

**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**YEŞİL EKSTRAKSİYON YÖNTEMİ İLE ELDE EDİLEN *Oryza sativa* L. ATIK KABUĞU PROTEİN EKSTRELERİNİN KİTOSAN
NANOPARTİKÜLLERİNE ENKAPSÜLASYONUNUN
OPTİMİZASYONU VE YÜKLÜ NANOPARTİKÜLLERİN
ÇEŞİTLİ TÜMÖR HÜCRELERİNE ANTİTÜMÖROJENİK
AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

GÖZDE BUDAK

KOCAELİ 2019

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

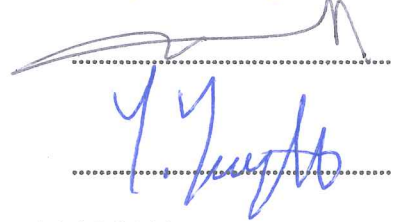
YÜKSEK LİSANS TEZİ

YEŞİL EKSTRAKSİYON YÖNTEMİ İLE ELDE EDİLEN *Oryza sativa* L. ATIK KABUĞU PROTEİN EKSTRELERİNİN KİTOSAN
NANOPARTİKÜLLERİNE ENKAPSÜLASYONUNUN
OPTİMİZASYONU VE YÜKLÜ NANOPARTİKÜLLERİN
ÇEŞİTLİ TÜMÖR HÜCRELERİNE ANTİTÜMÖROJENİK
AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

GÖZDE BUDAK

Doç.Dr. Canan SEVİMLİ GÜR
Danışman, Kocaeli Üniv.

Doç.Dr. Meltem MARAŞ
Jüri Üyesi, Bülent Ecevit Üniv.
Dr.Öğr. Üyesi Yonca YÜZÜGÜLLÜ
KARAKUŞ
Jüri Üyesi, Kocaeli Üniv.



Tezin Savunulduğu Tarih: 24.05.2019

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasında atık Oryza sativa L. kabuklarından yüksek basınçlı sıcak su ekstraksiyonu ile elde edilen protein ekstratlarının iyonik jelasyon metodu ile nanopartikül haline getirilerek çeşitli kanser hücre hatları üzerinde antikanser etkinliğinin araştırılması gerçekleştirilmiştir.

Yüksek lisans serüvenim boyunca desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, bana her zaman abla olan ve hakkını ödeyemeyeceğim çok sevgili danışmanım Doç. Dr. Canan SEVİMLİ GÜR'e teşekkürlerimi sunarım.

Tezimi sonlandırabilmem için bana özgür bir çalışma ortamı sunan, benimle deneyimlerini paylaşan ve gerekli desteği ve özveriye gösterdikleri için Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü, Öncül Akışkan Teknolojileri Laboratuvarından Doç. Dr. Özlem YEŞİL ÇELİKTAŞ'a ve Arş. Gör. Esra İLHAN'a, Hayvan Hücre Kültürü Laboratuvarı'ndan Dr. Öğr. Üyesi Sultan GÜLÇE İZ'e ve doktora öğrencisi Gizem ÖRS'e teşekkürü bir borç bilirim.

Çocukluğumdan beri her zaman birlikte ağlayıp, birlikte güldüğüm her derdime ortak olan dostlarım; Ayşegül ÇEKİÇ, Elif Melis ENÇ ve kuzenim Ceren SAYLAÇ'a, üniversitede tanışıp birçok şey paylaştığım dostlarım; Hümeysra ÖZKAN ve Melis ZENGİN KARATAŞ'a beni yüksek lisans sürecimde yalnız bırakmadıkları için teşekkür ederim.

Doğduğum günden bugüne dek maddi ve manevi desteklerini her zaman hissettiğim ve hissedeceğim annem Mürvet, babam Cavit BUDAK'a teşekkür ederim.

Bu tez çalışması Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (KOUBAP), 2018/149 no'lu proje ile maddi olarak desteklenmiştir.

