



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



**İNSAN SERUM ALBUMİN
NANOPARÇACIKLARINA YÜKLÜ DOSETAKSEL;
SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE PROSTAT
KANSERİNDE NÜKLEER GÖRÜNTÜLEME
POTANSİYELİ**

Yüksek Lisans Tezi

Ebru ERTÜGEN

Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Anabilim Dalı

İzmir
2019

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

**İNSAN SERUM ALBUMİN
NANOPARÇACIKLARINA YÜKLÜ DOSETAKSEL;
SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE PROSTAT
KANSERİNDE NÜKLEER GÖRÜNTÜLEME
POTANSİYELİ**

Ebru ERTÜGEN

Danışman : Prof. Dr. Fatma YURT ONARAN

Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Anabilim Dalı
Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Yüksek Lisans Programı

İzmir
2019

Ebru ERTÜGEN tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “İnsan Serum Albumini Nanoparçacıklarına Yüklü Dosetaksel: Sentezi, Karakterizasyonu ve Nükleer Görüntülemenin Değerlendirilmesi” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 18.06.2019 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

Jüri Başkanı

Raportör Üye

Üye

: Fatma Yurt Oasaran

: Kubra Durkan

: Selviye Akkeç

İmza



EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi / Doktora Tezi olarak sunduğum “İnsan Serum Albumini Nanoparçacıklarına Yüklü Dosetaksel: Sentezi, Karakterizasyonu ve Nükleer Görüntüleme Potansiyeli” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

18 / 06 / 2019

Ebru ERTÜGEN



ÖZET**İNSAN SERUM ALBUMİN NANOPARÇACIKLARINA YÜKLÜ
DOSETAKSEL; SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE PROSTAT
KANSERİNDE NÜKLEER GÖRÜNTÜLEME POTANSİYELİ**

ERTÜĞEN, Ebru

Yüksek Lisans Tezi, Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Fatma Yurt Onaran

Haziran 2019, 71 sayfa

Ülkemizde erkeklerde en sık görülen kanser türlerinden ikincisi prostat kanseridir. Kanser hastalığının tedavisinde; klinik tedavinin zamanında değerlendirilmesi ve tedaviyi izleme etkili bir terapi sistemi için kritik önem taşır. Kanser; aşama ve lokalizasyonlarına bağlı olarak cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi gibi uygulamalarla tedavi edilmeye çalışılır. Ancak bu tedavi yöntemleri normal hücrelere de hasar vermekte, çeşitli yan etkiler oluşturmaktadır. Kemoterapi ve radyoterapi yöntemleri yan etkilerine rağmen kanser tedavisinde en sık kullanılan yöntemlerdir.

Kemoterapi amacıyla kullanılan çoğu kanser ilaçları tümör hücreleri ile sağlıklı hücreleri birbirinden ayıramaz. Dolayısıyla sistemik toksisiteye ve yan etkilere neden olur. Bu durum; ilacın alınabilen maksimum dozunu sınırlar. Ayrıca hızlı eliminasyon ve geniş bir alana yayılım ilacın daha fazla miktarda uygulanmasını gerektirir. Bu ekonomik olmamakla beraber istenmeyen yan etkilerin ortaya çıkmasına sebep olur.

Bu tez çalışmasında prostat kanserinin teşhis ve tedavisi için antikanser ilaç olan dosetaksel yüklü nanoparçacık hazırlanmış ve antikanser ilacı yüklü

nanoaparçacık ^{131}I ile işaretlenmiştir. Taşıyıcı olarak 90 nm hidrodinamik çapa sahip ve zeta potansiyeli -52.6 mV olan insan serum albumin (HSA) nanoaparçacıkları sentezlenmiştir. SEM analizi sonuçlarına göre küresel şekilli HSA nanoaparçacıkların boyutunun 100-200 nm aralığında olduğu tespit edilmiştir. HSA nanoaparçacıkların antikanser ilacın hedef dokuya taşınımını sağlaması amaçlanmıştır. Dosetaksel (DTX) ilacı nanoaparçacıklara %50 verimle yüklenmiştir. DTX yüklü nanoaparçacıkların (DTX-HSA) boyutu ise 150-160 nm aralığındadır ve bu nanoaparçacıklar -27.2 mV zeta potansiyeline sahiptir. SEM analizi sonuçlarına göre DTX-HSA nanoaparçacıkların boyutunun 150-300 nm aralığında olduğu tespit edilmiştir. FTIR analizi sonuçları da HSA nanoaparçacık ve DTX-HSA nanoaparçacık sentezinin başarılı bir şekilde gerçekleştiğini desteklemektedir. *In vitro* ilaç salımı deneyi sonuçlarına göre HSA nanoaparçacıklarına yüklü DTX'in 48 saat sonunda pH 7.4 ortamında %80'i salınırken, pH 5.8 ortamında salım miktarının %93 olduğu tespit edilmiştir.

DTX-HSA nanoaparçacığı iyodojen metoduyla ^{131}I ile işaretlenmiştir. Kalite kontrol çalışmalarıyla işaretleme veriminin 98.67 ± 2.31 olduğu saptanmıştır. ^{131}I -DTX-HSA nanoaparçacığının *in vitro* olarak prostat tümör hücreleri (PC-3) ve sağlıklı prostat hücrelerinde (RWPE-1) tutulum deneyleri yapılmıştır. ^{131}I -DTX-HSA nanoaparçacıkların 24. saatte PC-3 hücre hattında tutulumunun 1.29 ± 0.22 , RWPE-1 hücre hattında 0.65 ± 0.17 olduğu tespit edilmiştir. PC-3 hücre hattında 24 saat inkübasyon süresinde tutulumun en yüksek olduğu, RWPE-1 hücrelerinde ise tutulumun inkübasyon süresi arttıkça azaldığı gözlemlenmiştir. Nanoaparçacığa yüklenen DTX antikanser ilacın sağlıklı hücelere kıyasla tümörlü hücrelerde seçimli akümüle olması ile sağlıklı hücrelerde toksik etkinin azaldığı, bu taşıyıcı sistem sayesinde ilacın yan etkilerinin azaldığı tespit edilmiştir. Böylece sentezlenen DTX-HSA nanoaparçacıkların prostat kanseri tedavisinde kullanılmasıyla daha etkili bir terapi sağlanacağı ortaya konulmuştur.

Elde edilen sonuçlar DTX-HSA nanoaparçacıklarının yüksek verimle ^{131}I ile işaretlenebileceğini ve prostat kanserinin nükleer görüntülemesinde faydalanabileceğini göstermiştir. Üstelik ^{131}I 'in β^- salınımının yanı sıra γ salınımı da olmasından dolayı ^{131}I -DTX-HSA'nın kanserin tedavisinde kullanılabilir.

Sonuç olarak, ^{131}I -DTX-HSA'nın prostat kanserinde hem nükleer görüntülemede hem de radyoterapisinde kullanılabilecek uygun bir ajan olarak görülmektedir. Bu alışmada ^{131}I -DTX-HSA'nın nükleer görüntüleme potansiyeli *in vitro* olarak saptanmıştır. Tez çalışmasının sonuçları gelecekte *in vivo* alışmalar ile bu potansiyelin araştırılmasında temel olacağından önem taşımaktadır.

Anahtar Kelimeler: İnsan Serum Albumini (HSA), dozetaksel, prostat kanseri, ^{131}I



ABSTRACT**DOCETAXEL LOADED HUMAN SERUM ALBUMIN
NANOPARTICLES; SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND
POTENTIAL OF NUCLEAR IMAGING OF PROSTATE
CANCER**

ERTÜGEN, Ebru

MSc Thesis, Department of Material Science and Engineering

Supervisor: Fatma YURT ONARAN

June 2019, 71 pages

The second most common type of cancer in men in our country is prostate cancer. Well-time clinical treatment and imaging have critical importance for an effective therapy system in the cancer treatment. Depending on the stages of cancer and its localization, the cancer treats with applications such as surgery, chemotherapy and radiotherapy. However these treatment methods damage normal cells and cause various side effects. The chemotherapy and radiotherapy methods are the most frequently used methods in the treatment of cancer despite their side effects.

Most cancer drugs used for chemotherapy cannot separate tumor cells from healthy cells. Therefore, it causes systemic toxicity and side effects. This situation limits the maximum available dose of the drug. In addition, rapid elimination and spread over a large area require a greater amount of the drug applied. In addition to not being economical, it causes undesirable side effects.

In this study, the anticancer drug loaded nanoparticles were prepared and labeled with ^{131}I for diagnosis and treatment of prostate cancer. Human serum albumin nanoparticles (HSA) with hydrodynamic diameter of 90 nm and a zeta potential of 52.6 mV were synthesized as drug delivery system. According to results of SEM analysis, the size of spherical HSA nanoparticles was measured to be in the range of 100-200 nm. HSA nanoparticles are aimed to provide transport of the anticancer drug to the target tissue. Docetaxel (DTX) were loaded onto the nanoparticles with 50% efficiency. The size of DTX loaded nanoparticles (DTX-HSA) is in the range of 150-160 nm and these nanoparticles have a zeta potential of -27.2 mV. According to results of SEM analysis, the size of DTX-HSA nanoparticles were determined as the range of 150-300 nm. The results of FTIR analysis support that syntheses of HSA nanoparticles and DTX-HSA nanoparticles were successfully carried out. According to *in vitro* drug release assay, 80% of DTX from loaded DTX-HSA nanoparticles was released at pH 7.4 medium, while 93% of DTX was released from DTX-HSA nanoparticles at pH 5.8 medium in the end of 48 hours.

DTX-HSA nanoparticles were labelled with ^{131}I via iodogen method. According to quality control studies the labelling efficiency was $98.67 \pm 2.31\%$. *In vitro* intracellular uptake experiments of ^{131}I -DTX-HSA nanoparticles was done on prostate tumor cells (PC-3) ($1.29 \pm 0.22\%$) and healthy prostate cells (RWPE-1) ($0.65 \pm 0.17\%$) at 24 hours. ^{131}I -DTX-HSA nanoparticles uptake is higher in PC-3 cell line than RWPE-1 cell line. The highest uptake in PC-3 cell line was observed in 24 hours incubation time, the uptake value reduced in incubation time increased. It is observed that toxic effect on healthy cells decreases by selective accumulation of DTX anticancer drug loaded nanoparticles in tumor cells compared to healthy cells thanks to drug delivery system. Thus the side effects of the drug decreased. It is put forth that use of DTX-HSA nanoparticles in the treatment of prostate cancer has been proven to be a more effective therapy.

Obtained results shown that DTX-HSA nanoparticles are labelled with ^{131}I with high efficiency and might be useful in nuclear imaging of prostate cancer. Moreover the ^{131}I -DTX-HSA nanoparticles may be contribute treatment of the cancer as it has a β^- emission of ^{131}I as well as γ emission. In conclusion, ^{131}I -

DTX-HSA appears as suitable agent that might be used in both nuclear imaging and radiotherapy of prostate cancer. In this study the nuclear imaging potential of ^{131}I -DTX-HSA was determined as *in vitro*. The results of study are important to be based on investigating of this potential with *in vivo* studies in the future.

Key words: Human serum albumin (HSA), docetaxel, prostate cancer, ^{131}I





ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında, tüm dünyada erkeklerde kanser ölümlerinde ikinci sırada gelen prostat kanseri tedavisi ve görüntülenmesinde kullanılabilecek ¹³¹I radyoşaretli, DTX antikanser ilacı yüklü HSA nanoparçacıkları üretilmiş, kalite kontrolü ve *in vitro* deneyleri gerçekleştirilmiştir. Bu konunun seçilmesindeki amaç, sıklıkla rastlanan kanser türlerinden olan prostat kanserinin tedavisinde karşılaşılan yan etkileri minimuma indirerek daha etkili bir terapi ve görüntüleme sağlamaktır.

Tez çalışmam süresince; planlama, araştırma ve yürütmede engin bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, yoğun iş temposu arasında bana değerli vaktini ayırarak yardımlarını esirgemeyen çok değerli sevgili tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Fatma YURT ONARAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım boyunca tecrübeleriyle bana desteklerini esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Sayın Ayça TUNÇEL ve Derya ÖZEL'e çok teşekkür ederim.

İZMİR

18/06/2019

Ebru ERTÜGEN

İÇİNDEKİLERSayfa

İÇ KAPAK	
KABUL ONAY SAYFASI	
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI.....	
ÖZET	i
ABSTRACT	v
ÖNSÖZ	ix
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xvii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xix
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	5
2.1 Prostat Kanseri.....	5
2.2 Nanoteknoloji	7
2.3 İnsan Serum Albumini Nanoparçacıkları	10

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.4 Dosetaksel	14
2.5 Radyoiyodinasyon ve ¹³¹ I ile İşaretleme	17
2.6 İnce Tabaka Radyo Kromatografisi.....	20
3.GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1 Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar.....	21
3.1.1 Kullanılan Kimyasallar.....	21
3.1.2 Kullanılan Cihazlar.....	21
3.2 İnsan Serum Albumini Nanoparçacıkların Sentezi.....	22
3.3 İnsan Serum Albumini Nanoparçacıklara Dosetaksel Yüklenmesi.....	23
3.4 Dosetaksel yüklü insan Serum Albumini Nanoparçacıkların Stok Çözeltilisinin Hazırlanması.....	24
3.5 Nanoparçacıkların Karakterizasyonu.....	24
3.5.1 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi ile Analizler.....	24
3.5.2 Dinamik Işık Saçılımı Analizleri.....	24
3.5.3 UV-VIS Spektrometresi Analizleri.....	25
3.5.4 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi.....	25
3.6 DTX-HSA Nanoparçacığının Salım Deneyleri.....	26

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.7 İodojen Kaplı Tüplerin Hazırlanması.....	26
3.8 Dosetaksel, HSA ve DTX-HSA Nanoparçacıkların ¹³¹ I ile İşaretlenmesi ve Kalite Kontrolü.....	26
3.9 Radyoişaretli DTX-HSA Nanoparçacıkların Lipfilite Tayini.....	27
3.10 ¹³¹ I-DTX-HSA Nanoparçacıkların <i>In Vitro</i> Stabilitesi.....	28
3.11 Hücre Kültürü.....	28
3.11.1 MTT Testi.....	29
3.11.2 DTX-HSA Nanoparçacığın <i>In Vitro</i> Hücre Tutulum Deneyi.....	29
4. BULGULAR.....	31
4.1 HSA nanoparçacıkların ve Dosetaksel Yüklü HSA Nanoparçacıkların Karakterizasyonu.....	31
4.1.1 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi Sonuçları.....	34
4.1.2 Dinamik Işık Saçılımı Sonuçları.....	34
4.1.3 Taramalı Elektron Mikroskobu Sonuçları.....	38
4.2 HSA Nanoparçacıklara Yüklü Dosetaksel Miktarının Tespiti.....	40
4.3 Salım Deneyi Sonuçları.....	41

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
4.4 DTX, HSA ve DTX-HSA Nanoparçacıkların ¹³¹ I ile İşaretleme Sonuçları.....	42
4.5 Radyoışaretleli DTX-HSA Nanoparçacığın Lipofilite Tayini.....	50
4.6 DTX-HSA Nanoparçacığın <i>In Vitro</i> Stabilite Sonuçları.....	50
4.7 Hücre Kültürü Çalışmaları Sonuçları.....	51
4.7.1 DTX ve DTX-HSA Nanoparçacıkların Sitotoksosite Sonuçları.....	51
4.7.2 Radyoışaretleli Serbest DTX ve DTX-HSA Nanoparçacıkların RWPE-1 ve PC-3 Hücre Hatlarındaki Tutulum Sonuçları.....	54
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	57
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	61
TEŞEKKÜR.....	69
ÖZGEÇMİŞ.....	71

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Prostat kanseri metastazları	7
2.2 İnsan serum albumini kimyasal yapısı.....	11
2.3 Radyoizotop işaretli HSA	14
2.4 Dositaksin kimyasal yapısı	15
2.5 İodojenin yapısal formülü.....	19
3.1 Karışıma gluteraldehit eklenmeden öncesi (A), sonrası (B).....	23
3.2 Zetasizer cihazı	25
4.1 HSA (a), HSA nanoparçacık (b), DTX-HSA nanoparçacık (c) ve tüm FTIR spektrumları (d)	33
4.2 HSA nanoparçacıkların boyut analizi (a), Zeta potansiyeli (b)	35
4.3 DTX-HSA nanoparçacıkların boyut analizi (a), zeta potansiyeli (b)	36
4.4 HSA (a), DTX-HSA nanoparçacıkların SEM görüntüleri.....	39
4.5 Dositaksin 0,002-0,016 M konsantrasyonlar arasında 283 nm dalga boyundaki kalibrasyon grafiği	40

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.6 DTX-HSA nanoparçacıklarından 48 saat boyunca PBS içinde <i>in vitro</i> DTX salınımı (0.1 M, pH 7.4 ve pH 5.8)	42
4.7 ¹³¹ I-DTX-HSA nanoparçacığının pH 3, 4, 8 ve 9.5'ta radyoışaretleme verimi.....	43
4.8 Na ¹³¹ I'in (a) n-bütanol-su-asetik asit (4-2-1) ve (b) metanol-su (9-1) banyolarındaki TLRC kromotogramları.....	45
4.9 Yükseltgenmiş ¹³¹ I'un (a) n-bütanol-su-asetik asit (4-2-1) ve (b) metanol-su (9-1) banyolarındaki TLRC kromotogramları.....	46
4.10 HSA np'nin (a) n-bütanol-su-asetik asit (4-2-1) ve (b) metanol-su (9-1) banyolarındaki TLRC kromotogramları.....	47
4.11 DTX'in (a) n-bütanol-su-asetik asit (4-2-1) ve (b) metanol-su (9-1) banyolarındaki TLRC kromotogramları.....	48
4.12 DTX-HSA np'nin (a) n-bütanol-su-asetik asit (4-2-1) ve (b) metanol-su (9-1) banyolarındaki TLRC kromotogramları.....	49
4.13 Na ¹³¹ I, Yük ¹³¹ I, HSA np, DTX ve DTX-HSA np'ların % işaretleme verimi (pH=8)	50
4.14 ¹³¹ I-DTX-HSA nanoparçacığının <i>in vitro</i> stabilitesinin zamana göre değişim.	51
4.15 RWPE-1 hücre hattında DTX ve DTX-HSA nanoparçacığının toksisitesi..	52
4.16 PC-3 hücre hattında DTX ve DTX-HSA nanoparçacığının toksisitesi.....	53
4.17 ¹³¹ I, ¹³¹ I-DTX ve ¹³¹ I-DTX-HSA nanoparçacığının RWPE-1 hücre hattında 1, 2, 4 ve 24 saat inkübasyon sürelerindeki tutulumları.....	54
4.18 ¹³¹ I, ¹³¹ I-DTX ve ¹³¹ I-DTX-HSA nanoparçacığının PC-3 hücre hattında 1, 2, 4 ve 24 saat inkübasyon sürelerindeki tutulumları.....	55

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 ABD'de 2018 yılında erkeklerde ve kadınlarda ayrı ayrı olarak en sık yaşam kaybına neden olması beklenen ilk 10 kanser türü.....	5
2.2 İyot izotoplarının bozunma çeşitleri, yarı ömürleri ve uygulama alanları.....	18
4.1 HSA ve DTX-HSA nanoparçacıkların boyut, PDI ve zeta potansiyel verileri.....	37
4.2 HSA np, DTX, DTX-HSA np, yükseltgenmiş ¹³¹ ve Na ¹³¹ I'in R _f değerleri.....	44



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
A_0	İlk Aktivite
A_1	Son Aktivite
β^-	Beta
β^+	Pozitron
γ	Gama
^{137}Cs	Sezyum-137
^{125}I	İyot-125
^{131}I	İyot-131
^{177}Lu	Lutesyum-177
^{99}Mo	Molibden-99
^{117}Pd	Paladyum-117
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	Teknesyum-99m
^{235}U	Uranyum-235
^{124}Xe	Xenon-124
^{188}Re	Renyum-188

Kısaltmalar

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium hücre kültürü ortamı
DMSO	Dimetil sülfoksit
DLS	Dinamik Işık Saçılımı
DTX	Dosetaksel
FBS	Fetal sığır serumu
FTIR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
HSA	İnsan Serum Albumini
MTT	3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolyum bromid
nm	Nanometre
PBS	Fosfat tamponlu salin
PET	Pozitron Emisyon Tomografisi
RPMI	Roswell Park Memorial Institute 1640 hücre kültürü ortamı
RT	Radyoterapi
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopu
SPECT	Tek Foton Emisyonlu Bilgisayarlı Tomografi
TLRC	İnce tabaka radyo kromatografisi

1. GİRİŞ

Kanser beraberinde taşıdığı fiziksel rahatsızlıkların yanı sıra sosyal, maddi ve manevi yönleri ile mücadelesi zor bir hastalıktır. Dünya genelinde kanser hastalığı son yıllarda her geçen gün artış göstermektedir. Kanser hastalığının tedavisinde klinik tedavinin zamanında değerlendirilmesi ve tedaviyi izleme etkili bir terapi sistemi için kritik önem taşır. Kanser; evre ve lokalizasyonlarına bağlı olarak cerrahi kanser tedavisi, kemoterapi, radyoterapi gibi yöntemlerle tedavi edilmeye çalışılır (Wang vd., 2008). Ancak bu tedavi yöntemleri normal hücrelere de hasar vermekte, çeşitli yan etkiler oluşturmaktadır. Kemoterapi ve radyoterapi yöntemleri yan etkilerine rağmen kanser tedavisinde en sık kullanılan yöntemlerdir. Meydana gelen yan etkilerin önüne geçmek için tümör hedefli antikanser ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilmeye çalışılmaktadır. Böylece kanser tedavisinden daha iyi sonuçlar elde edilebilmesi mümkün olabilmektedir. Radyoizotoplarla işaretli antikanser ilaçlar kullanıldığında hem teşhis hem de tedavi yapılabilmektedir.

Prostat kanseri, erkeklerde kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenlerinden biridir. Metastatik prostat kanserinin öncelikle tedavisi genellikle androjen baskılaması ile gerçekleştirilir. Antiandrojenler, androjenlerin etkisini bloke eden ilaçlardır. Bu tedavilerin hepsi kastrasyona neden olur. Çoğu hasta 18-48 ay boyunca yapılan tedaviye yanıt verir ve sonunda bir kastrasyona dirençle karşılaşılır. Doseksel, kastrasyon dirençli durumda standart terapi olarak kullanılır (Peer vd., 2013). Ayrıca doseksel tedavisi; uzun süreli hayatta kalma süresi ve yaşam kalitesinin iyileştirilmesi gibi olumlu sonuçlar vermektedir (Xue vd., 2016).

Doseksel, küçük hücreli akciğer kanseri, metastatik dirençli prostat kanseri, meme kanseri, baş ve boyun kanseri gibi çeşitli katı tümörlerin tedavisi için de kullanılmaktadır. İdeal olarak, toksisitenin önlenmesi ve etkinliğinin artırılması için hastalara göre ayrı ayrı dozajlanmaktadır.

Son yıllarda, nanoteknoloji çeşitli alanlarda, özellikle tıp alanında, uygulanmaktadır. En çok araştırılan nanoteknoloji alt alanlarından biri, spesifik hedefli kanser terapisi olasılığını arttıran nano ilaçlardır. Kanser gibi hastalıkların teşhisi ve tedavisi için yeni nanoparçacıkların (np) geliştirilmesiyle birlikte, nano ilaçlar alanında benzeri görülmemiş bir gelişme olmuştur (Thakor ve Gambhir, 2013). İnsan serum albumini (HSA), toksik ve immünojenik olmayan, biyolojik olarak uyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilir, uzun kan dolaşım süresine sahip olma özellikleriyle plazmada en çok bulunan proteindir (molekül ağırlığı 66.5 kDa). Doğal, biyoyumlu olan HSA nanoparçacığın ideal bir ilaç taşıyıcısı olduğu literatürde de kanıtlanmıştır (Wu vd., 2017).

Tian ve arkadaşları (2017) tarafından yapılan çalışmada paklitaksel kemoterapi ilacı insan serum albumin nanoparçacıklarına yüklenmiş ve kemoterapi etkinliğinin arttığı belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda bu ilaç yüklü parçacık faz çalışmalarını tamamlamış ve rutinde kullanılmaktadır. Diğer bir benzer çalışmada ise bevacizumab ilacı insan serum albumin nanoparçacıklarına yüklenmiş ve HSA nanoparçacıkları taşıyıcı olarak kullanılmıştır. Yapılan incelemelerde verimin arttığı gözlenmiş ve HSA nanoparçacıkların bu ilacın taşınımı için iyi bir aday olduğu ve *in vivo* değerlendirmelerin yolunu açtığı kanıtlanmıştır (Redin vd., 2018). Son yıllarda albümin nanoparçacıkları, yüksek ilaç yükleme kapasiteleri (Ghuman vd., 2005) ve *in vivo* olarak uygulandıklarında tolerans kabiliyetleri nedeniyle büyük dikkat çekmiştir (Green vd., 2006).

