

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**KARACİĞER KANSERİ TEDAVİSİNE YÖNELİK DUAL İLAÇ
İÇEREN TAŞIYICI SİSTEM HAZIRLANMASI,
KARAKTERİZASYONU VE KARACİĞER KANSERİ
ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN *İN VİTRO* İNCELENMESİ**

Ümmühan Fulden AYDIN

TIBBİ BİYOKİMYA DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Abdullah TULİ

ADANA-2025

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**KARACİĞER KANSERİ TEDAVİSİNE YÖNELİK DUAL İLAÇ
İÇEREN TAŞIYICI SİSTEM HAZIRLANMASI,
KARAKTERİZASYONU VE KARACİĞER KANSERİ
ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN *İN VİTRO* İNCELENMESİ**

Ümmühan Fulden AYDIN

TIBBİ BİYOKİMYA DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Abdullah TULİ

2. DANIŞMAN: Prof. Dr. Şenay ŞANLIER

Bu tez, Çukurova Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TDK-2021-14316 no'lu proje olarak desteklenmiştir.

ADANA-2025

KABUL VE ONAY



**T.C. ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS / DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ETİK BEYANI**



TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleri ile desteğini her zaman gösteren değerli danışman hocam Prof. Dr. Abdullah TULİ'ye ve lisans eğitimimden bu yana yolumu ışıyla aydınlatan ikinci danışmanım kıymetli hocam Prof. Dr. Şenay ŞANLIER'e en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Tez izleme toplantılarında bilgi ve deneyimlerini paylaşan değerli hocalarım Prof. Dr. Serhan KÜPELİ ve Doç. Dr. Zafer YÖNDEN'e katkılarında dolayı teşekkür ederim.

Doktora eğitimim süresince verdikleri katkılardan dolayı Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya ABD öğretim üyelerine ve çalışanlarına, tez çalışmamın deneysel aşamalarını gerçekleştirmemde desteğini esirgemeyen Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü'ne ve orada bulunan çalışma arkadaşlarıma ve Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ABD'na ve Doç. Dr. Nur SELVİ GÜNEL ile Gaye HAMARAT'a katkılarında dolayı ayrıca teşekkür etmek isterim.

Lisans, yüksek lisans ve doktora eğitimim süresince akademik ve manevi her türlü desteğiyle ve abla şefkatiyle yanımda olan Doç. Dr. Güliz AK DEMİROZ'e teşekkürü bir borç bilirim.

Eğitim hayatım boyunca ve akademisyenlik yolunda yürüdüğüm bu yolda her zaman arkamda durup bana destek olan anneme, babama, eşime, ablama, abime ve dostlarıma en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Tez çalışmamı TDK-2021-14316 no'lu proje ile maddi olarak destekleyen Çukurova Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne ve doktora eğitimimi gerçekleştirdiğim Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne ve çalışanlarına teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

KABUL VE ONAY	ii
YÜKSEK LİSANS / DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ETİK BEYANI	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xii
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİ	3
2.1. Kanser	3
2.2. Karaciğer Kanseri	9
2.3. Sorafenib ve Vismodegib İlaçları	11
2.3.1. Sorafenib	12
2.3.2. Vismodegib	15
2.4. İlaç Taşıma Sistemleri	18
2.4.1. Lipozomlar	20
2.4.1.1. Lipozom Hazırlama Yöntemleri	25
2.5. Nanopartiküler İlaç Hedefleme Stratejileri	27
2.5.1. Pasif Hedefleme	27
2.5.2. Aktif Hedefleme	29
2.5.3. Uyarıya Duyarlı Hedefleme	30
3. GEREÇ VE YÖNTEM	32
3.1 Gereçler	32
3.1.1. Çalışma Kapsamında Kullanılan Cihazlar	32
3.1.2. Çalışma Kapsamında Kullanılan Kimyasal Maddeler	32
3.2. Yöntemler	33
3.2.1. Boş Lipozom Eldesi, Optimizasyonu ve Karakterizasyonu	33
3.2.2. Sorafenib ve Vismodegib İlaçlarının Çözünürlük, Spektrum Tarama Çalışmaları	34
3.2.3. Sorafenib ve Vismodegib İlaçlarının Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) İle Ölçümü	35
3.2.4. Lipozomlara Sorafenib ve Vismodegib İlaçlarının Yüklenmesi, İlaç Yüklü Lipozomların Optimizasyon ve Karakterizasyon Çalışmaları	35
3.2.5. <i>In Vitro</i> İlaç Salımı	38
3.2.6. Stabilite Çalışmaları	39
3.2.7. Hemoliz Deneyi	39
3.2.8. Hücre Kültürü Çalışmaları	40
3.2.8.1. HepG2 Hücre Hattı Proliferasyon Deneyi	40

3.2.8.2. Sitotoksosite Deneyleri	41
3.2.9. Apoptoz Deneyi	42
3.2.10. İstatistiksel Hesaplamalar	43
4. BULGULAR	44
4.1. Boş Lipozom Eldesi, Optimizasyonu ve Karakterizasyonu	44
4.2. Sorafenib ve Vismodegib İlaçlarının Çözünürlük, Spektrum Tarama Çalışmaları	51
4.3. Sorafenib ve Vismodegib İlaçlarının Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) İle Ölçümü	53
4.3.1. Seçicilik	53
4.3.2. Tespit ve Kantitasyon Alt Sınırları	54
4.3.3. Doğrusallık	54
4.4. Lipozomlara Sorafenib ve Vismodegib İlaçlarının Yüklenmesi, İlaç Yüklü Lipozomların Optimizasyon ve Karakterizasyon Çalışmaları	56
4.5. <i>İn Vitro</i> İlaç Salımı	63
4.6. Stabilite Çalışmaları	64
4.7. Hemoliz Deneyi	65
4.8. Hücre Kültürü Çalışmaları	67
4.8.1. HepG2 Hücre Hattı Proliferasyon Deneyi	67
4.8.2. Sitotoksosite Deneyleri	68
4.9. Apoptoz Deneyi	88
5. TARTIŞMA	92
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	105
7. KAYNAKLAR	107
EKLER	119
Ek-1 Etik Kurul Onay Formu	119
ÖZGEÇMİŞ	120

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kanserin özellikleri	4
Şekil 2.2. Kanser vaka sayılarının bölgelere göre dağılımı	8
Şekil 2.3. Kanser tiplerine göre kanser vakalarının dağılımı	8
Şekil 2.4. Sorafenibin kimyasal yapısı	12
Şekil 2.5. Sorafenib etki mekanizması	13
Şekil 2.6. Vismodegibin kimyasal yapısı	15
Şekil 2.7. Hh sinyal iletimi	17
Şekil 2.8. Nanopartiküler taşıma sistemlerinin tarihsel gelişimi	19
Şekil 2.9. Lipozom yapısı	21
Şekil 2.10. Yapılarına göre lipozom çeşitleri	22
Şekil 2.11. Lipozom-hücre etkileşimleri	24
Şekil 2.12. İnce film hidrasyon yöntemi ile lipozom oluşturulması	26
Şekil 2.13. Nanopartiküllerin hedefleme stratejileri	27
Şekil 2.14. Artan geçirgenlik ve tutulma (EPR) etkisi	28
Şekil 2.15. Aktif hedefleme için nanopartiküllerin olası yüzey modifikasyonları	30
Şekil 3.1. Mini ekstrüder sistemi ile lipozomların ekstrüzyonu	34
Şekil 3.2. İlaç yüklü lipozom oluşumu aşamaları	37
Şekil 3.3. Yüklenecek ilaçların uzaklaştırılması amacıyla gerçekleştirilen diyaliz işlemi	38
Şekil 3.4. Diyaliz membranında salıma bırakılmak üzere hazırlanan diyaliz sistemi	39
Şekil 4.1. Lipit filmler	44
Şekil 4.2. Hidrasyon sonucu elde edilen lipozom yapısı	45
Şekil 4.3. Boş lipozoma ait hidrodinamik boyut grafikleri	47
Şekil 4.4. Boş lipozoma ait zeta potansiyel grafiği	48
Şekil 4.5. Boş lipozomlara ait C-TEM görüntüsü	48
Şekil 4.6. Lipozomu oluşturan lipit türevlerine ait FTIR spektrumu	50
Şekil 4.7. Boş lipozomlara ait FTIR spektrumu	51
Şekil 4.8. A) Sorafenibin spektrofotometrik soğurum tarama grafiği B) Vismodegibin spektrofotometrik soğurum tarama grafiği	53
Şekil 4.9. 40 µg/mL vismodegibe ait HPLC kromatogramı	54
Şekil 4.10. Vismodegibe ait HPLC standart grafiği	55
Şekil 4.11. 40 µg/mL sorafenibe ait HPLC kromatogramı	55
Şekil 4.12. Sorafenibe ait HPLC standart grafiği	56
Şekil 4.13. A) Boş lipozom için elde edilen lipit film, B) 1:1 (w:w) vismodegib: sorafenib eklenerek elde edilen lipit film, C) 1:5 (w:w) vismodegib: sorafenib eklenerek elde edilen lipit film	57
Şekil 4.14. Ekstrüzyon öncesi ilaç optimizasyon çalışması sonucu elde edilen lipozom görüntüleri	58
Şekil 4.15. Optimum kabul edilen 25:1 oranlı dual ilaç yüklü lipozoma ait hidrodinamik boyut grafiği	60

Şekil 4.16. Dual ilaç yüklü lipozoma ait zeta potansiyel grafiği	60
Şekil 4.17. Dual ilaç yüklü lipozomlara ait C-TEM görüntüsü	61
Şekil 4.18. A) Sorafenib ilacına ait FTIR spektrumu, B) Vismodegib ilacına ait FTIR spektrumu, C) Boş ve dual lipozomlara ait FTIR spektrumları	62
Şekil 4.19. Dual-Lip yapısından sorafenib ve vismodegib ilaçlarının zamana bağlı kümülatif salımı: A) pH 5,5, B) pH 7,4.....	64
Şekil 4.20. 4 °C ve 25 °C’de saklanan Dual-Lip yapısına ait zamana bağlı hidrodinamik boyut değişimi grafiği.....	66
Şekil 4.21. Dual-Lip hemoliz deneyi	66
Şekil 4.22. HepG2 hücre hattı proliferasyon eğrisi.....	67
Şekil 4.23. MTT canlılık testi sonrası formazon kristallerinin DMSO ile çözülmesiyle oluşan rengin mikropalakalardaki görseli	68
Şekil 4.24. Sorafenibin HepG2 hücrelerine 24 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiği.....	69
Şekil 4.25. Vismodegibin HepG2 hücrelerine 24 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiği.....	69
Şekil 4.26. Serbest ilaç birleşiminin HepG2 hücrelerine 24 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiği.....	70
Şekil 4.27. Sorafenibin HepG2 hücrelerine 48 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiği.....	70
Şekil 4.28. Vismodegibin HepG2 hücrelerine 48 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiği.....	71
Şekil 4.29. Serbest ilaç birleşiminin HepG2 hücrelerine 48 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiği.....	71
Şekil 4.30. Sorafenibin HepG2 hücrelerine 72 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiği.....	72
Şekil 4.31. Vismodegibin HepG2 hücrelerine 72 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiği.....	72
Şekil 4.32. Serbest ilaç birleşiminin HepG2 hücrelerine 72 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiği.....	73
Şekil 4.33. Boş-Lip’in HepG2 hücrelerine 24 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiği.....	74
Şekil 4.34. Sor-Lip’in HepG2 hücrelerine 24 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiği.....	75
Şekil 4.35. Vis-Lip’in HepG2 hücrelerine 24 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiği.....	75
Şekil 4.36. Dual-Lip’in HepG2 hücrelerine 24 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiği.....	76

Şekil 4.37. Boş-Lip'in HepG2 hücrelerine 48 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiği.....	76
Şekil 4.38. Sor-Lip'in HepG2 hücrelerine 48 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiği.....	77
Şekil 4.39. Vis-Lip'in HepG2 hücrelerine 48 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiği.....	77
Şekil 4.40. Dual-Lip'in HepG2 hücrelerine 48 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiği.....	78
Şekil 4.41. Boş-Lip'in HepG2 hücrelerine 72 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiği.....	78
Şekil 4.42. Sor-Lip'in HepG2 hücrelerine 72 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiği.....	79
Şekil 4.43. Vis-Lip'in HepG2 hücrelerine 72 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiği.....	79
Şekil 4.44. Dual-Lip'in HepG2 hücrelerine 72 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiği.....	80
Şekil 4.45. Sorafenibin HEK293 hücrelerine 24 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiği.....	81
Şekil 4.46. Vismodegibin HEK293 hücrelerine 24 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiği.....	82
Şekil 4.47. Serbest ilaç birleşiminin HEK293 hücrelerine 24 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiği.....	82
Şekil 4.48. Sorafenibin HEK293 hücrelerine 48 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiği.....	83
Şekil 4.49. Vismodegibin HEK293 hücrelerine 48 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiği.....	83
Şekil 4.50. Serbest ilaç birleşiminin HEK293 hücrelerine 48 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiği.....	84
Şekil 4.51. Sorafenibin HEK293 hücrelerine 72 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiği.....	84
Şekil 4.52. Vismodegibin HEK293 hücrelerine 72 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiği.....	85
Şekil 4.53. Serbest ilaç birleşiminin HEK293 hücrelerine 72 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiği.....	85
Şekil 4.54. Dual-Lip'in HEK293 hücrelerine 24 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiği.....	8/
Şekil 4.55. Dual-Lip'in HEK293 hücrelerine 48 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiği.....	8/

Şekil 4.56. Dual-Lip’in HEK293 hücrelerine 72 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiği.....	88
Şekil 4.57. 48 saat ilaç bileşimi uygulanan HepG2 hücrelerinin “inverted” mikroskop altındaki görüntüleri	89
Şekil 4.58. HepG2 hücrelerine ait 48. saat apoptoz deneyi akış sitometrisi analiz sonuçları	89
Şekil 4.59. HepG2 hücrelerine ait 72. saat apoptoz deneyi akış sitometrisi analiz sonuçları	90



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. HepG2 hücre hatlarına uygulanan örnekler	42
Çizelge 3.2. HEK293 hücre hatlarına uygulanan örnekler	42
Çizelge 4.1. Farklı ekstrüzyon sayılarına göre elde edilen lipozomların hidrodinamik boyutları	46
Çizelge 4.2. Farklı ilaç miktarlarına göre elde edilen ilaç yükleme miktarları ve verimleri.....	59
Çizelge 4.3. Farklı ilaç miktarlarına göre elde edilen hidrodinamik boyutlar ve zeta potansiyelleri	59
Çizelge 4.4. Dual-Lip ve Boş-Lip'e ait %hemoliz değerleri	66
Çizelge 4.5. HepG2 hücre hattı serbest ilaçlara dair IC ₅₀ (µg/mL) değerleri.....	73
Çizelge 4.6. HepG2 hücre hattı lipozomal sistemlere dair IC ₅₀ (µg/mL) değerleri	81
Çizelge 4.7. HEK293 hücre hattı serbest ilaçlara dair IC ₅₀ (µg/mL) değerleri	86

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

%	: yüzde
°C	: santigrat derece
µg	: mikrogram
µL	: mikrolitre
µm	: mikrometre
BCC	: “basal cell carcinoma”, bazal hücreli karsinom
Boş-Lip	: Boş lipozom
C-TEM	: “contrast transmission electron microscopy”, kontrastlı geçirimli elektron mikroskobu
Dhh	: “desert hedgehog”
DMSO	: dimetilsülfoksit
DNA	: deoksiribonükleik asit
DOPC	: 1,2-dioleoil-sn-gliserol-3-fosfolipid
DOPE	: 1,2-dioleoil-sn-gliserol-3-fosfoetanolamin
DOTAP	: 1,2-dioleoil-3-trimetilamonyum-propan
DOX	: dokсорubisin
DSPC	: 1,2-dipalmitoil-sn-gliserol-3-fosfolipid
DSPE	: 1,2-distearoil-sn-gliserol-3-fosfoetanolamin
DPPE	: 1,2-dipalmitoil-sn-gliserol-3-fosfoetanolamin
Dual-Lip	: dual ilaç yüklü lipozom
EPR	: “enhanced permeability and retention”, artırılmış geçirgenlik ve tutulma
FBS	: “fetal bovine serum”, fetal sığır serumu
FDA	: “U.S. Food and Drug Administration”
FITC	: Floresan izotiyosiyanat
FTIR	: “fourier transform infrared”, fourier dönüşümlü kızılötesi
Gli	: glioma ilişkili onkogen
GPCR	: G-protein-bağımlı reseptör
GUV	: “giant unilamellar vesicles”, dev tek katmanlı veziküller
H ₃ PO ₄	: fosforik asit
HBV	: hepatit B virüsü
HCC	: hepatoselüler karsinom
HCV	: hepatit C virüsü
Hh	: hedgehog
HPLC	: “high performance liquid chromatography”, yüksek performanslı sıvı kromatografisi
IC ₅₀	: “half-maximal inhibitory concentration”, yarı maksimal inhibitör derişimi
Ihh	: “Indian hedgehog”
KCl	: potasyum klorür
KH ₂ PO ₄	: potasyum dihidrojen fosfat
LUV	: “large unilamellar vesicles”, büyük tek katmanlı veziküller
mg	: miligram
mL	: mililitre
MLV	: “multilamellar vesicles”, çok katmanlı veziküller
mm	: milimetre
mM	: milimolar
MVV	: “multivesicular vesicles”, çok veziküllü veziküller
MTT	: (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolyum bromür)
mV	: milivolt
Na ₂ HPO ₄	: disodyum hidrojen fosfat
NaCl	: sodyum klorür

nm	: nanometre
NO	: nitrik osit
NP	: nanopartikül
OD	: optik dansite
PBS	: “phosphate buffered saline”,
PDGFR	: platelet kökenli büyüme faktörü reseptörü
pdi	: polidispersite indeksi
PEG	: polietilen glikol
PI	: propidyum iyodür
PLGA	: poli(D,L-laktik-ko-glikolik asid)
POPC	: 1-palmitoil-2-oleoil-sn-gliserol-3-fosfolipin
Ptch	: “patched”
SD	: standart sapma
Shh	: “sonic hedgehog”
Smo	: “smoothened”
Sor-Lip	: sorafenib yüklü lipozom
SUFU	: “suppressor of fused”, kaynaşmış baskılayıcı
SUV	: “small unilamellar vesicles”, küçük tek katmanlı veziküller
v/v	: “volume/volume”, hacim/hacim
VEGFR	: vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü
Vis-Lip	: vismodegib yüklü lipozom
ZnO	: çinko oksit
w/w	: “weight/weight”, ağırlık/ağırlık
$\bar{x}$	: ortalama

ÖZET

Karaciğer Kanseri Tedavisine Yönelik Dual İlaç İçeren Taşıyıcı Sistem Hazırlanması, Karakterizasyonu Ve Karaciğer Kanseri Üzerindeki Etkisinin *In Vitro* İncelenmesi

Karaciğer kanseri en sık tanı konulan altıncı kanser türü olup kansere bağlı ölümlerde üçüncü sıradadır. Sorafenib, erişkinlerde, karaciğer kanseri türlerinden hepatoselüler karsinomun birinci basamak tedavisinde kullanılan bir ilaçtır. Vismodegib hepatoselüler karsinom gelişiminde rol oynadığı düşünülen Hedgehog yolağının inhibitörüdür. Birleşik ilaç tedavileri kanserlerde tedavi etkinliğinin artırılması amacıyla kullanılabilir. Kanser tedavisinde kullanılan ilaçların neden olduğu yan etkilerin azaltılıp, terapötik etkinliklerinin artırılması için ilaç taşıma sistemlerine yüklenmesi kabul gören bir yaklaşımdır. Çalışmada hidrofobik karakterli bu iki ilacın lipozomal sisteme yüklenmesi, aynı zamanda sinerjik etkisinin incelenmesi ve karaciğer kanseri üzerinde terapötik etkinliğinin *in vitro* olarak araştırılması amaçlandı.

İnce lipit film hidrasyon yöntemiyle hazırlanan lipozomlara sorafenib ve vismodegib ilaçları beraber yüklendi. Dual ilaç yüklü lipozomların optimizasyon ve karakterizasyon çalışmaları, *in vitro* ilaç salımı, stabilite ve hemoliz deneyleri gerçekleştirilerek *in vitro* sitotoksitesi ve apoptotik etkisi araştırıldı. Elde edilen verilere göre lipozomal taşıma sisteminin karakteristik özelliklerinin uygun olduğu, ilaçları kontrollü saldı, hemolize neden olmadığı, hepatoselüler karsinom hücreleri üzerinde sitotoksik ve apoptotik etkisinin bulunduğu belirlendi. Bununla birlikte dual ilaç yüklü taşıma sisteminin sağlıklı insan hücrelerine zarar vermediği tespit edildi.

Sonuç olarak elde edilen dual ilaç yüklü taşıma sisteminin azaltılmış yan etki ve artırılmış terapötik etkinlik ile karaciğer kanseri tedavisinde kullanım potansiyelin olduğu kanısına varılabilir.

Anahtar sözcükler: Karaciğer kanseri, sorafenib, vismodegib, lipozomal ilaç taşıma, dual tedavi

ABSTRACT

Preparation and Characterization of Dual Drug Containing Carrier System for Liver Cancer Treatment and *In Vitro* Investigation of Its Effect on Liver Cancer

Liver cancer is the sixth most diagnosed cancer type and is the third leading cause of cancer-related deaths. Sorafenib is a drug used in the first-line treatment of hepatocellular carcinoma, a type of liver cancer, in adults. Vismodegib is an inhibitor of the Hedgehog pathway, which is thought to play a role in the development of hepatocellular carcinoma. Combined drug therapies can be used to increase the effectiveness of cancer treatment. Loading drugs used in cancer treatment into drug delivery systems is an accepted approach to reduce side effects and increase therapeutic efficacy. The aim of the study was to load these two hydrophobic drugs into the liposomal system, to examine their synergistic effects and to investigate their therapeutic efficacy on liver cancer *in vitro*.

Liposomes prepared by thin lipid film hydration method were loaded with sorafenib and vismodegib drugs together. Optimization and characterization studies, *in vitro* drug release, stability and hemolysis experiments of the dual drug loaded liposome were performed. Also *in vitro* cytotoxicity and apoptotic effect of dual drug loaded liposomes were investigated. According to the obtained data, it was determined that the liposomal drug delivery system had appropriate characteristics, released the drugs in a controlled manner, did not cause hemolysis, and had cytotoxic and apoptotic effects on hepatocellular carcinoma cells. However, it was determined that the dual drug-loaded liposomal system did not cause toxicity in healthy human cells.

As a result, it can be concluded that the obtained dual drug-loaded delivery system has the potential to be used in the treatment of liver cancer with reduced side effects and increased therapeutic efficacy.

Keywords: liver cancer, sorafenib, vismodegib, liposomal drug delivery, dual therapy

1. GİRİŞ

Kanser, vücuttaki bazı hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması ve vücudun diğer bölgelerine yayılmasıyla oluşan bir hastalıktır (1). Kanser hücreleri proliferatif uyarının sürdürülmesi, büyümeyi inhibe eden uyarılara duyarsızlık, immün sistemden kaçış, replikatif ölümsüzlük, tümör kaynaklı inflamasyon, invazyon ve metastaz, anjiyogenez, kararsız genom ve mutagenез, hücre ölümüne direnç ve hücresel metabolizmanın bozulması gibi bazı karakteristik özelliklere sahiptir (2).

Kanser, dünya çapında her altı ölümden birinin ve her bulaşıcı olmayan hastalıklardan kaynaklanan dört ölümden birinin sorumlusudur. 2022 verilerine göre dünya çapında yaklaşık 20 milyon yeni kanser vakası ve 9,7 milyon kanser ölümü meydana gelmiştir.

Karaciğer kanseri en sık teşhis edilen altıncı kanser türü olup kansere bağlı ölümlerde üçüncü sıradadır (3). Erişkinlerde karaciğer kanseri vakalarının %75-85'ini hepatosellüler karsinom oluşturmaktadır. Hepatosellüler karsinom oluşumunda hepatit B ve C virüsleri, alkol tüketimi, obezite, tip 2 diyabet gibi risk faktörlerinin yanı sıra çeşitli moleküler mekanizmalar da rol oynamaktadır (4),(5).

Hepatosellüler karsinom tedavisi lokal ya da sistemik olabilmektedir. Erken evrede tanı konulabilen hepatosellüler karsinom hastalarında lokal tedavi olası iken, ileri evrede tanı konulan ya da cerrahi sonrası nüks görülen hastalarda sistemik tedavi gerçekleştirilir (6). Sistemik tedavide birinci basamak olarak kullanılmak üzere ilk olarak onaylanan yolak hedefli bir ilaç olan sorafenib, multikinaz inhibitörü olarak görev yapmaktadır (7). Hepatosellüler karsinomda aktif hale geldiği keşfedilen yolaklardan biri de embriyonik gelişimde rol aldığı bilinen, saç, deri ve kök hücreler haricindeki tüm normal hücrelerde inaktif olan “Hedgehog” yolağıdır. Vismodegib “Hedgehog” yolağının bir bileşeni olan Smo reseptör inhibitörüdür (8),(9). Sistemik kanser tedavisinde kullanılan pek çok ilaç gibi sorafenib de yorgunluk, kilo kaybı, döküntü/soyulma, el-ayak sendromu, alopesi, ishal, iştahsızlık, mide bulantısı, karın ağrısı, hipertansiyon, duyuşsal nöropati, ağrı, kaşıntı, kuru cilt, hipoalbuminemi, hipofosfatemi, ishal, lipaz artışı, amilaz artışı, anoreksi, kusma, kabızlık, kas ağrısı, güçsüzlük, dispne, öksürük, kanama gibi yan etkiler oluşturmaktadır (10). Vismodegibin neden olduğu yan etkiler ise kas spazmları, saç

dökülmesi, disguzi (tat alma bozukluğu), kilo kaybı, yorgunluk, mide bulantısı, iştahsızlık ve ishal olarak sıralanabilir (8).

Sistemik kanser tedavilerindeki seçici olmayan ilaç dağılımından kaynaklanan yan etkilerin ortadan kaldırılmasında nanoteknolojik yaklaşımlar önemli bir rol oynamaktadır. Nanopartiküler ilaç taşıma sistemleri, ilaç direncinin ve yan etkilerin azaltılmasını, biyoyararlanım, ilaç çözünürlüğü ve kararlılığın artırılmasını, ilaç hedeflemenin olası kılınmasını, hasta iyilik halinin artırılması ve gereken ilaç dozunun azaltılmasını sağlayabilir (11).

İlk keşfedilen nanopartiküler taşıma sistemlerinden biri olan lipozomlar, doğal ya da sentetik lipidlerin sulu bir ortamda emülsifiye edilmesi sonucu oluşan, bir ya da daha fazla lipid çift katmanından oluşan küresel lipid vezikülleridir. Biyouyumlulukları, kararlılıkları, sentezlenmelerinin kolay olması, yüksek ilaç yükleme kapasiteleri, yüksek biyoyararlanımları nedeniyle lipozomlar, nanomedikal alanda yaygın olarak kullanılan nanopartiküllerdir. Boyutları yanında hem hidrofilik hem de lipofilik ilaç moleküllerini kapsülleme yetenekleri nedeniyle sıklıkla yeğlenmektedirler (12). Lipozom sentezi için çeşitli sentezleme yöntemleri olmakla birlikte en sık kullanılan yöntem ince film hidrasyonudur (13).

Normal damarların aksine, tümör damar sisteminin tipik olarak nispeten büyük gözeneklere sahip olması ve artan bir damar geçirgenliğine sahip oluşu, intravenöz olarak uygulanan nanoilaçların pasif hedeflemeyle tümör bölgelerine ulaşmasında etkin rol oynar. Aynı zamanda düzgün çalışan bir lenf drenaj ağının olmaması ilaç taşıma sistemlerinin pasif olarak tümör bölgesine toplanmasına ve tümöre kolaylıkla geçişine olanak tanır (14).

Bu çalışmayla karaciğer kanser türlerinden biri olan hepatoselüler karsinom tedavisinde kullanılmak üzere, pasif hedefli, sorafenib ve vismodegib ilaçlarını beraber içeren, lipozomal ilaç taşıma sisteminin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç çerçevesinde sorafenib ile vismodegibin HCC tedavisinde beraber kullanımının etkinliği de incelenmiştir. Ayrıca dual ilaç içeren lipozomal taşıma sisteminin sentez ve karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilerek, taşıma sisteminin hemolitik aktivitesi ile serbest ve taşıma sistemine yüklü ilaçların *in vitro* sitotoksitesi irdelenmiş ve karaciğer kanseri hücreleri üzerindeki apoptotik etkinliği araştırılmıştır.

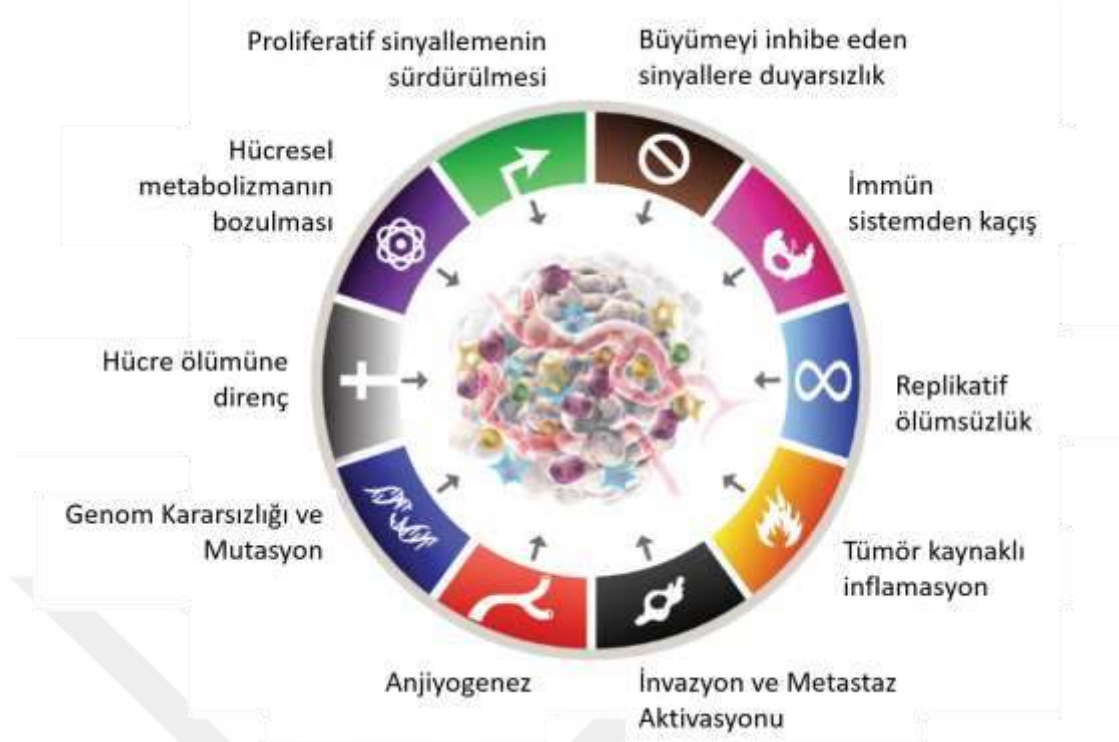
2. GENEL BİLGİ

2.1. Kanser

Dünya Sağlık Örgütü kanseri, vücudun hemen hemen her organında ya da dokusunda başlayabilen, anormal hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması, normal sınırlarını aşarak vücudun bitişik bölgelerini istila etmesi ve/veya diğer organlara yayılmasıyla oluşan büyük bir hastalık grubu olarak tanımlamaktadır (15).

Kanser hücreleri şekil 2.1’de görülen ve aşağıda sıralanan temel özelliklere sahiptir:

- Proliferatif uyarının sürdürülmesi
- Büyümeyle inhibe eden uyarılara duyarsızlık
- İmmün sistemden kaçış
- Replikatif ölümsüzlük
- Tümör kaynaklı inflamasyon
- İnvazyon ve metastaz aktivasyonu
- Anjiyogenez
- Kararsız genom ve mutajenez
- Hücre ölümüne direnç
- Hücre metabolizmasının bozulması



Şekil 2.1. Kanser'in özellikleri (2).

Kanser hücrelerinin tartışmasız en temel özelliği, çoğalmayı sürdürebilme yetenekleridir. Normal dokular, büyümeyi özendiren uyarıların üretimi ve salınımını denetleyerek hücre sayısının homeostazisi ve normal doku işlevinin korunmasını sağlar. Büyümeyi özendiren uyarılar, hücre içine büyük ölçüde hücre içi tirozin kinaz bölgeleri içeren hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanan büyüme faktörleri tarafından iletilir. Normal hücrelerdeki mitojenik uyarılar, diğer bir deyişle hücre çoğalma uyarılarıyla ilgili bilgiler henüz tam olarak anlaşılmamıştır. Normal dokular içindeki hücre sayısını ve konumunu denetleyen büyüme faktörü uyarılarının, hücreler arasında düzenlenmiş bir şekilde iletildiği düşünülmektedir. Buna karşın kanser hücrelerinin çoğalma uyarılarıyla ilgili bilgiler normal hücrelere göre daha iyi aydınlatılmıştır. Kanser hücreleri çoğalmalarını sürdürme yeteneğini çeşitli yollarla kazanabilirler: (a) Büyüme faktörü ligandlarını üretebilirler ve bu ligandlar ilgili reseptörlere bağlanarak yanıt verebilirler (otokrin proliferatif uyarım), (b) Kanser hücre yüzeyindeki reseptör proteinlerinin düzeylerinin artırılmasıyla büyüme ligandına aşırı duyarlı hale gelme söz konusu olabilir, (c) Çoğalma reseptör moleküllerindeki liganddan bağımsız uyarılmayı kolaylaştıran yapısal değişikliklerden de kaynaklanabilir (16).

Bağıışıklık sistemi, enfekte hücreler ya da kanser hücreleri gibi hastalıklı ve potansiyel olarak zararlı hücreleri saptayıp ortadan kaldırabilir. Bağıışıklık sisteminin bir parçası olan T hücresi aracılı gözetim, kanser hücresi yüzeyindeki insan lökosit antijen (“human leukocyte antigen”, HLA) tarafından sağlanan tümör antijenlerinin tanınmasına dayanır. Bu antijenler, kanser hücresine özgü genetik değışikliklerden ve değışmiş hücresel süreçlerden kaynaklanır. Ancak, tümör çeşitli mekanizmalarla immün sistemden kaçabilir. Tümörün uyguladığı immün kaçınma mekanizmaları, antitümör bağıışıklığını baskılamada farklı derecede etkilidir (17).

Kanser hücrelerinin makroskobik tümörler oluşturabilmek için sınırsız replikasyon potansiyeline ihtiyaç duyduğu yaygın olarak kabul görmüştür. Doğrusal kromozomların uçlarını kapatan ve genom kararlılığını koruyan koruyucu yapılar olan telomerlerin, sınırsız çoğalma yeteneğinde rol oynadığı düşünülmektedir. Telomer uzunluğu hücre bölünmesi ve yaşlanmayla kısalır. Telomerlerin kritik bir uzunluğa ulaşana kadar kısalması sonrası bir noktada işlevsiz hale gelirler ve replikatif yaşlanma (“replicative senescence”) olarak bilinen kalıcı bir hücre döngüsü durmasına girilir. Telomer kısalmasının neden olduğu yaşlanma, sınırsız hücre büyümesine karşı etkili bir bariyer görevi görür ve bu nedenle önemli bir tümör baskılayıcı mekanizmayı temsil eder. Telomerik DNA'nın uçlarına telomer tekrar segmentleri ekleyen özel bir DNA polimeraz olan telomeraz, ölümsüzleşmemiş hücrelerde hemen hemen yoktur; ancak insan kanser hücreleri de dahil olmak üzere kendiliğinden ölümsüzleşen hücrelerin büyük çoğunluğunda (%90'a yakın) işlevsel olarak önemli düzeylerde ifade edilir. Telomeraz, telomerik DNA'yı uzatarak, yokluğunda meydana gelecek olan telomer erozyonuna karşı koyabilir. Bu durum, hem yaşlanmaya hem de apoptoza karşı direnç gelişmesiyle sonuçlanır (16),(18). Apoptozis ya da programlanmış hücre ölümü, organizma gelişimi ve doku homeostazında önemli bir rol oynayan evrimsel olarak korunan bir süreçtir. Ancak bazı patolojik durumlarda, özellikle kanserde, hücreler, apoptozis kaynaklı ölüme uğrama yeteneklerini kaybederek, kontrolsüz çoğalır. Kanser hücrelerinde genellikle apoptotik kaskatın aktivasyonuna karşı önemli rol oynayan proteinlerin çoğunun aşırı ifade edildiği görülür (19).

Kanser hastalarının prognozunda tümör hücrelerinin invazyonu ve metastazı önem göstermektedir. Tümör metastazı, kanserle ilişkili ölümlerin %90'ından fazlasını ve ileri evre kanser hastalarının büyük çoğunluğunun klinik yönetimi için zorluk oluşturan,

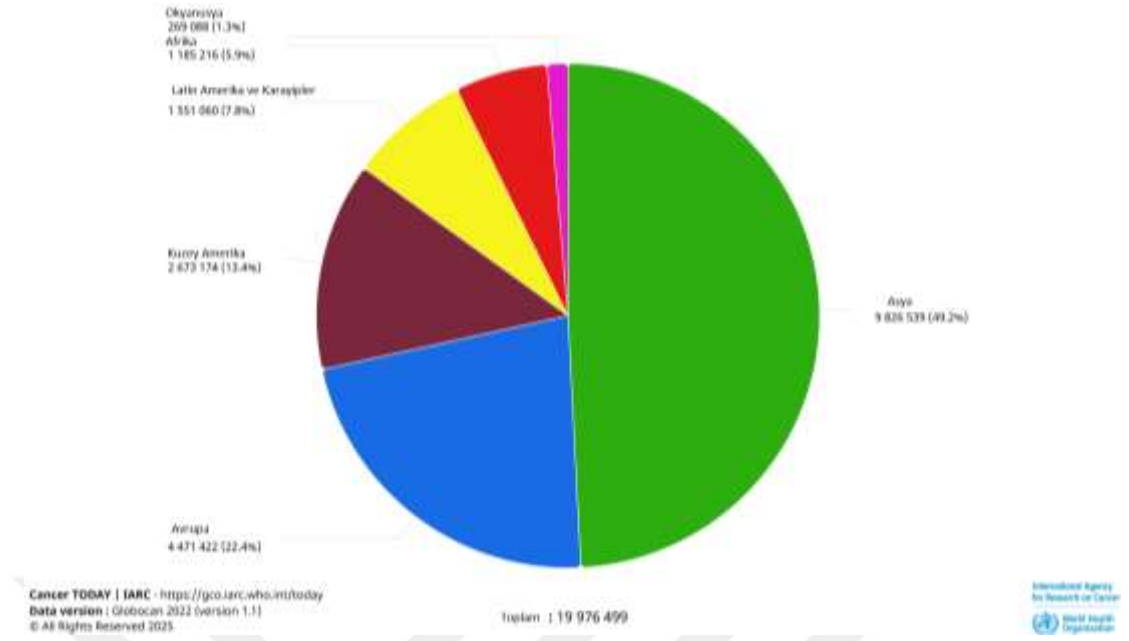
malignitenin ilerlemesinde rol alan önemli bir olaydır. Tümör metastazı, uzak organlarda ikincil tümörlerin oluşumuna yol açan bir dizi aşamayı içerir ve kanser kaynaklı mortalite ve morbiditeden büyük ölçüde sorumludur. Metastatik basamak kabaca üç ana sürece ayrılabilir; invazyon, intravazasyon ve ekstrasvazasyon. Hücre adhezyonunun kaybı, kötü huylu tümör hücrelerinin birincil tümör kütlelerinden ayrılmasına olanak tanır ve hücre-hücre dışı matriks etkileşimindeki değişiklikler, hücrelerin çevredeki stromaya invaze olmasına olanak tanır. Bu süreçte, bazal membranı ve hücre dışı matrisi parçalamak için gerekli maddelerin salgılanarak, hareketlilik ve göçün denetiminde yer alan proteinlerin ekspresyonu ya da baskılanması da söz konusudur. Böylece hücreler tümörün yakınındaki kan damarına girerek, dolaşım sistemine ulaşır ve uzak bölgelere metastaz yapabilir. Bu süreç intravazasyon olarak adlandırılır. Tümör hücresi ekstrasvazasyon sürecinde damar içinde biyokimyasal etkileşimlerle endotel hücrelerine yapışır ve böylece bazal membrana geçer. Yeni tümör daha sonra bu ikincil odakta çoğalabilir (20),(21).

Kanser hücrelerinin çoğalması ve metastatik yayılımı, yeterli oksijen ve besin sağlanmasına ve atık ürünlerin uzaklaştırılmasına bağlı olduğundan, damar ağında büyüme önemlidir. Bu nedenle anjiyogenez adı verilen yeni kan damarlarının oluşum süreci gerçekleşir. Tümör dokuları besin ve oksijene ihtiyaç duyduğunda anjiyogenez uyarılır. Anjiyogenezin hem aktivatör hem de inhibitör molekülleri tarafından düzenlendiği bilinmektedir (22).

Genomik kararsızlık, çoğu kanserde görülen bir özelliktir. Kalıtsal kanserlerde, genomik kararsızlık DNA onarım genlerindeki mutasyonlardan kaynaklanır ve kanser gelişimini yönlendirir. Kalıtsal olmayan kanserlerde genomik kararsızlığın moleküler temeli belirsizliğini korumaktadır (23). Genomik kararlılığın korunması, hücre bütünlüğünün, DNA replikasyonundan kaynaklanan hataların, hücre metabolizmasından kaynaklanan reaktif oksijen türleri gibi endojen genotoksiklerin ve ultraviyole ışık, iyonlaştırıcı radyasyon ya da DNA'ya zarar veren kimyasallar gibi ekzojen kanserojen saldırılarının önlenmesi açısından önemlidir. Tümör başlangıcı ve ilerlemesinin, normal hücrelerde meydana gelen genomik değişiklik ve sonrasında daha agresif alt klonların oluşmasından kaynaklandığına inanılmaktadır. Tümör hücre popülasyonunun normal hücrelere kıyasla genetik olarak daha dengesiz olduğu görülmektedir. Genomik kararsızlık, kanserli hücrelere büyüme avantajı sağlamaktadır (24).

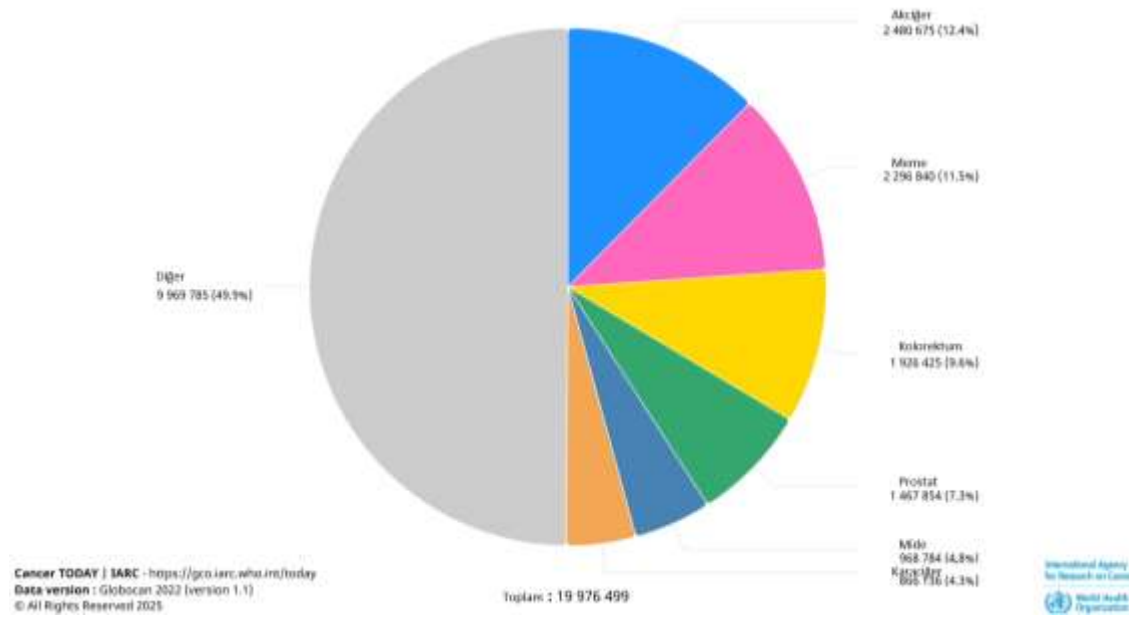
Tüm bu farklılıkların yanı sıra hücrel malign dönüşümde, metabolik değişiklikler de belirgin ölçüde meydana gelmektedir ve bu değişiklikler karsinogenezisin bir özelliği olarak kabul edilmektedir. Otto Warburg, kanser hücrelerinin oksijen varlığında bile oksidatif fosforilasyona gitmeden glikoliz yoluyla enerji ürettiğini bildirmiştir. Kanser hücrelerinde aerobik glikoliz olarak ifade edilen ve “Warburg etkisi” olarak da bilinen bu metabolik değişim sonucu, glukoz taşıyıcıları (GLUT) aracılığıyla glukoz alımı artırılır ve pirüvat laktata oksitlenir. Tümör dokularının hipoksik mikroçevresinde yüksek aerobik glikoliz oranı, kanser hücrelerine oksidatif fosforilasyon sınırlı olduğunda, yeterli ATP sağlamak gibi avantajlar getirir. Ayrıca glikolitik yoldaki ara metabolitler, DNA ve yağ asitlerinin sentezi için yapı taşları ya da öncüller meydana getirir. Örneğin, glikolitik yolda oluşan glukoz-6-fosfat, riboz-5-fosfat ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) üretmek için pentoz fosfat yoluna yönlendirilebilir. Glikoliz sırasında üretilen yüksek laktik asit seviyeleri, metalloproteinazları ve matris yeniden şekillendirme enzimlerini aktive edebilir ve böylece kanser invazyonuna ve metastazına katkıda bulunabilir. Kanser hücrelerinde glukoz tüketiminin artmasının yanı sıra glutamin alımının ve metabolizmasını arttığı da bilinmektedir. Bunların yanı sıra, kanser hücrelerinde metabolik yollardaki pek çok enzimde değişiklikler meydana geldiği (Örneğin trikarboksilik asit çevriminde ya da elektron transport zincirindeki bazı enzimlerin kanser hücrelerinde mutasyona uğradığı belirtilmektedir.) ve meydana gelen bazı metabolik değişikliklerin ilaç direnci ile de ilişkili olabileceği ifade edilmektedir (25),(26),(27).

Kanser, 21. yüzyılda önemli bir toplumsal, halk sağlığı ve ekonomik sorun olup, dünya çapında her altı ölümden birinin ve bulaşıcı olmayan hastalıklardan kaynaklanan her dört ölümden birinin sorumlusudur (3). GLOBOCAN (“Global Cancer Observatory”) 2022 verilerine göre her iki cinsiyet bir arada değerlendirildiğinde, 2022 yılında dünya çapında yaklaşık 20 milyon yeni vaka ve 9,7 milyon kanser ölümü meydana gelmiştir (28). Dünyada kanser vakalarının 2022 yılındaki bölgelere göre dağılımı şekil 2.2’de görülmektedir. Buna göre en fazla vaka oranı Asya kıtasında görülürken, onu Avrupa ve Kuzey Amerika izlemektedir. 2022 yılında Türkiye’de ise 240 bin yeni vaka ve 130 bin ölüm bildirilmiştir (29).



Şekil 2.2. Kanser vaka sayılarının bölgelere göre dağılımı (GLOBOCAN 2022).

Dünya çapında görülen kanser vakalarının kanser tiplerine göre dağılımı şekil 2.3'te görülmektedir. Buna göre her iki cinsiyet açısından değerlendirildiğinde en sık gözlenen kanser tipi akciğer kanseri iken onu sırasıyla meme, kolorektum, prostat, mide, karaciğer kanseri ve diğer kanserler izlemektedir.



Şekil 2.3. Kanser tiplerine göre kanser vakalarının dağılımı (GLOBOCAN 2022).

