konsantrasyonlar düşürülmüştür. Distile su ile 1:10 oranında seyrelterek, yoğunluk azaltılmıştır ve hücrelerin boyanması işlemi bu şekilde gerçekleştirilmiştir. Floresan mikroskopta hücrelerin nükleusları yeşil, sitoplazmalarında kırmızı renk floresan ışımalar tespit edilmiştir. AO, DNA'ya bağlandığında spektral olarak fluoresceine benzer, maksimum uyarılma 502 nm'de ve ışıma 525 nm'de yeşil olarak gözlenir. RNA ile ilişki kurduğunda ise, maksimum uyarılma 460 nm'de mavi renk olarak ve ışıma 650 nm'de kırmızı renk olarak gözlenir (http-8). Yapılan tez çalışmasında hücre sitoplazmalarında gözlenen kırmızı renkli ışımalar, AO boyasının, RNA ile ilişki kurmasından kaynaklanmaktadır, nukleusları ise yeşil floresan renkli gözlenmektedir (Bölüm 3.5.2, Şekil 3.81).

Oktadesil amin ile pozitif yük kazandırılmamış L14 ve L15 formülasyonlarının hücreye geçiş etkinlikleri L5 ve L8 ile karşılaştırıldığında L14'ün hücre tarafından alınmadığı belirlenmiştir. Bu sonuç partikülün yüzey yükünün hücre içine alımda ne kadar önemli olduğunu vurgulamaktadır. Oktadesilamin içermeyen ancak Anti-HER2 antikoru yüklenmiş L15 formülasyonunun düşük oranda hücrelere geçiş yaptığı belirlenmiştir (Şekil 3.91 ve 3.92). Bunun nedeni, yüklenen antikorun pozitif yük taşıması nedeni ile L15 formülasyonunun yüzey yükünün düşük seviyede olsa bile pozitif hale çevirmesi ve hücre yüzeyindeki reseptörlere tutunabilmesi ile hücre içine partikülün alımını sağlaması olarak yorumlanmıştır.

FITC içeren L4, L7 ve L13 formülasyonlarının düşük zeta potansiyele sahip olduğu yapılan ölçümlerde belirlenmiştir. Düşük yüzey yüküne ve büyük partikül boyutuna sahip olmaları nedeniyle hücre içine alınımının olmadığı floresan mikroskobu çalışmaları ile belirlenmiştir. Geçirimli elektron mikroskobu ile görüntülenen L4 ve L7 formülasyonları formülasyonların (Şekil 3.6 ve 3.3)

şekillerinde, vezikül yapılı lipozomlardan ziyade kübik şekilli FITC molekülleri tespit edilmiştir.

FITC-bağlı anti-HER2 antikoru doğrudan hücrelere uygulandığında, parlak yeşil, kırmızı renkli boyama özelliği göstermektedir (Bölüm 3.5.2). FITC-bağlı anti-HER2 antikoru yüklenmiş olan L6, L12 ve K4 formülasyonları hazırlanmıştır. Sitotoksisite profiline bakıldığında L6'nın hücrelere girdiği, dolaylı olarak söylenebilir. FITC, floresan özelliğini çok kısa sürede kaybetme özelliğinde bir moleküldür, bu nedenle çalışılması zordur, L12'nin hücrelere geçtiği floresan mikroskopta görüntülenmiştir (Şekil 3.86 ve 3.87).

L6 ve L7 formülasyonları karşılaştırıldığında, L7'nin hücreler üzerinde florosan boyama özelliği göstermediği, L6'nın hücre kültürü çalışmalarında florosan boyama özelliği gösterdiği tespit edilmiştir. Aynı molekülü içermelerine rağmen L7'nin hücrelere etki etmemesinin nedeni FITC'i çözmek için uygun ortam koşullarını tam olarak sağlayamayıp, lipozom formülasyonu içine enkapsüle edilememe olasılığını düşündürmektedir.

Etkin madde olarak taşıyıcı sistemlere yüklenen antikorların ve lipozom, katı lipit nanopartikül formülasyonlarının sitotoksisite profilleri belirlenmiştir. Boş lipozom formülasyonu L0, MCF-7 kanser hücrelerine uygulandığında, toksik etkisinin fazla olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 3.29-3.30). Bu sonuç, oluşturulan lipozom formülasyonlarının etkin madde yüklenmesi için uygun bir taşıyıcı olabileceğinin göstergesidir.

Formülasyon L2 (Şekil 3.33-3.34) ve L3 kıyaslandığında, L3'te iki kat fazla oranda antikor mevcuttur ve sitotoksisite sonuçlarına bakıldığında, L3'ün daha toksik olduğu görülmüştür (Şekil 3.35-3.36). Yapılan MTT değerlendirmelerine göre, lipozom formülasyonuna hapsedilen etkin madde miktarı artışı ile MCF-7 kanser hücreleri üzerindeki toksik etkinin doğru orantılı olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç, antikorun lipozom içerisine hapsedildiğini ya da yüzeye adsorbe olduğunu ve bu partikülün hücre yüzeyindeki reseptörlerle tutunarak etkin özellik gösterdiğini belirtmektedir.

L1 ve L9 karşılaştırıldığında, lipit oranı artışı ile hücreler üzerindeki sitotoksisite arasında bağlantı bulunamamıştır. Literatüre göre, fosfolipit yapılı

lipozom formülasyonları, biyoparçalanabilir ve biyouyumlu olduklarından dolayı, bileşenleri toksik etki göstermemektedir, bu da L9'daki lipit oranı artışının toksik etkisi olmadığı sonucunu desteklemektedir (Kshirsagar, 2000; Storm ve ark., 2003). L9'a kıyasla L1'in daha toksik etki göstermiş olmasının nedeni, L1 lipozom formülasyonunun zeta potansiyelinin (84,1 mV) L9'unkinden (46,6 mV) daha yüksek olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür (Mahato ve ark., 2008).

L10 formülasyonunun toksik etkisi, aynı oranda lipit içeren L9 formülasyonundan oldukça yüksek bulunmuştur. Bu formülasyonların zeta potansiyelleri (L9'un 46,6 mV ve L10'un 47,1 mV) arasında belirgin bir fark olmamasına rağmen, L10'un hücrelere daha öldürücü etki göstermesinin nedeni, etkin madde trastuzumab içeriyor olmasından kaynaklanmaktadır.

Müller ve arkadaşları ile başlayan KLN çalışmalarının yoğun ilgi görmesinin nedeni sitotoksik olmamalarıdır (Yuan ve ark., 2008; Subedi ve ark., 2009). Bu tez çalışmasında MTT deneyleriyle 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonucunda elde edilen katı lipit nanopartiküllerin MCF-7 hücrelerine toksik etkilerine bakılmıştır. Katı lipit nanopartiküllerin, lipozom formülasyonlarına kıyasla sitotoksisitesi oldukça yüksek bulunmuştur (Şekil 3.31-3.32 ve Şekil 3.61-3.62).

KLN formülasyonları kendi içinde karşılaştırıldıklarında antikor yüklenmiş formülasyonların boş formülasyona oranla daha toksik olduğu gözlenmiştir. Bu sonuç, KLN'lerin antikorun taşıyabilecek özellikte taşıyıcı sistemler olduğunu göstermektedir.