HSA çok sayıda hidrofobik molekülün bağlanabileceği küçük moleküllü terapi ve görüntüleme ajanlarını taşıyıcı olarak kullanılabilir (Sarıkaya vd., 2013). Böylece HSA nanoparçacıklar antikanser ilacın hedefe taşınımını sağlaması, ilacın tümör hücrelerine tutulumunu ve biyoyararlılığının artırılması, toksisitesinin azaltılması için umut vaat etmektedir (Wu vd., 2017).

Radyofarmasötikler, insanlarda hastalıkların tanı veya tedavisi amacıyla kullanılan, yapısında bir radyoaktif izotop bulunduran bileşiklerdir (Tian vd., 2017). Gerek görüntüleme gerekse tedavi amacıyla uygun taşıyıcı moleküllerin tasarlanması, sentezlenmesi ve uygun radyoizotoplarla işaretlenmesi gerekir.

Ayrıca teşhis ve tedavi amacıyla kullanılan radyoizotoplardan beklenen özellikler de birbirinden farklıdır. Teşhis amacıyla kullanılan radyoizotopların yayınladığı radyasyonun vücut dışından izlenebilmesi istenirken, tedavi amacıyla kullanılan radyoizotopun vücut içinde bulunduğu dokuyu tahrip etmesi istenir.

Radyoaktif iyot (^{131}I) rutin olarak nükleer tıpta kullanılmaktadır. ^{131}I ; 8,04 gün yarı ömürlü β^- ve γ bozunumu yapan bir radyonükliddir. Bu özelliklerinden dolayı ^{131}I tedavi ve görüntülemenin birlikte gerçekleşebilmesine olanak sağlar (Tian vd., 2017).

Bu tez çalışmasında, HSA nanoparçacıkları sentezlenmiş ve bu HSA nanoparçacıklara prostat tümörü hedefleyici olarak dosetaksel antikanser ilacı yüklenmiştir. Dosetaksel yüklenmiş HSA nanoparçacıklar ^{131}I ile işaretlenerek *in vitro* olarak prostat tümör hücresinde tutulum deneyleriyle ^{131}I -Dosetaksel-HSA nanoparçacığının nükleer görüntüleme potansiyeli ortaya konulmuştur.



2. GENEL BİLGİLER

2.1 Prostat Kanseri

Prostat kanseri, erkeklerde en sık rastlanan ve batı dünyasındaki ölüm oranıyla ikinci önde gelen kanser türüdür. Metastatik prostat kanserinin öncelikle tedavisi genellikle androjen baskılaması ile gerçekleşir (Peer vd., 2014).

Prostat kanseri, genellikle prostatın dış kısmında başlayan kötü huylu bir tümördür. Çoğu erkekte kanser çok yavaş gelişir. Hatta bu hastalığı olan birçok erkek bunun farkına bile varmayabilir. Erken prostat kanseri sadece prostat beziyle sınırlıdır ve bu türde kanseri olan hastaların çoğu yıllarca hiçbir sorunla karşılaşmadan hayatına devam edebilir. Prostat kanseri hem derece, hem evre ile değerlendirilir. Tümörün boyutu ve yayılımı, evreyi belirler. Erken evre prostat kanseri, yani T1 ve T2 evreleri, prostat bezi ile sınırlıdır. Evre T3 prostat kanseri, prostat bezinin hemen dışında bulunan dokulara ilerlemiştir. Evre T4 prostat kanseri, vücudun diğer kısımlarına yayılmıştır. Tablo 2.1'de 2018 yılına ait ABD'de kanser çeşitlerinin neden olduğu yaşam kaybı sayıları erkeklerde ve kadınlarda ayrı ayrı gösterilmiştir. Bu verilere göre erkeklerde prostat kanseri ikinci sırada yer almaktadır.

Tahmini kanser ilişkili yeni yaşam kaybı sayıları

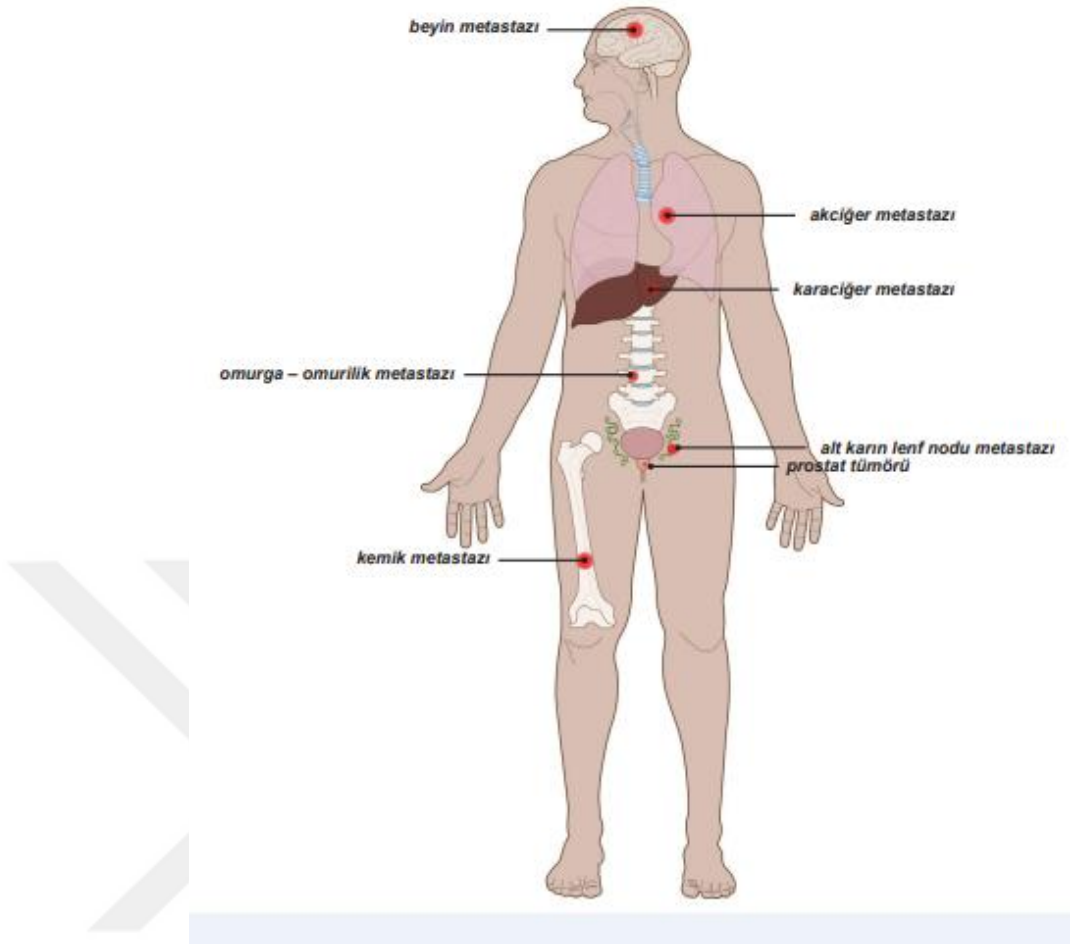
Erkekler			Kadınlar		
Akciğer	83,550	26%	Akciğer	70,500	25%
Prostat	29,430	9%	Meme	40,920	14%
Kolon ve rektum	27,390	8%	Kolon ve rektum	23,240	8%
Pankreas	23,020	7%	Pankreas	21,310	7%
Karaciğer & safra yolları	20,540	6%	Over (kadın yumurtalık)	14,070	5%
Lösemi	14,270	4%	Rahim	11,350	4%
Özofagus (yemek borusu)	12,850	4%	Lösemi	10,100	4%
Mesane	12,520	4%	Karaciğer & safra yolları	9,660	3%
Non-Hodgkin lenfoma	11,510	4%	Non-Hodgkin lenfoma	8,400	3%
Böbrek	10,010	3%	Beyin	7,340	3%
Tüm kanserler	323,630	100%	Tüm kanserler	286,010	100%

Çizelge 2.1 ABD'de 2018 yılında erkeklerde ve kadınlarda ayrı ayrı olarak en sık yaşam kaybına neden olması beklenen ilk 10 kanser türü (American Cancer Society, 2018)

Prostat kanseri, erken aşamada prostat spesifik antijen (PSA) adı verilen spesifik antijenin tespiti ile teşhis edilebilir. Prostat kanserinin, hormona bağımlı ve kastrasyona dirençli prostat kanseri olmak üzere iki farklı çeşidi bulunmaktadır. Başlangıçta, prostat kanseri hormonal tedaviye duyarlıdır. Bununla birlikte, sonuçta androjen yoksunluk tedavisine karşı direnç ortaya çıkar. Androjenden bağımsız prostat kanserinin antikanser ilaçlara genellikle duyarsız olduğu belirtilmelidir. Prostat kanseri hücresi apoptozizden kaçış nedeniyle kemoterapiye dirençlidir. İlaç direnci, kanser tedavisi için kritik bir konudur, ancak altta yatan mekanizmalar halen açık değildir (Liu vd., 1998).

Metastatik olmayan prostat kanseri için başlangıçtaki radyoterapiden (RT) sonra, hastaların % 20 ila % 30'unda biyokimyasal nüks görülür. Yüksek riskli lokalize prostat kanserinde, RT ile kombine edilmiş hormonlar uzun vadeli kansere özgü ve genel sağkalım oranlarını önemli ölçüde iyileştirir. Ancak bu hastaların % 30'u hala ortalama 6-7 yıllık takip süresiyle ölür (Mirjolet vd., 2017).

Metastatik prostat kanserinin öncelikle tedavisi genellikle androjen baskılaması ile gerçekleşir (Peer vd., 2014). Kemik metastazı doğrudan prostat kanseri mortalitesine ve morbiditesine katkıda bulunur. Prostat kanseri hastalarının % 85'inden fazlası otopside iskelet metastazı kanıtı gösterirken, ortalama sağkalım 30 ila 35 ay arasındadır. Prostat kanseri hastalarının yaşam kalitesi iskelet komplikasyonları ile önemli ölçüde riske girebilir (Wang vd., 2008). Şekil 2.1'de prostat kanserinin yaptığı farklı metastazlar gösterilmiştir.



Şekil 2.1 Prostat kanseri metastazları (Patients.Uroweb 2017)

2.2 Nanoteknoloji

Kanser, dünya genelinde en önemli ölüm nedenlerinden biridir ve kanser görülme sıklığı artmaya devam etmektedir. En yaygın kanser tedavileri kemoterapi, radyasyon ve cerrahi yöntemlerdir. Mevcut kanser tedavilerinin sıkça karşılaştığı zorluklar arasında antitümör ajanların spesifik olmayan sistemik dağılımı, tümöre ulaşan yetersiz ilaç konsantrasyonları ve terapötik yanıtları izleme yeteneğinin sınırlılığı bulunmaktadır. İlacın hedef bölgeye ulaşmasında yaşanan zorluklar, çoklu ilaç direnci gibi komplikasyonlara yol açmaktadır (Wang vd., 2008).

Nanoteknoloji, pek çok alanda etkilidir ve teknolojinin alt bölümlerini hızla geliştirmektedir. Tıpta da nanoteknoloji kullanılmaktadır. Nanoteknolojinin gelişen kullanım alanlarından biri kanser tedavisidir. Çünkü kanser tedavisinde nanoteknolojik olarak modifiye edilmiş yöntemler kullanılabilir. Nanoteknoloji, daha az zararlı maddelerle daha iyi tanı koymaya yardımcı olabilir, tümör hücrelerine lipozomlar ve fonksiyonel hale getirilmiş miseller ile etkili ilaç iletimi sağlayabilir (Aliosmanoğlu ve Basaran, 2012). Nanomalzemelere dayalı teşhis ve tedavi edici araçların uygulanması kanser tedavisine yardımcı olmaktadır. Yeni nano bazlı ilaç ve hedef tedavi şu anda onkolojideki uygulamalı nanoteknolojinin en iyi örnekleridir. (Yasri ve Wiwanitkit, 2019).

Nanoteknolojideki son gelişmeler araştırmacılara kanser görüntüleme ve tedavisi için yeni araçlar sağlamıştır. Bu teknoloji, tümöre özgü ligandlar, antikolar, antikanser ilaçları ve görüntüleme problemleri dahil olmak üzere, aynı anda birkaç fonksiyonel molekülle konjuge edilebilecek nanoparçacıkların geliştirilmesini sağlamıştır. Bu nanoparçacıklar kanser hücrelerine göre 100 ila 1000 kat daha küçük olduğundan, kan yoluyla kolayca transfer edilebilir. Hem kanser hücreleri yüzeyinde hem de içinde hedef tümöre özgü proteinlerle etkileşime girebilmektedir. Bu nedenle, kanser hücrelerine özgü taşıyıcı olarak uygulanmaları, şu anda kanser terapötikleri ve görüntüleme için mevcut yöntemlere önemli bir katkı oluşturmaktadır. Nanoparçacıklar; polimerler, metaller ve seramikler dahil olmak üzere birçok malzemeden oluşabilir. Üretim yöntemlerine ve kullanılan malzemelere bağlı olarak, bu parçacıklar çeşitli şekillerde ve boyutlarda olabilmektedirler (Wang vd., 2008).

Nanoparçacıklar, küçük boyutlarına göre benzersiz biyolojik özelliklere sahiptir. Bu durum diğer parçacıklardan daha büyük bir yüzey alanı/hacim oranına sahip olmalarını sağlar. Geniş fonksiyonel yüzey alanları, küçük moleküllü ilaçlar, DNA, RNA, proteinler ve problemler gibi diğer bileşikleri bağlamalarına, enkapsüle etmelerine ve taşımalarına izin verir. Ayrıca, ayarlanabilir büyüklükleri, şekilleri ve yüzey özellikleri, yüksek stabiliteyi, yüksek taşıyıcı kapasiteleri; hem hidrofilik hem de hidrofobik maddeleri birleştirme kabiliyetine sahip olmalarını ve farklı uygulama yollarıyla uyumluluklarını mümkün kılarak, tıbbın birçok alanında kullanım olanağı sağlar (Thakor ve Gambhir, 2013).

Daha iyi hedefleme seçiciliği ve daha iyi dağıtım etkinliği, terapötik ajanların veya görüntüleme kontrast formülasyonlarının geliştirilmesinde iki ana amaçtır. İdeal olarak, terapötik bir ilaç, normal dokulara en az zarar verecek şekilde tümör lezyonlarında seçici olarak zenginleştirilecektir. Bu hedeflere ulaşmak için tümör hücresi yüzeyinde genellikle bol miktarda veya benzersiz bir şekilde eksprese edilen antijenlere veya reseptörlere seçici olarak bağlanan antikolar veya diğer ligandlar, immünotoksinler, radyoimmünoterapötikler ve ilaç immünokonjugatları dahil olmak üzere ligand-hedefli bazı tedavi stratejileri geliştirilmektedir (Wang vd., 2008).

Tasarımı; mühendislik, kimya ve tıp alanlarından kaynaklanan moleküler görüntüleme ve hedefe yönelik tedaviye dayanan geniş ve çeşitli nanoparçacık dizisini uygulayarak, kanser nanoteknolojisi, kanser tedavilerinin karşısına çıkan mevcut engellerin birçoğuna çözümler vaat etmektedir. Nanoparçacıklar, moleküler seviyedeki biyolojik sistemler ile eşsiz etkileşime izin veren 5 ila 200 nm'lik bir mezoskopik boyut aralığına sahiptir. Malzeme bileşimlerinin bir sonucu olarak, nanoparçacıklar, ilaç kapsülleme ve biyouyumluluk için çok önemli olan kararlılık ve özgüllüğü koruyabilmektedir. Kanser nanoteknolojisindeki son gelişmeler, teşhis ve tedavinin bireysel hastaların moleküler profillerine dayandığı kişiselleştirilmiş onkoloji için heyecan verici fırsatlar yaratmaktadır (Wang vd., 2008).

Lipid veya polimer bazlı nanopartiküller gibi ilaç taşıyıcı sistemler (ilaç taşıyıcı sistemler), uygulanan ilaçların farmakolojik ve terapötik özelliklerini geliştirmek için tasarlanabilir. Partikül ilaç taşıyıcı sistemlerin klinik uygulamalarını engelleyen erken sorunların birçoğu, şimdi klinik kullanım için onaylanmış birçok antikanser ve antifungal ilaç taşıyıcı sistem formülasyonu ile aşılmıştır. Ayrıca, proteomik veya genomik araştırmadan türetilen yeni ilaçların *in vivo* teslimi için ilaç taşıyıcı sistemlerin avantajlarından yararlanılmasında ve ligand-hedefli terapötiklerde kullanımlarında büyük ilgi vardır (Allen ve Cullis, 2004).

Bir ilaç taşıyıcı sistemde dikkate alınması gereken en önemli ilaç özelliklerinden biri ilaç potansiyelidir. Kararlılık, çözünürlük, boyut ve yük gibi ek özellikler de önemlidir. Bir ilaç taşıyıcı sistemin taşıyabileceği molekül sayısı ne kadar düşük olursa, ilaç o kadar etkili olmalıdır. Bazı ilaç taşıyıcı sistemlerde terapötik olarak ilgili miktarda ilaç vermek için daha yüksek potansiyele sahip ilaçlara ihtiyaç duyulur. Oldukça yüksek miktarlarda taşıyıcının kullanılması; taşıyıcı toksisitesi, metabolizma ve eliminasyon, biyobozunabilirlik açılarından sorunlara yol açabilir. Ancak ilaç taşıyıcı sistemlerden lipozomlarda; her lipozom on binlerce ilaç molekülüne tutunabildiği için, ilaç potansiyeli bu taşıyıcı türü için daha az sorun teşkil etmektedir. Bununla birlikte biyodağılım nedeniyle küçük lipozom çapları isteniyorsa, lipozomların yüksek taşıma kapasitesi proteinler gibi çok büyük terapötik moleküller için problem haline gelebilmektedir (Allen ve Cullis, 2004).

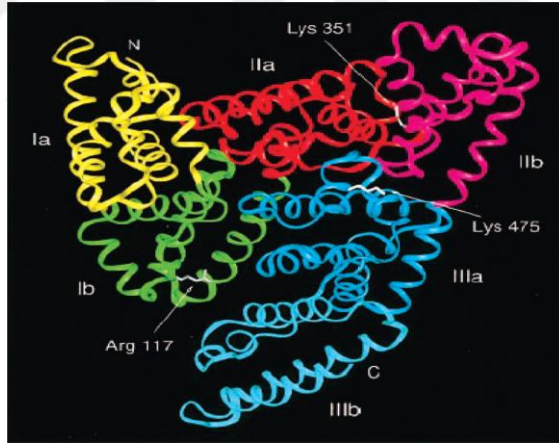
İlaç taşıyıcı sistem hedef dokuya ulaştığında, bu sistemin hedef hücreler için spesifikliğini arttıran metotların geliştirilmesi, makromoleküllerin hedef hücrelerin içindeki etkilerini daha verimli bir şekilde sunma yeteneklerini artırır. Bu zorlukların tanınması, hedefin daha gerçekleştirilebilir hale gelmesine yardımcı olacak yaklaşımlara olanak sunmaktadır (Allen ve Cullis, 2004).

2.3 İnsan Serum Albumini Nanoparçacıkları

Nanoparçacıklar, 10 ila 1000 nm arasında değişen katı veya koloidal partiküllerdir ve ilaç taşıyıcı platformlar olarak kullanılabilir (Singh ve Lillard, 2009). En son gelişmelere göre ilaç dağıtım sisteminin tasarlanmasında, düşük toksisite ile birlikte biyolojik uyumluluklarından ve biyolojik bozunabilirliklerinden dolayı protein bazlı nanoilaçlara odaklanılmıştır (Maham vd., 2009). Naoparçacıklar karmaşık kimyasal sentez veya karmaşık malzeme mühendisliği gerektirebilir. Bu nedenle, tamamen biyoyumlu ve immünojenik olmayan salım sistemlerinin basit ve güvenilir bir şekilde tasarlanması kanser terapisi için büyük önem taşımaktadır. İlaç taşınımı için çok işlevli bir protein olan insan serum albümini (HSA), toksik olmayan, immünojenik olmayan, biyoyumlu ve biyolojik olarak bozunabilir, özellikle uzun kan dolaşım süresine sahip olma özelliklerinden dolayı farmasötik alanında büyük ilgi çekmiştir (Sleep,

2015). Aynı zamanda, çeşitli ilaçlar için bir taşıyıcı görevi görebilen çok sayıda bağlanma yerine sahiptir.

Tek bir albumin monomeri, yaklaşık 7 nm çapında ve 66 kDa moleküler ağırlıktadır. İnsan serum albumininin kimyasal yapısı Şekil 2.2’de gösterilmiştir. Albumin, vücutta taşınan hidrofobik ilaçlarla bağlandığında, farmakokinetik profillerini iyileştirebilir. Buna ek olarak, albumin yükleme, geçirgenlik ve alıkonma (EPR) etkisinin artırılması sayesinde tümör hedeflemesi sağlanır. Ayrıca, albuminin, genellikle endotel hücre yüzeyinde bulunan ve birçok kanser hücre tipinin hücre zarı üzerinde aşırı eksprese edilen 60 kDa glikoprotein (gp60) reseptörüne spesifik olarak bağlanabileceği öne sürülmüştür. Bu bağlanma veziküllerin oluşumunu teşvik eder ve ilaçların sub-endotel boşluğuna verilmesine yol açar. HSA nanoparçacıkları, antikanser tedavileri alanında ilaç taşınımı için ilginç bir alternatif oluşturur (Fallacara vd., 2017).



Şekil 2.2 İnsan serum albumini kimyasal yapısı

HSA çoklu hidrofobik bağlanma uçları içerir ve doğal olarak birçok küçük molekülle terapötik ve görüntüleme ajanının taşıyıcısı olarak işlev görebilir.

Ayrıca, HSA (-COOH, -NH₂ ve -SH kısımları) üzerindeki amino asit kalıntılarından yararlanarak, terapötik ilaçlar, görüntüleme problemleri ve hedef ligandlar basit biyokonjugat kimyası ile HSA'ya kovalent olarak konjuge edilebilir. Bu olumlu avantajlarından dolayı, HSA, ilaçların ve görüntüleme problemlerinin taşınımı için ideal bir araç olarak kabul edilir. HSA bazlı bir dizi terapötik ve görüntüleme maddesi ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanmıştır. Örneğin, bir paklitaksel HSA bağlı nanoparçacık olan Abraxane, hem nanoilaç hem de albümin bazlı ilaç taşınım teknolojisi için bir dönüm noktası olmuştur (Han vd., 2017).

HSA yağ asitleri de dahil olmak üzere birkaç endojen bileşik taşımaktadır ve insan kanında bol miktarda serum proteini bulunmaktadır. HSA, yağ asitlerini dokulara iletmek için birincil taşıyıcıdır ve farklı spesifik yağ asitleri ile bağlanabilir. Çeşitli ilaç moleküllerini bağlama kabiliyeti ve farmakokinetik özelliklerini değiştirme kabiliyetine sahip olması nedeniyle farmasötik endüstrisinin ilgi odağı olmuştur. HSA, her biri iki alt etki alanı içeren (A ve B) ve 17 disülfür köprüleriyle stabilize edilmiş üç yapısal olarak benzer alandan (I, II ve III) oluşan küresel bir proteindir. HSA ayrıca N-terminalinde yüksek ilgili bir metal bağlama bölgesine sahiptir. HSA'nın birçok organik ve inorganik molekülle etkileşime girmesi ve bu proteinin hücre içi akıların yanı sıra birçok ilacın farmakokinetik davranışının önemli bir düzenleyicisidir. Araştırmalarda yağ asitlerinin HSA üzerindeki bağlanma uçları bulunmuştur. Bu nedenle, lipid kompleksinin protein sekonder yapısı, konformasyonu ve stabilitesi üzerindeki etkilerini incelemek için katyonik lipidlerin HSA ile sulu çözeltide bağlanmasının incelenmesi ilgi çekici bulunmuştur (Charbonneau vd., 2009).