2.2. Karaciğer Kanseri

Karaciğer kanseri GLOBOCAN 2022 yılı verilerine göre yılda 865 bin yeni vaka ile en sık teşhis edilen altıncı kanser türü olup kansere bağlı ölümlerde üçüncü sıradadır (3). 2020 yılı verileri incelendiğinde, karaciğer kanseri 90 ülkede kanser ölümünün ilk beş nedeni arasındadır. Doğu ve Güneydoğu Asya, Kuzey ve Batı Afrika ve Orta Amerika bu ülkelerin başındadır. Bununla birlikte karaciğer kanseri, Avrupa'daki (Bosna-Hersek, Fransa, İtalya, Moldova Cumhuriyeti ve Romanya) ve Batı Asya'daki (İran, Suudi Arabistan, Türkmenistan ve Özbekistan) bazı ülkelerde kanser kaynaklı ölümlerin ilk beş nedeninden biri olarak bildirilmiştir. 2020 ile 2040 yılları arasında yeni karaciğer kanseri vaka sayısının %55 oranında artacağı ve 2040 yılı için 1,4 milyon yeni tanı öngörülmektedir. Yine 2040 yılında, karaciğer kanserine bağlı 1,3 milyon ölüm gerçekleşeceği tahmin edilmektedir (30).

Karaciğer kanseri, çoğunlukla hepatosellüler karsinomu (HCC) (vakaların %75-85'i) ve intrahepatik kolanjiyokarsinomu (vakaların %10-15'i) kapsar. Hepatit B virüsü (HBV) ya da hepatit C virüsü (HCV) kronik enfeksiyonu dünya çapında HCC'nin %21 ila %55'inden sorumludur. HCC için diğer risk faktörleri arasında aflatoksin maruziyeti, yoğun alkol tüketimi, obezite, tip 2 diyabet ve sigara kullanımı yer alır (3). HCC'nin gelişimi, hepatosit iltihabı, nekroz ve rejenerasyonu içeren karaciğer hasarını içerir. Birden fazla risk faktörüne sahip olmak HCC gelişimine katkıda bulunabilir; örneğin, aflatoksinlere maruz kalan HBV hastalarının HCC geliştirme riski, maruz kalmayanlara kıyasla 60 kat daha fazladır. İleri steatoz, insülin direnci, hiperinsülinemi, yağ dokusu yeniden şekillenmesi, oksidatif hasar, genetik faktörler ve epigenetik değişikliklerle birlikte onkojenik sinyalleme aktif eder ve HCC gelişimini destekler. Alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı ("nonalcoholic fatty liver disease", NAFLD) son zamanlarda birçok ülkede HCC'nin başlıca nedenlerinden biri olarak öne çıkmaktadır. Alkolsüz steatohepatit ("nonalcoholic steatohepatitis", NASH), NAFLD'deki ilk inflamatuvar evre fazıdır ve hepatik lipid birikimi söz konusudur. Bu, potansiyel olarak zararlı metabolitlerin eş zamanlı birikimi ve karaciğer tümör oluşumunu destekleyen hücrel metabolik değişikliklerle karakterizedir. Ek olarak aşırı beslenme ve insülin direnci doğrudan bağışıklık sistemini harekete geçirebilir ve hepatositlere daha fazla zarar verebilir. Sonuç olarak, hepatosellüler stres, hepatositlerin apoptozunu, nekrozunu ve nekroptozu tetikleyerek HCC'ye yol açabilir (5).

Yukarıda ifade edilen risk faktörlerinin yanı sıra HCC oluşum ve gelişiminde bazı moleküler mekanizmalar da rol almaktadır. Bunlar arasında proto-onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve hücre çoğalma döngüsünde, hücre apoptozu ve hücre farklılaşmasında rol alan genlerdeki değişiklikler yer almaktadır. HCC'de en sık görülen gen mutasyonları telomeraz (TERT) promotörü, protein 53 (p53), β -katenin (CTNNB1), aksin-1 (AXIN1) AT açısından zengin etkileşimli alan içeren protein 1A (ARID1A) ve AT açısından zengin etkileşimli alan içeren protein 2 (ARID2)'dir. Telomer devamlılığı, p53 yolağı, Wnt yolağı, hücre döngüsü, Ras/MAPK yolağı, AKT/mTOR yolağı, kromatin yeniden şekillenmesi, oksidatif stres ve anjiyogenezdeki bozukluklar HCC oluşumunun %10'undan daha azını oluşturan diğer önemli parametrelerdir (4),(31).

HCC hastalarının %20-50'sinde epigenetik modifikasyonlar söz konusudur. Metilasyon genellikle HCC'nin başlangıcında ve ilerlemesinde meydana gelir. Histon deasetilazların da HCC patogeneğinde rol aldığı belirtilmektedir. Ayrıca çeşitli mikroRNA'ların anormal ekspresyonunun anjiyogenezi ve otofajiyi, hücre apoptozunu, çoğalmasını, metastazını ve invazyonunu düzenleyebileceği ve HCC'nin oluşumuna ve gelişimine katılabileceği ifade edilmektedir (4),(32).

Araştırmacılar, hücre sağ kalımını, apoptozu, hücre döngüsünü, çoğalmayı ve farklılaşmayı kontrol eden çoklu sinyal iletim yollarındaki moleküllerin anormal aktivasyonunun HCC ilerlemesine yol açtığını ileri sürmektedir. HCC gelişimindeki bu önemli sinyal yolları, “Ras/Raf/MAPK” yolu, “PI3K/Akt/mTOR” yolu, “Wnt/ β -katenin” yolu, “JAK/STAT” yolu, “Hippo-YAP/TAZ” yolu, “Hedgehog” (Hh) yolu ve “Notch” yolu olarak bildirilmektedir (4),(33),(34).

HCC tedavisinde lokal ya da sistemik tedavi stratejileri uygulanabilmektedir. Lokal tedavi yöntemleri karaciğer rezeksiyonunu, transplantasyonu, perkütanöz ablasyonu, hepatik arteriyel kemoembolizasyonu ve radyasyon tedavisini kapsamaktadır. Sistemik tedavi ise kemoterapi, immünolojik tedavi, hormonal tedaviler ve hedefli tedaviyi kapsar (35).

Cerrahi tedavi, küçük boyutlu tümörler ve karaciğer fonksiyonu bozulmamış (Örneğin sirotik karaciğer rejeneratif potansiyelini kaybeder ve daha az fonksiyonel hücre rezervine sahip olur ve bu nedenle tam cerrahi rezeksiyon olasılığını büyük ölçüde sınırlar.) hastalar için altın standarttır; karaciğer nakli ise karaciğer fonksiyonu bozulmuş hastalar için endikedir. Transplantasyon hepatokarsinom tedavisinde oldukça önemli rol

oynamaktadır (35). Ablasyon, erken evre hastalığı olan hastalar için potansiyel bir tedavi seçeneğidir. Ablasyonun başarısı, 2 cm'den 3 cm'ye kadar olan lezyonlarda en yüksektir ve 3 cm'den büyük tümörlerde önemli ölçüde azalır (36). Hepatik arteriyel kemoembolizasyon, rezekte edilemeyen hepatokarsinom için en yaygın tedavilerden biridir. Bu tedavi türünde geleneksel kemoterapide meydana gelenin aksine, lezyon içinde maksimum ilaç derişimine ulaşılırken çevre organlarda minimum ilaç derişimine olanak tanır. Ayrıca bu yöntemle kontrast madde enjekte edilerek hepatik arterlerin dağılımının radyolojik bir görüntülemesi ve hepatosellüler karsinomun doğru teşhisi de sağlanabilir (35).

Yaklaşık %40'ını oluşturan erken tanı konmuş HCC hastaları lokal tedaviye uygundur. Lokal tedaviye uygun olmayan ara evredeki hastalar ise sistemik ve kemoembolizasyon tedavisini gerektirir. Vakaların %50'sinden fazlasına ileri evrede tanı konması nedeniyle HCC'li hastalar için çoğunlukla uygulanan tedavi yöntemi sistemiktir. Buna ek olarak, ana tümörü cerrahi olarak çıkarılan kişilerin yaklaşık %70'inde de hastalık nüksedebilir. Doğrudan karaciğere uygulanan tedavilerin mümkün olmadığı veya nüksün görüldüğü durumlarda sistemik tedavi seçilir (6).

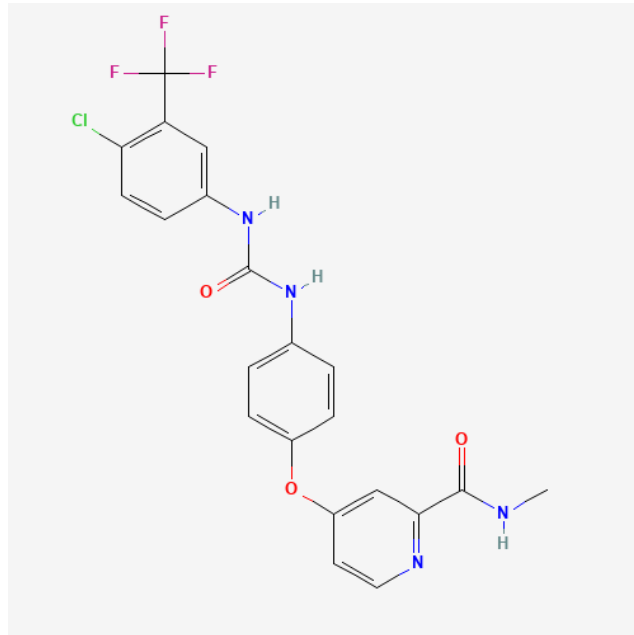
Sistemik tedavi, ileri evre HCC tedavisinin temelini oluşturur. İleri evre HCC'li hastalarda etkili sistemik tedavi, tümör boyutunun azalması, tümörle ilişkili semptomların iyileşmesi, yaşam kalitesinin artması ve sağ kalımın uzaması amacını taşır (37). Sorafenib, lenvatinib, donafenib, regorafenib, kabozantinib, ramusirumab, ve apatinib dahil olmak üzere çeşitli moleküler hedefli ajanlar, ileri evre HCC'ye karşı sistemik tedavilerin bel kemiği olmuştur (38). İleri evre HCC için onaylanan tedavilerin çoğu, immünoterapi, tirozin kinaz inhibitörleri ya da VEGF inhibitörlerini kapsar. Bu ajanların oluşturacağı sinerjiyi bulmak için klinik çalışmalarda birçok ilaç-ilaç, ilaç-immünoterapötik ajan birlikteliği de değerlendirilmeye devam edilmektedir (39).

2.3. Sorafenib ve Vismodegib İlaçları

Çalışma kapsamında HCC sistemik tedavisi için iki farklı yolak inhibitörü olan sorafenib ve vismodegib ilaçları seçilmiştir. Bu ilaçların sinerjik etkisinin irdelenmesi ve etkinliğinin artırılıp yan etkilerinin azaltılması amacıyla da bir taşıma sistemine yüklenmesi planlanmıştır.

2.3.1. Sorafenib

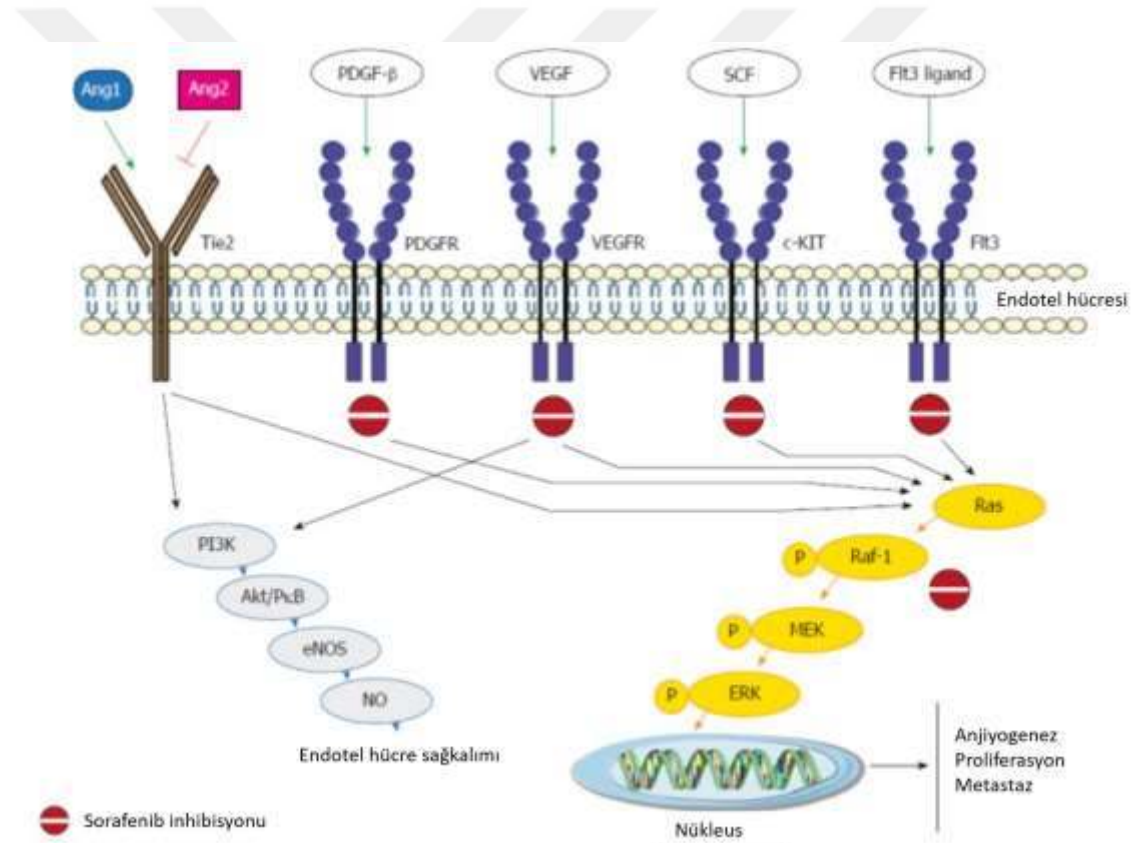
Sorafenib, 2006 yılında FDA (“U.S. Food and Drug Administration”) tarafından ileri evre renal hücreli karsinom tedavisi için, 2007 yılında ise ileri evre HCC tedavisi için tek yolak hedefli ilaç olarak onaylanmıştır (40). HCC için onaylandığı tarihten itibaren, ileri evre, rezeke edilemeyen HCC hastalarının birinci basamak tedavisinde kullanımı küresel olarak kabul edilmiştir ve 2017’ye kadar birinci basamak tedavide kullanılan tek ilaçtır(7),(41),(42). Sorafenibin onaylanmasından önce, rezeke edilemeyen ya da ileri metastatik HCC’li hastalar için dünya çapında onaylanmış sistemik bir tedavi bulunmamaktaydı (43). Nexavar® (Bayer) olarak da bilinen sorafenib, oral olarak uygulanan bir multikinaz inhibitörüdür. Uluslararası çok merkezli randomize kontrollü faz III çalışması olan SHARP (Sorafenib HCC Değerlendirme Rastgele Protokolü) çalışması, günde iki kez 400 mg sorafenib tedavisi uygulanan ileri evre HCC hastalarının plasebo grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı şekilde daha yüksek bir medyan sağkalıma (10,7’ye karşı 7,9 ay; P=0,0006) sahip olduğunu göstermiştir. Başka bir faz III çift kör, randomize, kontrollü klinik çalışması, sorafenibin ileri HCC hastalarının sağkalım süresini 2,3 ay uzatabileceğini göstermiştir. Bu çalışmalar sonrası sorafenib, ileri evre HCC sistemik tedavisinde birinci basamak olarak onay almıştır (44).



Şekil 2.4. Sorafenibin kimyasal yapısı (PubChem) (45).

Kimyasal yapısı şekil 2.4’te görülen sorafenib, kimyasal olarak 4-[4-[[4-kloro-3-(triflorometil) fenil] karbamoiloamino] fenoksi]-N-metilpiridin-2-karboksamid olarak adlandırılan, $C_{21}H_{16}ClF_3N_4O_3$ kapalı formüle sahip, 464,8 g/mol moleküler ağırlıklı, hidrofobik bir bileşiktir (45).

Sorafenibin ileri evre HCC hastalarında anjiyogenez ve proliferasyonu inhibe ederek etki gösterdiği belirtilmektedir (46). Sorafenib, anjiyogenezle ilişkili reseptörleri (VEGFR, PDGFR, hepatosit faktör reseptörü (c-Kit) ve Fms benzeri tirozin kinaz (Flt-3)) ve MAPK/ERK kinaz proliferasyon yolunun önemli bir bileşenleri olan Raf-1, B-Raf ve kinazları inhibe ederek etki gösteren küçük moleküldür (Şekil 2.5) (41),(47).



Şekil 2.5. Sorafenib etki mekanizması. Ang: Anjiyopoietin, Tie2: Tirozin-protein kinaz reseptörü, PDGFR: Platelet kaynaklı büyüme faktörü reseptörü, VEGFR: Vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü; SCF: Kök hücre faktörü; PI3K: Fosfatidil İnositol 3-Kinaz, Akt/PKB: Protein-kinaz B, eNOS: Endotelial nitrik oksit sentaz, NO: Nitrik oksit, P: Fosforile, MEK: Mitojenle aktive olan protein kinaz kinazı, ERK: Ekstraselüler sinyalle düzenlenen kinaz (41).

Sorafenible HCC tedavisi için onaylanan standart doz, günde iki kez 400 mg'dır (800 mg/gün). Ancak tedavi maliyetlerini düşürmek ve etkinliği azaltmadan toksisiteyi

kontrol altında tutmak için hastaların daha düşük bir başlangıç dozuyla tedavi edilmesi düşünülmektedir (42). Retrospektif bir çalışmada sorafenibin standart dozuyla tedavi edilen hastalara (medyan 276 tablet) kıyasla, yan etkilerden dolayı daha düşük dozla tedavi edilen hastalarda (medyan 180 tablet), genel sağ kalım oranı daha düşük bulunmamakla birlikte tedavi maliyetlerinin ve yan etkilerin azaltıldığı ifade edilmektedir (48).

Sorafenib hastalarda birçok klinik fayda göstermiş olsa da yan etkileri göz ardı edilemez durumdadır. Sorafenibin hedefleri olan hem VEGFR yolu hem de Raf kinaz birçok organda fizyolojik işlev ve homeostaz açısından önemlidir. Bu sinyal yollarının inhibisyonu terapötik etkinliğin yanı sıra ihmal edilemeyecek bir toksisiteye de yol açmaktadır (49). HCC hastalarında sorafenib ile ilişkili olduğu düşünülen en yaygın yan etkiler, yorgunluk, kilo kaybı, döküntü/soyulma, el-ayak sendromu, alopesi, ishal, iştahsızlık, mide bulantısı ve karın ağrısıdır. Sorafenibin yaygın diğer yan etkileri arasında ise hipertansiyon, duyuşal nöropati, ağrı, kaşıntı, kuru cilt, hipoalbuminemi, hipofosfatemi, ishal, lipaz artışı, amilaz artışı, karın ağrısı, anoreksi, kusma, kabızlık, kas ağrısı, güçsüzlük, dispne, öksürük ve kanama bulunur. Sorafenib kullanımına bağlı olduğu belirtilen laboratuvar değerlerindeki anormallikler arasında da lenfopeni, trombositopeni, nötropeni ve lökopeni yer almaktadır (10),(50).

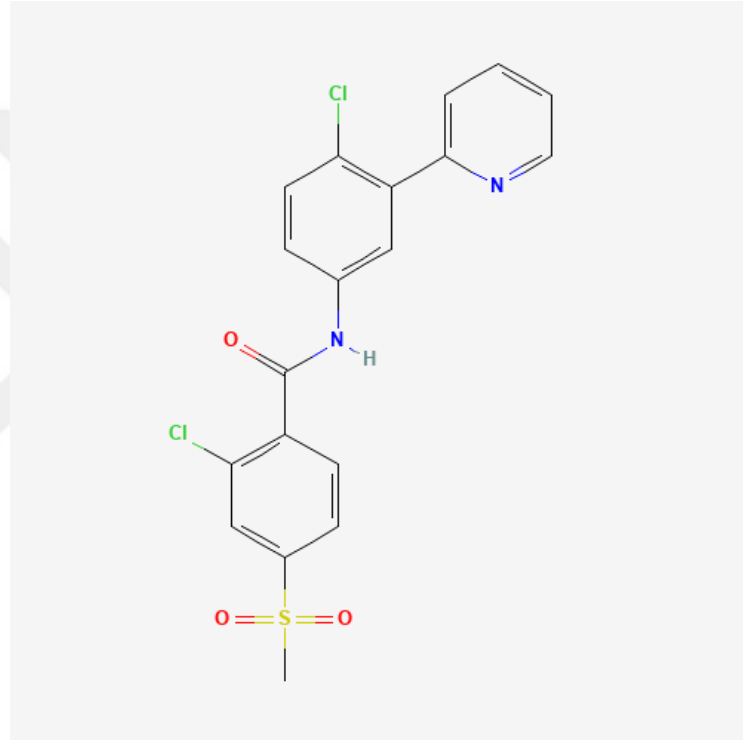
Sorafenib maruziyetinin HCC hastalarında çeşitlik biyolojik süreçler sonucu ilaç direncine de neden olduğu belirtilmektedir. Araştırmacılar, sorafenib direnci problemini aşmak için sorafenible birleşik tedavileri araştırma ihtiyacı duymuşlardır. Bu amaçla sorafenibin hem çeşitli kemoterapötiklerle hem kendisi gibi yolak hedefli ajanlarla hem de immünoterapötiklerle birlikte etkinliğini incelemişlerdir. Yukarıda belirtilen moleküllerin sorafenible birlikteliğinin daha etkili bir sağ kalım sonucu elde edilmesinde ve ilaç direncinin aşılmasında olası olduğu belirtilmektedir (46),(51).

Sorafenib kullanımın dezavantajları arasında söz konusu yan etkilerinin varlığı, ilaç direnci sorunu, suda çözünürlüğünün azlığı, oral alımı nedeniyle düşük biyoyararlanıma sahip olması gibi nedenler bulunmaktadır. Araştırmacılar, bu sorunların üstesinden gelebilmek için sorafenibin ilaç taşıma sistemlerine yüklenmesi ile tedavi etkinliğini üzerinde çalışmalar yapmaktadırlar. Bu amaçla çeşitli hedefleme stratejilerine göre tasarlanan, polimer, lipit, silika ve metal nanopartiküller gibi çeşitli nanopartiküller

ile karaciğer kanserinin tedavisinde sorafenibin terapötik etkinliğinin artırılıp yan etkilerinin düşürüldüğü belirtilmektedir (52), (53).

2.3.2. Vismodegib

Erivedge (Curis/Genentech) olarak da bilinen vismodegib, 2012 yılında bazal hücreli karsinom (BCC) tedavisi için FDA tarafından onaylanmış “Hedgehog” (Hh) sinyal yolağının küçük molekülü bir inhibitörüdür (54).



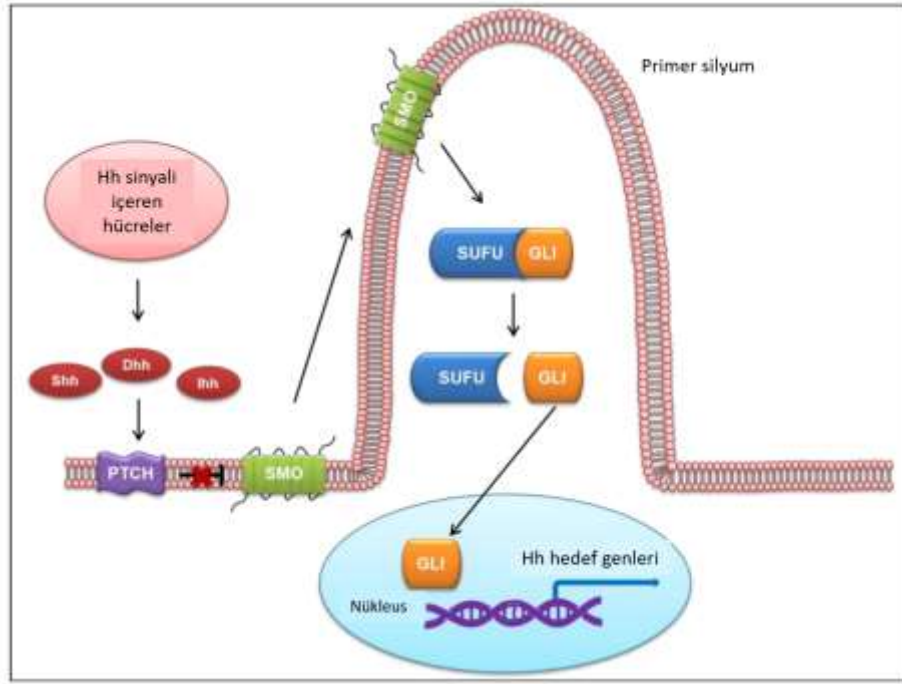
Şekil 2.6. Vismodegibin kimyasal yapısı (PubChem) (55).

Yapısı şekil 2.6’da görülen vismodegib kimyasal olarak 2-kloro-N-(4-kloro-3-piridin-2-ilfenil)-4-metilsülfonilbenzamid şeklinde adlandırılan, $C_{19}H_{14}Cl_2N_2O_3S$ kapalı formülüne sahip, 421,3 g/mol molekül ağırlığına sahip, hidrofobik bir bileşiktir (55).

Smoothened (SMO) reseptöre bağlanarak Hh yolağı antagonisti olarak etki gösteren vismodegib, Hh yolunun anormal aktivasyonunu inhibe eder. Hh sinyal yolağı, gelişmekte olan embriyoda hücre çoğalması, farklılaşması, apoptoz ve kendini yenilemesinin temel düzenleyicisidir. Gelişim sonrası Hh sinyal yolağı, saç, deri ve kök

hücreler haricindeki tüm normal hücrelerde inaktiftir (8). Ancak bu yolağın anormal aktivasyonu, BCC, medulloblastoma, meme kanseri, akciğer kanseri gibi çeşitli kanser türlerinde gösterilmiştir. Kanser hücrelerinin çoğalması ile birlikte kanser kök hücrelerinin büyümesini ve metastazı düzenleyen Hh yolağı aktivasyonunun, kanserlerin ilerlemesini yönlendirdiği belirtilmektedir. Bu nedenle son zamanlarda Hh sinyal yolağı, kanser tedavisinde en yoğun araştırılan hedeflerden biri haline gelmiştir (9),(56).

İnsanlarda, Hh yolağı birkaç ana bileşene sahiptir: (1) Hh ligandları (Omurgalılarda, “Sonic Hedgehog” (Shh), “Desert Hedgehog” (Dhh) ve “Indian Hedgehog” (Ihh) olmak üzere üç ekstraselüler Hh ligandı tanımlanmıştır.), (2) “Patched” reseptör (Ptch), (3) G-protein-bağımlı reseptör (GPCR) benzeri bir reseptör olan “Smoothened” reseptör (Smo) ve (4) Gli1, Gli2 ve Gli3 (glioma ile ilişkili onkogen) transkripsiyon faktörleri. Hh ligandı olmadığında Ptch, Smo'nun aktivitesini inhibe ederek yolak inhibisyonuna neden olur. Hh ligandı Ptch'ye bağlandığında, Smo'nun inhibisyonu kaldırılarak sinyal iletimi etkinleştirilmiş olur. Hh ligandının Ptch'ye bağlanması üzerine Smo, bir silyumun ucuna göç eder ve Gli-SUFU (“suppressor of fused”, kaynaşmış baskılayıcı) serbestleşmesi için sinyali gönderir. Gli transkripsiyon faktörlerinin aracılık etmesiyle de transkripsiyonel yanıt ortaya çıkar (şekil 2.7) (9),(56),(57).



Şekil 2.7. Hh sinyal iletimi (9) .

Hh yolağının karaciğer organogenezinde ve hepatik doku onarımında önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Ptch1'in HCC dokusunda, çevredeki neoplazik olmayan karaciğer dokusuna kıyasla aşırı ekspresyon gösterdiği bulundu. Ayrıca, Smo ve Gli1'in artan ekspresyonunun doğrudan HCC'nin büyük tümör boyutuyla ilişkili olduğu ifade edilmektedir (57). HCC'nin invaziv davranışının, Gli1/2'nin ifadesini kısmen baskılayan bir Smo inhibitörüyle azaltılabileceği belirtilmiştir (58). Wang et al. bir Gli inhibitörü olan GANT-61'in, CD44 pozitif HCC'de sorafenib direncini tersine çevirmek için Hh sinyallemesini önemli ölçüde baskıladığı belirtilmiş ve Hh yolağının HCC ilaç direncini etkileyebileceğini ortaya koymuştur (59). Tümör metastazı, kemoterapi direnci, kötü prognoz, düşük genel sağ kalım ve karaciğer nakli sonrası nüksün görüldüğü HCC hastalarında, sıklıkla Hh yolağı bileşenlerinin aşırı ekspresyonu görülmektedir. Hh yolağı bileşenlerinin HCC hücre hatları HepG2 ve Hep3B'de de aşırı ifade edildiği ortaya konmuştur. Ayrıca Hh yolağının apoptozu inhibe ettiği ve HCC hücrelerinin çoğalmasını, invazyonunu ve göçünü teşvik ettiği doğrulanmıştır. Smo inhibitörlerinin ise HCC'de tümör boyutunu küçülttüğü, anjiyogenezi ve metastazı engellediği ve radyosensitiviteyi artırdığı bildirilmiştir (60). Hu et al. (61), HCC tedavisinde birinci basamak tedavilerden biri olan lenvatinib ile bir Smo inhibitörünü (GANT61) beraber kullanmanın, lenvatinib

direnci ile ilişkili CD133 pozitif HCC hücrelerinde ilaç direncini tersine çevirmede etkili olduğunu bu nedenle HCC hastalarında Hh yolacağını hedeflemenin önemli olabileceğini belirtmişlerdir.

Vismodegib de kanser tedavisinde kullanılan diğer ilaçlar gibi pek çok yan etkiye neden olmaktadır. Bunlar kas spazmları, saç dökülmesi, dizguzi (tat alma bozukluğu), kilo kaybı, yorgunluk, mide bulantısı, iştahsızlık ve ishaldir (8). Vismodegibin yan etkilerinin azaltılıp tedavi etkinliğinin artırılması amacıyla taşıma sistemlerine yüklendiği çalışmalar da literatürde yerini almaktadır (62),(63),(64).

2.4. İlaç Taşıma Sistemleri

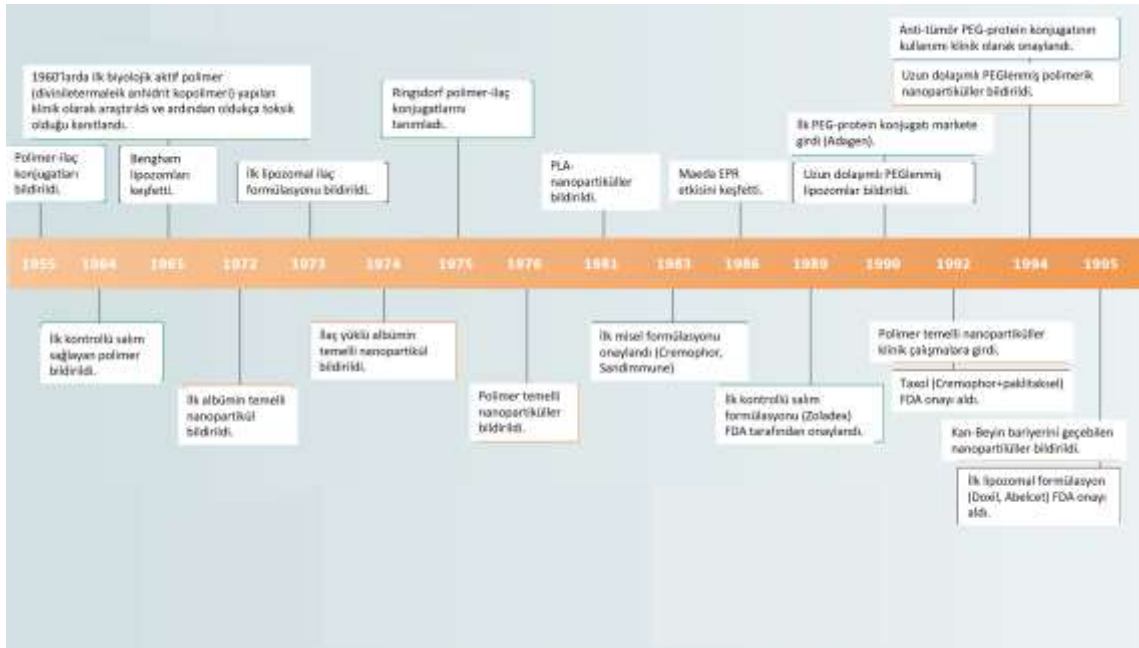
Kanser tedavisinde geleneksel yaklaşımlar, kemoterapötiklerin başta intravenöz olmak üzere diğer uygulama yöntemleriyle vücuda verilmesini içerir. Bu uygulama yöntemleri ile sitotoksik ilaçlar, sistemik dolaşıma dahil olarak özgül olmayan dağılım ve ilaç dirençlerinin oluşması gibi çeşitli sınırlamalara yol açar. Ancak son yıllarda, ilaç iletiminde, ilaç taşıma sistemlerinin oluşturulması gibi önemli teknolojik ilerlemeler yaşanmıştır.

İlaç taşıma, bir ilacın ya da farmakolojik olarak aktif bir maddenin, bir hastalığı tedavi etmek amacıyla hedef hücreye taşınmasını sağlayan yaklaşım olarak tanımlanabilir. İlacın bir nanotaşıyıcıya dahil edilmesi, ilacın hedefli ve sürekli taşınması için etkili yöntemlerden biridir. 1-1000 nm boyut aralığına sahip nanopartiküller, ilaçların hedefli ve kontrollü salınımına olanak sağlamasından dolayı ilaç taşıma sistemi olarak büyük umut vaat etmektedir. Nanopartiküler ilaç taşıma sistemleri ile ilaç tedavilerinin etkinliğinin artırılması ve yan etkilerinin azaltılması sağlanır. İlaçların nanopartiküller içine kapsüllenmesinin yararları arasında bozulmadan korunması, dolaşımdaki yarı ömürlerini artırılması, immünojenitelerini azaltılması, doğrudan hedef bölgeye iletilmesi ve kontrollü bir şekilde serbest bırakılarak terapötik etkilerinin en üst düzeye çıkarılması sayılabilir. Nanopartiküllere dayalı ilaç taşıma sistemleri kullanılarak, ilacın salımının dozu ve zamanlaması kontrol edilebilir. Bu sayede kişiselleştirilmiş ve etkili tedavi de sağlanabilir (65),(66),(67). Özetle nanopartiküler ilaç taşıma sistemleri:

- İlaç direncini azaltır.
- Toksisiteyi azaltır.

- Biyoyararlanımı artırır.
- İlaç çözünürlüğünü artırır.
- İlacın ve formülasyonun stabilitesini artırır.
- İlaç hedefleme yeteneğini artırır.
- Hasta refahını artırır.
- Gereken dozu azaltır (11).

İlaç taşıma sistemleri lipit temelli, inorganik yapılı ya da polimerik olabilir (68). Lipit temelli taşıma sistemlerini temelde lipozomlar, katı lipit nanopartiküller ve nanoyapılı lipit taşıyıcılar oluşturur (69). İnorganik yapılar, karbon nanotüpler, metal nanopartiküller (NP'ler), gümüş bazlı NP'ler, altın bazlı NP'ler, manyetik NP'ler, ZnO NP'ler, bakır oksit NP'ler olarak sıralanabilir (70). Polimerik nanopartiküller genel çatısı altında ise kitosan, albümin, jelatin, kollajen, polilaktik asit, polilaktid ko-glikolik asit, polietilen glikol (PEG), polikaprolakton gibi doğal ya da sentetik polimerlerden oluşturulmak üzere polimerik nanopartiküller, polimerik veziküller, miseller ve dendrimerler olarak üretilebilir (71).



Şekil 2.8. Nanopartiküler taşıma sistemlerinin tarihsel gelişimi (67).

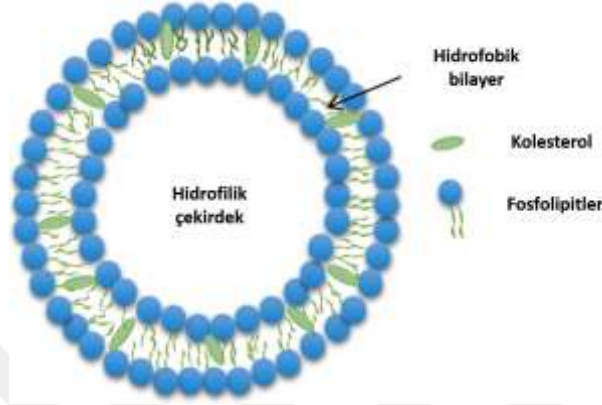
Nanopartiküler ilaç taşıma sistemlerinin tarihsel gelişiminin ilk FDA onayı alan nanopartiküler ilaç taşıma sistemine (Doxil®) kadar olan zaman dilimi şekil 2.8’de özetlenmiştir. İlk nanopartiküler ilaç taşıma sistemleri lipozomlar ve polimer-ilâç konjugatları olarak karşımıza çıkmaktadır. Polimer-ilâç konjugatları kapsamlı bir şekilde araştırılmış ve birçoğu kullanım onayı almıştır. Proteinlerin çözünürlüğünü ve plazma stabilitesini artırabilen ve immünojeniteyi azaltabilen PEG, polimer-ilâç konjugatı uygulamalarında bugüne kadar en çok çalışılan polimer olmuştur. 1994 yılında, PEG-L-asparaginaz (Oncospar; Enzon), akut lenfositik lösemi tedavisi için FDA onayı almıştır (67). İlaç taşıma sistemleri arasında, lipozomlar gibi lipit bazlı sistemler, kanser tedavisi için FDA tarafından onaylanan toplam nanofarmasötiklerin önemli bir kısmını oluşturmaktadır. 2022’ye dek FDA onayı alan ilaç taşıma sistemlerinin %56’sı lipit bazlı nanoformülasyonlar, %38’i protein bazlı ve %6’sı metal bazlı nanoformülasyonlar olarak yer almaktadır (72). Lipid bazlı ilaç dağıtım sistemleri ve kanser nanomedikal uygulamaları için önemli bir dönüm noktası, 1995 yılında Doxil®’in klinik onayının alınmasıydı. Doxil®, meme ve yumurtalık kanseri gibi solid tümörleri tedavi etmek için FDA tarafından onaylanan ilk nanoilaç olarak doksorubisin (DOX) içeren PEG ile kaplı bir lipozomal formülasyondur. PEG’lenmiş lipozomal doksorubisin olan Doxil®, serbest DOX’a göre daha düşük kardiyotoksisite riski, daha uzun plazma tutulum süresi ve artırılmış geçirgenlik ve tutulma (EPR) etkisi sayesinde pasif tümör hedeflemesi gibi çeşitli avantajlar sağlamaktadır (73).

Nanopartiküler ilaç taşıma sistemleri çeşitli yapılardan, pek çok sentezleme yöntemiyle sentezlenebilme, birden fazla ilacın ya da terapötik molekülün aynı anda yüklenebilmesi gibi pek çok türevlendirilebilme özelliklerine sahip olma ve aynı zamanda kontrollü salım ve artırılmış tedavi etkinliği ile azaltılmış yan etkiler gibi avantajlar getirmelerinden dolayı kanser tedavileri için araştırılmaya ve kullanılmaya devam edilmektedir (74).

2.4.1. Lipozomlar

Lipozomlar ilk olarak 1960’larda İngiliz bilim insanı Alec Bangham tarafından keşfedilen ve daha sonra en yaygın ilaç taşıma sistemlerinden biri haline gelen nano yapıları sistemlerdir (12). Lipozomlar, kolesterol ve amfifilik doğal ya da sentetik fosfolipitlerden oluşan, boyutları 20 nm ile 2,5 µm arasında değişen çift katmanlı veziküllerdir (Şekil 2.9).

Amfifilik karakterleri sayesinde hem hidrofilik hem de hidrofobik bileşiklerin içlerine yüklenmesini mümkün kılarlar. Lipozomların özellikleri, sentez yöntemine, lipidlerin türüne, bileşimine ve oranına göre farklılık gösterebilmektedir (75).



Şekil 2.9. Lipozom yapısı (12).

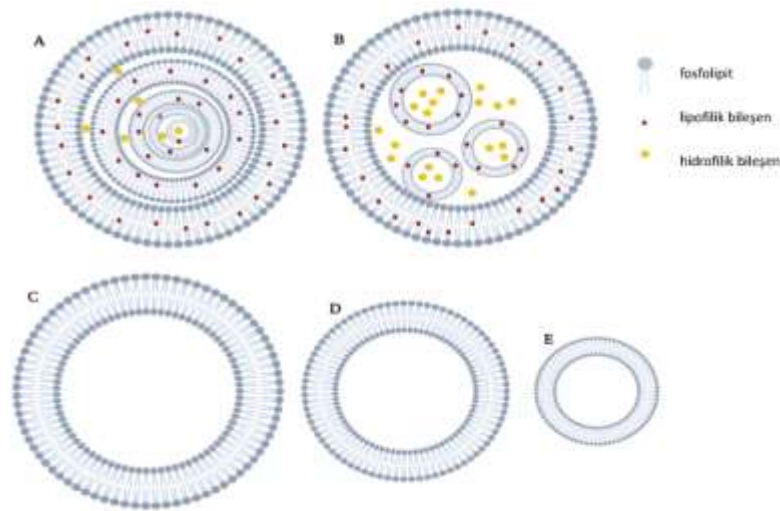
Fosfolipid çift katmanlı yapıları nedeniyle ilaç taşıyıcıları olarak lipozomlar, hedefli taşıma, yüksek biyouyumluluk, biyobozunurluk, kolay işlevselleştirme, düşük toksisite ve immünojenite gibi belirgin özellikler gösterir. Bu özellikler nedeniyle ilaçların salım sürekliliğini sağlayabilir ve terapötik indeksini büyük ölçüde artırabilir (76).

Lipozomların temel yapı taşları olan amfifilik karakterdeki fosfolipidlerin apolar yağ asidi zincirleri ve polar baş grupları, sulu ortamda kendi kendilerine bir araya gelirler. Polar fosfat grupları sulu ortamdaki su molekülleriyle etkileşime girdikçe hidrofobik kuyruklar birbirlerine doğru yönelmeye başlar. Bu yönelme ile lipozom oluşumu gerçekleşir. Sonikasyon, homojenizasyon gibi yöntemlerle termodinamik olarak enerji girdisine ihtiyaç duyulan lipozom oluşumunda, lipidler, sulu ortamda kararlı ve minimum yüzey gerilimine sahip bu vezikülleri oluşturma eğilimindedir (75),(76).

Fosfolipitler ve kolesterol, lipozomları oluşturan temel bileşenlerdir (77). En sık kullanılan fosfolipit fosfatidilkolin olmakla birlikte fosfatidil etanolamin, fosfatidil serin, fosfatidil inositol de kullanılabilir (78). Bu fosfolipitler normal hücrelerin zar yapısının bir bileşeni olduğundan, esas olarak yumurta sarısı ve soya fasulyesinden elde edilebilirler. Doğal fosfolipitlerdeki yağ asidi bileşeni, palmitik asit, stearik asit, oleik

asit, linoleik asit ve araşidonik asit olabilir. Doğal fosfolipitlere ek olarak sentetik fosfolipitler de lipozom sentezinde sıklıkla kullanılmaktadır. Bunlara örnek olarak 1,2-distearoil-sn-glisero-3-fosfoetanolamin (DSPE), 1,2-distearoil-sn-glisero-3-fosfokolin (DSPC) 1,2-dipalmitoil-sn-glisero-3-fosfokolin (DPPC), 1,2-dipalmitoil-sn-glisero-3-fosfoetanolamin (DPPE), 1,2-dioleoil-sn-glisero-3-fosfoetanolamin (DOPE), 1,2-dioleoil-3-trimetilamonyum-propan (DOTAP), 1,2-dioleoil-sn-glisero-3-fosfokolin (DOPC), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glisero-3-fosfokolin (POPC) verilebilir (12),(75). Kolesterol kullanımı, lipozom oluşumunda fosfolipit paketlenmesini ve bilayer oluşumunu desteklemekte, membran akışkanlığını azaltmakta, kan ve plazma gibi biyolojik sıvılarda bilayer kararlılığını iyileştirmektedir (76).

Lipozomlar yapılarına göre küçük tek katmanlı veziküller (SUV <100 nm), büyük tek katmanlı veziküller (LUV >100 nm), dev tek katmanlı veziküller (GUV >1 µm), çok katmanlı vezikül (MLV >0,5 µm) ve çok veziküllü veziküller (MVV >1 µm) olarak sınıflandırılırlar (Şekil 2.10). Lipozomların enkapsülasyon verimliliği, lipozom boyutuyla artmakla birlikte hidrofilik bileşikler için çift katman sayısına bağlı olarak azalır (12),(75). Lipozom nanoformülasyonlarının boyutu (biyomedikal uygulamalar için tercihen 50 ila 500 nm arasında değişir) ilaç iletim süreçlerini etkilemektedir. 100-150 nm aralığındaki çaplara sahip lipozomların hücre içine alımı desteklenir ve hastalığa sahip dokulardaki kan damarlarından kaçıp tümör içine girebilirler (79).

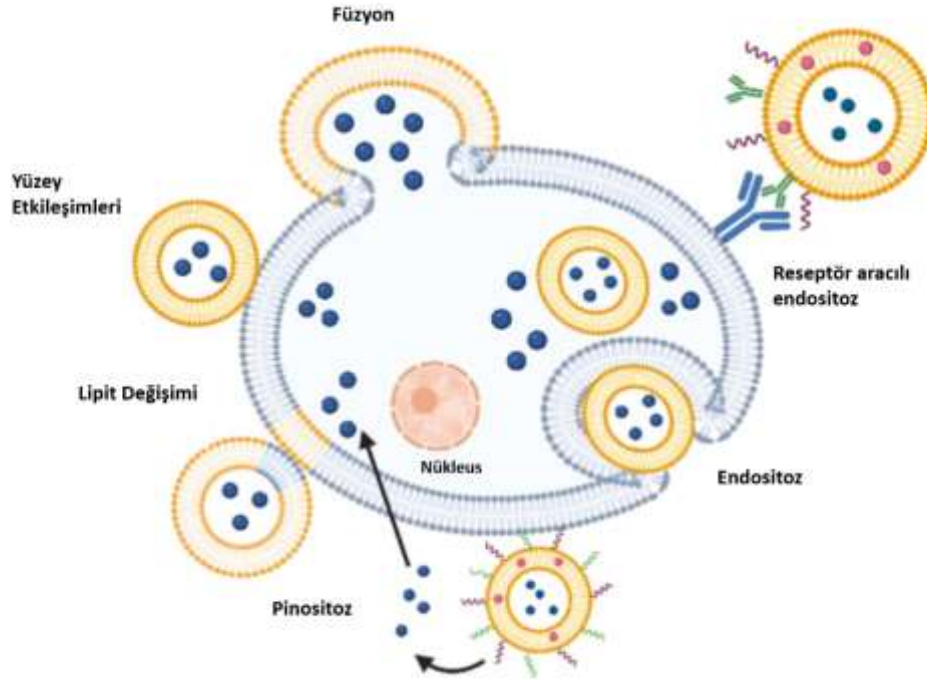


Şekil 2.10. Yapılarına göre lipozom çeşitleri. A) Çok katmanlı veziküller (MLV), B) Çok veziküllü veziküller (MVV), C) Dev tek katmanlı veziküller (GUV), D) Büyük tek katmanlı veziküller (LUV), E) Küçük tek katmanlı veziküller (SUV) (75).

Lipozomlar, bileşimlerine ve uygulama biçimlerine göre; geleneksel lipozomlar, yüklü lipozomlar, gizli (“stealth”) lipozomlar, aktif olarak hedeflenen lipozomlar, uyarıya duyarlı lipozomlar ve kabarcık lipozomlar olarak da sınıflandırılabilir (12).

