

**ALBÜMİN TABANLI NANO TAŞIYICILAR
GELİŞTİRİLMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Nursenem KARACA

Eskişehir 2018

ALBÜMİN TABANLI NANO TAŞIYICILAR GELİŞTİRİLMESİ

Nursenem KARACA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Özlem ÜNLÜER

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Haziran 2018

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Nursenem KARACA'nın "ALBÜMİN TABANLI NANO TAŞIYICILAR GELİŞTİRİLMESİ" başlıklı tezi 20/06/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Kimya Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

<u>Jüri Üyeleri</u>	<u>Unvanı Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Dr. Öğr. Üyesi Özlem ÜNLÜER
Üye	: Prof. Dr. Arzu ERSÖZ
Üye	: Doç. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ

Prof.Dr. Ersin YÜCEL
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

ALBÜMİN TABANLI NANO TAŞIYICILAR GELİŞTİRİLMESİ

Nursenem KARACA

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Bilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Haziran 2018

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Özlem ÜNLÜER

Bu çalışmada; ANADOLUCA (AmiNoAcid Decorated and Light Underpinning Conjugation Approach) yöntemi kullanılarak hiyaluronik asit (HA) modifiye albümin nanopartikülleri elde edilmiştir. Bu amaçla, çalışmanın ilk aşamasında, sığır serum albümini (BSA) katyonik hale getirilerek HA modifikasyonu için hazırlanmıştır. Ardından, elde edilen katyonik BSA ile HA etkileştirildikten sonra mikroemülsiyon polimerizasyon tekniğiyle gün ışığında, azot atmosferinde ve oda sıcaklığında nano formatta sentezlenmiştir. Elde edilen nano BSA-HA partiküllerinin dağılımı ve boyut analizi zetametre ile, morfolojik analizi taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile, floresans özelliklerindeki değişim floresans spektroskopisi ve yapı analizleri de fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi (FTIR), termal gravimetrik analiz (TGA) ve dairesel dikroizm (CD) spektroskopisi ile karakterize edilmiştir. Her bir karakterizasyon işlemi nano BSA partikülleri ile karşılaştırmalı olarak yapılmıştır.

Çalışmanın ikinci aşamasında, sentezlenen BSA-HA nanopartiküllerinin pankreas kanseri hücrelerinde *in vitro* sitotoksikite testleri ve görüntüleme çalışmaları yapılmıştır. Bunun için; PANC-1 ATCC® CRL146 standart hücre hattı kullanılmıştır. Nanopartiküllerin *in vitro* sitotoksik etkileri 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid (MTT) testi kullanılarak belirlenmiştir. Nanopartiküller toksik olmayan derişimlerde hücre ile etkileştirilerek sentezlenen BSA-HA nanopartiküllerinin floresan özellikleriyle görüntüleme çalışmaları yapılmıştır. Elde edilen verilere göre, BSA-HA nanopartiküllerinin hücre içine girerek, hücrelerin sitoplazmalarında ve membranlarında buldukları belirlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: ANADOLUCA, BSA-HA nanopartiküller, pankreas kanseri hücresi görüntüleme.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF ALBUMIN BASED NANO CARRIERS

Nursenem KARACA

Department of Chemistry

Anadolu University, Graduate School of Sciences, June 2018

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Özlem ÜNLÜER

In this study, hyaluronic acid (HA) modified albumin nanoparticles have obtained using the ANADOLUCA (Amino Acid Decorated and Light Underpinning Conjugation Approach) method. For this purpose, bovine serum albumin (BSA) has been made cationic and ready for HA modification during the first phase of the study. Subsequently, nano BSA has been synthesized by the interaction of cationic BSA and HA using microemulsion polymerization technique in daylight, under nitrogen atmosphere and at room temperature with the polymerization technique. The distribution and size distribution, morphological analysis, fluorescence properties and structure analysis for the obtained nano BSA-HA particles have been realized by zetameter, scanning electron microscopy (SEM), fluorescence spectroscopy, Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Thermal Gravimetric Analysis (TGA), Circular Dichroism (CD) spectroscopy, respectively. Each characterization process has been compared with nano BSA particles.

In the second phase of the study, *in vitro* cytotoxicity assays and imaging studies of synthesized BSA-HA nanoparticles have performed in pancreatic cancer cells. For this purpose, the PANC-1 ATCC® CRL 146 standard cell line has been used. *In vitro* cytotoxic effects of nanoparticles have determined using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) test. Nanoparticles have visualized by fluorescence characterization of BSA-HA nanoparticles synthesized by cell-mediated non-toxic concentrations. According to the obtained data, it has been determined that BSA-HA nanoparticles enter the cell and are present in the cytoplasm and membranes of the cells.

Keywords: ANADOLUCA, BSA-HA nanoparticles, pancreatic cancer cell imaging.

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmam boyunca öncelikle bilgi ve tecrübesi ile beni yönlendiren ve laboratuvar çalışmalarında destek veren sevgili tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Özlem Ünlüer'e, Biyokimya Bilim Dalı başkanı Prof. Dr. Arzu Ersöz'e ve hiçbir konuda desteklerini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Rıdvan Say'a teşekkürü bir borç bilirim.

Hücre kültürü çalışmalarındaki desteklerinden dolayı Doç. Dr. Gülşen Akalın Çiftçi'ye, çalışmam boyunca laboratuvar, madde ve malzemelerden yararlanmamı sağlayan Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi/Kimya Bölümü ve Eczacılık Fakültesi/Biyokimya Anabilim Dalı'na,

Her türlü manevi desteği sağlayan ailem ve sevgili eşim Ecz. Erkan Karaca'ya teşekkürlerimi sunarım.

Nursenem Karaca

Haziran 2018

20/06/2018

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Nursenem Karaca

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Nanoteknoloji.....	1
1.2. Nano Partikül Temelli İlaç Taşıma Sistemleri ve Özellikleri.....	3
1.2.1. Partikül boyutu.....	4
1.2.2. Yüzey yükü.....	5
1.3. Polimerik Nanopartiküller.....	6
1.3.1. Protein nanopartiküller.....	7
1.3.1.1. <i>Albümin nanopartiküller</i>	9
1.4. Protein Nanopartiküllerinin Hazırlama Teknikleri.....	11
1.4.1. Desolvasyon (koaservasyon).....	11
1.4.2. Emülsifikasyon.....	12
1.4.3. Albümin tabanlı nanopartikül teknolojisi.....	13
1.4.4. ANADOLUCA yöntemi.....	13
1.5. Hücre Kültürü Çalışmaları.....	15
1.6. Pankreas Kanseri	16
1.6.1. Hiyaluronik asit (HA) reseptörü.....	16
2. YÖNTEM.....	19
2.1. Kullanılan Kimyasallar.....	19
2.2. Kullanılan Cihazlar.....	19
2.3. ANADOLUCA Yöntemi ile Nanopartiküllerin Eldesi.....	20
2.3.1. Katyonik BSA eldesi.....	20

2.3.2. N-metakriloil amino-(L)-tirozin (MATyr) sentezi.....	20
2.3.3. bis(2-2'-bipiridil) (MATyr) ₂ Rutenyum (II) sentezi.....	21
2.3.4. BSA-HA nanopartiküllerinin eldesi.....	21
2.3.5. Nano BSA sentezi.....	22
2.4. Albümin Tabanlı Nanopartiküllerin Karakterizasyonu.....	22
2.4.1. SDS-PAGE (Sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforezi).....	23
2.4.2. Nanopartiküllerin boyut analizi.....	25
2.4.3. Nanopartiküllerin floresans spektroskopisi analizi.....	25
2.4.4. Nanopartiküllerin FTIR spektroskopisi analizi.....	26
2.4.5. Nanopartiküllerin TGA analizi.....	26
2.4.6. Nanopartiküllerin CD analizleri.....	27
2.5. Hücre Kültürü Çalışmaları.....	27
2.5.1. Hücrelerin çoğaltılması.....	28
2.5.2. <i>In vitro</i> sitotoksik etkinin belirlenmesi.....	29
2.5.3. Hücrelerin görüntülenmesi.....	29
3. BULGULAR VE YORUM.....	31
3.1. BSA-HA Nanopartiküllerinin Eldesi.....	31
3.2. Albümin Tabanlı Nanopartiküllerin Karakterizasyonu.....	31
3.2.1. SDS-PAGE (Sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforezi) analizi.....	31
3.2.2. Nanopartiküllerin boyut analizi.....	32
3.2.3. Nanopartiküllerin floresans spektroskopisi analizi.....	33
3.2.4. Nanopartiküllerin FTIR spektroskopisi analizi.....	33
3.2.5. Nanopartiküllerin TGA analizi.....	34
3.2.6. Nanopartiküllerin CD analizleri.....	35
3.3. Hücre Kültürü Çalışmaları.....	36
4. SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER.....	40
KAYNAKÇA.....	42
ÖZGEÇMİŞ	

TABLULAR DİZİNİ

		<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1.	Modifiye edilmiş Laemmli Yöntemi'ne göre SDS jel elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının hazırlanması.....	24
Tablo 3.1.	Hücrelerin MTT testi ile belirlenen % canlılık sonuçları.....	37

ŞEKİLLER DİZİNİ

		<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1	Fotosensitif rutenyum tabanlı aminoasit monomer oluşumunun şematik gösterimi (Say ve ark., 2012).....	14
Şekil 1.2	MTT'nin formazona indirgenmesi.....	16
Şekil 1.3	Hyaluronik asitin kimyasal yapısı.....	17
Şekil 1.4	CD44 reseptörü ve hyaluronik asitin hücre üzerindeki gösterimi.....	18
Şekil 2.1	N-metakriloil amino-(L)- tirozin sentezi.....	20
Şekil 2.2	bis(2-2'-bipiridil)(MATyr)2-Rutenyum (II) molekül yapısı.....	21
Şekil 2.3	Hyaluronik asitin kimyasal yapısı ve kimyasal modifikasyon için hedef bölgeler (Schanté ve ark., 2011).....	21
Şekil 2.4	İnverted mikroskopta Thoma lamı ile hücre sayımı.....	29
Şekil 2.5	Hücrelerin görüntülenmesi.....	30
Şekil 3.1	Katyonik BSA oluşumu.....	31
Şekil 3.2	SDS page jel görüntüsü; 1. BSA, 2. BSA nanopartikülü, 3. BSA-HA nanopartikülü.....	31
Şekil 3.3	A. BSA nanopartiküllerinin zeta boyut analizi B. BSA-HA nanopartiküllerinin zeta boyut analizi.....	32
Şekil 3.4	A. BSA nanopartiküllerinin SEM görüntüsü B. BSA-HA nanopartiküllerinin SEM görüntüsü.....	32
Şekil 3.5.	A. BSA nanopartiküllerinin floresans spektrumu B. BSA-HA nanopartiküllerinin floresans spektrumu.....	33
Şekil 3.6	A. BSA nanopartiküllerinin B. BSA-HA nanopartiküllerinin FTIR spektrumları.....	34
Şekil 3.7	A. BSA nanopartiküllerinin B. BSA-HA nanopartiküllerinin TGA analizi.....	34
Şekil 3.8	A. BSA nanopartikülleri B. BSA-HA nanopartikülleri için CD spektrumu.....	35
Şekil 3.9	PANC-1 hücrelerinin mikroskop görüntüsü.....	36
Şekil 3.10	BSA nanopartiküllerinin PANC-1 hücrelerindeki mikroskop görüntüleri; A)10x, B)20x.....	37
Şekil 3.11	HA-BSA nanopartiküllerinin PANC-1 hücrelerindeki mikroskop görüntüleri; A)20x, B)40x, C)40x.....	38

Şekil 3.12	Mikroskop görüntüsünde nanopartikülün ve hücre kısımlarının gösterilmesi.....	39
-------------------	---	----

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

α	Alfa
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
a/h	Ağırlık/hacim
ANADOLUCA	AmiNoAcid Decorated and Light Underpinning Conjugation Approach
APS	Amonyum persülfat
β	Beta
BSA	Sığır serum albümini (Bovine Serum Albumin)
CD	Dairesel dikroizm (Circular dichroism)
CD44	Clusters of differentiation 44
CO ₂	Karbondioksit
Da	Dalton
dk	Dakika
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDAC	1-etil-3-dimetil-aminopropil-karbodiimid-hidroklorid
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FBS	Fetal sığır serumu
FDA	Amerikan gıda ve ilaç dairesi (Food and drug administration)
FTIR	Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi
HA	Hiyaluronik asit
HAS	HA sentezleyiciler
HCl	Hidroklorik asit
HSA	İnsan serum albümini (Human Serum Albumin)
HYAL	Hiyalüronidazlar
KBr	Potasyum bromür
kDa	Kilodalton
nab	Albümin tabanlı nanopartikül teknolojisi
NHS	N-hidroksisüksinimid
nm	Nanometre
M	Molar
MATyr	N-metakriloil amino-(L)-tirozin

$\mu\text{g/g}$	Mikrogram/gram
mg/mL	Miligram/mililitre
$\mu\text{g/mL}$	Mikrogram/mililitre
mL	Mililitre
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid
mV	Milivolt
MWCO	Moleküler ağırlık kesme (Molecular weight cut-off)
s/y	Su/yağ
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
SEM	Taramalı elektron mikroskopu
SPARC	Secreted protein, acidic and rich in cysteine
std	Standart
PEG	Polietilen glikol
pI	İzoelektrik nokta
PLGA	Poli(laktik asit-ko-glikolik asit
ppm	Milyonda bir (Parts per million)
PVA	Polivinil alkol
QD	Kuantum dot
Rpm	Dakikadaki devir sayısı (Revolutions per minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
TEM	Transmisyon elektron mikroskopisi
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin
TGA	Termogravimetrik analiz
TNF	Tümör nekroz faktörü
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece

1. GİRİŞ

Son yıllarda, nanoteknoloji, kanser hedefleme ve görüntüleme için tanısal ve terapötik ajanlarda geniş uygulamalara sahip tıp alanında büyük potansiyel göstermiştir. Kemoterapinin, kanserli ve sağlıklı hücrelere antikanser ilaçların rastgele dağılımından dolayı büyük yan etkiler gösterdiği bilinen bir gerçektir. Bunu en aza indirmek için, araştırmacılar, kanser tespiti için ve kanser hücrelerine antineoplastik ilaçlar vermek için nano-cihazların geliştirilmesine katkıda bulunmaktadır. Buradan hareketle, yapılan tez çalışmasında pankreas kanseri hücreleri görüntülemek amaçlı yeni albümin temelli nanopartiküller geliştirilmiş ve etkinlikleri hücrelerle etkileştirilerek incelenmiştir.

1.1. Nanoteknoloji

Nanoteknoloji; atomsal, moleküler yapılar düzeyinde fonksiyonel materyallerin, cihazların ve sistemlerin geliştirilmesidir. Özellikle son 20 yılda nanoteknolojik gelişmelerde hızlı bir artış gözlenmekte ve bu alandaki yatırımlar günden güne artmaktadır. Bunun yanında nanoteknoloji tıp ve biyoteknoloji alanında nanopartikül sistemlerle ilgili araştırmalara ve uygulamalara ilişkin çalışmaların sayısında önemli ölçüde artış olmuştur. Nanopartiküller biyobozunur ve biyouyumlu olmaları, toksik özellik göstermemeleri, endüstriyel ölçekte üretilebilmeleri gibi sağladıkları birçok avantajlarından dolayı tıp, biyomedikal, biyomühendislik, farmasötik ve kozmetik alanlarında oldukça fazla ilgi görmektedir (Derman ve ark., 2013).

Nanopartiküller ilk defa yaklaşık 40 yıl önce aşuların ve kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik ajanların taşınması için geliştirilmiştir. Nanopartiküller, nanoboyutlu yapılarından dolayı mikropartiküler sistemlere kıyasla hücre içine daha fazla alınmaktadır (Derman ve ark., 2013). Nanopartiküllerin ilaç taşıma sistemi olarak tasarlanmasının temel amacı, ilaçların terapötik olarak optimal bir oranda ve dozaj rejiminde alana spesifik etkisini elde etmek için parçacık boyutunu, yüzey özelliklerini ve farmakolojik olarak aktif maddelerin salınımını kontrol etmektir. Nanopartikül sistemlerinin ilaç taşıma amacıyla kullanımının bazı avantajları vardır. Bunlar; nanopartiküllerin partikül boyutu, partikül morfolojisi ve yüzey yükü kontrol edilebilir, nano ölçekli ilaç taşıma sistemleri, küçük moleküller (hidrofilik veya hidrofobik), peptidler, proteinler ve nükleik asitler gibi çeşitli terapötik ve diagnostik ajanları taşıyabilir, aktif molekülleri kontrollü bir şekilde serbest bırakabilir (Lohcharoenkal ve ark., 2014). Nanopartiküller bir ilacı bozunmaya karşı korumaktadır, epitel yoluyla

difüzyonu kolaylaştırarak ilaç emilimini arttırmaktadır, farmakokinetik ve ilaç dokusu dağıtım profilini değiştirmektedir, hücre içi penetrasyon ve dağılımı iyileştirmektedir. Ayrıca, nanopartikülün yüzey özellikleri değiştirilerek ilacın istenen salınım biçimi ve biyodistribüsyonu sağlanabilmektedir (Elzoghby ve ark., 2012).

Nanopartikül tabanlı ilaç taşıma sistemlerinde polimerler dahil çeşitli materyaller, lipitler, polisakkaritler ve proteinler ilaç iletim taşıyıcıları olarak kullanılabilir. Nanopartiküllerin boyutu, ilacın sulu çözünürlük ve stabilitesi, yüzey yükü ve hidrofobikliği, nanomalzemelerin biyouyumluluk ve biyolojik olarak parçalanabilirliği ve ürünün antijenite ve toksisitesi gibi özellikleri dikkate alınarak materyal seçimi yapılabilir. Protein nanopartikülleri, düşük toksisite ve biyolojik bozunabilirlik gibi istenen özelliklerin birçoğu nedeniyle son yıllarda büyük ilgi görmüştür (Lohcharoenkal ve ark., 2014).