Literatürdeki çalışmalarda, HSA nanoparçacıklarının, desolvasyon işlemi ile 150 ila 280 nm arasında bir boyutta ve tekrar üretilebilir büyüklükte hazırlanabileceğini göstermektedir (Langer vd., 2003). HSA molekülleri, çapraz bağlanarak 220 nm çapa sahip küresel ve negatif zeta potansiyeline sahip nanoparçacıklar olarak oluşturulmuştur (Norouzi vd., 2017)

Genel olarak, gluteraldehit (GLU) ile çapraz bağlanma, albümin nanoparçacıklarını stabilize etmek için en sık uygulanan stratejilerden biridir (McGregor vd., 2006; Van Miller vd., 2002).

Kovalent olmayan ilaç yüklemesi için HSA'da hidrofobik uçlara ek olarak, HSA'nın fonksiyonel grupları (örneğin karboksil, amino, fenolik hidroksil ve tiyol grupları) kovalent işlevselleştirme ve radyoışaretleme için de uygundur. ^{188}Re , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{125}I ve ^{177}Lu gibi radyoizotoplar ile işaretlenen albümin nanoparçacıkların insan ağız epitel hücresi (KB), insan karaciğer hücresi (Hep-G2), SMMC7721 gibi hücre hatlarında yapılan *in vitro* çalışmalara literatürde yer verilmiştir (Lin vd., 2016; Mülner vd., 2019; Zu vd., 2013). Radyoizotop işaretli HSA nanoparçacıklar, kanser teşhisi ve tedavisinde ilgi çekici bir araştırma konusu olmasının yanı sıra, HSA'nın çok yönlü rolünün kombine kemo-radyoizotop tedavisi için kullanılması henüz en iyi bilinen konular arasında yer almamaktadır (Tian vd., 2017). Şekil 2.3'te HSA nanoparçacıklarının radyoışaretleme gösterilmektedir.



Şekil 2.3 Radyoizotop işaretli HSA

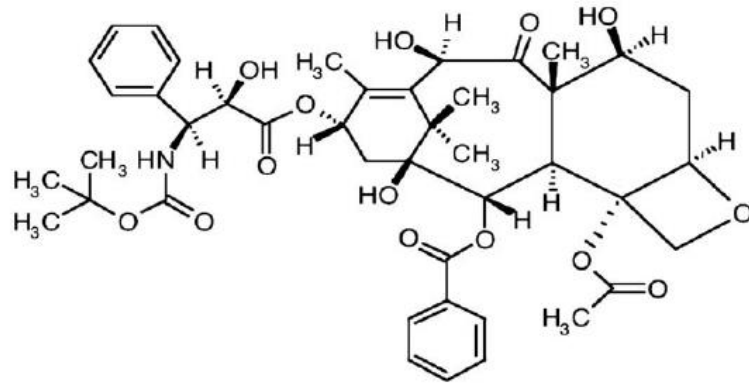
2.4 Doksetaksel

Prostat kanseri, erkekler arasında kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenlerinden biridir. Prostat kanserlerinin çoğu başlangıçta büyüme için androjenlere ihtiyaç duyarken, ileri seviyelerde, hormona dirençli bir duruma ilerleyebilirler. Doksetaksel bazlı sistemik kemoterapi, ileri fazdaki prostat kanserini tedavi etmek için önemli bir yaklaşımdır. Doksetaksel tedavisinin prostat kanserli hastalarda yaşam süresini ve kalitesini araştırmalar sonucunda ortaya konulmuştur (Xue vd., 2017).

Doksetaksel, ((2R, 3S) -N-karboksi-3-fenilizoserin, N-tert-butil ester, 13-ester ile 5b, 20-epoksi-1,2a, 4,7b, 10b ve 13a-hekzahidroksitaks-11-en-9-on4-asetat2-benzoat, trihidrat) (Şekil 2.4), yapısal olarak paklitakसेle benzer fakat daha etkilidir. Katı kanserlerin tedavisinde sıkça kullanılan bir kemoterapötik ajandır. Doksetaksel, büyük hücreli akciğer kanseri, metastatik kastrasyona dirençli prostat kanseri (mCRPC), meme kanseri, baş ve boyun kanseri dahil olmak üzere birçok katı tümörün tedavisi için onaylanmıştır. Bu kanserlerin çoğu tipik olarak organ fonksiyon bozukluğu olan ve çeşitli ilaçlar kullanan yaşlı insanlarda görülür. Minimum toksisite elde etmek için bireysel olarak hastalarda optimum dozu belirlemek zordur. Sistemik doksetaksel maruziyeti ve etkinliği arasındaki mevcut korelasyona rağmen, doketaksel farmakokinetiğini etkileyen kesin faktörler henüz tam olarak anlaşılmamıştır. Örneğin, doksetaksel dozajlarını hesaparken karaciğer bozukluğu dikkate alınmalıdır, çünkü doksetaksel temizlenmeyi azaltabilir. Ek olarak, ilaç-ilaç etkileşimleri, doksetaksel kullanılırken belirgin klinik öneme sahip olabilir. Özellikle, ketokonazol gibi CYP3A4'ü kuvvetle inhibe eden ilaçların, aynı zamanda doksetakselin temizlenmesini azaltabilecekleri için, doz modifikasyonu olmadan uygulanmaması gerekir. Cinsiyet, hadım durumu ve menopoz durumu, doksetaksel farmakokinetiğini etkileyen potansiyel faktörler olarak önemli olabilir. Doksetaksel farmakokinetiğinin öngörülmesinde farmakogenetiklerin rolü halen sınırlıdır. Çünkü klinik öneme sahip hiçbir polimorfizm bulunmamıştır (Nieuweboer vd., 2015).

Dosetakselin farmakokinetiği (PK) % 30 ile % 45 arasındadır ve oldukça değişkendir. Bu nedenle, hastalarda bireysel olarak dosetakselin toksisitesini ve antitümör aktivitesini tahmin etmek zordur. İdeal olarak, dosetakselin etkinliğini artırmak için hastalara uygun bireysel olarak farklı dozlar verilir. Bazı kemoterapötik ilaçlar, dosetaksel ile birlikte kullanıldığında, meme, pankreas, ürotelyalkarsinomlar ve mide kanserli hastalarda antikanser etkinliği yalnız kullanılmalarına göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Dosetakselin, 37 ° C'de ve pH 7.4'te bağlanan plazma proteininden % 98 daha büyük olduğu gösterilmiştir (Cheng vd., 2009).

Avrupa porsuk iğnesi bitkilerinden çıkarılan 10-deasetilbakatin III'ün kimyasal modifikasyonundan elde edilen dosetaksel (DTX), hücre döngüsünün G2/M fazını bloke eder ve mikrotüblerin depolimerizasyonunu önler. DTX'in düşük çözünürlüğünden dolayı, Sanofi A.Ş. tarafından Taxotere ticari ünvanına sahip geleneksel formülasyonunda polisorbata 80 ve etanol kullanılır. Polisorbata 80 kullanımı, daha sonra aktivite ve toksisite profilleri, aşırı duyarlılık, periferik nöropati, nötropeni ve stomatit/mukozit ve diğer ortak etkileşimlerin değişkenliğini indükleyebilen DTX'in farmakokinetiğini değiştirebilir (Nateghian vd., 2016). Şekil 2.4'te dosetakselin kimyasal yapısı verilmiştir.



Şekil 2.4 Dosetakselin kimyasal yapısı

Geleneksel kanser kemoterapisinde, kanser hücrelerinin öldürülmesinde doğrusal bir artış elde etmek için üssel bir şekilde uygulanan sitotoksik ilacın miktarını arttırmak gerekir. Bu nedenle, saç, cilt ve bağırsak hücreleri gibi normal hücreler spesifik olmayan sitotoksitede istenmeyen artışlardan etkilenebilir (Nateghian vd., 2016).

Dosetaksel taşıyıcıların aktivitesi, potansiyel olarak dosetakselin farmakokinetiğini etkileyen ilaç-ilaç etkileşimleri nedeniyle değişebilir. En büyük ilaç taşıyıcı ailesi pasif taşıyıcılardan oluşmaktadır (toplam taşıyıcı miktarının % 48'ini oluşturan çözünen taşıyıcılar (SLC)). Dosetaksel, SLC22A7, SLCO1B1, SLCO1B3, SLC22A7 ve muhtemelen SLCO1A2 'nin bilinen bir substratıdır. SLC'lerin yanı sıra, ATP bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcılarının üyeleri, çoklu ilaç direnci ve çeşitli antikanser ilaçların farmakokinetiği bakımından yoğun bir şekilde çalışılmaktadır. Dosetakselin, ABCB1 (ATP bağlayıcı kaset taşıyıcı B1, p-glikoprotein (p-gp)), ABCC2 (kanaliküler multispesifik organik anyon taşıyıcı 1 (cMOAT), MRP2) ve ABCC10 (çoklu ilaç direnci ile ilişkili protein 7 (MRP7)) tarafından taşındığı bilinmektedir (Nieuweboer vd., 2015).

Dosetakselin mide-bağırsak emilimi sınırlıdır. Bunun nedeni, ABCB1'in direkt olarak dosetakseli bağırsak lümeni veya safraya salgılamasıdır. Üstelik, dosetakselin biyoyararlanımı, karaciğerin ilk geçiş etkisi ile büyük ölçüde azalmaktadır. Dosetaksel şu anda sadece intravenöz yoldan uygulanmaktadır. Oral olarak verilen dosetaksel uygulamalarında yan etkilerin azaltılması ve dosetakselin biyoyararlanımını artırmak için araştırmalar devam etmektedir (Nieuweboer vd., 2015).

Dosetakselin % 90'ından fazlası plazma proteinlerine bağlanır. Lipofilik özellikleri nedeniyle, dosetaksel, çeşitli dokularda birikim gösteren, büyük bir dağılım hacmine sahiptir. Kanser hastalarındaki biyodağılım çalışmalarına dayanarak, karaciğerde ve safra kesesinde yüksek miktarda dosetaksel tutulumu görülürken, ince bağırsaklarda, böbreklerde, kemik iliğinde, akciğerlerde ve mesanede daha az tutulum görülmüştür. Beyinde dosetaksel tutulumu, ABCB1 ve ABCC2 gibi taşıyıcıları içeren etkili bir kan beyin bariyeri nedeniyle sınırlıdır (Clarke vd., 1999; Van der Veldt vd., 2010; Deeken vd., 2007).

Dosetaksel karaciğerde metabolize edilir. Tutulum, SLC ailesine ait olan Organik Anyon Aktarma Peptitleri (OATP) 1B1 ve OATP1B3 gibi alım taşıyıcıları yoluyla kolaylaştırılır. Bu taşıyıcılar, dosetakselin sinüzoidal kandan hepatositlere alımına aracılık eder. Iusuf ve arkadaşları kısa süre önce OATP1A2'nin de in vivo olarak dosetaksel alımına dahil olduğunu bulmuşlardır (Graan Aj vd., 2012; Baker vd., 2009; Iusuf vd., 2015).

Dosetaksel suda çözünürlüğü çok düşük olan ve yaygın olarak kullanılan bir kemoterapötik ajandır. DTX'in insan serum albuminine konjugasyonu, suda çözünürlüğünü arttırmada etkili bir yoldur (Nagethian vd., 2016).

2.5 Radyoiodinasyon ve ¹³¹I ile İşaretleme

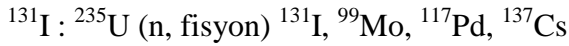
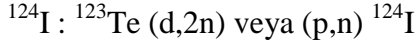
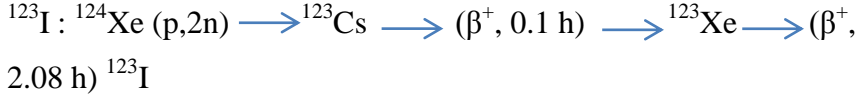
Nükleer tıp, hastalığın teşhisinde ve tedavisinde, radyofarmasötik olarak adlandırılan radyoizotoplar içeren ilaçların kullanılmasını içerir. Bu radyofarmasötikler radyoaktif izotop içermektedir ve belirli bir hastalık veya vücut işlevlerinin görüntülenmesini sağlamaktadırlar. Bu teknikler organ yapısı ve fonksiyonu hakkında bilgi sağlamaktadırlar. Gama ve pozitron yayan radyonüklidlerin çeşitliliğine bağlı olarak tanısal nükleer tıpta kullanılmak üzere çok çeşitli radyofarmasötikler geliştirilmiştir (Hart, 2006).

Radyoaktif iyot (¹³¹I), 1940'lerden bu yana tiroid hastalıklarının tedavisinde yaygın olarak kullanılmıştır. ¹³¹I, negatif β bozunması yapar. Bu bozunmada açığa çıkan maksimum enerji 606 keV (%90), ortalama enerji ise 192 keV'dir. Dokuda 0,8 mm'lik bir yol katedebilmektedir. 8.04 gün yarılanma süresinden dolayı tedavi için tercih edilmektedir (Mumtaz vd., 2009; Mody vd., 2015).

¹³¹I ayrıca görüntüleme için kullanılacak yüksek enerjili gama radyasyonu (364 keV, %10) yayar. Yüksek enerjili gama emisyonu düşük çözünürlüklü görüntülere yol açar. Bununla birlikte, uzun yarı ömür, gizli metastatik hastalıkların saptanmasında faydalı olmaktadır. Çünkü görüntüleme, radyofarmasötiğin alınmasından birkaç gün sonra yapılabilir.

Çizelge 2.2’de iyot izotoplarının bozunma çeşitleri, yarı ömürleri ve uygulama alanları ile ilgili bilgiler verilmiştir.

İyot izotoplarının elde edilmeleri:



Çizelge 2.2 İyot izotoplarının bozunma çeşitleri, yarı ömürleri ve uygulama alanları

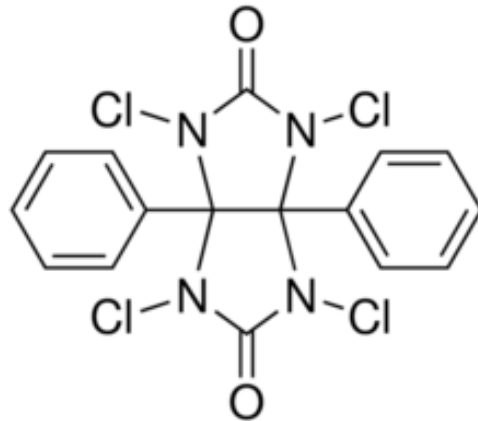
izotop	Bozunma çeşidi (%)	Yarı ömür	Uygulama
¹²⁰ I	β ⁺ (56), EC(44)	1.35 saat	PET
¹²² I	β ⁺ (77), EC(33)	3.6 dakika	PET
¹²³ I	EC(100)	13.2 saat	SPECT
¹²⁴ I	β ⁺ (22), EC(78)	4.8 gün	PET
¹²⁵ I	EC(100)	60 gün	Radyoterapi
¹³¹ I	β ⁺ (90), EC(10)	8.04 gün	SPECT/PET

Klasik iyodinasyon yaklaşımı ile farmakolojik/biyolojik olarak aktif bileşiklerin radyoiyodinasyonu, izotopun yarı ömrü, kullanılan konsantrasyonlar, *in vitro* stabilite, radyoişaretli ilacın plazma proteinine bağlanması ve canlı sistemlerde biyodağılım gibi birçok önemli parametre göz önünde bulundurularak yapılabilir. Farmasötiğin radyoiyot ile işaretlenmesiyle lipofilik verimin artmasının, öncüllerin fizikokimyasal ve *in vivo* veya *in vitro* farmakolojik özellikleri üzerinde kayda değer değişiklikler sağlayabildiği bilinmektedir. Bu nedenle, söz konusu etkilerden kaçınmak için, radyoiyodinun hedef farmasötik üzerindeki konumu dikkate alınmalıdır. Farmakolojik özelliklerin yanı sıra iyotlu bileşiğin toksikolojik özelliklerini araştırmak önemlidir (Mushtaq vd., 2016).

İşaretleme yerinin seçimi tamamen işaretlenecek maddelerin kimyasal, biyolojik ve yapısal özelliklerine bağlıdır. Yapısal motifler, genellikle elektrofilik veya nükleofilik özellik gösterir. Bu, *in vivo* stabilitesi yüksek olan güçlü karbon-iyot bağı oluşumuna yol açar; örneğin: vinilik veya aromatik bileşikler üzerine yer değiştirme reaksiyonu ile radyoiyot bağlanır (Mushtaq vd., 2016).

İodojen Yöntemi

İyot ile işaretleme iodojen ve Kloramin-T gibi yöntemlerle gerçekleştirilebilir. İodojen, Kloramin-T'ninkine benzer veya daha düşük radyokimyasal verim sağlayan, ancak etiketlenecek peptitler, hücre membranları ve proteinlere asgari hasarlara neden olan bir oksitleyici madde olan 1,3,4,6-tetrakloro-3a,6a difenilglikolürün (Şekil 2.5) ticari ismidir. İodojen sulu fazda çözünmez, ancak diklorometan veya kloroform gibi bazı uçucu organik çözücülerde çözülür ve reaksiyon kabına aktarılır. Organik çözücünün buharlaştırılmasıyla ince bir oksitleyici madde tabakası elde edilir. Bu şekilde iyodun iodojenle etkileşimi ve işaretleme veriminin artması sağlanır (Yurt F., 1998). Bir reaksiyon kabında, radyoiyot ile birlikte işaretlenecek sulu bir bileşik çözeltisinin, oksitleyici ajan ile etkileşmesine izin verilir, ardından sulu karışım çıkarılır. Bu işaretleme, aktif aromatik gruplar içeren bileşikler için uygundur (Mushtaq vd., 2016).



Şekil 2.5 İodojenin yapısal formülü

İodojen hafif oksitleyici ajandır, bu yüzden oksidatif yan reaksiyonların olasılığı oldukça düşüktür. İodojen, reaksiyon kabının duvarlarına kaplanarak yüksek verim ile işaretlenebilmektedir. İodojen kaplı tüp, 1 mg iyodojenin 1 mL diklorometan içerisinde çözülüp, çözücünün buharlaştırılması ile elde edilir (Yurt vd., 2016).

2.6 İnce Tabaka Radyo Kromatografisi (TLRC)

Kromatografi tekniği diğer ayırma tekniklerinin yeterli olmadığı durumlarda öncelikle fiziksel ve kimyasal nitelikleri çok benzeyen maddelerin ayırma işleminde kullanılmaktadır. İnce tabaka kromatografisi (TLC), düzlemsel kromatografi tekniğidir. TLC yaygın olarak kullanılan kromatografi yöntemlerinin en basitidir. Radyoışaretli maddelerin bağlanma verimlerinin analiz edildiği uygulamalar ince tabaka radyo kromatografisi olarak adlandırılır. Bu teknikte kalitatif ve yarı kantitatif analiz yapmak için, çözücü içeren uygun kapalı bir kap ve TLC şeritleri gerekmektedir. Tekniklerin ve malzemelerin optimizasyonu ile yüksek verimli ayırmalar, doğru ve kesin ölçümler elde edilebilmektedir.

Analiz gerçekleştirilirken sabit fazın bir ucuna numune damlatılır ve numune hızlı bir şekilde kurutulur. Sabit fazın ucu, kapalı bir kap içerisinde çözücü karışım olan hareketli faza yerleştirilir. Sabit faz ve mobil faz doğru seçildiyse, karışımın bileşenleri, hareketi fazın sabit faz boyunca hareketi sırasında farklı oranlarda göç eder. Mobil faz uygun bir mesafeye kadar ulaştığında sabit faz çıkarılır ve hızlı bir şekilde kurutulur. Bölgeler gün ışığı veya ultraviyole (UV) ışık altında tespit edilir.

Kromatografik tutma ve seçiciliğe dahil olan etkileşimler, hidrojen bağı, yük transferi, iyon-iyon, iyon-dipol ve van der Waals etkileşimleridir. TLRC'deki bileşenlerin tanımlanması ölçülen R_f değerlerinin standartları ile karşılaştırılmasına dayanmaktadır. R_f değerlerinin değişmesine neden olan faktörler arasında TLC şeritinin boyutu, türü, yapısı, mobil fazın akış yönü, mobil fazın hacmi ve bileşimi, dengeleme koşulları yer almaktadır (Sherma ve Fried, 2011).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

3.1.1 Kullanılan Kimyasallar

- Dasetaksel (Koçak Farma)
- Gluteraldehit (Karaca Chemicals)
- Etanol (Merck)
- Metanol (Merck)
- İnsan serum albumini (Sigma Aldrich)
- 1,3,4,6-Tetrakloro-3 α ,6 α -difenil-glikoril (İyodojen) (Sigma Aldrich)
- Na¹³¹I (Ege Üniversitesi Hastanesi, Nükleer Tıp Anabilim Dalı)
- n-oktanol (Merck)
- n-bütanol (Merck)
- Asetik asit (Merck)
- Amonyak (Merck)
- Fetal sığır serumu (FBS) (Biological Industries)
- Tripsin EDTA (1X) (Biological Industries)
- Rorwell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 hücre kültürü ortamı (Biological Industries)
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) hücre kültürü ortamı (Biological Industries)
- Fosfat tamponlu salin (PBS) (Amresco)
- 3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolyumbromid (MTT) (Sigma Aldrich)
- Diklorometan (Merck)
- TLC selüloz F (Merck Plastik plaka 20x20)
- PC-3 insan prostat (adenokarsinoma) hücre hattı (American Type Culture Collection, Rockville, MD, ABD)
- RWPE insan prostat hücre hattı (American Type Culture Collection, Rockville, MD, ABD)

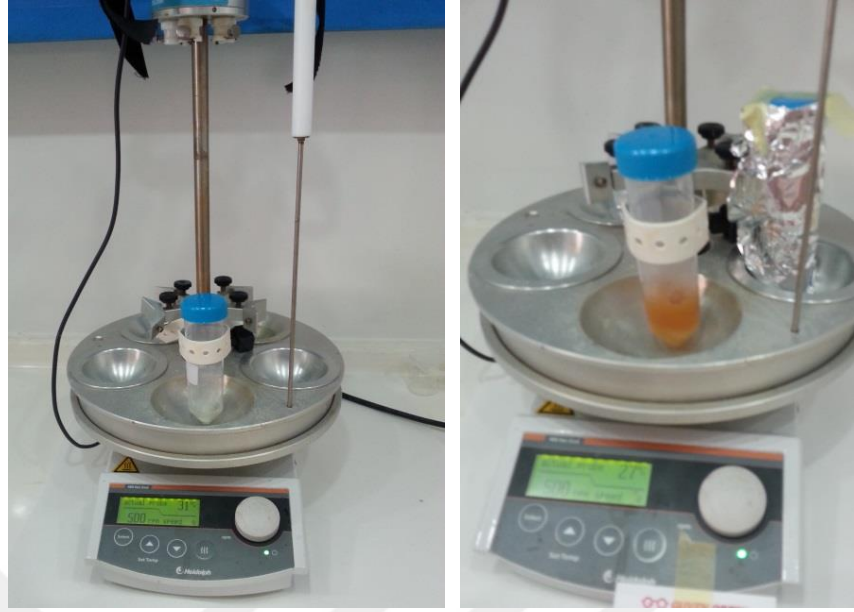
3.1.2 Kullanılan Cihazlar

- Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi-FTIR (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü)
- Dinamik ışık saçılımı boyut ve zeta potansiyel ölçüm sistemi-DLS (Marvern NanoZS90, Birleşik Krallık) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü)
- UV-VIS spektrometresi (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü)
- TLC Bioscan (AR2000, Berlin Almanya) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü)

- Doz kalibratörü (Bidex AtomLamb 100 Plus) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü)
- Santrifüj cihazı (Nüve CN180) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü)
- Vorteks cihazı (Ika) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü)
- Isıtıcı manyetik karıştırıcı (Ika) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü)
- CO₂ inkübatörü (Sanyo) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü)
- Laminar flow kabin (Thermo) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü)
- Invert mikroskop (Leica) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü)
- Işık mikroskobu (Olympus) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü)
- Otoklav (Hirayoma) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü)
- Hassas terazi (Ohaus, Pioneer PA214C) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü)
- Ultrasonik banyo (CEIA CP104 Standard Ultrasonic Cleaner) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü)

3.2 İnsan Serum Albumin Nanoparçacıklarının Sentezi

HSA nanoparçacıkları daha önce yayınlanan çalışmalardaki prosedürlere göre sentezlenmiştir (Redin vd., 2018; Fallarca vd., 2017; Iwao vd., 2018). 1 mL insan serum albumini, 1 mL bidistile suyla seyreltilmiştir. Manyetik karıştırıcıda oda sıcaklığında 500 rpm'de 30 dakika karıştırılmıştır. Manyetik karıştırıcıda karışmakta olan çözeltiliye 8 mL etanol şırınga pompası kullanılarak 1 mL/dakika hızla damla damla eklenmiştir. 0.1 M'lık amonyum hidroksit (NH₄OH) eklenerek pH 9'a getirilmiş ve çapraz bağlayıcı olarak 240 µL % 8'lik gluteraldehid yine şırınga pompası kullanılarak 1mL/dakika sabit hızla damla damla ilave edilmiştir. Eklenen gluteraldehit ile birlikte karışımın renginin kahverengiye döndüğü gözlemlenmiştir. Bu renk değişimi Şekil 3.1'de gösterilmiştir. Karışım oda sıcaklığında 500 rpm sabit hızda 24 saat karıştırılmıştır. 24 saat sonunda pH'ı 6 olduğu gözlemlenen karışım 10000 rpm'de 20 dakika santrifüjlenerek fazlarına ayrılmıştır. Üst faz ayrıldıktan sonra, bidistile su kullanılarak 2 kez yıkama işlemi uygulanmış ve süpernatant ayrılmıştır. Dipte kalan pellet liyafilizatör yardımıyla kurutulmuş ve kuru insan serum albumin nanoparçacıkları elde edilmiştir. Elde edilen nanoparçacıklar +4 °C'de saklanmıştır.



