

**ASKORBİK ASİT YÜKLÜ
KATI LİPİD NANOPARTİKÜLLERİN
KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ
APOPTOTİK ETKİLERİ**

Gamze GÜNEY
Yüksek Lisans Tezi

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı
Temmuz, 2011

Bu tez çalışması Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu tarafından desteklenmiştir. Proje No: 110T028



JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Gamze Güney'in “**Askorbik Asit Yüklü Katı Lipid Nanopartiküllerin Kanser Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkileri**” başlıklı **İleri Teknolojiler** Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans Tezi 24.06.2011 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı) : Prof. Dr. H. MEHTAP KUTLU
Üye : Prof. Dr. ZERRİN İNCESU
Üye : Doç. Dr. LÜTFİ GENÇ

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

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Rıdvan SAY



ÖZET

Yüksek Lisans

ASKORBİK ASİT YÜKLÜ KATI LİPİD NANOPARTİKÜLLERİN KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ APOPTOTİK ETKİLERİ

Gamze GÜNEY

Anadolu Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

İleri Teknolojiler Ana Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. H. Mehtap KUTLU
2011, 118 sayfa

Bu çalışma, askorbik asidin kanser hücrelerinde etkisini arttırmak için askorbik asit yüklü KLN'in hazırlanarak, kanser hücrelerine olan sitotoksik ve apoptotik etkilerinin belirlenmesine ve etkileşimlerinin değerlendirilmesine yöneliktir.

Çalışmanın birinci aşamasında askorbik asidin H-ras 5RP7 ve NIH/3T3 hücreleri üzerine sitotoksik etkisini ölçmek için MTT testinden faydalanılmış ve apoptotik etkisini ölçmek amacıyla Akım Sitometri kullanılmıştır. İkinci aşamada, askorbik asit yüklü KLN hazırlandıktan sonra karakterizasyonu yapılmıştır. Hazırlanan nanopartiküllerin bu hücre hatları üzerinde olan sitotoksik ve apoptotik etkisi ölçülmüştür. Son olarak askorbik asit ve askorbik asit yüklü KLN'in bu hücre hatları ile etkileşimleri TEM ve Konfokal Mikroskopu kullanılarak incelenmiştir.

Askorbik asit ve askorbik asit yüklü KLN'in H-ras 5RP7 ve NIH/3T3 hücreleri üzerinde olan etkileri araştırılıp, karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak, askorbik asit yüklü KLN'in kanser hücreleri üzerinde apoptotik ve sitotoksik etkisinin daha fazla olduğu, yapılan karakterizasyon çalışmalarıyla bu formülasyonun uygun bir terapötik taşıyıcı olarak kullanılabileceği kararına varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kanser, Askorbik asit, KLN, TEM ve Konfokal Mikroskop.



ABSTRACT

Master of Science Thesis

THE APOPTOTIC EFFECTS OF ASCORBIC ACID LOADED SOLID LIPID NANOPARTICLES ON CANCER CELLS

Gamze GÜNEY

Anadolu University

Graduate School of Sciences

Advanced Technologies Program

Supervisor: Prof. Dr. H. Mehtap KUTLU

2011, 118 pages

This study is intended for determination of the cytotoxic and apoptotic effects by preparing ascorbic acid loaded solid lipid nanoparticles (SLN) and evaluated the interaction of cancer cells to increase the effects of ascorbic acid on cancer cells.

In the first stage study, we were utilized MTT test to measure the cytotoxic effects of ascorbic acid on H-*ras* 5RP7 and NIH/3T3 cells and used Flow Cytometry to measure the apoptotic effects. In the second stage, after ascorbic acid loaded SLN were prepared, they were characterized. These prepared nanoparticles were measured the cytotoxic and apoptotic effects on these cell lines. Finally, the interactions of ascorbic acid and ascorbic acid loaded SLN in these cell lines were investigated by using TEM and Confocal Microscopy.

The effects of ascorbic acid and ascorbic acid loaded SLN were investigated and compared on H-*ras* 5RP7 and NIH/3T3 cells. In conclusion, ascorbic acid loaded SLNs have more apoptotic and cytotoxic effect on cancer cells, the characterization studies concluded that the formulation can be used as a suitable therapeutic carrier.

Keywords: Cancer, Ascorbic acid, SLN, TEM and Confocal Microscopy.



TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, beni yönlendirerek, çalışma alanımla ilgili deneyim kazanmamı sağlayan ve her zaman destek olan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mehtap KUTLU'ya,

Tez çalışmam boyunca her zaman yardımcı olan ve Bitki, İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezi (BİBAM) bünyesindeki imkânlardan faydalanmamı sağlayan, Sayın Doç. Dr. Lütfi GENÇ'e,

Tezimin miktar tayini kısmında yardımlarını esirgemeyen ve her zaman destek olan Sayın Dr. Erol ŞENER'e,

Neşesiyle her zaman bana moral veren ve tezimin tüm aşamalarında yardımcı olan Arzu İŞCAN'a,

Tezimin yazım aşamasında bana yardımcı olan ve stresli zamanlarıma sabırla katlanabilen arkadaşım Gökhan DİKMEN'e,

Lisansüstü eğitimim boyunca moral desteklerini esirgemeyen arkadaşlarım Melis Debreli COŞKUN'a, Gülşah ALBAYRAK'a ve BİBAM personeline,

Zor günlerimde hep yanımda olan ve her zaman desteğini hissettiğim Sayın Ersin ESKİLER'e

Beni tüm eğitim hayatım boyunca hep destekleyen, hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan ve bugün burada olmamı sağlayan Ailem'e,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım....

Ayrıca kanser hastalığı üzerine çalışmama sebep olan ve 15.03.2008'te Pankreas Kanserinden kaybettiğim babam (Mehmet Zeki GÜNEY'i) saygıyla anıyor ve tezimi babama ithaf ediyorum!

Gamze GÜNEY

Temmuz 2011

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii

1. GİRİŞ	1
1.1. Kanserin Tanımı ve Kanser Hücrelerinin Özellikleri.....	2
1.2. Hücre Döngüsü ve Kanser Oluşumundaki Yeri.....	4
1.2.1. Siklinler ve Siklin Bağımlı Kinazlar (CDK).....	5
1.2.2. Hücre Döngüsünün Kontrol Noktaları.....	6
1.2.3. Hücre Döngüsü ve Kanser.....	7
1.3. Kanser Oluşumunda Etkili Olan Genler.....	8
1.3.1. Onkogenler.....	8
1.3.2. Tümör Baskılayıcı Genler.....	9
1.4. Apoptoz ve Kanser Oluşumundaki Rolü.....	11
1.4.1. Apoptozun Morfolojisi ve Nekroz ile Arasındaki Farklar.....	12
1.4.2. Apoptozun İndüksiyonu.....	13
1.4.3. Apoptozun Düzenlenmesinde Görev Alan Genler.....	15
1.4.4. Apoptozu Belirleme Yöntemleri.....	18
1.4.5. Apoptoz ve Kanser Arasındaki İlişki.....	19
1.5. Askorbik Asidin Kanser Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisi.....	19
1.5.1. Askorbik Asidin Tarihçesi.....	20
1.5.2. Askorbik Asidin Biyokimyasal Yapısı.....	20
1.5.3. Askorbik Asidin Etki Mekanizmaları.....	21
1.5.4. Askorbik Asidin Hücreye Alım Mekanizması.....	21
1.5.5. Askorbik Asidin Kanser Tedavisindeki Yeri.....	24
1.6. Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler.....	28
1.6.1. Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Avantajları.....	29



1.6.2. Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Çeşitleri.....	30
1.6.3. Katı Lipid Nanopartiküller (KLN).....	31

2. GEREÇ VE YÖNTEM **45**

2.1. Gereç.....	45
2.1.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler.....	45
2.1.2. Kullanılan Sarf Malzemeler.....	45
2.1.3. Kullanılan Cihazlar.....	45
2.2. Yöntem.....	46
2.2.1. <i>H-ras</i> 5RP7 (Sıçan Embriyo Fibroblast) Hücre Serisi ve NIH/3T3 (Fare Embriyo Fibroblast) Hücreleri ile Hücre Kültürü Uygulamaları.....	46
2.2.2. Askorbik Asidin <i>H-ras</i> 5RP7 ve NIH/3T3 Hücreleri ile Etkileşimi.....	47
2.2.3. YPSK ile Askorbik Asidin Miktar Tayini.....	47
2.2.4. Askorbik Asit Yüklenmiş KLN.....	49
2.2.5. Askorbik Asit Yüklenmiş KLN'in <i>H-ras</i> 5RP7 ve NIH/3T3 ile Etkileşimi.....	51
2.2.6. MTT Testi ile Mitokondriyel Süksinat Dehidrojenaz Enzim Ölçümü.....	51
2.2.7. Akım Sitometri ile Apoptotik Etkinin Ölçülmesi.....	52
2.2.8. Konfokal Mikroskop ile Hücresel Değişikliklerin İncelenmesi.....	53
2.2.9. Geçirimli Elektron Mikroskop (TEM) ile İnce Yapısal Değişikliklerin İncelenmesi.....	54
2.2.10. İstatiksel Değerlendirme.....	56

3. BULGULAR **57**

3.1. Askorbik Asidin <i>H-ras</i> 5RP7 ve NIH/3T3 Hücreleri ile Etkileşiminin Değerlendirilmesi.....	57
3.1.1. Askorbik Asidin <i>H-ras</i> 5RP7 ve NIH/3T3 Hücrelerindeki Sitotoksik Bulguları.....	57

3.1.2. Askorbik Asidin H-ras 5RP7 ve NIH/3T3 Hücrelerindeki Apoptotik Bulguları.....	60
3.2. Askorbik Asit Yüklenmiş KLN'in H-ras 5RP7 ve NIH/3T3 Hücreleri ile Etkileşiminin Değerlendirilmesi.....	69
3.2.1. Askorbik Asit Yüklü KLN'in H-ras 5RP7 ve NIH/3T3 Hücrelerindeki Sitotoksik Bulguları.....	69
3.2.2. Askorbik Asit Yüklü KLN'in H-ras 5RP7 ve NIH/3T3 Hücrelerindeki Apoptotik Bulguları.....	72
3.3. Askorbik Asidin Miktar Tayininin Değerlendirilmesi.....	81
3.4. Askorbik Asit Yüklenmiş KLN'in Karakterizasyonunun Değerlendirilmesi.....	82
3.4.1. Zeta Potansiyel ve Partikül Boyutları.....	82
3.4.2. Etken Madde Yükleme Etkinliği.....	83
3.4.3. İlaç Salımının Belirlenmesi.....	83
3.4.4. Yüzey Morfolojisinin TEM ile İncelenmesi.....	84
3.5. Konfokal Mikroskop ile Yapısal Değişikliklerin Görüntülenmesi.....	85
3.6. TEM ile İnce Yapısal Değişikliklerin Görüntülenmesi.....	92
4. TARTIŞMA ve SONUÇ	97
KAYNAKLAR	101

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1. Hücre döngüsü boyunca siklin-CDK aktivitelerinin ve hücre döngüsü kontrol noktalarının gösterilmesi.....	6
1.2. p53 proteinin hücre döngüsü üzerindeki etkisi.....	11
1.3. Mitokondrinin apoptozdaki rolü.....	15
1.4. Bcl-2 ailesi proteinlerinin sahip olduğu özelliklerin gösterilmesi.....	16
1.5. Askorbik asit ile glukozun formülasyon yapılarının karşılaştırılması.....	23
1.6. Askorbik asidin hücreye alınmasını sağlayan sodyum bağımlı (SVCT) ve glukoz bağımlı (GLUT) taşıyıcılar.....	24
1.7. Üç etken madde hapsedme modelinin gösterilmesi.....	37
1.8. Aktif ve pasif hedeflemenin şematik olarak gösterilmesi.....	38
1.9. EPR etkisi ile pasif hedeflemenin şematik hali.....	40
1.10. Nanopartiküllerin hücreye girmesini sağlayan aktif hedeflemenin şematik hali.....	42
3.1. Askorbik asidin uygulandığı 5RP7 hücrelerinin canlılık yüzdelerinin grafiği.....	58
3.2. Askorbik asidin uygulandığı NIH/3T3 hücrelerinin canlılık yüzdelerinin grafiği.....	59
3.3. Askorbik asidin uygulandığı 5RP7 hücrelerinde, Annexin V FITC değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 24 saatlik histogramları.....	62
3.4. Askorbik asidin uygulandığı 5RP7 hücrelerinde, Annexin V FITC değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 48 saatlik histogramları.....	63



3.5. Askorbik asidin uygulandığı 5RP7 hücrelerinde, Annexin V FITC değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 72 saatlik histogramları	64
3.6. Askorbik asidin uygulandığı NIH/3T3 hücrelerinde, Annexin V FITC değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 24 saatlik histogramları	66
3.7. Askorbik asidin uygulandığı NIH/3T3 hücrelerinde, Annexin V FITC değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 48 saatlik histogramları	67
3.8. Askorbik asidin uygulandığı NIH/3T3 hücrelerinde, Annexin V FITC değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 72 saatlik histogramları	68
3.9. Askorbik asit yüklü KLN'in uygulandığı 5RP7 hücrelerinin canlılık yüzdelerinin grafiği	70
3.10. Askorbik asit yüklü KLN'in uygulandığı NIH/3T3 hücrelerinin canlılık yüzdelerinin grafiği	71
3.11. Askorbik asit yüklü KLN'in uygulandığı 5RP7 hücrelerinde, Annexin V FITC değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 24 saatlik histogramları	74
3.12. Askorbik asit yüklü KLN'in uygulandığı 5RP7 hücrelerinde, Annexin V FITC değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 48 saatlik histogramları	75
3.13. Askorbik asit yüklü KLN'in uygulandığı 5RP7 hücrelerinde, Annexin V FITC değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 72 saatlik histogramları	76
3.14. Askorbik asit yüklü KLN'in uygulandığı NIH/3T3 hücrelerinde, Annexin V FITC değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 24 saatlik histogramları	78

3.15. Askorbik asit yüklü KLN'in uygulandığı NIH/3T3 hücrelerinde, Annexin V FITC değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 48 saatlik histogramları.....	79
3.16. Askorbik asit yüklü KLN'in uygulandığı NIH/3T3 hücrelerinde, Annexin V FITC değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 72 saatlik histogramları.....	80
3.17. Askorbik asidin zamana bağlı salım grafiği.....	84
3.18. Askorbik asit yüklü KLN'in zamana bağlı salım grafiği.....	84
3.19. Askorbik asit yüklü KLN'in TEM görüntüleri.....	85
3.20. 5RP7 hücrelerinin genel morfolojik yapısının konfokal mikroskopu ile görüntülenmesi.....	86
3.21. Askorbik asidin uygulandığı 5RP7 hücrelerinde oluşan yapısal değişikliklerin konfokal mikroskopu ile görüntülenmesi.....	87
3.22. Askorbik asit yüklü KLN'in uygulandığı 5RP7 hücrelerinde oluşan yapısal değişikliklerin konfokal mikroskopu ile görüntülenmesi.....	88
3.23. NIH/3T3 hücrelerinin genel morfolojik yapısının konfokal mikroskopu ile görüntülenmesi.....	90
3.24. Askorbik asidin uygulandığı NIH/3T3 hücrelerinde oluşan yapısal değişikliklerin konfokal mikroskopu ile görüntülenmesi.....	91
3.25. Askorbik asit yüklü KLN'in uygulandığı NIH/3T3 hücrelerinde oluşan yapısal değişikliklerin konfokal mikroskopu ile görüntülenmesi.....	91
3.26. 5RP7 hücrelerinin TEM ile görüntülenmesi.....	93
3.27. Askorbik asidin uygulandığı 5RP7 hücrelerinin TEM ile görüntülenmesi.....	94

3.28. Askorbik asit yüklü KLN'in uygulandığı 5RP7 hücrelerinin TEM ile görüntülenmesi.....	94
3.29. Kontrol grubu olan NIH/3T3 hücrelerinin TEM ile görüntülenmesi.....	95
3.30. Askorbik asidin uygulandığı NIH/3T3 hücrelerinin TEM ile görüntülenmesi.....	96
3.31. Askorbik asit yüklü KLN'in uygulandığı NIH/3T3 hücrelerinin TEM ile görüntülenmesi.....	96

ÇİZELGELER DİZİNİ

1.1. Normal hücreler ile kanser hücrelerinin bazı özelliklerinin karşılaştırılması...	3
1.2. Apoptoz ile nekroz arasındaki farklar.....	13
2.1. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi çalışma koşulları.....	48
3.1. Askorbik asidin uygulandığı 5RP7 hücrelerinin canlılık yüzde değerleri.....	58
3.2. Askorbik asidin uygulandığı NIH/3T3 hücrelerinin canlılık yüzde değerleri...	59
3.3. Askorbik asidin uygulandığı 5RP7 hücrelerinde, Annexin V FITC değerlendirmesi ile elde edilen 24 saatlik apoptotik yüzde değerleri.....	60
3.4. Askorbik asidin uygulandığı 5RP7 hücrelerinde, Annexin V FITC değerlendirmesi ile elde edilen 48 saatlik apoptotik yüzde değerleri.....	60
3.5. Askorbik asidin uygulandığı 5RP7 hücrelerinde, Annexin V FITC değerlendirmesi ile elde edilen 72 saatlik apoptotik yüzde değerleri.....	61
3.6. Askorbik asidin uygulandığı NIH/3T3 hücrelerinde, Annexin V FITC değerlendirmesi ile elde edilen 24 saatlik apoptotik yüzde değerleri.....	65
3.7. Askorbik asidin uygulandığı NIH/3T3 hücrelerinde, Annexin V FITC değerlendirmesi ile elde edilen 48 saatlik apoptotik yüzde değerleri.....	65
3.8. Askorbik asidin uygulandığı NIH/3T3 hücrelerinde, Annexin V FITC değerlendirmesi ile elde edilen 72 saatlik apoptotik yüzde değerleri.....	65
3.9. Askorbik asit yüklü KLN'in uygulandığı, 5RP7 hücrelerinin canlılık yüzde değerleri.....	70
3.10. Askorbik asit yüklü KLN'in uygulandığı, NIH/3T3 hücrelerinin canlılık yüzde değerleri.....	71
3.11. Askorbik asit yüklü KLN'in uygulandığı 5RP7 hücrelerinde, Annexin V FITC değerlendirmesi ile elde edilen 24 saatlik apoptotik yüzde değerleri.....	73



- 3.12.** Askorbik asit yüklü KLN'in uygulandığı 5RP7 hücrelerinde, Annexin V FITC değerlendirmesi ile elde edilen 48 saatlik apoptotik yüzde değerleri..73
- 3.13.** Askorbik asit yüklü KLN'in uygulandığı 5RP7 hücrelerinde, Annexin V FITC değerlendirmesi ile elde edilen 72 saatlik apoptotik yüzde değerleri...73
- 3.14.** Askorbik asit yüklü KLN'in uygulandığı NIH/3T3 hücrelerinde, Annexin V FITC değerlendirmesi ile elde edilen 24 saatlik apoptotik yüzde değerleri.....77
- 3.15.** Askorbik asit yüklü KLN'in uygulandığı NIH/3T3 hücrelerinde, Annexin V FITC değerlendirmesi ile elde edilen 48 saatlik apoptotik yüzde değerleri.....77
- 3.16.** Askorbik asit yüklü KLN'in uygulandığı NIH/3T3 hücrelerinde, Annexin V FITC değerlendirmesi ile elde edilen 72 saatlik apoptotik yüzde değerleri.....77
- 3.17.** Askorbik asidin BSS ve % geri kazanım değerlerinin verilmesi82
- 3.18.** Askorbik asit ve askorbik asit yüklü KLN'in partikül boyutları, PI ve zeta potansiyellerinin karşılaştırılması.....83

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AFM	: Atomik kuvvet mikroskopisi
AIF	: Apoptoz indükleyici faktör
AO	: Akridin oranj
ATP	: Adenozin trifosfat
CDK	: Siklin bağımlı kinazlar
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
EPR	: Geçirgenlik ve retansiyon etkisi
FBS	: Fetal Bovin Serum
FS	: Fosfotidil serin
GLUT	: Glukoz taşıyıcıları
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
KLN	: Katı Lipid Nanopartikül
LD	: Lazer kırınımı
MTT	: 3-(4, 5-dimetiliazol-2-yl)-2, 5 difeniltertrozolyum bromit
PCS	: Foton Korelasyon Spektroskopisi
PI	: Propium iodide
RES	: Retiküloendotelyal sistem
RNA	: Ribo nükleik asit
ROS	: Reaktif oksijen türleri
TEM	: Geçirimli Elektron Mikroskopu
YBH	: Yüksek basınçlı homojenizasyon
YE	: Yükleme etkinliği
YPSK	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi



1. GİRİŞ

Günümüzde mevcut kanser tedavi yöntemleri (cerrahi müdahale, kemoterapi ve radyoterapi) bir çok yan etkiye sahip olmalarından dolayı yetersiz kalmaktadır. Kanser tedavilerinde yeni yaklaşımlar, tedavinin sadece kemoterapi ve radyoterapi ile birlikte uygulanması değil aynı zamanda normal hücre veya dokuları hasardan korumak ve ilaç direncine engel olmayı amaçlamaktadır. Bu açıdan uygulanan yöntemlerin etkinliği, çeşitli anti kanserojen ilaçların kanser hücrelerini hedefleyip normal hücrelere mümkün olabildiğince az zarar vermesine bağlıdır (Peppas-Brannon ve Blanchette, 2004; Hu Jack ve ark., 2010).

Son yıllarda, vitaminlerin kanser tedavisindeki etkilerini belirlemeye yönelik birçok çalışma yapılmaktadır. Vitaminler vücutta metabolik olayların normal bir şekilde meydana gelmesi ve sağlıklı durumun sürdürülmesi için gerekli olan, vücutta sentez edilemeyen veya az sentezlenen ve besinler içinde çevreden ufak miktarda alınması zorunlu maddelerdir (Akkan, 1999). Suda çözünen bir vitamin olan askorbik asit (C vitamini, L-askorbik asit) insan beslenmesindeki temel rolünün dışında; kanser, enfeksiyonlar, viral gibi patolojik durumlar, solunum hastalıkları, soğuk algınlığı ve tüm kardiyovasküler hastalıklarda da önemli bir yere sahiptir (Padayatty ve Levin, 2000; Chen ve ark., 2005).

Konvansiyonel tedavide gözlenen olumsuzlukları ortadan kaldırmak, ilacın etkisinin hücresel düzeylere taşınmasını arttırmak, ilaçların kan dolaşımında ya da diğer biyolojik sıvılardaki derişimini ve salım kinetiklerini optimize etmek, ilaçların farmokokinetik ve farmakodinamik özelliklerini değiştirmek, etkin ve güvenli tedavi sağlamak, toksik etkilerini gidermek, ilaçların kararlılığını arttırmak ve vücudun diğer bölgelerinde herhangi bir istenmeyen etkileşmeye neden olmadan hedef bölgede istenilen düzeyde farmokolojik yanıt elde etmek için nanoteknolojiden faydalanılarak nano boyutlu ilaç taşıma sistemleri geliştirilmiştir (Kaş, 2002; Farokhzad ve Langer, 2009; Sitterberg ve ark., 2010)

Günümüzde, kanser tedavisinde alternatif bir ilaç taşıyıcı sistem olarak katı lipid nanopartiküllerin (KLN) kullanımı büyük dikkat çekmektedir. Çünkü anti kanser ilaçları normal hücrelerde toksik etki, zayıf seçicilik, kararlılık ve tümör hücrelerinde ilaç dayanıklılığını arttırma riski gibi özelliklere sahip olduklarından dolayı bu kısıtlamalar KLN kullanılarak ortadan kaldırılabilir

(Mulla ve ark., 2010). KLN, mevcut kolloidal sistemlere alternatif bir taşıyıcı sistem olarak ortaya çıkan, küçük boyuta sahip, otoklavda sterilize edilebilen, kontrollü ve sürekli salım sağlayan fiziksel stabilitesi yüksek olan taşıyıcılardır. Bu sistemlerin üstünlükleri arasında, kolloidal büyüklükte olmaları, biyolojik olarak geçirimli olmaları, hidrofilik ve hidrofobik ilaçların yüklenebilmesi, üretim için gerekli aletlerin basit olması, yüksek ilaç yükleme kapasitesine sahip olmaları, toksik etkilere sahip olmamaları gibi özellikler sayılabilir (Kaş ve Eldem, 2002; Numanoğlu ve Tarımcı, 2006; Kamboj ve ark., 2010).

Kanser hücreleri enerji ihtiyaçlarını karşılamak için glukozu ihtiyaç duymaktadırlar. Bu çalışmada; hidroksil gruplarından dolayı glukozu benzer yapıya sahip olan askorbik asit seçilmiştir. Daha sonra askorbik asit yüklü KLN hazırlanmış ve kanser hücreleri ile etkileşiminin sağlanması amaçlanmıştır. Askorbik asit ve askorbik asit yüklü KLN'in kanserli ve normal hücre hatları üzerinde olan apoptotik ve sitotoksik etkilerini belirlemek için, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) testinden ve Akım Sitometri cihazından (Flow Sitometri) faydalanılmıştır. Bu hücrelerde meydana gelen yapısal ve ince yapısal değişiklikleri belirlemek için ise TEM ve konfokal mikroskopu kullanılmıştır. Ayrıca elde edilen nanopartiküllerin kalitesini kontrol etmek amacıyla foton korelasyon spektroskopisi (PCS) ve yüksek performanslı sıvı kromatografisinden (YPSK) yararlanılarak partikül boyutu, zeta potansiyeli, ilaç salımı ve ilaç yükleme kapasitesi bulunmuştur.

1.1. Kanser Tanımı ve Kanser Hücrelerinin Özellikleri

Hücreler bir taraftan programlı ölüm (apoptozis) ile yok olurken, diğer taraftan da büyüme faktörlerinin etkisiyle çoğalır. Kanser, kontrolsüz hücre bölünmesi ile karakterize olan ve bazı etkilerle değişime uğramış hücrelerin kontrolsüz olarak çoğalıp büyümelerinin sonucu oluşan bir hastalıktır.

Kanserin kökeni, hangi dokudan tüvelendiğine bağlıdır. Kanser hücrelerinin yaklaşık %85'i epitel hücrelerinden oluşur ve karsinoma olarak sınıflandırılır. Mezoderm hücrelerinden (kemik, kas hücreleri) tüvelenenler sarkoma olarak sınıflandırılırken, bezsel dokulardan tüvelenenler ise adenokarsinoma olarak isimlendirilmektedir (Pecorino, 2008; Weinberg, 2007).

Kanser hücreleri pek çok karakteristik özelliğe sahiptirler. Bu karakteristik özelliklerin temeli önemlidir. Çizelge 1.1’de kanser hücreleri ile normal hücreler arasındaki farklar belirtilmiştir. Bütün kanser tedavileri, uyarılan hücreye ve çevresine odaklanmaktadır. Bu özelliklerin mekanizmalarının anlaşılması ile kanser tedavisinde başarılar elde edilebilir.

Çizelge 1.1. Normal hücreler ile kanser hücrelerinin bazı özelliklerinin karşılaştırılması (Pecorino, 2008; Weinberg, 2007).

	NORMAL HÜCRELER	KANSER HÜCRELERİ
Büyüme sinyal otonomisi	Normal hücreler bölünmek için büyüme faktörlerine ihtiyaç duyarlar.	Kanser hücreleri büyüme faktör sinyallerine ihtiyaç duymazlar
Büyüme inhibitör sinyallerinin etkisiz hale gelmesi	Normal hücreler homeostaziyi sağlamak için inhibitör sinyallere cevap verirler.	Kanser hücreleri bölünmeyi inhibe edici faktörlere cevap vermezler
Apoptozisin etkisiz hale gelmesi	Normal hücreler DNA hasarına yanıt olarak apoptozise giderler.	Kanser hücreleri apoptotik sinyallerden kaçarlar.
Limitsiz replikasyon potansiyelleri (İmmortalite)	Çoğu normal hücrenin bölünme sayısı sınırlıdır. İmmortalitenin mekanizmalarından biri kromozom uçlarında olan telomerlerdir. Hücreler bölünürken, çoğu normal hücre tipinde telomerler gittikçe kısalır.	Kanser hücreleri sınırsız sayıda bölünürler. Kanser hücrelerinde telomerler telomerez enziminin etkisiyle yenilenirler. Sonuç da, telomerlerin uzunluğu sabit kalır ve hücre sınırsız sayıda bölünür.
Anjiyogenez	Normal hücreler oksijen ve besin sağlamak için kan damarlarına bağılırlar. Fakat damar yapısı yetişkinlerde sabittir.	Kanser hücreleri, yeni kan damarları oluşturarak tümörün yayılması için anjiyogenezi tetiklerler.
Metastaz	Normal hücreler vücutta yerlerine bağılırlar ve genelde göç etmezler.	Kanser hücrelerinin vücudun bir yerinden diğer yerine hareket ederek metastaz yaparlar. Buda kanser ölümlerinin en önemli nedenidir.

1.2. Hücre Döngüsü ve Kanser Oluşumundaki Yeri

Hücre bölünmesi, bir hücrenin morfolojik ve genetik olarak birbirine tıpa tıp benzeyen iki yavru hücreye bölünmesidir. Her bir yavru hücre de iki yavru hücre oluşturmak için bölünür ve böylece hücre bölünmesi bir döngü şeklinde devam eder, bu döngüye **hücre döngüsü** denir. Hücre döngüsü (siklus), çoğalmak üzere uyarılmış bir hücrede gerçekleşen ve bir dizi geçici biyokimyasal aktivitelerin ve morfolojik değişikliklerin görüldüğü bir süreçtir (Pecorino, 2008). Genel olarak, hücreler bir bölünme sinyali almadıkları sürece hücre siklusunun aktif (G_1 , G_2 , S ve M) fazlarına girmezler ve istirahat fazı denilen **G_0 fazında** beklerler. Hücrelerin ikiye bölünmesi **mitoz** ile gerçekleşir. Hücreler mitoz girmeden önce bir hazırlık safhası geçirirler ve bu safhada hücreler hacimce büyürler. Bu hazırlık safhasında bölünme için gerekli olan çeşitli düzenleyici proteinler (Siklin) ve makromoleküller (DNA) sentezlenir. Bu hazırlık safhasına da **interfaz** denir. Şekil 1.1.'de gösterildiği gibi; interfaz kendi içinde **G_1 , S, ve G_2** olmak üzere çeşitli alt bölümlerden (fazlardan) oluşur. Mitoz ve interfaz birlikte hücre siklusu olarak bilinen bir döngüyü oluştururlar (Park ve Lee, 2003).

G_1 ve G_2 kısaltmaları “gap” (ara, boşluk) sözcüğünden gelmektedir. S ise DNA sentezi (replikasyon) fazını göstermektedir. M ise mitoz anlamına gelmektedir.

- **G_1 fazı**; hücre siklusunun süresi açısından en değişkenlik gösterdiği fazdır. Bu fazın süresi siklusun en önemli belirleyicisidir. Bu fazda hücreler ya bölünmek, ya farklılaşmak, ya da ölmek için karar verirler.
- **S fazında**; hücre DNA'sının normal miktarının 2 katına çıktığı fazdır. Hızlı olmasının nedeni, DNA iplikçiklerinin birbirinden ayrılması esnasında bazılar, çeşitli ilaçlar veya mutajenler gibi dış ajanların etkisine açık hale gelirler. Bu yüzden DNA sentezi başladığında hemen bitirilmelidir.
- **G_2 fazında**; bir önceki (S) fazında replike olmuş DNA ve kromatin proteinleri yoğunlaşırlar ve paketlenirler. Tamir mekanizmalarından kaçmış hasarlı DNA veya replike olmamış DNA bu fazda kontrol edilir.
- **M fazında**; paketlenmiş kromatitler düzgün bir şekilde aynı konuma gelirler ve ardından hücre çeşitli aşamalardan geçerek (profaz, metafaz,

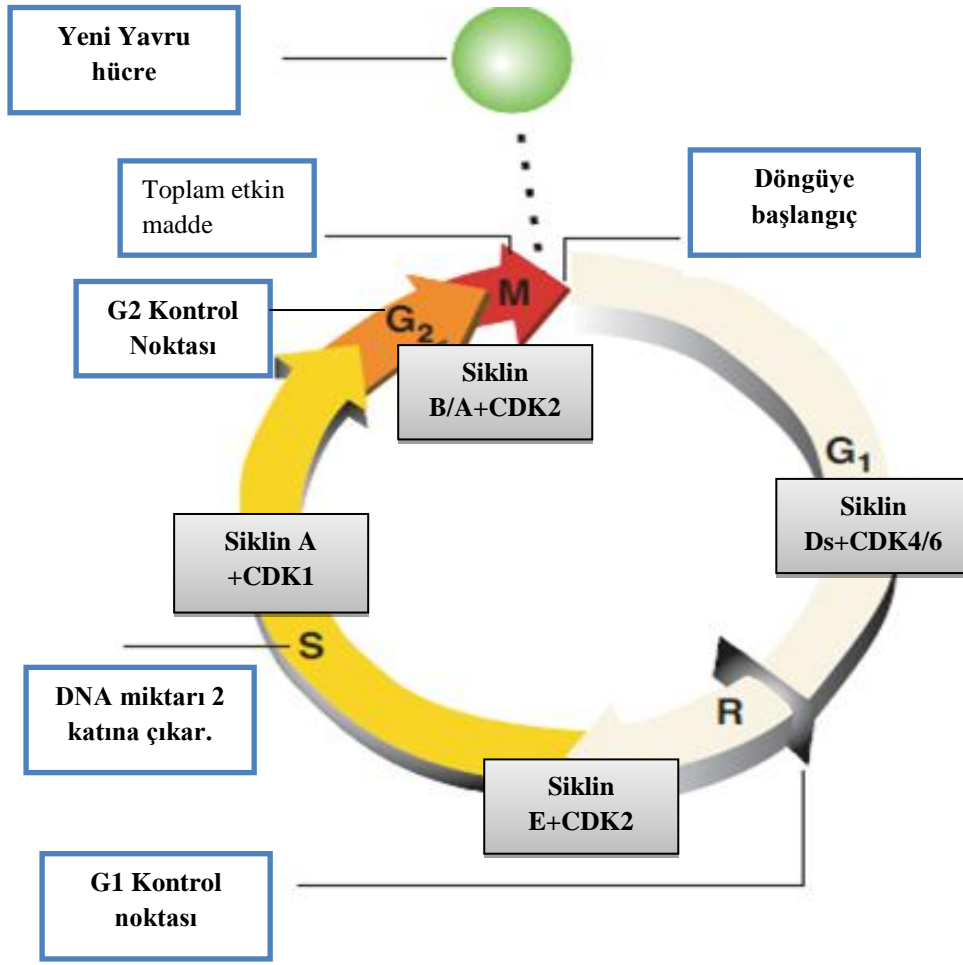
anafaz, telofaz ve sitokinez) ikiye bölünmüş olur (Franks, 1996; Baserga, 1999).

1.2.1. Siklinler ve Siklin Bağımlı Kinazlar (CDK)

Bir hücre döngüsü ortalama olarak 16 saat sürer. G_1 , S, G_2 fazları (interfaz) hücre siklusunun %90'nını kapsar. Mitoz bölünme ise 1-2 saat sürmektedir. Bu fazlardaki hücre döngüsü siklin adı verilen bir seri protein tarafından düzenlenir. Hücre siklusu; siklinler (CYC=CLN), siklin bağımlı kinazlar (CDK) ve siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (CDI) tarafından kontrol edilir. Bu proteinlerin düzeyleri hücre siklusunun farklı fazlarında farklılıklar gösterir (Malumbres ve Barbacid, 2007).

Siklinlerin düzenleyici CDK alt birimleri vardır. Siklin bağımlı kinazlar kendi başlarına bulduklarında inaktiftirler. Ancak, sikline bağlandıklarında aktifleşirler ve böylece aktif siklin-CDK komplekslerini oluştururlar. CDI (p15, p18, p19, p21 ve p27) ise ya siklinlere, ya CDK'lara ya da her ikisine bağlanarak CDK aktivitelerini inhibe eden proteinlerdir (Schwartz ve Shah, 2005).

Farklı siklin-CDK kompleksleri hücre döngüsünde spesifik noktalarda yer alırlar ve faz geçişlerinde önemli görevleri vardır. Şekil 1.1.'de gösterildiği gibi; siklin D hücre döngüsünde ilk sentezlenen siklindir ve CDK 4/6 ile birlikte G_1 fazı boyunca sürer. Siklin D, G_1 'den S fazına geçişte Siklin E geninin ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli bir rol alır. Siklin A-CDK 2 S fazı sürecinde önemlidir. Siklin A, B-CDK 1 G_2 fazında bulunur, mitotik siklinlerdir ve G_2 -M fazı geçişinde etkilidir (Pecorino, 2008; Puri ve ark., 1999).



Şekil 1.1. Hücre döngüsü boyunca siklin-CDK aktivitelerinin ve hücre döngüsü kontrol noktalarının gösterilmesi (Sandal, 2002; Pecorino, 2008)

1.2.2. Hücre Döngüsünün Kontrol Noktaları

Hücre bölünmesi, hücre siklusu içinde yer alan bazı kontrol noktaları tarafından düzenli olarak kontrol edilir. Hücre döngüsü kontrol noktaları DNA hasarına hücrel yanıtı tetikleyen bir seri biyokimyasal sinyalden oluşmaktadır. Birçok hücre döngüsü kontrol noktalarının efektörleri siklin bağımlı kinazlardır (Pines, 1997; Sandal 2002).

G₁ kontrol noktası DNA hasarına yanıt olarak hücre döngüsünü durdurur ve S fazında DNA hasarının çoğaltılmasını engeller. Eğer herhangi bir lezyon saptanırsa, hücreler G₁ kontrol noktasının yardımı ile ya hasarı onarırlar ya da apoptoza giderek ölürlür. **G₂ kontrol noktası**, S fazının uygun tamamlanmasını sağlamak için eşlenmeyen DNA'ya ya da hasar gören DNA'ya yanıt olarak hücre

döngüsünü durdurur. **M fazı kontrol noktası;** mitotik iğ üzerindeki kaymalara yanıt olarak kromozomal ayırma yol açar. Bu kontrol noktalarının işlevlerinde herhangi bir hasar meydana gelirse, kromozomlar ayrılmadığı için kanser oluşumunu tetikleyen mutasyonlara yol açar (Pecorino, 2008; Weinberg, 2007).

1.2.3. Hücre Döngüsü ve Kanser

Kanser hücreleri kontrolsüz bölünmeleri ile karakterizedir. İnsan tümörlerinde genellikle hücre döngüsü düzenleyicilerini kodlayan genlerde mutasyon görülmektedir. Bu genlerde olan mutasyonlar, büyüme faktörünün kendi kendini idare etmesine (otonomisine) yol açar. Mutasyonlar çoğunlukla pronkogenler ve tümör baskılayıcı genlerde meydana gelir. Ayrıca, Rb ve p53 gibi tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu, hücre döngüsünü inhibe eden proteinlerin fonksiyonlarının bozulmasına neden olur (Vermeulen ve ark., 2003). Kanser hücrelerinde bulunan mutasyonlar; CDK, siklin bağımlı kinazlar, CDI ve kontrol noktalarındaki proteinlerde gözlenir. Kanserde bulunan mutasyonlar gen amplifikasyonu ile siklinlerin (siklin D ve E) aşırı ekspresyonunu tetikler. Örneğin, akciğer kanserlerinde siklin D'nin DNA amplifikasyonu %15 oranında olduğu bulunmuştur. Ayrıca pankreas kanserinde P16^{ink4a} inhibitörünün geninde delesyon olduğu görülmüştür (Pecorino, 2008).

Normal koşullarda, kontrol noktaları inaktiftir, fakat spesifik sinyallerce aktif olduklarında, hücre döngüsünü durdururlar. Kanser hücreleri, hasarlı DNA'nın çoğalmasını engelleyen kontrol noktalarını ya kaybetmişlerdir ya da reddederler. G₂ kontrol noktalarında oluşan hasarlar ise kromozomal kırılmalarla ilişkilidir ve genetik kararsızlığa yol açar (Pecorino, 2008; Puri ve ark., 1999).

Radyasyon, vb. etkenlere maruz kalan hücrelerde de hücre siklusunda hatalar olabilmektedir. Örneğin; gamma radyasyonuna maruz kalan hücreler G fazında kalamaz ve S fazında hasarlı DNA'yı kopyalarak gen mutasyonuna veya hatalı kromozom dizilimine neden olurlar (Cabadak, 2008; Park ve Lee, 2003).

Bu yüzden hücre döngüsü kontrol noktalarının ve bu kontrol noktalarının efektörleri olan siklin-CDK komplekslerinin anlaşılması, kanserin anlaşılabilmesinde önemli bir yer tutmaktadır (Collins ve ark., 1997).

1.3. Kanser Oluşumunda Etkili Olan Genler

Karsinogenez mekanizmalarının anlaşılmasındaki önemli gelişmeler onkogenler, proto-onkogen ve sonradan tümör baskılayıcı genlerin keşfi ile ortaya çıkmıştır.

1.3.1. Onkogenler

Pro-onkogenler hücre bölünmesi üzerinde pozitif etki gösterirken, tümör baskılayıcı genler düzensiz hücre bölünmesini engeller. **Pro-onkogenler** (c-onc veya normal hücre genleri) normal hücrelerde, hücre bölünmesini ve farklılaşmasını kontrol eden hücrel genlerdir; amplifikasyon veya modifikasyon gibi çeşitli mekanizmalar ile onkogenlere dönüşürler. Onkogenler kanserin gelişimine katkıda bulunan aktive olmuş genlerdir. Bu aktivasyon; çoğu proteini kodlayan gen amplifikasyonundan, nokta mutasyonundan veya kromozomal translokasyondan oluşabilir. İnsan kanserlerinde sayısız onkogenler tespit edilmiştir (Osborne ve ark., 2004; Croce 2008).

Onkogenler hücrel veya retroviral orjinli genlerdir. **Hücrel onkogenler**; kanser hücrelerinden DNA elde edildikten sonra, bu DNA'ların normal hücrelere sokulmasıyla hücrelerin kanserleşmesi (DNA transfeksiyonu) yoluyla keşfedilmişlerdir. **Retroviral onkogenler** (v-onc) hayvan tümörlerinden elde edilmiş hızla transforme edici retrovirüslerde ilk olarak keşfedilmiştir. Hücrel onkogenler hem intronlara hem de ekzonlara sahipken, viral onkogenler sadece ekzonlara sahiptir (Kopnin, 2000; Weinberg, 1983).

➤ Ras Geni

Hayvan ve insan kanser tümörü model sistemlerinde en sık bozulmaya uğrayan onkogen ras ailesindeki mutasyonlardır. Bunu myc, siklin D, ret, erb-B, bcl-2, mdm-2, abl gibi diğer onkogenler takip eder. Ras genleri p21 olarak adlandırılan moleküler ağırlığı 21 kDa olan proteinleri kodlayan ve hücrenin çoğalması ve farklılaşmasında temel rol oynayan bir proteindir. p21 proteini tirozin kinaz reseptörleri ile etkileşime girerek sinyal iletim yolunu aktive eder. Bu nedenle, tüm ras gen ürünleri GTPaz aktivitesine sahiptir ve hücrenin büyümesini ve farklılaşmasını düzenlerler (Teich, 1996).

Ras gen ailesindeki mutasyonlar çeşitli insan kanserlerinde bulunur. Bu mutasyonların çoğu (12, 13 veya 61 kodonda) olan nokta mutasyonlarıdır. Mutasyona uğramış ras p21 aktive olan proteine (GAP) GTPaz bağlanma yeteneğini engelleyen bir yapıda olur. Böylece guanozin trifosfat (GTP) bağlı aktif durumda p21 tutulur (Buyru ve ark., 2003).

Ras gen ailesi *H-ras* (Harvey *ras*), *K-ras* (Kirsten *ras*), *R-ras*, *M-ras* ve *N-ras* (Neuroblastoma *ras*) olmak üzere 5 üyeden oluşmaktadır. Bunlar hücrenin kendi orjinal onkogenleri olup, virüslerde yalnızca *H-ras* ve *K-ras* onkogenlerinin karşılığı bulunmuştur. *H-ras* ve *K-ras*, fare sarkomu virüsü ilk olarak Harvey ve Kirsten viral (*V-ras*) onkoprotein olarak belirlenmiş ve hücrel transformasyonda yer aldıkları bulunmuştur. *N-ras* onkoprotein nöroblastoma hücre hattında tespit edilmiştir. İnsan DNA dizisindeki 11p15.5, 12p12.1, 1p13 kromozomlarda bulunmuştur (Macaluso ve ark., 2002; Spandidos, 2007).

1.3.2. Tümör Baskılayıcı Genler

Tümör baskılayıcı genler, hücrelerin büyümesini kontrol eden veya farklılaşmasında etkili olan genlerdir. Bu özelliklerini kaybederlerse, hücrelerin fenotiplerini değiştirerek kanser hücrelerine dönüşmesini sağlarlar (Komarova ve ark., 2003).