Nanopartiküllerin karakterizasyonu ve morfolojik analizi, transmisyon elektron mikroskopisi (TEM), taramalı elektron mikroskopu (SEM), atomik kuvvet mikroskobu (AFM), dinamik ışık saçılması (DLS), X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS), toz X-ışını kırınım (XRD) yöntemleriyle belirlenebilir (Panta ve ark., 2014). SEM, mikron altı aralıkta boyutlandırma için gerekli olan nanometre çözünürlüğe sahiptir ve parçacık morfolojisini belirlemek için çok değerlidir. Elektronlar, numuneyi oluşturan atomlarla etkileşime girerek, numunenin yüzey topoğrafyası, kompozisyonu ve elektrik iletkenliği gibi diğer özellikleri içeren sinyalleri üretir (Jahanshahi ve Babaei, 2008).

Son yıllarda, nanopartiküller sahip oldukları avantajlardan dolayı nanoteknoloji, tıp, biyoteknoloji ve diğer alanlarda yoğun olarak araştırılmaktadırlar. Tıp alanında özellikle antikanser, antiinflamatuvar ve antiparaziter ilaçlar, peptit ve proteinler için taşıyıcı sistem olarak ve aşılar da kullanılmaktadır. Antijenik özellikteki molekülleri taşıyan nanopartiküllerin ise, immünolojide ümit verici sonuçlar oluşturduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Derman ve ark., 2013).

Nanoteknoloji ile ilaçların çözünürlüklerini arttırmak, yarı ömrünü uzatmak, terapötik indekslerini geliştirmek ve immünojenikliklerini azaltmak için ilaçların verilmesini daha hassas bir şekilde hedeflemek için nanomalzemeler tarafından sağlanan imkânlar kullanılmaktadır. Son yıllarda, nanopartiküllere dayalı birkaç tedavi şekli kanser, ağrı ve enfeksiyona dayalı hastalıkların tedavisinde başarıyla uygulanmaya başlamıştır (Petros ve DeSimone, 2010). Çeşitli uygulamalarda polimerik nanopartiküller, katı lipit nanopartiküller, seramik nanopartiküller, manyetik

nanopartiküller, polimerik miseller, polimer-ilaç konjüгатları, nanotüpler ve dendrimerler gibi farklı türdeki nano boyutlu taşıyıcılar geliştirilmektedir (Elzoghby ve ark., 2012).

Son zamanlarda, FDA (Food and Drug Administration-Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi)'nin meme kanseri tedavisinde albumin-taksol nanoformülasyonunun (Abraxane-ABI 007) onaylaması üzerine nanopartikül tabanlı ilaç dağıtım sistemlerinin geliştirilmesine yönelik araştırmalar arttırmıştır (Nigam ve ark., 2014).

Choi ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada (Choi ve ark., 2015) akciğer kanseri tedavisinde inhalasyon yoluyla kullanılmak üzere doksorubisin yüklü albumin nanopartikülleri elde edilmiştir ve tümör nekroz faktörü (TNF) ile ilişkili apoptoz indükleyici ligand ile kaplanmıştır. Fareler üzerinde yapılan *in vivo* çalışmalar sonucunda doksorubisin ve kaplayıcı ligandın sinerjik antikanser etkili olduğu bulunmuştur.

Rhaese ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (Rhaese ve ark., 2003) kompleks koerservasyon yöntemi ile polietilenimin ile katyonik hale getirilmiş DNA-albumin nanopartikülleri hazırlanmıştır. Gen taşınması amacıyla elde edilen bu nanopartiküller insan embriyonik epitelyal böbrek hücreleri üzerinde düşük sitotoksik etki göstermiştir.

1.2. Nano Partikül Temelli İlaç Taşıma Sistemleri ve Özellikleri

Nanopartikül temelli ilaç taşıma sistemleri için iki önemli faktörden bir tanesi partikül boyutu diğeri yüzey yüküdür (Chakraborty ve ark., 2013). Parçacık boyutunu, yüzey özelliklerini ve farmakolojik olarak aktif etken maddelerin salınımını kontrol etmek ilacın terapötik olarak optimal oran ve dozda alana spesifik etkisini elde etmek için önemlidir (Jahanshahi ve Babaei, 2008).

Wartlick ve arkadaşları 2004'teki çalışmada (Wartlick ve ark., 2004) albumin nanopartiküllerini desolvasyon yöntemiyle hazırlamışlardır. Bu amaçla nanopartiküller avidin türevi madde ile kovalent bağlanmıştır ve HER-2 reseptörüne spesifik biyotinleşmiş trastuzumab molekülleri nanopartiküllere yüklenmiştir. HER-2 reseptörünün aşırı bulunduğu meme kanseri hücrelerinde (SK-BR-3 hücre hatlarında) nanopartiküllerin hücrelerle etkileşimi incelenmiştir.

Lin ve arkadaşları 1999'daki çalışmasında (Lin ve ark., 1999) metokspolietilen glikol modifiye albumin nanopartiküllerini koerservasyon yöntemiyle hazırlamışlardır. Yaklaşık 150 nm boyutunda nanopartiküller elde edilmiştir. Yüzey modifiye nano

partiküllerde, modifiye edilmemiş partiküllere kıyasla partikül yüzeyinde plazma protein adsorpsiyonunun azaldığını göstermişlerdir.

Lin ve arkadaşları 2001 yılında yapmış oldukları çalışmada (Lin ve ark., 2001), rose Bengal yüklü polietilen glikol [(poli(thioeteramido asit)–poli(etilen glikol) ve metoksi poli(etilen glikol)] modifiye albümin nanopartikülleri pH koaservasyon yöntemiyle elde edilmiştir. Foton korelasyon spektroskopisi kullanılarak 118,8-141,1 nm arasında partikül büyüklüğüne sahip nanopartiküller elde edilmiştir. Bu çalışmada nanopartiküllerden ilaç salınımının tripsin varlığında hızlandığı bulunmuştur.

Dreis ve arkadaşları yaptıkları çalışmada (Dreis ve ark., 2007) ilaç taşıyıcı sistem olarak albümin nanopartiküllerini kullanmışlardır ve nanopartikülleri desolvasyon yöntemiyle hazırlamışlardır. Doksorubisin yüklü albümin nanopartiküllerin boyutları 150-500 nm arasında belirlenmiştir. Bu çalışmada ayrıca nanopartiküllerin *in vitro* ortamda nöroblastoma hücreleri üzerindeki hücre canlılığına olan etkisi ve antikanser etkileri incelenmiştir.

1.2.1. Partikül boyutu

İlaç yüklemesi ve ilacın salınımı partikül büyüklüğünden etkilenmektedir. Nanopartiküller, küçük boyutları ve hareketliliği nedeniyle daha geniş bir biyolojik hedef yelpazesine sahiptir. Küçük partiküllerin daha geniş yüzey alanı vardır. Geniş yüzey alanı, etken maddenin parçacık dış kısmında veya yakınında birleşmesine neden olur ve bu daha hızlı aktif bileşen salınmasına neden olmaktadır (Chakraborty ve ark., 2013). Daha küçük parçacıklar, nanopartiküllerin taşınması sırasında parçacıkların toplanması riskine sahiptir. Mümkün olan en küçük boyutta ancak maksimum stabiliteye sahip nanopartiküllerin elde edilmesi önemlidir (Jahanshahi ve Babaei, 2008). Birçok çalışmada, bir ilaç dağıtım sistemi olarak mikron altı boyuttaki nanopartiküllerin, mikropartiküller üzerinde birtakım avantajlara sahip olduğu gösterilmiştir. Vücut dağılımı çalışmaları, 230 nm'den büyük nanoparçacıkların dalakta biriktiğini göstermiştir (Jahanshahi ve Babaei, 2008).

Bir nanopartikülün boyutu, yüzey özellikleri ve şekli, *in vivo* çalışmalarda da önemli bir role sahiptir. Büyüklüğün etkileri ile ilgili araştırmalar ile ilgili bazı genel sonuçlara varılmıştır. 5 nm'den küçük partiküllerin sirkülasyondan ekstravazasyon veya böbrek klirensi yoluyla hızla temizlendiği gösterilmiştir. Bunun yanında partikül boyutu

nanometre aralığından yaklaşık 15 µm aralığına doğru arttıkça, birikimin öncelikle karaciğer, dalak ve kemik iliğinde gerçekleştiği bildirilmiştir. ~10 nm ile ~15 µm boyut aralığındaki nanopartiküllerin hücre alımının büyük ölçüde hücre tipine bağlı olduğu bulunmuştur (Petros ve DeSimone, 2010). Bir çalışmada 100 nm boyutundaki nanopartiküllerin Caco-2 hücrelerinden; 1 µm boyutundaki mikropartiküllere oranla iki buçuk kat daha fazla, 10 µm boyutundaki mikropartiküllere oranla ise altı kat daha fazla hücre içerisine alındığı gösterilmiştir (Desai ve ark., 1997). Polimerin parçalanması partikül boyutundan da etkilenebilir. Örneğin, Jahanshahi ve Babaei'nin bir çalışmasında poli (laktik asit-ko-glikolik asit (PLGA) polimer *in vitro* bozunum hızının, artan partikül boyutu ile arttığı bulunmuştur (Jahanshahi ve Babaei, 2008).

1.2.2. Yüzey yükü

Yüzey yükü, partiküllerin ilaç taşıma sisteminde kullanılabilmesi için önemli bir özelliktir. Bir çalışmada poli (DL-laktid-ko-glikolid) nanopartiküllerinin, hücreler tarafından endositoz yoluyla alındığı bulunmuştur. Hücreye girdikten sonra, nanopartiküllerin bu endozomlardan hücresel sitoplazmaya geçtiği tespit edilmiştir. Bu durumun nanopartikülün yüzey yükündeki değişimden (negatiften pozitive) kaynaklandığı bulunmuştur. Başka bir çalışmada nanopartikül yüzey yükünün kan-beyin bariyerinin geçirgenliğini değiştirebileceği bildirilmiştir (Chakraborty ve ark., 2013).

Nanopartiküllerin yüzey modifikasyonunu incelemek için birçok teknik geliştirilmiştir. Yüzey modifikasyonunun etkinliği, yüzey yükünü, fonksiyonel grupların yoğunluğunu veya yüzey hidrofilitesinde artışı tahmin ederek ölçülebilir. Yüzey modifikasyonunun ölçülmesinde kullanılan bir yöntem, nanopartikül içeren sulu süspansiyondan zeta potansiyelini belirlemektir. Bu, partiküllerin elektrik potansiyelini yansıtır ve partikül bileşiminin ve dispersiyon haline getirildiği ortamın bileşiminden etkilenir. Zeta potansiyelini ölçmenin başlıca nedeni, koloidal kararlılığı öngörmektir. Zeta potansiyeli, partiküller arasındaki itici kuvvetlerin bir ölçüsüdür. Çoğu sulu koloidal sistemler elektrostatik itme ile stabilize olduğundan, partiküller arasındaki itici güçler ne kadar büyük olursa, birbirine yaklaşır, bir agregasyon oluşturma ihtimalleri o kadar düşük olur. Jahanshahi ve Babaei yaptıkları çalışmada yüzey yükü partiküllerin bir araya toplanmasını önlediği için (+/-) 30 mV üzerinde bir zeta potansiyeline sahip nanopartiküllerin süspansiyonda dengeli olduğunu göstermişlerdir. Yine bu çalışmada,

Tween 80 kaplı nanopartiküllerin kan-beyin bariyerini geçtiği gösterilmiştir (Jahanshahi ve Babaei, 2008).

1.3. Polimerik Nanopartiküller

Polimerik nanopartiküller doğal (Albumin, jelatin, kollajen, kitosan vb.) ve sentetik (Poli akrilat, poli laktid vb.) hammaddeler olmak üzere sınıflandırılabilirler. Polimerik nanopartiküller, biyolojik olarak parçalanabilir ve daha az toksik özellikte olmaları nedeniyle kullanım alanları çoktur. Bunların yanında, yüksek biyoyararlanıma sahip olma, daha iyi ilaç yükleme ve kontrollü salım yapabilme özellikleri sayesinde ilaç taşıyıcı sistemler olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Polimerik nanopartiküllerin yüzey modifikasyonu ile reseptöre spesifik olarak ilaç hedefleme mümkün olmaktadır (Elzoghby ve ark., 2012; Derman ve ark., 2013).

Farmasötik bileşikler kararsız olabilir, hızla bozulabilir veya sulu çözelti içinde çok zayıf çözünürlüğe sahip olabilirler. Böyle ilaçların etkinliğini göstermesi, hedef dokunun fizyolojik ortamına uyum sağlaması, stabilitesini koruması ve kontrollü ilaç salınımı için nanopartiküller gibi ilaç taşıyıcı sistemler gereklidir. Taşıyıcı sistem, sentetik veya doğal polimerik sistemlerden oluşabilir. Ancak klinik olarak etkili, düşük maliyetli ve toksik olmaması çok önemlidir (Maham ve ark., 2009).

Polimer tabanlı ilaç taşıma sistemlerinin, tekdüze nanopartiküllerin sentezi için önemli ölçüde iyileştirilmesi gerektiği düşünülmektedir. Birçok polimer tabanlı malzeme sentetiktir ve biyolojik olarak bozunabilir özellikleri sınırlıdır. Sentetik polimerik nanopartiküllerin vücutta meydana getirdikleri immünojenik reaksiyonlar kullanımlarını büyük ölçüde kısıtlamaktadır (Maham ve ark., 2009).

İlaç yüklü biyolojik olarak parçalanabilen polimerler vücuda yerleştirilebilir ve lokalize ilaç verme ve bir ilacın aylar boyunca kontrollü bir şekilde salınması için kullanılabilir. Günümüzde anti-tümör ilaçların kontrollü salınımını sağlayan goserelin (Zoladex®) ismiyle bilinen leutinizan hormon salgılatıcı küçük polimer çubuklar ve leuprolide (Leupron Depot®) ismiyle bilinen polimer mikropartiküller prostat kanseri için kullanılmaktadır. Beyin kanseri tedavisinde ise yine polimerik yapıda tasarlanan karmustin (Gliadel®) kullanılmaktadır. Onaylanan ilk terapötik nanopartikül olan Abraksan® paklitaksel yüklü bir albümin nanopartikülüdür. Abraksan metastatik meme

kanseri tedavisinde etkin olarak kullanılmaktadır. Bunların yanında birçok ilaç yüklü nano sistemin klinik denemelerine devam edilmektedir (Duncan, 2006).

1.3.1. Protein nanopartiküller

Protein nanopartiküller, hayvansal proteinler olan albümin, jelatin veya bitkisel proteinler olan gliadin, zein ve legumini hammadde olarak kullanarak elde edilirler (Chakraborty ve ark., 2013). Doğal olmaları sebebiyle düşük toksisiteye sahiptirler. Amfifilik özellikleri nedeniyle madde ve çözücülerle iyi bir şekilde etkileşime girerler. Biyolojik olarak parçalanabilir ve metabolize edilebilirler. Sığır ve insan serum albümini suda çözünürken zein ve gliadin suda çözünmeyen proteinlerdir. Şimdiye kadar, protein nanopartikülleri üzerine birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmaların çoğu jelatin, albümin ve gliadin'den türeyen nanopartiküllerin hazırlanması ve karakterizasyonu üzerine odaklanmıştır (Lohcharoenkal ve ark., 2014).

Protein nanopartiküllerin biyoyararlanımı, biyo-bozunabilir özellikleri ve protein yapısı yüzeyinde ve içindeki işlevli gruplar nedeniyle modifikasyonun kolaylığı onu ilaç dağıtımı için umut verici bir taşıma sistemi yapmaktadır. Doğal proteinlerin ve işlenmiş sentetik polipeptitlerin çeşitliliği ve biyo-uyumluluk özellikleri çok yönlü ilaç taşınmasında önemli yer tutmaktadır. İlaç molekülleri protein tabanlı nanopartiküller ile erozyon ve proteolizden korunabilir (Maham ve ark., 2009).

Eşit olarak dağılmış mikroküreler veya nanopartiküllerin sentezi için protein nanopartiküllerinin geliştirilmesi gerekmektedir. Protein nanopartiküllerinin uygulamaları, ilaç verme ve terapötik amaçlar için kullanılmaları için daha fazla gelişimlerine ihtiyaç vardır (Maham ve ark., 2009). Çeşitli kanserler (meme, yumurtalık, beyin, melanom ve lenfatik), bulaşıcı hastalıklar, kronik hastalıklar ve otoimmün hastalıklar gibi hastalıkların potansiyel tedavisi için protein bazlı platformlar da geliştirilmektedir.

Say ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada (Say ve ark., 2013) polimerik α -amilaz nanopartikülleri mikroemülsiyon polimerizasyon tekniği ile sentezlenmiştir. Nano-enzim sistemi, rutenyum tabanlı amino asit monomerleri ve haptenleri kullanarak ışığa duyarlı konjugasyon ve çapraz bağlama stratejisinin kullanıldığı ANADOLUCA yaklaşımı ile elde edilmiştir.

Protein nanopartiküllerin, çeşitli ligandların bağlanması için yüzey modifikasyonları kolaylıkla yapılabilir. Örneğin; albümin nanopartiküllerinin yüzeyindeki fonksiyonel grupların (Karboksilik ve amino grupları gibi) varlığı nedeniyle nanopartiküllerin yüzeyinde değişiklik mümkün olmaktadır. Ligandların albümin nanopartiküllerinin yüzeyine konjugasyonu, genellikle ligandlar ve albümin yüzeyindeki fonksiyonel gruplar arasındaki kovalent bağ oluşumu yoluyla elde edilmektedir. Albümin-ligand kombinasyonlarında protein, ilaç iletiminde biyolojik olarak bozunabilir bir taşıyıcı olarak görev yapmaktadır. Ligand ise farmakokinetik parametrelerin (örneğin yüzey aktif maddeler) modifiye edilmesi, nanosistem kararlılığının artırılması, dolaşım yarı ömrünün uzatılması için kullanılmaktadır (Örn., Katyonik polimerler). Önceki çalışmalarda polietilen glikol (PEG)'lenmiş protein nanopartikülleri kanser tedavisi için bir ilaç taşıyıcı olarak araştırılmıştır. Bu şekilde nanopartikülün yarılanma ömrü artmıştır ve ilaç yüklü PEG'lenmiş nanopartiküllerin tümör büyümesini engellediği gösterilmiştir (Lee ve ark., 2006)

Wartlick ve arkadaşlarının 2004 yılında yapmış olduğu çalışmada (Wartlick ve ark., 2004), meme kanseri hücrelerine hedeflemek için albümin nanopartikülleri yüzeyine biyotinlenmiş avidini kovalent olarak bağlamıştır. Bu şekilde hücrelerdeki HER2 reseptörleri hedeflenmiştir.