Mayıs-2019

Gözde BUDAK

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
TABLolar DİZİNİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ÖZET.....	ix
ABSTRACT.....	x
GİRİŞ	1
1. GENEL BİLGİLER	2
1.1. Oryza Sativa L.'nin Genel Özellikleri.....	2
1.1.1. Oryza sativa L.'nin kullanım alanları	6
1.1.2. Oryza sativa L.'nin sağlık üzerine etkileri	8
1.2. Ekstraksiyon	9
1.2.1. Yüksek basınçlı sıcak su ekstraksiyonu (YBSSE)	10
1.3. Nanopartikül	14
1.3.1. Mikro ve nano enkapsülasyon	15
1.3.1.1. Mikro ve nano enkapsülasyon için ham maddeler ve kaplama malzemeleri.....	17
1.4. Kitosan.....	18
1.4.1. Kitosan nanopartiküllerinin hazırlanması	19
1.4.1.1. İyonik jelasyon metodu.....	20
1.4.1.2. Kitosan nanopartiküllerinin özellikleri	20
1.5. Poaceae Familyasına ait Antikarsinojenik Aktivite Çalışmaları	21
2. MALZEME VE YÖNTEM.....	29
2.1. Örneklerin Eldesi.....	29
2.2. Yüksek Basınçlı Sıcak Su Ekstraksiyonu ile Pirinç Kabuğu Ekstraktlarının Eldesi	29
2.3. Pirinç Kabuğu Ekstrelerinin Protein İçeriğinin Belirlenmesi.....	30
2.4. Kitosan Nanopartiküllerinin Sentezi	30
Şekil 2.3. Elde edilen protein ekstraktlarının iyonik jelasyon metodu ile enkapsüle edilmesi.	30
2.1. Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyel Analizler	30
2.1.1. Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) analizi	31
2.1.2. Fourier dönüşüm kızılötesi (FTIR) analizi	31
2.1.3. Taramalı elektron mikroskopi (SEM) analizi.....	31
2.2. Tümör Hücrelerinin Kültür Ortamında Çoğaltılması ve Ekstrelerin İnkübasyonu	31
2.2.1. Deneyde kullanılan hücre hatları.....	33
2.3. Hücre Canlılık Oranlarının Belirlenmesi	34
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	36
3.1. Ekstraksiyon sonrasında ekstrelerin protein miktarının belirlenmesi	36
3.2. Ekstrakt yüklü kitosan nanopartiküllerinin sentezi	36
3.3. İn vitro Sitotoksik Aktivite Çalışmaları.....	39

3.3.1. Protein ekstraları ile yüklü nanopartiküllerin tümör hücreleri üzerine antitümörojenik etkileri.....	39
SONUÇLAR VE ÖNERİLER	62
KAYNAKLAR.	63
KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER	74
ÖZGEÇMİŞ	75



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Nanosfer ve nanokapsül yapısı.....	16
Şekil 1.2.	Kitosanın ana kullanım alanları.....	19
Şekil 1.3.	İyonik jelasyon yöntemi ile yüklü kitosan nanopartiküllerinin hazırlanması.	20
Şekil 2.1.	Yüksek basınçlı sıcak su ekstraksiyon cihazı (Amar Equipments, India) ve ekstraksiyon sonrasında elde edilen protein lizati.....	29
Şekil 2.2.	Kurutulmuş pirinç kabuğu örneği.	29
Şekil 2.3.	Elde edilen protein ekstraktlarının iyonik jelasyon metodu ile enkapsüle edilmesi.	30
Şekil 2.4.	Oluşturulan kitosan nanopartiküllerinin karakterizasyonu (Malvern Zeta-sizer Nano-ZS, Malvern, Inst. Ltd. UK).	31
Şekil 2.5.	MDA-MB-231, MCF7, A-549 ve Vero hücrelerinin çoğaltılması.	32
Şekil 2.6.	Hücrelerin pasajlanması, çoğaltılması ve dondurulması.	32
Şekil 2.7.	MDA-MB-231, MCF-7, A-549 ve Vero hücrelerinin dondurulması.....	32
Şekil 2.8.	MCF-7 (insan, meme, adenokarsinoma) hücre hattı.	33
Şekil 2.9.	MDA-MB-231 (insan, meme, adenokarsinoma) hücre hattı.....	33
Şekil 2.10.	A-549 (insan, akciğer karsinomu) hücre hattı.	33
Şekil 2.11.	Vero (Afrika yeşil maymun, böbrek epiteli) hücre hattı.	34
Şekil 2.12.	Hücrelerin mikro platelere/mikroplakalara dağıtılması.	34
Şekil 2.13.	Ekstrelerin hücrelerin üzerine inkübasyonu ve MTT protokolünün uygulanması.....	34
Şekil 2.14.	Hücrelere MTT testi yapılması.	35
Şekil 2.15.	MTT protokolü sonrası hücrelerde oluşan mavi formazan miktarına bağlı absorbans değerlerinin mikropilaka okuyucu spektrofotometrede ölçülmesi (BioTek-ELx800, UK).....	35
Şekil 3.1.	Bradford yöntemi sonrasında çizilen standart eğri.....	36
Şekil 3.2.	Ekstrakt yüklenmiş kitosan nanopartiküllerinin dış yüzey betimi SEM ile gözlenmiştir.	37
Şekil 3.3.	Enkapsüle edilmiş atık pirinç kabuğu proteininin (A), ve kitosanın (ekstrakt yok) (B) boyut dağılımı.	37
Şekil 3.4.	DSC çalışmaları, kitosan nanopartiküllerindeki ekstraktın fiziksel durumunu araştırmak için gerçekleştirildi.....	38
Şekil 3.5.	Kitosanın FTIR spektrumu.....	39
Şekil 3.6.	Kitosan ve boş kitosan-TPP nanopartikülünün 48 saatin sonunda, çeşitli kanser hücre hatları üzerinde (A549, MCF7, MDA-MB-231) ve normal hücre hattında (Vero) hücre canlılıklarına olan etkisi. NK (hücre+medium+%0,1 DMSO), negatif kontrol; PK (doksorubisin 10µG/mL), pozitif kontrol.....	41
Şekil 3.7.	Pirinç kabuğu protein ekstresi ile yüklü RHECN1, RHECN2 ve RHECN3 nanopartiküllerinin 48 saat sonunda, çeşitli kanser hücre hatlarının (A549, MCF7, MDA-MB-231) ve	