Formülasyon koşulları altında antikorun yapısal değişikliğinin belirlenmesi için çalışmalar yapılmıştır. Seçilen anti-HER2 antikorunun saf halinin çok pahalı olması nedeniyle piyasa ürünü olan ve meme kanseri tedavisinde kullanılan, 21 mg/2mL konsantrasyonda serum fizyolojikte disperse edilmiş Herceptin® temin edilerek ve saflaştırılarak kullanılmıştır. Antikorun saflaştırılması için amonyum sülfat çöktürme yöntemi kullanılmıştır. Bu işlem sırasında antikorun zarar görüp görmediği SDS-PAGE yöntemi ile araştırılmıştır. Amonyum sülfat çöktümesi (Şekil 3.96'da 4. kuyucuk) ve ardından diyaliz işlemi yapılarak (Şekil 3.96'da 3.

kuyucuk) tuzdan arındırılıp formülasyonlara yüklenen antikorların yapısında bozulma olmadığı gösterilmiştir. Çöktürme ve diyaliz işlemleri antikor yapısına zarar vermediği belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre, nanopartikül formülasyonlarının oluşturulması aşamasında, mekanik ve kimyasal etkiye maruz kalan antikorun yapısında bir değişme gözlenmemiştir. 1.5 dakikadan 20 dakikaya kadar belirlenen aralıkta antikora sonikasyon uygulanmıştır, yapısal bir bozulma olmadığı ortaya konmuştur (Şekil 3.94).

Geliştirilen ekstraksiyon yöntemi ile nanopartiküllerden izole edilen antikorlar, SDS-PAGE yöntemi ile görüntülenmiştir (Şekil 3.96). Ekstraksiyon yönteminin antikor üzerinde yapısal bozulmaya sebep olmadığı tespit edilmiştir. Şekil 3.96'da 7., 8., 11. ve 12. kuyucuklarda, 207 K ve 105 K arasında küçük bir bant gözlenmiştir. 7. kuyucukta FITC-bağlı anti-HER2 antikoru içeren L6 lipozom formülasyonu ve 11. kuyucukta FITC-bağlı anti-HER2 antikoru içeren K4 katı lipit nanopartikül formülasyonu bulunmaktadır. Bu bandın gözlenme nedeni, ekstaksiyon yöntemi değildir çünkü aynı yöntem 5., 6., 9. ve 10. kuyucuklardaki formülasyonlar için de kullanılmıştır ve burada bant gözlenmemiştir. Sonikasyonun da antikora zarar vermediği Şekil 3.96'da gösterilmiştir, dolayısıyla diğerlerinden farklı olarak burada bant gözlenmesi FITC-bağlı anti-HER2 antikorunun, Herceptin®'den saflaştırılan trastuzumabdan daha kırılgan olduğunu göstermektedir. 8. ve 12. kuyucuklara liyofilizasyon sonrasında sulandırılan formülasyonlardan ekstraksiyon yapılarak elde edilen antikorlar yüklenmiştir ve aynı ara bant burada da gözlenmektedir. Liyofilizasyon işleminin antikorun yapısında bozulma meydana getirdiği düşünülmektedir. Bu nedenle antikor enkapsüle edilmiş lipozom ve katı lipit nanopartikül formülasyonları için liyofilize ederek kurutma yönteminin uygun olmadığı sonucuna varılmıştır.

L2 ve L3 formülasyonlarının stabilitesi partikül boyutu, polidispersite indisi ve zeta potansiyeli bakımından beş ay süresince test edilmiştir. Standart sapma hesaplanarak, L2 formülasyonunun boyutu için 13.41, zeta potansiyeli için 1.69 ve polidispersite indisi için 0.01 bulunmuştur. L3 formülasyonunun boyutu için

standart sapma 17.82, zeta potansiyeli için 2.49 ve polidispersite indisi için 0.01 olarak hesaplanmıştır. L2 ve L3 formülasyonlarının beş aylık stabilite ölçümleri yapılmıştır ve boyutlarında, polidispesite indislerinde ve zeta potansiyellerinde kayda değer bir değişim gözlenmemiştir. Bu sonuca göre, etkin madde yüklenmiş olan L2 ve L3 lipozom formülasyonları bu süre için stabil kabul edilmiştir.

Elde edilen formülasyonlar, SEM görüntülerini alabilmek için uygulanan liyofilizasyon yöntemiyle toz hale getirilmişlerdir. Lipozom formülasyonu liyofilizasyon sonrası tekrar süspanse hale getirilerek boyut ölçümü yapılmıştır, lipozom veziküllerin boyutunun büyüdüğü gözlenirken, aynı işlemler uygulanan katı lipit nanopartikül formülasyonunun liyofilizasyon sonrası boyutunun küçüldüğü gözlenmiştir. Liyofilizasyonun partiküllerin topaklanmasına neden olduğu tespit edilmiştir (Bölüm 3.4).

L2 ve K2 formülasyonlarının liyofilizayon sonrası zeta potansiyellerinin yükseldiği gözlenmiştir.

Taşıyıcı sistemlerin hedeflendirilerek hastaya maksimum fayda sağlayacak şekilde kullanıldığı bilinmektedir. Khawli ve arkadaşlarının (2002) monoklonal antikorların kimyasal modifikasyonla tümörün nekrotik kısmına yöneliminin geliştirilmesi için yaptıkları çalışmada, antikorların klinik potansiyelini geliştirmek istemişlerdir. Normal hücrelere bağlanmasını en aza indirirken, bu metotla tümör içine alımı arttırmak istenmiştir. chTNT-1, chTNT-2 ve chTNT-3 olarak katı tümörü hedefleyen üç kimerik mAb kullanılmıştır. İdeal modifikasyon koşullarını tanımlamak için, TNT mAb çeşitli oranlarda biyotin ile reaksiyona sokulmuştur ve atılım ve biyodağılım analizleri test edilmiştir. Biyotinlenen mAb'lerin vücut atılım süreleri daha hızlı ve modifiye edilmeyen antikorlarla karşılaştırıldığında biyodağılım profillerinin daha iyi olduğu bulunmuştur. Kimyasal modifikasyonun katı tümörün nekrotik kısmına antikorların yönlendirilmesini geliştirmek için kullanışlı bir yöntem gibi göründüğü ortaya konmuştur.

Hedefleme için nanopartikül yüzeyine pegilasyon yapılması ve onun serbest ucuna monoklonal antikor bağlanarak hedefleme yapılabilmesi gibi işlemlere ve antikorun kimyasal bağlanması sürecinde biyotinleme gibi işlemlere gerek

duyulduğu literatürde bildirilmiştir (Tseng ve ark., 2007; Khawli ve ark., 2002; Pan ve ark., 2008).

