

OSMAN TAYYAR ARLI

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2021

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**SİSPLATİN YÜKLÜ, MİSELER YAPIDA KAZEİN
NANOPARTİKÜLLERİN SENTEZİ,
KARAKTERİZASYONU VE İN VİTRO UYGULAMALARI**

OSMAN TAYYAR ARLI

**DANIŞMAN
PROF.DR.LEMAN YALÇINTEPE GÜNEŞTUTAR**

**BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
BİYOFİZİK**

İSTANBUL-2021

İTHAF

Bu küçük çabayı insanlığın gelişimi için büyük çabalar sarf etmiş devlere ithaf ediyorum...

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın tamamlanmasında başlıca İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Bölümü'nden danışman hocam Prof. Dr. Leman Yalçın-tepe Güneştutar'a ve Bölüm Başkanı Prof. Dr. Muhammet Bektaş'a, çalışmanın konusu hakkında bana yol gösteren ve bana bu yolu açan İstanbul Üniversitesi – Cerrahpaşa – Mühendislik Fakültesi- Kimya Mühendisliği Bölümü'nden Prof. Dr. Serkan Naci Koç'a, bu çalışmanın tamamlanmasında, hücre kültürü ve laboratuvar desteği yanında motivasyon açısından bana çok büyük destek olan Haliç Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Bölümü'nden Dr. Öğrt. Üyesi. Fulya Dal Yöntem'e, lisanstan beri beni teşvik eden ve çalışmalarına devam etmem konusunda beni motive eden İstanbul Üniversitesi – Cerrahpaşa – Mühendislik Fakültesi - Kimya Mühendisliği Bölümü'nden Prof. Dr. Ali Durmuş'a, SEM analizlerimi tamamlamakta bana yardımcı olan İstanbul Üniversitesi – Cerrahpaşa – Mühendislik Fakültesi - Kimya Mühendisliği Bölümü'nden Dr. Öğrt. Üyesi Hasan Özdemir'e ve Prof. Dr. M. A. Faruk Öksüzömer'e, DLS analizlerim için bana laboratuvarlarını açan ve yardımcı olan Prof. Dr. İsmail Boz'a ve Doç. Dr. Mehtap Şafak Boroğlu'na, TEM analizlerimi tamamlamakta bana yardımcı olan İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Bölümü'nden Prof. Dr. Seyhun Solakoğlu ve ekibine, ATR-FT-IR analizimi tamamlamakta bana yardımcı olan Bezmiâlem Vakıf Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Bölümü'nden Doç. Dr. Belma Zengin Kurt'a teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 35612

İÇİNDEKİLER

İTHAF.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
TABLolar LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	x
ÖZET	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Nanoteknoloji ve Kanser Tedavisi için Nanotaşıyıcılar	5
2.2. Nanotaşıyıcıların Tümörlere Hedeflendirilmiş Taşınımı ve EPR Etkisi	8
2.3. Biyobozunur Polimerik Nanopartiküller ve Kontrollü Salım.....	9
2.5. Çoklu İlaç Direncine Karşı Nanotaşıyıcıların Avantajları.....	11
2.6. Protein Esaslı İlaç Nano Taşıyıcılar.....	12
2.6.1. Jelatin	12
2.6.2. Kolajen	14
2.6.3. Albumin	14
2.6.4. Kazein	15
2.6.4.1. Kazeinlerin Yapısı ve Özellikleri.....	16
2.6.4.2. Alfa-Kazein.....	17
2.6.4.3. Beta-Kazein.....	18
2.6.4.4. Kappa-Kazein.....	19
2.6.4.5. Kazein Misel Modelleri	20
2.6.4.6. Kazein Nanomisellerin Uygulamaları.....	22
2.6.4.7. Kazeinlerin Sistemsel Sentezi ve Sekresyonu	29
2.7. Platin Esaslı İlaçların Kimyası.....	32
2.8. Sisplatin Esaslı Nano Taşıyıcı Formülasyonları	33
2.9. Protein Esaslı Nano Taşıyıcıların Dezavantajları ve Gelecek Perspektifleri.....	34
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	36

3.1.GEREÇLER.....	36
3.1.1.Kimyasal Maddeler	36
3.1.2.Sarf Malzemeler	36
3.1.3.Cihazlar	37
3.1.4.Çalışmada Kullanılan Tamponlar	38
3.1.5.Çalışmada Kullanılan Hücre Hatları	38
3.2.YÖNTEMLER.....	39
3.2.1.Miseler Yapıda Kazein Nanopartiküllerin Sentezi	39
3.2.2.Sentezlenen Nanopartiküllerin Karakterizasyonu.....	41
3.2.2.1.Sodyum Dodesil Sülfat – Poliakrilamid Jel Elektroforez (SDS-PAGE) Analizi	41
3.2.2.2.Dinamik Işık Saçılımı Cihazı (DLS) ile Parçacık Boyutu Dağılımı Analizi ..	42
3.2.2.3.Taramalı Elektron Mikroskopi (SEM) Analizi	42
3.2.2.4.Geçirmeli Elektron Mikroskobu (TEM) Analizi	42
3.2.2.5.Zayıflatılmış Toplam Yansıma – Fourier Dönüştürücü Kızılötesi (ATR-FT-IR) Spektrometresi Analizi.....	43
3.2.2.6. İndüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektrometresi (ICP-MS) Analizi.....	44
3.2.3.Hücre Kültürü Çalışmaları.....	44
3.2.3.1.Hücrelerin Açılması	44
3.2.3.2.Hücrelerin Pasajlanması.....	44
3.2.3.3.Hücrelerin Sayılması.....	45
3.2.3.4.Hücrelerin Dondurulması.....	45
3.2.3.5.Hücrelerin Boş ve Sisplatin Yüklü Nanopartiküller ve Serbest Sisplatin ile Muamele Edilmesi	45
3.2.3.6.Hücre Üst Sıvılarından Hücrelere Ulaşmayan Sisplatin Miktarının ICP-MS Analizi ile Belirlenmesi	48
3.2.3.7.Boş Kazein Nanopartiküllerinin, Sisplatin Yüklü Kazein Nanopartiküllerinin ve Serbest Sisplatinin Hücre Canlılığına Olan Etkisinin MTT Testi ile Belirlenmesi	48
3.2.3.8.İstatistiksel Analiz.....	49
4. BULGULAR.....	50
4.1.Sentezlenen Nanopartiküllere Ait Bulgular	50
4.1.1.Molekül Ağırlığı Dağılımları ve Saflikları	50
4.1.2.Parçacık Boyutu Dağılımları.....	51

4.1.3.Yüzey Özellikleri, Morfolojileri ve Boyutları	51
4.1.4.Sisplatin Bağlanması.....	52
4.1.5.Enkapsülasyon Verimliliği.....	54
4.2.Sentezlenen Nanopartiküllerin Hücre Canlılığına Olan Etkilerine Ait Bulgular....	55
4.2.1.Hücrelere Ulaşmayan Sisplatine Ait ICP-MS Bulguları.....	55
4.2.2.MTT Testlerine Ait Bulgular	56
4.2.2.1.MCF-7 Hücre Hattına Ait Bulgular	56
4.2.2.2.A-375 Hücre Hattına Ait Bulgular.....	57
4.2.2.3.3T3 Hücre Hattına Ait Bulgular.....	58
4.2.2.4.HUVEC Hücre Hattına Ait Bulgular	59
5. TARTIŞMA	62
KAYNAKLAR	66
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	89

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1: Kanser tedavisi için nano taşıyıcıların akılcı tasarımı.....	6
Tablo 2:Piyasadaki bazı nano taşıyıcıların örnekleri.....	7
Tablo 3: Çeşitli kazein bazlı nutrasötiklerin özeti. ^[175]	23
Tablo 4: Çeşitli kazein bazlı ilaçlar, bildirilen parçacık boyutları, zeta potansiyeli ve kapsülleme teknikleriyle birlikte listelenmiştir. ^[175]	28
Tablo 5: Klinik araştırmaları devam eden sispaltin nanopartikül formülasyonları. ^[263]	34
Tablo 6: Hücrelere ulaşmayan sispaltine ait ICP-MS bulguları.	55



ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 1: Nanotaşıyıcıların ilaçları tümörlere verebildiği farklı mekanizmaların şematik gösterimi. Polimerik nanopartiküller, temsili nano taşıyıcılar (daireler) olarak gösterilmiştir. Pasif doku hedeflemesi, nanopartiküllerin artan geçirgenliği ve etkisiz lenfatik drenaj (EPR etkisi) yoluyla elde edilir. Aktif hücresel hedefleme (ek), nanopartiküllerin yüzeyini hücreye özgü tanıma ve bağlanmayı destekleyen ligandlarla işlevselleştirerek elde edilebilir. 9
- Şekil 2: (a) Payens tarafından önerilen kaplama çekirdek modeli(b) kazein miselinin alt misel modeli (c) koyu halkaların kalsiyum fosfat nanokümelerini temsil ettiği kazein monomerlerinin Holt modeli. (d) İkili bağlanmayı temsil eden kazein miselinin Horne modeli; burada dikdörtgen çubuklar, protein-protein etkileşimlerinin meydana geldiği hidrofobik bölgeleri temsil ederken, halkalar üçgenler olarak gösterilen kalsiyum fosfat kümelerine bağlanan protein hidrofilik bölgeleri temsil eder ve κ -kazein monomeriktir ve yüzeydedir. ^[145, 159, 170] 21
- Şekil 3: Laktasyon yapan meme bezinin hücre fizyolojisi. Lümeni çevreleyen emziren epitel hücrelerinden oluşan tek bir alveol ve farklı mekanizmalarla protein ve lipidin aktif sekresyonunu gösteren tipik bir laktasyon yapan hücre. ^[128] 30
- Şekil 4: Golgi aygıtlarında (G) kazein misellerinin (CM) oluşumu ve küçük alt miseller partiküllerin daha büyük miseller (üstte) halinde agregasyonu. İçeriğini alveolar lümene (alt) boşaltmak üzere olan bir Golgi aygıtı (G) ve lümende halihazırda bir kazein miseli (CM) ^[128] 30
- Şekil 5: Sulu çözeltide Sisplatinin hidrokso komplekslerinin oluşumu. ^[234] 32
- Şekil 6: Sentez için hazırlanmış olan deney düzeneği. Buz banyosu içinde manyetik karıştırıcıda karışmakta olan sodyum kazeinat dispersiyonu ve pH kontrolü için sabitlenmiş pH metre. 39
- Şekil 7: Ayrılan üst sıvı ve çöken miseller. 40
- Şekil 8: Liyofilize edilmiş örnekler. 40
- Şekil 9: Biorad Elektroforez sistemi. 41
- Şekil 10: Vakumlu etüvde kurutulmuş sisplatin çözeltisi ve çöken toz sisplatin. 43
- Şekil 11: DMEM içinde çözülmüş örnekler. 46
- Şekil 12: Falkon tüplerde hazırlanmış örneklerle ait alikotlar ve hücre kültürü çalışma ortamı. 96 kuyulu plakalardaki hücreler örneklerle muamele edilmeden önce. 47

Şekil 13: A-375, 3T3, HUVEC ve MCF-7 hücre hatlarının 96 kuyulu plakalarda inkübatör içinde görüntüsü.	48
Şekil 14: A-375 hücre hattının 96 kuyulu plakalara ekildikten sonraki görüntüsü ve A-375 hücre hattında formazan kristallerinin oluşumu.	49
Şekil 15: SDS-PAGE jeline ait görüntü.....	50
Şekil 16: Boş ve Sisplatin yüklü kazein nanopartiküllerin parçacık boyutu dağılımları.	51
Şekil 17: Kazein nanopartiküllere ait SEM görüntüleri.....	51
Şekil 18: Kazein nanopartiküllere ait TEM görüntüleri.	52
Şekil 19: Sisplatin, boş kazein ve sisplatin yüklü kazein nanopartiküllere ait ATR-FT-IR spektrumu.....	53
Şekil 20: MCF-7 hücre hattı 24 saatlik ortalama MTT testi sonuçları grafiği.	56
Şekil 21: MCF-7 hücre hattı 48 saatlik ortalama MTT testi sonuçları grafiği.	56
Şekil 22: MCF-7 hücre hattı 72 saatlik ortalama MTT testi sonuçları grafiği.	56
Şekil 23: A-375 hücre hattı 24 saatlik ortalama MTT testi sonuçları grafiği.	57
Şekil 24: A-375 hücre hattı 48 saatlik ortalama MTT testi sonuçları grafiği.	57
Şekil 25: A-375 hücre hattı 72 saatlik ortalama MTT testi sonuçları grafiği.	58
Şekil 26: 3T3 hücre hattı 24 saatlik ortalama MTT testi sonuçları grafiği.....	58
Şekil 27: 3T3 hücre hattı 48 saatlik ortalama MTT testi sonuçları grafiği.....	59
Şekil 28: 3T3 hücre hattı 72 saatlik ortalama MTT testi sonuçları grafiği.....	59
Şekil 29: HUVEC hücre hattı 24 saatlik ortalama MTT testi sonuçları grafiği.	60
Şekil 30: HUVEC hücre hattı 48 saatlik ortalama MTT testi sonuçları grafiği.	60
Şekil 31: HUVEC hücre hattı 72 saatlik ortalama MTT testi sonuçları grafiği.	60

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

EPR Etkisi Enhanced Permeability And Retention Effect, Arttırılmış Geçirgenlik ve Tutma Etkisi

GRAS Generally Recognized As Safe, Genellikle Güvenli Kabul Edilen

CDDP cis-diamindikloroplatin (II)

FDA Food and Drug Administration, Gıda ve İlaç İdaresi

PEG Polietilen Glikol

PLA Polilaktik asit

FITC Floresein İzotiyosiyanat

DNA Deoksiribo nükleik asit

RNA Ribonükleik asit

mAb Monoklonal antikorlar

CD20 Cluster of Differentiation 20, Farklılaşma Kümeleri 20

HPMA N-(2 hidroksipropil)metakrilamid

MDR Multi-Drug Resistance, Çoklu İlaç Direnci

Pgp P-glikoprotein

GA Glutaraldehit

rHG Rekombinant Human Gelatin, Rekombinant İnsan Jelatini

BSA Bovine Serum Albumine, Sığır Serum Albumini

BMP Bone Morphogenetic Protein, Kemik Morfogenetik Proteini

RES Reticuloendothelial System, Retikuloendotelyal Sistem

HSA Human Serum Albumine, İnsan Serum Albumini

EDTA Etilendiamintetraasetik Asit

CCP Colloidal Calcium Phosphate, Kolloidal Kalsiyum Fosfat

ODAM Odontogenic Ameloblast-Associated Protein, Odontojenik ameloblast ilişkili protein

SER Spesifik Serin

SANS Small Angle Neutron Scattering, Küçük Açılı Nötron Saçılımı

EM Elektron Mikroskobu

rCM Re-assembled Casein Micelle, Yeniden birleştirilmiş Kazein Miseli

EGCG Epigallocateşin-3-gallat

β -CN Beta-Kazein

MTGase Mikrobiyal Transglutaminaz

CM Casein Micelle, Kazein Miseli

ER Endoplazmik Retikulum

ERAD Endoplasmic-Reticulum-Associated Protein Degradation, Endoplazmik Retikulumla İlişkili Bozunma

DHA Dokosaheksaenoik asit

GI Gastrointestinal

$C_6H_5K_3O_7 \cdot H_2O$ Tripotasyum Sitrat Monohidrat

K_2HPO_4 Dipotasyum Hidrojen Fosfat

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ Kalsiyum Klorür Dihidrat

HCl Hidroklorik Asit

NaOH Sodyum Hidroksit

DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium/F-12

FBS Fetal Bovine Serum, Fetal Sığır Serumu

PBS Dulbecco's Phosphate Buffer Saline, Fosfat Tamponu

MTT Metiltiazolildifenil-tetraazolyum bromür

DMSO Dimetil Sülfoksit

SEM Scanning Electron Microscope, Taramalı Elektron Mikroskobu

TEM Transmission Electron Microscope, Geçirmeli Elektron Mikroskobu

ATR-FT-IR Attenuated Total Reflectance – Fourier Transform – Infrared Spectroscopy, Zayıflatılmış Toplam Yansıma – Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometresi

DLS Dynamic Light Scattering, Dinamik Işık Saçılımı

ICP-MS Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry, İndüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektrometresi



ÖZET

Arlı OT. Sisplatin Yüklü, Miseler Yapıda Kazein Nanopartiküllerin Sentezi, Karakterizasyonu ve İn Vitro Uygulamaları. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyofizik ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2021.

Bu çalışma kapsamında kanser tedavisinde kullanılan en yaygın ve etkili anti-kanser ajanlarından biri olan sisplatin herhangi bir çapraz bağlayıcı ajan kullanılmadan sodyum kazeinat ile enkapsüle edilmiştir. Sitrat, fosfat ve kalsiyum iyonları yardımıyla ve basit koaservasyon yoluyla yeniden birleştirilmiş misel yapısında kazein nanopartiküller sentezlenmiştir. Sentezlenen nanopartiküllerin SDS-PAGE analizi ile saflığı ve alt birimlerinin molekül ağırlığı belirlenmiştir. DLS analizi ile efektif çapları 196,4 nm ve polidispersiteleri 0,226 olarak bulunmuştur. SEM ve TEM analizleri kullanılarak Holt Modeli ile uyumlu küresel misel yapıları gözlemlenmiştir. ATR-FT-IR analizi ile sisplatin-kazein bağlanması belirlenmiştir. ICP-MS analizi ile Pt tayini yapılarak kazein nanopartiküllerin sisplastini %94,8 verimlilik ile enkapsüle ettiği tespit edilmiştir. MTT testi ile sisplatin yüklü kazein nanopartiküllerin 4 farklı hücre hattında (MCF-7, A-375, 3T3 ve HUVEC) sitotoksiteleri incelenmiş ve *in vitro* ortamda sağlıklı hücre hatlarında düşük sitotoksite gösterirken, kanser hücre hatlarında daha sitotoksik oldukları gözlemlenmiştir. Sisplatinin hücrelere ulaşp ulaşmadığını belirlemek için MCF-7 ve HUVEC hücre hatlarında MTT testi öncesi belirli dozlarla muamele edilmiş hücrelerin üst sıvıları alınarak ICP-MS analizi yapılmış ve sisplatinin bu hücre hatlarında yüksek oranda hücrelere ulaştığı tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Nanopartiküller, İlaç Taşıyıcı Sistemler, Kazeinler, Sisplatin, Kanser

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 35612

ABSTRACT

Arli OT. Synthesis, Characterization and In Vitro Applications of Cisplatin-Loaded Micellar Casein Nanoparticles. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Biophysics. Master of Science Thesis. Istanbul. 2021.

In this study, cisplatin, one of the most common and effective anti-cancer agents used in cancer treatment, was encapsulated with sodium caseinate without using any cross-linking agents. Casein nanoparticles were synthesized in the recombined micellar structure with the help of citrate, phosphate and calcium ions and by simple coacervation. The purity and molecular weight of the subunits of the synthesized nanoparticles were determined by SDS PAGE analysis. Effective diameters of 196.4 nm and polydispersity were found to be 0.226 by DLS analysis. SEM and TEM analyzes were used to observe spherical micelles compatible with the Holt Model. Cisplatin-casein binding was determined by ATR-FT-IR analysis. Pt was determined by ICP-MS analysis and it was determined that casein nanoparticles encapsulated cisplatin with an efficiency of 94.8%. The cytotoxicity of cisplatin-loaded casein nanoparticles in 4 different cell lines (MCF-7, A-375, 3T3 and HUVEC) was examined with the MTT test and it was observed that while they showed low cytotoxicity in healthy cell lines in vitro, they were more cytotoxic in cancer cell lines. In order to determine whether cisplatin reaches the cells, ICP-MS analysis was performed by taking the supernatant of the cells treated with certain doses before the MTT test in MCF-7 and HUVEC cell lines, and it was determined that cisplatin reached the cells at a high rate in these cell lines.

Key Words: Nanoparticles, Drug Delivery Systems, Caseins, Cisplatin, Cancer

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 35612

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser her yıl tahmini 7,6 milyon kişiyi ölüme götüren ve tüm ölümlerin %13'ünü oluşturan dünya çapında en önemli ölüm sebeplerinden biridir. Kansere bağlı ölüm oranının 2030 yılına kadar 13,1 milyona çıkması beklenmektedir. Kanser tek başına bir hastalık değil, her bir organ veya sistemde farklı hastalıkların gelişimine sebep olabilen bir hastalıktır. Bazı tahminler sigara içme veya diğer yaşam tarzı faktörleri ve insan davranışındaki değişikliklerle potansiyel kanser ölümlerinin %30'nun önlenebileceğini gösterebilir, ağırlıklı olarak birçok kanser ölümü basit hayat tarzı değişiklikleri ile önlenememekte ve bunun için teknolojik inovasyonlar gerekmektedir.^[1-4]

Son yıllardaki teknolojik gelişmeler ile viral enfeksiyonların (örn. İnsan Papilloma Virüsü) sebep olduğu kanserin önlenmesinde kayda değer başarılar elde edilmiştir. Bu başarı mevcut aşı teknolojilerinin yaygınlaştırılması ve aşılama verimliliğini arttırmak için nanoteknoloji ve benzer teknolojilerin kullanımıyla daha da artırılabilir.^[5-8] Günümüzde ise aynı yaklaşım Covid-19 Pandemisi'nin önlenmesinde görülmektedir. Sars-Cov-2'nin ortadan kaldırılmasında en ön saflarda yer alan Pfizer/Biontech ve Moderna gibi mRNA aşılarının başarılarında nanoteknoloji büyük rol oynamaktadır.^[9-11] Ayrıca nanoteknolojinin görüntüleme kullanılmasıyla kanserin erken teşhisi mümkün olabilir ve mevcut tarama sistemleri geliştirilerek kanserin önlenmesinde daha iyi sonuçlar alınabilir.^[12-13] Bunun yanında birçok kanser türü için tedavi amaçlı yeni yaklaşımlar gereklidir. Bu terapötik gereksinimleri karşılamak için normal ve malignant hücreler arasında ayırım yapabilen, aynı zamanda gerekli sitotoksiteyi sağlayabilen nano boyutlu moleküler araçlar geliştirilmelidir.^[14] Malignant hücreler, kemoterapötik ajanların ve hücre bölünmesi inhibitörlerinin anti-kanser etkisine karşı moleküler düzeyde değişim ve anjiyojenik mekanizmaları harekete geçirme yeteneklerini kullanarak hipoksik durumları önlemek ve besin alımını arttırmak için direnç sağlarlar. Bu nedenle temel terapötik yaklaşımlar, özellikle tümör anjiyojenezini inhibe etmeyi amaçlayan kanserin ayırt edici özelliklerini hedeflemektir.^[15] Nanoteknoloji esaslı görüntüleme tekniklerinin gelişmesi, kanser hastalarının hayatta kalma oranını arttırmak için hedefe dayalı ilaç geliştirme stratejilerine yol açmıştır. Bu terapötik ajanlar, malignitenin genotipine ve fenotipine

bağlı olarak oldukça spesifik olmakla birlikte çeşitli moleküler hedefler için yüksek bir afiniteye sahiptirler. Kanser tedavi stratejileri, radyoterapi ve adjuvan/neo-adjuvan cerrahiye ek olarak çok çeşitli kombinasyonlar ile kemoterapi ilaçlarını içerir. Kemoterapi ile ilgili en temel dezavantaj ise istenmeyen yan etkilerdir. Bu yüzden sağlıklı hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerden kaçınmak için hedeflendirilmiş taşımaya özel nanopartiküller kullanarak yeni terapötik formülasyonlar geliştirmeye yönelik oldukça yoğun araştırmalar yürütülmektedir.^[16-18]

Nanopartikül esaslı ilaç taşıma sistemleri, terapötik maddeleri zarar görmüş bölgelere veya belirli hücrelere güvenli bir şekilde iletebilen “kontrollü salım rezervuarına” sahip olma yeteneklerinden dolayı dikkate değer bir ilerleme göstermektedirler. Tıbbi açıdan güvenli kullanım için, nanopartiküller biyo-uyumlu olmalı, yani yapı doğrudan tümöre veya kan dolaşımına salındığında bağışıklık tepkisine ve olumsuz yan etkilere neden olmadan biyolojik bir sistemle bütünleşebilmelidir. Nanopartiküller ayrıca kontrollü ilaç salımı sağlarken, terapötik ajanın korumasını sağlamalı ve dolaşım süresini arttırmalı böylece sağlıklı hücrelere toksiteyi azaltmalıdır. Bu gelişmiş geçirgenlik ve tutma etkisini (enhanced permeability and retention effect, EPR Etkisi) sağlayabilir.^[19-22] Nanopartiküller tıp alanında biyoyararlanımı geliştirmek, terapötik ajanların taşınımını arttırmak, yeni görüntüleme teknikleri geliştirmek, bir molekül veya molekül grubu için biyolojik sistemlerin kontrolünü sağlamada kullanılmaktadır. Lipozomlar, nano-elmaslar, kuantum noktalar, karbon nanotüpler, grafen ve metal esaslı nanopartiküller gibi çok çeşitli nanoyapılar tanı veya tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Nanopartiküllerin kendine özgü özellikleriyle, hem tanısal hem de terapötik ajanları tek bir nanopartiküle entegre etmek mümkündür. Bu özellikler hedef bölgede ajanların biyolojik dağılımının ve birikiminin izlenmesine izin verir ve böylece ilaçların salımı görselleştirilebilir ve ölçülebilir bu da terapötik etkinliğin uygun şekilde değerlendirilmesini sağlar. Nanopartiküllerin sahip oldukları küçük boyutları hücre membranlarından geçmelerini ve retiküloendotelial sistem tarafından tespit edilmelerini engellemeye izin verir. Böylece degradasyona uğramaktan kaçınırlar. Sahip oldukları yüksek yüzey alanları sayesinde, terapötik ajanların yüklenmesini arttırarak onları tıbbi kullanım için ideal hale getirir.^[23-32] Son yıllarda farmasötik ve biyomedikal ajanların uygulanması için biyolojik olarak parçalanabilen polimerlerin kullanımı çarpıcı bir şekilde artmıştır. Biyobozunur polimerlerin en önemli biyomedikal uygulamaları, kontrollü ilaç salım

sistemleri alanındadır. Biyolojik olarak parçalanabilen polimerler, doğal veya sentetik olabilir. Genel olarak, sentetik polimerler, daha geniş bir özellik yelpazesi sunacak şekilde uyarlanabildiklerinden, doğal olanlara göre daha büyük avantajlar sunarlar. Bununla birlikte, toksisitenin sentetik polimerlerle ilişkilendirilmesi daha olasıdır. Doğal polimerler ise genellikle sentetik polimerlerden daha güvenli kabul edilebilir. Bu nedenle, doğal polimerlerin ilaç taşıyıcı taşıyıcılar olarak belirli avantajları vardır. Gıda proteinlerine dayalı ilaç taşıma sistemleri, yüksek besin değerleri, emülsifikasyon, jelleşme, köpürme ve su bağlama kapasitesi gibi mükemmel fonksiyonel özelliklerinin yanı sıra gıda endüstrisindeki bileşenler olarak uygulamaları nedeniyle ümit vaat etmektedir. Gıda proteini ağları, polipeptit birincil yapıları üzerindeki fonksiyonel gruplar aracılığıyla çok çeşitli aktif bileşiklerle etkileşime girme yeteneğine sahiptir. Böylece aktif moleküllerin tersine çevrilebilir bağlanması ve vücut içinde istenen bölgede salımlanana kadar onları korumak için çeşitli olanaklar sunar. Ek olarak, proteinler metabolize edilebilir; gıda proteinlerinin sindirim enzimleri tarafından hidrolizi, in vivo olarak, örneğin gastrointestinal, kardiyovasküler, endokrin, immün ve sinir sistemleri üzerinde bir dizi fizyolojik etki uygulayabilen biyoaktif peptidler üretir.^[33-48] Jelatin, kolajen, kazein, albümin ve peynir altı suyu proteini gibi proteinlere dayalı sistemler; ilaçların besin maddelerinin, biyoaktif peptitlerin ve probiyotik organizmaların taşınması için incelenmiştir. Filmler, hidrojeller, mikropartiküller ve nanopartiküller dahil olmak üzere çok çeşitli protein bazlı iletim sistemi formülasyonları tanımlanmıştır.^[49-54]

Süt proteinleri, biyoaktif maddeler için doğal araçlardır. Besinsel ve fonksiyonel özelliklerinden dolayı gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Başlıca süt proteini olan kazein ucuzdur, kolaylıkla temin edilebilir, toksik değildir ve oldukça stabildir. Doğal bir gıda ürünü olarak, bu GRAS (generally recognized as safe, genellikle güvenli olarak kabul edilir) protein biyolojik olarak uyumludur ve biyolojik olarak parçalanabilir. Süte alerjisi olan hastaların sindirimine dayanan araştırmalar, hastaların %62'sinin β -laktoglobuline (β -lg), %60'ının kazeine ve %53'ünün α -laktalbümine tepki verdiğini ortaya koymuştur. En yüksek alerjik yanıtı sahip olan β -lg, asit sindirimine olan göreceli direnci nedeniyle. Özellikle kazeinler kolayca sindirilebilecek şekilde evrimleşmiştir.^[55-56] Kazeinlerin yapısal ve fizikokimyasal özelliklerinin çoğu, ilaç taşınım sistemlerinde işlevselliklerini kolaylaştırır. Bu özellikler arasında iyonların ve küçük moleküllerin bağlanabilmesi, yüzey aktif ve

stabilize edici özellikler, mükemmel emülsifikasyon ve jelleşme, su bağlama kapasiteleri ile birlikte kendi kendine birleştirme özellikleri bulunur. PH'a duyarlı jel şişme davranışı, kazeini programlanabilir salım için kullanışlı hale getirir. Kazein ayrıca, sinerjistik özellik kombinasyonları ile kompleksler ve konjugatlar oluşturmak için diğer makromoleküllerle etkileşime girebilir. Ek olarak, kazeinin hassas yükü korumak için gerekli olan, biyoaktif maddenin biyo-erişilebilirliğini kontrol etmeyi ve biyoyararlanımını arttırmayı sağlayan çeşitli koruyucu yetenekleri vardır. Örneğin kazein, 200-300 nm civarında güçlü UV soğurma özelliklerini kullanarak radyasyona, özellikle UV ışığına karşı bir kalkan görevi görebilir. Eşsiz fizikokimyasal özellikleri ile bu doğal polimerik yüzey aktif madde, geleneksel ve yeni ilaç ve nutrasötik salım sistemlerinin hazırlanması için iyi bir adaydır.^[57-58]

Sisplatin (cis-diamindikloroplatin (II), CDDP), intrastrand çapraz bağlar ve diğer bağlar ile DNA'nın kovalent modifikasyonuna dayanan önemli genotoksisite sergileyen bir platin (Pt) koordinasyon kompleksidir. Sisplatin, 1969'da Rosenberg ve Vancamp tarafından aday kemoterapi ajanı olarak önerilmiştir ve 1978'de testis ve yumurtalık kanserlerinin tedavisi için FDA onayı almıştır. Günümüzde geniş antitümör aktivitesi sayesinde meme, karaciğer, akciğer, yumurtalık, testis, mesane, baş ve boyun, küçük hücreli ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserleri dahil olmak üzere çeşitli katı tümörlerin tedavisinde en yaygın ve etkili antikanser ajanlarından biri olmaya devam etmektedir. Bununla birlikte, ilacın normal doku ile tümör dokusu arasında seçici olmayan dağılımı, akut nefrotoksisite, miyelosupresyon ve kronik nörotoksisite gibi doz sınırlayıcı yan etkilerin etkisini artırabilir. Terapötik oran, intrinsik sisplatin direnci sergileyen veya tedavi süresince direnç kazanan tümörler tarafından daha da baskılanır. Bu sınırlamaların üstesinden gelmek için, kanser hücrelerinde tercihli birikimi teşvik etmek ve böylelikle olumsuz yan etkileri azaltmak için sisplatinin ilaç taşıma sistemleri çok çeşitli nanopartikül ile araştırılmaktadır.^[59-65] Bu çalışma kapsamında da sisplatin yüklü misel yapısında kazein nanopartiküller bir çapraz bağlayıcı olmadan kendi kendine birleşme yöntemiyle sentezlenmiş; elde edilen nanopartiküllerin saflıkları, molekül ağırlıkları, boyutları, morfolojileri ve yüzey özellikleri, ilaç bağlanmaları, enkapsülasyon verimlilikleri karakterize edilip *in vitro* ortamda 4 farklı hücre hattı; MCF-7 (İnsan Meme Adenokarsinoma Hücreleri), A-375 (İnsan Melonoma Hücreleri), NIH-3T3 (Fare Embriyonik Fibroblast Hücreleri) ve HUVEC (İnsan Umbilikal Damar Endotel Hücreleri) üzerinde sitotoksiteleri incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nanoteknoloji ve Kanser Tedavisi için Nanotaşıyıcılar

Nanoteknolojinin -atomik ve moleküler bileşenleri kullanarak malzeme mühendisliği ve üretimi- onkolojide ilk ve bugüne kadarki en önemli yararlanıcı olmasıyla birlikte tıbbın diğer tüm dallarına da fayda sağlaması beklenmektedir. Nanoteknoloji, Ulusal Nanoteknoloji Girişimi'nin (National Nanotechnology Initiative, NNI, <http://www.nano.gov>) en katı tanımıyla, en az bir boyutta kabaca 1 ile 100 nm boyutundaki yapıları ifade eder. Bu büyüklüğü ifade etmek için küçük bir molekül (1 nm), bir virüs (100 nm), bir bakteri (1000 nm) ve bir insan saçının enine kesiti (100.000 nm) örnek verilebilir. Daha yaygın olarak nanoteknoloji, boyutları birkaç yüz nanometreye kadar olan ve her bir bileşeni yukarıdan aşağıya (top-down) veya aşağıdan yukarıya (bottom-up) mühendislik ile geliştirilen yapıları ifade eder.^[66-70]

Nanomateriyaller, tek tek bileşenlerin hassas bir şekilde bir araya getirilmesiyle elde edilen, ancak tek başına bileşenlerle elde edilemeyen işlevsel özelliklere sahip olabilir. Nanomateriyallerin sürtünme ve diğer moleküller ile etkileşim gibi fizikokimyasal özellikleri daha büyük ölçekte eşdeğer malzemelerden farklıdır. Nanoteknolojinin tıpta en yaygın kullanımı, bu alanlarda mevcut teknolojinin mevcut durumundan daha iyi performans gösterme potansiyeline sahip yeni terapötik ve görüntüleme modalitelerinin geliştirilmesi alanlarında olmuştur.^[71]