Teng ve arkadaşlarının 2013'teki çalışmasında (Teng ve ark., 2013), folik asit konjuge protein nanopartikülleri hazırlanmıştır. Bu nanopartiküller, folik asit konjuge olmayan nanopartiküllerden daha küçük partikül boyutu göstermiştir. Bu nanopartiküllerin hücreler içerisine daha fazla alındıkları tespit edilmiştir ve bu nanopartiküllere daha fazla miktarda ilaç yüklenebilmiştir.

Han ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada (Han ve ark., 2013) metastatik akciğer kanseri tedavisinde katyonik sığır serum albümini yeni bir siRNA dağıtım sistemi olarak araştırılmıştır. Katyonik grubu ile modifikasyon proteinin pI'sının ve yüzey yükünün kontrol edilmesini sağlamıştır. Bunun yanında toksisiteyi arttırmadan siRNA'nın daha verimli ve hedefli olarak verilmesine izin vermiştir. Sonuçta tümör büyümesini inhibe eden etkili bir gen susturma etkisi göstermiştir.

1.3.1.1. Albümin nanopartiküller

Albümin, globüler bir proteindir ve vücutta depo ve taşıyıcı görevi görmektedir. Vücuttaki ozmotik basıncın korunması ve besinlerin hücrelere bağlanması da albüminin görevlerindedir. Bu protein, su ve seyreltilmiş tuz çözeltisi içinde serbestçe çözünebilmektedir. pH 4 ile 9 aralığında kararlıdır ve herhangi bir zararlı etki olmadan 60°C'de 10 saate kadar ısıtılmaktadır. Albümin pH 7.4'te %40 (a/h) gibi yüksek bir oranda çözünebilmektedir (Lohcharoenkal ve ark., 2014; Jahanshahi ve Babaei, 2008).

Albümin, immünojenik olmayan, biyouyumlu ve biyolojik olarak bozunabilir özelliklere sahip bir serum proteindir. Albümin; tiyol, amino ve karboksilik gruplar gibi farklı reaktif gruplar taşımaktadır. Bu gruplar sayesinde ligand bağlanması veya diğer yüzey değişiklikleri albümin üzerinde kolayca uygulanabilmektedir (Chakraborty ve ark., 2013).

Albümin, yumurta beyazı (ovalbümin), sığır serum albümini (Bovine Serum Albumin, BSA) ve insan serum albümini (Human Serum Albumin, HSA) gibi çeşitli kaynaklardan elde edilebilmektedir (Lohcharoenkal ve ark., 2014). BSA, düşük molekül ağırlığına sahiptir (69,323 Da) ve ilaç taşınmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. HSA vücutta en çok bulunan plazma proteindir (35-50 g/L insan serumu) ve ortalama yarı ömrü 19 gündür. HSA, 66.500 Da'lık bir molekül ağırlığına sahiptir. HSA, 585 amino asitten oluşan ve bir sülfhidril grubu, 17 disülfür köprüsü oluşturan 35 sisteinil kalıntısı içeren çözünür bir globüler monomerik proteindir. pH'ya (pH: 4-9 aralığında sabit), sıcaklığa (60°C'de 10 saate kadar ısıtılabilir) ve organik çözücülere karşı son derece sağlamdır (Elzoghby ve ark., 2012).

Albümin, nanoküre ve nanokapsül gibi nanopartiküllerin hazırlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Albümin kullanılarak 50-300 nm boyut aralığında nanopartikül elde edilebilmektedir. Albümin nanopartiküllerinden ilaç salınımı, proteaz sindirimi ile doğal olarak gerçekleşmektedir (Lohcharoenkal ve ark., 2014; Elzoghby ve ark., 2012). Albümin gp60 reseptörlerine bağlanarak hücrelere alınabilmektedir (Nigam ve ark., 2014).

Protein nanopartikülleri, antikanser ilaçların verilmesi için sıklıkla kullanılmaktadır. Bunların arasından albümin katı tümörlerde birikme eğilimindedir ve bu nedenle son zamanlarda albümin nanopartiküller kanser tedavisinde anti-tümör ilaçların bölgeye özgü taşınması için kapsamlı bir şekilde araştırılmaktadır. Yapılan bir çalışmada alkaloit yapısında olan noskapin, HSA nanopartikülünde tümör hücrelerine

taşınmıştır. Bu çalışmada noskapin yükleme verimliliği %85-96 ve nanopartiküller 150-300 nm aralığında elde edilmiştir (Sebak ve ark., 2010).

Yu ve ark.nın 2014'te yapmış olduğu çalışmada (Yu ve ark., 2014), BSA nanopartikülleri desolvasyon yöntemi ve ardından glutaraldehit fiksasyonu ve ısı denatürasyonu ile hazırlanmıştır. Sonuçta, rodamin B yüklü nanopartiküllerin partikül çapı yaklaşık 492 nm olarak tespit edilmiştir. Yaptıkları *in vivo* hayvan deneylerinde nanopartiküllerin Gine domuzlarının iç kulaklarında biriktiği belirlenmiştir.

Qi ve ark.nın 2014 yılında yapmış olduğu çalışmada (Qi ve ark., 2014), folik asit modifiye albümin nanopartikülleri desolvasyon yöntemiyle elde edilmiştir. Bu çalışmada beaxarotene yüklü nanopartiküllerin boyutu $195,3 \pm 5,6$ nm olarak tespit edilmiştir. Nanopartiküller akciğer kanseri hücre hatlarında sitotoksik etkileri açısından değerlendirilmiştir.

Merodio ve ark.nın 2001 yılındaki çalışmasında (Merodio ve ark., 2001), gansiklovir yüklü albümin nanopartikülleri koaservasyon yöntemi ile elde edilmiştir. Çapraz bağlayıcı olarak glutaraldehit kullanılmıştır. Formülasyon aşamasında glutaraldehitin eklendiği aşama değiştirilerek 200-400 nm boyutunda nanopartiküller elde edilmiştir. Nanopartiküllerin ilaç yükleme kapasitesi, *in vitro* salınım özellikleri asidik ve bazik ortamlarda bunun yanında ortama tripsin eklenerek değerlendirilmiştir.

Li ve ark.nın yapmış olduğu çalışmada (Li ve ark., 2011) ise 10-hidroksikamptotesin yüklü folik asit modifiye albümin nanopartikülleri desolvasyon yöntemiyle elde edilmiştir. Bu çalışmada yaklaşık 233,9 nm boyutunda nanopartiküller elde edilmiştir. Mide ve akciğer kanseri hücre hatlarında *in vitro* hücre alımı incelenmiştir. Buna göre folik asit ligandına duyarlı mide kanseri hücrelerinde daha yüksek miktarda nanopartikülün hücre içine alındığı belirlenmiştir.

Zhao ve ark.nın 2010 yılında yaptıkları çalışmada (Zhao ve ark., 2010) paklitaksel yüklü albümin nanopartikülleri desolvasyon yöntemiyle hazırlanmıştır ve folik asit ile modifiye edilmiştir. Bu çalışmada 210 nm'de nanopartiküller elde edilmiştir. Nanopartiküllerin insan prostat kanser hücre hatlarında 12 saat inkübasyondan sonraki görüntülerinde hücrelerin içlerinde daha yoğun oldukları belirlenmiştir.

1.4. Protein Nanopartiküllerinin Hazırlama Teknikleri

Desolvasyon, emülsifikasyon, termal jelleşme ve son zamanlarda nano sprey kurutma, albümin tabanlı nanopartikül teknolojisi (nab teknolojisi) gibi bazı nanoteknolojik yöntemler albumin nanopartiküllerinin eldesi için sıklıkla kullanılmaktadır. Protein nanopartiküllerinin hazırlanması, proteindeki çekici ve gerici kuvvetlerin dengelenmesine dayanmaktadır. Bu partikül oluşumunda protein bileşimi, derişimi, çapraz bağlanması, iyonik kuvvet, solvent tipi ve pH gibi hazırlama koşullarına bağlı olarak konformasyonel değişikliğe uğrar. Hazırlama işlemi sırasında proteinlerin açılması ile disülfidler ve tiyoller gibi etkileşimli gruplar ortaya çıkar. Sonraki termal veya kimyasal çapraz bağlanma, ilaç moleküllerine sahip çapraz bağlı nanopartiküllerin oluşumuna neden olmaktadır. Koaservasyon/desolvasyon ve emülsiyon esaslı yöntemler protein nanopartiküllerinin hazırlanması için yaygın şekilde kullanılmaktadır (Lohcharoenkal ve ark., 2014).

1.4.1. Desolvasyon (koaservasyon)

Koaservasyon veya desolvasyon, protein nanopartikülleri eldesi için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde, sulu albümin çözeltisine etanol veya aseton gibi organik çözücüler damla damla ilave edilerek bulanıklaşma sağlanır. Bu süreçte albüminin suda çözünürlüğü azalır ve çözeltide faz ayrımı olur. Çözücü madde ilavesi, protein yapısında konformasyon değişikliklerine yol açarak proteinin çökmesine neden olur. Çöken albümin parçacıkları glutaraldehit ile çapraz bağlanır. Sonuçta oluşan nanopartiküller liyofilizasyon yöntemiyle kurutulularak saklanmaktadır (Lohcharoenkal ve ark., 2014; Elzoghby ve ark., 2012).

Koaservasyon yönteminde, protein içeriği, pH, iyonik kuvvet, çapraz bağlayıcı madde derişimi, karıştırma hızı ve desolvasyon maddesi miktarı gibi hazırlama koşullarına bağlı olarak farklı boyutlarda nanopartiküller elde edilmektedir. Bu nedenle yöntemdeki değişkenleri kontrol altında tutarak istenilen boyutta nanopartiküller elde edilebilir (Lohcharoenkal ve ark., 2014; Jahanshahi ve Babaei., 2008). Daha önce yapılan çalışmalarda pH, glutaraldehit miktarı gibi faktörlerin değiştirilmesiyle nanopartikül boyutunda meydana gelen değişimler incelenmiştir.

Das ve ark.nın 2005 yılında yaptıkları çalışmada (Das ve ark., 2005), aspirin yüklü albümin nanopartiküller koaservasyon yöntemi ile hazırlanmıştır. Bu çalışmada

aspirin/albumin oranı 0,06-1,0 olduğunda partikül boyutunun 47-191 nm arasında değiştiği belirlenmiştir. *In vitro* salınım çalışmalarında, aspirin yüklü albumin nanopartiküllerinin ilacı 72 saatte yaklaşık %90 salınım yaptığını göstermektedir.

Weber ve arkadaşlarının 2000 yılında yapmış oldukları çalışmada (Weber ve ark., 2000), çapraz bağlayıcı olarak kullanılan glutaraldehit derişimi, etanol miktarı ve sıcaklık değiştirilerek elde edilen nanopartikülün boyutu üzerindeki etkisi incelenmiştir. Sonuçta, çapraz bağlayıcı derişimi arttırıldığında, partikül yüzeyindeki amino grubu sayısının azaldığı belirlenmiştir. Bu çalışmada glutaraldehit miktarının değiştirilmesi partikül boyutunda belirgin değişimlere neden olmamıştır. Bunun yanında, zeta potansiyelinin, artan glutaraldehit derişimi ile azalma eğiliminde olduğu gösterilmiştir.

1.4.2. Emülsifikasyon

Emülsifikasyon yönteminde, sulu protein çözeltisi, yüksek hızda bir homojenleştirici veya ultrasonikatör yardımıyla bitkisel bir yağ (pamuk yağı, hint yağı vb.) içinde emülsiyon haline getirilmektedir. Nanopartiküllerin elde edilmesi için fosfatidilkolin ve Span 80 gibi yüzey aktif maddeler stabilizatör olarak eklenir. Bu yöntemde termal veya kimyasal çapraz bağlanma kullanılabilir. Yağ fazı daha sonra bir organik çözücü kullanılarak uzaklaştırılır, böylece nano boyutta proteinler oluşturulur. Isıtılmış yağ (120°C üzeri) damla damla ilave edilmesiyle var olan suyun hızla buharlaşması ve albuminin denature olması sağlanır. Bu işlem aynı zamanda nanopartiküllerin oluşumuna neden olmaktadır. Bu yöntemde protein derişimi ve su-yağ oranı (s/y) parçacık boyutunu etkilemektedir. Protein derişimi ve faz hacim oranının artırılması nanopartiküllerin boyutunu arttırmaktadır. Desolvasyon ve emülsiyon yöntemi ile hazırlanan nanopartiküllerden yağ fazı ve organik çözücünün uzaklaştırılması, ürünlerin güvenli bir şekilde kullanılması için gerekli bir işlem basamağıdır (Lohcharoenkal ve ark., 2014; Elzoghby ve ark., 2012).

Mishra ve ark.nın 2006 yılında yaptıkları çalışmada (Mishra ve ark., 2006), emülsifikasyon yönteminde zeytinyağının yağ fazı olarak hazırlanmasıyla 150 nm boyutunda HSA nanopartikülleri elde edilmiştir. Kan beyin bariyeri hedefleme amaçlı bu çalışmada albumin nanopartiküllerinin yüzeyi transferrin ile modifiye edilmiştir.

1.4.3. Albümin tabanlı nanopartikül (Nanoparticle albumin-bound nab™) teknolojisi

American Bioscience, lipofilik ilaçları nanopartikül içine kapsüllemek için benzersiz bir albümin tabanlı nanopartikül teknolojisi (nab-teknolojisi) geliştirmiştir. Bu teknolojinin uygulama prosesine göre, öncelikli olarak ilaç, HSA ile sulu bir çözücü içerisinde karıştırılmaktadır. Ardından, 100-200 nm boyut aralığında ilaç-albümin nanopartikülleri oluşturmak için bir jet vasıtasıyla yüksek basınç altında geçirilmektedir. Bu işlemler sonrasında elde edilen yaklaşık 130 nm çapında Abraxane® (nab-paclitaxel; paclitaxel-albümin nanopartikül), metastatik meme kanseri tedavisinde kullanılan ilk FDA onaylı nanoteknoloji temelli bir kemoterapiktir (Fu ve ark., 2009; Elzoghby ve ark., 2012).

Abraxane® çeşitli klinik araştırmalarda konvansiyonel paklitaksel formülasyonlarından daha üstün olduğu gösterilmiş paklitaksel yüklü bir albümin nanopartikülüdür. Albümin bağlı paklitaksel formülasyonu, standart paklitaksel (Taxol®) formülasyonuna göre daha yüksek dozlama sağlamıştır (Hawkins ve ark., 2008).

Nab-teknolojisi, geliştirilmiş ilaç taşınımı ve tümör hedeflemesi yoluyla hedefe yönelik kemoterapi için geniş bir platform sağlamaktadır. Bu teknoloji, tümör hücrelerinde albümin reseptörünü (gp60) kullanan ve albümin bağlayıcı protein olan SPARC (Secreted Protein, Acidic and Rich in Cysteine)'yi hedefleyen enjekte edilebilir albümin tabanlı bir nanopartikül ilaç taşıma sistemidir (Desai, 2007; Lluch ve ark., 2014). Nab-teknolojisi, hidrofobik ilaçların verilmesi için Cremophor ve Tween gibi toksik çözücülerin ve sürfaktanların kullanılma ihtiyacını ortadan kaldırmaktadır. ABI-008 (nab-dosetaksel) ve ABI-009 (nab-rapamisin) gibi birçok nab ilacı faz çalışmaları aşamasındadır (Desai, 2007; Fu ve ark., 2009; Elsadek ve Kratz, 2012; Kratz, 2008). Nab-teknolojisi farklı çalışmalarda da kullanılmaktadır. Örneğin; Kim ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptıkları çalışmada (Kim ve ark., 2011), intravenöz uygulama için 130-150 nm boyut aralığında kurkumin yüklü HSA nanopartiküllerini elde etmek için nab-teknolojisini kullanmıştır.

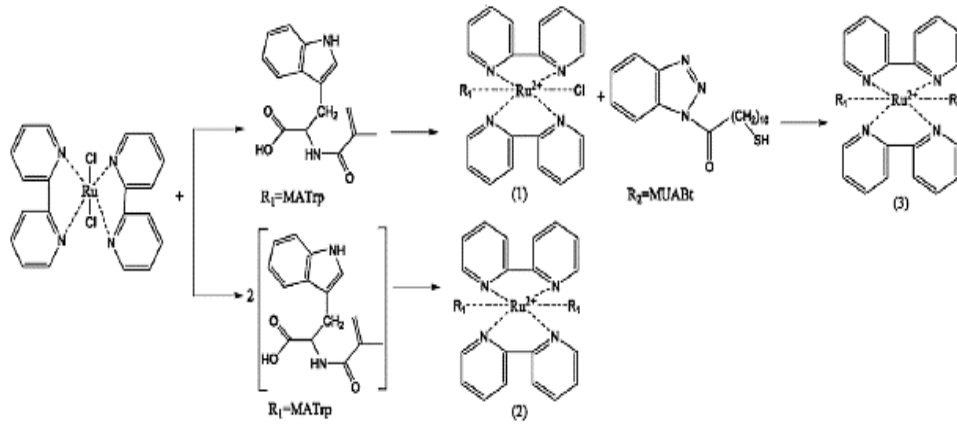
1.4.4. ANADOLUCA yöntemi

ANADOLUCA (AmiNoAcid Decorated and Light Underpinning Conjugation Approach), yeni sentetik materyalleri ve bunların yaşam bilimleri ve biyoteknolojideki

uygulamalarını içeren yeni bir konjuge protein yaklaşımıdır (Say ve ark., 2011). ANADOLUCA, ışığa duyarlı rutenyum tabanlı aminoasit monomerlerinin (Şekil 1.1) ve haptenlerin, rutenyum-şelat bazlı monomerlerin mikro ve nano yapıları üzerinde fotosensitasyon ve konjugasyon yaklaşımı kullanılarak aminoasit monomer-protein çapraz bağlanması üzerine kurulmuş bir yöntemdir. Aminoasit ve rutenyum-şelat bazlı monomere dayanan ışığa duyarlı, kovalent ve çapraz bağlayıcı konjugasyon yöntemleri, doğru bir şekilde antikor yönlendirmesini sağlamaktadır ve bağlanma sonrasında denatürasyonu önlemektedir. Bu yöntem, proteinlerin verimli bir şekilde bağlanmasını sağlamaktadır. Duyarlı aminoasit monomer bağlayıcıları kimyasal olarak tepkimeye girebilir ve çok sayıda farklı mikro ve nano yüzeye biyolojik olarak uyumludurlar (Say ve ark., 2012; Say ve ark., 2013).