A

B

Şekil 3.1 Karışıma gluteraldehit eklenmeden öncesi (A), sonrası (B)

3.3 İnsan Serum Albumini Nanoparçacıklara Dosetaksel Yüklenmesi

Bir mg HSA nanoparçacık hassas terazide tartılmış ve 1 mL ultra saf suda vorteks yardımıyla dispers edilmiştir. Oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda 500 rpm sabit hızda 90 dakika boyunca karıştırılmıştır. Karışmaya devam eden HSA nanoparçacıklarına 1 mL (20 mg) dosetaksel damla damla eklenmiş, bu işlem sırasında tüpün ışıkla teması kesilmiş ve 24 saat karışmaya bırakılmıştır. Karıştırma işlemi sonrasında 10000 rpm hızda 10 dakika santrifüjlenerek üst faz ayrılmıştır. Dosetaksel yükleme verimini saptamak için ayrılan üst faz +4 °C'de ışık görmeyecek şekilde saklanmıştır. Süpernatanta 5 mL bidistile su eklenerek 10000 rpm'de 10 dakika santrifüjle yıkama işlemi uygulanmıştır. Yıkama işleminden sonra ayrılan pelet kurutulularak +4°C'de ışık görmeyecek şekilde saklanmıştır.

3.4 Doseksel Yüklü İnsan Serum Albumin Nanoparçacıklarının Stok Çözeltisinin Hazırlanması

Yapılacak deney ve analizlerde kullanılmak üzere, kurutulan doseksel yüklü HSA nanoparçacıklara (DTX-HSA np) 500 µL bidistile su eklenmiştir ve vorteks kullanılarak katı haldeki nanoparçacıkların su içerisinde homojen olarak dispers olması sağlanmıştır.

3.5 Nanoparçacıkların Karakterizasyonu

Hazırlanan HSA nanoparçacıkların ve doseksel yüklü HSA nanoparçacıkların karakterizasyonu FTIR, DLS, SEM ve UV-VIS spektrometre cihazları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.5.1 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi ile Analizler

HSA nanoparçacıkları ve DTX-HSA nanoparçacıklarının FTIR analiz spektrumları FTIR (Perkin Elmer, Waltham, USA) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Karakterizasyon amacıyla insan serum albuminin FTIR analizi yapılmıştır.

3.5.2 Dinamik Işık Saçılımı Analizleri

HSA nanoparçacıkların ve DTX-HSA nanoparçacıkların DLS ile karakterizasyonu Zetasizer (Marvern NanoZS90, United Kingdom) cihazı ile yapılmıştır. Tanecik boyutu ve zeta potansiyelleri belirlenmiştir. Boyut analizlerinde çözgen olarak ultra saf su kullanılmış ve 0.22 µm filtreden geçirilmiştir. Nanoparçacıkların hidrodinamik çapları belirlenmiştir. Zeta potansiyeli ölçümleriyle ise, HSA nanoparçacık ve DTX-HSA nanoparçacıkların yüzey yükü tayin edilmiştir. Nanoparçacıklar ultra saf suda dispers edilerek küvetlerde ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Zetasizer cihazı Şekil 3.2'de verilmiştir.



Şekil 3.2 Zetasizer cihazı

3.5.3 UV-VIS Sepktrometresi Analizleri

HSA nanoparçacıklarına yüklenen dosetaksel miktarının saptanması için UV-VIS spektrometre cihazı kullanılmıştır. Bunun için farklı konsantrasyonlarda dosetaksel çözeltileri hazırlanarak 283 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Konsantrasyona karşı absorbans değerleri kullanılarak bir standart grafik oluşturulmuştur. DTX-HSA nanoparçacıkların hazırlanması sırasında ayrılan üst fazın absorbansı ölçülmüştür. Standart grafiğinden yararlanarak HSA nanoparçacıklarına yüklenen dosetaksel miktarı hesaplanmıştır.

3.5.4 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

HSA ve DTX-HSA nanoparçacıklarının morfolojileri taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak incelenmiştir.

3.6 DTX-HSA Nanoparçacığın Salım Deneyleri

DTX'in DTX-HSA nanoparçacıklarından *in vitro* ilaç salınımı, fosfat tamponu içinde gerçekleştirilmiştir (PBS, pH 7.4 ve 5.8). 1 mg/mL DTX-HSA nanoparçacıkları tüpe aktarılmıştır, daha sonra 5 mL salınım ortamına (PBS) yerleştirilmiştir ve 120 rpm'de, 37°C'de çalkalanmıştır. Önceden belirlenmiş farklı zamanlarda, çözelti 10000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatantlar, DTX miktarını bulmak için UV-Vis spektrometresi ile analiz edilmiştir. Analizler her zaman aralığı için üç kez yapılmıştır. Sonuçlar yüzde cinsinden kümülatif ilaç salınımını hesaplamak için kullanılmış ve zamana bağlı yüzde ilaç salınımı grafiği çizilmiştir.

3.7 İodojen Kaplı Tüplerin Hazırlanması

Radyoışaretleme deneylerinde kullanılmak üzere her 1.5x6 cm'lik tüp için 1 mg iodojen (1,3,4,6-Tetrakloro-3 α -6 α -difenil-glikoril) tartılıp, 250 μ L diklorometan (CH₂Cl₂) içerisinde çözülmüştür. Oda sıcaklığında çözgenin uçması ve tüpteki iodojenin çeperlere ince film tabakası şeklinde kaplanması sağlanmıştır. Hazırlanan iodojen film kaplı cam tüpler +4°C'de saklanmıştır.

3.8 Dosetaksel, HSA ve DTX-HSA Nanoparçacıkların ¹³¹I ile İşaretlenmesi ve Kalite Kontrolü

DTX, HSA nanoparçacıkları ve DTX-HSA nanoparçacıklarının radyoışaretleme işlemi ¹³¹I kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Radyoışaretleme iodojen metodu kullanılarak yapılmıştır.

2 mg HSA nanoparçacık 1 mL saf su içerisinde dispers edilerek stok çözeltisi hazırlanmıştır (2 mg/mL). Radyoışaretleme için bu stoktan 100 μ L alınmış ve iodojen kaplı cam tüplerde 555x10⁴ Bq aktivitede ¹³¹I ile işaretlenmiştir. Radyoışaretleme farklı pH'larda (pH=3, 4, 8 ve 9.5) 40 dakika inkübasyon süresinde gerçekleştirilmiştir. Deneyler sonunda optimum işaretleme pH'ı saptanmıştır.

Dosetakselin işaretlenmesi ise şişeden 100 µL DTX çekilerek 150 µCi ¹³¹I ile iodojen kaplı tüplerde 40 dakika inkübe edilerek gerçekleştirilmiştir.

DTX-HSA nanoparçacığının radyoişaretlenmesinde daha önceden hazırlanan 500 µL stok çözeltiden 100 µL çekilerek 555x10⁴ Bq ¹³¹I ile iyodejen kaplı tüplerde 40 dakika inkübe edilmiştir. İşaretleme farklı pH'larda gerçekleştirilmiş (pH 3, 4, 8 ve 9.5) ve işaretleme verimine olan etkisi incelenmiştir.

Radyoişaretleme verimi ince tabaka radyokromatografisi yöntemi ile belirlenmiştir. İşaretleme verimini belirlemek amacıyla yükseltgenmiş ¹³¹I, Na¹³¹I, ¹³¹I-HSA, ¹³¹I-DTX, ¹³¹I-DTX-HSA örnekleri 1.2x10 cm boyutlarda kesilmiş selüloz kaplı TLC şeritlerine, taban noktasından 0.5 cm yukarısında olacak şekilde damlatılmıştır. Mobil faz olarak n-bütanol-su-asetik asit (4-2-1) ve metanol-su (9-1) banyoları hazırlanmıştır. TLC şeritleri bu tanklara yerleştirilip çözgenin yeteri kadar ilerlemesi beklenmiştir. Çözgenler yeterince ilerledikten sonra çözgenin yürüme mesafesi işaretlenmiş ve oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan TLC şeritlerinin üzeri kaplanarak TLC Bioscan cihazında kromatogramları alınmıştır. R_f değerleri (maddenin yürüdüğü mesafe / çözgenin yürüdüğü mesafe) ve % işaretlenme verimi saptanmıştır.

3.9 Radyoişaretli DTX-HSA Nanoparçacıkların Lipofilite Tayini

Lipofilite tayini için optimum koşullarda ¹³¹I ile işaretlenen DTX-HSA nanoparçacığından 50 µL alınarak içinde 3 mL n-oktanol ve 3 mL su bulunan falkonlara konulmuştur. Falkonlar 1 saat vorteksenerek karıştırılmıştır. Fazların ayrılmasını sağlamak içinse 2500 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Alt faz ve üst fazdan 500'er µL alınarak ependorflara konulmuş ve Cd(Te) dedektörü ile aktiviteleri sayılmıştır. Aynı işlem 3 kez tekrarlanmıştır.

3.10 ¹³¹I-DTX-HSA Nanoparçacıkların *in vitro* Stabilitesi

In vitro stabilite çalışması radyoşaretli DTX-HSA nanoparçacıkların raf ömrünü belirlemek için yapılmıştır. Bu nedenle bileşik işaretlenip inkübasyon süresi dolduktan sonra temiz bir tüpe alınarak reaksiyon durdurulmuştur. 0. dakikada verimini ölçmek için TLC şeritlerinin üzerine damlatma yapılmış ve n-bütanol-su-asetik asit mobil fazı ve metanol-su mobil fazını içeren tanklara konulmuştur. Çözgen yeteri kadar yürüdüğünde tanktan alınarak kurutulmuş ve TLRC Bioscan cihazında örnekler taratılmış ve kalite kontrolleri gerçekleştirilmiştir. Aynı işlem 30, 60, 180 ve 1440. dakikalarda da gerçekleştirilerek ¹³¹I-DTX-HSA nanoparçacıkların *in vitro* stabilitesi saptanmıştır.

3.11 Hücre Kültürü

Hücre kültürü çalışmaları, PC3 insan prostat kanseri hücresi ve RWPE-1 insan prostat epiteli hücre hatları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. RWPE-1 hücreleri için % 20 FBS, % 1 L-glutamin, %1 sodyum pürüvat, esansiyel aminoasitler ve % 1 penisilin-streptomisin içeren RPMI 1640 ortamında kültüre edilmiştir. PC3 hücreleri için ise % 1 L-glutamin, %1 sodyum pürüvat, esansiyel aminoasitler ve % 1 penisilin-streptomisin içeren DMEM ortamında kültüre edilmiştir. Hücreler, 37°C'de % 5 CO₂ içeren inkübatörde muhafaza edilmiştir. MTT (3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolyum bromid) testi ile, DTX yüklü HSA nanoparçacığının PC3 ve RWPE-1 hücreleri kullanılarak, bu hücreler üzerindeki toksisitesi tespit edilmiştir. Bununla birlikte ¹³¹I ile işaretli DTX-HSA nanoparçacığının PC3 ve RWPE-1 hücrelerindeki tutulumu yüzdesel olarak hesaplanmıştır.

3.11.1 MTT Testi

PC-3 ve RWPE-1 hücre hatları sırasıyla DMEM ve RPMI 1640 ortamlarında 96'lık platelere ekilerek 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda, hücreler üzerindeki besiyer uzaklaştırılmış ve kuyucuklar PBS ile 1 kez yıkanmıştır. Daha sonra hücreler üzerine serum içermeyen besiyer ve 5, 10, 20, 50, 75 ve 100 nM konsantrasyonlarında DTX-HSA nanoparçacığı eklenmiş ve 24 saat 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda, hücreler üzerindeki besiyer uzaklaştırılmış ve MTT solüsyonu uygulanarak hücrelerin yüzde canlılık oranı hesaplanmıştır. MTT solüsyonunu hazırlamak içinse, 0,5 mg/ml MTT içeren solüsyon, kuyucuk başına 100 µl olarak hücreler üzerine eklenmiş ve 37°C'de 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. Üç saat sonunda, MTT solüsyonu uzaklaştırılmış ve MTT kristallerini çözmek için 100 µl DMSO hücreler üzerine eklenmiştir. Kuyucukların absorbansı 550 nm'de mikropłaka okuyucu ile ölçülmüştür. Yüzde hücre canlılığı, hiçbir bileşik uygulanmamış kontrol grubu canlılığı % 100 kabul edilerek ve hücresiz kuyucukların absorbansı ilişkili oldukları kuyucukların absorbansından çıkarılarak hesaplanmıştır.

3.11.2 DTX-HSA Nanoparçacığının *In Vitro* Hücre Tutulum Deneyi

¹³¹I radyonüklidi, ¹³¹I ile işaretli DTX-HSA nanoparçacığının hücrelerindeki tutulum potansiyeli incelenmiştir. *In vitro* tutulum deneyleri Yurt et al. (2017) ve Yurt et al. (2018) çalışmaları esas alınarak gerçekleştirilmiştir. PC3 ve RWPE1 hücre hatları, 24 saatte % 80 konfluent olacak şekilde 24 kuyucuklu plakalara ekilmiştir (kuyucuk başına 40.000 hücre). 24 saat sonunda hücreler üzerindeki besiyer uzaklaştırılmış ve yerine kuyucuk başına 500 µl hacminde ve 10 µCi aktivitede ¹³¹I, 10 nM ¹³¹I-DTX-HSA nanoparçacıkları eklenmiştir. Hücreler 37°C'de farklı sürelerde (1, 2, 4 ve 24 saat) inkübasyona bırakılmıştır. Her inkübasyon süresi ve her hücre hattı için ayrı plakalar hazırlanmıştır. İnkübasyon süresi dolan plakalardaki kuyucukların aktivitesi Cd(Te) RAD-501 tek kanallı gama sayım sistemi ile sayılmıştır (A₀). Daha sonra kuyucuklar üzerindeki besiyer uzaklaştırılarak PBS ile yıkanmıştır. Yıkamadan sonra kuyucuklara 500'er µl PBS

eklenmiş / resuspense edilmiş ve tekrar aktiviteleri sayılmıştır (A_1). Sayımlar tamamlandıktan sonra $(A_1/A_0) \times 100$ formülü ile % tutulum verimi hesaplanmıştır.



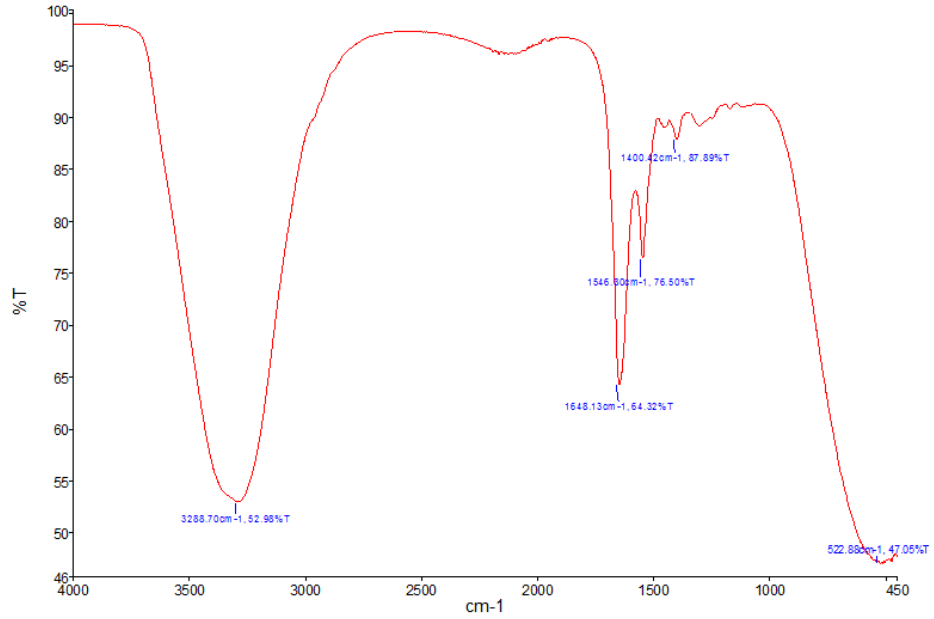
4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1 HSA Nanoparçacıklarının ve Doksetsel Yüklü HSA Nanoparçacıklarının Karakterizasyonu

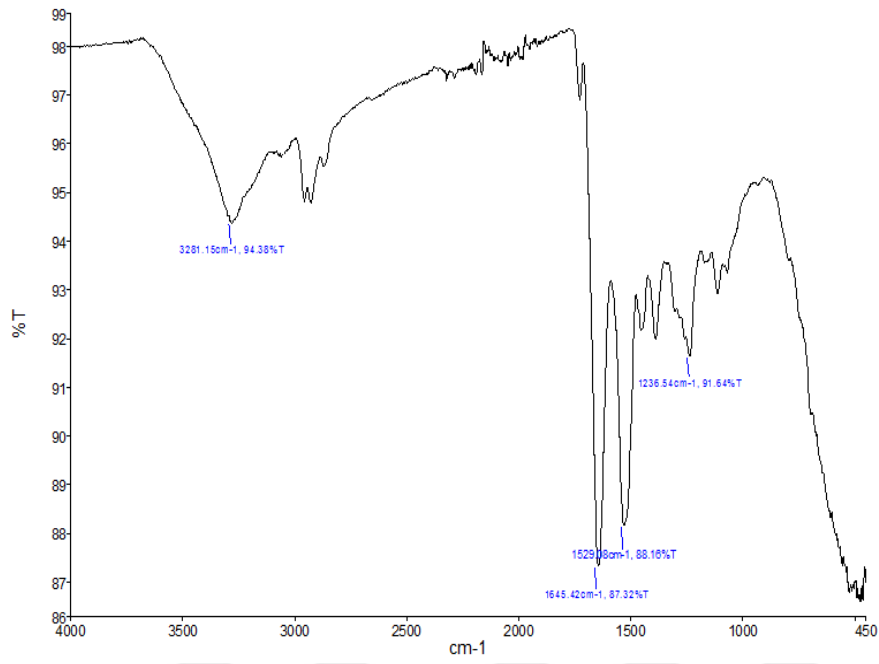
HSA ve DTX-HSA nanoparçacıklarının karakterizasyonları DLS, FTIR ve SEM cihazları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4.1.1 Fourier Dönümlü Kızılötesi Spektroskopisi Sonuçları

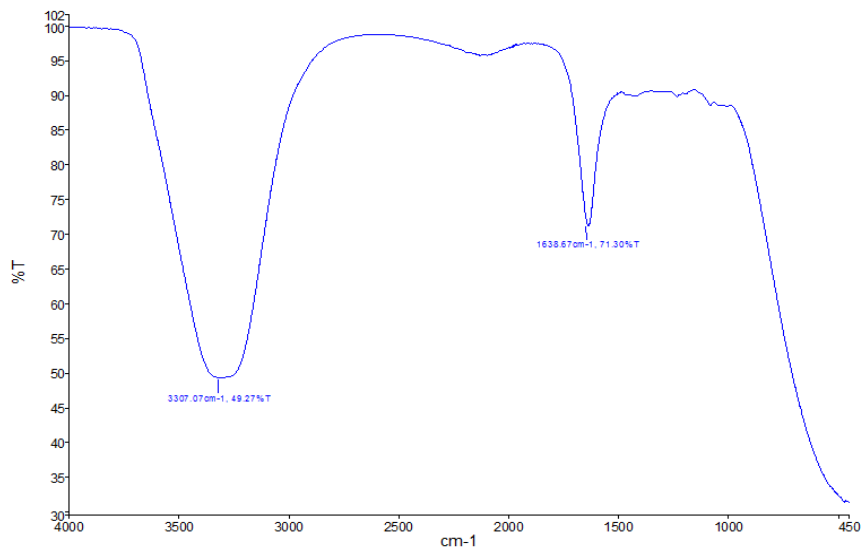
FTIR cihazı ile alınan insan serum albumini (a), insan serum albumini nanoparçacığı (b), dosetaksel yüklü insan serum albumini nanoparçacığı (c) FTIR spektrumları ve tüm spektrumların karşılaştırılması (d) Şekil 4.1 de gösterilmiştir.



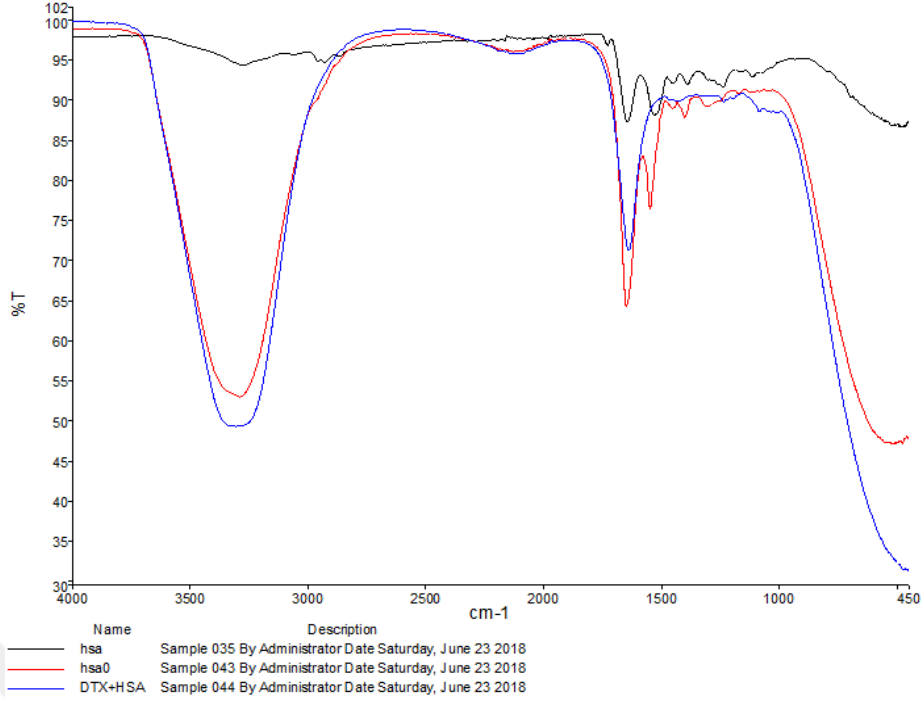
(a)



(b)



(c)



(d)

Şekil 4.1 HSA (a), HSA nanoparçacık (b), DTX-HSA nanoparçacık (c) ve tüm FTIR spektrumları (d)

İnsan serum albumini FTIR spektrumunda ; 3288, 1648, 1546, 1400 ve 522 cm^{-1} 'de pikler gözlemlenmiştir. Orta infrared polipeptit aralığındaki spektrumlar üç bölgeye ayrılır: Amid I ($1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$), amid II ($1600\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$) ve amid III ($1320\text{-}1230\text{ cm}^{-1}$). Protein sekonder yapısal bileşiklerine karşı en hassas spektral bölge, neredeyse tamamen farklı peptit bağlantılarının -CO germe titreşimlerinden kaynaklanan amid I bandıdır. Esas olarak -NH bükülme düzleminden ve CN gerilme titreşiminden türettiği için, proteinin konformasyonuna çok duyarlı olduğuna inanılmaktadır (Prosapio vd., 2014).