Yaşam bilimleri uygulamaları için yeni nanoteknoloji platformlarının çokça tanıtılmasıyla, nanoteknolojinin tıpta potansiyel uygulanması, bu erken kullanımların önemli ölçüde ötesine uzanmaktadır. Ulusal Kanser Enstitüsü, kanser mortalitesini iyileştirmek için yeni nanoteknolojilerin geliştirilmesine yönelik 144 milyon dolarlık 2004 taahhüdünde (<http://nano.cancer.gov>) altı alanda fırsatların yolunu tanımladı: (1) hastalık patogenezi için sorumlu moleküler değişikliklerin tespiti; (2) hastalık teşhisi ve görüntüleme; (3) ilaç taşıma ve tedavi; (4) kombine tedavi ve teşhis uygulamaları için çok işlevli sistemler; (5) bir terapötik ajanın in vivo etkinliğini bildirmek için moleküler araçlar; ve (6) bilimsel keşfi ve temel araştırmayı hızlandıracak nano ölçekli teknolojiler. Kanser tedavisi için nano taşıyıcıların akılcı tasarımına ait özet Tablo 1'de gösterilmiştir.^[71]

Tablo 1: Kanser tedavisi için nano taşıyıcıların akılcı tasarımı

Nano taşıyıcılar, serbest ilaçlara göre birçok avantaj sunabilir, bu avantajlar şunlardır:	Hızlı ve etkili klinik dönüşüm için nanotaşıyıcılar şu özelliklere sahip olmalıdır:
✓ İlaçları erken degradasyondan korumak ✓ İlaçların biyolojik çevre ile erken etkileşime girmesini önlemek ✓ İlaçların seçilen bir dokuya emilimini arttırmak (örn. Katı tümör) ✓ Farmakokinetik ve ilaç doku dağılım profilini kontrol etmek ✓ Hücre için penetrasyonu iyileştirmek	✓ Biyouyumlu, iyi karakterize edilmiş ve kolayca işlevsel hale getirilmiş bir materyalden yapılmalı ✓ Normal hücrelere (veya dokuya) göre hedef hücrelerde yüksek diferansiyel alım etkinliği sergilemeli ✓ Artırılmış etkinlik için sulu koşullar altında ya çözünür ya da koloidal olmalı ✓ Daha uzun bir dolaşım yarı ömrüne, düşük bir agregasyon oranına ve uzun bir raf ömrüne sahip olmalı

Kanser terapötik uygulamaları için akıllı ilaç taşıyıcı araçların geliştirilmesinde nanoteknolojinin uygulanmasının en yaygın örnekleri arasında -nanotaşıyıcılar olarak da adlandırılırlar- polimerik nanopartiküller, dendrimerler, nanokabuklar, lipozomlar, nükleik asit esaslı nanopartiküller, manyetik nanopartiküller ve virüs nanopartikülleri yer alır. Nanotaşıyıcılar ilaç etkinliğini artırarak, ilaç toksisitesini düşürerek ve uzun bir süre boyunca ilaçların kararlı durumda terapötik seviyelerine ulaşarak, halihazırda mevcut ilaçların terapötik indeksini geliştirme potansiyeline sahiptir. Nanotaşıyıcılar aynı zamanda ilaç çözünürlüğünü ve ilaç stabilitesini de geliştirebilir. Bu da yetersiz farmakokinetik veya biyokimyasal özellikler nedeniyle prelinik veya klinik geliştirme sırasında durmuş olan potansiyel olarak etkili yeni kimyasal ajanların geliştirilmesine izin verir. Son olarak, nano taşıyıcılar aynı zamanda hedeflendirilmiş ilaç taşınımı, kombine tedaviler veya eşzamanlı terapötik ve tanısal uygulamalara yönelik sistemler için çok işlevli sistemlerin geliştirilmesini kolaylaştırabilir. Son 30 yılda ilaç taşıma uygulamaları için farklı fiziksel ve biyokimyasal özelliklere sahip artan sayıda nano ölçekli taşıyıcı ortaya çıkmıştır. Daha yakın zamanda ise, kanser nanoteknolojisinin çığır açan potansiyeli ortaya çıkmıştır. Bu potansiyel terapötik ve tanısal uygulamalar için FDA tarafından onaylanan birkaç birinci nesil nanotaşıyıcı örneği ile (Abraxane, Doxil, DuanoXome ve Feridex) giderek daha fazla tanınmaktadır. Piyasadaki bazı nanotaşıyıcıların örnekleri Tablo 2’de verilmiştir. [66, 72-80]

Tablo 2:Piyasadaki bazı nano taşıyıcıların örnekleri

Bileşim	Ticari İsim	Nanotaşıyıcı	Kullanım
Stiren maleik anhidrit-neokarzinostatin	Zinostatin/Stimalmer	Polimer-protein konjugatı	Hepatoselüler karsinoma
PEG-L-asparaginaz PEG -granülosit koloni uyarıcı faktör	Oncaspar Neulasta/PEGfilgrastim	Polimer-protein konjugatı	Akut lenfoblastik lösemi Kemoterapi ile ilişkili nötropeni önleme
IL-2 kaynaştırılmış difteri toksini Kalikeamisin konjuge anti-CD33 antikoru	Ontak(Denilelukin diftitox) Mylotarg	İmünotoksin Kemo-imünokonjugat	Kutanöz T hücreli lenfoma Akut miyelojenöz lösemi
Anti-CD20 konjuge itriyum-90 veya indiyum-111 Anti-CD20 konjuge iyot-131	Zevalin Bexxar	Radyo-imünokonjugat	Relaps veya refrakter, düşük dereceli, foliküler veya dönüştürülmüş Hodgkin dışı lenfoma
Daunorubisin Doksorubisin	DaunoXome Myocet	Lipozom	Kaposi sarkomu Tekrarlayan memenin kombinasyon tedavisi kanseri, yumurtalık kanseri, Kaposi sarkomu
Doksorubisin	Doxil/Caelyx	PEG-Lipozom	Refrakter Kaposi sarkomu, tekrarlayan meme kanseri, yumurtalık kanseri
Vinkristin	Onco TCS	Lipozom	Nükseden agresif Hodgkin dışı lenfoma
Paklitaksel	Abraxane	Albumin	Metastatik meme kanseri

2.2. Nanotaşıyıcıların Tümörlere Hedeflendirilmiş Taşınımı ve EPR Etkisi

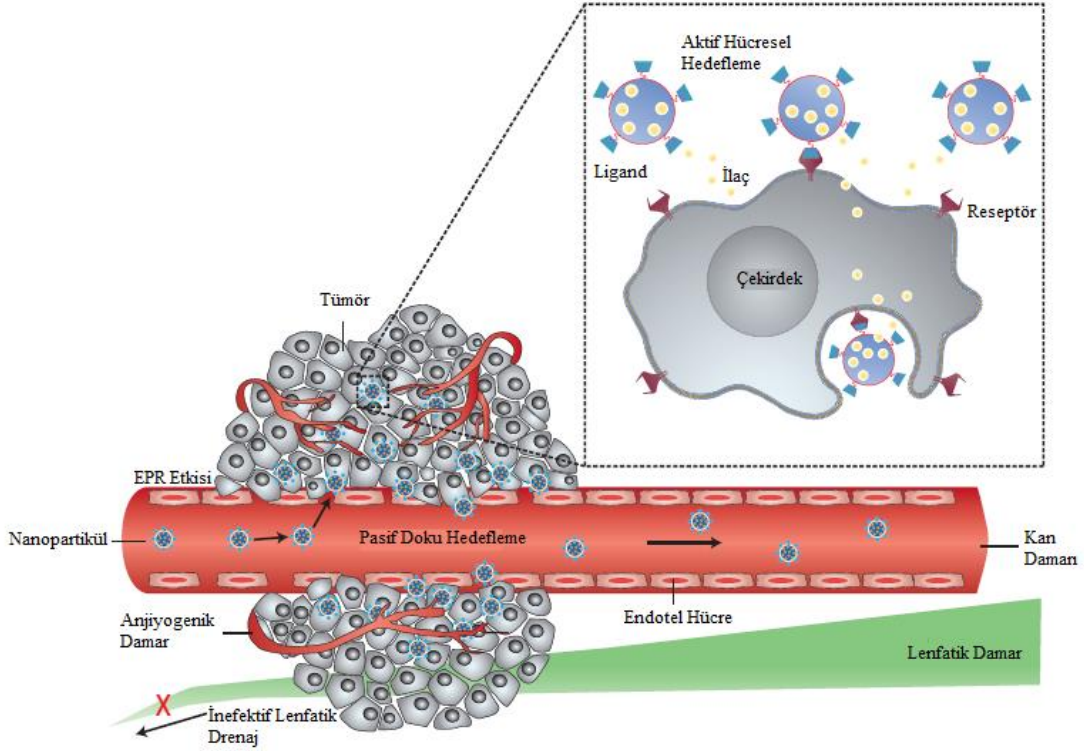
Tümörlerin vaskülaritesi, büyüyen tümöre yeterli oksijen ve besin tedarikini sürdürmek için vasküler nekroz alanlarından, yoğun şekilde vaskülarize olan alanlara kadar oldukça heterojendir. Tümör kan damarları normal kan damarlarına kıyasla, altta anormal bazal membranı bulunan ve proliferen endotel hücrelerinin yüksek bir oranı ile, kan damarlarının artan kıvrımlılığı ve perisitlerde bir eksiklik dahil olmak üzere çeşitli anormalliklere sahiptir. Tümör mikrodamarları, kısmen vasküler endotelyum büyüme faktörü, bradikinin, nitrik oksit, prostaglandinler ve matriks metaloproteinazların anormal sekresyonu ile düzenlenen artmış geçirgenlik gösterir.^[81]

Makromoleküllerin tümör etrafındaki kılcal damarlar boyunca taşınması açık endotelyal hücreler arası bağlantılar veya endotelyal hücrelerin karşı bağlantıları aracılığı ile gerçekleşebilir. Çeşitli modellerde bu nakil yollarının gözenek geçirme boyutlarının $<1 \mu\text{m}$ aralığında olduğu tahmin edilmektedir. Genel olarak partiküllerin damar dışına çıkıp hücrelere ulaşması (ekstravazasyon) boyutları ile ters orantılıdır. Daha küçük partiküller ($<200 \text{ nm}$) tümörlerin etrafını saran kılcal damarlarda ekstravazasyon için daha uygun olacaktır.^[82-83]

Tümör lenfatik sistemi de anormaldir, tümörlerde sıvı tutulmasına ve dışa doğru konvektif interstisyel sıvı akışı ile yüksek interstisyel basınca neden olur. Bu özelliğin, tümör hücresi intravazasyonunu teşvik ettiği ve tümör metastazına ve mikrovaskülatürden tümör interstisyumuna nanotaşıyıcı ekstravazasyonunun bloke olmasına neden olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte sağlam bir lenfatik sistemin olmaması, partiküller interstisyumdan kolayca temizlenememesi nedeniyle, tümör interstisyumunda nanotaşıyıcıların tutulmasıyla sonuçlanır. Buradan yola çıkarak tümör etrafında sızdıran mikrovaskülatür ve sağlam lenfatik sistemin yokluğu tümörlerde plazma ve diğer dokularda bulunandan daha yüksek bir konsantrasyonla nanotaşıyıcının birikimine sebep olur. Bu pasif taşıma ve “gelişmiş geçirgenlik ve tutma etkisi” (enhanced permeation and retention effect, EPR) ile sonuçlanır (Şekil 1).^[84-85]

İlaçların bu durumda nanotaşıyıcılardan salınması, gelişmiş tümör sitotoksitesine dönüşen nispeten daha yüksek bir intratümoral ilaç konsantrasyonu ile sonuçlanır. Bu nanotaşıyıcılar, tümör mikro ortamında tümöre özgü veya tümörle ilişkili antijenleri tanıyan antikolar, aptamerler, peptitler veya küçük moleküller gibi ligandlar ile nanotaşıyıcıların yüzeyini işlevselleştirerek "aktif" kanser hedeflemesi için daha

fazla modifiye edilebilir. Bir faydalı yükün (ilaç, antikor, nükleik asit vb.) spesifik olarak hedeflendirilmesi, hücre içi alımı ve düzenlenmiş terapötik iletimi, nanotaşıyıcıların rasyonel bir tasarımı yoluyla türetilen özelliklerdir. Nanoteknolojinin kanser tedavisine uygulanması, "akıllı" nanopartiküllerin geliştirilmesi de dahil olmak üzere, gerçekten heyecan verici ve umut verici bir araştırma alanıdır.^[86-92]



Şekil 1: Nanotaşıyıcıların ilaçları tümörlere verebildiği farklı mekanizmaların şematik gösterimi. Polimerik nanopartiküller, temsili nano taşıyıcılar (daireler) olarak gösterilmiştir. Pasif doku hedeflemesi, nanopartiküllerin artan geçirgenliği ve etkisiz lenfatik drenaj (EPR etkisi) yoluyla elde edilir. Aktif hücresel hedefleme (ek), nanopartiküllerin yüzeyini hücreye özgü tanıma ve bağlanmayı destekleyen ligandlarla işlevselleştirerek elde edilebilir.

2.3. Biyobozunur Polimerik Nanopartiküller ve Kontrollü Salım

Neredeyse her tıp dalı, son altmış yılda kontrollü salımlı polimer teknolojilerinden oldukça etkilenmiştir. Buna örnek olarak kardiyoloji, oftalmoloji, endokrinoloji, ortopedi, ağrı tıbbı ve onkoloji verilebilir. Günümüzde klinik uygulamada bu sistemlerin birkaç örneği Atridox, Lupron Depot, Gliadel, Zoladex, Trelstar Depot ve Sandostatin LAR'dır.^[93-98]

İlaç taşınımının da ötesine geçen kontrollü salımlı polimer sistemleri pazarının yıllık dünya çapında 60 milyar dolar olduğu tahmin edilmektedir ve her yıl 100 milyondan fazla kişi tarafından kullanılmaktadır. "Kontrollü salım", doğal veya sentetik

bir polimerin bir ilaçla, ilacın daha sonra salınması için önceden belirlenmiş bir şekilde polimer sistemi içinde kapsülleneceği şekilde bir araya getirilmesi ile meydana gelir. Polimerik ilaç taşıyıcılar, kapsüllenmiş ilaçları yüzey veya toplu erozyon, difüzyon veya şişme yoluyla serbest bırakan ve ardından zamana veya şartlara bağlı olarak difüzyonu takip eden nanopartiküller olarak tasarlanabilirler. Aktif maddenin salımı uzun bir süre boyunca sabit olabilir veya uzun bir süre boyunca döngüsel olabilir. pH ve sıcaklıktaki değişiklikler veya glikoz gibi bir analitin varlığı gibi çevresel ve diğer harici olaylar tarafından tetiklenebilir. Genel olarak kontrollü salımlı polimer sistemleri, diğer ilaç verme yöntemlerine kıyasla daha uzun bir süre boyunca optimum bir aralıkta ilaç seviyeleri sağlayabilir. Bu nedenle, ilacın etkinliğini artırır ve hasta uyumunu en üst düzeye çıkarırken, oldukça toksik, zayıf çözünür veya nispeten kararsız ilaçların farmasötik yararlanımını artırır. Kontrollü ilaç taşınımının birincil amacı, yetersiz ve aşırı doz potansiyelini ortadan kaldırırken daha etkili tedaviler elde etmektir. Kontrollü salım uygulama sistemlerinin kullanılmasının diğer avantajları arasında ilaç seviyelerinin istenen bir aralıkta korunması, daha az uygulama ihtiyacı, söz konusu ilacın optimal kullanımı ve artan hasta uyumu yer alır. Bu özellikle, tedavinin etkililiğinin, mümkün olduğunca az sağlıklı hücreyi etkilerken kanser hücrelerini öldürme yeteneği ile doğrudan ilişkili olduğu kanser terapisi ile ilgilidir. [71, 99-104]

Polimerik nanopartiküller, kanser kemoterapisi için en etkili nano taşıyıcıları temsil edebilir. Bu nanopartiküller, kanser hücrelerini spesifik olarak hedeflemek için yüzey işlevli hale getirilebilir ve terapötik etkinliklerini arttırmak için uzun bir sistemik dolaşım yarılanma ömrüne sahip olabilir. Nanopartikül yüzeyi genellikle polietilenglikol (PEG) gibi hidrofilik polimerlerin yüzeyine aşılması, konjuge edilmesi veya adsorbe edilmesiyle sterik olarak stabilize edilir. Polimerik nanopartiküller, hidrofilik veya hidrofobik küçük ilaç molekülleri taşımak için kolaylıkla formüle edilebilir. Bunun yanında çeşitli polimer sistemleri geliştirilerek proteinler ve nükleik asitler gibi makromolekülleri taşımak için kullanılmıştır. [71, 105-110]

Biyolojik olarak parçalanabilen polimerler tipik olarak, metabolize edilen ve normal metabolik yollarla vücuttan atılan tek tek monomerlere ayrılır. Polimer bozunma hızı ve buna bağlı ilaç salımı, polimer yan zincirinin modifikasyonu, yeni polimerlerin geliştirilmesi veya kopolimerlerin sentezi ile kontrol edilebilir. Bu konu araştırmacılar tarafından akademik ve endüstri laboratuvarlarında onlarca yıldır aktif bir araştırma

alanı olmuştur. Polimer alanındaki yoğun araştırmalarının sonucu olarak sayısız yeni ilaç araştırması, endüstriyel ve klinik uygulama için farklı kapsülleme ve salım özelliklerine sahip artan bir polimer cephaneliği olmuştur.^[71, 111-116]

2.5. Çoklu İlaç Direncine Karşı Nanotaşıyıcıların Avantajları

Hücre içine girebilen hedeflendirilmiş nanotaşıyıcılar aracılığıyla ilaçların verilmesi, ilaçların hücrelere difüzyonuna alternatif bir yol sağlar. Bu yaklaşım, hedeflenen taşıyıcıların çeşitli antikanser ilaçlarını kanser hücresinden dışarı taşıyan ve kemoterapiye karşı direnç üreten “MDR” taşıyıcıları olarak bilinen integral membran proteinlerinin aktivitesini atlamasına izin verebilir.^[117]

Kanser ilacı direncinin moleküler temeli karmaşıktır ve kemoterapötik ilaçları nötralize edebilen yüksek enzim seviyeleri ile ilişkilendirilmiştir. Bununla birlikte daha sıklıkla, kemoterapötik ilaçları aktif olarak hücre dışına pompalayan ve hücre içi ilaç dozlarını öldürücü eşik seviyelerinin altına düşüren MDR taşıyıcılarının aşırı ekspresyonundan kaynaklanır. Tüm kanser hücreleri MDR taşıyıcılarını ifade etmediği için kemoterapi, MDR taşıyıcılarını yüksek oranda ifade eden ilaca dirençli küçük bir hücre popülasyonunu geride bırakırken, MDR taşıyıcılarını ifade etmeyen veya hafif ifade eden ilaca duyarlı hücreleri öldürecektir. İlaça dirençli hücrelerin çoğalması ile birlikte, artık ilaca dirençli hücreler tümör popülasyonuna hakim olduğu için kemoterapi başarısız olabilir. MDR taşıyıcıları arasında en yaygın olarak araştırılan proteinler şunlardır: P-glikoprotein (aynı zamanda MDR1 veya ABCB1 olarak da adlandırılır), çoklu ilaca dirençle ilişkili proteinler (MRP'ler), en çok inceleneni, MRP1 (veya ABCC1) ve göğüs kanseri direnç proteini (ABCG2). Bu proteinlerin farklı yapıları vardır, ancak kemoterapi ilaçlarını hücrelerden dışarı atmak gibi benzer bir işlevi paylaşırlar.^[117-118]

Birkaç çalışma, MDR taşıyıcılarının etkisinden kaçınabilmek için nanotaşıyıcıların kullanılma olasılığını göstermiştir. SP1049C, doksorubisin içeren hidrofobik bir çekirdek ve hidrofilik kuyruktan oluşan iyonik olmayan (pluronik veya poloksamer olarak da bilinir) bir blok kopolimerdir. SP1049C'nin bir fare lösemi modelinde p-glikoprotein aracılı ilaç direncini aştığı gösterilmiştir ve şu anda klinik değerlendirme altındadır.^[119-120]

Çoklu ilaç direncine sahip bir hücre hattında doksorubisin yüklü lipozomların folat reseptör aracılı hücre alımının, serbest doksorubisin alımının tersine, P-

glikoprotein (Pgp) aracılı ilaç akışından etkilenmediği gösterilmiştir. MDR'yi tersine çevirmeyi amaçlayan diğer bir çalışmada, anti-Pgp mAb'ye (MRK-16) konjuge edilmiş vinkristin yüklü lipid nanopartiküller, dirençli insan miyelojenöz lösemi hücre hatlarında, hedeflendirilmemiş partiküllere göre daha fazla sitotoksosite göstermiştir.^[121-122]

Bunlara ek olarak, hücre hatları içinde veya fare tümör modellerinde polimer terapötikler, polimerik nanopartiküller, lipid nanokapsüller ve miseller kullanılarak çoklu ilaç direncinin zorlukları ile ilgili çalışmalar ele alınmıştır. İlaçların ve MDR pompa inhibitörlerinin seçici taşınımı için hedeflendirilmiş nanotaşıyıcı ile kombinasyon tedavileri, muhtemelen dirençli tümörlerin ortaya çıkardığı bazı problemlere odaklı olacaktır.^[123-126]

2.6. Protein Esaslı İlaç Nano Taşıyıcılar

Nanopartiküllerin üretimi için literatürde doğal polimerlerin kullanımı çok iyi tanımlanmıştır. Biyolojik olarak parçalanabilirlik, antijenik olmama, yüksek besin değeri, yenilenebilir kaynaklardan elde edilme ve çeşitli ilaçlara olağanüstü bağlanma kapasitesi gibi istisnai özellikleri nedeniyle GRAS (genellikle güvenli olarak kabul edilir) ilaç dağıtım araçları olarak protein nanotaşıyıcılar geliştirilmesine ilgi artmaktadır. Proteinler, emülsifikasyon, jelleşme, köpüklenme ve su bağlama kapasitesi gibi mükemmel fonksiyonel özelliklerine ek olarak sulu bir sterik bariyer yoluyla retiküloendotelial sistem (RES) tarafından daha az opsonizasyon olasılığına sahiptir. Dahası, protein nanopartikülleri üretim sırasında kolaylıkla hazırlanabilir ve ölçeklenebilir. Polipeptitlerin birincil dizilerindeki çok sayıda fonksiyonel grup sayesinde protein nanopartikülleri, terapötik bileşiklerle farklı etkileşimler oluşturmak ve ardından aktif moleküllerin tersinir bağlanması için çeşitli olasılıklar sunan üç boyutlu ağlar oluşturmak için kullanılabilir ve bunları bir matriste korur. Proteinlerin sindirim enzimleri tarafından hidrolizi, in vivo bir dizi fizyolojik etki gösterebilen biyoaktif peptidler üretir.^[127]

2.6.1. Jelatin

Jelatin, asit ve alkalın hidroliziyle kolajenden elde edilen denatüre bir proteindir. İlaç, kozmetik ve gıda ürünlerinde uzun bir güvenli kullanım geçmişine sahiptir ve FDA tarafından GRAS malzemesi olarak kabul edilmektedir. Denatüre olması nedeniyle nispeten düşük antijeniteye sahiptir. Fonksiyonel grupları çeşitli kimyasal

modifikasyonlar için uygundur, bu özellikle hedeflendirilmiş ilaç taşıma araçlarının geliştirilmesinde faydalı olabilir. Jelatin, hidrofobik gruplarla birlikte hem katyonik hem de anyonik gruplara sahip bir poliamfolittir. Tekrarlayan glisin, prolin ve alanin amino asit üçlü dizileri, üçlü sarmal yapısından sorumludur. Jelatin nanopartiküllerin antikanser, anti-HIV, antimalarial, antimikrobiyal, iskelet kas gevşetici ve analjezikler dahil olmak üzere çeşitli ilaçlar, protein sentez inhibitörleri, doku tipi plazminojen aktivatörü ve ayrıca gen iletiminde başarılı şekilde kullanıldığı bildirilmiştir. Jelatin nanopartikülleri hazırlamak için desolvasyon, koaservasyon faz ayırma, emülsifikasyon-solvent buharlaştırma, ters faz buharlaştırma ve nanopresipitasyon gibi çeşitli yöntemler kullanılmıştır.^[127]

Doğal jelatinin bir desolvasyon ajanı (örneğin, alkol veya aseton) ile desolvasyonu, geniş bir boyut aralığına sahip büyük nanopartiküller üretir. Bu nedenle, Coester ve ark. tarafından düşük molekül ağırlıklı jelatin moleküllerini atmak ve daha sonra dar boyut dağılımıyla daha küçük nanopartikülleri çöktürmek için iki aşamalı bir desolvasyon süreci benimsenmiştir. Çapraz bağlayıcı olarak glutaraldehitin (GA) kullanılması, nanopartiküllerin mekanik özelliklerinde ve stabilitesinde iyileşmeye yol açsa da, yüksek toksisitesi nihai ürünün uygulamalarını sınırlayabilir. Bu nedenle, toksik olmayan çapraz bağlama ajanlarının kullanımı bir alternatif olarak ortaya çıkmıştır. Genipin, ihmal edilebilir bir sitotoksositeye (GA'dan ~ 10.000 kat daha az) sahip, doğal olarak oluşan bir çapraz bağlama maddesidir. Rekombinant insan jelatini (rHG) nanopartikülleri, çapraz bağlayıcı olarak genipin kullanılarak hazırlanmış ve sürekli salım, daha az başlangıç genişlemesi ve güvenlik açısından protein esaslı ilaç taşınımı için büyük bir potansiyel göstermiştir. Model proteinin (FITC-BSA) yaklaşık %50'si nanopartiküllerden 10 gün içinde salınmıştır.^[127] Paklitaksel yüklü jelatin nanopartiküller hazırlamak için bir koaservasyon faz ayırma yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde Tween-20 içeren jelatin solüsyonuna sulu bir sodyum sülfat solüsyonu, ardından paklitaksel içeren izopropanol ilave edilmiştir. Çözücü olarak kremofor/etanol kullanan geleneksel paklitaksel formülasyonu ile karşılaştırıldığında, nanopartiküller organlarda ve dokularda daha uzun tutulma ve daha yüksek birikim göstermiştir (ortalama 3,2 kat). Başka bir çalışmada, sisplatin yüklü jelatin/poli (akrilik asit) nanopartiküller, nanopartiküllerdeki sisplatin platini ve karboksilik gruplar arasında bir kompleks olduğu yerde başarıyla hazırlanmıştır. Sisplatin yüklü nanopartikül

formülasyonu, murin hepatik H22 tümör taşıyan fare modelinde antikanser etkisinde serbest cisplatinden daha iyi etkinlik göstermiştir.^[127]

2.6.2. Kolajen

Kolajen omurgalıların birincil yapısal materyalidir ve toplam vücut proteinlerinin yaklaşık %20-30'unu oluşturan en bol memeli proteindir. Biyolojik olarak parçalanabilirliği, zayıf antijen özelliği ve üstün biyouyumluluğu nedeniyle tıbbi uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, kolajen bazlı sistemlerin bazı dezavantajları, yeterli tedarik sağlamanın zorluğundan ve bunların zayıf mekanik mukavemetinden kaynaklanmaktadır. Fiziksel ve kimyasal özelliklerin iyileştirilmesi, kolajen bazlı uygulamalardaki bazı dezavantajların üstesinden gelebilir.^[127] Biyolojik olarak parçalanabilen kolajen bazlı nanoküreler termal olarak kararludur ve sterilizasyonları kolayca gerçekleştirilebilir. Dahası, nanopartiküller RES tarafından alınabilir ve anti-HIV ilaçları gibi eksojen bileşiklerin bazı hücrelere, özellikle de makrofajlara alımını artırabilir. Bu da sistemik bir taşıyıcı olarak kolajen bazlı nanopartiküllerin ek bir avantajı olabilir. Geniş yüzey alanına sahip küçük boyutları, yüksek adsorptif kapasiteleri ve berrak bir koloidal çözelti oluşturmak için suda dağılma kabiliyetleri nedeniyle kolajen bazlı nanopartiküller, antimikrobiyal ajanlar veya steroidler için sürekli salım formülasyonu olarak kullanılmıştır.^[127]

Bir çalışmada etinolün dermal dağıtımını artırmak için kolajen nanopartiküller kullanılmış ve yeni çökeltilmiş ilaca göre dahil edilen ilacın deri yoluyla daha hızlı ve daha fazla taşınmasını kolaylaştırmıştır. Son zamanlarda, BMP-2'den türetilmiş sentetik peptit ile yüklenmiş kitosan mikroküreler, gözenekli bir nano-hidroksiapatit/kolajen/poli-L-laktik asit (PLLA) iskelesine dahil edilmiştir. Sentetik peptid, hem dahil edilen kitosan mikrokürelerin hem de PLLA matrisinin bozunmasına bağlı olarak, geçici olarak kontrollü bir şekilde salınmıştır.^[127]

2.6.3. Albumin

Geçtiğimiz yıllarda albümin, terapötik ve tanısal ajanlar için çok yönlü bir makromoleküler taşıyıcı olarak ortaya çıktı. Albüminin toksik olmadığı, immünojenik olmadığı, biyolojik olarak uyumlu olduğu, biyolojik olarak parçalanabileceği ve zararsız bozunma ürünlerine in vivo olarak metabolize olabileceği gösterilmiştir. Ek olarak, kan dolaşımında 19 günlük yarılanma ömrüne sahip endojen albüminin, birçok yeni ilacın

farmakokinetik profilinin yanı sıra ilaç hedefleme özelliklerinin iyileştirilmesinde önemli bir rol oynayabileceği muhtemeldir.

Ticari olarak albüminler, yumurta akı (ovalbümin), sığır serumu (sığır serum albümini, Bovine Serum Albumine, BSA) ve insan serumundan (insan serum albümini, Human Serum Albumine, HSA) elde edilir. Albümin nanopartiküllerini hazırlamak için kullanılan teknikler arasında desolvasyon, emülsifikasyon, termal jelleştirme, nano sprey kurutma, nab-teknoloji (nanopartikül albümine bağlı) ve kendi kendine birleşme bulunmaktadır.^[127]

2.6.4. Kazein

Süt proteinleri normalde iki ana proteine ayrılır: kazein ve peynir altı suyu proteinleri. Süte beyaz bir görünüm verecek kadar güçlü ışık saçan kolloidal proteinler kazein miselleri olarak adlandırılır. Bununla birlikte, miseller etanol, üre, etilendiamintetraasetik asit (EDTA) ilavesiyle veya pH'ı artırarak bozulursa beyaz renk kaybolur. Kazein miselleri, bir arada tutulan ve kovalent olmayan moleküller arası bağlanma etkileşimleriyle sistematik hale getirilen, kalsiyumda çözünmeyen protein ve kalsiyum fosfat içeren kolloidal partiküllerin karmaşık heterojen bir birleşiminden oluşur. Supramoleküller olarak da adlandırılan kazein miselleri, memeli yenidoğanların büyüme ve enerji gereksinimlerini karşılamaya yardımcı olan kalsiyum, fosfat ve amino asitlerin temel besin kaynağıdır ve tamamen meme bezlerinde oluştukları için yeni doğanlara kalsifikasyon olmaksızın kalsiyum ve fosfatı doğal yoldan verebilirler.^[128-132]

1950'lerde, kazein, optik rotasyonel dispersiyon ile elde edilen bulguların yanında konformasyon ve boyut özelliklerine dayalı olarak belgelenen ilk proteinlerden biriydi. Kazein miselleri kabaca küresel şekildedir, 50-600 nm (ortalama yaklaşık 120 nm) çap aralığına ve 10^{3-6} ila 10^9 Da arasında kütleye sahiptir. Sütün mililitresinde hidratlı ve açık protein matriksine yayılmış şekilde 10^{14-16} kazein miseli kaydedilmiştir.

Kazein proteinleri pH 4,6'da çökelir ve kuru ağırlık esasına göre, kazein miselleri, toplu halde kolloidal kalsiyum fosfat (CCP) olarak da ifade edilen, başta bazı magnezyum ve sitrat olmak üzere % 94 kazein, % 6 mineral ve eser miktarda başka türler içerir. Besinsel ve fonksiyonel özelliklerinden dolayı gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar ve ayrıca biyoaktif maddelerin (vitaminler, yağ asitleri vb.) doğal taşıyıcıları olarak kabul edilirler. Ek olarak düşük maliyetlidirler, kolayca erişilebilirler, oldukça kararlıdır ve toksik değildirler. Kazein proteinleri, doğal olarak

biyoyoumlu ve biyolojik olarak parçalanabilen birer GRAS proteinidir. Kazeinler ayrıca, iyonları ve küçük molekülleri bağlama, makromoleküllerle kompleksler oluşturma, eşsiz yüzey aktif ve stabilize etme özellikleri, mükemmel emülsifikasyon, jelleşme ve su bağlama özelliklerinin yanı sıra kendiliğinden birleşme gibi benzersiz yapısal ve fizikokimyasal özellikleri nedeniyle geleneksel ve yeni ilaç taşıma sistemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Kazeinin pH'a duyarlı jel şişme davranışı, onu kontrollü salım için faydalı kılar. Dahası, kazein hassas ve kapsüllenmiş biyoaktif maddeleri korumak için hayati önem taşıyan çeşitli koruma yeteneklerine sahiptir, böylece bu biyoaktif maddelerin biyo-erişilebilirliğinin ve biyoyararlanımının kontrolünü sağlar. Kazeinler, sağlam UV soğurma özelliklerine sahiptir ve bu, kazeinin radyasyona, özellikle de UV radyasyonuna karşı bir kalkan görevi görmesini sağlayabilir.^[55-57, 133-134]

2.6.4.1. Kazeinlerin Yapısı ve Özellikleri

Kazein misellerinin varlığı ilk olarak 19. yüzyılda belgelenmiştir ve 1960'ların ortalarında iç ve dış yapıları hakkında ayrıntılı bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışma nanokümelerin su bağlama özellikleri ve asitleştirme yoluyla veya bir süt pıhtılaşma enzimi ilavesiyle pıhtılaşma gibi çeşitli işlemler sırasında işlevselliklerinin doğru şekilde anlaşılmasına yardımcı olmuştur. Çok sayıda çalışma yapılmış olmasına rağmen, bunların hiçbiri kazein misellerinin yapısı, boyutu ve dağılımı hakkında tutarlı ve net bir fikir sağlayamamıştır.^[135-137]

Holt tarafından 20 türden, kazeinin birincil yapıları üzerine yapılan filogenetik araştırma, tüm kazeinlerin salgılanan, kalsiyum fosfat bağlayıcı bir protein grubunun üyeleri olduğunu göstermektedir. Kazein genlerinin ilk ve son eksonları çevrilmemiş olarak kalırken, faz sıfır intronları ile ayrılan kısa ve uzun eksonlar olarak yapılandırılırlar. Kazein misel genleri, kemik ve diş geni ODAM'den (Odontojenik Ameloblast ile ilişkili proteini kodlayan) geliştirilmiştir. Bununla birlikte, kalsiyuma duyarlı kazein genleri, geliştirilmiş yapılandırılmış plan (Bauplan) aracılığıyla iki kazein geni sınıfı arasındaki hayati farklılıkları elde etmek için κ -kazein genine giden biraz farklı bir takip yolu izler.