Nanopartikül sentezinde ANADOLUCA yaklaşımı şimdiye kadar birçok çalışmada kullanılmıştır. Bu çalışmalardan bazıları aşağıda özetlenmiştir.

Uzun ve ark.nın 2013 yılında yaptıkları çalışmada (Uzun ve ark., 2013), insan plazmasından albümin ve immünoglobulin G moleküllerinin aynı anda alınması amacıyla yeni adsorbanların hazırlanması için ANADOLUCA yaklaşımı ile hazırlanan nanoproteinler kriyojel yapılara yerleştirilmiştir.



Şekil 1.1. Fotosensitif rutenyum tabanlı aminoasit monomer oluşumunun şematik gösterimi (Say ve ark., 2012)

Say ve ark.nın 2013 yılında yapmış oldukları çalışmada (Say ve ark., 2013) ise tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) belirlenmesi amacıyla sensör sistemleri geliştirilmiştir. Bu amaçla fotosensitif nano yapıdaki TNF- α ANADOLUCA yaklaşımı ile hazırlanmıştır.

Say ve ark.nın 2011 yılındaki çalışmasında (Say ve ark., 2011), ışığa duyarlı yeniden kullanılabilir özellikte nanoyapılı lipaz, mikroemülsiyon polimerizasyon yöntemi ile ANADOLUCA yaklaşımı ile hazırlanmıştır. Nanoproteinlerin boyutu yaklaşık 100 nm olarak tespit edilmiştir ve paranitrofenil palmitatın hidrolizinde (pH: 6-10) serbest lipaz enziminden daha fazla aktivite göstermiştir.

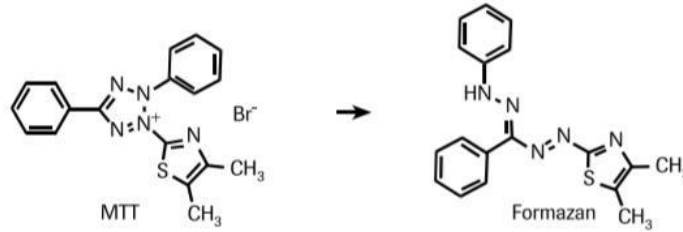
ANADOLUCA yöntemiyle sentezlenen, aminoasit ve rutenyum-şelat tabanlı monomerlerle hazırlanan ışığa duyarlı nanopartiküller floresans özellikleri sayesinde diğer birçok nanopartikül hazırlama yöntemine göre avantaj sağlamaktadır. ANADOLUCA yöntemi ile elde edilen nanoprotein yapıların, doğru antikor yönelimi sağlanır ve denatürasyonu önlenir. Işığa duyarlı çapraz bağlama ile oda sıcaklığında, gün ışığında ve azot atmosferi altında kolayca hazırlanan nanoproteinler, reseptöre spesifik olarak modifiye edilebilir özelliklerinin yanında tekrar kullanılabilir özelliktedirler (Say ve ark., 2011; Say ve ark., 2013).

1.5. Hücre Kültürü Çalışmaları

Kimyasal, biyolojik ve fiziksel faktörler hücreleri farklı derecelerde etkileyerek sitotoksositeye neden olabilir. Bir bileşiğin biyolojik özelliklerini anlamak için, toksik veya toksik olmayan etkilerini belirlemek gerekir. *In vitro* sitotoksosite testleri (hücre canlılığı testleri), muhtemel ilaç adaylarının değerlendirilmesi veya bazı bileşiklerin sitotoksik profillerinin araştırılması için genellikle kullanılan hücre kültürü tabanlı ölçüm yöntemleridir (Fotakis ve Timbrell, 2006).

Hücre canlılığı ve sitotoksosite testlerinde hücre canlılığı tespiti için kullanılan çeşitli reaktifler vardır. Bunlar, enzim aktivitesi, hücre zarı geçirgenliği, ATP üretimi ve koenzim üretimi gibi çeşitli hücre işlevlerine dayanmaktadır. *In vitro* sitotoksosite belirlemek amacıyla sıklıkla kullanılan MTT testinde, metabolik olarak aktif hücrelerde sarı bir tetrazolyum tuzu mor renkli formazan kristaline dönüşür (Mossmann, 1983; Fotakis ve Timbrell, 2006). Tetrazolyum tuzu, hücrelerde mitokondriyal süksinat dehidrogenaz enzimi ile formazana dönüşmektedir (Şekil 1.2). Mitokondriyal süksinat dehidrogenaz sarı renkli tetrazolyum tuzunu çözünür mor renkli formazana dönüştürmektedir. Bu yöntemin kullanımı kolay, güvenli, yüksek bir tekrarlanabilirliğe sahiptir ve hem hücre canlılığı hem de sitotoksosite testlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. MTT formazan suda çözünmez ve hücrelerde mor renkli kalıcı kristaller

oluşturur. Bu nedenle ölçüm alınmadan önce, kristalleri çözülmek için organik bir çözücü gerekmektedir (Fotakis ve Timbrell, 2006).



Şekil 1.2. MTT'nin formazona indirgenmesi

1.6. Pankreas Kanseri

Pankreatik adenokarsinom, hastalığın ileri aşamalarında tespit edilebilen ölümcül bir hastalıktır ve büyük bir sağlık problemi olmaya devam etmektedir (Nigam ve ark., 2014). Metastatik pankreatik kanser, ağrı, asteni, anoreksiya ve kaşeksi ile karakterize, ilerleyici, zayıflatıcı bir hastalıktır ve Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde her yıl görülen kanser ölümlerinin en yaygın dördüncü nedenidir. Bu hastalığın ABD'de yılda 30.000 kişinin ölümüne neden olduğu tahmin edilmektedir. Pankreatik kanserin en önemli özelliklerinden biri, lokal tümör invazyonu ve erken sistemik yayılımıdır. Pankreatik kanserin bu özelliklerinin moleküler temeli tam olarak anlaşılamamıştır. Pankreas kanseri ile ilişkili sürekli rapor edilen temel risk faktörleri yaş, aile öyküsü ve sigara içiciliği olmasına rağmen başlıca nedensel faktörler yeterince anlaşılmamıştır (Li ve ark., 2007; Li ve ark., 2015). Pankreas kanseri dokularının zenginleştirilmiş tümör stromal bileşeni ve düzensiz damarlanması nedeniyle, terapötik ajanların etkili bir şekilde verilmesi oldukça zordur. Bu nedenle, bu ölümcül hastalığı tedavi etmek için hedefli ilaç sunumu için yenilikçi stratejiler bulmak zorunludur (Nigam ve ark., 2014).

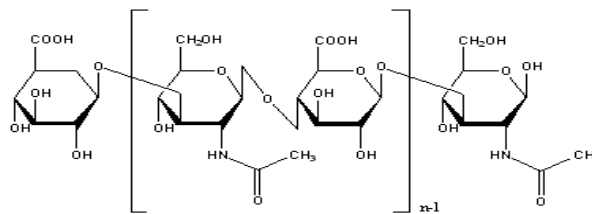
1.6.1. Hiyaluronik asit (HA) reseptörü

Hiyaluronik asit (HA), β -1,4- D-glukuronik asit ve β -1,3-N-asetil-D-glukozamin disakkarit birimlerini içeren büyük bir glikozaminoglikandır (Şekil 1.3) ve eşsiz biyofiziksel özelliklerinden dolayı, doku homeostazı ve biyomekaniklerinin korunmasına doğrudan katkıda bulunur (Cheng ve ark., 2015 (1)). HA, bir sinyal molekülü olarak, hücre işlevlerine aracılık etmek için hücre içi olayları aktive etmek için çeşitli hücre

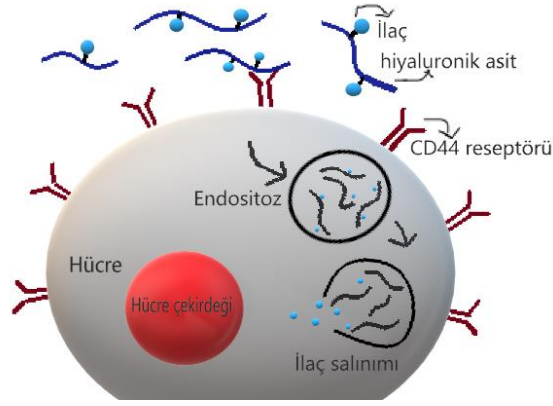
yüzevi reseptörleri ve HA bağlayıcı proteinlerle etkileşime girer (Dicker ve ark., 2014). HA, HA sentezleyiciler (HAS1, HAS2 ve HAS3) tarafından sentezlenir ve hialüronidazlar (temel olarak HYAL1, HYAL2 ve HYAL3) tarafından yıkılır (Cheng ve ark., 2015 (2)). HA, tüm omurgalı dokuların hücre dışı matrisinde bulunur, bununla birlikte derişimi ve bağlanma yerleri değişir. Vücut sıvılarında, HA derişimi, kan serumunda 0,01-0,1 µg/g, sinoviyal sıvıda 1400-3600 µg/g arasında değişir; yumuşak bağ dokusunda HA içeriği, 8,5-18 µg/g'dan 140-338 µg/g aralığına kadar değişmektedir (Dicker ve ark., 2014).

HA, birkaç kDa ila 10.000 kDa arasında değişen çeşitli moleküler boyutlarda bulunmaktadır. Yüksek molekül ağırlıklı HA yerine düşük molekül ağırlıklı HA, kanser dokularında spesifik olarak birikmiş ve tümör ilerlemesiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir. Önceki çalışmalar, pankreatik kanserde HA ekspresyonunun arttığını göstermiştir (Cheng ve ark., 2015(2)). HA, bir HA reseptörü olan Clusters of Differentiation 44 (CD44)'ün aşırı ifade edildiği çeşitli kanser hücrelerine bağlanır. CD-44 hücrelerine karşı hedeflenmiş ilaç ile pankreas kanseri tedavisindeki ilaç direnci yok edilebilir (Nigam ve ark., 2014).

CD44, insanlarda kromozom 11'in kısa kolunda bulunan tek bir genden türemiştir ve çeşitli hücrelerde çeşitli işlevleri yerine getiren bir protein ailesini temsil etmektedir (Underhill, 1992). HA-bağlayıcı proteinler HA'yı bağlarken kullanan ailenin üyeleri arasında CD44 yer almaktadır. CD44, hücrenin plazma zarını kaplayan birçok bölgeden oluşan, her yerde bulunabilen bir HA reseptör proteindir (Şekil 1.4) (Dicker ve ark., 2014). HA, biyolojik olarak parçalanabilen, biyolojik olarak uyumlu, toksik olmayan ve immünojenik olmayan polimer özellikteki eşsiz özelliklerinden dolayı anti kanser ilaç dağıtımında geniş çapta araştırılmıştır. Çeşitli kanser hücrelerinde eksprese edilen CD44 reseptörünün hedeflenmesi, bazı anti kanser ilaçlarının terapötik etkililiğinde gelişmeler gösteren deneysel çalışmalarla tamamlanan bilimsel topluluğun ilgisini çekmiştir (Dubey ve ark., 2017).



Şekil 1.3. Hiyaluronik asitin kimyasal yapısı



Şekil 1.4. CD44 reseptörü ve hiyaluronik asitin hücre üzerindeki gösterimi

Nigam ve ark.nın 2014 yılında yapmış olduğu çalışmada (Nigam ve ark., 2014), HA ve grafen kuantum dot (QD) ile modifiye edilmiş HSA nanopartikülleri, gempitabinin pankreatik kansere hedeflenmiş olarak verilmesi için hazırlanmıştır. Bu çalışmada nano formülasyonda kontrollü ilaç salınımı sağlanmıştır. Nanopartikülün HA ile modifiye edilmesi ile pankreas kanser hücreleri hedeflenmiştir. Uygulama sonucunda pankreas kanser hücrelerinde gempitabinin etkinliğinin arttığı gözlenmiştir.

Banzato ve arkadaşlarının 2008’de yapmış olduğu çalışmada (Banzato ve ark., 2008), HA-paklitaksel biyokonjugatı geliştirilmiştir ve CD44 reseptörü hedeflenmiştir. Bu konjugatın reseptör aracılı mekanizma yoluyla hücrelere girdiği gösterilmiştir. Bu çalışmada tümör hücresi büyümesine karşı derişime bağlı bir önleyici etki olduğu belirlenmiştir. Biyokonjuge kaynaklı paklitakselin kan seviyelerinin, konjuge olmayan serbest ilaç ile elde edilenden daha yüksek ve devam ettiğini ortaya koyulmuştur. Tümör hücrelerinin HA-paklitaksel biyokonjugatı ile fareler üzerindeki intraperitoneal tedavisi serbest ilaçla karşılaştırıldığında terapötik etkinlikte artış ortaya koymuştur.

Bu tez çalışmasında ANADOLUCA yöntemi ile sentezlenen HA modifiye albümin nanopartiküllerinin *in vitro* ortamda pankreas kanseri hücrelerinde görüntülenmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda öncelikle BSA etilendiamin ile inkübe edilerek katyonik hale getirilmiştir. İlk defa bu çalışma ile mikroemülsiyon polimerizasyon tekniğiyle sentezlenen HA-BSA nanopartiküllerinin karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Daha sonra nanopartiküllerin standart pankreas kanseri hücre hattında 24 saatlik inkübasyon sonundaki görüntüleri alınmıştır. Nanopartiküllerin floresans özelliklerinden de yararlanarak hücreler ile etkileşimleri incelenmiştir.

2. YÖNTEM

2.1. Kullanılan Kimyasallar

BSA ve BSA-HA nanopartikülünün elde edilmesinde etilendiamin (Sigma-Aldrich), BSA (Sigma), HA (Fluka), 1-etil-3-dimetil-aminopropil-karbodiimid-hidroklorid (EDAC (Sigma-Aldrich), N-hidroksisüksinimid (NHS) (Acros Organics), amonyum persülfat (APS) (Alfa Aesar), distile su ve azot gazı kullanılmıştır. Fotosensitif monomer olarak kullanılan (MATyr)₂Ru(bipyr)₂monomeri literatürdeki prosedüre göre sentezlenmiştir (Say ve ark., 2011).

Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yönteminde Coomassie Brilliant mavisi (Fluka), akrilamid (Merck), N,N'-Metilen bisakrilamid (Sigma-Aldrich), trizma base (Sigma), SDS (Sigma), HCl (Sigma-Aldrich), gliserol (Sigma-Aldrich), 2-merkaptolanol (Sigma), bromofenol mavisi (Sigma-Aldrich), glisin (Sigma), N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin (TEMED) (Sigma) ve distile su kullanılmıştır.

3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid (MTT) yöntemi ile *in vitro* sitotoksitenin belirlenmesi deneyinde ise fetal sıgır serumu (FBS, Sigma), fosfat tamponu (Sigma), Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium (Sigma), tripsin (Sigma-Aldrich), etilendiamintetraasetik asit (EDTA, Sigma-Aldrich), tripan mavisi (Sigma), MTT (Sigma) ve Dimetil sülfoksit (DMSO, Merck) kullanılmıştır.

2.2. Kullanılan Cihazlar

Nanopartikül eldesinde manyetik karıştırıcı (JEIO TECH MS-52M), santrifüj (MPW-251) ve pH metre (Hanna Instruments HI 2211) kullanılmıştır. Thermo Scientific elektroforez sistemi kullanılarak SDS-PAGE jel elektroforezi gerçekleştirilmiştir. Nanopartiküllerin karakterizasyon çalışmalarında ZetaSizer (Malvern Instruments Nano ZS), Floresans Spektrofotometresi (Varian Cary Eclipse), Circular Dichroism (CD) Spektrofotometresi (Chirascan), taramalı elektron mikroskobu (SEM, Carlzeiss), FTIR Spektrofotometresi (Perkin Elmer) ve TGA (Perkin Elmer) analiz cihazı kullanılmıştır.

In vitro sitotoksitate deneylerinde CO₂ inkübatörü (Panasonic), sıcak su banyosu (Julabo TW20), soğutmalı santrifüj (Hermle Z446K), steril kabin (Telstar Bio II Advance), inverted mikroskop (Leica DMi1), hücre görüntüleme cihazı (iRiS™ Digital Cell Imaging System from Logos Biosystems) kullanılmıştır.

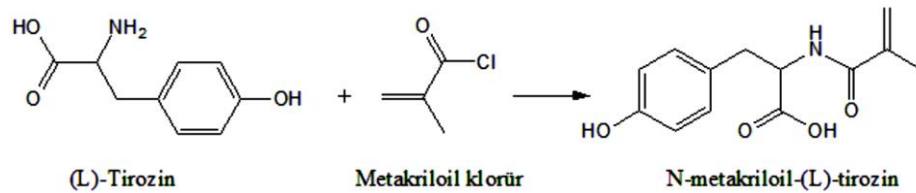
2.3. ANADOLUCA Yöntemi ile Nanopartiküllerin Eldesi

2.3.1. Katyonik BSA eldesi

BSA nanopartikülleri hazırlanmadan önce HA ile etkileştirilmelerini sağlamak amacıyla öncelikli olarak katyonik BSA elde edilmiştir. Bu amaçla, 40 µL 1,4 M etilendiamin, 5 mL %10 (a/h) BSA ile etkileştirilmiştir. EDAC bir spatül ucu kadar eklenmiş ve oda sıcaklığında 2 saat karıştırılmıştır. Ardından pH 4.75 olan 1 mL 4 M asetat tamponu çözeltiliye eklenerek 1 saat daha karıştırılmıştır. Bu süre sonunda reaksiyon ortamından elde edilen partiküllerin boyut elemesi yapılması amacıyla por genişliği 50.000 Da olan moleküler ağırlık kesme (Molecular weight cut-off, MWCO) filtre ile büyük moleküller ultrasantrifüj tekniği ile ayrılmıştır. İşlem sonunda yaklaşık 50.000 Da ağırlıktan küçük partiküller elde edilerek sonraki aşamalarda bu katyonik BSA partikülleri kullanılmıştır.