Geleneksel lipozomlar, geliştirilen ilk nesil lipozomlardır. Bunlar, katyonik, anyonik ya da nötr fosfolipitlerden ve kolesterolden oluşan bir lipit çift katmanından oluşur. Lipozom kararlılığını ve kanda dolaşım sürelerini artırmak için sterik olarak kararlı lipozomlar oluşturulmuştur. Gizli lipozomlar olarak adlandırılan bu lipozomların elde edilmesinde hidrofilik bir polimer olan PEG’in en uygun seçim olduğu gösterilmiştir (80),(81). Anyonik ve katyonik lipozomları hazırlamak için genellikle sırasıyla oleik asit ve DOTAP kullanılır. Yüklü parçacıkların birbirini itmesi nedeniyle kümelenme eğilimlerinin azalmasından dolayı yüklü lipozomların saklanması sırasında daha yüksek kararlılık gösterdiği belirtilmektedir (12). Lipozomlar da diğer nanopartiküller gibi özel ligandlarla modifiye edilip aktif olarak hedeflendirilebilir, uyarıya duyarlı ya da içine gaz yüklenerek kabarcık lipozomlar biçiminde tasarlanabilir (82),(83),(84).

Hücre zar yapısına benzerliği ve küçük boyutları, lipozomları, hücre içine ilaç iletiminde avantajlı hale getirmektedir. Lipozomlar taşıdıkları etken maddelerin iletimi için hücrelerle dört ana mekanizma ile etkileşime girebilirler (şekil 2.11): (a) hücre yüzeyi bileşenleri ile özgün etkileşimler, (b) fagositik hücrelerce endositoz, (c) lipozomlardan plazma membranına lipitlerin eklenmesiyle füzyon, ardından lipozomal içeriğin sitoplazmaya salınması (d) lipozomların çift katmanlı bileşenlerinin hücre membranı bileşenleriyle değişimi. Bu mekanizmalardan birden fazlası aynı anda gerçekleşebilir. Nötr, anyonik ve uyarıya duyarlı lipozomlar genellikle endositoz yoluyla hücrelere alınırlar. Öte yandan, katyonik lipozomların ilaçları hücrelere iletmek için membran füzyonu ve endositozu kullandıkları bildirilmiştir. PEG’lenmiş lipozomlar içeriklerini kontrollü olarak hücre dışı sıvıya bırakır. Ardından etken madde difüzyon ya da pinositoz yoluyla hücrelere girer. Son olarak, ligandla hedeflenmiş lipozomlar, reseptör aracılı endositoz yoluyla hücreye girer (85),(86).



Şekil 2.11. Lipozom-hücre etkileşimleri (85).

Ticari olarak kullanımda olan birçok lipozomal ürün bulunmaktadır ve daha fazlası da klinik geliştirme aşamasındadır. Doxil® (Caelyx®) 1995 yılında Sequus Pharmaceuticals tarafından piyasaya sunulmuştur. Doxil®, Kaposi sarkomunun tedavisi için tasarlanmış PEG kaplı doksorubisin lipozomu olarak tasarlanmıştır. LipoDox®, 2012 yılında Sun Pharma tarafından üretilen DOX'u kapsülleyen FDA onaylı bir başka PEG'lenmiş lipozomal formülasyondur. Daunorubisin, akut miyeloid lösemiye (AML) tedavi etmek için lipozomlara yüklenen ikinci antrasiklin antineoplastik ilaç olarak DaunoXome® adıyla yer almıştır. Myocet®, daha kısa dolaşım yarı ömrü ve daha az kardiyak yan etki gösteren DOX içeren PEG'lenmemiş bir lipozomal formülasyondur. CPX-351 olarak da bilinen Vyxeos®, sitarabin ve daunorubisin ilaçlarını birlikte içeren lipozomal formülasyondur. Bu formülasyon, artırılmış etkinlik sağlamış, yan etkiler ise azalmıştır (12),(75),(76). Bunların yanı sıra antifungal etkinlik gösteren (amfoterisin B içeren Ambisome®) ya da ağrı kesici olarak sürekli salıma sahip (DepoFoam™ isimli morfin formülasyonu) lipozomal formülasyonlar da bulunmaktadır (12).

2.4.1.1. Lipozom Hazırlama Yöntemleri

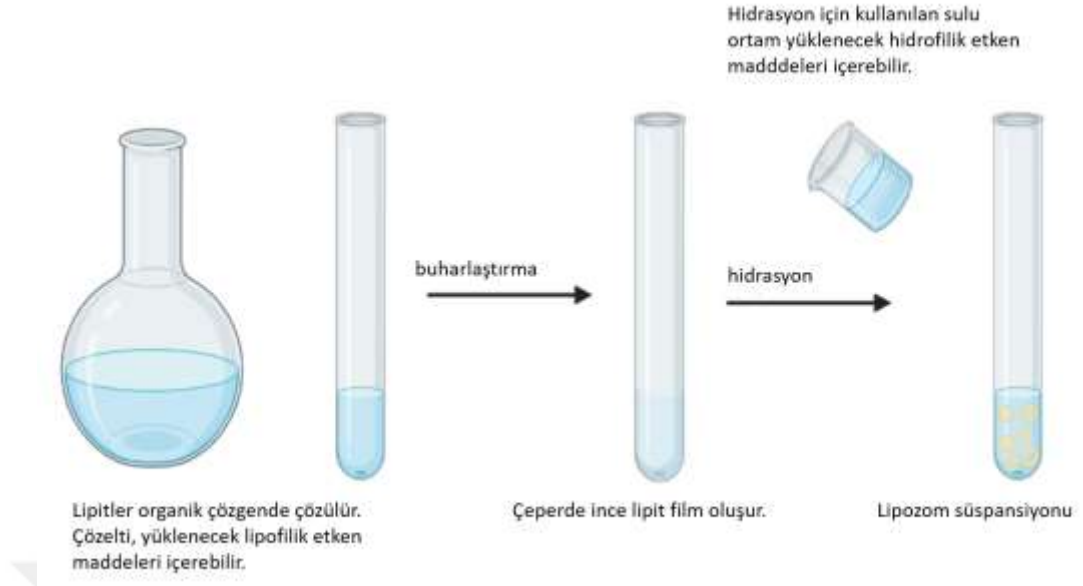
Lipozom nanoformülasyonu oluşturma yöntemlerinin temel hedefi, tek boyutlu (“monodisperse”) parçacıkların (dar boyut dağılımına sahip) oluşturulmasıdır. Geleneksel lipozom hazırlama yöntemlerinin temel aşamaları şu şekilde sıralanabilir:

- Lipitlerin organik bir çözücünde çözülmesi,
- Organik çözücüyle elde edilen lipit çözeltisinin kurutulması,
- Lipitin sulu bir ortamla ıslatılması,
- Küçültme ya da katmanlarda değişiklik,
- Oluşum sonrası saflaştırma, sterilizasyon gibi işlemler,
- Son nanoformülasyon ürününün karakterizasyonu (79),(87).

Lipozom oluşumunda çeşitli teknikler kullanılmakla birlikte en sık kullanılan ve bizim de tez çalışmasında kullandığımız yöntem ince film hidrasyon yöntemidir. Bunun dışında kullanılan geleneksel yöntemler ters-faz evaporasyon, etanol-eter enjeksiyon, deterjan uzaklaştırma, dehidrasyon-rehidrasyon, dondurma-çözme, Fransız basınçlı hücre presi yöntemleridir (77),(79),(81). Geleneksel yöntemlerin boyut ve katman kontrolünde ek süreçlere ihtiyaç duyuyor olması nedeniyle mikroakışkan tekniği de lipozom eldesinde kullanılabilir (88).

İnce Film Hidrasyon Yöntemi

İnce film hidrasyon tekniği (Bangham yöntemi olarak da adlandırılır.) MLV'lerin hazırlanmasında kullanılan en eski, en yaygın ve en basit yöntemdir. Homojen bir karışım sağlamak için lipit bileşenleri bir organik çözücünde (diklorometan, kloroform, etanol ya da kloroform-metanol karışımı gibi) çözülür. Ardından, 45–60 °C sıcaklıkta vakum pompası altında buharlaştırma ile organik çözücünün uzaklaştırılması sağlanır. Organik çözücünün uzaklaştırılması küçük hacimlerde, nitrojen ya da argon gazı aracılığıyla, daha büyük hacimlerde genellikle döner buharlaştırıcı ile gerçekleştirilir. Organik çözücünün uzaklaştırılmasından sonra, homojen, kuru, ince bir lipit film oluşur. Son aşamada lipit film hidrasyonu, distile su ya da pH 7,4 PBS gibi uygun bir sulu çözelti ile yapılır. Hidrasyon işlemi (Yaklaşık 1-2 saat sürer.) genellikle 60-70 °C'lık sıcaklığın üzerinde bir sonikatör ya da homojenizatör varlığında gerçekleştirilir (Şekil 2.12) (79),(89).



Şekil 2.12. İnce film hidrasyon yöntemi ile lipozom oluşturulması (75).

Sonik prob kullanımı ve ekstrüzyon işlemi lipozomların boyut küçültmesi için en sık kullanılan yöntemlerdir. Ultrasonik dalgaların frekansı ve işlemin süresi üretilen lipozomların boyut dağılımı üzerinde etkilidir. SUV üretiminde sonikasyon, sentez sonrası işlemler arasında kolay ve kullanışlı olmasına rağmen, ekstrüzyonla üretilenlere kıyasla daha az homojen dağılıma sahip lipozom eldesiyle sonuçlanır (13). Ekstrüzyon yönteminde büyük boyutlardaki lipozomlar, polikarbonat membranlardan (50 nm'den 5 µm'ye kadar gözenek çapına sahip) ya da asimetrik seramik filtreden geçerek dar boyut dağılımına sahip daha küçük lipozomlar haline getirilirler. Bu şekilde MLV'lerden LUV'lar ve SUV'lar elde edilebilir. Boyut küçültmenin potansiyel mekanizması, MLV'lerin membran gözeneginin girişinde açılması ve membran geçişi sırasında yeniden düzenlenmesidir. Lipozomal katmanların boyutu ve yapısı, polikarbonat membranın gözenek boyutu, geçiş döngüsü sayısı, basınç ve akış hızı gibi kritik parametrelerden etkilenir (77). Ekstrüzyon yöntemleri ile lipozom boyutu küçültmenin yüksek tekrarlanabilirliğe sahip olması avantajının yanında, başlıca dezavantajı, büyük ölçekli üretimlerde ürün kayıplarının varlığıdır (79).

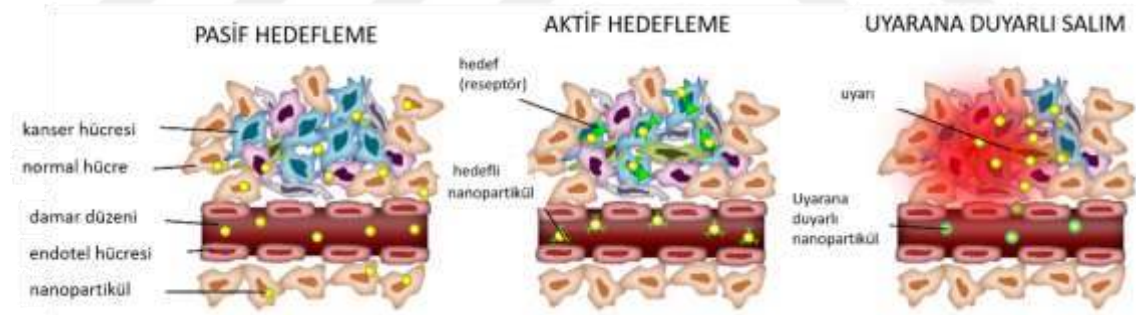
Etken maddeler lipozomlara pasif ya da aktif yükleme yaklaşımlarıyla yüklenebilir. Pasif yükleme yaklaşımında etken maddeler lipozomlara oluşturulma aşamasında yüklenir. Hidrofilik yapıdaki bir ilaç, lipozomun ortasındaki sulu boşlukta

kapsüllenebilir ya da lipofilik yapıdaki bir ilaç, ilaç molekülleri ve lipidler arasındaki, iyonik, elektrostatik, kovalent olmayan ya da sterik etkileşimler yoluyla lipozomların çift katmanına gömülebilir. Aktif yükleme yaklaşımı ise boş lipozomlar üretildikten sonra etken maddenin ya da diğer bir ifadeyle ilacın yüklenmesidir. Bu yaklaşımda pH ya da iyon derişimi gradyanı, ilacın lipozomların iç çekirdeğine doğru membrandan geçmesini sağlar (77).

Lipozomlara yüklenemeyen etken maddelerin uzaklaştırılmasında kullanılan başlıca teknikler arasında ultrafiltrasyon, ultrasantrifüjleme, diyaliz ve kromatografi (boyut dışlama, jel geçirgenliği veya iyon değişimi) yer almaktadır (79).

2.5. Nanopartiküler İlaç Hedefleme Stratejileri

Kanser tedavisindeki kısıtlılıklardan biri, normal dokularda ciddi yan etkilere yol açan terapötiklerin yetersiz hedeflenmesi olarak kabul edilmektedir. Bu sorunun aşılmasında bugün için pasif hedefleme, aktif hedefleme ve uyarıya duyarlı hedefleme olmak üzere üç temel hedefleme stratejisi kullanılmaktadır (Şekil 2.13) (90).



Şekil 2.13. Nanopartiküllerin hedefleme stratejileri (91).

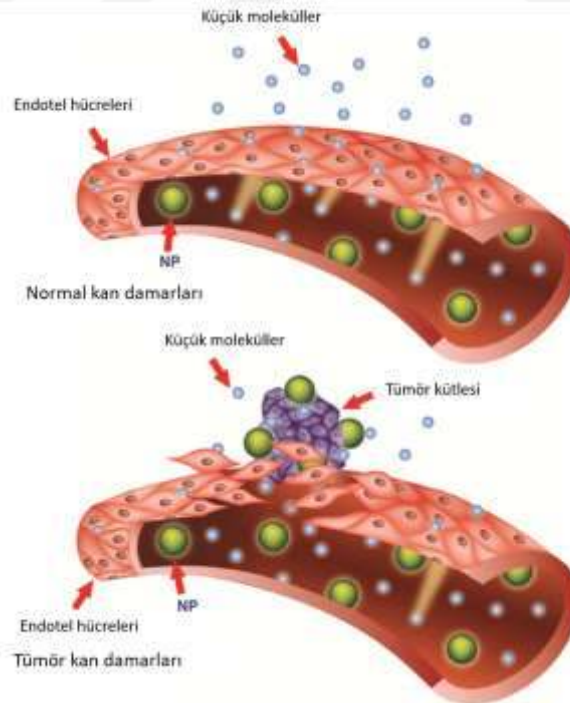
2.5.1. Pasif Hedefleme

Pasif hedefleme, tümör ortamına özgü, sağlıklı dokularda normalde bulunmayan ayırt edici özellikler nedeniyle nanosistemlerin tümör mikroçevresinde birikmesini kolaylaştırır. Pasif hedeflemede, nanopartiküller de dahil olmak üzere makromoleküller, artan geçirgenlik ve tutulma (EPR) etkisi sonucunda neoplazik dokularda birikir. EPR

etkisi, nanopartiküllerin boyut aralığı, neoplazik dokuların sızdıran damar yapısı ve bozulmuş lenfatik drenajına dayanmaktadır (92).

Normal damarlarla karşılaştırıldığında, tümör damarları bazal membran anormallikleri ve hızla çoğalan endotel hücrelerini kaplayan perisit sayısının azalması nedeniyle sızdırır. Bu, nanopartikülün vasküler duvardan tümör hücrelerini çevreleyen interstisyuma geçişi için artırılmış bir geçirgenlikle sonuçlanır (şekil 2.14). Tümör damarlarının gözenek boyutu, tümörlerin anatomik konumuna bağlı olarak 100 nm'den 1 μm 'ye kadar değişir; normal damarların sıkı endotel bağlantıları ise 5-10 nm boyutundadır.

Solid tümörler aynı zamanda bozulmuş bir lenf ağıyla da karakterize edilir. Lenf damarları vücudun her tarafına yayılmış olup, başlıca görevleri hücreler arası sıvıyı kan dolaşımına geri kazandırmaktır. Makromoleküller normalde lenf sistemi yoluyla dokulardan temizlenir. Ancak solid tümörlerde lenfatik drenaj eksikliğinden dolayı, makromoleküllerin temizlenmesi azalır. Bu sayede nanopartiküllerin de tümör interstisyumunda daha uzun süre kalabildiği ifade edilmektedir (93).

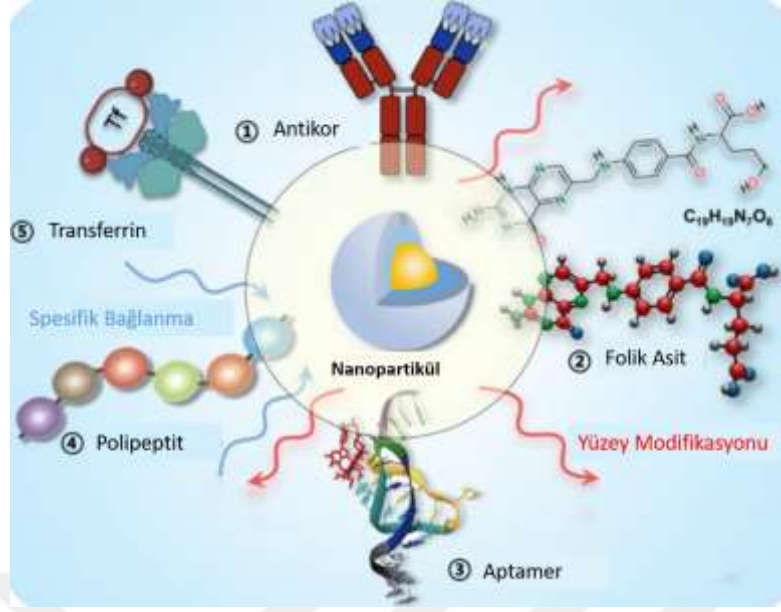


Şekil 2.14. Artan geçirgenlik ve tutulma (EPR) etkisi (94) .

EPR etkisi, kusurlu bazal membrana, bradikinin ve NO gibi geçirgenliği artırıcı faktörlerin katkısıyla oluşmuş büyük hücreler arası boşluklara sahip endotel hücrelerine, yüksek orandaki anjiyogeneze, yüksek vasküler geçirgenliğe ve düşük lenfatik direnaja sisteminin varlığına bağlıdır. EPR etkisi, tümörün yeri ve tipi, antikanser ajanların fiziksel ve kimyasal özellikleri, tümör seçiciliği, tümörlerdeki kan perfüzyonu gibi çeşitli faktörlerden etkilenmektedir (14). Tümör içinde ve farklı tümör tipleri arasında damarların geçirgenliği aynı olmayabilir. Tümör damarlarının gözenekliliği ve gözenek boyutu, tümör tipine, konak mikroçevresine, vasküler yapıya ve tümör olgunluğunun derecesine göre değişir. Bu durum EPR etkisinin nanopartikül hedeflemesinde kullanımına kısıtlamalar getirebilmektedir (93). Bununla birlikte pasif hedefleme, özgül ligand ve antikor kullanımını gerektirmemesi, daha az masraflı olması ve solid tümörlere karşı yüksek etkinliğe sahip olması nedeniyle aktif hedeflemeye göre önemli üstünlükler gösterir (14).

2.5.2. Aktif Hedefleme

Tümör hücrelerinin yüzeyinde çeşitli reseptörlerin varlığı, nanopartiküllerin onlara özel ligandlarla özelleştirilerek elde edilmesi sayesinde gerçekleşen özgün bağlanmayla aktif hedefli ilaç iletiminin gerçekleştirilmesini olası kılabılır (95). Tümör dokusunda pasif hedefleme ile nanopartiküllerin birikimi sonrası hücre içine alınması, nanopartiküllerin hedef hücrelerde aşırı ifade edilen reseptörlere ya da diğer yüzey membran proteinlerine aktif olarak hedeflenmesiyle sağlanabilir. Nanotaşıyıcıların yüzeyindeki ligandlar ile tümör hücreleri üzerinde ifade edilen reseptörler arasındaki özgün etkileşimler, reseptör aracılı endositozu tetikleyerek nanopartikül alımını kolaylaştırır. Antikorlar, aptamerler, peptitler ve proteinler (örneğin transferin) ve çeşitli reseptör ligandları (örneğin folik asit) dahil olmak üzere nanopartikülleri aktif olarak hedeflemek için çok sayıda hedefleme ligandı kullanılabilmektedir (Şekil 2.15) (96).



Şekil 2.15. Aktif hedefleme için nanopartiküllerin olası yüzey modifikasyonları (95).

2.5.3. Uyarıya Duyarlı Hedefleme

Uyarıya duyarlı ilaç taşıma sistemleri, EPR etkisi ile tümör dokusunda nanopartikülün birikmesi sonrası tümör içi ya da dışındaki çeşitli uyarıcı mekanizmalar aracılığıyla ilacın salınmasını ve tümör hücrelerine daha etkili biçimde nüfuz etmesini sağlar. Uyarıya duyarlı hedefleme amacıyla hazırlanan nanopartiküller, redoks, sıcaklık, pH değişimi, enzimler, manyetik alan, ışık, ultrason ya da elektriksel uyarı gibi çeşitli içsel ya da dışsal uyarılara yanıt olarak yapısal değişikliklere uğrayabilmelidir (97),(98).

Tümör mikroçevresinin asidik bir pH içerdiği bilinmektedir. pH'ye duyarlı bir ilaç taşıma sistemi, tümör hücrelerinin hafif asidik ortamında ilaç salımına yanıt verecek şekilde tasarlanabilir. Kanseri hücrelerinde matriks metalloproteinazlar, katepsin, hiyaluronidaz, tripsin, trombin, proteinaz K gibi bazı enzimlerin ekspresyonunda artış görülebilir. Kanseri hücrelerinde bu enzim seviyelerinin artışından faydalanılarak nanotaşıyıcılardan etken maddelerin kontrollü salımı, nanotaşıyıcıların fiziksel olarak parçalanması ya da taşıyıcı ile etken madde arasındaki bağların kırılması sağlanabilir (99),(100). Ayrıca manyetik alan gibi dışsal bir uyarı ile de etkili bir hedefleme gerçekleştirilebilir. Manyetik nanopartiküller kullanılarak dışardan uygulanan bir manyetik alanla ilacın tümör dokusunda birikimi artırılabilir. Uygulanan bu manyetik alan sayesinde manyetik nanopartiküller ilaç birikiminin yanı sıra hipertermi oluşumuyla da tedavi etkinliği sağlayabilir. Bununla birlikte içsel ve dışsal uyarıların beraberce

kullanımıyla birden fazla uyarana duyarlı ilaç taşıma sistemlerinin oluşturulması da olasıdır (95).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Gereçler

3.1.1. Çalışma Kapsamında Kullanılan Cihazlar

Vorteks (Boeco)

Etüv (Memmert)

Sonik prob (Bandelin)

Sonik banyo (Thermomac)

Mini ekstrüder (Avanti Polar Lipids)

200 ve 400 nm çaplı polikarbonat membranlar (Whattman)

Su banyosu (Memmert)

Spektrofotometre (Shimadzu UV-1601)

Mikropipetler (Eppendorf)

Manyetik karıştırıcılar (İka)

pH metre (Hanna)

Biyogüvenlik kabini (Mikrotest MGK-120)

İnverted mikroskop (Olympus CKX41)

Işık mikroskobu

CO₂'li inkübatör (Nuve EC 160)

Mikroplaka okuyucu (Thermo Scientific Multiskan FC)

Akış sitometrisi cihazı (BD Accuri C6).

3.1.2. Çalışma Kapsamında Kullanılan Kimyasal Maddeler

Lipoid P 75-3 (Lipoid)

Emülmetik 930 (Lucas Meyer)

Kolesterol (Sigma)

Etanol

Sorafenib (CaymanChem)

Vismodegib (SantaCruz)

Azot gazı

NaCl (Sigma)

KCl (Sigma)
Na₂HPO₄ (Sigma)
KH₂PO₄ (Sigma)
H₃PO₄ (Merck)
Asetonitril (Merck)
Diyaliz membranı (M_wCO 14000 Da)
Triton-X-100 (Merck)
Fetal sığır serumu (FBS) (Hyclone)
Penisilin-streptomisin (ThermoScientific)
L-glutamin (Gibco)
RPMI besi ortamı (Hyclone)
Dimetilsülfoksit (DMSO) (Isolab)
MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolyum bromür) ayıracı (AmBeed)
Tripsin-EDTA (Gibco)
Anneksin V-FITC/PI apoptoz kiti (Elabscience)

3.2. Yöntemler

3.2.1. Boş Lipozom Eldesi, Optimizasyonu ve Karakterizasyonu

6 mg Lipoid P 75-3 (Fosfolipit 1 olarak ifade edilecektir.), 6 mg Emülmetik 930 (Fosfolipit 2 olarak ifade edilecektir.), 1 mg kolesterol tartıldı (101). 2 mL %96'lık etanolde 70 °C su banyosunda arada vorteksenerek çözüldü. Lipozom oluşturma amacıyla ince lipit film hidrasyon yöntemi (102) kullanılacağından etanol, 70 °C'de azot (N₂) gazı geçirilerek uzaklaştırıldı. Etanol kalıntılarının uzaklaştırılması amacıyla elde edilen lipit filmler 50-60 °C de etüvde kurutuldu.

Elde edilen lipit filmlerden lipozom eldesi için lipit filmler 2 mL pH 7,4 PBS ("phosphate buffered saline") ile ıslatıldı. Sonik banyo ve sonik prob yardımıyla yaklaşık 45 dakika süresince hidrate edilerek lipozom oluşumu sağlandı.

Oluşturulan lipozomlar Avanti Polar Lipids mini ekstrüder sistemi (Şekil 3.1) ile sırasıyla 400 ve 200 nm gözenek çapına sahip polikarbonat membranlar kullanılarak ekstrüde edildi. Ekstrüzyon sayısı denemeleri 5, 10 ve 15 kez olmak üzere 400 ve 200 nm por çapına sahip membranların her biri için gerçekleştirildi (103).



Şekil 3.1. Mini ekstrüder sistemi ile lipozomların ekstrüzyonu.

Ekstrüde edilmeyen ve edilen lipozomların hidrodinamik boyut ölçümleri (Malvern Panalytical Zetasizer Ultra) ile optimal hidrodinamik boyutlu boş lipozomun zeta potansiyel ölçümü (Malvern Panalytical Zetasizer Ultra) hizmet alımı ile Ege Üniversitesi İlaç Geliştirme ve Farmakokinetik Araştırma - Uygulama Merkezi (ARGEFAR)'nda ve C-TEM (Yüksek Kontrastlı Transmisyon Elektron Mikroskobu, FEI Tecnai G2 Spirit BioTwin CTEM) görüntülemesi de Orta Doğu Teknik Üniversitesi Merkezi Laboratuvar (MERLAB)'da yapıldı. Hidrodinamik boyut, polidispersite indeksi (pdi), zeta potansiyel ve C-TEM analizi distile su ile 1000 kat seyreltilen örneklerde gerçekleştirildi. Lipozom oluşumunda kullanılan her üç lipit ve lipozom için FTIR (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi) spektroskopisi (Perkin Elmer Spectrum Two) analizleri Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi (MATAL)'nda hizmet alımı ile yapıldı.

3.2.2. Sorafenib ve Vismodegib İlaçlarının Çözünürlük, Spektrum Tarama Çalışmaları

Sorafenib ve vismodegib ilaçlarının hidrofobik karakteri sebebiyle, ilaçlar lipozoma lipit film oluşturma evresinde eklenecek olup bu nedenle ilaçların da etanolde çözünüp çözünmediği denendi. Sorafenib ve vismodegib ilaçları 1 mg tartılarak 1 mL etanolde çözme denemesi yapıldı. Sonik prob ve vorteks yardımıyla ilaçların 1 mg/mL olacak şekilde etanolde çözüldüğü belirlendi.

Sorafenib ve vismodegib ilaçlarının görünür bölge/ultraviyole spektrofotometresi aracılığıyla ölçümü için etanolde çözülmüş ilaçların ayrı ayrı spektrum taramaları gerçekleştirildi. Bu amaçla ilaçların 800-200 nm dalga boyları aralığında verdiği absorbansların ölçümü gerçekleştirildi.

3.2.3. Sorafenib ve Vismodegib İlaçlarının Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) İle Ölçümü

Sorafenib ve vismodegib ilaçlarının ölçümü için Pulusu V.S. ve Kommarajula P.'nin (104) yöntemi modifiye edildi. Her iki ilaç da aynı yöntem ile tespit edildi. Buna göre ilaçların analizi için kullanılan yöntem şu şekildedir;

Cihaz	: SHIMADZU LC-20AT (PDA)
Kolon	: ACE 5 C18 (150x4,6 mm)
Mobil Faz	: A: % 0,1 fosforik asit (%50) B: Asetonitril (%50)
Akış Hızı	: 1 mL/dakika
Kolon Sıcaklığı	: 30 °C
Dalga Boyu	: 264 nm
Enjeksiyon Hacmi	: 10 µL

Kullanılan yöntem için validasyon çalışmaları (seçicilik, tespit ve kantitasyon alt sınırı, doğrusallık) yapıldı. HPLC ile ilaç analizleri Ege Üniversitesi ARGEFAR'da hizmet alımı ile gerçekleştirildi. Seçicilik, tespit ve kantitasyon alt sınırları ile doğrusallıklar belirlendi.

3.2.4. Lipozomlara Sorafenib ve Vismodegib İlaçlarının Yüklenmesi, İlaç Yüklü Lipozomların Optimizasyon ve Karakterizasyon Çalışmaları

Vismodegib ve sorafenib sulu fazda çözünmediklerinden, organik çözgen fazında (etanol) çözdürülerek lipozomlara lipid film oluşturma aşamasında yüklendi. Bu amaçla farklı ilaç miktarları ile çalışılarak ilk olarak ön denemeler gerçekleştirildi, ardından optimizasyon yapıldı.

İlaç yükleme ön denemesi olarak ilaçlardan 1 mg olacak şekilde ekleme yapıldı. Buna göre lipidler 1 mL etanolde çözdürüldükten sonra 0,5 mL, 1 mg ilaç içeren sorafenib çözeltisi ve 0,5 mL, 1 mg ilaç içeren vismodegib çözeltisi eklenerek vortekslendi ve organik faz azot gazı ile uzaklaştırıldı. Ardından lipozom oluşturma hidrasyon ve ekstrüzyon aşamaları gerçekleştirildi. Sonuçlarda da bahsedileceği üzere, istenilen yapının elde edilememesi sebebiyle ilaç derişimlerinin azaltılması planlanarak ve

yaklaşık oral alım dozları üzerinden düşünülerek (vismodegib için 150 mg/gün, sorafenib için 400 mg/günde iki kez (105),(106),(107),(108) sorafenib: vismodegib oranı 5:1 olacak şekilde; 1 mg/0,5 mL sorafenib ve 0,2 mg/0,5 mL vismodegib ile deneme tekrarlandı. Yine lipozom yapısının elde edilememesi sebebiyle ilaç derişimlerinin yüksek geldiği düşünülerek ve ileri literatür taraması yapılarak farklı oranlarda ilaç derişimi denemelerine geçildi.

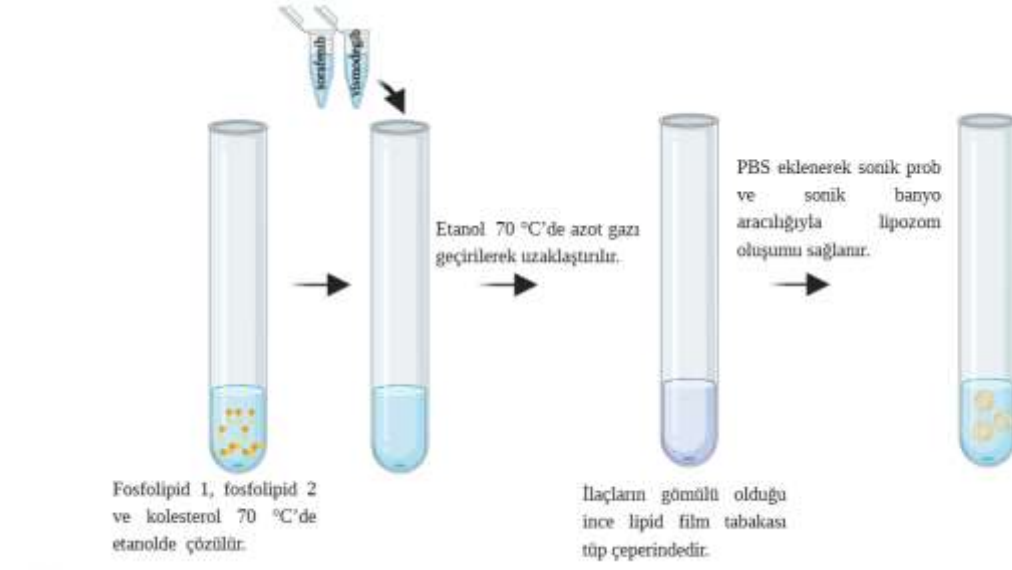
Li et al. (109), lipozomal sisteme vismodegib yüklerken ilaç: lipit oranını 1:30 (w/w) olacak şekilde tutmuştur. Bunun yanı sıra, Calienni et al. (110) da yine lipozomal vismodegib hazırlarken 40:7:1,4 (w/w/w) (soya fasülyesi fostatidilkolini: sodyum kolat: vismodegib) oranını kullandıklarını belirtmiştir. Xiao et al. (111) ise sorafenib yükledikleri lipozomları hazırlarken 40:5:2 (w/w/w) (Lipoid E80:kolesterol: sorafenib) oranını kullandıklarını ifade etmiştir.

Bu doğrultuda optimizasyon çalışmaları lipit: ilaç oranları 20:1, 25:1, 30:1, 35:1 ve 40:1 (w/w) olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Buna göre; dual ilaç yüklü lipozom hazırlanmasında uygulanan adımlar şu şekildedir;

6 mg fosfolipit 1, 6 mg fosfolipit 2, 1 mg kolesterol tartıldı. 1 mL %96'lık etanolde 70 °C su banyosunda arada vortekslenerek çözüldü. 0,5 mL vismodegib ve 0,5 mL sorafenib çözeltisinden olmak üzere toplam 1 mL ilaç çözeltisi eklenerek su banyosunda arada vortekslenerek lipit-ilac karışımları hazırlandı. Hazırlanan ilaç çözeltilerinin başlangıç derişimleri oranlara göre şu şekildedir: 0,6 mg/mL (20:1), 0,48 mg/mL (25:1), 0,4 mg/mL (30:1), 0,34 mg/mL (35:1) ve 0,3 mg/mL (40:1). Ardından lipit filmleri oluşturmak üzere etanol 70 °C'de azot (N₂) gazı geçirilerek uzaklaştırıldı. İleri kurutma amacıyla elde edilen lipit filmler 50-60 °C de etüvde kurutuldu.

Elde edilen lipit filmlerden lipozom eldesi için lipit filmler 2 mL pH 7,4 PBS ile ıslatıldı. Sonik banyo ve sonik prob yardımıyla yaklaşık 45 dakika süresince hidrate edilerek lipozom oluşumu sağlandı (Şekil 3.2).



Şekil 3.2.İlaç yüklü lipozom oluşumu aşamaları.

Oluşturulan lipozomlar sırasıyla 400 ve 200 nm gözenek çapına sahip polikarbonat membranlar kullanılarak 10'ar kez ekstrüde edildi.

Lipozomlara yüklenemeyen ilaçları uzaklaştırmak ve bu şekilde yükleme verimini hesaplamak için diyaliz işlemi gerçekleştirildi. Buna göre elde edilen lipozomlar PBS'e karşı oda sıcaklığında diyalizlendi (Şekil 3.3)(112).



Şekil 3.3. Yüklenmeyen ilaçların uzaklaştırılması amacıyla gerçekleştirilen diyaliz işlemi.

Ardından toplanan diyaliz sularında HPLC ile ilaçların tayini gerçekleştirilerek, lipozomal sistemlerin içerdikleri ilaç miktarları ve yükleme verimi aşağıdaki formül ile her bir ilaç için hesaplandı:

$$\% \text{yükleme verimi} = \frac{\text{başlangıç ilaç miktarı } (\mu\text{g}) - \text{yüklenmeyen ilaç miktarı } (\mu\text{g})}{\text{başlangıç ilaç miktarı } (\mu\text{g})} \times 100$$

Her bir oran için elde edilen lipozomlarda hidrodinamik boyut ve zeta potansiyel ölçümü gerçekleştirildi.

Optimum olarak elde edilen dual ilaç yüklü FTIR ve C-TEM analizi ile de karakterize edildi.

3.2.5. *İn Vitro* İlaç Salımı

Hazırlanan ilaç yüklü sistemin *in vitro* ilaç salım profilini incelemek amacıyla, başlangıç ilaç miktarları bilinen vismodegib ve sorafenib yüklü lipozomlar diyaliz membranlarına alındı (şekil 3.4). 5 mL, 10 mM pH 5,5 asetat ve 7,4 fosfat tamponlarında

37 °C de salıma bırakıldı (103), (113). 30. dakika, 1., 2., 3., 4., 6., 8., 12., 24., 32., 48. ve 56. saatlerde tamponlar alınıp toplanarak yerine yenisi konuldu.

Ardından toplanan tampon çözeltilerinde HPLC ile ilaç tayini gerçekleştirilerek aşağıdaki denklem yardımıyla kümülatif ilaç salım grafiği oluşturuldu.

$$\%kümülatif\ salım = \frac{\text{salınan ilaç miktarı}}{\text{toplam ilaç miktarı}} \times 100$$



Şekil 3.4. Diyaliz membranında salıma bırakılmak üzere hazırlanan diyaliz sistemi.

3.2.6. Stabilite Çalışmaları

Stabilite çalışmaları için dual ilaç yüklü lipozomlar yukarıda anlatıldığı şekilde hazırlanarak Ege Üniversitesi MATAL’da hizmet alımı ile liyofilize edildi. Liyofilize edilen örnekler 4 °C ve 25 °C’ de 1, 2, 3 ve 6 ay saklandı. İlgili aylarda hidrodinamik boyut ve etken madde (sorafenib ve vismodegib) miktarı analizleri gerçekleştirildi.

3.2.7. Hemoliz Deneyi

Hazırlanan ilaç taşıyıcı sistemin intravenöz (iv) uygulamaya ve organizmaya verilmek üzere uygunluğunun araştırılması için hemoliz deneyi gerçekleştirildi.

Eritrositler PBS ile yıkandı. Ardından %2 (v/v) eritrosit süspansiyonu (PBS'te) hazırlandı. Boş ve ilaç içeren lipozomların 500; 250; 100; 50 ve 25 µg/mL lik derişimleri hazırlanarak 1:1 (v/v) eritrosit süspansiyonu ile karıştırılarak 37 °C'de 2 saat inkübe edildi. Deneyde pozitif kontrol olarak %1 Triton-X-100 çözeltisi kullanılırken, negatif kontrol olarak PBS kullanıldı. Süre sonunda 1200 rpm'de 10 dk santrifüjlenerek eritrositler çöktürüldü. Üst faz 540 nm'de spektrofotometrik (Shimadzu UV-1601) olarak okunarak aşağıdaki denklem yardımıyla %hemoliz miktarı belirlendi (114),(115),(116).

$$\%Hemoliz = \frac{ODörnek - ODnegatifkontrol}{ODpozitif kontrol - ODnegatif kontrol} \times 100$$

3.2.8. Hücre Kültürü Çalışmaları

HepG2 (hepatoselüler karsinoma hücre hattı) ve normal insan hücreleri için yaygın olarak kullanılan standartlardan biri olan (117),(118),(119),(120) HEK293 (insan normal embriyonik böbrek hücre hattı) hücreleri %10 FBS, %1 Penisilin-Streptomisin, 2 mM L-glutamin içeren RPMI ortamında %5 CO₂ içeren, sıcaklığı 37 °C'ye ayarlanmış inkübatörde kültüre edildi. ~%80 doluluk oranına ulaşan hücreler tripsin-EDTA ile kaldırılıp pasajlanarak çoğaltma işlemine devam edildi.

3.2.8.1. HepG2 Hücre Hattı Proliferasyon Deneyi

Sitotoksosite deneylerinde kuyucuk başına ekilecek HepG2 hücre sayısının bulunması amacıyla proliferasyon deneyi gerçekleştirildi. Hücrelerin canlılığını belirlemek üzere Tim Mosmann (121) tarafından geliştirilen MTT testi kullanıldı. Pozitif yükü ve lipofilik yapısı nedeniyle hücre zarından ve canlı hücrelerin mitokondriyal iç zarından geçerek metabolik olarak aktif hücreler tarafından formazan kristaline indirgenebilen MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolyum bromür), bir mono-tetrazolyum tuzudur. (122). Bu özellikleri sayesinde hücre canlılığı kolorimetrik olarak tayin edilebilmektedir. MTT ayırıcı 5 mg/mL olacak şekilde hazırlanıp sterilizasyon amacıyla 0,22 mikronluk filtreden geçirildi ve ana stok çözelti olarak saklandı. Canlılık deneyi öncesi MTT çözeltisi 1:10 (v/v) oranında serum içeren besi ortamı ile seyreltilerek çalışma çözeltisi hazırlandı. Tripan mavisi ile ışık mikroskobu aracılığıyla sayımı yapılan hücreler, 96 kuyucuklu plakalara her hücre sayısı grubu 3 tekrar olmak üzere kuyucuk başına 1×10^5 hücreden başlanarak seri dilüsyonlarla 100 µL besi ortamı içerisinde ekildi. 96 saat süre ile hücreler inkübatörde inkübe edildi. 96 saat

sonunda kuyucuklardaki besi ortamı uzaklaştırılarak ve kuyucuk başına 100 µL olacak şekilde MTT çalışma çözeltisi eklendi. 4 saat karanlık ortamda inkübe edildi. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra, süpernatant dikkatlice uzaklaştırılarak ve her kuyucuğa, formazan kristallerini çözmek amacıyla 100 µL DMSO eklendi. Plakalar, kristallerin tamamen çözünmesi için etüvde 10 dakika bekletildikten sonra, mikro plaka okuyucuda (Thermo Scientific Multiskan FC) 595 nm dalga boyunda optik dansite (OD, absorbans) değerleri ölçüldü.

3.2.8.2. Sitotoksisite Deneyleri

Sitotoksisite deneyleri için tripan mavisi ile sayımı yapılan HepG2 ve HEK293 hücreleri, 96 kuyucuklu plakalara 1×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde 100 µL besi ortamı içerisinde ekildi (123),(124). 24 saat boyunca kuyucuklara tutunması için inkübe edildi. Süre sonunda besi ortamları uzaklaştırılarak, hücrelere besi ortamı ile seyreltilen farklı derişimlerde örnekler (Çizelge 3.1 ve 3.2’de detaylı olarak verilmektedir.) uygulandı. 24, 48 ve 72 saat inkübe edildi. İlaçların tek tek, beraber ve taşıma sisteme yüklendiğinde gösterdiği sitotoksik etkilerin belirlenmesi için belirtilen gruplara uygulanan derişimler literatür üzerinden değerlendirilerek denendi (113),(123),(125),(126). Örnekler ilgili derişimlere, serum içeren besi ortamları ile seyreltilerek hazırlandı. Kontrol grubu olarak herhangi bir etken madde içermeyen besi ortamı ile inkübe edilen hücreler kullanıldı.

Süreler sonunda örnekler uzaklaştırılarak 3.2.8.1.’de anlatılan MTT testi ile canlılık analizleri gerçekleştirildi. %canlılık değerleri excel kullanılarak, hücrelerin %50’sini öldüren inhibitör derişimi (IC₅₀, “half-maximal inhibitory concentration”, yarı maksimal inhibitör derişimi) Graphpad Prism 8.0 yazılımı kullanılarak hesaplandı.

Çizelge 3.1. HepG2 hücre hatlarına uygulanan örnekler.

HepG2 hücre hattı grupları	Derişim
Serbest sorafenib	30; 20; 15; 10; 7,5; 5 ve 2,5 µg/mL
Serbest vismodegib	100; 80; 75; 50; 40; 30; 15 µg/mL
Serbest birleşim (sorafenib+vismodegib)	30; 20; 15; 10; 7,5; 5 ve 2,5 µg/mL sorafenib ve 30; 20; 15; 10; 7,5; 5 ve 2,5 µg/mL vismodegib
Boş lipozom	En yüksek lipit derişimine sahip grup olan Vis-Lip ile aynı oranlarda seyreltilerek hazırlandı.
Sorafenib yüklü lipozom (Sor-Lip)	33,3; 21,1; 16,6; 11,1; 5,5; 2,76; 1,38 µg/mL sorafenib
Vismodegib Yüklü Lipozom (Vis-Lip)	48,8; 24,4; 12,2; 6,1; 3,05; 1,5; 0,75 µg/mL vismodegib
Dual İlaç Yüklü Lipozom (Dual-Lip)	19,5; 9,75; 4,88; 2,44; 1,22; 0,31; 0,3 µg/mL vismodegib ve 23,2; 11,6; 5,8; 2,9; 1,45; 0,72; 0,36 µg/mL sorafenib

Çizelge 3.2. HEK293 hücre hatlarına uygulanan örnekler.

HEK293 hücre hattı grupları	Derişim
Serbest sorafenib	30; 20; 15; 10; 7,5; 5 ve 2,5 µg/mL
Serbes vismodegib	100; 80; 75; 50; 40; 30; 15 µg/mL
Serbest birleşim (sorafenib+vismodegib)	30; 20; 15; 10; 7,5; 5 ve 2,5 µg/mL sorafenib ve 30; 20; 15; 10; 7,5; 5 ve 2,5 µg/mL vismodegib
Dual İlaç Yüklü Lipozom (Dual-Lip)	29,2; 14,8; 7,4; 3,7; 1,8; 0,92; 0,46 µg/mL vismodegib ve 33,3; 16,6; 8,3; 4,2; 2,1; 1,04; 0,52 µg/mL sorafenib

3.2.9. Apoptoz Deneyi

Sitotoksisite deneyleri sonucunda hesaplanan IC₅₀ değerlerine göre, serbest ilaç birleşiminin ve dual ilaç yüklü lipozomun HepG2 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi, Anneksin V/FITC-PI apoptoz kiti (Elabscience) (127) kullanılarak akış sitometresi (BD Accuri C6) ile incelendi. Anneksin V, kalsiyuma bağımlı bir şekilde fosfatidilserine

bağlanan anneksin ailesinin bir üyesidir. FITC (Floresan izotiyosiyanat) ile konjuge hali olan Anneksin V-FITC, apoptotik hücre zarının dış kısmındaki fosfotidilserine özgül olarak bağlanır ve akış sitometrisi veya flöresan mikroskobu ile tespit edilebilir. Membranın bütünlüğünün kaybolması nedeniyle PI (propidyum iyodür), DNA'yı boyamak üzere geç apoptotik veya nekrotik hücrelere girebilir. Bu şekilde farklı apoptotik aşamalardaki hücreler Anneksin V ve PI kullanılarak ayırt edilebilir. Anneksin V-FITC pozitif hücreler erken apoptotik, Anneksin V-FITC ve PI çift pozitif hücreler nekrotik veya geç apoptotik hücreler ve PI pozitif hücreler ise nekrotik hücreler olarak tespit edilebilmektedir (127),(128),(129).

Bu amaçla 6 kuyucuklu mikropalakalara 5×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde 3 mL besi ortamı içinde HepG2 hücreleri ekildi ve 24 saat boyunca tutunmaları için inkübatörde inkübe edildi. Etken maddeler 48. ve 72. saatteki IC_{50} derişimlerinde (48. saat için; 3,81 μ g/mL sorafenib ve 3,37 μ g/mL vismodegib içeren dual lipozom ve 6,11 μ g/mL sorafenib ve vismodegib içeren serbest ilaç birleşimi, 72. saat için; 3,22 μ g/mL sorafenib ve 2,87 μ g/mL vismodegib içeren dual lipozom ve 4,41 μ g/mL sorafenib ve vismodegib içeren serbest ilaç birleşimi) RPMI ortamı ile seyreltilerek (son hacim 3 mL olacak şekilde) hazırlandı ve ilgili süreler boyunca HepG2 hücrelerine uygulandı. Kontrol hücrelerine herhangi bir etken madde uygulanmadı. Süre sonunda etken maddeler uzaklaştırılarak hücreler PBS ile yıkandı. Ardından tripsin-EDTA ile mikropalaka yüzeyinden kaldırıldı. Kit protokolü doğrultusunda; 250 μ L 1X Anneksin V-bağlanma tamponu örnek gruplarına eklendi. Ardından 2,5 μ L Anneksin V-FITC ve 2,5 μ L PI ilave edilerek 15-20 dakika karanlıkta oda sıcaklığında inkübe edildi. Süre sonunda akış sitometresinde örnekler analiz edildi (127),(130),(131),(132).