Misel bütünlüğünün hidrofobik etkileşimler ve kalsiyum fosfat nanokümeler (CCP) ile köprüleme yoluyla korunduğu bulunmuştur. Ayrıca, kazeinin prolin bakımından zengin ve reomorfik açık yapısı, çözeltelerde enerjik olarak uygun

konformasyonlar, çevresel koşullara göre yapısal esneklik, proteolitik bölünme ve hedeflendirilmiş ilaç dağıtımı gibi çeşitli özellikler sağlar.

Aynı zamanda, disülfid bağlarının olmaması nedeniyle kazeinin çok az ikincil veya üçüncül yapısı vardır, bu da onu oldukça ısıl kararlı hale getirir. Ayrıca, 2 g su/g proteini bağlayabilen gözenekli bir yapıya sahip olan, sulu çözelti içinde doğal veya yapay olarak sentezlenmiş miseller halinde kendiliğinden birleşebilirler.^[55, 128, 138-142]

Küresel olarak süt, insan diyetinin önemli bir parçasıdır ve memeli yenidoğanlara doğal bağışıklık sağlamanın yanı sıra, kendine özgü bir bileşimi ve özellikleri vardır. Sütün ana fraksiyonu, sağlıklı hayvan sütünde 25 kg/m³ konsantrasyona sahip bir fosfoprotein grubundan oluşan kazeindir. Sığır sütünde kazein, yaklaşık 4:1:3.5:1.5 oranlarında, ayırt edici yapıları ve işlevleri olan α_1 - (% 38), α_2 - (% 10), β - (% 34) ve κ -kazein (% 15) olarak bilinen dört proteinden oluşur.^[57, 143-144]

Belirli bir kazein miseli, yaklaşık 20.000 protein molekülünden oluşur. Ancak bunlar, küçük amfifilik parçacıkların tipik bir montaj özelliği olan hidrofilik başlıklar ve hidrofobik kuyruklarla birlikte toplanmamıştır. Aslında, miseller kalsiyum fosfat ile birlikte α - ve β -kazein segmentlerinin birikiminden kaynaklanırken yüzey κ -kazein ile stabilize edilmiştir. Bu dört proteinin fosforilasyonu spesifik serin (SER) kalıntılarındaki meydana gelir ve sırasıyla 8, 9–11, 5 ve 1 fosfat içerir. Ayrıca fosforilasyon, glikozilasyon (k-) veya genetik polimorfizm kapsamındaki farklılıklar nedeniyle mikro heterojenite sergilerler. Bu ayrı proteinlerin moleküler ağırlıkları 19 ile 25 kDa arasında iken, ortalama izoelektrik noktası (pI) 4.6 ile 4.8 arasındadır. Bu dört proteinin tümü uyarlanabilir ve amfifilik yapılara sahiptir ve ayrıca hidrofilik ve hidrofobik fragmanlara sahiptir.^[57, 134, 145-146]

2.6.4.2. Alfa-Kazein

α s-kazein olarak da bilinen alfa-kazein, temel beslenme özelliklerine sahip önemli bir kazein fraksiyonudur. α s-kazein ayrıca α s₁- ve α s₂-kazein adlı iki ayrı gen ürününden oluşur. Hem α_1 - hem de α_2 - kazeinde bulunan bir fosfat merkezi, nanomiseller arasında bir bağlantı ajanı olarak işlev görür. α s₁-kazein, 40 amino aside sahiptir ve yüksek oranda fosforile edilmiştir, sekiz fosfat grubundan yedisini içerir. Ayrıca on iki karboksil grubuna, dört pozitif gruba sahiptir ve kazein ailesinin yaklaşık % 40'ını oluşturur. Post-translasyonel modifikasyondan önce proteinin moleküler kütlesi

~23 kDa'da değerlendirilir ve bu, sekiz SER kalıntısının fosforilasyonuna bağlı olarak ~23.6 kDa'ya yükseltilebilir.

α_{S1} - serisinin (α_{S1} -Crn) dört çeşidi şimdiye kadar doğrulanmıştır. Azalan elektroforetik hareketliliklerine göre A, B, D ve C olarak etiketlenirler. Üretimleri dominant allel içermeyen dört allelik otozomal gen tarafından kontrol edilir. α_{S2} -kazein de yüksek oranda fosforile edilmiştir.

Geçtiğimiz yıllarda, hem α_{S1} - hem de α_{S2} -kazeinin, ısı ve diğer stres koşulları nedeniyle pıhtılaşma ve çökelmeye karşı koruyabilen moleküler şaperon özelliklerine sahip olduğu keşfedilmiştir. α -kazeinin bu şaperon etkisi, proteinin kısmen açılmış hedef proteinlerini etkileşim yoluyla stabilize etmesini ve böylelikle küçük ısı şok proteinleri (sHsps) ve klusterin adı verilen diğer ilgisiz şaperonlar tarafından oluşturulanlara benzer bir çözünür ve yüksek moleküler ağırlıklı kompleks geliştirmesini sağlar.^[133-134, 139-140, 147-149]

2.6.4.3. Beta-Kazein

1990'ların sonlarında, β -kazeinin yüksek yüklü N-terminal bölgesinin molekülün beş fosfatından dördüne, yedi karboksil grubuna ve yalnızca iki pozitif gruba sahip olduğu bildirilmiştir. β -kazein, toplam büyükbaşlardaki sütün kazein proteininin yaklaşık %30'unu oluşturan önemli bir protein bileşenidir, oysa insan sütünde toplam kazeinin %85'ini oluşturur.

Moleküller arası hidrofobik ve amfifilik yapısı sayesinde kendi kendine bir misel yapıya monte edilebilir ve β -kazeini ilaç dağıtım sistemleri için ideal hale getirir. Chia ve ark., amino asit diziliminden kaynaklanan farklı bölünme modellerine sahip birçok β -kazein varyantının tanımlandığını bildirmişlerdir. Chia ve ark., amino asit diziliminden kaynaklanan farklı bölünme modellerine sahip birçok β -kazein varyantının tanımlandığını bildirmişlerdir. Bununla birlikte, inek sütünde A1 ve A2 türleri olarak bilinen iki ana varyant mevcuttur. Bu varyantlar, A1 β -kazein durumunda tek bir amino asit, histidin (konum 67'de) ve A2 β -kazein durumunda prolin ile değiştirilmiştir.

Sığır-kazeini tipik olarak tamamen fosforile formlarda görünürken, insanlarda β -kazein, çoklu fosforile formlarda (molekül başına 0-5 fosfat grupları) oluşur. Bu fosforilasyon, gastrointestinal sindirilebilirliği artırmaya yardımcı olur. Bununla

birlikte, insan β -kazeini ile benzer fizikokimyasal özelliklerin getirdiği asit fosfataz yoluyla sığır β -kazeinin defosforilasyonu da emülsiyon stabilitesini artırır.^[150-153]

2.6.4.4. Kappa-Kazein

κ -kazein, kazein proteininin nispeten küçük bir bileşenidir ve yaklaşık % 12-15'ini oluşturur. Kalsiyum iyonlarında (Ca^{2+}) çözünür, ancak kazein molekülünün geri kalanı (% 85) Ca^{2+} tarafından çöktürülür.

1956'da, Waugh ve Von Hippel ilk olarak κ -kazeini izole etmişler ve kazein misel yapısıyla ilgili ayrıntıları belirlemişlerdir. κ -kazein (siyalize glikoprotein olarak da bilinir) yalnızca bir fosfat ve on dört karboksilik asit grubu içerir ve miselin hidrofilik C-terminal bölgesinde konumlandırılmıştır.

κ -kazein öncelikle kazein misel yüzeyini kaplar ve böylece miselleri intermiseller elektrostatik ve sterik itme yoluyla stabilize eden hidrofilik, yüklü bir yüzey tabakası sağlar. Ayrıca, κ -kazein molekülü hidrofobik kalsiyum α s- β -kazeinat çekirdeğine bağlanır ve toplanmayı önleyen solvatlı bir kaplama sağlar. Kazein misel stabilitesi, misel yüzeyinde κ -kazeinin varlığına bağlıdır ve hidrofobik miselin iç kısmı ile sulu ortam arasında bir arayüz olarak işlev görür. κ -kazein, ısı işlemlerde peynir altı suyu proteinleri ile tiyol katalizli disülfid değişim reaksiyonlarına ve peynir mayası bölünmesine aktif olarak katılır, böylece misel pıhtılaşmasını kolaylaştırır.

Misel yüzeyindeki proteinin üç boyutlu yapısı bu κ -kazein fonksiyonlarını düzenler. κ -kazein yapısının belirlenmesi, proteinin kendiliğinden birleşen ve kristalleşmeyen özelliklerinden dolayı olağan yollarla hala mümkün değildir. Bunun yerine algoritmalar, κ -kazeinin belirli ikincil yapılarını öngörmek için kullanılmıştır.^[146, 150, 154-156]

Kazeinin çeşitli bileşenlerinin ayrılması, saflaştırılması ve fraksiyonlanması, ultrafiltrasyon, mikrofiltrasyon, elektroforez ve kromatografik teknikler gibi çeşitli tekniklerle mümkündür. Tek tek kazeinlerin poliakrilamid jel elektroforezi ile ayrılması mümkündür, ancak çok yüksek moleküler kütleli kazein polimerleri, jel matrisinden neredeyse hiç girmez ve zayıf bir şekilde çözülür. Buna karşılık, boyut dışlama kromatografi tekniği, UV/Vis veya kırılma indisi gibi konsantrasyona duyarlı dedektörler aracılığıyla kazein fraksiyonlarının kantitatif analizinde yararlıdır, ancak ayırma tekniği kolon malzemesine bağlıdır ve çok yüksek moleküler kütleli analiz,

özellikle ayırma aralığı dardır. Bununla birlikte, alan akış fraksiyonasyonu, tüm boyut aralığı boyunca kazein polimerlerinin araştırılmasında etkilidir.^[157-158]

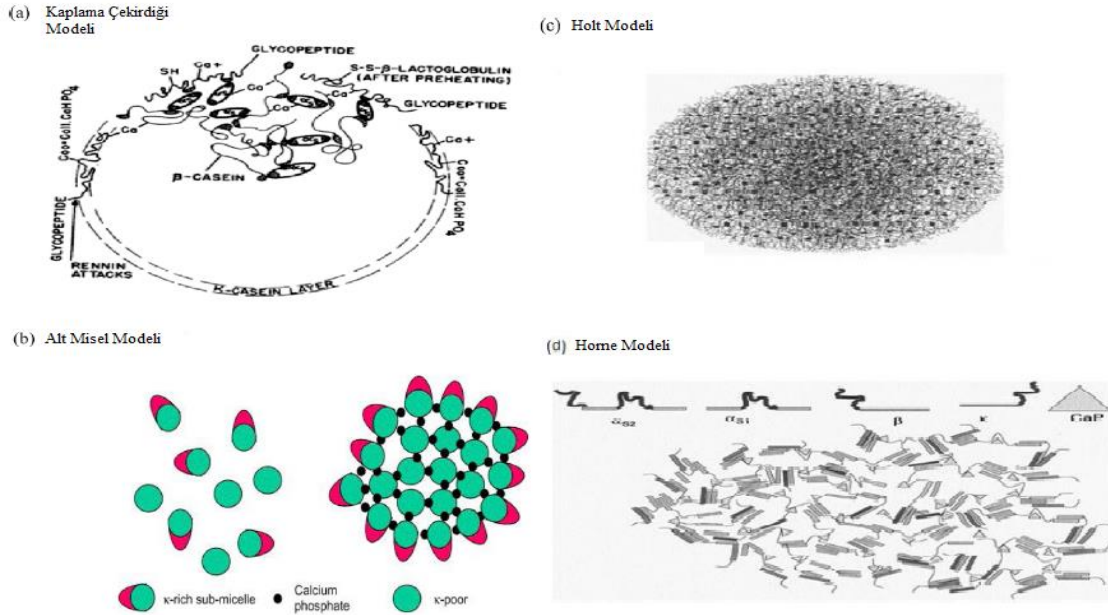
2.6.4.5. Kazein Misel Modelleri

Son 50 yılda, misellerin sentezi ve kimyasal bozunmasına dayalı olarak, kazein misel yapısının çeşitli modelleri önerilmiş ve bu konuda daha sonra araştırmalar yapılmıştır. Çok sayıda çalışma yapılmış olmasına rağmen, kazein miselleri için henüz kesin bir yapı öne sunulmamış, kazeinlerin ve ayrıca kazein misellerinin fonksiyonel özelliklerine dayanan bir dizi model önerilmiştir. Bununla birlikte, kaplama çekirdeği modeli, alt misel modeli, Holt ve Horne modeli, Şekil 4'te tasvir edildiği gibi en çok kabul gören yapı modelleridir. Waugh, önce kazein yapısı fikrinde devrim yarattı ve daha sonra yapıyı çeşitli araştırmacılar defalarca revize ettiler.

Tüm modellerde kazeinin kendiliğinden birleşmesi (kalsiyum yokluğunda bile) gözlemlenmiştir. Protein alt misellerinin CCP tarafından birbirine yapıştırıldığı da öne sürülmüştür ve kazein alt miselleri hakkındaki fikir bu noktada ortaya çıkmıştır. 1965 yılında, Waugh ve Nobel ilk olarak kaplama çekirdeği modelini önerdi. Ca^{2+} çözeltilerindeki kazeinin çözünürlüğüne dayalı olarak, bu model, kalsiyum yokluğunda κ -kazeinlerle (çekirdek olarak) α_1 - ve β -kazeinlerin düşük ağırlıklı küresel oluşumu olarak önerilmiştir. Bu kaplama kompleksinin yüzeyine yayılan κ -kazein monomerleri ve misel boyutu, κ -kazein miktarı ile değerlendirilir. Bu nedenle, kolloidal kazein kompleksinin liyofilik doğası ve κ -kazeinin proteolitik enzimlere yaklaşabilirliği, bu model aracılığıyla daha iyi açıklanmaktadır. Payens 1966 yılında kazeinlerin misel olarak birleşmeleri ile ilgili deneysel bulgulara dayanarak misel çekirdeğinin, kalsiyum fosfat (hem yüzeyde hem de miselin içinde konumlandırılmış) ile birlikte β -kazeinlere gevşek bir şekilde bağlanmış α_1 -kazein molekülleri içerdiğini öne sürmüştür (Şekil 4).^[138, 140, 159-165]

Waugh'un önerilerine dayanarak, 1969'da ferritin etiketli κ -kazein antikorları aracılığıyla elektron mikroskobu ile kazein miselinin yüzeyinde κ -kazeini bulmaya çalışılmıştır. Bununla birlikte, kazein misel yüzeyinde çok az κ -kazein konsantrasyonu bulunmuştur veya hiç bulunmamıştır. Daha sonra κ -kazeinin miselin içinde bulunabileceği ve α_1 - ve β -kazeinler için bir çekirdeklenme merkezi olarak hareket edebileceği ve sonuç olarak CCP tarafından stabilize edilebileceği varsayılmıştır. Bu misel modelinin yüzeyi, bazı CCP tarafından desteklenen α_1 - ve β -kazeinleri içerir.

1987'de Paquin ve ark. kazein misel çekirdeğinin hidrofobik etkileşimler yoluyla bağlanan bir α_{s1} -kazein, CCP ve β -kazein ağından oluştuğunu varsaymışlardır. Kazein misellerinin jel kromatografisinden (EDTA ayrışmış) iki protein fraksiyonunu tanımak için tek tabakalı yöntemler kullanmışlardır.^[166-169]



Şekil 2: (a) Payens tarafından önerilen kaplama çekirdek modeli (b) kazein miselinin alt misel modeli (c) koyu halkaların kalsiyum fosfat nanokümelerini temsil ettiği kazein monomerlerinin Holt modeli. (d) İkili bağlanmayı temsil eden kazein miselinin Horne modeli; burada dikdörtgen çubuklar, protein-protein etkileşimlerinin meydana geldiği hidrofobik bölgeleri temsil ederken, halkalar üçgenler olarak gösterilen kalsiyum fosfat kümelerine bağlanan protein hidrofilik bölgeleri temsil eder ve κ -kazein monomeriktir ve yüzeydedir.^[145, 159, 170]

Alt misel modelinde, CCP'nin, kazein misellerinin SANS (Küçük açılı nötron saçılımı) spektrumlarında gözlemlendiği gibi, 9,3 nm yarıçaplı küçük bir kürenin (alt misel) çevresinde yer aldığı öne sürülmüştür.^[171-173] Alt misel modeli Walstra tarafından daha da modifiye edilmiş ve CCP'nin sadece yüzeyde değil, aynı zamanda alt birimler olarak içeride de yer aldığı belirtilmiştir. Bununla birlikte, alt misel modeli McMahon ve McManus tarafından elektron mikroskobu (EM) çalışmalarından sonra reddedilmiştir. Önceki EM çalışmaları, misellerin küresel veya ahududu benzeri görünümünü göstermektedir, alt misel modeline benzer ve EM numune hazırlama sırasında artefaktlar sunduğundan doğal kazein molekülünü temsil etmemektedir. Kriyo-transmisyon elektron mikroskobu ile incelendiğinde, 8-10 nm'den büyük elektron yoğun partiküller içermeyen misel içinde ayırt edilemez bir iç kuaterner yapı gözlenmiştir.^[130, 162, 174]

Holt daha sonra nano küme modelini tanıtmıştır ve CCP'nin nanojel olarak da bilinen homojen bir protein ağı içinde küçük kiraz taşları gibi yayıldığını belirtmiştir. Kazeinin kalsiyum fosfatla ilişkisi bir nano kümenin büyümesini engeller ve böylece meme bezi dokusunun kireçlenmesini de önler. Homojen bir protein matrisi genellikle nano kümelerden dışarıya sızan protein kuyruklarının diğer proteinlerle zayıf etkileşimi sonucunda oluşur. Dalgleish, nano küme oluşumunun artan kalsiyum fosfat konsantrasyonundan kaynaklandığı fikrini sunmuştur ve böylece misel yapısı oluşumunda kalsiyum fosfatın rolü hakkında kapsamlı bir fikir sağlamıştır. Bu model aynı zamanda basitçe kalsiyum iyonlarının kazeinata eklenmesi veya fosfat iyonları olmadan misel oluşumunun başarısızlığının arkasındaki fikri de desteklemektedir. Araştırmada tüm kazein kullanılmamış olsa da, kazeinata hem kalsiyum hem de fosfatın hassas bir şekilde eklenmesi ile misel oluşumunun mümkün olabileceği bulunmuştur. Dahası kazein, kalsiyum ve fosfat karışımlarından misellerin oluşumu konusunda kesinlik yoktur. Ayrılmış miseller, önceki boyutlarını geri kazanmazlar ve ultra yüksek basınçlı işlem后会 sonra parçalar veya kısmen yeniden kümelenmiş parçacıklar şeklinde kalırlar, böylece montaj işleminde bazı kinetik kontrol faktörlerinin katılımını destekler.^[128, 135, 175]

Horne, daha sonra ikili bağlanma modeli olarak bilinen polikondenzasyon yöntemini önermiştir. Bu model, kazein supramolekül oluşumunun, hidrofobik etkileşim ve kalsiyum fosfat kümesinin köprülenmesi yoluyla bireysel kazeinlerin çapraz bağlanmasına bağlı olduğu fikrini desteklemektedir.

Hidrofobik olarak bağlanmış proteinin daha fazla çekirdeklenmesi, elektrostatik itici etkileşimler tarafından bastırılır ve moleküller arasındaki etkileşim enerjisi elektrostatik itme ve hidrofobik etkileşimin sonucudur.^[130, 175-176] Bu model, böylece, κ -kazeinin hidrofobik bağlanma yoluyla kazein supramolekülüne, N-terminal bölgesine bağlandığı fikrini ortaya koymuştur. Sonuç olarak koloidal kalsiyum fosfat veya zincir oluşumu için başka bir hidrofobik bağlanma yoluyla bağlantılar için fosfoserin kümelerinin bulunmaması nedeniyle daha fazla kümelenme inhibe edilir.^[130, 175-176]

2.6.4.6. Kazein Nanomisellerin Uygulamaları

Sütte bulunan saf kazeinler gıda ve ilaç endüstrilerinde kullanılabilir, kazeinatlara ayrışabilir veya kısmen peptitlere hidrolize edilebilir. Üç form da çözünürlük, emülsifikasyon, köpük oluşumu ve stabilizasyonu, su bağlama, jelleşme, ısı

ve asit stabilitesi gibi çeşitli fizikokimyasal özelliklerinden dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca fosfor atomları α_1 -kazein, α_2 -kazein ve β -kazeinde kümeler halinde oluşur ve minerallerin şelasyonuna izin vererek mineraller için tercih edilen bir taşıyıcı görevi görür. Bu nedenle kazein ve bunların ayrı ayrı bileşenleri, dahil edilen bileşiklerin etkinliğini ve biyoyararlanımını geliştirmek için çeşitli nutrasötiklerde ve farmasötiklerde yaygın olarak kullanılmıştır. Kozmesötik endüstride de kullanılmaktadırlar.^[175, 153, 200]

Nutrasötikler, farmasötikler ve kozmesötiklerdeki çeşitli kazein uygulamaları aşağıda Tablo 3’de verilmiştir. Diyet yoluyla insan sağlığının iyiliği için çeşitli mikro besinler (vitaminler, mineraller ve nutrasötikler) fonksiyonel yiyecek ve içecek ürünlerine dahil etme girişimleri olmuştur. Ancak, petrol ve/veya suda düşük çözünürlük ve gıda işleme, taşıma, depolama ve üretim sürecinde fiziksel, kimyasal veya enzimatik bozulmaya karşı savunmasızlık gibi fizikokimyasal ve biyolojik sınırlamaları nedeniyle ticari gıda ürünlerine asimile edilemeyenler, bu nedenle koruma gerektirir. Bazı mikro besinlerin, üretildikleri formda kabul edilebilirliklerini azaltabilen ve dolayısıyla aroma maskeleymesini gerektiren kötü bir tadı vardır. Diğer mikro besinler, diğer gıda bileşenleri ile etkileşimleri nedeniyle düşük biyoyararlanıma ve biyoaktiviteye sahiptir. Bu nedenle, insan sağlığının iyileştirilmesi için biyoyararlanımlarını artırmak için mikro besinlerin kapsüllenmesi, korunması, hedeflenmiş ve kontrollü verilmesi için gıda sınıfı koloidal dağıtım sistemleri üretmek için araştırmalar yürütülmektedir.^[175, 201-202]

Tablo 3: Çeşitli kazein bazlı nutrasötiklerin özeti.^[175]

	Biyoaktifler	Enkapsülasyon Mekanizması	Taşıma Sistemi	Ref.
Polifenoller	Epigallocateşingallat	Nanoenkapsülasyon	Kazein miselleri	177
		Kendiliğinden Birleşen β -kazeinler	β -kazeinler	178
	Kurkumin	Nanoenkapsülasyon	Kazeinler	179
		Kendiliğinden birleşen sodyum kazeinat	Sodyum kazeinat	180
		Kendiliğinden birleşen β -kazeinler	β -kazeinler	181
	Naringenin	Kendiliğinden birleşen β -kazeinler	β -kazeinler	182
		Nanoenkapsülasyon	α - ve β - kazeinler	183

	Resveratrol	Nanoenkapsülasyon	Sodyum kazeinat	184
		Nanoenkapsülasyon	Zein kaplı sodyum kazeinat	185
Vitaminler	D ₂ Vitamini	Yeniden birleşen kazein miselleri	Kazein miselleri	186
		Yeniden birleşen kazein miselleri	Sodyum kazeinat	187
	D ₃ Vitamini	Yeniden birleşen kazein miselleri	Kazein miselleri	188
		Kendiliğinden birleşen β -kazeinler	β -kazeinler	189
	β -karoten	Nanoenkapsülasyon	Kazein miselleri	190
		Kendiliğinden birleşen sodyum kazeinat	Sodyum kazeinat	191
	A Vitamini	Nanoenkapsülasyon	Kazein miselleri	192
	Folik Asit	Yeniden birleşen kazein miselleri	Sodyum kazeinat	193
Uçucu Yağlar	Timol	Nanoenkapsülasyon	Sodyum kazeinat	194
	Biberiye Ekstratı	Nanoenkapsülasyon	Kazein miselleri	195
Yağ Asitleri	Omega-3 (DHA)	Kendiliğinden birleşen sodyum kazeinat	Sodyum kazeinat	196
	Omega-3	Nanoenkapsülasyon	Kazein miselleri	197
Mineraller	Demir	Metal İyon Bağlanması	Kazeinler	198
Proteinler	Laktoferrin	Nanoenkapsülasyon	Kazein miselleri	199

Son zamanlarda, biyoyararlanımı artırmak ve gıda bilimi ve teknolojisindeki biyoaktif bileşiklerin ve kimyasalların korunmasını sağlamak için farklı nano dağıtım sistemleri formüle edilmiş ve test edilmiştir. Nanopartiküller, çökelme olmaksızın gıda ürünlerine kolayca dahil edilir ve tüketici tarafından fark edilmeyerek ürünlerin kabul edilebilirliğini artırabilirler. Nanoteknolojideki önemli özelliklerden biri, kendiliğinden birleşen moleküler üst yapıların (nanoyapıların) varlığıdır. Çalışmalar, gıdaların, etin kas liflerinde aktin-miyozin kompleksi, bitki diyetlerinde nişasta granülleri ve sütte kazein miselleri gibi pek çok sistemi doğal olarak barındırdığını göstermiştir. Gıda proteinleri, biyolojik olarak parçalanabilirlik, antijenik olmama, geniş yenilenebilir kaynaklar, yüksek besin değeri, çeşitli nutrasötiklere bağlanma kapasitesi, toksik olmama ve biyouyumluluk gibi farklı ve olağanüstü özellikleri nedeniyle etkili

nutrasötik nano taşıyıcılar için uygun adaylardır. Düşük maliyetle de mevcuttur ve zorlu mide ortamlarına karşı stabildirler, sindirim enzimlerine dirençlidirler ve bağırsak yüzeyi için muko yapışkanlığa sahiptirler. Nutrasötikleri verimli bir şekilde verebilen en önemli nano taşıyıcılardan biri, hidrofobik bir yapı ve GRAS statüsüne sahip olması nedeniyle sığır sütü proteindir (agregalar).^[175, 202-204]

Pahalı olmayan, yaygın olarak bulunabilen, yüksek besin değerine ve iyi sensör özelliklere sahip kazein proteini, hidrofobik biyoaktif maddeleri doğal olarak taşıyabilir ve insan vücudunda bileşikleri serbest bırakabilir. Ayrıca, sulu gıda sistemlerindeki terapötik bileşiklerin istenmeyen tadını maskeleyerek karmaşık gıda sistemlerinde nutrasötiklerin çözünürlüğünü artırabilirler. Doğal kazein miselleri, açık yapıları ve etkileşim için erişilebilir bölgeleri nedeniyle düşük moleküler ağırlıklı hidrofobik bileşikler içerebilir. Örneğin hidrofobik moleküllerin anneden yenidoğana taşınması sütteki kazein misellerinin biyolojik bir rolüdür. Süt proteininin hidrofobik bileşenlerle bağlanmasının hidrofobik etkileşimler ve Van der Waals kuvvetleriyle birlikte hidrojen bağlanması yoluyla olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte, vitaminler, polifenoller ve yağ asitleri gibi hidrofobik maddelerin tersinir bağlanması, protein ve ligand arasındaki kovalent olmayan etkileşimler yoluyla olabilir. Sadece kazein değil, β -kazein gibi kazein fraksiyonları, vitamin stabilitesini artırabilen hidrofobik etkileşim yoluyla vitaminlerle bağlanmada rol oynar.^[55, 189, 201, 205-206]

Kazeinler işlenmiş süt ve gıda ürünlerinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Nutrasötiklerde kazein kullanımının, ihtiyaç duyulan diğer aktif bileşenlerin miktarını azaltabildikleri için üreticiler için verimli ve uygun maliyetli olduğu kanıtlanmıştır. Ayrıca, temel yapısal bütünlüklerini koruyarak çeşitli ürünlerde işleme sırasında stabilitelerini korurlar. Yüksek yağ tüketimi insan sağlığı üzerinde olumsuz bir etkiye sahiptir, bu nedenle az yağlı veya sıfır yağlı gıda ürünlerinin üretimine yönelik araştırmalar yapılmalıdır. Cohen ve ark. nutrasötikler için protein esaslı taşıma sistemlerini incelemiştir. Başlangıçta, yeniden birleştirilmiş kazein (rCM) içinde kapsüllenmiş D vitamini ve diğer yağda çözünen besinler içeren az yağlı ürünler çalışmışlardır. Ancak son zamanlarda, Cohen ve ark. insan klinik deneylerinde, rCM'de hapsedilmiş D₃ ile yağsız yoğurdun, sentetik yüzey aktif madde Tween-80'e benzer şekilde yüksek biyoyararlanım gösterdiği bulmuşlardır. Kazein miselleri ayrıca, alkali pH'ın hidrofobikliği desteklediği ve dolayısıyla kapsülleme kapasitesini artırdığı doğal

kazein misellerinde balık ve bitkisel yağlardan omega-3 yağ asitlerinin kapsüllenmesinde rol oynamışlardır. Biberiye gibi uçucu yağlar da kazein nanomiselleri içinde iyi bir şekilde kapsüllenmiştir. (-) - Epigallokateşin-3-gallat (EGCG), yeşil çaydaki başlıca kateşindir ve insan sağlığı için çeşitli yararlarının yanı sıra antioksidatif özellikleriyle de bilinir. Zayıf oksidatif stabilitesi nedeniyle, EGCG kullanımı nutrasötiklerde sınırlıdır. Bununla birlikte, EGCG, kurkumin, naringenin ve resveratrol gibi diğer polifenollerin kazein ve kazein fraksiyonları içinde kapsüllendiği bildirilmiştir.^[177, 179-185, 187-188, 195, 200, 207-209]

Kazeinler diğer nanopartikülat sistemlere kıyasla misel çekirdek içindeki ilaç çözünürlüğü nedeniyle daha yüksek hücre içi alım, yüksek stabilite, biyouyumluluk ve daha yüksek ilaç kapsülleme gibi geleneksel ve yeni ilaç taşıma sistemleri için iyi bir aday olmasını sağlayan bir dizi ilginç özelliğe sahiptir. Ayrıca düşük polimer içeriği gerektirirler ve ilacı pH, ışık ve doku tahrişine karşı ve ayrıca polimerik kabuk koruması nedeniyle korurlar. Biyolojik dağılım ilaçtan ziyade dağıtım sistemine bağlı olduğundan, nahoş tadı maskeleyeceğinden ve ayrıca ilacın sürekli salımını sağladığı için nanoyapılı kazeinler bir ilacın terapötik etkinliğini de artırabilir. Dahası, kazein doğal olarak kapsülleme yeteneğine sahiptir ve kazeinin hidrofobik kısmı sadece hidrofobik maddelerle etkileşime girerek kazeini ideal bir dağıtım sistemi haline getirir. Nanoyapılı salım sistemlerini imal etmek için kullanılabilen ticari kazein ürünleri arasında, 4,6 pH'ta asit çökeltme yoluyla hazırlanan asit kazein ve β -kazein oluşumu için başlangıç malzemesi olan sodyum kazeinat bulunur. Kazeinler diğer süt proteinleri kadar sıcaklığa duyarlı değildir.^[55, 134, 142, 175, 210-211]

Son zamanlarda kazeinler, oluşumları için organik çözücülerin veya yüzey aktif maddenin kullanılmasını gerektiren lipit bazlı nanopartiküllerin yerine kullanılmaktadır. Biyoaktif molekülleri hapsedebilen kazein esaslı ilaçlar, emülsifikasyon, kimyasal veya enzimatik çapraz bağlama, basit koaservasyon, elektrostatik kompleksasyon, aşı kopolimerizasyonu, ısıyla jelleşme ve polielektrolit iyonik kompleksleme yoluyla hazırlanır. Kazein temelli nano taşıma sistemleri, nano boyutlu misellerden enzimatik olarak çapraz bağlı nano jel partiküllerine (veya nanopartiküllere) kadar çeşitlilik gösterir.^[134, 142, 175]

Semo ve ark. ilk olarak kazein misellerini hidrofobik nutrasötiklerin (yağda çözünen vitamin D2) nanoenkapsülasyonu için kullanmışlardır. Sıgır kazeininin kendiliğinden birleşme özelliğine sahip olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca yeniden birleştirilmiş kazein misellerinin (rCM) vitaminleri UV bozulmasına karşı koruduğu ve mide ortamına karşı koruyarak kapsüllenmemiş vitaminlere kıyasla biyoyararlanımı artırdığı da bulunmuştur. Vitaminin, misellerde serumdan 5.5 kat daha fazla konsantrasyon olduğu bulunmuştur. Loewen ve ark. ayrıca fosfat, sitrat ve kalsiyum konsantrasyonlarının vitamin yüklemesi üzerindeki etkisini ve optimum vitamin yüklemesi elde etmek için bu üç faktörün optimum seviyelerini değerlendirmek üzere yanıt yüzey metodolojisini kullanmışlardır. Bununla birlikte rCM, triklosan, dokosaheksaenoik asit ve kurkumin gibi kemoterapötik ajanlarla kompleks oluşturabilen çeşitli hidrofobik ilaçları kapsüllemek için kullanılmıştır.^[179, 187, 212-216]

Çapraz bağlama yoluyla kazein nanopartiküllerinin üretimi de incelenmiştir. Çapraz bağlı kazein nanopartikülleri, kontrollü salım, antitümör aktivitesi ve hepatotoksitesini azaltmak için flutamidi (hidrofobik antikanser ilaç) kapsüllemek için kullanılmıştır. Nanopartiküllerin, bir sıçan modelinde tek başına ilaca kıyasla prostat kanseri hücrelerine karşı daha yüksek antiproliferatif, anti-anjiyojenik ve apoptotik etkiler gösterdiği gözlenmiştir. Dahası çapraz bağlama, ilaçların biyoyararlanımını ve hedeflendirilmiş taşınımını da artırabilir. Örneğin glutaraldehit çapraz bağlı kazein, özellikle bağırsağa hedeflendirilerek karvediol ve doksorubisin-indosiyenin yeşili içeren manyetik partikülleri kapsüllemek için kullanılmıştır. Transglütaminaz çapraz bağlı kazein nanopartiküller ise bir tümör içine penetrasyonunu arttırmak için sisplatin taşıma sistemi olarak hazırlanmıştır.^[217-220]

En bol miktarda bulunan amfifilik proteinler olan kazeinler, stabilize emülsiyonlar yapmak için emülsiyonlarda da yaygın olarak kullanılmaktadır. Kazeinler, yağ-su arayüzünde güçlü bir şekilde adsorbe olabilir. Bu nedenle homojenizasyon sırasında yüksek yüzey aktivitesine sahiptir, işleme ve depolamada stabilite sağlar ve pH, yapı, esneklik, topaklanma ve sıcaklık gibi çeşitli koşullara bağlı olarak emülsiyonlarda birleşmeyi önler. Kazeinatların kazein miselinden daha yüksek yüzey aktivitesi olduğu gösterilmiştir, bunun yanında emülsiyon yüzeyindeki protein konsantrasyonu, kalsiyum kazeinatlar için sodyum kazeinattan daha yüksektir.^[55, 221-222]

Kazein miselleri ayrıca toksik olmama, hidrofiliklik, oral ilaç uygulamasında biyolojik uyumluluk ve kimyasal modifikasyonlar için reaktif alanların mevcudiyeti gibi çeşitli özellikler nedeniyle hidrojel oluşumu için ideal kabul edilir. Kazein hidrojelleri gözeneklidir ve jelin kontrollü çapraz bağ yoğunluğu ve sulu ortama hidrojel afinitesi yoluyla kolayca formüle edilebilir. Sulu kazein solüsyonlarında jelleşmeyi indüklemek için çeşitli fiziksel ve kimyasal çapraz bağlama yöntemleri çalışılmıştır. Song ve ark., sulu bir sistemde genipin ile çapraz bağlanma yoluyla sığır serum albümininin (BSA) kontrollü salımı için kazein hidrojellerini formüle etmişlerdir.