Sonuç olarak,

- Yapılan tez çalışmasında biyotinleme gibi kimyasal bir reaksiyon veya pegilasyon gibi partikül yüzeyini kaplama işlemlerine gerek duyulmadan antikor bağlanabilmiş/yüklenmiş bir koloidal ilaç taşıyıcı sistem oluşturulmuştur.
- Yukarıda bahsedilen işlem basamaklarını kısaltarak hem maliyeti azaltılmış hem de çok işlem basamağından oluşan bu bağlanma sürelerini kısaltarak zamandan tasarruf edilmiştir.
- Hazırlanan sistemlerin partikül boyutları ve dağılımları hedeflemede kullanılan sistemler için ideal özelliktedir.
- Taşıdıkları yüzey yükleri ve en kapsülasyon yetileri değerlendirildiğinde, antikor ile birlikte farklı etkin maddelerin (örn:antikanser) hücre içine alımında etkin olacağı sonucuna varılmıştır.
- Antikor üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda, formülasyon koşullarının antikor üzerinde olumsuz etkilerinin olmadığı belirlenmiştir.
- Özellikle lipozomal sistemlerin sitotoksik etkilerinin düşük olması, toksik etkin maddelerin enkapsüle edilebileceğini ve yüklenmiş antikor sayesinde farklı alanlara yönelmeden hedef hücreye doğrudan partikülün taşınabileceği kanısına varılmıştır.

Öneriler

İlaç taşıyıcı koloidal sistemler için taşıma kapasitesinin belirlenmesi özellikle *in vivo* çalışmalar için yararlı olacaktır. Yapılan çalışmada öncelik, *in vitro*'da partiküllerin hücrelere geçip geçmediğinin tespit edilmesi idi, partiküllerin hücreler tarafından alındıkları hücre kültürü çalışmalarıyla ve floresans görüntüleme yöntemleriyle ortaya konmuştur.

Elde edilen nanopartiküllerin tamamı kararlılık açısından takip edilmemiştir, sadece iki lipozom formülasyonunun (L2 ve L3) kararlılığı takip edilmiştir, katı lipit nanopartiküller için de bu çalışma gerçekleştirilebilinir.

İlaç taşıyıcı sistemlerin sistematik dolaşımda davranışlarının belirlenmesi için *in vivo* çalışmalar sürdürülmelidir. Sistematik dolaşımda partikül davranışlarının karşılaştırmalı olarak belirlenmesi için de, partikül yüzeylerine pegilasyon işlemi yapılarak her iki sistemin etkinliği araştırılabilir.

Nanopartiküllerin yüzeyine adsorbe ve içine enkapsüle edilen antikorların, LC-MS ve/veya MS-MS sistemleri ile glikoprotein yapısında herhangi bir hasarın olup olmadığı tespit edilebilir (Novotny ve Alley, 2013). Bilindiği üzere antikorlar glikoprotein yapılı moleküllerdir, protein yapılarının formülasyon koşullarında SDS-PAGE yöntemi ile analizi yapılıp, yapısal bir bozulma olmadığı tespit edilmiş olsa da, glikobiyolojik olarak MS (kütle spektroskopisi) sistemleri ile incelenmesi glikozil yapılarında herhangi bir değişim olup olmadığı tespit edilerek farklı bir bakış açısı kazandırılmış olacaktır.

KAYNAKLAR

Akman, Ö., Altunay, F., Aşut, G., Bayraktar, T., Uçar, A., Toyran, N. Al-Otaibi, *Lipozomlar*, 2013. http://tip.baskent.edu.tr/egitim/mezuniyetoncesi/calismagrp/ogrsmpzsnm12/11.3.pdf.

Allen, T.M., Brandeis, E., Hansen, C.B., Kao, G.Y., Zalipsky, S., "A new strategy for attachment of antibodies to sterically stabilized liposomes resulting in efficient targeting to cancer-cells", *Biochim. Biophys. Acta* **1237** (2), 99–108, 1995.

Allen, T.M., Mumbengegwi, D.R., Charrois, G.J., "Anti-CD19-targeted liposomal doxorubicin improves the therapeutic efficacy in murine B-cell lymphoma and ameliorates the toxicity of liposomes with varying drug release rates", *Clin. Cancer Res.* **11**, 3567–3573, 2005.

Almeida, A., Souto, E., "Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins", *Advanced Drug Delivery Reviews* **59**, 478–490, 2007.

Aloğlu, H., Öner, Z., "Peyniraltı Suyu Proteinlerinin Mikroenkapsülasyon Teknolojisinde Kaplama Materyali Olarak Kullanım Olanakları", *Akademik Gıda* **8** (3), 38-42, 2010.

Altintas, I., Kok, R. J., Raymond, M. S., "Targeting epidermal growth factor receptor in tumors: From conventional monoclonal antibodies via heavy chain-only antibodies to nanobodies", *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, PHASCI 2356 No. of Pages 9, 2011.

Anonim, *Bağışık Yanıtın Oluşumu*, 2013. http://w2.anadolu.edu.tr/aos/kitap/EHSM/1213/unite12.pdf.

Aslan, F., *Oküler Reseptör Fizyolojisi*, 2013. http://med.ege.edu.tr/Image/gozdoc/okuler_reseptor_fizyolojisi_fatih.pdf.

Bakker-Woudenberg, I. A., Lokerse, A. F., ten Kate, M.T., Mouton, J.W., Woodle, M.C., and Storm, G., "Liposomes with prolonged blood circulation and selective localization in Klebsiella pneumoniae-infected lung tissue", *J. Infect. Dis.* **168** (1), 164-71, 1993.

Barenholz, Y., “Doxil® — ilk FDA-onaylı nano-ilaç: Lessons learned”, *Journal of Controlled Release* COREL-06254; No of Pages 18, 2012.

Barrajón-Catalán, E., Menéndez-Gutiérrez, M., Falco, A., Carrato, A., Saceda, M., Micol, V., “Selective death of human breast cancer cells by lytic immunoliposomes: Correlation with their HER2 expression level”, *Cancer Letters* **290**, 192–203, 2010.

Behr, J.P., “DNA strongly binds to micelles and vesicles containing lipopolyamines or lipointercalants”, *Tetrahedron Lett*. **27**, 5861–5864, 1986.

Benhabbour, S.R., Luft, J.C., Kim, D., Jain, A., Wadhwa, S., Parrott, M.C., Liu, R., DeSimone, J. M., Mumper, R., “In vitro and in vivo assessment of targeting lipid-based nanoparticles to the epidermal growth factor-receptor (EGFR) using a novel Heptameric ZEGFR domain”, *Journal of Controlled Release* COREL-06055; No of Pages 9, 2011.

Bernett, M., Karki, S., Moore, G., Leung, I., Chen, H., Pong, E., Duc-Hanh, T. Nguyen, Jacinto, J., Zalevsky, J., Muchhal, U. S., Desjarlais, J. R., and Lazar, G., “Engineering Fully Human Monoclonal Antibodies from Murine Variable Regions”, *J. Mol. Biol.* **396**, 1474–1490, 2010.

Bozdağ, S., Caliş, S, Kaş, HS, Ercan, MT, Peksoy, I, Hincal, AA., “In vitro evaluation and intra-articular administration of biodegradable microspheres containing naproxen sodium”, *J Microencapsul.*, Jul-Aug;**18**(4):443-56, 2001.

Braden, C.B. and Poljak, R.J., “The Structure and Thermodynamics of Antibody-protein Antigen Interactions”, Y. Shoenfeld, R.C. Kennedy and S. Ferrone, editors. *Idiotypes in Medicine: Autoimmunity, Infection and Cancer*, 1997.

Brannon-Peppas, L, Blanchette, JO., “Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy”, *Adv Drug Deliv Rev*, **56**, 1649–59, 2004.