2.3.2. N-metakriloil amino-(L)-tirozin (MATyr) sentezi

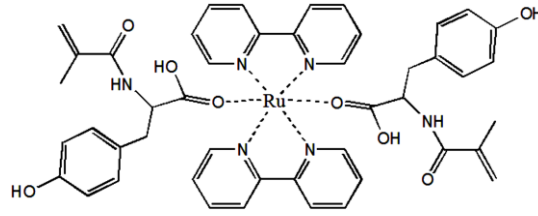
Nano BSA sentezi sırasında reaksiyonda çapraz bağlayıcı olarak kullanılan 3-(4-hidroksifenil)-2-[(2-metakriloil) amino] propanoik asit (metakriloil amino tirozin, (MATyr)) sentezi için uygulanan yöntemde (Şekil 2.1), öncelikli olarak 0,5 g L-tirozin metilester ve 0,2 g hidrokinon, 100 mL diklorometan çözücüsü içerisinde çözülmüştür. Ardından çözeltili 0°C'ye soğutulmuş ve 12,7 g trietilamin çözeltiliye ilave edilmiştir. Daha sonra reaksiyon karışımı üzerine yavaşça 5 mL metakriloil klorür eklenerek, çözeltili azot atmosferi altında manyetik karıştırıcı ile oda sıcaklığında 2 saat karıştırılmıştır. Kimyasal reaksiyon sonunda, hidrokinon ve reaksiyona girmeyen metakriloilin fazlası %10'luk NaOH çözeltisi ile ekstrakte edilmiştir. Daha sonra su fazı döner buharlaştırıcı kullanılarak uzaklaştırılmış ve kalan kısım (MATyr), eter-sikloheksan karışımı ile kristallendirilerek saflaştırılmıştır (Say ve ark., 2011).



Şekil 2.1. N-metakriloil amino-(L)-tirozin sentezi

2.3.3. Bis(2-2'-bipiridil) (MATyr)2 Rutenyum (II) sentezi

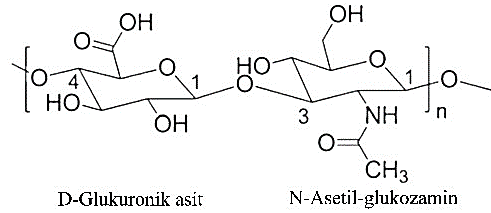
Işığa duyarlı rutenyum merkezli bis(2-2'-bipiridil)(MATyr)₂-Rutenyum(II) (Şekil 2.2) aminoasit-monomerin kimyasal sentezi için uygulanan yöntemde, 1 g diklorobis(2-2'-bipiridil) rutenyum(II) (RuCl₂(bipy)₂) saf su içinde çözülmüş ve çözelti 0°C' a soğutulmuştur. Daha sonra trietilamin ve 1 g MATyr sulu çözeltisi damla damla RuCl₂(bipy)₂ çözeltisine eklenmiştir ve oda sıcaklığında 30 dk. karıştırılmıştır. Karışım 80°C' da 24 saat reflaks edilmiştir. Oluşan kahverengi kompleks süzülmuş, eter ile yıkanmış ve vakum altında kurutulmuştur (Say ve ark., 2011).



Şekil 2.2. bis(2-2'-bipiridil)(MATyr)₂-Rutenyum (II) molekül yapısı

2.3.4. BSA-HA nanopartiküllerinin eldesi

BSA-HA nanopartiküllerinin sentezinden önce, elde edilen katyonik BSA, HA ile etkileştirilerek BSA ve HA moleküllerinin elektrostatik olarak etkileşmesi sağlanmıştır. Şekil 2.3'de HA'nın yapısı ve kimyasal modifikasyona uygun hedef bölgeleri verilmiştir. Bu amaçla, 2000 ppm katyonik BSA, 10.000 kDa HA ile 1 saat boyunca +4°C'de etkileştirilmiştir. BSA ve HA molekülleri etkileştirildikten sonra nano yapılı BSA-HA partiküllerinin sentezine geçilmiştir.



Şekil 2.3. Hiyaluronik asidin kimyasal yapısı ve kimyasal modifikasyon için hedef bölgeler (Schanté ve ark., 2011)

Nano BSA-HA partiküllerinin sentezi ANADOLUCA metoduna göre (Say ve ark., 2011), mikroemülsiyon tekniğiyle azot atmosferinde, gün ışığında, oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Mikroemülsiyon ortamı 0,5 g PVA'nın, 45 mL deiyonize su içinde dispers edilmesiyle elde edilmiştir. ANADOLUCA yöntemine göre; 2000 ppm BSA-HA kompleksi 1 mg/mL derişiminde 250 µL'lik (MATyr)₂-Ru-(MATyr)₂ ile 2 saat azot atmosferinde oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Böylelikle BSA-HA kompleksine fotosensitif rutenyum tabanlı monomer bağlanarak floresans özelliği kazandırılmıştır. Ardından BSA-HA kompleksi PVA çözeltisine eklenerek ve 20 dk. etkileştirilmiştir. Daha sonra, 0,02 g APS'nin 45 mL deiyonize suda çözülmesiyle elde edilen başlatıcı çözeltiden 20 mL reaksiyon ortamına eklenerek, reaksiyon 48 saat boyunca oda sıcaklığında, gün ışığında ve azot atmosferinde 150 rpm karıştırma hızında gerçekleştirilmiştir. 48 saat sonunda hazırlanan BSA-HA nanopartikülleri 6000 rpm'de 20 dk. santrifüjlenerek reaksiyon ortamından ayrılmıştır. Elde edilen BSA-HA nanopartikülleri 2 kere deiyonize su ile yıkanarak reaksiyona girmeyen maddeler yapıdan uzaklaştırılmıştır. Elde edilen BSA-HA nanopartikülleri 4°C'de saklanmıştır.

2.3.5. Nano BSA Sentezi

Elde edilen nano BSA-HA partiküllerinin karakterizasyonunda karşılaştırmalı olarak kullanmak amacıyla nano BSA partikülleri yine ANADOLUCA metoduna göre sentezlenmiştir. Bu amaçla; 2000 ppm 5 mL BSA çözeltisi 250 µL (MATyr)₂-Ru-(MATyr)₂ çapraz bağlayıcıyla 2 saat boyunca azot atmosferinde oda sıcaklığında etkileştirilmiştir. Elde edilen BSA-(MATyr)₂-Ru-(MATyr)₂ kompleksi bölüm 2.3.4'te belirtilen başlatıcı olarak APS'nin de bulunduğu mikroemülsiyon ortamına eklenerek 48 saat boyunca oda sıcaklığında, gün ışığında ve azot atmosferinde 150 rpm karıştırma hızında reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen BSA nanopartikülleri 6000 rpm'de 20 dk. santrifüjlenerek reaksiyon ortamından ayrılmış ve ardından 2 kere deiyonize su ile yıkanarak reaksiyona girmeyen maddeler ortamdaki uzaklaştırılmıştır.

2.4. Albümin Tabanlı Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Sentezlenen albümin tabanlı nanopartiküllerin karakterizasyonu aşamasında nanopartiküllerin molekül büyüklükleri ve saflığı SDS-PAGE analiziyle, morfolojik yapıları ve molekül büyüklükleri SEM görüntülerinin alınması ve zetametre analizleriyle,

nano partiküllerin sentezinde protein yapısının korunup korunmadığı CD spektrumlarının alınmasıyla gerçekleştirilmiştir. Nanopartiküllerin floresans özellikleri nano BSA ile karşılaştırmalı olarak floresans spektrofotometresi ile, sıcaklıkla bozunma spektrumları TGA analizi ile ve atomlar arasındaki bağların belirlenmesi FTIR analizi ile gerçekleştirilmiştir.

2.4.1. SDS-PAGE (Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi) analizi

Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE), proteinler ve nükleik asitler gibi biyolojik makromolekülleri ayırmak için en çok kullanılan yöntemlerden biridir. Makromoleküller, molekülün uzunluğunun, konformasyonunun ve yükünün bir fonksiyonu olan elektroforez hareketliliğine göre birbirinden ayrılırlar. Bu yöntemde akrilamid doğrusal polimerler ve bisakrilamid poliakrilamid zincirleri arasında çapraz bağlar oluşturmaktadır. Jeldeki gözenek büyüklüğü, bisakrilamid ve akrilamid derişimine göre değişmektedir. Yüksek bisakrilamid/akrilamid oranı ve yüksek akrilamid derişimi düşük elektroforetik mobiliteye neden olmaktadır. Akrilamid ve bisakrilamid monomerlerinin polimerizasyonu APS ile indüklenmektedir. Polimerizasyonu desteklemek için genellikle bir serbest radikal stabilizatörü olan TEMED eklenir. SDS amfipatik bir deterjandır ve anyonik baş ve lipofilik kuyruğa sahiptir. Proteinlerin denatüre edilmesi ve negatif yüklenmelerini sağlamak amacıyla SDS kullanılır. Sonuç olarak, negatif yüklü proteinler, pozitif elektrota doğru hareket eder ve elektroforez sırasında büyüklüklerine göre ayrılırlar (Hames, 1998).

Literatürde, Laemmli (1970)'nin protein karakterizasyon işleminde, SDS-PAGE'de %5'lik yükleme jeli ve %12'lik ayırma jeli kullanılmış, örnekler yüklendikten sonra sırasıyla 16 ve 30 mA'de elektroforezde yürütülmüş ve jel bir gece Coomassie Brilliant mavisinde boyandıktan sonra 2 saat fiksatifte bekletilip dekolorize edilmiş ve fotoğrafı çekilmiştir. Tablo 2.1'de bu yöntemde hazırlanan çözeltilerin oranları verilmiştir.

Tez kapsamında yapılan çalışmada, sentezlenen katyonik BSA'nın ve nano BSA-HA partiküllerinin molekül ağırlığı ve saflığı SDS-PAGE analiziyle tayin edilmiştir. Bu amaçla, aşağıda detayları verilen çözeltiler kullanılmıştır.

Tablo 2.1. Modifiye edilmiş Laemmli Yöntemi'ne göre SDS jel elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının hazırlanması

	Ayırma jeli (%12 T)	Yükleme jeli (%5 T)
Monomer (A)	12 mL	1,6 mL
Tampon	7,5mL (B)	2,5 mL (C)
%10 SDS (D)	0,3 mL	0,1 mL
H₂O	10,2 mL	5,63 mL
TEMED	15 µL	5 µL
Karışımın havası alınır		
APS (E)	300 µL	100 µL

Kullanılan SDS-PAGE Stok Çözeltileri:

- A)** *Monomer (akrilamid/bis) çözeltisi (%30 T, %2.7 C_{bis}):* 29,2 g akrilamid, 0,8 g bis tartılarak deiyonize distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Karanlıkta 4°C'de saklanmıştır.
- B)** *4X ayırma jeli tamponu (1,5 M Tris, pH 8.8):* 18,15 g Tris 3 N HCl ile pH 8.8'e ayarlanmıştır. Daha sonra deiyonize distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. 4°C'de saklanmıştır.
- C)** *4X yükleme jeli tamponu (0,5 M Tris, pH 6.8):* 3 g Tris 5 N HCl ile pH 6.8'e ayarlanmıştır ve deiyonize distile su ile 50 mL'ye tamamlanmıştır. 4°C'de saklanmıştır.
- D)** *%10 SDS:* 10 g SDS tartılarak deiyonize distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Oda sıcaklığında saklanmıştır.
- E)** *%10 APS (polimerizasyon başlatıcı):* Kullanılmadan hemen önce 0,5 g APS'nin deiyonize distile su ile 5 mL'lik çözeltisi hazırlanmıştır.
- F)** *Ayırma jeli yüzey çözeltisi (0,375 M tris, %0,1 SDS, pH 8.8):* 25 mL Tris (B), 1 mL SDS (D) deiyonize su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Oda sıcaklığında saklanmıştır.
- G)** *2X örnek uygulama tamponu (0,125 M tris, %4 SDS, %20 gliserol, %10 2-merkaptolanol, %0,2 bromofenol mavisi pH 6.8):* 2,5 mL tris (C), 4 mL SDS (D), 2 mL gliserol, 1 mL 2-merkaptolanol, 0,02 g bromofenol mavisi deiyonize su ile 10 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti – 20°C'de saklanmıştır.
- H)** *5X tank tamponu (0,025 M tris, 0,192 M glisin, %0,1 SDS, pH 8.3):* 15 g Tris, 72 g glisin, 5 g SDS deiyonize su dan oluşan 1000 mL'lik çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti 4°C'de saklanmıştır ve kullanılacağı zaman oda sıcaklığına gelmesi beklenmiş ve 5 defa su ile seyreltilmiştir.

Ayırma jeli dökmeye hazır olunca, hemen TEMED eklenmiştir ve döküm haznesindeki cam plakalar arasında kısa plakanın altına kadar yavaşça dökülmüştür. Jel

seviyesini düzeltmek ve mevcut olabilecek istenmeyen hava kabarcıklarını uzaklaştırmak için polimerizasyondan önce jelin üstüne çok az bütanol eklenmiştir. Jel polimerize edildikten sonra, bütanol uzaklaştırılmıştır. Daha sonra kuyu oluşturucu tarak cam plakalar arasındaki açıklığa yerleştirilmiştir. Yükleme jeli hazırlandıktan sonra hızlıca TEMED eklenmiştir ve ayırma jelinin üzerine yavaşça dökülmüştür. Yükleme jelinin polimerizasyonu tamamlandığında kuyu oluşturucu tarak dikkatlice çıkarılmıştır. Jel kuyularının olduğu kısma yeterli miktarda tank tamponu konulmuştur. Numunelerin boyanması ve denatüre edilmesi amacıyla örnek uygulama tamponu ile karıştırılan numuneler sıcak su banyosunda 4 dk. bekletilmiştir. Daha sonra her bir kuyucuğa boyalı denatüre örneklerden 10'ar μL yüklenmiştir. Elektroforez düzeneği çalışır duruma getirildikten sonra numuneler yaklaşık 1 saat yürütülmüştür. Yürütme işleminden sonra jel yavaş akan su altında dikkatlice düzeneden ayrılmıştır. Jel üzerindeki numuneler 30 dk. fiksatif (%40 metanol, %10 asetik asit) içerisinde bekletilmiştir. Bu süre sonunda distile su ile yıkanan jel üzerindeki proteinler fiksatif çözeltisi ile hazırlanan Coomassie Brilliant Blue ile 4-5 saat bekletilerek boyanmıştır. Boyanın protein olmayan bölgelerden uzaklaşması amacıyla yıkama işlemi yapılmıştır. Son olarak görüntüsü alınan jelin değerlendirilmesi yapılmıştır.

2.4.2. Nanopartiküllerin boyut analizi

Sentezlenen nano BSA-HA partiküllerinin partikül boyutu, zetametre ve SEM görüntülerinin alınmasıyla belirlenmiştir. Bu amaçla, 2000 ppm nanopartiküllerden 100 μL alınarak 3 mL'ye distile su ile seyreltilmiş ve ölçümler 25°C'de 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

SEM analizi için örnekler silisyum üzerine damlatılarak etüvde yarım saat bekletilmiş ardından, altın kaplanarak görüntüler alınmıştır. SEM görüntüleri alınırken de partiküllerin boyutları belirlenerek zetametre ölçümleriyle karşılaştırılmıştır.

2.4.3. Nanopartiküllerin floresans spektroskopisi analizi

Sentezlenen nano BSA-HA partiküllerinin floresans özellikleri rutenyum tabanlı aminoasit monomerlerle etkileştirilerek elde edilen kompleksin floresans özellikte olmasından kaynaklanmaktadır. Bu doğrultuda sentezlenen yapıların floresans analizleri 2000 ppm nanopartiküllerden 100 μL alınarak 3 mL'ye distile su ile seyreltilmiş

örneklerle gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, aynı derişimlerde nano BSA ve nano BSA-HA'nın floresans spektroskopisiyle analizi yapılarak elde edilen veriler karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

2.4.4. Nanopartiküllerin FTIR spektroskopisi analizi

IR spektrumu, maddeyi oluşturan atomlar arasındaki bağların titreşimiyle oluşan frekanslarına karşılık gelen absorpsiyon pikleri ile örneğin parmak izini göstermektedir. Her maddenin kendine özgü bir FTIR spektrumu vardır. FTIR spektroskopisi katı, sıvı ve gaz örneklerin analizinde kullanılmaktadır. FTIR analizi yapılması planlanan katı örnekler için üç farklı hazırlama tekniği kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden ilkinde örnek KBr (130°C' de 4 saat kurutularak elde edilen) ile karıştırılarak ince disk haline getirilmektedir. İkinci teknikte ise KBr kullanılmaksızın örneğin kendisi ince bir film haline getirilmektedir. Üçüncü yöntem olan solüsyon tekniğinde ise örnek bir çözügen içerisinde çözülerek analize hazırlanmaktadır. İnce film veya disk tekniğinde film formuna getirilmiş maddelerin kalitatif ve kantitatif analizi yapılmaktadır. Solüsyon tekniğinde ise çözülmüş maddelerin kalitatif analizi yapılabilmektedir.

Nano BSA-HA partiküllerinin FTIR Spektroskopisi analizi için KBr tabletleri hazırlanmış ve 2 KBr tableti arasında 1 damla nanopartikül örneklerinden damlatılarak spektrum alınmıştır. Elde edilen FTIR spektrumları nano BSA'nın FTIR spektrumlarıyla karşılaştırılarak, nano BSA-HA'nın yapısı yorumlanmıştır.