Çapraz bağlanmada ağırlıkça %8 kazein çözeltisi kullanılmış ve çapraz bağlı kazein hidrojelinin mekanik mukavemetinin değişken genipin miktarları ile ayarlanabileceği bulunmuştur. Bununla birlikte, pH 7.4'te yüksek miktarlarda şişme ve BSA salımı gözlenmiştir. Ayrıca, formülasyonlardaki değişken genipin konsantrasyonları nedeniyle, hidrojinin çeşitli çapraz bağlanma ve şişme dereceleri gözlenmiştir. Böylece, genipin çapraz bağlı hidrojellerin bağırsakta protein ilaç iletimi için uygun bir polimerik taşıyıcı olabileceği varsayılmıştır. Daha sonra, doğal bir enzim olan mikrobiyal transglutaminaz (MTGase) kullanılarak kazein proteininin enzimatik çapraz bağlanması, herhangi bir kimyasal çapraz bağlayıcı kullanmadan biyoaktif toksik olmayan bir farmasötik üretmek için çalışılmıştır.^[1271, 142-143, 223-224]

Tablo 4: Çeşitli kazein bazlı ilaçlar, bildirilen parçacık boyutları, zeta potansiyeli ve kapsülleme teknikleriyle birlikte listelenmiştir.^[175]

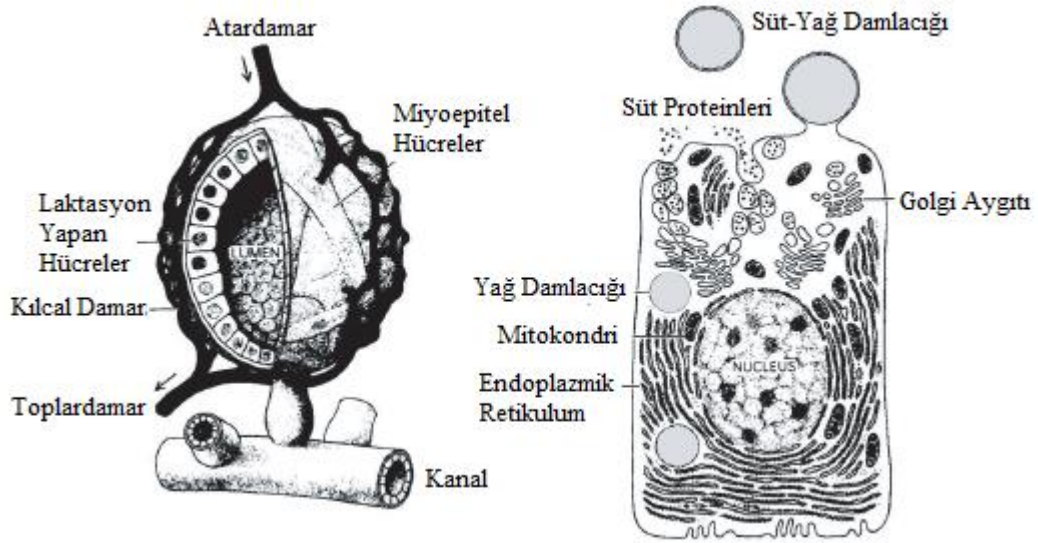
İlaç	Taşıma Sistemi	Enkapsülasyon Mekanizması	Partikül Boyutu (nm)	Zeta Potansiyeli (mV)
Flutamit	Kazein	Sodyum tripolifosfat çapraz bağlı nanopartikül	<100	+7,54/+173,3
	Kazein Miseli	Genipin çapraz bağlı nanopartikül	61-96	-34,7/-30,5
Sisplatin	Kazein	Transglutaminaze çapraz bağlı nanopartikül	257	-20,0
Kurkumin	Sodyum kazeinat	pH'a bağlı nanoenkapsülasyon	<100	-37,63

Selekoksib	β -kazein	Sprey kurutulmuş polimerik nanopartikül	128	-
	β -kazein	Kendi kendine birleşen β -kazein	31	>-40
	β -kazein	Kendi kendine birleşen β -kazein	22-40	-
Paklitaksel	β -kazein	Kendi kendine birleşen β -kazein	<100	>-40
Mitoksantro n	β -kazein	Kendi kendine birleşen β -kazein	<100	-40
Metformin	Sodyum kazeinat	Kendi kendine birleşen sodyum kazeinat	963	-23
Alfuzosin	Kazein Miseli	Genipin çapraz bağlı nanopartikül	122-260	-21,6/-36,6

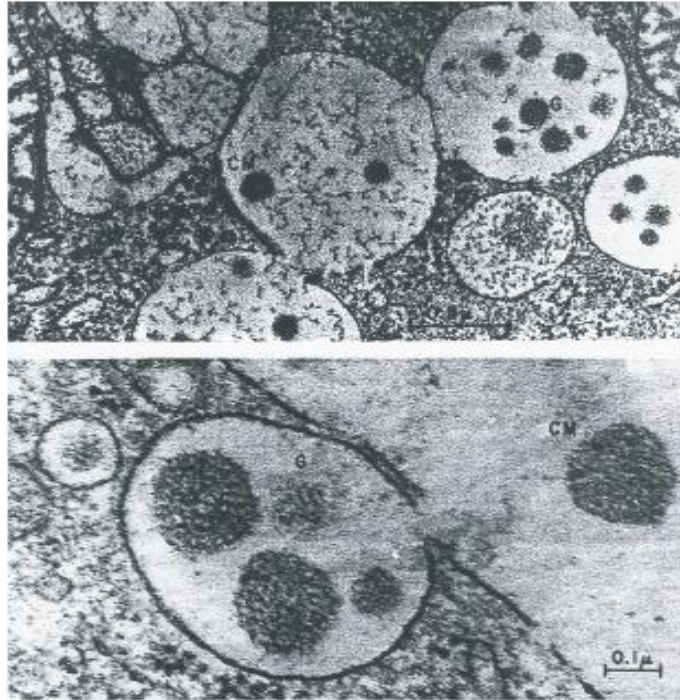
2.6.4.7. Kazeinlerin Sistemsel Sentezi ve Sekresyonu

Dış ter bezlerinden meme bezinin evrimi, birçok türde çok çeşitli dış görünümlem sağlamıştır, ancak doku düzeyinde Şekil 3'de gösterildiği gibi ortak bir organizasyon teması vardır. Meme salgı hücreleri epiteldir ve duktal dokuya bağlı alveollerde düzenlenmiştir. Salgı epitel hücreleri, oksitosin hormonuna yanıt olarak sütü büzüp kanallara atabilen bir mioepitelyal hücre tabakası ile çevrilidir. Alveoller, süt sentezi ve salgılanması için gerekli olan metabolik öncüllerin sabit bir akışını sağlamak için oldukça vaskülarize haldedir. Son olarak, vaskülarize alveoller, hücre dışı bir matriks içine gömülüdür.^[128, 225]

Süt bileşenlerinin nihai sulu ortamlarına adaptasyonu salgılama sırasında başlar. Lipid ve protein sentezi başlangıçtan itibaren bölünmüştür. Amino asitler ve bunların metabolik öncülleri aktif olarak salgı epitel hücrelerine taşınır ve oldukça gelişmiş kaba endoplazmik retikulumun ribozomları üzerinde proteinlere birleştirilir. Memeli kaynaklı tüm süt proteinleri, Şekil 3'de gösterilen endoplazmik retikulum lümenine yeni oluşan proteinlerin sokulmasını sağlayan korunmuş lider sekanslara sahiptir. Proteinler daha sonra Şekil 4'de gösterildiği gibi Golgi aparatından taşınır; muhtemelen sütün küresel proteinleri bu süreçte katlanır. Golgi aygıtında, çoğu türde başlıca süt proteinleri olan kazeinler, yaklaşık 100 nm çapında küresel kompleksler olarak görünmektedir.^[128, 225-226]



Şekil 3: Laktasyon yapan meme bezinin hücre fizyolojisi. Lümeni çevreleyen emziren epitel hücrelerinden oluşan tek bir alveol ve farklı mekanizmalarla protein ve lipidin aktif sekresyonunu gösteren tipik bir laktasyon yapan hücre.^[128]



Şekil 4: Golgi aygıtlarında (G) kazein misellerinin (CM) oluşumu ve küçük alt miseler partiküllerin daha büyük miseller (üstte) halinde agregasyonu. İçeriğini alveolar lümeneye (alt) boşaltmak üzere olan bir Golgi aygıtı (G) ve lümeninde halihazırda bir kazein miseli (CM)^[128]

Kazeinler, kalsiyum taşınması sürecini başlatmak için kalsiyumla aktive olan membrana bağlı kinaz tarafından fosforile edilir. Membranla ilişkili bir ATPaz, veziküllere kalsiyum sağlar. Kalsiyum, kazein ve fosfatın alt miseler yapılarına kademeli olarak girmesi, kazein misellerinin oluşumuna yol açar ve bu hayati minerallerin etkili

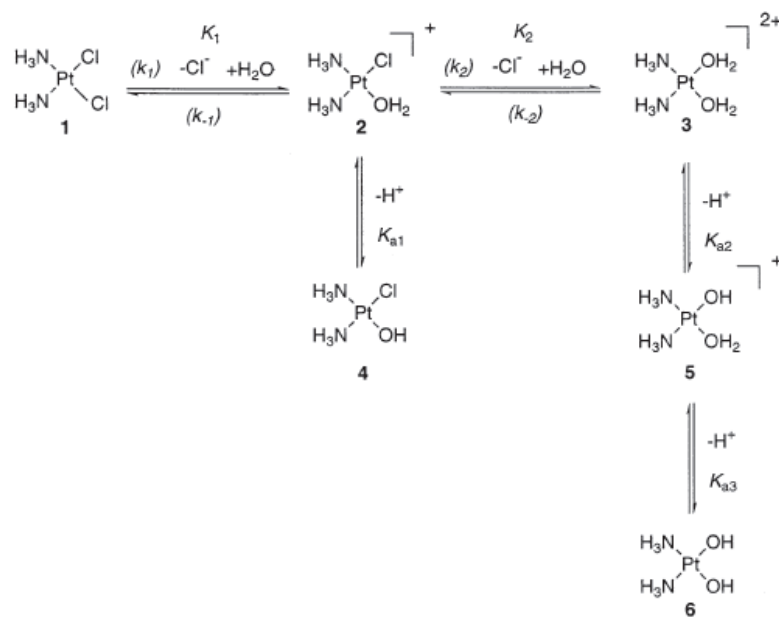
bir şekilde taşınmasını sağlar. Bu süreç, trans Golgi'ye en yakın salgı veziküllerinde küçük alt miseler partiküllerin görüldüğü Şekil 4'de gösterilmiştir. Kalsiyumun bağlanması ve fosfat birikmesi yoluyla kolloidal kazein miselleri oluşur ve sonunda ters pinositozla salgılanır (Şekil 4). Genel olarak bu görüş, kazein misellerinin sentezi ve salgılanmasında proteinli alt miseler yapıların katılımını güçlü bir şekilde desteklemektedir.^[128, 227-228.]

Endoplazmik retikulumun (ER) lümeni içinde kazein salgılanması süreci, spesifik olarak çalışılmamıştır; bununla birlikte, hücre biyolojisi ve diğer sistemlerde protein katlanması hakkındaki son bilgilere yapılan atıflar, kazein misel oluşumu sorunlarına daha fazla ışık tutabilir. Protein katlanmasının kalite kontrolü konusu, hücre biyolojisinde geniş çapta araştırılan bir alan haline gelmiştir. Endoplazmik retikulumla ilişkili bozunma (Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation, ERAD) sürecinin birçok salgı sisteminde meydana geldiği bulunmuştur. Yukarıda belirtildiği gibi, kazeinin korunmuş lider sekansları, oluşan proteinlerin ER'nin lümenine sokulmasına neden olur. Yeni salgılanan proteinler ER'nin ötesine geçmeden önce son biçimlerine katlanmalı ve çok bileşenli sistemler bir araya gelmelidir. Düzgün ilişkilendirememe veya katlanamama katlanmamış protein yanıtına, etiketlemeye ve ERAD sistemi tarafından kaldırılmaya yol açar. Genel olarak, ER lümeninin ortamı, kazeinlerin imza işlevsel özelliğine (kendi kendine birleşim) elverişli olacaktır, bu nedenle ilk kazein-kazein etkileşimleri doğal olarak burada meydana gelecektir. ER lümeni bir kalsiyum depolama merkezi görevi görürken, serbest kalsiyum iyonu konsantrasyonu, fosforile edilmemiş kazeinler için bağlanma sabitlerinin çok altında bir konsantrasyon olan 1 ile 3 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ arasında dalgalanır. Muhtemelen, kazeinlerin uygun şekilde ilişkilendirilmesi, bozulmadan kaçmalarına ve işlem için Golgi'ye geçmelerine yardımcı olur.^[128, 229-230]

Birbirinden ayrı kazeinlerin korunmuş dizilerinin seçilmiş ikincil yapısal elemanlara yol açtığı ve bu elemanların klasik protein katlanması olmaksızın kazeinlerin kendiliğinden birleşmesine yol açtığı tartışılmaktadır. Yani kazein çok az üçüncül yapı içerir veya hiç içermez ve doğrudan ikincil yapı oluşumundan hem sert hem de esnek elemanlar sergileyen dördüncül yapılara doğru ilerler. Bu, protein yapısının biyolojik fonksiyona yol açtığı yapısal biyolojinin temel ilkesiyle uyumludur (Anfinsen Hipotezi).^[128, 231-233]

2.7. Platin Esaslı İlaçların Kimyası

Platin içeren ilaçların antitümör özellikleri, büyük ölçüde ligand yer değiştirme reaksiyonlarının kinetiğine atfedilebilir. Bu konuya yapılan diğer katkılarda uzun uzadıya tartışıldığı gibi, platin esaslı ilaçların birincil hedeflerinin DNA nükleobazlarındaki azot verici atomlar olduğuna inanılmaktadır. Metal iyonu ile bu atomlar arasında oluşan bağlar, hücre bölünmesi sürecine müdahale etmek veya bir hücrenin onarılamaz hasarını fark eden hücre içi mekanizmaları tetiklemek için yeterince uzun ömürlü olmalıdır. Nükleobaz azot atomları ile platin (II) arasındaki bağlar bu gereksinimi açıkça karşılar. Nükleobaz azot atomları ile kararsız bağlar oluşturan metal iyonları benzer şekilde hareket edemezler ve aktif bileşikler vermezler. Öte yandan, enjekte edilen metal bazlı ilaç, nispeten kısa bir süre içinde, başlangıçtaki bileşik üzerindeki "ayrılan grupların" DNA baz azot atomları ile değiştirilmesine izin veren bir dizi reaksiyona girmelidir. Sisplatin, cis-[PtCl₂(NH₃)₂] (**1**) nispeten reaktif olmayan bir moleküldür. Biyolojik sistemlerde bulunan ve nükleobazlar dahil olmak üzere azot veya oksijen verici gruplar aracılığıyla platine bağlanan moleküllerin hiçbirisiyle doğrudan reaksiyona girmez. Bununla birlikte, sulu çözeltide sisplatinin kloro ligandları, cis-[PtCl(H₂O)(NH₃)₂]⁺ (**2**) ve cis-[Pt(H₂O)₂(NH₃)₂]²⁺ (**3**) oluşturmak için su ile kademeli bir şekilde değiştirilebilir. Çözeltinin pH'ına bağlı olarak, bağlı su molekülleri hidrokso kompleksleri (**4**), (**5**) ve (**6**)'yı vermek üzere protonsuzlaşabilir (Şekil 5).^[234-237]



Şekil 5: Sulu çözeltide Sisplatinin hidrokso komplekslerinin oluşumu.^[234]

Pt-OH₂ bağı, Pt-Cl'den çok daha reaktiftir. Bu nedenle su kompleksleri, DNA nükleobazları gibi N-verici ligandları ile kolayca reaksiyona girer. Bu nedenle sisplatinin hidrolizi, genellikle DNA ile reaksiyonu için gerekli bir başlangıç olarak kabul edilir. Su kompleksleri ayrıca hedef DNA dışında in vivo bulunan moleküller ile sisplatinden daha kolay reaksiyona girer. Bu nedenle toksisiteye yol açan reaksiyonlarda rol oynarlar. Cis-[Pt(H₂O)₂(NH₃)₂]²⁺ (3)'ün bağlı su molekülleri çok değişkendir, bu nedenle bu tür biyolojik olarak önemli birçok molekülle ayırım gözetmeden reaksiyona girer. Bu nedenle çok zehirlidir.^[234-237]

Karboplatin sisplatinden daha az toksiktir ancak aynı zamanda eşit doz bazında daha az anti-tümör aktivitesine sahiptir. Bu özellikler, hidroliz reaksiyonlarına girme eğiliminin çok daha düşük olmasıyla ilişkilidir - aslında, hidroliz hızı fizyolojik koşullar altında ihmal edilebilir derecede yavaştır. Karboplatin doğrudan guanozin monofosfat ile reaksiyona girer, ancak sadece yavaş reaksiyon gösterir. Sisplatin ve karboplatin, önceden hidrolize ihtiyaç duymadan kükürt içeren ligandlarla (örn. Metiyonin, sistein) doğrudan reaksiyona girer. Örneğin, metiyonin ile karboplatin, hem metiyonin hem de dikarboksilat ligandının monodentat bağlandığı nispeten uzun ömürlü türler verir. Monodentata sülfür yoluyla bağlanan tiyoeter ligandları bazı durumlarda guanozin nitrojeni ile yer değiştirebileceğinden, bu tür tiyoeter komplekslerinin hidroliz yolunu atlayarak DNA plastinasyonunda ana ara maddeler olabileceği öne sürülmüştür. Bu olasılık, kapsamlı deneylerin konusu olmaya devam etmektedir. Bu tür mekanizmaların rolü ne olursa olsun, sisplatinin hidroliz kimyasının bu platin bazlı ilaçların (ve genel olarak cis-[PtCl₂(amin)₂] bileşiklerinin) antitümör aktivitesinde, toksisitesinde ve metabolizmada önemli bir faktör olduğu doğrudur.^[236-244]

2.8. Sisplatin Esaslı Nano Taşıyıcı Formülasyonları

Organik (polimerik nanopartiküller, polimerik miseller, polimerik konjugatlar, dendrimerler, lipozomlar, polimer kaplı lipozomlar ve nanokapsüller), inorganik ferromanyetik nanopartiküller, altın nanopartiküller ve mezogözenekli silika nanopartiküller dahil olmak üzere çeşitli taşıyıcılar ve hibrit nanopartiküller (karbon nanotüpler, nano ölçekli koordinasyon polimerleri ve polisilsesquioxane nanopartiküller) platin bazlı ilaçların taşınımı kolaylaştırmak için uyarlanmıştır. Bu nanopartikül ilaç taşıyıcı sistemlerden bazıları umut verici prelinik sonuçlar göstermiştir ve birkaç klinik araştırmalara girmiştir (Tablo 5).^[245-263]

Tablo 5: Klinik araştırmaları devam eden sisplatin nanopartikül formülasyonları. ^[263]

	Formülasyon	řirket	Endikasyon	Klinik Deneme
NC-6004 (Nanoplatin™)	Polimerik Misel	NanoCarrier Co.	Çeşitli kanserler	Faz I/II/III
AP5280	Polimer(HPMA)- Sisplatin Konjugatı	Access Pharmaceuticals, Inc.	Çeşitli kanserler	Faz II
L-NNDP (Aroplatin™)	Lipozom-Sisplatin	New York Üniversitesi, Tıp Fakültesi	Malign plevral mezotelyoma	Faz II
SPI-077	PEGile edilmiş lipozomal sisplatin	Alza Corporation	Baş ve boyun kanseri, akciğer kanseri	Faz II
LiPlaCis	PEGile edilmiş lipozomal sisplatin	LiPlasome Pharma	İleri veya dirençli tümörler	Faz I
Lipoplatin	PEGile edilmiş lipozomal sisplatin	Regulon Inc.	Çeşitli kanserler	Faz III

2.9. Protein Esaslı Nano Taşıyıcıların Dezavantajları ve Gelecek Perspektifleri

Doğal polimerler olarak proteinler, çok çeşitli moleküler ağırlıklarına sahip farklı boyutlarda heterojen karışımlardır. Dolayısıyla heterojen nanopartikül boyut dağılımı üretirler ve partiden partiye varyasyon sergilerler. Bu, endüstriyel uygulama için protein nanopartikül hazırlamanın ölçek büyütme sürecini engelleyebilir. Bu dezavantajın üstesinden gelmek için ilginç bir strateji, rekombinant protein teknolojisidir. Rekombinant proteinlerin monodispersitesi ve kesin olarak tanımlanmış özelliklerinin yanı sıra çapraz bağlanan grupların, bağlanma parçalarının veya programlanabilir bozunma hızlarının öngörülebilir yerleşimi, onları ilaç dağıtımı ve doku mühendisliğı için yararlı kılar. ^[127, 264] Rekombinant HSA ve rekombinant jelatine dayanan tek dağılımlı nanopartiküller başarıyla hazırlanmıştır. Hayvan proteini bazlı nanopartiküllerin dezavantajları arasında, hidrofilik yapıları ve sulu ortamlarda hızlı çözünme nedeniyle sürekli bir ilaç salımı sağlayamamasıdır. Sistem suyu emdiğinde ve şiştiğinde, ilaçlar hızla yayılabilir.

Genellikle protein nanopartiküllerini sertleştirmek için kullanılan kimyasal çapraz bağlayıcılar (örneğin, glutaraldehit ve formaldehit), *in vivo* biyodegradasyon sırasında dokularla reaksiyona girerek toksik ürünlerin oluşumu riskiyle birlikte nanopartiküllerin içinde reaksiyona girmemiş kalıntı çapraz bağlayıcı varlığından muzdariptir. Bu problem, çapraz bağlanmaya gerek kalmadan hidrofobik bitki proteinleri kullanılarak aşılabılır. Ayrıca bitki proteinleri, sığır spongiformensefaliti gibi hayvan proteini ile ilgili hastalıkların yayılma riskini azaltır. Olası protein immünojenitesiyle ilgili olarak, albümin, jelatin, zein ve kazein nanopartikülleri uygulamalarında i.v. uygulamadan sonra hiçbir antijenik reaksiyon rapor edilmemiştir. Protein nanopartiküllerinin, zararlı yan etkiler olmaksızın *in vivo* olarak iyi tolere edilmesi muhtemeldir.^[127]

Nano kapsülleme ve nanopartikülasyon yoluyla vitaminler, mineraller, çeşitli biyoaktif maddeler ve nutrasötik bileşiklerin taşınımı için etkili bir taşıyım aracı olarak kazein miselleri kullanılmıştır. Son gelişmeler, sağlık ve gıda endüstrisinde gelecekteki beklentiler için kazein misellerinin doğal ve üstün avantajlarının önemini vurgulamıştır. Bununla birlikte kazeinin açık yapısı, özellikle protein yapısının sertleşmesi ve proteolitik enzimlerin neden olduğu kalıntıların tıkanması nedeniyle kontrol edilmeyen patlama salımı gibi bazı sınırlamalara neden olur. Bu sınırlama, çapraz bağlama maddeleri aracılığıyla geliştirilmektedir. Buna ek olarak kazeinin kendi kendine birleşen doğası kazein misel oluşumuna yol açabilir. Ancak yanlış birleştirilmiş protein komplekslerine yol açan bazı işlevsiz kümelenmeler vardır. Bu nedenle, kazein misellerinin kendi kendine birleşmesinin yanı sıra protein-protein etkileşimi yoluyla oluşan işlevsiz kümeleşmeler hakkında ayrıntılı çalışmalara sahip olmak önemlidir.

Araştırmacılar, kanser ve diğer ilgili hastalıklarda hedeflenen ve kontrollü salım özellikleri nedeniyle sürekli artan talebi karşılamak için kazeine dayalı dağıtım sistemleri geliştirmek için hala yeni ve daha iyi teknikler arıyorlar. Dahası, bu doğal olarak oluşan proteinin çeşitli biyoaktif maddeler ve gıda bileşenlerini taşıma potansiyelini tam olarak anlamak için insanda kazein miselleri yoluyla iletilen biyoaktif maddenin etkili işlevselliğine ilişkin verileri oluşturmak için insan çalışmalarına ihtiyaç vardır.^[175]

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.GEREÇLER

3.1.1.Kimyasal Maddeler

- Sodyum kazeinat (Aksuvital Doğal Ürünler A.Ş.)
- Sisplatin (Cisplatin-Koçak 25mg/50ml) (Koçak Farma İlaç ve Kimya San.A.Ş.)
- Absolüt Etanol (Alkomed Kimya Koz.San.Ve Diş Tic.Ltd.Şti)
- $C_6H_5K_3O_7 \cdot H_2O$ (tripotasyum sitrat monohidrat) (Merck)
- K_2HPO_4 (dipotasyum hidrojen fosfat) (Merck)
- $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (kalsiyum klorür dihidrat) (Merck)
- HCl (hidroklorik asit) (Merck)
- NaOH (sodyum hidroksit) (Merck)
- Hücre Medyumu (Dulbecco's Modified Eagle Medium/F-12) (DMEM) (Gibco)
- Tripsin-EDTA (%0.25) (Gibco)
- Fetal Sığır Serum (Fetal Bovine Serum) (FBS) (Gibco)
- Penisilin-Streptomisin (Gibco)
- Fosfat Tamponu (Dulbecco's Phosphate Buffer Saline) (PBS) (Corning)
- Metiltiazolildifenil-tetraazolyum bromür (MTT) (Sigma-Aldrich)
- Dimetil Sülfoksit (DMSO) (Sigma-Aldrich)
- Protein belirteci (marker) (Biorad)

diğer tüm kimyasal malzemeler Sigma-Aldrich ve Merck firmasından sağlandı.

3.1.2.Sarf Malzemeler

- 10 µl pipet ucu (Isolab)
- 100 µl pipet ucu (Isolab)
- 1000 µl pipet ucu (Isolab)
- 75 cm² flask (Corning)

- 15 ml santrifüj tüpü (Corning)
- 50 ml santrifüj tüpü (Corning)
- 96 kuyulu plaka (Corning)
- Kriyo tüp (Corning)
- %4-12'lik 10 kuyulu hazır SDS-PAGE jeli (Biorad)

3.1.3.Cihazlar

- Mikropipetler (1-20 µL, 20-200 µL ve 200-1000 µL) (Eppendorf)
- Hemasitometre (Marienfeld)
- Jel Elektroforez Sistemi (Biorad)
- Kuru Blok Isıtıcı (Starlab)
- Buz Makinası (Hoshizaki)
- Derin Dondurucu (-80°C) (Nuaire)
- Distile Su Cihazı (GFL)
- Etüv (Sanyo)
- Laminar Hava Akım Cihazı ELB 2472 (Heraus)
- Otoklav (Hirayama)
- pH metre (Hanna)
- Santrifüj (Hettich)
- Sıvı Azot Tankı (34 XT Taylor-Wharton)
- Ters Mikroskop (Carl Zeiss Microscopy ZEISS Axio Vert.A1)
- Vorteks (Biosan)
- Manyetik karıştırıcı (İkamag)
- Hassas Terazı (Scaltec)
- Liyofilizatör (Labconco FreeZone 2.5 Liter Benchtop Freeze Dry System)
- Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) (FEI Quanta™ 450 FEG)
- Geçirmeli Elektron Mikroskobu (TEM) (JEOL 1011)

-Zayıflatılmış Toplam Yansıma – Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometresi (ATR-FT-IR) (Bruker ALPHA ATR-FT-IR Spectrometer)

-Dinamik Işık Saçılımı Cihazı (DLS) (Brookhaven's NanoBrook 90Plus Particle Size Analyzer)

-Plak Okuyucu (Thermo Scientific Multiskan GO Microplate Spectrophotometer)

-İndüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektrometresi (ICP-MS) (Perkin Elmer, Nexion 1000)

3.1.4.Çalışmada Kullanılan Tamponlar

-PAGE Yükleme Tamponu (5x)

10 mM β -merkapto-etanol

%10 SDS

%20 Gliserol

0.2 M Tris-HCl pH:6.8

%0.05 Bromfenol mavisi

-Tris-Glisin-SDS PAGE Yürütme Tamponu

3 g Tris-Base

14,4 g Glisin

1 g SDS

1000 ml dH₂O'da çözülerek oda sıcaklığında saklandı.

3.1.5.Çalışmada Kullanılan Hücre Hatları

-MCF-7 (İnsan Meme Adenokarsinoma Hücreleri) hücre hattı (Haliç Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı)

-A-375 (İnsan Melonoma Hücreleri) hücre hattı (İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı)

-HUVEC (İnsan Umbilikal Damar Endotel Hücreleri) hücre hattı (İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı)

-NIH-3T3 (Fare Embriyonik Fibroblast Hücreleri) hücre hattı (İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı)

3.2.YÖNTEMLER

3.2.1.Miseler Yapıda Kazein Nanopartiküllerin Sentezi

Yeniden birleşen misel yapısında kazein nanopartiküllerin sentezi için öncelikle, %2'lik (w/v) kazein dispersiyonu hazırlandı. Bunun için 2 g sodyum kazeinat tartıldı ve bir beher içinde 100 ml saf suda çözülerek, 4 saat oda sıcaklığında sabit karıştırma hızı ile manyetik karıştırıcıda, hiçbir topak kalmayınca kadar karıştırıldı. Elde edilen dispersiyon, tamamen hidrate olması için 24 saat +4°C'de bekletildi. Daha sonra, çalışmada kullanılacak olan çözeltiler, tartımları yapılarak saf su içinde hazırlandı. 0.4 M $C_6H_5K_3O_7 \cdot H_2O$ (tripotasyum sitrat monohidrat), 0.08 M K_2HPO_4 (dipotasyum hidrojen fosfat), 0.08 M $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (kalsiyum klorür dihidrat), 0.1 N HCl (hidroklorik asit) ve 0.1 N NaOH (sodyum hidroksit) hazırlandı. Elde edilen çözeltiler de 24 saat +4°C'de bekletildi.

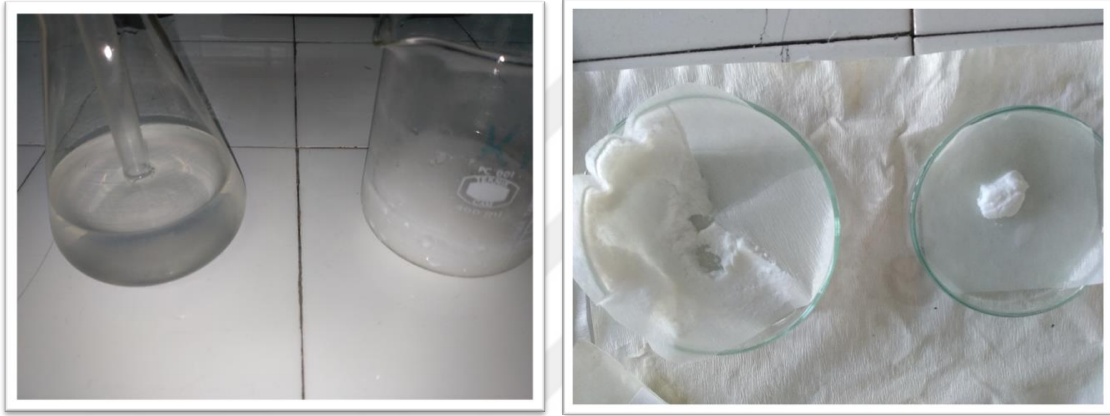


Şekil 6: Sentez için hazırlanmış olan deney düzeneği. Buz banyosu içinde manyetik karıştırıcıda karışmakta olan sodyum kazeinat dispersiyonu ve pH kontrolü için sabitlenmiş pH metre.