Bruin K., Ruthardt K., von Gersdorff K., Bausinger R., Wagner E., Ogris M. and Bräuchle C., “Cellular Dynamics of EGF Receptor–Targeted Synthetic Viruses”, doi:10.1038/mt.sj.6300176, 2007.

Caia Z., Zhang H., Liu J., Berezov A., Muralid R., Wange Q., Greene M., "Targeting erbB receptors", *Seminars in Cell & Developmental Biology* **21**, 961–966, 2010.

Calfa C., Rosenblatt C., Cho H., Webster K., Shin S., "Antibodies and antibody-fusion proteins as anti-angiogenic, anti-tumor agents update on cancer therapeutics", 159–173, 2006.

Chames, P., Regenmortel, M., Weiss, E. and Baty, D., "Themed Sectıon: Vector Desıgn And Drug Delıvery Revıew Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future", *British Journal of Pharmacology,* **157**, 220–233, 2009.

Chang, J., Wang, H., Zhao, P., Liang, X., Gong, X., Song, T., Niu, R., "Folate-PEG coated cationic modified chitosan – Cholesterol liposomes for tumor-targeted drug delivery", *Biomaterials* **31**, 4129–4138, 2010.

Chen, Z.Y., Liang, Qiu, R.X., "Targeted gene delivery in tumor xenografts by the combination of ultrasound-targeted microbubble destruction and polyethylenimine to inhibit survivin gene expression and induce apoptosis", *J. Experim.Clin. Cancer Res.* **29**(152), 1-9, 2010.

Clerc, S, Barenholz, Y.A., "quantitative model for using acridine orange as a transmembrane pH gradient probe", *Anal Biochem,* 259:104_111, 1998.

Coester C, Kreuter J, Briesen HV, Langer K., "Preparation of avidinlabelled gelatin nanoparticles as carriers for biotinylated peptide nucleic acid (PNA)", *Int J Pharm*, 196:147–9, 2000.

Correale, P., Marra, M., Remondo, C., Migali, C., Misso, G., Arcuri, F., Del Vecchio, M., Carducci, A., Loiacono, L., Tassone, P., Abbruzzese, A., Tagliaferri, P., Caraglia, M., "Cytotoxic drugs up-regulate epidermal growth factor receptor (EGFR) expression in colon cancer cells and enhance their susceptibility to EGFR-targeted antibody-dependent cellmediated-cytotoxicity", (Adcc) *European Journal Of Cancer*, **46**, 1703–1711, 2010.

Crombet, T, Osorio, M, Cruz, T, Roca, C, del Castillo, R, Mon, R, et al., "Use of the humanized anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody h-R3 in combination with radiotherapy in the treatment of locally advanced head and neck cancer patients", *J Clin Oncol*, **22**(9):1646–54, 2004.

Çelebi, N., Koloitler , Kontrollü Salım Sistemleri, A.Z. Gürsoy (ed), Kontrollü Salım Derneği Yayını No:1, İstanbul, 245-255, 2002.

Çırakoğlu, B. "Monoklonal antikorlar", *Bilim ve Teknik Dergisi*, sayfa (6-7), mayıs 2002.

Çiçin, İ., *Hormon Reseptörü Negatif Ve Her-2 Negatif Meme Kanserli Hastalarla Hormon Reseptörü Negatif Ve Her-2 Pozitif Meme Kanserli Hastaların Demografik, Patolojik Ve Klinik Özelliklerinin Karşılaştırılması*, Yan Dal Uzmanlık Tezi, Trakya Üniversitesi, Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı, Edirne, 2008.

Dandamudi, S., Patil, V., Fowle, W., Khaw, B. A., Campbell, R. B., "External magnet improves antitumor effect of vinblastine and the suppression of metastasis", *Cancer Science*, **100** (8), 1537-43, 2009.

Dassonville, O, Formento, JL, Francoual, M, Ramaioli, A, Santini, J, Schneider, M, et al., "Expression of epidermal growth factor receptor and survival in upper aerodigestive tract cancer", *J Clin Oncol*, **11**(10):1873–8, 1993.

Dassonville, O., Bozec A., Fischel J.L., Milano G.,"EGFR targeting therapies: Monoclonal antibodies versus tyrosine kinase inhibitors Similarities and differences", *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, **62**, 53–61, 2007.

Demirel, M. and Yazan, Y., "Katı lipit nanopartiküller (SLN) FABAD", *J. Pharm. Sci.*, **25**, 167-179, 2000.

Dinauer, N, Balthasar S, Weber C, Kreuter J, Langer K, Briesena HV., "Selective targeting of antibody-conjugated nanoparticles to leukemic cells and primary T-lymphocytes", *Biomaterials*, **26**, 5898–906, 2005.

Dong, Z., Ma, Y., Khizar Hayat, K., Jia, C., Xia, S., "Morphology and release profile of microcapsules encapsulating peppermint oil by complex coacervation", *Journal of Food Engineering*, Volume **104**, Issue 3, Pages 455–460, 2011.

Ekambaram, P., Abdul Hasan Sathali, A., "Formulation and evaluation of solid lipid nanoparticles of ramipril", *Pharmaceutics*, Volume:**3**, Issue:3, Page:216-220, 2011.

Ekambaram, P., Sathali, A.H. and Priyanka, K., "Solid lipid nanoparticles: A review", *Sci. Revs. Chem. Commun*., **2**(1), 80-102, 2012.

Elbayoumi, T.A., Torchilin, V.P., “Enhanced cytotoxicity of monoclonal anticancer antibody 2C5-modified doxorubicin-loaded PEGylated liposomes against various tumor cell lines”, *european journal of pharmaceutical sciences* **3** 2 159-168, 2007.

Ergen, N., *TC İstanbul Kültür Üniversitesi, Moleküler Biyoloji Teknikleri II Uygulama Kitabı*, 2013.

Fernandis, AZ, Wenk, MR., “Membrane lipids as signaling molecules”, *Curr Opin Lipidol.* , Apr;18(2):121-8, 2007.

Flegler, S.L., Heckman, J.W., Klomparens, K.L., “Scanning and Transmission Electron Microscopy: An Introduction”, *Oxford Univ. Press*, ISBN #0-19-510751-9, 1993.

Freitas, C., Müller, R. H. “Spray drying of solid lipid nanoparticles (SLNTM)” *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **46**, 145-151, 1998.

Gomes, A.V., Gomes Lab, University of California, 2010.

Göçmen, D., İnkaya A.N., Tosun, İ., Gürbüz, O., *Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforez (SDS-PAGE) Tekniği ile Gluten Proteinlerinin Tespiti*, Türkiye 10. Gıda Kongresi; Erzurum, 21-23 Mayıs 2008.

Gren, NM., “Avidin, The Nature of the Biotin-binding Site”, *Biochem J* , 89:585–91, 1963.

Gullick, W.J., Marsden, JJ, Whittle, N, Ward, B, Bobrow, L, Waterfield, MD., “Expression of epidermal growth factor receptors on human cervical, ovarian, and vulval carcinomas”, *Cancer Res,* **46**(1):285–92, 1986.

Gürsoy A., , *Lipozomlar (Kontrollü İlaç Serbestleştiren Sistemler),* Gürsoy A., Pişkin E., Peppas A., Dortunç B., Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 173, 1989.