3.2.10. İstatistiksel Hesaplamalar

Elde edilen veriler için tanımlayıcı istatistikler hesaplandı (ortalama $\pm$ standart sapma). Gruplar arasında normal dağılım varsayımı sağlandığı için bağımsız gruplarda T testi kullanıldı. İki'den fazla grubun genel karşılaştırılmasında normal dağılım varsayımı sağlandığı için Tek Yönlü Varyans Analizi kullanıldı. Bu karşılaştırmalarda anlamlı bulunan durumlar için grupların ikili karşılaştırılmalarında grup içi varyanslar homojen olduğu için Tukey testi kullanıldı. $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. İstatistiksel analizler IBM SPSS Statistics 20 yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi.

4. BULGULAR

Çalışma kapsamında gerçekleştirilen boş lipozom eldesi ve karakterizasyon çalışmaları, vismodegib ve sorafenib ilaçlarının lipozomal sisteme yüklenmesi ve elde edilen ilaç taşıma sisteminin karakterizasyon çalışmalarına ait deney sonuçları ile taşıma sisteminin *in vitro* ilaç salım çalışmaları, hemoliz deneyi ve stabilite deneylerine ait bulgular detaylı olarak anlatılacaktır. Bunun yanı sıra hazırlanan lipozomal ilaç taşıma sisteminin *in vitro* sitotoksite deney verileri ile apoptoz deneyi sonuçları da bu başlık altında verilecektir.

4.1. Boş Lipozom Eldesi, Optimizasyonu ve Karakterizasyonu

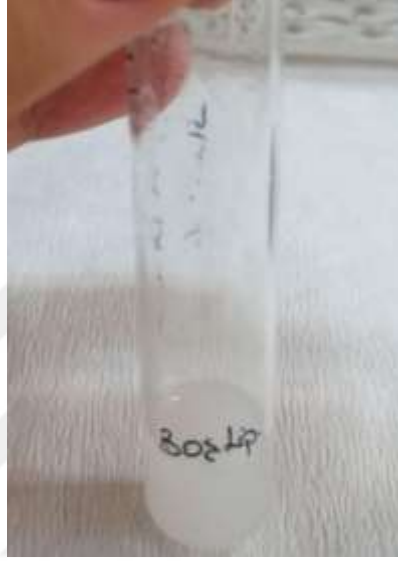
Organik çözgenin (etanol) uzaklaştırılmasıyla elde edilen, vismodegib ve sorafenib ilaçlarını içeren lipit filmler şekil 4.1’de görüldüğü üzere tüp çeperinde gözlenmektedir.



Şekil 4.1. Lipit filmler.

Fosfolipit 1'in erime sıcaklığı 70 °C olması sebebiyle, çözgen uzaklaştırma aşamasında sıcaklığın 70 °C'nin altına düşmesi durumunda lipit film oluşumunun sağlanamadığı belirlendi.

Lipit filmler başarılı bir şekilde elde edildikten sonra PBS ile ıslatılarak sonik prob ve sonik banyo yardımıyla elde edilen ilk lipozom yapısı şekil 4.2'de verilmiştir.

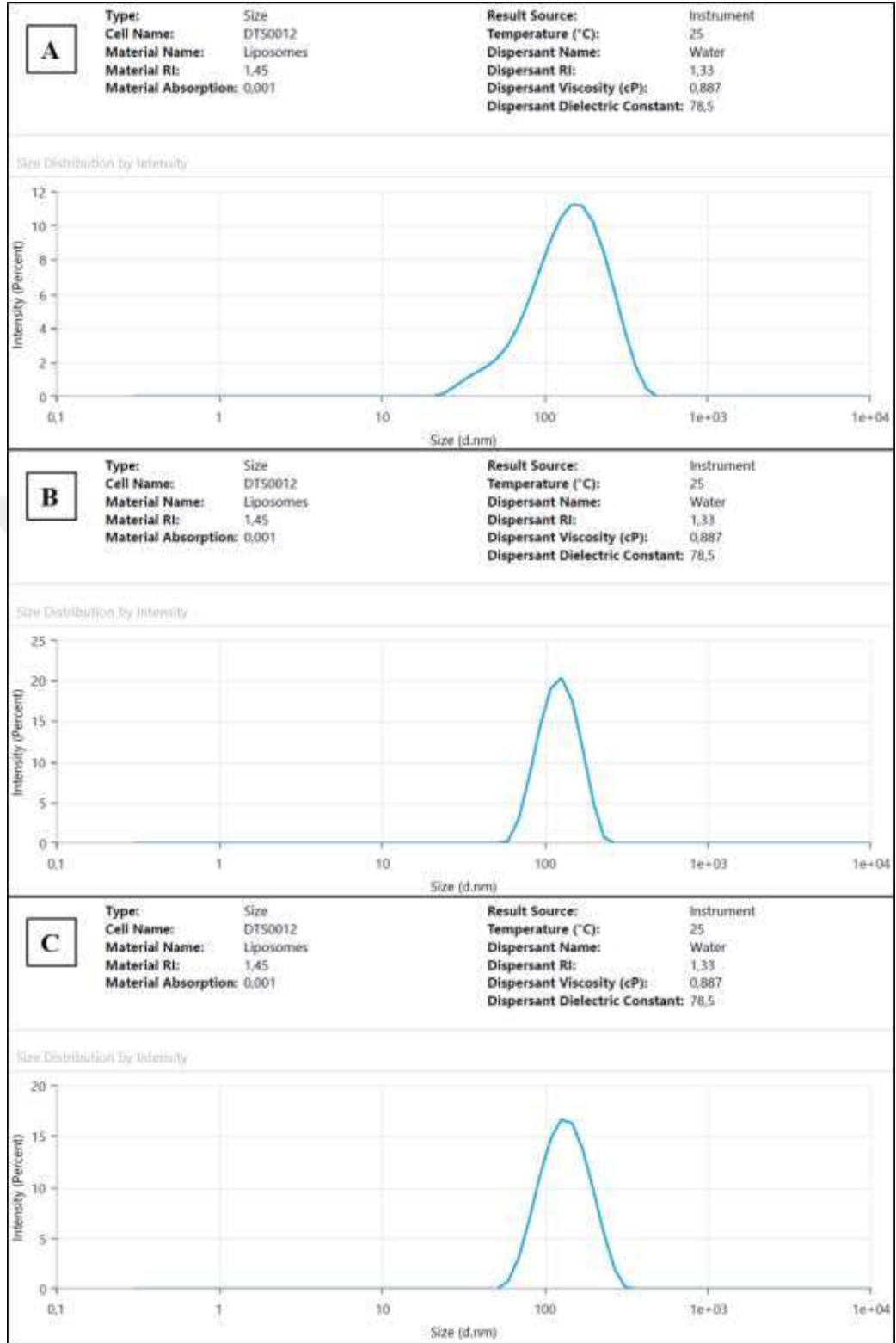


Şekil 4.2. Hidrasyon sonucu elde edilen lipozom yapısı.

Farklı ekstrüzyon sayılarına göre elde edilen lipozomların hidrodinamik boyutları çizelge 3'te ve hidrodinamik boyut grafikleri ise şekil 4,3'te verilmiştir. Buna göre 5'er, 10'ar ve 15'er kez 400 ve 200 nm gözenek çapına sahip membranlardan ekstrüzyon sonrası elde edilen son lipozomların boyutları 10 ve 15 kez ekstrüde edilenler için sırasıyla $124,8 \pm 4,5$ nm ve $124,2 \pm 1,0$ nm olması sebebiyle optimum olarak sırasıyla 400 ve 200 nm gözenek çapına sahip membranlardan 10'ar kez ekstrüde edilmesi seçilmiştir (çizelge 4.1). Ekstrüde edilmeyen lipozom, 400 nm membrandan 10 kez ekstrüde edilen ve 200 nm membrandan 10 kez ekstrüde edilen lipozomlara ait hidrodinamik boyut grafikleri şekil 4.3'de görülmektedir. Ayrıca lipozomların polidispersite indekslerinin 0,3'ten küçük olması nedeniyle lipozom boyutlarının homojen dağıldığını söylenebilmektedir (133).

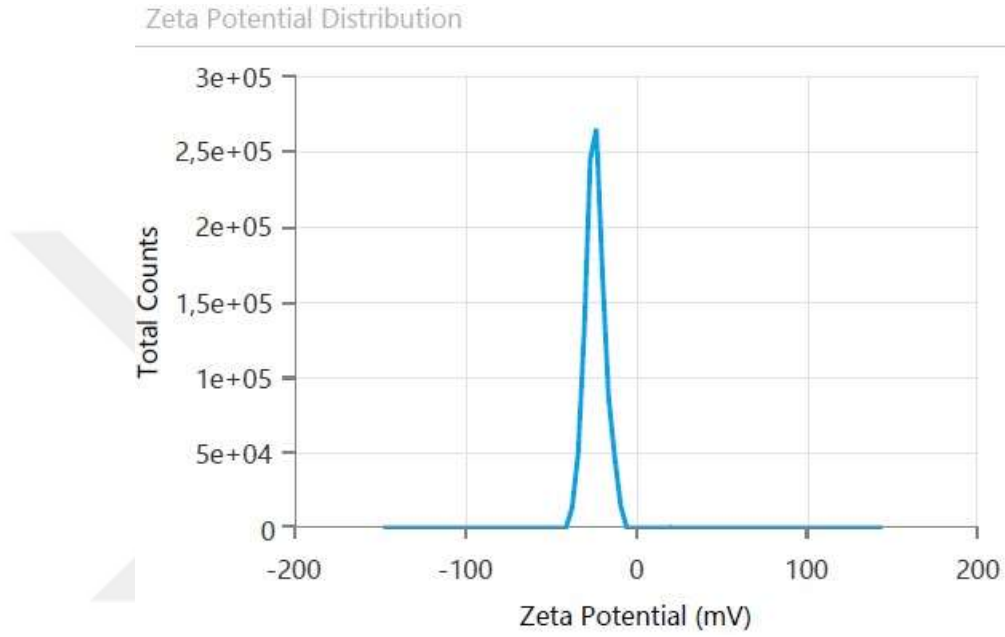
Çizelge 4.1. Farklı ekstrüzyon sayılarına göre elde edilen lipozomların hidrodinamik boyutları (n=3).

	Hidrodinamik Boyut (nm) $\bar{x} \pm SD$	Polidispersite İndeksi (pdi) $\bar{x} \pm SD$
Direkt lipozom	$145,9 \pm 4,5$	$0,382 \pm 0,07$
400 nm (5 kez)	$137,7 \pm 2,7$	$0,316 \pm 0,027$
400 nm (10 kez)	$134,7 \pm 9,1$	$0,266 \pm 0,016$
400 nm (15 kez)	$131,6 \pm 0,3$	$0,283 \pm 0,03$
200 nm (5 kez)	$136,0 \pm 6,7$	$0,263 \pm 0,038$
200 nm (10 kez)	$124,8 \pm 4,5$	$0,241 \pm 0,026$
200 nm (15 kez)	$124,2 \pm 1,0$	$0,247 \pm 0,056$

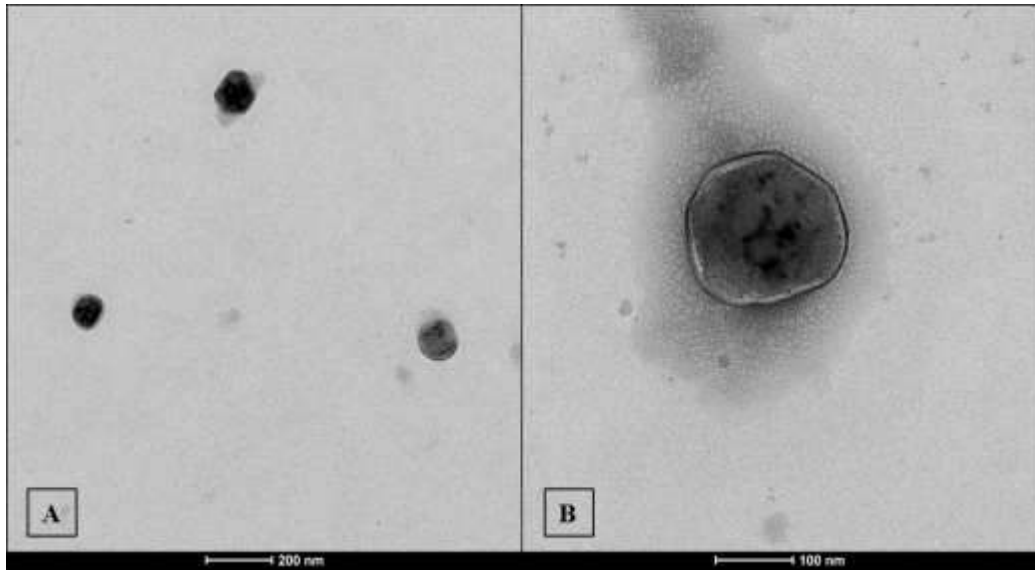


Şekil 4.3. Boş lipozoma ait hidrodinamik boyut grafikleri A) Ekstrüde edilmeyen lipozom, B) 400 nm membrandan 10 kez ekstrüde edilen lipozom C) 200 nm membrandan 10 kez ekstrüde edilen lipozom.

Elde edilen boş lipozomlara ait zeta potansiyeli $-21,9 \pm 2,2$ mV'dir (Şekil 4.4). Zeta potansiyeli -10 ile $+10$ mV arasında olan nanopartiküller yaklaşık olarak nötr olarak kabul edilirken, zeta potansiyeli $+30$ mV'den büyük veya -30 mV'den az olan nanopartiküller sırasıyla kuvvetli katyonik ve anyonik olarak kabul edilir. Elde edilen lipozomlar anyonik karakterdedir (134).



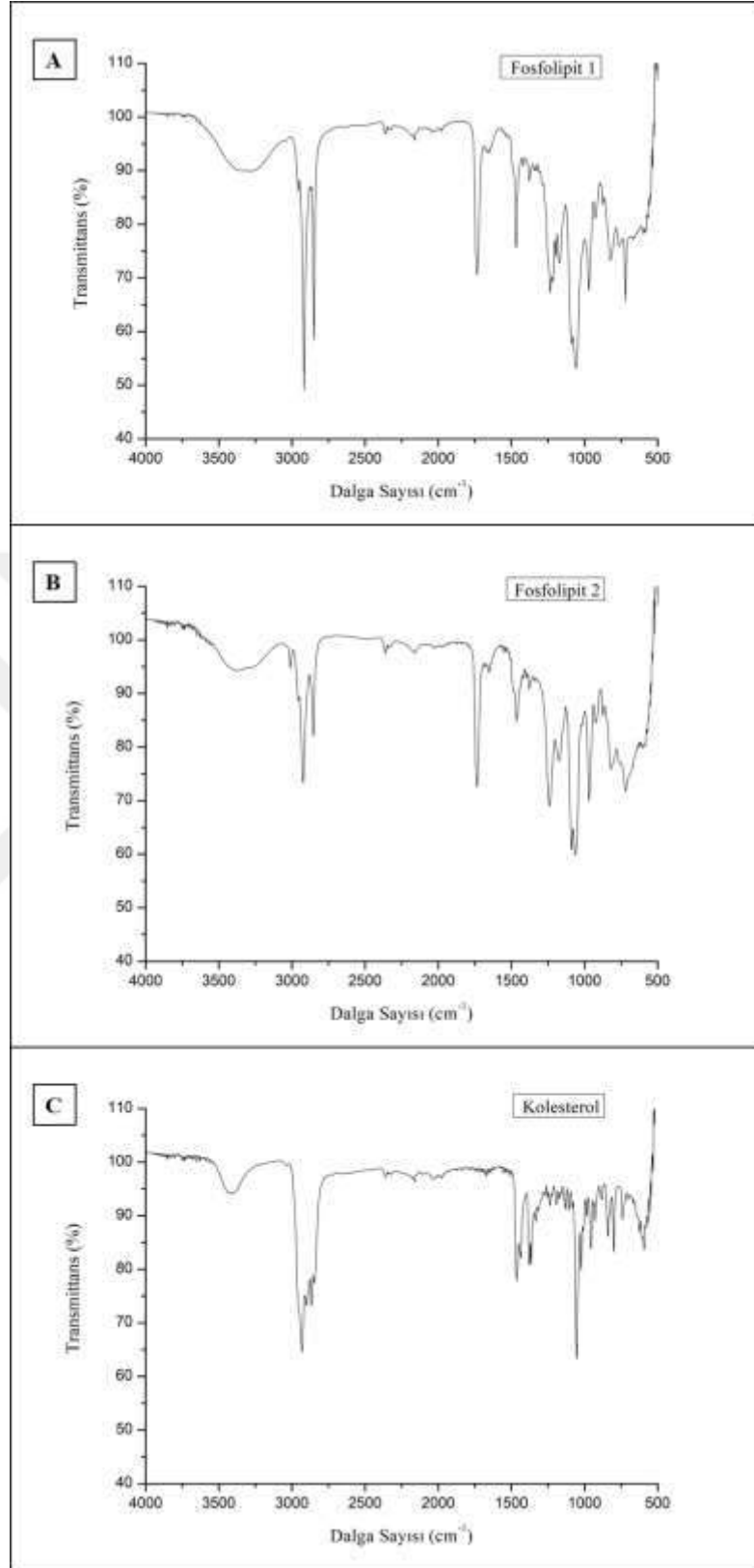
Şekil 4.4. Boş lipozoma ait zeta potansiyel grafiği.



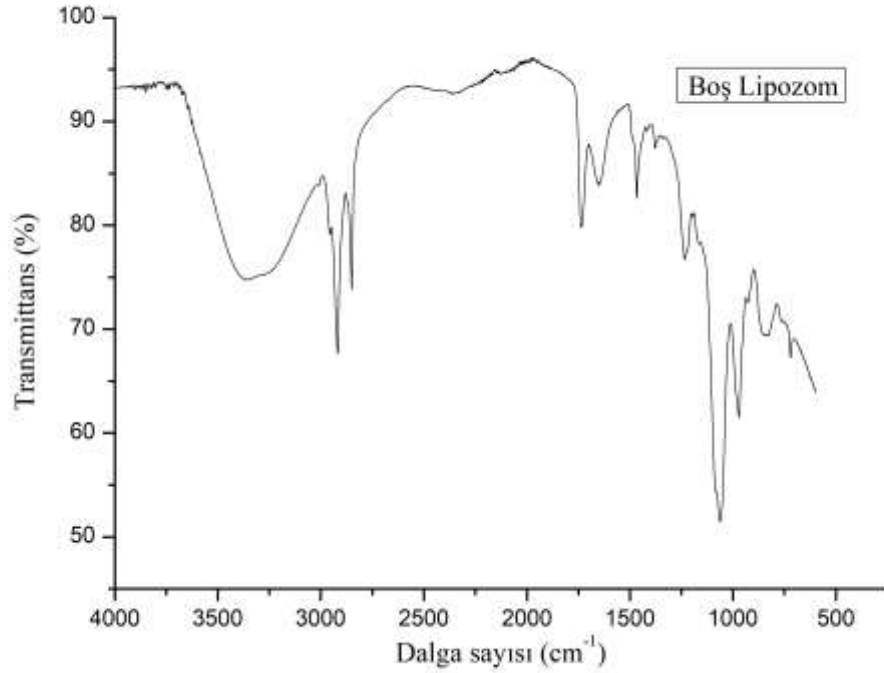
Şekil 4.5. Boş lipozomlara ait C-TEM görüntüsü. A) 200 nm ölçekli, B) 100 nm ölçekli .

Boş lipozomlara ait C-TEM görüntüsü şekil 4.5'te verilmektedir. C-TEM analizine göre sentezlenen lipozomların küresel şekilli ve çapının da yaklaşık 100-130 nm civarında olduğu söylenebilir.





Şekil 4.6. Lipozomu oluşturan lipid türlerine ait FTIR spektrumu, A) fosfolipit 1 (Lipoid P 75-3). B) fosfolipit 2 (Emülmetik 930 Lucas Meyer). C) kolesterol (sigma).



Şekil 4.7. Boş lipozomlara ait FTIR spektrumu.

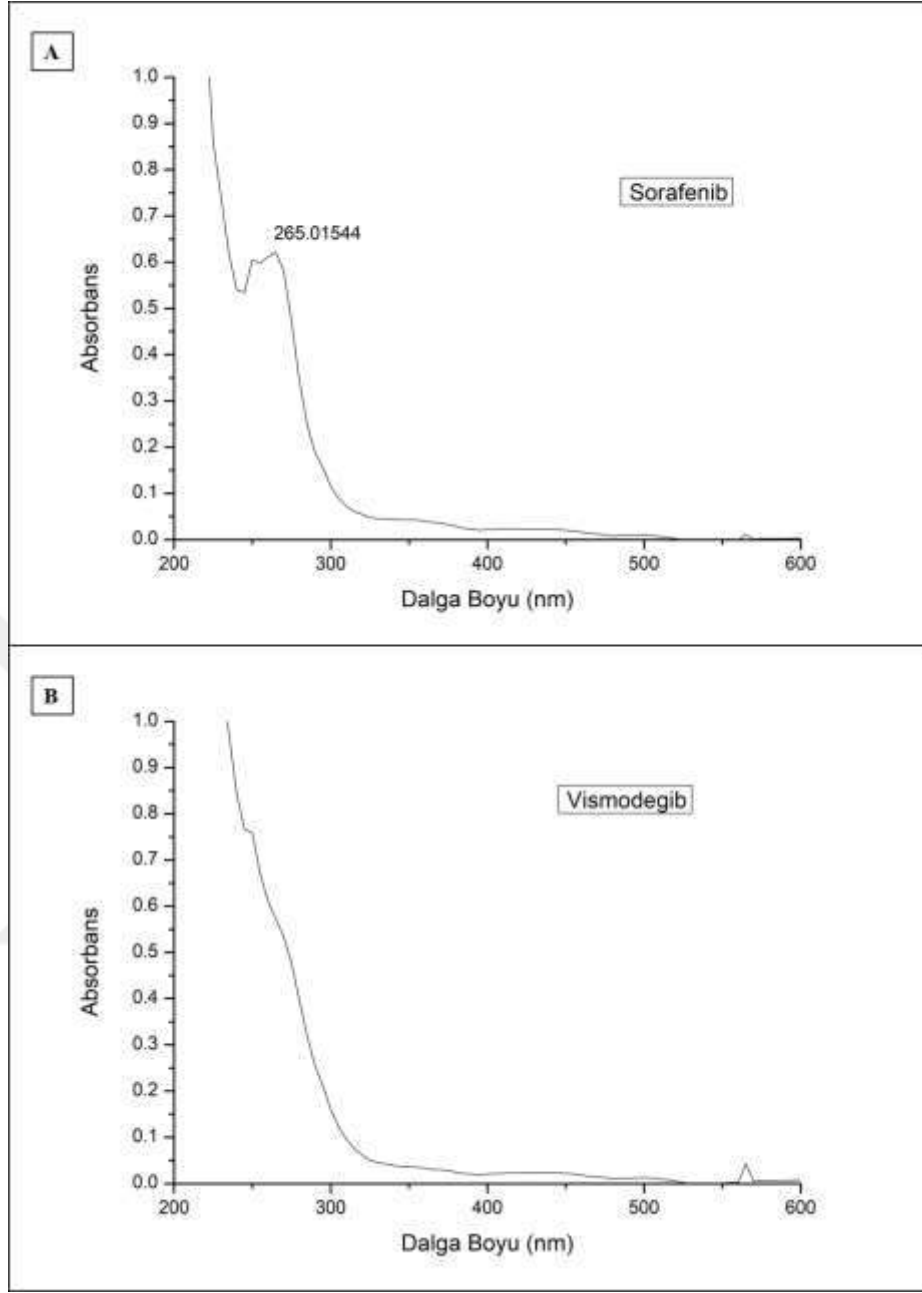
Şekil 4.6 ve şekil 4.7’de sırasıyla lipozomu oluşturan lipid türevlerinin ve boş lipozomların FTIR spektrumu görülmektedir. Boş lipozoma dair FTIR spektrumundaki 2900 ve 2848 cm^{-1} ’de gözlenen pikler lipid açıl- CH_3 ve $-\text{CH}_2$ gruplarının asimetrik ve simetrik gerilme titreşim pikleri ve 1470 ve 1380 cm^{-1} pikleri ise aynı grupların eğilme titreşimlerine ait piklerdir. 1735 cm^{-1} de gözlenen $\text{C}=\text{O}$ ester gerilim titreşim piki lipid esterlerinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca 1230 ve 1060 cm^{-1} pikleri ise fosfolipitlerin yapısında bulunan $\text{P}=\text{O}$ gerilim titreşimini göstermektedir (135),(136),(137). 1735 cm^{-1} ’deki gerilim pikinin hafiflediği gözlenir. Bu kolesterol yapısının $\text{C}=\text{O}$ gerilimine karşı koyduğu sterik engelden kaynaklanmaktadır (138). Bu bilgiler doğrultusunda FTIR analizi lipozom yapısının başarı ile elde edildiğini doğrular niteliktedir.

4.2. Sorafenib ve Vismodegib İlaçlarının Çözünürlük, Spektrum Tarama Çalışmaları

Hidrofobik karakteri sebebiyle lipozoma lipid film oluşturma aşamasında eklenecek olan sorafenib ve vismodegib ilaçlarının lipidlerin çözöldüğü ve organik fazı oluşturmaya sağlayan etanolde sonik prob ve vorteks yardımıyla 1 mg/mL olacak şekilde çözöldüğü belirlendi.

Sorafenib ve vismodegib ilaçlarının 800-200 nm dalga boyları aralığında absorbans taraması yapıldı. Buna göre sorafenib ilacının 265 nm dalga boyunda soğurum yaptığı belirlendi (Şekil 4.8-A). Vismodegib ilacına dair net bir pik alınamamış olmakla birlikte (Şekil 4.8-B) sorafenible aynı dalga boyunda soğurum yaptığı gözlemlendi. Bu nedenle iki ilaç lipozoma aynı anda yüklendiğinde ilaçların birlikte tespit edilmesi birbirlerine yapacakları soğurum girişiminden dolayı mümkün olamayacaktır. İlaçların spektrofotometrik olarak tespiti mümkün olmadığından, HPLC ile ölçülmesine karar verildi.





Şekil 4.8. A) Sorafenibin spektrofotometrik soğurum tarama grafiği B) Vismodegibin spektrofotometrik soğurum tarama grafiği.

4.3. Sorafenib ve Vismodegib İlaçlarının Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) İle Ölçümü

4.3.1. Seçicilik

Kör numune ile mobil faz ortamında çözünmüş vismodegib ve aynı şekilde sorafenib standardına ait kromatogramlar karşılaştırıldı. Vismodegib ve sorafenibe ait alıkonma zamanında diğer ilacın herhangi bir sinyal vermediği gözlemlendi.

4.3.2. Tespit ve Kantitasyon Alt Sınırları

Vismodegib

Tespit sınırı (“Limit of Detection” LOD) ve kantitasyon sınırı (“Limit of Quantitation” LOQ) değerleri sinyal/gürültü (S/N) oranları esas alınarak hesaplandı. LOD değeri 0,017 µg/mL, LOQ değeri ise 0,056 µg/mL olarak belirlendi.

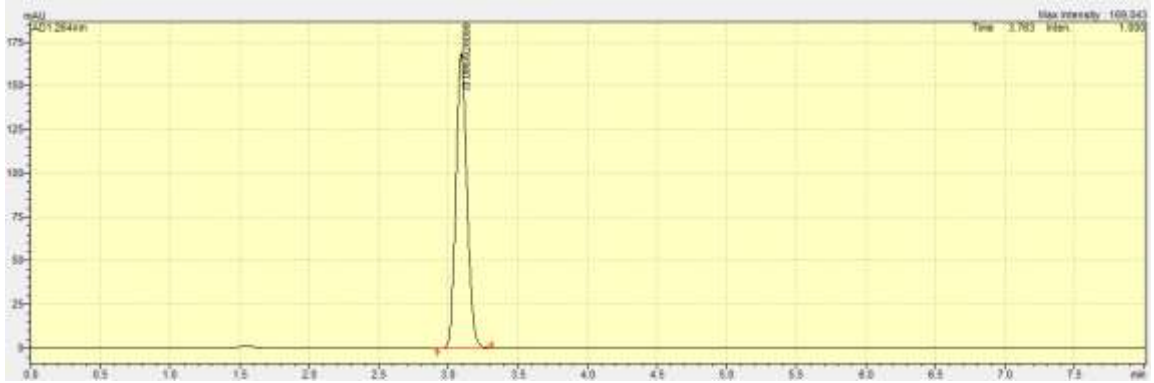
Sorafenib

LOD ve LOQ değerleri sinyal/gürültü (S/N) oranları esas alınarak hesaplandı. LOD değeri 0,019 µg/mL, LOQ değeri ise 0,065 µg/mL olarak belirlendi.

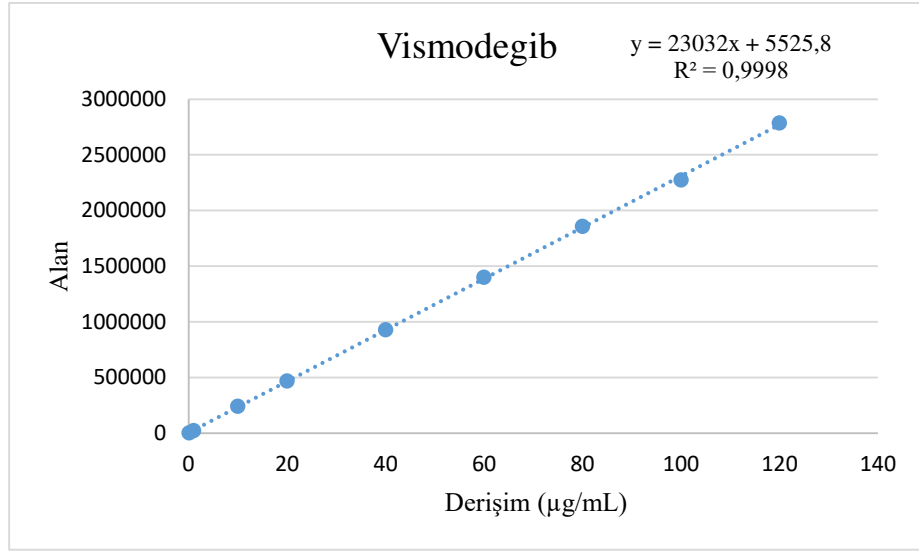
4.3.3. Doğrusallık

Vismodegib

Kalibrasyon eğrisi, 0,1 ile 120 µg/mL arasında seçilen farklı derişimlerdeki standart çözeltilerin, pik alan değerlerinin derişim değerlerine karşı grafiğe geçirilmesiyle oluşturuldu. Örnek olarak 40 µg/mL vismodegib için alınan kromatogram şekil 4.9’da verilmiştir. Eğri için regresyon parametrelerinin değerleri $y = ax + b$ denklemi ile hesaplandı, değerler $a = 23032$, $b = 5525,8$ ve $R^2 = 0,9998$ şeklindedir (şekil 4.10).



Şekil 4.9. 40 µg/mL vismodegibe ait HPLC kromatogramı.



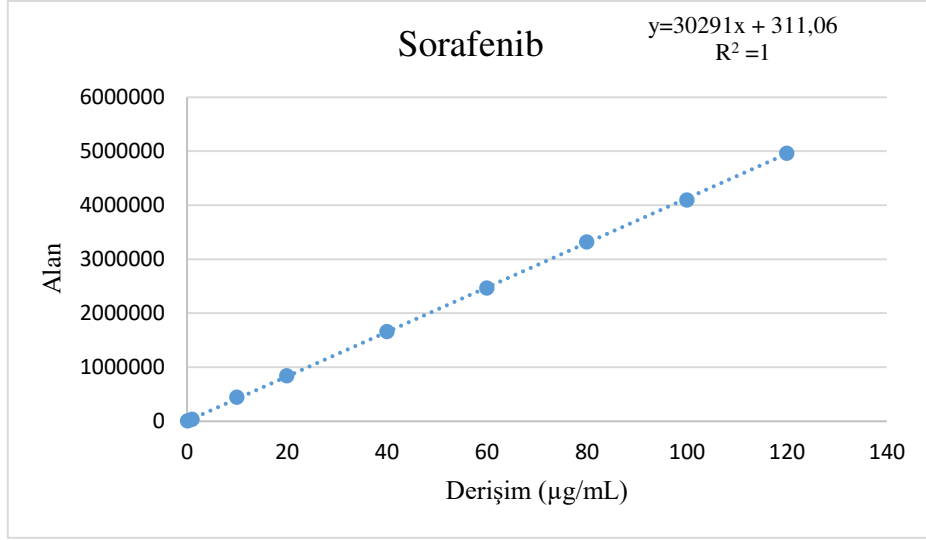
Şekil 4.10. Vismodegibe ait HPLC standart grafiğı.

Sorafenib

Kalibrasyon eğrisi, 0,1 ile 120 µg/mL arasında seçilen farklı derişimlerdeki standart çözeltilerin, pik alan değerlerinin derişim değerlerine karşı grafiğı geçirilmesiyle oluşturuldu. Örnek olarak 40 µg/mL sorafenib için alınan kromatogram şekil 4.11’de verilmiştir. Eğri için regresyon parametrelerinin değerleri $y = ax + b$ denklemi ile hesaplandı, değerler $a = 30291$, $b = 311,06$ ve $R^2 = 1$ şeklindedir (şekil 4.12).



Şekil 4.11. 40 µg/mL sorafenibe ait HPLC kromatogramı.



Şekil 4.12. Sorafenibe ait HPLC standart grafiği.

4.4. Lipozomlara Sorafenib ve Vismodegib İlaçlarının Yüklenmesi, İlaç Yüklü Lipozomların Optimizasyon ve Karakterizasyon Çalışmaları

İlaç yükleme ön denemelerinde her iki ilaştan 1 mg/0,5 mL olacak şekilde ilave edilmesi sonucu uygun lipit film yapısı elde edilemedi. Bu nedenle lipit film oluşumu yaklaşık oral alım dozu düşünülerek 1 mg/0,5 mL sorafenib ve 0,2 mg/0,5 mL vismodegib ilave edilerek denendi. Her iki durumda da hazırlanan lipit filmlerin homojen bir şekilde tüp çeperinde oluşmadığı, lipit tabakasının tüpün dibine çökme eğiliminde bulunduğu (şekil 4.13) hazırlanan lipozom yapısının da topaklanma eğiliminde olduğu gözlemlendi. Lipofilik karakterdeki ilaçların yüksek derişimlerinin, fosfolipitlerin yan zincirlerini bozarak moleküller arası etkileşimi azaltmasından dolayı (110), (139) lipit film ve lipozom yapısının uygun bir şekilde elde edilemediği sonucuna ulaşıldı.



Şekil 4.13. A) Boş lipozom için elde edilen lipit film, B) 1:1 (w:w) vismodegib: sorafenib eklenerek elde edilen lipit film, C) 1:5 (w:w) vismodegib: sorafenib eklenerek elde edilen lipit film.

Başlık 3.2.4'te detaylı olarak anlatılan 20:1, 25:1, 30:1, 35:1 ve 40:1 lipit: ilaç oranları olacak şekilde hazırlanan lipozomlar şekil 4.14'te görülmektedir.



Şekil 4.14. Ekstrüzyon öncesi ilaç optimizasyon çalışması sonucu elde edilen lipozom görüntüleri A) 20:1 B) 25:1 C) 35:1 D) 30:1 E) 40:1 oranı ve F) boş lipozom.

Hazırlanan lipozom yapıları HPLC ile etken madde miktarı, hidrodinamik boyut ve zeta potansiyel yönünden karakterize edilmiştir. Buna göre elde edilen veriler çizelge 4.2 ve çizelge 4.3’de görülmektedir. Her iki ilaç için de en yüksek ilaç miktarlarının yüklenebildiği 25:1 oranı yükleme verimlerinin de yüksek olması sebebiyle ve uygun hidrodinamik boyut ve zeta potansiyel verilerine sahip olması nedeniyle optimum kabul edildi.

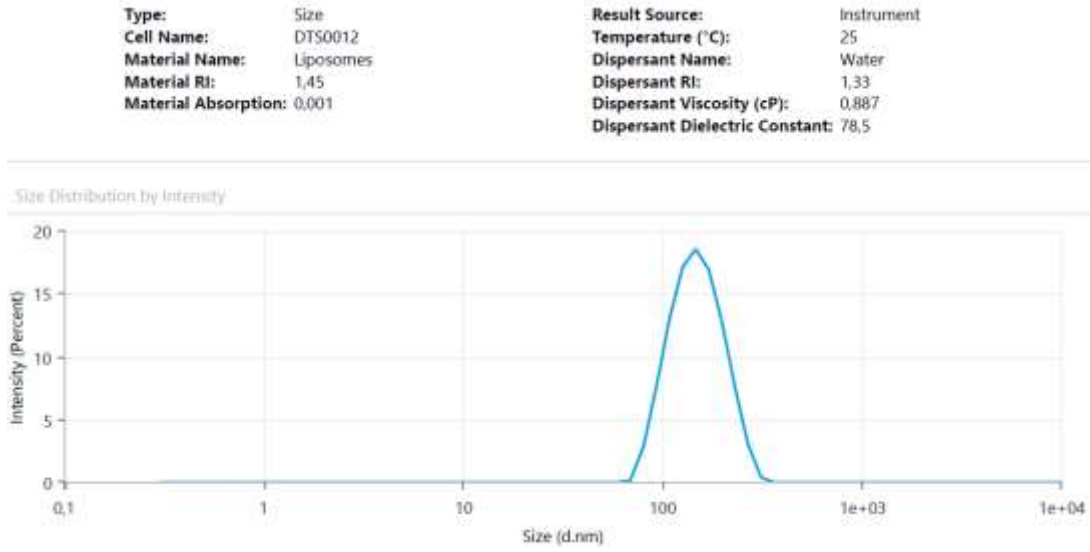
Çizelge 4.2. Farklı ilaç miktarlarına göre elde edilen ilaç yükleme miktarları ve verimleri.

Lipit: İlaç (w:w)	Yüklenen İlaç Miktarı (sorafenib µg)	% yükleme verimi (sorafenib)	Yüklenen İlaç Miktarı (vismodegib µg)	% yükleme verimi (vismodegib)
20:1	Lipozom yapısında topaklanmalar gözleendiği için lipozom yapısının düzgün elde edilemediği düşünülerek ileri analiz yapılmamıştır.			
25:1	221,8	92,4	195	81,3
30:1	174,4	87,2	141,8	70,9
35:1	159,9	94,0	136,1	80,0
40:1	121,7	81,1	96,9	64,6

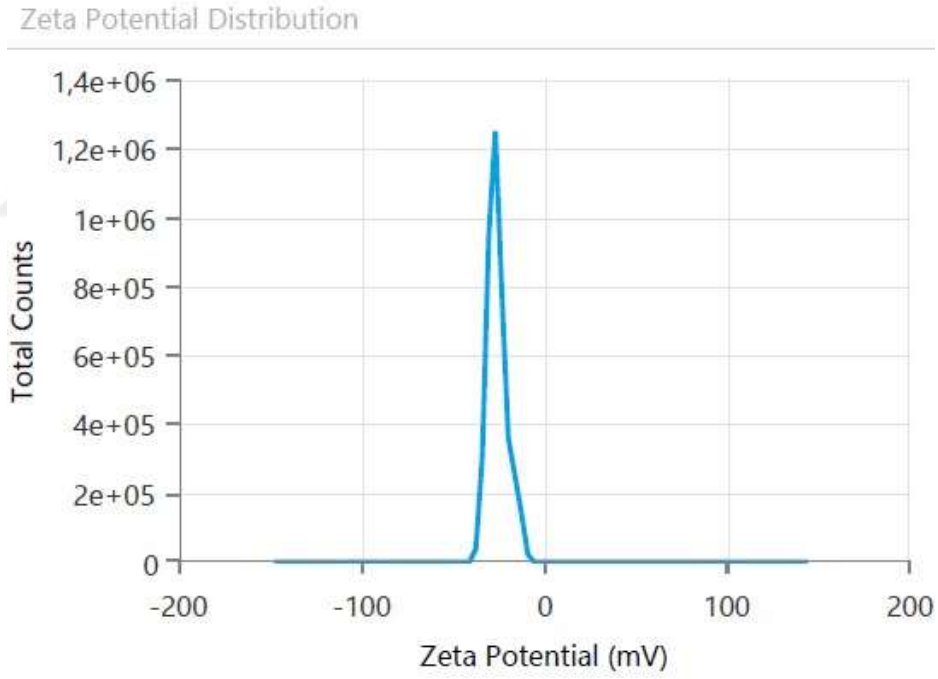
Çizelge 4.3. Farklı ilaç miktarlarına göre elde edilen hidrodinamik boyutlar ve zeta potansiyelleri (n=3).

Lipit: İlaç (w:w)	Hidrodinamik boyut (nm) $\bar{x} \pm SD$	pdi $\bar{x} \pm SD$	Zeta Potansiyel (mV) $\bar{x} \pm SD$
boş lipozom	124,8 ± 4,5	0,24 ± 0,02	-21,9 ± 2,2
20:1	307,2 ± 151,4	0,55 ± 0,27	-9,4 ± 4,6
25:1	158,3 ± 8,0	0,25 ± 0,08	-18,8 ± 3,07
30:1	326,2 ± 31,9	0,51 ± 0,03	-20,0 ± 1,5
35:1	192,2 ± 83,1	0,36 ± 0,1	-20,5 ± 1,4
40:1	137,2 ± 4,4	0,19 ± 0,02	-21,1 ± 3,5

Optimum olarak kabul edilen dual ilaç yüklü lipozomun (Dual-Lip) karakterizasyon çalışma sonuçlarına göre; ilaç yükleme verimleri sorafenib için %92,4 ve vismodegib için %81,3 olup içerdiği etken madde miktarı sırası ile 221,8 µg ve 195 µg'dır. Dual-Lip'in hidrodinamik boyutu 158,3 ± 8,0 nm (pdi: 0,25 ± 0,08) (şekil 4.15) ve zeta potansiyel değeri de -18,8 ± 3,07 mV'dur (şekil 4.16).

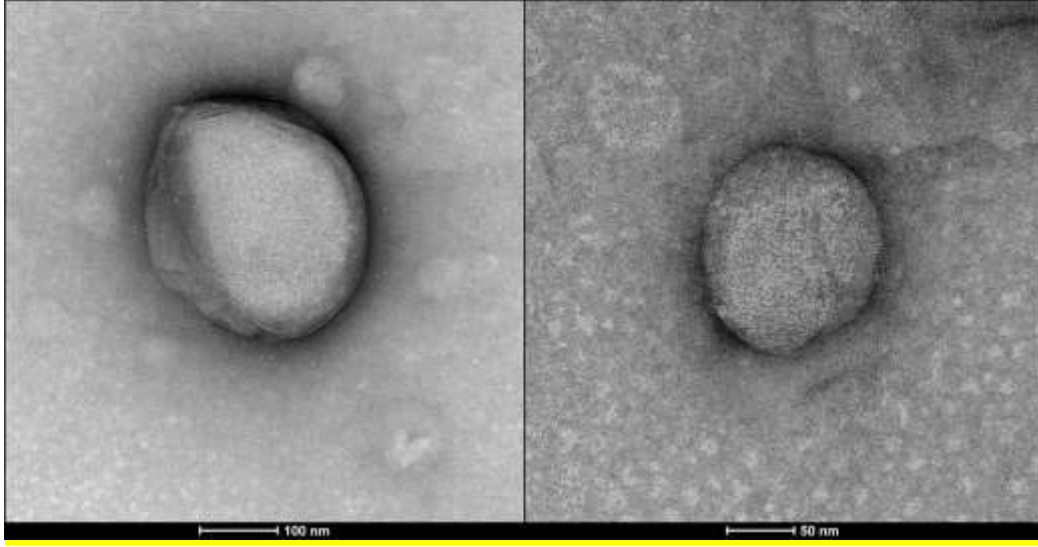


Şekil 4.15. Optimum kabul edilen 25:1 oranlı dual ilaç yüklü lipozoma ait hidrodinamik boyut grafiği.



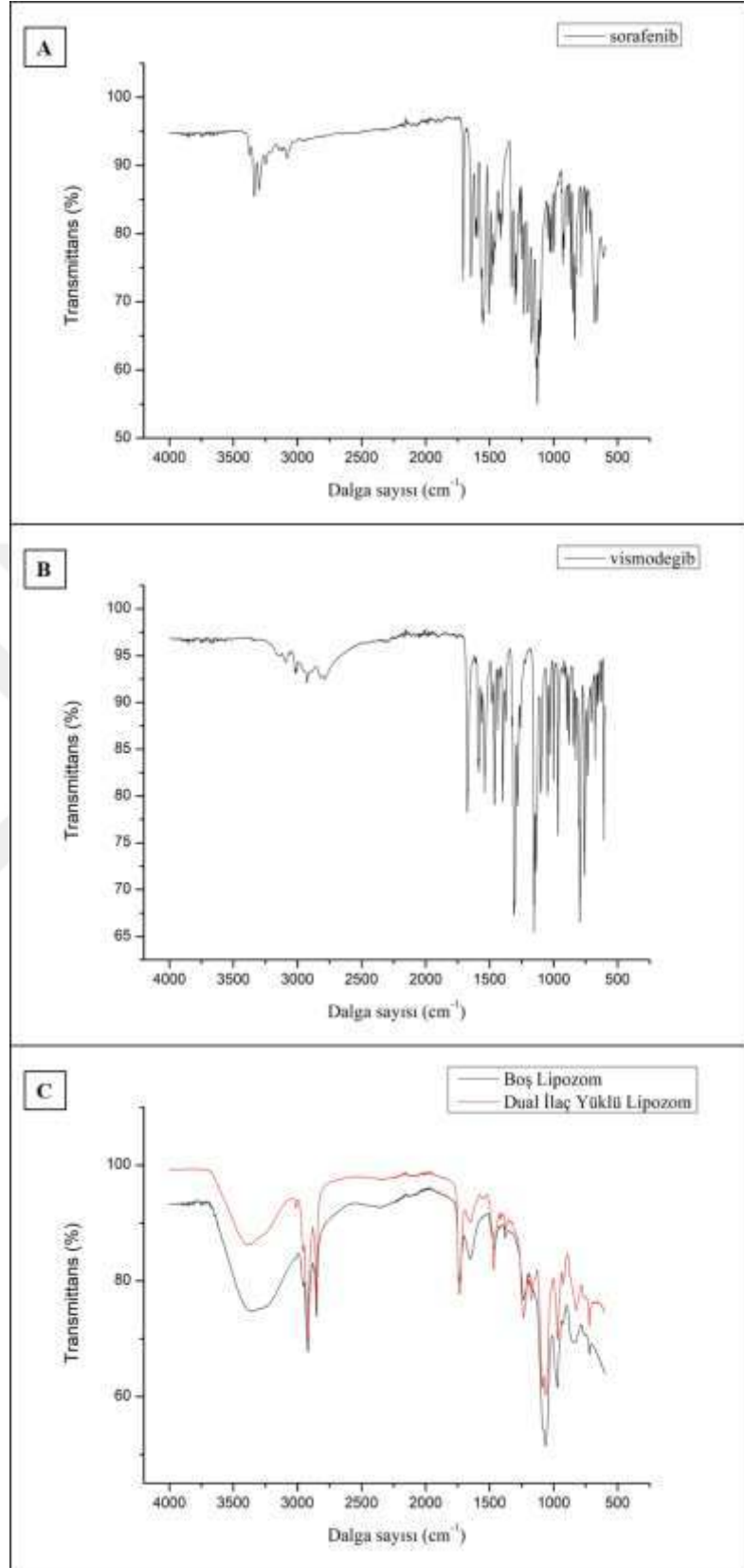
Şekil 4.16. Dual ilaç yüklü lipozoma ait zeta potansiyel grafiği.

Dual-Lip'e ait C-TEM görüntüsü şekil 4.17'de verilmektedir. C-TEM analizine göre Dual-Lip yapısı küresel şekilli ve yaklaşık 160 nm boyutludur.