	normal hücre hattının (Vero) hücre canlılıklarına olan etkisi. NK (hücre+medium+%0,1 DMSO), negatif kontrol. PK (doksorubisin 10µG/mL), pozitif kontrol.....	46
Şekil 3.8.	RHECN3 nanopartikülünün MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki zamana bağlı sitotoksik aktivitesi. Her hücre hattı RHECN3 ile 24, 48, 72, 96, 110 ve 134 saat 37°C’de inkübe edilmiş ve MTT testi uygulanmış ve %hücre canlılık hesaplanmıştır.....	48
Şekil 3.9.	RHECN3 nanopartikülünün MCF-7 hücre hattı üzerindeki zamana bağlı sitotoksik aktivitesi. Her hücre hattı RHECN3 ile 24, 48, 72, 96, 110 ve 134 saat 37°C’de inkübe edilmiş ve MTT testi uygulanmış ve %hücre canlılık hesaplanmıştır.	49
Şekil 3.10.	RHECN3 nanopartikülünün A549 hücre hattı üzerindeki zamana bağlı sitotoksik aktivitesi. Her hücre hattı RHECN3 ile 24, 48, 72, 96, 110 ve 134 saat 37°C’de inkübe edilmiş ve MTT testi uygulanmıştır ve %hücre canlılık hesaplanmıştır.....	49