Gürsoy, A.Z., “Lipozomlar”, *Kontrollü Salım Sistemleri*, A.Z. Gürsoy(Ed), Kontrollü Salım Derneği Yayını No:1, İstanbul, 1103-1116, 2002.

Gürsoy, A.Z., “Kontrollü Salım Sistemleri”, *Farmasötik Teknoloji-Temel Konular ve Dozaj Şekilleri-*, A.Z. Gürsoy(Ed), Kontrollü Salım Derneği Yayını No:2, İstanbul, 409-421, 2004.

Gvili, K., Benny, O., Danino, D., Machluf, M., "Poly(D,L-lactide-co-glycolide acid) Nanoparticles for DNA delivery:waiving preparation complexity and ıncreasing efficiency", *Biopolymers*, **85**(5-6), 379-391, 2006.

Hanada, N., Lo, H.W., Day, C.P., Pan, Y., Nakajima, Y.,. Hung, M.C, "Co-regulation of B-Myb expression by E2F1 and EGF receptor", *Mol. Carcinog.* **45**, 10–17, 2006.

Hanahan, D.,Weinberg, RA., "The hallmarks of cancer", *Cell*, 100(1):57–70, 2000.

Harari, D. and Yarden, Y., "Molecular mechanisms underlying ErbB2/ HER2 action in breast cancer", *Oncogene*, **19**(53):6102–14, 2000.

Harding, J. A., Engbers, C. M., Newman, M. S., Goldstein, N. I., Zalipsky, S., "Immunogenicity and pharmacokinetic attributes of poly_ ethylene glycol/ - grafted immunoliposomes", *Biochimica et Biophysica Acta* 1327, 181–192, 1997.

Hatakeyama H., Akita H., Ishida E., Hashimoto K., Kobayashi H., Aoki T., Yasuda J., Obata K., Kikuchi H., Ishida T., Kiwada H., Harashima H., "Tumor targeting of doxorubicin by anti-MT1-MMP antibody-modified PEG liposomes", *International Journal of Pharmaceutics* **342**, 194–200, 2007.

Hendler, FJ, Ozanne, BW., "Human squamous cell lung cancers Express increased epidermal growth factor receptors", *J Clin Invest*, **74**(2): 647–51, 1984.

Hu, L-D., Tang, X., Cui, F-D. "Solid lipid nanoparticles (SLNs) to improve oral bioavailability of poorly soluble drugs" *J. Pharm. Pharmacol.*, 56, 1527-1535, 2004.

Hu, Y. Z., Zhu, J. A., Jiang, Y.G., Hu, B., "Ultrasound microbubble contrast agents: Application to therapy for peripheral vascular disease", *Advances in Therapy*, **26** (4), 425-434, 2009.

Hun, X., Zhang, Z., "Anti-epidermal growth factor receptor (anti-EGFR) antibody conjugated fluorescent nanoparticles probe for breast cancer imaging", *Spectrochimica Acta Part A* **74**, 410–414, 2009.

Hun, X., Zhang, Z., Tiao, L., 2008, "Anti-Her-2 monoclonal antibody conjugated polymer fluorescent nanoparticles probe for ovarian cancer imaging", *Analytica Chimica Acta* **625**, 201–206, 2008.

Immordino, M.L., Dosio, F., Cattel, L., "Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential", *International Journal of Nanomedicine*, **1**(3), 297-315, 2006.

Ishida, O., Maruyama, K., H. Tanahashi, M. Iwatsuru, K. Sasaki, M. Eriguchi, H. Yanagie, "Liposomes bearing polyethyleneglycol-coupled transferrin with intracellular targeting property to the solid tumors in vivo", *Pharm. Res*. **18**, 1042–1048, 2001.

Ishida, T., Ichihara, M., Wang, X., Yamamoto, K., Kimura, J., Majima, E., Kiwada, H., "Injection of PEGylated liposomes in rats elicits PEG-specific IgM, which is responsible for rapid elimination of a second dose of PEGylated liposomes", *Journal of Controlled Release* **112**, 15–25, 2006.

Jain, RK., "Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors", *Adv Drug Deliv Rev*, **46**:149–68, 2001.

Jameela, SR, Kumary, TV, Lal, AV, Jayakrishnan, A., "Progressive loaded chitosan microspheres: a long acting biodegradable controlled delivery system", *J Cont Rel*, **52**:17-24, 1998.

Joanitti, G., Azevedo, R., Freitas, S., "More on the mechanism of drug loading by the ammonium sulfate gradient. Apoptosis and lysosome membrane permeabilization induction on breast cancer cells by an anticarcinogenic Bowman–Birk protease inhibitor from Vigna unguiculata seeds", 2010.

Kaş, H.S., "İlaç Taşıyıcı Partiküler Sistemler", *Kontrollü Salım Sistemleri*, A.Z. Gürsoy(Ed), Kontrollü Salım Derneği Yayını No:1, İstanbul, 1103-1116, 2002.

Kataoka, K., Itaka, K., Nishiyama, N., Yamasaki, Y., Oishi, M. and Nagasaki, Y., "Smart polymeric micelles as nanocarriers for oligonucleotides and siRNA delivery", *Nucleic Acids Symposium Series*, **49**(1), 17-18, 2005.

Khawli, L.A., M.M. Mizokami, J. Sharifi, P.S. Hu, A.L. Epstein, "Pharmacokinetic characteristics and biodistribution of radioiodinated chimeric TNT-1,-2, and 3, monoclonal antibodies after chemical

modification with biotin", *Cancer Biother. Radiopharm.* **17** (4), 359–370, 2002.

Kim, B-D., Na, K., Choi, H-K. "Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles (SLN) made of cacao butter and curdlan" *Eur. J. Pharm. Sci.*, **24**, 199-205, 2005.

Kirby, B., Hasselbrink Jr, E., "Zeta potential of microfluidic substrates: 1. Theory, experimental techniques, and effects on separations", *Electrophoresis*, **25**, 187–202, 2004.

Klibanov, A.L., , "Antibody-mediated targeting of PEG-coated liposomes", (Eds. M.C. Woodle, G. Storm), *Longcirculating Liposomes: Old Drugs, New Therapeutics (Biotechnology Intelligence Unit)*, Springer Verlag, Berlin, (p. 269), 1997.

Kolter, T., "A view on sphingolipids and disease", *Chemistry and Physics of Lipids***,** Volume **164**, Issue 6, Pages 590–606, 2011.

Kshirsagar, N.A., "Drug Delivery Systems", *Indian Journal of Pharmacology*, **32**: S54-S61, 2000.

Kullberg, E. B., Bergstrand, N., Carlsson, J., Edwards, K., Johnson, M., Sjo¨berg, S., and Geda, L., "Development of EGF-Conjugated Liposomes for Targeted Delivery of Boronated DNA-Binding Agents", *Bioconjugate Chem.*, **13**, 737-743, 2002.

Laemmli, U.K., "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", *Nature*, **227**, 680–685, 1970.

Lasic, D.D. and Templeton, N.S., "*Bioorganic Colloids:Macromolecules, DNA, Self Assembled Particles, and Their Complexes*, Gene Therapy Therapeutic Mechanisms and Strategies", N.S.Templeton and D.D.Lasic, M. (ed.), Vol. **12**, p.241-266. Dekker Inc., New York Basel, 2000.