Şekil

4.17. Dual ilaç yüklü lipozomlara ait C-TEM görüntüsü.

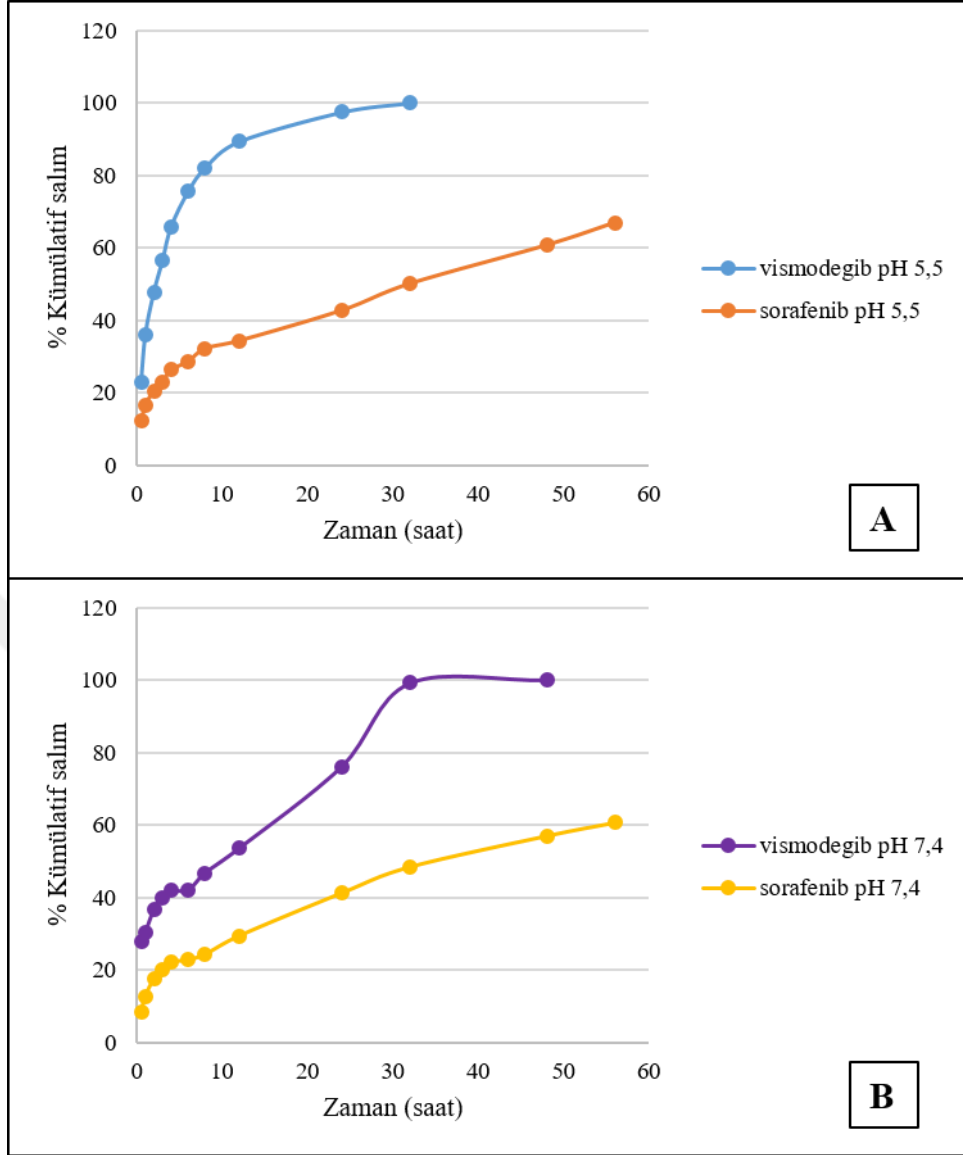


Şekil 4.18. A) Sorafenib ilacına ait FTIR spektrumu, B) Vismodegib ilacına ait FTIR spektrumu, C) Boş ve dual lipozomlara ait FTIR spektrumları.

Şekil 4.18’de verilen FTIR spektrumlarına bakıldığında, vismodegib ilacının yapısındaki S=O grubuna ait 1170 cm^{-1} ’deki gerilme piki Dual-Lip’e ait FTIR spektrumunda görülmektedir (140). Sorafenib ilacına ait flor halojeninden kaynaklanan C-F titreşim piki ise yine Dual-Lip’e ait FTIR spektrumunda 1400 cm^{-1} ’de yer almaktadır (141). Ayrıca Dual-Lip’e ait FTIR spektrumunda gözlenen 1540 cm^{-1} ’deki N-H bükülme piki de ilaçlardaki –N-H yapısından kaynaklanmaktadır (140),(141),(142). Buna göre ilaçların lipozomal sisteme başarı ile yüklendiği FTIR analizi ile doğrulanmaktadır.

4.5. *İn Vitro* İlaç Salımı

İn vitro ilaç salımı taşıyıcı sistemin ilacı fizyolojik koşullarda ve tümör mikroçevresini taklit eden asidik pH’de ne kadar saldıgının belirlenmesi açısından önem taşımaktadır. Tümör mikroçevresinin pH değerlerinin 5,5-7,0 aralığında olduğu ifade edilmektedir (143),(144). Bu nedenle tümör mikroçevresini taklit etmek amacıyla pH 5,5 ve fizyolojik koşulları taklit etmek için de pH 7,4 tampon ortamında lipozomal sisteme yüklenen ilaçların salım yüzdeleri incelendi. Dual-Lip yapısından sorafenib ve vismodegib ilaçlarının salımının incelenmesi amacıyla gerçekleştirilen *in vitro* ilaç salım deneyinin sonuçları şekil 4.19’da görülmektedir. Elde edilen verilere göre sorafenibin lipozomal sistemden salımı her üç pH için de vismodegibe göre daha yavaş gerçekleşmektedir. İlk 4 saat içinde vismodegibin pH 5,5’te $65,8 \pm 0,3$ ’ü ve pH 7,4’te ise $41,8 \pm 0,4$ ’ü salınırken, sorafenibin ise pH 5,5’te $26,3 \pm 0,3$ ’ü ve pH 7,4’te ise $22 \pm 0,03$ ’ü salınmıştır. Bu değerler 12. saate ulaşıldığında vismodegib için; pH 5,5’te $89,3 \pm 0,6$ ’ya ve pH 7,4’te $53,6 \pm 0,4$ ’e ulaşırken, sorafenib için ise; pH 5,5’te $34,4 \pm 0,5$ ’e ve pH 7,4’te $29,4 \pm 0,2$ ’ye ulaşmıştır. Vismodegib asidik ortamda daha hızlı salınmasına karşın, 32. saatin sonunda her iki pH için de tüm ilacın Dual-Lip yapısından salındığı tespit edildi. Bununla birlikte sorafenibin, 56. saatin sonunda pH 5,5’te $66,9 \pm 0,6$ ’sı ve pH 7,4’te ise $60,7 \pm 0,3$ ’ü salınmıştır.

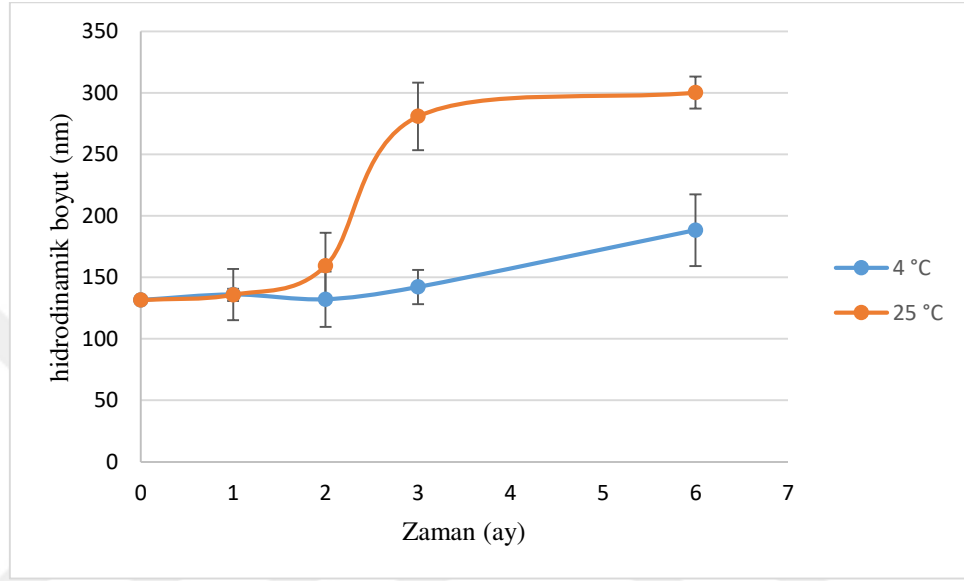


Şekil 4.19. Dual-Lip yapısından sorafenib ve vismodegib ilaçlarının zamana bağlı kümülatif salımı: A) pH 5,5, B) pH 7,4.

4.6. Stabilité Çalışmaları

Dual-Lip yapısının 4 °C ve 25 °C’de ne kadar stabil kaldığının belirlenmesi için 6 ay süreyle gerçekleştirilen stabilite çalışmaları kapsamında yapının hidrodinamik boyut ve etken madde içerikleri incelendi. Şekil 4.20’de süreye bağlı olarak hidrodinamik boyutlarındaki değişiklikler verildi. Buna göre liyofilize edildikten sonra (0. zaman) PBS ortamında disperse edilerek hidrodinamik boyutu ölçülen Dual-Lip’in $131,6 \pm 1,9$ nm (pdi değeri: 0,21) olarak ölçüldü. Dual-Lip yapısının 4 °C’de 3. aya kadar hidrodinamik boyutunda değişiklik belirlenmedi. 6. ayda ise boyutun $188,4 \pm 103,4$ nm (pdi değeri:0,41) olduğu belirlendi. Dual-Lip yapısının 4°C’de 6. ayda bozulmaya başladığı

söylenbilir. 25 °C’de ise hidrokinamik boyut sonuçlarına göre, yapının 3. ayda $281 \pm 13,99$ nm (pdi:0,35), 6. ayda ise $300,4 \pm 29,1$ nm (pdi:0,54) boyutlu olduğu saptandı. Buna göre, Dual-Lip yapısı 3. ayda 4 °C’de daha iyi korunmuş olduğu söylenbilir. 6. ayda ise 25 °C’de boyutlardaki değışikliğin daha belirgin hale geldiği gözlandı.



Şekil 4.20. 4 °C ve 25 °C’de saklanan Dual-Lip yapısına ait zamana bağı hidrokinamik boyut değışimi grafiğı.

Etken madde miktarı tayini HPLC’de yapılmış olup, belirtilen aylarda HPLC ile lipozomdan salınan etken madde tespiti gerçekleştirilemedi.

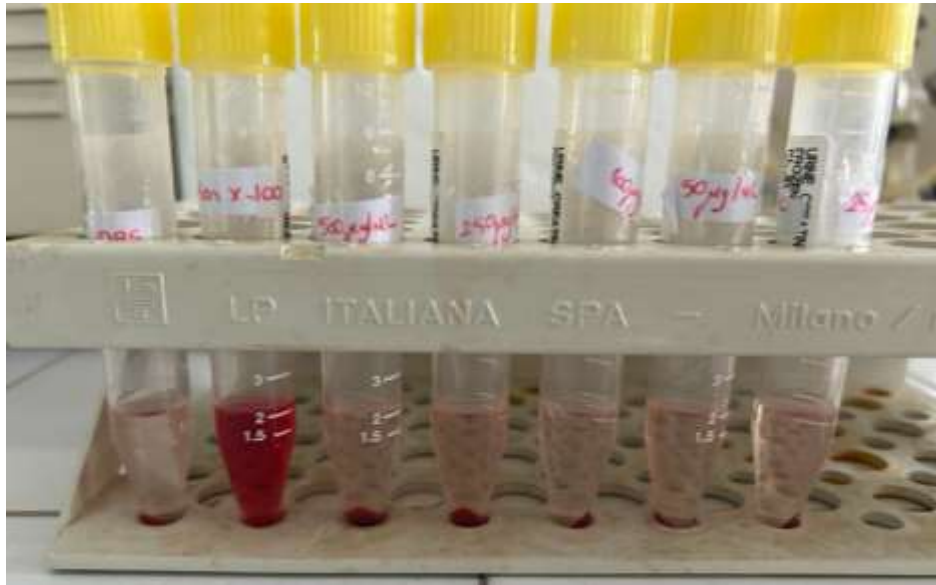
4.7. Hemoliz Deneyi

Boş ve dual ilaç içeren lipozomların 500; 250; 100; 50 ve 25 µg/mL’lik derişimlerine ait %hemoliz değeri çizelge 4.4’de görölmektedir.

Çizelge 4.4. Dual-Lip ve Boş-Lip'e ait %hemoliz değerleri.

Derişim (µg/mL)	% Hemoliz	
	Dual-Lip	Boş-Lip
500	≤5	≤5
250	≤5	≤5
100	≤5	Hemoliz yok
50	≤5	Hemoliz yok
25	≤5	Hemoliz yok

%10'dan düşük hemolitik aktivite materyalin intravenöz uygulamaya uygunluğunu göstermektedir. Bunun yanı sıra, %10'dan düşük hemoliz değeri materyalin hemolitik olmadığını gösterirken %5'ten düşük hemoliz değeri, hemoliz yok olarak kabul edilir (145),(146),(147). Bu nedenle hazırlanan dual ilaç yüklü lipozomal sistemin intravenöz uygulamaya uygun biyoyumlu bir formülasyon olduğu ifade edilebilir (Şekil 4.21).

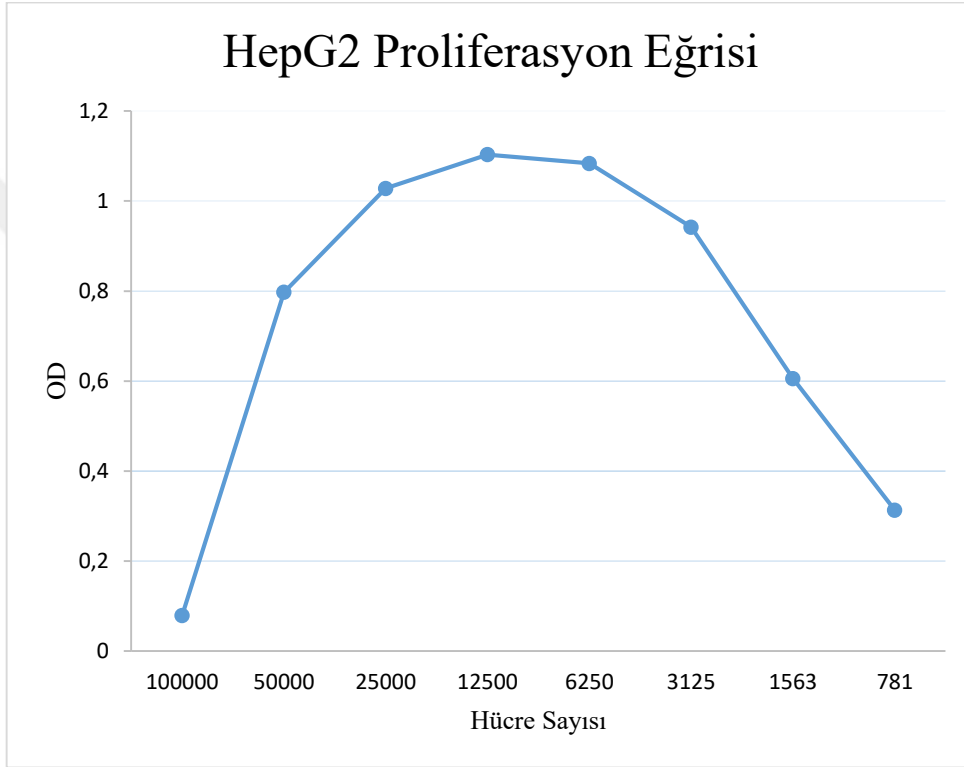


Şekil 4.21. Dual-Lip hemoliz deneyi; sırasıyla negatif kontrol (PBS), pozitif kontrol (Triton-x-100), 500; 250; 100; 50 ve 25 µg/mL Dual-Lip.

4.8. Hücre Kültürü Çalışmaları

4.8.1. HepG2 Hücre Hattı Proliferasyon Deneyi

HepG2 hücre hattına dair gerçekleştirilen proliferasyon deneyi sonucu sitotoksisite deneylerinde kullanılacak hücre sayısı kuyucuk başına 10^4 hücre olacak şekilde belirlendi (Şekil 4.22).



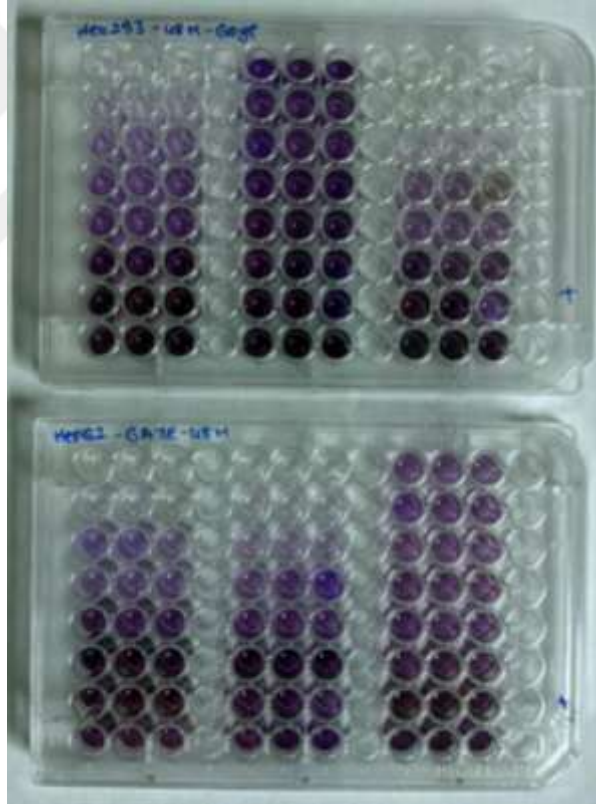
Şekil 4.22. HepG2 hücre hattı proliferasyon eğrisi.

Seri seyreltmeler ile kuyucuklara ekilen hücre sayısına bağlı olarak MTT testi sonucu elde edilen optik dansite (OD, absorbans) değerleri Şekil 4.22’de görülmektedir. Buna göre hücre sayısı 12500 iken hücre canlılığı pik (OD değeri: 1,1033) yapmaktadır. Daha yüksek ve daha düşük hücre sayılarında hücre canlılığı daha azdır. Bu durum, 10000-780 aralığında hücre bulunan kuyucuklarda hücre sayısının azlığından, 12500 hücre sayısının üstünde ise çeşitli nedenlerle hücre ölümlerinin gerçekleşmesine bağlı hücre sayısının azalmasından kaynaklanmaktadır. Bu nedenle hücre sayısının pik yaptığı 12500 değeri ile en yakın OD değeri olan 6250 hücre sayısı (OD değeri: 1,0837) arasında

olacak şekilde bir değer alınarak, kuyucuk başına düşen hücre sayısı 10000 olarak belirlendi. Kuyucuk başına hücre sayısı belirlemede hücre sayısına bağlı ölçülen OD değerinin 0,75-1,25 aralığında olması gerekmektedir (148),(149).

4.8.2. Sitotoksosite Deneyleri

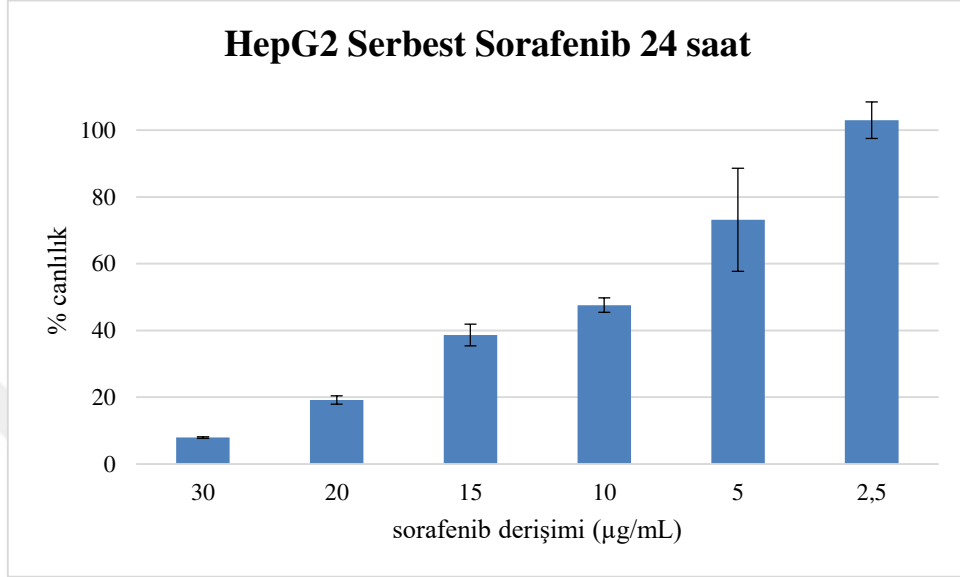
Sorafenib ve vismodegib ilaçlarının hepatoselüler karsinom (HepG2) hücre hattı ve insan normal embriyonik böbrek (HEK293) hücre hattı üzerinde tek tek ve beraber oluşturdıkları sitotoksik etki incelenmiş olup bu ilaçların taşıyıcı sisteme yüklenmesi durumunda meydana getirdikleri sitotoksosite de 24, 48 ve 72 saat sürelerde MTT canlılık testi ile belirlendi. MTT testi sonrası mikropılaka görünümü Şekil 4.23'te görölmektedir.



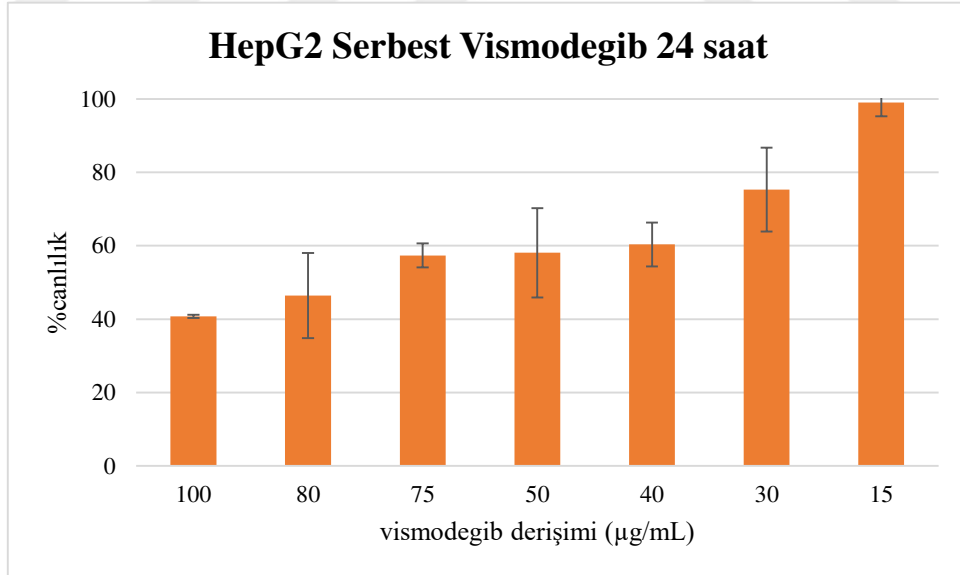
Şekil 4.23. MTT canlılık testi sonrası formazon kristallerinin DMSO ile çözölmesiyle oluşan rengin mikropılakalardaki görseli.

Serbest halde (taşıyıcı sisteme yüklenmeden) sorafenib ilacının HepG2 hücre hattı üzerinde sitotoksik etkinliğinin serbest haldeki vismodegibe göre daha fazla olduğu ve zamana bağlı olarak her iki ilacın da sitotoksitesinin arttığı gözlemlendi. Bununla birlikte,

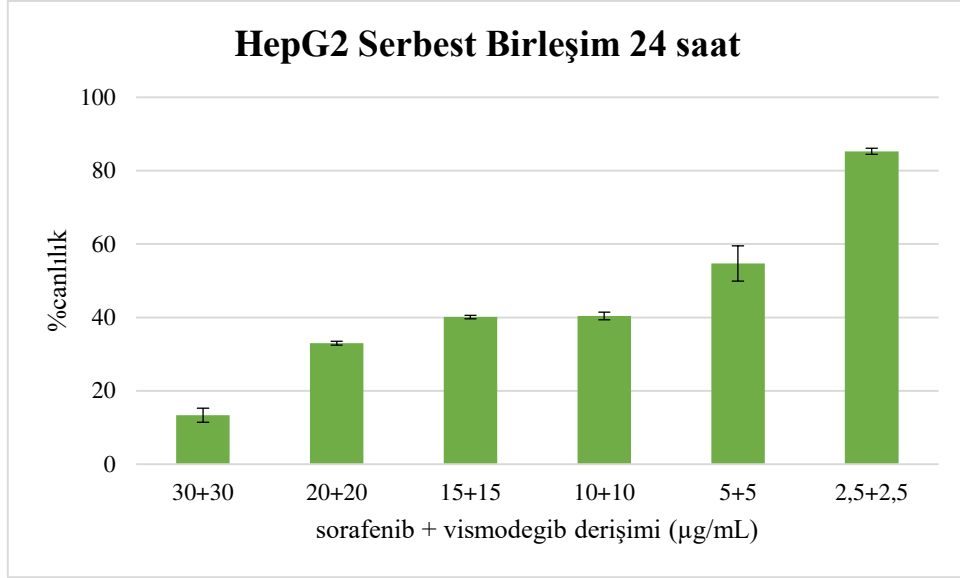
iki ilacın birleşimi halinde tek tek yarattıkları sitotoksik etkiden daha fazla sitotoksiste meydana getirdikleri saptandı (Şekil 4.24-4.32).



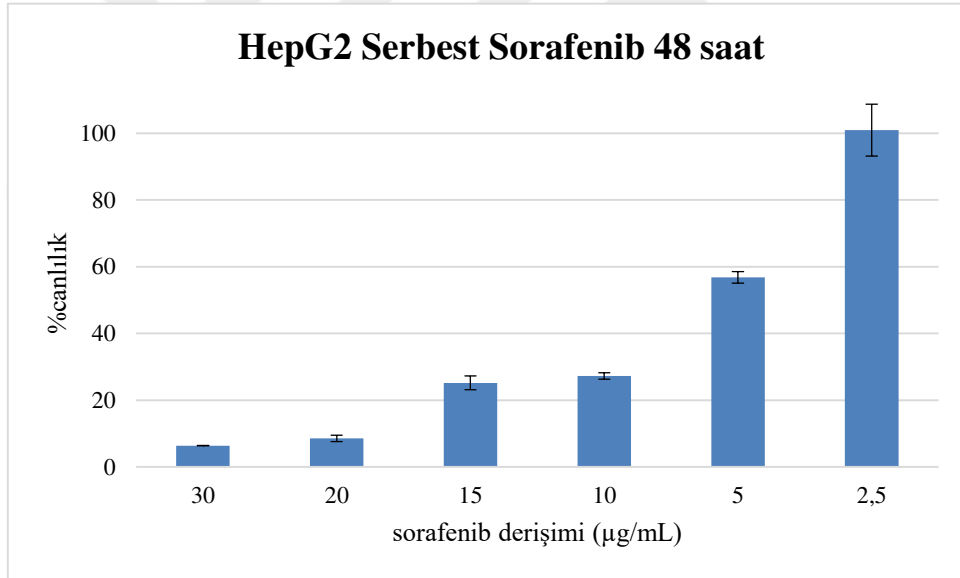
Şekil 4.24. Sorafenibin HepG2 hücrelerine 24 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiğı.



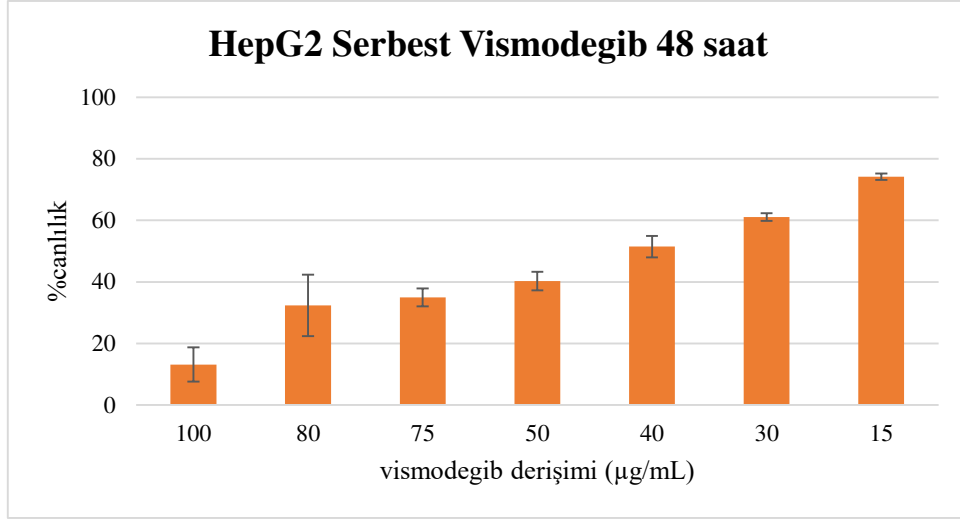
Şekil 4.25. Vismodegibin HepG2 hücrelerine 24 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiğı.



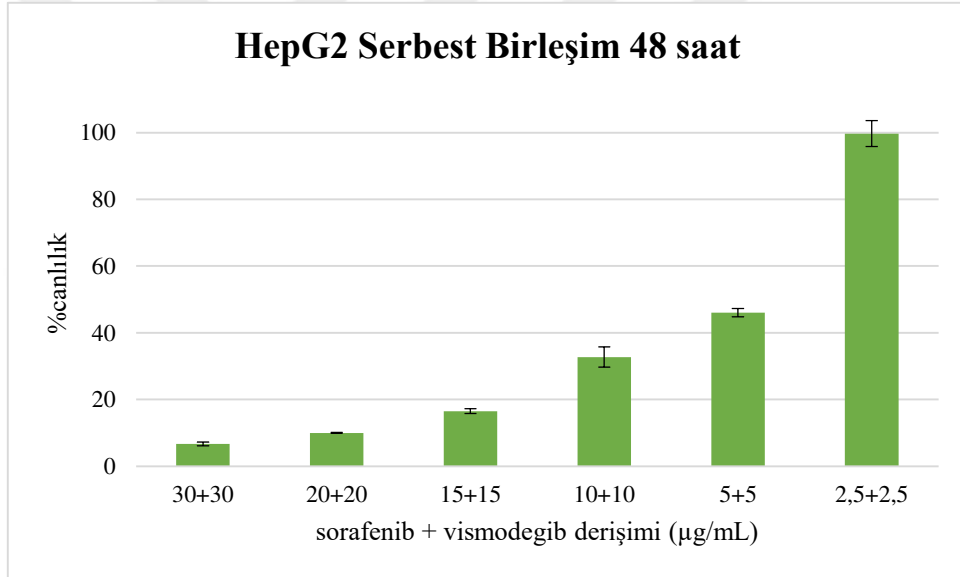
Şekil 4.26. Serbest ilaç birleşiminin HepG2 hücrelerine 24 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiğı.



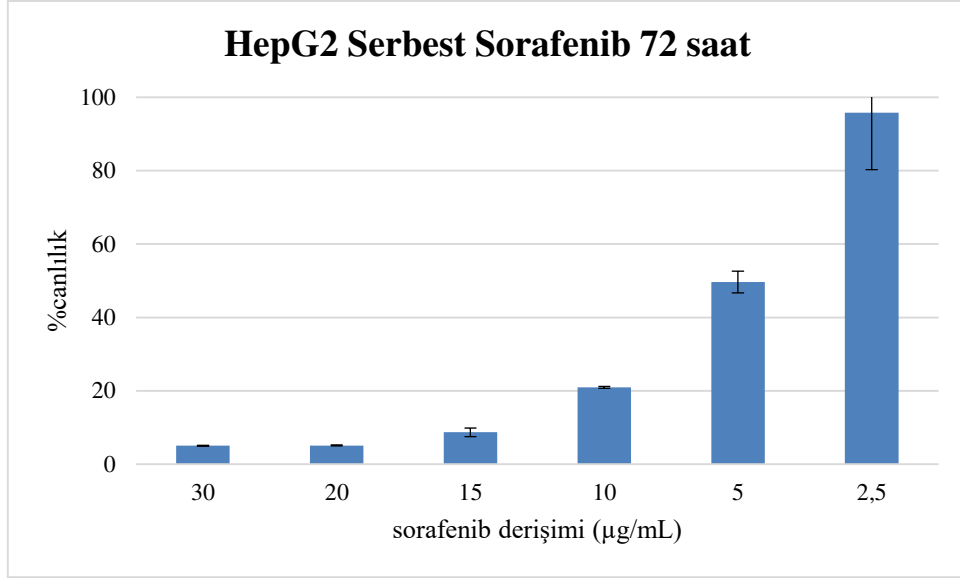
Şekil 4.27. Sorafenibin HepG2 hücrelerine 48 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiğı.



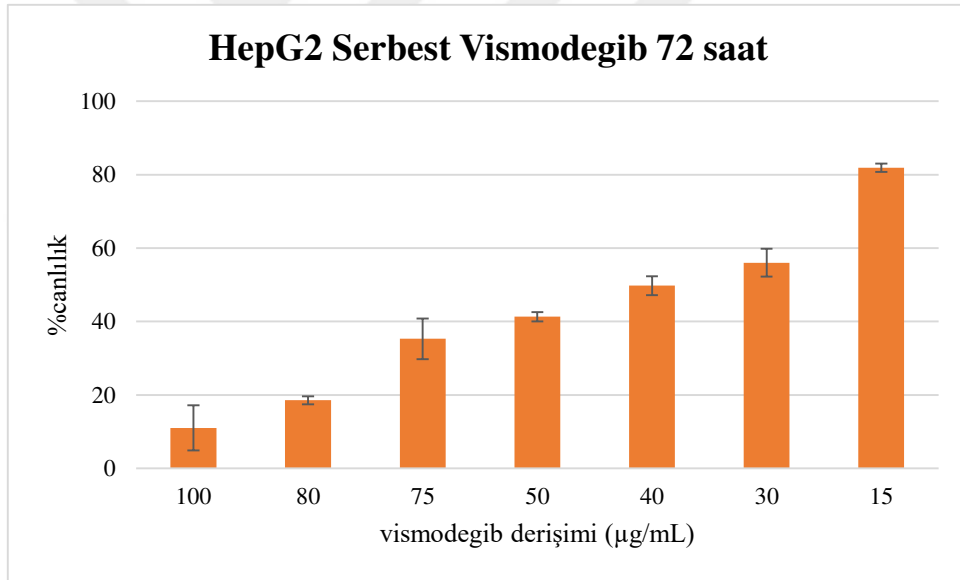
Şekil 4.28. Vismodegibin HepG2 hücrelerine 48 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiğı.



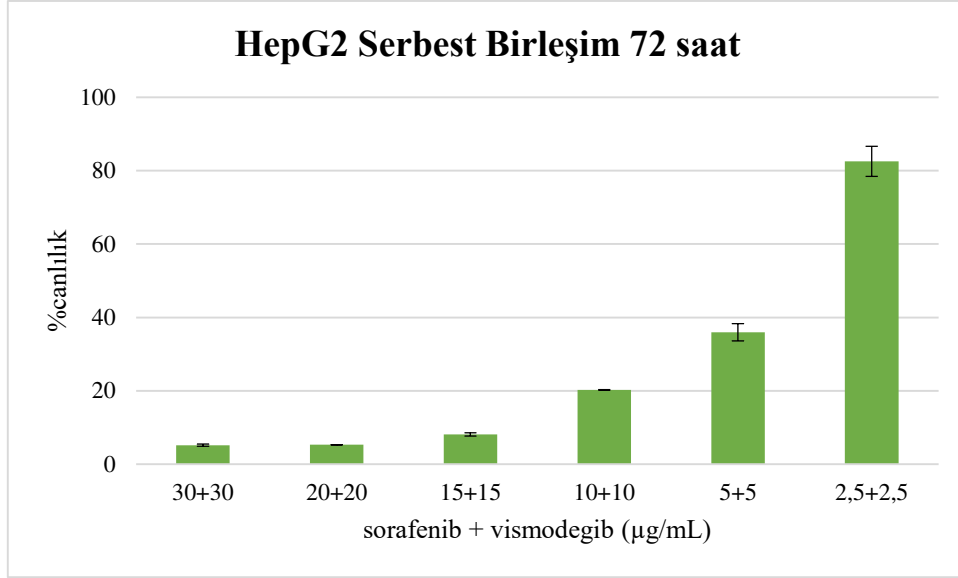
Şekil 4.29. Serbest ilaç birleşiminin HepG2 hücrelerine 48 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiğı.



Şekil 4.30. Sorafenibin HepG2 hücrelerine 72 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiğı.



Şekil 4.31. Vismodegibin HepG2 hücrelerine 72 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiğı.



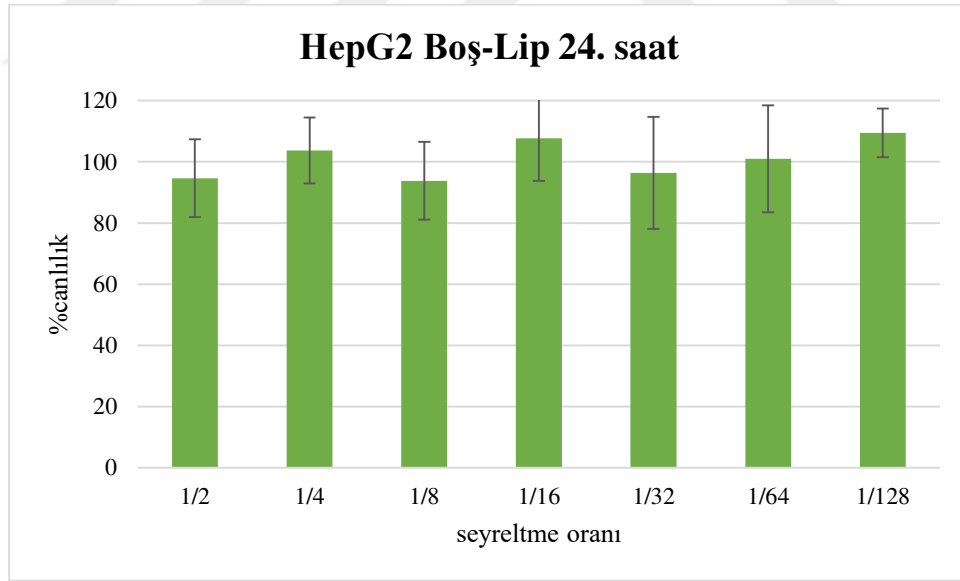
Şekil 4.32. Serbest ilaç birleşiminin HepG2 hücrelerine 72 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiği.

Sitotoksite analizleri sonrasında HepG2 hücre hattı üzerinde, serbest ilaçlar için hesaplanan IC_{50} değerleri çizelge 4.5’ te görülmektedir. Buna göre vismodegibin IC_{50} değeri tek başına uygulandığında 24., 48. ve 72. saatler için sırasıyla $73,7 \pm 15,7$; $39,4 \pm 2,7$ ve $38,3 \pm 1,5$ µg/mL’dir. Sorafenibin tek başına uygulandığında IC_{50} değeri ise 24., 48. ve 72. saatler için sırasıyla $9,99 \pm 0,87$; $6,72 \pm 0,29$ ve $5,47 \pm 0,22$ µg/mL’dir. Birleşim halinde ilaçların IC_{50} değerleri $8,08 \pm 0,35$; $6,12 \pm 0,10$ ve $4,41 \pm 0,15$ µg/mL’dir. İlaçların tek tek ve birleşim halindeki IC_{50} değerinde zamana bağlı olarak düşüş olduğu belirlendi ($p < 0,05$). Aynı zamanda hem vismodegibin hem de sorafenibin IC_{50} değerleri birbirleriyle kombine edildiğinde belirgin ölçüde azalmaktadır ($p < 0,05$). Bu durum ilaçların HepG2 hücre hattı üzerindeki sinerjik etkisini gözler önüne sermektedir.

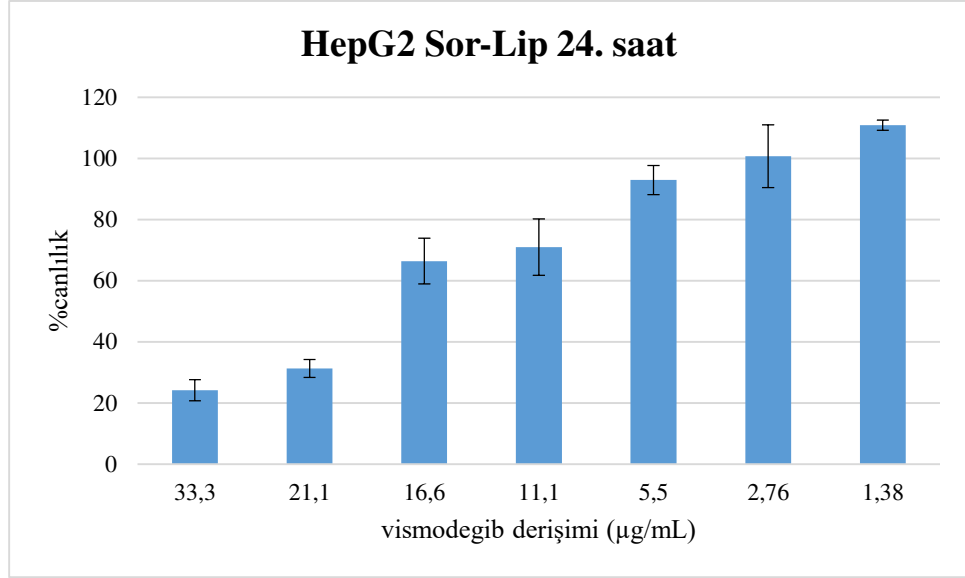
Çizelge 4.5. HepG2 hücre hattı serbest ilaçlara dair IC_{50} (µg/mL) değerleri (n = 3).

	Sorafenib $\bar{x} \pm SD$	Vismodegib $\bar{x} \pm SD$	Serbest Birleşim (sorafenib ve vismodegib) $\bar{x} \pm SD$
24. saat	$9,99 \pm 0,87$	$73,7 \pm 15,7$	$8,08 \pm 0,35$
48. saat	$6,72 \pm 0,29$	$39,4 \pm 2,7$	$6,12 \pm 0,10$
72. saat	$5,47 \pm 0,22$	$38,3 \pm 1,5$	$4,41 \pm 0,15$

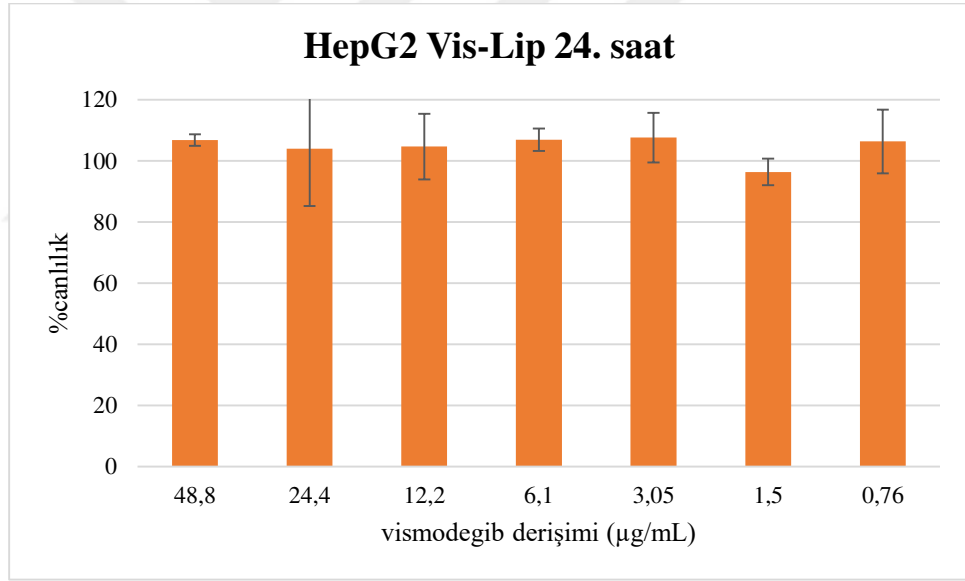
Lipozomal taşıyıcı sisteme yönelik sitotoksikite deneylerine göre, boş lipozom yapısı HepG2 hücre hattı üzerinde sitotoksik etki göstermedi. İlaçlar taşıyıcı sisteme tek tek ve beraber yüklendiklerinde HepG2 hücre hattı üzerinde meydana getirdikleri sitotoksik etkiye dair canlılık grafikleri Şekil 4.33-4.44'te görülmektedir. Sorafenibin taşıyıcı sisteme yüklendiğinde HepG2 hücre hattı üzerinde sitotoksik etkinliğinin yine lipozoma yüklü vismodegibe göre daha fazla olduğu belirlendi. Vismodegibin sitotoksik etkinliğinin lipozomal sisteme yüklenmesiyle artış göstermediği gözlemlendi. Ancak, bu iki ilaç beraber lipozomal sisteme yüklendiğinde tek tek lipozoma yüklü hallerinden daha fazla sitotoksikiteye neden olmaktadır. Bunun yanı sıra bu ilaçların kombine halde taşıyıcı sisteme yüklenmesiyle meydana getirdikleri sitotoksikite serbest halde kombine edildiklerinden daha fazladır. Sor-Lip ve Dual-Lip yapısının zamana bağlı olarak sitotoksik etkisinin arttığı da belirlendi. Sonuç olarak, iki ilacın hem sinerjik etkiye sahip olduğu hem de taşıyıcı sisteme yüklendiklerinde daha fazla sitotoksik etkiye neden olduğu saptandı.



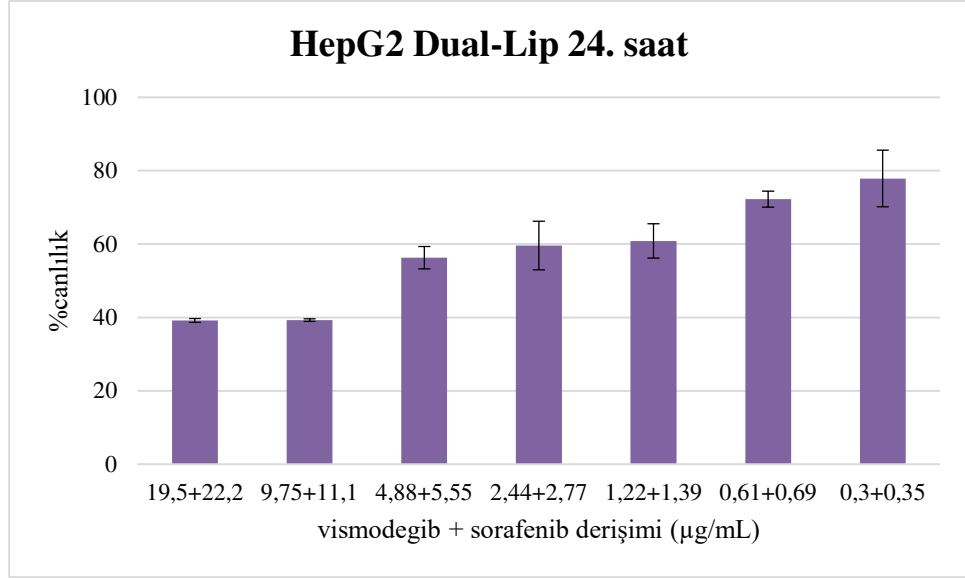
Şekil 4.33. Boş-Lip'in HepG2 hücrelerine 24 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiği.



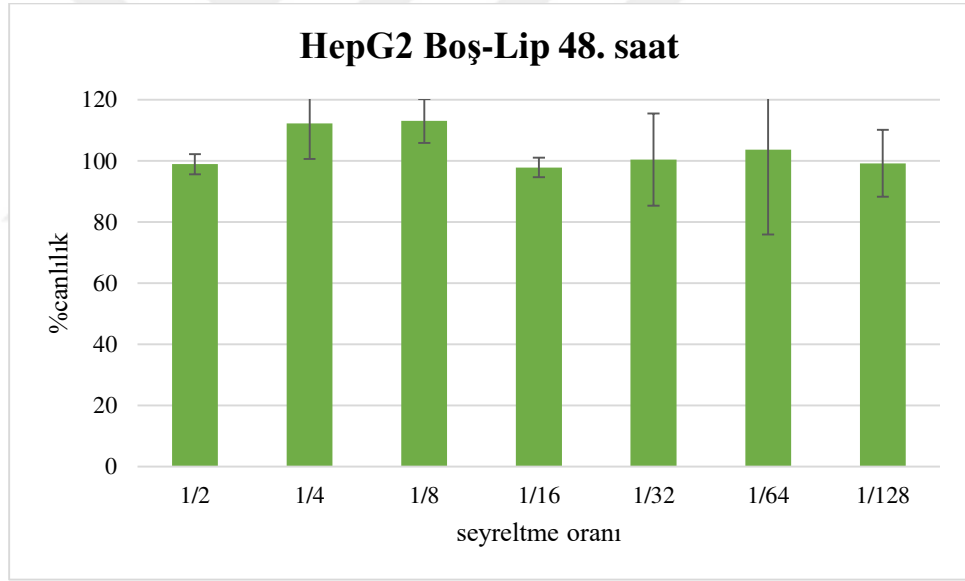
Şekil 4.34. Sor-Lip'in HepG2 hücrelerine 24 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiğı.