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1.1. Kahverengi ve beyaz pirincin besinsel bileşenlerinin karşılaştırılması ($\mu\text{G/mL}$).....	5
Tablo 1.2. Pirinç kabuğu bileşimi.....	6
Tablo 3.1. Kitosan'ın 48 saatin sonunda, çeşitli kanser hücre hatları üzerinde (A549, MCF7, MDA-MB-231) ve normal hücre hattında (Vero) hücre canlılıklarına olan etkisi. NK (hücre+medium+%0,1 DMSO), negatif kontrol; PK (doksorubisin 10 $\mu\text{G/mL}$), pozitif kontrol.....	40
Tablo 3.2. Boş nanopartikülün 48 saatin sonunda, çeşitli kanser hücre hatları üzerinde (A549, MCF7, MDA-MB-231) ve normal hücre hattında (Vero) hücre canlılıklarına olan etkisi. NK (hücre+medium+%0,1 DMSO), negatif kontrol; PK (doksorubisin 10 $\mu\text{G/mL}$), pozitif kontrol.....	40
Tablo 3.3. RHECN1 (%0,1 (w/v) ekstre) nanopartikülü 48 saatin sonunda, çeşitli kanser hücre hatlarının (A549, MCF7, MDA-MB-231) ve normal hücre hattının (Vero) hücre canlılıklarına olan etkisi. NK (hücre+medium+%0,1 DMSO), negatif kontrol; PK (doksorubisin 10 $\mu\text{G/mL}$), pozitif kontrol.....	43
Tablo 3.4. RHECN2 (%0,2 (w/v) ekstre) nanopartikülü 48 saatin sonunda, çeşitli kanser hücre hatlarının (A549, MCF7, MDA-MB-231) ve normal hücre hattının (Vero) hücre canlılıklarına olan etkisi. NK (hücre+medium+%0,1 DMSO), negatif kontrol; PK (doksorubisin 10 $\mu\text{G/mL}$), pozitif kontrol.....	44
Tablo 3.5. RHECN3 (%0,3 (w/v) ekstre) nanopartikülü 48 saatin sonunda, çeşitli kanser hücre hatlarının (A549, MCF7, MDA-MB-231) ve normal hücre hattının (Vero) hücre canlılıklarına olan etkisi. NK (hücre+medium+%0,1 DMSO), negatif kontrol; PK (doksorubisin 10 $\mu\text{G/mL}$), pozitif kontrol.....	46
Tablo 3.6. Pirinç kabuğu ekstresi yüklü nanopartiküllerin 3,125 $\mu\text{G/mL}$ konsantrasyonda A549, MCF7, MDA-MB-231 ve normal (Vero) hücre hatları üzerindeki hücre canlılık oranları.....	46
Tablo 3.7. Atık pirinç kabuğu protein ektreleri ile yüklü kitosan nanopartiküllerinin A549, MCF7, MDA-MB-231, Vero hücre hatlarındaki IC50 değerleri. Pozitif kontrol (doksorubisin, 10 $\mu\text{G/mL}$).....	47
Tablo 3.8. RHECN3 nanopartikülünün 3 adet tümörojenik ve 1 adet normal hücre hattı üzerindeki, 3,125 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda tümör hücrelerinin %canlılığına ve zamana bağlı olarak etkisi.	50

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

µG	: Mikro gram
µm	: Mikro metre
µM	: Mikro molar
A549	: İnsan akciğer karsinoma hücre hattı
Caco-2	: İnsan kolorektal adenokarsinoma hücre hattı
Caov-3	: İnsan over adenokarsinoma hücre hattı
cm ⁻¹	: Santimetre üzeri -1
G	: Gram
HCT-116	: İnsan kolorektal karsinoma hücre hattı
Hela	: İnsan serviks karsinoma hücre hattı
HepG2	: İnsan hepatoselüler karsinoma hücre hattı
HL-60	: Akut promiyelositik lösemi hücre hattı
HT-29	: İnsan kolon adenokarsinoma hücre hattı
IMR-32	: İnsan beyinnöroblastoma hücre hattı
INS832/13	: Rat, Pankreatik tümör
IU	: İnternasyonal ünite
M	: Molar
MCF-7	: İnsan, meme adenokarsinoma hücre hattı
MDA-MB-231	: İnsan, meme adenokarsinoma hücre hattı
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
NIH3T3	: Fare fibroblastı
Nm	: Nanometre
°C	: Santigrat derece
PC3	: İnsan prostat adenokarsinoma
RPMI-1640	: Moore ve diğ. tarafından Roswell Park Memorial Enstitüsü'nde geliştirilen bir hücre kültürü besiyeri
VERO	: Afrika yeşil maymun böbrek epiteli hücre hattı
w/v	: Hacim ağırlıkça

Kısaltmalar

AgNP	: Gümüş nanopartikülü
BSE	: Basınçlı Sıvı Ekstraksiyonu
BSSE	: Basınçlı Sıcak Su Ekstraksiyonu
CO ₂	: Karbon dioksit
CS-AL	: Kitosan-aljinat
CSNP	: Kitosan nanopartikülü
DMH	: 1,2-dimetilhidrazin
DMSO	: Dimetilsülfoksit