Buz banyosunda içinde, beherde karışmakta olan (Şekil 6) 100 ml %2'lik (w/v) kazein dispersiyonuna önce 100 μ L sisplatin daha sonra absolüt etanol eklendi. Karışımdaki son etanol konsantrasyonu %1.25'i geçmemiştir. Karışmakta olan dispersiyona 2 ml $C_6H_5K_3O_7 \cdot H_2O$, 12 ml K_2HPO_4 , 10 ml $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ve karışma devam ederken 1.25 ml K_2HPO_4 ve 2.5 ml $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ eklendi. Bu işlem 15 dakika aralıklarla 8 kez tekrarlandı. Son olarak, hacim saf su ile 200 ml'ye getirilerek 1 saat karışmaya bırakıldı. İşlem boyunca pH 6.7-7 arasında tutuldu. Kazeinin son konsantrasyonu %1 olmuştur. 1 saat karıştırma sonrası 0.1 M HCl ile karışım kazeinin

izoelektrik noktası olan pH 4.6'ya getirilerek oluşan misellerin çökmesi sağlandı. Filtre kağıdı ile çökelti ve üst sıvı ayrıldı (Şekil 7). Ayrılan üst sıvı analiz için +4°C'de saklandı. Elde edilen çökelti -20°C'de gece boyu dondurulduktan sonra, yine gece boyu, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Biyofizik Bölümü'nde bulunan Lanconco marka FreeZone 2.5 Liter Benchtop Freeze Dry System cihazı ile liyofilizasyona bırakıldı

Liyofilize edilmiş örnekler karakterizasyonları ve *in vitro* uygulamalarda kullanılmak üzere -20°C'de saklandı (Şekil 8). Aynı işlemler boş kazein nanopartiküller için sisplatin eklemeyen tekrarı.



Şekil 7: Ayrılan üst sıvı ve çöken miseller.

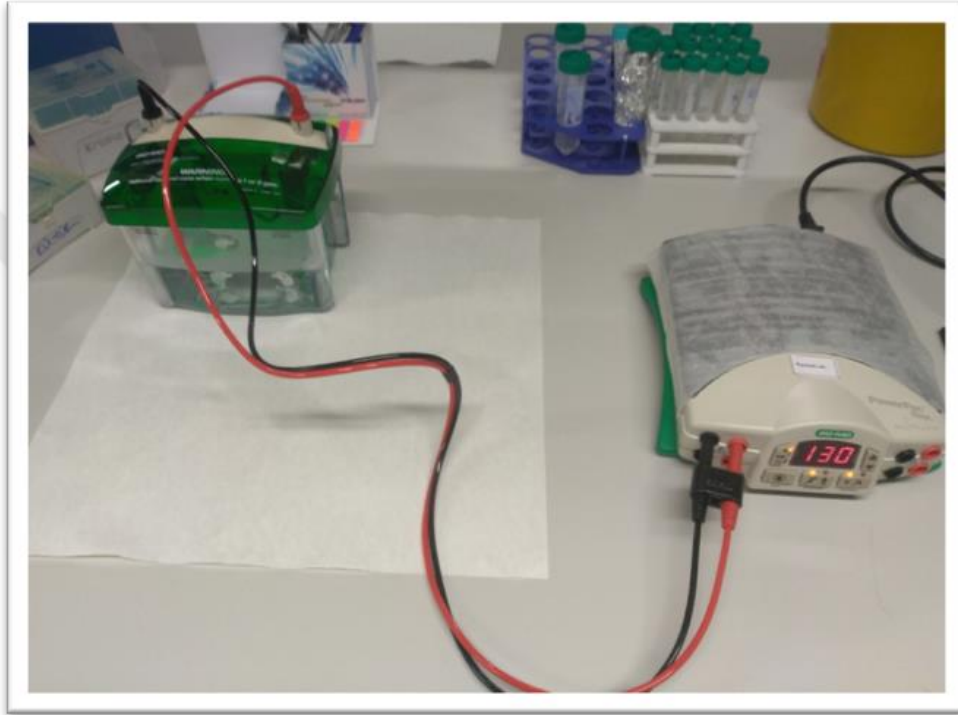


Şekil 8: Liyofilize edilmiş örnekler.

3.2.2.Sentezlenen Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

3.2.2.1.Sodyum Dodesil Sülfat – Poliakrilamid Jel Elektroforez (SDS-PAGE) Analizi

Sentezlenen boş ve sisplatin yüklü nanopartiküllerin saflıklarının ve molekül ağırlıklarının dağılımlarının belirlenmesi Haliç Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Bölümü'nde bulunan Biorad marka elektroforez sistemi ile yapıldı (Şekil 9).



Şekil 9: Biorad Elektroforez sistemi.

%4-12'lik hazır jel kaseti elektroforez tankı içine yerleştirildi. Önceden hazırlanmış olan yürütme tamponu tanka eklendi. Liyofilize edilmiş boş ve sisplatin yüklü örneklerinin tartımı yapıldı, fosfat tamponu (PBS) içinde 15 ml'lik steril santrifüj tüplerinde 1 mg/ml konsantrasyonunda çözüldü ve birer dakika vortekslendi. Örneklerden 200 µL alınarak eppendorflara aktarıldı ve yükleme tamponu eklenerek Haliç Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde bulunan Starlab marka kuru blok ısıtıcıda 10 dakika 100°C'de denatüre edildi. Daha sonra, yükleme için tank içindeki jel kasetinin üzerindeki örnek yükleme bölgelerinde bulunan tarak çıkartıldı. Denatüre edilmiş örnekler ve markerlar kuyu başına 15 ve 20 µg/µL olacak şekilde kuyulara yüklendi. Tank güç kaynağına bağlanarak 130 mV voltajda yürütme yapıldı. 45 dakika sonra örnekler jelin alt sınırına gelince yürütme durduruldu.

Yürütme durdurulduktan sonra jel tanktan alınarak dikkatlice etrafındaki kaset kırıldı. Jel saf su ile yıkanarak kalıntılardan temizlendi, bir kaba alınarak üzerini kaplayacak miktarda coomassie brilliant blue boyası eklendi ve 1 saat oda sıcaklığında boyamaya bırakıldı. Boyama sonrası boya ortamdan alınarak jel üzerine %10'luk asetik asit çözeltisi eklenerek, bağlanmayan boyanın uzaklaştırılması için gece boyu çalkanmaya bırakıldı. Boya uzaklaştırıldıktan sonra markerlara ve örneklerle ait bantlardan yola çıkarak molekül ağırlığı dağılımları ve saflıkları belirlendi.

3.2.2.2.Dinamik Işık Saçılımı Cihazı (DLS) ile Parçacık Boyutu Dağılımı Analizi

Sentezlenen nanopartiküllerin parçacık boyutu dağılımı ölçümü İstanbul Üniversitesi – Cerrahpaşa Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü'nde bulunan Brookhaven marka NanoBrook 90Plus Particle Size Analyzer cihazı ile yapıldı. Liyofilize edilmiş boş ve sisplatin yüklü örneklerin tartımı yapıldı, fosfat tamponu (PBS) içinde 15 ml'lik steril santrifüj tüplerinde 1 mg/ml konsantrasyonunda çözüldü ve birer dakika vortekslendi. Örnekler ölçüm öncesi 5 dakika sonikatörlü su banyosunda bekletildi. Cihazın küvetlerine konulan örnekler küvetlerin dışı temizlendikten sonra ve içinde baloncuk olmadığı gözlemlendikten sonra ölçümler yapıldı.

3.2.2.3.Taramalı Elektron Mikroskopi (SEM) Analizi

Sentezlenen nanopartiküllerin yüzey özelliklerinin incelenmesi ve boyut analizleri İstanbul Üniversitesi – Cerrahpaşa Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü'nde bulunan FEİ marka Quanta™ 450 FEG taramalı elektron mikroskobu ile yapıldı. Liyofilize edilmiş boş ve sisplatin yüklü örneklerin tartımı yapıldı, fosfat tamponu (PBS) içinde 15 ml'lik steril santrifüj tüplerinde 1 mg/ml konsantrasyonunda çözüldü ve birer dakika vortekslendi. Örnekler ölçüm öncesi 5 dakika sonikatörlü su banyosunda bekletildi. Karbon bant üzerine boş ve sisplatin yüklü örnekler damlatıldı, yüksek vakum altında üzerlerine altın püskürtüldü. 10 ve 5 kV'da farklı büyütme ölçeklerinde inceleme yapıldı.

3.2.2.4.Geçirmeli Elektron Mikroskobu (TEM) Analizi

Sentezlenen nanopartiküllerin morfolojilerinin incelenmesi ve boyut analizleri İstanbul Üniversitesi – İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda bulunan JEOL marka JEOL 1011 geçirmeli elektron mikroskobu ile yapıldı. İnceleme negatif işaretleme ile yapıldı. Liyofilize edilmiş boş ve sisplatin yüklü

örneklerin tartımı yapıldı, fosfat tamponu (PBS) içinde 1mg/ml konsantrasyonunda çözöldü, birer dakika vortekslendi. Daha sonra tekrar fosfat tamponu ile 1/100 seyreltildi. Örnekler ölçüm öncesi 5 dakika sonikatörlü su banyosunda bekletildi. Karbon film kaplı 400 mesh bakır gridlere damlatılan boş ve kazein yüklü örnekler 5 dakika bekletildikten sonra, gridler negatif işaretleme için 15'er dakika %1'lik uranyum asetat çözeltisi ile muamele edildi. Daha sonra gridler su damlaları ile yıkandı ve oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. 60 ve 80 kV'da farklı büyötmelerde inceleme yapıldı.

3.2.2.5.Zayıflatılmış Toplam Yansıma – Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (ATR-FT-IR) Spektrometresi Analizi

Sisplatin ile sentezlenmiş nanopartiköller arasındaki ilaç bağlanma özelliklerinin analizi Bezmîâlem Vakıf Üniversitesi – Eczacılık Fakölteşi – Farmasötik Kimya Anabilim Dalı'nda bulunan Bruker marka ALPHA ATR-FT-IR cihazı ile yapıldı. Liyofilize edilmiş boş ve sisplatin yüklü örnekler cihazın ölçüm aparatı altına yerleştirilerek sıkıştırıldı ve 4000-400 cm^{-1} aralığında ölçömler alındı. Tek başına sisplatinin ölçömlü için, eser miktarda NaCl içeren 25mg/50ml konsantrasyonundaki 10 ml sisplatin çözöltü petri içinde, İstanbul Üniversitesi – Cerrahpaşa Mühendislik Fakölteşi Kimya Mühendisliği Bölümü'nde bulunan Selecta marka vakumlu etövde 40°C'de 8 mmHg basınçta 24 saat kurumaya bırakıldı. 24 saat sonra kuruyan sarı renkli sisplatin ve beyaz renkli NaCl kristalleri spatöl yardımıyla dikkatlice kazınarak cam vialle alındı. NaCl kristalleri olabildiğince ayıklanmaya çalışıldı (Şekil 10).

Daha sonra ALPHA ATR-FT-IR cihazı ile cihazın ölçüm aparatın altına yerleştirilerek sıkıştırıldı ve 4000-400 cm^{-1} aralığında ölçömler alındı.



Şekil 10: Vakumlu etövde kurutulmuş sisplatin çözöltü ve çöken toz sisplatin.

3.2.2.6. İndüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektrometresi (ICP-MS) Analizi

İlaç enkapsülasyon verimliliğinin belirlenmesi için sentez sırasında nanopartikül çökeltisi alındıktan sonra ayrılan üst sıvıda kalan sisplatin tayini hizmet alımı ile İstanbul Üniversitesi – Cerrahpaşa – Proje Teknoloji Ofisi, Merkez Laboratuvarı'nda bulunan Perkin Elmer marka Nexion 1000 cihazı ile yapıldı. Enkapsüle edilmemiş ve üst sıvıda kalan sisplatin miktarını belirlemek için Pt tayini yapıldı. Enkapsülasyon verimliliğini hesaplamak için başlangıçta eklenen sisplatin miktarından enkapsülasyon sonrası serbest sisplatin miktarı çıkartıldı, başlangıçta eklenen sisplatin miktarına bölündü ve yüz ile çarpılarak yüzde verimlilik hesaplandı.

$$\% \text{Enkapsülasyon Verimliliği} = \frac{\text{Baş. Sisplatin Miktarı} - \text{Serbest Sisplatin Miktarı}}{\text{Baş. Sisplatin Miktarı}} \times 100$$

3.2.3. Hücre Kültürü Çalışmaları

3.2.3.1. Hücrelerin Açılması

Sıvı azot tankında -196°C'de saklanan MCF-7 (İnsan Meme Adenokarsinoma Hücreleri), A-375 (İnsan Melonoma Hücreleri), NIH-3T3 (Fare Embriyonik Fibroblast Hücreleri) ve HUVEC (İnsan Umbilikal Damar Endotel Hücreleri) hücre soylarının her biri çarpaz kontaminasyondan kaçınmak için ayrı ayrı açıldı.

Laminar akım altında, aseptik şartlara bağlı olarak çalışıldı. Hücreler açılırken, hızlı bir şekilde oda sıcaklığında çözüldü. Standart kültür koşullarında, %10 FBS ve %1 antibiyotik (100 µg/ml streptomisin ve 100 U/ml penisilin) içeren DMEM/F-12 hücre medyumundan (cDMEM) 5-6 ml eklenerek 15 ml'lik steril santrifüj tüplerinde 3000 devir/dakika'da 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası ayrılan üst sıvılar atıldı, oluşan peletlere 1-2 ml taze cDMEM ile pipetaj yapıldı ve içerisinde 10-12 ml taze cDMEM olan 75 cm²'lik flasklara ekildi.

3.2.3.2. Hücrelerin Pasajlanması

75 cm²'lik flasklara ekilmiş olan hücreler 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edildi. Her bir hücre soyu ayrı ayrı, ters mikroskopta 2-3 günde bir kontrol edildi. Hücreler semikonfluent duruma geldiklerinde 3-4 ml tripsin-EDTA çözeltisi ile 3-4 dakika inkübe edilerek kaldırıldı. Kalkan hücreler üzerlerine 3-4 ml taze cDMEM eklenerek flasklardan alındı ve 15 ml'lik steril santrifüj tüplerine aktarıldı. 3000

devir/dakika'da 5 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvılar atıldı ve peletler 1-2 ml taze cDMEM ile çözülerek yine 75 cm²'lik flasklara ekildi.

3.2.3.3.Hücrelerin Sayılması

Hücreler her bir ekim ve saklama için dondurulma öncesi Marienfield marka hemasitometri ile sayıldı. 75 cm²'lik flasklarda ekili olan hücreler 3-4 ml tripsin-EDTA çözeltisi ile 3-4 dakika inkübe edilerek kaldırıldı, kalkan hücrelerin üzerlerine 3-4 ml taze cDMEM eklenerek flasklardan alındı ve 15 ml'lik steril santrifüj tüplerine aktarıldı. 3000 devir/dakika'da 5 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvılar atıldı ve oluşan peletler hücre yoğunluğuna bağlı olarak 1-3 ml taze cDMEM ile çözüldü.

Elde edilen hücre süspansiyonlarından 10 µL alınarak, hemasitometre üzerindeki her iki hücre sayım bölgesi ile lamel arasına kapiler etki ile dağıtıldı. Hemasitometre üzerindeki iki bölgede de, her bir 16 karede sayım yapıldı. Ortalama alınarak 16 ile çarpıldı. 1 ml'deki hücre sayısını bulmak için 10.000 ile çarpıldı ve hücre sayıları belirlendi.

3.2.3.4.Hücrelerin Dondurulması

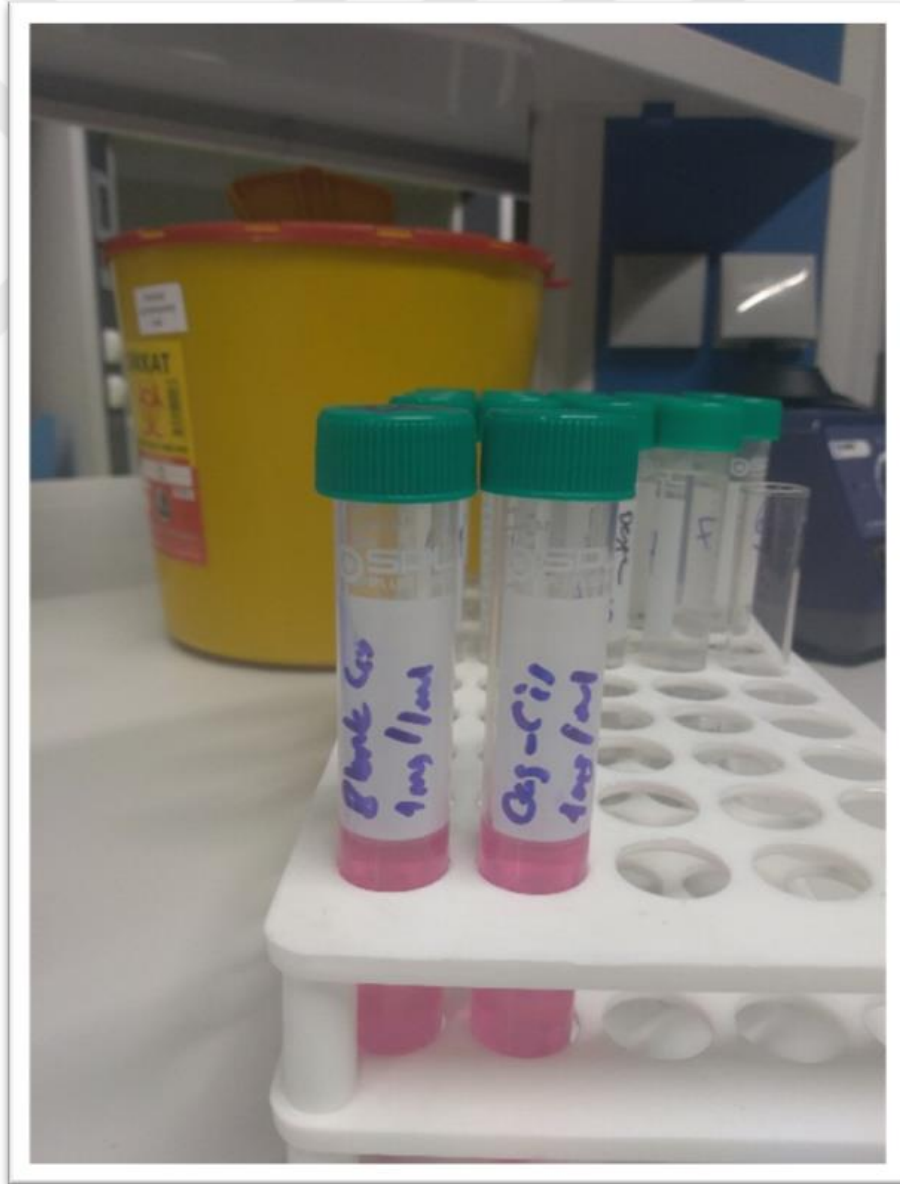
Her bir hücre soyu çalışmalar tamamlandıktan sonra ayrı ayrı donduruldu. 75 cm²'lik flasklara ekili olan hücreler, 3-4 ml tripsin-EDTA çözeltisi ile 3-4 dakika inkübe edilerek kaldırıldı, kalkan hücrelerin üzerine 3-4 ml taze cDMEM eklenerek flasklardan alındı ve 15 ml'lik steril santrifüj tüplerine aktarıldı. 3000 devir/dakika'da 5 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvılar atıldı ve oluşan peletler hücre yoğunluğuna bağlı olarak 1-3 ml taze cDMEM ile çözüldü. Sayım yapıldıktan sonra hücre sayısı, kriyo tüp içerisinde 5x10⁶ hücre olacak şekilde ayarlandı. 1/9 oranında DMSO/FBS içinde kriyo tüplere aktarılan hücreler 24 saat -80°C'de bekletildikten sonra sıvı azot tankına konuldu.

3.2.3.5.Hücrelerin Boş ve Sisplatin Yüklü Nanopartiküller ve Serbest Sisplatin ile Muamele Edilmesi

-20°C'de saklanan boş ve sisplatin yüklü liyofilize edilmiş nanopartikül örneklerinin her birinden 10 mg tartıldı ve laminar akım altında 15 ml'lik steril santrifüj tüpleri içerisinde 10 ml taze cDMEM'de çözüldü (Şekil 11). Konsantrasyonları 1 mg/ml olan örnekler, birer dakika vortekslendi ve oda sıcaklığında çözülmeye bırakıldı. +4°C'de saklanmakta olan sisplatin çözeltisi laminar akım altında ependorflara

aktarıldı. Boş kazein nanopartikülleri, sisplatin yüklü kazein nanopartikülleri ve serbest sisplatin için taze cDMEM ile 1, 2.5, 5, 10, 15, 30, 40, 50, 75 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarında alikotlar hazırlandı (Şekil 12). Stok ve alikotlar her bir ekim öncesi taze olarak hazırlandı.

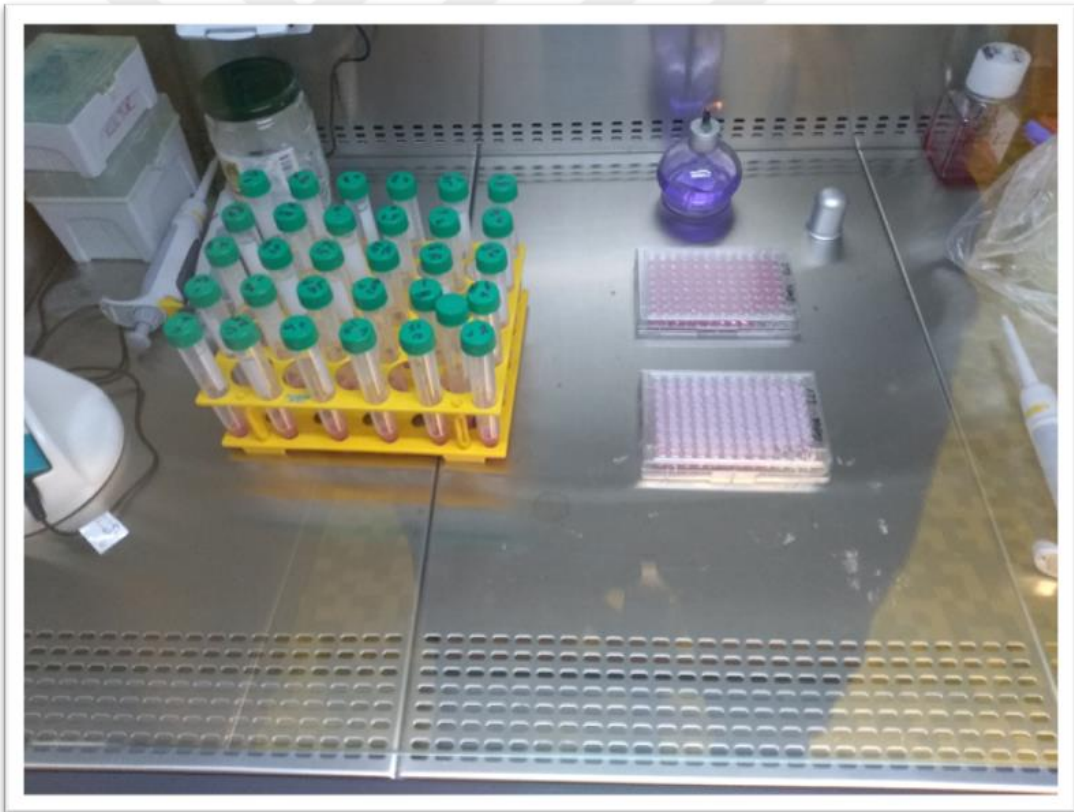
Çalışmada kullanılan her bir hücre soyu (MCF-7, A-375, NIH-3T3 ve HUVEC) çarpaz kontaminasyondan kaçınmak için ayrı ayrı, laminar akım altında ve aseptik şartlarda 96 kuyulu plakalara her kuyuda 10^4 hücre olacak şekilde ekildi. Her bir hücre soyu için farklı inkübe sürelerine ait 3 ayrı 96 kuyulu plakaya ekim yapıldı. Toplamda 12 plakaya ekim yapıldı. Toplamda 12 plaka 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sürelerine göre 37°C’de %5 CO₂ ortamında inkübe edildi (Şekil 13).



Şekil 11: DMEM içinde çözülmüş örnekler.

Çalışmada kuyu hacimleri 200 μ L olarak belirlendi. Her bir plakadaki kuyulara önce 150 μ L hücre+medyum süspansiyonu ekildi. Boş kuyularına sadece 200 μ L medyum eklendi. 24 saat inkübasyondan sonra her bir hücre soyu için bütün plakalar ters mikroskop altında incelendi ve konfluasyon durumları kontrol edildi.

Muamele için her bir plakadaki kuyulara 50 μ L içerisinde farklı konsantrasyonlarda örnekler ve serbest sisplatin inkübasyon sürelerine göre sırasıyla verildi. 24 saatlik inkübasyondan sonra, ilk gün 24 saat muamele için, ikinci gün 48 saat muamele için ve üçüncü gün 72 saat muamele için maddeler verildi. Kontrol kuyularına sadece 50 μ L medyum eklendi. Her bir plaka için 3 tekrarlı kuyularda çalışıldı. Plakalarda 3 kontrol, 3 boş (sadece medyum) ve 3'er tekrarlı, farklı dozlarda; boş kazein nanopartikül, sisplatin yüklü kazein nanopartikül ve serbest sisplatinin olduğu kuyular bulundu. Her bir hücre soyu için deneyler 2 kez tekrarlandı.



Şekil 12: Falcon tüplerde hazırlanmış örneklere ait alikotlar ve hücre kültürü çalışma ortamı. 96 kuyulu plakalardaki hücreler örneklerle muamele edilmeden önce.



Şekil 13: A-375, 3T3, HUVEC ve MCF-7 hücre hatlarının 96 kuyulu plakalarda inkübatör içinde görüntüsü.

3.2.3.6. Hücre Üst Sıvılarından Hücrelere Ulaşmayan Sisplatin Miktarının ICP-MS Analizi ile Belirlenmesi

MCF-7 ve HUVEC hücre soylarının 24 ve 48 saat sisplatin yüklü kazein nanopartiküller ile muamele edilmiş hücrelerin bulunduğu plakalardaki 1 µg/ml ve 100 µg/ml konsantrasyonlarının olduğu kuyulardan üst sıvılar kuyu cidarından mikropipet ile dikkatlice alındı ve eppendorflara aktarıldı. ICP-MS analizi ile Pt tayini yapılarak hücrelere ulaşmayan sisplatin miktarı belirlendi.

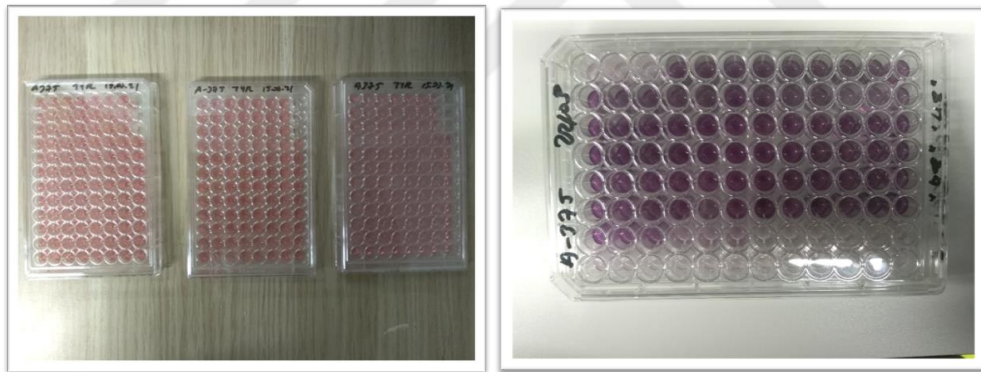
3.2.3.7. Boş Kazein Nanopartiküllerinin, Sisplatin Yüklü Kazein Nanopartiküllerinin ve Serbest Sisplatinin Hücre Canlılığına Olan Etkisinin MTT Testi ile Belirlenmesi

+4°C’de saklanan 5 mg/ml konsantrasyonunda MTT çözeltisi laminar akım altında eppendorflara aktarıldı. 24, 48 ve 72 saat örnekler ve serbest sisplatin ile muamele edilmiş hücrelerin bulunduğu plakalar her bir inkübasyon süresi sonrası, ters mikroskopla incelendi ve görüntülendi (Şekil 14). Plakalardaki hücreler her bir inkübasyon süresi sonrası, laminar akım altında ve aseptik şartlarda MTT ile muamele edildi. Her bir plakadaki bütün kuyulara 4 µL MTT çözeltisi eklendi ve mor formazon

kristalleri gözlemlenene kadar 3-4 saat inkübe edildi. Kristallerin oluşumu gözlemlendikten sonra her bir plakadaki kuyuların içerisi boşaltılarak 200 µL DMSO eklendi (Şekil 16). Plakalar alüminyum folyo ile sarılarak 1 saat oda sıcaklığında bekletildi.

Beklemenin ardından Haliç Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde bulunan Thermo Scientific marka Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer cihazı ile ölçüm öncesi bir dakika çalkalama yapılarak 540, 570 ve 595 nm dalgaboylarında absorbans ölçümleri yapıldı. Hücre canlılığının belirlenmesi için kontrol ve farklı dozlara ait absorbans değerlerinden boş absorbans değerleri çıkartıldı, her bir dozun kontrole oranla ne kadar değiştiğini ölçmek için kontrole ait absorbansa değerine bölündü ve 100 ile çarparak yüzde canlılık hesaplandı. Elde edilen sonuçlardan yola çıkarak örnekler ile serbest sisplatine ait sitotoksosite belirlendi.

$$\%Hücre\ Canlılığı: \frac{Abs_{Örn.} - Abs_{Boş}}{Abs_{Kont.} - Abs_{Boş}} \times 100$$



Şekil 14: A-375 hücre hattının 96 kuyulu plakalara ekildikten sonraki görüntüsü ve A-375 hücre hattında formazan kristallerinin oluşumu.

3.2.3.8. İstatistiksel Analiz

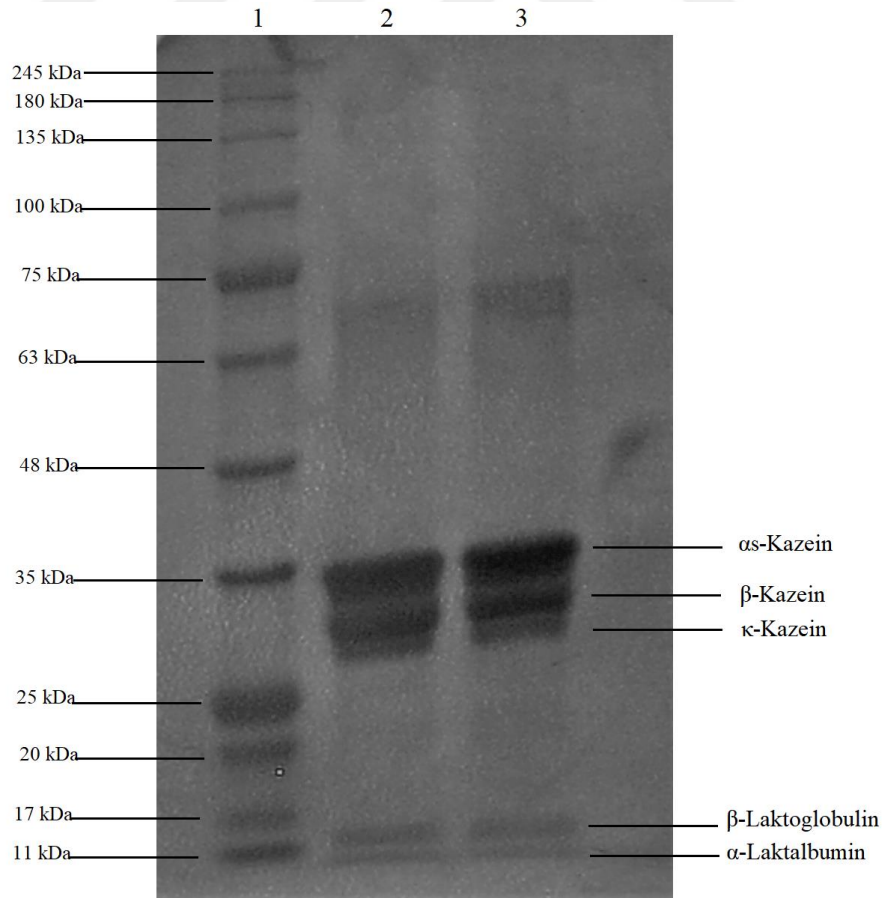
DeneySEL verilerin istatistiksel analizinde *GraphPad Prism 9* programı kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ düzeyinde yapıldı. Verilerin değerlendirilmesinde parametrik olmayan one-way-ANOVA (Friedman Testi) testi kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1.Sentezlenen Nanopartiküllere Ait Bulgular

4.1.1.Molekül Ağırlığı Dağılımları ve Saflıkları

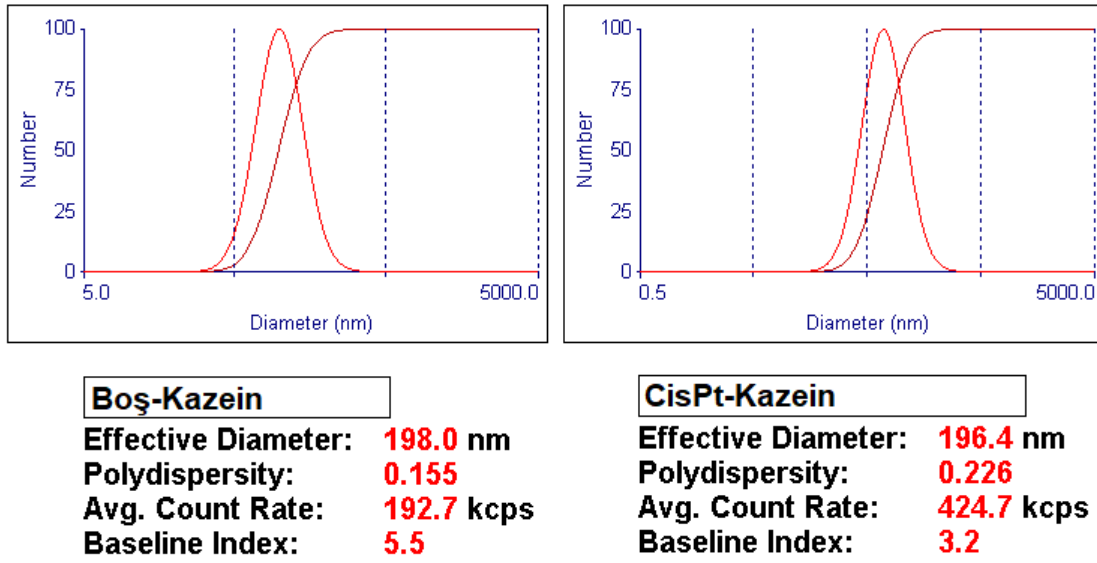
SDS-PAGE analizi ile sisplatin yüklü ve boş kazein nanopartiküllerin alt birimlerinin molekül ağırlığı dağılımları ve saflıkları belirlendi. Şekil 15'deki jel görüntüsünde 1. kuyu belirteçlere, 2. kuyu boş kazein nanopartiküllere ve 3. kuyu sisplatin yüklü kazein nanopartiküllere ait bantlar görülmektedir. 2. ve 3. kuyularda tipik monomerik kazeinler (α -, β - ve κ -kazeinler) görülmekte ve karakteristik doğal kazein bantlarını ifade etmektedir. Bunun yanısıra kazeinlerle birlikte β -laktoglobulin ve α -laktalbumine ait bantlar da görülmektedir. Jel görüntüsünde de görüldüğü gibi, α _{s1} ve α _{s2} kazeinler, yaklaşık 35-36 kDa molekül ağırlığına, β -kazein yaklaşık 29-30 kDa molekül ağırlığına, κ -kazein yaklaşık 27-28 kDa molekül ağırlığına, β -Laktoglobulin yaklaşık 13-14 kDa ve α -laktalbumin yaklaşık 6-7 kDa molekül ağırlığına sahiptir.