Tümör baskılayıcı genler (anti-onkogenler, resesif tümör genler) hücrel genlerdir; büyüme faktörünü baskılayarak tümörün bölünmesini engellerler. Bu genler büyüme düzenleyici veya hücre adezyon ve proteaz aktivitesinin düzenlenmesi gibi tümör hücrelerinin yayılmasını sağlayan metastazı etkileyebilecek işlevleri vardır. Son 20 yılda sayısız onkogen ve tümör baskılayıcı gen keşfedilmiştir. Yaklaşık 100 tane onkogen (hücrel ve viral) ve 20 tane tümör baskılayıcı gen tanımlanmıştır (Kopnin, 2000; Osborne ve ark., 2004). Tümör baskılayıcı genlerden kanser için en önemlileri Retinoblastoma (Rb) geni ve p53 genidir.

➤ **Retinoblastoma Geni (Rb):**

Rb geninde bir mutasyon sonucu oluşan Rb proteini bir tür çocuk göz kanseridir. İnsanın 13. kromozomu üzerinde yer alır. Rb, hücre döngüsünü G₁ evresinden DNA sentezinin gerçekleştiği S evresine geçişi yavaşlattığı için bir

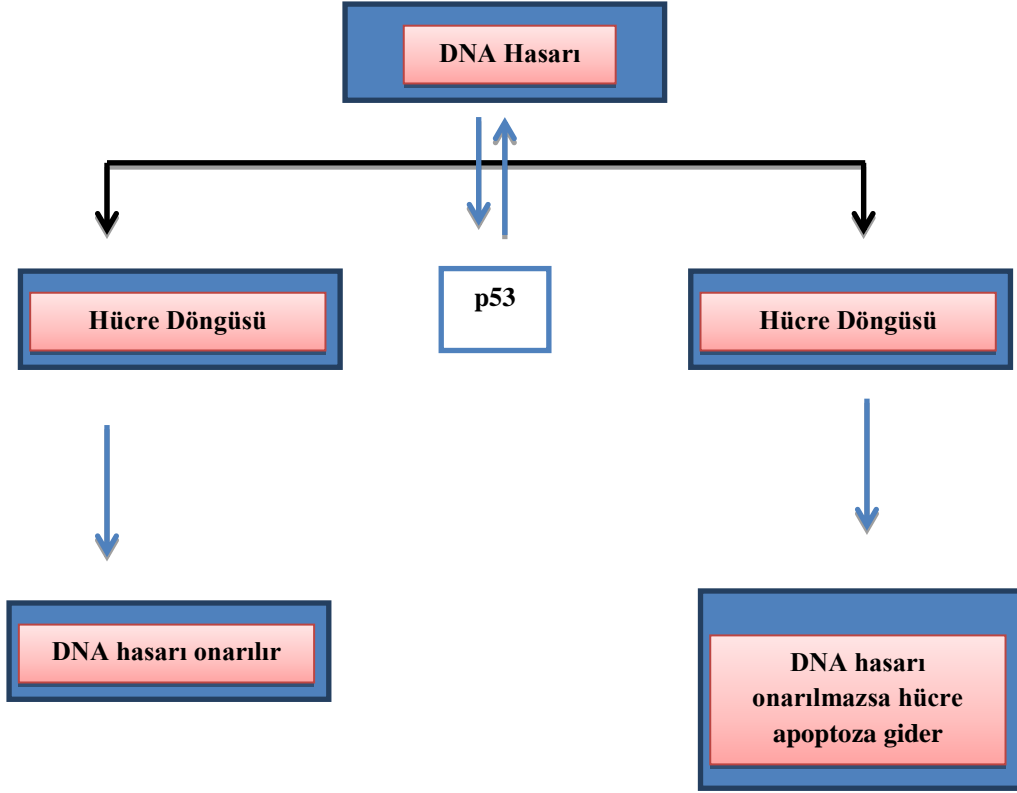
tümör baskılayıcı olarak görev almaktadır. Rb'nin en önemli hedeflerinden birisi S evresinin gerçekleşmesi için gerekli olan hücrel transkripsiyon faktörü olan E2F genlerin aktivasyonunda rolü olan protein ile etkileşime geçmesidir (Sandal, 2002; Stein ve ark., 1999).

Rb proteini hücre bölünmesinin düzenlenmesi ve tümör oluşum mekanizmasında önemli bir role sahiptir (Thangue, 1997).

➤ **p53 Geni:**

p53 tümör baskılayıcı gen, hücre döngüsünde gen ekspresyonunu düzenleyen DNA'ya bağlanabilen bir proteini kodlamaktadır. DNA'da oluşabilecek bir hasarda ya hücrenin büyümesini durdurur ya da hücreyi apoptoza sürükler. Eğer p53 geni kaybolur ya da mutasyona uğrarsa, hücre bölünmeye devam eder ve hasarlı DNA'yı replike eder. Böylece mutasyon yavru hücelere geçer buda kanserin gelişiminde önemli bir belirteç olarak gözlemlenmektedir (Teich, 1996; Gangopadhyay ve ark., 1997). p53 geninin ürünü olan protein, herhangi bir DNA hasarı oluşması durumunda, hücre döngüsünün G₁/S kontrol noktasında sentezlenir ve hücrenin S evresine girmeden G₁ evresinde bekletilmesini sağlar (Spandidos, 2007; Sandal, 2002; Weinberg, 2007).

p53 geninin aktive olması, BAX, Bcl-2 ve diğer apoptozu kontrol eden genlerin ekspresyonunu ortadan kaldırarak, hücre döngüsünü durduran p21^{WAF1} ve GADD45 genlerin ekspresyonunu sağlar (Kopnin, 2000).



Şekil 1.2. p53 proteinin hücre döngüsü üzerindeki etkisi

1.4. Apoptoz ve Kanser Oluşumundaki Rolü

Çok hücreli organizmalarda hücre bölünmesi ile artan hücre sayısı aynı zamanda hücrelerin ölüme gitmeleri ile dengelenmektedir. Eğer organizmada bir hücreye gereksinim duyulmuyorsa hücre içi ölüm programları aktive edilerek hücrenin intihar süreci başlatılır. Apoptoz olarak adlandırılan önceden programlanmış hücre ölümüyle hücre çoğalması arasında kontrollü bir denge vardır. Apoptoz terimi ilk olarak 1972 de J.F.K.Kerr tarafından nekrozdan farklı olarak gerçekleşen diğer bir ölüm şekli olarak tanımlanmıştır. Yaptıkları çalışmalarda apoptoza uğrayan hücrelerin çekirdeklerinin yoğunlaştığını ve hücre içeriklerinin membran ile çevrili apoptotik cisimcikler şeklinde alındığını belirlemişlerdir (Gewies, 2003; Altunkanyak ve Özbek, 2008; Pınarbaşı, 2007). Apoptoz, embriyolojik gelişim ve erişkin dokunun yaşamının sürdürülmesinde anahtar rol oynar. Apoptoz embriyogenesisiz, sinaptogenesisiz, immün yanıt, doku ve organ oluşumu gibi çeşitli biyolojik süreçlerin merkezinde yer alır (Ekshyyan ve Aw, 2004).

Tüm hastalıkların temeli hücrenin hasar görmesidir. Eğer hasar çok fazla ise, hücrenin yapısında ve işlevselliğinde geri dönülemez değişiklikler meydana gelir, bu da hücreyi ölüme götürür. Apoptoz farklı hastalıklar sonucu oluşabilir. Örneğin; fiziksel koşullar (embryonik ve fetal gelişim, erişkin dokularda hücre yenilenmesi), patolojik koşullar (hiperplazi regresyonu, patolojik atrofi, ilaçlar, toksik kimyasallar, kimyasal karsinojenler ve kanser kemoterapi ajanları ve radyasyon), hastalık durumları (otoimmün hastalıklar, iskemi, nörodejeneratif hastalıklar (Alzheimer hastalığı), kan hücrelerinde bozukluklar, viral enfeksiyonlar ve çeşitli inflamatuvar hastalıklar (Cameron ve Feuer, 2000).

1.4.1. Apoptozun Morfolojisi ve Nekroz ile Arasındaki Farklar

- Apoptozda ana morfolojik olay, nükleusun yoğunlaşması ve daha sonra parçalara ayrılmasıdır. Normalde bir hücrede birbirini takip eden 7 kırılma onarılabılırken, apoptoziste yaklaşık 300000 kırılma meydana gelir ve hücre onarımı yapılamaz. Ayrıca kromatin çekirdek zarına yakın bölgelerde yoğunlaşır.
- Apoptoz, tek bir hücrede, büzüşme ve çevre hücrelerle olan temasın kaybolması ile karakterizedir. Hücresel büzüşmenin nedeni Na^+ , K^+ , Cl^- taşıyıcı sistemin durması nedeniyle hücre içi ve dışı arasındaki iyon geçişlerinin durması ya da hücre iskeletindeki aktin filamentleri ve lamininlerin ayrılmasıyla hücrenin büzölmeye başlamasıdır.
- Hücre iskeleti apoptozda önemli bir role sahiptir. Elektron mikroskopunda apoptoz esnasında, hücrelerde meydana gelen kromatin yoğunlaşması, sitoplazma büzölmesi, plazma membranının kabarması, mitokondri dışı membranında şişme, mitokondrial membran aralığında sitokrom C ve bir oksidoredüktaz ile ilişkili flavoprotein olan apoptoz indükleyici faktör (AIP) salınımı, bilinen morfolojik değişikliklerdir.
- Apoptoz süreci ilerledikçe sitoplazmik çıkıntılar ve tomurcuklanmalar oluşur. Daha sonra hücreler sitozol, yoğun kromatin ve organel içeren apoptotik cisimciklere parçalanır (Gewies, 2003; Potten ve Wilson, 2004; Pınarbaşı, 2007).

Çizelge 1.2. Apoptoz ile nekroz arasındaki farklar (Cameron ve Feuer, 2000; Potten ve Wilson, 2004; Lacasse ve ark., 2005)

NEKROZ	APOPTOZ
Fizyolojik bir ölüm şeklidir. Hücreler gruplar halinde ölür	Hem fizyolojik hem patolojik bir ölüm şeklidir. Hücreler tek tek veya birkaçı birarada ölür.
Hücre içine aşırı sıvı girmesi sonucu hücre şişer ve hücre içeriği dış ortama aktığından inflamasyon oluşur.	Hücre büzülür, apoptotik hücre veya cisimcikler komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edildiklerinden inflamasyon oluşmaz.
Nekrotik hücre de kromatin yoğunluğu normal hücredeki görüntüye benzer.	Apoptotik hücrede kromatin nükleus membranının çevresinde yoğunlaşır.
Nekrotik hücrenin plazma membranı bütünlüğünü kaybeder.	Apoptotik hücrede hücre membranı bütünlüğünü korur.

1.4.2. Apoptozun İndüksiyonu

Bir hücrede apoptoz ya çevreden gelen sinyallerle [Tümör nekroz faktörü (TNF), koloni uyarıcı faktörler (CSF), nöron büyüme faktörü (NGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), glukokortikoidler, radyasyon, ilaçlar, çeşitli antijenler, (Fas/FasL , sFas proteinleri, virüsler) ya da çeşitli genlerin (Bcl-2, c-myc, p53, p21, ras onkogeni, fas (CD95/APO1)] aktivasyonu ile başlar (Akşit ve Bildik, 2008; Cameron ve Feuer, 2000).

Apoptozun mekanizması; ölüm sinyallerinin oluşması, hücre membranı tarafından ölüm sinyallerinin alınması [Fas ligandı, tümör nekroz faktörü (TNF), Lenfotoksin (TNF-beta)], hücrede ölümün gerçekleşmesi (mitokondriyal iç yolak ya da hücre yüzeyindeki ölüm almaçları) ve ölen hücrelerin fagositozla uzaklaştırılması olmak üzere dört aşama da gerçekleşir (Kandaş, 2004; Akşit ve Bildik, 2008).

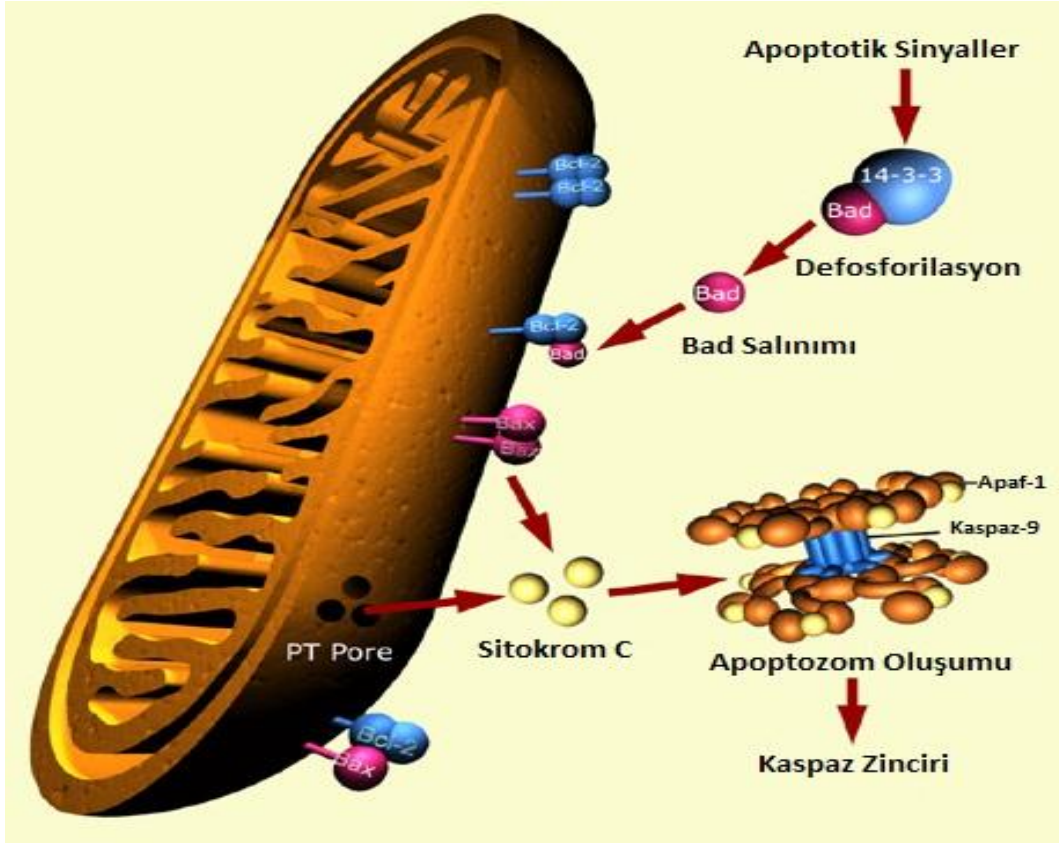
Memeli hücrelerinde apoptozun indüksiyonunu sağlayan iki tane büyük yolak belirlenmiştir. Dış yolak; membranda bulunan ölüm almaçlarına ligandların bağlanmasıyla aktive olur ve başlatıcı kaspazlardan 8 ve 10 aracılığıyla sinyalin

diğer kaspazlara iletilip aktive edilmesiyle gerçekleşir. İç ölüm yolağı; büyüme ve üreme faktörlerinin azlığı, hormon eksikliği ve DNA hasarı (p53 geni yoluyla) sonucunda sitokrom c'nin salınımı ile kaspaz 9 aktivasyonuna, ardından kaspaz zincirinin aktive olması ile gerçekleşir (Pınarbaşı, 2007).

Mitokondrinin Apoptozdaki Rolü

Mitokondri hücre ölümünün düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Mitokondri, apoptoz uyarıcı faktör (AIF), Smac/ DIABLO ve sitokrom c gibi pro-apoptotik proteinleri içerir. Bcl-2 ailesinin üyelerinden olan, proapoptotik gruplar, sitokrom c'nin mitokondri zarından hücre içine geçişini sağlayarak apoptozun uyarılmasında etkili olurken, antiapoptotik grup üyeleri ise sitokrom c salınımına engel olarak apoptozu baskılamaktadır (Pınarbaşı, 2007).

Mitokondriyel apoptoz yolağı hücrenin dışından gelen uyarılara ya da hücre içi DNA hasarları sonrası oluşan uyarılara karşı hücreler tarafından kullanılan en yaygın yolaktır. Mitokondride apoptozun gerçekleşmesini sitokrom c salınımı sağlar. Sitokrom c, kaspaz olarak adlandırılan hücre içi proteazları doğrudan uyarabilmektedir. Bir hücrede sitokrom c, apoptoz indükleyici faktörler (AIF) ile birlikte mitokondriden salınıp sitoplazmaya geçtiğinde apoptotik proteaz aktivasyon faktörleri (Apaf 1) ile bağlanıp ve apoptozom kompleksinin oluşmasını sağlar. Bu kompleks, inaktif olan prokaspaz-9'u aktifleştirerek kaspaz kaskadının başlamasını sağlar (Akşit ve Bildik, 2008; Cruchten ve Broeck, 2002; Brenner ve Kroemer, 1999).



Şekil 1.3. Mitokondrinin apoptozdaki rolü. Ölüm sinyallerine yanıt olarak mitokondriden sitokrom c salınır. Sitokrom c, Apaf-1, prokaspaz-9 ile etkileşerek apoptozomu oluşturur ve kaspaz zincirinde aktivasyon başlar.

(<http://www.Sgul.ac.uk/depts/immunology/dash/apoptosis/mito.html>)

1.4.3. Apoptozun Düzenlenmesinde Görev Alan Genler

Apoptozun oluşumunda birçok gen görev almaktadır. Bu genlerin bir kısmı hücre yüzeyinde bulunurken diğer kısmı hücre içi sinyal iletim yollarında görev alırlar. Apoptozda görev alan en önemli genler; Bcl-2 ailesi genleri, kaspazlar ve p53 genidir.

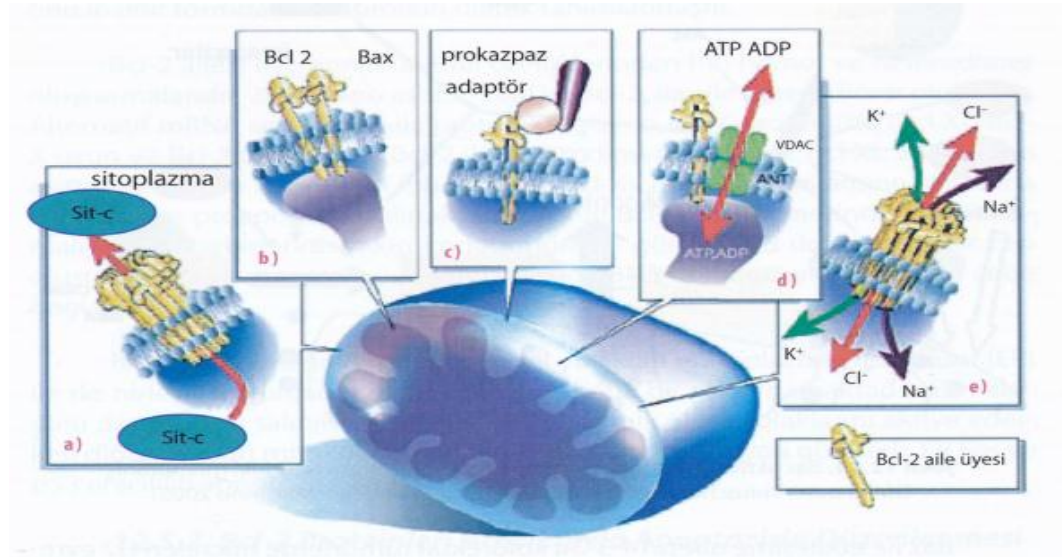
❖ Bcl -2 Ailesi Genleri

Bcl-2 ailesi antiapoptotik ve proapoptotik üyelerden oluşan ve apoptozun düzenlenmesinde en önemli role sahip olan onkoprotein grubudur. Bu ailenin 20 üyesi tanımlanmıştır; üyelerinin bir kısmının apoptozu uyardığı (Bax, Bad, Bid, Bcl-xS), bir kısmının ise inhibe ettiği (BHRL-1, bcl-xl, bcl-w, bfl-1, brag-1) bilinmektedir (Akşit ve Bildik, 2008; Kandaş, 2004).

İlk memeli genlerinden biri olarak keşfedilen hücre ölümünü düzenleyen antiapoptotik gen bcl-2'dir. Mitokondride, nükleus dışında ve endoplazmik retikulum zarında bulunan Bcl-2, 25-26 kDa ağırlığında olan bir proteindir. Bcl-2 proteinlerinin mitokondriyel yolakları endoplazmik retikulum (ER) ile birleşir. Bu organel de apoptozda kritik bir rol oynamaktadır. ER kalsiyum depolarının salınımı ile bir yandan ölüm yolaklarını aktive ederken diğer yandan mitokondri için doğrudan proapoptotik uyarı gönderir. Ayrıca Fas ve p53 aracılıklı apoptoza katkıda bulunur (Pınarbaşı, 2007; Hockenbery, 1994).

Bazı bcl-2 genleri apoptozu inhibe etmekten ziyade tetiklemeleriyle tanımlanırlar. Bunların içinde en önemlisi bax ailesidir. Bcl-2 mitokondride sitokrom c'nin salınımı ile kontrol edilir. Sitozole mitokondriden salınan sitokrom c kaspaz aktivasyonu ve DNA fragmentasyonu için gereklidir. Bcl-2 mitokondriden salınan sitokrom c'yi bastırıcı olarak işlev görmektedir (Kasof ve ark., 1999).

Bcl-2 apoptoz sırasında, proapoptotik üyelerine bağlanarak apoptoza etki eder, mitokondri membranından iyon akışını düzenler, sitokrom c salınımı düzenler ve Apaf-1'e bağlanarak inhibisyonun sağlanması gibi birçok işlev görür (Pınarbaşı, 2007).



Şekil 1.4. Bcl-2 ailesi proteinlerinin sahip olduğu özelliklerin gösterilmesi **a)** mitokondri membranında por oluşturarak sitokrom c ve diğer intermembran proteinlerinin salınmasını, **b)** pro ve antiapoptotik üyeler arasında heterodimer oluşumunu **c)** Adaptör moleküller aracılığı ile kaspazların aktivitesinin düzenlenmesi, **d)** Diğer

mitokondriyel proteinlerle etkileşim (VDAC), e) Oligomerize olarak zayıf seçici iyon kanalı oluştururlar (Pınarbaşı, 2007)

❖ Kaspazlar

Büyük bir proteaz enzim ailesi olan kaspazlar apoptoz ile yakından ilişkilidir. Aktif merkezlerinde sistein amino asidini taşırlar ve hedefledikleri proteinleri aspartik asit birimlerinden kestikleri için bu ismi almışlardır. Kaspazların aktivasyonu ve fonksiyonu, kaspaz-kaskad sistemi dahil, apoptozu inhibe eden proteinler, Bcl-2 ailesi proteinleri, kalpain ve Ca^{+2} gibi çeşitli moleküller tarafından düzenlenir (Fan ve ark., 2005; Cohen, 1997).

Kaspazlar, sitoplazmada normalde inaktif proenzimler olarak bulunurlar ve prokaspaz adını alırlar. Fakat proteolitik parçalanmadan sonra aktif hale geçerek kaspaz aktivasyon zincirini başlatırlar. Bu proteinler, hücre fonksiyonları için gerekli olan, özellikle hücre iskeleti yapısal proteinleri ve DNA tamirinde rol alan proteinlerin parçalanmasından sorumludurlar (Kandaş, 2004; Ekshyyan ve Aw, 2004).

Kaspazlar sadece apoptozun son aşamasını yürütmekle kalmazlar aynı zamanda bazı durumlarda hücre ölümünün uyarılmasında da görev alırlar. Kaspazlar apoptotik yolun son aşamasının vazgeçilmez bir parçası olarak rol alırlar (Kasof ve ark., 1999). Kaspazların bazıları (Kaspaz 2, 8, 9, 10) başlatıcı kaspazlar olarak bilinirken, bazıları da (3, 6, 7) efektör kaspazlar olarak bilinir. Başlatıcı kaspazlar apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara iletirler. Apoptotik yolağın sonraki aşamalarında görev alan kaspaz enzim zincirinin diğer üyeleri ise efektör kaspazlar olarak adlandırılırlar. Efektör kaspazlar başlatıcı bir kaspazla aktive edilirler. Kaspazlardaki hasarlar otoimmün hastalıklara, kansere ve bazı nörolojik bozuklukların oluşumuna katkıda bulunabilirler. Hatta kaspaz 8'in nöroblastomada tümör süpressörü olarak işlev gördüğü de bulunmuştur (Cameron ve Feuer, 2000; Ratogi ve Sinha, 2009; Pınarbaşı, 2007).

❖ p53 Geni

Bir tümör süpressör gen olan p53 geni, kromozom 17'de yerleşiktir ve 53 kDa ağırlığında bir proteini kodlar. Hücrede bir şekilde (radyasyon, kemoterapi

etkisiyle) DNA hasarı oluştuğunda, eğer hasar onarılabilecek düzeyde ise hücre siklusunu G₁ fazında durdurur ve hücreye DNA'sını tamir edebilmesi için zaman kazandıran bir proteindir. Eğer DNA hasarı tamir edilemeyecek kadar büyükse bu durumda p53 apoptozu indükler. p53'ün apoptozu indüklemesi, Bax'ın ekspresyonunu artırması böylece Bcl-2/Bax oranını değiştirmesi yoluyla gerçekleşir. Uyarılan p53, bcl-2 ailesinden bax'ın uyarılmasına yol açarak apoptoz mekanizmasını başlatabildiği gibi, Fas, DR4 ve DR5 gibi hücre yüzeyi ölüm reseptörlerini uyararak da apoptozu uyarabilmektedir. Ek olarak p53 ile aynı işlevi gören p63 ve p73 genleri de tespit edilmişlerdir (Thiede ve ark., 2000; Akşit ve Bildik, 2008; Pınarbaşı, 2007).

İşlevsel p53 radyasyon ya da kemoterapik ilaçların yanı sıra c-myc gibi transforme olmuş onkogenlerin ve E1A adenovirüsün neden olduğu apoptoz için gereklidir. Fakat tüm apoptoz yollarından sorumlu değildir, çünkü glukokortikoidler tarafından tetiklenen hücre ölümünde etkisi görülmez. p53'ün işlevi hücre tipine ya da fiziksel koşullara bağlıdır. Aslında, sitokinler ve büyüme faktörleri p53'ün apoptozu tetiklemesinde etkilidirler. p53'ün genotoksik olarak uyarılması, hücre döngüsündeki süreçleri kontrol eden bir kontrol noktası olarak hareket eder ve genomik bütünlüğü sağlamaktadır (Kasof ve ark., 1999; Weinberg, 2007).

p53 geni mutasyona uğrarsa, yanlış proteinler kodlanır ve buda kanser gelişimine yol açar. Çoğu kanserde, p53 geninin mutasyona uğradığı bulunmuştur. Bu da p53 proteininin fonksiyonunu kaybettiğini göstermektedir (Potten ve Wilson, 2004).

1.4.4. Apoptozu Belirleme Yöntemleri

Apoptozun belirlenmesinde çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemler;

- Morfolojik görüntüleme yöntemleri
(Elektron Mikroskopu, Floresans Mikroskop ve Konfokal Mikroskop)
- İmmunohistokimyasal yöntemler
- Biyokimyasal yöntemler (FACS analizleri, Annexin Yöntemi, MTT Yöntemi, Kaspazlar, Tunel Tekniği)

- Moleküler biyoloji yöntemleri (DNA Ladder, Semi-kantitatif mRNA analizleri, RNAaz Üretim metodu, Fas Analizi, Fas Ligand Analizi, TRAIL/TRAIL R, Bcl-2 Üretimi, Bcl-XL Üretimi (Altunkanyak ve Özbek, 2008).

1.4.5. Apoptoz ve Kanser Arasındaki İlişki

Tümör hücreleri DNA hasarına ve onkogen aktivasyonuna yanıt olarak birçok sinyal ürettiklerinde apoptozis başlar. Tümör baskılayıcılar aracılığıyla çoğu hücre karsinogenik karakteristiğini apoptoz ile ortadan kaldırır. Fakat tümör hücreleri edinilen mutasyonlarla apoptotik yanıtta kaçarlar. Apoptozdan kaçmaları mutasyonların daha da çok oluşumuna yol açar. Tümör hücreleri normal hücrelere göre birçok apoptoz indükleyici sinyallere (oksidatif stress, onkogen aktivasyonu gibi) sahiptirler. Tümör hücrelerinde apoptotik yollar genelde kusurludur. Bu yoldan çıkarak, tümör hücrelerinde apoptotik yolun düzeltilmesi p53 geninin hedeflendirilmesiyle yeni kanser terapötikleri için kayda değer bir strateji olabilir. Kanser hücreleri ile normal hücreler arasında kaspaz aktivasyonunda da temel farklılıklar vardır. Kanser hücreleri düzensiz IAP'ler tarafından inhibe olan aktifleşmiş kaspazlar içerirler fakat normal hücreler inaktif prokaspazlar içerirler. Bu yüzden kanser hücreleri normal hücrelerle karşılaştırıldığında apoptotik yanıtın tetiklenmesine daha yatkındırlar (Pecorino, 2008; Soucie ve ark., 2005).

1.5. Askorbik Asidin Kanser Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisi

Askorbik asit (C vitamini) 176,13 g/mL ağırlığına sahip suda çözünebilen altı karbonlu bir laktondur. Askorbat ekstrasellüler sıvıda çok önemli bir antioksidandır. Suda çözünen bir vitamin olduğu için dokularda yüksek derişimlerde bulunabilir (göz, beyaz kan hücreleri, beyin, pankreas, karaciğer) (Spielholz, 1997; Gonzales ve ark., 2005).

Yaklaşık tüm memeliler, sürüngenler ve kurbağalar vücutlarının günlük ihtiyacı olan askorbik asidi üretirler. Çoğu memeli askorbik asidi karaciğerlerinde sentezlerken, sürüngenler ve kurbağalar böbreklerinde sentezlerler. İnsanlar, primatlar ve meyve yarasaları askorbik asit üretme yeteneklerini kaybetmişlerdir. İnsanlar L-gulokolakton oksidaz (GLO) enziminin eksikliğinden dolayı askorbik

asit üretemezler. Bu gen enzimde kodlanmıştır fakat mutasyona uğradığı için bu proteini üretememektedir (Spielholz, 1997; Padayatty, 2003).

1.5.1. Askorbik Asidin Tarihçesi

Askorbik asit 1700'lerde ilk olarak skorbit hastalığının tedavisi için kullanılmasına rağmen, aslında tam olarak tanımlanamamıştır. 1753'de, İngiliz fizikçi James Lind yayınladığı skorbit hastalığının bilimsel incelemesinde, narenciye meyvalarının skorbit hastalığını tedavi ettiğini ve yeterli miktarda alındığında bu hastalıktan korunulabildiğini açıklamıştır. Daha sonra, 1928'de Dr. Albert Szent-Györgyi C vitaminini izole etmiştir ve bu molekülün skorbit hastalığını tedavisinden sorumlu olduğunu açıklamış ve adını, anti-skorbit etkisini göstermek için askorbik asit olarak koymuştur (Szent-Györgyi, 1928). Bu çalışma 1937'de Dr. Albert Szent-Györgyi'ye Nobel ödülü kazandırmıştır. 20.yy sonlarına doğru Dr. Linus Pauling, yüksek dozda C vitamininin soğuk algınlığına karşı koruyucu olduğunu savunmuştur ve askorbik asidin kanser tedavisindeki önemini vurgulamıştır (Lawson, 2003).

Askorbik asidin keşfinden beri, vücuttaki rolünü ve sağlığa olan faydasını anlamak için milyonlarca çalışma yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda; immün sistemi güçlendirdiği, katarakta karşı koruduğu, serbest radikal hasarından DNA'yı koruyarak kansere karşı koruduğu, E vitamini ile birlikte kalp hastalığı riskini azaltarak lipoproteinlerin oksidasyonuna karşı koruduğunu ve ayrıca kollajen oluşumunu uyardığı, UV ışınının hasarına karşı cildi koruduğu ve inflamatuvar yanıtı modifiye ettiği gösterilmiştir (Spielholz, 1997).

1.5.2. Askorbik Asidin Biyokimyasal Yapısı

Askorbik asit birçok reaksiyonda, direk ya da dolaylı olarak enzimlere elektron sağlar. Askorbik asit hidroksilaz enzimlerinin kofaktörü olan metal iyonlarına elektron sağladığı için, hidroksilasyon reaksiyonlarını hızlandırmada önemli bir role sahiptir. Hidroksilasyon reaksiyonları kollajen sentezinde, lizini karnitine, dopamini nörepinefrine dönüştürmede ve tirozin metabolizmasında, sitokrom p-450 aktivitesinde, kolesterol metabolizmasında ve dış kaynaklı bileşiklerin detoksifikasyonunda önemlidir (Padayatty ve ark., 2003; Padayatty ve Levine, 2001; Heaney ve ark., 2008).

Askorbik asit kararlı olmayan oksijeni, nitrojeni ve sülfür merkezli radikalleri azalttığı için güçlü bir antioksidandır. Ayrıca diğer vitaminlerle sinerjik bir etkiye sahip olduğu bilinmektedir (Gilloteaux ve ark., 1998; Gonzales ve ark., 2005).

1.5.3. Askorbik Asidin Etki Mekanizmaları

- Lenfosit üretimini arttırarak immün sistemi güçlendirir.
- Tümörlerin metastaz yapmasını engelleyen kollajenin kofaktördür.
- Tümörlerin birbirleri ile etkileşimini engelleyen ve metastazı durduran hyaluronidaz enzimini inhibe eder. Kanser hücreleri hyaluronidaz enzimini kollajen ve fibrinleri yıkarak, tümörün büyümesi ve yayılması için gerekli alanı yaratmak için kullanırlar.
- Karnitin olarak bilinen proteinin sentezinde yer alır. Karnitin enerji üretimi için mitokondride yağların taşınması için gereklidir.
- Vücutta birçok hormon ve nörotransmitteri aktivite eden peptidil α - mono oksijenaz (PAM) işlevinde yer alır.
- Bağırsakta demir absorpsiyonu için gereklidir.
- Onkojenik virüslerin inhibisyonunu sağlar.
- Yaraların iyileşmesini kolaylaştırır.
- Tamoksifen, sisplatin gibi kemoterapik ilaçların etkisini güçlendirirken, adriamisin gibi toksik kemoterapik ilaçların toksisitesini azaltır.
- Hücreyi radikal hasara karşı korur.
- Karsinojenik maddeleri nötralize eder (Calvino ve Levine, 2001; Iqbal ve ark., 2004; Heaney ve ark., 2008).

1.5.4. Askorbik Asidin Hücreye Alım Mekanizması

Serbest radikaller tarafından oluşan DNA'daki hasar, karsinogenezin ilk aşamasıdır. Kanserden korunmak için vücudun DNA mutasyonlarından korunmaya ihtiyacı vardır. Vücut serbest radikallerin hasarına karşı kendisini antioksidan kullanarak savunur (Ge ve ark., 2008).

Askorbik asid 6 karbonlu molekülün 2. ve 3. karbonları arasındaki çift bağdan 2 elektron verdiği için antioksidan olarak bilinir ve diğer bileşiklerin okside olmasını sağlar. Askorbik asidin doğasında bu reaksiyon olduğu için

kendini de okside edebilir (Buettner ve Moseley, 1993). Askorbik asit sadece antioksidan aktiviteye sahip değildir aynı zamanda yüksek derişimlerde de kanser hücreleri üzerinde sitotoksik aktivitesi vardır. Anaerobik glikoliz için pürivatların kullanımını inhibe ederek oksidatif metabolizmayı düzenler. Artan hücre proliferasyonu ile ilişkisi olan araşidonik asit ve türevlerini inhibe eder. Büyümeyi inhibe edici özelliği en az 7 farklı tümör çeşidinde çalışılmıştır. Yapılan çalışmalarda, bu sitotoksik etkisinin askorbik asidin prooksidan özelliğinden kaynaklandığı bulunmuştur (Padayatty ve Levine, 2001).

Kanser oluşumuna yol açan DNA kırılmaları, lipid peroksidasyonu hücre membranının bozulması, hücre ATP'nin tükenmesi (Krebs çemberinde ve elektron taşıma sistemindeki anahtar rol oynayan enzimlerin oksidatif inaktivasyonu) gibi negatif hücre etkilerde, askorbik asit hidrojen peroksit üreterek hatta oksidasyonu için gerekli olan bakır ve demir gibi elementlerle yapısını güçlendirerek, katalaz aktivitesi olmayan tümör hücrelerinin hücre membranlarına zarar vererek, hücrelerin ölmesine yol açar (Ge ve ark., 2008; Astuya ve ark., 2005).

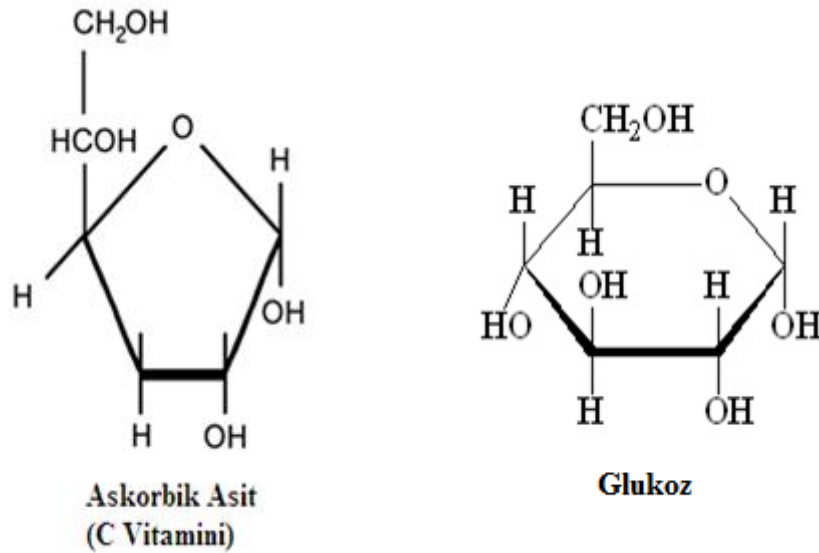
Genel olarak, askorbik asitin sitotoksik etkisinin merkez noktası hidrojen peroksittir. Hücreler tarafından üretilen hidrojen peroksit miktarı askorbik asit derişimine bağlıdır. Hidrojen peroksit, askorbik asitin metabolik oksidasyonla dehidroaskorbik asite dönüşümü boyunca intraselüler olarak üretilir. Hidrojen peroksit lipid peroksidasyonunu başlatır. Kanser hücrelerinde, askorbik asitin antiproliferatif etkisi, askorbik asitin oksidasyonu için katalizatör olan bakır iyonlarının eklenmesiyle oluşur. Bakır, bakır sülfat formundayken tirozin aktivitesini inhibe eder. Bu da katalaz, süperoksit dismutaz, glutasyon peroksidaz gibi antioksidan enzimlerin kanser hücrelerinde seviyesini azalttığından dolayı, kanser hücrelerini askorbik asite karşı daha seçici yapar ve hidrojen peroksitin toplanmasını sağlayarak hücre hasara yol açmaktadır (Lawson, 2003; Iqbal ve ark., 2004; Chen ve ark., 2005).

Askorbik asit sodyum bağımlı taşıyıcılar (SVCT) SVCT1 ve SVCT2 ile taşınır. SVCT1 epitel sistemlerden (bağırsak, böbrek, karaciğer) ve diğer epitel dokularda (akciğer, gözyaşı bezi, epididimus) taşıyıcı olması ile sınırlı iken, SVCT2 oldukça geniş bir taşıyıcıdır. Askorbik asidin bu taşıyıcıları var olmasına

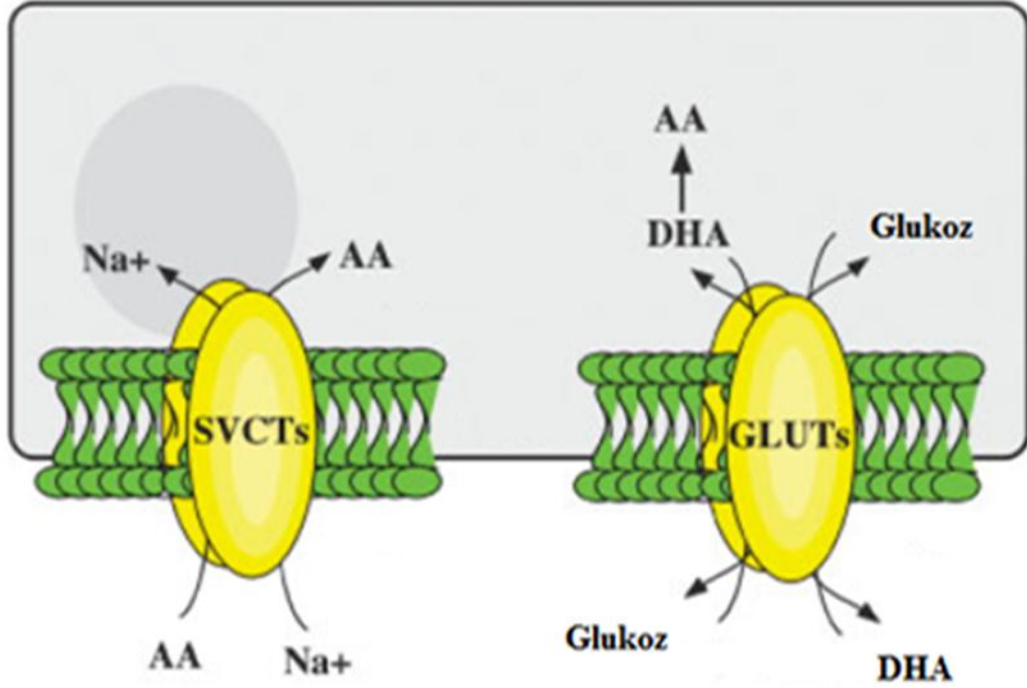
rağmen, bazı dokular (eritrositler) askorbik asidi okside olmuş formu olan dehidroaskorbat (DHA) halinde glukoz taşıyıcıları ile (GLUT) taşımayı tercih ederler (Kodaman ve ark., 1998; Spielholz ve ark., 1997; Agus ve ark., 1999; Padayatty ve Levine, 2001).

Askorbik asidin avantajı, kanser hücreleri enerji ihtiyaçlarını karşılamak için glukozu ihtiyaç duyarlar ve yeterli glukoz ihtiyaçlarını karşılamak için glukoz taşıyıcılarını (GLUT) artırırlar. Bu da askorbik asit ya da okside olmuş formunu kanser hücrelerine girmesini kolaylaştırır. Çünkü askorbik asit ve glukoz hidroksil gruplarından dolayı, benzer yapıya sahiptir. Askorbik asit kanser hücrelerinde sitotoksik etkiye sahipken, normal hücrelerde toksik etkisi yoktur. Bu da normal hücreyle kanser hücreleri arasında katalaz enziminin farklı seviyede olmasından dolayıdır. Katalaz hidrojen peroksiti su ve serbest oksijene metabolize eder fakat kanser hücrelerinde bu enzim yoktur (Verrax ve ark., 2008; Lawson, 2003; Astuya ve ark., 2005).

Ayrıca karsinogenik süreçte mitokondrinin işlevi de önemlidir. Askorbik asit iyi bir elektron verici olduğu için, mitokondrinin enerji yolağı için gereken elektronları fiziksel ve metabolik olarak sağlar (Gonzales ve ark., 2005; Sagun ve ark., 2005).



Şekil 1.5. Askorbik asit ile glukozun formülasyon yapılarının karşılaştırılması



Şekil 1.6. Askorbik asidin hücreye alınmasını sağlayan sodyum bağımlı (SVCT) ve glukoz bağımlı taşıyıcılar (GLUT) (Astuya ve ark., 2005)

1.5.5. Askorbik Asidin Kanser Tedavisindeki Yeri

Askorbik asidin kanser tedavisindeki rolünü anlamak için yapılan çalışmaların başlangıcı 1970'li yıllara dayanmaktadır. Askorbik asidin antikanserojenik etkisi ilk olarak, 1974 yılında Cameron ve Campbell tarafından çalışılmış, yüksek dozda askorbik asidin kansere karşı doğal direnci güçlendirdiği, askorbik asit ek alınımının kanser tedavisinde standart bir destekleyici olarak kabul göreceğini bulduktan sonra (Cameron ve Campbell, 1974), 1976 yılında Cameron ve Pauling tarafından askorbik asidin kanser tedavisinde kullanılabileceğini açıklanmıştır. Cameron ve Pauling askorbid asidin kanser tedavisinde kullanımı ile ilgili iki hipotez öne sürmüşlerdir. Birincisi, askorbatın antitümör etkisini kollajen sentezi ile arttırdığı, ikincisi ise hiyaluronik asidin oluşumunu engelleyen hyaluronidaz enzimini inhibe etmesidir. Yaptıkları çalışmalarında, askorbat ile tedavi edilen kanser hastalarının yaşam süresini üç kat daha arttırdığını, hatta kanserin ilk aşamalarında askorbat tedavisi görenlerinin

ömrünün 5 yıldan 20 yıla kadar çıkabileceğini bulmuşlardır (Cameron ve Pauling, 1976). 1978 yılında bir diğer çalışmalarında, askorbat alan kanser hastalarının yaşam kalitelerinin arttığı, fakat erken aşamada teşhis edilen kanser hastalarında çok daha fazla etkisi olabileceği gösterilmiştir (Cameron ve Pauling, 1978). Ayrıca yaptıkları başka bir çalışmada hem insan hem de hayvan deneylerinde, askorbik asitin invaziv tümör enzimlerini inhibe ettiğini, ayrıca yüksek dozda askorbik asit alımının immün sistemi çeşitli yollarla güçlendirdiğini, askorbat kimyasal ve fiziksel karsinojenlere ve onkogenik virüslere karşı koruyucu bir rolü olduğunu bulmuşlardır (Cameron ve ark., 1979). Daha sonra askorbat ile tedavi edilen erken aşamadaki kanser hastalarının yaşam sürelerinin analizler sonucunda kontrollere göre (180 gün) ortalama 343 gün olarak arttığını bulmuşlardır (Cameron ve Campbell, 1991).