DPPH	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
DSC	: Differencial Scanning Calorimetry (Diferansiyel Taramalı Kalorimetri)
FTIR	: Fourier Transform Infrared Spectroscopy (Fourier Dönüşüm İnfrared Spektroskopi)
HCl	: Hidro klorik asit
IC ₅₀	: Inhibition Concentration (Minimum inhibisyon konsantrasyonu)
KCl	: Potasyum klorür
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NaOH	: Sodyum hidroksit
Na-TPP	: Sodyum tripolifosfat
NO ₂	: Azot dioksit
PGA	: Poliglikolit
PLA	: Polilaktik
PLGA	: Poli laktik koglikolit
PMMA	: Poli metil akrilat
SEM	: Scanning Electron Microscopy (Taramalı elektron mikroskopisi)
Si ₃ N ₄	: Silisyum nitrür
SiC	: Silisyum karbür
SiCl ₄	: Silisyum tetraklorür
SSE	: Sıcak Su Ekstraksiyonu
TPP	: Tripolifosfat
YBSSE	: Yüksek Basınçlı Sıcak Su Ekstraksiyonu

YEŞİL EKSTRAKSİYON YÖNTEMİ İLE ELDE EDİLEN ORYZA SATIVA L. ATIK KABUĞU PROTEİN EKSTRELERİNİN KİTOSAN NANOPARTİKÜLLERİNE ENKAPSÜLASYONUNUN OPTİMİZASYONU VE YÜKLÜ NANOPARTİKÜLLERİN ÇEŞİTLİ TÜMÖR HÜCRELERİNE ANTİTÜMÖROJENİK AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Ülkemizde bol olarak açığa çıkan atık lignoselülozik biyokütle olarak pirinç kabuğuna polifenol, flavonoid, yağ ve protein içeriği ile çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olması nedeniyle tıp, eczacılık ve gıda endüstrisindeki kullanımına olan ilgi her geçen gün artmaktadır. Bu çalışmanın amacı, yüksek basınçlı sıcak su ekstraksiyon yöntemi kullanılarak elde edilen atık pirinç kabuğu protein ekstresinin karakterizasyonu ve kitosan ile iyonik jelasyon metodu kullanılarak enkapsüle edilmesidir. Bu bağlamda, partikül büyüklüğü dağılımı diferansiyel tarama kalorimetrisi (DSC), fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile belirlenmiştir. Daha sonra pirinç kabuğu protein ekstresi içeren kitosan nanopartiküllerinin sitotoksik aktivitesi, A549 (insan, akciğer, karsinoma), MDA-MB-231 (insan, meme, adenokarsinoma), MCF-7 (insan, meme, adenokarsinoma) ve Vero (Afrika yeşil maymun, böbrek epiteli) hücre hatlarında altı konsantrasyon aralığında (3,12 ile 100µG/mL arasında) MTT deneyi kullanılarak 48 saat boyunca incelenmiştir. Kitosan nanopartikülleri, özellikle test edilen üç farklı kanser hücre hattı arasında insan, akciğer, karsinoma (A549) hücrelerinde en yüksek sitotoksikite sergilemiş ve normal Vero hücrelerinde ise sitotoksik etki göstermemiştir. En düşük hücre canlılığı %41 olarak A549 ile 3.12µG/mL’de görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Atık Pirinç Kabuğu, Kitosan Nanopartikülleri, Sitotoksik Aktivite, Tümör Hücreleri, Yüksek Basınçlı Sıcak Su Ekstraksiyonu.

OPTIMIZATION OF ENCAPSULATION OF *ORYZA SATIVA* L. WASTE RICE HUSK PROTEIN EXTRACTS OBTAINED BY GREEN EXTRACTION METHOD TO CHITOSAN NANOPARTICLES AND INVESTIGATION OF ANTITUMOROGENIC ACTIVITY OF LOADED CHITOSAN NANOPARTICLES TO VARIOUS TUMOR CELLS

ABSTRACT

Waste lignocellulosic biomass rice husk is abundantly found in our country. Since it has various biological activities with a content polyphenol, flavonoid, oil and protein, interest in its usage in medical, pharmaceutical and food industries is increasing day by day. In this study, the main objectives are to characterize rice husk protein extracts obtained using high pressure hot water, and to encapsulate the extracts with chitosan using ionic gelation method. In order to eliminate the low stability of proteins and to increase their bioviability, the protein extract are encapsulated with chitosan. In this context, particle size distributions were determined by differential scanning calorimetry (DSC), fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and scanning electron microscopy (SEM). After that the cytotoxic activity of chitosan nanoparticles containing rice husk protein extracts has been investigated in A549 (human, lung, carcinoma), MDA-MB-231 (human, breast, adenocarcinoma), MCF-7 (human, breast, adenocarcinoma) and Vero (African green monkey, kidney) cell lines within six concentrations ranging between 3.12 and 100 μ G/mL for 48 hours using MTT assay. Chitosan nanoparticles exhibited the highest cytotoxicity particularly on human lung carcinoma (A549) cells among three different cancer cell lines tested and was not cytotoxic to the normal Vero cells. The lowest cell viability has been seen as 41% at 3.12 μ G/mL with A549.