HSA, HSA nanoparçacığı ve DTX-HSA nanoparçacıkların her birinin FTIR spektrumlarında 1648, 1645 ve 1638 cm^{-1} 'de amid I bandının varlığını kanıtlayan pikler gözlemlenmiştir. Ayrıca HSA ve HSA nanoparçacık spektrumları karşılaştırıldığında her ikisinde de 1529, 1546 cm^{-1} bölgelerinde amid II bandı görülmüştür. HSA'da gözlemlenen 1400 cm^{-1} bölgesindeki -COO bağları, HSA nanoparçacıkların spektrumunda görülmemiştir. Fakat 1236 cm^{-1} 'de amid III

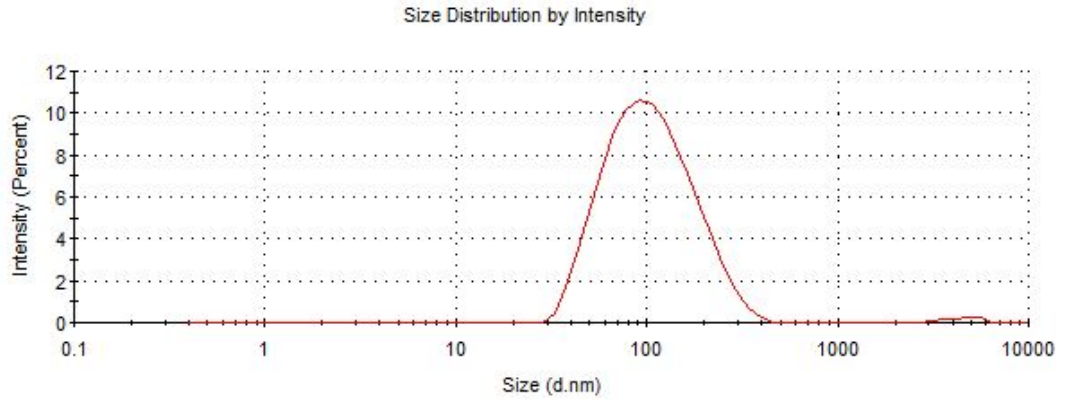
bandı piklerine (-CN germe ve -NH bükülmeleri titreşimleri) rastlanmıştır. Bu verilere dayanarak HSA nanoparçacık sentezinin başarılı olduğu ispatlanmıştır.

3300 cm^{-1} bölgesinde NH bükülme piki HSA, HSA nanoparçacık ve dosetaksel yüklü HSA nanoparçacıklarda görülmüştür. Ancak HSA nanoparçacıklarda görülen amid II (1529 cm^{-1}) ve amid III (1236 cm^{-1}) pikleri DTX-HSA nanoparçacıklarda görülmemiştir. Dosetaksel; protein polipeptitlerinde C=O ve C-N gruplarıyla etkileşime girer ve polipeptit karbonil hidrojen bağlanma ağının yeniden düzenlenmesine neden olur (Cheng vd., 2009). Bu spektruma göre dosetaksel antikanser ilacının HSA nanoparçacıklara başarılı bir şekilde yüklendiği kanıtlanmıştır.

4.1.2 Dinamik Işık Saçılımı Sonuçları

HSA nanoparçacıkları ve DTX-HSA nanoparçacıklarının boyutları ve zeta potansiyelleri dinamik ışık saçılımı cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Hazırlanan nanoparçacıklar suda dispers edildikten sonra analiz gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.2 ve 4.3'te sırasıyla HSA ve DTX-HSA nanoparçacıkların DLS boyut analizi grafikleri gösterilmiştir.

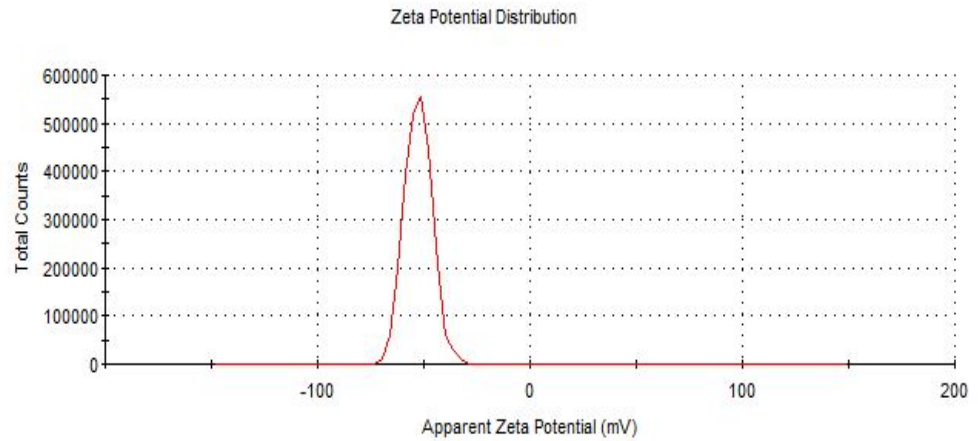
	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 92,33	Peak 1: 115,1	99,0	61,50
Pdl: 0,203	Peak 2: 4477	1,0	888,8
Intercept: 0,931	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result quality : Good			



(a)

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -52,6	Peak 1: -52,6	100,0	6,35
Zeta Deviation (mV): 6,35	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,0723	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality : Good

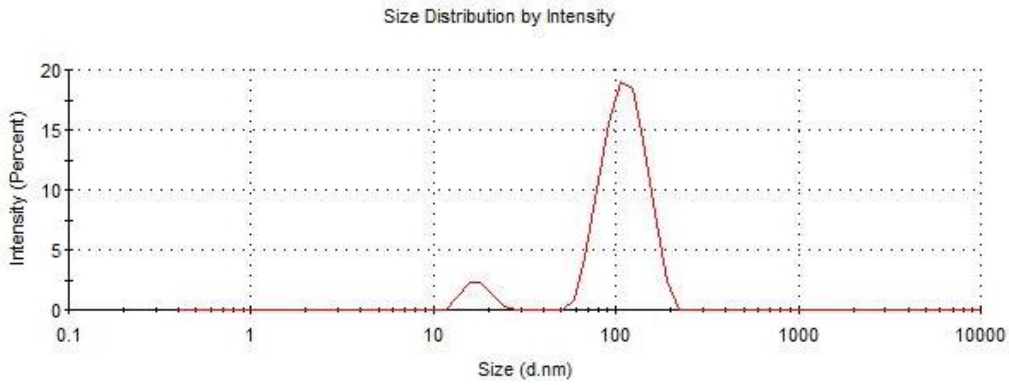


(b)

Şekil 4.2 HSA nanoparçacıkların boyut analizi (a), Zeta potansiyeli (b)

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 151,7	Peak 1: 114,3	92,8	29,38
Pdl: 0,231	Peak 2: 17,35	7,2	2,748
Intercept: 0,920	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

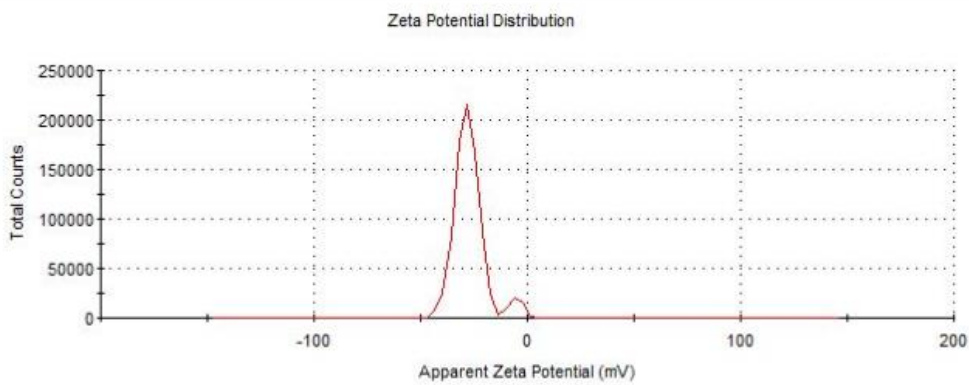
Result quality : **Refer to quality report**



(a)

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -27,2	Peak 1: -28,5	94,2	5,35
Zeta Deviation (mV): 7,41	Peak 2: -5,85	5,8	3,36
Conductivity (mS/cm): 0,0292	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality : **Good**



(b)

Şekil 4.3 DTX-HSA nanoparçacıkların boyut analizi (a), zeta potansiyeli (b)

HSA nanoparçacıkların hidrodinamik çapının 90 nm civarında olduğu görülmüştür. Zeta potansiyeleri ise -52,6 mV olarak belirlenmiştir. Sentezlenen nanoparçacığın PDI değeri 0.203 olarak ölçülmüştür. DTX-HSA nanoparçacıkların hidrodinamik çapı ise 150 nm ölçülmüş, zeta potansiyelleri -27,2 mV olarak belirlenmiştir. DTX-HSA nanoparçacıkların PDI değeri 0,231 olarak ölçülmüştür. Langer ve arkadaşları 2003 yılında yayınladıkları çalışmada HSA nanoparçacıkların hidrodinamik çapının ortalama olarak 100-300 nm arasında değiştiğini belirtmişlerdir (Langer vd., 2003).

Lomis ve arkadaşlarının 2016 yılında yaptıkları çalışmada DTX-HSA nanoparçacıkların boyutunun 200 nm'den küçük olduğu tespit edilmiştir. Zeta potansiyeli $-26,8 \pm 3,1$ mV, PDI değeri ise 0,3'ün altında ölçülmüştür.

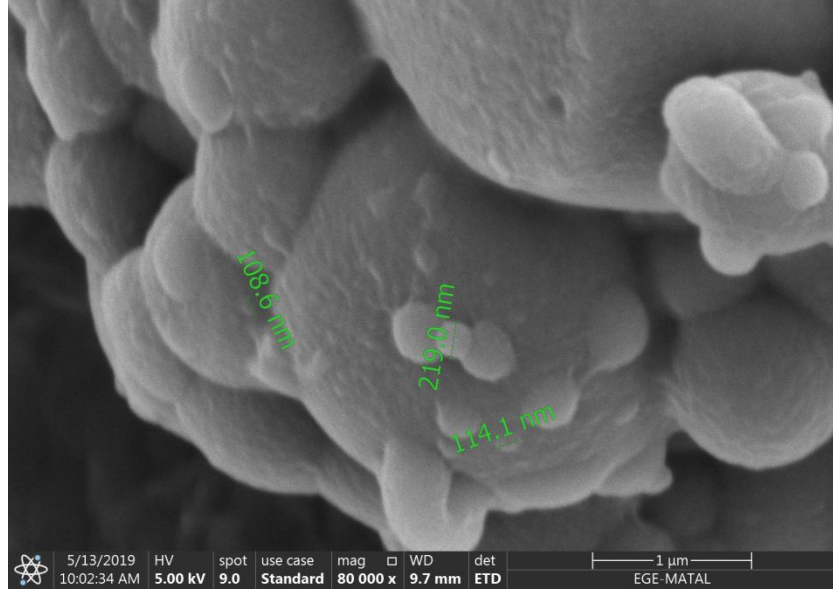
Çizelge 4.1 HSA ve DTX-HSA nanoparçacıkların boyut, PDI ve zeta potansiyel verileri

	Boyutu	PDI	Zeta potansiyel
HSA np	92,33 nm	0,203	-52,6 mV
DTX-HSA np	151,7 nm	0,231	-27,2 mV

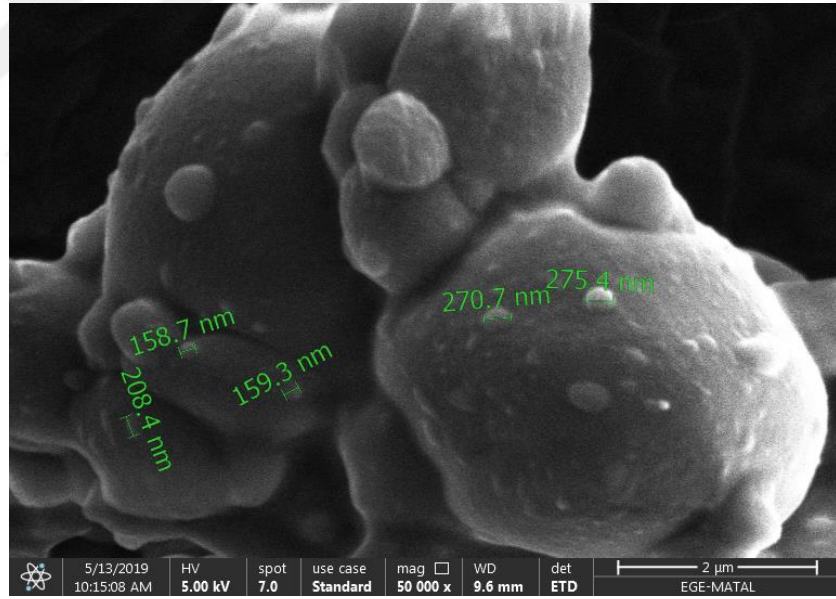
Sentezlenen nanoparçacıkların boyutlarının literatürle de uyumlu olduğu görülmüştür. Aynı zamanda ilaç yüklenmesi ile hidrodinamik çapın ve yüzey yükünün değiştiği gözlemlenmiş, boyutlardaki ve yüzey yükündeki bu değişime dayanarak sentez ve ilaç yükleme adımlarının başarılı bir şekilde gerçekleştirildiği sonucuna varılmıştır. HSA nanoparçacıklarının sentezinin başarılı olduğunu söyleyebilmek için yapılan FTIR analizinin yanı sıra DLS analizi de gerçekleştirilmiştir.

4.1.3 Taramalı Eletron Mikroskobu (SEM) Sonuçları

SEM analizi ile belirlenen HSA ve DTX-HSA nanoparçacıkların görüntüleri Şekil 4.4'te verilmiştir. SEM görüntüleri incelendiğinde DLS verilerine göre boyutların daha büyük olduğu gözlemlenmiştir. HSA nanoparçacıkların boyutlarının 100-200 nm aralığında, DTX-HSA nanoparçacıkların boyutlarının ise 150-300 nm aralığında olduğu tespit edilmiştir. İlaç yüklü nanoparçacıkların boyutunun HSA nanoparçacıklardan daha büyük olduğu gözlemlenmiştir. Bu görüntülere göre ilaç yüklemenin başarılı olduğu da kanıtlanmaktadır. Ayrıca nanoparçacıkların küresel şekilli oldukları tespit edilmiştir. SEM görüntülerine göre HSA ve DTX-HSA nanoparçacıkların aglomere olmaya meyilli oldukları görülmüştür.



(a)

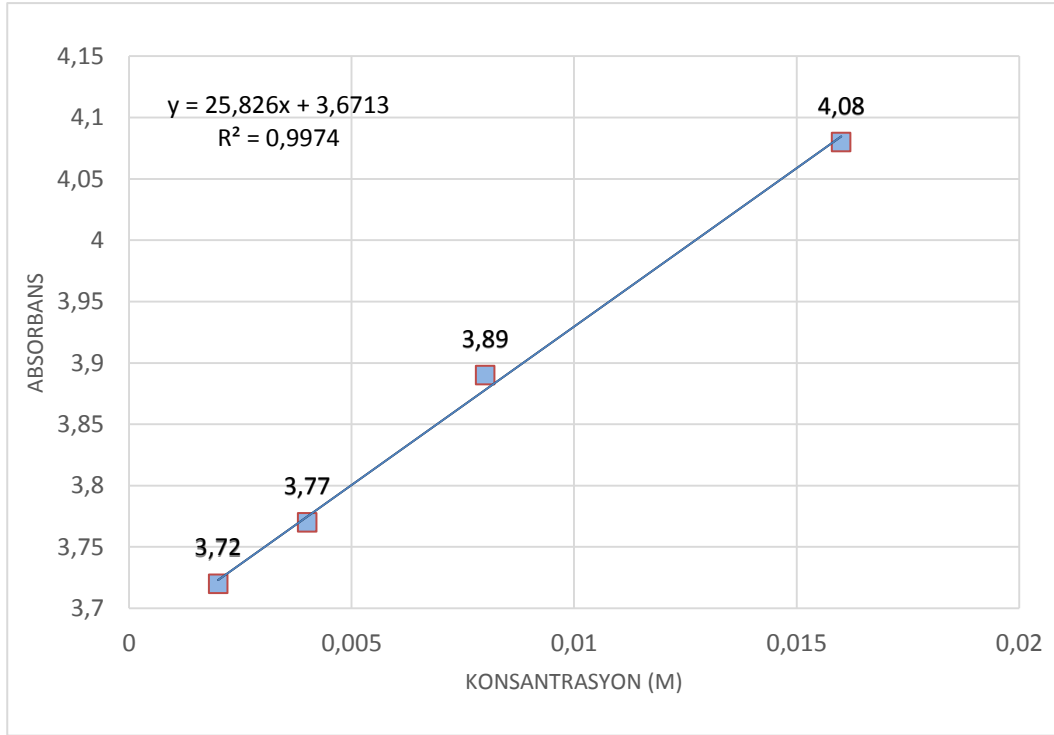


(b)

Şekil 4.4 HSA (a), DTX-HSA (b) nanoparçacıkların SEM görüntüleri

4.2 Nanoparçacıklara Yüklü Dosetaksel Miktarının Tespiti

HSA nanoparçacıklara yüklenen dosetaksel miktarını tayin etmek amacıyla dosetakselin 0,002-0,016 M konsantrasyonlarındaki UV-VIS spektrometresi absorbans değerleri ölçülmüştür. Şekil 4.5'te 283 nm dalga boyunda UV-VIS spektrumunda absorbans değerleri kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizilmiştir.

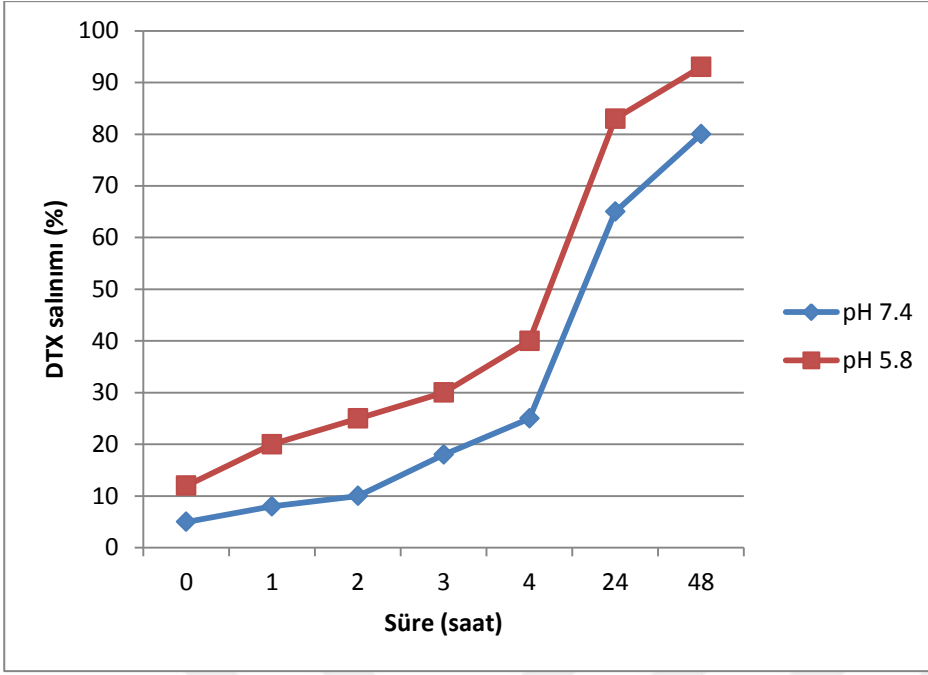


Şekil 4.5 Dosetakselin 0,002-0,016 M konsantrasyonlar arasında 283 nm dalga boyundaki kalibrasyon grafiği

Nanoparçacıklara yüklenen dosetaksel miktarı kalibrasyon grafiğinden elde edilen $y = 25,826x + 3,6713$ formülünden hesaplanmış ve ilaç yükleme veriminin % 50 olduğu tespit edilmiştir. 1 mg nanoparçacığa 10 mg dosetaksel yüklendiği hesaplanmıştır.

4.3 *In Vitro* İlaç Salımı

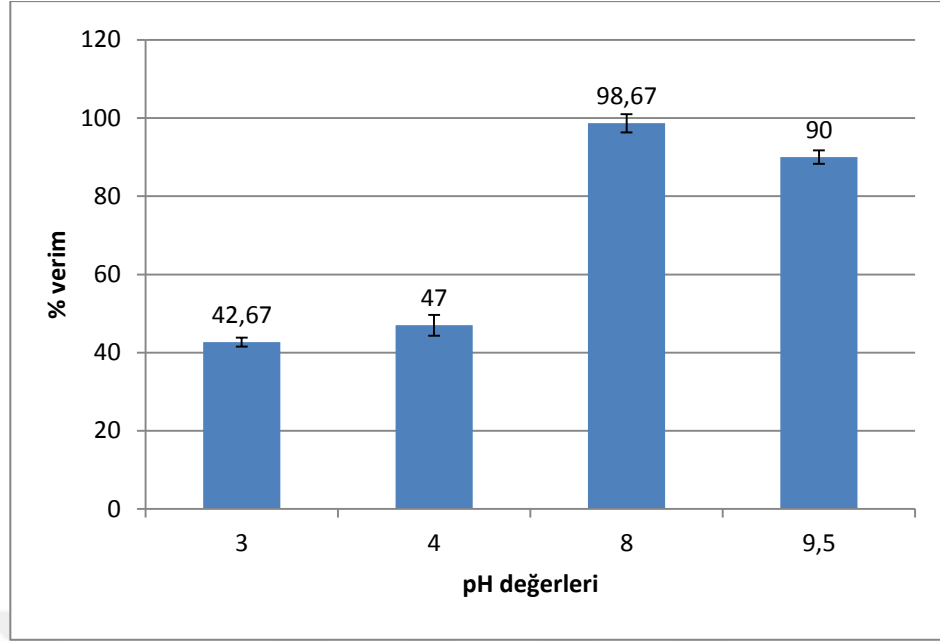
0.1 M pH 7.4 ve pH 5.8'de PBS içerisinde DTX-HSA nanoparçacıklarının *in vitro* salım davranışı 48 saat süresince Şekil 4.6'da görülmektedir. Bu deneyde, pH 7.4 ve pH 5.8 sırasıyla sağlıklı doku ve tümörlü dokuyu temsil etmektedir. İlk 4 saatte, nanoparçacıkların üzerindeki toplam DTX'in pH 7.4 ortamında %25'i salınırken, nanoparçacıkların üzerindeki toplam DTX'in pH 5.8 ortamında %40'ı salınmıştır. 24 saat sonra, pH 7.4 salım ortamında, ilaç salım miktarı %65 olarak hesaplanırken, pH 5.8 ortamında % 83 olduğu görülmüştür. Her iki pH değeri için plato seviyesine 48 saat sonra ulaşılmıştır. pH 7.4 ve pH 5.8'de, ilaç salım seviyesi 48 saat boyunca sırasıyla %80 ve %93'tür. Cheng ve ark. 2018'de yaptıkları bir çalışmada, ilk 8 saatte %29,1 DTX-BIO-BSA-NP'lerden ilk yavaş salınım pH 7.4'te görülmüştür. Takip eden 28 saat içinde, patlama salınımı, sürekli bir şekilde %59.0'a yükselmiştir. Bu da kanser hücrelerine karşı sürekli savaşa imkanı sağlayarak kanser hücrelerinin canlılığının azalmasına neden olmuştur. DTX-BIO-BSA-NP'lerin (%81.6) kümülatif salınımı, 4 gün sonra dosetakselinkinden (%89.9) daha az olduğu görülmüş ve dosetakselin, DTX-BIO-BSA NP'lerinin sert çekirdeğinde iyi kapsüllenmesine atfedilmiştir. 4 gün sonra %81.6'lık bir kümülatif salınım, nanoparçacık formülasyonunun neredeyse dosetaksel salımının tamamına ulaştığını göstermiştir.