Askorbik asidin kanser tedavisinde etkileri ile ilgili çalışmalar, Cameron ve Pauling'in çalışmalarını destekleyici sonuçlar ile devam etmiştir. 1982 yılında yüksek dozda askorbat ile tedavi edilen 130 kanser hastasının yaşam süresinin uzadığı gösterilmiştir (Murata ve ark., 1982). Aynı yılda Dunham ve ark. farelerde ultraviyole ışık ile uyarılan dermal neoplazma tümörlerinde L-askorbik asit alımının etkisini araştırmış, yemeklerine L-askorbik asit eklenen farelerde dermal tümör oluşumunun azaldığı bulunmuştur (Dunham ve ark., 1982).

İlerleyen yıllarda C vitaminine maruz bırakılan kanser hücrelerinin hücre yüzeyleri ve ince yapıları incelenmiş, C vitamininin sitolitik ve otofajik etkiyi arttırarak, hücre membran bütünlüğünü bozduğunu, kollajen sentezini arttırdığını ve böylece kanser hücrelerinin metabolizmasını ve proliferasyonunu inhibe ettiği bulunmuştur (Lupulescu, 1992). Maramag ve ark. C vitamini prostat kanseri hücrelerinin canlılık oranını ve proliferasyonunu inhibe ettiğini bulmuşlardır (Maramag ve ark., 1997). İki yıl sonra yapılan başka bir çalışmada stromal hücre oksidasyonunda tümör hücrelerinin C vitaminini alma mekanizmaları çalışılmış, C vitamininin dehidroaskorbik asit formunda GLUT taşıyıcıları ile hücreye alındığını, normal hücrelerle karşılaştırıldığında kanser hücrelerinde C vitaminin derişiminin arttığını ve *in vitro* bazı neoplastik hücrelerin büyümesi engellemede önemli bir rol aldığı bulunmuştur (Agus ve ark., 1999).

Askorbik asit ile K₃ vitamininin sinerjik bir etkiye sahip olduğu ile ilgili literatürde birçok çalışma vardır. İnsan prostat karsinoma hücreleri ve T24 insan mesane karsinoma hücrelerinde C ve K₃ vitamininin sinerjik antitümör aktivitesi çalışılmış, bu kombinasyonun oksidatif stresi arttırdığı, hüce zarına zarar verdiği ve DNA fragmentasyonuna neden olarak kanser hücrelerin üzerinde sitotoksik etkiye sahip olduğunu bulunmuştur (Jamison ve ark., 1996; Gilloteaux ve ark., 1998; Verrax ve ark., 2003).

Cameron ve Pauling'in çalışmalarından sonra, Levine ve Padayatty en yüksek konsantrasyonda bile intravenöz verilen askorbik asidin normal hücrelere hiçbir zarar vermeyip çeşitli kanser hücrelerine karşı toksik etkiye sahip olduğunu bulmuşlardır. Kanser hücrelerinde askorbatın toksik etkisinin intraselüler konsantrasyondan çok ekstraselüler konsantrasyonda yüksek seviyede olduğunu bulmalarına rağmen bu toksisitenin mekanizmasını açıklayamamışlardır (Levine ve ark., 1996; Padayatty ve Levine, 2000). Diğer bir çalışmalarında C vitaminin güçlü bir antioksidan özelliğe sahip olduğunu bulmalarına rağmen klinik çalışmalarda insanlarda olan antioksidan özelliği henüz desteklenememiştir (Padayatty ve ark., 2003). 2004 yılında yaptıkları çalışmalarında, C vitamininin oral ve intravenöz kullanımı çalışılmış, intravenöz C vitamininin oral verilen C vitaminine göre plazma konsantrasyonunun daha fazla olduğunu ve normal hücrelerde toksik etkiye sahip olmayıp kanser tedavisinde etkili bir rolü olabileceği bulunmuştur (Padayatty ve ark., 2004; Padayatty ve ark., 2006). Chen ve ark. 2005 yılında, bu etkinin mekanizmasını bulmak için askorbik asidin hidrojen peroksit üreterek kanser hücrelerinin seçici bir şekilde öldürmesiyle ilgili bir çalışma yapmışlar, askorbatın ekstraselüler hidrojen peroksit (H₂O₂) formasyonunu başlattığını bulmuşlardır ve askorbat derişiminin farmakolojik ürünü olan hidrojen peroksitin kanser tedavisine ek olarak potansiyel bir terapötik olarak kullanılabiliceğini bulmuşlardır (Chen ve ark., 2005). 2008 yılında Hoffer ve ark. yüksek dozda askorbik asitin antikanser etki gösterdiğini fakat ilerlemiş kanser hastalarında önceden gördükleri tedaviden dolayı antikanser etkisinde başarısız olduğunu bulmuşlardır (Hoffer, ve ark., 2008). Levine ve ark. askorbatın kanser tedavisinde farmakokinetiğini çalışmış ve aynı yılda askorbik asidin kanser üzerine olan etkileri ile ilgili bir derleme yapmışlardır (Levine ve ark., 2009).

Askorbik asidin kanser tedavisindeki rolünü anlamada en önemli aşama, Riordan ve ark., askorbik asidin kanser hücrelerinde toksik olduğunu ve mekanizmasını göstermiş olmalarıdır. Riordan ve ark. tarafından 1990 yılında böbrek hücre karsinoması olan hastaların tedavisinde yüksek dozda intravenöz C vitamininin etkilerini çalışmış ve yüksek dozda C vitamininin normal hücrelerde toksik ve herhangi bir yan etkiye sahip olmayıp, kanser hücrelerinde toksik etkiye sahip olduğu bulmuştur (Riordan ve ark., 1990; Riordan ve ark., 1995; Riordan ve ark., 2000). Mikirova ve ark. tarafından 2001 yılında kanser hücrelerinde C vitamini ile beraber manyetik alanın etkileri araştırılmış, düşük frekansta manyetik alan ile C vitamini kombinasyonunun tümör hücrelerini %50 oranında uyardığı ve normal hücrelere zarar vermediğini bulmuşlardır (Mikirova ve ark., 2001). 2011 yılında intravenöz askorbik asidin kanser ile ilişkili durumları önleyici mi yoksa tedavi edici mi olduğu çalışılmış, askorbik asidin kanser hastalarında inflamasyonu azaltma, hayat kalitesini artırma gibi faydaları olduğu bulunmuş ve askorbik asidin toplanan tüm biyolojik verilere göre mükemmel bir ajan olma olasılığı olduğu bulunmuştur (Ichim ve ark., 2011).

Bu çalışmaların dışında, glutasyon düzeyi azalmış HL-60 hücrelerinde oksidatif stres tarafından gerçekleşen hücre ölümünde C vitaminin mekanizması araştırılmıştır. Bu çalışmada, oksidatif stres ile ilgili hücrelerin kendini savunma mekanizması olarak C vitamininin antioksidan özelliğinin kanser hücrelerinde kullanılabileceği bulunmuştur (Guaiquil ve ark., 2001). Ayrıca insan kolon kanser hücrelerinde mitokondriyal süperoksit anyonlar tarafından apoptozun askorbik asit ile baskılanması çalışılmıştır. Antioksidan özelliği olan askorbik asidin mitokondride reaktif oksijen üretimini azalttığı bulunmuştur. Kemoterapi esnasında yüksek dozda askorbik asit alınmasının, kanser tedavisi için faydalı olduğu bulunmuştur (Wenzel ve ark., 2004). 2005 yılında, akciğer mikrovaskular endotel hücrelerinde redoks bağımlı canlılığın C vitamini ile uyarılması çalışılmıştır. Farmakolojik konsantrasyonda C vitamini reaktif oksijen türleri (ROS) üreterek akciğer mikrovaskular hücrelerde oksidatif stresi uyardığı, hidrojen peroksit ve intraselüler demirin bu süreçte kritik bir rol oynadığı bulunmuştur (Varadharaj ve ark., 2005). Reidling ve ark. C vitamininin insan karaciğer epitel hücrelerinde sodyum bağımlı taşıyıcılar ile alınımı ve

mekanizması çalışılmıştır (Reidling ve ark., 2008). BALB/C anjiyogenezin sınırlanmasında yüksek konsantrasyonda askorbik asidin farelere implante edilen 180 sarkoma kanserinde yüksek dozda askorbik asidin anjiyogenezi inhibe ettiğini bulmuşlardır fakat anjiyogeneze karşı askorbik asidin mekanizmasını bulamamışlardır (Yeom ve ark., 2009). Son olarak 2011 yılında insan kolon kanseri hücrelerinde sisplatin tedavisi süresince p53 aracılığıyla olan apoptozdaki, C vitaminin etkisi çalışılmıştır. Sisplatin ile C vitamininin HCT-116 kolon kanseri hücrelerini apoptozise karşı daha hassas hale getirdiği ve bu birleşik tedavinin kolon kanserine karşı tedavide yeni bir strateji olarak kullanılabileceği bulunmuştur (An ve ark., 2011).

1.6. Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler

Nanoteknoloji 10-1000 nm arasındaki sistemlerin, araçların, materyallerin sentezi, tasarımı ve uygulanması üzerine geliştirilmiş, matematik, fizik biyoloji, eczacılık ve malzeme mühendisliği gibi bütün bilim dallarını kapsayan, son zamanlarda nanoboyutta taşıyıcılar geliştirilmesi amacıyla ilaç taşıma sistemlerine odaklanılmasını sağlayan multidisipliner bir bilim dalıdır (Park 2007; Farokhzad ve Langer 2009; Poole ve Owens 2003). Nanopartiküller biyolojik sistemlerle etkileşime giren multifonksiyonel materyallerdir ve genellikle 10-1000 nm arasında boyuta sahip olan, doğal ya da sentetik polimer veya lipid gibi farklı biyolojik materyallerden oluşan ilaç taşıyıcıları olarak kullanılırlar. Nanopartiküller, zayıf çözünen ilaçların çözünürlüğünü arttıran, ilacı hedeflendirebilen ve ilaç biyoyumumluluğunu geliştiren hedefli ilaç taşıma aracı olarak kullanılır. Bu yapılar anti kanser ilaçların hedefli taşınması için tasarlanan nanopartikül sistemlerinin gelişmesine yol açmıştır. Birçok anti kanser ajanı kanserli hücre ile normal hücreyi ayırt edemediği için birçok yan etki ve toksisiteye sahiptir. Ayrıca, hedeflenmiş doku ve organda hızlı kaybolmalarından dolayı ilacın yüksek miktarda alımını gerektirirler (Soppimath ve ark., 2001; Sinha ve ark., 2006; Pragati ve ark., 2009; Li ve ark., 2007; Bhowmik ve ark., 2009; Rao ve ark., 2010).

İlaç taşıma sistemlerinde son gelişmeler, biyolojik çevreyle ilacın etkileşiminin anlaşılmasına, hedefli hücre popülasyonlarına ya da hücre yüzey

reseptörlerine hedeflenmesine, ilacın kontrollü salınımına, moleküler mekanizmasına ve hastalığın altında yatan patolojinin anlaşılmasına dayanan nano sistemlerin uygulanmasıdır. Nano boyutta ilaç taşıma sistemleri ilacı hedeflendirebilen, arzu edilen zaman ve bölgede kontrollü salınımını sağlayan ve nano boyutlu taşıyıcıları içerirler. Genellikle nanoboyutlu taşıyıcılar 1000 nm altında boyuta sahip ve nanokürecikler, nanokapsüller, nanomiseller, nanolipozomlar ve nanolipidler gibi çeşitli morfolojik yapılarda bulunurlar (Jones ve ark., 1997; Sitterberg ve ark., 2010; Tao ve Desai, 2003; Kshirsagar, 2000).

1.6.1. Nanopartiküler İlaç Taşıma Sistemlerinin Avantajları

Nanopartiküler ilaç taşıma sistemlerinin önemli avantajları vardır:

- Nanopartiküler ilaç taşıma sistemleri, ultra küçük hacimleri nedeniyle en küçük kılcal damardan geçebilir ve fagositler tarafından yakalanmaları zordur.
- İstenilen zamanda istenilen bölgeye hedeflenebilirler.
- Karaciğer, dalak, akciğer, omurilik ve lenf gibi hedef organlara ulaşmak için hücre ve doku boşluğuna nüfuz edebilirler.
- Sıcaklığa, pH'ya, biyobozunurluğa hassas olduklarından dolayı kontrollü salınım yapma özelliğine sahiptirler.
- İlaçların toksik ve yan etkilerini azaltabilir hatta yok edebilirler.
- Kontrollü ilaç salınımı elde etmek için taşıyıcı materyallerin kombinasyonunu ve seçiciliğini sağlarlar.
- Nanopartiküllerin endüstriyel çapta üretimi ve klinik alanda uygulanması kolaydır.
- İn vivo süreçte nanopartiküllerin hedef doku ve organlarla etkileşiminin açıklanması daha kolaydır.
- Yüksek kapsülasyon ve ilaç yükleme kapasitesine sahiptirler.
- Matrikste eşsiz ilaç dağılımından dolayı tercih edilirler (Jones ve ark., 1997; Mohanraj ve Chen, 2006; Farokhzad ve Langer, 2009; Li ve ark., 2007; Reddy ve ark., 2006).

1.6.2. Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Çeşitleri

Güncel metodlara alternatif olarak yeni ilaç taşıma sistemlerinin geliştirilmesiyle, yüksek miktarda ilaç taşınımıyla yan etkilerin ortadan kalkması sağlanmıştır. Emülsiyonlar, lipozomlar, KLN gibi lipid bazlı sistemler hidrofobik ilaçların zayıf çözünürlük sorunlarının üstesinden gelmek için geliştirilmiş ve başarılı olunmuştur.

❖ Polimerik Miseller

Boyutları 10-100 nm arasında değişen tek bir hidrofobik çekirdek, hidrofilik kabuk ve amfifilik blok kopolimerlerden oluşan, hedefleme yapabilen bir ilaç taşıyıcı sistemdir. Misellerle hidrofobik ilaç taşımak için ilacın hidrofobik çekirdeğe, hidrofilik ilaç taşımak için ilacın hidrofilik kabuğa yüklenmesi gerekir (Yang ve ark., 2008; Trubetskoy ve ark., 2006).

❖ Dendrimerler

Dendrimerler, boyutları 50-1000 nm arasında değişen, globüler yapıda olan, suda çözünebilir, enkapsülasyon yapılabilir yeteneğine sahip ve hedeflenme yapabilen ilaç taşıyıcı sistemlerdir (Bharali ve ark., 2009; Morgan ve ark., 2006).

❖ Lipozomlar

Lipozomlar, iç bölgesi sulu bir kaviteden oluşan fosfolipid tek tabaka ile çevrili, nano boyutlu, özel bölgelere hedefleme yapabilen, toksisitesi düşük, biyouyumlu ilaç taşıyıcıdır. Lipozomlarda hidrofilik ilaçlar sulu yapıda olan iç bölgeye, hidrofobik yapıda olan ilaçlar ise fosfolipid tek tabakaya yüklenir (Castelli ve ark., 2010; Przeworska ve ark., 2010)

❖ Katı Lipid Nanopartiküller (KLN)

Katı lipid nanopartiküller, 50-1000 nm arasında boyuta sahip ve katı lipid, emülsifer ve çözücüden oluşan, su ya da sulu çözeltide disperse olan partiküllerdir. Kullanılan lipidler trigliserit, gliserit, yağ asidi ve steroid olabilir. Çeşitli emülsiyonlar ve çözücüler lipid dağılımını homojenize etmek için kullanılır (Müller ve ark., 2000; Wissing ve ark., 2004; Mulla ve ark., 2010).

1.6.3. Katı Lipid Nanopartiküller (KLN)

Geleneksel ilaç taşıyıcı sistemlerin (emülsiyon, lipozom ve polimerik nanopartiküller vb.) dezavantajlarını ortadan kaldırılmak için 1991 yılında mevcut kolloidal sistemlere alternatif bir taşıyıcı sistem olarak KLN'ler geliştirilmiştir. KLN'ler 50-1000 nm arasında boyuta sahip, vücut ve oda sıcaklığında katı halde bulunan lipidten oluşan, yüzeyinde tek tabaka halinde fosfolipit molekülü bulunan bir katı hidrofobik çekirdekten ibaret, lipozom ve nanopartikül arasında bir yapıda olan, ilaç taşıyıcı olarak kullanılan katı partiküllerdir. İlk olarak Müller tarafından keşfedilmiştir. 1990'ların başından beri KLN'lere çeşitli antikanser ilaçları (doksorubisin, daunorubisin, idarubisin, oaklitasel, kampotesin, etopozit vb.) yüklenmiş ve test edilmiştir. Ayrıca kozmetik, dermal ve tedavi-teşhis uygulamalarında potansiyel bir taşıma sistemi olduğu onaylanmıştır (Pal ve Nayak, 2010; Kayser ve ark., 2005; Ocheke ve ark., 2009; Shaji ve Jain, 2010).

KLN'in Avantajları ve Dezavantajları

KLN'ler son yıllarda diğer taşıma sistemlerinin avantajlarını taşıyıp ve dezavantajlarını taşımadığı için kolloidal taşıma sistemi olarak dikkat çekmektedir.

Avantajları;

- Küçük boyuta sahip olma,
- İstenilen zaman ve oranda kontrollü ilaç salımı,
- Yüzey modifikasyonu ile kolay bir şekilde spesifik bölgeye hedeflenebilme,
- Kimyasal, fotokimyasal ya da oksidatif hasara karşı ilacı koruma ve kolayca üretilebilme,
- İlacın yan etkilerini azaltma,
- Toksik metabolit üretmeme,
- Organik çözücülerden kaçınma,
- Uzun süre kararlı kalma,
- Hapsedilmiş biyoaktif bileşiklerin biyoyumluluğunu güçlendirme,
- Kolay steril edilebilme,
- Düşük maliyet,

- Hem lipofilik hem de hidrofilik bileşiklerin yüklenebilme kapasitesine sahip olma ve modifikasyonlarla formülasyonlarında değişiklikler yapılabilme,
- Endüstriyel boyutta üretim,
- Biyolojik yarı ömrü kısa olan ilaçların yarı ömrünü uzatma,
- Yüksek ilaç yükleme kapasitesine sahip olma,
- Oral, dermal, rektal, parenteral, pulmoner, topikal, oküler ve oftalmik olarak alınabilmeleridir (Shaji ve Jain, 2010; Pragati ve ark., 2009; Kamboj ve ark., 2010; Sailaja ve ark., 2011; Mulla ve ark., 2010).

Dezavantajları;

Pek çok avantaja sahip olmalarına rağmen, KLN'lerin kullanımını sınırlayan bazı faktörler de vardır;

- Nispeten düşük etken madde yükleme kapasitesine sahiptirler.
- Saklama sırasında görülebilen polimorfik geçişler nedeniyle, etken madde taşıyıcıdan dışarı sızabilir ya da çökebilir.
- KLN dispersiyonlarının su içeriği nispeten (%70 – 99.9) yüksektir.
- Ortamda farklı kolloidal yapılar da bulunabilir.
- Düşük birleşme oranına sahiptirler.
- Vücutta kısa dolaşım zamanına sahiptirler.
- Fiziksel olarak stabil değildir (Hou ve Zhou, 2007; Jores ve ark., 2003; Kaş, 2002).

KLN'in Üretim Yöntemleri

❖ Yüksek Basıncılı Homojenizasyon Yöntemi

Yüksek basınçlı homojenizasyon (YBH), KLN üretiminde güvenilen ve en yaygın kullanılan etkili bir yöntemdir. Bu yöntemde KLN üretmek için, dar bir aralıkta yüksek basınç homojenizatörü ile sıvıya (100-200 bar) arasında bir basınç uygulanır. Yüksek basınç ve kavitasyon partikülü daha küçük partiküllere parçalar. Genel olarak bu teknik sıcak ve soğuk homojenizasyon olmak üzere iki şekilde gerçekleştirilir. Fakat her iki şekilde erimiş lipid içine ilacın karıştırılmasına dayanır (Mäder ve Mehnert, 2005; Müller ve ark., 2006; Kamboj ve ark., 2010; Sharma ve ark., 2010; Kamble ve ark., 2010).

❖ Sıcak Homojenizasyon

Sıcak homojenizasyon, yağın erime noktasının üstünde bir sıcaklıkta yürütülür ve emülsiyon homojenizasyonuna benzerdir. Etken madde içeren erimiş lipid, aynı sıcaklıktaki sulu emülgatör çözeltisi içinde yüksek hızda karıştırılarak disperse edilir. Elde edilen sıcak ön-emülsiyon homojenizatörden geçirilir ve sonuçta oluşan sıcak Y/S nanoemülsiyonu oda sıcaklığına soğutulur. Bu şekilde lipid katılaşır ve KLN elde edilir. Genellikle, ilaç ve taşıyıcının bozulmasını hızlandırmasına rağmen, düşük vizkositesinden dolayı küçük boyutta partikül elde edilmesini sağlar (Mäder ve Mehnert, 2005; Müller ve ark., 2006; Mukherjee ve ark., 2009; Parhi ve Suresh, 2010; Kamble ve ark., 2010; Numanoglu ve Tarımcı, 2006).

❖ Soğuk Homojenizasyon

Etken maddenin içinde çözüldüğü veya disperse edildiği erimiş lipid, hızlı bir şekilde kuru buz ya da sıvı nitrojen ile soğutulur. Bu soğutma işlemi lipidin kırılabilirliğini artırarak katı lipid mikropartikül oluşumu sağlar. Lipid mikropartiküller soğuk emülgatör çözeltisinde disperse edilir. Elde edilen ön-süspansiyon oda sıcaklığı veya altında bir sıcaklıkta homojenize edilir. Kaviteleme gücü ile lipid mikropartiküllerden KLN elde edilmiş olur.

Soğuk homojenizasyon yöntemi sıcak homojenizasyon yönteminde ortaya çıkan;

- Sıcaklığa bağlı ilacın bozulması,
- Homojenizasyon süresinde etken maddenin sulu fazda dağılımı,
- Nanoemülsiyonun lipid rekristalizasyonunun güçlüğü gibi bazı problemlerin üstesinden gelmek için geliştirilmiştir.

Ancak sıcak homojenizasyon ile karşılaştırıldığında, daha büyük partikül boyutu ve daha dar boyut dağılımına sahiptir (Mäder ve Mehnert, 2005; Müller ve ark., 2006; Numanoglu ve Tarımcı, 2006; Mukherjee ve ark., 2009; Kamboj ve ark., 2010; Parhi ve Suresh, 2010; Kamble ve ark., 2010).

❖ Yüksek Hızda Karıştırma veya Ultrasonikasyon Yöntemi

Her iki yöntem de, yaygın olarak kullanılır ve uygulanması kolaydır. Bu yöntemlerin avantajı, KLN üretimi için gerekli olan aletlerin her laboratuvarında kolay elde edilebilir olmasıdır. Yüksek hızda karıştırma yönteminin dezavantajı, partikül boyutunun oldukça geniş olmasıdır. Buda fiziksel stabiliteyi ve saklanma süresini etkiler. Ultrasonikasyon yönteminin dezavantajı ise, metal kontaminasyonuna neden olmasıdır. Stabil formülasyon yapmak için hem yüksek hızda çevirme hem de ultrasonikasyon beraber kullanılması önerilir (Mäder ve Mehnert, 2005; Müller ve ark., 2006; Sailaja ve ark., 2011; Kamboj ve ark., 2010; Parhi ve Suresh, 2010; Kamble ve ark., 2010).

❖ Çözücü Emülsifikasyon-Buharlaştırma Yöntemi

Çözücü emülsifikasyon - buharlaştırma yönteminde, lipofilik materyaller su ile karışmayan organik çözücüde (toluen, kloroform vb.) çözülür. Çözücünün vakum altında buharlaştırılmasıyla, lipid nanopartikülleri oluşarak çöker. Bu yöntemin önemli bir avantajı, hazırlama sırasında ısı uygulanmamasıdır. Bu nedenle, yüksek sıcaklıkta bozulan etken maddelerin yüklenmesi için uygun bir yöntemdir. Yöntemin dezavantajı ise, organik çözücü kullanımının gerekmesidir (Mäder ve Mehnert, 2005; Müller ve ark., 2006; Numanoğlu ve Tarımcı, 2006; Kamboj ve ark., 2010; Sailaja ve ark., 2011; Parhi ve Suresh, 2010; Kamble ve ark., 2010).

❖ Mikroemülsiyon

Gasco ve ark 2000 yılında mikroemülsiyonların dilüsyonuna dayanan bir KLN hazırlama yöntemi geliştirmişlerdir. Bu yöntemde önce, lipid (yağ asitleri veya gliseridler) eritilir. Su, emülgatör ve yardımcı emülgatör karışımı, lipidle aynı sıcaklıkta olacak şekilde ısıtılır ve erimiş lipide eklenerek karıştırılır. Oluşan mikroemülsiyon, özel olarak geliştirilen termostatlı bir şırınga kullanılarak, aşırı miktardaki soğuk su (2-3°C) içinde mekanik bir karıştırma ile disperse edilir. Fazla su, ultrafiltrasyon veya liyofilizasyon ile uzaklaştırılır. Mikroemülsiyonun oluşumunda sıcaklık ve pH önemlidir (Müller ve ark., 2000; Sailaja ve ark., 2011; Kamboj ve ark., 2010; Numanoğlu ve Tarımcı, 2006; Parhi ve Suresh, 2010; Kamble ve ark., 2010).

❖ Süperkritik Akışkan Yöntemi

Süperkritik akışkan yöntemi KLN üretimi için geliştirilen yeni bir tekniktir. Bu yöntem çözücü kullanımından kaçınmakla beraber nanopartikülleri süspansiyon halinde elde etmek yerine kuru toz halinde elde etmeyi ve yumuşak basınç ve sıcaklık koşullarının uygun olması gibi bazı avantajlara sahiptir. Bu yöntem için karbon dioksit solüsyonu iyi bir seçenektir (Sailaja ve ark., 2011; Kamboj ve ark., 2010; Parhi ve Suresh, 2010; Kamble ve ark., 2010).

❖ Püskürterek Kurutma Yöntemi

Püskürterek kurutma yöntemi liyofilizasyona alternatif bir yöntem olarak geliştirilmiştir ve liyofilizasyon yönteminden daha ucuzdur. Bu yöntemde yüksek sıcaklık ve çalkalama gücü önemli etkenlerdir. Bu etkenler nanopartiküllerin kısmen erimesine yol açtığı için nanopartiküllerin çökmesine neden olur (Sailaja ve ark., 2011; Kamboj ve ark., 2010; Parhi ve Suresh, 2010; Kamble ve ark., 2010).

KLN'in Karakterizasyonu

KLN'lerin yeterli ve tam karakterizasyonu, elde edilen nanopartiküllerin kalitesinin kontrolü için gereklidir. Karakterizasyon için en önemli parametreler; partikül boyutu, zeta potansiyel, ilaç yükleme kapasitesi, ilaç salımı ve yüzey morfolojisidir.

❖ Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyel

Partikül boyutu ve boyut dağılımı, nanopartikül sistemlerinin en önemli karakteristik özelliklerinden birisidir. Bu özellik nanopartikül sistemlerinin *in vivo* dağılımını, toksisitesini, hedeflenebilme yeteneğini, nanopartiküllerin kararlılığını, ilaç yükleme kapasitesini ve ilaç salınımı gibi önemli özelliklerini belirler. Genellikle, nanopartiküllerin küçük boyut ve daha iyi hareket edebilme yeteneklerinden dolayı mikropartiküllere göre daha iyi biyolojik olarak hedeflenebilirler ve hücre içine alınmaları daha yüksektir (Mohanraj ve Chen, 2006; Bunjes, 2005).

Partikül boyutunun belirlenmesinde en hızlı ve en yaygın kullanılan yöntemler foton korelasyon spektroskopisi (PCS) ya da lazer kırınımı (LD)

yöntemidir. Foton korelasyon spektroskopisinde partikül hareketinin neden olduğu yayılan ışığın yoğunluğunun ölçümüne dayanır ve partikülün yarıçapını belirler. Nanopartiküllerin karakterizasyonu için iyi bir cihazdır fakat büyük mikropartikülleri saptayamaz. Genellikle sonunda da foton korelasyon spektroskopisiyle alınan sonuçlar TEM ile doğrulanır (Mohanraj ve Chen, 2006; Sailaja ve ark., 2011; Bunjes, 2005).

Zeta potansiyel kolloidal dispersiyonun kararlılığı hakkında bilgi sağlar. Nanopartiküllerin zeta potansiyelleri genel olarak nanopartiküllerin yüzey yüklenme özelliklerine dayanır ve partiküllerin elektrik yükünü yansıtır. Nanopartiküllerin zeta potansiyellerinin ± 30 mV olması süspansiyonda partiküllerin toplanmasını engelleyen yüzey yüklenmesi ile kararlı olduğunu gösterir (Mohanraj ve Chen, 2006; Bunjes, 2005; Haskell ve ark., 2006).

❖ İlaç Yükleme kapasitesi

Yeterli yükleme kapasitesi, etken maddenin erimiş lipidte çözünürlüğüne bağlıdır. KLN’de etken madde lipid içerisinde yüksek çözünürlüğe sahiptir. Çünkü erimiş solüsyon bir anda soğutulur buda katı lipid oranının düşük olmasını sağlar. Çözünürlüğü güçlendirmek için erimiş lipide çözücüler eklenebilir. Ayrıca lipidin kimyasal doğası da önemlidir.

İlaç taşıma sisteminin uygunluğu ilacı yükleme kapasitesine bağlıdır. Yükleme kapasitesi genellikle lipid faza (matriks+ilaç) göre değişir. İlacın yükleme kapasitesi;

- İlacın erimiş lipidte çözünebilirliğine,
- Erimiş lipid ve ilacın karışabilirliğine,
- Katı lipid matriksin fiziksel ve kimyasal özelliklerine,
- Lipid materyalinin polimorfik durumuna bağlıdır (Kreuter, 1994; Müller ve ark., 2000; Parhi ve Suresh, 2010; Haskell ve ark., 2006).

❖ İlaç Salımı

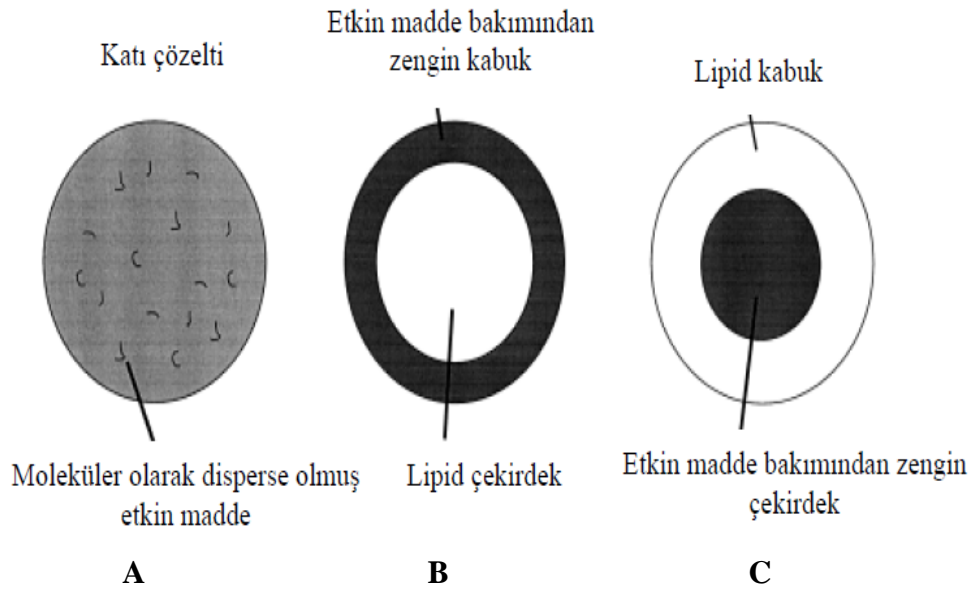
KLN’den hızlı salım, geniş yüzey alanı ve küçük molekül büyüklüğü nedeniyle yüksek difüzyon katsayısına, matriksin düşük viskozitesine ve kısa difüzyon mesafesine bağlıdır. KLN’den etken madde salımı üretim yöntemine ve kullanılan lipidlere bağlı olarak farklılıklar gösterebilir (Kaş, 2002).

KLN'den etken madde salınım profili; lipid matriksin yapısına, partikül boyutuna ve üretim parametrelerine (yüzey etken madde, konsantrasyonu, sıcaklık vb.) bağlıdır. Yüksek sıcaklık ve yüzey etken madde konsantrasyonu ilacın sulu fazda çözünürlüğünü artırır (Müller ve ark., 2000; Parhi ve Suresh, 2010; Wissing ve ark., 2004).

Daha küçük parçacıklar daha büyük yüzey alanına sahip olduğu için daha hızlı ilaç salımı yaparlar. Oysa daha büyük parçacıklar daha büyük çekirdeğe sahiptir. Çekirdeğin büyük olması da daha fazla ilaç yüklemesine sebep olduğu için, ilacın yavaş bir şekilde difüze olmasına neden olur. Küçük boyutlu nanopartikülleri formüle etmek oldukça zordur fakat stabilitesi daha iyidir (Huang ve Brazel, 2001; Mohanraj ve Chen, 2006).

Etken maddenin KLN içindeki yükleme kapasitesini etkileyen faktörler;

- Eritilmiş lipid içinde etken maddenin çözünürlüğü,
- Katı lipid matriksin kimyasal yapısı,
- Lipid matriksin polimorfik formudur.



Şekil 1.7. Üç etken madde hapsedme modelinin gösterilmesi **A)** Katı çözelti modeli **B)** Etkin madde bakımından zengin kabuk içeren **C)** Etkin madde bakımından zengin çekirdek içeren çekirdek-kabuk modeli (Müller ve ark., 2000; Numanoğlu ve Tarımcı, 2006).

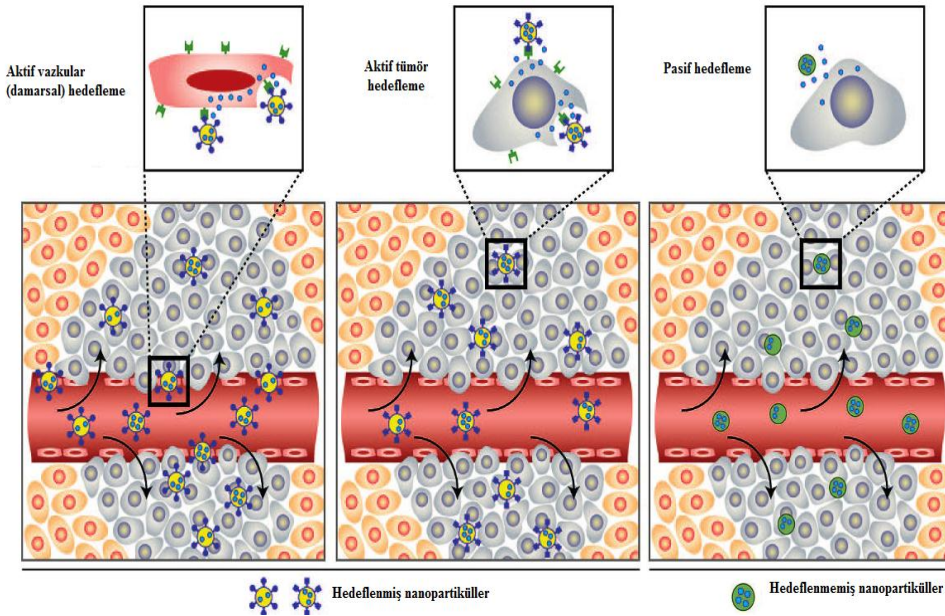
❖ Yüzey Morfolojisi

KLN'lerin şekillerinin belirlenmesinde, diğer partiküler sistemlerinde olduğu gibi, atomik kuvvet mikroskobisi (AFM) ve elektron mikroskobu (TEM) kullanılabilir. Düz bir silikon yüzeye sabitlenen nanopartiküllerin şekilleri, AFM ile vakuma ihtiyaç duyulmadan belirlenebilmektedir. TEM ile de partiküllerin boyutu ve morfolojik özellikleri gözlemlenebilir. Küçük boyuta sahip nanopartiküller için iyi bir validasyon yöntemidir (Sailaja ve ark., 2011; Haskell ve ark., 2006).

Hücreye Hedefleme Mekanizmaları

Geleneksel kemoterapi ajanları vücut içinde hem kanserli hem de normal hücrelere spesifik olmayan bir şekilde yayılırlar. Bu yüzden kanserli hücelere sınırlı miktarda ilaç ulaştığından dolayı toksik etkiye neden olurlar.

Hem aktif hem pasif hedeflenebilen nanopartiküller kanser hücrelerinde ilacın intraselüler konsantrasyonunu güçlendirirken normal hücelere toksik etkisini engellemektedir. Dahası, nanopartiküllere spesifik reseptörler bağlanarak, hücrede ilaç direnç mekanizması olan P-glikoproteini geçilerek, reseptör bağlı endositoz aracılığıyla hücreye girerler. Nanopartiküller ilaç taşıma sistemleri sayısız avantaja sahip olmasına rağmen, hala zayıf oral biyoyumluluğa, fiziksel kararsızlığa, dokuda yetersiz dağılıma ve toksisiteye sahiptir (Cho ve ark., 2008)



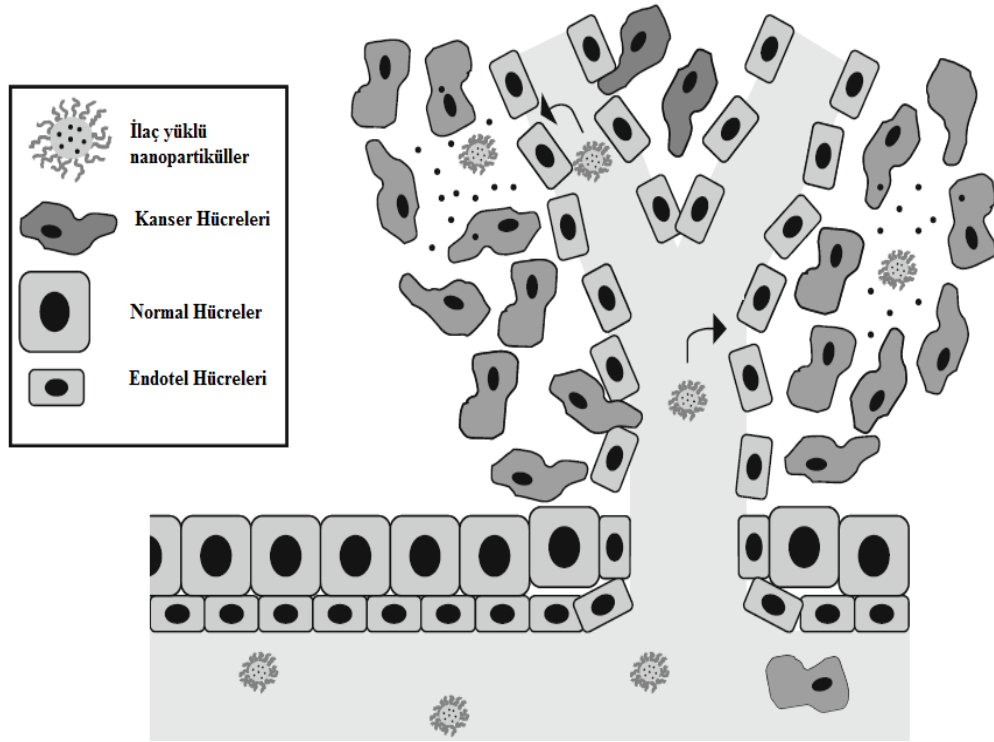
Şekil 1.8. Aktif ve pasif hedeflemenin şematik olarak gösterilmesi (Farokhzad ve Langer, 2009)

Hedef dokuya nanopartiküller aracılığı ile ilacın hedeflendirilmesi iki yolla gerçekleşir.

Pasif Hedefleme: Pasif hedeflendirme de ilaç taşıyıcı sistemlerin partikül boyutları, yüzey yükleri, veriliş yolları ve yüzey hidrofobisitesi değiştirilerek farklı hedeflere yönlendirilebilirler. Pasif hedefleme, intravenöz enjeksiyondan sonra, taşıyıcının doğal olarak hedeflenerek, organ, doku ve hücreye yerleşmesidir. Pasif hedefleme, nanopartiküllerin boyutundan, tümörün mikroçevresinden ve geçirgenlik ve retansiyon etkisinden (EPR) dolayı avantajlıdır (Sinha ve ark., 2006; Kaş ve Eldem, 2002).

- **EPR etkisi:** Anjiyogenez fizyolojik bir süreç olup, yeni damarların oluşması, gelişmesi anlamına gelir. Özellikle kanserli hücreler büyümeleri için gerekli olan besinleri alabilmek için anjiogenezi uyarırlar. Geçirgenlik ve retansiyon etkisi (EPR) nanopartiküllerin boyut ve yüzey özellikleri ile retikuloendotelial sistemden (RES) kaçmalarına ve kanda daha uzun süre kalmalarına böylece hedeflenmiş tümörlü dokuya ulaşmasını sağlar. Buda büyüme faktörü ve matriks metalloproteinaz gibi anjiyogenez düzenleyici enzimlerin dengesinin bozulmasına neden olur. Böylece endotel komşu hücreler arasında 600 ile 800 nm büyüklüğünde boşluklar oluşur. Bu bozuk damarsal yapı zayıf lenfotik drenaja sahip olduğu için EPR etkisini uyarır ve nanopartiküllerin bu boşluklardan geçip tümörlü dokularda toplanmasını sağlar. Serbest ilaca göre nanopartikül yüklü ilaçların EPR etkisi ile normalden 10 kat daha fazla olduğu için tümörlü dokularda toplanması daha kolay olur. Fakat nanopartiküllerin lokalizasyonu tümörde homojen değildir. Bu faktör yüksek konsantrasyonda nanopartiküllerin tümörlü dokunun bir kısmında birikmesini sağlar. Genel olarak, nanopartiküllerin tümörlü hücrede birikmesi partikül boyutuna, yüzey özelliklerine, nanopartikülün yarı ömrüne ve tümörün anjiyogenez derecesine bağlıdır. Az nanopartikül toplanması genellikle nekrotik tümörlerde ya da ön anjiyogenetik tümörlerde görülür (Cho ve ark., 2008, Wang ve ark., 2008; Alexis ve ark., 2010; Amiji, 2007).

- **Tümör mikroçevresi:** Hızla çoğalan kanser hücreleri etrafındaki mikroçevrelerini etkilerler. Tümör hücreleri ekstra enerji elde etmek için glikolizi kullanmaya adapte olmak zorundadırlar. Buda çevrelerinin asidik olmasını sağlar. Ayrıca, kanser hücreleri tümörün göçü ve yayılmasında hayati önemi olan bazı enzimleri sentezlemek zorundadırlar [Matriks metalloproteinaz (MMPs)] (Amiji, 2007; Peppas ve Blanchette, 2004).