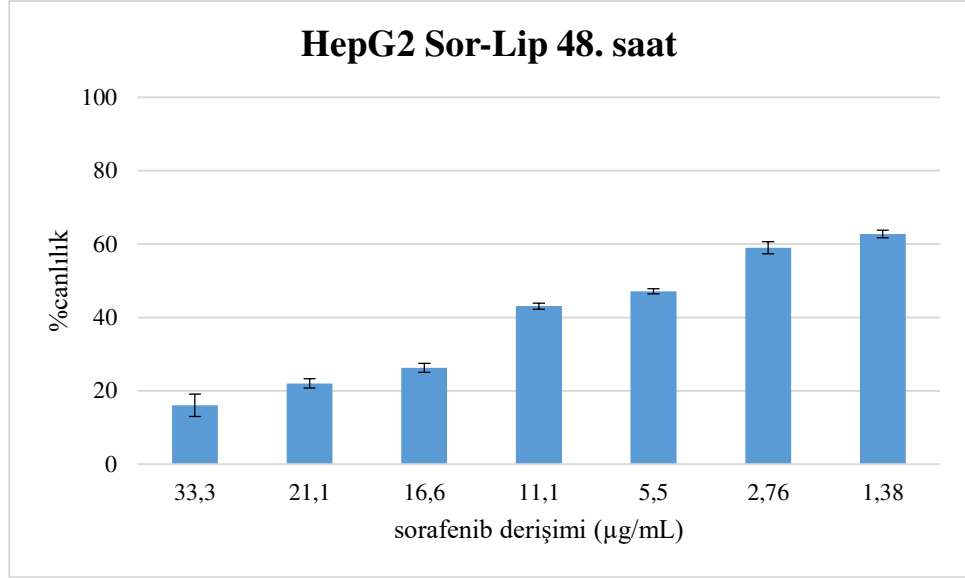
Şekil 4.35. Vis-Lip'in HepG2 hücrelerine 24 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiğı.



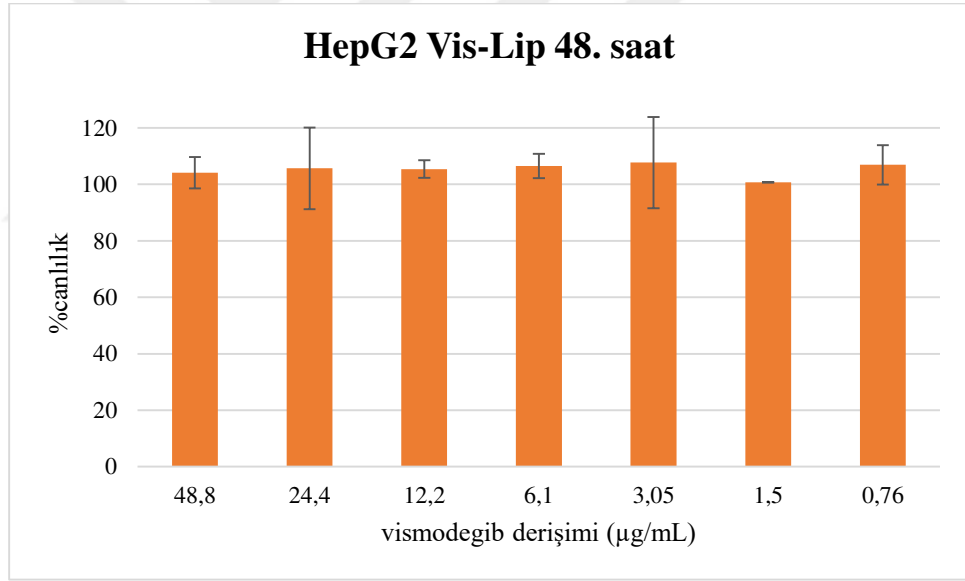
Şekil 4.36. Dual-Lip'in HepG2 hücrelerine 24 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiğı.



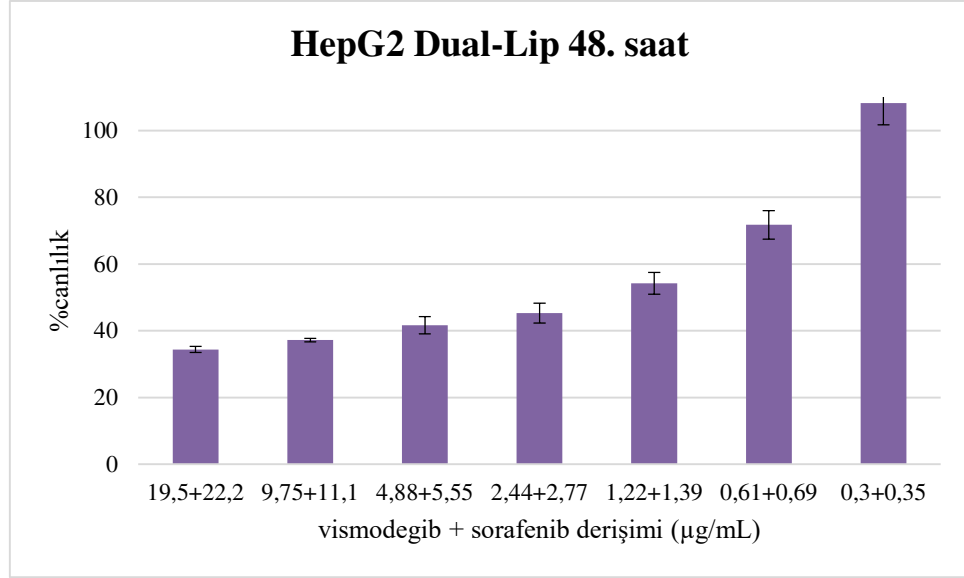
Şekil 4.37. Boş-Lip'in HepG2 hücrelerine 48 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiğı.



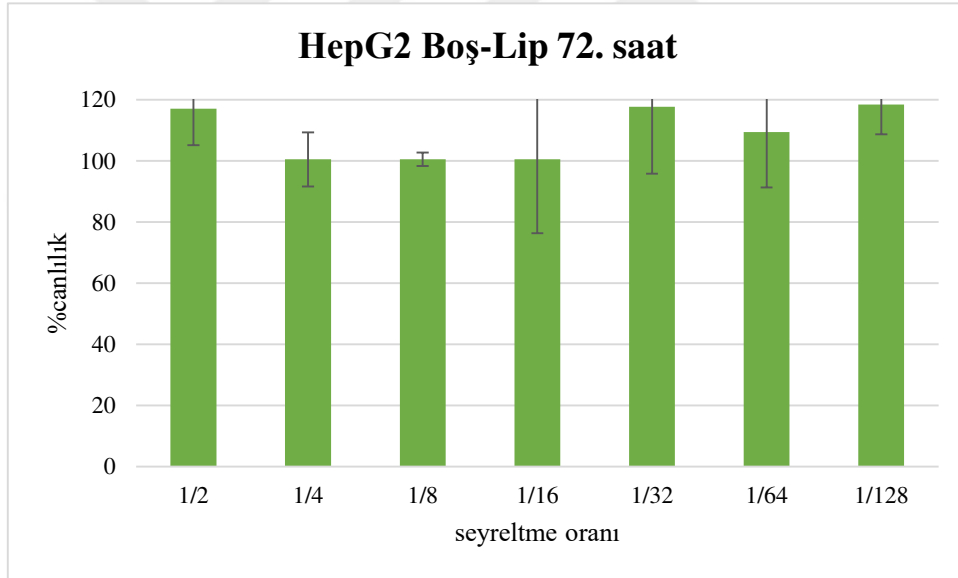
Şekil 4.38. Sor-Lip'in HepG2 hücrelerine 48 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiğı.



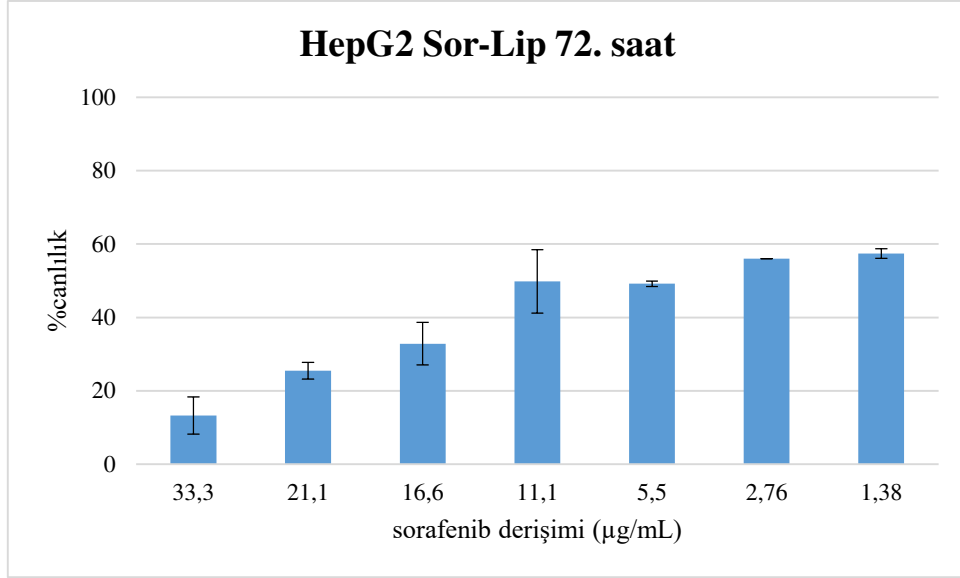
Şekil 4.39. Vis-Lip'in HepG2 hücrelerine 48 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiğı.



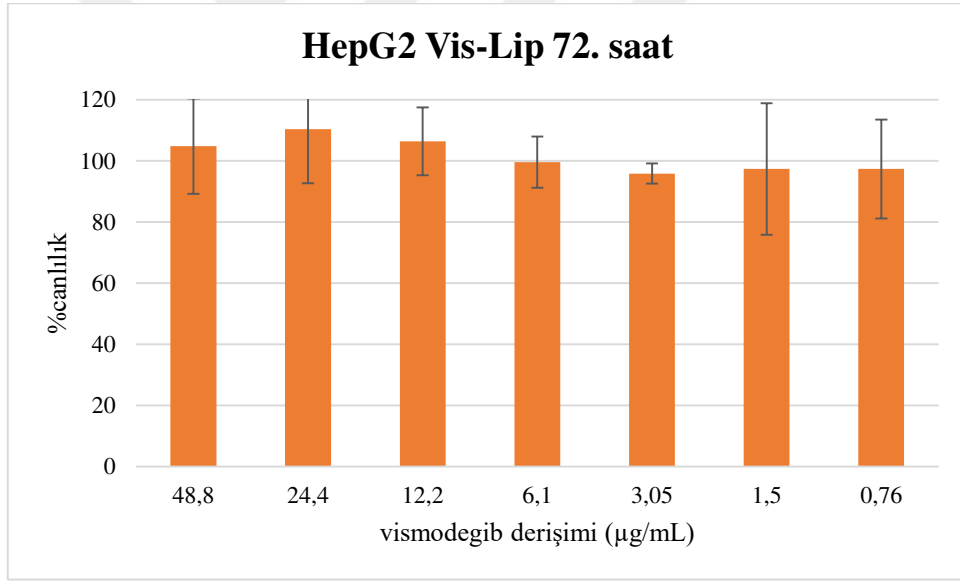
Şekil 4.40. Dual-Lip'in HepG2 hücrelerine 48 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiğı.



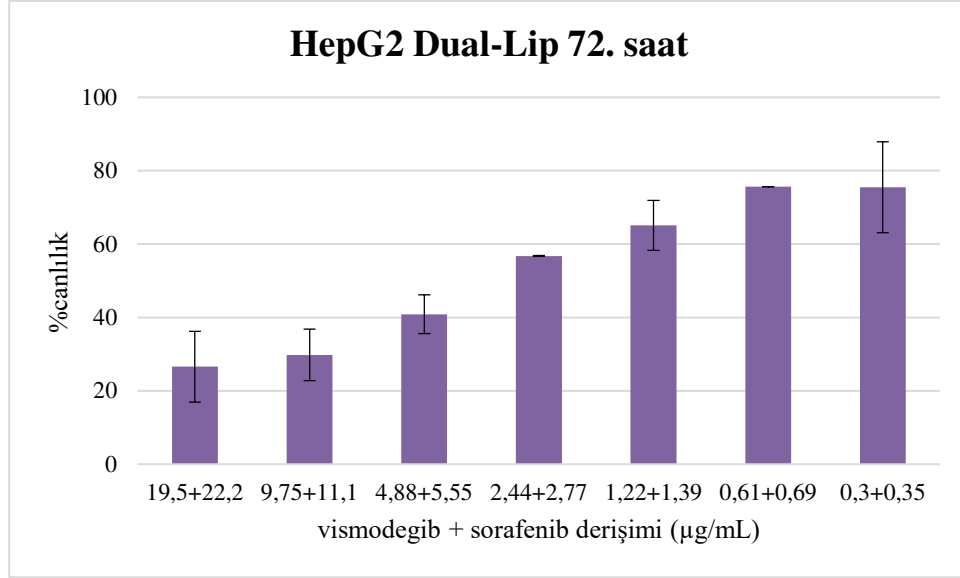
Şekil 4.41. Boş-Lip'in HepG2 hücrelerine 72 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiğı.



Şekil 4.42. Sor-Lip'in HepG2 hücrelerine 72 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiğı.



Şekil 4.43. Vis-Lip'in HepG2 hücrelerine 72 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiğı.



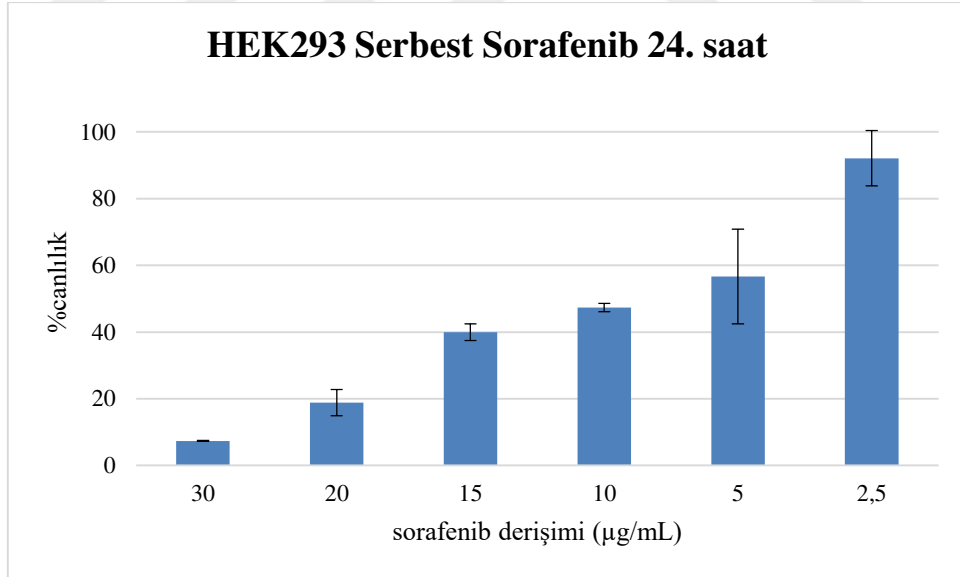
Şekil 4.44. Dual-Lip'in HepG2 hücrelerine 72 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiğı.

Sitotoksosite analizleri sonrasında lipozomal sistemler için hesaplanan IC_{50} değerleri çizelge 4.6'da görölmektedir. Buna göre Sor-Lip'in IC_{50} değeri tek başına uygulandığında 24., 48. ve 72. saatler için sırasıyla $18,24 \pm 1,32$; $4,2 \pm 0,17$ ve $4,07 \pm 0,5$ $\mu\text{g/mL}$ 'dir. Vis-Lip'in IC_{50} değeri ise her üç saat için de 48 $\mu\text{g/mL}$ 'den büyüktür. Dual-Lip yapısının 24., 48. ve 72. saat IC_{50} değerleri ise sırasıyla, sorafenib için; $6,34 \pm 1,54$; $3,81 \pm 0,11$ ve $3,22 \pm 0,52$ $\mu\text{g/mL}$ iken, vismodegib için; $5,61 \pm 1,33$; $3,37 \pm 0,1$ ve $2,87 \pm 0,45$ $\mu\text{g/mL}$ 'dir. İlaçların lipozomal sisteme dual olarak yüklenmesi ile elde edilen IC_{50} değerleri serbest birleşim halinde uygulanmalarından daha düşüktür ($p < 0,05$). Ancak Dual-Lip yapısının 24. saatteki IC_{50} değeri, 48. ve 72. saatlerdeki IC_{50} değerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek iken ($p < 0,05$), 48. ve 72. saatlerdeki değerler istatistiksel olarak farklı bulunmadı ($p > 0,05$). Hem vismodegibin hem de sorafenibin IC_{50} değerleri, birbirleriyle kombine edilip lipozomal sisteme yüklendiğinde azalmaktadır ($p < 0,05$). Ancak bu durum vismodegib için daha belirgindir.

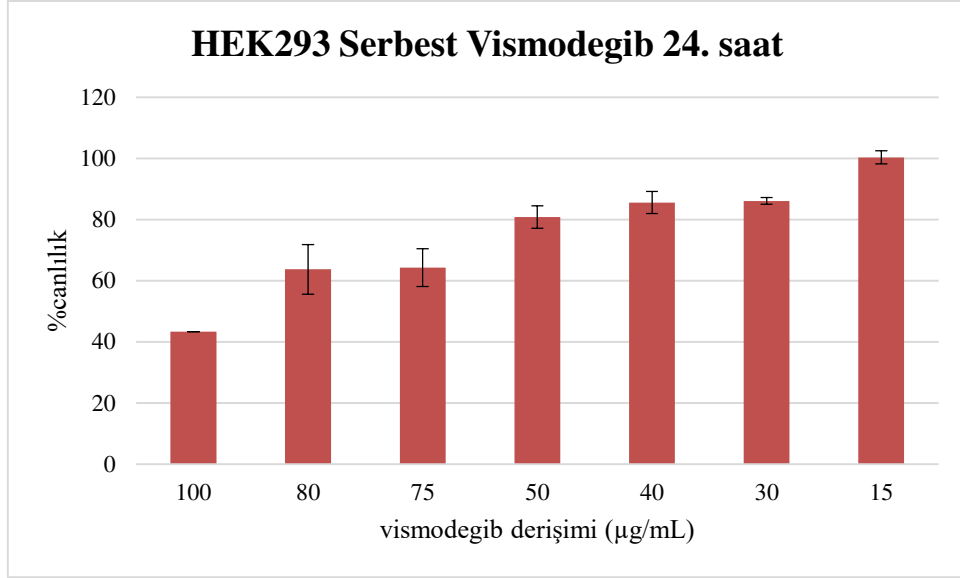
Çizelge 4.6. HepG2 hücre hattı lipozomal sistemlere dair IC₅₀ (µg/mL) değerleri (n = 3).

	Sor-Lip $\bar{X} \pm SD$	Vis-Lip $\bar{X} \pm SD$	Dual-Lip (sorafenib) $\bar{X} \pm SD$	Dual-Lip (vismodegib) $\bar{X} \pm SD$
24. saat	18,24 ± 1,32	> 48,8	6,34 ± 1,54	5,61 ± 1,33
48. saat	4,2 ± 0,17	> 48,8	3,81 ± 0,11	3,37 ± 0,1
72. saat	4,07 ± 0,5	> 48,8	3,22 ± 0,52	2,87 ± 0,45

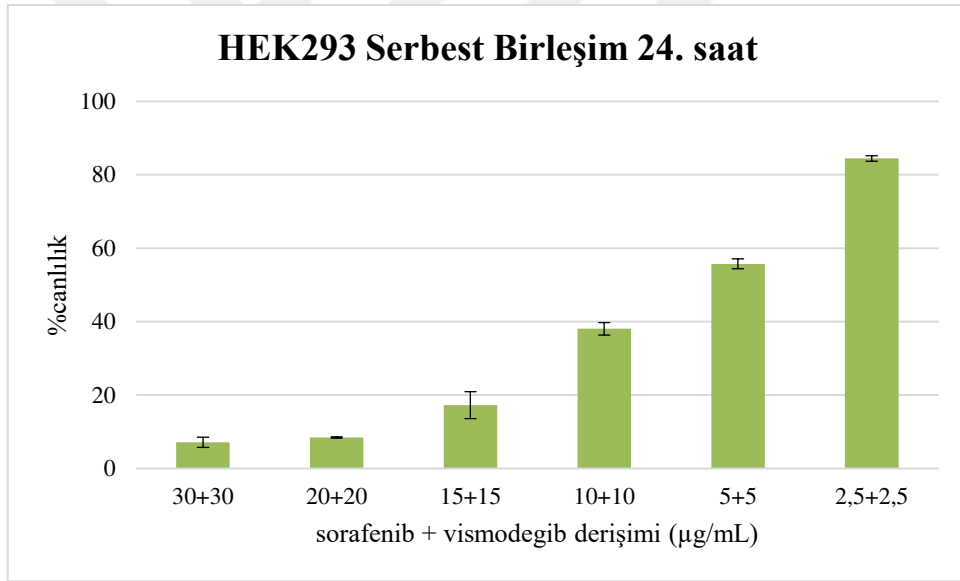
Serbest halde (taşıyıcı sisteme yüklenmeden) sorafenib ilacının HEK293 hücre hattı üzerinde, HepG2 hücre hattındaki sonuçlara benzer şekilde, sitotoksik etkinliğinin serbest haldeki vismodegibe göre daha fazla olduğu ve zamana bağlı olarak gözlemlendi. İki ilacın birleşimi halinde tek tek yarattıkları sitotoksik etkiden çok daha fazla sitotoksikite meydana getirdikleri, hatta bu sitotoksik etkinin HepG2 hücre hattından daha fazla olduğu saptandı (Şekil 4.45-4.53). Bu sonuçlara göre, serbest haldeki ilaçlar, sağlıklı insan hücreleri üzerinde belirgin bir sitotoksikiteye sahip olduğu belirlendi.



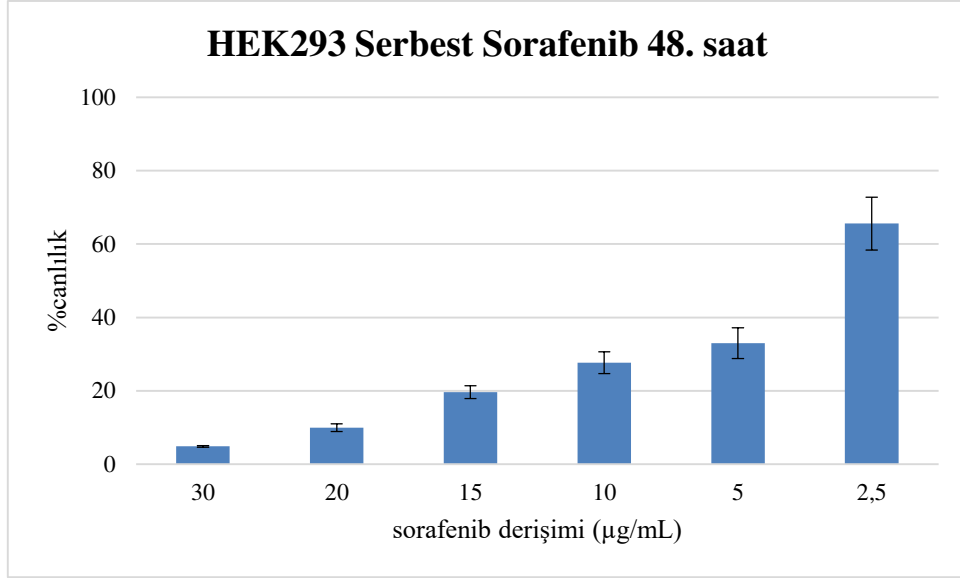
Şekil 4.45. Sorafenibin HEK293 hücrelerine 24 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiği.



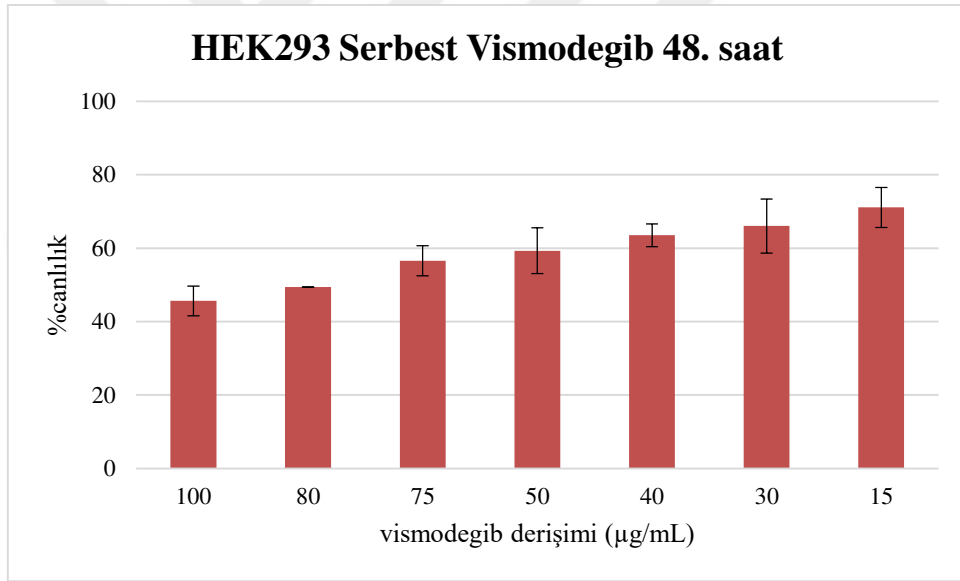
Şekil 4.46. Vismodegibin HEK293 hücrelerine 24 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiğı.



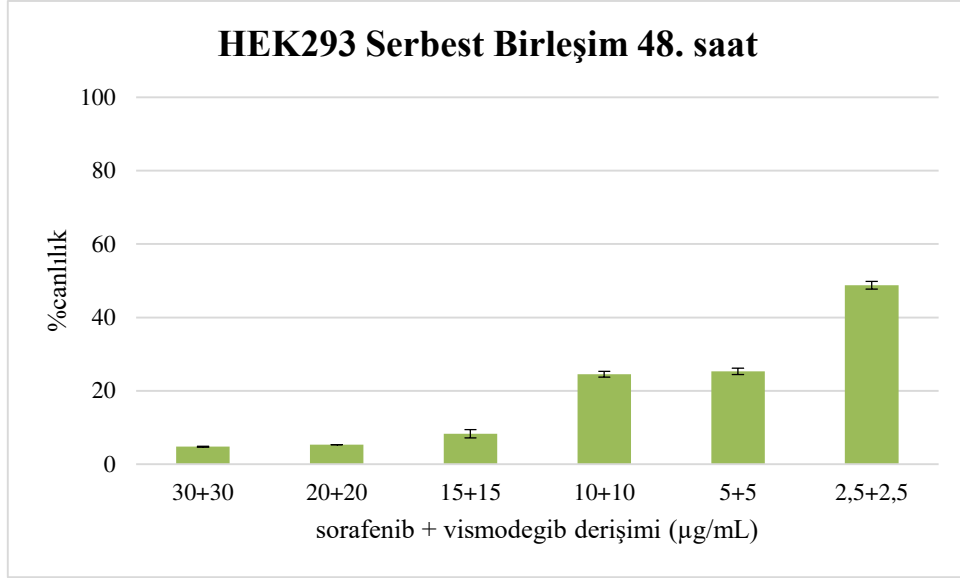
Şekil 4.47. Serbest ilaç birleşiminin HEK293 hücrelerine 24 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiğı.



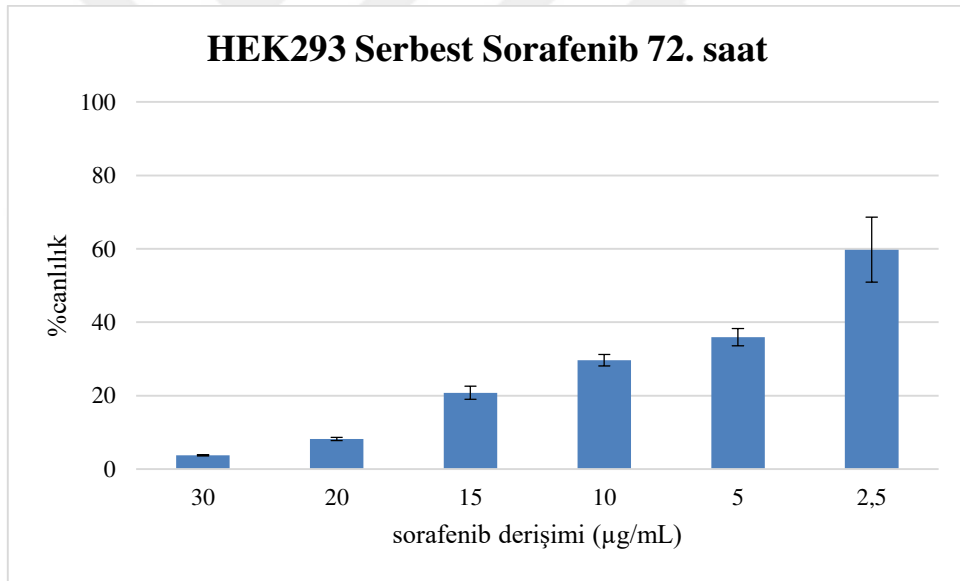
Şekil 4.48. Sorafenibin HEK293 hücrelerine 48 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiğı.



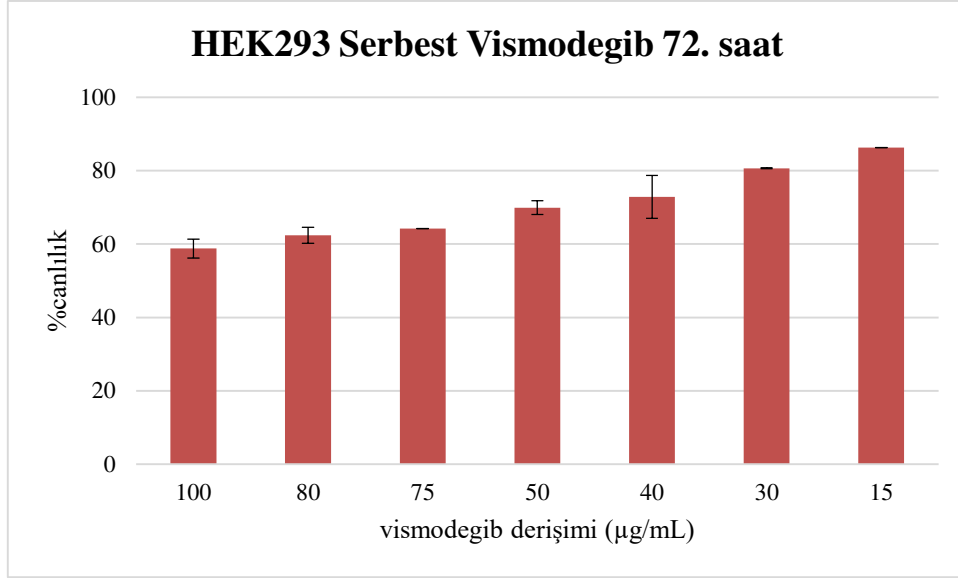
Şekil 4.49. Vismodegibin HEK293 hücrelerine 48 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiğı.



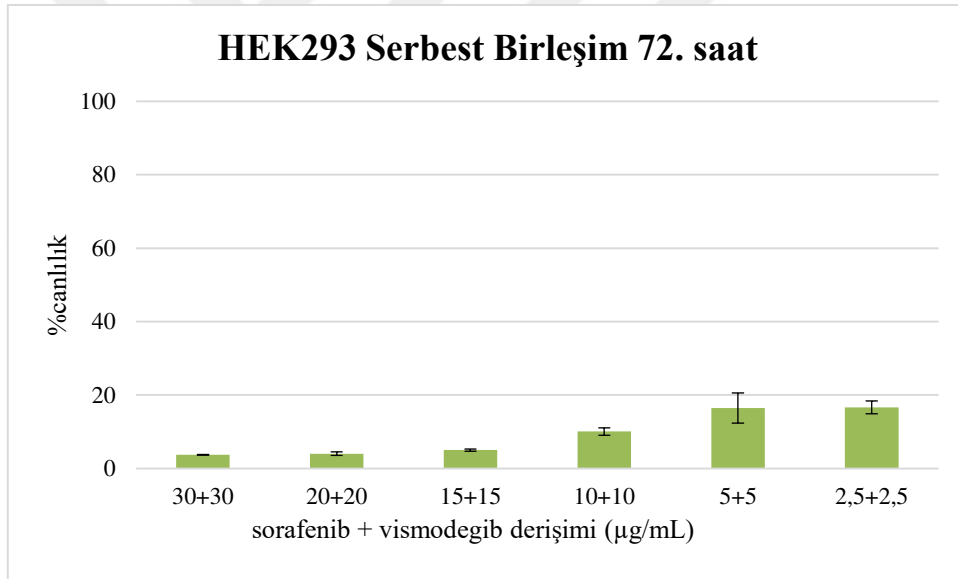
Şekil 4.50. Serbest ilaç birleşiminin HEK293 hücrelerine 48 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiğı.



Şekil 4.51. Sorafenibin HEK293 hücrelerine 72 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiğı.



Şekil 4.52. Vismodegibin HEK293 hücrelerine 72 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiğı.



Şekil 4.53. Serbest ilaç birleşiminin HEK293 hücrelerine 72 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiğı.

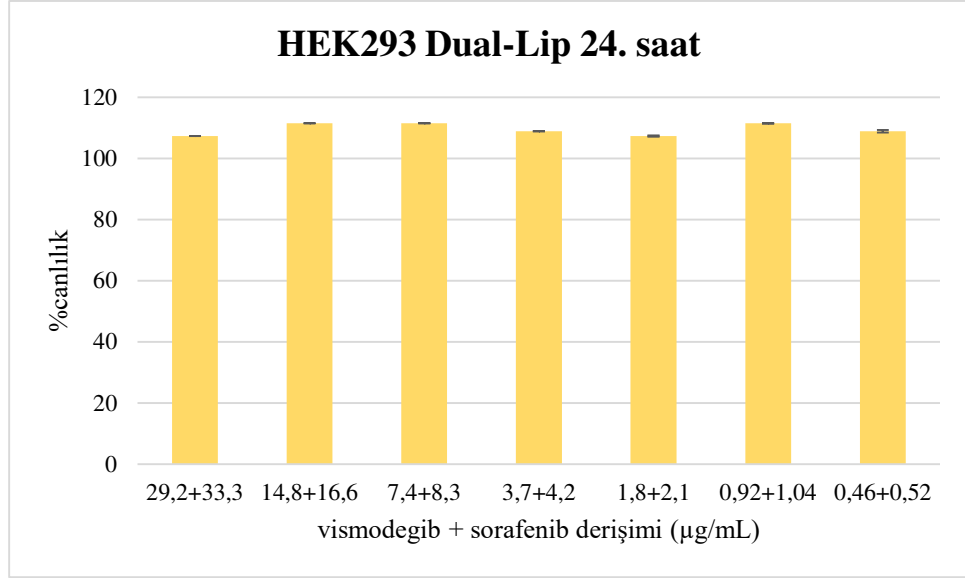
Sitotoksosite analizleri sonrasında HEK293 hücre hattı üzerinde serbest ilaçlar için hesaplanan IC_{50} değerleri çizelge 4.7’de görülmektedir. Buna göre vismodegibin IC_{50} değeri tek başına uygulandığında 24., 48. ve 72. saatler için sırasıyla $96,2 \pm 7,3$; $90,7 \pm 14,7$ ve >100 µg/mL’dir. Sorafenibin tek başına uygulandığında IC_{50} değeri ise 24., 48. ve 72. saatler için sırasıyla $8,39 \pm 1,55$; $3,7 \pm 0,72$ ve $3,48 \pm 0,69$ µg/mL’dir. Birleşim halinde ilaçların IC_{50} değerleri $6,33 \pm 0,11$; $2,31 \pm 0,09$ ve $0,26 \pm 0,07$ µg/mL’dir. İlaçların

sağlıklı hücreler üzerindeki öldürücü etkisi sitotoksosite analizleri sonucu ortaya konmuştur. Hatta sorafenib ilacının tek başına sağlıklı insan hücrelerine olan öldürücü etkisinin, karaciğer kanseri hücrelerine olan etkisinden 48. saat için 1,8 kat; 72. saat için 1,6 kat ve vismodegible birleşim halinde ise 48 saat için 2,6 kat; 72 saat için 17 kat fazladır.

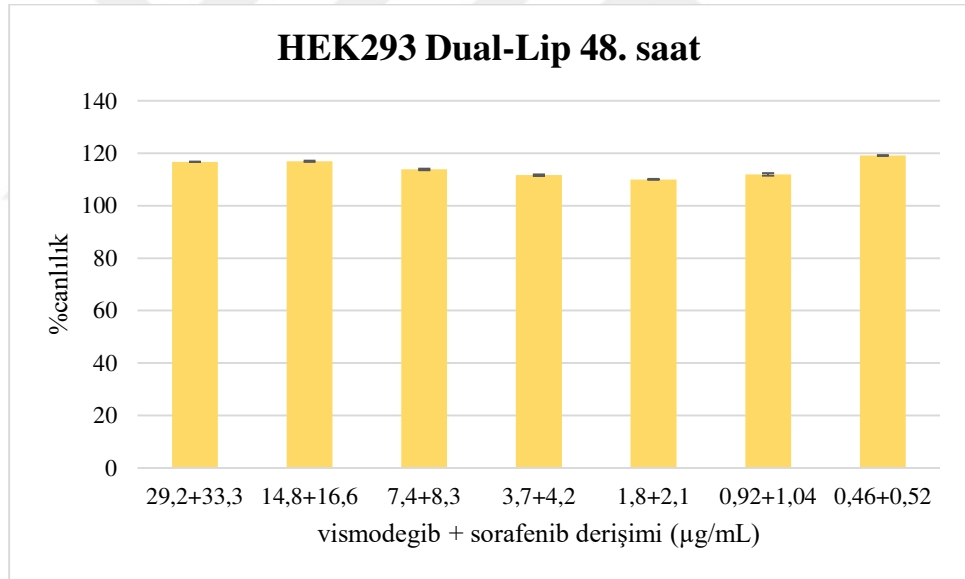
Çizelge 4.7. HEK293 hücre hattı serbest ilaçlara dair IC₅₀ (µg/mL) değerleri (n = 3).

	Sorafenib $\bar{x} \pm SD$	Vismodegib $\bar{x} \pm SD$	Serbest Birleşim (sorafenib ve vismodegib) $\bar{x} \pm SD$
24. saat	8,39 ± 1,55	96,2 ± 7,3	6,33 ± 0,11
48. saat	3,7 ± 0,72	90,7 ± 14,7	2,31 ± 0,09
72. saat	3,48 ± 0,69	>100	0,26 ± 0,07

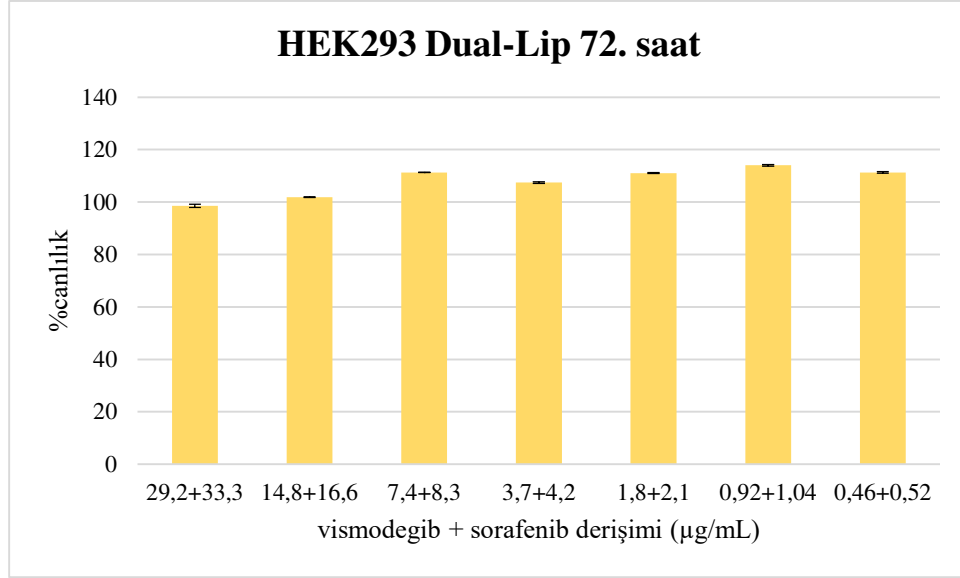
İlaçların tedavi etkinliğinin artırılmasının yanı sıra sağlıklı hücreler üzerindeki toksik etkilerinin azaltılması ilaç taşıma sistemlerinin ana amaçlarındandır. Serbest ilaçların lipozomal taşıma sistemine yüklenmesi sonrası HEK293 sağlıklı insan hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini gösteren grafikler şekil 4.54-4.56’da verilmiştir. Buna göre Dual-Lip yapısının HEK293 hücrelerinde sitotoksik etki göstermediği, hatta HepG2 hücrelerine uygulanandan daha yüksek dozda bile herhangi bir toksik etki yaratmadığı belirlendi. Sitotoksosite analizleri sonrasında HEK293 hücre hattı üzerinde Dual-Lip lipozomal sisteme yüklenmiş ilaçlar için IC₅₀ değerleri her üç saatte de sorafenib için; >33,3 µg/mL iken vismodegib için; >29,2 µg/ mL’dir.



Şekil 4.54. Dual-Lip'in HEK293 hücrelerine 24 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiğı.



Şekil 4.55. Dual-Lip'in HEK293 hücrelerine 48 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiğı.

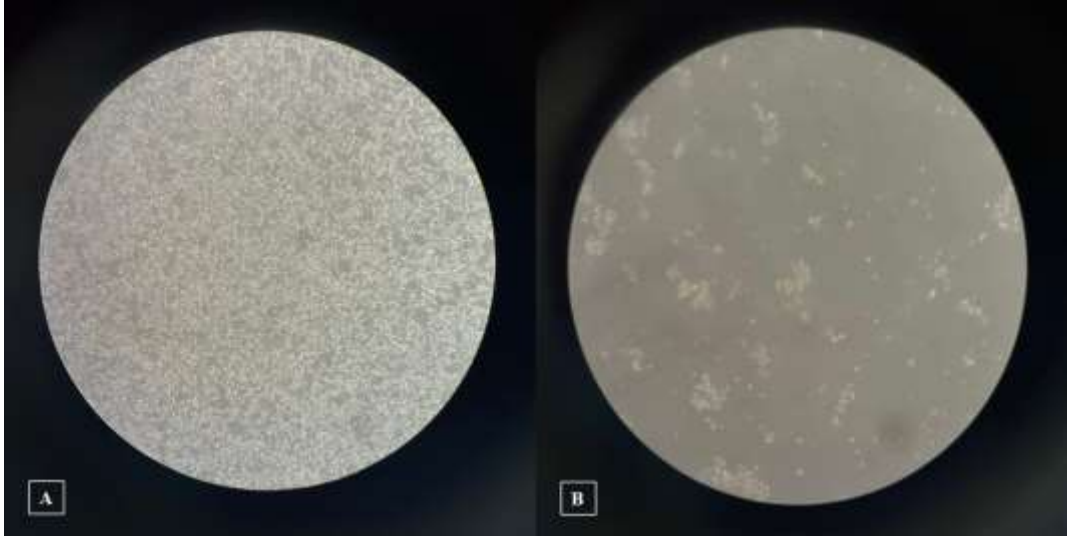


Şekil 4.56. Dual-Lip'in HEK293 hücrelerine 72 saat uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiğı.

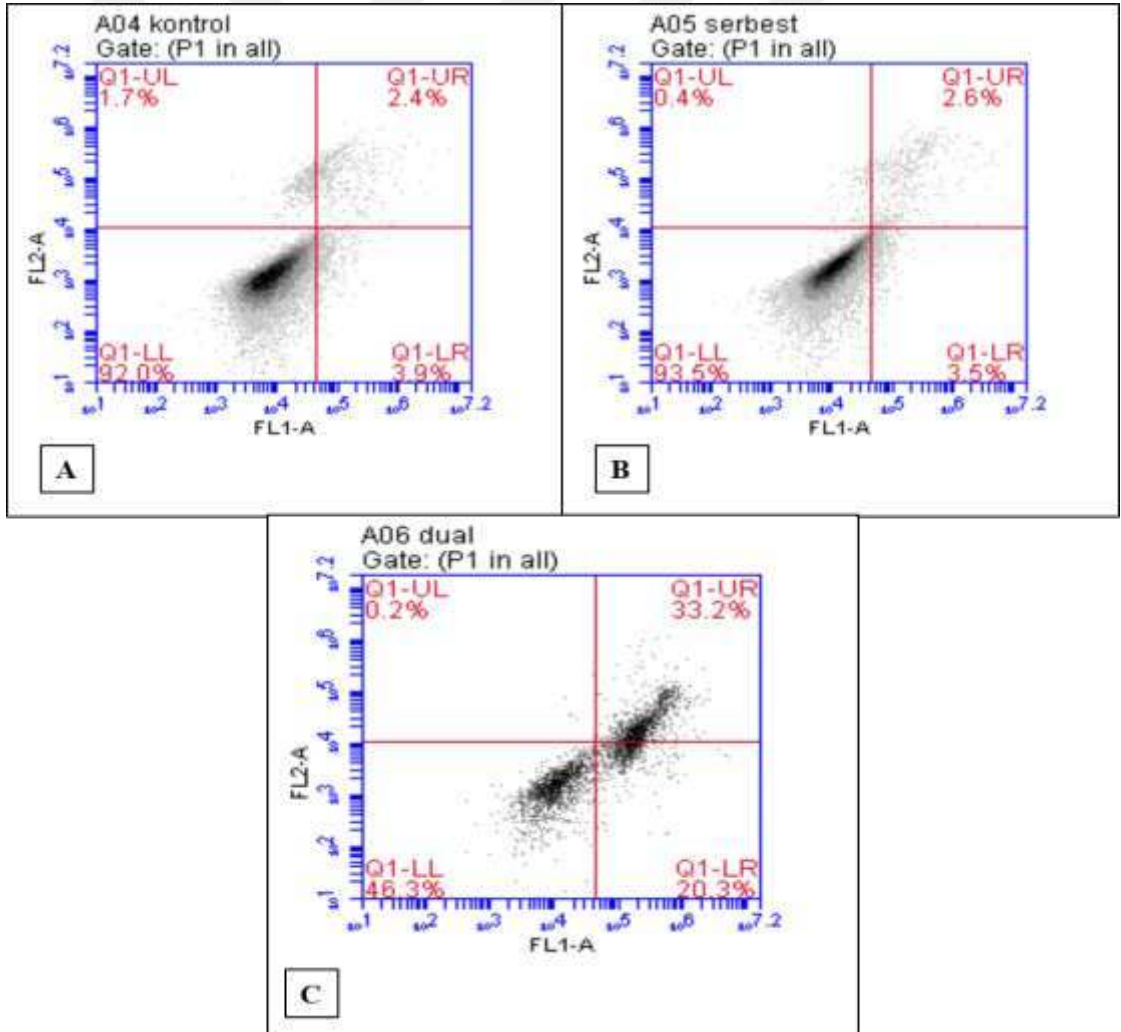
HepG2 ve HEK293 hücre hatları üzerinde serbest ilaçlar, birleşimleri ve lipozomal sisteme yüklenmiş ilaçlar ile tezin hipotezini oluşturan Dual-Lip yapısının sitotoksosite deneyi sonuçları değerlendirildiğinde, karaciğer kanseri tedavisinde kullanılan sorafenib ilacının, “Hedgehog” yolağı inhibitörü olan vismodegib ile sinerjik etki oluşturduğu ve bu nedenle karaciğer kanseri tedavisinde kombine halde kullanımının mümkün olduğu tespit edildi. Bununla birlikte bu ilaçların beraber lipozomal sisteme yüklenmesi sonucu karaciğer kanseri tedavisi için daha etkin bir hal aldığı belirlendi. Bunun yanı sıra serbest ilaçların sağlıklı insan hücreleri üzerinde güçlü öldürücü etkileri söz konusu iken, hazırlanan taşıma sisteminin sağlıklı hücrelerde toksisite yaratmadığı görüldü. Buna göre Dual-Lip yapısının karaciğer kanseri tedavisinde kullanılmak üzere, sorafenib ve vismodegib ilaçlarını beraber taşımak suretiyle sinerjik etkili, artırılmış ilaç etkinliğine sahip, sağlıklı dokulara zarar vermeyen bir formülasyon olduğu söylenebilir.