Şekil 4.6 DTX-HSA nanoparçacıklarından 48 saat boyunca PBS içinde *in vitro* DTX salınımı (0.1 M, pH 7.4 ve pH 5.8)

4.4 DTX, HSA ve DTX-HSA Nanoparçacıkların ^{131}I ile İşaretleme Sonuçları

DTX, HSA ve DTX-HSA nanoparçacıkları ^{131}I radyonüklidi ile iodojen metoduyla işaretlenmiştir. İodojen tüplerin hazırlanmasında 1 mg iodojen kullanılmıştır. Radyoışaretlemede optimum koşulların belirlenmesi için işaretleme pH 3, 4, 8, 9.5 ortamlarında gerçekleştirilmiştir. İşaretlemenin farklı pH değerlerinde elde edilen radyoışaretleme verimi değerleri Şekil 4.7’de verilmiştir.



Şekil 4.7 ¹³¹I-DTX-HSA nanoparçacığının pH 3, 4, 8 ve 9.5'ta radyoişaretleme verimi

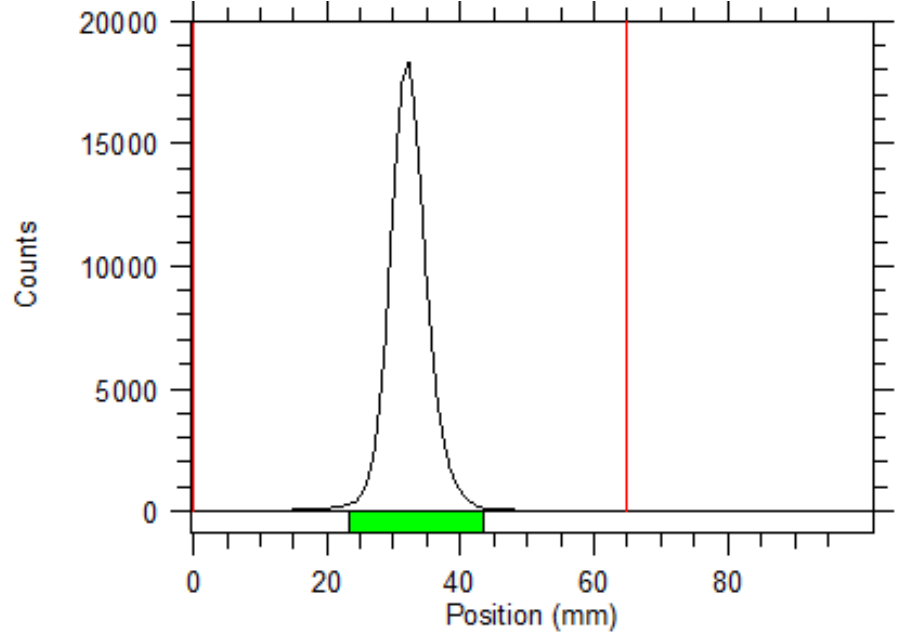
¹³¹I-DTX-HSA nanoparçacığının radyoişaretleme veriminin pH=3 ortamında gerçekleştirildiğinde işaretleme veriminin %42.67±1.15, pH=4 ortamında %47±2.65, pH=8 ortamında %98.67±2.31, pH=9.5 ortamında ise %90±1.73 olduğu görülmüştür. İşaretleme veriminin en düşük olduğu pH değerinin 3, en yüksek olduğu değer ise 8 olduğu gözlemlenmiştir. Ortamın pH'ının 9.5 seviyesine artırılmasıyla birlikte verimde tekrar bir düşüş olduğu görülmüştür. Bu verilere göre ortam pH'ının 8 olduğu durum optimum radyoişaretleme koşulu olarak belirlenmiştir.

Radyoişaretlemenin kalite kontrolü TLRC metoduna göre gerçekleştirilmiştir. Mobil faz olarak n-bütanol-su-asetik asit (4-2-1) ve metanol-su (9-1) banyoları kullanılmıştır. DTX, HSA np, DTX-HSA np, yükseltgenmiş ¹³¹I (Yük ¹³¹I) ve Na¹³¹I'in bu iki banyodaki R_f değerleri saptanmıştır. Tablo 4.2'de R_f değerleri verilmiştir.

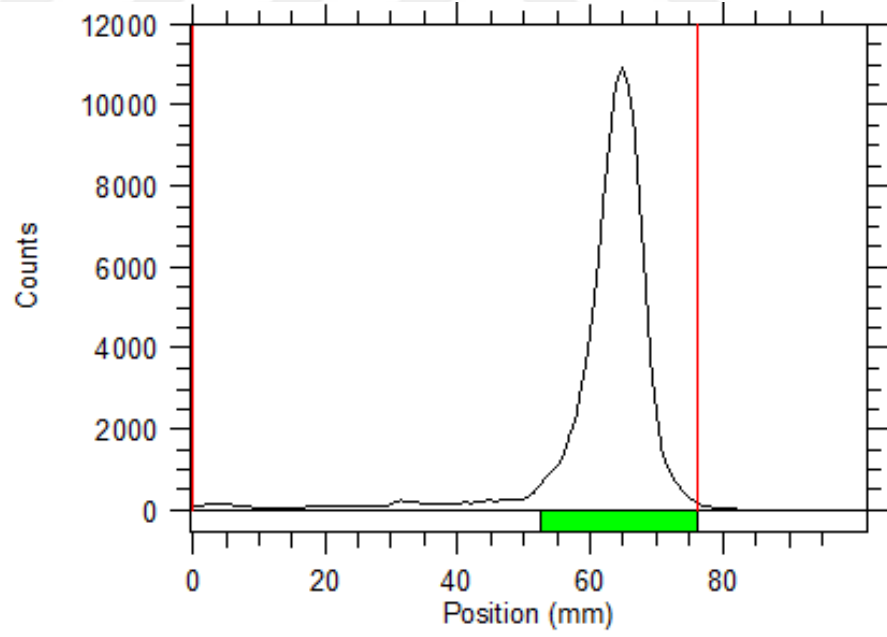
Çizelge 4.2 HSA np, DTX, DTX-HSA np, yükseltgenmiş ^{131}I ve Na^{131}I 'in R_f değerleri

	n-bütanol-su-asetik asit (4-2-1)	Metanol-su (9-1)
Na^{131}I	0,49	0,84
Yük ^{131}I	0,93	0,56
^{131}I-HSA	0,06	0,05
^{131}I-DTX	0,77	0,45
^{131}I-DTX-HSA	0,04	0,05

Çizelge 4.2'de görüldüğü üzere seçilen her iki banyoda da R_f değerlerinin farklı olması radyoişaretli maddelerin işaretleme başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğini göstermektedir. Bioscan cihazı ile elde edilen piklerin alanlarından radyoişaretleme % verimi tespit edilmiştir. Na^{131}I , yükseltgenmiş ^{131}I (Yük ^{131}I), HSA np, DTX, DTX-HSA np'nin (a) n-büt-su-asetik asit, (b) metanol-su banyolarındaki TLRC kromatogramları sırasıyla Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11 ve Şekil 4.12'de sırasıyla verilmiştir.

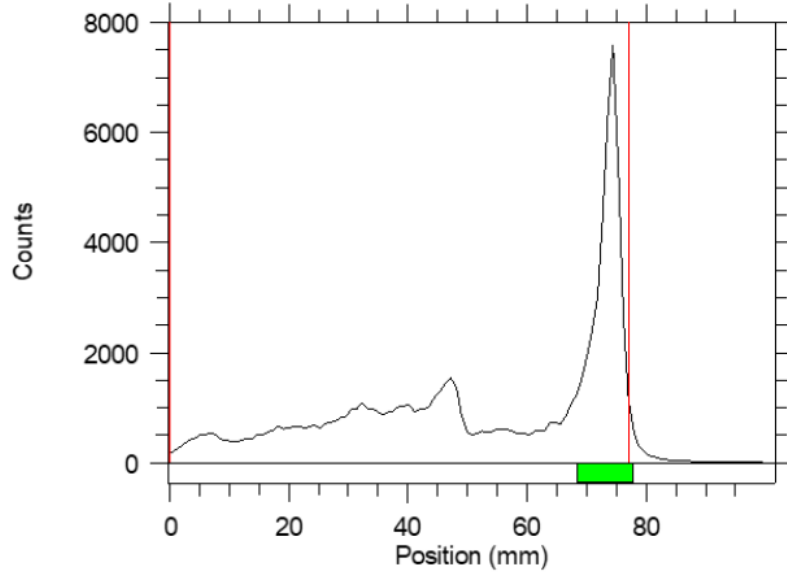


(a)

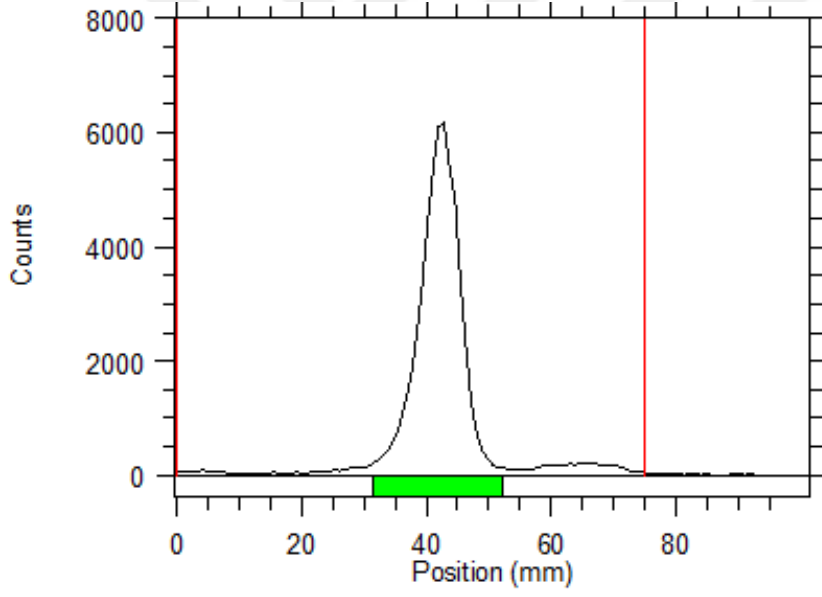


(b)

Şekil 4.8 $Na^{131}I$ 'in (a) n-bütanol-su-asetik asit (4-2-1) ve (b) metanol-su (9-1) banyolarındaki TLRC kromotogramları

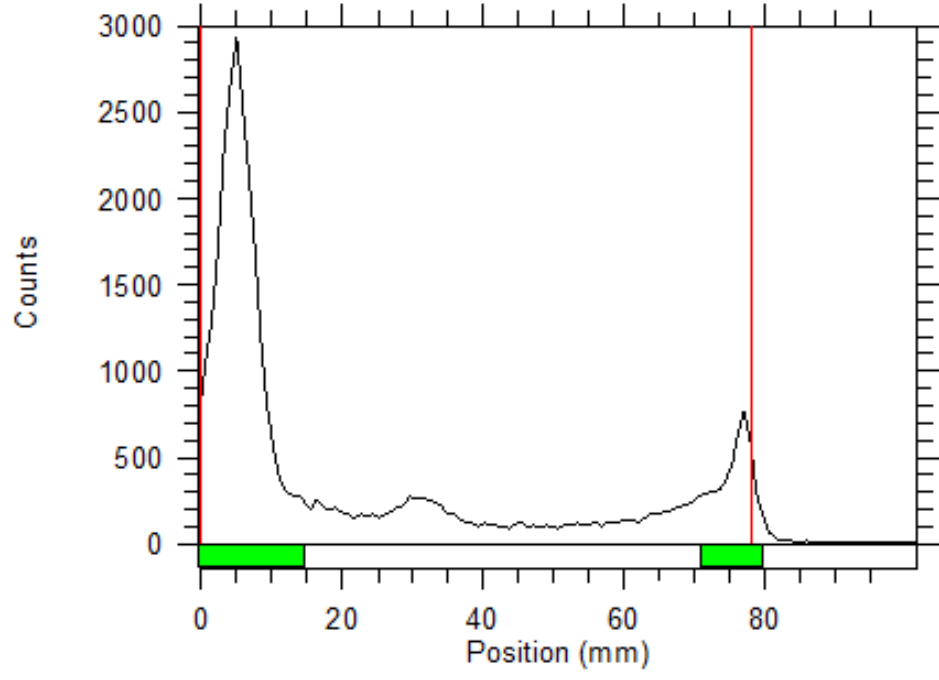


(a)

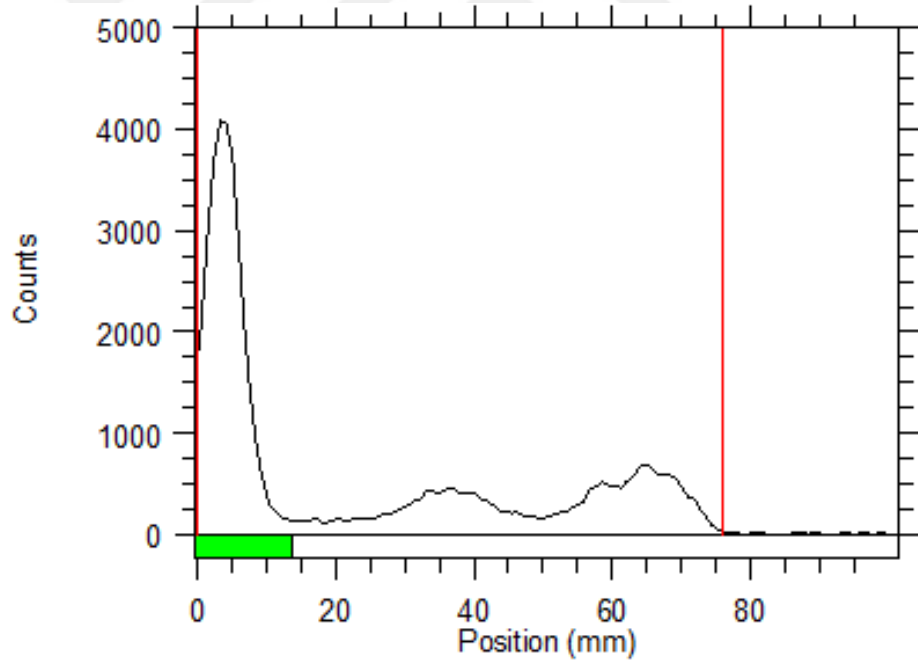


(b)

Şekil 4.9 Yükseltgenmiş ^{131}I 'un (a) n-bütanol-su-asetik asit (4-2-1) ve (b) metanol-su (9-1) banyolarındaki TLRC kromatogramları

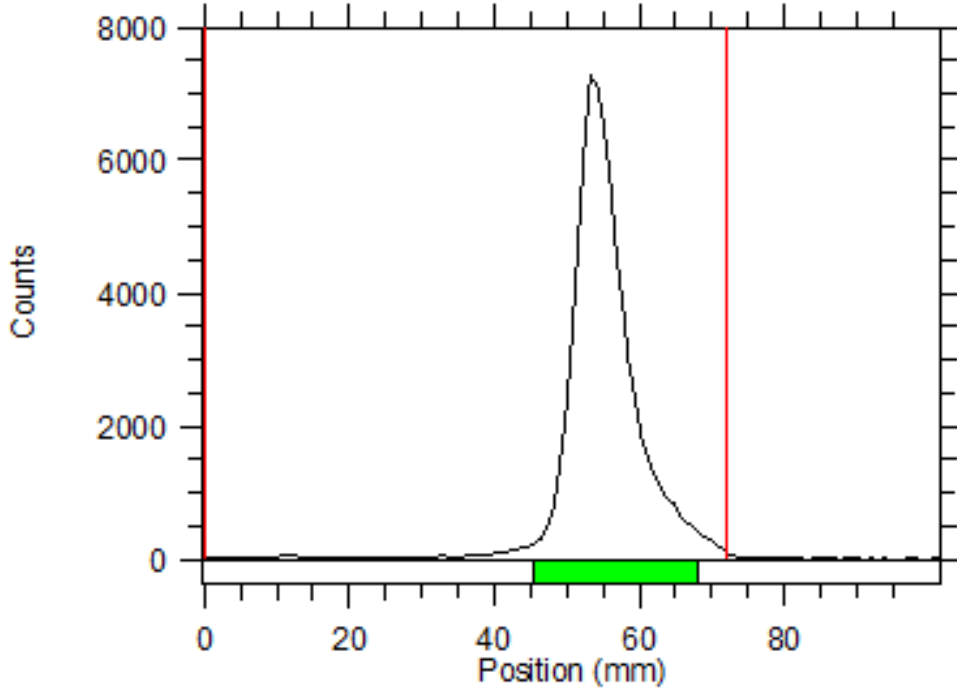


(a)

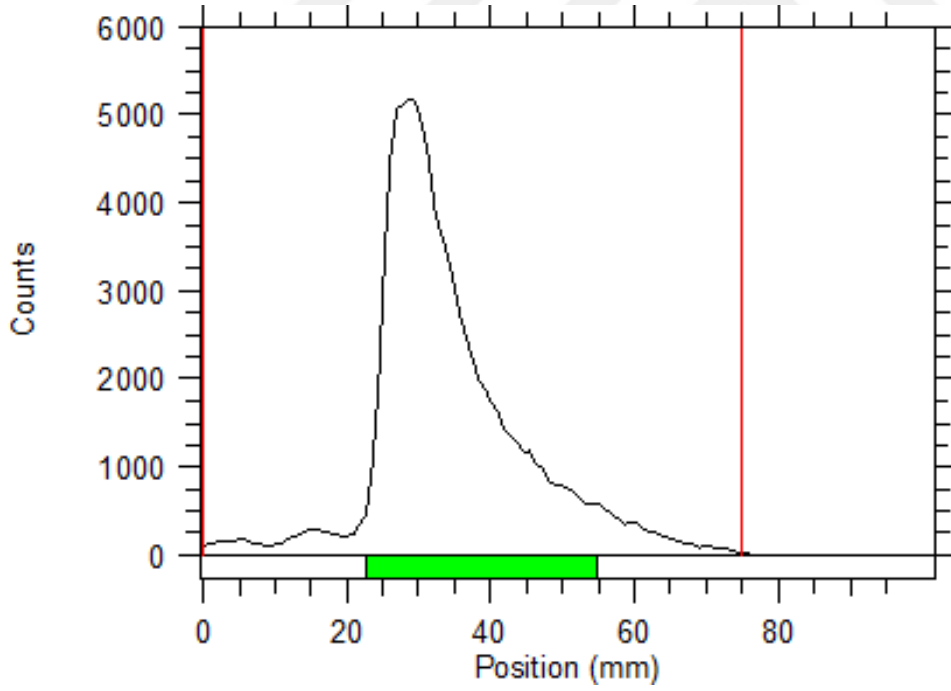


(b)

Şekil 4.10 HSA np'nin (a) n-bütanol-su-asetik asit (4-2-1) ve (b) metanol-su (9-1) banyolarındaki TLRC kromotogramları

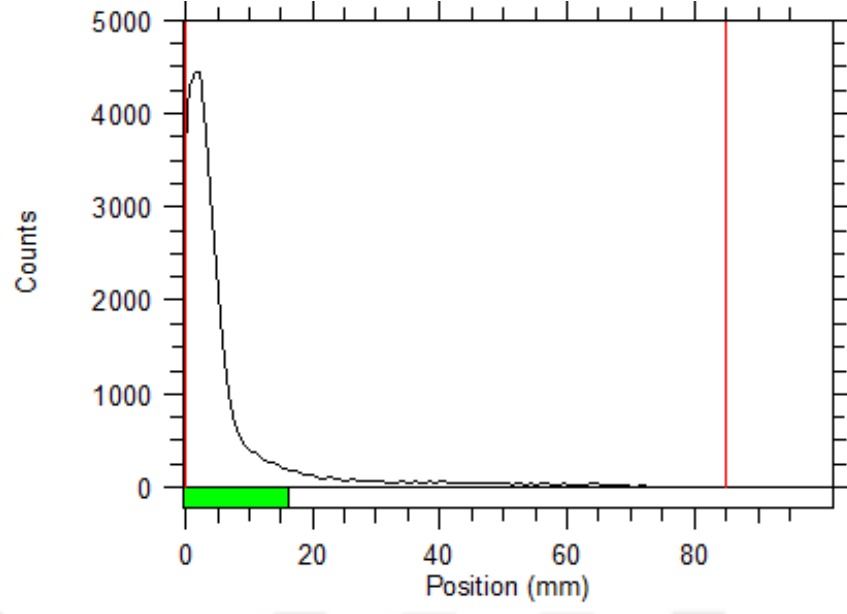


(a)

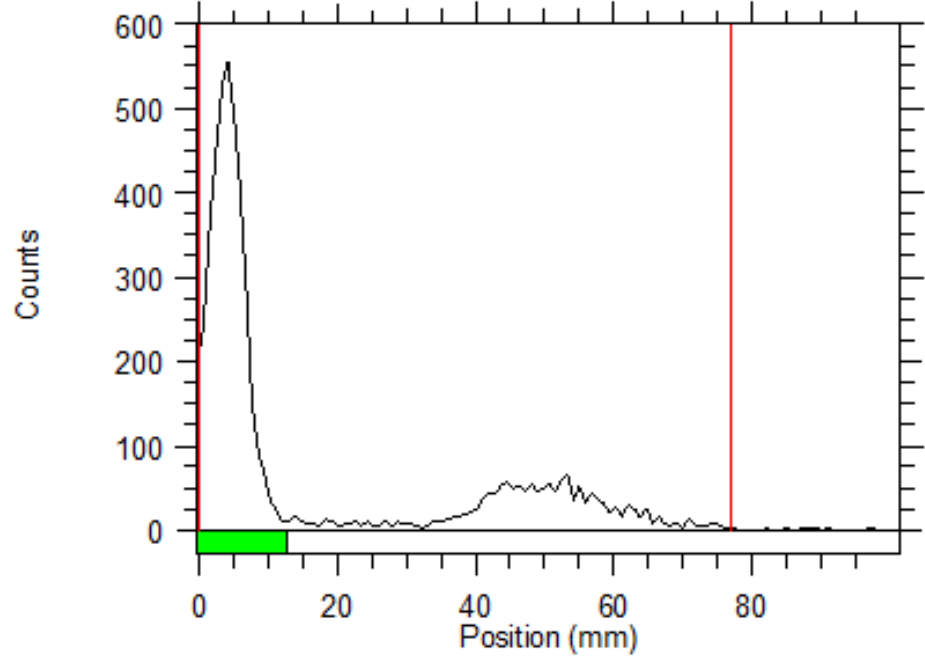


(b)

Şekil 4.11 DTX'in (a) n-bütanol-su-asetik asit (4-2-1) ve (b) metanol-su (9-1) banyolarındaki TLRC kromotogramları



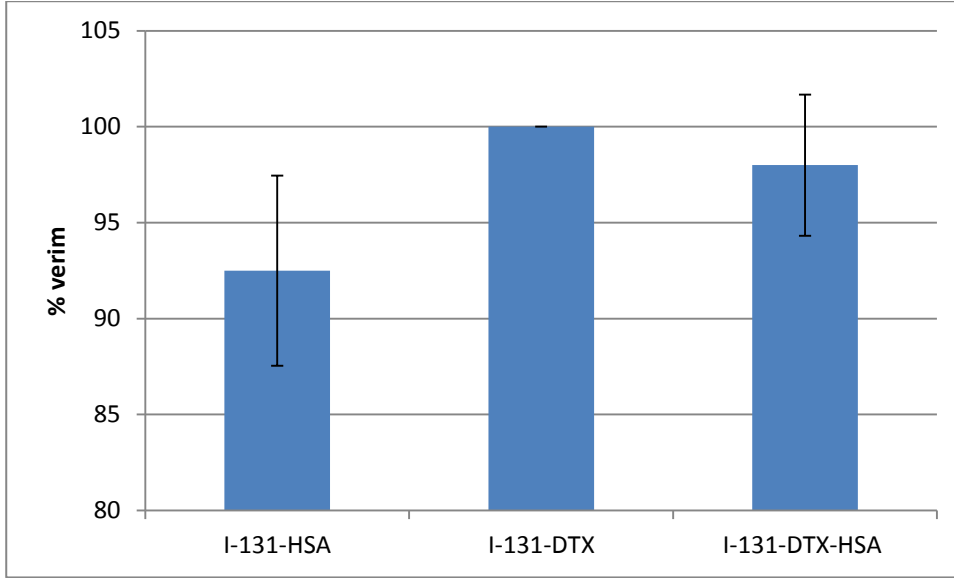
(a)



(b)

Şekil 4.12 DTX-HSA np'nin (a) n-bütanol-su-asetik asit (4-2-1) ve (b) metanol-su (9-1) banyolarındaki TLRC kromotogramları

TLRC verilerine göre pH=8 ortamında ^{131}I ile işaretlemeye verim; HSA nanoparçacıkları için $\% 92,5 \pm 4,95$, saf DTX için $\% 100$ ve DTX-HSA nanoparçacıkları için $\% 98 \pm 3,68$ olduğu tespit edilmiştir. Şekil 4.13'te optimum koşullardaki verim grafiği verilmiştir.