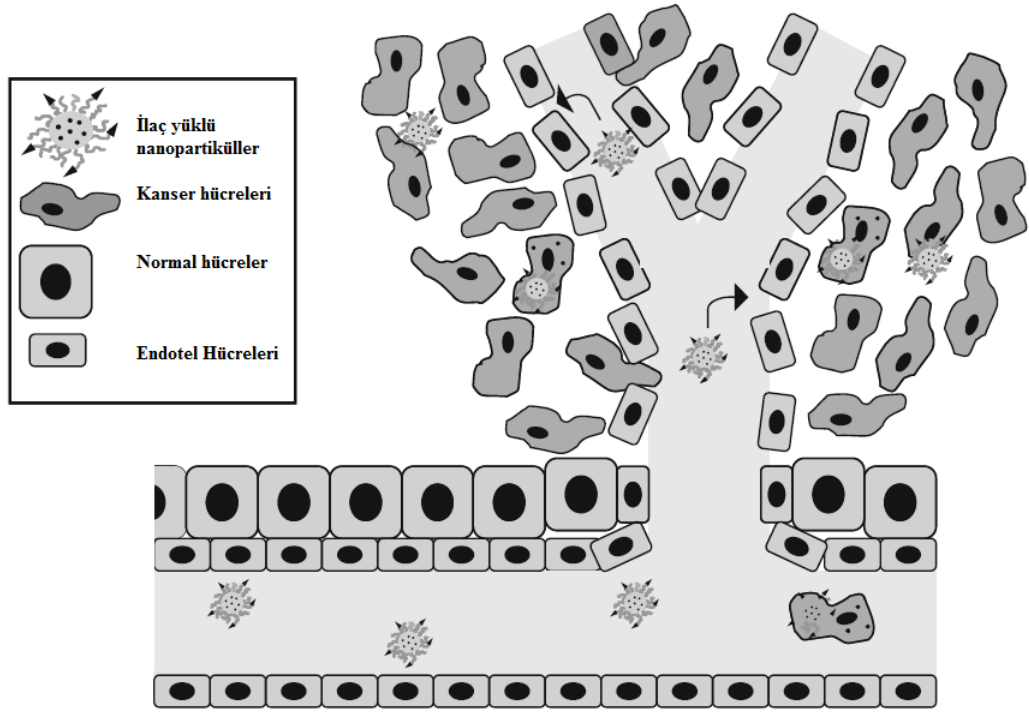
Şekil 1.9. EPR etkisi ile pasif hedeflemenin şematik hali (Alexis ve ark., 2010)

Aktif Hedefleme: Aktif hedeflendirme, partiküler sistemlerin RES’de toplanmaması, ancak doğal dağılımı modelinin değiştirilmesi sonucu spesifik hücrelere, dokulara ya da organlara yönlendirilmesi esasına dayanır. Sistemde ya doğrudan doğruya etken maddeye ya da etken maddeyi taşıyan taşıyıcıya bağlı hedeflenen bir madde bulunmaktadır. Manyetik, ultrasonik ve ligand-reseptör aracılı aktif hedefleme olabilir.

Polimerik nanopartiküllerin EPR etkisi, tümör mikro çevresi ve tümör anjiyogenezi gibi bazı faktörler tarafından tümörlü dokulara girmesi sağlanırken klinik olarak hedefleme yetenekleri eksiktir. EPR etkisi düşük lenfotik drenajdan

dolayı ilacın tümörde toplanmasına yardımcı olurken, ilacın hücreden dışarı çıkmasını da uyardığı için osmatik basıncın artmasına neden olur. Bu da kanser dokusunda ilacın bazı yerlerde toplanmasını sağlar. Bu sınırlamaları ortadan kaldırmak için nanopartiküllere eklenen antibodiler ya da hedeflenmiş ligand içeren ilaç-polimer konjugasyonları geliştirilmiştir. Aktif taşıma ilaç yada ilaç taşıyıcı nanosistemlerin aktif, seçici, tanıma yeteneği yüksek olan ve özel hücrelerle etkileşebilen aktif ajanlarla spesifik modifiye edilmesine dayanır. Hedefli molekül ile bağlanacağı reseptör ya da antijen, tümör hücre yüzeyine özel sentezlenir ve kanserli dokuya seçici bir şekilde hedeflenir (Wang ve ark., 2008; Vasir ve ark., 2005; Kaş ve Eldem, 2002).

- **Antijen-reseptör ekspresyonu:** İdeal olarak hücre yüzey antijenleri ve reseptörleri özellikle tümöre spesifik hedefleme için bazı özelliklere sahiptir. İlk olarak, sadece tümörlü hücrelerde ekspre olurlar. İkinci olarak, tüm hedefli tümör hücrelerinde homojen dağılırlar ve kan sirkülasyonunda kaybolmazlar (Cho ve ark., 2008).
- **Hedeflenen konjugatların internalizasyonu:** Internalizasyon reseptör bağlı endositoz aracılığı ile gerçekleşir. Örneğin folat reseptörü. Hedefli konjugat hücre yüzeyindeki folat reseptörüne bağlanırsa, plazma membranı endozom formunda kompleks reseptörün ve ligandın alınmasını sağlar. Bu yeni formlanan endozom hedeflenen organelere gider (Cho ve ark., 2008).



Şekil 1.10. Nanopartiküllerin hücreye girmesini sağlayan aktif hedeflemenin şematik hali. Nanopartiküllerin yüzeyinde hedeflenebilen ligandlar tümörlü hücelere reseptör aracılığı ile bağlanır ve reseptör bağlı endositozis aracılığı ile lokal ilaç taşınmasını sağlar (Alexis ve ark., 2010)

Kanser Tedavisinde KLN

Katı lipid nanopartiküller ile ilgili olarak hazırlanma yöntemleri, karakterizasyonları, formülasyonları, kararlılıklarını etkileyen faktörler, ilaç yükleme kapasiteleri ve ilaç salımı özelliklerinin çalışıldığı birçok araştırma literatürde mevcuttur (Müller ve ark., 2000; Mehnert ve Mäder, 2001; Wissing ve ark., 2004; Müller ve ark., 2004; Radtke ve ark., 2005).

Kanserli hücreler üzerine olan sitotoksik etkisine baktığımızda ise, çeşitli *in vitro* ölçüm yöntemlerinden yararlanılarak yapılan çalışmalarda antikanserojen etkisi bilinen herhangi bir etken maddenin yüklenmiş olduğu KLN formülasyonlarının serbest ilaca göre kanserli hücreler üzerinde daha yüksek bir sitotoksik etkiye sahip olduğu ve terapötik uygulamalar için diğer ilaç taşıma sistemlerinin dezavantajlarını taşımayıp avantajlarını birleştirdiğinden dolayı uygun bir ilaç taşıyıcı sistem olduğu bulunmuştur.

Bir antikanser ilacı olan paklitaksel ile ilgili birçok çalışma mevcuttur. Bu çalışmalarda paklitaksel yüklü KLN'lerin çeşitli kanser hücre hatları (HCT-15, U-118, A-549, MCF-7 ve HL-60 vb.) üzerinde etkisi araştırılmıştır. Sonuç olarak, paklitaksel yüklü KLN formülasyonlarının terapötik uygulamalar için uygun olduğu ve serbest paklitaksele göre daha yüksek toksik etkiye sahip olduğu bulunmuştur (Koziara ve ark., 2004, 2006; Lee ve ark., 2007; Miglietta ve ark., 2010). Serpe ve ark. çeşitli antikanser ilaçları yüklü KLN'lerin kolorektal kanser hücre hattı (HT-29) üzerinde sitotoksik etkisini araştırmışlardır. Çalışma da paklitaksel, doksorubisin ve kolesterol bütirat kullanıp, bu ilaçları KLN'lere yüklemişlerdir. Çalışmanın sonucunda, her ilacın katı lipide yüklenmiş formülasyonunun serbest ilaca göre daha yüksek sitotoksik etkiye sahip olduğunu bulmuşlardır (Serpe ve ark., 2004). Bir başka çalışmada, hepatokarsinom hücrelerinin tedavisinde doksorubisin taşıyıcı olarak polietilen glikol (PEG) modifiyeli KLN hazırlanmıştır. PEG modifiyeli KLN'nin serbest ilaca göre anti tümör etkisinin daha fazla olduğunu ve gelecekte kontrollü ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılabilceği bulunmuştur (Chen ve ark., 2006). 2006 yılında mitoksantron (MTO) yüklü KLN'lerin akciğer kanserinde terapötik etkisini araştırılmıştır. MTO yüklü KLN'nin yüksek ilaç yükleme kapasitesine ve eşsiz boyuta sahip olduğunu, lenf düğümlerine ilacın hedeflenmesinde başarılı olduğunu ve yan etkiyi en aza indirerek ilacın terapötik etkisini arttırdığı bulunmuştur (Lu ve ark., 2006). Aynı yılda bir diğer çalışmada, oridonin yüklü KLN'ler hazırlanmış ve *in vitro* ve *in vivo* olarak çalışılmıştır. Oridonin yüklü KLN'in *in vitro* salımının uzun sürdüğünü, *in vivo* dağılımının ise hem terapötik etkiyi arttırdığı hemde toksik etkiyi azalttığı bulunmuştur (Zhang ve ark., 2006). 2007 yılında deksametazon asetat (DXM) yüklü KLN'le akciğerin hedeflenmesi çalışılmış, DXM ile DXM-yüklü KLN karşılaştırıldığında akciğer tarafından kolay alındığını akciğer hastalıklarında potansiyel olarak kullanılabilceği bulunmuştur (Xiang Q., ve ark. 2007). MCF-7 göğüs kanserinde kullanılan bir antikanser ilacı olan tamoksifen yüklü KLN, Alhaj ve ark. tarafından 2008 yılında çalışılmıştır. Tamoksifen yüklü KLN'lerin serbest ilaç ile karşılaştırıldığında, tamoksifen yüklü KLN'in MCF-7 hücrelerine karşı önemli bir sitotoksik etkiye sahip olduğunu ve anti-östrojen ilaçlarına alternatif bir formülasyon olarak

düşünülebileceği bulunmuştur (Alhaj ve ark 2008). Başka bir antikanserojen ilaç olan nimesulid yüklü KLN'in hazırlanması, karakterizasyonu ve sitotoksik etkisi çalışılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda suda çözünmeyen ilaçlardan olan nimesulid gibi ilaçların KLN'e başarılı bir şekilde yüklendiği ve serbest ilaçla karşılaştırıldığında HT-29 ve SW-480 hücre hatlarında antitümör etkiye sahip olduğu bulunmuştur (Bondi ve ark., 2009). Aynı yılda podofilotoksin yüklü KLN kanser hücrelerinde uzun süren antikanser etkiye sahip olduğu ve kanser hücrelerinde apoptotik etkiyi güçlendirdiğini bulunmuştur (Zhu ve ark., 2009). 5-fluorourasil yüklü KLN'in kolon kanserinde etkisinin araştırıldığı çalışmada, bu formülasyonun kolon tümörlerine ilacın alımını güçlendirdiğini ve ilacın bağırsakta kanserli bölgede yayılımı sağladığı bulunmuştur. Bu çalışmanın gelecekte hayvan modelleri ile geliştirilebileceği önerilmektedir (Yassin ve ark., 2010).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Askorbik asit, Dimetil sülfoksit (DMSO), MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2)-2,5-diphenyl tetrazolium bromid), Acridin Orange (Sigma); Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Fetal Bovin Serumu (FBS), Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (10000 U/mL penisilin, 10mg/mL streptomisin), Tripsin-Etilendiamintetraasetik asit (Tripsin/EDTA), Dulbecco's sodyum-fosfat tamponu (PBS) (GIBCO); Osmium tetroksit, Gluteraldehit, Araldit, Propilen oksit, Uranyl asetat, Kurşun sitrat (Electron Microscopy Science); Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit, BD Pharmingen™; diğer bütün kimyasallar analitik saflıkta olup, Merck AG (Darmstadt, Almanya) firmasından sağlanmıştır.

2.1.2. Kullanılan Sarf Malzemeler

25 ve 75 cm²'lik flask (TPP, İsviçre), 96 ve 6 kuyucuklu plakalar (TPP), cam pipetler (1, 2, 5 ve 10 mL hacimlerinde), pastör pipetler, enjektörler (10, 20 ve 50 mL hacimlerinde), 25, 50, 100, 250, 500 ve 1000 mL'lik Durham şişeleri, steril santrifüj tüpleri (15 ve 50 mL) (TPP, İsviçre), steril tek kullanımlık filtreler (0,2 mikron çapında), Thoma lamı (Marienfeld, Almanya), 10,100 ve 1000 µL'lik pipet takımı ve uçları (Eppendorf, Almanya), Analiz tüpleri, 12 x 75 mm (BD Pharmingen™, San Jose, CA USA), Steril cam petri kapları (Corning, ABD), Lamel 15×15, Rodajlı lam, Kryotüp, Grid.

2.1.3. Kullanılan Cihazlar

BD FACSAria™ Akış sitometri cihazı, Leica TCS SP5 Konfokal Mikroskop, TEM (FEI, Hollanda), Nano Zetasizer (ZS, Malvern, UK), Ultra-Turrax1 (T25), Agilent 1100 series HPLC (Agilent, USA), Janke&Kunkel IKA®, Almanya), Inverted Mikroskop (Olympus ABD), CO₂ inkübatörü (Heraeus, Almanya), Kuru hava sterilizatörü (Heraeus, Almanya), ELIZA cihazı (Bio.Tek. ELx808IU), Ultraturaks (T25, Janke&Kunkel IKA®, Germany), Nüve BM 302 Su Banyosu, Megafuge 1.0/1.0R santrifüj (Heraeus, Almanya), Kuru hava

sterilizatörü (Heraeus, Almanya), Otoklav (Hirayama, Japonya), Steril kabin (Holten, İngiltere), Çeker Ocak (İnterlab), Hassas terazi (Ohaus, ABD).

2.2. Yöntem

2.2.1. H-ras 5RP7 (Sıçan Embriyo Fibroblast) Hücre Serisi ve NIH/3T3 (Fare Embriyo Fibroblast) Hücreleri ile Hücre Kültürü Uygulamaları

❖ Hücre Serilerinin Stoktan Çıkarılması

-196 °C de sıvı azot tankında bulunan sıçan embriyo fibroblast 5RP7 (H-ras onkogeni transform hücreler) (Garbisa ve ark.1987) ve fare embriyo fibroblast NIH/3T3 (Todaro ve Green, 1963) hücreleri tanktan çıkarılır. İçeriği tamamen eriyince %10 FBS (Fetal Bovine Serum) içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) besiyeri içine alınarak, 1200 rpm' de 10 dk santrifüj edilir. Süpernatant kısmı döküldükten sonra, hücreler yeni besiyeri içinde süspanse edilerek kültür flasklarına alınıp ve 37 °C'de, %5 CO₂ içeren inkübatörde kültüre kaldırılır.

❖ Hücre Serilerinin Pasajlanması

5RP7 ve NIH/3T3 hücreleri flaskları tamamen kapladıkları zaman flask içindeki besiyerleri bir pipet yardımıyla uzaklaştırılır. Bu hücre hatlarının yüzeylerinin PBS ile hafifçe yıkanması sağlanır. Daha sonra 1X tripsin/EDTA solüsyonu konularak yapışan bu hücre hatlarının flasktan kalkması sağlanır. Tripsinin hücrelere zarar vermesini engellemek için hücreler kalktıktan sonra besiyeri konularak 1200 rpm de 5 dk santrifüj yapılır. Bu süre sonunda süpernatant kısım atılır ve üreyen hücrelerin miktarına göre hücreler flasklara bölünür.

❖ Hücre Serilerinin Stoklanması

Çoğalan hücreler, PBS ile yıkandıktan sonra, 1X tripsin/EDTA yardımıyla kaldırılıp besiyeri eklenip, 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edilir. Santrifüj sonrasında pellet üzerine her bir karyotüp (vial) için 1800 µL hücre besiyeri konulup, 30 dk kuru buz üzerinde bekletilir ve 30 dakika sonra her bir karyotüpe 200 µL DMSO çözeltisi ilave edilip vialler -20 °C'ye kaldırılır. 3-4 saat sonrasında vialler sıvı azot tankına (-196°C) yerleştirilerek, stoklama işlemi tamamlanır.

2.2.2. Askorbik Asidin H-ras 5RP7 ve NIH/ 3T3 Hücreleri ile Etkileşimi

Askorbik asidin stok solüsyonu, Preobrazhensky ve ark. 2001 yılında yaptıkları çalışmadan faydalanılarak hazırlanmıştır. Bu çalışmanın çerçevesinde, askorbik asidin stok çözeltisi; 3 mL solüsyonda 35,2 mg askorbik asit çözülerek uygun pH ayarlaması yapıldıktan sonra 5 mL'ye ortam ile tamamlanarak hazırlanmıştır. Deneye alınmak üzere stoktan çıkarılan 5RP7 ve NIH/3T3 hücreleri gerekli sayıya ulaştıktan sonra askorbik asidin bu hücreler üzerinde sitotoksik etkisini ve doz aralığını belirlemek için MTT yönteminden yararlanılmıştır. Hazırlanan stok çözeltisinden çeşitli seyreltmeler yapılarak askorbik asit 500 µM/mL, 1000 µM/mL, 1500 µM/mL, 2000 µM/mL, 2500 µM/mL ve 3000 µM/mL konsantrasyonları 200 µL ortam içine uygulanmıştır. Çalışılan doz aralığından en etkin üç doz (1500 µM/mL, 2000 µM/mL, 2500 µM/mL) seçilip 5 mL ortam içine uygulanarak, bu hücre hatlarında meydana gelen apoptotik etki akım sitometri cihazı kullanılarak ölçülmüştür.

2.2.3. YPSK ile Askorbik Asidin Miktar Tayini

Analitik yöntem validasyonu, bir test yönteminin doğru ve kesin bir şekilde sürekli olarak bekleneni gerçekleştirdiğinin kanıtlanmasıdır. Bir analitik yöntemin validasyonu, o yöntemin doğruluk, kesinlik ve güvenilirliğinin kanıtlanmasına yönelik olarak gerçekleştirilmektedir (Green, 1996).

Askorbik asitin kantitatif analizi ters faz yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (RP-YPSK) yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde HP CHEMSTATION programı ve Hewlett-Packard Agilent 1100 cihazı kullanılmıştır. Kalibrasyon doğrusunun elde edilmesi için 50-2000 µM/mL aralığındaki standart çözeltiler hazırlanmıştır. Bu yöntemin güvenilirliğinin belirlenmesi için validasyon çalışmaları yapılmıştır.

Çizelge 2.1. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi çalışma koşulları

Hareketli faz	Metanol:Su:Fosfat Tamponu(2:78:20, h/h)
Enjeksiyon hacmi	20 µL
Akış hızı	0,8 mL.dk⁻¹
Kolon	4.6 x 250 mm, 5 µm C₁₈ ACE kolon
Dalga Boyu	254 nm

❖ Doğrusallık (Linearity)

Askorbik asidin miktar tayini için geliştirilen bu yöntemde seçilen konsantrasyon aralığında artan konsantrasyon ile doğru orantılı olarak artan pik alanının arasındaki ilişkinin doğrusal olup olmadığı değerlendirilmiştir.

Standart eğrinin belirlenmesi için, askorbik asit PBS’de çözülerek stok çözelti hazırlanmıştır v 10 mM/mL stok elde edilmiştir. Bu stok çözeltilerden hareketle, 50-2000 µM/mL konsantrasyonlarında 5 farklı çözelti hazırlanmış ve YPSK’ya enjekte edilerek pik alanları bulunmuştur. Her bir askorbik asit µM’ına denk gelen pik alanı bulunarak kalibrasyon doğru denklemi hesaplandı. Hesaplarda her bir nokta için en az 3 değerlerin ortalaması kullanıldı. Her ölçüm 3 defa tekrarlandı. gün-içi ve günler-arası doğrusallık sonuçları hesaplanmıştır.

❖ Doğruluk (Accuracy)

Kullanılan analitik yöntem ile elde edilen bulguların gerçek değerlere yakınlığının gösterilmesi amacıyla yapılmaktadır. Seçilen üç farklı konsantrasyonda (100, 500, 2000 µM/mL) hazırlanan askorbik asit çözeltileri YPSK ile analiz edilerek örneklerin geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. Okunan değerler kalibrasyon denkleminde yerine konarak elde edilen konsantrasyonlardan % geri kazanım değerleri hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Geri Kazanım} = (K_{\text{pratik}} / K_{\text{teorik}}) \times 100$$

Kpratik: Etkin maddelerin kalibrasyon denkleminde elde edilen konsantrasyon değerleri.

Kteorik: Etkin maddelerin hazırlanan konsantrasyon değerleri

❖ Kesinlik (Precision)

Bir analitik yöntemin kesinliği, istatistiksel açıdan yeterli değerlendirmenin yapılacağı sayıda, aynı konsantrasyondaki örnekler ölçülerek ortalama, standart hata (SH) ve bağıl standart sapma (BSS) hesaplanmasıyla gerçekleştirilir. BSS'nın %2'den küçük olması yöntemin kesinliğinin bir göstergesidir.

PBS'de etken maddenin üç farklı konsantrasyonda (100, 500, 2000 $\mu\text{M}/\text{mL}$) çözeltileri hazırlanmıştır. Çözeltilerin konsantrasyonlarına göre pik alanları YBSK enjeksiyonu sonrasında belirlenmiştir. Her konsantrasyon için deney 3 kez tekrarlanmış ve 1. gün yapılan çalışmalar 2., ve 3. günde tekrar edilmiştir ($k=3$). Kesinlik ile ilgili gün-içi kesinlik ve günler-arası tekraredilebilirlik değerleri kullanılarak yöntemin kesinliği hesaplanmıştır.

❖ Teşhis ve Tayin Sınırları

Bir analitik yöntemin teşhis sınırı, örnek içerisindeki teşhis edilen fakat kesinlikle kantitatif olarak tam miktarının belirlenmesine gerek olmayan analitin en küçük miktarıdır. Bu sınırlar düşük konsantrasyona sahip bir seri örneğin analiz edilmesiyle belirlenmiştir. Her bir ortam için 3 paralel kalibrasyon denklemi bulunmuştur. En düşük değerine karşılık gelen alanların standart sapma değerleri hesaplanmış ve bu değerlerin ortalaması, seçilen kalibrasyon doğrusunun eğimine bölünmüştür. Bu değer 3.3 ile çarpılarak teşhis sınırı (LOD); 10 ile çarpılarak tayin sınırı (LOQ) belirlenmiştir.

2.2.4. Askorbik Asit Yüklenmiş KLN

Askorbik Asit Yüklenmiş KLN'in Hazırlanması

Askorbik asit yüklü KLN'i hazırlamak için sıcak homojenizasyon tekniği kullanılmıştır. Bu tekniğe göre; %2,5 lipid, %5 askorbik asit ve %1,2 oranında yüzey etken madde (Tween 80) kullanılmıştır. Önce lipidin 80°C erimesi sağlanmıştır. Lipid eridikten sonra askorbik asit eklenerek aynı sıcaklıkta erimesi sağlanmıştır. Daha sonra Tween 80 yavaş yavaş ilave edilerek ultraturaks aracılığı ile 20500 rpm 'de 1 dk karıştırılmış ve böylece askorbik asit yüklü KLN elde edilmiştir. Aynı zamanda etken madde (askorbik asit) kullanılmadan kontrol

grubu olarak aynı şekilde boş KLN'de hazırlanmıştır (Müller ve ark., 1993; Siekmann ve Westesen, 1994).

Askorbik Asit Yüklü KLN'in Karakterizasyonu

❖ Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyel Ölçümü

Askorbik asit yüklü KLN'lerin partikül boyutu ve zeta potansiyel ölçümleri Zetasizer Nano Series (Nano-ZS) (Malvern Instruments, İngiltere) kullanılarak yapılmıştır. Her formülasyon için ardarda üç ölçüm yapılmıştır. Ölçümler sırasında cihazın sıcaklığı 25°C, ışık saçılım açısı 90° olacak şekilde ayarlanmıştır.

❖ Enkapsülasyonun Değerlendirilmesi

Etken madde yüklü KLN'ler 7500 rpm +4°C'de 30 dk boyunca santrifüjlendikten sonra elde edilen süpernatandaki etken madde miktarı 0.2 µm'lik filtre kağıdından süzildükten sonra YPSK yöntemiyle miktar tayini hesaplanmıştır. Etkin maddenin yükleme etkinliği (%YE), aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\%YE = 100 \times \frac{\text{Toplam etkin madde miktarı} - \text{Serbest etkin madde miktarı}}{\text{Toplam etkin madde miktarı}}$$

❖ İlaç Salımının Değerlendirilmesi

İlaç salımı, USP XXXI, NF26 (2008) palet metodu kullanılarak 37°C' de, 75 rpm'de 450 mL fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) (pH 6.8) disolüsyon ortamında gerçekleştirilmiştir. Örnekler alınarak YPSK'ya enjekte edilerek bakılmıştır. Çözünme ortamından (6., 12., 24., 48., 72. ve 96. saatler) enjektör yardımıyla 5 mL'lik örnekler 0,2 µm'lik membran filtreden süzülerek alınmış ve YBSK'da ölçüm yapılmıştır. Alınan örnek hacmi kadar ortam sıvısı her seferinde yerine konulmuştur. Her bir çalışma 3 kez tekrarlanmıştır.

❖ Yüzey Morfolojisinin İncelenmesi

Sıcak homojenizasyon tekniği ile elde edilen askorbik asit yüklü KLN'lerin yüzey özellikleri ve şekilleri, geçirimli elektron mikroskobu (TEM)

(TEM; FEI, Hollanda) ile fotoğrafları çekilerek incelenmiştir. TEM yönteminde santrifüjlenerek süpernatanın ayrıldığı nanopartiküller 100 µL MiliQ su içinde süspanse edildikten sonra karbon kaplı bakır grid üzerine damlatılarak emdirilmiştir. %2'lik (a/h) uranil asetat ile 20 saniye muamele edilerek boyanması sağlandıktan sonra suyla boyanın fazlası uzaklaştırılmıştır. 24 saat boyunca kuruyan nanopartiküller TEM ile görüntülenmiştir.

2.2.5. Askorbik Asit Yüklenmiş KLN'in H-ras 5RP7 ve NIH/ 3T3 ile Etkileşimi

Sıcak homojenizasyon tekniği ile elde edilen askorbik asit yüklü KLN'lerin H-ras 5RP7 ve NIH/3T3 hücreleri üzerinde olan etkisini görmek için 2,5 µM/mL, 5 µM/mL, 7,5 µM/mL, 10 µM/mL, 15 µM/mL ve 20 µM/mL derişimleri denenerek bu hücre hatları üzerinde MTT testinin yardımı ile sitotoksik etkisine bakılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre seçilen en etkin üç doz (15 µM/mL, 20 µM/mL ve 25 µM/mL) 5 mL ortam içine uygulanarak hücrelerde meydana gelen apoptotik etki akım sitometri cihazında ölçülmüştür.

2.2.6. MTT Testi ile Mitokondriyel Süksinat Dehidrojenaz Enzim Ölçümü

MTT testinin protokolü ilk kez Mossman tarafından 1983 yılında belirlenmiştir. Bu yöntem sağlıklı hücrelerde mitokondrinin MTT boyasının tetrazolium (3-(4,5-dimethylthiazol-2)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, MTT halkasını parçalayabilmesi esasına dayanmaktadır (Mossman, 1983). Bu reaksiyon bir mitokondriyal enzim olan süksinat dehidrojenaz enziminin aktivitesine bağlıdır. Tetrazolium halkasının parçalanması ile soluk sarı renkli MTT boyası koyu mavi-mor formazan ürününe dönüşür. Sonuç olarak canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renkte boyanmakta, ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler boyanmamaktadır (Fotokis ve Timbrell, 2006).

96 kuyulu hücre kültürü plakaların her kuyucuğuna 1×10^3 hücre/mL de olacak şekilde hazırlanan H-ras 5RP7 ve NIH/ 3T3 hücre süspansiyonu aktarılarak, hücreler 37°C' de inkübe edilir. Askorbik asit ve askorbik asit yüklü KLN ile 24, 48 ve 72 saat muamele edilen hücrelerden inkübasyon süresi sonunda her bir kuyucuğa 20 µL MTT boyası (5 mg/mL) ilave edilerek ve hücreler

37°C’de 2 saat daha inkübe edilir. Bu süre sonunda hücrelerden MTT boyası uzaklaştırılarak ve her bir kuyuya canlı hücreler tarafından oluşturulan formazan tuzlarının çözünmesi için 200 µL DMSO eklenerek 10 dk inkübe edilir. Renk değişimi, ELX808-IU Bio-Tek plaka okuyucusunda 540 nm dalga boyu ile belirlenir. Bileşen ile muamele edilmeyen kontrol hücre canlılığı % 100 olarak kabul edilerek, deney hücrelerinin canlılık oranları % olarak ifade edilir. Bu test askorbik asit ve askorbik asit yüklü KLN için iki hücre grubunda 3’er defa olmak üzere tekrar edilmiştir.

2.2.7. Akım Sitometri ile Apoptotik Etkinin Ölçülmesi

Akım sitometri, hücre veya partiküllerin akmakta olan bir akışkanın içindeyken özelliklerinin incelenip, ölçülmesini sağlayan cihazdır. Akım sitometrisi ile bir süspansiyon halindeki hücre ya da partiküller, lazer ışığı ile aydınlatılmakta olan bir bölmeden geçirilir; hücrelerin ışığın önünden geçerken verdikleri sinyaller (hücrelerin büyüklüğü veya hücreye bağlanan çeşitli floresan özellikte boyalar vb.) toplanarak analiz edilir (Taneli, 2007).

Askorbik asit ve askorbik asit yüklü KLN’in *H-ras* 5RP7 ve NIH/3T3 hücreleri üzerinde olan apoptotik etkilerini ölçmek için, apoptoz mekanizmasının tetiklenmesi ile hücre dış yüzeyine hareket eden fosfolipidlerine karşı yüksek affiniteye sahip Annexin-V ile incelenmiştir. Normal hücrelerde, fosfolipidlerin (FS) bölgeleri sitoplazmik membranın iç kısmında bulunurlar. Apoptoz sürecinde, FS bölgeleri yer değiştirerek dış membrana yönelir. Annexin-V, FS gibi negatif yüklü fosfolipidlere bağlanan spesifik bir proteindir. Apoptoz sırasında hücreler, plazma membranının PI’yı (propidium iodide) serbestleştirme yeteneğini yitirmeden önce Annexin V’ye bağlanır. PI ise geç apoptoz (nekroz) olan hücrelerin belirlenmesinde kullanılan bir boyadır. Annexin V ve PI kombinasyonu ile boyanan hücrelerde canlı, apoptotik ve nekrotik hücre popülasyonları aynı anda ayırmak mümkündür; Q1 (PI₍₊₎, Annexin V FITC₍₋₎) nekrotik hücrelerin sayısını, Q2 (PI₍₋₎, Annexin V FITC₍₊₎) erken apoptoza uğrayan hücre popülasyonunu, Q3 (PI₍₋₎, Annexin V FITC₍₋₎) canlı hücrelerin sayısını ve Q4 (PI₍₊₎, Annexin V FITC₍₊₎) geç apoptoza uğrayan hücre popülasyonunun sayısını verir (Martin ve ark., 1995; Van Heerde ve ark., 1995; Karaboz ve ark., 2008).

Askorbik asit ve askorbik asit yüklü KLN'in H-ras 5RP7 ve NIH/3T3 hücreleri üzerinde olan apoptotik etkilerini ölçmek için hücreler 1×10^6 /ml olacak şekilde toma lamı ile sayıldıktan sonra uygun derişimlerde askorbik asit ve askorbik asit yüklü KLN muamele edilip 24, 48 ve 72 saat süre karbondioksitli inkübatörde bekletilmiştir. İnkübasyon sonunda hücreler santrifüjlenip, 2 kere soğuk PBS ile yıkanmıştır. Üzerine 5 µL Annexin V-FITC ve 5 µL PI ilave edildikten sonra, oda sıcaklığında ve karanlıkta 15 dk süreyle bekletilmiştir. Bu süre sonunda, 400 µL Annexin V binding buffer eklenip hücreler 1 saat içinde analize alınmıştır. FACS Aria flow cytometer cihazında Diva 6.0 software kullanılarak, hücrelerin yüzdeleri saptanmıştır.

2.2.8. Konfokal Mikroskop ile Hücresel Değişikliklerin İncelenmesi

Lazer taramalı konfokal mikroskobu, floresan veya yansıtıcı problemler ile işaretlenmiş kemik, beyin ve diğer benzeri dokuların oldukça kalın kesitleri, gelişmekte olan embriyolar gibi küçük organizmalar ve bütün haldeki hücre örnekleri ile çalışma imkanı sağlar. Bu teknoloji sayesinde en yüksek ışık mikroskobu çözünürlüğü ile hücre altı yapılar, fonksiyonları ve hücre/organizma yapısının detaylı bir şekilde görüntülenmesini sağlar. Akridin oranj (AO) çift veya tek zincirli nükleik asitlere bağlanabilen, hücrenin çekirdeğine DNA ve RNA'yı seçici bir şekilde boyayabilen, hücrenin çekirdeği hakkında bilgi sahibi olmamızı sağlayan floresan özellikte metakromatik bir boyadır. Maksimum absorpsiyonu yaklaşık 455–490 nm'dir. AO, hücre içindeki tek zincirli nükleik asitleri kırmızıya, çift zincirli nükleik asitleri de (DNA ve kendi üstünde çifte sarmal yapmış RNA) yeşile boyamaktadır (Kapuscinski, 1990; Kapuscinski ve ark., 1982).

Askorbik asit ve askorbik asit yüklü KLN'in uygulandığı H-ras 5RP7 ve NIH/3T3 hücreleri üzerinde olan morfolojik değişikliklerini belirlemek için; 1×10^6 hücre/mL steril lamellerin yerleştirildiği cam petri kaplarına aktarılıp, belirlenen en etkin derişimlerdeki askorbik asit (2500 µM/mL) ve askorbik asit yüklü KLN (25 µM/mL) hücrelere eklenerek 72 saat etüvde 37°C'de inkübasyona tabi tutulmuştur. Bu sürenin bitiminde hücreler 2 defa 1XPBS solüsyonu ile yıkanıp %70 etanolde 15 dk boyunca fikse edilmiştir. Daha sonra, AO (0,1 mg/mL) ile 10 dk inkübe edilip son kez 1XPBS ile yıkanmıştır. Hazırlanan

numuneler lazer taramalı konfokal mikroskopunda (Leica TCS SP5) incelenmek üzere preparat haline getirilmiştir ve Leica Confocal Software Version 2.00 programı kullanılarak incelenmiştir (Cotter ve Martin, 1996).

2.2.9. Geçirimli Elektron Mikroskop (TEM) ile İnce Yapı Değişikliklerin İncelenmesi

Askorbik asit ve askorbik asit yüklü KLN'in H-ras 5RP7 ve NIH/3T3 hücreleri üzerinde olan ince yapısal değişiklikleri incelemek için; 1×10^6 /ml H-ras 5RP7 ve NIH/3T3 hücreleri en etkin derişimlerde askorbik asit ve askorbik asit yüklü KLN muamele edildikten sonra 72 saat süre karbondioksitli inkübatörde bekletilmiştir. Bu süre sonunda, askorbik asit ve askorbik asit yüklü KLN ile etkileştirilen hücreler TEM'de incelenmesi için doku takibi protokolüne geçilmiştir Ayrıca aynı zamanda bu hücre hatlarının kontrol grupları da aynı protokolle hazırlanmıştır.

- **Fiksatif Hazırlama:** İlk fiksatif, tamponlanmış gluteraldehittir.

Fosfat tamponu;

Na_2HPO_4 ve KH_2PO_4 karıştırılarak, tampon solüsyonu hazırlanmıştır.

İncelenecek hücrelerin yapısı ve büyüklüğüne göre, hücreler tespit içerisinde 4-24 saat arasında $+4^\circ\text{C}$ 'de fikse edilmiştir.

- **Yıkama:** Fikse olmuş hücrelerden fiksatifi uzaklaştırmak için hücreler tampon çözeltisi ile yıkanır (3X15 dk.).
- **İkinci Tespit (Osmium Tetroksit):** Yıkanan hücreler % 1'lik OSO_4 içerisine alınıp, 2 saat süreyle rotatorda döndürülerek, fikse edilmeleri sağlanmıştır. Bu süre sonunda tampon ile 3X15 dk. yıkanır.
- **Dehidratasyon:** Etil alkol ile yapılır.
 - % 50 Alkol 15 dk.X2 $+4^\circ\text{C}$
 - % 70 Alkol 15 dk.X2 $+4^\circ\text{C}$
 - % 90 Alkol 15 dk.X2 $+4^\circ\text{C}$
 - % 96 Alkol 30 dk.X2 $+4^\circ\text{C}$
 - Absolu Alkol 30 dk.X1 $+4^\circ\text{C}$

Absolu Alkol 30 dk.X1 +25°C

➤ **Şeffaflandırma:**

Propilenoksit 30 dk.X2

Resin + Propilenoksit (1/1)

Hücreler bu karışımda 2 saat süreyle rotatorda döndürülür.

➤ **Bloklama:** Taze hazırlanmış resinle bloklama işlemi yapılır.

Polimerizasyon işlemi 48 saat boyunca 60°C’de yapılmıştır.

Resin Solusyonunun Hazırlanması:

Araldit CY212 20 mL,

DDSA 20 mL,

BDMA 0,6 mL,

Dibütilfitalat 1 mL.

➤ **Kesitlerin Boyanması:** Uranil asetat boyasının hazırlanması;

Metil Alkol 80 mL,

Uranil asetat 2 gr,

Distile su 20 mL.

Bu boya içerisinde gridler 45-60 dk. bekletilip, distile suyla yıkanır (boya kullanılmadan önce süzülmalıdır).

➤ **Kurşun Sitrata Boyasının Hazırlanması:**

A Karışımı

10 N NaOH 2 gr,

Distile su 5 mL.

B Karışımı

Kurşun sitrat 200 mgr,

Distile su 50 mL.

B karışımı üzerine 0,5 mL A karışımı katılıp, kuvvetlice çalkalanarak karıştırılmıştır (pH 12-13 arası olmalıdır). Temiz bir falkona konup, karanlıkta ve

+4°C’de saklanır. Boyanan kesitler elektron mikroskopunda incelenip, fotoğrafları çekilmiştir.

2.2.10. İstatiksel Değerlendirmeler

MTT deneylerinin sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesinde GraphPad Prism programı kullanılmış ve elde edilen verilerin tek yönlü ANOVA ile Posthoc olarak Tukey testi uygulanarak anlamlılıkları belirlenmiştir. Anlamlılık değeri olarak $p<0.05$ kabul edilmiştir.

3. BULGULAR

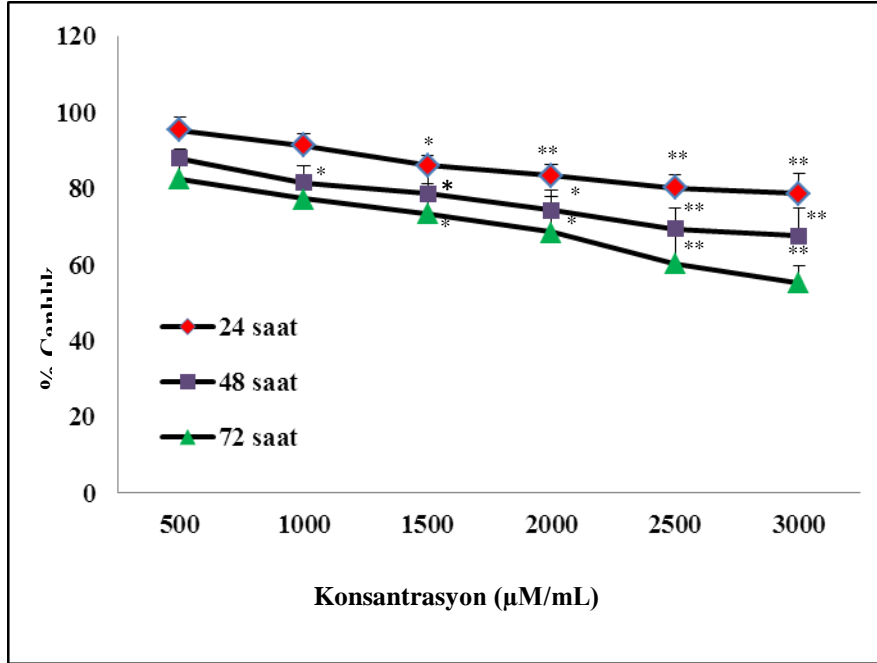
3.1. Askorbik Asidin *H-ras* 5RP7 ve NIH/3T3 Hücreleri ile Etkileşiminin Değerlendirilmesi

3.1.1. Askorbik Asidin *H-ras* 5RP7 ve NIH/3T3 Hücrelerindeki Sitotoksik Bulguları

Askorbik asidin uygulandığı *H-ras* 5RP7 ve NIH/3T3 hücreleriyle yapılan MTT testi sonucunda, uygulanan maddenin tüm dozlarında mitokondriyal aktivite de zamana ve doza bağlı olarak 5RP7 hücrelerinde, canlılık yüzdesinde bir azalma gözlenirken (Çizelge 3.1, Şekil 3.1), NIH/3T3 hücrelerinde herhangi bir sitotoksik etkiye sahip olmadığı gözlemlenmiştir (Çizelge 3.2, Şekil 3.2). 5RP7 hücrelerinin canlılık oranındaki azalma miktarı en belirgin olarak 72 saatte gözlemlenmiştir. Bu hücre hattına uygulanan askorbik asidin en düşük dozunda (500 $\mu\text{M}/\text{mL}$) ölüm yüzdesi; 24 saatte %4,8, 48 saatte % 12,2 ve 72 saatte %17,5 olarak bulunmuştur. En etkili doz olan 2500 $\mu\text{M}/\text{mL}$ askorbik asit uygulandığında ise, 24 saatte %19,8, 48 saatte % 31,7 ve 72 saatte %39,7 olarak bulunmuştur. Uygulanan 1500, 2000, 2500 ve 3000 $\mu\text{M}/\text{mL}$ dozlarının hücre canlılığına olan etkisi doza ve zamana bağlı olarak kontrole göre anlamlı bulunmuştur. NIH/3T3 hücrelerine uygulanan askorbik asit ise, doza ve zamana bağlı olarak kontrolle karşılaştırıldığında doz ve zaman arttıkça hücrelerin proliferasyonunda bir azalma olduğu için anlamlı farklılığın azaldığı tespit edilmiştir.

Çizelge 3.1. Askorbik asidin uygulandığı 5RP7 hücrelerinin canlılık yüzde değeri

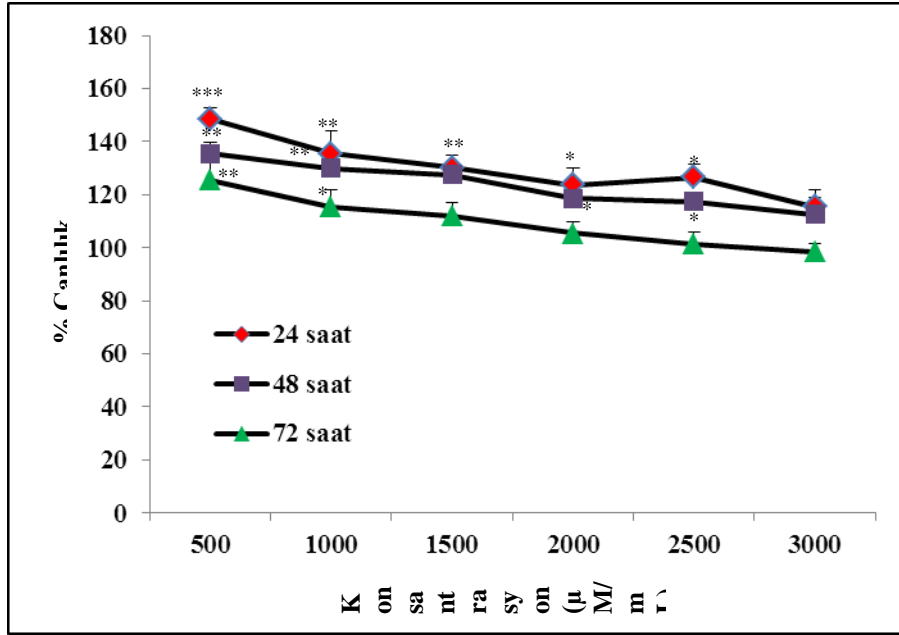
Dozlar ($\mu\text{M/mL}$)	Canlılık Yüzdeleri (%)		
	24 saat	48 saat	72 saat
500	95,2	87,8	82,5
1000	91,2	81,5	77,3
1500	86,1	78,7	73,4
2000	83,3	74,3	68,5
2500	80,2	69,3	60,3
3000	78,6	67,5	55,2



Şekil 3.1. Askorbik asidin uygulandığı 5RP7 hücrelerinin canlılık yüzdelerinin grafiği. Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyunun ortalamasını temsil etmektedir. Anlamlılık değeri $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **, $p < 0.001$ ***; ortalama değeri \pm Standart Hata ($n=6$)

Çizelge 3.2. Askorbik asidin uygulandığı NIH/3T3 hücrelerinin canlılık yüzde değerleri

Dozlar ($\mu\text{M}/\text{mL}$)	Canlılık Yüzdeleri (%)		
	24 saat	48 saat	72 saat
500	148,4	135,5	125,5
1000	135,4	129,8	115,3
1500	130,2	127,4	112
2000	123,5	118,5	105,5
2500	126,4	117,3	101,5
3000	115,5	112,5	98,5



Şekil 3.2. Askorbik asidin uygulandığı NIH/3T3 hücrelerinin canlılık yüzdelerinin grafiği. Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyunun ortalamasını temsil etmektedir. Anlamlılık değeri $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$, $p < 0.001^{***}$, ortalama değerler \pm Standart Hata (n=6)

3.1.2. Askorbik Asidin H-ras 5RP7 ve NIH/3T3 Hücrelerindeki Apoptotik Bulguları

Askorbik asidin 5RP7 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisine bakıldığında, genel olarak zaman ve doza bağlı olarak canlılığın yüzdesinde bir azalma gözlemlenmiştir. En belirgin etki 72 saatte gözlemlenmiştir (Çizelge 3.5, Şekil 3.5). 24 ve 48 saatte canlılığın yüzdesi en fazla %7.4 azalırken, 72 saatte bu oran %27'ye çıkmıştır (Çizelge 3.3, 3.4, Şekil 3.3, 3.4). NIH/3T3 hücreleri üzerinde olan etkisine genel olarak baktığımızda ise; herhangi bir apoptotik etki gözlemlenmemiştir (Çizelge 3.6, 3.7, Şekil 3.6, 3.7). Ancak 72 saatte uygulanan en yüksek dozda (2500 $\mu\text{M}/\text{mL}$) canlılık yüzdesi %88.4'e düşmüştür (Çizelge 3.8, Şekil 3.8).