2.4.5. Nanopartiküllerin TGA analizi

Termogravimetri, genel olarak malzemelerde sıcaklığın veya zamanın bir fonksiyonu olarak meydana gelen kütle kaybı ve/veya kazanımlarının belirlenmesinde kullanılır. Deney numunesi, sabit ısıtma hızında ısıtılır ve kütle değişimi sıcaklığın bir fonksiyonu olarak ölçülüp kaydedilir. Alternatif olarak, numunenin, uygun bir sabit sıcaklıkta, belli bir zaman aralığında kütle değişimi zamanın bir fonksiyonu şeklinde ölçülüp kaydedilir. Genel olarak, deney numunesinin kütle değişimine neden olan reaksiyonlar; bozunma veya yükseltgenme reaksiyonları veya bir bileşenin buharlaşmasıdır. Kütle zamana veya sıcaklığa karşı çizilen grafiği TG eğrisidir. Sıcaklığın fonksiyonu olarak malzemenin kütledeki değişim ve bu değişimin yayıldığı aralık malzemenin termal kararlılığının göstergesidir. TG verileri, aynı deney şartları

altında elde edilen ölçümler kullanılmak kaydıyla, aynı monomerden elde edilmiş polimerler ailesinin bağıl termal kararlılıklarının değerlendirilmesinde ve polimer-polimer veya polimer-katkı maddesi etkileşimlerinin irdelenmesinde kullanılabilir.

Sentezlenen nano BSA ve nano BSA-HA partiküllerinin kütlece bileşimlerinin analizleri termogravimetrik analizle belirlenmiştir. Bu amaçla eşit miktarlarda nano partiküller yüksek sıcaklıklarda bozunması sağlanarak elde edilen piklerden kütlece bileşim analizi yapılmıştır.

2.4.6. Nanopartiküllerin CD analizleri

CD Spektroskopisi, moleküler yapıların dairesel dikroizm analizini belirli bir dalga boyu aralığında ölçebilen spektroskopik bir yöntemdir. Ölçümler, elektromanyetik spektrumun görünür ve UV bölgesinde gerçekleştirilmektedir. Dairesel dikroizm analizinde polarize demetin dairesel bileşenlerinden birinin diğerinden daha fazla absorblanmasıyla oluşan absorpsiyon farkı nedeniyle eliptik polarize demet meydana gelmektedir. Sağ ve sol dairesel polarize ışık arasındaki absorpsiyon farkı sonucunda ise “dairesele dikroizm” oluşmaktadır. Dairesel polarize ışığın optikçe aktif taneciklerle etkileşimi sonucunda da makromoleküllerin yapısal, kinetik ve termodinamik özellikleri ile ilgili bilgiler elde edilmektedir.

Bu yöntem, protein katlamaları ve sekonder yapılarda, DNA/RNA etkileşimlerinde, enzim kinetiği çalışmalarında ve genellikle kiral yapıdaki moleküllerin yapısını incelemek amacıyla kullanılmaktadır. Proteinlerin sekonder yapısı sıcaklık ve pH gibi çevresel faktörlerden etkilenmektedir. Bu yöntem ile sekonder yapıların çevresel faktörlerden nasıl etkilendiği ve diğer moleküllerle etkileşimi incelenmektedir.

Sentezlenen nano BSA-HA partiküllerinin nano yapısı elde edildiğinde protein yapısının korunup korunmadığı CD analiziyle takip edilmiştir. Buna göre 100 µL’lik 2000 ppm’lik örnekler kuvarz CD kuvvetlerine uygulanarak 180-350 nm aralığında analizleri yapılmıştır. Elde edilen veriler nano BSA ve BSA ile karşılaştırılmıştır.

2.5. Hücre Kültürü Çalışmaları

Nanopartiküllerin sitotoksik etkileri PANC-1 ATCC® CRL146 hücreleri kullanılarak değişik derişim aralıklarında (BSA nanopartikülü: 125-0,2 µg/mL ve BSA-HA nanopartikülü: %0,5-0,001 mL/mL) steril koşullarda değerlendirilmiştir. Bu amaçla,

nanopartiküllerin PANC-1 hücrelerinde oluşturduğu sitotoksik etki *in vitro* MTT testi ile belirlenmiştir. Bunun için nanopartiküller hücreler ile birlikte 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda MTT boyası eklenmiştir ve canlılığı devam eden hücreler mor renge dönüşmüştür. Mikroplaka okuyucuda ölçüm alınmadan önce, hücrelerden mor rengi çözündürmek için DMSO eklenmiştir. 5 dk. bekletildikten sonra yüzde canlılığın tespit edilmesi için 540 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüm alınmıştır. Numune içermeyen kontrol kuyularından elde edilen absorbans değerleri %100 canlılık kabul edilerek nanopartikül kuyularındaki hücre canlılığı hesaplanmıştır. Toksik olmayan ve canlılığın daha yüksek olduğu derişim belirlendiğinde nanopartiküllerin floresans özelliklerinden yararlanarak 24 saat inkübe edilmiş nanopartikül ile hücrelerin görüntüleme çalışmaları yapılmıştır.

2.5.1. Hücrelerin çoğaltılması

Deneylerde kullanılan hücrelerinin çoğaltılması ve deneye hazırlanması için 2-3 günde bir rutin olarak pasajlama işlemi yapılmıştır. PANC-1 hücreleri RPMI ve %10 FBS içeren besi ortamı içeren flasklarda, 37°C'de, %5 CO₂ içeren ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinden sonra ölü hücrelerin besiyerine geçmesini sağlamak için flask hafifçe çalkalanmıştır ve steril bir pipetle kültür şişesi içindeki besiyeri alınarak atılmıştır. Hücrelerin yıkanması için flask içerisine 5 mL fosfat tamponu ilave edilmiştir ve yıkama çözeltisi ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Daha sonra ortama tripsin EDTA çözeltisi (1X) konularak hafifçe çalkalandıktan sonra inkübatörde yaklaşık 5 dk. bekletilmiştir. İnkübatörden alınan hücrelerin üzerine 20-25 mL besiyeri ilave edilerek hücreler süspanse edilmiştir ve bölünerek yeni kültür flasklarına alınmıştır. Daha sonra hücreler tekrar inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat inkübasyondan sonra flask hafifçe çalkalanmıştır ve ortamdaki besiyeri atılmıştır. Flask içerisine tripsin-EDTA çözeltisi konularak hafifçe çalkalandıktan sonra inkübatörde yaklaşık 5 dk. bekletilmiştir. Daha sonra ortama besiyeri ilave edilerek pipet yardımıyla santrifüj tüpüne alınmıştır ve santrifüj tüpü içindeki hücre süspanasyonu çalkalandıktan sonra 10 µL alınarak 10 µL tripan mavisini ile boyanmıştır. Oluşan çözeltinin 10 µL'si thoma lamı kullanılarak sayılmıştır. Şekil 2.4'de inverted mikroskopla Thoma lamında hücre sayımı ekipmanı gösterilmiştir.



Şekil 2.4. *Inverted mikroskopta Thoma lamı ile hücre sayımı*

2.5.2. *In vitro* sitotoksik etkinin belirlenmesi

Test edilecek numunelerin *in vitro* sitotoksik etkileri PANC-1 hücre hatları üzerinde MTT testi kullanılarak belirlenmiştir.

Deney için yeterli sayıya ulaşan hücreler Thoma lamı ile sayılarak 96 kuyucuklu plakalara her kuyucuğa 2×10^4 hücre gelecek şekilde 100 μ L kadar ekilmiştir. Hücreler 24 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra test maddelerinin seri dilüsyonları 100'er μ L uygulanmıştır. 24 saat inkübasyondan sonra, besiyerleri hücrelerden uzaklaştırılmıştır. Hücreler fosfat tamponu ile hazırlanan 5 mg/mL MTT solüsyonu ile 3 saat CO₂ inkübatöründe inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda MTT içeren besiyerleri kuyucuklardan uzaklaştırılmış ve her kuyucuğa 100 μ L DMSO ilave edilip, 5 dk. beklendikten sonra plakalardaki hücrelerin optik dansiteleri spektrofotometrik olarak 540 nm dalga boyunda ELISA okuyucuda okutulmuştur. Test maddeleri ile muamele edilmeyen kontrol hücre canlılığı %100 olarak kabul edilerek, hücrelerin canlılık oranları % olarak ifade edilmiştir. Deneyle 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir (Mossmann, 1983; Keiser vd., 2000).

2.5.3. Hücrelerin görüntülenmesi

Hücre görüntüleme çalışmaları için 6 kuyucuklu steril plakanın her kuyucuğuna 10×10^4 hücre ekilmiştir. 24 saat inkübasyondan sonra 32 μ g/mL BSA ve %0,125 mL/mL HA-BSA nanopartikülü hücrelere uygulanmıştır ve tekrar 24 saat inkübasyona

bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda hücrelerin fikse edilmesi amacıyla 1 mL %90'lık etanol 5 dk. süreyle hücrelere uygulanmıştır. Daha sonra distile su ile 5 defa yıkama yapılmıştır. Pankreas kanseri hücreleri ile etkileştirilen BSA ve HA-BSA nanopartikülleri dijital hücre görüntüleme cihazında (Şekil 2.5) görüntülenmiştir.

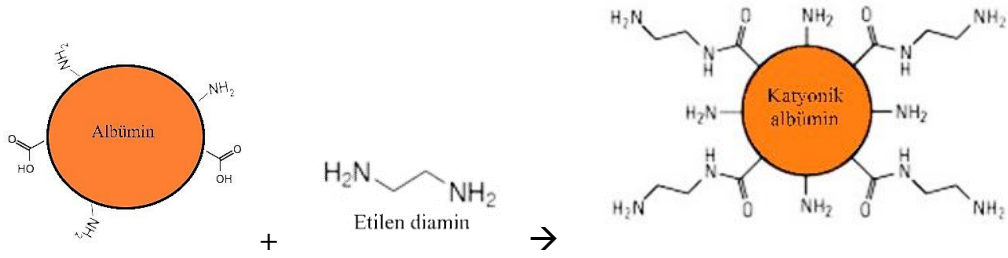


Şekil 2.5. Hücrelerin görüntülenmesi

3. BULGULAR VE YORUM

3.1. BSA-HA Nanopartiküllerinin Eldesi

Bu çalışmada; öncelikle ANADOLUCA yöntemi ile BSA ve BSA-HA nanopartikülleri elde edilmiştir. BSA'nın katyonik hale getirilmesi sayesinde nanopartikülün HA ile modifikasyonu sağlanmıştır. BSA'nın etilendiamin ile inkübasyonu sonucunda elde edilen katyonik albümin Şekil 3.1'de şematize edilmiştir.

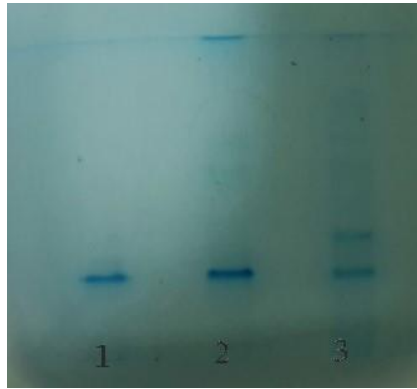


Şekil 3.1. Katyonik BSA oluşumu

3.2. Albümin Tabanlı Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

3.2.1. SDS-PAGE (Sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforezi) analizi

BSA nanopartikülü ve BSA-HA nanopartikülleri poliakrilamit jelde elektriksel alanda yürütülerek saflıkları ve nanopartiküllerin BSA içerip içermedikleri tespit edilmiştir. Nanopartiküller BSA'nın yürüme mesafesinde spotlar vermişlerdir. Şekil 3.2'de görüldüğü gibi 1. katyonik BSA'nın vermiş olduğu spot, 2. nano-BSA'nın vermiş olduğu spottur. 3'de görülen bant nano BSA-HA'nın içerdiği BSA ve HA'nın vermiş olduğu spotları içermektedir.

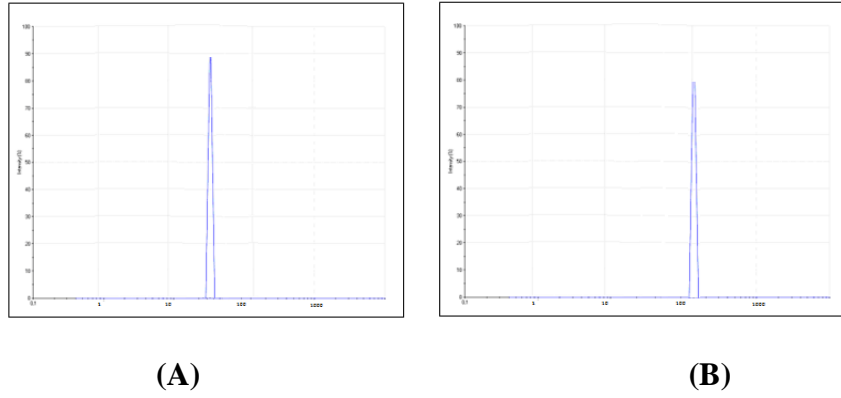


Şekil 3.2. SDS page jel görüntüsü; 1. BSA, 2. BSA nanopartikülü, 3. BSA-HA nanopartikülü

3.2.2. Nanopartiküllerin boyut analizi

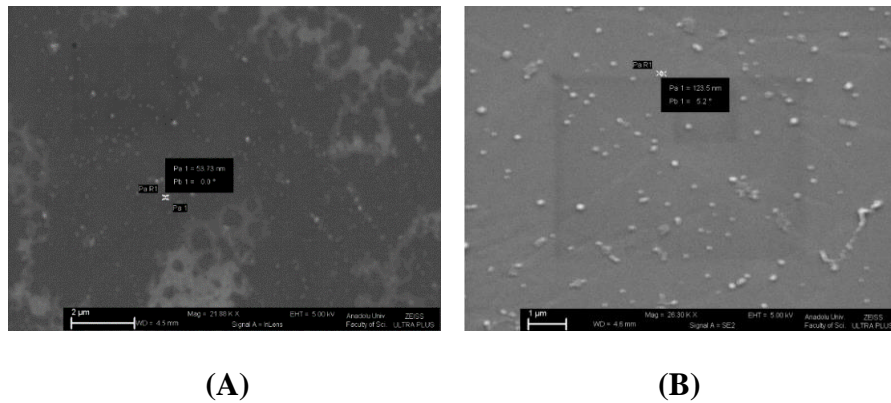
ANADOLUCA yöntemine göre elde edilen nanopartiküllerin yüzey özellikleri ve partikül boyutunun belirlenmesi için SEM görüntüleri alınmış ve zeta metre ile boyutları belirlenmiştir.

Şekil 3.3’de BSA ve BSA-HA nanopartiküllerinin zeta boyut analizi verilmiştir. Buna göre partiküllerin boyut dağılımının sırasıyla 55-60 nm ve 110-125 nm aralığında olduğu görülmektedir.



Şekil 3.3. A. BSA nanopartiküllerinin zeta boyut analizi, B. BSA-HA nanopartiküllerinin zeta boyut analizi

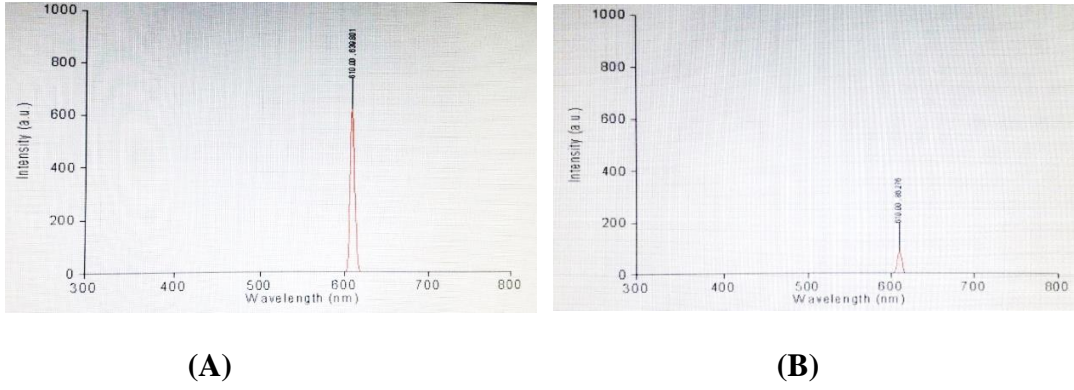
BSA nanopartiküllerinin SEM görüntüsü Şekil 3.4 A’da verilmiştir. Buna göre BSA nanopartiküllerinin boyutu 53,73 nm olarak tespit edilmiştir. Şekil 3.4 B’de HA modifiye BSA nanopartiküllerinin SEM görüntüsü verilmiştir. BSA-HA nanopartiküllerin boyutu ise 123,5 nm olarak ölçülmüştür.



Şekil 3.4. A. BSA nanopartiküllerinin SEM görüntüsü B. BSA-HA nanopartiküllerinin SEM görüntüsü

3.2.3. Nanopartiküllerin floresans spektroskopisi analizi

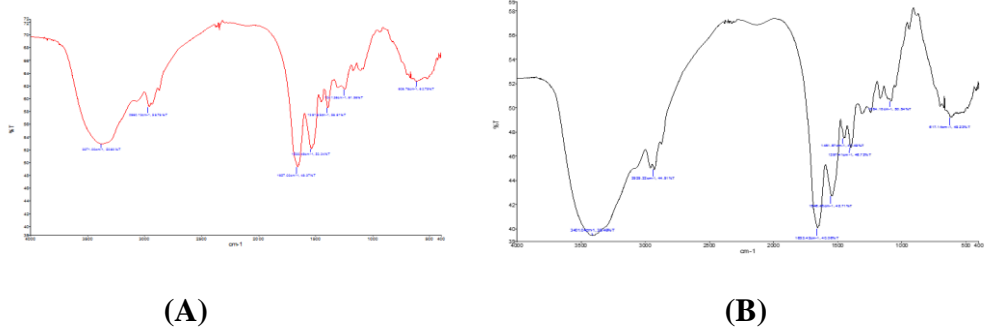
ANADOLUCA yöntemine göre elde edilen nanopartiküllerin floresans özellikleri floresans spektroskopisi ile değerlendirilmiştir. BSA ve BSA-HA nanopartiküllerinin floresans spektrumu Şekil 3.5’de verilmiştir. Buna göre 610 nm’de BSA nanopartiküllerine ait floresans piki elde edilmiştir. Şekil 3.5 B’de verilen pik değerlendirildiğinde, BSA-HA nanopartiküllerine ait floresans pikinin BSA nanopartiküllerine ait pikten (Şekil 3.5 A) daha düşük şiddette olduğu görülmüştür. Bu sonuç, floresans özellikteki BSA nanopartiküllerine floresans özellikte olmayan HA’nın bağlanmasıyla ilişkilendirilmektedir.