Şekil 15: SDS-PAGE jeline ait görüntü.

4.1.2.Parçacık Boyutu Dağılımları

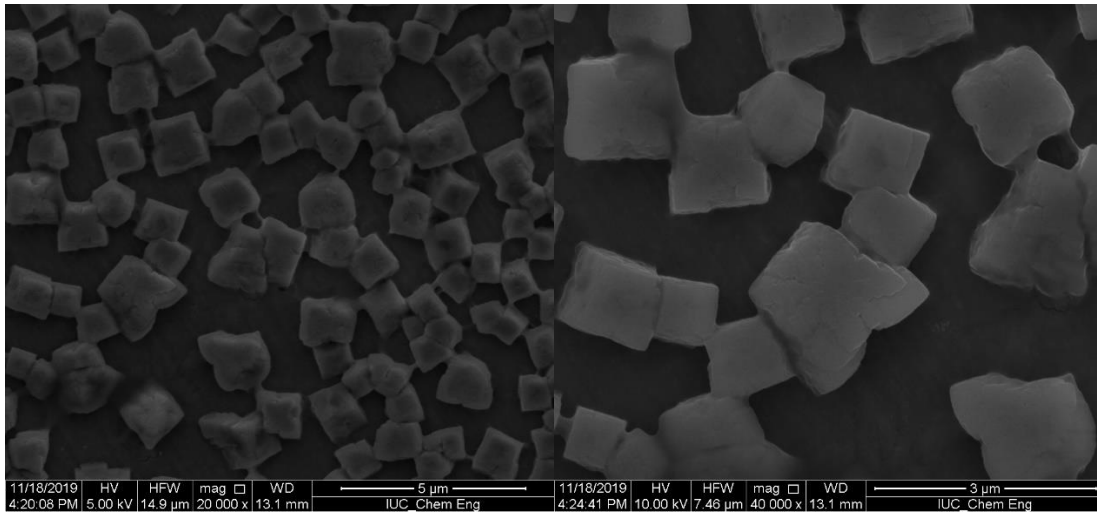
DLS analizi ile sisplatin yüklü ve boş kazein nanopartiküllerin parçacık boyutu dağılımları belirlendi. Şekil 18’de gösterilen analiz sonuçlarına göre boş kazein nanopartiküllerinin ortalama efektif çapı 198 nm, polidispersitesi ise 0.155’dir. Polidispersitelerinin 0.2 civarı ve altında olması nanopartiküllerin benzer çaplarda (uniform yapıda) olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde sisplatin yüklü nanopartiküllerin ortalama efektif çapı 196.4 nm, polidispersitesi ise 0.226’dır.



Şekil 16: Boş ve Sisplatin yüklü kazein nanopartiküllerin parçacık boyutu dağılımları.

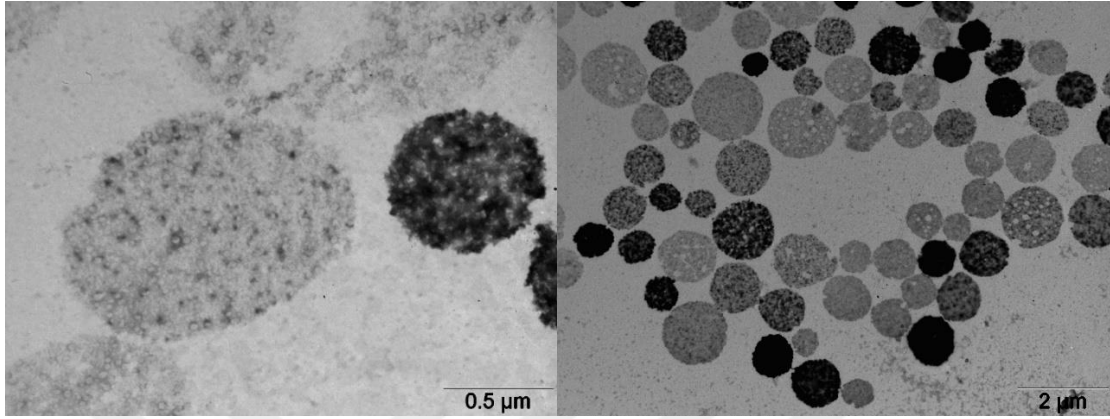
4.1.3.Yüzey Özellikleri, Morfolojileri ve Boyutları

SEM ve TEM analizleri ile sisplatin yüklü ve boş nanopartiküllerin yüzey özellikleri, morfolojileri ve boyutları belirlendi.



Şekil 17: Kazein nanopartiküllere ait SEM görüntüleri.

Şekil 17’de gösterilen SEM görüntülerinde kazein nanopartiküller kümelenmiş polimorfik yapılar olarak görülmektedir. Kümelerin boyutları 100 nm’den 1.5 μm ’ye kadar değişiklik göstermektedir. Nanopartiküllerin boyutları DLS analizi sonuçları ile örtüşmektedir.

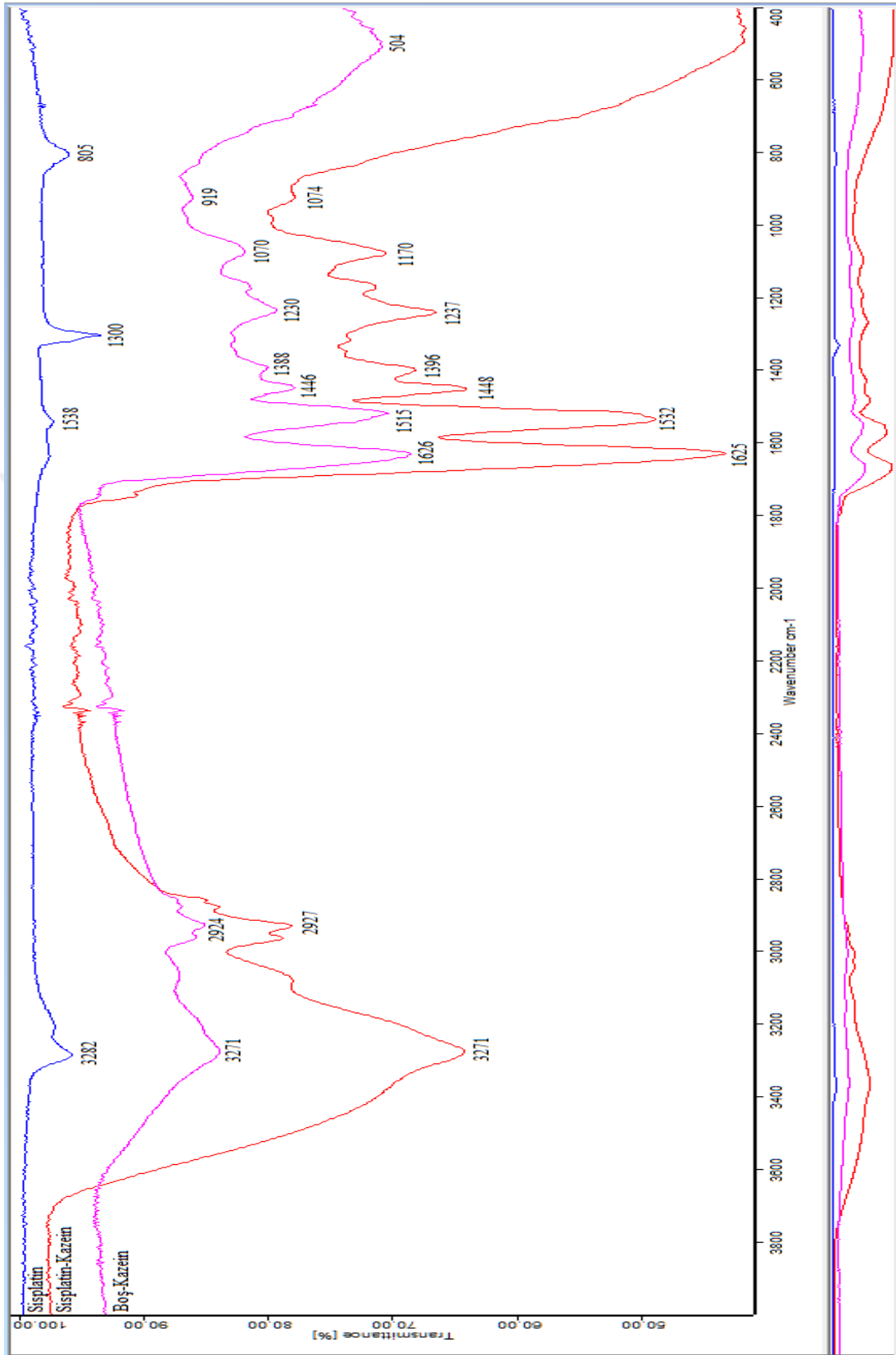


Şekil 18: Kazein nanopartiküllere ait TEM görüntüleri.

Şekil 18’de gösterilen TEM görüntülerinde kazein nanopartiküllerin misel yapıları görülmektedir. Negatif boyama ile boyanmış kazein misellerinin küresel ve bozulmamış yapıları dikkat çekmektedir. Misellerin boyutları 100 nm ile 1.5 μm arasında değişiklik göstermektedir. Misellerin boyutları DLS analizi sonuçları ile örtüşmektedir. Ek olarak Şekil 21’de kazein misellerinin karakteristiğini kıyaslamak ve farklılığı ortaya koymak için, tek başına fosfat tamponunun (PBS) TEM görüntüleri görülmektedir.

4.1.4.Sisplatin Bağlanması

ATR-FT-IR analiz sonuçları ile sisplatinin kazein nanopartiküllere bağlanması Şekil 19’da spektrumda gösterilmiştir.



Şekil 19: Sispaltin, boş kazein ve sispaltin yüklü kazein nanopartiküllere ait ATR-FT-IR spektrumu.

Kazein, $-\text{CH}_2$ (metil) gruplarının $2930\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$ aralığında dalgasayısındaki titreşim bantları, yani simetrik ve asimetrik germe bağları ile karakterizedir. Bu titreşimler, yan zincirlerde altı karbon atomu içeren lizin ve hatta üç $-\text{CH}_2$ grubu içeren arjinin gibi daha yüksek konsantrasyonda $-\text{CH}_2$ gruplarına sahip amino asitlerin varlığını gösterir. Bunun yanında $-\text{COOH}$ (karboksil) gruplarının $3280\text{-}3270\text{ cm}^{-1}$ aralığında dalgasayısındaki titreşim bantları belirgindir. Bu grupların varlığı kazeinlerin stabil yapılarını açıklayabilir. Ayrıca 1625 cm^{-1} dalgasayısındaki tepe tipik Ar-CH=CH (vinil) gruplarının varlığını göstermektedir. Bu tirozin ve fenilalanin gibi amino asitlerin varlığını gösterir. $1540\text{-}1530\text{ cm}^{-1}$ aralığında amid gerilme alanında $-\text{CONH}_2$ (amid) grupları belirgindir, bu bantların çevresindeki etkileşimler güçlü hidrojen bağlarının varlığını da göstermektedir. $1275\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ aralığı dalgasayıları P=O (fosfor amid) gruplarının ve $1260\text{-}1230\text{ cm}^{-1}$ arası dalgasayıları P=O (fosfonat) gruplarının göstergesidir. Bu da kazein ile fosfat arası köprülerin varlığını gösterir.

Spektrumda sisplatine ait bantlara bakıldığında 3282 cm^{-1} dalgasayısında karakteristik amin gerilme tepesi görülmektedir. Bunun yanında 1538 cm^{-1} dalgasayısında asimetrik amin esnemesi, 1300 cm^{-1} dalgasayısında simetrik amin esnemesi, 805 cm^{-1} dalgasayısında R-Cl gerilmesi görülmektedir.

Boş kazein ile sisplatin yüklü kazein nanopartiküllere ait FT-IR spektrumuna bakıldığında ilaç yüklü nanopartiküllere ait tepelerin yoğunluğunda azalma görülmektedir, bu sisplatinin kazeine bağlanmasının bir göstergesidir, ek olarak bantlardaki kayma farkları da sisplatin-kazein arasındaki bağlanmayı desteklemektedir.

4.1.5. Enkapsülasyon Verimliliği

Sisplatin yüklü kazein nanopartiküllerin enkapsülasyon verimliliği daha önce söz edilen formüle göre hesaplandı. Nanopartiküllerin sentezi aşamasında, sisteme eklenen başlangıçtaki sisplatin miktarı $0,5\text{ ppm}$ 'dir. Sentez sonrası ayrılan süpernatantta ICP-MS Pt analizi sonucu $0,026\text{ ppm}$ serbest platin bulundu. Bu verilere göre enkapsülasyon verimliliği $\%94,8$ bulundu.

$$\% \text{Enkapsülasyon Verimliliği} = \frac{0,5 - 0,026}{0,5} \times 100 = 94,8$$

4.2.Sentezlenen Nanopartiküllerin Hücre Canlılığına Olan Etkilerine Ait Bulgular

4.2.1.Hücrelere Ulaşmayan Sisplatine Ait ICP-MS Bulguları

Çalışma kapsamında enkapsüle edilmiş sisplatin hücrelere girip girmediğini belirlemek için, MCF-7 ve HUVEC hücre hatlarına ait 96 kuyulu plakalarda MTT testi öncesi belirli plakaların 2 farklı dozu içeren kuyularından üst sıvılar alınarak ICP-MS/Pt tayini analizi yapıldı.

Analiz sonuçlarından yola çıkarak, kuyulara verilen enkapsüle edilmiş sisplatinin hücrelere ulaşmayan miktarları tespit edildi (Tablo 6).

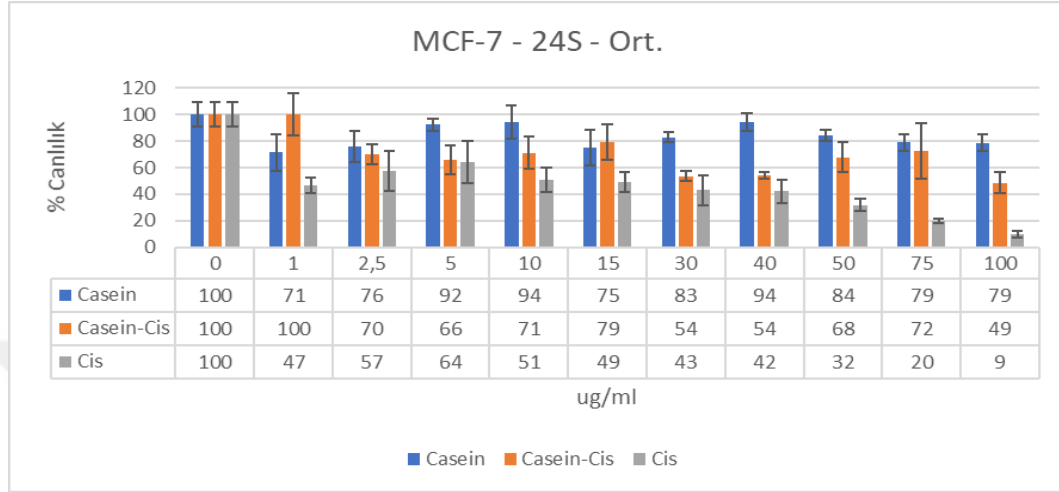
Tablo 6: Hücrelere ulaşmayan sisplatine ait ICP-MS bulguları.

Hücre Hattı	Muamele Süresi	Kuyu Hacmi	Kuyuya Eklenen Sisplatin Miktarı	Muamele Sonrası Üst Sıvıda Tespit Edilen Platin Miktarı
MCF-7	24 Saat	200 µL	1 µg/ml – 1 ppm	0,122 µg/ml – 0,122 ppm
		200 µL	100 µg/ml – 100 ppm	0,092 µg/ml – 0,092 ppm
	48 Saat	200 µL	1 µg/ml – 1 ppm	0,128 µg/ml – 0,128 ppm
		200 µL	100 µg/ml – 100 ppm	0,093 µg/ml – 0,093 ppm
HUVEC	24 Saat	200 µL	1 µg/ml – 1 ppm	0,068 µg/ml – 0,068 ppm
		200 µL	100 µg/ml – 100 ppm	0,089 µg/ml – 0,089 ppm
	48 Saat	200 µL	1 µg/ml – 1 ppm	0,072 µg/ml – 0,072 ppm
		200 µL	100 µg/ml – 100 ppm	0,064 µg/ml – 0,064 ppm

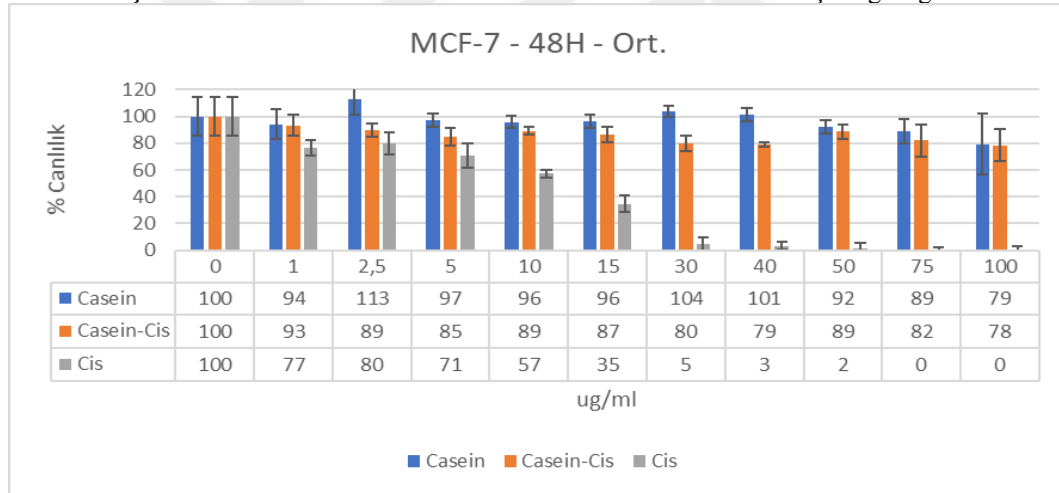
4.2.2.MTT Testlerine Ait Bulgular

4.2.2.1.MCF-7 Hücre Hattına Ait Bulgular

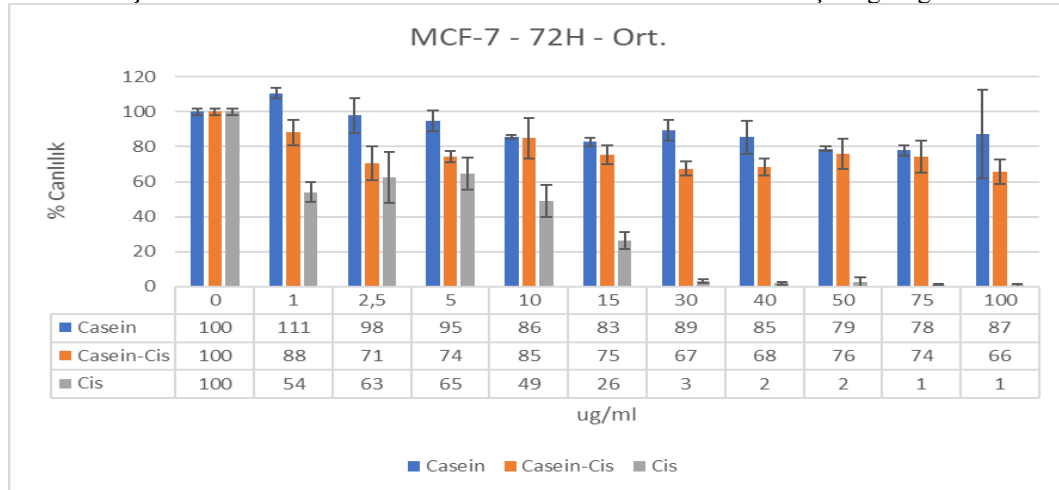
Şekil 20, 21 ve 22’de MCF-7 hücre hattının 24, 48 ve 72 saatlik ortalama MTT testi sonuçları grafikleri gösterilmiştir.



Şekil 20: MCF-7 hücre hattı 24 saatlik ortalama MTT testi sonuçları grafiği.



Şekil 21: MCF-7 hücre hattı 48 saatlik ortalama MTT testi sonuçları grafiği.

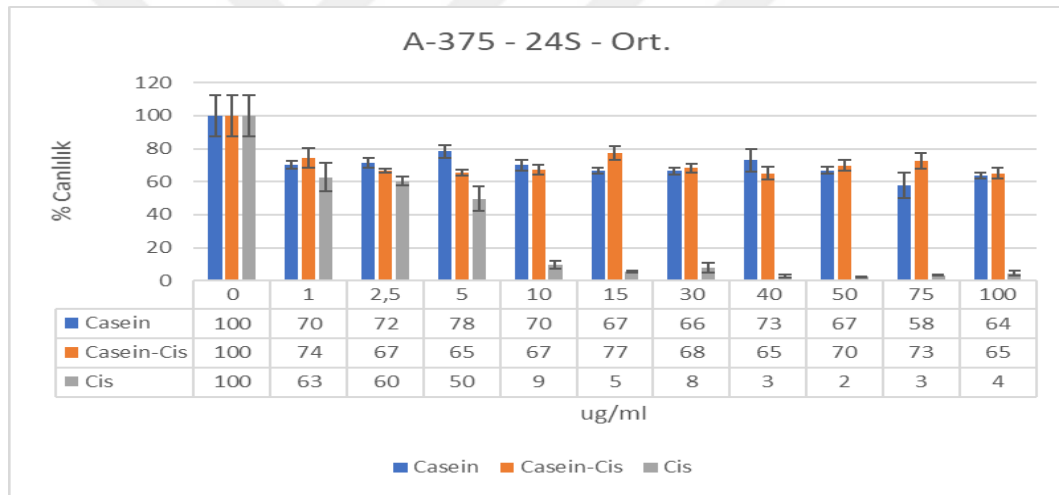


Şekil 22: MCF-7 hücre hattı 72 saatlik ortalama MTT testi sonuçları grafiği.

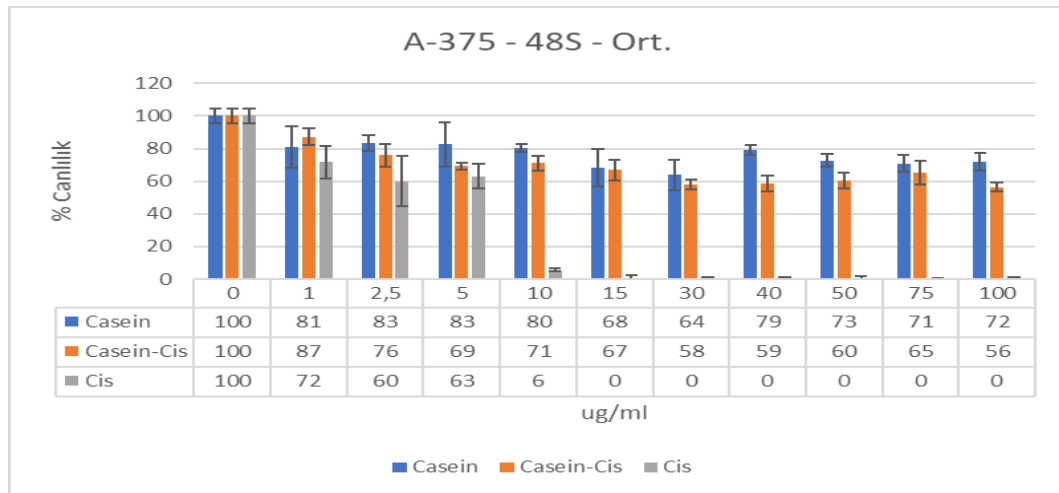
Şekil 20’de 24 saatlik muamele sonuçlarına bakıldığında boş kazein nanopartiküllerin bütün dozlarda sitotoksik etkileri oldukça düşükken, 30, 40 ve 100 $\mu\text{g/ml}$ ’lik dozlarda sisplatin yüklü kazein nanopartiküllerin sitotoksik etkileri oldukça belirgindir. Diğer dozlar ise söz konusu dozlara göre daha az sitotoksik etki göstermiştir. Serbest sisplatin ise artan dozlara bağlı olarak sitotoksik etki göstermiştir. Şekil 21 ve 22’de görüldüğü üzere 48 ve 72 saatlik muamele sonuçlarına bakıldığında serbest sisplatinin artan dozlarda sitotoksik etkileri oldukça belirgin göstermekle birlikte boş ve sisplatin yüklü nanopartiküllerde kayda değer sitotoksik etki gözlemlenmemiştir. Friedman Testine bağlı olarak sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4.2.2.2.A-375 Hücre Hattına Ait Bulgular

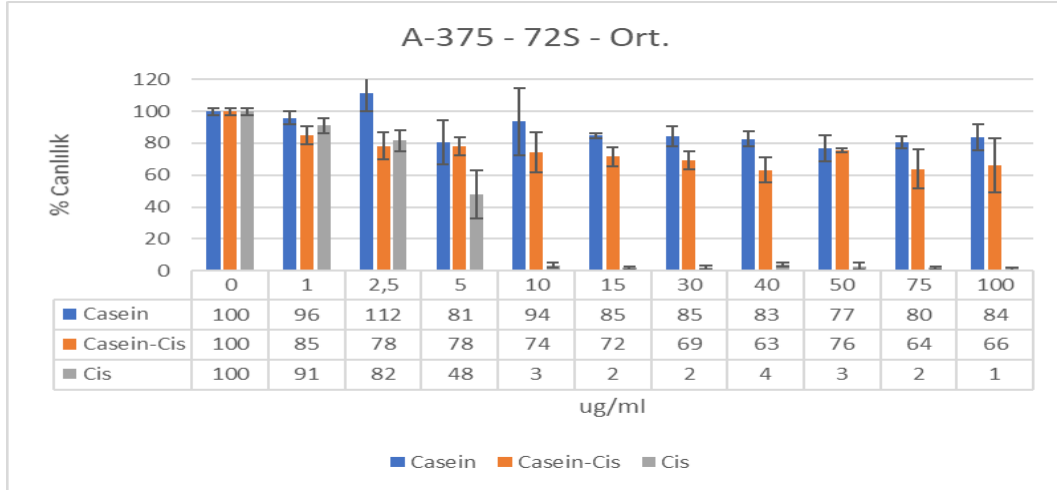
Şekil 23, 24 ve 25’de A-375 hücre hattının 24, 48 ve 72 saatlik ortalama MTT testi sonuçları grafikleri gösterilmiştir.



Şekil 23: A-375 hücre hattı 24 saatlik ortalama MTT testi sonuçları grafiği.



Şekil 24: A-375 hücre hattı 48 saatlik ortalama MTT testi sonuçları grafiği.

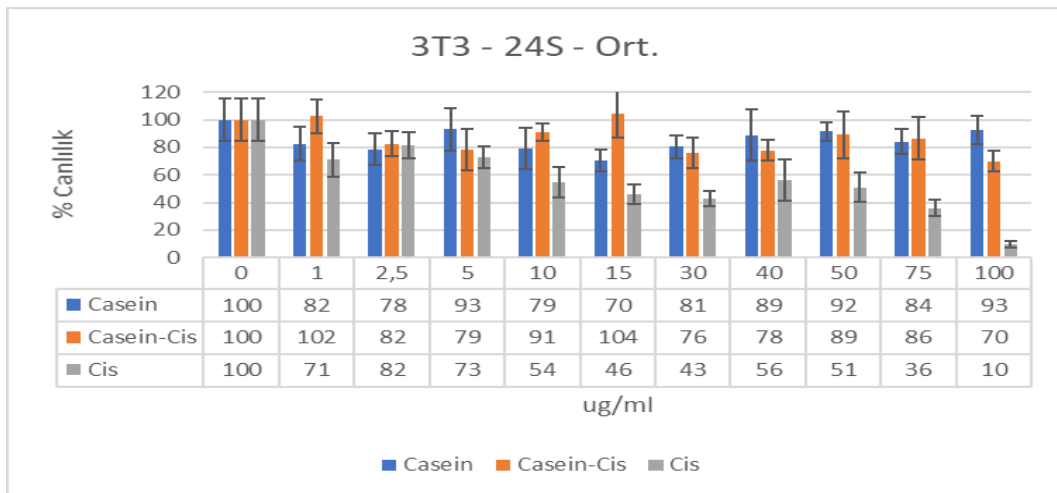


Şekil 25: A-375 hücre hattı 72 saatlik ortalama MTT testi sonuçları grafiği.

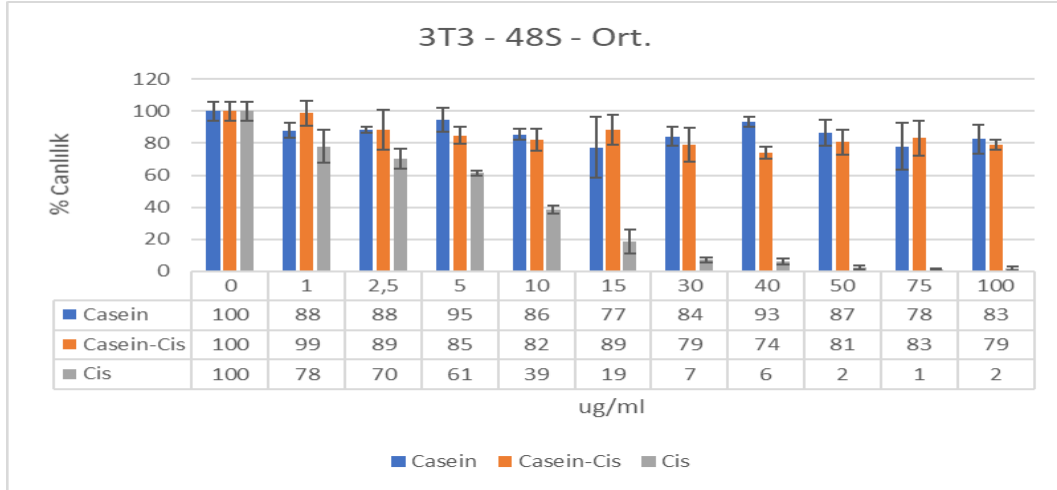
Şekil 23'e bakıldığında 24 saatlik muamele süresinde hem boş kazein nanopartiküllerin hem de sisplatin yüklü kazein nanopartiküllerin A-375 hücre hattında, her ne kadar aralarında küçük farklar bulunsun da benzer sitotoksik etki gösterdiği görülmektedir. Serbest sisplatin ise 5 µg/ml dozdan sonra A-375 hücre hattında ciddi sitotoksik etki göstermiştir. Şekil 24 ve 25'de 48 ve 72 saatlik muamele sürelerine bakıldığında ise her iki muamele süresinde de sisplatin yüklü kazein nanopartiküllerin boş kazein nanopartiküllere nazaran daha sitotoksik olduğu görülmektedir. Yine her iki muamele süresinde de sisplatin 5 µg/ml'lik dozdan sonra ciddi sitotoksik etki göstermiştir. Friedman Testine bağlı olarak sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4.2.2.3.3T3 Hücre Hattına Ait Bulgular

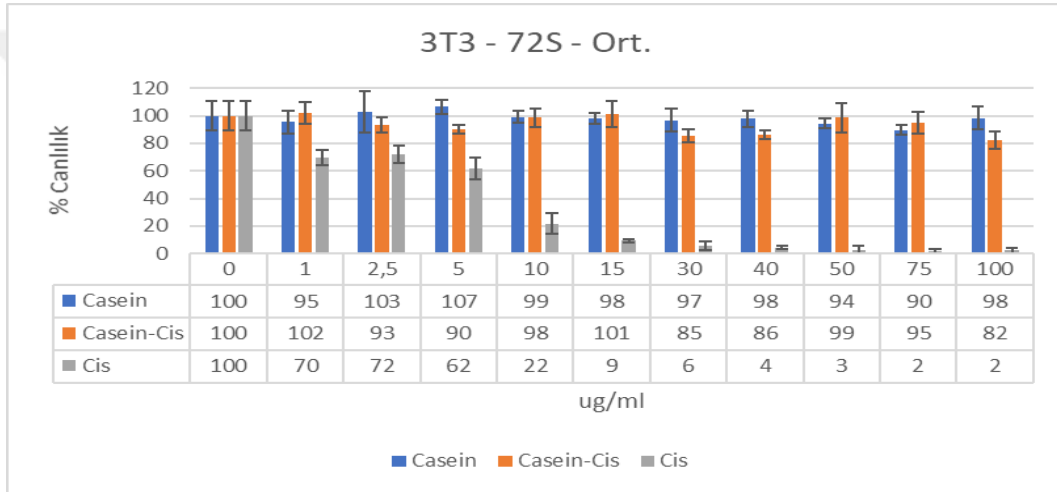
Şekil 26, 27 ve 28'de 3T3 hücre hattının 24, 48 ve 72 saatlik ortalama MTT testi sonuçları grafikleri gösterilmiştir.



Şekil 26: 3T3 hücre hattı 24 saatlik ortalama MTT testi sonuçları grafiği.



Şekil 27: 3T3 hücre hattı 48 saatlik ortalama MTT testi sonuçları grafiği.

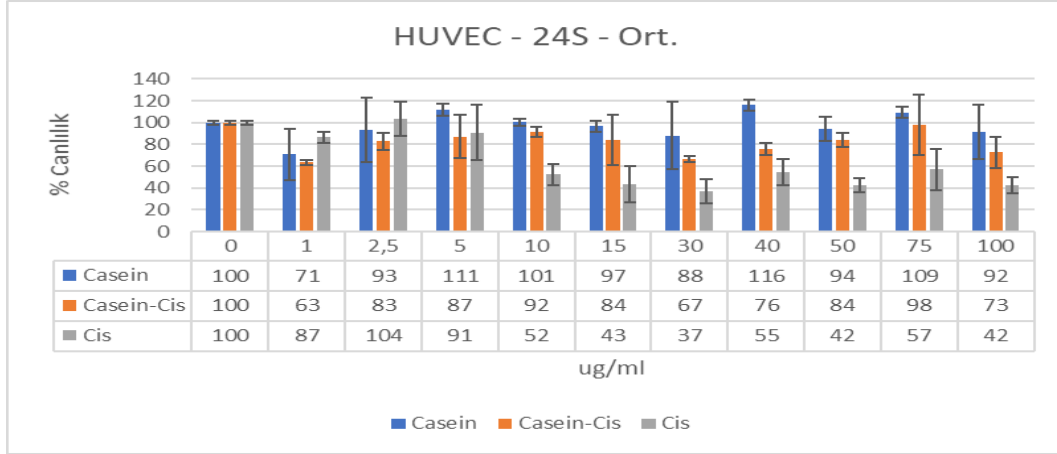


Şekil 28: 3T3 hücre hattı 72 saatlik ortalama MTT testi sonuçları grafiği.