Keywords: Waste Rice Husk, Chitosan Nanoparticles, Cytotoxic Activity, Tumor Cells, High Pressure Hot Water Extraction.

GİRİŞ

Kanser, dünya çapında bir sağlık sorunudur ve sadece bir hastalık olarak tanımlanmayıp, kontrolsüz hücre proliferasyonunda en sık görülen vakadır. 100’den fazla farklı kanser türü vardır ve bunların çoğu, adını büyümeye başladıkları organ veya hücreden alır (Hawkins, 1992; Martinez ve diğ., 2003). Meme ve rahim ağzı kanseri, dünyadaki kadınlarda kansere bağlı başlıca ölüm nedenlerindendir. Bu tür kanserlerin yüksek prevalansı, erken kanser evrelerinde tespit edilmesini sağlayan stratejilerin bulunmamasından kaynaklanmaktadır (Palacio-Mejia ve diğ., 2009; Gök ve diğ., 2011). Kemoterapi kansere karşı en yaygın kullanılan tedavi yöntemidir, ancak bazı hastalar ilaçlara karşı direnç geliştirir ki bu son yıllarda önemli bir sorun haline gelmiştir. Tedaviye direnç, hastalar arasındaki bireysel farklılıkların yanı sıra tümör hücreleri arasındaki genetik farklılıkları da içeren çok çeşitli faktörden kaynaklanabilir (Gottesman, 2002; Jordan ve Wilson, 2004; Bhutia ve Maiti, 2008). Farmasötik bilim araştırmalarında yeni kaynakların doğal kaynaklardan keşfedilmesi çok büyük önem taşır.

Birçok araştırmacı bu hastalığın etkilerini ortadan kaldırmak için çaba harcarken diğer taraftan ekosistemlerin kullanılması birçok doğal kaynağın tükenmesine sebep olur. Bu sebeple, biyolojik atıkları yüksek katkı değerlikli ürünlere dönüştürmek ve endüstride yeni kullanım alanları oluşturmak gerekmektedir (Parades-Lopez ve diğ., 2010). Atıkların çevreye zarar vermeden değerlendirilmesi ve yeniden doğaya kazandırılması gerekir. Atıklardan biri lignoselülozik esaslı pirinç kabuğudur (çeltik kabuğu). Pirinç veya çeltik (*Oryza sp.*) buğdaygiller (*Poaceae*) familyasından bir bitki türüdür.

Prinç kabuğu, pirincin beyaz pirince işlenmesi sırasında açığa çıkan bir yan üründür (Mazlum, 1989). Pirinç üretimi sırasında taneler kabuklardan ayrılırken 2 kabuk açığa çıkar. İlk kabuk “kepektir” ve kimyasal içeriği yetiştiği konuma göre ve yetiştirme farklılıklarına göre değişiklik göstermekle birlikte hayvan yemi olarak da kullanılır (An ve diğ., 2011). İkinci kabuğa “kavuz veya kapçık” adı verilir. En dıştaki kabuktur ve serttir (Mazlum, 1989). Pirinç kabuğunun uygulama alanları çok çeşitlidir. Kırsal

kesimlerde ısınma ihtiyaçlarını karşılamak amacıyla yakacak olarak kullanılırken (Beagle, 1978), inşaat sektöründe yapı malzemesi olarak kullanılmaya elverişlidir. Ayrıca sanayide, renk ve koku giderici olarak pirinç kabuklarından aktif karbon elde edilmesi için kullanılabilir. Mısır, Japonya gibi ülkelerde refrakter malzeme üretimi ve izolasyon amacıyla pirinç kabuğundan faydalanılır.