Lee, J., Groothuis, T., Cusan, C., Mink, D., Feijen, J., "Lysosomally cleavable peptide-containing polymersomes modified with anti-EGFR antibody for systemic cancer chemotherapy", *Biomaterials* **32**, 9144e9153, 2011.

Leo, E, Vandelli, MA, Cameroni, R, Flavio, F., "Doxorubicin-loaded gelatin nanoparticles stabilized by glutaraldehyde: involvement of the drug in the cross-linking", *Int J Pharm*, **155**:75–82, 1997.

Li, C.X., Parker, A., Menocal, E., Xiang, S., Borodyansky, L., Fruehauf, J.H., "Delivery of RNA interference", Cell Cycle, **5**(18), 2103-2109, 2006.

Lila, S. A., Kizuki S., Doi Y., Suzuki T., Ishida T., Kiwada H., "Oxaliplatin encapsulated in PEG-coated cationic liposomes induces significant tumor growth suppression via a dual-targeting approach in a murine solid tumor model", *Journal of Controlled Release* **137**, 8–14, 2009.

Lima, M., Simoes, S., Pires, P., Faneca, H., Düzgüneş, N., "Cationic lipid–DNA complexes in gene delivery: from biophysics to biological applications", *Advanced Drug Delivery Reviews* **47**, 277–294, 2001.

Liu, XH, Wiley, HS, Meikle, AW., "Androgens regulate proliferation of human prostate cancer cells in culture by increasing transforming growth factoralpha (TGF-alpha) and epidermal growth factor (EGF)/TGF-alpha receptor", *J Clin Endocrinol Metab*, **77**(6):1472–8, 1993.

Lockhart, C, Berlin, JD. , "The epidermal growth factor receptor as a target for colorectal cancer therapy", *Semin Oncol*, **32**(1):52–60, 2005.

Lodish, Berk, Matsudaira, Kaiser, Krieger, Scott, Zipursky, Darnel, "Growth and Use of Cultured Cells", *Molecular Cell Biology*, 5th Edition, Chapter 6, page 237, 2003.

Maeda, H., Bharate G.Y., Daruwalla J., "Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **71**, 409–419, 2009.

Male, D., Brostoff, J., Roth, D.B., Roitt, I., "Chapter 3: Immunoglobulins - Structure And Function", *Immunology* (Ed: Mosby), 7th ed., 2006.

Marcucci, F. and Lefoulon, F., "Active targeting with particulate drug carriers in tumor therapy: fundamentals and recent progress", *DDT* Vol. 9, No. 5 1359-6446/04, 2004.

Mazza, C., Malissen, B., "What guides MHC-restricted TCR recognition?", *Seminars in Immunology* **19**, 225–235, 2007.

Merrill, A.H., Vance, D.E., and Vance, J.E., (Eds.), "Sphingolipids", *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes (5th Edn.)* Chapter 13, 2008.

Morrow, D.A., Antman, EM., and Sayah, A., "Evaluation of the time saved by prehospital initiation of reteplase for ST elevation Myocardial Infarction. Results of the early retavase - thrombolysis in myocardial infarction (ER-TIMI) 19 Trial", *Medical Journal Armed Forces India*, Volume 59, Issue 1, P. 81-82, 2003.

Mundargi, RC, Babu, VR, Rangaswamy, V, Patel, P, Aminabhavi, TM., "Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives", *J Control Release.*, **11**;125(3):193-209, 2008.

Müller, R.H., Mäder, K., Gohla, S. "Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **50** 161±177, 2000.

Neal, DE, Marsh, C, Bennett, MK, Abel, PD, Hall, RR, Sainsbury, JR, et al., "Epidermalgrowth- factor receptors in human bladder cancer: comparison of invasive and superficial tumours", *Lancet*, **1**(8425):366–8, 1985.

Nicholson, RI, Gee, JM, Harper, ME., "EGFR and cancer prognosis", *Eur J Cancer*, **37**(Suppl. 4):S9–15, 2001.

Novotny, MV, Alley, WR Jr, "Recent trends in analytical and structural glycobiology", *Curr Opin Chem Biol.*, S1367-5931(13)00101-4. doi: 10.1016/j.cbpa.2013.05.029, 2013.

Numanoğlu, U., Tarımcı, N., "Katı Lipid Nanopartiküllerin (Slntm) Özellikleri, Farmasötik Ve Kozmetik Alandaki Uygulamaları", *Ankara Ecz. Fak. Derg.*, **35** (3) 211 – 235, 2006.

Olbricha, C., Gessnera, A., Schro¨derb, W., Kaysera, O., Müller, R., "Lipid–drug conjugate nanoparticles of the hydrophilic drug diminazene—cytotoxicity testing and mouse serum adsorption", *Journal of Controlled Release* **96** , 425– 435, 2004.

Öner, F., "Süspansiyonlar", *Farmasötik Teknoloji, Temel Kavramlar*, A.Z. Gürsoy(Ed), Kontrollü Salım Derneği Yayını No:2, İstanbul, 26-269, 2004.

Özer, A.Y., "Niozomlar", *Kontrollü Salım Sistemleri*, A.Z. Gürsoy(Ed), Kontrollü Salım Derneği Yayını No:1, İstanbul, 1103-1116, 2002.

Pan, H., Han, L., Chen, W., Yao, M., Lu, W., "Targeting to tumor necrotic regions with biotinylated antibody and streptavidin modified liposomes", *Journal of Controlled Release* **125**, 228–235, 2008.

Pan, X., Guan, J., Yood, J., Epsteind, A., Lee, L., Lee, R., "Cationic lipid-coated magnetic nanoparticles associated with transferrin for gene delivery", *International Journal of Pharmaceutics* **358**, 263–270, 2008.

Park, J., Hong, K., Kirpotin, D., Olivier, Meye@, Papahadjopoulos, D., Benza, C., "Anti-HER2 immunoliposomes for targeted therapy of human tumors", *Cancer Letters* **118**, 153- 160, 1997.

Park, J.W., Kirpotin, D.B., Hong, K., Shalaby, R., Shao, Y., Nielsen, U.B., Marks, J.D., Papahadjopoulos, D., Benz, C.C., "Tumor targeting using anti-her2 immunoliposomes", *Journal of Controlled Release* **74**, 95–113, 2001.

Park, Y.S., "Tumor-directed targeting of liposomes", *Bioscience Reports*, **22** (2), 267-281, 2002.

Pata, V., Ahmed, F., Discher, DE., Dan, N., "Membrane solubilization by detergent: resistance conferred by thickness", *Langmuir*, **20**:3888e93, 2004.

Peelen, E., Knippenberg, S., Muris, A., Thewissen, M., Smolders, J., Cohen, Tervaert J.W., Hupperts, R., Damoiseaux, J., "Effects of vitamin D on the peripheral adaptive immune system", *A review Autoimmunity Reviews* **10**, 733–743, 2011.

Peksoy, İ., Arıca, B., Ercan, M., Kaş, H., Tuncel, M., Şener, B., Aşansü, A.,Ünsal, I., Oğuz, A., "Fagositik aktivasyon yoluyla lökosit işaretlemede Tc-99m poli (l-laktik) asit mikroküre lerinin kullanımı", *Genel Tıp Derg*, **14**(4):125-132, 2004.