Şekil 4.13 ^{131}I -HSA np, ^{131}I -DTX ve ^{131}I -DTX-HSA np'lerin % işaretleme verimi (pH=8)

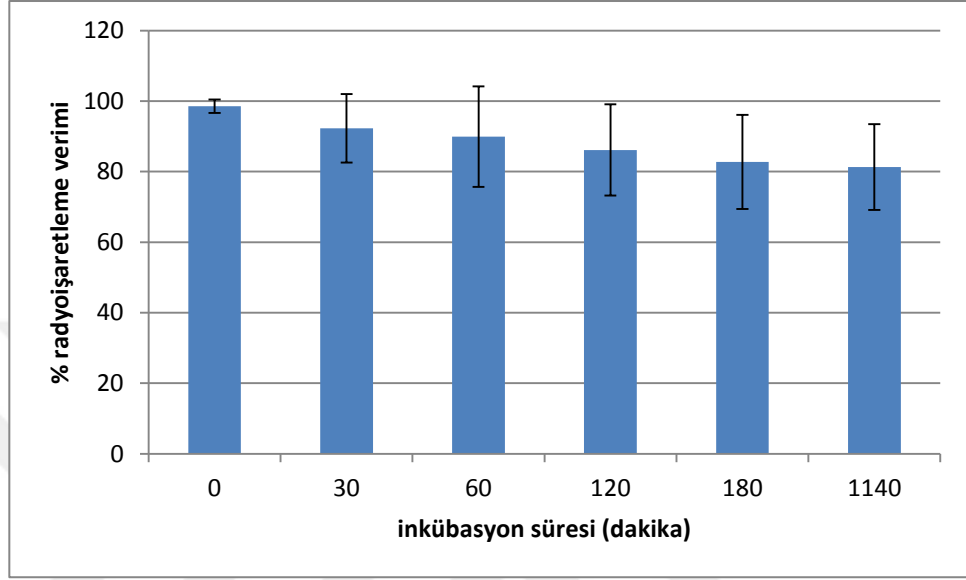
4.5 Radyoışaretili DTX-HSA Nanoparçacığın Lipofilite Tayini

^{131}I -DTX-HSA nanoparçacıklarıyla yapılan lipofilite çalışmaları sonucunda deneysel log P değeri 0.66 ± 0.012 olarak bulunmuştur. ^{131}I -DTX-HSA bileşiğinin lipofilik olduğu tespit edilmiştir.

4.6 DTX-HSA Nanoparçacığın *In Vitro* Stabilite Sonuçları

^{131}I -DTX-HSA nanoparçacığın raf ömrünü saptayabilmek için yapılan *in vitro* stabilite çalışmalarının sonuçları Şekil 4.14'te verilmiştir. 0, 30, 60, 120, 180 ve 1440 dakika olmak üzere, farklı inkübasyon sürelerinde işaretleme verimleri incelenmiştir. Sırasıyla reaksiyon verimleri 98.5 ± 1.91 , 92.29 ± 9.69 , 89.88 ± 14.26 , 86.13 ± 12.94 , 82.75 ± 13.31 , 81.29 ± 12.2 olarak saptanmıştır. Radyoışaretili DTX-

HSA nanoparçacığın işaretleme verimi zamanla düşmeye başlamış fakat stabilitesini 24 saate kadar yüksek oranda koruduğu gözlemlenmiştir. *In vitro* stabilite deneyi sonuçlarına göre radyoşaretli DTX-HSA nanoparçacığın stabilitesinin yapılacak çalışmalar için yeterince uzun olduğu saptanmıştır.

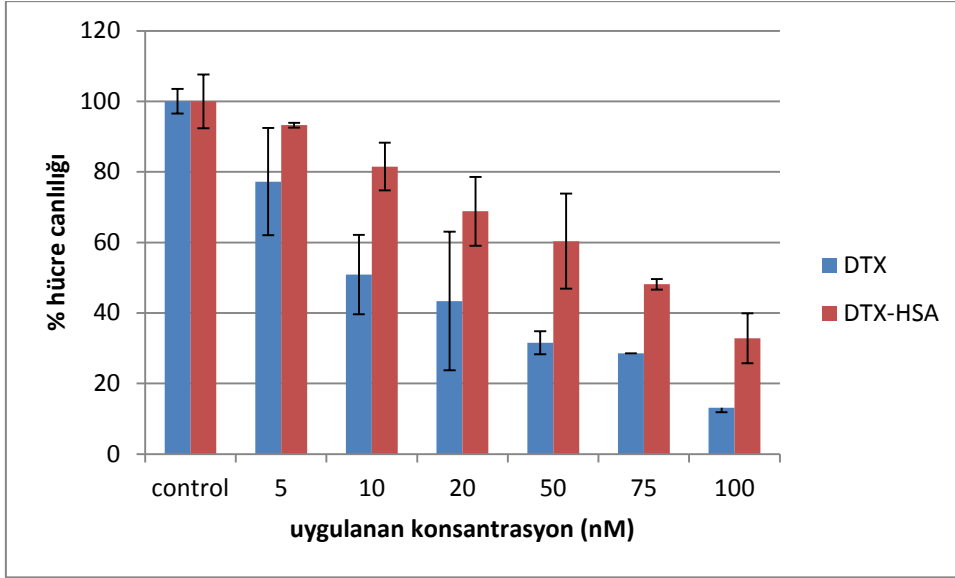


Şekil 4.14 ^{131}I -DTX-HSA nanoparçacığın *in vitro* stabilitesinin zamana göre değişimi

4.7 Hücre Kültürü Çalışmaları Sonuçları

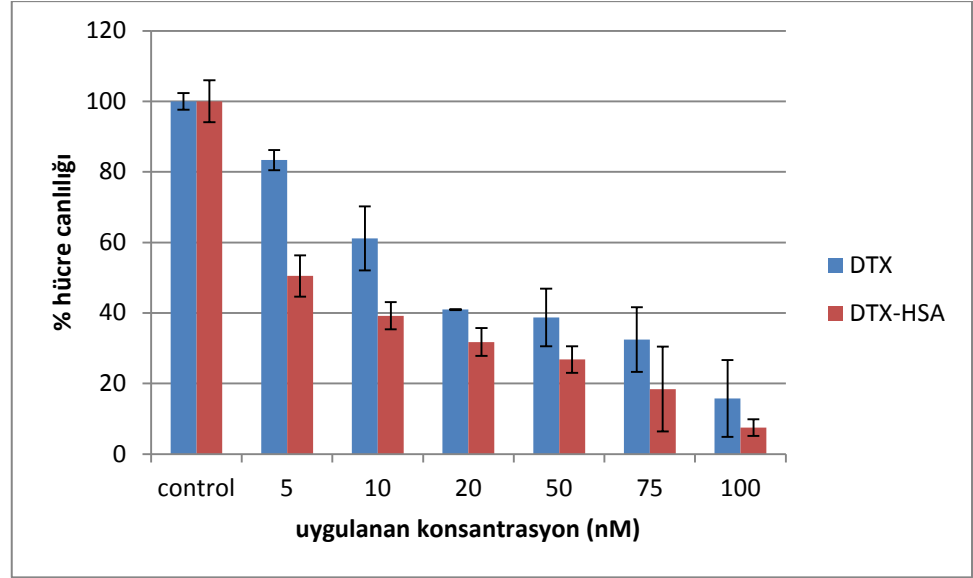
4.7.1 DTX ve DTX-HSA Nanoparçacıkların Sitotoksisite Sonuçları

Hücre kültürü çalışmaları PC-3 ve RWPE-1 hücre hatları ile gerçekleştirilmiştir. Her iki hücre hattında DTX ve DTX-HSA nanoparçacığı ile sitotoksisite çalışmaları yapılmıştır. Hücre hatlarına uygulanan 5, 10, 20, 50, 75 ve 100 nM konsantrasyonlardaki DTX ve DTX-HSA nanoparçacıklar kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır. Şekil 4.15 ve Şekil 4.16'da sırasıyla RWPE-1 ve PC-3 hücrelerinde elde edilen sitotoksisite sonuçlarının grafikleri verilmiştir.



Şekil 4.15 RWPE-1 hücre hattında DTX ve DTX-HSA nanoparçacığının toksisitesi

RWPE-1 hücre hattına yalnızca serbest DTX verildiğinde 5, 10, 20, 50, 75 ve 100 nM konsantrasyonlarda % hücre canlılığı oranları sırasıyla; 77.23±15.19, 50.88±11.29, 43.38±19.68, 31.53±3.28, 28.54, 13.09±1.22 olarak tespit edilmiştir. 10 nM konsantrasyonda hücre canlılığı % 50 civarına düşmüştür. Serbest DTX'in bu hücre hattında oldukça toksik bir etkisinin olduğu gözlemlenmiştir. Aynı hücre hattına DTX-HSA nanoparçacıkları aynı konsantrasyonlarda verildiğinde hücre canlılığı oranları sırasıyla; 93.23±0.7, 81.48±6.77, 68.83±9.75, 60.34±13.47, 48.13±1.51, 32.84±7.07 olarak tespit edilmiştir. RWPE-1 hücre hattına 75 nM konsantrasyonda DTX-HSA nanoparçacıkları verildiğinde hücrelerin % 50'sinin canlı kalabildiği gözlemlenmiştir. RWPE-1 hücre hattında HSA nanoparçacıklara yüklenen DTX, serbest DTX'e göre daha az sitotoksik etkiye neden olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Şekil 4.15'teki verilere göre RWPE-1 hücrelerinde DTX-HSA nanoparçacıklarının IC₅₀ değerinin 75 nM, serbest DTX'in IC₅₀ değerinin ise 10 nM olduğu tespit edilmiştir.



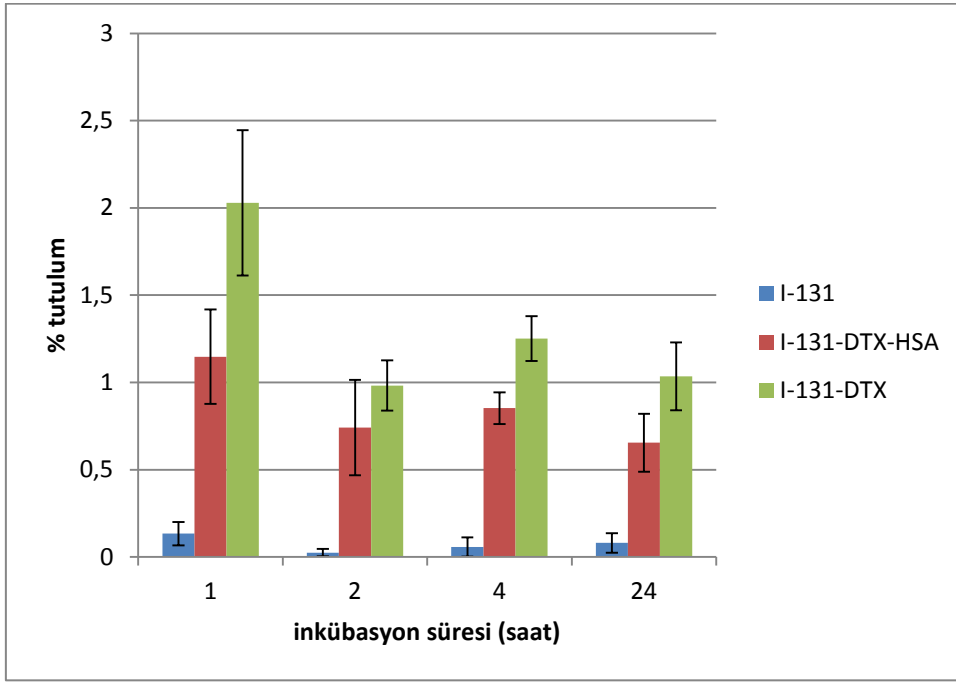
Şekil 4.16 PC-3 hücre hattında DTX ve DTX-HSA nanoparçacığının toksisitesi

PC-3 hücre hattına serbest DTX verildiğinde 5, 10, 20, 50, 75 ve 100 nM konsantrasyonlarda % hücre canlılığı oranları sırasıyla; 83.34±2.83, 61.14±9.08, 40.94±0.15, 38.74±8.16, 32.49±9.16, 15.72±10.89 olarak tespit edilmiştir. 20 nM konsantrasyonda serbest DTX uygulandığında hücre canlılığı oranı % 50'nin altına düşmüştür. Aynı hücre hattına DTX-HSA nanoparçacıkları aynı konsantrasyonlarda verildiğinde % hücre canlılığı oranları sırasıyla; 50.48±5.84, 39.20±3.87, 31.77±3.98, 26.79±3.78, 18.42±12.05, 7.51±2.34 olarak tespit edilmiştir. PC-3 hücre hattına 5 nM konsantrasyonda DTX-HSA nanoparçacıkları verildiğinde hücre canlılığı % 50 oranında azalmıştır. PC-3 hücre hattında HSA nanoparçacıklarına yüklenen DTX, serbest DTX'e göre daha toksik bir etkiye sebep olmuştur. Şekil 4.16'daki verilere göre DTX-HSA nanoparçacıklarının PC-3 hücrelerindeki IC₅₀ değerinin 5 nM olduğu, serbest DTX'in IC₅₀ değeri ise 20 nM olduğu tespit edilmiştir.

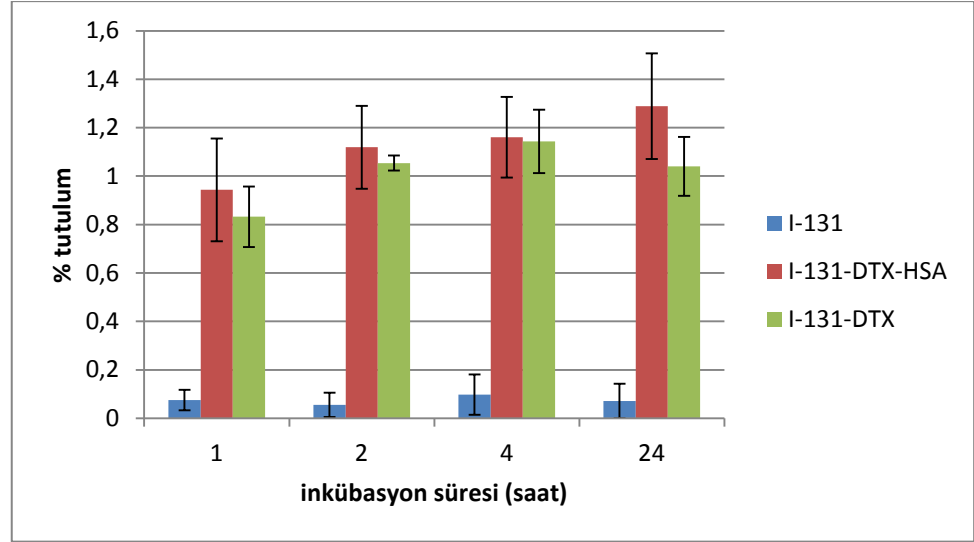
Nateghian et al 2015 yılında yapılan çalışmada folik asit kaplı HSA nanoparçacıklara DTX yüklemiş ve DTX-HSA+HSA-FA nanoparçacıklarının sitotoksitelerinin serbest DTX'ten % 45 daha fazla olduğunu ortaya konulmuştur. Jiang et al 2015 yılında yaptığı bir çalışmada ise folat kaplı DTX-HSA nanoparçacıkları sentezlemiş ve PC-3 hücre hattında 72 saat inkübasyon süresinde IC₅₀ değerinin 35 nM olduğunu ortaya konulmuştur.

4.7.2 Radyoşaretli Serbest DTX ve DTX-HSA Nanoparçacıkların RWPE-1 ve PC-3 Hücre hatlarındaki Tutulum Sonuçları

Rayoşaretli serbest DTX ve ^{131}I -DTX-HSA nanoparçacığının PC-3 ve RWPE-1 hücrelerindeki yüzdesel olarak tutulumu tespit edilmiştir. RWPE-1 ve PC-3 hücre hatlarında ^{131}I , ^{131}I -DTX ve ^{131}I -DTX-HSA nanoparçacığının tutulum grafikleri Şekil 4.17 ve Şekil 4.18’de sırasıyla verilmiştir.



Şekil 4.17 ^{131}I , ^{131}I -DTX ve ^{131}I -DTX-HSA nanoparçacığının RWPE-1 hücre hattında 1, 2, 4 ve 24 saat inkübasyon sürelerindeki tutulumları



Şekil 4.18 ¹³¹I, ¹³¹I-DTX ve ¹³¹I-DTX-HSA nanoparçacığının PC-3 hücre hattında 1, 2, 4 ve 24 saat inkübasyon sürelerindeki tutulumları

RWPE-1 hücre hattında ¹³¹I-DTX'in 1, 2, 4 ve 24 saat inkübasyon sürelerindeki % tutulumlarının sırasıyla; 2.03 ± 0.42 , 0.98 ± 0.14 , 1.25 ± 0.13 , 1.03 ± 0.19 olduğu tespit edilmiştir. ¹³¹I-DTX-HSA nanoparçacıklarının 1, 2, 4 ve 24 saat inkübasyon sürelerindeki % tutulumları sırasıyla; 1.15 ± 0.27 , 0.74 ± 0.27 , 0.85 ± 0.09 , 0.65 ± 0.17 olduğu tespit edilmiştir. Bu hücre hattında ¹³¹I-DTX-HSA nanoparçacıkların tutulumunun ¹³¹I-DTX tutulumundan daha fazla olduğu görülmüştür. DTX'in HSA nanoparçacıklara yüklenmesinin RWPE-1 hücrelerinde tutulumu azalttığı gözlemlenmiştir. RWPE-1 hücrelerinde en yüksek tutulum hem ¹³¹I-DTX hem de ¹³¹I-DTX-HSA için ilk 1 saatte görülürken, 24 saatlik inkübasyon süresiyle tutulumun azaldığı görülmüştür.

PC-3 hücre hattında ¹³¹I-DTX'in 1, 2, 4 ve 24 saat inkübasyon sürelerindeki % tutulumlarının sırasıyla; 0.83 ± 0.12 , 1.05 ± 0.03 , 1.14 ± 0.13 , 1.04 ± 0.12 olduğu görülürken, ¹³¹I-DTX-HSA nanoparçacıkların 1, 2, 4 ve 24 saat inkübasyon sürelerindeki % tutulumlarının sırasıyla; 0.94 ± 0.21 , 1.12 ± 0.17 , 1.16 ± 0.17 , 1.29 ± 0.22 olduğu görülmüştür. PC-3 hücre hattında ¹³¹I-DTX-HSA nanoparçacıkların tutulumu ¹³¹I-DTX'e göre fazladır. Minimum tutulum oranı hem ¹³¹I-DTX hem de ¹³¹I-DTX-HSA için ilk 1 saatte gözlemlenmiştir. Ayrıca inkübasyon süresi 24 saate kadar uzadığında tutulum yüzdesi de artmaktadır.

HSA nanoparçacıklara yüklü DTX, PC-3 hücre hattında ^{131}I -DTX'e göre fazla tutulurken, RWPE-1 hücre hattında ^{131}I -DTX'e göre daha az tutulum gösterdiği saptanmıştır.



5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Prostat kanseri erkeklerde en yaygın görülen kanser türüdür ve erkeklerde kanserden ölümlerde ikinci sırada yer alır. Bu nedenle prostat kanserinin teşhis ve tedavisinde kullanılacak yeni ajanların geliştirilmesi oldukça önemlidir (Xue vd., 2017). Bu tez çalışmasında prostat kanseri tedavisi ve nükleer görüntülemesinde kullanılacak dosetaksel yüklü nanoparçacık geliştirilmiştir.

Dosetaksel, prostat kanseri tedavisinde kullanılan oldukça toksik bir kemoterapi ilacıdır. Çalışmamızda sentezlenen HSA nanoparçacıklara dosetaksel yüklenerek ayrıca yan etkilerin de azaltılması sağlanmıştır.

HSA nanoparçacıkların sentezi desolvasyon tekniği ile gerçekleştirilmiştir ve çapraz bağayıcı olarak gluteraldehit kullanılmıştır. Literatürde de Langer ve arkadaşları 2003 yılında yaptıkları bir çalışmada HSA nanoparçacıkları desolvasyon metodu ile sentezlemişler ve çapraz bağlayıcı olarak gluteraldehit kullanmışlardır. Bu yöntemle 100-300 nm boyut aralığında aralığında, küresel nanoparçacıklar sentezlemesi başarılmıştır. Lomis ve arkadaşları ise 2016 yılında 200 nm'den küçük, -26.8 mV zeta potansiyeline sahip DTX-HSA nanoparçacıkları sentezlemişlerdir. Çalışmamızda sentezlenen HSA nanoparçacıklar Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi, Taramalı Elektron Mikroskobu, Dinamik Işık Saçılımı cihazlarıyla karakterize edilmiştir. Bu analizler sonucunda -52.6 mV yüzey yüküne sahip 100-200 nM boyut aralığında HSA nanoparçacıkların başarılı bir şekilde sentezlendiği kanıtlanmıştır. Ayrıca FTIR analizleri sonucunda HSA nanoparçacıklarında, HSA'dan farklı olarak görülen amid III bandı da nanoparçacık sentezinin başarılı olduğunu kanıtlamaktadır.

İlaç yükleme verimi, eklenen ilacın başlangıç oranının artmasıyla artmaktadır. Thang ve arkadaşlarının 2016 yılında yaptıkları çalışmada eklenen DTX'in HSA'ya ilk oranı % 18 olduğu için yükleme verimi % 8.33'e ulaşmıştır. Bu tez çalışmasında sentezlenen HSA nanoparçacıklara % 50 verim ile dosetaksel antikanser ilacı yüklenmiştir. İlaç yükleme esnasında 1 mg nanoparçacık için 20

mg dosetaksiel eklenmiştir ve bu ilacın 10 mg'ının HSA nanoparçacıklarına yüklendiği görülmüştür. İlaç yüklü HSA nanoparçacıkların yükleme verimi UV-VIS spektrometresi ile gerçekleştirilmiştir. DTX-HSA nanoparçacığının lipofilik olduğu yapılan lipofilité testlerinde tespit edilmiş ve DTX'in HSA nanoparçacıklara yüklenerek suda çözünürlüğünün artması sağlanmıştır. Hazırlanan DTX-HSA nanoparçacıkların boyutu 150 nm ve zeta potansiyelinin -27.2 mV olduğu tespit edilerek literatürdeki diğer çalışmalarla uyumlu olduğu görülmüştür (Lomis vd., 2016).

DTX-HSA nanoparçacıkların pH 7.4 ve pH 5.8 ortamlarında *in vitro* ilaç salım profili incelediğinde ilk 4 saatteki miktarın sırasıyla %25 ve %40 olduğu görülmüştür. 24 saatten sonra pH 7.4 ve 5.8'de sırasıyla %65 ve %83, 48 saat sonunda ise %80 ve %93 olduğu gözlemlenmiştir. Bu iki salınım ortamı karşılaştırıldığında ilaç salınım profilinin birbirine paralel ve pH 5.8 ortamında ilaç salınımının daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçların literatürle uyum içerisinde olduğu görülmüştür. DTX-HSA nanoparçacıkları üzerindeki yüklü DTX'in 48 saat sonunda neredeyse tamamının salındığı tespit edilmiştir.

DTX-HSA nanoparçacığı iodojen yöntemi ile ^{131}I ile işaretlenmiştir. İşaretlemenin pH=8 ortamında 98.67 ± 2.31 verimle gerçekleştiği TLRC yöntemi ile kalite kontrolü sağlanarak kanıtlanmıştır. ^{131}I -DTX-HSA radyoişaretli nanoparçacığın 24 saat sonunda işaretleme veriminin 81.29 ± 12.2 olduğu görülmüş ve görüntüleme çalışmaları için raf ömrünün yeterli olduğu ortaya konulmuştur.