4.9. Apoptoz Deneyi

Serbest ilaç birleşiminin ve Dual-Lip yapısının apoptotik etkisi anneksin V-FITC/PI kiti ile 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonrası akış sitometresinde incelendi. Hücrelerin canlılık ile erken apoptoz/geç apoptoz/nekroz evrelerindeki yüzdesel miktarları belirlendi.

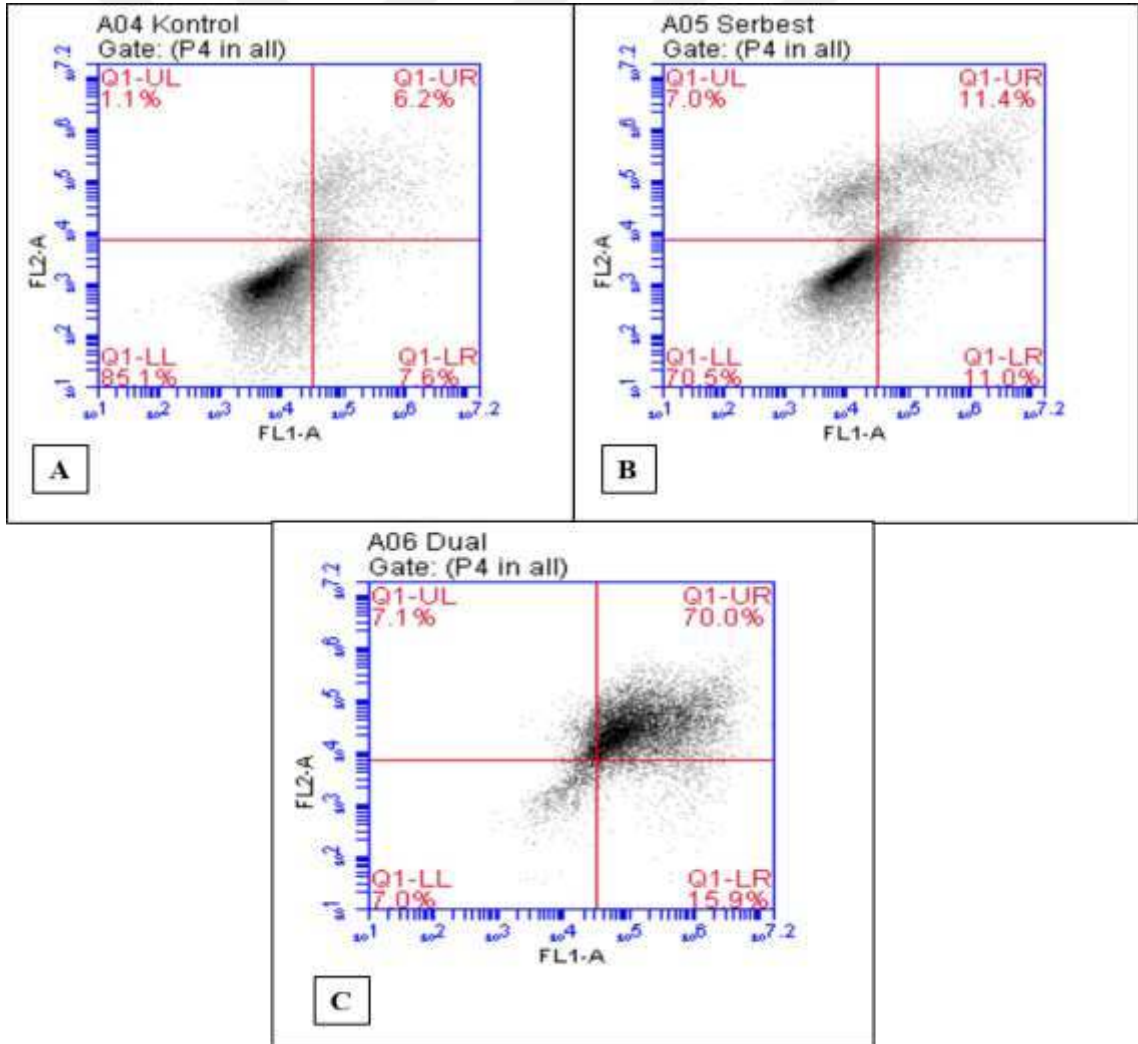


Şekil 4.57. 48 saat ilaç bileşimi uygulanan HepG2 hücrelerinin “inverted” mikroskop altındaki görüntüleri. A) serbest ilaç birleşimi uygulanan hücreler, B) Dual-Lip uygulanan hücreler.



Şekil 4.58. HepG2 hücrelerine ait 48. saat apoptoz deneyi akış sitometrisi analiz sonuçları. A) kontrol grubu B) serbest ilaç birleşimi grubu C) Dual-Lip grubu.

48. saat için; 3,812 $\mu\text{g/mL}$ sorafenib ve 3,366 $\mu\text{g/mL}$ vismodegib içeren dual lipozom ve 6,108 $\mu\text{g/mL}$ sorafenib ve vismodegib içeren serbest ilaç birleşimi uygulanan HepG2 hücrelerinin “inverted” mikroskobu altındaki görüntüleri şekil 4.57’de, apoptoz deneyi sonrası akış sitometrisi analiz sonuçları ise şekil 4.58’de görülmektedir. Buna göre, kontrol grubunda hücrelerin %92’sinin canlı, %3,9’unun proapoptotik, %2,4’ünün geç apoptozda olduğu ve %1,7’sinin de nekrotik olduğu tespit edildi. Serbest ilaç birleşimi uygulanan hücrelerin %93,5’inin canlı, %3,5’inin proapoptotik, %2,6’sının geç apoptozda olduğu ve %0,4’ünün de nekrotik olduğu görüldü. Buna karşın Dual-Lip’in hücreler üzerindeki etkisinin arttığı gözlemlendi. Analiz sonuçlarına göre Dual-Lip uygulanan hücrelerin %46,3’ünün canlı, %20,3’ünün proapoptotik, %33,2’sinin geç apoptozda olduğu ve %0,2’sinin de nekrotik olduğu belirlendi.



Şekil 4.59. HepG2 hücrelerine ait 72. saat apoptoz deneyi akış sitometrisi analiz sonuçları. A) kontrol grubu B) serbest ilaç birleşimi grubu C) Dual-Lip grubu.

72. saat için; 3,215 µg/mL sorafenib ve 2,867 µg/mL vismodegib içeren dual lipozom ve 4,414 µg/mL sorafenib ve vismodegib içeren serbest ilaç birleşimi uygulanan HepG2 hücrelerinde gerçekleştirilen apoptoz deneyi sonuçları şekil 4.59'da görülmektedir. Buna göre, kontrol grubunda hücrelerin %85,1'inin canlı, %7,6'sının proapoptotik, %6,2'sinin geç apoptozda olduğu ve %1,1'inin de nekrotik olduğu tespit edildi. Serbest ilaç birleşimi uygulanan hücrelerin 48. saatten farklı olarak %70,5'inin canlı, %11,1'inin proapoptotik, %11,4'ünün geç apoptozda olduğu ve %7,0'sinin de nekrotik olduğu görüldü. Buna karşın Dual-Lip'in hücreler üzerindeki apoptotik etkisinin serbest ilaç birleşimine göre daha fazla olduğu ve süreye bağlı olarak da arttığı gözlemlendi. Analiz sonuçlarına göre Dual-Lip uygulanan hücrelerin %7,0'sinin canlı, %15,9'unun proapoptotik, %70,0'inin geç apoptozda olduğu ve %7,1'inin de nekrotik olduğu belirlendi.

Akış sitometri analizi grafiklerinde sol alt kadran canlı hücreleri (anneksin V-, PI -), sağ alt kadran erken apoptotik hücreleri (anneksin V +, PI -), sağ üst kadran geç apoptotik hücreleri (anneksin V +, PI +) ve sol üst kadran ise (anneksin V -, PI +) nekrotik hücreleri göstermektedir (150). Dual-Lip'in, serbest ilaç birleşimine göre HepG2 hücre hattı üzerindeki apoptotik etkisinin daha fazla olduğu görülmektedir. Bununla birlikte süreye bağlı olarak hem ilaç birleşiminin hem de Dual-Lip yapısının hücreler üzerindeki apoptotik etkisinde artış görülmektedir. Ancak Dual-Lip yapısının hücreleri apoptoza sürüklenme oranı serbest ilaç birleşimine göre belirgin bir şekilde daha fazla olarak göze çarpmaktadır.

5. TARTIŞMA

Karaciğer kanseri dünya çapında en sık teşhis edilen altıncı kanser türü olup kansere bağlı ölümlerde üçüncü sıradadır. Tedavide kullanılan antikanser ajanların doku seçimliliğinin düşük olması sebebiyle meydana gelen yan etkiler hastanın yaşam kalitesini düşürmektedir. Aynı zamanda etkin dozun kanserli dokuya ulaşması olası olmamaktadır. Antikanser ajanların birleşimi, ilaç dozunun azaltılmasına olanak tanımasının yanında birden fazla antikanser hedefi üzerindeki etkinlik için potansiyel bir platform sağlayabilmektedir. Ancak kullanılan pek çok antikanser ilacın hidrofobisitesinden kaynaklı düşük çözünürlüğe sahip olması da uygulama açısından kısıtlılık yaratmaktadır. Yeni bir ilaç molekülünün geliştirilmesi pahalı ve zaman alıcıdır. İlaç tedavisinin bireyselleştirilmesi, doz titrasyonu ve terapötik ilaç takibi gibi farklı yöntemler kullanılarak “eski” ilaçların güvenlik-etkinlik oranının iyileştirilmesi denenmektedir. Bunun yanı sıra ilacın kontrollü hızda verilmesi, yavaş taşınımı, hedefli taşınımı oldukça çekici yöntemler olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu amaçla geliştirilen ilaç taşıma sistemleri, antikanser ajanlar için arttırılmış etkinlik ve azaltılmış yan etki sağlayabilmektedir. Nanoteknolojinin tıpta kullanımı hızla yayılmaktadır. Bu amaçla nanopartiküler ilaç taşıma sistemleri geliştirilmeye devam edilmektedir. Serbest ilaçların doğrudan uygulanması ile karşılaştırıldığında, ilaçların nanotaşıyıcılar ile taşınması, yüksek hidrofobisiteye sahip ilaçların çözünürlüğünün artırılması, iyileştirilmiş farmakokinetik özellikler, uzun dolaşım süresi, en aza indirilmiş yan etkiler ile sürekli ve kontrollü ilaç salımı gibi belirgin avantajlar sağlayabilmektedir. Bu amaçla çalışma kapsamında karaciğer kanseri tedavisinde kullanılmak üzere dual ilaç yüklü nano boyutlu lipozomal ilaç taşıma sistemi geliştirildi.

Karaciğer kanseri tedavisinde kullanılmak üzere hazırlanan dual ilaç yüklü lipozomal taşıma sistemi ince lipit film hidrasyon yöntemi ile sentezlenmiş olup, optimizasyon ve karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Elde edilen formülasyonun ilaç salım ve hemoliz çalışmaları ile ve *in vitro* sitotoksitesite ve apoptoz deneyleri yapıldı. Buna göre; boş lipozomlar $124,8 \pm 4,5$ nm boyutlu ve $-21,9 \pm 2,2$ mV zeta potansiyele sahip olarak elde edildi. Cannito et al. (151), karaciğer kanserini hedeflemek üzere ince lipit film hidrasyon ve ekstrüzyon yöntemi ile sentezledikleri, hyaluronik asit ve PEG ile

yüzeyini modifiye ettikleri çeşitli lipozom yapılarının 165-225 nm boyut aralığında olduğunu ifade etmektedir. Zhang et al. (152) da benzer şekilde farklı lipid türevleri ile ince lipid film hidrasyon ve ekstrüzyon yöntemi ile hazırladıkları lipozomların 100-200 nm aralığında boyuta sahip olduğunu ifade etmektedir. Bununla birlikte çalışmada bizim yapımıza benzer şekilde; fosfotidilkolin ve kolesterol ile hazırlanan lipozomların yaklaşık 160 nm boyutlu olduğu görüldü. Verilerimiz literatürle uyumlu olmakla birlikte söz konusu boyut değişkenliğinin kullanılan lipid kaynakları ya da miktarlarındaki farklılıklardan kaynaklanabileceği düşünüldü (153),(154).

Hazırlanan dual ilaç yüklü lipozom yapısının hidrodinamik boyutu $158,3 \pm 8,0$ nm ve zeta potansiyel değeri de $-18,8 \pm 3,07$ mV'dur. Sorafenib ilacı yapıya %92,4 verimle yüklenirken, vismodegib ilacı da %81,3 verimle yüklendi.

Anyonik lipozomlar, katyonik lipozomlara göre daha yavaş klirens kinetiğine sahiptir, makrofajlarca gerçekleştirilen fagositozları daha azdır (51). Negatif yüklü lipozomlar, aralarındaki güçlü itici coulomb kuvvetleri nedeniyle lipozomal formülasyonun kümeleşmesini engelleme açısından avantajlıdır. Güçlü pozitif yüzey yüküne sahip lipozomlar ise hücre zarlarıyla etkileşime girerek toksisiteye neden olabilir, bu da hücre bütünlüğünü bozarak hücre hasara yol açabilir (52). Çalışmamızda elde edilen Dual-Lip yapısı anyonik karakterliydi. Buna göre tartışmanın ileriki bölümlerinde de çeşitli örneklerle ifade edileceği üzere Dual-Lip yapısının zeta potansiyel değeri açısından ilaç taşıma sistemi olarak kullanıma uygun olduğu sonucuna varıldı.

Doku düzeyinde bakıldığında EPR etkisinden faydalanılarak yapılacak pasif hedeflemelerde nanotaşıyıcı sistem genel olarak 20-200 nm boyutlu olarak tasarlanır; ancak 400 nm ye kadar olan boyutlardaki taşıyıcıların da tümör bölgesinde biriktiği belirtilmektedir (155),(156). Buna göre hazırlanan dual ilaç yüklü lipozomal sistemin pasif hedeflemeye uygun bir boyutta elde edildiği söylenebilir.

Sachaniya et al., (157) ince lipid film hidrasyon yöntemiyle hazırladıkları ve lipofilik karakterdeki A vitaminini yükledikleri lipozomların boyutlarını çalışmamızda elde ettiğimiz lipozom boyutlarına benzer şekilde 151,2 nm olarak ifade etmiştir. Wei et al.'ın (158) hepatoselüler karsinomaya hedeflemek üzere tasarladıkları PEG ve laktoferrin ile türevlendirdikleri lipozomların, yine çalışmamıza benzer şekilde, 127-159 nm boyut aralığında ve $<0,3$ pdi değerinde olduğunu belirtmişlerdir. Lipid film oluşturma aşamasında ekleyerek enkapsüle ettikleri kumarin-6 ve DiR'in (1,10-

dioktadesiltetrametil indotrikarbosiyanin iody) enkapsülasyon veriminin de %85-87 aralığında olduğunu ifade etmişlerdir. Frías et al. (63), vismodegib yükledikleri ve fosfatidilkolinden meydana getirdikleri lipozomların zeta potansiyel değerini $-17,6 \pm 0,2$ mV olarak belirtmiştir. Li et al. (109), ise karaciğer fibrozunu tedavi etmek amacıyla hepatik satellit hücrelerine integrin ile aktif olarak hedeflendirdikleri vismodegib yüklü lipozomların, yaklaşık 80 nm boyutlu (pdi:0,25) olduğunu, $-21,8 \pm 0,2$ mV zeta potansiyele ve %98,5 enkapsülasyon verimine sahip olduğunu belirtmektedir. Bir başka çalışmada, hepatoselüler karsinom için sorafenib ve dosetakselin dual olarak yüklendiği, folat ve kondrotin sülfatla türevlendirilmiş lipozom yapısının boyutları $165,95 \pm 2,06$ nm, zeta potansiyel değeri $-20,73 \pm 1,37$ mV, sorafenib enkapsülasyon verimi $\%90,27 \pm 0,63$ ve dosetaksel enkapsülasyon verimi $\%86,55 \pm 1,90$ olarak belirtilmiştir (113). Yukarıda belirttiğim ilaç yükleme verimleri, hidrodinamik boyut, pdi değeri ve zeta potansiyel verileri açısından değerlendirildiğinde karaciğer kanseri için hazırlanan dual ilaç yüklü lipozom formülasyonunun özelliklerinin literatürle uyumlu olduğu sonucuna varıldı.

Tümör mikroçevresinin pH'si, yüksek miktarda glukoz tüketiminin varlığı ancak oksidatif fosforilasyonun azlığı sebebiyle üretilen laktat dolayısıyla asidiktir (159). Bu nedenle, hazırlanan Dual-Lip yapısının asidik pH'lerde ve fizyolojik pH'de ilaçları ne oranda salacağını tespiti için ilaç salım deneyleri gerçekleştirildi. Asidik mikroçevreyi taklit etmek amacıyla pH 5,5 ve fizyolojik koşulları taklit etmek amacıyla ise pH 7,4 tampon sistemleri kullanılarak diyaliz metodu ile kümülatif ilaç salım miktarları belirlendi. Buna göre; Dual-Lip yapısının vismodegib ilacını sorafenibten daha hızlı saldığı tespit edildi. Vismodegib ilacı 32. saatin sonunda her iki pH'de de tamamen salınırken sorafenib ilacının 56. saatin sonunda pH 5,5'ta $\%66,9 \pm 0,6$ 'sı ve pH 7,4'te ise $60,7 \pm 0,3$ 'ü salındığı saptandı. Sorafenibin sulu ortamda çözünürlüğü vismodegibden daha azdır. Yüksek hidrofobikliğe sahip ilaçların lipozomların içinde kalma eğilimi hidrofilik olanlara göre daha fazladır (160),(161). Bu nedenle vismodegibin sorafenibden daha hızlı salınması beklenen bir durumdur.

Xiao et al. (111), gadolinyum ile beraber lipozomlara yükledikleri sorafenib için pH 7,4'te *in vitro* salımı izlemişlerdir. Buna göre sorafenib ilacının pH 7,4'te çalışmamıza benzer şekilde ilk dört saat içinde yaklaşık %20 sinin salındığı, 60 saatin sonunda ise yaklaşık %50'sinin salındığı görülmekte olup yavaş ve sürekli bir salımın varlığı ile nispeten uzun bir süre boyunca sabit bir ilaç derişiminin korunduğu ifade edilmektedir.

Yao et al. (113), sorafenib ve dosetakselin lipit bilayerın arasına dual olarak yüklendiği, folat ve kondrotin sülfatla türevlendirilmiş katyonik lipozomlardan pH 7,4 ve kondrotin sülfat yapısını parçalamak üzere lizozomal bir enzim olan hiyalüronidaz ilave ettikleri pH 5,5 ortamında ilaçların salımını incelemiştir. 24 saatte pH 7,4'te sorafenibin % 27,5'unun salındığını, pH 5,5'ta hiyalüronidaz aktivitesi sonrası ise %58,7'sinin salındığını ifade etmişlerdir. Buna göre bizim çalışmamızda hazırlanan lipozomal sistem, sorafenib ilacını pH 5,5' de bu çalışmaya göre daha yavaş salmaktadır. Vismodegibin karaciğer kanseri tedavisinde serbest formda kullanımı henüz yeni çalışılmakta ve nanotaşıyıcılarla kullanımına ise henüz rastlanmamaktadır. Bu nedenle farklı kanser türleri için hazırlanan sistemler ile kıyaslandığında; Salem et al.'ın (162), deri kanseri için jel formülasyon yapmak üzere pH 5,5 izotonik fosfat tamponunda hazırladıkları lipozomlardan vismodegib salımını, yine pH 5,5 izotonik fosfat tamponu içerisinde izledikleri görülmektedir. $258,67 \pm 9,00$ nm boyutlu, $-7,72 \pm 1,53$ mV yüke sahip bu lipozomlardan vismodegib salımı 24 saat sonunda yaklaşık %60 olarak verilmiştir. Hidrokarbon zincirlerinin uzunluğu, simetrisi, moleküller arası ve molekül içi etkileşimleri, dallanma ve doymamışlık derecesi, çift tabakanın kalınlığını ve akışkanlığını, lipozom yükü ve boyutları ilaç salım hızını belirlemektedir (77),(163),(164). Bu nedenle bahsedilen çalışmalarda ilaç salım miktarlarındaki farklılıklar lipozomların yük, boyut, hidrokarbon zincirlerinin özelliklerinin farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Sorafenibin lipozomal sistemlerden farklı nanotaşıyıcılardan salımına yönelik literatür incelendiğinde; hepatoselüler karsinom tedavisinde kullanılmak üzere sorafenib etkinliğinin artırılması amacıyla hazırlanan sorafenib yüklü kitosan nanopartiküllerden pH 7,4 ve pH 4,5'ta gerçekleştirilen salım çalışmasına göre; sorafenibin lipozomal sistemler dışındaki taşıyıcı sistemlerle de benzer salım grafiklerinin elde edildiği görülmektedir (124). Başka bir çalışmada sorafenibin katı lipid nanopartiküllerden pH 7,4'te salımı izlenmiş olup, 50 saatte yaklaşık %80'inin salındığı ve sürekli bir ilaç salımına sahip olduğu ifade edilmektedir (165).

Tümör mikroçevresinin Warburg etkisi, zayıf lenfatik drenaj ve yetersiz kanlanma gibi nedenlerle düşük pH'ye sahip olduğu ifade edilmektedir (159). İlaçların tümör mikroçevresini taklit eden pH 5,5'ta, fizyolojik pH'yi taklit eden pH 7,4'ten fazla salınıyor oluşu taşıyıcı sistemin avantajlarından birini daha oluşturmaktadır. Bu sayede ilaç taşıma sistemi ilaçları dolaşımda daha az salarken kanserli dokuda daha fazla

salabilecektir. Literatür verileriyle de kıyaslandığında elde ettiğimiz Dual-Lip yapısının ilaç salım özellikleri açısından uygun olduğu gözlemlendi.

Stabilite ticari bir ürün üretiminde dikkate alınması gereken noktalardan biridir. Sabilite hazırlanan taşıyıcı sistemin belirli bir süre boyunca kimyasal ve fiziksel bütünlüğünü korumasının bir ölçüsüdür. Lipozomların stabilitesinde, hazırlama, lipid seçimi, depolama koşulları etkilidir (166). Çalışma kapsamında lipozomlar stabilite deneyleri için liyofilize edildi. Liyofilizasyon lipozomların kararlılığını artırmak ve içerisine yüklenmiş hassas maddelerin bozunmasını önlemek için en yaygın kullanılan tekniklerden biridir (167). Dual-Lip yapısında 4 °C'de 6. ayda, 25 °C'de ise 3. ayda fiziksel değişiklikler meydana gelmeye başladığı söylenebilir. Ghanbarzadeh et al. (168), sirolimus yükledikleri ve ince lipid film hidrasyon yöntemi aracılığıyla dipalmitoilfosfatidilkolin (DPPC) ve kolesterol ile oluşturdukları lipozomların stabilitesini incelemek için lipozomları liyofilize etmiş, liyoprotektan olarak dektroz kullandıkları ve kullanmadıkları koşullarda 6 ay süreyle incelemişlerdir. İlaç içeriğinin 4 ve 25 °C sıcaklıklarda ya da liyoprotektan varlığıyla değişmediğini ancak liyoprotektan bulunmayan lipozomların boyutunda artış olduğunu belirtmişlerdir. Yine bir başka çalışmada (169) DSPC, 1,2-dipalmitoil-sn-gliserol-3-fosfogliserol (DPPG) ve kolesterol bileşimine sahip lipozomların 4-6 °C'de 6 aya kadar stabil kaldığı ve liyofilize edilerek saklanan lipozomların boyutlarında değişiklik gözlenmediği ifade edilmektedir. Yukarıda sunulan farklı literatür verilerinin stabilite deneylerimizle uyumlu olduğu belirlendi.

İn vitro hemoliz çalışması sonucumuza göre Dual-Lip yapısı hemolize neden olmamaktadır. Hemolitik aktivitenin %10'dan düşük olması materyalin intravenöz uygulamaya uygunluğunu göstermektedir. Bunun yanı sıra hemoliz değerini %5'ten de düşük olarak bulmamız hemolizin olmadığını göstermektedir (145),(146),(147). Bu da yapının biyouyumlu olduğunu, intravenöz uygulamaya uygun olduğunu ortaya koymaktadır (170). Taşıyıcı sistemin anyonik karakterinin, katyonik karakterde lipidlerden elde edilen lipozomlara göre daha az eritrosit hasarına yol açtığı ifade edilmektedir. Bunun sebebi ise katyonik lipidlerin (Örneğin, DOTAP sentetik bir katyonik lipiddir.) eritrosit membran lipidleriyle yer değiştirme eğiliminde bulunması ve membran stabilitesini etkilemesidir. Bununla birlikte yapıda fosfatidilkolin ya da fosfotidiletanolamin gibi lipidlerin varlığının bu lipid değişimini azalttığı belirtilmektedir (171). Elmowafy et al. çalışmalarında, biyoyararlanımı oldukça düşük olan

hepatokoruyucu silimarini (süt devedikeninin (*Silybum marianum*) tohum özütü) taşımak üzere karaciğer hedefli bir lipozomal sistem geliştirmiştir (172). Hidrojenlenmiş soya fosfotidil kolini ve kolesterol ile farklı şekillerde hazırladıkları lipozom yapılarının (PEG'leyerek ya da PEG'lemeden, ilaç çözünürlüğünü artırmak amacıyla polisorbitat80 ekleyerek ya da eklemeyen vb) hemolitik aktivitesini incelemişlerdir. Buna göre; lipozomal yapılar için en fazla %12,7'lik bir hemolitik aktivite görülmesinin hazırlanan lipozomal sistemlerin hemolitik olmadığına kanıtı olarak belirtmişlerdir. Zhao et al., hepatoselüler karsinom proliferasyonunu azalttığı bilinen biyoyararlanımı düşük, yan etkileri yüksek olan triptolit bileşiğini, transferrin ile aktif hedefledikleri lipozom yapısına yüklemişlerdir. Elde ettikleri transferrin hedefli $85,33 \pm 0,41$ verimle triptolit yüklü lipozomların, $130,33 \pm 1,89$ nm boyutuna, $-23,20 \pm 0,90$ mV yüke sahip olduğu ve hemolitik aktivitelerinin %5'ten küçük olduğu belirlenmiştir (173). Bu veriler göz önünde bulundurulduğunda, çalışmamızda sentezlemiş olduğumuz Dual-Lip yapısı hemolitik aktivite yönünden kullanıma uygun ve literatürle uyumludur.

In vitro sitotoksikite deneyleri, hazırlanan taşıyıcı sistemin karaciğer kanseri hücreleri üzerindeki etkisinin belirlenmesinin yanı sıra sağlıklı insan hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin belirlenmesinde de önem taşımaktadır. Bu nedenle bir seri örnek grubu ile sitotoksikite deneyleri kurgulanmış ve %canlılık ile IC_{50} değerleri hesaplanmıştır. Sorafenib 2007 yılında ileri evre hepatoselüler karsinomda kullanılmak üzere FDA tarafından onaylanmış kemoterapötik bir ajandır (44). Deneylerimiz sonucunda HepG2 hücre hattı üzerinde 24 ve 48 saat MTT sitotoksikite analizi sonrası sorafenibin IC_{50} değerleri sırası ile $9,99 \pm 0,87$ ve $6,72 \pm 0,29$ $\mu\text{g/mL}$ olarak bulduk. Yao et al. (113), HepG2 hücrelerinde sorafenibin 24 saatlik uygulaması sonrası buldukları IC_{50} değerini $10,20 \pm 0,72$ $\mu\text{g/mL}$ olarak belirtmiştir. Bir başka çalışmada ise HepG2 hücrelerinde sorafenibin 48 saatlik IC_{50} değeri $15,145$ μM ($7,04$ $\mu\text{g/mL}$) ve liposomal sorafenibin IC_{50} değeri ise $9,63$ μM ($4,48$ $\mu\text{g/mL}$) olarak verilmektedir (126). Çalışmamız kapsamında 48. saatte Sor-Lip IC_{50} değeri de $4,2 \pm 0,17$ $\mu\text{g/mL}$ 'dir. Bu veriler ışığında sonuçlarımız literatür ile uyumludur. Ayrıca sorafenibin lipozomal sisteme yüklenmesi ile de HepG2 hücreleri üzerindeki IC_{50} değerinin düştüğü görülmektedir ($p < 0,05$).

Fan et al. (174), HepG2 hücrelerinde 30 μM ($12,6$ $\mu\text{g/mL}$) vismodegibin sitotoksitesini MTT analizi ile incelemiş 48. saatte yaklaşık %80'inin canlı olduğunu bildirmişlerdir. Bunun yanı sıra vismodegibin etki yolağı olan "Hedgehog" yolağının Shh

sinyallemesinin aktif olmasından dolayı etkili bir hücre ölümüne neden olduğunu ifade etmişlerdir. Çalışmamız kapsamında 15 µg/mL vismodegibin 48 saatlik uygulaması sonrası hücrelere ait canlılığın %74 olduğu görülmektedir. Vismodegibin sorafenibden farklı olarak IC₅₀ değerinin lipozomal sisteme yüklenmesiyle düşmediği görülmektedir. Vismodegib etki sinyalini bir transmembran proteine bağlanması aracılığıyla oluşturmaktadır. Ek olarak lipozomal sistemlerin ve lipozomal sistemlerle taşınan ilaçların çeşitli şekillerde hücre içine alındığı bilinmektedir (85). Lipozomal sistem ilacı yavaş ve kontrollü bir şekilde salmaktadır. Vis-Lip yapısının IC₅₀ değerinin artma nedeni, Vis-Lip yapısından hücre içine alınmadan salınan vismodegib miktarının az olması ile açıklanabilir.

İki veya daha fazla terapötik ajanın birleştirildiği bir birleşik ilaç tedavisinin monoterapi yaklaşımına kıyasla etkinliği artırdığı ve ilaç direncinin azaltılmasında etkili olduğu bilinmektedir (175). Biz de çalışmamız kapsamında karaciğer kanseri tedavisinde kullanılmakta olan sorafenib ile “Hedgehog” yolağı inhibitörü vismodegibin potansiyel sinerjik etkisini değerlendirmek üzere birlikte kullandık.

van Malenstein et al. (125), vismodegibin HepG2 hücreleri üzerindeki etkilerinin incelendiği çalışmalarında, sorafenibin hepatoselüler karsinom tedavisinde kullanımının meydana getirdiği ilaç direncini incelemiş ve vismodegib uygulaması ile sorafenib duyarlılığının geri kazanılmasını çalışmışlardır. Buna göre; sorafenib direnci gelişmemiş hücrelerde sorafenib IC₅₀ değeri 72. saat için 5,5 µM olarak ifade edilirken, sorafenib etkisine bağlı direnç gelişen hücrelerde IC₅₀ değerinin 16 µM’a çıktığı ifade edilmektedir. Bu hücrelere 5 µM vismodegib uygulanmasının sorafenibin IC₅₀ değerini 16 µM’dan 11,5 µM’a düşürdüğü belirtilmektedir. Vismodegibin bu etkisinin MRP-1 (“multidrug resistance protein-1”, çoklu ilaç direnci proteini-1) üzerinden değil, ABCG2 (“ATP-binding cassette sub-family G member 2”, ATP-bağlayıcı kaset alt-ailesi G-üyyesi 2)’yi inhibe ederek gösterdiği ifade edilmektedir. Sorafenibin karaciğer kanseri tedavisinde vismodegib dışındaki “Hedgehog” yolağı inhibitörleri ile birlikte uygulamasının araştırıldığı bir çalışmada itrakonazol olarak bilinen “Hedgehog” yolağı inhibitörü R51211’in, sorafenibe ek olarak kullanımının karaciğer kanserinde sitotoksiste, apoptoz ve otofajiyi tetikleyerek çok yönlü bir yaklaşım sağlama potansiyelinin olduğu belirtilmektedir. R51211’in sorafenib ile birlikte kullanımının HepG2 hücrelerinde sorafenib sitotoksitesini artırdığı ve “Hedgehog” agonisti ile yaptıkları çalışmalar

sonucunda da bu etkinliğin “Hedgehog” yolağı inhibisyonu sayesinde gerçekleştiği ifade edilmektedir (176). Çalışmamız kapsamında, vismodegibin sorafenib ile kombine edilerek HepG2 hücrelerine uygulanmasının sorafenibin IC₅₀ değerini, 24. saatte $9,99 \pm 0,87 \mu\text{g/mL}$ ’den $8,08 \pm 0,35 \mu\text{g/mL}$ ’ye, 48. saatte $6,72 \pm 0,29 \mu\text{g/mL}$ ’den $6,12 \pm 0,10 \mu\text{g/mL}$ ’ye ve 72. saatte $5,47 \pm 0,22 \mu\text{g/mL}$ ’den $4,41 \pm 0,15 \mu\text{g/mL}$ ’ye düşürdüğü görüldü ($p < 0,05$). Aynı şekilde vismodegibin IC₅₀ değeri de 24. saatte $73,7 \pm 15,7 \mu\text{g/mL}$ ’den $8,08 \pm 0,35 \mu\text{g/mL}$ ’ye, 48. saatte $39,4 \pm 2,7 \mu\text{g/mL}$ ’den $6,12 \pm 0,10 \mu\text{g/mL}$ ’ye ve 72. saatte $38,3 \pm 1,5 \mu\text{g/mL}$ ’den $4,41 \pm 0,15 \mu\text{g/mL}$ ’ye düşmüştür ($p < 0,05$). Serbest birleşik ilaçların IC₅₀ değerindeki süreye bağlı düşüş de istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,05$). Buna bulgular literatürle de kıyaslandığında vismodegib ile sorafenibin sinerjik etki göstererek karaciğer kanseri tedavisinde kullanım potansiyeli olduğu çıkarımına varılabilir.

Çalışmamızda temel olarak karaciğer kanseri tedavisine yönelik yukarıda etkileri tartışılan iki ilacı içeren lipozom formülasyonun oluşturulması kurgulandı. Elde edilen Dual-Lip yapısının karaciğer kanseri hücre hattı üzerinde etkinliği araştırıldı. Buna göre ilaçların serbest halde birlikte uygulanması durumunda HepG2 hücrelerindeki IC₅₀ değerleri birbirine eşit ve 24., 48. ve 72. saat için sırasıyla $8,08 \pm 0,35 \mu\text{g/mL}$, $6,12 \pm 0,10 \mu\text{g/mL}$ ve $4,41 \pm 0,15 \mu\text{g/mL}$ ’dir. Buna karşın Dual-Lip yapısının IC₅₀ değerleri 24, 48 ve 72 saat için sırasıyla sorafenib için $6,34 \pm 1,54 \mu\text{g/mL}$, $3,81 \pm 0,11 \mu\text{g/mL}$, $3,22 \pm 0,52 \mu\text{g/mL}$ ve vismodegib için $5,61 \pm 1,33 \mu\text{g/mL}$, $3,37 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$ ve $2,87 \pm 0,45 \mu\text{g/mL}$ olarak bulundu. İlaçlar lipozomal sisteme yüklendiğinde IC₅₀ değerlerinin düştüğü belirlendi. Ancak vismodegibin her üç saatteki düşüşü istatistiksel olarak anlamlı bulunur iken sorafenib açısından değerlendirildiğinde 24. saatteki düşüş istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0,05$). Buna karşın 48. ve 72. saatlerdeki düşüş istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0,05$). İlaçların lipozomal sistemden salınması süreye bağlı olarak gerçekleşmektedir. 48. ve 72 saatlerde yani zamana bağlı olarak lipozomal sistemin serbest ilaçlara göre daha fazla etki yarattığını saptadık. Sor-Lip’in 24. saatte anlamlı bir fark yaratmaması lipozomal sistemden vismodegibe göre daha yavaş salınmasına bağlanabilir. Bütün veriler değerlendirildiğinde çalışmamızın hipotezini destekler nitelikte, ilaçların taşıyıcı sisteme yüklenmesi durumunda ilaç etkinliğinin artırılmış olduğunu gözlemledik.

Serbest ilaçların tek tek ve birleşim halinde ve hazırlanan son formülasyon yapısı olan Dual-Lip'in sağlıklı hücreler üzerinde meydana getirdiği sitotoksosite Hek293 hücrelerinde incelendi. Serbest ilaçların Hek293 hücre hattı üzerinde belirgin bir sitotoksosite gösterdiği, ancak Dual-Lip yapısının sitotoksik etki göstermediği belirlendi. Espinosa-Bustos et al. (177) , vismodegibin Hek293 hücreleri üzerindeki IC₅₀ değerini 50 µM'dan fazla olduğunu, Chang et al. (123) ise sorafenibin Hek293 hücreleri üzerindeki IC₅₀ değerini 3,1 µg/mL olarak bulduklarını belirtmişlerdir. Bu bilgiler ışığında çalışmamızda elde ettiğimiz veriler literatürle uyumludur. Serbest ilaçlar birleşim halinde Hek293 hücreleri üzerinde ilaçların tek tek gösterdiği sitotoksik etkiden daha fazla sitotoksosite oluşturdu. Sorafenibin Hek293 ve HepG2 hücre hattındaki IC₅₀ değerlerindeki farklılık 24. saatte istatistiksel olarak anlamlı bulunmazken (p >0,05), 48. ve 72. saatlerde anlamlı bulundu (p < 0,05). Buna karşın ilaç birleşiminin Hek293 hücreleri için IC₅₀ değerleri, HepG2 hücrelerine göre her üç saat için de istatistiksel olarak anlamlı olarak daha düşük bulundu (p <0,05). Serbest ilaçların sağlıklı hücreler üzerinde belirgin bir sitotoksosite meydana getirdiği çalışmamızdan elde ettiğimiz verilerle de doğrulanmaktadır. Buna karşın Dual-Lip yapısı normal hücreler üzerinde, HepG2 hücrelerine uygulanan derişimden daha yüksek derişimde bile sitotoksik etki yaratmamaktadır. Ganesan et al. (178), sorafenib-tosilat ve etoposid birleşiminin karaciğer kanseri üzerinde birlikteliğinin ve lipozomal sisteme yüklendiklerinde meydana getirdikleri sitotoksik etkiyi kanser ve kanser olmayan hücre hatlarında incelemişlerdir. Buna göre sorafenib-tosilat ve etoposid birleşiminin HepG2 hücre hattı üzerinde sinerjik etkisinin olduğu, lipozomal sisteme yüklendiklerinde ilaç etkinliklerinin daha da arttığını ortaya koymuşlardır. Aynı zamanda sorafenib-tosilat ve etoposid birleşiminin kanserli olmayan insan göbek damarı endotel hücreleri (HUVEC'ler) üzerinde serbest halde belirgin bir sitotoksitesi olduğunu, ancak lipozomal halde sitotoksik etki yaratmadığını ifade etmişlerdir. Bu sayede lipozomların, ilaç güvenliği sağladığını, kanserli olmayan hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerini azalttığını ve HepG2 kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini artırdığını belirtmişlerdir. Sisplatin ve diallil disülfidin antikanser etkinliklerinin artırılmasını güden bir çalışmada, lipozomal taşıma sistemine beraber yüklenmesiyle kanser ile kanser olmayan hücrelerde sitotoksik etkinlikleri incelenmiştir. Araştırmacılar nanoformülasyonun sağlıklı hücrelerde kanser hücrelerine kıyasla önemli bir toksisite göstermediğini, bunun da nanoformülasyonlarının normal hücreler için

güvenli olduğunu gösterdiğini vurgulamışlardır (179). Literatür ve sonuçlarımız değerlendirildiğinde, Dual-Lip yapısının çalışmamızın hipotezini destekler nitelikte kanserli hücreler üzerinde artırılmış ilaç etkinliği meydana getirirken, aynı dozda sağlıklı hücrelerde toksik etki yaratmadığı belirlendi.

Apoptoz fizyolojik ve patolojik koşullar altında gerçekleşen, iyi düzenlenen kompleks bir hücre ölümü sürecidir. Kanserde apoptotik süreçlerdeki denge bozulmuştur ve bu kompleks ölüm mekanizmasına gereken sinyaller, hücrelere iletilemez. Ölmesi gereken hücrelerin ölüm sinyalini alamamasıyla bu malign hücre grubu çoğalmaya ve metastaza ilerlerler. Apoptotik mekanizmasının bozulması yalnızca kanser oluşumunu tetiklemekle kalmaz aynı zamanda kanser hücrelerinin tedaviye dirençli hale gelmesinde de rol oynayabilir. İlaçlar ve çeşitli tedavi stratejileri ile kanser hücrelerini apoptotik sürece yeniden dahil etmek kanser hücrelerinin yok edilmesinde önem taşımaktadır (180),(181). Nanoboyutlu ilaç taşıma sistemleri, tümör mikroçevresindeki apoptotik yolların düzenlenmesi, ilaç direncini aşma ve tedavi etkinliğinin artırılması gibi mekanizmalarda etkin rol oynayabilmektedir. Çünkü bu nanotaşıyıcılar, apoptozu intrinsik (içsel, mitokondriyal) veya ekstrinsik (dışsal, ölüm reseptörü) yollarla indükleyebilen kemoterapötik ajanları kapsülleyebilir ve kanser dokusuna doğrudan taşıyabilir (182),(183).

PI, plazma membran bütünlüğü ve geçirgenliğindeki farklılıklar yoluyla hücrelerin canlı, apoptotik veya nekrotik olup olmadığını belirlemek için Anneksin V ile birlikte yaygın olarak kullanılmaktadır, PI sağlam plazma membranı varlığında hücreleri boyayamadığı için canlı ya da erken apoptozdaki hücreleri boyayamaz. Geç apoptotik ve nekrotik hücrelerde, plazma ve nükleer membranların bütünlüğü azalır, bu da PI'nin nükleik asitlere yapışmasına ve kırmızı floresans göstermesine olanak tanır (184). Apoptozun erken evrelerinde fosfatidilserinin (PS) plazma membranının iç kısmından dış tabakaya taşınması söz konusudur. Anneksin V, PS'ye yüksek afinitesi olan Ca^{2+} bağımlı bir fosfolipit bağlayıcı proteindir. PS'nin dış hücre yüzeyine taşınması yalnızca apoptoza özgü değildir, hücre nekrozu sırasında da meydana gelir. Ancak, bu iki hücre ölümü şekli arasındaki fark, apoptozisin başlangıç evrelerinde hücre zarının sağlam kalması, nekrozun meydana geldiği anda ise hücre zarının bütünlüğünü kaybetmesi ve geçirgen hale gelmesidir. Hücre bütünlüğünün bozulmadığı anneksin V bağlanmış erken

apoptozdaki hücrelerin boyaması ise anneksin V'e bağlı FITC'nin yeşil floresan vermesi ile gerçekleştirilir (185),(186).

Serbest ilaç birleşiminin ve Dual-Lip yapısının apoptotik etkisi, anneksin V-FITC/PI kiti ile 48. ve 72. saatlik inkübasyon sonrası akış sitometresinde incelenerek hücrelerin canlılık ile erken apoptoz / geç apoptoz / nekroz evrelerindeki yüzdesel miktarları belirlendi. Hazırlanan dual ilaç içeren lipozomal taşıyıcı sistemin HepG2 karaciğer kanseri hücreleri üzerinde meydana getirdiği apoptotik etkinlik incelendiğinde, ilaçların serbest birleşim halinde uygulanmasından çok daha etkin bir şekilde apoptoza neden oldukları belirlendi. Apoptoz deneyi sonuçlarına göre 48 saat serbest ilaç birleşimi uygulanan hücrelerin %93,5'inin canlı, %6,1'inin apoptozda olduğu buna karşın Dual-Lip uygulanan hücrelerin %46,3'ünün canlı, %53,5'inin apoptozda olduğu tespit edildi. Serbest ilaç birleşimi uygulanan hücrelerin 72. saatte %70,5'inin canlı, %22,5'inin apoptozda olduğu, buna karşın Dual-Lip uygulanan hücrelerin %7,0'sinin canlı, %85,9'unun apoptozda olduğu belirlendi. Ganesan et al. (178), sorafenib ve etoposidi beraber yükledikleri lipozomal sistem ile HepG2 hücre hattı üzerinde anneksin V-FITC/PI boyama ile apoptoz düzeyini ölçmüşlerdir. Bu çalışmada, 24 saatlik IC₅₀ derişimlerinde uyguladıkları serbest (0,57 µg/mL) ve lipozomal formülasyonun (0,39 µg/mL) apoptotik etkinliğini, akış sitometrisinde incelediklerinde serbest ilaç birleşiminin yaklaşık %20, lipozomal sistemin ise yaklaşık %30 oranında apoptoza yol açtığını belirtmişlerdir. Kontrol hücrelerine göre her iki grupta da apoptotik etkinliğin arttığı görülmekle birlikte lipozomal formülasyonun apoptotik etkinliğinin daha fazla olmasını ise serbest ilaçlara kıyasla artan hücresel emilim ve ilaç moleküllerinin çekirdeğe artan difüzyonundan kaynaklandığını ifade etmişlerdir. Sun et al. (187), hepatoselüler karsinom tedavisinde sorafenib ve glipikan-3 si-RNA (siGPC3)'yı beraber yükledikleri lipozomal sistemin (SF PL/siGPC3, (siGPC3 derişimi: 0,1 nM, Sorafenib dozu: 3 µM)), HepG2 hücrelerinde 48 saat sonunda %47,4 oranında apoptoz ve nekroza yol açtığını, kontrol hücrelerinde ise %4,4 oranında apoptoz görüldüğünü belirtmişlerdir. Çalışmamızın yenilikçi yanlarından birini oluşturan sorafenib ve vismodegib ilaçlarının beraber kullanımı karaciğer kanseri tedavisinde henüz çalışılmamış olsa da Barui et al. (188), pankreas duktal adenokarsinomunda bu iki ilacı bir ilaç taşıma sistemine yükleyerek geliştirdikleri yeni formülasyonun apoptotik etkilerini de incelemişlerdir. Çalışmalarında, BxPC-3 (insan pankreas kanser hücre hattı) ve AsPC-1 (insan pankreas

adenokarsinom metastatik hücre hattı) hücre hatlarında 24 saat sonrası, serbest ilaç birleşimi (20 µg/mL ilaç), AsPC-1 hücrelerini %6,6 oranında erken apoptoza, %5,4 oranında geç apoptoz ve nekroza sürükler iken BxPC-3 hücrelerinde %4,5 oranında erken apoptoz, %6,1 oranında geç apoptoz ve nekroz olduğu belirtilmiştir. Aynı çalışmada sorafenib ve vismodegibi beraber içeren taşıma sistemi (20 µg/mL) AsPC-1 hücrelerini %5,2 oranında erken apoptoza, %10,1 oranında geç apoptoz ve nekroza sürükler iken BxPC-3 hücrelerinde %3,7 oranında erken apoptoz, %11,9 oranında geç apoptoz ve nekroz olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca çalışmanın kontrol AsPC-1 hücrelerinde erken apoptoz oranı %2,3 ve geç apoptoz ve nekroz oranı %1,2 iken, kontrol BxPC-3 hücrelerinde ise erken apoptoz oranı %2,5 ve geç apoptoz ve nekroz oranı %3,6'dır. Bu veriler hem AsPC-1 hem de Bx-PC3 hücreleri, çift ilaç yüklü taşıma sistemi ile test edildiğinde, kontrol hücrelerine veya serbest ilaç birleşimiyle tedavi edilen hücreye göre daha yüksek bir hücre ölümü yüzdesine sahip olduğunu göstermektedir. Bir başka çalışmada (189), N-asetilgalaktozamin ile aktif hedeflendirilmiş lipozomal sisteme yüklenen sorafenib ile poli(D,L-laktik-ko-glikolik asid) (PLGA) nanopartiküllere yüklenen selumetinib, PLGA nanopartiküllerin lipozoma enkapsüle edilmesiyle hibrid bir nanotaşıma sisteminde (HNP) bir araya getirilmiştir. Bu taşıma sisteminin zeta potansiyel değeri $-21,5 \pm 2,3$ mV, boyutu $194,4 \pm 0,71$ nm ve içerdiği etken madde miktarları ise 7,76 µg/mg HNP selumetinib ve 6,58 µg/mg HNP olarak belirtilmektedir. Bu taşıma sisteminin HepG2 hücreleri üzerindeki apoptotik etkilerini hem serbest ilaçlar ve taşıma sistemi özelinde hem de süreye bağlı olarak incelemişlerdir. Selumetinib ve sorafenibi beraber içeren HNP ile 72 saat uygulama sonrası, hemen hemen tüm hücrelerin PI ve/veya anneksin V boyandığını (erken/geç apoptoz ve nekrozdaki toplam hücre oranı $> \%80$), ancak aynı derişimlerde serbest ilaç birleşiminde canlılık oranının oldukça yüksek (yaklaşık %50) olduğu belirtilmiştir. Bunun yanı sıra 48 saatlik uygulama sonrasında apoptotik evreler değerlendirildiğinde, selumetinib ve sorafenibi beraber içeren HNP uygulanan hücrelerde, anneksin V ve PI çift pozitif boyamanın çok daha az olduğunu (erken/geç apoptoz ve nekrozdaki toplam hücre oranı yaklaşık %50), yalnızca anneksin V ile boyamanın (erken apoptotik evre) daha belirgin olduğu vurgulanmıştır. Serbest ilaç birleşiminde ise apoptoz oranı çok daha düşük olarak görülmektedir (erken/geç apoptoz ve nekrozdaki toplam hücre oranı $< \%40$). Çalışmamızda da benzer şekilde süreye bağlı olarak apoptozun arttığı görüldü. Hazırladığımız taşıma sisteminin apoptotik etkilerinin,

Çalışmalardan farklı şekilde, serbest ilaç birleşiminin yarattığı apoptotik etkiden çok daha (48 saat için yaklaşık 9 kat ve 72 saat için yaklaşık 4 kat) fazla olduğu saptandı.