Perez, R, Pascual, M, Macias, A, Lage, A., "Epidermal growth factor receptors in human breast cancer", *Breast Cancer Res Treat*, **4**(3):189–93, 1984.

Piccart-Gebhart, M.J., Procter, M., Leyland-Jones, B., Goldhirsch, A., Untch, M., Smith, I., Gianni, L., Baselga, J., Bell, R., Jackisch, C., Cameron, D., Dowsett, M., Barrios, C.H., Steger, G., Huang, C.S., Andersson, M., Inbar, M., Lichinitser, M., Lang, I., Nitz, U., Iwata, H., Thomssen, C., Lohrisch, C., Suter, T.M., Ruschoff, J., Suto, T., Greatorex, V., Ward, C., Straehle, C., McFadden, E., Dolci, M.S., Gelber, R.D., "Trastuzumab after adjuvant

chemotherapy in HER2-positive breast cancer", *N. Engl. J. Med*. **353**, 1659–1672, 2005.

Pietersz, G.A., Patrick, M.R., Chester K.A., "Preclinical characterization and in vivo imaging studies of an engineered recombinant technetium-99m-labeled metallothionein-containing anti-carcinoembryonic antigen single-chain antibody", *J. Nucl. Med.* **39**, 47–56, 1998.

Ramírez, B., Alpízar, Y., Hernández Fernández, D., Hidalgo, G., Capote, A., Pérez Rodríguez, R., Fernández, L., "Anti-EGFR activation, anti-proliferative and pro-apoptotic effects of polyclonal antibodies induced by EGFR-based cancer vaccine", *Vaccine* **26**, 4918–4926, 2008.

Reichert, J., Clark, J Rosensweig, Laura, B Faden & Matthew C Dewitz "Monoclonal antibody successes in the clinic" *Nature Biotechnology*, Volume 23, Number 9, 2005.

Ren, J. L., Wang, Z. G., Zhang, Y., Zheng, Y. Y., Li, X. S., Zhang, Q. X., Wang, Z. X., Xu, C.S., "Transfection efficiency of TDL compound in HUVEC enhanced by ultrasound-targeted microbubble destruction", *Ultrasound in Medicine & Biology*, **34** (11), 1857-1867, 2008.

Sambrook, J. ve D. Russell, "Chapter 14: Screening Expression Libraries", *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 3th ed., Cold Spring Harbour Laboratory, 2001.

Sambrook, J. ve D. Russell, "Chapter 17: Analysis of Gene Expression in Cultured Mammalian Cells", *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 3th ed., Cold Spring Harbour Laboratory, 17-84, 2001.

Santini, D., Pantano, F., Vincenzi, B., Loupakis, F., Caraglia, M., Falcone, A., Tonini, G., "Molecular predictive factors of response to anti-EGFR antibodies in colorectal cancer patients", *Ejcsupplements,* **6,** 86–90, 2008.

Sapra, P., Allen, T.M., "Ligand-targeted liposomal anticancer drugs", *Progress in Lipid Research* **42**, 439–462, 2003.

Sava, M., Duda, E., Huang, L., "A genetically modified recombinant tumor necrosis factor-alpha conjugated to the distal terminals of liposomal surface grafted polyethyleneglycol chains", *Int. J. Pharm.* **184**, 45–51, 1999.

Schiffelers, R., Koning, G., Hagen, T., Fensa, M., Schraa, A., Janssen, A., Kok, R., Molema, G., Storm, G., "Anti-tumor efficacy of tumor vasculature-targeted liposomal Doxorubicin", *Journal of Controlled Release* **91**, 115–122, 2003.

Schmitz, K. R., Ferguson, K.M., "Interaction of antibodies with ErbB receptor extracellular Regions", *Experimental Cell Research* **315**, 659–670, 2009.

Schwarz, C., Mehnert, W. "Freze drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles (SLN)" *Int. J. Pharm.* **157**, 171-179, 1997.

Sesay, M.A., "Monoclonal Antibody Conjugation via Chemical Modification", *Biopharm International*, **16**, 12; ProQuest pg. 32, 2003.

Sezgin, Z., Yüksel, N., Baykara, T., "İlaç Taşıyıcı Sistemler Olarak Polimerik Misellerin Hazırlanması Ve Karakterizasyonu", *Ankara Ecz. Fak. Derg.*, **32**(2) 125-142, 2003.

Shanker, A., "Adaptive control of innate immunity", *Immunology Letters* **131** 107–112, 2010.

Silindir, M., *SPECT/BT Yöntemi ile Tümör Teşhis ve Görüntülenmesinde Kullanılacak Nanoboyutlu Lipozom Formülasyonlarının Geliştirilmesi*, Yüksek lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2009.

Siwak, D. R., Tari Ana, M. and Lopez-Berestein, G., "The Potential of Drug-carrying Immunoliposomes as Anticancer Agents", *Clin Cancer Res* , **8**:955-956, 2002.

Slamon, DJ, Clark, GM, Wong, SG, Levin, WJ, Ullrich, A, McGuire, WL., "Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene", *Science*, **235**(4785):177–82, 1987.

Slamon, DJ, Leyland-Jones, B, Shak, S, Fuchs, H, Paton, V, Bajamonde, A, et al., "Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2", *N Engl J Med*, **344**(11):783–92, 2001.

Sousa Anto´nio, M., Schulze-Makuch, D., "The immune system as key to cancer treatment: Triggering its activity with microbial agents", *Bioscience Hypotheses*, **2**, 388e392, 2009.

Steinhauser, I., Spa¨nkuch, B., Strebhardt, K., Langer, K., “Trastuzumab-modified nanoparticles: Optimisation of preparation and uptake in cancer cells”, *Biomaterials* **27**, 4975–4983, 2006.

Stockert, J.C., Blázquez-Castro, A., Canete, M., Horobin, R.W., Villanueva, A., “MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets”, *Acta Histochem*. 2012.

Storm, G. and Crommelin, D., “Liposomes: quo vadis?”, *PSTT* Vol. **1**, No. 1, 1998.

Streets, A., Sourigues, Y., Kopito, R., Melki, R., Quake, S., “Simultaneous Measurement of Amyloid Fibril Formation by Dynamic Light Scattering and Fluorescence”, *Reveals Complex Aggregation Kinetics*, Volume **8** | Issue 1 e54541, 2013.

Subedi, RK, Kang, KW, Choi, HK., “Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles loaded with doxorubicin”, *Eur J Pharm Sci.*, Jun 28;**37**(3-4):508-13, 2009.

Şenel, B., *siRNA Taşıyıcı Sistem Geliştirme ve Değerlendirme Çalışmaları*, Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Eskişehir, 2012.

Şengel-Türk, C., Hasçiçek, C., Gönül, N., “Nanoparticulate Drug Delivery Systems For Targeting The Drugs To The Brain”, *Journal of Neurological Sciences*, Volume 24, Number 3, Page(s) 254-263, 2007.

Yoshida, T., Okamoto, I., Iwasa, T., Fukuoka, M., Nakagawa, K., “The anti-EGFR monoclonal antibody blocks cisplatin-induced activation of EGFR signaling mediated by HB-EGF”, *FEBS Letters* **582**, 4125–4130, 2008.