DTX-HSA nanoparçacığı ve serbest DTX'in sitotoksité testleri sonucunda RWPE-1 hücre hattında IC_{50} değerleri sırasıyla; 75 nM ve 10 nM olarak bulunmuştur. PC-3 hücre hatlarında ise IC_{50} değerleri DTX-HSA için 5 nM, serbest DTX için 20 nM olarak tespit edilmiştir. Karanika ve arkadaşlarının 2015 yılında yaptığı çalışmada PC-3 hücre hattında 48 saat inkübasyon süresinde DTX'in IC_{50} değeri 70.5 nM olarak tespit edilmiştir. Ayrıca RWPE-1 hücrelerinde 0.5 nM konsantrasyonun bile canlılığı azalttığı gözlenmiştir. Bu tez çalışmasında da DTX-HSA nanoparçacıkların PC-3 hücre hattında RWPE-1 hücre hattına göre

daha toksik olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca DTX-HSA nanoparçacıkların PC-3 hücre hattında serbest DTX'e göre hücre canlılığını önemli ölçüde azaltırken, RWPE-1 hücre hattında hücre canlılığı seviyesi serbest DTX'e göre yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu verilere göre dozetaksel antikanser ilacını HSA nanoparçacıklara yükleyerek RWPE-1 hücre hattı gibi sağlıklı hücrelerdeki toksik etkileri azaltılırken, PC-3 gibi tümör hücrelerindeki etkinliği artırılabilir. Böylece sentezlenen DTX-HSA nanoparçacıkların prostat kanseri tedavisinde meydana gelen yan etkileri azatması sağlanarak daha etkili bir terapi ortaya konulabileceği kanıtlanmıştır.

Radyoişaretli DTX ve DTX-HSA nanoparçacıkların her iki hücre hattında yapılan tutulum deneyleri sonuçlarının sitotoksosite deneyi sonuçlarını destekler nitelikte olduğu gözlemlenmiştir. ¹³¹I-DTX-HSA radyoişaretli nanoparçacık PC-3 hücre hattında % 1.28 tutulum gösterirken, ¹³¹I-DTX'in %1.04 oranında tutunduğu, RWPE-1 hücre hattında ise ¹³¹I-DTX-HSA nanoparçacığının % 0.65 tutulum gösterirken, ¹³¹I-DTX'in % 1.03 tutunduğu görülmüştür. Bu verilere göre sağlıklı hücrelerde de toksik etki gösteren DTX antikanser ilacı HSA nanoparçacıklara yüklenerek prostat kanseri hücrelerinde seçimli olarak akümüle olması sağlanabilmektedir ve kanserli hücrelerin ölümünü artırırken sağlıklı hücrelerde daha az etki göstermektedir. Bunun yanı sıra ¹³¹I ile yüksek verimle işaretlenebilen DTX-HSA nanoparçacığı, prostat kanserinin nükleer görüntülemesine olanak sağlayacak ve ¹³¹I'in γ emisyonunun yanı sıra β -emisyonunun da olması nedeniyle radyoterapi etkisi de sağlayabilecektir.

HSA nanoparçacıkların yüksek dozetaksel yüklenebilme kapasitesi sayesinde, ¹³¹I-DTX-HSA nanoparçacıkların prostat kanseri hücrelerinde seçimli akümüle olmaları, yüksek *in vitro* tutulum verileri nükleer görüntüleme ve terapi için etkili bir teranostik ajan olma yolunda umut vaad edici olduğu görülmektedir.



KAYNAKLAR DİZİNİ

- Ahmed, M. H., Byrne, J. A., McLaughlin, J., Ahmed, W.,** 2013, Study of human serum albumin adsorption and conformational change on DLC and silicon doped DLC using XPS and FTIR spectroscopy, *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 4, UK, 194-203p
- Aliosmanoğlu, A. ve Basaran, I.,** 2012, Nanotechnology in cancer treatment, *J Nanomed Biotherapeut Discov*, 2, Turkey, 4p
- Allen, T.M. and Cullis, P. R.,** 2004, Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream, *Drug Discovery*, 303p
- Baker, S. D., Verweij, J., Cusatis, G.A., van Schaik, R. H., Marsh, S., Orwick, S. J.,** 2009, Pharmacogenetic pathway analysis of docetaxel elimination, *Clin Pharmacol Ther*, 85,155–63p.
- Brigger, I., Dubernet, C., Couvreur, P.,** 2002, Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, France, 631–651p
- Charbonneau, D., Beaugard, M., Tajmir-Riahi, H. A.,** 2009, Structural Analysis of Human Serum Albumin Complexes with Cationic Lipids, *J. Phys. Chem. B*, 113, Canada, 1777–1784p
- Cheng, H., Liu, H., Zhang, Y., Zou, G. ,** 2009, Interaction of the docetaxel with human serum albumin using optical spectroscopy methods, *Journal of Luminescence* 129, China, 1196–1203p
- Cheng, K., Sun, S., Gong, X.,** 2018, Preparation, characterization, and antiproliferative activities of biotin-decorated docetaxel-loaded bovine serum albumin nanoparticles, *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, ; 54(2), China, 17295p
- Clarke, S. J. And Rivory, L. P.,** 1999 Clinical pharmacokinetics of docetaxel, *Clin Pharmacokinet*, 36, 99–114p.
- Crabb, S., Brittle, A., Martin, K., Downs, N., Ratchliffe, I., Maishman, T., Ellis, M., Thompson, S., Khoo, V.,** 2017, ProCAID: a phase I clinical trial to combine the AKT inhibitor AZD5363 with docetaxel and prednisolone chemotherapy for metastatic castration resistant prostate cancer, 35:599–607p
- Deeken, J. F. and Loscher, W.,** 2007, The blood-brain barrier and cancer: transporters, treatment, and Trojan horses, *Clin Cancer Res* 2007, 13, 1663–74p.
- Fallacara, A. L., Mancini, A., Zamperini, C., Dreassi, E., Marianelli, S., Chiariello, M., Pozzi, G., Santoro, F., Botta, M., Schenone, S.,** 2017, Pyrazolo[3,4-d]pyrimidines-loaded human serum albumin (HSA) nanoparticles: Preparation, characterization and cytotoxicity evaluation

KAYNAKAR DİZİNİ (Devam)

against neuroblastoma cell line, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 27, Italy, 3196–3200p 64

- Ghuman, J., Zunszain, P.A., Petitpas, I., Bhattacharya, A.A., Otagiri, M., Curry, S.**, 2005, Structural basis of the drug binding specificity of human serum albumin, *Journal of Molecular Biology*, 353, 38-52p
- Gou, Y., Zhang, Y., Zhang, Z., Wang, J., Zhou, Z., Liang, H., Yang, F.**, 2017, Design of an anticancer copper(II) prodrug based on the Lys199 residue of the active targeting human serum albumin nanoparticle carrier, *Molecular Pharmaceutics*, 14, China, 1861–1873p
- Graan, A.J., Lancaster, C.S., Obaidat, A., Hagenbuch, B., Elens, L., Friberg, L. E.**, 2012, Influence of polymorphic OATP1B-type carriers on the disposition of docetaxel, *Clin Cancer Res*, 18, 4433–40p
- Green, M.R., Manikhas, G.M., Orlov, S., Afanasyev, B., Mkakhson, A.M., Bhar, P., Hawkins, M.J.**, 2006, Abraxane, a novel cremophor free albumin bound particle form of paclitaxel for the treatment of advanced non-small-cell lung cancer, *Annals of Oncology*, 17, 1263-1268p
- Han, H., Wang, J., Chen, T., Yin, L., Jin, Q., Ji, J.**, 2017, Enzyme-sensitive gemcitabine conjugated albumin nanoparticles as a versatile theranostic nanoplatform for pancreatic cancer treatment, *Journal of Colloid and Interface Science*, 507, China, 217–224p
- Hart, S.**, 2006, Ionising radiation: promoting safety for patients, visitors and staff, *Learning Zone Oncology Nursing*, 20, 47-57p
- Hossenifar, N., Sharif, A., Goodarzi, N., Amini, M., Dinarvand, R.**, 2017, Preparation of human serum albumin nanoparticles using a chemometric technique, *Journal of Nanostructure in Chemistry*, 7, Iran, 327–335p
- Iusuf, D., Hendrikx, J. J., van Esch, A., van de Steeg, E., Wagenaar, E., Rosing, H.**, 2015, Human OATP1B1, OATP1B3 and OATP1A2 can mediate the in vivo uptake and clearance of docetaxel, *Int J Cancer*, 136, 225–33p.
- Iwao, Y., Tomiguchi, I., Domura, A., Mantaira, Y., Minami, A., Suzuki, T., Ikawa, T., Kimura, S., Itai, S.**, 2018, Inflamed site-specific drug delivery system based on the interaction of human serum albumin nanoparticles with myeloperoxidase in a murine model of experimental colitis, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 125, Japan, 141–147p
- Jiang L., Zhao X., Zheng C., Li F., Maclean J. L., Chen F.**, 2015, The quantitative detection of the uptake and intracellular fate of albumin nanoparticles, *RSC Adv.* 5 34956–34966p

KAYNAKAR DİZİNİ (Devam)

- Karanika, S., Karantanos, T., Kurosaka, S., Wang, J., Hirayama, T., Yang, G., Park, S., Golstov, A., Tanimoto, R., Li, L., Thoöpson, T. C., 2015,** GLIPR1- Δ TM synergizes with docetaxel in cell death and suppresses resistance to docetaxel in prostate cancer cells, *Molecular Cancer*, 14, USA, 122p
- Kumar, P. V. And Jain, N. K., 2007,** Suppression of agglomeration of ciprofloxacin-loaded human serum albumin nanoparticles, *PharmSciTech*, India 65
- Langer, K., Balthasar, S., Vogel, V., Dinauer, N., Briesen, H., Schuber, D., 2003,** Optimization of the preparation process for human serum albumin (HSA) nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, Germany, 169–180p
- Lazarri, s., Moscatelli, D., Codari, F., Salmona, M., Morbidelli, M., Diomede, L., 2012,** Colloidal stability of polymeric nanoparticles in biological fluids, *J Nanopart Res*, 14, Italy, 920p
- Lin, M., Huang, J., Zhang, D., Jiang, X., Zhang, J., Yu, H., Xiao, Y., Shi, Y., Guo, T., 2016,** Hepatoma-targeted radionuclide immune albumin nanospheres: ¹³¹I-antiAFPmAb-GCV-BSA-NPs, *Analytical Cellular Pathology*, China, 8p
- Lin, W., Garnett, M. C., Schacht, E., Davis, S. S., Illum, L., 1999,** Preparation and *in vitro* characterization of HSA-mPEG nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics* 189, Belgium, 161–170p
- Liu, C., Kao, C., Tseng, Y., Lo, Y., Chen, C., 2017,** Ginger Phytochemicals Inhibit Cell Growth and Modulate Drug Resistance Factors in Docetaxel Resistant Prostate Cancer Cell.
- Liu, F., Zhou, M., Zhang, F., 1998,** ¹²⁵I labelling of human serum albumin and fibrinogen and a study of protein adsorption properties on the surface of titanium oxide film, *Application Radiat Isot*, 49, China, 67-72p
- Lomis, N., Westfall, S., Farahdel, L., Malhotra, M., Shum-Tim, D., Prakash, S., 2016,** Human serum albumin nanoparticles for use in cancer drug delivery: process optimization and *in vitro* characterization, *Nanomaterials*, 116, Canada 66
- Maham, A., Thang, Z., Wu, H., Wang, J., Lin, Y., 2009,** Protein based nanomedicine platforms for drug delivery, 15, 1706-21p
- Mahapatro, A. and Singh, D. K., 2011,** Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines, *Journal of Nanobiotechnology*, 9, USA, 55p
- Mahdavian, P., Bahadorikhalili, S., Vafaei, S.Y., Daman, Z., Amini, M., 2017,** Peptide functionalized poly ethylene glycol-poly caprolactone nanomicelles for specific cabazitaxel delivery to metastatic breast cancer cells, *Material Science and Engineering C*, 301–312p.

KAYNAKAR DİZİNİ (Devam)

- Mathur, A., Elmageed, Z. Y. A., Liu, X., Kostochka, M. L., Zhang, H., Abdel-Mageed, A. B., Mondal, D.,** 2014, Subverting ER-Stress towards apoptosis by nelfinavir and curcumin coexposure augments docetaxel efficacy in castration resistant prostate cancer cells, Plos One
- Mirjolet, C., Boudon, J., Loiseau, A., Chevrier, S., Boidot, R., Oudot, A., Collin, B., Martin, E., Joy, P.A., Millot, N., Crehance, G.,** 2017, Docetaxel titanate nanotubes enhance radiosensitivity in an androgen-independent prostate cancer model, International Journal of Nanomedicine, 12, 6357-6364p
- Miyake, H., Sugiyama, T., Matsushita, Y., Tamura, K., Motoyoma, D., Ito, T., Otsuka, A.,** 2017, No significant impact of prior treatment profile with docetaxel on the efficacy of cabazitaxel in Japanese patient with metastatic castration-resistant prostate cancer, 34, 141p
- Mody, R.J., Wu, Y.M., Lonigro, R.J.,** 2015, Integrative clinical sequencing in the management of refractory or relapsed cancer in youth, Original Investigation, 314, 913-925p
- Mumtaz, M., Lin, L. S., Hui, K. C., Khir, A. S. M.,** 2009, Radioiodine I-131 for the therapy of graves' disease, Malaysian Journal of Medical Sciences, 16(1), Malaysia, 25p
- Mushtaq, S., Jeon, J., Shahen, A., Jang, B. S., Park, S. H.,** 2016, Critical analysis of radioiodination techniques for micro and macro organic molecules, J Radioanal Nucl Chem, 309, Hungary, 859–889p
- Müller, C., Struthers, H., Winiger, C., Zhernosekov, K., Schibli, R.,** 2013, DOTA conjugate with an albumin-binding entity Enables the first folic acid-targeted ¹⁷⁷Lu-radionuclide tumor therapy in mice, Journal of Nuclear Medicine, 54, Switzerland, 124–131p
- Nagethian, N., Goodarzi, N., Amini, M., Atyabi, F., Khorramizadeh, R., Dinarvand, R.,** 2016, Biotin/Folate decorated Human serum albumin nanoparticles of docetaxel: Comparison of chemically conjugated nanostructures and physically loaded nanoparticles for targeting of breast cancer, Chem Biol Drug Des, 87, Iran, 69–82p 67
- Nieuweboer, A. J. M., Morree, E., Graan, A., Sparreboom, A., Wit, R., Matjijssen, R. H. J.,** 2015, Inter-patient variability in docetaxel pharmacokinetics: A review, 605-613p.
- Niknejad, H. and Mahmoudzadeh, R.,** 2015, Comparison of different crosslinking methods for preparation of docetaxel loaded albumin nanoparticles, Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 14(2), Iran, 385-394p.
- Nosrati, H., Rakhshbahar, A., Salehiabar, M., Afroogh, S., Manjili, H. K., Danafar, H., Davaran, S.,** Bovine serum albumin: An efficient

KAYNAKAR DİZİNİ (Devam)

- biomacromolecule nanocarrier for improving the therapeutic efficacy of chrysin, *Journal of Molecular Liquids*, 271, Iran, 639-646p
- Nourozi, P., Amini, M., Mottoghitalab, F., Tekie, F. S.M., Dinarvand, R., Mirzaie, Z. H., Atyabi, F.**, Design and fabrication of dual-targeted delivery system based on gemcitabine conjugated human serum albumin nanoparticles, Iran
- Peer, A., Gottfried, M., Sinibaldi, V., Carducci, M., Eisenberger, M., Sella, A., Amit, R., Berger, R., Keizman, D.**, 2014, Comparison of abiraterone acetate versus ketoconazole in patients with metastatic castration resistant prostate cancer refractory to docetaxel, 74, 433-440p
- Prosapio, V., Reverchon, E., De Marco, I.**, 2014, Antisolvent micronization of BSA using supercritical mixtures carbondioxide + organic solvent, *The Journal of Supercritical Fluids*, 94, Italy, 189–197p
- Qu, N., Lee, R., Sun, Y., Cai, G., Wang, J., Wang, M., Lu, J., Meng, Q., Teng, L., Wang, D., Teng, L.**, 2016, Cabazitaxel-loaded human serum albumin nanoparticles as a therapeutic agent against prostate cancer, *International Journal of Nanomedicine*, 11, China, 3451–3459p
- Qu, N., Sun, Y., Li, Y., Hao, F., Qiu, P., Teng, L., Xie, J., Gao, Y.**, 2019, Docetaxel-loaded human serum albumin (HSA) nanoparticles: synthesis, characterization, and evaluation, *Biomedical Engineering Online*, 18:11, China 68
- Quian, C. and Liu, Z.**, 2016, Albumin Carriers for Cancer Theranostics: A conventional platform with new promise, *Advanced Materials*, 28, China, 10557–10566p
- Redin, I. L., Boiero, C., Martínez-Ohárriz, M. C., Agüeros, M., Ramos, R., Penuelas, I., Allemandi, D., Llabot, J. M., Irache, J. M.**, 2018, Human serum albumin nanoparticles for ocular delivery of bevacizumab, *International Journal of Pharmaceutics*, 541, Spain, 214–223p
- Prosapio, V., Reverchon, E., De Marco, I.**, 2014, Antisolvent micronization of BSA using supercritical mixtures of carbondioxide+organic solvent, *The Journal of Supercritical Fluids*, 94, 189-197p
- Ruttala, H. B., Ko, Y. T.**, 2015, Liposome Encapsulated Albumin-Paclitaxel Nanoparticle for Enhanced Antitumor Efficacy, *Pharm Res*, 32, New York, 1002–1016p
- Sarıkaya, M. ve Enginar, H.**, 2012, L-Tirozin'in 131I ile Radyoişaretlenmesi ve Radyofarmasötik Potansiyelinin İncelenmesi, *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 12, Afyon, 1-8s
- Scheer, A., Feijen, J., Elhorst, J. K., Dagneaux, P., Snodders, C.**, 1978, Feasibility of radiolabelling for human serum albumin (HSA) adsorption studies, *Journal of Colloid and Interface Science*, 66, Netherlands

KAYNAKAR DİZİNİ (Devam)

- Sherma, J. And Fried,** 2011, Review of advances in the thin layer chromatography of pesticides: 2008–2010, *Journal of Environmental Science and Health*, 46, USA, 557–568p
- Singh, R., Sankar, C., Rajasree, P. H.,** 2012, Human serum albumin nanoparticles for enhanced drug delivery to treat breast cancer: Preparation and In Vitro assessment, *Int. J. of Pharm. & Life Sci.*, 2055-2063p
- Sleep, D.,** 2014, Albumin and its application in drug delivery, *Expert Opinion on Drug Delivery*, 12, UK, 793-812p
- Taghvaei, S., Kasesz, Y., Barough, M. S.,** 2017, Analysis of the caregiver effective dose during I-131 therapy of thyroid, *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 14:1361-5. 69
- Taneja, N., Singh, K.,** 2018, Rational design of polysorbate 80 stabilized human serum albumin nanoparticles tailored for high drug loading and entrapment of irinotecan, *International Journal of Pharmaceutics*, 536, UK, 82–94p
- Tang, X., Wang, G., Shi, R., Jiang, K., Meng, L., Ren, H., Wu, J., Hu, Y.,** 2015, Enhanced tolerance and antitumor efficacy by docetaxel-loaded albumin nanoparticles, *Drug Delivery*, 23(8), China, 2686–2696p
- Thakor, A.S. and Gambhir, S. S.,** 2013, Nanooncology: The future of cancer diagnosis and therapy, *CA Cancer J Clin*, 63, 395–418p
- Tian, L., Chen, Q., Yi, X., Wang, G., Chen, J., Ning, P., Yang, K., Liu, Z.,** 2017, Radionuclide I-131 labeled albumin-paclitaxel nanoparticles for synergistic combined chemo-radioisotope therapy of cancer, *Theranostics* 7(3), China, 614-623p
- Tiwari, G., Tiwari, R., Sriwastawa, B., Bhari, L., Pandey, S., Pandey, P., Bannerjee, S.,** 2016, Drug delivery systems: An updated review, *International Journal of Pharmaceutical Investigation*,
- Van der Veldt, A. A., Hendrikse, N. H., Smit, E. F., Mooijer, M. P., Rijnders, A. Y., Gerritsen, W. R.,** 2010, Biodistribution and radiation dosimetry of ¹¹C-labelled docetaxel in cancer patients, *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 37, 1950–8p.
- Wang, X., Yang, L., Chen, Z., Shin, D.,** 2008, Application of nanotechnology in cancer therapy and imaging, *CA Cancer J Clin*, ;58, Atlanta, 97–110p 70
- Wang, Y., Zhang, S., Iqbal, S., Chen, A., Wang, X., Wang, Y., Liu, D., Bai, K., Kucuk, O., Wu, D.,** 2014, Pomegranate extract inhibits the bone metastatic growth of human prostate cancer cells and enhances the *in vivo* efficacy of docetaxel chemotherapy, 74, 497-508p
- Williams, J. F., Muenchen, H. J., Kamradt, J. M., Korenchuk, S., Pienta, K. J.,** 2000, Treatment of androgen-independent prostate cancer using antimicrotubule agents docetaxel and estramustine in combination: An experimental study, *The Prostate*, 44, 275–278p

KAYNAKAR DİZİNİ (Devam)

- Wu, M., Lian, B., Deng, Y., Feng, Z., Zhong, C., Wu, W., Huang, Y., Wang, L., Zu, C., Zhao, X.,** 2017, Resveratrol-loaded glycyrrhizic acid-conjugated human serum albumin nanoparticles wrapping resveratrol nanoparticles: Preparation, characterization, and targeting effect on liver tumors, *Journal of Biomaterials Applications*, 32(2), 191–205p
- Xue, L., Wang, Z., Li, H., Li, Z., Chen, Q., Zhang, P., Chen, H., Wang, Z., Chong, T.,** 2017, RBPJ contributes to acquired docetaxel resistance in prostate cancer cell, 13, 279-285p
- Yasri, S., Wiwanitkit, V.,** 2019, Nanotechnology in oncology: A concern on its unwanted effects and ethics, *Journal of Medical Society*, 32, Thailand, 81-3p
- Yurt F., Ünak, P., Aşıkoğlu, M., Erenel, G., Özkılıç, H., Dündar, Ç., Tuğlular, I.,** 1998, Radiopharmaceutical potential of I-¹³¹ labeled diazepam, *International Symposium on Modern Trends in Radiopharmaceuticals for Diagnosis and Therapy*, IAEA-SM-355, 114-115p
- Yurt F., Ocakoglu K., Colak S.G., Ersoz O.A., Er O.,** 2017, Synthesis and investigation of anticancer potential of radiolabeled naphthalene monoimide bearing imidazolium salt, *Chemical Biology & Drug Design*, 90, 141-146p
- Yurt F., Ince M., Colak S.G., Ocakoglu K., Er O., Soylu H.M.,** 2017, Investigation of in vitro PDT activities of zinc phthalocyanine immobilised TiO₂ nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, 524, 467-474p
- Yurt Onaran F., Sarı F., İnce Ocakoğlu M., Colak S.G., Er O., Soylu H.M.,** 2018, Photodynamic therapy and nuclear imaging activities of SubPhthalocyanine integrated TiO₂ nanoparticles, *Journal of Photochemistry and Photobiology a-chemistry*, 367, 45-55p
- Zhao, S., Wang, W., Huang, Y., Fu, Y., Chen, Y.,** 2014, Paclitaxel loaded human serum albumin nanoparticles stabilized with intermolecular disulfide bonds, *Royal Society of Chemistry*, 5, 1658–1663p



TEŞEKKÜR

Tez konusunun belirlenmesinden tezin son aşamasına kadar kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile yüksek lisans eğitimim boyunca olumlu ve yapıcı eleştirileriye bana yol gösteren, yoğun iş temposunda bile bana vakit ayırıp yardımlarını esirgemeyen Tez Danışmanım saygı değer hocam Sayın Prof. Dr. Fatma YURT ONARAN'a teşekkürü borç bilirim. Çalışmalarım boyunca tecrübeleri doğrultusunda tüm samimiyetleriyle bana yardımcı olan, birlikte çalışmaktan çok keyif aldığım sevgili arkadaşlarım Sayın Ayça TUNÇEL ve Derya ÖZEL'e çok teşekkür ederim. Son olarak tüm hayatım boyunca olduğu gibi akademik hayatımda da bana desteğini esirgemeyen, her zaman inanan güvenen sevgili aileme teşekkürlerimi sunarım.

18 / 06 / 2019

Ebru ERTÜGEN



ÖZGEÇMİŞ

ADI SOYADI : Ebru ERTÜĞEN
DOĞUM YERİ : İzmir / TÜRKİYE
DOĞUM TARİHİ : 21/09/1991

ÖĞRENİM BİLGİSİ

LİSANS: Anadolu Üniversitesi
Malzeme Bilimi ve Mühendisliği
YÜKSEK LİSANS: Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Anabilim Dalı