Çizelge 3.3. Askorbik asidin uygulandığı 5RP7 hücrelerinde, Annexin V FITC değerlendirmesi ile elde edilen 24 saatlik apoptotik yüzde değerleri

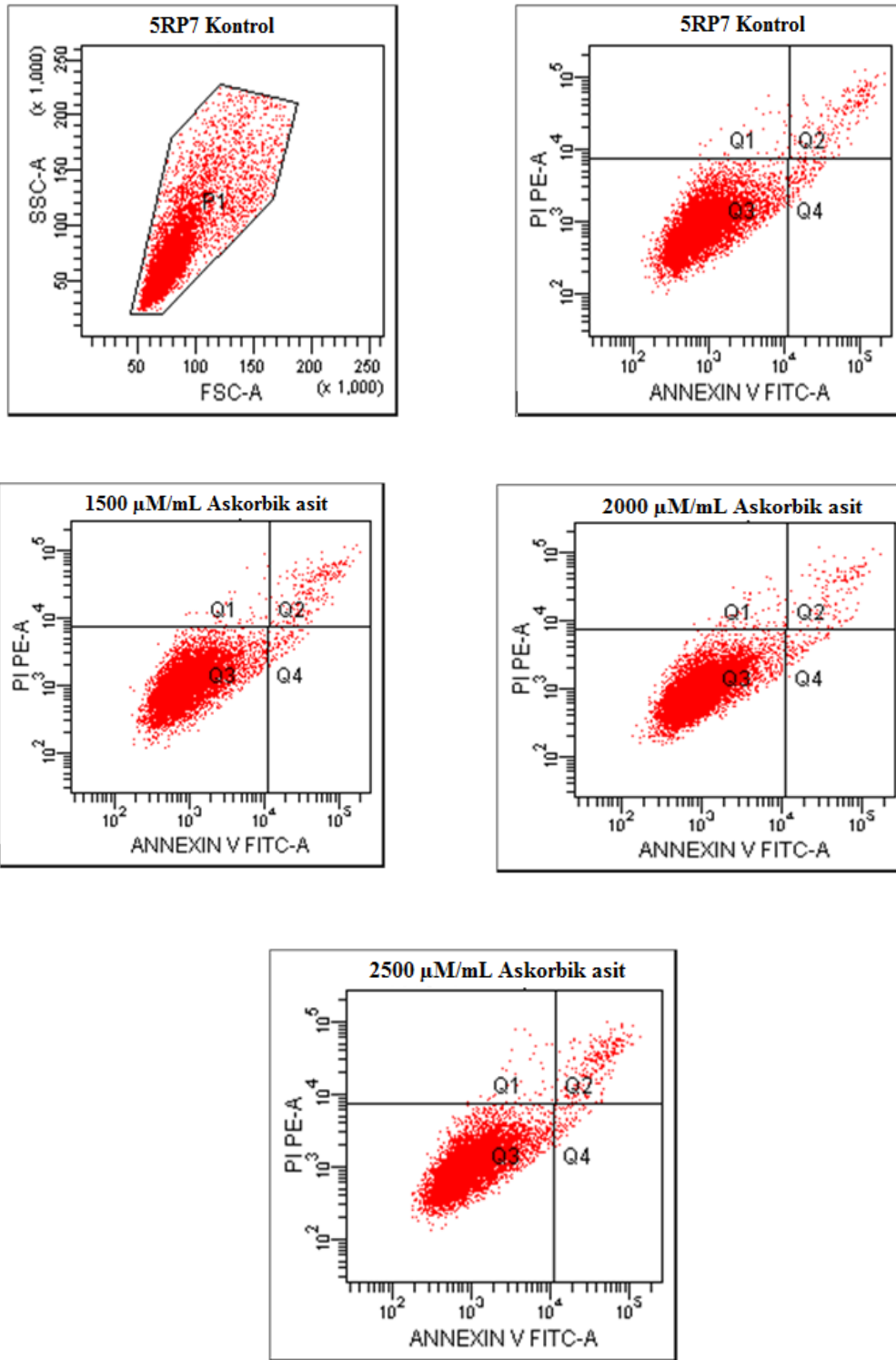
24 Saat	Q1(%)	Q2(%)	Q3(%)	Q4(%)
Kontrol	0.6	3.0	95.0	1.3
1500 $\mu\text{M}/\text{mL}$	1.2	3.4	94.4	0.9
2000 $\mu\text{M}/\text{mL}$	1.5	2.6	94.8	1.1
2500 $\mu\text{M}/\text{mL}$	1.2	4.6	93.1	1.0

Çizelge 3.4. Askorbik asidin uygulandığı 5RP7 hücrelerinde, Annexin V FITC değerlendirmesi ile elde edilen 48 saatlik apoptotik yüzde değerleri

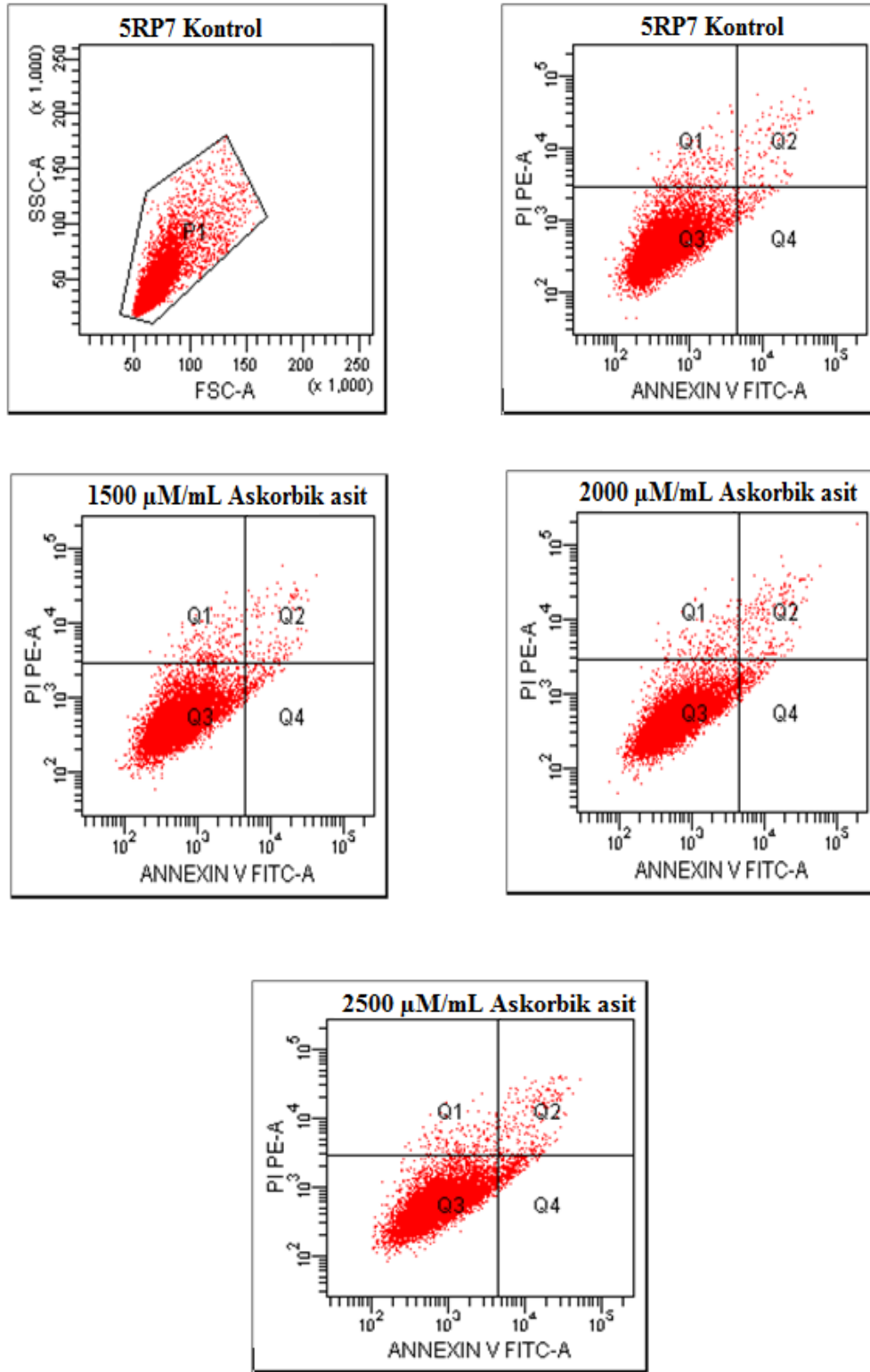
48 Saat	Q1(%)	Q2(%)	Q3(%)	Q4(%)
Kontrol	2.5	1.7	94.6	1.1
1500 $\mu\text{M}/\text{mL}$	2.2	1.7	94.8	1.3
2000 $\mu\text{M}/\text{mL}$	1.7	2.9	93.2	2.1
2500 $\mu\text{M}/\text{mL}$	1.8	2.9	92.6	2.7

Çizelge 3.5. Askorbik asidin uygulandığı 5RP7 hücrelerinde, Annexin V FITC değerlendirmesi ile elde edilen 72 saatlik apoptotik yüzde değerleri

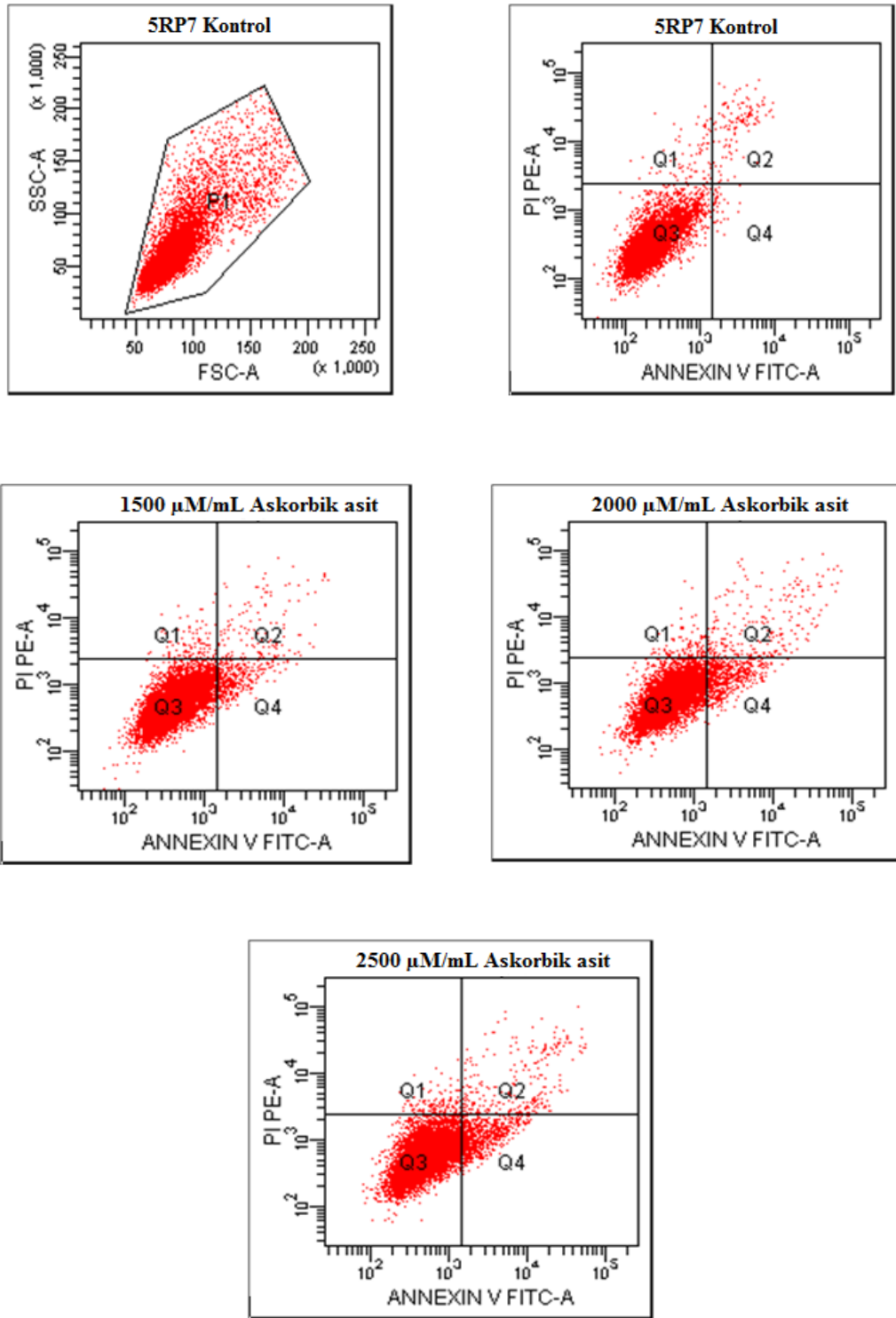
72 Saat	Q1(%)	Q2(%)	Q3(%)	Q4(%)
Kontrol	1.1	3.1	94.9	0.9
1500 µM/mL	1.3	9.4	81.3	8.0
2000 µM/mL	1.2	9.3	78.2	10.8
2500 µM/mL	1.7	14.5	73.0	11.2



Şekil 3.3. Askorbik asidin uygulandığı 5RP7 hücrelerinde, Annexin V FITC değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 24 saatlik histogramları (Q1=% Nekroz, Q2=% Erken Apoptoz, Q3= % Canlılık Q4= % Geç Apoptoz)



Şekil 3.4. Askorbik asidin uygulandığı 5RP7 hücrelerinde, Annexin V FITC değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 48 saatlik histogramları (Q1=% Nekroz, Q2=% Erken Apoptoz, Q3=% Canlılık Q4=% Geç Apoptoz)



Şekil 3.5. Askorik asidin uygulandığı 5RP7 hücrelerinde, Annexin V FITC değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 72 saatlik histogramları (Q1=% Nekroz, Q2= % Erken Apoptoz, Q3= % Canlılık Q4= % Geç Apoptoz)

Çizelge 3.6. Askorbik asidin uygulandığı NIH/3T3 hücrelerinde, Annexin V FITC değerlendirmesi ile elde edilen 24 saatlik apoptotik yüzde değerleri

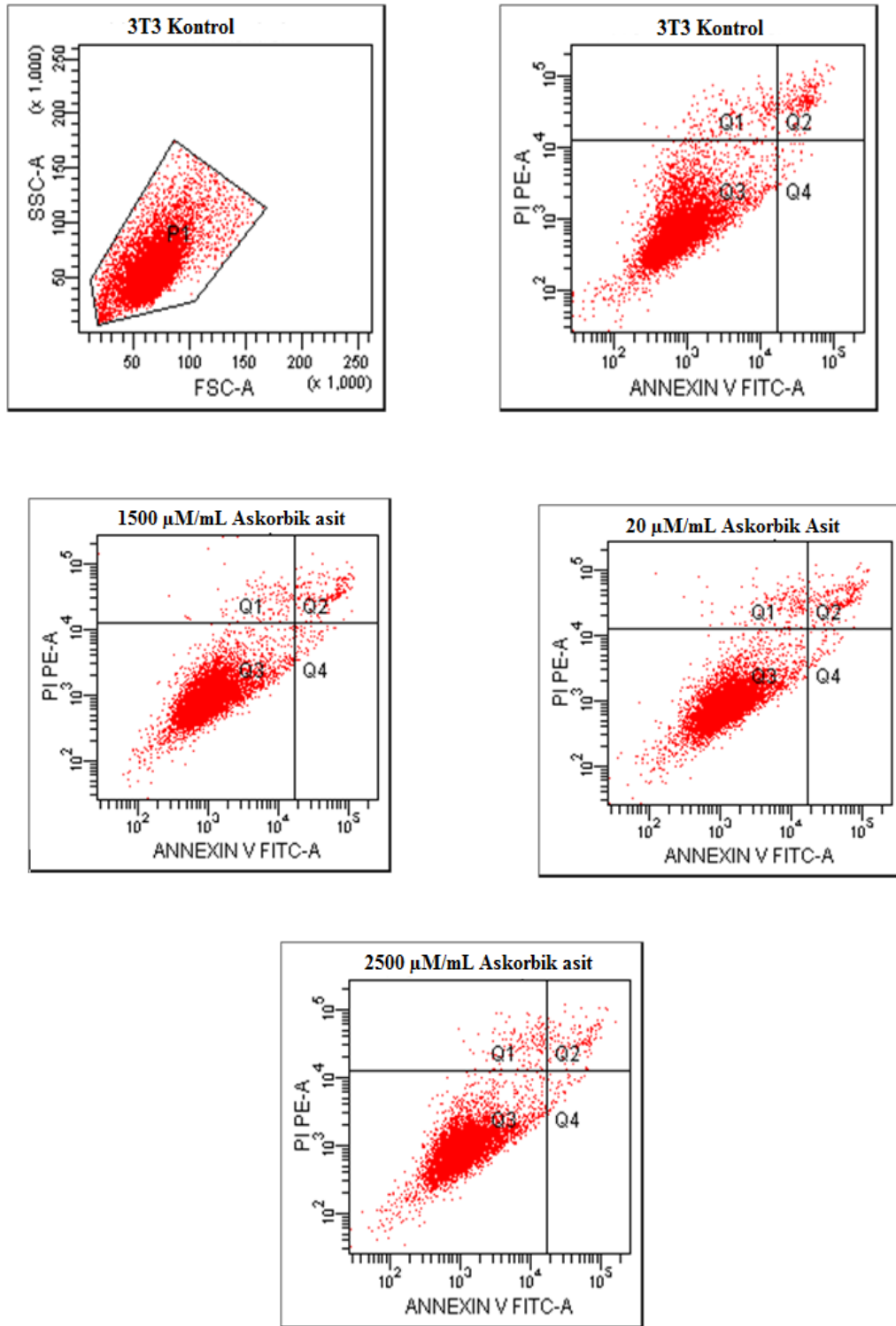
24 Saat	Q1(%)	Q2(%)	Q3(%)	Q4(%)
Kontrol	2.1	2.9	94.6	0.4
1500 µM/mL	1.5	2.4	95.1	0.9
2000 µM/mL	2.2	3.5	93.4	0.9
2500 µM/mL	1.9	2.2	95.0	0.9

Çizelge 3.7. Askorbik asidin uygulandığı NIH/3T3 hücrelerinde, Annexin V FITC değerlendirmesi ile elde edilen 48 saatlik apoptotik yüzde değerleri

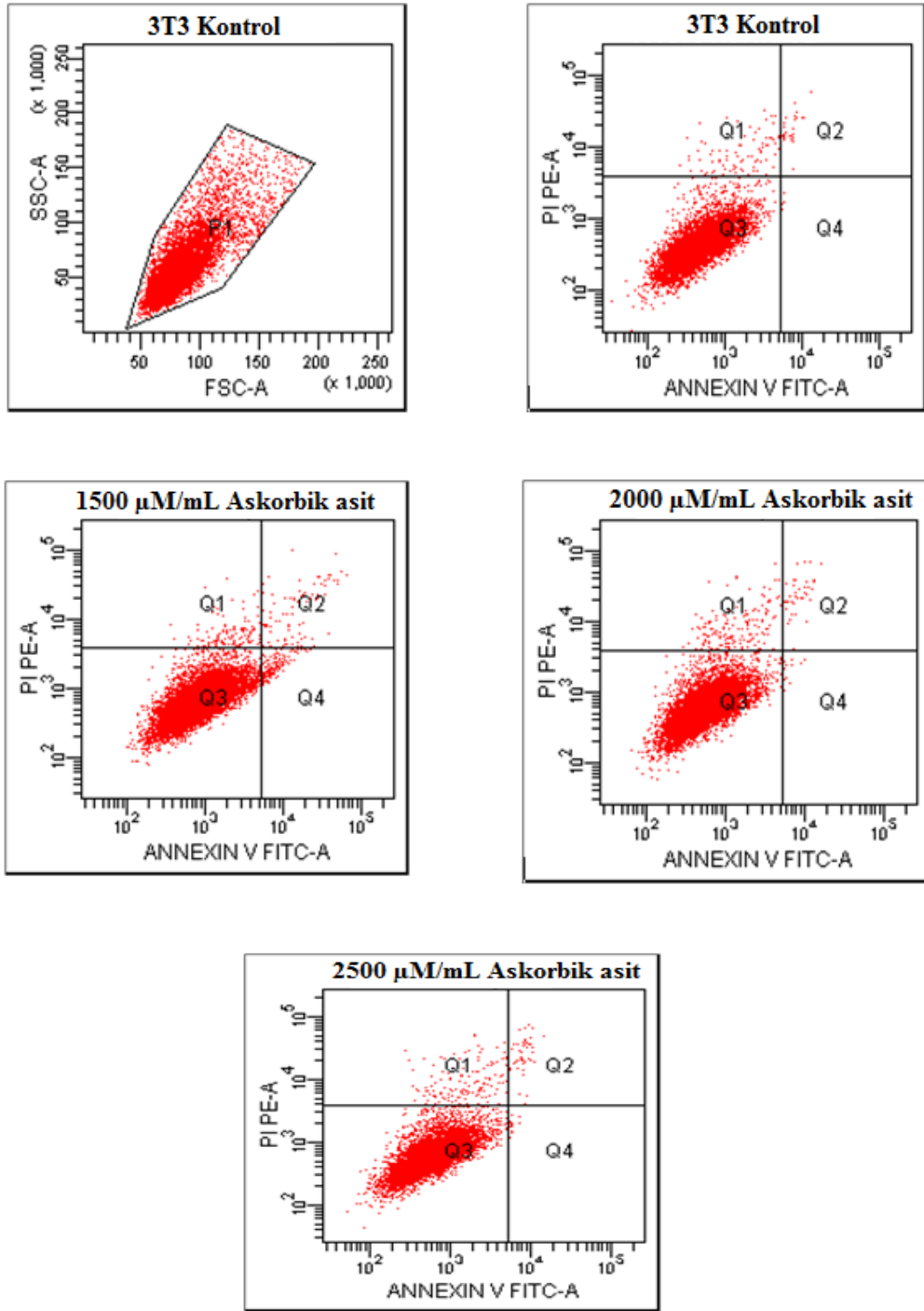
48 Saat	Q1(%)	Q2(%)	Q3(%)	Q4(%)
Kontrol	1.3	0.8	97.9	0.1
1500 µM/mL	1.6	1.8	94.9	1.8
2000 µM/mL	2.5	0.8	96.5	0.2
2500 µM/mL	2.4	1.1	96.4	0.2

Çizelge 3.8. Askorbik asidin uygulandığı NIH/3T3 hücrelerinde, Annexin V FITC değerlendirmesi ile elde edilen 72 saatlik apoptotik yüzde değerleri

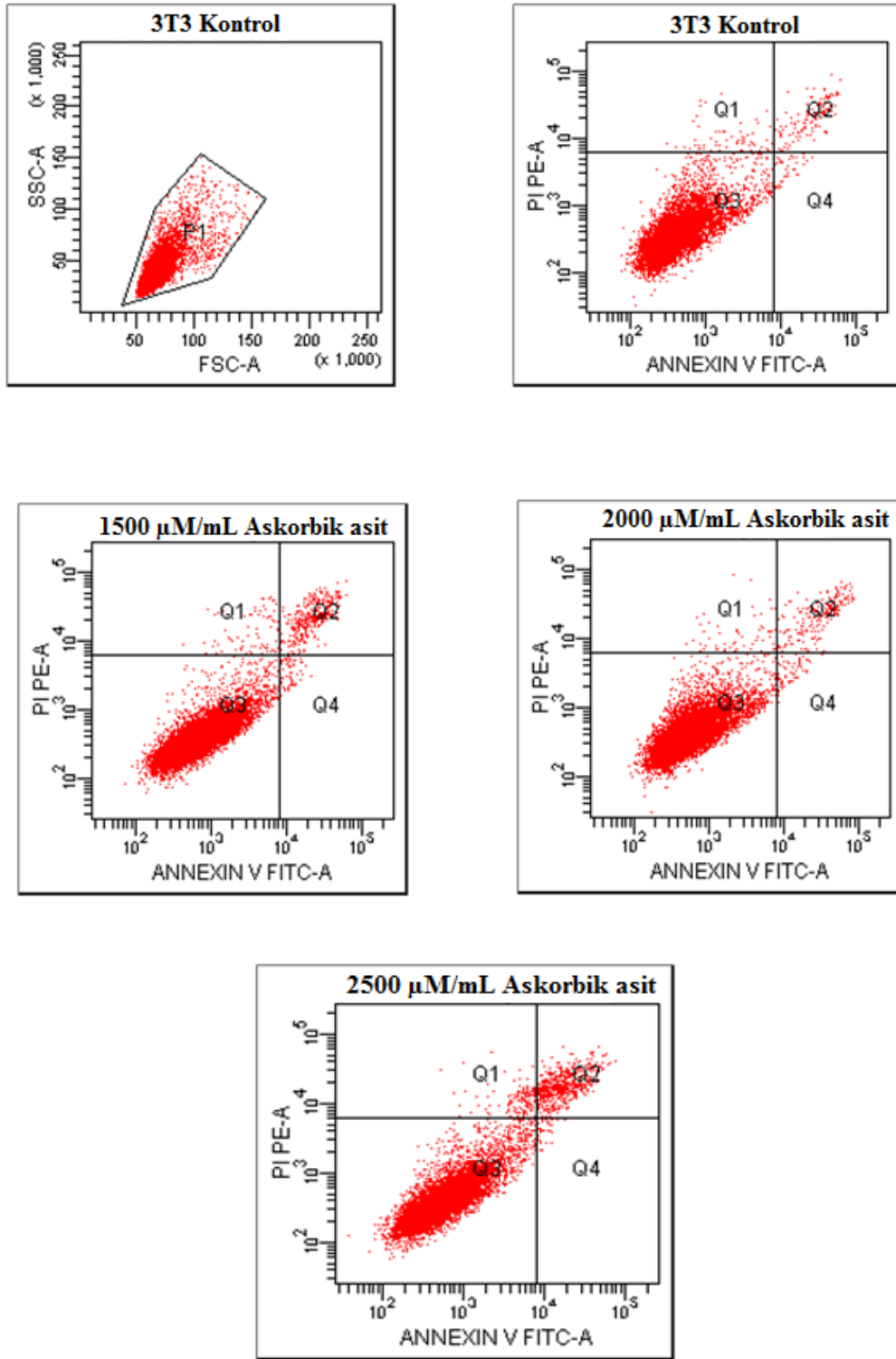
72 Saat	Q1(%)	Q2(%)	Q3(%)	Q4(%)
Kontrol	0.7	1.5	97.4	0.4
1500 µM/mL	0.9	4.5	93.8	0.7
2000 µM/mL	0.8	2.9	95.6	0.7
2500 µM/mL	1.8	9.4	88.4	0.5



Şekil 3.6. Askorbik asidin uygulandığı NIH/3T3 hücrelerinde, Annexin V FITC değerlendirilmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 24 saatlik histogramları (Q1=% Nekroz, Q2= % Erken Apoptoz, Q3= % Canlılık Q4= % Geç Apoptoz)



Şekil 3.7. Askorbik asidin uygulandığı NIH/3T3 hücrelerinde, Annexin V FITC değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 48 saatlik histogramları (Q1=% Nekroz, Q2= % Erken Apoptoz, Q3= % Canlilik Q4= % Geç Apoptoz)



Şekil 3.8. Askorbik asidin uygulandığı NIH/3T3 hücrelerinde, Annexin V FITC değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 72 saatlik histogramları (Q1=% Nekroz, Q2= % Erken Apoptoz, Q3= % Canlilik Q4= % Geç Apoptoz)

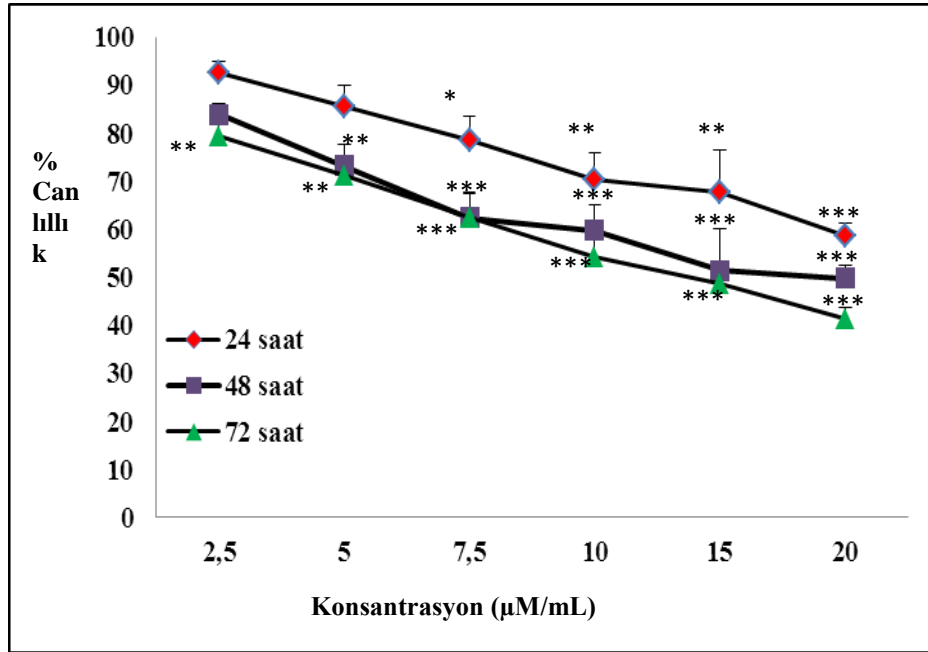
3.2. Askorbik Asit Yüklenmiş KLN'in H-ras 5RP7 ve NIH/3T3 Hücreleri ile Etkileşiminin Değerlendirilmesi

3.2.1. Askorbik Asit Yüklü KLN'in H-ras 5RP7 ve NIH/3T3 Hücrelerindeki Sitotoksik Bulguları

Askorbik asit yüklü KLN'in uygulandığı 5RP7 ve NIH/3T3 hücreleri üzerinde olan sitotoksik etkisine baktığımızda; doza ve zamana bağlı olarak kontrole göre karşılaştırıldığında 24 saat için 7,5, 10, 15 ve 20 µM/mL anlamlı iken, 48 saat için 5, 7,5, 10, 15 ve 20 µM/mL anlamlı ve 72 saat için 2,5, 5, 7,5, 10, 15 ve 20 µM/mL dozlarının anlamlı olduğu bulunmuştur. Doz ve saate bağlı anlamlılık artmıştır. Askorbik asit yüklü KLN uygulanan 5RP7 hücrelerinde zamana ve doza bağlı olarak canlılık yüzdeleri azalırken, NIH/3T3 hücreleri üzerinde herhangi bir toksik etkiye sahip olmadığı bulunmuştur. Askorbik asit yüklü KLN'in en düşük dozu (2,5 µM/mL) 5RP7 hücrelerine uygulandığında ölüm oranı; 24 saatte %7,3, 48 saatte % 16,1 ve 72 saatte %21,5 olarak bulunurken, en etkili doz olan 20 µM/mL askorbik asit yüklü KLN verildiğinde, 24 saatte %41,3, 48 saatte % 51,2 ve 72 saatte %59,5 olarak bulunmuştur. En anlamlı saat 72 saat olarak tespit edilmiştir (Çizelge 3.9, Şekil 3.9). Askorbik asit yüklü KLN'i askorbik asitle karşılaştırdığımızda, doza ve zamana bağlı olarak bakıldığında 5RP7 hücre hattında askorbik aside göre daha etkili olduğu ve ölüm oranının anlamlı olarak arttığı bulunmuştur. Ayrıca hem askorbik asidin hem de askorbik asit yüklü KLN'in NIH/3T3 hücre hattında herhangi bir sitotoksik aktivitesi gözlemlenmemiştir. Fakat askorbik asit yüklü KLN'in uygulandığı bu hücre hattında doza bağlı olarak kontrole karşılaştırıldığında, sadece 24 saat için anlamlı farklılık bulunmuştur. Çünkü özellikle 72 saatte hücrelerin canlılık yüzdelerinde az bir miktarda da (% 6,5) olsa azalma gözlemlenmiştir (Çizelge 3.10, Şekil 3.10).

Çizelge 3.9. Askorbik asit yüklü KLN'in uygulandığı 5RP7 hücrelerinin canlılık yüzde değerleri

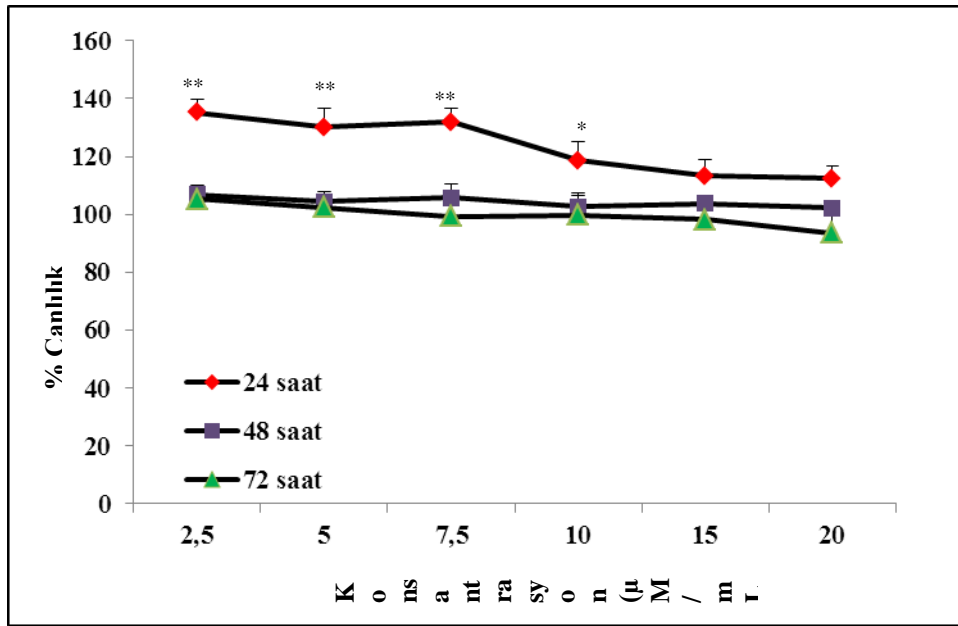
Dozlar ($\mu\text{M}/\text{mL}$)	Canlılık Yüzdeleri (%)		
	24 saat	48 saat	72 saat
2,5	92,7	83,9	79,5
5	85,5	73,2	71,2
7,5	78,5	62,4	62,5
10	70,3	59,7	54,3
15	67,8	51,4	48,7
20	58,7	49,8	41,5



Şekil 3.9. Askorbik asit yüklü KLN'in uygulandığı 5RP7 hücrelerinin canlılık yüzdelerinin grafiği. Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyunun ortalamasını temsil etmektedir. Anlamlılık değeri $p<0.05^*$, $p<0.01^{**}$, $p<0.001^{***}$, ortalama değerler \pm Standart Hata (n=6)

Çizelge 3.10. Askorbik asit yüklü KLN'in uygulandığı NIH/3T3 hücrelerinin canlılık yüzde değerleri

Dozlar ($\mu\text{M}/\text{mL}$)	Canlılık Yüzdeleri (%)		
	24 saat	48 saat	72 saat
2,5	135,3	106,8	105,4
5	130,1	104,5	102,4
7,5	131,9	105,8	99,3
10	118,5	102,6	99,7
15	113,3	103,7	98,2
20	112,4	102,3	93,5



Şekil 3.10. Askorbik asit yüklü KLN'in uygulandığı NIH/3T3 hücrelerinin canlılık yüzde değerlerinin grafiği. Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyunun ortalamasını temsil etmektedir. Anlamlılık değeri $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$, $p < 0.001^{***}$, ortalama değerler \pm Standart Hata (n=6)

3.2.2. Askorbik Asit Yüklü KLN'in H-ras 5RP7 ve NIH/3T3 Hücrelerindeki Apoptotik Bulguları

Askorbik asit yüklü KLN'in 5RP7 hücreleri üzerinde apoptotik etkilerine Annexin V-FITC kullanarak bakıldığında, zaman ve doza bağlı olarak kontrole göre karşılaştırıldığında, zaman ve doz arttıkça hücrelerin canlılık oranında (Q3) azalma olduğu ve hem erken apoptoz (Q2) hemde geç apoptoz yüzdesinde (Q4) belirgin bir artış gözlemlenmektedir. Akım sitometriden elde edilen sonuçlara göre, en etkin saat 72 saat olarak (% 43 ölüm) belirlenmiştir (Çizelge 3.13, Şekil 3.13) ve MTT testindeki sonuçlara paralel sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca askorbik asit yüklü KLN'in askorbik asite göre apoptotik etkisinin daha fazla olduğu bulunmuştur (Çizelge 3.11, 3.12, Şekil 3.11, 3.12). Askorbik asit yüklü KLN'in NIH/3T3 hücreleri üzerinde olan apoptotik etkisine baktığımızda, canlılık yüzdesi en fazla 72 saatte azalmıştır (% 11.9) (Çizelge 3.14, 3.15, 3.16). Doza ve zamana bağlı artışa bakarsak, hücrelerde erken (Q2) apoptozun arttığı gözlemlenmektedir (Şekil 3.14, 3.15, 3.16).

Çizelge 3.11. Askorbik asit yüklü KLN'in uygulandığı 5RP7 hücrelerinde, Annexin V FITC değerlendirmesi ile elde edilen 24 saatlik apoptotik yüzde değerleri

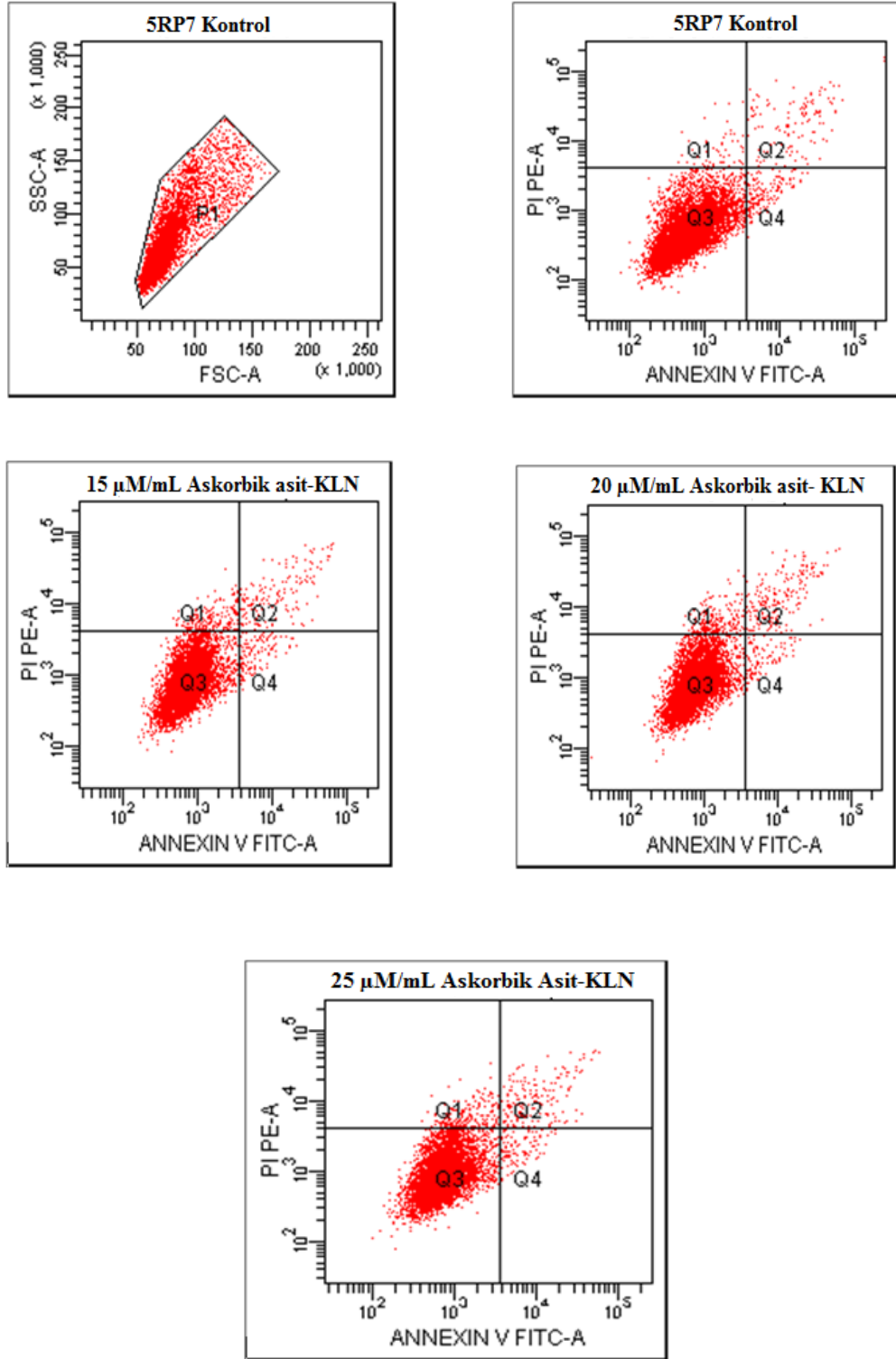
24 Saat	Q1(%)	Q2(%)	Q3(%)	Q4(%)
Kontrol	1.0	2.5	94	2.4
15 µM/mL	3.9	7.3	85.3	3.5
20 µM/mL	4.1	7.5	85.7	2.7
25 µM/mL	4.9	7.2	85.7	2.2

Çizelge 3.12. Askorbik asit yüklü KLN'in uygulandığı 5RP7 hücrelerinde, Annexin V FITC değerlendirmesi ile elde edilen 48 saatlik apoptotik yüzde değerleri

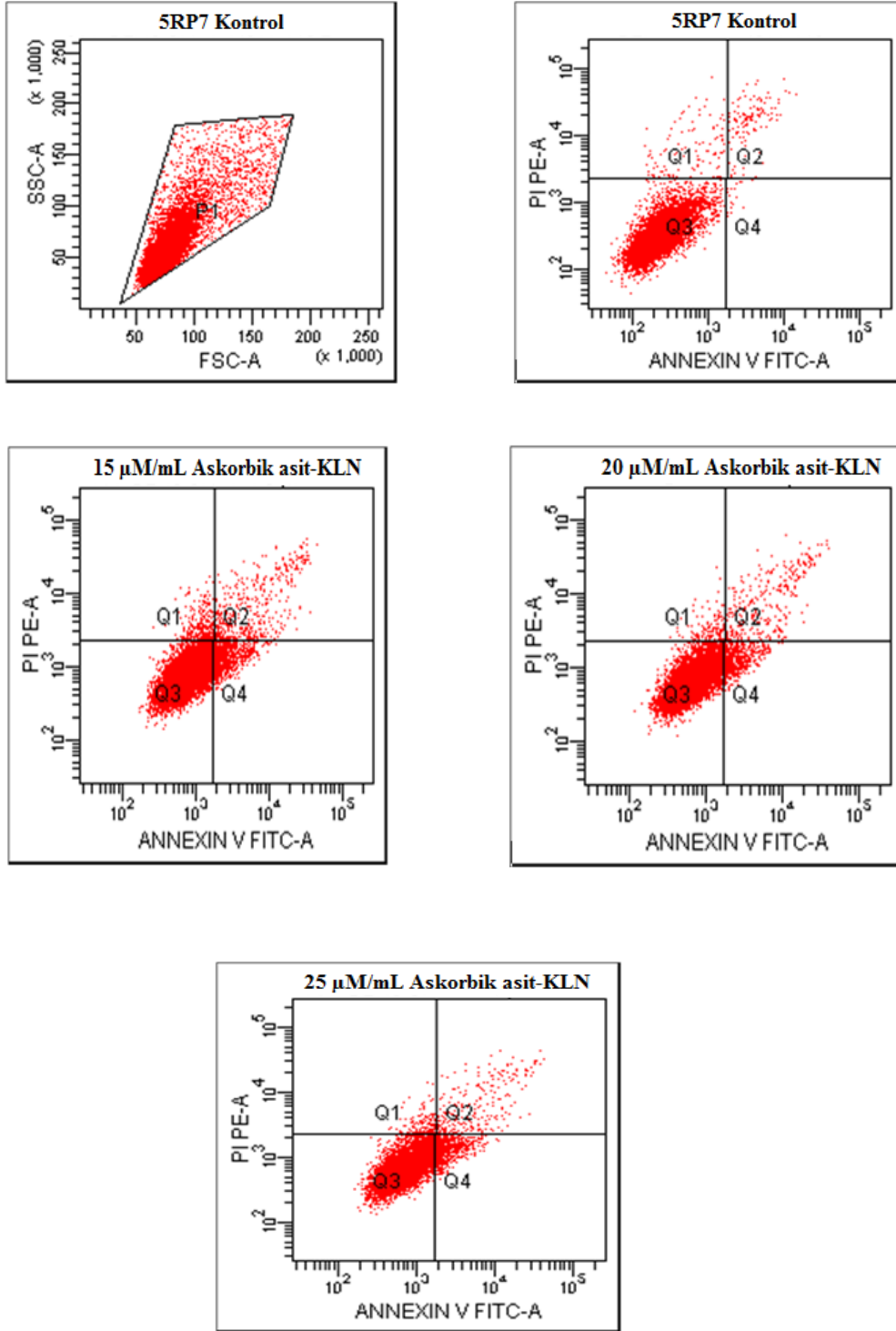
48 Saat	Q1(%)	Q2(%)	Q3(%)	Q4(%)
Kontrol	1.7	2.7	95.2	0.4
15 µM/mL	3.9	14.0	70.6	11.6
20 µM/mL	2.2	14.4	72.6	10.9
25 µM/mL	2.6	17.5	65.6	14.3