Yeşil ekstraksiyon tekniği olarak adlandırılan basınçlı su ekstraksiyonu (Mustafa ve Tuner, 2011), doğaya zarar vermeyen solvent kullanılarak yüksek verimli alternatif yöntemlere ihtiyaç vardır. Basınçlı su ekstraksiyonu, yüksek basınç altında ve yüksek sıcaklık koşullarında solventler yardımıyla katı örneklerden analitlerin ekstraksiyonu amacıyla kullanılan bir tekniktir (Çam ve Işıl, 2006). Basınçlı solvent ekstraksiyonu biyoloji, farmasötik ve gıda sanayisinde popüler bir tekniktir.

Bu çalışmada ilk olarak, atık kabul edilen pirinç kabuğundan katma değeri yüksek ürünler elde edilecek şekilde değerlendirilmesi için atık pirinç kabuğundan yüksek basınçlı sıcak su ekstraksiyonu ile ham protein ekstresi elde edildi. İkinci olarak, pirinç kabuğu protein ekstraktları iyonik jelasyon metoduyla elde edilen kitosan nanopartiküllere enkapsüle edildi. Son olarak, pirinç kabuğu protein ekstresi yüklü kitosan nanopartiküllerin farklı tümör hücre hatları üzerinde sitotoksik etkileri incelenerek ilaç ve gıda sanayisinde kullanılması amaçlandı.

1. GENEL BİLGİLER

1.1. *Oryza Sativa L.*'nın Genel Özellikleri

Pirinç (*Oryza sativa L.*), dünyanın neredeyse yarısı için bir gıda maddesidir ve 100'den fazla ülkede yetiştirilmektedir (Ohtsubo ve diğ., 2005). Pirinç işleme sırasındaki atıklar, düşük besin değeri nedeniyle pirinç kepeğinden daha düşük kaliteli bir ürün olarak kabul edilmesine rağmen, pirinç tohumu ve pirinç kepeği varlığından dolayı fitokimyasal içeriği önemli olabilir. Pirinç tohumu, E vitamini, orizanol ve γ -aminobütirik asit (Yu ve diğ., 2007) gibi biyoaktif bileşikler, pirinç kepeği ise E vitamini ve oryzanol içerir (Danielski ve diğ., 2005). Son yirmi yılda yapılan araştırmalar, pirinç kepeğinin benzersiz bir antioksidan bileşik kompleksi içerdiğini göstermiştir. Bu bitkisel gıdaların diyabet, hipertansiyon, kardiyovasküler hastalık ve kanser gibi çeşitli metabolik hastalıkların tedavisinde faydalı olduğu bulunmuştur (Devi ve Arumughan, 2007). Pirinç kepeği türevli biyoaktif bileşenlerin antikanser etkilerine, apoptozu indüklemeye, hücre çoğalmasını önleme ve malign hücrelerde hücre döngüsü ilerlemesini değiştirme yetenekleri aracılık eder. Pirinç tohumu yetiştiriciliğinin kanserin önlenmesinde kilit bir rol oynadığı bildirilmiştir (Katyama ve diğ., 2002).

2008 yılında dünya pirinç üretimi yaklaşık 661 milyon metrik ton idi. En az 114 ülke pirinç yetiştirmektedir ve 50'den fazlası yıllık 100.000 ton veya daha fazla üretime sahiptir. Tüketimden önce, hemen hemen tüm pirinç öğütülmüş ve bunun sonucunda 66 milyon metrik ton pirinç kepeği 2008 yılında pirinç öğütme sonucunun yan ürünü olarak üretilmiştir (IRRI, 2008). Pirinç, dünyanın birçok bölgesinde, özellikle Asya ülkelerinde, temel bir gıda maddesidir. Dünyada her yıl yaklaşık 21–26 milyon ton pirinç üretilmektedir. Öğütme işleminden pirinç kabukları, kepekleri ve az miktarda kırılmış pirinç içeren büyük miktarda pirinç yan ürünü üretilir (Onyeneho ve Hettiarachchy 1992) ve pirinç kepeğinin küçük bir kısmı pirinç kepeği yağı yapmak için kullanılır. Birçok çalışma, pirinç atıklarında biyoaktif bileşiklerin varlığını bildirmiştir. Pirinç kepeği, zengin bir orzanyol kaynağı veya sterilerül esterdir (Seetharamaiah ve Prabhakar 1986; Norton 1995). Ek olarak