6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması kapsamında karaciğer kanseri tedavisinde kullanılmak üzere daha önce birlikteliği denenmemiş, iki farklı yolak üzerinden sitotoksik etki gösteren vismodegib ve sorafenib ilaçlarının dual olarak bir lipozomal sisteme yüklenmesi, bu şekilde yeni bir ilaç taşıyıcı sistem formülasyonunun hazırlanması ve bu formülasyonun karaciğer kanseri hücre hattında etkinliğinin araştırılması gerçekleştirildi. Lipozomal taşıma sistemi ince lipit film yöntemi ile hazırlandı. Boyutları ekstrüzyon yöntemi ile 10 kez 400 ve 200 nm gözenek çapına sahip membranlardan geçirilerek küçültüldü ve yapı boyut açısından daha homojen hale getirildi. İlaçlar yüklenmeden önce lipozomlar $124,8 \pm 4,5$ nm boyutlu ve $-21,9 \pm 2,2$ mV zeta potansiyele sahip olarak elde edildi. Lipozomal sisteme vismodegib ve sorafenib ilaçlarının yüklenmesinin ardından ilaç yükleme verimleri sorafenib için %92,4 ve vismodegib için %81,3 olup etken madde miktarı sırasıyla 221,8 µg ve 195 µg içeriğindeydi. Dual-Lip'in hidrodinamik boyutu $158,3 \pm 8,0$ nm (pdi: $0,25 \pm 0,08$) ve zeta potansiyel değeri de $-18,8 \pm 3,07$ mV olarak bulundu. C-TEM analizi ile yapının küresel ve 150-160 nm boyutlu olduğu saptandı. Yapı FTIR analizi ile doğrulandı. Karakterizasyon çalışmaları sonucunda, yapının karaciğer kanserine pasif hedeflemeli ilaç taşıyıcısı olarak literatüre uygun özellikler taşıdığı belirlendi. İlaç taşıma sisteminin yavaş ve sürekli bir ilaç salımı özelliği göstermesinin yanı sıra ilaçları tümör mikroçevresine benzer asidik koşullarda, fizyolojik koşullara göre daha fazla saldığı belirlendi. Hemoliz çalışmalarına göre lipozomal ilaç taşıyıcı sistemin eritrositlerde hemolize neden olmadığı, intravenöz uygulamaya uygun olduğu tespit edildi. İlaçların kombine edilmesi ile karaciğer kanseri hücre hattı HepG2 hücreleri için IC_{50} değeri 48. saatte her iki ilaç için $6,12 \pm 0,10$ µg/mL, ilaçların dual olarak yüklendiği lipozom yapısının (Dual-Lip) IC_{50} değeri sorafenib için $3,81 \pm 0,11$ µg/mL ve vismodegib için $3,37 \pm 0,1$ µg/mL olarak bulundu. Serbest ilaç birlikteliği sonucu sağlıklı insan hücreleri (HEK293) üzerinde her iki ilaç için elde edilen IC_{50} değeri 48. saatte $2,31 \pm 0,09$ µg/mL olarak belirlenir iken Dual-Lip yapısının HepG2 hücrelerine uygulanan derişimlerde sağlıklı hücrelerde sitotoksiste oluşturmadağı belirlendi. Apoptoz deney sonuçları, serbest ilaç birleşimi uygulanan hücrelerin %70,5'inin canlı, %11,1'inin

proapoptotik, %11,4'ünün geç apoptozda olduğunu ve %7,0'sinin de nekrotik olduğunu buna karşın Dual-Lip uygulanan hücrelerin %7,0'sinin canlı, %15,9'unun proapoptotik, %70,0'inin geç apoptozda olduğunu ve %7,1'inin de nekrotik olduğunu gösterdi.

Elde edilen veriler doğrultusunda tez kapsamında hazırlanan ilaç taşıma sisteminin karaciğer kanseri tedavisinde daha etkin bir tedavi sağlamanın yanı sıra sağlıklı hücrelere verilen zararın ortadan kaldırılmasında avantaj sağlayacak yeni bir formülasyon olduğu kanısına varıldı.

Gerçekleştirilen deneysel aşamalar sonucunda elde ettiğimiz formülasyonumuzun karaciğer kanseri tedavisinde kullanılabilecek potansiyel bir ilaç taşıma sistemi olabileceği ortaya kondu. Formülasyonun ürüne dönüştürülebilmesini kapsayan hücre içine alım çalışmaları, *in vivo* karaciğer kanseri modelindeki terapötik etkinin araştırılması, farmakokinetik deneyler, ilaçların etkilediği yolaklardaki gen ekspresyonu gibi ileri çalışmalar aracılığıyla formülasyonun faz öncesi çalışmalarının da tamamlanması gerektiği kanısındayız.

7. KAYNAKLAR

1. **Brown JS, Amend SR, Austin RH, Gatenby RA, Hammarlund EU, Pienta KJ.** Updating the Definition of Cancer. *Mol Cancer Res.* **2023**;21(11):1142–7.
2. **Hanahan D.** Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* **2022**;12(1):31–46.
3. **Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al.** Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* **2024**;74(3):229–63.
4. **Wang Y, Deng B.** Hepatocellular carcinoma: molecular mechanism, targeted therapy, and biomarkers. *Cancer Metastasis Rev.* **2023**;42(3):629–52. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10555-023-10084-4>
5. **Calderon-Martinez E, Landazuri-Navas S, Vilchez E, Cantu-Hernandez R, Mosquera-Moscoso J, Encalada S, et al.** Prognostic Scores and Survival Rates by Etiology of Hepatocellular Carcinoma: A Review. *J Clin Med Res.* **2023**;15(4):200–7. Available from: <https://www.doi.org/10.14740/jocmr4902>
6. **Leowattana W, Leowattana T, Leowattana PT.** Systemic treatment for unresectable hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* **2023**;29(10):1551–68.
7. **Feng MY, Chan LL, Chan SL.** Drug Treatment for Advanced Hepatocellular Carcinoma: First-Line and Beyond. *Curr Oncol.* **2022**;29(8):5489–507.
8. **Aditya S, Rattan A.** Vismodegib: A smoothened inhibitor for the treatment of advanced basal cell carcinoma. *Indian Dermatol Online J.* **2013**;4(4):365.
9. **Nguyen NM, Cho J.** Hedgehog Pathway Inhibitors as Targeted Cancer Therapy and Strategies to Overcome Drug Resistance. *Int J Mol Sci.* **2022**;23(3).
10. **Iyer R, Fetterly G, Lugade A, Thanavala Y.** Sorafenib: A clinical and pharmacologic review. *Expert Opin Pharmacother.* **2010**;11(11):1943–55.
11. **Bhatia S.** Nanoparticles Types, Classification, Characterization, Fabrication Methods and Drug Delivery Applications. *Natural Polymer Drug Delivery Systems: Nanoparticles, Plants, and Algae.* Springer; **2016**. 1–225 p.
12. **Nsairat H, Khater D, Sayed U, Odeh F, Al Bawab A, Alshaer W.** Liposomes: structure, composition, types, and clinical applications. *Heliyon.* **2022**;8(5):e09394. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09394>
13. **Large DE, Abdelmessih RG, Fink EA, Auguste DT.** Liposome composition in drug delivery design, synthesis, characterization, and clinical application. *Adv Drug Deliv Rev.* **2021**;176:113851. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.113851>
14. **Shinde VR, Revi N, Murugappan S, Singh SP, Rengan AK.** Enhanced permeability and retention effect: A key facilitator for solid tumor targeting by nanoparticles. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* **2022**;39(June 2021):102915. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2022.102915>
15. **World health organization;** Cancer. **2018**. p. 1. Available from: <https://www.who.int/health-topics/cancer>
16. **Hanahan D, Weinberg RA.** Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell.* **2011**;144(5):646–74.

Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

17. **Roerden M, Spranger S.** Cancer immune evasion, immunoediting and intratumour heterogeneity. *Nat Rev Immunol.* **2025**; Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41577-024-01111-8>
18. **Bailey SM.** Editorial: Hallmark of cancer: replicative immortality. *Front Oncol.* **2023**;13(April):14–5.
19. **Mohammad RM, Muqbila I, Lowec L, Yedjoud C, Hsue HY, Linf LT, Siegeling MD, Fimognari C, Kumari NB, Doua QP, Yangk H, Samadil AK, Russom GL, Carmela Spagnuolo C et al.** Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer. *Semin Cancer Biol.* **2015**;35(0):78–103.
20. **Tracey A. Martin, Lin Ye, Andrew J. Sanders, Jane Lane and WGJ.** Cancer Invasion and Metastasis: Molecular and Cellular Perspective. **2013.** Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK164700/>
21. **Li Y, Liu F, Cai Q, Deng L, Ouyang Q, Zhang XHF, et al.** Invasion and metastasis in cancer: molecular insights and therapeutic targets. *Signal Transduct Target Ther.* **2025**;10(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41392-025-02148-4>
22. **Nishida N, Yano H, Nishida T, Kamura T, Kojiro M.** Angiogenesis in cancer. *Vasc Health Risk Manag.* **2006**;2(3):213–9.
23. **Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD.** Genomic instability an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2010**;11(3):220–8.
24. **Yao Y, Dai W.** Genomic Instability and Cancer. *J Carcinog Mutagen.* **2014**;5:1–17.
25. **Pavlova NN, Thompson CB.** Emerging metabolic hallmarks of cancer. *Cell Metab.* **2016**;23(1):27–47.
26. **Oliveira GL, Coelho AR, Marques R, Oliveira PJ.** Cancer cell metabolism: Rewiring the mitochondrial hub. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* **2021**;1867(2):166016. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbdis.2020.166016>
27. **Hammoudi N, Ahmed KBR, Garcia-Prieto C, Huang P.** Metabolic alterations in cancer cells and therapeutic implications. *Chin J Cancer.* **2011**;30(8):508–25.
28. **International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, Global Cancer Observatory;** Available from: <https://gco.iarc.fr/en>.
29. **Populations @ Gco.Iarc.Fr** [Internet]. Available from: <http://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-populations?population=900&sex=0>.
30. **Rumgay H, Arnold M, Ferlay J, Lesi O, Cabaasag CJ, Vignat J, et al.** Global burden of primary liver cancer in 2020 and predictions to 2040. *J Hepatol.* **2022**;77(6):1598–606. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2022.08.021>
31. **Guichard C, Amaddeo G, Imbeaud S, Ladeiro Y, Pelletier L, Maad I Ben, et al.** Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma. *Nat Genet.* **2012**;44(6):694–8.
32. **Xu X, Tao Y, Shan L, Chen R, Jiang H, Qian Z, et al.** The role of MicroRNAs in hepatocellular carcinoma. *J Cancer.* **2018**;9(19):3557–69.
33. **Kudo M.** Signaling pathway and molecular-targeted therapy for hepatocellular carcinoma. *Dig Dis.*

2011;29(3):289–302.

34. **Galuppo R, Maynard E, Shah M, Daily MF, Chen C, Spear BT, et al.** Synergistic inhibition of HCC and liver cancer stem cell proliferation by targeting RAS/RAF/MAPK and WNT/ β -Catenin pathways. *Anticancer Res.* **2014**;34(4):1709–14.
35. **Rossi L.** Current approach in the treatment of hepatocellular carcinoma. *World J Gastrointest Oncol.* **2010**;2(9):348.
36. **Maluccio M, Covey A.** Recent progress in understanding, diagnosing, and treating hepatocellular carcinoma. *CA Cancer J Clin.* **2012**;62(6):394–9.
37. **Zhou J, Sun H, Wang Z, Cong W, Wang J, Zeng M, et al.** Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Hepatocellular Carcinoma (2019 Edition). *Liver Cancer.* **2020**;9(6):682–720.
38. **Yang X, Yang C, Zhang S, Geng H, Zhu AX, Bernards R, et al.** Precision treatment in advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell.* **2024**;42(2):180–97.
39. **Sadagopan N, He AR.** Recent Progress in Systemic Therapy for Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Int J Mol Sci.* **2024**;25(2).
40. **Keating GM.** Sorafenib: A Review in Hepatocellular Carcinoma. *Target Oncol.* **2017**;12(2):243–53.
41. **Marisi G, Cucchetti A, Ulivi P, Canale M, Cabibbo G, Solaini L, et al.** Ten years of sorafenib in hepatocellular carcinoma: Are there any predictive and/or prognostic markers? *World J Gastroenterol.* **2018**;24(36):4152–63.
42. **Cabral LKD, Tiribelli C, Sukowati CHC.** Sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma: The relevance of genetic heterogeneity. *Cancers (Basel).* **2020**;12(6):1–19.
43. **Abdel-Rahman O, Fouad M.** Sorafenib-based combination as a first line treatment for advanced hepatocellular carcinoma: A systematic review of the literature. *Crit Rev Oncol Hematol.* **2014**;91(1):1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2013.12.013>
44. **Zhu YJ, Zheng B, Wang HY, Chen L.** New knowledge of the mechanisms of sorafenib resistance in liver cancer. *Acta Pharmacol Sin.* **2017**;38(5):614–22.
45. **Sorafenib** @ pubchem.ncbi.nlm.nih.gov [Internet]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sorafenib>
46. **Tang W, Chen Z, Zhang W, Cheng Y, Zhang B, Wu F, et al.** The mechanisms of sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma: theoretical basis and therapeutic aspects. *Signal Transduct Target Ther.* **2020**;5(1):1–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41392-020-0187-x>
47. **Westin SN, Sood AK, Coleman RL.** Targeted therapy and molecular genetics [Internet]. Ninth Edit. *Clinical Gynecologic Oncology.* Elsevier Inc.; **2018.** 470–492.e10 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-323-40067-1.00018-8>
48. **Reiss KA, Yu S, Mamtani R, Mehta R, D’Addeo K, Wileyto EP, et al.** Starting dose of sorafenib for the treatment of hepatocellular carcinoma: A retrospective, multi-institutional study. *J Clin Oncol.* **2017**;35(31):3575–81.
49. **Li Y, Gao ZH, Qu XJ.** The adverse effects of sorafenib in patients with advanced cancers. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* **2015**;116(3):216–21.
50. **Keating GM, Santoro A.** Sorafenib: A review of its use in advanced hepatocellular carcinoma. *Drugs.* **2009**;69(2):223–40.

51. **Niu L, Liu L, Yang S, Ren J, Lai PBS, Chen GG.** New insights into sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma: Responsible mechanisms and promising strategies. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer*. **2017**;1868(2):564–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2017.10.002>
52. **Kong FH, Ye QF, Miao XY, Liu X, Huang SQ, Xiong L, et al.** Current status of sorafenib nanoparticle delivery systems in the treatment of hepatocellular carcinoma. *Theranostics*. **2021**;11(11):5464–90.
53. **Khan MA, Raza A, Ovais M, Sohail MF, Ali S.** Current state and prospects of nano-delivery systems for sorafenib. *Int J Polym Mater Polym Biomater*. **2018**;67(18):1105–15. Available from: <https://doi.org/10.1080/00914037.2018.1429434>
54. **Dlugosz A, Agrawal S, Kirkpatrick P.** Vismodegib. *Nat Rev Drug Discov*. **2012**;11(6):437–8.
55. **Vismodegib** @ pubchem.ncbi.nlm.nih.gov [Internet]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Vismodegib>
56. **Sari IN, Phi LTH, Jun N, Wijaya YT, Lee S, Kwon HY.** Hedgehog signaling in cancer: A prospective therapeutic target for eradicating cancer stem cells. *Cells*. **2018**;7(11).
57. **Jing J, Wu Z, Wang J, Luo G, Lin H, Fan Y, et al.** Hedgehog signaling in tissue homeostasis, cancers, and targeted therapies. *Signal Transduct Target Ther*. **2023**;8(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41392-023-01559-5>
58. **Fan YH, Ding J, Nguyen S, Liu XJ, Xu G, Zhou HY, et al.** Aberrant hedgehog signaling is responsible for the highly invasive behavior of a subpopulation of hepatoma cells. *Oncogene*. **2016**;35(1):116–24.
59. **Wang S, Wang Y, Xun X, Zhang C, Xiang X, Cheng Q, et al.** Hedgehog signaling promotes sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma patient-derived organoids. *J Exp Clin Cancer Res*. **2020**;39(1):1–15.
60. **Luo X, He X, Zhang X, Zhao X, Zhang Y, Shi Y, et al.** Hepatocellular carcinoma: signaling pathways, targeted therapy, and immunotherapy. *MedComm*. **2024**;5(2):1–29.
61. **Hu Q, Hu X, Zhang L, Zhao Y, Li L.** Targeting Hedgehog signalling in CD133-positive hepatocellular carcinoma: improving Lenvatinib therapeutic efficiency. *Med Oncol* [Internet]. **2021**;38(4):1–11. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12032-021-01487-w>
62. **Kandekar SG, Singhal M, Sonaje KB, Kalia YN.** Polymeric micelle nanocarriers for targeted epidermal delivery of the hedgehog pathway inhibitor vismodegib: formulation development and cutaneous biodistribution in human skin. *Expert Opin Drug Deliv*. **2019**;16(6):667–74. Available from: <https://doi.org/10.1080/17425247.2019.1609449>
63. **Aguayo Frías ET, Maza Vega D, Calienni MN, Lillo C, Vazquez DS, Alonso SDV, et al.** Enhanced skin delivery of vismodegib-loaded rigid liposomes combined with ethosomes. *OpenNano*. **2023**;14(August).
64. **Calienni MN, Febres-Molina C, Llovera RE, Zevallos-Delgado C, Tuttolomondo ME, Paolino D, et al.** Nanoformulation for potential topical delivery of Vismodegib in skin cancer treatment. *Int J Pharm*. **2019**;565(April):108–22. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.05.002>
65. **Sultana A, Zare M, Thomas V, Kumar TSS, Ramakrishna S.** Nano-based drug delivery systems: Conventional drug delivery routes, recent developments and future prospects. *Med Drug Discov*. **2022**;15(February):100134. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.medidd.2022.100134>
66. **Elumalai K, Srinivasan S, Shanmugam A.** Review of the efficacy of nanoparticle-based drug

delivery systems for cancer treatment. *Biomed Technol.* **2024**;5(August 2023):109–22. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bmt.2023.09.001>

67. **Petros RA, Desimone JM.** Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nat Rev Drug Discov.* **2010**;9(8):615–27.
68. **Yang J, Jia C, Yang J.** Designing nanoparticle-based drug delivery systems for precision medicine. *Int J Med Sci.* **2021**;18(13):2943–9.
69. **Xu L, Wang X, Liu Y, Yang G, Falconer RJ, Zhao CX.** Lipid Nanoparticles for Drug Delivery. *Adv NanoBiomed Res.* **2022**;2(2).
70. **Ghosn Y, Kamareddine MH, Tawk A, Elia C, El Mahmoud A, Terro K, et al.** Inorganic Nanoparticles as Drug Delivery Systems and Their Potential Role in the Treatment of Chronic Myelogenous Leukaemia. *Technol Cancer Res Treat.* **2019**;18:1–12.
71. **Bhardwaj H, Jangde RK.** Current updated review on preparation of polymeric nanoparticles for drug delivery and biomedical applications. *Next Nanotechnol.* **2023**;2(April):100013. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.nxnano.2023.100013>
72. **Rodríguez F, Caruana P, De la Fuente N, Español P, Gámez M, Balart J, et al.** Nano-Based Approved Pharmaceuticals for Cancer Treatment: Present and Future Challenges. *Biomolecules.* **2022**;12(6):1–27.
73. **Waheed I, Ali A, Tabassum H, Khatoon N, Lai WF, Zhou X.** Lipid-based nanoparticles as drug delivery carriers for cancer therapy. *Front Oncol.* **2024**;14(April):1–17.
74. **Edis Z, Wang J, Waqas MK, Ijaz M, Ijaz M.** Nanocarriers-mediated drug delivery systems for anticancer agents: An overview and perspectives. *Int J Nanomedicine.* **2021**;16:1313–30.
75. **Aydın ÜF, Tuli A.** Lipid-Based Nanocarriers and Applications in Medicine. *Recent Prog Pharm Nanobiotechnology A Med Perspect.* **2022**;5:23–52.
76. **Wang S, Chen Y, Guo J, Huang Q.** Liposomes for Tumor Targeted Therapy: A Review. *Int J Mol Sci.* **2023**;24(3):1–25.
77. **Liu P, Chen G, Zhang J.** A Review of Liposomes as a Drug Delivery System: Current Status of Approved. *Molecules.* **2022**;27(4):1372.
78. **Daraee H, Etemadi A, Kouhi M, Alimirzalu S, Akbarzadeh A.** Application of liposomes in medicine and drug delivery. *Artif Cells, Nanomedicine Biotechnol.* **2016**;44(1):381–91.
79. **Lombardo D, Kiselev MA.** Methods of Liposomes Preparation: Formation and Control Factors of Versatile Nanocarriers for Biomedical and Nanomedicine Application. *Pharmaceutics.* **2022**;14(3).
80. **Sercombe L, Veerati T, Moheimani F, Wu SY, Sood AK, Hua S.** Advances and challenges of liposome assisted drug delivery. *Front Pharmacol.* **2015**;6(DEC):1–13.
81. **Has C, Sunthar P.** A comprehensive review on recent preparation techniques of liposomes. *J Liposome Res.* **2020**;30(4):336–65. Available from: <https://doi.org/10.1080/08982104.2019.1668010>
82. **Forssen E, Willis M.** Ligand-targeted liposomes. *Adv Drug Deliv Rev.* **1998**;29(3):249–71.
83. **Lee Y, Thompson DH.** Stimuli-responsive liposomes for drug delivery. *Wiley Interdiscip Rev Nanomedicine Nanobiotechnology.* **2017**;9(5):1–76.
84. **Sun C.** Bubble Liposome: a Modern Theranostic Approach of New Drug Delivery. *World J Pharm*

Pharm Sci. **2017**;(May):1290–314.

85. **Gbian DL, Omri A.** Lipid-Based Drug Delivery Systems for Diseases Managements. *Biomedicines.* **2022**;10(9).
86. **Karami N, Moghimipour E, Salimi A.** Liposomes as a novel drug delivery system: Fundamental and pharmaceutical application. *Asian J Pharm.* **2018**;12(1):S31–41.
87. **Mozafari M.** Liposomes: An Overview of Manufacturing Techniques. *Cell Mol Biol Lett.* **2005**;10(October 2005):711–9. Available from: <http://www.cmbi.org.pl>.
88. **Yu B, Lee RJ and Lee JL.** Microfluidic Methods for Production of Liposomes. *Methods Enzym.* **2009**;465:129–41.
89. **Zhang H.** Thin-film hydration followed by extrusion method for liposome preparation. *Methods Mol Biol.* **2017**;1522:17–22.
90. **Tian H, Zhang T, Qin S, Huang Z, Zhou L, Shi J, et al.** Enhancing the therapeutic efficacy of nanoparticles for cancer treatment using versatile targeted strategies. Vol. 15, *Journal of Hematology and Oncology.* BioMed Central; **2022**. 1–40 p. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13045-022-01320-5>
91. **Hafeez MN, Celia C, Petrikaite V.** Challenges towards Targeted Drug Delivery in Cancer Nanomedicines. *Processes.* **2021**;9.
92. **Bazak R, Hourri M, Achy S El, Hussein W, Refaat T.** Passive targeting of nanoparticles to cancer: A comprehensive review of the literature. *Mol Clin Oncol.* **2014**;2(6):904–8.
93. **Huynh NT, Roger E, Lautram N, Benoît JP, Passirani C.** The rise and rise of stealth nanocarriers for cancer therapy: Passive versus active targeting. *Nanomedicine.* **2010**;5(9):1415–33.
94. **Pearce AK, O'Reilly RK.** Insights into Active Targeting of Nanoparticles in Drug Delivery: Advances in Clinical Studies and Design Considerations for Cancer Nanomedicine. *Bioconjug Chem.* **2019**;30(9):2300–11.
95. **Sun L, Liu H, Ye Y, Lei Y, Islam R, Tan S, et al.** Smart nanoparticles for cancer therapy. *Signal Transduct Target Ther.* **2023**;8(1).
96. **Bazak R, Hourri M, Achy S El, Kamel S, Officer H, Refaat T, et al.** Cancer active targeting by nanoparticles: a comprehensive review of literature. *J Cancer Res Clin Oncol.* **2016**;141(5):769–84.
97. **Rahim MA, Jan N, Khan S, Shah H, Madni A, Khan A, et al.** Recent advancements in stimuli responsive drug delivery platforms for active and passive cancer targeting. *Cancers (Basel).* **2021**;13(4):1–52.
98. **Qiao Y, Wan J, Zhou L, Ma W, Yang Y, Luo W, et al.** Stimuli-responsive nanotherapeutics for precision drug delivery and cancer therapy. *Wiley Interdiscip Rev Nanomedicine Nanobiotechnology.* **2019**;11(1):1–20.
99. **Thomas RG, Surendran SP, Jeong YY.** Tumor Microenvironment-Stimuli Responsive Nanoparticles for Anticancer Therapy. *Front Mol Biosci.* **2020**;7(December).
100. **Tian M, Xin X, Wu R, Guan W, Zhou W.** Advances in intelligent-responsive nanocarriers for cancer therapy. *Pharmacol Res.* **2022**;178(December 2021):106184. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2022.106184>
101. **Huang X, Caddell R, Yu BO, Xu S. et al.** Ultrasound-enhanced Microfluidic Synthesis of

- Liposomes. *Anticancer Res.* **2010**;30(2):463–6.
102. **Ahmed KS, Hussein SA, Ali AH, Korma SA, Lipeng Q, Jinghua C.** Liposome: composition, characterisation, preparation, and recent innovation in clinical applications. *J Drug Target.* **2019**;27(7):742–61. Available from: <https://doi.org/10.1080/1061186X.2018.1527337>
 103. **Y.Yao, Z. Su, Y. Liang NZ.** pH-Sensitive carboxymethyl chitosan-modified cationic liposomes for sorafenib and siRNA co-delivery. *Int J Med.* **2015**;6185–98.
 104. **Pulusu VS, Kommarajula P.** Chromatography Development and Validation of a New Chromatographic Method for the Estimation of Vismodegib by RP-HPLC. *J Chromatogr Sep.* **2019**;10(3):1–6.
 105. **Sorafenib** DB00398 @ go.drugbank.com [Internet]. Available from: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00398>
 106. **Sorafenib** @ www.drugs.com [Internet]. Available from: <https://www.drugs.com/dosage/sorafenib.html>
 107. **Vismodegib** DB08828 @ go.drugbank.com [Internet]. Available from: <https://go.drugbank.com/drugs/DB08828>
 108. **Vismodegib** @ www.drugs.com [Internet]. Available from: <https://www.drugs.com/dosage/vismodegib.html>
 109. **Li Y, Pu S, Liu Q, Li R, Zhang J, Wu T, et al.** An integrin-based nanoparticle that targets activated hepatic stellate cells and alleviates liver fibrosis. *J Control Release.* **2019**;303(March):77–90. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.04.022>
 110. Calienni MN, Vega DM, Temprana CF, Izquierdo MC, Ybarra DE, Bernabeu E, et al. The topical nanodelivery of vismodegib enhances its skin penetration and performance in vitro while reducing its toxicity in vivo. *Pharmaceutics.* **2021**;13(2).
 111. **Xiao Y, Liu Y, Yang S, Zhang B, Wang T, Jiang D, et al.** Sorafenib and gadolinium co-loaded liposomes for drug delivery and MRI-guided HCC treatment. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* **2016**;141:83–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.01.016>
 112. **Guo Y, Zhang Y, Ma J, Li Q, Li Y, Zhou X, et al.** Light/magnetic hyperthermia triggered drug released from multi-functional thermo-sensitive magnetoliposomes for precise cancer synergetic theranostics. *J Control Release.* **2018**;272(April 2017):145–58.
 113. **Yao Y, Hu Y, Meng X, Feng F, Xu F, Wang G, et al.** Dual-targeting liposomal delivery of sorafenib and docetaxel for enhanced synergistic therapy in advanced hepatocellular carcinoma. *Pharm Sci Adv.* **2024**;2(March):100046.
 114. **Mayer A, Vadon M, Rinner B, Novak A, Wintersteiger R, Fröhlich E.** The role of nanoparticle size in hemocompatibility. *Toxicology.* **2009**;258(2–3):139–47.
 115. **Yallapu MM, Chauhan N, Othman SF, Khalilzad-Sharghi V, Ebeling MC, Khan S, et al.** Implications of protein corona on physico-chemical and biological properties of magnetic nanoparticles. *Biomaterials.* **2015**;46:1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.12.045>
 116. **Nogueira DR, Scheeren LE, Pilar Vinardell M, Mitjans M, Rosa Infante M, Rolim CMB.** Nanoparticles incorporating pH-responsive surfactants as a viable approach to improve the intracellular drug delivery. *Mater Sci Eng C.* **2015**;57:100–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2015.07.036>

117. **Liu X, Shan K, Shao X, Shi X, He Y, Liu Z, et al.** Nanotoxic effects of silver nanoparticles on normal HEK-293 cells in comparison to cancerous hela cell line. *Int J Nanomedicine*. **2021**;16:753–61.
118. **Yulong Jin, Yanyan Huang, Hua Yang GL and RZ.** A peptide-based pH-sensitive drug delivery system for targeted ablation of cancer cells. *R Soc Chem*. **2015**;1–4.
119. **Xiao L, Hou Y, He H, Cheng S, Hou Y, Jin H, et al.** A novel targeted delivery system for drug-resistant hepatocellular carcinoma therapy. *Nanoscale*. **2020**;12(32):17029–44.
120. **Mdlovu NV, Lin KS, Weng MT, Hsieh CC, Lin YS, Carrera Espinoza MJ.** In vitro intracellular studies of pH and thermo-triggered doxorubicin conjugated magnetic SBA-15 mesoporous nanocarriers for anticancer activity against hepatocellular carcinoma. *J Ind Eng Chem*. **2021**;102:1–16. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2021.06.004>
121. **Mosmann T.** Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J Immunol Methods*. **1983**;65:55–63.
122. **Ghasemi M, Turnbull T, Sebastian S, Kempson I.** The mtt assay: Utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. *Int J Mol Sci*. **2021**;22(23).
123. **Chang HC, Huang YT, Chen CS, Chen YW, Huang YT, Su JC, et al.** In vitro and in vivo activity of a novel sorafenib derivative SC5005 against MRSA. *J Antimicrob Chemother*. **2016**;71(2):449–59.
124. **Albalawi F, Hussein MZ, Fakurazi S, Masarudin MJ.** Fabrication and characterization of nanodelivery platform based on chitosan to improve the anticancer outcome of sorafenib in hepatocellular carcinoma. *Sci Rep*. **2023**;13(1):1–13. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-38054-4>
125. **van Malenstein H, Dekervel J, Verslype C, Van Cutsem E, Windmolders P, Nevens F, et al.** Long-term exposure to sorafenib of liver cancer cells induces resistance with epithelial-to-mesenchymal transition, increased invasion and risk of rebound growth. *Cancer Lett*. **2013**;329(1):74–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2012.10.021>
126. **Bartos A, Iancu I, Ciobanu L, Onaciu A, Moldovan C, Moldovan A, et al.** Hybrid Lipid Nanoformulations for Hepatoma Therapy: Sorafenib Loaded Nanoliposomes—A Preliminary Study. *Nanomaterials*. **2022**;12(16).
127. **Annexin-v-fitc-reagent--e-ck-a111** @ www.elabscience.com [Internet]. Available from: <https://www.elabscience.com/p/annexin-v-fitc-reagent--e-ck-a111>
128. **Hingorani R, Deng J, Elia J, McIntyre C, Mittar D.** Detection of Apoptosis Using the BD Annexin V FITC Assay on the BD FACSVerse™ System. *BD Biosci*. **2011**;8(August):1–2.
129. **Kumar R, Saneja A, Panda AK.** An Annexin V-FITC-Propidium Iodide-Based Method for Detecting Apoptosis in a Non-Small Cell Lung Cancer Cell Line. *Methods Mol Biol*. **2021**. p. 213–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33683697/>.
130. **Tunki L, Kulhari H, Vadithe LN, Kuncha M, Bhargava S, Pooja D, et al.** Modulating the site-specific oral delivery of sorafenib using sugar-grafted nanoparticles for hepatocellular carcinoma treatment. *Eur J Pharm Sci*. **2019**;137(June):104978. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2019.104978>
131. **Taha AM, Aboulwafa MM, Zedan H, Helmy OM.** Ramucirumab combination with sorafenib enhances the inhibitory effect of sorafenib on HepG2 cancer cells. *Sci Rep*. **2022**;12(1):1–16. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-21582-w>

132. **Yao Y, Wang T, Liu Y, Zhang N.** Co-delivery of sorafenib and VEGF-siRNA via pH-sensitive liposomes for the synergistic treatment of hepatocellular carcinoma. *Artif Cells, Nanomedicine Biotechnol.* **2019**;47(1):1374–83. Available from: <https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1596943>
133. **Danaei M, Dehghankhold M, Ataei S, Hasanzadeh Davarani F, Javanmard R, Dokhani A, et al.** Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics.* **2018**;10(2):1–17.
134. **Clogston JD, Patri AK.** Zeta Potential Measurement. *Methods Mol Biol.* **2011**;697:63–70.
135. **Güler G, Gärtner RM, Ziegler C, Mäntele W.** Lipid-protein interactions in the regulated betaine symporter BetP probed by infrared spectroscopy. *J Biol Chem.* **2016**;291(9):4295–307.
136. **Zhang L, Song X, Qi Q, Liu W.** Interaction of DPPC liposomes with cholesterol and food protein during in vitro digestion using Dynamic Light Scattering and FTIR spectroscopy analysis. *Food Chem.* **2022**;375(August 2021):131893. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131893>
137. **Rudra A, Deepa RM, Ghosh MK, Ghosh S, Mukherjee B.** Doxorubicin-loaded phosphatidylethanolamine-conjugated nanoliposomes: In vitro characterization and their accumulation in liver, kidneys, and lungs in rats. *Int J Nanomedicine.* **2010**;5(1):811–23.
138. **Briuglia ML, Rotella C, McFarlane A, Lamprou DA.** Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release. *Drug Deliv Transl Res.* **2015**;5(3):231–42.
139. **Sariisik E, Koçak M, Küçük Baloğlu F, Severcan F.** Interaction of the cholesterol reducing agent simvastatin with zwitterionic DPPC and charged DPPG phospholipid membranes. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* **2019**;1861(4):810–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2019.01.014>
140. **Ybarra DE, Calienni MN, Ramirez LFB, Frias ETA, Lillo C, Alonso S del V, et al.** Vismodegib in PAMAM-dendrimers for potential theragnosis in skin cancer. *OpenNano.* **2022**;7(March):100053. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.onano.2022.100053>
141. **Wiergowska G, Stasiłowicz A, Miklaszewski A, Lewandowska K, Cielecka-Piontek J.** Structural polymorphism of sorafenib tosylate as a key factor in its solubility differentiation. *Pharmaceutics.* **2021**;13(3).
142. **Calienni MN, Tuttolomondo ME, Alonso V, Montanari J, Alvira FC.** Experimental and theoretical study of the structural features of Vismodegib molecule. *J Mol Struct.* **2020**;1205:127581. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.127581>
143. **Estrella V, Chen T, Lloyd M, Wojtkowiak J, Cornnell HH, Ibrahim-Hashim A, et al.** Acidity generated by the tumor microenvironment drives local invasion. *Cancer Res.* **2013**;73(5):1524–35.
144. **Xu J, Li Y, Li Z, Shao W, Song J, Wei J.** Acidic Tumor Microenvironment Promotes Pancreatic Cancer through miR-451a/MEF2D Axis. *J Oncol.* **2022**.
145. **Amin K, Dannenfelser RM.** In Vitro Hemolysis: Guidance for the Pharmaceutical Scientist. *J Pharm Sci.* **2012**;101(7):2271–80.
146. **Jagwani S, Jalalpure S, Dhamecha D, Jadhav K, Bohara R.** Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Evaluation of Resveratrol Loaded Cationic Liposomes for Targeting Hepatocellular Carcinoma. *ACS Biomater Sci Eng.* **2020**;6(9):4969–84.
147. **Neun BW, Ilinskaya AN, Dobrovolskaia MA.** Updated method for in vitro analysis of nanoparticle hemolytic properties. *Methods Mol Biol.* **2018**;1682:91–102.

148. **Culture Collection AT.** MTT Cell Proliferation Assay. ATCC, *Instr Guid.* **2024**;ATCC® 30-1:1–6.
149. **Gerlier D, Thomasset N.** Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J Immunol Methods.* **1986**;94(1–2):57–63.
150. **Alshehade SA, Almoustafa HA, Alshawsh MA, Chik Z.** Flow cytometry-based quantitative analysis of cellular protein expression in apoptosis subpopulations: A protocol. *Heliyon.* **2024**;10(13):e33665. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e33665>
151. **Cannito S, Bincoletto V, Turato C, Pontisso P, Scupoli MT, Ailuno G, et al.** Hyaluronated and PEGylated Liposomes as a Potential Drug-Delivery Strategy to Specifically Target Liver Cancer and Inflammatory Cells. *Molecules.* **2022**;27(3).
152. **Zhang L, Kuang Y, Liu J, Liu Z, Huang S, Zhuo R.** Long circulating anionic liposomes for hepatic targeted delivery of cisplatin. *RSC Adv.* **2016**;6(80):76905–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/C6RA08566K>
153. **Chang SF, Yeh CC, Chen PJ, Chang HI.** The impact of lipid types and liposomal formulations on osteoblast adiposity and mineralization. *Molecules.* **2018**;23(1):1–17.
154. **Pamunuwa G, Karunaratne V, Karunaratne DN.** Effect of lipid composition on in vitro release and skin deposition of curcumin encapsulated liposomes. *J Nanomater.* **2016**;2016.
155. **Bozzuto G, Molinari A.** Liposomes as nanomedical devices. *Int J Nanomedicine.* **2015**;10:975–99.
156. **Attia MF, Anton N, Wallyn J, Omran Z, Vandamme TF.** An overview of active and passive targeting strategies to improve the nanocarriers efficiency to tumour sites. *J Pharm Pharmacol.* **2019**;71(8):1185–98.
157. **Sachaniya J, Savaliya R, Goyal R, Singh S.** Liposomal formulation of vitamin A for the potential treatment of osteoporosis. *Int J Nanomedicine.* **2018**;13:51–3.
158. **Wei M, Xu Y, Zou Q, Tu L, Tang C, Xu T, et al.** Hepatocellular carcinoma targeting effect of PEGylated liposomes modified with lactoferrin. *Eur J Pharm Sci.* **2012**;46(3):131–41.
159. **Gao W, Chan J, Farokhzad OC.** pH-responsive Nanoparticles for Drug Delivery. *Mol Pharm.* **2010**;7(6):1913–20.
160. **Gulati M, Grover M, Singh S, Singh M.** Lipophilic drug derivatives in liposomes. *Int J Pharm.* **1998**;165(2):129–68.
161. **Monteiro N, Martins A, Reis RL, Neves NM.** Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine. *J R Soc Interface.* **2014**;11(101).
162. **Salem HF, Gamal A, Saeed H, Kamal M, Tulbah AS.** Enhancing the Bioavailability and Efficacy of Vismodegib for the Control of Skin Cancer: In Vitro and In Vivo Studies. *Pharmaceuticals.* **2022**;15(2):1–14.
163. **Kohli AG, Kierstead PH, Venditto VJ, Walsh CL, Szoka FC.** Designer lipids for drug delivery: From heads to tails. *J Control Release.* **2014**;190:274–87. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.04.047>
164. **Nagayasu A, Uchiyama K, Kiwada H.** The size of liposomes: A factor which affects their targeting efficiency to tumors and therapeutic activity of liposomal antitumor drugs. *Adv Drug Deliv Rev.* **1999**;40(1–2):75–87.
165. **Zhang H, Zhang FM, Yan SJ.** Preparation, in vitro release, and pharmacokinetics in rabbits of

- lyophilized injection of sorafenib solid lipid nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. **2012**;7:2901–10.
166. **Sainaga Jyothi VGS, Bulusu R, Venkata Krishna Rao B, Pranothi M, Banda S, Kumar Bolla P, et al.** Stability characterization for pharmaceutical liposome product development with focus on regulatory considerations: An update. *Int J Pharm*. **2022**;624(May):122022. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.122022>
 167. **Yu JY, Chuesiang P, Shin GH, Park HJ.** Post-processing techniques for the improvement of liposome stability. *Pharmaceutics*. **2021**;13(7).
 168. **Ghanbarzadeh S, Valizadeh H, Zakeri-Milani P.** The effects of lyophilization on the physico-chemical stability of sirolimus liposomes. *Adv Pharm Bull*. **2013**;3(1):25–9.
 169. **Crommelin DJA, van Bommel EMG.** Stability of liposomes on storage: Freeze Dried, Frozen or as an Aqueous Dispersion. *Pharmaceutical Research*. **1983** p. 159–63. Available from: [papers3://publication/uuid/3E74CA00-5FDB-4680-BD4F-2F2B8E2D51EA](https://pubs.rsc.org/en/publication/uuid/3E74CA00-5FDB-4680-BD4F-2F2B8E2D51EA).
 170. **Michanetzis GPAK, Missirlis YF, Antimisariis SG.** Haemocompatibility of nanosized drug delivery systems: Has it been adequately considered? *J Biomed Nanotechnol*. **2008**;4(3):218–33.
 171. **Wojewodzka J, Pazdzior G, Langner M.** A method to evaluate the effect of liposome lipid composition on its interaction with the erythrocyte plasma membrane. *Chemistry and Physics of Lipids*. **2005**;135:181–7.
 172. **Elmowafy M, Viitala T, Ibrahim HM, Abu-Elyazid SK, Samy A, Kassem A, et al.** Silymarin loaded liposomes for hepatic targeting: In vitro evaluation and HepG2 drug uptake. *Eur J Pharm Sci*. **2013**;50(2):161–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2013.06.012>
 173. **Zhao X, Yang Y, Su X, Xie Y, Liang Y, Zhou T, et al.** Transferrin-Modified Triptolide Liposome Targeting Enhances Anti-Hepatocellular Carcinoma Effects. *Biomedicines*. **2023**;11(10).
 174. **Fan J, Zhang X, Wang S, Chen WT, Li Y, Zeng X, et al.** Regulating autophagy facilitated therapeutic efficacy of the sonic Hedgehog pathway inhibition on lung adenocarcinoma through GLI2 suppression and ROS production. *Cell Death Dis*. **2019**;10(9).
 175. **Mokhtari RB, Homayouni TS, Baluch N, Morgatskaya E, Kumar S, Das B, et al.** Combination therapy in combating cancer. *Oncotarget*. **2017**;8(23):38022–43. Available from: www.impactjournals.com/oncotarget
 176. **Hasan AM, Cavalu S, Saber S, Doghish AS, Hamad RS, Abdel-Reheim MA, et al.** Hedgehog signaling mastery: R51211's promise in augmenting the therapeutic efficacy of sorafenib. *Life Sci*. **2024**;351(February):122791. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2024.122791>
 177. **Espinosa-Bustos C, Bertrand J, Villegas-Menares A, Guerrero S, Di Marcotullio L, Navacci S, et al.** New Smoothed ligands based on the purine scaffold as potential agents for treating pancreatic cancer. *Bioorg Chem*. **2024**;151(March).
 178. **Ganesan S, Upadhye VJ, Sharma N, Arora A, Chinnathambi A, Alharbi SA, et al.** Construction of Sorafenib Tosylate and Etoposide-loaded Liposomes: A Path to Precision Liver Cancer Therapy and its Apoptosis Induction. *ChemistrySelect*. **2024**;9(48):1–9.
 179. **Gunasekaran K, Vasamsetti BMK, Thangavelu P, Natesan K, Mujiyambere B, Sundaram V, et al.** Cytotoxic Effects of Nanoliposomal Cisplatin and Diallyl Disulfide on Breast Cancer and Lung Cancer Cell Lines. *Biomedicines*. **2023**;11(4):1–16.
 180. **Wong RSY.** Apoptosis in cancer: From pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res*. **2011**;30(1):87. Available from: <http://www.jecr.com/content/30/1/87>

181. **Gökbayrak Atay İN, Gezer AH, Kasap E.** The importance of apoptosis in cancer development and treatment. *Turk Onkol Derg.* **2021**;36(3):381–8.
182. **Luobin L, Wanxin H, Yingxin G, Qinzhou Z, Zefeng L, Danyang W, et al.** Nanomedicine-induced programmed cell death in cancer therapy: mechanisms and perspectives. *Cell Death Discov.* **2024**;10(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41420-024-02121-0>
183. **Hamad I, Harb AA, Bustanji Y.** Liposome-Based Drug Delivery Systems in Cancer Research: An Analysis of Global Landscape Efforts and Achievements. *Pharmaceutics.* **2024**;16(3).
184. **Rieger AM, Nelson KL, Konowalchuk JD, Barreda DR.** Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. *J Vis Exp.* **2011**;50:3–6.
185. István Vermes, Clemens Haanen HSN, Reutellingsperger C. A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine early apoptotic cells using fluorescein labelled expression on Annexin V. *J Immunol Methods.* 1995;184:39–51.
186. **Vermes I, Haanen C, Reutelingsperger C.** Flow cytometry of apoptotic cell death. *J Immunol Methods.* **2000**;243(1–2):167–90.
187. **Sun W, Wang Y, Cai M, Lin L, Chen X, Cao Z, et al.** Codelivery of sorafenib and GPC3 siRNA with PEI-modified liposomes for hepatoma therapy. *Biomater Sci.* **2017**;5(12):2468–79.
188. **Barui S, Conte M, Percivalle NM, Montero RMG, Racca L, Allione M, et al.** Dual Drug Loaded Nanotheranostic Platforms as a Novel Synergistic Approach to Improve Pancreatic Cancer Treatment. *Part Part Syst Charact.* **2023**;40(4).
189. **Farinha D, Migawa M, Sarmiento-Ribeiro A, Faneca H.** A combined antitumor strategy mediated by a new targeted nanosystem to hepatocellular carcinoma. *Int J Nanomedicine.* **2021**;16:3385–405.

EKLER

Ek-1 Etik Kurul Onay Formu



ÖZGEÇMİŞ