Çizelge 3.13. Askorbik asit yüklü KLN'in uygulandığı 5RP7 hücrelerinde, Annexin V FITC değerlendirmesi ile elde edilen 72 saatlik apoptotik yüzde değerleri

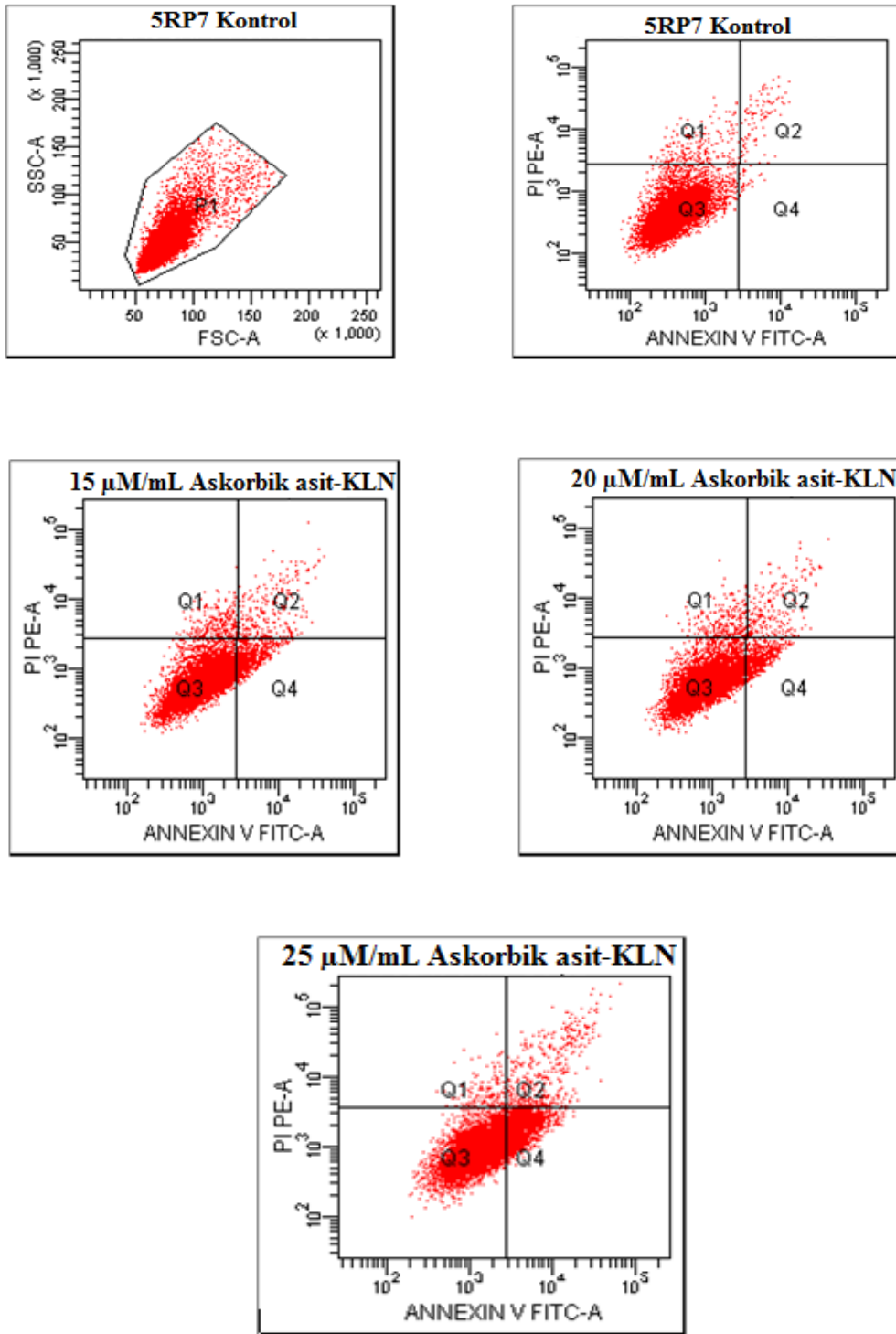
72 Saat	Q1(%)	Q2(%)	Q3(%)	Q4(%)
Kontrol	2.7	1.6	95.3	0.4
15 µM/mL	3.3	7.9	77.1	11.7
20 µM/mL	3.4	8.7	76.4	11.6
25 µM/mL	3.7	10.5	57	28.8



Şekil 3.11. Askorbik asit yüklü KLN'in uygulandığı 5RP7 hücrelerinde, Annexin V FITC değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 24 saatlik histogramları (Q1=% Nekroz, Q2= % Erken Apoptoz, Q3= % Canlılık Q4= % Geç Apoptoz)



Şekil 3.12. Ascorbik asit yüklü KLN'in uygulandığı 5RP7 hücrelerinde, Annexin V FITC değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 48 saatlik histogramları (Q1=% Nekroz, Q2= % Erken Apoptoz, Q3= % Canlılık Q4= % Geç Apoptoz)



Şekil 3.13. Askorbik asit yüklü KLN'in uygulandığı 5RP7 hücrelerinde, Annexin V FITC değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 72 saatlik histogramları (Q1=% Nekroz, Q2= % Erken Apoptoz, Q3= % Canlılık Q4= % Geç Apoptoz)

Çizelge 3.14. Askorbik asit yüklü KLN'in uygulandığı NIH/3T3 hücrelerinde, Annexin V FITC değerlendirmesi ile elde edilen 24 saatlik apoptotik yüzde değerleri

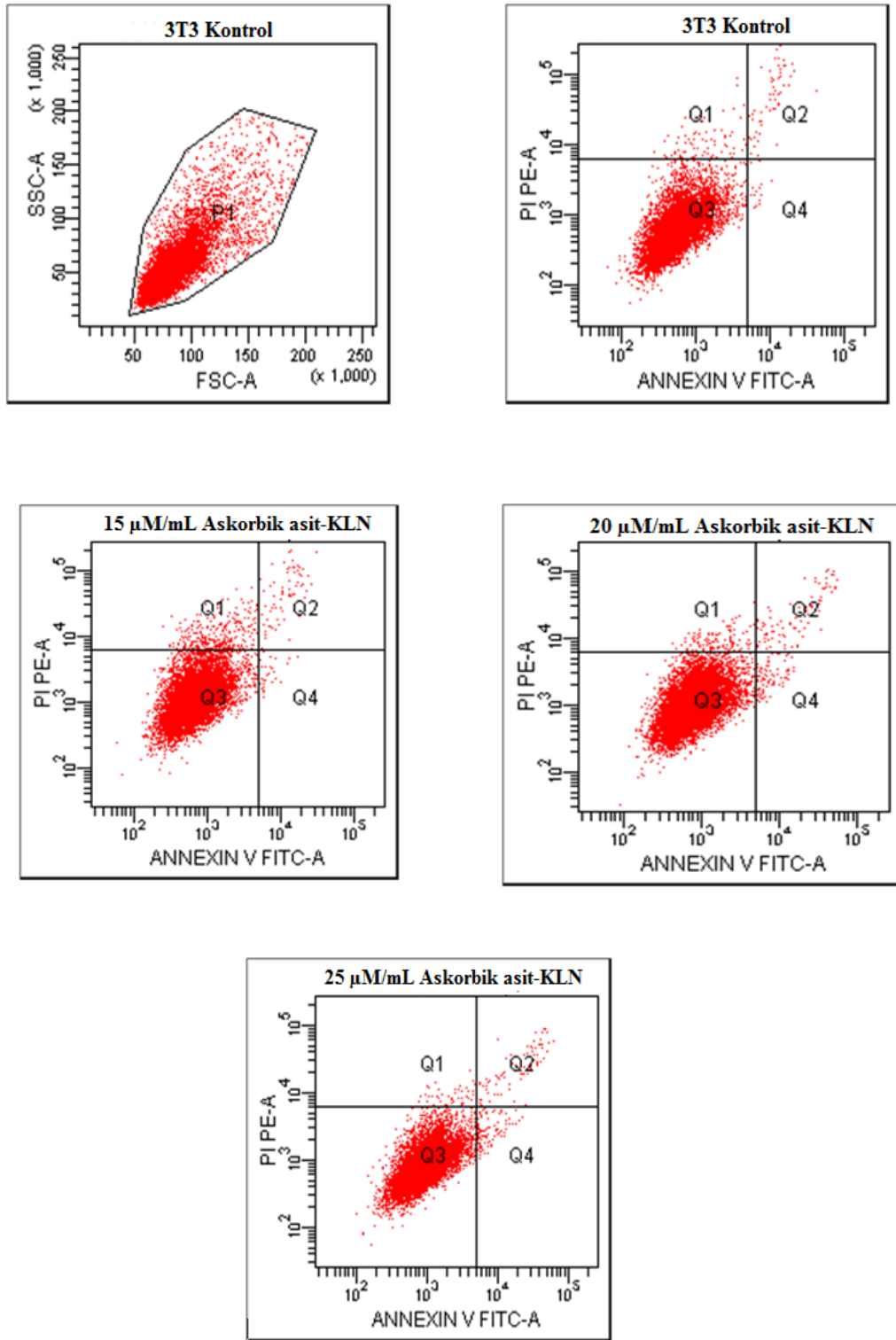
24 Saat	Q1(%)	Q2(%)	Q3(%)	Q4(%)
Kontrol	0.9	1.0	97	0.3
15 µM/mL	4.2	1.4	94.0	0.4
20 µM/mL	1.7	1.8	95.0	1.4
25 µM/mL	0.7	1.7	95.4	2.2

Çizelge 3.15. Askorbik asit yüklü KLN'in uygulandığı NIH/3T3 hücrelerinde, Annexin V FITC değerlendirmesi ile elde edilen 48 saatlik apoptotik yüzde değerleri

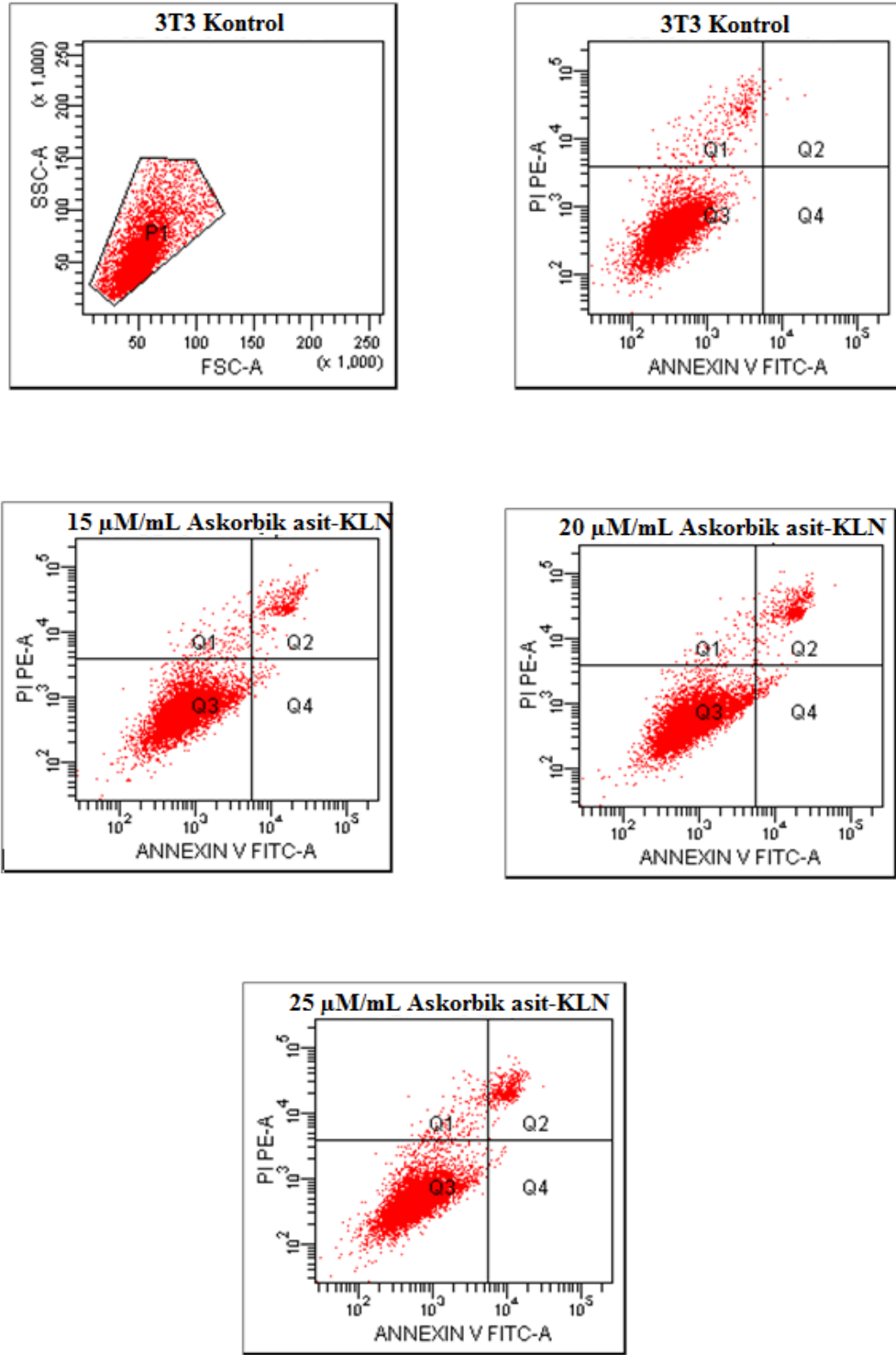
48 Saat	Q1(%)	Q2(%)	Q3(%)	Q4(%)
Kontrol	3.6	0.3	96.1	0.0
15 µM/mL	2.1	5.1	92.3	0.5
20 µM/mL	1.5	7.3	89.8	1.4
25 µM/mL	2.4	6.3	91.8	0.3

Çizelge 3.16. Askorbik asit yüklü KLN'in uygulandığı NIH/3T3 hücrelerinde, Annexin V FITC değerlendirmesi ile elde edilen 72 saatlik apoptotik yüzde değerleri

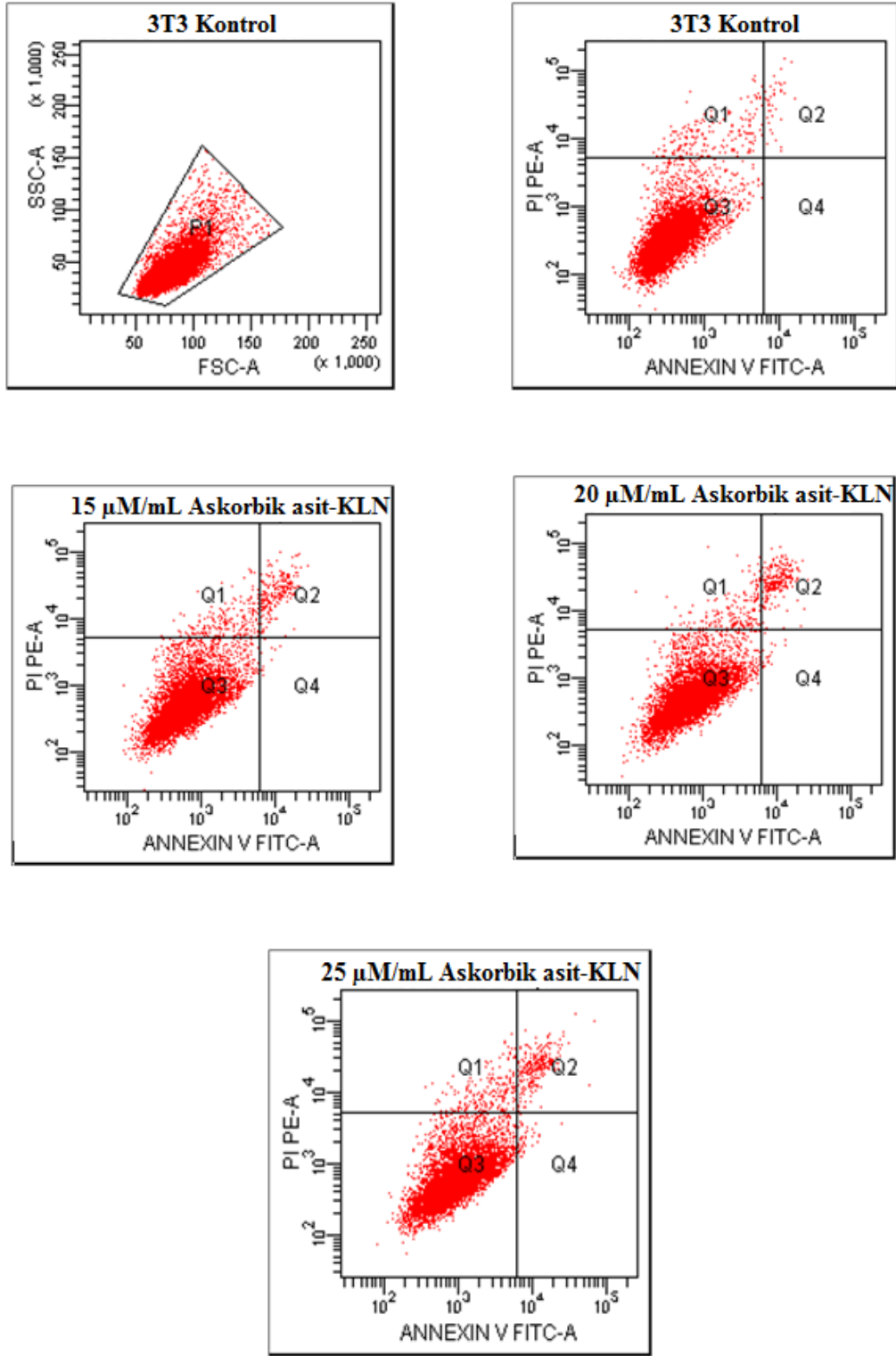
72 Saat	Q1(%)	Q2(%)	Q3(%)	Q4(%)
Kontrol	2.1	0.7	97.2	0.0
15 µM/mL	2.7	4.9	92.1	0.2
20 µM/mL	2.5	7.0	89.7	0.8
25 µM/mL	3.2	7.7	88.1	1.0



Şekil 3.14. Askorbik asit yüklü KLN'in uygulandığı NIH/3T3 hücrelerinde, Annexin V FITC değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 24 saatlik histogramları (Q1=% Nekroz, Q2= % Erken Apoptoz, Q3= % Canlılık Q4= % Geç Apoptoz)



Şekil 3.15. Askorbik asit yüklü KLN'in uygulandığı NIH/3T3 hücrelerinde, Annexin V FITC değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 48 saatlik histogramları (Q1=% Nekroz, Q2= % Erken Apoptoz, Q3= % Canlılık Q4= % Geç Apoptoz)



Şekil 3.16. Askorbik asit yüklü KLN'in uygulandığı NIH/3T3 hücrelerinde, Annexin V FITC değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 72 saatlik histogramları (Q1=% Nekroz, Q2= % Erken Apoptoz, Q3= % Canlılık Q4= % Geç Apoptoz)

3.3. Askorbik Asidin Miktar Tayininin Değerlendirilmesi

Bölüm 2.2.3.1’de açıklandığı gibi, askorbik asit 10 mM/mL derişimindeki ana stok çözeltisinden hareketle 50, 100, 500, 1000 ve 2000 µM/mL derişiminde seyreltmeler yapılmıştır. Kalibrasyon derişimleri ölçümü hedeflenen nanopartikül formülasyonlarındaki askorbik asidin içeriği ve örneği analize hazırlama işlemleri öngörülerek belirlenmiştir. Üçer set halinde hazırlanan kalibrasyon noktaları derişimlerin pik normalizasyonlarına karşı doğrusal regresyonunun yapılması sonucunda elde edilen doğru denklemi $y = 9.39x - 33.25$ fonksiyonun tanımlayıcılık katsayısı da 0.9998 bulunmuştur (n=6). Sonuç olarak kullanılan analitik yöntemin 50-2000 µM/mL konsantrasyon aralığında doğrusallığı gösterilmiştir.

Askorbik asidin hazırlanan 3 farklı konsantrasyonu 3’er kere YPSK’ya enjekte edilerek, her konsantrasyona karşılık gelen normalizasyon değerleri hesaplanmıştır. Hesaplanan değerler kalibrasyon denkleminde yerine konarak elde edilen % geri kazanım değerleri Çizelge 3.17’de verilmiştir. Yöntemin yüzde geri kazanım değerleri %93’ten büyük bulunmuştur, buda yöntemin doğruluk derecesini göstermektedir.

Ayrıca yöntemler bölümünde anlatıldığı üzere, YPSK yönteminin kesinlik ölçümleri yapılmıştır. Kesinlik çalışmalarına ait Çizelge 20’de verilen sonuçlara göre; BSS <%2 olarak bulunduğu için kesinlik sonuçları uygundur. Saptama sınırı (LOD) ve ölçüm sınırı (LOQ) değerleri de hesaplanmıştır. LOD= 2,356 LOQ=7,064 olarak bulunmuştur. Hesaplanan yöntemin LOD ve LOQ değerleri askorbik asidin miktar tayini ve askorbik asit yüklü KLN’in salım özellikleri için yeterlidir.

Çizelge 3.17. Askorbik asidin BSS ve % geri kazanım değerlerinin verilmesi

n=3 Derişim ($\mu\text{M}/\text{mL}$)	Gün içi			Günler Arası, k=3		
	Ölçülen derişim	BSS*	%Geri kazanım**	Ölçülen derişim	BSS	%Geri kazanım
100	9.38	1,80	93.82	9.74	1.42	97.35
500	48.69	1,22	97.39	48.08	1.28	96.16
2000	189.92	0,09	94.96	195.25	1.20	97.63

* Kesinlik ** Doğruluk BSS= Bağlı Standart Sapma

3.4. Askorbik Asit Yüklenmiş KLN'in Karakterizasyonunun Değerlendirilmesi

3.4.1. Zeta Potansiyel ve Partikül Boyutları

Askorbik asit ve üretilen askorbik asit yüklü KLN'ler, partikül büyüklüğü ve polidisperslik indisi açısından, Zetasizer ile oda sıcaklığında, 90°'lik açı ile değerlendirildi (n=3). Örnekler değerlendirmeden önce filtre edilmiş, 2.5 mL bidistile su (pH=7) ile seyreltilmiştir. Parçacık büyüklüğü dağılımını değerlendirmek için ayrıca 0-1 arasında değerler alan polidisperslik indisi verileri de kullanılmıştır. Sıfıra yakın değerlerin homojen dağılımı gösterdiği polidisperslik indisi verileri değerlendirildiğinde, askorbik asit yüklü KLN'in yaklaşık 0.400 gibi düşük değerler alarak homojen bir dağılıma sahip olduğu gösterilmiştir (Çizelge 21).

Zeta potansiyel, kolloidal dispersiyonların kararlılığı hakkında bilgi vermektedir. Partiküllerin kinetik enerjileri potansiyel enerjiyi aşarsa, partiküller birbirine yaklaşır ve topaklanma meydana gelir. Bundan dolayı zeta potansiyelin belirli bir değer altında olması gerekir (± 30 mV). Askorbik asit yüklü KLN'in zeta potansiyellerine baktığımızda; yaklaşık olarak -25 mV olarak bulunmuştur (Çizelge 3.18). Zeta potansiyelin ne kadar düşük olursa sistem o kadar kararlı olur. Sonuç olarak; askorbik asit yüklü KLN, askorbik aside göre hem boyut olarak daha küçük hem de zeta potansiyel değerlerinden dolayı daha kararlı olduğu bulunmuştur.

Çizelge 3.18. Askorbik asit ve askorbik asit yüklü KLN'in partikül boyutları, PI ve zeta potansiyellerinin karşılaştırılması

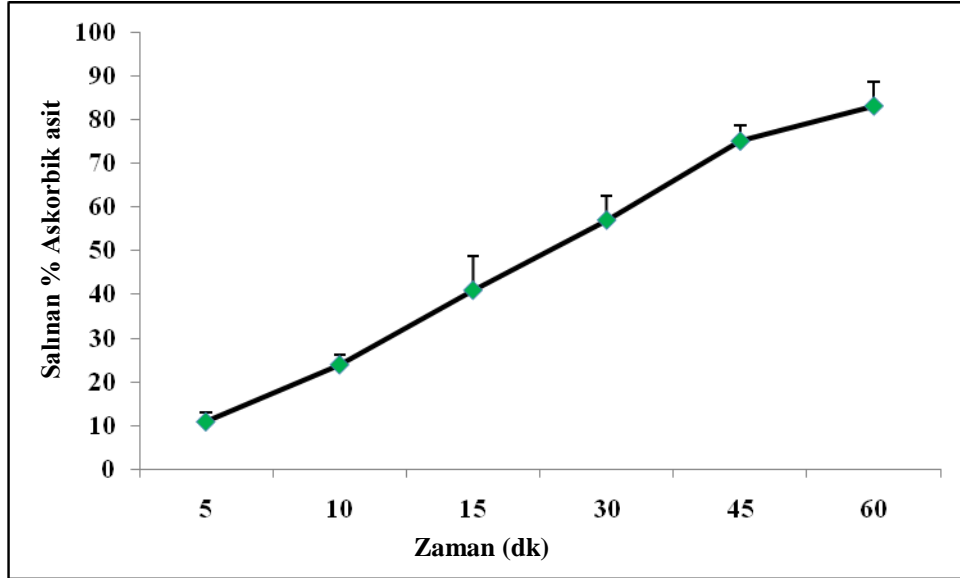
	Partikül Boyutu (nm)	Polydispers indisi (PI)	Zeta Potansiyel (mV)	Zeta Potansiyel (mV) (3.ay)
Askorbik asit	725,5	0,584	2,95	3,11
	652,5	0,478	3,09	3,42
	638,4	0,545	2,4	2,71
Askorbik asit yüklü KLN	213	0,377	-24	-21
	202,4	0,321	-19,5	-20,2
	225,5	0,387	-25,4	-26,1
Boş KLN	170,7	0,399	-16,5	-18,3
	160,4	0,369	-15,4	-14,7
	155,5	0,379	-17,8	-19,6

3.4.2. Etken Madde Yükleme Etkinliği

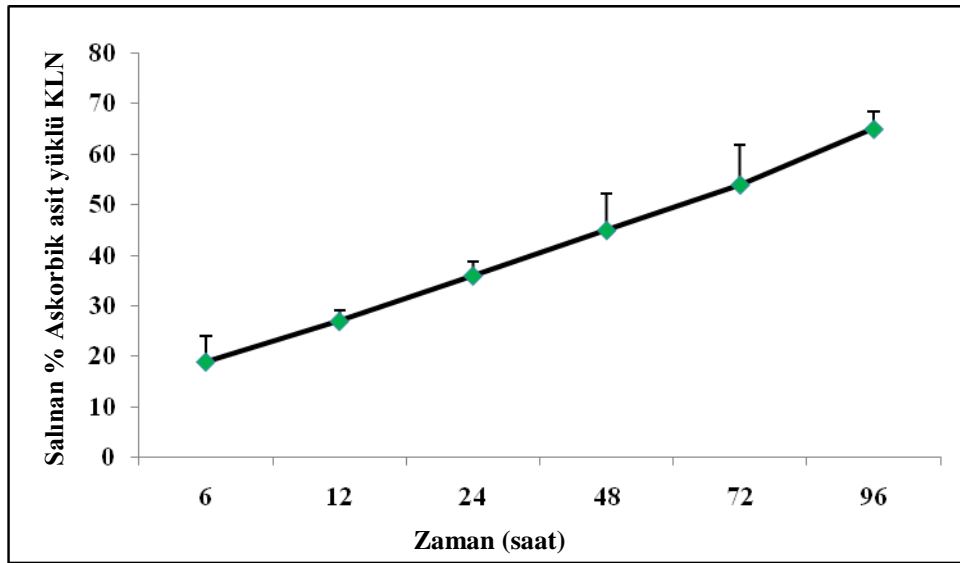
Askorbik asit yüklü KLN'in etken madde yükleme kapasitesine bakıldığında yöntemler kısmında verilen formüle göre hesaplandığında %90 olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak; askorbik asit yüklü KLN'in etken madde yükleme kapasitesi yüksek olduğu için uzun süre salım yapabilme kapasitesine sahip olduğu ve sıcak homojenizasyon tekniği ile üretilen bu nanopartiküllerin başarılı bir şekilde üretilip, yüksek oranda madde hapsettiği bulunmuştur.

3.4.3. İlaç Salımının Belirlenmesi

Elde edilen pik şiddetine göre salıverilen askorbik asit miktarı doğru denklemi kullanılarak hesaplanmıştır. Salım bulguları zamana karşı yüzde salım grafiğine geçirildiğinde; askorbik asidin 1 saatte neredeyse tamamen salındığı görülürken (Şekil 3.17), askorbik asit yüklü KLN'in en fazla %65 askorbik asiti salım yaptığı bulunmuştur (Şekil 3.18). Sonuç olarak; askorbik asit yüklü KLN kontrollü salım yaptığı ve askorbik asite göre salım süresinin daha uzun sürdüğü bulunmuştur. Ayrıca bekleme esnasında (3 ay) formülasyonlarda herhangi agregasyon olmaması ve zeta potansiyellerinin değişmemesi, hazırlanan KLN'in kararlı bir formülasyon olduğunu da göstermektedir.



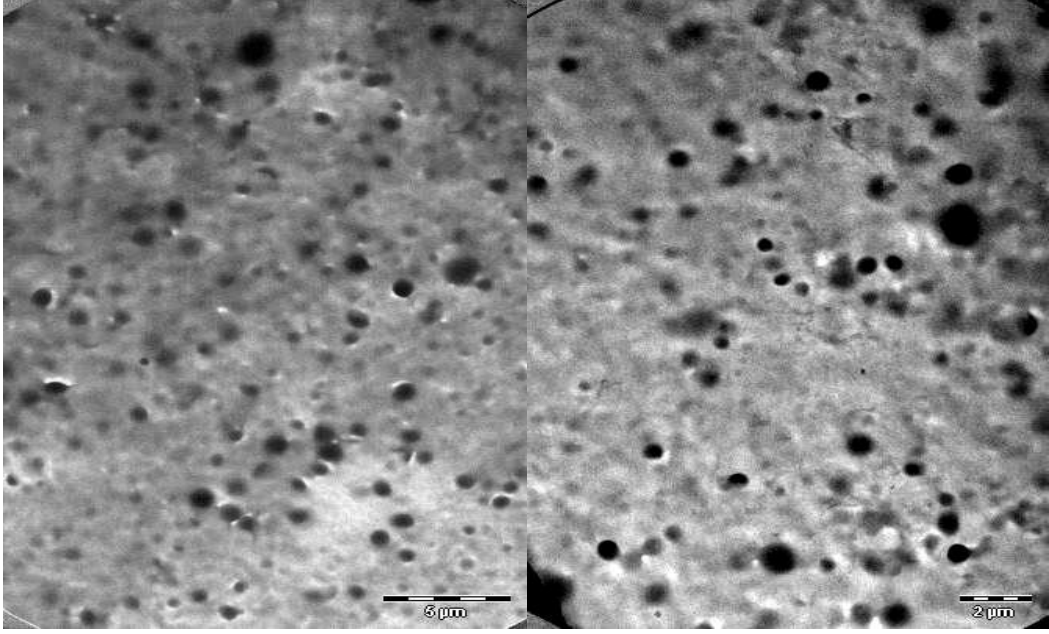
Şekil 3.17. Askorbik asidin zamana bağlı salım grafiği (pH 6.8)



Şekil 3.18. Askorbik asit yüklü KLN'in zamana bağlı salım grafiği (pH 6.8)

3.4.4. Yüzey Morfolojisinin TEM ile İncelenmesi

Askorbik asit yüklü KLN'in yüzey morfolojisi TEM ile belirlenmiştir. Elde edilen görüntüler, KLN formülasyonunun küresel şekilde ve mikronaltı boyutta olduğunu göstermiştir (Şekil 3.19).

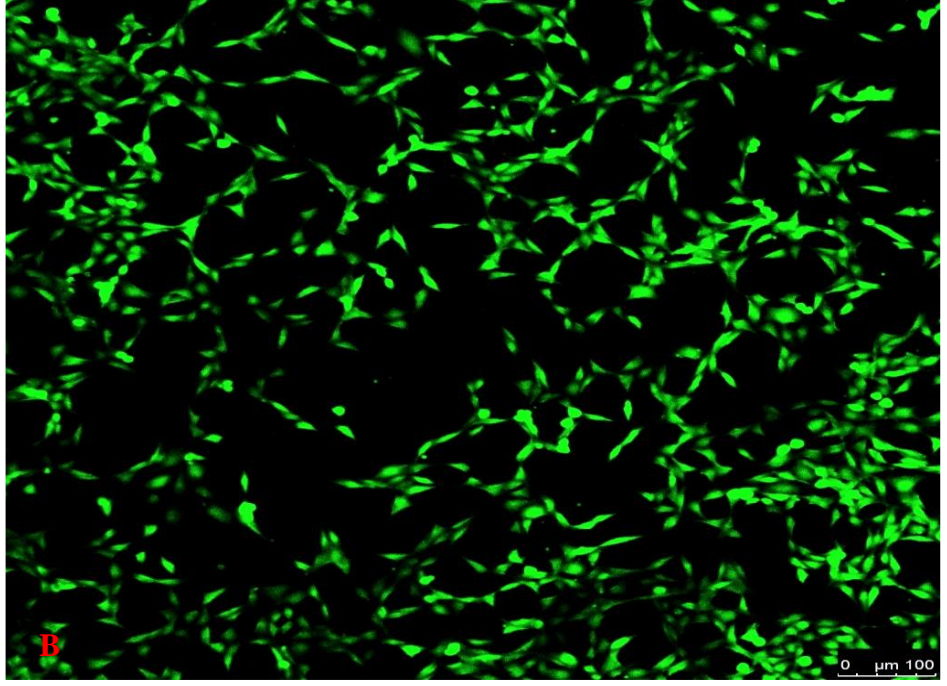
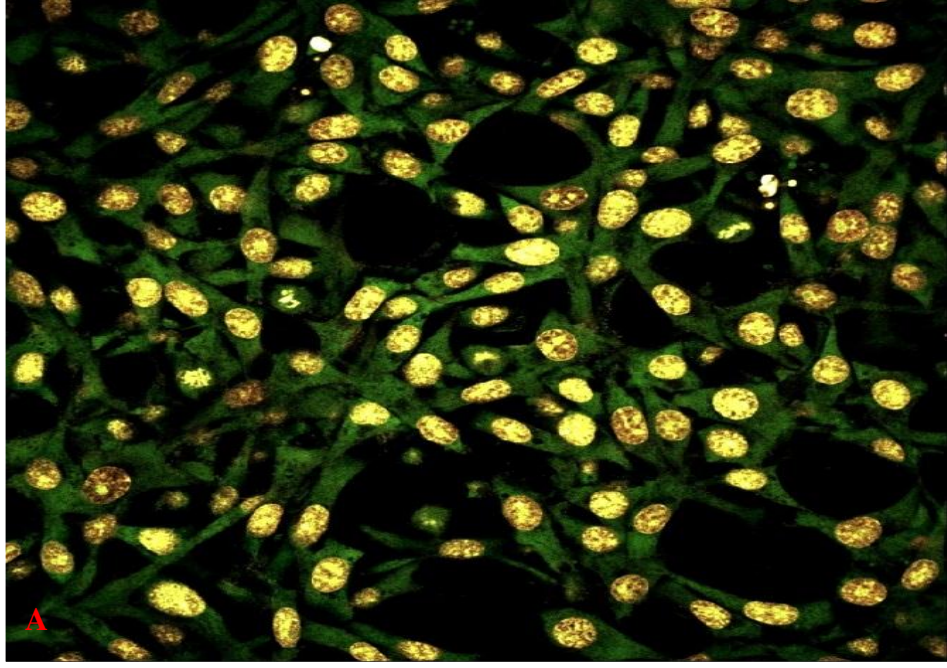


Şekil 3.19. Askorbik asit yüklü KLN'in TEM görüntüleri

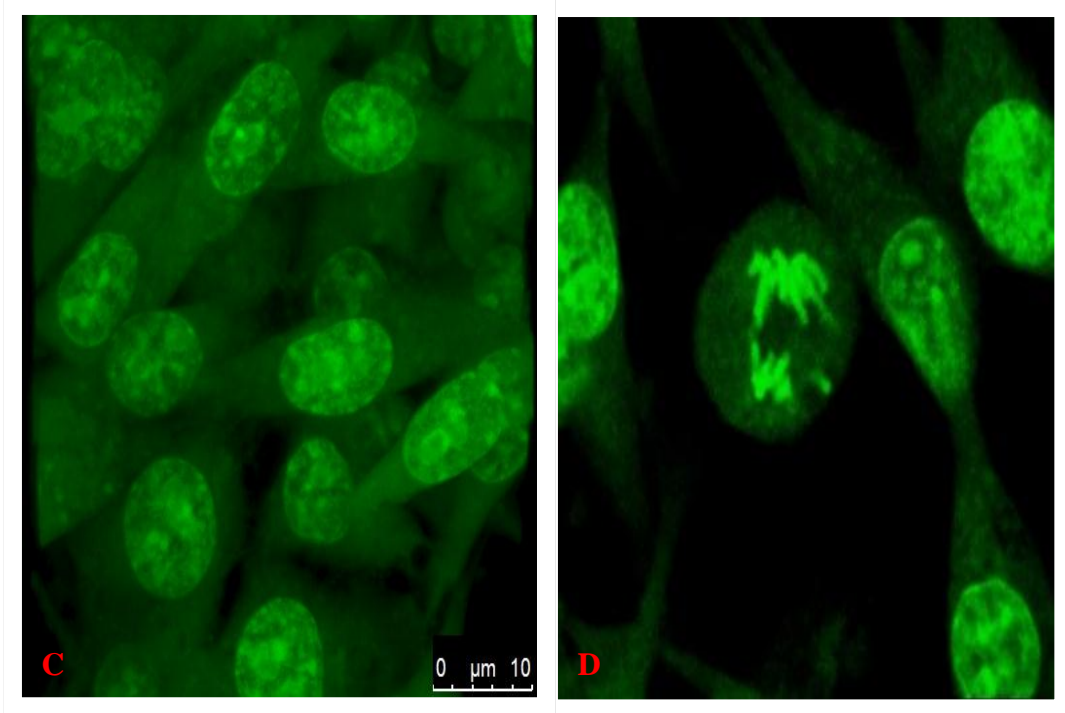
3.5. Konfokal Mikroskop ile Yapısal Değişikliklerin Görüntülenmesi

5RP7 hücreleri (Şekil 3.20) ve kontrol gurubu olan NIH/3T3 hücrelerinin (Şekil 3.23) genel morfolojik yapısına konfokal mikroskobu ile bakıldığında, hücrelerin, hücreler arası bağlantıların ve çekirdeğin düzgün morfolojik yapıya sahip olduğu gözlemlenmiştir. Askorbik asit uygulanan 5RP7 hücrelerinde oluşan yapısal değişikliklere bakıldığında; askorbik asidin genel olarak hücre membranında toplandığını fakat hücrelere genel olarak yapısal bir hasar vermediği görülmüştür (Şekil 3.21). Hücrelerin çekirdek morfolojisi düzgün yapıdadır. Askorbik asit yüklü KLN uygulanan 5RP7 hücrelerini incelediğimizde ise; bu hücre hattında belirgin bir şekilde hücrelerde boşluklar, hücreler arası bağlantılarda kopmalar, çekirdekte deformasyonlar ve apoptotik cisimciklerin oluşumları görülmüştür. Ayrıca nanopartiküllerin hücrenin sitoplazmasına yayılarak belirgin bir hasar verdiği gözlemlenmiştir (Şekil 3.22).

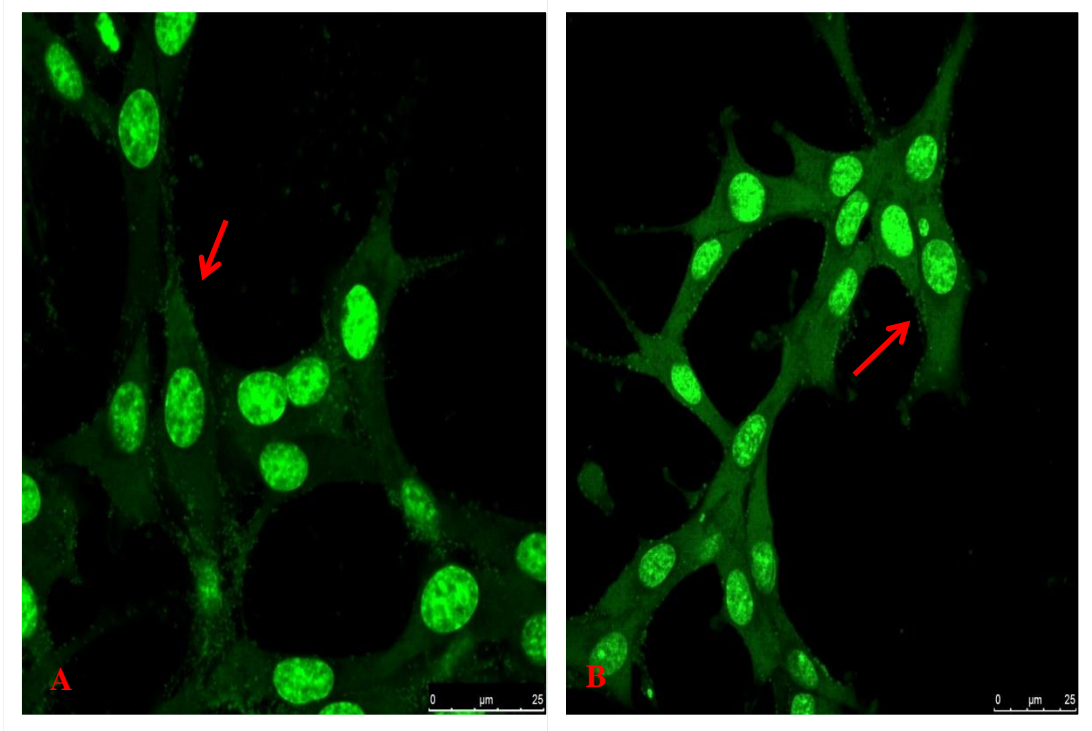
Askorbik asit (Şekil 3.24) ve askorbik asit yüklü KLN'in uygulandığı (Şekil 3.25) NIH/3T3 hücre hattındaki yapısal değişiklikleri incelendiğinde; genel olarak hücrelerin morfolojisi normal görülmektedir. Ancak bazı hücrelerde az da olsa hasar gözlemlenmiştir. Fakat genel olarak baktığımızda, 5RP7 hücrelerine uygulanan askorbik asit ve askorbik asit yüklü KLN ile kıyaslandığında ihmal edilebilir derecede az bir hasar vardır.