Talaveraa, A., Mackenzie, J., Garrido, G., Friemann, R., López-Requena, A., Morenob, E., Krengel, U., “Structure of the Fab fragment of the anti-murine EGFR antibody 7A7 and exploration of its receptor binding site”, *Molecular Immunology* **48,** 1578– 1585, 2011.

Tan X, Egami H, Ishikawa S, Nakagawa M, Ishiko T, Kamohara H, et al., “Relationship between activation of epidermal growth factor receptor and cell dissociation in pancreatic cancer”, *Int J Oncol*, **25**(5):1303–9, 2004.

Terada, T., Mizobata, M., Kawakami, S., Yabe, Y., Yamashita, F., Hashida, M., "Basic fibroblast growth factor-binding peptide as a novel targeting ligand of drug carrier to tumor cells", *J. Drug Target*. **14**, 536–545, 2006.

Terada, T., Mizobata, M., Kawakami, S., Yamashita, F., Hashida, M., "Optimization of tumor-selective targeting by basic fibroblast growth factor-binding peptide grafted PEGylated liposomes", *Journal of Controlled Release* 119 262–270, 2007.

Tiselius, A. and Kabat, E.A., "An Electrophoretic Study of Immune Sera and Purified Antibody Preparations", 1939.

Tokuda, Y., "Antibodies as molecular target-based therapy: trastuzumab", *Int J Clin Oncol*, **8**(4):224–9, 2003.

Torchilin, V. and Lukyanov, A., "Peptide and protein drug delivery to and into tumors: challenges and solutions", *DDT,* Vol. 8, No. 6, 2003.

Torchilin, V., "Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems", *Journal of Controlled Release* **73**, 137–172, 2001.

Torchilin, V.P., "Multifunctional nanocarriers", *Advanced Drug Delivery Reviews* **58**, 1532–1555, 2006.

Trachsel, E., Neri, D., "Antibodies for angiogenesis inhibition, vascular targeting and endothelial cell transcytosis", *Advanced Drug Delivery Reviews* **58**, 735– 754, 2006.

Truong-Le, VL, Walsh, SM, Schweibert, E, Mao, H-Q, Guggino, WB, August, JT, et al., "Gene transfer by DNA–gelatin nanospheres", *Arch Biochem Biophys*, **361**(1):47–56, 1999.

Tseng, C., Wang, T., Dong, G., Wu, S.Y., Young, T.H., Shieh, M.J., Lou, P.J., Lin, F.H., "Development of gelatin nanoparticles with biotinylated EGF conjugation for lung cancer targeting", *Biomaterials* **28**, 3996–4005, 2007.

Uchida, M., Wei Li, X., Mertens, P., Alpar, H.O., "Transfection by particle bombardment: Delivery of plasmid DNA into mammalian cells using gene gun", *Biochim. Biophys. Acta*, 1790(8), 754–764, 2009.

Uddin, S.N., Cationic lipids used in non-viral gene delivery systems, *BMB Rev*., **2** (3), 58-67, 2007.

Vandervoort, J, Ludwig, A., "Preparation and evaluation of drugloaded gelatin nanoparticles for topical ophthalmic use", *Eur J Pharm Biopharm*, **57**:251–61, 2004.

Vasir, JK, Labhasetwar, V. "Targeted drug delivery in cancer therapy", *Technol Cancer Res Treat*, **4**(4):363–74, 2005.

Venkateswarlu, V., Manjunath, K., "Preparation, characterization and in vitro release kinetics of clozapine solid lipid nanoparticles" *J. Cont. Rel*. **95**, 627-638, 2004.

Veronese, F., "Peptide and protein PEGylation: a review of problems and solutions", *Biomaterials* **22**, 405-417, 2001.

Weiner, L., Surana, R. & Wang, S., *Nature Reviews Immunology* **10**, 317-327 doi:10.1038/nri2744, 2010.

Wells, A., "Tumor invasion: role of growth factor-induced cellmotility", *Adv Cancer Res*, **78**:31–101, 2000.

Yang, X. , Jia, X., Corvalan, J. R.F., Wang, P., Davis, C. G., "Development of ABX-EGF, a fully human anti-EGF receptor monoclonal antibody, for cancer therapy", *Critical Reviews in Oncology:Hematology* **38**, 17–23, 2001.

Yao, J., Ruan, Y., Zhai, T., Guan, J., Tang, G., Li, H., Dai, S., "ABC block copolymer as "smart" pH-responsive carrier for intracellular delivery of hydrophobic drugs", *Polymer* **52**, 3396e3404, 2011.

Yasugia, K., Nagasakia, Y., Katoa, M., Kataoka, K., "Preparation and characterization of polymer micelles from poly(ethylene glycol)-poly(D,L-lactide) block copolymers as potential drug carrier", *Journal of Controlled Release* **62** 89–100, 1999.

Yokoyama, M., "Drug targeting with nano-sized carrier systems", *J Artif Organs*, **8:**77–84, 2005.

Yoon, S., Nakayama, K., Hikita, T., Handa, K., and Hakomori, S., "Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase is modulated by GM3 interaction with N-linked GlcNAc termini of the receptor", *The National Academy of Sciences of the USA*, vol**. 103** no. 50 18987–18991, 2006.

Young, S, Wong, M, Tabata, Y, Mikos, AG., "Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules", *J Control Release*, **109**:256–74, 2005.

Yuan, H., Miao, J., Du, Y.Z., You, J., Hu, F.Q., Zeng, S., "Cellular uptake of solid lipid nanoparticles and cytotoxicity of encapsulated paclitaxel in A549 cancer cells", *Int. J. Pharm.*, **348**(1–2), 137–145, 2008.

Zhang, YP, Sekirov, L, Saravolac, EG, Wheeler, JJ, Tardi, P, Clow, K, Leng, E, Sun, R, Cullis, PR and Scherrer, P, "Stabilized plasmid-lipid particles for regional gene therapy: formulation and transfection properties", *Gene Therapy*, **6,** 1438–1447, 1999.

Zhau, HY, Chang, SM, Chen, BQ, Wang, Y, Zhang, H, Kao, C, et al., "Androgenrepressed phenotype in human prostate cancer", *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**(26):15152–7, 1996.

Zhu, L., Lu, Y., Miller, D., and Mahato, R., "Structural and Formulation Factors Influencing Pyridinium Lipidbased Gene Transfer", *Bioconjug Chem.*, **19**(12): 2499–2512. doi:10.1021/bc8004039, 2008.

http-1 http://www.turkimmunoloji.org.tr/

http-2 http://tr.wikipedia.org/wiki/Monoklonal_antikor

http-3 http://www.ebioscience.com/knowledge-center/antigen/immunoglobulin/structure.htm

http-4 http://en.wikipedia.org/wiki/Antibody

http-5 http://www.istanbul.edu.tr/fen/notlar/1260045256.pdf

http-6 http://tr.wikipedia.org/wiki/Misel

http-7 http://www2.cnrs.fr/en/1043.htm

http-8 http://en.wikipedia.org/wiki/Acridine_orange

http-9 http://www.istanbul.edu.tr/eng/metalurji/sem.htm

http-10 http://www.lgcstandards-atcc.org/

http-11 http://www.manfred.maitz-online.de/labor/protocols/protocols.html?MTTTest.htm