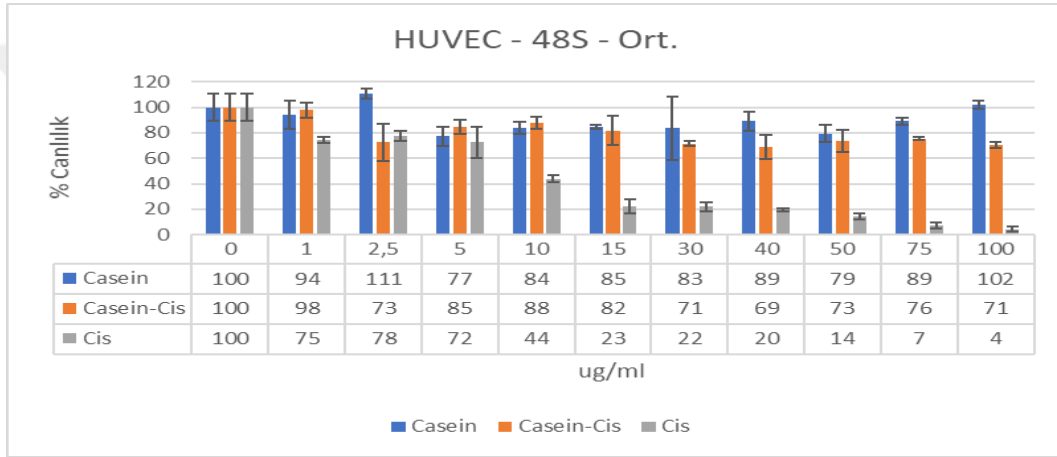
Şekil 26'ya bakıldığında 24 saatlik muamele süresinde dikkat çekici bir şekilde hem boş kazein nanopartiküllerin hem de sisplatin yüklü kazein nanopartiküllerin 3T3 hücre hattında belirgin sitotoksik etki göstermediği görülmektedir. Serbest sisplatin ise artan dozlara bağlı olarak sitotoksik etki göstermiştir. Şekil 27 ve 28'de 48 ve 72 saatlik muamele sürelerinde 24 saatlik muamele süresine benzer şekilde hiçbir dozda hem kazein nanopartiküllerin hem de sisplatin yüklü kazein nanopartiküllerin sitotoksik etkisi gözlemlenmemiştir. Serbest sisplatin ise 48 saatlik muamele süresinde 15 µg/ml, 72 saatlik muamele süresinde ise 10 µg/ml dozlarından sonra ciddi oranda sitotoksik etki göstermiştir. Friedman Testine bağlı olarak sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4.2.2.4.HUVEC Hücre Hattına Ait Bulgular

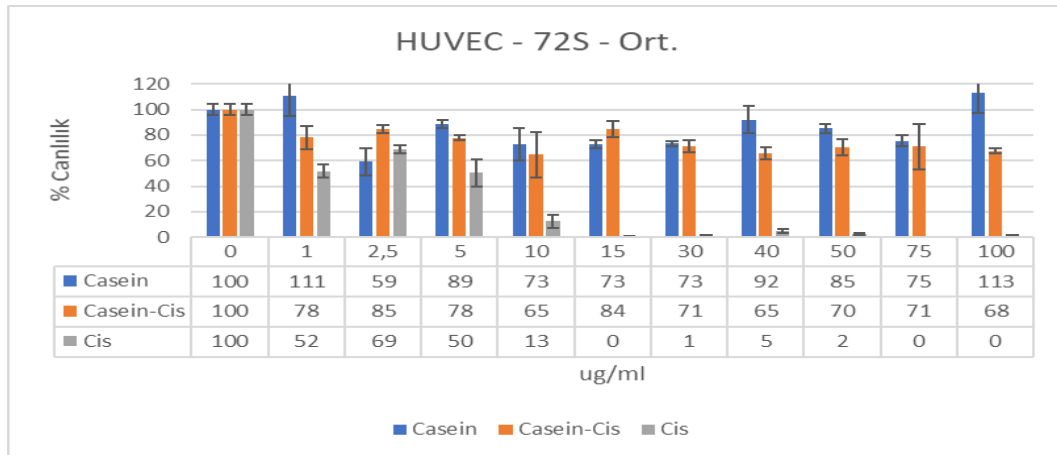
Şekil 29, 30 ve 31'de HUVEC hücre hattının 24, 48 ve 72 saatlik ortalama MTT testi sonuçları grafikleri gösterilmiştir.



Şekil 29: HUVEC hücre hattı 24 saatlik ortalama MTT testi sonuçları grafiği.



Şekil 30: HUVEC hücre hattı 48 saatlik ortalama MTT testi sonuçları grafiği.



Şekil 31: HUVEC hücre hattı 72 saatlik ortalama MTT testi sonuçları grafiği.

Şekil 29'da 24 saatlik muamele süresine bakıldığında boş kazein nanopartiküllerin sitotoksik etki göstermediği görülmektedir. Bunun yanında sisplatin yüklü kazein nanopartiküller HUVEC hücre hattında, 3T3 hücre hattına benzer şekilde daha az sitotoksik etki göstermiştir. Serbest sisplatin ise artan dozlara bağlı olarak

büyük oranda sitotoksosite göstermiştir. Şekil 30 ve 31'e bakıldığında ise 48 ve 72 saatlik muamele sürelerinde 24 saatlik muamele süresine benzer sitotoksosite görülmektedir. Bunun yanında bazı dozlarda boş kazein nanopartiküller canlılığı arttırırken serbest sisplatin 24 saatlik muamele süresine kıyasla 10 µg/ml'lik dozdan sonra ciddi oranda sitotoksosite göstermiştir. Friedman Testine bağlı olarak sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.



5. TARTIŞMA

Nanoteknolojinin tıp alanında güvenli kullanımının yaygınlaşması ile biyobozunur polimerlerin doku mühendisliği ve ilaç taşıma sistemlerinde yaygın olarak kullanılması ve ticari formlarının oluşması hızlanmıştır. Genel olarak sentetik polimerlerin daha geniş bir özellik yelpazesi sunacak şekilde uyarlanabildiklerinden doğal polimerlere nazaran daha avantajlı olarak gözükseler de toksisite ile ilişkilendirilmeleri ilaç taşıma sistemlerinde doğal polimerlerin öne çıkmasına sebep olmuşlardır.

Doğal polimerlerden özellikle gıda proteinleri hali hazırda endüstride kullanılmaları, kolay ulaşılabilirlikleri ve ucuz olmaları gibi özellikleri ile ilaç taşıyıcı sistemler için daha çok ümit vaat etmektedirler. Bunların yanında gıda proteinlerinin *in vivo* olarak sindirim enzimleri tarafından kolay hidrolizleri istenmeyen yan ürünler ve biyouyumluluk açısından büyük avantajlar sağlar. Doğal bir gıda proteini olan kazein memelilerde biyoaktif maddelerin ve iyonların doğal taşıyıcısı olarak terapötik sistemler için uygun bir adaydır. 1978 yılında FDA'dan onay almasından bu yana sisplatin geniş antitümör aktivitesi ile çok çeşitli kanser türlerinde, katı tümörlerin tedavisinde en yaygın ve etkili antikanser ajanlarından biri olmaya devam etmektedir. Sisplatinin seçici olmayan dağılımı gibi doz sınırlayıcı yan etkilerinin üstesinden gelmek için sağlıklı hücrelere zarar vermeden kanserli hücrelerdeki tercihli birikimini arttırmaya yönelik çalışmalar ön plana çıkmaktadır.

Bu çalışma kapsamında da basit koaservasyon yöntemiyle sodyum kazeinattan yola çıkılarak ve sütte bulunan doğal iyonlar aracılığı ile yeniden birleştirilmiş kazein miselleri oluşturularak sisplatin başarılı bir şekilde enkapsüle edilmiş ve miseler yapıda sisplatin yüklü kazein nanopartikülleri sentezlenmiştir.

Nanopartiküllerin sentezi için Knoop ve arkadaşlarının 1979 yılında ortaya koydukları kazein miselleri ile ilgili çalışma ve Semo ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptıkları çalışma esas alınmıştır. Knoop ve ark. süttten asit veya baz çöktürmesi yoluyla elde edilen kazein ile fosfat, sitrat ve kalsiyum iyonları varlığında sütte doğal olarak bulunan misellere çok benzer misellerin tekrardan oluşturulabileceğini göstermişlerdir. Ek olarak bu iyonların miktarlarına bağlı olarak da yeniden birleştirilen misellerin stabilitelerinin ve boyutlarının ayarlanabileceğini göstermişlerdir.

Semo ve ark. ise bu protokolü kullanarak hidrofobik ajanların kazein miselleri ile enkapsüle edilebileceğini öne sürmüşler ve D₂ vitamininin enkapsülasyonunu başarılı bir şekilde gerçekleştirmişlerdir. Bunu yaparken Knoop ve ark. protokolünde bazı değişiklikler yapmışlar ve koaservasyon yoluyla yeniden birleştirilmiş kazeinlerin oluşturulması için daha ideal bir protokol ortaya koymuşlardır. Söz konusu çalışmalardan yola çıkarak bu çalışmada sığır sütünden elde edilen sodyum kazeinat ve sütte doğal olarak bulunan iyonların yaklaşık miktarları ile kazein miselleri *in vitro* olarak oluşturulmuş ve bu şekilde sisplatin enkapsüle edilmiştir.

Bu çalışma kapsamında sisplatin enkapsüle edilmiş misel yapısında kazein nanopartiküllerin ve sisplatin enkapsüle edilmemiş misel yapısında boş kazein nanopartiküllerin safsızlık içerip içermedikleri ve kazein alt birimlerinin molekül ağırlıklarının tayini SDS-PAGE analizi ile yapılmıştır. SDS-PAGE analizi sonucu hem boş nanopartiküllerde hem de sisplatin yüklü nanopartiküllerde kazeine ait karakteristik bantlar dışında bant oluşumu gözlenmemiş ve oluşan bantlardan α -kazeinlerin 35-36 kDa civarında, β -kazeinin 29-30 kDa civarında, κ -kazeinin 27-28 kDa civarında olduğu gözlemlenmiştir. Bunların yanında β -laktoglobuline ait bant 13-14 kDa civarında ve α -laktalbumine ait bant 6-7 kDa civarında gözlemlenmiştir. Bu değerler literatürde bulunan değerlere büyük oradan benzerlik göstermektedir.

Sentezlenen boş ve sisplatin yüklü kazein nanopartiküllerin parçacık boyutu dağılımları dinamik ışık saçılımı (DLS) analizi ile belirlenmiş ve boş nanopartiküllerin ortalama çapları 198 nm, sisplatin yüklü nanopartiküllerin 196,4 nm olarak belirlenmiştir. Ayrıca boş nanopartiküllerin polidispersiteleri 0,155, sisplatin yüklü nanopartiküllerin 0,226 olarak belirlenmiştir. Genel olarak nanopartiküller için 0,2 ve altı polidispersite değerlerinde partikül çaplarının birbirine yakın olduğu yani uniform yapıda oldukları kabul edilmektedir. Bu çalışma kapsamında sentezlenen nanopartiküllerin EPR Etkisi için uygun çaplara sahip oldukları ve uygun polidispersiteye sahip oldukları söylenebilir.

Çalışma kapsamında nanopartiküllerin görüntülenmesi SEM ve TEM ile yapılmış, SEM görüntülerinde kazein nanopartikülleri polimorfik kümeler olarak gözlemlenmiştir. Söz konusu polimorfik kümelerin boyutları DLS analizi ile uyumlu olmakla birlikte aralarındaki bağların fosfat iyonlarının oluşturduğu köprülerden ileri geldiği düşünülmektedir.

TEM analizlerinde ise kazein nanopartiküllerin misel yapısı net olarak görülmekle birlikte, kazein nanopartiküllerin yüzeylerinde “tüylü” κ -kazeinler ile birlikte Holt Modeliyle uyumlu olduğu görülmektedir. Benzer şekilde TEM sonuçları da DLS analizi ile uyumludur.

Sisplatinin kazeine bağlanmasının belirlenebilmesi için boş ve sisplatin yüklü kazein nanopartiküllerin liyofilize edilmiş formları ve sisplatinin kurutulmuş formları ile ATR-FT-IR analizleri yapılmıştır. Sisplatinin analizi için çalışmada kullanılan sisplatin çözeltisi vakumlu etüvde kurutulmuştur. FT-IR spektrumundan yola çıkarak boş kazein nanopartiküllerin kazeinin karakteristik spektrumunu gösterdiği gözlemlenmiştir. Bunun yanında spektrumda Pt-Cl tepesinin kaybolmasından yola çıkarak sisplatinin sentez sırasında sulu çözeltilerindeki cis- $[Pt (H_2O)_2(NH_3)_2]^{2+}$ hidrokso kompleksini oluşturduğu ve bu reaktif formun kazeinin N-verici kısımları ile bağ oluşturduğu düşünülmektedir. Ayrıca bu bağlanmada H-bağları ve hidrofobik etkileşimlerin de rol oynadığı düşünülmektedir. Sisplatin yüklü kazein nanopartiküllerin spektrumuna bakıldığında ise kazeine ait tepelerin yoğunluğunda azalma ve kayma olduğu gözlemlenmektedir buradan yola çıkarak Sisplatinin-kazeine bağlandığı düşünülmektedir.

Ayrıca sisplatinin kazein nanopartiküllerdeki yüzde enkapsülasyon verimliliğinin hesaplanması için ICP-MS analizi ile sentez sırasında ayrılan üst sıvıdan Pt tayini yapılmış ve yüzde enkapsülasyon verimliliği %94,8 bulunmuştur.

Sentezlenen boş ve sisplatin yüklü nanopartiküllerin *in vitro* ortamda sitotoksitelerinin belirlenmesi için MCF-7 (İnsan Meme Adenokarsinoma Hücreleri), A-375 (İnsan Melonoma Hücreleri), 3T3 (Fare Embriyonik Fibroblast Hücreleri) ve HUVEC (İnsan Umbilikal Damar Endotel Hücreleri) hücre hatlarında MTT Testi uygulanmıştır. MCF-7 hücre hattının MTT testi sonuçlarına bakıldığında boş kazein nanopartiküllerin her üç muamele süresinde de canlılığı etkilemediği bazı dozlarda ise arttırdığı gözlemlenmiştir. Bunun yanında sisplatin-kazein nanopartiküllerin 24 saatlik muamele süresinde özellikle 30, 40 ve 100 $\mu g/ml$ dozlarda daha fazla sitotoksik olduğu gözlemlenmiştir. 48 ve 72 saatlik muamele sürelerinde daha az sitotoksikite görülmesinin sebebinin ilk 24 saat içerisinde kazeinin, sisplatini ortama vermesinden kaynaklı olduğu düşünülmektedir. A-375 hücre hattının 24 ve 48 saatlik muamele sürelerinde boş kazein nanopartiküllerin canlılığa etkisi daha fazla olurken 72 saatlik muamele süresinde canlılığa daha az etki ettiği gözlemlenmiştir. Sisplatin-kazein

nanopartiküller ise artan dozlarda daha sitotoksik olduğu gözlemlenmiştir. 3T3 hücre hattında ise dikkat çekici bir şekilde her üç muamele süresinde de hem boş hem de sisplatin yüklü nanopartiküllerin canlılığı büyük oranda etkilemediği ve sitotoksik olmadığı gözlemlenmiştir.

Benzer şekilde HUVEC hücre hattında da her üç muamele süresinde sitotoksikite gözlemlenmediği gibi canlılığın bazı dozlarda arttığı gözlemlenmiştir. Canlılığın bazı dozlarda artmasının kazein nanopartiküllerin hücreleri beslemesinden kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Bu gözlemlere dayanarak sisplatin yüklü kazein nanopartiküllerin *in vitro* ortamda sağlıklı hücrelere zarar vermeden kanserli hücrelerde sitotoksik olduğu sonucuna varılmıştır.

MTT testi öncesi MCF-7 ve HUVEC hücre hatlarının 1 ve 100 µg/ml dozlarının 24 ve 48 saatlik muamele sürelerinden sonra alınan hücre üst sıvılarından yapılan ICP-MS/Pt tayini ile sisplatin-yüklü kazein nanopartiküllerin çok yüksek oranda hücrelere ulaştığı da tespit edilmiştir.

Sonuç olarak bu çalışmada sisplatin kazein ile miseler yapıda nanopartiküller ile enkapsüle edilmiş ve karakterize edilerek sitotoksik etkileri dört farklı hücre hattında gözlemlenmiştir. Daha ileri çalışmalar için farklı sisplatin ve kazein konsantrasyonlarının yanı sıra *in vivo* ortama uygun modifikasyonların yapılabileceği ortaya koyulmuştur.

KAYNAKLAR

- [1] Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int. J. Cancer* 2010, 127, 2893–2917.
- [2] Watabe K, Nishi M, Miyake H, Hirata K. Lifestyle and gastric cancer: a case-control study. *Oncol. Rep.* 1998, 5, 1191–1194.
- [3] Holmes RS, Vaughan TL. Epidemiology and pathogenesis of esophageal cancer. *Semin. Radiat. Oncol.* 2007, 17, 2–9.
- [4] Barnard RJ. Prevention of cancer through lifestyle changes. *Evid. Based Complementary Altern. Med.* 2004, 1, 233–239.
- [5] Moniz M, Ling M, Hung CF, Wu TC. HPV DNA vaccines. *Front. Biosci.* 2003, 8, d55–d68.
- [6] Paavonen J, Naud P, Salmeron J, Wheeler CM, Chow SN, Apter D, Kitchener H, Castellsague X, Teixeira JC, Skinner SR, Hedrick J, Jaisamrarn U, Limson G, Garland S, Szarewski A, Romanowski B, Aoki FY, Schwarz TF, Poppe WA, Bosch FX, Jenkins D, Hardt K, Zahaf T, Descamps D, Struyf F, Lehtinen M, Dubin G. Efficacy of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by oncogenic HPV types (PATRICIA): final analysis of a double-blind, randomised study in young women. *Lancet* 2009, 374, 301–314.
- [7] Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol.* 1999, 189, 12–19.
- [8] Parkin DM, Bray F. Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. *Vaccine* 2006, 24 Suppl 3, S3/11–25.
- [9] Khurana A, Allawadhi P, Khurana I, Allwadhi S, Weiskirchen R, Banothu AK, Chhabra D, Joshi K, Bharani K. Role of nanotechnology behind the success of mRNA vaccines for COVID-19. *Nano Today*, 2021, 101142, 1748-0132.
- [10] Weiss C, Carriere M, Fusco L, Capua I, Regla-Nava JA, Pasquali M, Scott JA, Vitale F, Unal MA, Mattevi C, Bedognetti D, Merkoçi A, Tasciotti E, Yilmazer A,

Gogotsi Y, Stellacci F, & Delogu LG. Toward nanotechnology-enabled approaches against the COVID-19 pandemic. *ACS Nano*, 2020, 14(6), 6383-6406

[11] Tang Z, Zhang X, Shu Y, Guo M, Zhang H, Tao W. Insights from nanotechnology in COVID-19 treatment. *Nano Today*, 2021, 36, 101019

[12] Nystrom L, Rutqvist LE, Wall S, Lindgren A, Lindqvist M, Ryden S, Andersson I, Bjurstam N, Fagerberg G, Frisell J, Tabar L, Larsson L-G. Breast cancer screening with mammography: overview of Swedish randomised trials. *Lancet* 1993, 341, 973–978.

[13] Winawer S, Fletcher R, Rex D, Bond J, Burt R, Ferrucci J, Ganiats T, Levin T, Woolf S, Johnson D, Kirk L, Litin S, Simmang C. Colorectal cancer screening and surveillance: clinical guidelines and rationale-Update based on new evidence. *Gastroenterology* 2003, 124, 544–560.

[14] Gmeiner, W. H., Ghosh, S. Nanotechnology for cancer treatment. *Nanotechnology Reviews*, 2014, 3(2).

[15] Jurj, A., Braicu, C., Pop, L., Tomuleasa, C., Gherman, C., & Berindan-Neagoe, I., The new era of nanotechnology, an alternative to change cancer treatment. *Drug Design, Development and Therapy*, 2017,11, 2871-2890.

[16] Vlad C, Kubelac P, Vlad D, Irimie A, Achimas Cadariu P. Evaluation of clinical, morphopathological and therapeutic prognostic factors in rectal cancer. Experience of a tertiary oncology center. *J BUON*. 2015,20(1):92–99.

[17] Herbrink M, Nuijen B, Schellens JH, Beijnen JH. Variability in bioavailability of small molecular tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Treat Rev*. 2015,41(5):412–422.

[18] Banu H, Sethi DK, Edgar A, et al. Doxorubicin loaded polymeric gold nanoparticles targeted to human folate receptor upon laser photothermal therapy potentiates chemotherapy in breast cancer cell lines. *J Photochem Photobiol B*. 2015,149:116–128.

[19] Fujita Y, Kuwano K, Ochiya T. Development of small RNA delivery systems for lung cancer therapy. *Int J Mol Sci*. 2015, 16(3), 5254–5270.

[20] Lee BS, Yip AT, Thach AV, Rodriguez AR, Deming TJ, Kamei DT. The targeted delivery of doxorubicin with transferrin-conjugated block copolypeptide vesicles. *Int J Pharm*. 2015, 496(2), 903–911.

- [21] Wilczewska AZ, Niemirowicz K, Markiewicz KH, Car H. Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacol Rep*. 2012, 64(5), 1020–1037.
- [22] Kleinstreuer C, Childress E, Kennedy A. Chapter 10 – Targeted drug delivery: multifunctional nanoparticles and direct micro-drug delivery to tumors. In: Becker SM, Kuznetsov AV, editors. *Transport in Biological Media*. Boston, Elsevier, 2013, 391–416.
- [23] Jain K, Mehra NK, Jain NK. Potentials and emerging trends in nanopharmacology. *Curr Opin Pharmacol*. 2014, 15, 97–106.
- [24] Tomuleasa C, Braicu C, Irimie A, Craciun L, Berindan-Neagoe I. Nanopharmacology in translational hematology and oncology. *Int J Nanomedicine*. 2014, 9, 3465–3479.
- [25] Kim PS, Djazayeri S, Zeineldin R. Novel nanotechnology approaches to diagnosis and therapy of ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2011, 120(3), 393–403.
- [26] Ajnai G, Chiu A, Kan T, Cheng CC, Tsai TH, Chang J. Trends of gold nanoparticle-based drug delivery system in cancer therapy. *J Exp Clin Med*. 2014, 6(6), 172–178.
- [27] Gao Y, Xie J, Chen H, et al. Nanotechnology-based intelligent drug design for cancer metastasis treatment. *Biotechnol Adv*. 2014, 32(4), 761–777.
- [28] Song G, Tarrant TK, White TF, et al. Roles of chemokines CCL2 and CCL5 in the pharmacokinetics of PEGylated liposomal doxorubicin in vivo and in patients with recurrent epithelial ovarian cancer. *Nanomedicine*. 2015, 11(7), 1797–1807.
- [29] Wang Y, Chen L. Quantum dots, lighting up the research and development of nanomedicine. *Nanomedicine*. 2011, 7(4), 385–402.
- [30] Baetke SC, Lammers T, Kiessling F. Applications of nanoparticles for diagnosis and therapy of cancer. *Br J Radiol*. 2015, 88(1054), 20150207.
- [31] Irimie AI, Braicu C, Cojocneanu-Petric R, Berindan-Neagoe I, Campian RS. Novel technologies for oral squamous carcinoma biomarkers in diagnostics and prognostics. *Acta Odontol Scand*. 2015, 73(3), 161–168.
- [32] Thanh NTK, Green LAW. Functionalisation of nanoparticles for biomedical applications. *Nano Today*. 2010, 5, 213–230.

- [33] R. Langer, New methods of drug delivery, *Science*, 1990, 1527–1533.
- [34] Y. Lu, S.C. Chen, Micro and nano-fabrication of biodegradable polymers for drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56, 2004, 1621–1633.
- [35] D.H. Lewis, in: M. Chasin, R. Langer (Eds.), *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems*, Marcel Dekker, New York, 1990, pp. 1–8.
- [36] C.M. Bryant, D.J. McClement, Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat-denatured whey, *Trends Food Sci. Technol.* 9, 1998, 143–151.
- [37] A.H. Clark, Gelation of globular proteins, in: S.E. Hill, D.A. Leward, J.R. Mitchell (Eds.), *Functional Properties of Food Macromolecules*, Aspen, Gaithersburg MD, 1998, pp. 77–142.
- [38] E. Dickinson, Colloidal aggregation: mechanism and implications, in: E. Dickinson, T. van Vlie (Eds.), *Food Colloids, Biopolymers and Materials*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2003, pp. 68–83.
- [39] P. Walstra, Studying food colloids: past, present and future, in: E. Dickinson, T. van Vlie (Eds.), *Food Colloids, Biopolymers and Materials*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2003, pp. 391–400.
- [40] L. Chen, G.E. Remondetto, M. Subirade, Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems, *Trends Food Sci. Technol.* 17, 2006, 272–283.
- [41] L. Chen, M. Subirade, Food-protein-derived materials and their use as carriers and delivery systems for active food components, in: N. Garti (Ed.), *Delivery and Controlled Release of Bioactives in Foods and Nutraceuticals*, Woodhead Publishing Ltd., UK, 2008, pp. 251–278.
- [42] K.D. Panyam, Peptides from milk proteins and their properties, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 43, 2003, 607–633.
- [43] H. Korhonen, A. Pihlanto, Bioactive peptides: new challenges and opportunities for dairy industry, *Aust. J. Dairy Technol.* 58, 2003, 129–134.

- [44] M.A. Vandelli, F. Rivasi, P. Guerra, F. Forni, R. Arletti, Gelatin microspheres crosslinked with d, l-glyceraldehyde as a potential drug delivery system: preparation, characterization, in vitro and in vivo studies, *Int. J. Pharm.* 215, 2001, 175–184.
- [45] S. Sahin, H. Selek, G. Ponchel, M.T. Ercan, M.A. Sargon, A. Hincal, H.S. Kas, Preparation, characterization and in vivo distribution of terbutaline sulfate loaded albumin microspheres, *J. Control. Release* 82, 2002, 345–358.
- [46] M.S. Latha, K. Rathinam, P.V. Mohanan, A. Jayakrishnan, Bioavailability of theophylline from glutaraldehyde cross-linked casein microspheres in rabbits following oral administration, *J. Control. Release* 34, 1995, 1–7.
- [47] G.A. Digenis, B.G. Thomas, V.P. Shah, Cross-linking of gelatin capsules and its relevance to their in vitro–in vivo performance, *J. Pharm. Sci.* 83, 1994, 915–921.
- [48] A. Teglia, G. Secchi, New protein ingredients for skin detergency: native wheat protein-surfactant complexes, *Int. J. Cosm. Sci.* 16, 1994, 235–246.
- [49] L. Chen, G. Remondetto, M. Rouabhia, M. Subirade, Kinetics of the breakdown of cross-linked soy protein films for drug delivery, *Biomaterials* 29, 2008, 3750–3756.
- [50] A.J. Kuijpers, P.B. van Wachem, M.J.A. van Luyn, L.A. Brouwer, G.H.M. Engbers, J. Krijgsveld, In vitro and in vivo evaluation of gelatin chondroitin sulphate hydrogels for controlled release of antibacterial proteins, *Biomaterials* 21, 2000, 1763–1772.
- [51] R.G. Payne, M.J. Yaszemski, A.W. Yasko, A.G. Mikos, Development of an injectable, in situ crosslinkable, degradable polymeric carrier for osteogenic cell populations, Part 1, encapsulation of marrow stromal osteoblasts in surface crosslinked gelatin microparticles, *Biomaterials* 23, 2002, 4359–4371.
- [52] B. Rössler, J. Kreuter, D. Scherer, Collagen microparticles: preparation and properties, *J. Microencapsul.* 12, 1995, 49–57.
- [53] T.D. Sokoloski, G.P. Royer, Drug entrapment within native albumin beads, in: S.S. Davis, L. Illum, J.G. McVie, E. Tomlinson (Eds.), *Microspheres and Drug Therapy*, Pharmaceutical, Immunological and Medical Aspects, Elsevier, Amsterdam, 1984, pp. 295–307.

- [54] M. Rosenberg, S.L. Young, Whey proteins as microencapsulating agents. Microencapsulation of anhydrous milk fat structure evaluation, *Food Struct.* 12, 1993, 31–41.
- [55] Y.D. Livney, Milk proteins as vehicles for bioactives, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 15, 2010, 73–83.
- [56] Y. Katz, N. Rajuan, M. Goldberg, A. Cohen, E. Heyman, M. Leshno, Avoidance of early regular exposure to cow's milk protein is a major risk factor for development of IgE mediated cow's milk allergy (cma), *J. Allergy Clin. Immunol.* 123, 2009, S211.
- [57] H.E. Swaisgood, Chemistry of the caseins, in: P.F. Fox, P.L.H. McSweeney (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry. Vol. 1: Proteins Part A*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2003, pp. 139–202.
- [58] E. Semo, E. Kesselman, D. Danino, Y.D. Livney, Casein micelle as a natural nanocapsular vehicle for nutraceuticals, *Food Hydrocoll.* 21, 2007, 936–942.
- [59] Rosenberg B, Vancamp L. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature*, 1969, 222, 385–386.
- [60] Wheate NJ, Walker S, Craig GE, Oun R. The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. *Dalton Trans*, 2010, 39, 8113–8127.
- [61] Ali I, Wani WA, Saleem K, Haque A. Platinum compounds: a hope for future cancer chemotherapy. *Anticancer Agents Med Chem*, 2013, 13, 296–306.
- [62] Hartmann JT, Lipp HP. Toxicity of platinum compounds. *Expert Opin Pharmacother* 2003, 4, 889–901.
- [63] Sastry J, Kellie SJ. Severe neurotoxicity, ototoxicity and nephrotoxicity following high-dose cisplatin and amifostine. *Pediatr Hematol Oncol* 2005, 22, 441–445.
- [64] Köberle B, Tomicic MT, Usanova S, Kaina B. Cisplatin resistance: preclinical findings and clinical implications. *BBA Rev Cancer* 1806, 2010:172–182.
- [65] Marrache S, Pathak RK, Dhar S. Detouring of cisplatin to access mitochondrial genome for overcoming resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014, 111:10444–10449.
- [66] Ferrari M. Cancer nanotechnology: Opportunities and challenges. *Nat Rev Cancer* 2005, 5, 161–71.

- [67] Farokhzad OC, Langer R. Nanomedicine: Developing smarter therapeutic and diagnostic modalities. *Adv Drug Deliv Rev* 2006, 58, 1456–9.
- [68] Whitesides GM. The “right” size in nanobiotechnology. *Nat Biotechnol* 2003, 21, 1161–5.
- [69] LaVan DA, McGuire T, Langer R. Small-scale systems for in vivo drug delivery. *Nat Biotechnol* 2003, 21, 1184 –91.
- [70] Farokhzad OC, Karp JM, Langer R. Nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer targeting. *Expert Opin Drug Deliv* 2006, 3, 311–24.
- [71] Alexis F, Rhee JW, Richie JP, Radovic-Moreno AF, Langer R, Farokhzad OC. New frontiers in nanotechnology for cancer treatment. *Urol Oncol*. 2008 Jan-Feb, 26(1), 74-85.
- [72] Bae Y, Jang WD, Nishiyama N, et al. Multifunctional polymeric micelles with folate-mediated cancer cell targeting and pH-triggered drug releasing properties for active intracellular drug delivery. *Mol Biosyst* 2005, 1, 242–50.
- [73] Nasongkla N, Bey E, Ren J, et al. Multifunctional polymeric micelles as cancer-targeted, MRI-ultrasensitive drug delivery systems. *Nano Lett* 2006;6:2427–30.
- [74] Larina IV, Evers BM, Ashitkov TV, et al. Enhancement of drug delivery in tumors by using interaction of nanoparticles with ultrasound radiation. *Technol Cancer Res Treat* 2005;4:217–26.
- [75] Torchilin VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov* 2005;4:145– 60.
- [76] Bangham AD, Standish MM, Watkins JC. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol* 1965;13:238 –52.
- [77] Green MR, Manikhas GM, Orlov S, et al. Abraxane, a novel Cremophor- free, albumin-bound particle form of paclitaxel for the treatment of advanced non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2006;17:1263–8.
- [78] Ellerhorst JA, Bedikian A, Ring S, et al. Phase II trial of Doxil for patients with metastatic melanoma refractory to frontline therapy. *Oncol Rep* 1999;6:1097–9.

- [79] Fassas A, Anagnostopoulos A. The use of liposomal daunorubicin (DaunoXome) in acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 2005; 46:795– 802.
- [80] Wang YX, Hussain SM, Krestin G. Superparamagnetic iron oxide contrast agents: Physicochemical characteristics and applications in MR imaging. *Eur Radiol* 2001;11:2319 –31.
- [81] Jain RK. Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors. *Adv Drug Deliv Rev* 2001;46:149–68.
- [82] Yuan F, Dellian M, Fukumura D, et al. Vascular permeability in a human tumor xenograft: Molecular size dependence and cutoff size. *Cancer Res* 1995;55:3752– 6.
- [83] Kong G, Braun RD, Dewhirst M. Hyperthermia enables tumorspecific nanoparticle delivery: Effect of particle size. *Cancer Res* 2000;60:4440 –5.
- [84] Jain RK. Transport of molecules in the tumor interstitium: A review. *Cancer Res* 1987;47:3039 –51.
- [85] Maeda H, Wu J, Sawa T, et al. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: A review. *J Control Release* 2000;65:271– 84.
- [86] Kirpotin DB, Drummond DC, Shao Y, et al. Antibody targeting of long-circulating lipidic nanoparticles does not increase tumor localization but does increase internalization in animal models. *Cancer Res* 2006;66:6732– 40.
- [87] Farokhzad OC, Jon S, Khademhosseini A, et al. Nanoparticleaptamer bioconjugates: A new approach for targeting prostate cancer cells. *Cancer Res* 2004;64:7668 –72.
- [88] Farokhzad OC, Cheng J, Teply BA, et al. Targeted nanoparticleaptamer bioconjugates for cancer chemotherapy in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:6315–20.
- [89] Chiu SJ, Ueno NT, Lee RJ. Tumor-targeted gene delivery via anti-HER2 antibody (trastuzumab, Herceptin) conjugated poly ethylenimine. *J Control Release* 2004;97:357– 69.
- [90] Cheng J, Teply BA, Sherifi I, et al. Formulation of functionalized PLGA-PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery. *Biomaterials* 2007;28:869 –76.