Şekil 3.5. A. BSA nanopartiküllerinin floresans spektrumu B. BSA-HA nanopartiküllerinin floresans spektrumu

3.2.4. Nanopartiküllerin FTIR spektroskopisi analizi

BSA ve BSA-HA nanopartiküllerinin içerdiği fonksiyonel grupların aydınlatılması ve BSA-HA’nın yapısının BSA nanopartikülleriyle karşılaştırılması amacıyla KBr tabletleri hazırlanarak her iki tür nanopartikülün de FTIR spektrumları alınmıştır. Şekil 3.6 A BSA nanopartikülünün, Şekil 3.6 B ise BSA-HA nanopartiküllerinin FTIR spektrumlarını göstermektedir.

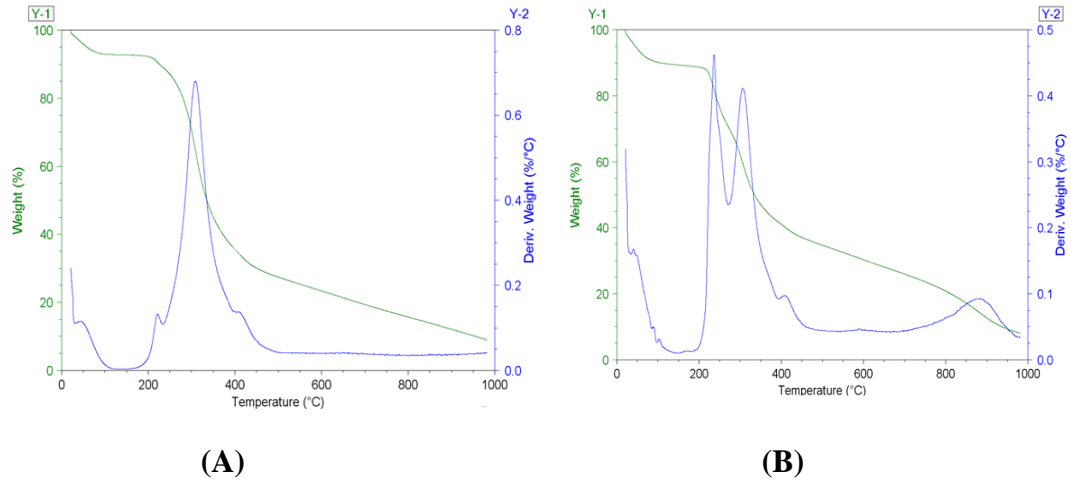


Şekil 3.6. A. BSA nanopartiküllerinin B. BSA-HA nanopartiküllerinin FTIR spektrumları

FTIR spektrumu değerlendirildiğinde, Şekil 3.6 B'deki spektrumda BSA piklerine ek olarak (1540 cm⁻¹'de amit I yapısındaki C=O gerilmesi ve amit II yapısındaki N-H eğilmesi, 1384 cm⁻¹'de C-N gerilme pikleri) HA'nın yapısındaki O-H gerilmesinin karakteristik piki 3322 cm⁻¹ ve yaklaşık 1680 cm⁻¹ de gelen CO-NH amid bağınyı belirten piklerin varlığı BSA nanopartiküllerinin HA ile modifiye olduğunu işaret etmektedir.

3.2.5. Nanopartiküllerin TGA analizi

BSA ve BSA-HA nanopartiküllerinin termogravimetrik analiz sonuçları Şekil 3.7'de verilmektedir.

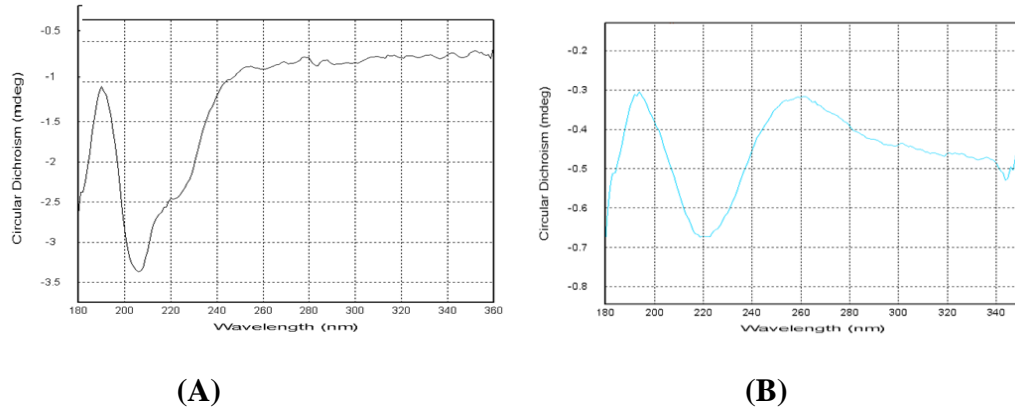


Şekil 3.7. A. BSA nanopartiküllerinin B. BSA-HA nanopartiküllerinin TGA analizi

Elde edilen verilere göre, sıcaklıkla bozunma eğrilerine bakıldığında Şekil 3.7 A’da belirtilen termogramda BSA nanopartikülleri iki basamaklı bir bozunma eğrisine sahip iken, Şekil 3.7 B’de belirtilen BSA-HA nanopartiküllerine ait termogramda BSA nanopartiküllerininkine ek olarak ekstra iki bozunma eğrisi daha görülmektedir. Görülen ekstra iki bozunma eğrileri HA’nın yapısındaki N-asetil glikozamin ve glukuronik asit kısımlarından meydana gelmektedir. Böylelikle TGA analiziyle de BSA nanopartiküllerinin HA ile modifikasyonu kanıtlanmıştır.

3.2.6. Nanopartiküllerin CD analizleri

Sentezlenen BSA ve BSA-HA nanopartiküllerinin yapılarındaki proteinlerin konformasyonlarında modifikasyon öncesi ve sonrası değişimin takibi için her iki tür nanopartikülün CD analizi yapılmıştır. Şekil 3.8, BSA ve BSA-HA nanopartiküllerinin CD spektrumlarını göstermektedir.

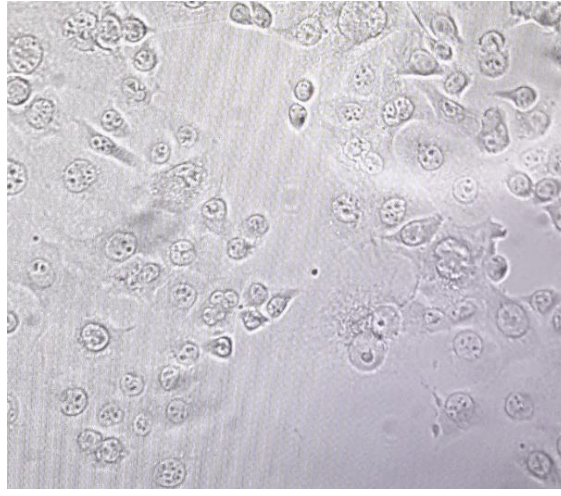


Şekil 3.8. A. BSA nanopartikülleri B. BSA-HA nanopartikülleri için CD spektrumu

Buna göre, Şekil 3.8 A’da 190-210 nm arasında gelen pik α -heliks katlanması 210-230 nm arasında gelen pik β -katlanmalarını ifade etmektedir. 320-360 nm arasındaki bölge ise nanopartiküllerin yapısındaki aromatik grupları ifade eden bölgedir. Şekil 3.8 B’deki spektrum değerlendirildiğinde ise, α -heliks katlanmasının yapıda devam ettiği ancak HA’nın yapıya modifiye olmasıyla rastgele katlanmaların arttığı görülmektedir. Yine 320 nm’den sonraki bölgede BSA-HA nanopartiküllerinin yapısındaki aromatik yapılar görülmektedir. CD spektrumları değerlendirildiğinde, protein yapısında modifikasyon sonrası herhangi bir deformasyon olmadığı görülmektedir.

3.3. Hücre Kültürü Çalışmaları

RPMI ve FBS içeren besi ortamında, 37°C’de, %5 CO₂’li ortamda 2-3 günlük pasajlama işlemleri ile çoğaltılan pankreas kanseri hücreleri 6 kuyucuklu steril plakanın her kuyucuğuna 10x10⁴ sayıda olacak şekilde ekilmiştir. 24 saatlik inkübasyondan sonra 5 defa yıkanan hücrelerin dijital görüntüleme cihazı ile görüntüleri alınmıştır. Şekil 3.9’da numune içermeyen kuyucuktaki hücrelerin görüntüsü verilmiştir.



Şekil 3.9. PANC-1 hücrelerinin mikroskop görüntüsü

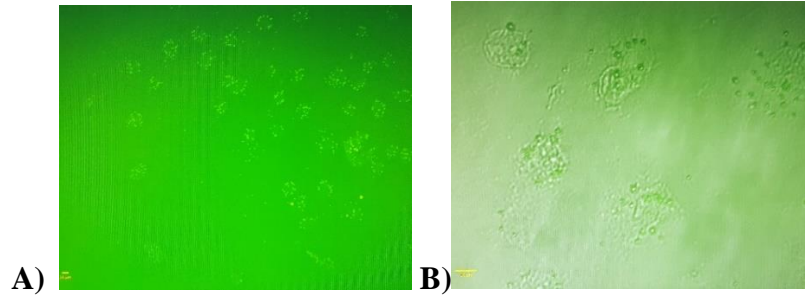
Nanopartiküllerin *in vitro* sitotoksik etkilerinin belirlenmesi çalışmalarında değişik derişim aralıklarında doza bağımlı olmayan etki gözlenmiştir. ANADOLUCA yöntemi ile elde edilen BSA nanopartikülleri 125-0,2 µg/mL derişim aralığında pankreas kanseri hücreleriyle etkileştirilmiştir. Sonuçlar kontroller ile karşılaştırıldığında %44,2-55,0 aralığında hücre canlılıkları gözlenmiştir (Tablo 3.1). BSA nanopartikülleri 32 µg/mL derişimde pankreas kanseri hücreleriyle 24 saat inkübe edilmiştir ve sonuçta oluşan etki dijital hücre görüntüleme cihazında incelenmiştir. Buna göre tabana yapışan hücrelerin canlılıklarını koruduğu gözlenmiştir. Görüntülere göre floresan özellikteki nanopartiküllerin etrafa yayılmış şekilde ve hücrelerin etraflarında oldukları saptanmıştır. Şekil 3.10’da BSA nanopartiküllerinin pankreas kanseri hücreleri ile inkübasuonu sonucu çekilen görüntüleri verilmiştir. Buna göre Şekil 3.10 A’da BSA nanopartikülleri hücrelerin duvarlarında yoğun bir şekilde olmak üzere hücrelerin etrafında floresan ışımaya yayan partiküller şeklinde 10X büyütmede gözlenmiştir. Şekil 3.10 B’de ise aynı görüntü

20X büyütmede alınmıştır. Yine bu görüntüde floresan ışığa yayan BSA nanopartikülleri gözükmemektedir.

Tablo 3.1. Hücrelerin MTT testi ile belirlenen % canlılık sonuçları

BSA nanopartikülü (µg/mL)	% canlılık	±std	HA-BSA nanopartikülü % (mL/mL)	% canlılık	±std
125	49,9	3,2	0,5	68,3	3,4
62,5	52,2	0,7	0,25	51,2	1,8
31,2	51,0	1,4	0,125	44,5	1,3
15,6	44,2	0,4	0,062	49,5	2,8
7,8	48,1	4,3	0,031	53,5	1,6
3,9	51,0	1,8	0,016	56,2	3,6
1,9	50,7	1,9	0,008	62,0	1,9
1,0	44,3	0,5	0,004	66,4	1,7
0,5	46,4	0,8	0,002	53,9	0,6
0,2	55,0	2,8	0,001	70,5	1,7

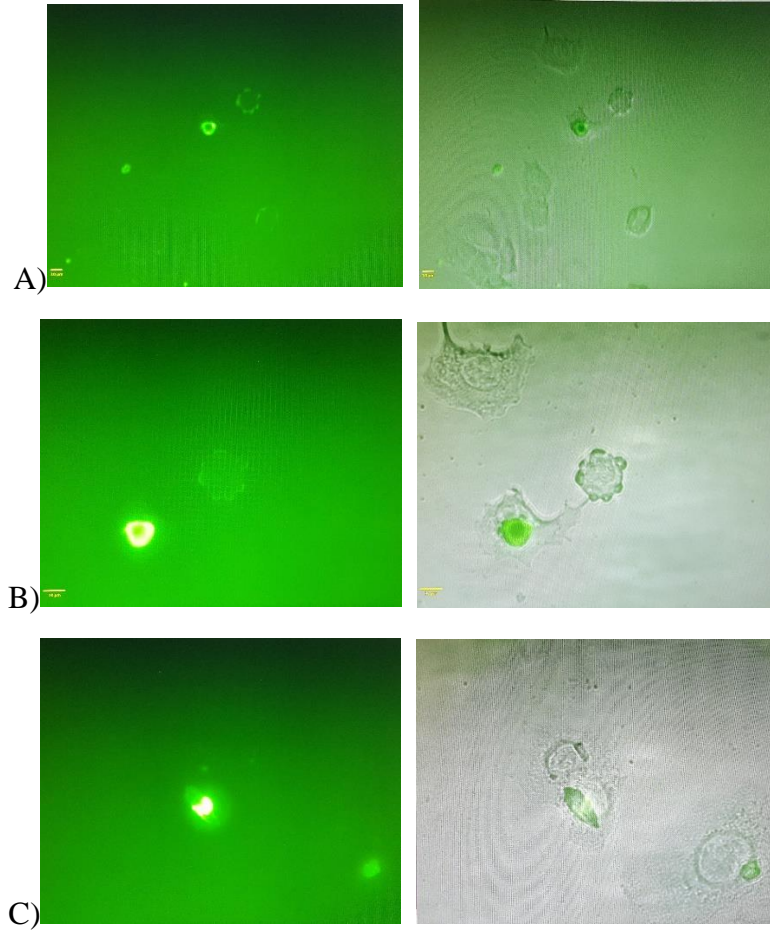
std: standart sapma



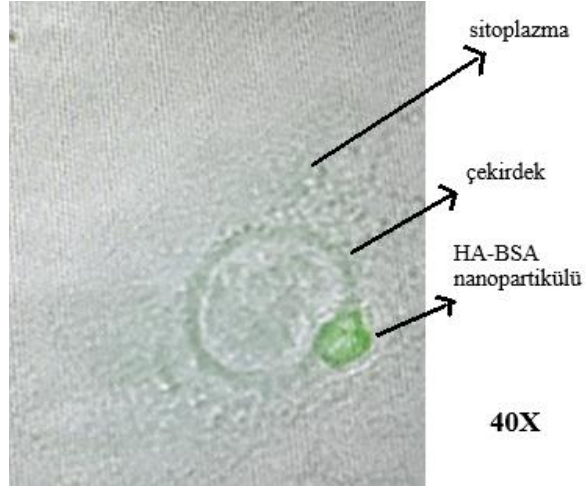
Şekil 3.10. BSA nanopartiküllerinin PANC-1 hücrelerindeki mikroskop görüntüleri; A)10x, B)20x

ANADOLUCA yöntemi ile elde edilen BSA nanopartiküllerinin katyonik hale getirilmeleri ve HA ile modifikasyonu sonucu elde edilen BSA-HA nanopartikülleri %0,5-0,001 mL/mL derişim aralığında hücreler ile etkileştirilmiştir. Sonuçta doza bağlı olmayan etki göstererek hücre canlılıkları %44,5-70,5 olarak belirlenmiştir (Tablo 3.1). BSA-HA nanopartikülleri %0,125 mL/mL derişimde hücrelere uygulanmıştır. 24 saatlik inkübasyondan sonra dijital görüntüleme cihazında hücrelerin nanopartiküller ile olan etkileşimleri incelenmiştir. Buna göre pankreas kanseri hücreleri plaka tabanına yapışmış ve canlılıklarını korumuştur. Görüntülerde BSA-HA nanopartikülleri hücrelerin etrafında, hücre içlerinde sitoplazmada ve hücre çekirdeğinin yanında belirlenmiştir. Bunun yanında nanopartiküllerin hücreler ile etkileşimlerinin homojen olmadığı gözlenmiştir. Şekil 3.11’de BSA-HA nanopartiküllerinin pankreas kanseri hücreleri ile çekilen görüntüleri verilmiştir. Buna göre Şekil 3.11 A’da floresan ışığa yayan

nanopartiküllerin hücrenin çekirdeği etrafındaki 20X büyütmede çekilen görüntüsü verilmiştir. Şekil 3.11 B’de ise Şekil 3.11 A’daki görüntüye daha çok yaklaşılarak 40X büyütmede görüntü çekilmiştir. Bu görüntüde sitoplazması dağılmış hücrenin çekirdeği etrafında floresan ışımaya yapan nanopartiküller açık bir şekilde gözükmektedir. Şekil 3.11 C’de hücrenin içinde sitoplazmada görüntülenen diğer BSA-HA nanopartikülleri yer almaktadır. Şekil 3.12’de nanopartikülün hücrede konumlanması ve hücrenin kısımları gösterilmiştir.