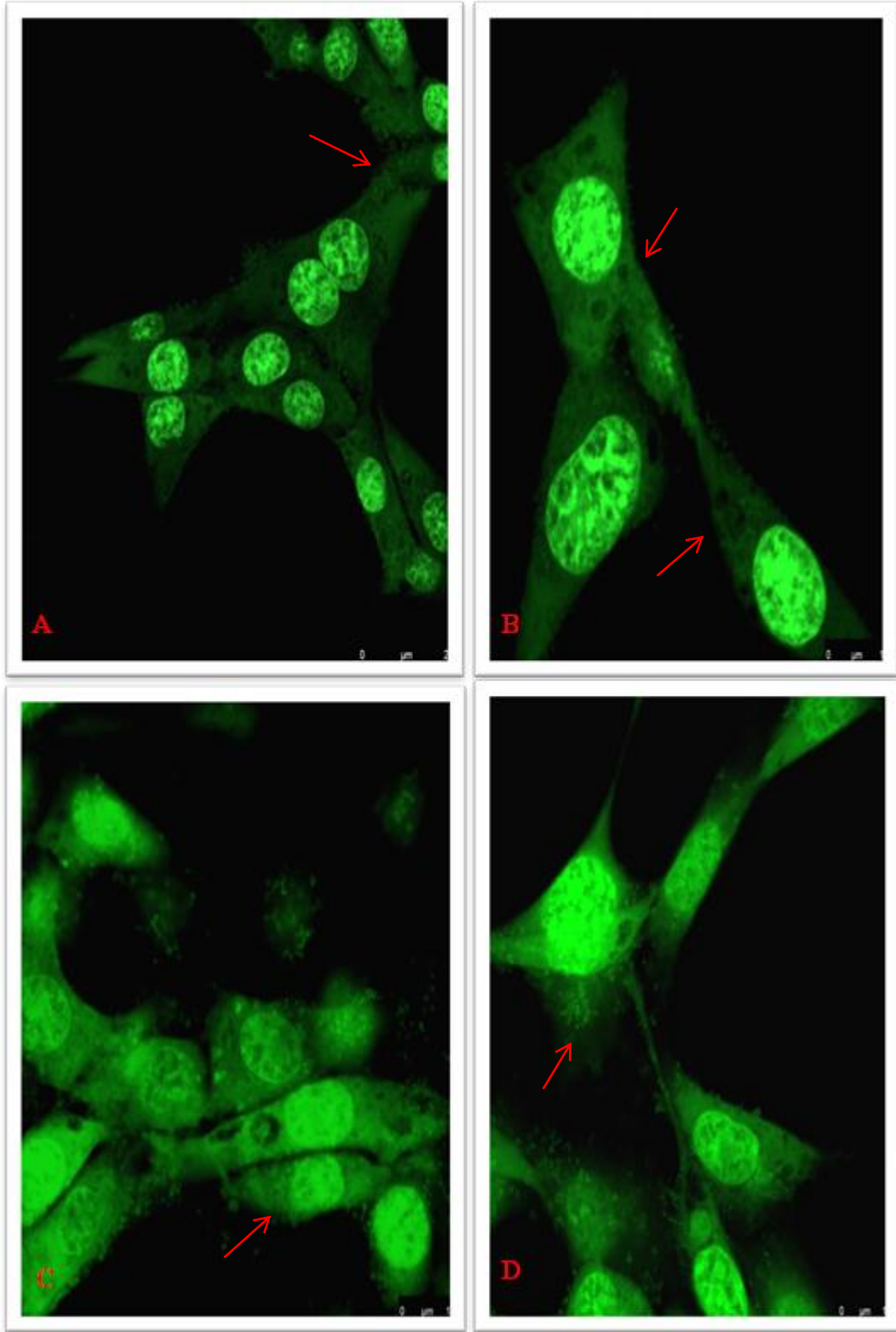
Şekil 3.20. 5RP7 hücrelerinin genel morfolojik yapısının konfokal mikroskobu ile görüntülenmesi



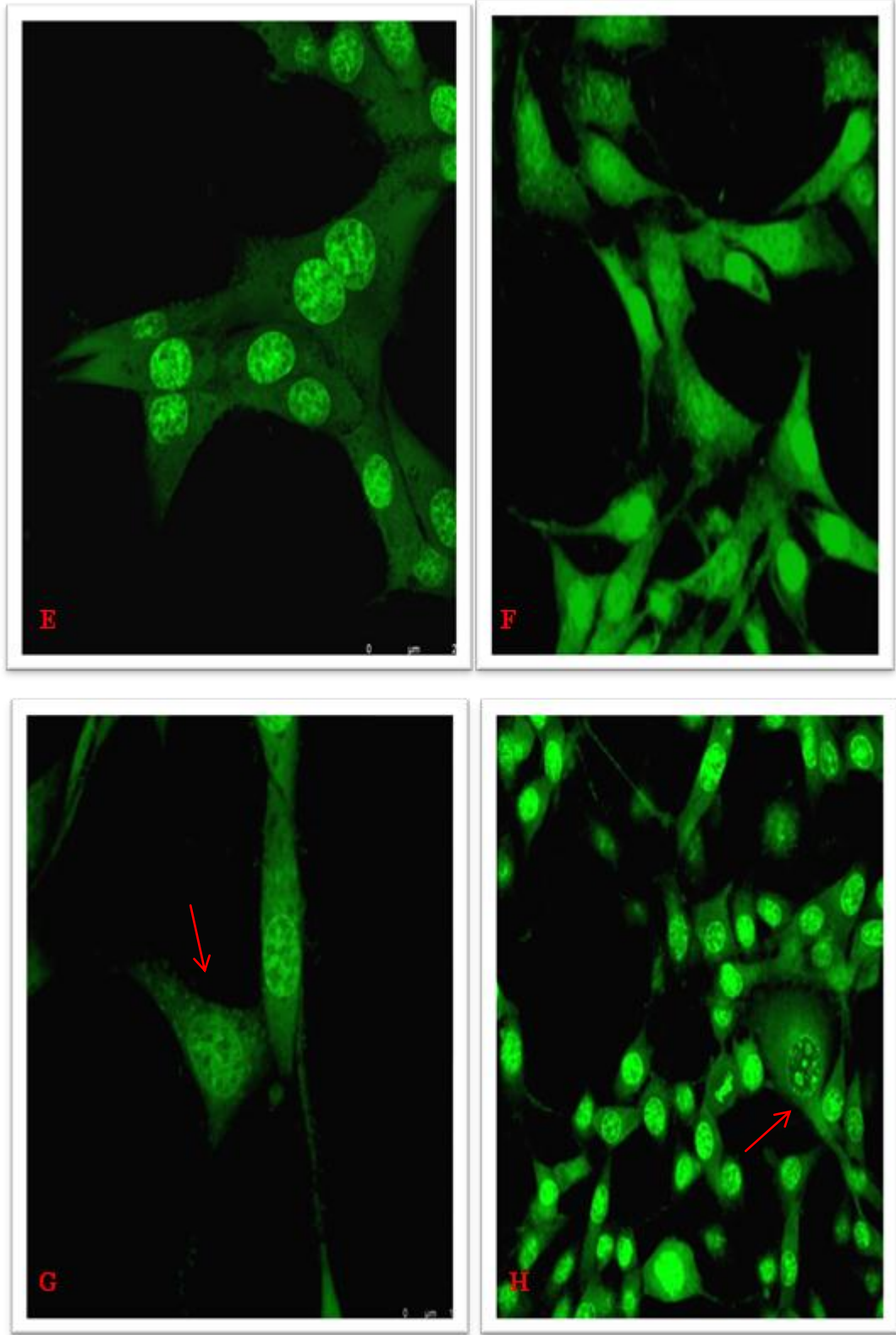
Şekil 3.20. (Devam) 5RP7 hücrelerinin genel morfolojik yapısının konfokal mikroskobu ile görüntülenmesi



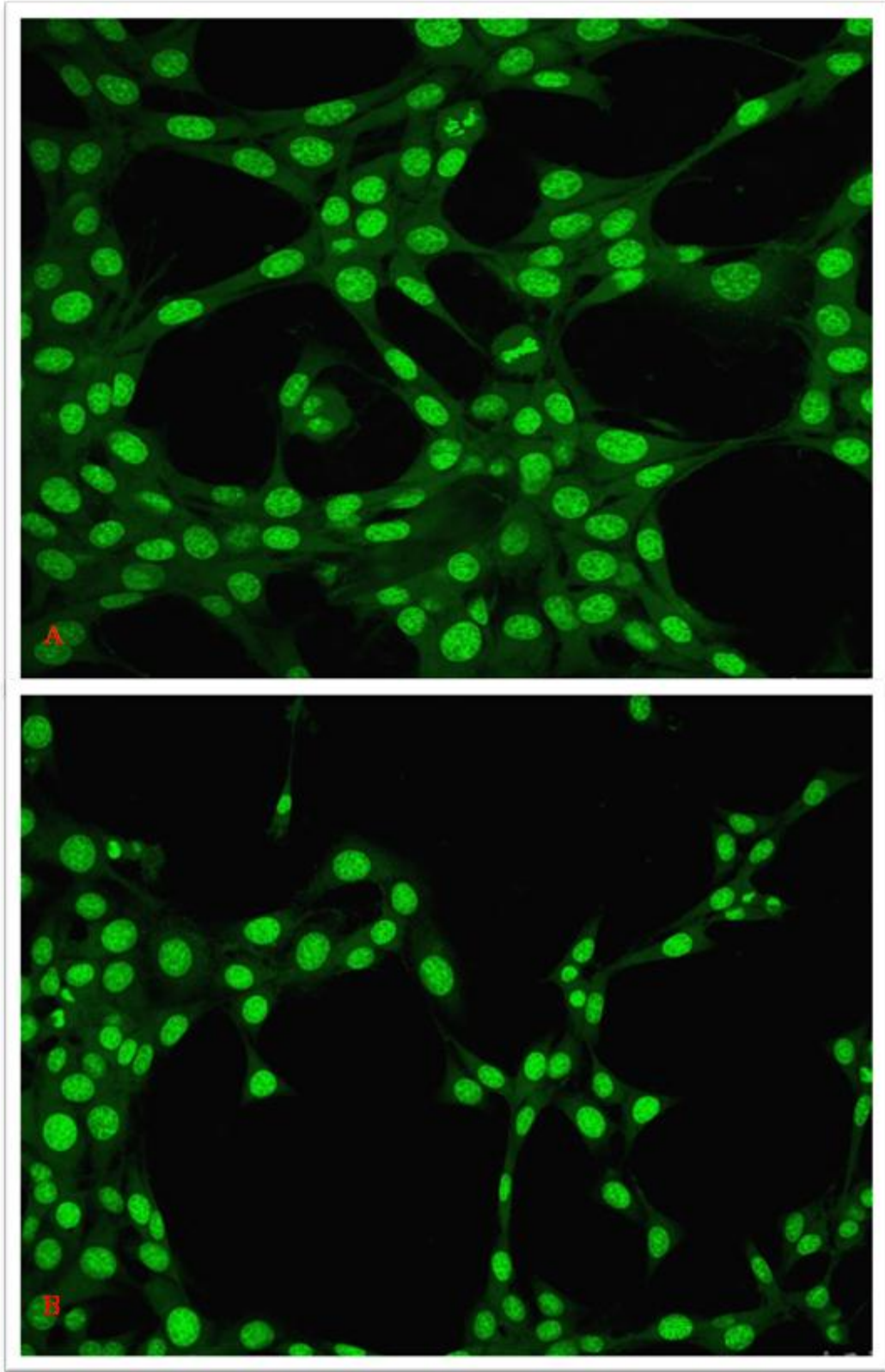
Şekil 3.21. Askorbik asidin uygulandığı 5RP7 hücrelerinde oluşan yapısal değişikliklerin konfokal mikroskobu ile görüntülenmesi → Askorbik asit



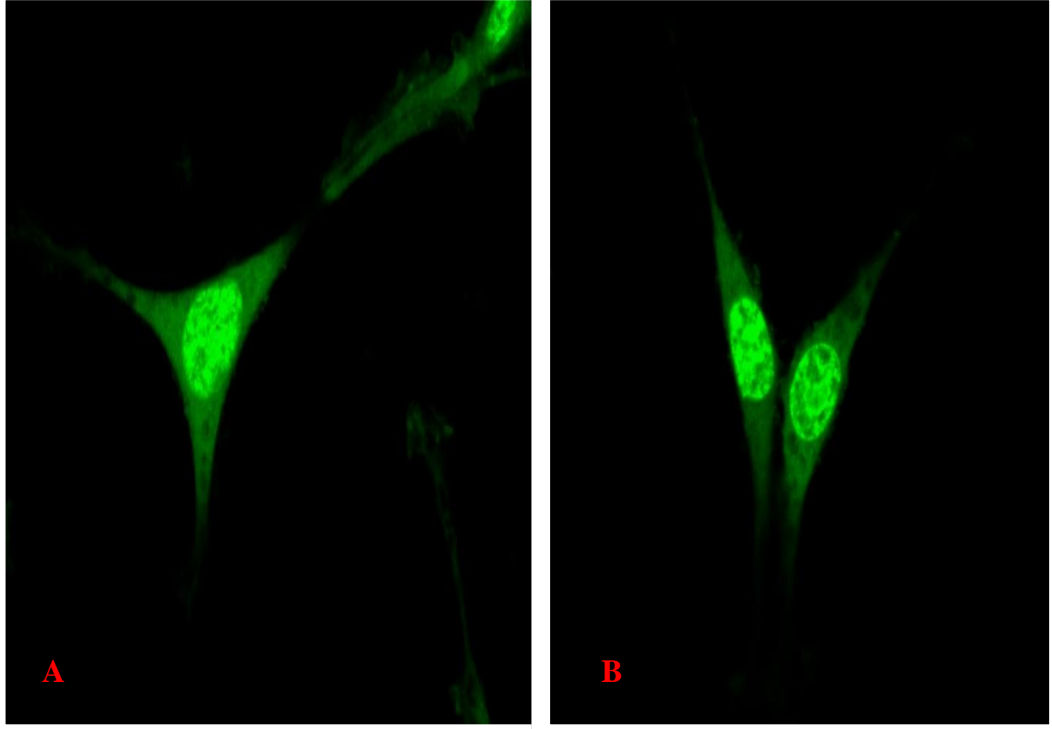
Şekil 3.22. Askorbik asit yüklü KLN'in uygulandığı 5RP7 hücrelerinde oluşan yapısal değişikliklerin konfokal mikroskobu ile görüntülenmesi → Askorbik asit yüklü KLN ve hücrelerde oluşan boşluklar



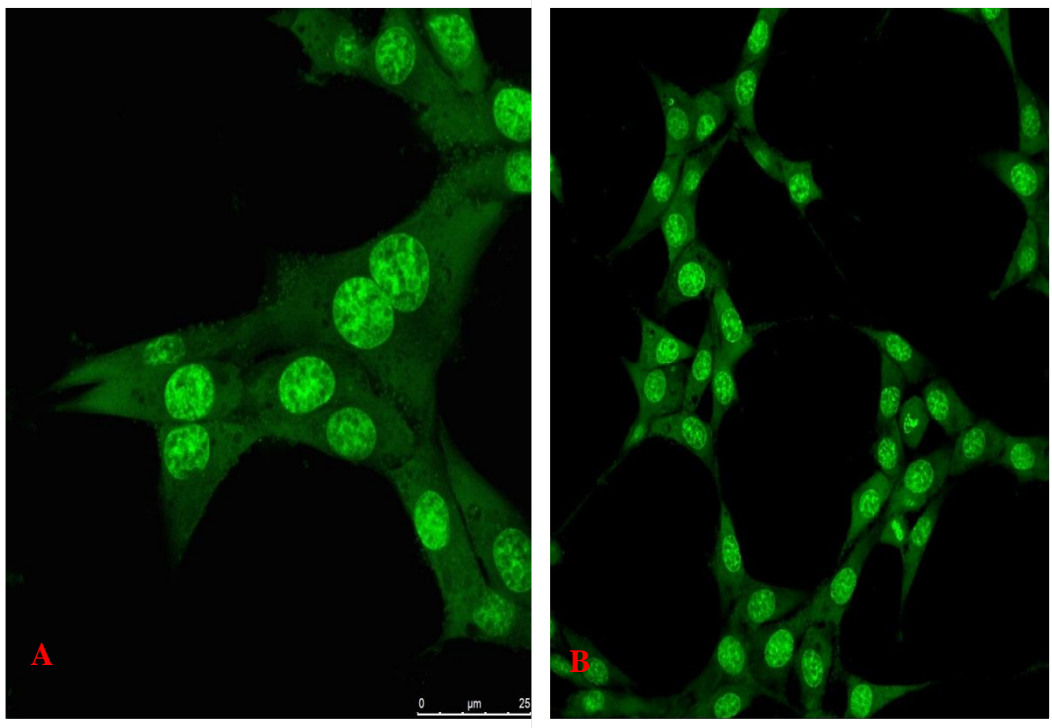
Şekil 3.22. (Devam) Askorbik asit yüklü KLN'in uygulandığı 5RP7 hücrelerinde oluşan yapısal değişikliklerin konfokal mikroskobu ile görüntülenmesi



Şekil 3.23. NIH/3T3 hücrelerinin genel morfolojik yapısının konfokal mikroskobu ile görüntülenmesi



Şekil 3.24. Askorbik asidin uygulandığı NIH/3T3 hücrelerinde oluşan yapısal değişikliklerin konfokal mikroskobu ile görüntülenmesi

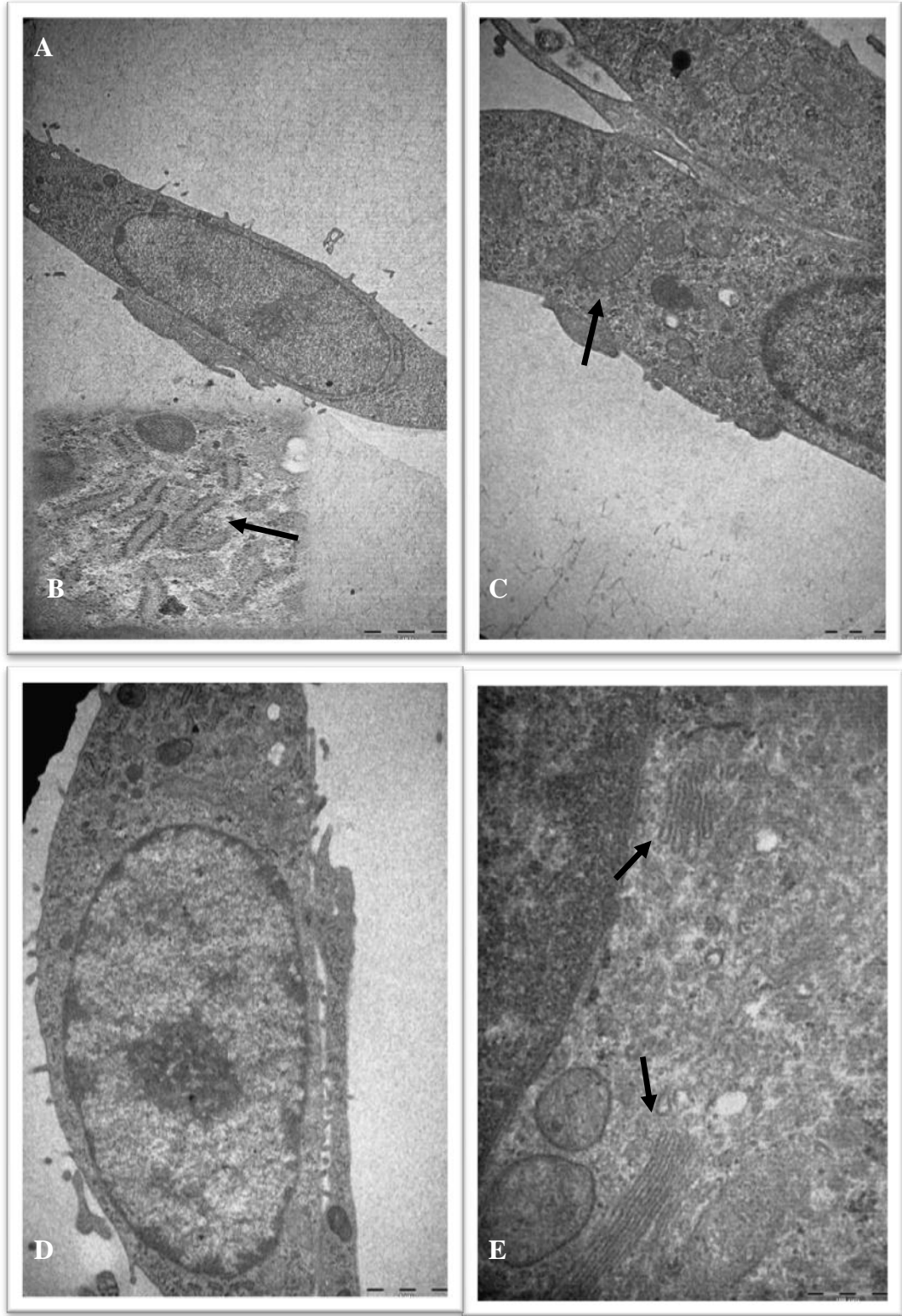


Şekil 3.25. Askorbik asit yüklü KLN'in uygulandığı NIH/3T3 hücrelerinde oluşan yapısal değişikliklerin konfokal mikroskobu ile görüntülenmesi

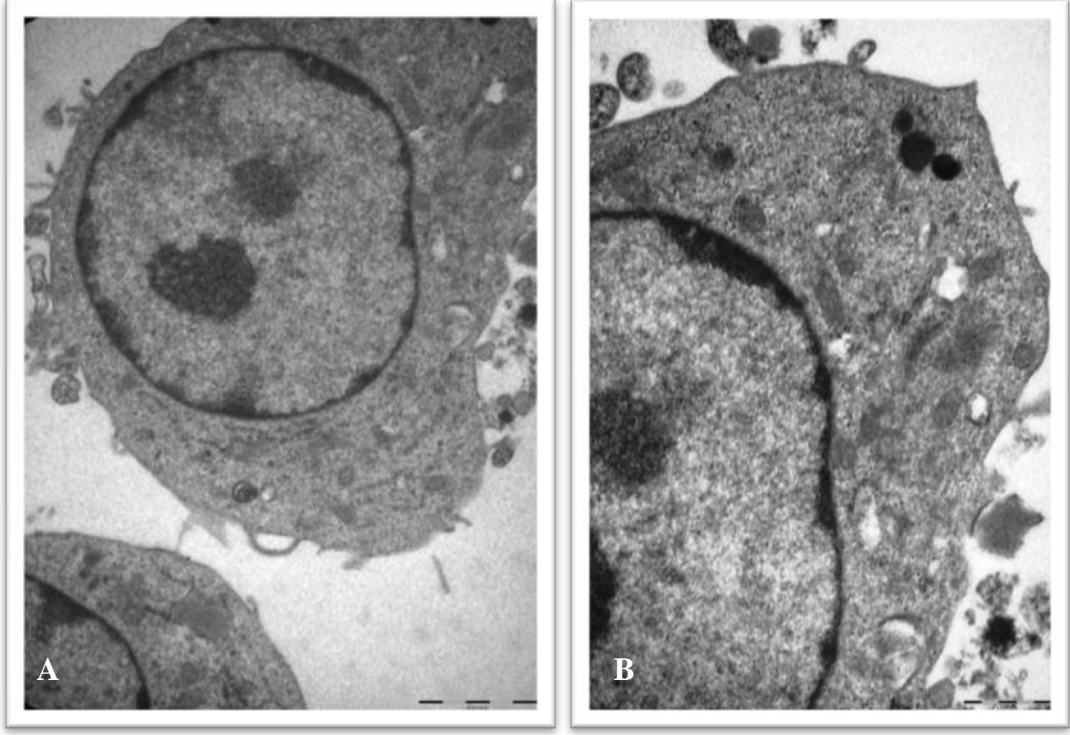
3.6. TEM ile İnce Yapısal Değişikliklerin Görüntülenmesi

5RP7 hücreleri (Şekil 3.26) ve kontrol grubu olan NIH/3T3 hücrelerini (Şekil 3.29) TEM ile incelediğimizde; hücrelerin normal hücre yapısına sahip olduğu ve herhangi bir morfolojik hasar olmadığı gözlemlenmiştir. Bu hücre hatlarından alınan ince yapısal kesitlerde; hücrelerin sağlam bir hücre zarı ve çekirdek zarı sahip olduğu, hücrelerin bütünlüğünü koruduğu, mitokondri, golgi ve endoplazmik retikulum gibi hücre organellerinde hiçbir yapısal bozukluk olmadığı görülmüştür (Şekil 3.26 (B), (E)). Askorbik asitin uygulandığı 5RP7 hücrelerini incelediğimizde (Şekil 3.27), kontrol görüntülerine yakın görüntüler elde edilmiştir. Fakat çok az hasar tespit edilmiştir. Apoptozun morfolojik özelliklerinden biri olan apoptotik cisimcikler oluşumları tespit edilmiş, ayrıca otofajik vakuol ve lizozom miktarında artış gözlemlenmiştir. Hücre içerisinde yer yer boşluklar oluşmuştur (Şekil 3.27 (B)). Askorbik asit yüklü KLN'in uygulandığı 5RP7 hücrelerini incelediğimizde ise, kontrol grubuna göre hücrenin morfolojisi belirgin bir şekilde yuvarlaklaşmıştır (Şekil 3.28 (B)). Askorbik asit uygulanan 5RP7 hücrelerine göre lizozom miktarında daha fazla artış görülmüştür (Şekil 3.28 (A)). Hücre organellerinde (mitokondri, ER) yapısal hasarlar gözlemlenmiştir. Ayrıca nekrozise giden hücreler de tespit edilmiştir. Alınan ince kesitlerde, askorbik asit yüklü KLN'in hücreye girişi görüntülenmiştir (Şekil 3.28 (C), (D)).

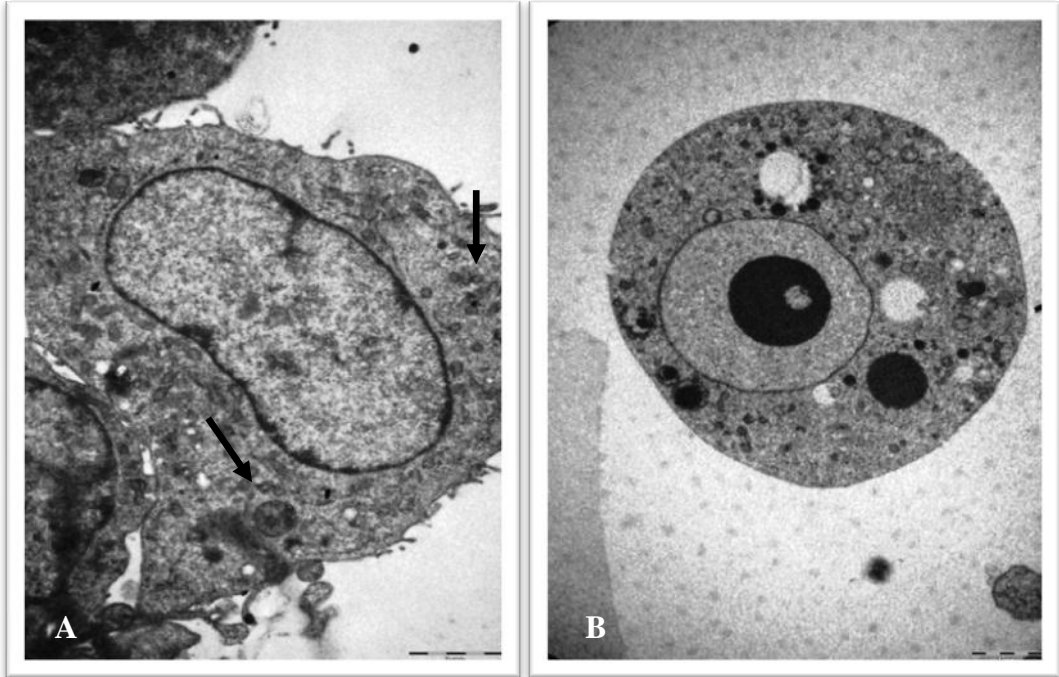
Askorbik asit ve askorbik asit yüklü KLN uygulanan NIH/3T3 hücrelerine baktığımızda, bu hücre hattında herhangi bir yapısal bozukluk gözlemlenmemiştir (Şekil 3.30, 3.31). Fakat bazı hücrelerde az miktarda da olsa deformasyonlar ve bazı hücrel boşluk oluşumları gözlemlenmiştir.



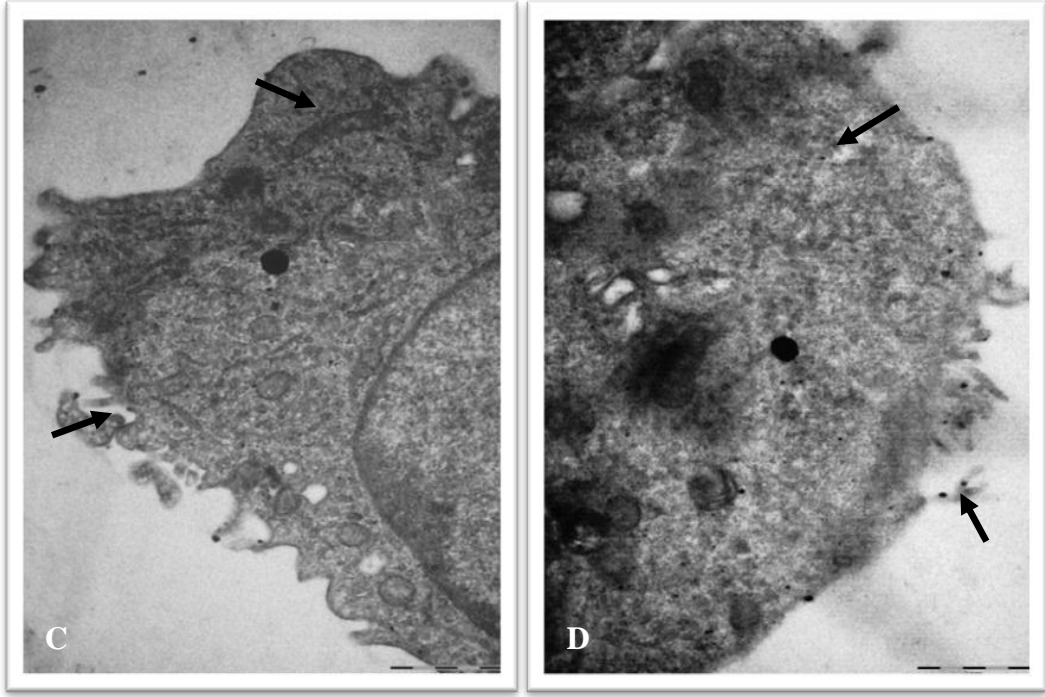
Şekil 3.26. SRP7 hücrelerinin TEM ile görüntülenmesi. (A) X8200 (B) X87000 → Granüllü endoplazmik retikulum (C) X26500 → Mitokondri (D) X16500 (E) X87000 → Endoplazmik retikulum ve golgi aparatı



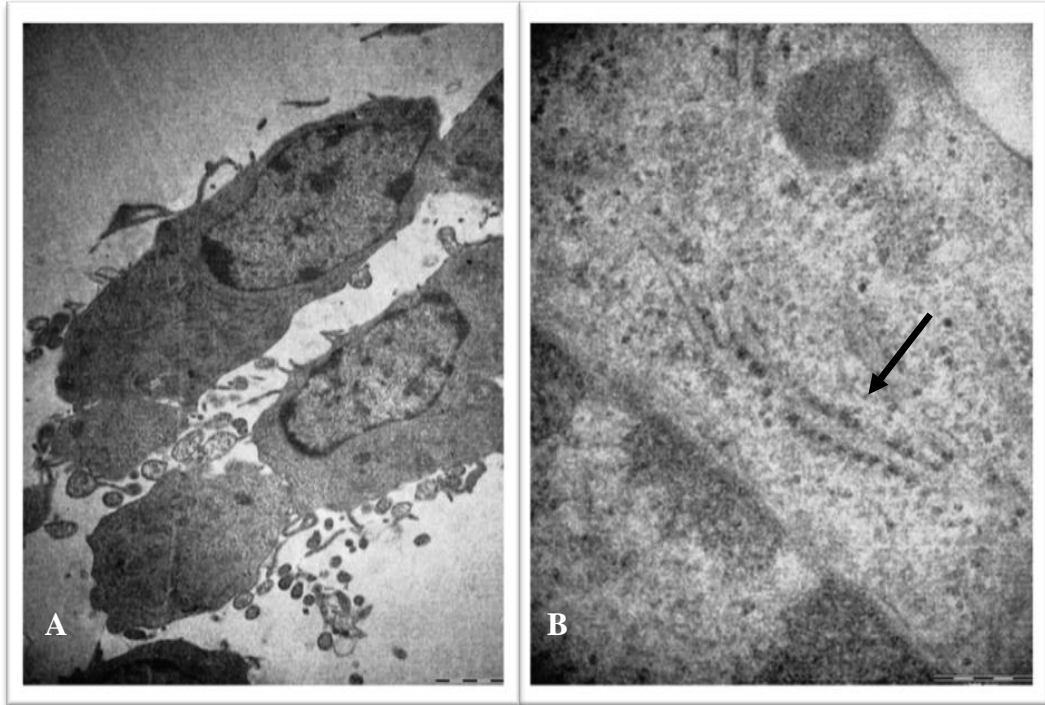
Şekil 3.27. Askorbik asidin uygulandığı 5RP7 hücrelerinin TEM ile görüntülenmesi. (A) X9900 (B) X16500 → Boşluk ve kristalleri bozulmuş mitokondri



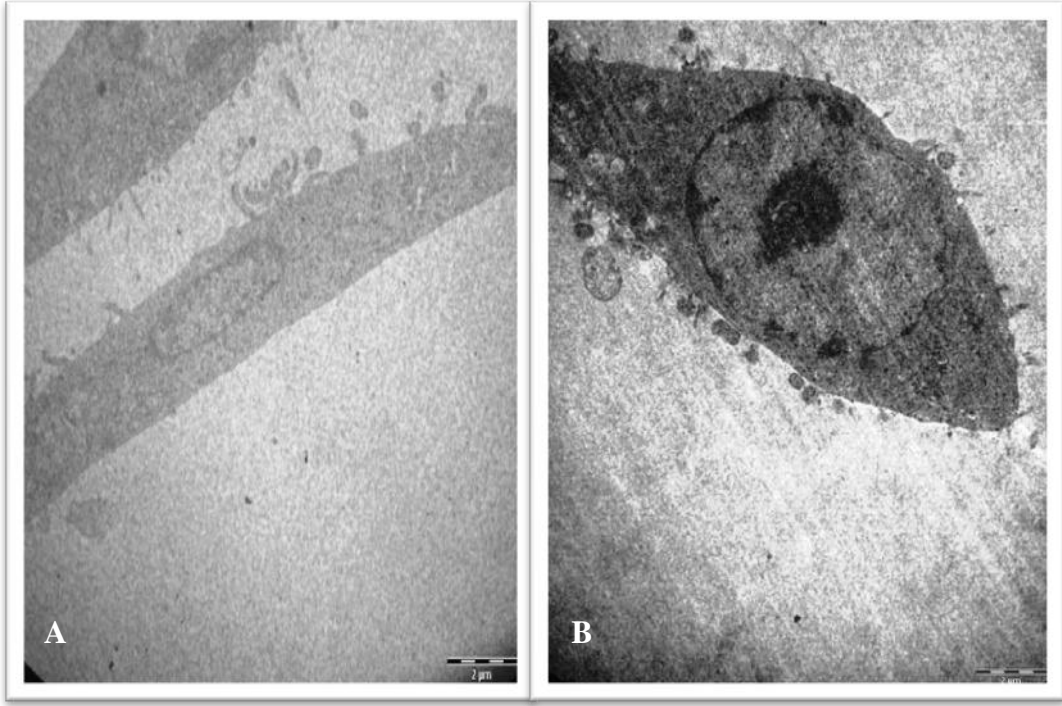
Şekil 3.28. Askorbik asit yüklü KLN'in uygulandığı 5RP7 hücrelerinin TEM ile görüntülenmesi. (A) X8200 → Sekonder lizozomlar (B) X6000



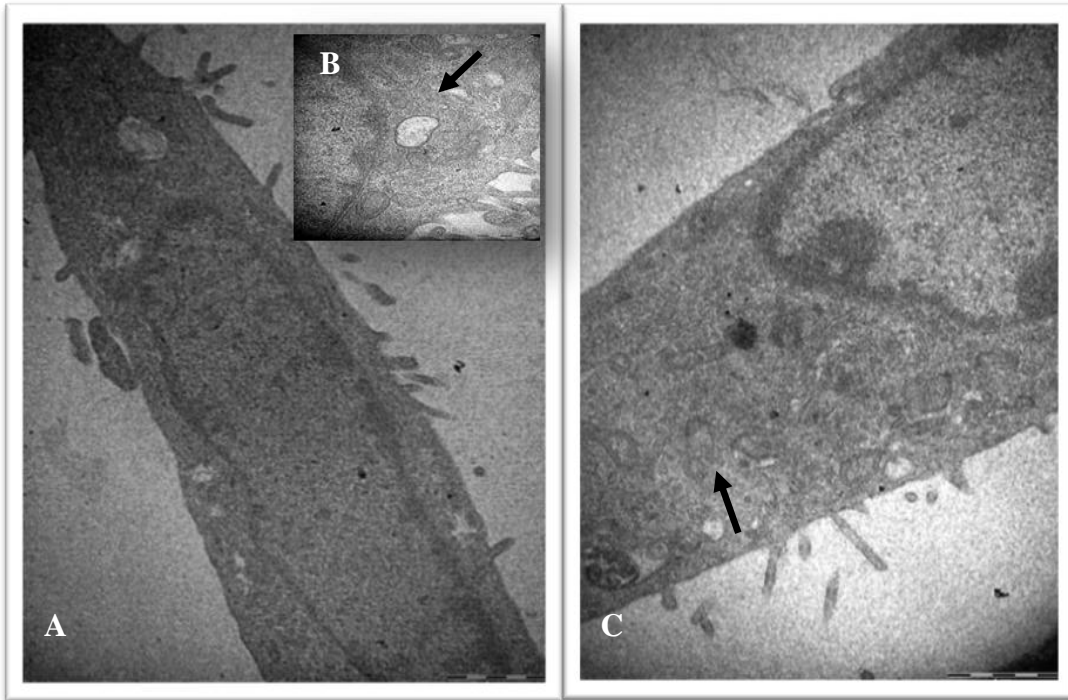
Şekil 3.28. (Devam) Askorbik asit yüklü KLN'in uygulandığı 5RP7 hücrelerinin TEM ile görüntülenmesi. (C) X20500 (D) X20500 → Askorbik asit yüklü KLN



Şekil 3.29. Kontrol grubu olan NIH/3T3 hücrelerinin TEM ile görüntülenmesi. (A) X6000 (B) X87000



Şekil 3.30. Askorbik asidin uygulandığı NIH/3T3 hücrelerinin TEM ile görüntülenmesi. (A) X6000 (B) X6000



Şekil 3.31. Askorbik asit yüklü KLN'in uygulandığı NIH/3T3 hücrelerinin TEM ile görüntülenmesi (A) X16500 (B) X20500 (C) X43000

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Günümüzde bilinen kanser tedavilerinde çeşitli sitotoksik ajanlar kullanılarak, çoğalan kanser hücrelerini yok etmek amaçlanmaktadır. Birçok antikanser ilacının, spesifik hücre özgülükleri olmayıp, toksisiteyi başlatıp vücut içinde tüm sistemlerde yan etkileri olduğu bilinmektedir. Bunun yanı sıra kanser çok geç aşamada teşhis edildiği için, fark edildiğinde çoktan vücudun diğer kısımlarına yayılmış durumda olmaktadır (Hanahan ve Weinberg, 2002; Hahn ve Weinberg, 2002; Nie ve ark., 2007).

Çalışmanın çeşitli noktalarında da belirtildiği gibi, son yıllarda kanseri tedavi etmeye yönelik farklı yaklaşımlar bilim insanları tarafından öne sürülmekte ve çalışılmaktadır. Bu çalışmaların bazıları incelendiğinde, kanserin tedavisinde vitaminlerin rolü büyük dikkat çekmektedir. Askorbik asit antioksidan özelliği iyi bilinen suda çözünen bir vitamindir. Literatürde askorbik asidin kanser hücreleri ve hastalarında etkilerini belirlemeye yönelik birçok çalışma yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda; askorbik asidin normal hücrelere zarar vermeden kanser hücreleri üzerinde toksik bir etkiye sahip olduğu, yüksek dozda intravenöz olarak uygulanan kanser hastalarında ise, hastaların belirli bir derecede de olsa ömrünü uzatıp, daha kaliteli yaşam sürmesini sağladığı tespit edilmiştir. Ayrıca kanser hücreleri üzerinde olan etkisinin mekanizması da açıklanmıştır (Cameron ve Campbell, 1974 ve 1991; Riordan ve ark., 1990; 1995; 2000; Padayatty ve Levine, 2000; 2004; 2006; Hoffer, ve ark., 2008).

Çalışmanın birinci kısmını oluşturan H-ras 5RP7 ve NIH/3T3 hücrelerinde askorbik asidin etkisine bakıldığında, yapılan MTT testi sonuçlarına göre, 5RP7 hücrelerinin zamana ve doza bağlı olarak canlılık yüzdesini azaltırken (Şekil 11), kontrol grubu olan NIH/3T3 hücrelerinde herhangi bir toksik etkisinin olmadığı bulunmuştur (Şekil 12). Ayrıca Annexin V- PI kiti uygulanarak askorbik asidin 5RP7 hücrelerinde apoptotik etkisine bakıldığında ise; MTT testinden elde edilen verileri destekleyici sonuçlar bulunmuştur (Şekil 13, 14 ve 15). Zaman ve doz arttıkça 5RP7 hücrelerinde hem sitotoksik hem de apoptotik etki artarken, NIH/3T3 hücrelerinde herhangi bir sitotoksik ve apoptotik etkinin olmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 16, 17 ve 18).

Nano boyutta araçlar anti kanser ilaçlarının hedefli taşınması için dizayn edilen nano yapılara dayalı nanopartiküler sistemlerin gelişmesine yol açmıştır. Bu nano yapılar kullanılarak normal hücrelere zarar vermeden kanserli hücrelere kemoterapik ajanların yüksek dozlarda hedeflenerek taşınması sağlanabilir. Nanopartiküler ilaç taşıma sistemlerinin kullanılmasıyla, antikanser ilaçlarının spesifik organ, doku ya da hücreye hedeflenmesi ile ilacın yan ve toksik etkilerinin azalması sağlanır ve kontrollü ilaç salımı ile ilacın terapötik etkisi artırılmış olur (Hughes, 2005; Wang ve ark., 2008; Rao ve ark. 2010).

Son yıllarda yapılan araştırmalar göstermiştir ki, KLN diğer koloidal taşıyıcı sistemlere alternatif bir ilaç taşıyıcı sistem olarak geliştirilen, diğer koloidal taşıyıcıların avantajlarını bir arada barındıran ve dezavantajlarını ortadan kaldıran bir ilaç taşıyıcı sistemdir. Sayısız avantajlara sahip olan KLN'e çeşitli antikanser ilaçları yüklenerek kanser hücrelerinin ilaçlara karşı olan direncin kırılması sağlanarak, ilacın aktif ya da pasif hedeflendirilmesiyle kanserli hücrelerde ilacın konsantrasyonunu artırılır. Böylece ilacın terapötik etkisi güçlendirilir ve normal hücrelerde neden olduğu toksik etkisi azaltılmış olur (Cavalli ve ark. 1999; Numanoğlu ve Tarımcı, 2006). Yapılan çalışmalarda, çeşitli antikanser özelliğe sahip maddeler (mitoksantron, tamoksifen, bütrat, doksorubisin vb.) KLN'e yüklenerek farklı kanser hücreleri hatlarında olan sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Sonuç olarak; serbest ilaca göre KLN'e yüklenen maddelerin daha etkin olduğu ve kanser tedavisinde alternatif bir sistem olarak kullanılabileceği bulunmuştur (Serpe ve ark., 2004; Lu ve ark., 2006; Lee ve ark., 2007; Alhaj ve ark 2008; Miglietta ve ark., 2010).

Çalışmanın ikinci kısmında güvenilir ve kolay bir hazırlama yöntemi olan sıcak homojenizasyon tekniği tercih edilerek askorbik asit yüklü KLN hazırlanmıştır. Hazırlanan bu formülasyonun kalitesini kontrol etmek için partikül boyutu ve zeta potansiyeli ölçülmüş, ayrıca yüzey morfolojisi TEM ile incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre hazırlanan nanopartikül formülasyonunun askorbik aside göre daha küçük boyuta sahip olduğu ve daha kararlı bir yapıda olduğu bulunmuştur (Çizelge 21). Ayrıca nanopartiküllerin küresel ve nano boyutları TEM ile fotoğraflanarak desteklenmiştir (Şekil 29).

Askorbik asidin YPSK ile tam validasyonu yapılarak askorbik asit yüklü KLN'in askorbik asidi yükleme etkinliği ve ilacı *in vitro* salımı belirlenmiştir. Yükleme ve *in vitro* salım çalışmaları, etken madde olarak kullanılan askorbik asidin KLN'e yüklenebileceğini ve askorbik asidin hazırlanan bu nanopartiküler sistemler aracılığı ile salınabileceğini göstermiştir (Şekil 28). Hazırlanmış olan askorbik asit yüklü KLN'in, askorbik asidin kan dolaşımındaki kalış süresini uzattığı ve *in vivo* stabilitesini artırdığı düşünülmektedir.

Askorbik asit yüklü KLN'in H-ras 5RP7 ve NIH/3T3 hücreleri üzerinde olan sitotoksik ve apoptotik etkisine baktığımızda ise; askorbik asit yüklü KLN'lerin 5RP7 hücre hattında hem sitotoksik hem de apoptotik etkiyi arttırırken (Şekil 19, 21, 22, 23), NIH/3T3 hücre hattında herhangi bir sitotoksik ve apoptotik etkisinin bulunmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 20, 24, 25, 26). Elde edilen veriler çalışmanın ilk kısmında yapılan askorbik asidin bu hücre hatları üzerinde olan etkileri ile karşılaştırıldığında, askorbik asit yüklü KLN'in askorbik aside göre hem apoptotik hemde sitotoksik etkisinin zamana ve doza bağlı olarak kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı bir şekilde arttığı bulunmuştur.