- [91] Bagalkot V, Farokhzad OC, Langer R, et al. An aptamer-doxorubicin physical conjugate as a novel targeted drug-delivery platform. *Angew Chem Int Ed Engl* 2006;45:8149–52.
- [92] Arencibia JM, Schally AV, Krupa M, et al. Targeting of doxorubicin to ES-2 human ovarian cancers in nude mice by linking to an analog of luteinizing hormone-releasing hormone improves its effectiveness. *Int J Oncol* 2001;19:571–7.
- [93] Guzman LA, Labhasetwar V, Song C, et al. Local intraluminal infusion of biodegradable polymeric nanoparticles. A novel approach for prolonged drug delivery after balloon angioplasty. *Circulation* 1996;94:1441–8.
- [94] Bourlais CL, Acar L, Zia H, et al. Ophthalmic drug delivery systems—recent advances. *Prog Retin Eye Res* 1998;17:33–58.
- [95] Eerikainen H, Kauppinen EI. Preparation of polymeric nanoparticles containing corticosteroid by a novel aerosol flow reactor method. *Int J Pharmacol* 2003;263:69–83.
- [96] Holland TA, Mikos AG. Biodegradable polymeric scaffolds. Improvements in bone tissue engineering through controlled drug delivery. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2006;102:161–85.
- [97] Schroder U, Sabel BA. Nanoparticles, a drug carrier system to pass the blood-brain barrier, permit central analgesic effects of i.v. dalargin injections. *Brain Res* 1996;710:121–4.
- [98] Moghimi SM. Recent developments in polymeric nanoparticle engineering and their applications in experimental and clinical oncology. *Anticancer Agents Med Chem* 2006;6:553–61.
- [99] Kost J, Langer R. Responsive polymeric delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev* 2001;46:125–48.
- [100] Shenoy DB, Amiji MM. Poly(ethylene oxide)-modified poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles for targeted delivery of tamoxifen in breast cancer. *Int J Pharmacol* 2005;293:261–70.
- [101] Shmeeda H, Mak L, Tzemach D, et al. Intracellular uptake and intracavitary targeting of folate-conjugated liposomes in a mouse lymphoma model with up-regulated folate receptors. *Mol Cancer Ther* 2006;5:818–24.

- [102] Yin X, Hoffman AS, Stayton PS. Poly(N-isopropylacrylamide-copropylacrylic acid) copolymers that respond sharply to temperature and pH. *Biomacromolecules* 2006;7:1381–5.
- [103] Furgeson DY, Dreher MR, Chilkoti A. Structural optimization of a “smart” doxorubicin-polypeptide conjugate for thermally targeted delivery to solid tumors. *J Control Release* 2006;110:362–9.
- [104] Brown LR, Edelman ER, Fischel-Ghodsian F, et al. Characterization of glucose-mediated insulin release from implantable polymers. *J Pharmacol Sci* 1996;85:1341–5.
- [105] Gref R, Minamitake Y, Peracchia MT, et al. Biodegradable longcirculating polymeric nanospheres. *Science* 1994;263:1600–3.
- [106] Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Long-circulating and targetspecific nanoparticles: Theory to practice. *Pharmacol Rev* 2001;53: 283–318.
- [107] Gref R, Luck M, Quellec P, et al. “Stealth” corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): Influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2000;18:301–13.
- [108] Owens DE III, Peppas NA. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int J Pharmacol* 2006;307: 93–102.
- [109] Tobio M, Gref R, Sanchez A, et al. Stealth PLA-PEG nanoparticles as protein carriers for nasal administration. *Pharmacol Res* 1998;15: 270–5.
- [110] Perez C, Sanchez A, Putnam D, et al. Poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol) nanoparticles as new carriers for the delivery of plasmid DNA. *J Control Release* 2001;75:211–24.
- [111] Langer R, Tirrell DA. Designing materials for biology and medicine. *Nature* 2004;428:487–92.
- [112] Langer R, Folkman J. Polymers for the sustained release of proteins and other macromolecules. *Nature* 1976;263:797– 800.
- [113] Langer R. Drug delivery and targeting. *Nature* 1998;392:5–10.
- [114] Langer R. New methods of drug delivery. *Science* 1990;249:1527–33.

- [115] Langer R. Drug delivery. Drugs on target. Science 2001;293:58 –9.
- [116] Langer R, Peppas NA. Advances in biomaterials, drug delivery, and bionanotechnology. AICHE J 2003;49:2990 –3006.
- [117] Gottesman, M. M., Fojo, T. & Bates, S. E. Multidrug resistance in cancer: Role of ATP-dependent transporters. Nat. Rev. Cancer 2, 48–58 (2002).
- [118] Peer, D. & Margalit, R. Fluoxetine and reversal of multidrug resistance. Cancer Lett. 237, 180–187 (2006).
- [119] Danson, S. et al. Phase I dose escalation and pharmacokinetic study of pluronic polymer-bound doxorubicin (SP 1049C) in patients with advanced cancer. Brit. J. Cancer 90, 2085–2091 (2004).
- [120] Batrakova, E. V. et al. Anthracycline antibiotics non-covalently incorporated into the block copolymer micelles: In vivo evaluation of anti-cancer activity. Brit. J. Cancer 74, 1545–1552 (1996).
- [121] Goren, D. et al. Nuclear delivery of doxorubicin via folate-targeted liposomes with bypass of multidrug-resistance efflux pump. Clin. Cancer Res. 6, 1949–1957 (2000).
- [122] Matsuo, H. et al. Possibility of the reversal of multidrug resistance and the avoidance of side effects by liposomes modified with MRK-16, a monoclonal antibody to P-glycoprotein. J. Control. Release 77, 77–86 (2001).
- [123] Duncan, R., Vicent, M. J., Greco, F. & Nicholson, R. I. Polymer-drug conjugates: towards a novel approach for the treatment of endocrine-related cancer. Endocrine-Relat. Cancer 12, S189–S199 (2005).
- [124] Wong, H. L. et al. A new polymer-lipid hybrid nanoparticle system increases cytotoxicity of doxorubicin against multidrug-resistant human breast cancer cells. Pharm. Res. 23, 1574–1585 (2006).
- [125] Garcion, E. et al. A new generation of anticancer, drug-loaded, colloidal vectors reverses multidrug resistance in glioma and reduces tumor progression in rats. Mol. Cancer Ther. 5, 1710–1722 (2006).

- [126] Lee, E. S., Na, K. & Bae, Y. H. Doxorubicin loaded pH-sensitive polymeric micelles for reversal of resistant MCF-7 tumor. *J. Control. Release* 103, 405–418 (2005).
- [127] Elzoghby, A. O., Samy, W. M., & Elgindy, N. A. (2012). Protein-based nanocarriers as promising drug and gene delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 161(1), 38-49.
- [128] C.G. De Kruif, et al., Casein micelles and their internal structure, *Adv. Colloid Interface Sci.* 171 (2012) 36–52.
- [129] C. Holt, Unfolded phosphopolypeptides enable soft and hard tissues to coexist in the same organism with relative ease, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 23 (3) (2013) 420–425.
- [130] D. McMahon, B. Oommen, Casein Micelle Structure, Functions, and Interactions, in *Advanced Dairy Chemistry*, Springer, 2013, pp. 185–209.
- [131] P.F. Fox, Chapter 1 - milk: an overview A2 - Thompson, Abby, in: M. Boland, H. Singh (Eds.), *Milk Proteins*, Academic Press, San Diego, 2008, pp. 1–54.
- [132] G.M. Tavares, et al., Milk proteins as encapsulation devices and delivery vehicles: applications and trends, *Trends Food Sci. Technol.* 37 (1) (2014) 5–20.
- [133] T.M. Treweek, Alpha-casein As a Molecular Chaperone, (2012).
- [134] A.O. Elzoghby, W.S.A. El-Fotoh, N.A. Elgindy, Casein-based formulations as promising controlled release drug delivery systems, *J. Control. Release* 153 (3) (2011) 206–216.
- [135] D.G. Dalgleish, On the structural models of bovine casein micelles—review and possible improvements, *Soft Matter* 7 (6) (2011) 2265–2272.
- [136] M.G. Semenova, E. Dickinson, *Biopolymers in Food Colloids: Thermodynamics and Molecular Interactions*, CRC Press, 2010.
- [137] A. Bouchoux, et al., How to squeeze a sponge: casein micelles under osmotic stress, a SAXS study, *Biophys. J.* 99 (11) (2010) 3754–3762.
- [138] C. Holt, Casein and casein micelle structures, functions and diversity in 20 species, *Int. Dairy J.* 60 (2016) 2–13.

- [139] C. De Kruif, C. Holt, Casein micelle structure, functions and interactions, *Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins*, Springer, 2003, pp. 233–276.
- [140] D.S. Horne, Steric stabilization and casein micelle stability, *J. Colloid Interface Sci.* 111 (1) (1986) 250–260.
- [141] S. Rahimi Yazdi, *Changing the Structure of Casein Micelles to Improve the Delivery of Bioactive Compounds*, (2012).
- [142] A. Poonia, Potential of milk proteins as nanoencapsulation materials in food industry, in: S. Ranjan, N. Dasgupta, E. Lichtfouse (Eds.), *Nanoscience in Food and Agriculture 5*, Springer International Publishing, Cham, 2017, pp. 139–168.
- [143] C. Ranadheera, et al., Utilizing unique properties of caseins and the casein micelle for delivery of sensitive food ingredients and bioactives, *Trends Food Sci. Technol.* 57 (2016) 178–187.
- [144] P. Walstra, On the stability of casein micelles¹, *J. Dairy Sci.* 73 (8) (1990) 1965–1979.
- [145] H. Farrell, et al., Casein micelle structure: what can be learned from milk synthesis and structural biology? *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 11 (2) (2006) 135–147.
- [146] P. Fox, A. Brodkorb, The casein micelle: historical aspects, current concepts and significance, *Int. Dairy J.* 18 (7) (2008) 677–684.
- [147] T. Huppertz, Chemistry of the Caseins, in *Advanced Dairy Chemistry*, Springer, 2013, pp. 135–160.
- [148] P. Fox, Milk proteins: general and historical aspects, *Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins*, Springer, 2003, pp. 1–48.
- [149] W. Eigel, et al., Nomenclature of proteins of cow's milk: fifth revision¹, *J. Dairy Sci.* 67 (8) (1984) 1599–1631.
- [150] D. Dalgleish, Casein micelles as colloids: surface structures and stabilities, *J. Dairy Sci.* 81 (11) (1998) 3013–3018.
- [151] S.K. Nitta, K. Numata, Biopolymer-based nanoparticles for drug/gene delivery and tissue engineering, *Int. J. Mol. Sci.* 14 (1) (2013) 1629–1654.

- [152] J. Chia, et al., A1 beta-casein milk protein and other environmental pre-disposing factors for type 1 diabetes, *Nutr. Diabetes* 7 (5) (2017) e274.
- [153] Z. Atamer, et al., Bovine β -casein: isolation, properties and functionality. A review, *Int. Dairy J.* 66 (2017) 115–125.
- [154] C. De Kruif, E.B. Zhulina, κ -casein as a polyelectrolyte brush on the surface of casein micelles, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 117 (1) (1996) 151–159.
- [155] R.J. Hill, R.G. Wake, Amphiphile Nature of κ -Casein as the Basis for its Micelle Stabilizing Property, *Nature* 221 (1969) 635.
- [156] L.K. Creamer, et al., Micelle stability: κ -casein structure and function, *J. Dairy Sci.* 81 (11) (1998) 3004–3012.
- [157] J. Maubois, Separation, extraction and fractionation of milk protein components, *Le Lait* 64 (645-646) (1984) 485–495.
- [158] N. Raak, et al., Size separation techniques for the characterisation of cross-linked casein: a review of methods and their applications, *Separations* 5 (1) (2018) 14.
- [159] D.S. Horne, Casein micelle structure: models and muddles, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 11 (2) (2006) 148–153.
- [160] R. Trejo, Casein Micelles From Bovine Milk: Native Structure, Interactions, and Practical Applications of Their Structural Modification, (2012).
- [161] C. Holt, Structure and stability of bovine casein micelles, *Adv. Protein Chem.* 43 (1992) 63–151.
- [162] P. Walstra, Casein sub-micelles: do they exist? *Int. Dairy J.* 9 (3) (1999) 189–192.
- [163] C. Holt, Casein micelle substructure and calcium phosphate interactions studied by sephacryl column chromatography, *J. Dairy Sci.* 81 (11) (1998) 2994–3003.
- [164] C. Holt, D.S. Horne, Its implications for dairy technology, *Netherlands Milk Dairy J.* 50 (1996) p. 85-1.
- [165] C. Holt, L. Sawyer, Caseins as rheomorphic proteins: interpretation of primary and secondary structures of the α S1-, β -and κ -caseins, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 89 (15) (1993) 2683–2692.

- [166] R.W. Noble Jr., D.F. Waugh, Casein Micelles. Formation and structure. I1, J. Am. Chem. Soc. 87 (10) (1965) 2236–2245.
- [167] T. Payens, Association of caseins and their possible relation to structure of the casein Micelle1, J. Dairy Sci. 49 (11) (1966) 1317–1324.
- [168] R. Parry, R. Carroll, Location of κ -casein in milk micelles, Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Protein Struct.e 194 (1) (1969) 138–150.
- [169] P. Paquin, et al., Interfacial Properties of Milk Casein Proteins, ACS Publications, 1987.
- [170] C. Phadungath, Casein micelle structure: a concise review, Songklanakarin J. Sci. Technol. 27 (1) (2005) 201–212.
- [171] C.W. Slattery, R. Evard, A model for the formation and structure of casein micelles from subunits of variable composition, Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Protein Struct. 317 (2) (1973) 529–538.
- [172] C.W. Slattery, Model calculations of casein micelle size distributions, Biophys. Chem. 6 (1) (1976) 59–64.
- [173] D. Schmidt, Colloidal aspects of casein, Netherlands Milk and Dairy Journal 34 (1) (1980) 42–64.
- [174] D.J. McMahon, W.R. McManus, Rethinking casein micelle structure using electron microscopy1, J. Dairy Sci. 81 (11) (1998) 2985–2993.
- [175] Rehan, F., Ahemad, N., & Gupta, M. (2019). Casein nanomicelle as an emerging biomaterial—A comprehensive review. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 179, 280-292.
- [176] D.S. Horne, Casein structure, self-assembly and gelation, Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 7 (5) (2002) 456–461.
- [177] S. Haratifar, M. Corredig, Interactions between tea catechins and casein micelles and their impact on renneting functionality, Food Chem. 143 (2014) 27–32.
- [178] Z. Yuksel, E. Avci, Y.K. Erdem, Characterization of binding interactions between green tea flavanoids and milk proteins, Food Chem. 121 (2) (2010) 450–456.

- [179] A. Sahu, N. Kasoju, U. Bora, Fluorescence study of the curcumin– casein micelle complexation and its application as a drug nanocarrier to cancer cells, *Biomacromolecules* 9 (10) (2008) 2905–2912.
- [180] K. Pan, Q. Zhong, S.J. Baek, Enhanced dispersibility and bioactivity of curcumin by encapsulation in casein nanocapsules, *J. Agric. Food Chem.* 61 (25) (2013) 6036–6043.
- [181] M. Esmaili, et al., Beta casein-micelle as a nano vehicle for solubility enhancement of curcumin; food industry application, *LWT-Food Sci. Technol.* 44 (10) (2011) 2166–2172.
- [182] A.A. Moeiniafshari, A. Zarrabi, A. Bordbar, Exploring the interaction of naringenin with bovine beta-casein nanoparticles using spectroscopy, *Food Hydrocoll.* 51 (2015) 1–6.
- [183] P. Bourassa, J. Bariyanga, H.A. Tajmir-Riahi, Binding sites of resveratrol, genistein, and curcumin with milk α - and β -Caseins, *J. Phys. Chem. B* 117 (5) (2013) 1287–1295.
- [184] D.P. Acharya, L. Sanguansri, M.A. Augustin, Binding of resveratrol with sodium caseinate in aqueous solutions, *Food Chem.* 141 (2) (2013) 1050–1054.
- [185] I.J. Joye, G. Davidov-Pardo, D.J. McClements, Encapsulation of resveratrol in biopolymer particles produced using liquid antisolvent precipitation. Part 2: stability and functionality, *Food Hydrocoll.* 49 (Supplement C) (2015) 127–134.
- [186] O. Menendez-Aguirre, et al., High pressure-assisted encapsulation of vitamin D2 in reassembled casein micelles, *High Press. Res.* 31 (1) (2011) 265–274.
- [187] E. Semo, et al., Casein micelle as a natural nano-capsular vehicle for nutraceuticals, *Food Hydrocoll.* 21 (5) (2007) 936–942.
- [188] Y. Cohen, et al., The bioavailability of vitamin D 3, a model hydrophobic nutraceutical, in casein micelles, as model protein nanoparticles: human clinical trial results, *J. Funct. Foods* 30 (2017) 321–325.
- [189] S.A. Forrest, R.Y. Yada, D. Rousseau, Interactions of vitamin D3 with bovine β -lactoglobulin A and β -casein, *J. Agric. Food Chem.* 53 (20) (2005) 8003–8009.

- [190] X. Pan, P. Yao, M. Jiang, Simultaneous nanoparticle formation and encapsulation driven by hydrophobic interaction of casein-graft-dextran and β -carotene, *J. Colloid Interface Sci.* 315 (2) (2007) 456–463.
- [191] L. Cornacchia, Y.H. Roos, Stability of β -carotene in protein-stabilized oil-in-water delivery systems, *J. Agric. Food Chem.* 59 (13) (2011) 7013–7020.
- [192] M. Mohan, J. Jurat-Fuentes, F. Harte, Binding of vitamin A by casein micelles in commercial skim milk, *J. Dairy Sci.* 96 (2) (2013) 790–798.
- [193] R. Penalva, et al., Casein nanoparticles as carriers for the oral delivery of folic acid, *Food Hydrocoll.* 44 (Supplement C) (2015) 399–406.
- [194] H. Chen, Y. Zhang, Q. Zhong, Physical and antimicrobial properties of spray-dried zein–casein nanocapsules with co-encapsulated eugenol and thymol, *J. Food Eng.* 144 (Supplement C) (2015) 93–102.
- [195] E. Arranz, et al., Improved bioavailability of supercritical rosemary extract through encapsulation in different delivery systems after in vitro digestion, *Food Digest.: Res. Curr. Opin.* 6 (1-3) (2015) 30–37.
- [196] P. Zimet, D. Rosenberg, Y.D. Livney, Re-assembled casein micelles and casein nanoparticles as nano-vehicles for ω -3 polyunsaturated fatty acids, *Food Hydrocoll.* 25 (5) (2011) 1270–1276.
- [197] S. Ghasemi, S. Abbasi, Formation of natural casein micelle nanocapsule by means of pH changes and ultrasound, *Food Hydrocoll.* 42 (2014) 42–47.
- [198] S. Raouche, et al., Casein micelles as a vehicle for iron fortification of foods, *Eur. Food Res. Technol.* 229 (6) (2009) 929–935.
- [199] S.G. Anema, C.K. de Kruif, Lactoferrin binding to transglutaminase cross-linked casein micelles, *Int. Dairy J.* 26 (1) (2012) 83–87.
- [200] El-Salam M. Abd, Safinaz El-Shibiny, Formation and potential uses of milk proteins as nano delivery vehicles for nutraceuticals: a review, *Int. J. Dairy Technol.* 65 (1) (2012) 13–21.
- [201] I.J. Joye, G. Davidov-Pardo, D.J. McClements, Nanotechnology for increased micronutrient bioavailability, *Trends Food Sci. Technol.* 40 (2) (2014) 168–182.

- [202] B. Hu, Q.-r. Huang, Biopolymer based nano-delivery systems for enhancing bioavailability of nutraceuticals, *Chin. J. Polym. Sci.* 31 (9) (2013) 1190–1203.
- [203] E. Acosta, Bioavailability of nanoparticles in nutrient and nutraceutical delivery, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 14 (1) (2009) 3–15.
- [204] M. Boland, H. Singh, A. Thompson, *Milk Proteins: From Expression to Food*, Academic Press, 2014.
- [205] F. Kimpel, J.J. Schmitt, Milk proteins as nanocarrier systems for hydrophobic nutraceuticals, *J. Food Sci.* 80 (11) (2015).
- [206] M. Cheema, A.N. Hristov, F.M. Harte, The binding of orally dosed hydrophobic active pharmaceutical ingredients to casein micelles in milk.(Report)(Author abstract), *J. Dairy Sci.* 100 (11) (2017) 8670.
- [207] K. Radha, A. Thomas, C. Sathian, Application of nano technology in dairy industry: prospects and challenges—a review, *Indian J. Dairy Sci.* 67 (5) (2014).
- [208] S. Haratifar, A. Guri, 5 Nanocapsule Formation by Caseins. *Nanoencapsulation Technologies for the Food and Nutraceutical Industries*, (2017), p. 140.
- [209] Y. Cohen, et al., Re-assembled casein micelles improve in vitro bioavailability of vitamin D in a Caco-2 cell model, *Food Funct.* (2017).
- [210] T.K. Głąb, J. Boratyński, Potential of Casein as a carrier for biologically active agents, *Top. Curr. Chem.* 375 (4) (2017) 71.
- [211] B.I. Kharisov, O.V. Kharissova, U. Ortiz-Mendez, *CRC Concise Encyclopedia of Nanotechnology*, CRC Press, 2016.
- [212] S.M. Jafari, *Nanoencapsulation Technologies for the Food and Nutraceutical Industries*, Academic Press, 2017.
- [213] D.J. McClements, *Nanoparticle-and Microparticle-based Delivery Systems: Encapsulation, Protection and Release of Active Compounds*, CRC Press, 2014.
- [214] A. Loewen, B. Chan, E.C.Y. Li-Chan, Optimization of vitamins A and D3 loading in re-assembled casein micelles and effect of loading on stability of vitamin D3 during storage, *Food Chem.* 240 (Supplement C) (2018) 472–481.

- [215] A. Roach, J. Dunlap, F. Harte, Association of triclosan to casein proteins through solvent-mediated high-pressure homogenization, *J. Food Sci.* 74 (2) (2009).
- [216] P. Zimet, Y.D. Livney, Beta-lactoglobulin and its nanocomplexes with pectin as vehicles for ω -3 polyunsaturated fatty acids, *Food Hydrocoll.* 23 (4) (2009) 1120–1126.
- [217] A.O. Elzoghby, et al., Novel ionically crosslinked casein nanoparticles for flutamide delivery: formulation, characterization, and in vivo pharmacokinetics, *Int. J. Nanomed.* 8 (2013) 1721–1732.
- [218] S. Kumar, S.K. Singh, In silico-in vitro-in vivo studies of experimentally designed carvedilol loaded silk fibroin-casein nanoparticles using physiological based pharmacokinetic model, *Int. J. Biol. Macromol.* 96 (2017) 403–420.
- [219] J. Huang, et al., Layer-by-layer assembled milk protein coated magnetic nanoparticle enabled oral drug delivery with high stability in stomach and enzymeresponsive release in small intestine, *Biomaterials* 39 (2015) 105–113.
- [220] X. Zhen, et al., Cellular uptake, antitumor response and tumor penetration of cisplatin-loaded milk protein nanoparticles, *Biomaterials* 34 (4) (2013) 1372–1382.
- [221] P.G. Maher, et al., Optimization of β -Casein stabilized nanoemulsions using experimental mixture design, *J. Food Sci.* 76 (8) (2011) C1108–C1117.
- [222] D.J. McClements, Y. Li, Structured emulsion-based delivery systems: controlling the digestion and release of lipophilic food components, *Adv. Colloid Interface Sci.* 159 (2) (2010) 213–228.
- [223] F. Song, et al., Novel casein hydrogels: formation, structure and controlled drug release, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 79 (1) (2010) 142–148.
- [224] F. Song, et al., Genipin-crosslinked casein hydrogels for controlled drug delivery, *Int. J. Pharm.* 373 (1) (2009) 41–47
- [225] Patton S., *Milk: Its Remarkable Contribution to Human Health and Well-Being*, Transaction Publishers, New Brunswick, NJ, 2004.
- [226] Farrell H.M., Jr., Physical equilibria: Proteins, in: Wong N.B. (Ed.), *Fundamentals of Dairy Chemistry*, 3rd edn., Van Nostrand, Reinhold, NY, 1988, pp. 461–510.

- [227] Bingham E.W., Farrell H.M., Jr., Casein kinase from the Golgi apparatus of lactating mammary gland, *J. Biol. Chem.* 249 (1974) 3647–3651.
- [228] Bingham E.W., McGranaghan M.B., Wickham E.D., Leung C.T., Farrell H.M., Jr., Properties of $[Ca^{2+} + Mg^{2+}]$ -adenosine triphosphatases in the Golgi apparatus and microsomes of the lactating mammary glands of cows, *J. Dairy Sci.* 76 (1993) 393–400.
- [229] Farrell H.M., Jr., Malin E.L., Brown E.M., Qi P.X., Casein micelle structure: What can be learned from milk synthesis and structural biology? *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 11 (2006) 135–147.
- [230] Meusser B., Hirsch C., Jarosch E., Sommer T., ERAD: the long road to destruction, *Nat. Cell Biol.* 7 (2005) 766–772.
- [231] Anfinsen C.B., Principles that govern the folding of protein chains, *Science* 181 (1973) 223–230.
- [232] Farrell H.M., Jr., Qi P.X., Brown E.M., Cooke P.H., Tunick M.H., Wickham E.D., Unruh J.J., Molten globule structures in milk proteins: Implications for potential new structure-function relationships, *J. Dairy Sci.* 85 (2002) 459–471.
- [233] Farrell H.M., Jr., Brown E.M., Hoagland P.D., Malin E.L., Higher order structures of the caseins: A paradox?, in: Fox P.F., McSweeney P.L.H. (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry - 1: Proteins*, 3rd edn., Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, NY, 2003, Part A, pp. 203–231.
- [234] Berners-Price, S. J., & Appleton, T. G. (n.d.). The chemistry of cisplatin in aqueous solution. *Platinum-Based Drugs in Cancer Therapy*, 3-35.
- [235] Bancroft, D. P., Lepre, C. A., and Lippard, S. J. (1990) ^{195}Pt NMR kinetic and mechanistic studies of cis- and trans-diamminedichloroplatinum(II) binding to DNA. *J. Am. Chem. Soc.* 112, 6860–6871.
- [236] Miller, S. E. and House, D. A. (1991) The hydrolysis products of cis-diammine dichloroplatinum(II). 5. The anation kinetics of $\text{cis-Pt(X)(NH}_3)_2(\text{OH})_2^+$ ($X = \text{Cl, OH}$) with glycine, monohydrogen malonate and chloride. *Inorg. Chim. Acta* 187, 125–132.
- [237] Cleare, M. J. and Hoeschele, J. D. (1973) Studies on the antitumor activity of group VIII transition metal complexes. Part I. Platinum (II) complexes. *Bioinorg Chem.* 2, 187–210.

- [238] Miller, S. E. and House, D. A. (1991) The hydrolysis products of cis-diammine dichloroplatinum(II). 5. The anation kinetics of cis-Pt(X)(NH₃)₂(OH₂)⁺ (X = Cl, OH) with glycine, monohydrogen malonate and chloride. *Inorg. Chim. Acta* 187, 125–132.
- [239] Frey, U., Ranford, J. D., and Sadler, P. J. (1993) Ring-opening reactions of the anticancer drug carboplatin: NMR characterisation of cis-[Pt(NH₃)₂(CBDCA-O)(5'-GMP-N7)] in solution. *Inorg. Chem.* 32, 1333–1340.
- [240] Barnham, K. J., Djuran, M. I., Murdoch, P. del S., Ranford, J. D., and Sadler, P. J. (1996) Ring-opened adducts of the anticancer drug carboplatin with sulfur amino acids. *Inorg. Chem.* 35, 1065–1072.
- [241] Lempers, E. L. M. and Reedijk, J. (1991) Interactions of platinum ammine compounds with sulfur-containing biomolecules and DNA fragments. *Adv. Inorg. Chem.* 37, 175–217.
- [242] Barnham, K. J., Djuran, M. I., Murdoch, P. del S., Ranford, J. D., and Sadler, P. J. (1995) L-Methionine increases the reaction of 5'-guanosine monophosphate with the anticancer drug cisplatin: mixed-ligand adducts and reversible methionine binding. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 3721–3726.
- [243] Heudi, O., Cailleux, A., and Allain, P. (1998) Kinetic studies of the reactivity between cisplatin and its monoaquo species with L-methionine. *J. Inorg. Biochem.* 71, 61–69.
- [244] van Boom, S. S. G. E. and Reedijk, J. (1993) Unprecedented migration of [Pt(dien)]²⁺ (dien=1,5,-diamino-3-azapentane) from sulfur to guanosine-N7 in S-guanosyl-L-methionine. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1397–1398.
- [245] Dhar S, Gu FX, Langer R, Farokhzad OC, Lippard SJ. Targeted delivery of cisplatin to prostate cancer cells by aptamer functionalized Pt(IV) prodrug-PLGA-PEG nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008, 105:17356–17361.
- [246] Dhar S, Kolishetti N, Lippard SJ, Farokhzad OC. Targeted delivery of a cisplatin prodrug for safer and more effective prostate cancer therapy in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011, 108:1850–1855.

- [247] Nishiyama N, Okazaki S, Cabral H, Miyamoto M, Kato Y, Sugiyama Y, Nishio K, Matsumura Y, Kataoka K. Novel cisplatin-incorporated polymeric micelles can eradicate solid tumors in mice. *Cancer Res* 2003, 63:8977–8983.
- [248] Uchino H, Matsumura Y, Negishi T, Koizumi F, Hayashi T, Honda T, Nishiyama N, Kataoka K, Naito S, Kakizoe T. Cisplatin-incorporating polymeric micelles (NC-6004) can reduce nephrotoxicity and neurotoxicity of cisplatin in rats. *Br J Cancer* 2005, 93:678–687.
- [249] Lin X, Zhang Q, Rice J, Stewart D, Nowotnik D, Howell S. Improved targeting of platinum chemotherapeutics: the antitumour activity of the HPMA copolymer platinum agent AP5280 in murine tumour models. *Eur J Cancer* 2004, 40:291–297.
- [250] Xiong Y, Jiang W, Shen Y, Li H, Sun C, Ouahab A, Tu J. A poly(γ , l-glutamic acid)-citric acid based nanoconjugate for cisplatin delivery. *Biomaterials* 2012, 33:7182–7193.
- [251] Pisani MJ, Wheate NJ, Keene FR, Aldrich-Wright JR, Collins JG. Anionic PAMAM dendrimers as drug delivery vehicles for transition metal-based anticancer drugs. *J Inorg Biochem* 2009, 103:373–380.
- [252] Krieger ML, Eckstein N, Schneider V, Koch M, Royer H-D, Jaehde U, Bendas G. Overcoming cisplatin resistance of ovarian cancer cells by targeted liposomes in vitro. *Int J Pharm* 2010, 389:10–17.
- [253] Iinuma H, Maruyama K, Okinaga K, Sasaki K, Sekine T, Ishida O, Ogiwara N, Johkura K, Yonemura Y. Intracellular targeting therapy of cisplatin-encapsulated transferrin-polyethylene glycol liposome on peritoneal dissemination of gastric cancer. *Int J Cancer* 2002, 99:130–137.
- [254] Lee SM, O'Halloran TV, Nguyen ST. Polymer-caged nanobins for synergistic cisplatin-doxorubicin combination chemotherapy. *J Am Chem Soc* 2010, 132:17130–17138.
- [255] Guo S, Miao L, Wang Y, Huang L. Unmodified drug used as a material to construct nanoparticles: delivery of cisplatin for enhanced anti-cancer therapy. *J Control Release* 2014, 174:137–142.

- [256] Guo S, Wang Y, Miao L, Xu Z, Lin CM, Zhang Y, Huang L. Lipid-coated cisplatin nanoparticles induce neighboring effect and exhibit enhanced anticancer efficacy. *ACS Nano* 2013, 7:9896–9904.
- [257] Thierry B, Al-Ejeh F, Khatri A, Yuan Z, Russell PJ, Ping S, Brown MP, Majewski P. Multifunctional core–shell magnetic cisplatin nanocarriers. *Chem Commun* 2009:7348–7350.
- [258] Dhar S, Daniel WL, Giljohann DA, Mirkin CA, Lippard SJ. Polyvalent oligonucleotide gold nanoparticle conjugates as delivery vehicles for platinum(IV) warheads. *J Am Chem Soc* 2009, 131:14652–14653.
- [259] Tao Z, Toms B, Goodisman J, Asefa T. Mesoporous silica microparticles enhance the cytotoxicity of anticancer platinum drugs. *ACS Nano* 2010, 4:789–794.
- [260] Dhar S, Liu Z, Thomale J, Dai H, Lippard SJ. Targeted single-wall carbon nanotube-mediated Pt (IV) prodrug delivery using folate as a homing device. *J Am Chem Soc* 2008, 130:11467–11476.
- [261] Rieter WJ, Pott KM, Taylor KML, Lin W. Nanoscale coordination polymers for platinum-based anticancer drug delivery. *J Am Chem Soc* 2008, 130:11584–11585.
- [262] Della Rocca J, Huxford RC, Comstock-Duggan E, Lin W. Polysilsesquioxane nanoparticles for targeted platin-based cancer chemotherapy by triggered release. *Angew Chem Int Ed* 2011, 123:10514–10518.
- [263] Duan, X., He, C., Kron, S. J., & Lin, W. (2016). Nanoparticle formulations of cisplatin for cancer therapy. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 8(5), 776-791.
- [264] P.B. Malafaya, G.A. Silva, R.L. Reis, Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59 (2007) 207–233

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

SİSPLATİN YÜKLÜ, MİSELER YAPIDA KAZEİN
NANOPARTİKÜLLERİN SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE İN
VİTRO UYGULAMALARI

ORJİNALLIK RAPORU

% 6	% 4	% 1	% 3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	% 2
2	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	% 1
3	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
4	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	<% 1
5	www.azhaberler.com İnternet Kaynağı	<% 1
6	avesis.istanbulc.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
7	Submitted to Karadeniz Teknik University Öğrenci Ödevi	<% 1
8	pubs.rsc.org İnternet Kaynağı	<% 1