Şekil 3.11. BSA-HA nanopartiküllerinin PANC-1 hücrelerindeki mikroskop görüntüleri;
A)20x, B)40x, C)40x



Şekil 3.12. *Mikroskop görüntüsünde nanopartikülün ve hücre kısımlarının gösterilmesi*

4. SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER

Albümin biyolojik olarak parçalanabilir ve düşük toksisiteye sahip bir doğal proteindir. Son yıllarda albüminin tümörlerde birikme eğiliminde olması ve yapısındaki işlevsel grupların kolayca modifikasyonunun yapılabilmesi nedenleriyle hedefe yönelik nanoalbümin çalışmaları hız kazanmıştır. Günümüzde pankreas kanseri hastalığın ileri aşamalarında tespit edilebilen hasta üzerinde ciddi semptomlar gösteren ölümcül bir hastalıktır ve bu kanserde HA ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Bu nedenle HA reseptörü olan CD-44, pankreas kanseri tedavisinde umut vadetmektedir. Bu bilgilerden hareketle bu tez çalışmasında hedefe yönelik HA modifiye albümin tabanlı nanopartiküller geliştirilmesi ve pankreas kanseri hücreleri ile etkileştirilerek etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Bu tez çalışmasında daha önceden bilinen bir nanopartikül sentezleme yaklaşımı olan ANADOLUCA temel alınmıştır. BSA'nın HA ile modifikasyonu için öncelikle BSA etilendiamin ile inkübe edilerek katyonik hale getirilmiştir. Etilendiamin BSA'nın karboksil gruplarına bağlanarak amino grupları bakımından fazla BSA elde edilmiştir. Daha sonra oda sıcaklığında, gün ışığında ve azot atmosferinde mikroemülsiyon polimerizasyon tekniğiyle floresan özellikteki BSA-HA nanopartikülleri elde edilmiştir. Nanopartiküllerin floresan özellikleri rutenyum tabanlı aminoasit monomerlerle etkileştirilerek elde edilen kompleksin floresans özelliğinden kaynaklanmaktadır. Bu özellik görüntüleme çalışmalarında nanopartiküllere avantaj sağlamıştır.

Nanopartiküllerin karakterizasyon çalışmaları kapsamında SDS-PAGE, zeta boyut ölçümü, SEM görüntüleme, floresan spektroskopisi, TGA analizi, FTIR analizi ve CD spektroskopisi teknikleri kullanılmıştır. SDS-PAGE deneyinde nanopartiküllerin saflıkları ve BSA içerdikleri teyit edilmiştir. Zeta metre ile boyut analizinde nano BSA için 55-60 nm ve nano BSA-HA için 110-125 nm aralılarında nanopartikül boyutları tespit edilmiştir. SEM görüntülerinde ise BSA ve BSA-HA için sırasıyla 53,73 nm ve 123,5 nm olarak boyut ölçülmüştür. Buna göre Zeta metre ve SEM görüntülerinden elde edilen veriler yaklaşık olarak birbirini destekleyici özelliktedir. Nanopartiküllerin mikron altı boyutları *in vivo* çalışmalarda avantaj sağlamaktadır. Bizim çalışmamızda da elde edilen nanopartikül boyutlarının floresan özellikleriyle birlikte vücut bölümlerinin görüntülenmesi ve antikanser ilaçların hedefe yönelik taşınmasında avantaj sağlayacağı düşünülmektedir.

Floresan özellikteki nano BSA ile BSA-HA nanopartiküllerinin karşılaştırmalı olarak floresan spektrumları değerlendirilmiştir. Buna göre HA bağlı BSA nanopartikülünde daha düşük şiddette olmak üzere iki nanopartikül yapısında da 610 nm’de floresan etki gözlenmiştir. FTIR spektroskopisi analizinde BSA nanopartikülünün karakteristik spektrumu elde edilmiştir. BSA-HA nanopartikülünün spektrumunda beklenildiği üzere BSA nanopartikülüne ek olarak HA’dan kaynaklanan pikler gözlenmiştir. TGA spektrumlarında ise nano-BSA spektrumundan farklı olarak BSA-HA nanopartikülünde iki bozunma eğrisi daha gözlenmiştir. Bu bozunma eğrileri HA’nın yapısını oluşturan N-asetil glikozamin ve glukuronik asit yapılarından meydana gelmektedir. Nanopartiküllerin CD spektrumları incelendiğinde ise HA ile modifikasyon sonrasında BSA yapısında herhangi bir deformasyon olmadığı görülmektedir.

Hücre kültürü çalışmalarında PANC-1 standart pankreas kanseri hücre hattı kullanılmıştır. Pankreas kanseri hücreleriyle etkileştirilen nanopartiküllerin 24 saat sonraki görüntüleri alınmıştır. Buna göre nano BSA’nın genellikle hücrelerin etrafında ve membranlarında oldukları ancak BSA-HA nanopartiküllerinin beklenildiği gibi genellikle hücrelerin sitoplazmasında oldukları tespit edilmiştir. Pankreas kanseri hücrelerinde HA reseptörlerinin yoğun bir şekilde eksprese edilmesi nedeniyle HA bağlı BSA nanopartikülleri bu reseptörlere bağlanarak hücre içine girmiştir.

Daha önceki çalışmalarda ANADOLUCA yaklaşımı ile nano-protein sentezlenmiştir. Ancak ilk defa bu tez çalışması ile HA ile modifiye edilmiş BSA nanopartikülleri mikroemülsiyon polimerizasyon tekniği ile sentezlenmiştir.

Nigam ve arkadaşlarının çalışmasında (Nigam ve ark., 2014), HA modifiye HSA nanopartikülleri pankreas kanseri hedefleme amacıyla elde edilmiştir. Ancak bu çalışmada nanopartiküller grafen QD ile floresan özellik kazanmıştır.

Yapılan tez çalışmasında, oda sıcaklığında, gün ışığında ve azot atmosferi altında kolayca hazırlanabilen aminoasit ve rutenyum-şelat tabanlı monomerlerle çapraz bağlı ışığa duyarlı nanopartiküllerin senteziyle floresans özellikli ve tekrar tekrar kullanılabilen pankreas kanseri tanısı için yeni yapılar ortaya konmuştur.

KAYNAKÇA

- Banzato, A., Bobisse, S., Rondina, M., Renier, D., Bettella, F., Esposito, G. (2008). A paclitaxel-hyaluronan bioconjugate targeting ovarian cancer affords a potent *in vivo* therapeutic activity. *Clin. Cancer Res.* 14, 3598-6306.
- Chakraborty, C., Pal, S., Doss, G. P., Wen, Z., Lin, C. (2013). Nanoparticles as ‘smart’ pharmaceutical delivery. *Frontiers in Bioscience*, 18, 1030-1050.
- Cheng, X., Sato, N., Kohi, S., Koga, A., Hirata, K. (2015 (1)). Receptor for hyaluronic acid-mediated motility is associated with poor survival in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Journal of Cancer*, 6 (11), 1093-1098.
- Cheng, X., Kohi, S., Koga, A., Hirata, K., Sato, N. (2015 (2)). Hyaluronan stimulates pancreatic cancer cell motility. *Oncotarget*, 7 (4).
- Choi, S. H., Byeon, H.J., Choi, J.S., Thao, L., Kim, I., Lee, E.S., ... & Youn, Y. S. (2015). Inhalable self-assembled albumin nanoparticles for treating drug-resistant lung cancer. *Journal of Controlled Release*, 197, 199-207.
- Das, S, Banerjee, R., Bellare, J. (2005). Aspirin loaded albumin nanoparticles by coacervation: Implications in drug delivery. *Trends Biomater. Artif. Organs*, 18, 203-212.
- Derman, S., Kızılbey, K., Akdeste, Z.M. (2013). Polymeric nanoparticles. *Sigma*, 31, 107-120.
- Desai, M. P., Labhasetwar, V., Walter, E., Levy, R. J., Amidon, G. L. (1997). The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent. *Pharmaceutical Research*, 14, 1568-1573.
- Desai, N. (2007). Nanoparticle albumin bound (nab) technology: Targeting tumors through the endothelial gp60 receptor and SPARC. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 3 (4), 339.
- Dreis, S., Rothweiler, F., Michaelis, M., Cinatl Jr, J., Kreuter, J., Langer, K. (2007). Preparation, characterisation and maintenance of drug efficacy of doxorubicin-loaded human serum albumin (HSA) nanoparticles. *International journal of pharmaceutics*, 341 (1-2), 207-214.

- Dicker, K.T., Gurski, L.A., Pradhan-Bhatt, S., Witt, R.L., Farach-Carson, M.C., Jia, X. (2014). Hyaluronan: A simple polysaccharide with diverse biological functions, *Acta Biomaterialia*, 10, 1558-1570.
- Dubey, R.D., Klippstein, R., Wang, J.T.W., Hodgins, N., Mei, K.C., Sosabowski, J., ... & Al-Jamal, K.T. (2017). Novel hyaluronic acid conjugates for dual nuclear imaging and therapy in CD44-expressing tumors in mice *in vivo*. *Nanotheranostics*, 1 (1), 59.
- Duncan, R. (2006). Polymer conjugates as anticancer nanomedicines. *Nature reviews cancer*, 6 (9), 688.
- Elsadek, B. and Kratz, F. (2012). Impact of albumin on drug delivery-new applications on the horizon. *J. Control Release*, 157, 4-28.
- Elzoghby, A.O., Samy, W.M., Elgindy, N.A. (2012). Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 157, 168-182.
- Fotakis, G. and Timbrell, J. A. (2006). *In vitro* cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*, 160, 171-177.
- Fu, Q., Sun, J., Zhang, W., Sui, X., Yan, Z., He, Z. (2009). Nanoparticle albumin-bound (NAB) technology is a promising method for anti-cancer drug delivery. *Recent patents on anti-cancer drug discovery*, 4 (3), 262-272.
- Hames, B. D. (Ed.). (1998). Gel electrophoresis of proteins: a practical approach (Vol. 197). OUP Oxford.
- Han, J., Wang, Q., Zhang, Z., Gong, T., Sun, X. (2013). Cationic bovine serum albumin based self-assembled nanoparticles as siRNA delivery vector for treating lung metastasis cancer. *Small*, 10 (3), 524-535.
- Hawkins, M. J., Soon-Shiong, P. and Desai, N. (2008). Protein nanoparticles as drug carriers in clinical medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60 (8), 876-885.
- Jahanshahi, M. and Babaei, Z. (2008). Protein nanoparticle: A unique system as drug delivery vehicles. *African Journal of Biotechnology*, 7 (25), 4926-4934.
- Keiser, K., Johnson, C. C. and Tipton, D. A. (2000). Cytotoxicity of mineral trioxide aggregate using human periodontal ligament fibroblasts. *J. Endod.*, 26, 288-291.

- Kim, T. H., Jiang, H. H., Youn, Y. S., Park, C. W., Tak, K. K., Lee, S., Kim, H., Jon, S., Chen, X., Lee, K. C. (2011). Preparation and characterization of water-soluble albumin-bound curcumin nanoparticles with improved antitumor activity. *Int. J. Pharm.* 403, 285-291.
- Kratz, F. (2008). Albumin as a drug carrier: design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. *J. Control Release*, 132, 171-183.
- Lee, G. Y., Park, K., Nam, J. H., Kim, S. Y., Byun, Y. (2006). Antitumor and anti-metastatic effects of gelatin-doxorubicin and PEGylated gelatin-doxorubicin nanoparticles in SCC7 bearing mice. *Journal of Drug Targeting*, 14 (10), 707-716.
- Li, C., Heidt, D. G., Dalerba, P., Burant, C. F., Zhang, L., Adsay, V., ... & Simeone, D. M. (2007). Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer research*, 67 (3), 1030-1037.
- Li, X., Zhang, X., Zheng, L., Guo, W. (2015). Expression of CD44 in pancreatic cancer and its significance. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 8 (6), 6724-6731.
- Li, Q., Liu, C., Zhao, X., Zu, Y., Wang, Y., Zhang, B., ... & Sun, B. (2011). Preparation, characterization and targeting of micronized 10-hydroxycamptothecin-loaded folate-conjugated human serum albumin nanoparticles to cancer cells. *International journal of nanomedicine*, 6, 397.
- Lieber, M., Mazzetta, J., Nelson-Rees, W., Kaplan, M., Todaro, G. (1975). Establishment of a continuous tumor-cell line (panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *International journal of cancer*, 15 (5), 741-747.
- Lin, W., Garnett, M. C., Davis, S. S., Schacht, E., Ferruti, P., Illum, L. (2001). Preparation and characterisation of rose Bengal-loaded surface-modified albumin nanoparticles. *Journal of controlled release*, 71 (1), 117-126.
- Lin, W., Garnett, M. C., Schacht, E., Davis, S. S., Illum, L. (1999). Preparation and *in vitro* characterization of HSA-mPEG nanoparticles. *International journal of pharmaceutics*, 189 (2), 161-170.
- Lluch, A., Álvarez, I., Muñoz, M., Seguí, M.Á., Tusquets, I., García-Estévez, L. (2014). Treatment innovations for metastatic breast cancer: nanoparticle albumin-bound

- (NAB) technology targeted to tumors. *Critical reviews in oncology/hematology*, 89 (1), 62-72.
- Lohcharoenkal, W., Wang, L., Chen, Y. C., Rojanasakul, Y. (2014). Protein nanoparticles as drug delivery carriers for cancer therapy. *BioMed research international*, 2014, 1-12.
- MaHam, A., Tang, Z., Wu, H., Wang, J., Lin, Y. (2009). Protein-Based Nanomedicine Platforms for Drug Delivery. *Small*, 5 (15), 1706-1721.
- Merodio, M., Arnedo, A., Renedo, M. J., Irache, J. M. (2001). Ganciclovir-loaded albumin nanoparticles: characterization and *in vitro* release properties. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 12 (3), 251-259.
- Mossmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 65, 55-63.
- Mishra, V., Mahor, S., Rawat, A., Gupta, P.N., Dubey, P., Khatri, K., Vyas, S.P. (2006). Targeted brain delivery of AZT via transferrin anchored pegylated albumin nanoparticles. *Journal of drug targeting*, 14 (1), 45-53.
- Nigam, P., Waghmode, S., Louis, M., Wangnoo, S., Chavan, P., Sarkara, D. (2014). Graphene quantum dots conjugated albumin nanoparticles for targeted drug delivery and imaging of pancreatic cancer. *J. Mater. Chem.*, 2, 3190-3195.
- Panta, P., Kim, D.Y., Kwon, J.S., Son, A.R., Lee, K.W., Kim, M. S. (2014). Protein drug-loaded polymeric nanoparticles. *J. Biomedical Science and Engineering*, 7, 825-832.
- Petros, R.A. and DeSimone, J.M. (2010). Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9, 615.
- Qi, L., Guo, Y., Luan, J., Zhang, D., Zhao, Z., Luan, Y. (2014). Folate-modified bexarotene-loaded bovine serum albumin nanoparticles as a promising tumor-targeting delivery system. *Journal of Materials Chemistry B*, 2 (47), 8361-8371.
- Rhaese, S., von Briesen, H., Rübsamen-Waigmann, H., Kreuter, J., Langer, K. (2003). Human serum albumin-polyethylenimine nanoparticles for gene delivery. *Journal of Controlled Release*, 92 (1-2), 199-208.

- Say, R., Diltemiz, S.E., Çelik, S., Ersöz, A. (2013). Nanolabel for TNF- α determination. *Applied Surface Science*, 275, 233-238.
- Say, R., Ersoz, A., Hur, D., Yılmaz, F., Denizli, A., Atılır Özcan, A., Emir Diltemiz, S., Yazar, S., Biçen, Ö., Büyüktiryaki, S., Keçili, R., Saka, G., Fındık, T. (2011). Photosensitive Aminoacid-Monomer Linkage And Bioconjugation Applications In Life Sciences And Biotechnology. *ABD Patent* WO/2011/070402.
- Say, R., Keçili, R., Biçen, Ö., Şişman, F. Y., Hür, D., Denizli, A., Ersöz, A. (2011). A novel nanoprotein particle synthesis: Nanolipase. *Process biochemistry*, 46 (8), 1688-1692.
- Say, R., Şenay, R. H., Biçen, Ö., Ersöz, A., Yılmaz, F. Ş., Akgöl, S., Denizli, A. (2013). Polymeric amylase nanoparticles as a new semi-synthetic enzyme system for hydrolysis of starch. *Materials Science and Engineering: C*, 33 (4), 1900-1906.
- Schantéa, C.E., Zuber, G., Herlin, C., Vandamme, T.F. (2011). Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*, 85, 469-489.
- Sebak, S., Mirzaei, M., Malhotra, M., Kulamarva, A., Prakash, S. (2010). Human serum albumin nanoparticles as an efficient noscapine drug delivery system for potential use in breast cancer: Preparation and *in vitro* analysis. *Int. J. Nanomedicine*, 5, 525-532.
- Teng, Z., Luo, Y., Wang, T., Zhang, B., Wang, Q. (2013). Development and application of nanoparticles synthesized with folic acid conjugated soy protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 6, 2556-2564.
- Underhill, C. (1992). CD44: The hyaluronan receptor. *Journal of Cell Science*, 103, 293-298.
- Uzun, L., Armutcu, C., Biçen, Ö., Ersöz, A., Say, R., & Denizli, A. (2013). Simultaneous depletion of immunoglobulin G and albumin from human plasma using novel monolithic cryogel columns. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 112, 1-8.
- Yu, Z., Yu, M., Zhang, Z., Hong, G., & Xiong, Q. (2014). Bovine serum albumin nanoparticles as controlled release carrier for local drug delivery to the inner ear. *Nanoscale research letters*, 9 (1), 343.

- Wartlick, H., Michaelis, K., Balthasar, S., Strebhardt, K., Kreuter, J., Langer, K. (2004). Highly specific HER2-mediated cellular uptake of antibody-modified nanoparticles in tumour cells. *Journal of drug targeting*, 12 (7), 461-471.
- Weber, C., Coester, C., Kreuter, J., Langer, K. (2000). Desolvation process and surface characterisation of protein nanoparticles. *International journal of pharmaceutics*, 194 (1), 91-102.
- Zhao, D., Zhao, X., Zu, Y., Li, J., Zhang, Y., Jiang, R., & Zhang, Z. (2010). Preparation, characterization, and *in vitro* targeted delivery of folate-decorated paclitaxel-loaded bovine serum albumin nanoparticles. *International journal of nanomedicine*, 5, 669.