Çalışmanın son kısmında, hücre hatlarında olan yapısal ve ince yapısal değişiklikleri incelemek için TEM ve konfokal mikroskobundan faydalanılmıştır. H-ras 5RP7 hücrelerinde askorbik asit ile askorbik asit yüklü KLN'in neden olduğu yapısal ve ince yapısal değişiklikleri karşılaştırıldığında; nanopartikül formülasyonunun askorbik aside göre hücrelere daha çok zarar verdiği görülmüştür. Nanopartiküllerin uygulandığı hücrelerde; hücreler arası boşluklar, hücrelerin genel morfolojik yapısında bozukluklar, hücreler arası bağlantılarda kopmalar, hücrenin çekirdeğinde meydana gelen deformasyonlar (Şekil 32) ve alınan ince kesitlerde organel bazında değişiklikler gözlemlenmiştir (Şekil 38). Ayrıca hücrelerin apoptoza gittiği gözlemlenmektedir. NIH/3T3 hücrelerine uygulanan hem askorbik asit hem de askorbik asit yüklü KLN'in bu hücre hattında genel olarak bir hasar vermediği tespit edilmiştir (Şekil 34, 35, 40, 41).

Bu çalışma; askorbik asit yüklü KLN hazırlamak için; farklı yöntemlerin geliştirilmesiyle, ya da farklı yüzdelerde lipid, yüzey etken madde ve etken madde kullanılarak farklı formülasyonların yapılması ve bu formülasyon yapılarının karakterizasyonu yapılarak elde etmiş olduğumuz formülasyon yapısı ile

karşılaştırılıp değerlendirilmesi ile geliştirilebilir. Ayrıca hazırlamış olduğumuz nanopartiküller farklı kanser hücre hatları üzerinde sitotoksik ve apoptotik etkisine belirlenerek, bu hücrelerde meydana getirdiği yapısal ve ince yapısal değişiklikler incelenerek karşılaştırma yapılabilir. Son olarak *in vivo* çalışmalara geçilerek, askorbik asit yüklü KLN formülasyonlarının fareler üzerinde toksik etkisi, kan dolaşımında kalış süresi ve dokularda meydana getirdiği yapısal ve ince yapısal değişiklikler incelenerek yapılan çalışma geliştirilebilir.

Çeşitli antikanserojen maddelerin nanoteknolojik uygulamalarla geliştirilen lipide dayalı ilaç taşıyıcı sistemlere yüklenmesiyle, spesifik olarak hücreye ya da dokuya hedeflenebilen ve yan etkiyi minimuma indirerek maksimum terapötik etkiyi sağlayan uygun ilaç taşıyıcı sistemlerinin geliştirilmesiyle, gelecekte kansere çözüm bulunabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Agus, D.B., Vera, J.C. ve Golde, D.W. (1999), "Stromal Cell Oxidation: A Mechanism by which Tumors Obtain Vitamin C," *Cancer Research*, **59**, 4555-4558.
- Akkan, G. (1999), "Vitaminler," İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, *Akılcı İlaç Kullanımı Sempozyumu*, İstanbul, 45-57.
- Akşit, H. ve Bildik, A. (2008), "Apoptosis," *YYÜ. VET. FAK. DER.*, **19(1)**, 55-63.
- Alexis, F., Pridgen, E.M., Langer, R. ve Farokhzad, O.C. (2010), "Nanoparticle Technologies for Cancer Therapy," *Drug Delivery Handbook of Experimental Pharmacology* (Ed: Schafer-Korting, M.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Alhaj, N.A., Abdullah, R., İbrahim, S. ve Bustamam, A. (2008), " Tamoxifen Drug Loading Solid Lipid Nanoparticles Prepared by Hot High Pressure Homogenization Techniques," *Am. J. Pharm& Toxicol.*, **3(3)**, 219-224.
- Altunkanyak, B.Z. ve Özbek, E. (2008), "Programlanmış Hücre Ölümü: Apoptoz Nedir?," *Tıp Araştırma Dergisi*, **6(2)**, 93-104.
- Amiji, M.M. (2007), "Nanotechnology- Improving Targeted Delivery," *Drug Delivery*, 53-59.
- An, S.H., Kang, J.H., Kim, D.H. ve Lee, M.S. (2011), "Vitamin C increases the apoptosis via up-regulation p53 during cisplatin treatment in human colon cancer cells," *BMB Reports*, 211-216.
- Astuya, A., Caprile, T., Castro, M., Salazar, K., Garcia, M., Reinicke, K., Rodriguez, F., Vera, J.C., Millan, C., Ulloa, V., Low, M., Martinez, F. ve Nualart, F. (2005), "Vitamin C Uptake and Recycling Among Normal and Tumor Cells from the Central Nervous System," *Journal of Neuroscience Research*, **79**, 146-156.
- Baserga, R. (1999), "Introduction to The Cell Cycle," *The Molecular Basis of Cell Cycle and Growth Control*, (Ed: Stein, G.S., Baserga, R., Giordano, A. ve Denhardt, D.T.), A John Wiley&Sons, Inc., United States America, 1-14.
- Bharali, D.J., Khalil, M., Gürbüz, M., Simone, T.M. ve Mousa, S.A. (2009), "Nanoparticles and cancer therapy: A concise review with emphasis on dendrimers," *Int. J. Nanomedicine*, **4**, 1-7.

- Bhowmik, D., Chriranjib, Margret, R. ve Jayakar, B. (2009), "Role of Nanotechnology in Novel Drug Delivery System," *J. Pharm. Sci. And Tech.*, **1(1)**, 20-35.
- Bondi, L.M., Azzolina, A., Craparo, E.F., Capuano, G., Lampiasi, N., Giammona, G. ve Cervello, M. (2009), "Solid Lipid Nanoparticles Containing Nimesulide: Preparation, Characterization and Cytotoxicity Studies," *Current Nanoscience*, **5**, 39-44.
- Brenner, C. ve Kroemer, G. (1999), "The Mitochondrion: Decisive for Cell Death" Control, *Signalling Pathways in Apoptosis*, (Ed: Watters, D. ve Lavin, M.), Harwood academic publishers, Singapore, 207-226.
- Buettner, G.R. ve Moseley, P.L. (1993), "EPR spin trapping of free radicals produced by bleomycin and ascorbate," *Free Radic Res Commun*, **19**, 89-93.
- Bunjes, H. (2005), "Characterization of Solid Lipid Nano and Microparticles," *Lipospheres in drug Targets and Delivery*, (Ed: Nastruzzi, C.), CRS Press, USA, 41-61.
- Buyru, N., Tiğli, H., Özcan, F. ve Dalay, N. (2003), "Ras Oncogenes Mutation in Urine Sediments of Patients with Bladder Cancer", *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, **36(4)**, 399-402.
- Cabadak, H. (2008), " Hücre Siklusu ve Kanser," *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, **9(3)**, 51-61.
- Cameron, R. ve Feuer, G. (2000), "Incidence of Apoptosis and its Pathological and Biochemical Manifestations," *Apoptosis and Its Modulation by Drugs*, (Ed: Cameron, R.G. ve Feuer, G.), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1-35.
- Cameron, E. ve Campbell, A. (1974), "The Orthomolecular Treatment of Cancer II.Clinical Trial of High-Dose Ascorbic Acid Supplements in Advanced Human Cancer," *Chem-Biol. Interaction*, **9**, 258-315.
- Cameron, E. ve Pauling, L. (1976), "Supplemental ascorbate in the supportive treatment of cancer: Prolongation of survival times in terminal human cancer," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **73(10)**, 3685-3689.

- Cameron, L. ve Pauling, L. (1978), "Supplemental ascorbate in the supportive treatment of cancer: reevaluation of prolongation of survival times in terminal human cancer (Vitamin C)," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **75(9)**, 4538-4542.
- Cameron, E., Pauling, L. ve Leibovitz, B. (1979), "Ascorbic Acid and Cancer : A review," *Cancer Research*, **39**, 663-681.
- Cameron, E. ve Campbell, A. (1991), "Innovation quality control: and 'unpublishable' clinical trial of supplemental ascorbate in incurable cancer," *Med. Hypotheses*, **36(3)**, 185-189.
- Cameron, R. ve Feuer, G. (2000), "Molecular Cellular and Tissue Reactions of Apoptosis and Their Modulation by Drugs," *Apoptosis and Its Modulation by Drugs*, (Ed: Cameron, R.G. ve Feuer, G.), Springer- Verlag, Berlin Heidelberg, 37-57.
- Calvino, N. ve Levine, S. (2001), "Vitamin C and Cancer- Storm of Controversy," *Alternative health*, **71**, 1-7.
- Castelli, D.D., Dastru, W., Terreno, E., Cittadino, E., Torres, M.E., Spadaro, M. ve Aime, S. (2010), "In vivo MRI multicontrast kinetic analysis of the uptake and intracellular trafficking of paramagnetically labeled liposomes," *Journal of Controlled Release*, **144**, 271-279.
- Cavalli, R., Peira, E., Caputo, O. ve Gasco, M.R. (1999), "Solid lipid nanoparticles as carriers of hydrocortisone and progesterone complexes with β -cyclodextrin," *Int. J. Pharm.* 59-69.
- Center for Drug Evaluation and Research, Food and Drug Administration Guidance for Industry (2001). Analytical Procedures and Methods Validation Available at (Internet) <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>.
- Chen, D.B., Yang, T.Z., Lu, W.L ve Zhang, Q. (2001), "In vitro and in vivo study of two types of long-circulating solid lipid nanoparticles containing paclitaxel," *Chem Pharm Bull*, **49**, 1444-147.
- Chen, R., Zhou, J., Tang, Q., Lu, H., Zhou, Q. ve Zhang, L. (2006), "Poly (ethylene glycol) modified solid lipid nanoparticles as carriers of

doxorubicin for the treatment of hepatocarcinoma cells,” *Nanoscience*, **11(3)**, 225-229.

- Chen, Q., Espey, M.G., Krishna, M.C., Mitchell, J.B., Corpe, C.P., Buettner, G.R., Shacter, E. ve Levine, M. (2005), “Pharmacologic ascorbic acid concentrations selectively kill cancer cells: Action as a pro-drug to deliver hydrogen peroxide to tissues,” *PNAS*, **102(38)**, 13604-13609.
- Cho, K., Wang, X. ve Nie, S. (2008), “Therapeutics Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer,” *Clin. Cancer Res.*, **14**, 1310-1316.
- Cohen, G.M. (1997), “Caspases: the executioners of apoptosis,” *Biochem. J.*, **326**, 1-16.
- Collins, K., Jacks, T. ve Pavletich, N.P. (1997), “The cell cycle and cancer,” *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 2776-2778.
- Cotter, T.G. ve Martin, S.J. (1996), “Techniques in Apoptosis (User’s Guide),” Portland Press, London.
- Croce, C.M. (2008), “Oncogenes and Cancer,” *N. Eng. J. Med.*, **358(5)**, 502-511.
- Cruchten, S.V. ve Broeck, V. (2002), “Morphological and Biochemical Aspects of Apoptosis, Oncosis and Necrosis,” *Anat. Histol. Embryol.*, **31**, 214-223.
- Duarte, T.L., Almeida, G.M. ve Jones, G.D.D. (2007), “Investigation of the role of extracellular H₂O₂ and transition metal ions in the genotoxic action of ascorbic acid in cell culture models,” *Toxicology Letters*, **170**, 57-65.
- Dunham, W.B., Zuckerkandl, E., Reynolds, R., Willoughby, R., Marcuson, R., Barth, R. ve Pauling, L. (1982), “Effects of intake of L-ascorbic acid on the incidence of dermal neoplasms induced in mice by ultraviolet light,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **79**, 7532-7536.
- Ekshyyan, O. ve Aw, T.Y. (2004), “Apoptosis in Acute and Chronic Neurological Disorders,” *Frontiers in Bioscience*, **9**, 1567-1576.
- Fan, T., Han, L., Chong, R. ve Liang, J. (2005), “Caspase Family Proteases and Apoptosis,” *Acta. Biochim. Biophys. Sin.*, **37(11)**, 720-727.
- Farokhzad, O.C. ve Langer, R. (2009), “Impact of Nanotechnology on Drug Delivery” *ACS Nano*, **3(1)**, 16-20.

- Fotokis, G. ve Timbrell, A. J. (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.
- Franks, L.M. (1996), "What is Cancer?," *Cellular and Molecular Biology of Cancer*, (Ed: Franks, L.M. ve Teich, N.M.) Oxford University Press Inc., New York, 1-20.
- Gangopadhyay, S.B., Abraham, J., Lin, Y.P. ve Benchimol, S. (1997), "The tumour suppressor gene p53," *Oncogenes and Tumour Suppressors*, (Ed: Peters, G. ve Vousden, K.H.), Oxford University Press Inc., New York, 261-291.
- Garbisa, S., Pozzatti, R., Muschel, R.J., Saffiotti, U., Ballin, M., Goldfarb, R.H., Khoury, G. ve Liotta, L.A. (1987), "Secretion of type IV collagenolytic protease and metastatic phenotype: induction by transfection with c-HA-ras but not c-HA-ras plus ad2-ela," *Cancer Res.*, **47** (6), 1523-1528.
- Ge, M., Reilly, A., Baillie, N., Twentyman, G., Sturt, J., Fitzpatrick, M. ve Taylor, T. (2008), "Vitamin C: Evidence, application and commentary," *NFZB*, **35**, 312-318.
- Green, J.M. (1996) "A practical guide to analytical method validation" *Anal. Chem.*, **68**, 305-309.
- Gewies A. (2003), "Introduction to Apoptosis," *ApoReview*, 1-26.
- Gilloteaux, J., Jamison, J.M., Arnold, D., Ervin, E., Eckroat, L., Docherty, J.J., Neal, D. ve Summers, J.L. (1998), "Cancer Cell Necrosis by Autophagy: Synergism of Antitumor Activity of Vitamin C: Vitamin K3 on Human Bladder Carcinoma T24 Cells," *FAMS Inc.*, **20**, 564-575.
- Gonzales, M.J., Massari, J.R., Mora, E.M., Guzman, A., Riordan, N.H., Riordan, H.D., Casciari, J.J., Jackson, J.A. ve Franco, A. (2005), "Orthomolecular Oncology Review: Ascorbic Acid and Cancer 25 Years Later," *Integrative Cancer Therapies*, **4**(1), 32-44.
- Guaiquil, V., Veras, C.J. ve Golde, D. (2001), "Mechanism of Vitamin C Inhibition of Cell Death Induced by Oxidative Stress in Glutathione-depleted HL-60 Cells," *The Journal of Biological Chemistry*, **276**, 40955-40961.

- Hahn, W.C. ve Weinberg, R.A. (2002), “Modelling the molecular circuitry of cancer,” *Nat. Rev. Cancer*, **2**, 331-341.
- Hanahan, D. ve Weinberg, R.A. (2002), “The hallmarks of cancer,” *Cell*, **100**, 57-70.
- Hockenbery, D.M. (1994), “The Bcl-2 Gene: A Regulator of Programmed Cell Death,” *Apoptosis*, (Ed: Minich, E. Ve Schimke, R.T.), Plenum Press, United States of America, 157-177.
- Hou, J. ve Zhou, S. (2007), “New research on development of solid lipid nanoparticles,” *Journal of Medical Colleges of PLA*, **22(6)**, 385-390.
- Haskell, R.J. (2006), “Physical Characterization of Nanoparticles,” *Nanoparticle Technology for Drug Delivery*, (Ed:Gupta, R.B. ve Kompella, U.B.), Pharmaceu Tech., Inc., Pinehurst, North Carolina, 103-139.
- Heaney, M.L., Gardner, J.R., Karasavvas, N., Golde, D.W., Scheinberg, D.A., Smith, E.A. ve Connor, O.A. (2008), “Vitamin C Antagonizes the Cytotoxic Effects of Antineoplastic Drugs,” *Cancer Res.*, **68(19)**, 8031-8038.
- Hoffer, L.J., Levine, M., Assouline, S., Melnychuk, D., Padayatty, S.J., Rosadiuk, K., Rousseau, C., Robitaille, L. ve Miller, W.H. (2008), “Phase I clinical trial of i.v. ascorbic acid in advanced malignancy,” *Ann. Oncol.*, **19(11)**, 1969-1974.
- Hu Jack, C., Aryal, S. ve Zhang, L. (2010), “Nanoparticle- assisted combination therapies for effective cancer treatment,” *Therapeutic Delivery*, **1(2)**, 323-334.
- Huang, X. ve Brazel, C.S. (2001), “On the importance and mechanism of burst release in matrix- controlled drug delivery systems,” *Journal of Controlled Release*, **73**, 121-136.
- Hughes, G.A.(2005), “Nanostructure-mediated drug delivery. Nanomedicine: Nanotechnology,” *Biology and Medicine*, **1**, 22-30.
- Ichim, T.E., Minev, B., Braciak, T., Luna, B., Hunninghake, R., Mikirova, N.A., Jackson, J.A., Gonzales, M.J., Massari, J.R., Alexandrescu, D.T., Dasanu, C.A., Bogin, V., Ancans, J., Stevens, R.B., Markosian, B., Koropatnick, J., Chen, C. ve Riordan, N.H. (2011), “Intravenous ascorbic acid to prevent

and treat cancer-associated sepsis?," *Journal of Translational Medicine*, **9(25)**, 1-13.

Iqbal, K., Khan, A. ve Khattak, M.M. (2004), "Biological Significance of Ascorbic acid(Vitamin C) in Human Health- A Review," *Pakistan Journal of Nutrition*, **3(1)**, 5-13.

Jamison, J.M., Gilloteaux, J., Venugopal, M., Kock, J.A., Sowick, C., Shah, R. ve Summers, J.L. (1996), "Flow cytometric and ultrastructural aspects of the synergistic antitumor activity of vitamin C- vitamin K₃ combinations against human prostatic carcinoma cells," *Tissue and Cell*, **6**, 687-701.

Jones, D.S., Woolfson, D.A., Brown, A.F. ve O'Neill, J.M. (1997), "Mucoadhesive, syringeable drug delivery systems for controlled application of metronidazole to the periodontal pocket: In vitro release kinetics, syringeability, mechanical and mucoadhesive properties," *Journal of Controlled Release*, **49**, 71-79.

Jores, K., Mehnert, W., Bunjes, H., Drechsler, M. ve Mader, K. (2003), "From solid lipid nanoparticles (SLN) to nanospoons. Visions and reality of colloidal lipid dispersions," *Controlled Release Society 30th Annual Meeting Proceedings*.

Kamble, V.A., Jagdale, D.M. ve Kadam, V.J. (2010), "Solid lipid nanoparticles as drug delivery systems," *Int.J. Pharm. And Bio Sci*, **1(3)**, 1-9.

Kamboj, S., Bala, S. ve Nair, A.B. (2010), "Solid Lipid Nanoparticles: An Effective Lipid Based Technology for Poorly Water Soluble Drugs," *Int. J. Pharmaceutic. Sci. Rev. And Research*, **5(2)**, 78-90.

Kandaş, N.Ö. (2004), "Apoptosis, Programlı Hücre Ölümü," *Ankara Üniv. Dikimevi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Dergisi*, **5(1)**, 7-10.

Karaboz, İ., Kayar, E. ve Akar, S. (2008), "Flow Sitometri ve Kullanım Alanları," *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi*, **6(2)**, 01-18.

Komarova, N.L., Sengupta, A. ve Mowak, M.A. (2003), "Mutation-selection networks of cancer initiation tumor supressor genes and chromosomal instability," *Journal of Theoretical Biology*, **233**, 433-450.

- Kapuscinski, J. (1990), "Interaction of nucleic acid with fluorescent dyes: spectral properties of condensed complexes," *J. Histochem. Cytochem.*, **38**, 1323-1329.
- Kapuscinski, J., Darzynkiewicz, Z. ve Melamed, M.R. (1982), "Luminescence of the solid complexes of acridine orange with RNA," *Cytometry*, **2**, 201-211.
- Kasof, G., Degenhardt, K., Perez, D., Thomas, A. ve White, E. (1999), "Overview: A Matter of Life and Death," *Signalling Pathways in Apoptosis*, (Ed: Watters, D. ve Lavin, M.), Harwood academic publishers, Singapore, 1-28.
- Kaş, H.S. (2002), "İlaç Taşıyıcı Partiküler Sistemler," *Kontrollü Salım Sistemleri*, (Ed: Gürsoy, A.Z.), Elma Bilgisayar Basım ve Ambalaj San.Tic.Ltd.Şti., İstanbul, 65-95.
- Kaş, H.S. ve Eldem, T. (2002), "Kontrollü Salım Sistemlerinin Hedeflendirilmesi," *Kontrollü Salım Sistemleri*, (Gürsoy, A.Z.), Elma Bilgisayar Basım ve Ambalaj San.Tic.Ltd.Şti., İstanbul, 299-304.
- Kayser, O., Lemke, A. ve Trejo, N. (2005), "The Impact of Nanobiotechnology on the Development of new Drug delivery Systems," *Current Pharmaceutical Biotechnology*, **6**, 3-5.
- Kopnin, B.P. (2000), "Targets of Oncogenes and Tumor Supressors: Key for Understanding Basic Mechanism of Carcinogenesis," *Biochemistry*, **65(1)**, 5-33.
- Kodaman, P.H., Aten, R.F. ve Behrman, H.R. (1998), "Accumulation of ascorbate by endocrine-regulated and glucose-sensitive transport of dehydroascorbic acid in luteinized rat ovarain cells," *Biology of Reproduction*, **58**, 407-413.
- Koziara, J.M., Whisman, T.R., Tseng, M.T. ve Mumper, R.J. (2006), "In-vivo efficacy of novel paclitaxel nanoparticles in paclitaxel-resistant human colorectal tumors," *J Control Release*, **112**, 312-319.
- Koziara, J.M., Lockman, P.R., Allen, D.D. ve Mumper, R.J. (2004), "Paclitaxel nanoparticles for the potential treatment of brain tumors," *J Control Release*, **99**, 259-269.

- Kreuter, J. (1994), "Nanoparticles, Colloidal Drug Delivery Systems," (Ed: Kreuter, J.) Applied Analytical Industries, Inc., Wilmington, North Carolina, 219-315.
- Kshirsagar, N.A. (2000), "Drug Delivery Systems," *India Journal of Pharmacology*, **32**, 54-61.
- Lacasse, E.L., Holcik, M., Korneluk, R.G. ve Mackenzie, A.E. (2005), "Apoptosis in health, disease and therapy overview and methodology," *Apoptosis in Health and Disease*, (Ed: Holcik, M., Lacasse, E., Mackenzi, A. ve Korneluk, R.), Cambridge University Press, United Kingdom, 1-48.
- Lawson, S. (2003), "The Trials and Tribulations of Vitamin C," *Journal of Orthomolecular Medicine*, **18(3&4)**, 173-186.
- Lee, M.K., Lim, S.J. ve Kim, C.K. (2007), "Preparation, characterization and in vitro cytotoxicity of paclitaxel-loaded sterically stabilized solid lipid nanoparticles," *Biomaterials*, **28**, 2137-2146.
- Levine, M., Contilena, C., Wang, Y., Welch, R.W., Washko, P.W., Dhariwal, K.R., Park, J.B., Lazarev, A., Graumlich, J.F., King, J. ve Cantilena, L.R. (1996), "Vitamin C pharmacokinetics in healthy volunteers: Evidence for a recommended dietary allowance," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **93**, 3704-3709.
- Levine, M., Espey, M.G. ve Chen, Q. (2009), "Losing and finding a way at C: New promise for pharmacologic ascorbate in cancer treatment," *Free Radical Biology & Medicine*, **47**, 27-29.
- Li, L., Chen, D., Zhang, Y., Deng, Z., Ren, X., Meng, X., Tang, F., Ren, J. ve Zhang, L. (2007), "Magnetic and fluorescent multifunctional chitosan nanoparticles as a smart drug delivery system," *Nanotechnology*, **18**, 1-6.
- Lu, B., Xiong, S., Yang, H., Yin, X. ve Chao, R. (2006), "Solid lipid nanoparticles of mitoxantrone for local injection against breast cancer and its lymph node metastases," *European J. Pharmaceutical Sci.*, 1-9.
- Lupulescu, A. (1992), "Ultrastructure and cell surface studies of cancer cells following vitamin C administration," *Exp. Toxicol. Pathol.*, **44(1)**, 3-9.
- Macaluso, M., Russo, G., Cinti, C., Bazan, V., Gebbia, N. ve Russo, A. (2002), "Ras Family Genes: An Interesting Link Between Cell Cycle and Cancer," *Journal of Cellular Physiology*, **192**, 125-130.

- Mäder, K. ve Mehnert, W. (2005), "Solid Lipid nanoparticles- Concepts, Procedures and Physicochemical Aspects," *Lipospheres in drug Targets and Delivery*, (Nastruzzi C.), 1-18.
- Malumbres, M. ve Barbacid, M. (2007), "Cell cycle kinases in cancer," *Current Opinion in Genetics & Development*, **17**, 60-65.
- Maramag, C., Menon, M., Balaji, K.C., Reddy, P. ve Laxmanan, S. (1997), "Effect of Vitamin C Prostate Cancer Cells in vitro: Effect on Cell Number, Viability and DNA Synthesis," *Prostate*, **32**, 188-195.
- Martin, S.J., Reutelingsperger, C.P., McGahon, A.J., Rader, J.A. (1995), "Earlier distribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition of overexpression of Bcl-2 and Abl.," *J. Exp. Med.*, **182**, 1545-1556.
- Mehnert, W. ve Mäder, K. (2001), "Solid lipid nanoparticles production, characterization and applications," *Adv. Drug Del. Rev.*, **47**, 165-196.
- Miglietta, A., Cavalli, R., Bocca, C., Gabriel, L. ve Gasco, M.R. (2010), "Cellular uptake and cytotoxicity of solid lipid nanospheres (SLN) incorporating doxorubicin or paclitaxel," *Int J Pharm.*, **210**, 61-67.
- Mikirova, N., Jackson, J.A., Casciari, J.J. ve Riordan, H.D. (2001), "The Effect of Alternating Magnetic Field Exposure and Vitamin C on Cancer Cells," *Journal of Orthomolecular Medicine*, **16(3)**, 177-182.
- Mohanraj, V.J. ve Chen, Y. (2006), "Nanoparticles- A Review," *Trop. J. Pharmaceutical Research*, **5(1)**, 561-573.
- Morgan, M.T., Nakanishi, Y., Kroll, D.J., Griset, A.P., Carnahan, M.A., Wathier, M., Oberlies, N.H., Manikumar, G., Wani, M.C. ve Grinstaff, M.W. (2006), "Dendrimer- Encapsulated Camphothecins: Increased Solubility, Cellular Uptake and Cellular Retention Affords Enhanced Anticancer Activity In vitro," *Cancer Res.*, **66(24)**, 11913-11921.
- Mossman, T. (1983), "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay," *J. Immunol Method*, **65**, 55-63.

- Mukherjee, S., Ray, S. ve Thakur, R.S. (2009), "Solid Lipid Nanoparticles: A Modern Formulation Approach in Drug Delivery System," *Indian J. Pharm. Sci.*, **71(4)**, 349-358.
- Mulla, J.S., Khazi, I.M. ve Makandi, V.G. (2010), "Solid Lipid nanoparticles: potential applications," *Indian Journal of Novel Drug Delivery*, **2(3)**, 82-87.
- Murata, A., Morishige, F. ve Yamauchi, H. (1982), "Prolongation of survival times of terminal cancer patients by administration of large doses of ascorbate," *Int. J. Vitam. Nutr. Res. Suppl.* **23**, 103-113.
- Müller, R.H., Mader, K. ve Gohla, S. (2000), "Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery-a review of the state of the art," *European J. Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **50**, 161-177.
- Müller, R.H., Möschwitzer, J. ve Bushrab, F.N. (2006), "Manufacturing of nanoparticles by Milling and Homogenization Techniques," *Nanoparticle Technology for Drug Delivery*, (Ed: Gupta, R.B. ve Kompella, U.B.), Pharmaceu Tech., Inc., Pinehurst, North Carolina, 21-53.
- Müller, R.H., Radtke, M. ve Wissing, S.A. (2004), "Lipid nanoparticles (SLN and NLC) for drug delivery," *Nanoparticles for Pharmaceutical Applications* (Ed: Kumar, R., Tabata, Y. ve Domb, A.), American Scientific Publishers, 43-56.
- Müller, R.H., Schwarz, C., Mehnert, W. ve Lucks, J.S. (1993), "Production of solid lipid nanoparticles (SLN) for Controlled Drug Delivery," *Proc. Int. Symp. Controlled Release Bioactive Mater.*, **20**, 480-481.
- Nie, S., Xing, Y., Kim, G.J. ve Simons, J.W. (2007), "Nanotechnology Applications in Cancer," *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, **9(12)**, 1-32.
- Numanoğlu, U. ve Tarımcı, N. (2006), "Katı Lipid Nanopartiküllerin (SLNTM) Özellikleri, Farmasötik ve Kozmetik Alandaki Uygulamaları," *Ankara Ecz. Fak. Der.*, **35(3)**, 211-235.
- Ochekpe, N.A., Olorunfemi, P.O. ve Ngwuluka, N.C. (2009), "Nanotechnology and Drug Delivery Part 2: Nanostructures for Drug Delivery," *Trop. J. Pharm. Res.*, **8(3)**, 275-287.

- Osborne, C., Wilson, P ve Tripathy, D. (2004), "Oncogenes and Tumor Suppressor Genes in Breast Cancer ; Potential Diagnostic and Therapeutic Applications," *The Oncologist*, **9**, 361-377.
- Padayatty, S.J., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee, J., Chen, S., Corpe, C., Dutta, A., Dutta, S.K. ve Levine, M. (2003), "Vitamin C as an antioxidant: Evaluation of its role in disease prevention," *Journal of American College of Nutrition*, **22(1)**, 18-35.
- Padayatty, S. ve Levine, M. (2000), "Reevaluation of Ascorbate in Cancer Treatment: Emerging Evidence, Open Minds and Serendipity," *Journal of American College of Nutrition*, **19(4)**, 423-425.
- Padayatty, S.J. ve Levine, M. (2001), "New insight into the physiology and pharmacology of vitamin C," *CMAJ.*, **164(3)**, 353-355.
- Padayatty, S.J., Riordan, H.D., Hewitt, S.M., Katz, A., Hoffer, L.J. ve Levine, M. (2006), "Intravenously administered vitamin C as cancer therapy: three cases," *CMAJ*, **174(7)**, 937-942.
- Padayatty, S.J., Sun, H., Wang, Y., Riordan, H.D., Hewitt, S.M., Katz, A., Wesley, R.A. ve Levine, M. (2004), "Vitamin C Pharmacokinetics: Implications for Oral and Intravenous Use," *Annals of Internal Medicine*, **140(7)**, 533-538.
- Pal, D. ve Nayak, A.K. (2010), "Nanotechnology for targeted delivery in cancer therapeutics," *Int. J. Pharmaceutic. Sci. Rev. And Research*, **1(1)**, 1-7.
- Parhi, R. ve Suresh, P. (2010), "Production of solid lipid nanoparticles-drug loading and release mechanism," *J.Chem: Pharm. Res.*, **2(1)**, 211-227.
- Park, M. ve Lee, S. (2003), "Cell Cycle and Cancer," *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, **36(1)**, 60-65.
- Park, K. (2007), "Nanotechnology: What it can do for drug delivery," *J. Control Release*, **120(1-2)**, 1-3.
- Pecorino, L. (2008), *Molecular Biology of Cancer*, Oxford University Press Inc., New York.
- Peppas, L. ve Blanchette, J.O. (2004), "Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy," *Advanced Drug Delivery Reviews*, **56**, 1649-1659.

- Pınarbaşı, E. (2007), “Apoptosiz (Programlı Hücre Ölümü),” *Moleküler Biyoloji*, (Ed: Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M. ve Tanyolaç, B.), Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, 423-467.
- Pines, J. (1997), “Mammalian cell cycle control,” *Oncogenes and Tumour Suppressors*, (Ed: Peters, G. ve Vousden, K.H.), Oxford University Press Inc., New York, 189-232.
- Poole, P.C. ve Owens, F.J. (2003), *Introduction to Nanotechnology*, John Wiley&Sons, Inc. Hoboken, New Jersey, 1-8.
- Potten, C. ve Wilson, J. (2004), “*Apoptosis The Life and Death of Cells*,” Cambridge University of Press, United States of America.
- Pragati, S., Kuldeep, S., Ashok, S. ve Satheesh, M. (2009), “Solid Lipid Nanoparticles: A Promising Drug Delivery Technology,” *Int. J. Pharmaceutical Science and Nanotechnology*, **2(2)**, 509-516.
- Preobrazhensky, S., Malugin, A. ve Wentz, M. (2001), “Flow Cytometric Assay for Evaluation of the Effects of Cell Density on Cytotoxicity and Induction of Apoptosis,” *Cytometry*, **43**, 199-203.
- Przeworska, E., Stasiuk, M., Gubernator, J. ve Kozubek, A. (2010), “Resorcinolic lipids improve the properties of sphingomyelin-cholesterol liposomes,” *Chemistry and Physics of Lipids*, **163**, 648-654.
- Puri, P.L., Maclachlan, T.K., Levrero, M. ve Giordano, A. (1999), “The Intrinsic Cell Cycle: From Yeast to Mammals,” *The Molecular Basis of Cell Cycle and Growth Control*, (Ed: Stein, G.S., Baserga, R., Giordano, A. ve Denhardt, D.T.), A John Wiley&Sons, Inc., United States America, 15-80.
- Radtke, M., Souto, E.B. ve Müller, R.H. (2005), “NLC[®]-The novel generation of solid lipid carriers,” *Pharm. Tech. Europe*, **17**, 45-50.
- Rao, D.P., Srivastav, S.K., Prasad, C., Saxena, R. ve Asthana, S. (2010), “Role of Nanoparticles in Drug Delivery,” *Int. J. Nanotechnology and Applications*, **4(1)**, 45-49.
- Reddy, L.H., Adhikari, J.S., Dwarakanath, B.S., Sharma, R.K. ve Murthy, R.R. (2006), “Tumoricidal effects of etoposide incorporated into solid lipid nanoparticles after intraperitoneal administration in dalton’s lymphoma bearing mice,” *The AAPS Journal*, **8(2)**, 254-262.

- Reidling, J.C., Subramanian, V.S., Dahhan, T., Sadat, M. ve Said, H.M. (2008), "Mechanism and regulation of vitamin C uptake: studies of the hSVCT systems in human liver epithelial cells," *Am.J.Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **295**, 1217-1227.
- Riordan, H.D., Jackson, J.A., Riordan, N.H. ve Schultz, M. (1990), "High-Dose Intravenous Vitamin C in the Treatment of a patient with Renal Cell Carcinoma of the Kidney," *J. Orthomol. Med*, **5**, 72-73.
- Riordan, N.H., Riordan, H.D., Meng, X., Li, Y. ve Jackson, J.A. (1995), "Intravenous Ascorbate as a Tumor Cytotoxic Chemotherapeutics Agent," *Medical Hypotheses*, **44(3)**, 207-213.
- Riordan, N.H., Riordan, H.D., Casciari, J. (2000), "Clinical and Experimental Experiences with Intravenous Vitamin C," *Journal of Orthomolecular Medicine*, **15(4)**, 201-213.
- Sagun, K.C., Carcamo, J.M., Golde, D.W. (2005), "Vitamin C enters mitochondria via facilitative glucose transporter 1 (Glut1) and confers mitochondrial protection against oxidative injury," *The FASEB Journal*, **19**, 1657-1667.
- Sailaja, A.K., Amareshwar, P. ve Chakravarty, P. (2011), "Formulation of solid lipid nanoparticles and their applications," *Current Pharma Research*, **1(2)**, 197-203.
- Sandal, T. (2002), "Molecular Aspects of the Mammalian Cell Cycle and Cancer," *The Oncologist*, **7**, 73-81.
- Schwartz, G.K. ve Shah, M.A. (2005), "Targeting the Cell Cycle: A new Approach to Cancer Therapy," *Journal of Clinical Oncology*, **23(36)**, 9408-9421.
- Serpe, L., Catalano, M.G., Cavalli, R., Ugazio, E., Bosco, O., Canaparo, R., Muntoni, E., Frairia, R., Gasco, M.R., Eandi, M. ve Zara, G.P. (2004), "Cytotoxicity of anticancer drugs incorporated in solid lipid nanoparticles on HT-29 colorectal cancer cell line," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **58**, 673-680.
- Shaji, J. ve Jain, V. (2010), "Solid lipid nanoparticles: A novel carrier for chemotherapy," *Int. J. Pharmacy and Pharm. Sci.*, **2(3)**, 8-17.

- Sharma, A., Jindal, M., Aggarwal, G. ve Jain, S. (2010), "Development of a novel method for fabrication of solid lipid nanoparticles: using high shear homogenization and ultrasonication," *RJPBCS*, **1(2)**, 265-274.
- Siekmann, B. ve Westesen, K. (1994), "Melt-Homogenized solid lipid nanoparticles stabilized by the nonionic surfactant tyloxapol, I. Preparation and particle size determination," *Pharm., Pharmacol. Lett.*, **3**, 194-197.
- Sinha, R., Kim, G.J., Nie, S. ve Shin, D.M. (2006), "Nanotechnology in cancer therapeutics : bioconjugated nanoparticles for drug delivery," *Mol. Cancer Ther.*, **5(8)**, 1909-1917.
- Spielholz, C., Golde, D.W., Houghton, A.N., Nualart, F. ve Vera, J.C. (1997), "Increased Facilitated Transport of Dehydroascorbic acid without Changes in Sodium-Dependent Ascorbate Transport in Human Melanoma Cells," *Cancer Research*, **57**, 2529-2537.
- Sitterberg, J., Özçetin, A., Ehrhardt, C. ve Bakowsky, U. (2010), "Utilising atomic force microscopy for the characterization of nanoscale drug delivery systems," *European J. Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **74**, 2-13.
- Soppimath, K.S., Aminabhavi, T.M., Kulkarni, A.R. ve Rudzinski, W.E. (2001), "Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices," *Journal of Controlled Release*, **70**, 1-20.
- Soucie, E.L., Evan, G. ve Penn, L.Z. (2005), "Apoptosis and Cancer," *Apoptosis in Health and Disease*, (Ed: Holcik, M., Lacasse, E., Mackenzi, A. ve Korneluk, R.), Cambridge University Press, United Kingdom, 75-95.
- Spandidos, D.A. (2007), "Oncogenes and tumor supressor genes as paradigms in oncogenes," *Journal of BUON*, **12(1)**, 9-12.
- Stein, S.G., Wijnen, A.V., Frenkel, B., Hushka, D., Stein, J.L. ve Lian, J.B., (1999), "Gene Expression: The Regulatory and Regulated Mechanism," *The Molecular Basis of Cell Cycle and Growth Control*, (Ed: Stein, G.S., Baserga, R., Giordano, A. ve Denhardt, D.T.), A John Wiley&Sons, Inc., United States America, 183-224.
- Szent-Györgyi, A. (1928), "Observations on the function of peroxidase systems and the chemistry of the adrenal cortex," *Biochem. J.*, **22**, 1387-1409.

- Taneli, F. (2007), "Flow Sitometri Tekniği ve Klinik Laboratuvarlarda Kullanımı," *Türk Klinik Biyokimya Derg.*, **5(2)**, 75-82.
- Tao, S.L. ve Desai, T.A. (2003), "Microfabricated drug delivery systems: from particles to pores," *Advanced Drug Delivery Reviews*, **55**, 315-328.
- Teich, M.N. (1996), "Oncogenes and Cancer," *Cellular and Molecular Biology of Cancer*, (Ed: Franks, L.M. ve Teich, N.M.) *Oxford University Press Inc.*, New York, 169-202.
- Thangue, N.B. (1997), "The retinoblastoma gene product and its relatives," *Oncogenes and Tumour Suppressors*, (Peters, G. ve Vousden, K.H.), Oxford University Press Inc., New York, 233-260.
- Thiede, C., Kim, T.D. ve Neubauer, A. (2000), "Use of p53 as Cancer Cell Target for Gene Therapy," *Apoptosis and Its Modulation by Drugs*, (Ed: Cameron, R.G. ve Feuer, G.), Springer- Verlag , Berlin Heidelberg , 236-255.
- Todaro, G.J. ve Green, H. (1963), "Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines," *J.Cell Biol.*, **17**, 299-313.
- Trubetskoy, O.V., Finel, M., Burke, T.J. ve Trubetskoy, V.S. (2006), "Evaluation of synthetic polymeric micelles as a stabilization medium for the handling of membrane proteins in pharmaceutical drug discovery," *J.Pharm. Pharmaceut. Sci.*, **9(3)**, 271-280.
- Van Heerde, W.L., Degroot, P.G. ve Reutelingsperger, C.P.M. (1995), "The complexity of the phospholipid binding protein Annexin V," *Thromb. Haemost.*, **73**, 172-179.
- Varadharaj, S., Watkins, T., Cardounel, A.J., Garcia, J.G.N., Zweier, J.L., Kuppusamy, P., Natarajan, V. ve Parinandi, N. (2005), "Vitamin C-Induced Loss of Redox- Dependent Viability in Lung Microvascular Endothelial Cells," *Antioksidants & Redox Signaling*, **7(1&2)**, 287-300.
- Vasir, J.K., Reddy, M.K. ve Labhasetwar, V.D. (2005), "Nanosystems in Drug Targeting: opportunities and Challenges," *Current Nanoscience*, **1**, 47-64.

- Vermeulen, K., Bockstaele, D. ve Berneman, Z.N. (2003), "The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer," *Cell Prolif.*, **36**, 131-149.
- Verrax, J., Cadrobbi, J., Delvaux, M., Jamison, J.M., Gilloteaux, J., Summers, J.L., Taper, H.S. ve Calderon, P.B. (2003), "The association of vitamins C and K3 kills cancer cells mainly by autophagy, a novel form of cell death. Basis for their potential use as adjuvants in anticancer therapy," *European Journal of Medicinal Chemistry*, **38**, 451-457.
- Verrax, J., Taper, H. ve Calderon, P. (2008), "Targeting Cancer Cells by an Oxidant-Based Therapy," *Current Molecular Pharmacology*, **1**, 80-92.
- Wang, X., Yang, L., Chen, Z. ve Shin, D.M. (2008), "Application of nanotechnology in cancer therapy and imaging," *CA Cancer J. Clin.*, **58**, 97-110.
- Weinberg, R.A. (2007), "The Nature of Cancer," *The Biology of Cancer*, Garland Science, Taylor&Francis Group, LLC, United States of America.
- Wenzel, U., Nickel, A., Kuntz, S. ve Daniel, H. (2004), "Ascorbic acid suppresses drug-induced apoptosis in human colon cancer cells by scavenging mitochondrial superoxide anions," *Carcinogenesis*, **25**, 703-712.
- Wissing, S.A., Kayser, O. ve Müller, R.H. (2004), "Solid Lipid nanoparticles for parenteral drug delivery," *Advanced Drug Delivery Reviews*, **56(9)**, 1257-1272.
- Xiang, Q., Wang, M., Chen, F., Gong, T., Jian, Y., Zhang, Z. ve Huang, Y. (2007), "Lung-targeting Delivery of Dexamethasone Acetate Loaded Solid Lipid Nanoparticles," *Arch. Pharm. Res.*, **30(4)**, 519-525.
- Yang, X., Chen, Y., Yuan, R., Chen, G., Blanco, E., Gao, J. ve Shuai, X. (2008), "Folate-encoded and Fe₃O₄-loaded polymeric micelles for dual targeting of cancer cells," *Polymer*, **49**, 3477-3485.
- Yassin, A.E.B., Anwer, K., Mowafy, H.A., Bagory, İ., Bayomi M.A. ve Alsarra, İ.A. (2010), "Optimization of 5-fluorouracil solid lipid nanoparticles: a preliminary study to treat colon cancer," *Int. J. Med. Sci.*, **7(6)**, 398-408.
- Yeom, C., Lee, G., Park, J., Yu, J., Park, S., Yi, S., Lee, H.R., Hong, Y.S., Yang, J. ve Lee, S. (2009), "High dose concentration administration of ascorbic

acid inhibits tumor growth in BALB/C mice implanted with sarcoma 180 cancer cells via the restriction of angiogenesis,” *Journal of Translational Medicine*, **7(70)**, 1-9.

Zhang, D., Tan, T. ve Gao, L. (2006), “Preparation of oridonin-loaded solid lipid nanoparticles and studies on them in vitro and in vivo,” *Nanotechnology*, **17**, 5821-5828.

Zhu, R.R., Qin, L.L., Wang, M., Wu, S.M., Zhang, R., Liu, Z.X., Sun, X.Y. ve Yao, S.D. (2009), “Preparation, characterization and anti-tumor property of podophyllotoxin-loaded solid lipid nanoparticles,” *Nanotechnology*, **20**, 1-7.