pirinç kepeği, büyük bir antioksidan aktivite sergileyen potansiyel bir tokoferol kaynağı, tokotrienolün genel fenolik bileşiği (Nicolosi ve diğ., 1994) sağlanması ve birçok kronik hastalık riskinin azaltılmasında önemle tavsiye edildiğini gösterir (Liu, 2007). Pirinç kepeğinin faydalı bileşenleri, steroller, c-orizanoller, tokoferoller, tokotrienoller ve fenolik bileşikler içerir (Aguilar-Garcia ve diğ., 2007). Pirinç kepeğinde bulunan ferulik asit, *p*-kumarik asit ve diferulat gibi bazı özel fenolik asitler meyve ve sebzelerde önemli miktarlarda bulunmaz (Adom ve Liu, 2002). Ferulik asidin aldoz redüktaz üzerindeki inhibitör etkinliği, diyabetik komplikasyonların önlenmesiyle ilişkilidir (Yawadio ve diğ., 2007). Triterpen alkollerden veya ferulik asit esteri olan sterollerden oluşan bir lipofilik fitosterol karışımı olan c-oryzanol, antioksidan aktivite ve kolesterol düşürücü etki sergiler (Miller ve Engel, 2006). C-orizanollerin yanı sıra, tokoferoller, tokotrienoller ve pirinç kepeğindeki bazı fenolik bileşikler sağlığın korunmasında önemli bir rol oynayan antioksidan aktivite, antimutajenik ve antikanser gibi potansiyel olarak faydalı etkilere sahiptir (Nam ve diğ., 2005). Serbest, çözünür ester ve çözünmeyen bağlı formda bulunan ferulik asit ve *p*-kumarik asit, pirinçteki başlıca fenolik bileşiklerdir (Sosulski ve diğ., 1982).

Pirinç, dünyadaki en yaygın yetiştirilen gıda tahıl mahsullerinden biridir ve özellikle Asya'da, insan nüfusu için en önemli gıda maddesi olarak hizmet etmektedir. Ayrıca, pirinç üretiminin çoğu, beslenme ve kalori alımı amacıyla insan tüketimi için pişmiş formda kullanılır. Bununla birlikte, kabukları gibi genel olarak tüketilmemiş bir kısım vardır. Hasat edilen pirincin yaklaşık %20 kuru ağırlığına sahip olan pirinç kabukları, Güney Kore'de yıllık olarak bir milyon tondan fazla bir ağırlıkta üretilmektedir (Park ve Lee, 2009; Lee ve diğ., 2003). Bununla birlikte, pirinç işlemenin bir yan ürünü olan pirinç kabuğu, düşük sindirilebilirlik, düşük kütle yoğunluğu, yüksek silika içeriği ve aşındırıcı özelliklerden dolayı besleme stoğu olarak düşük maliyetli değerleri nedeniyle çoğunlukla israf edilmektedir (Saha ve Cotta, 2008). Genel olarak, kabuk gibi bitkilerin dış katmanları, tohumları oksidatif hasardan korumada önemli bir rol oynar ve bu nedenle flavonoidler, hidrokinamik asit türevleri, izoviteksin, fitik asit, anisol, vanilin, sringaldehit gibi büyük miktarlarda güçlü antioksidanlar içerir (Lee ve diğ., 2003; Asamari ve diğ., 1996). Pirinç kabuğu, doğal antioksidan kaynağıdır (Moure ve diğ., 2001). Özellikle, bu tür bir atığın önde gelen bir örneği olan pirinç kabuğu, iç malzemeleri oksidatif strese karşı korumak için polifenolik bileşikler içeren

bir antioksidan savunma sistemi içerir (Ramarathnam ve diğ., 1988). Son zamanlarda, Ramarathnam ve diğ., (1989), beyaz pirinç kabuğundan izole edilmiş izoviteksinin, kuvvetli antioksidan aktivite gösterdiğini göstermişlerdir (Ramarathnam ve diğ., 1989). Kim ve diğ., pirinç kabuğu kaynaklı momilakton B'nin insan kolon kanseri hücrelerine karşı sitotoksik ve antitümör aktivitesine sahip olduğunu bulmuştur (Kim ve diğ., 2007). Ayrıca, Jeon ve ark., pirinç kabuğunun metanol ekstraktlarından elde edilen fenolik bileşiklerin, tekli oksijenin temizleyicilere karşı yüksek antioksidan aktivite gösterdiğini ve insan lenfositlerinde DNA'ya yüksek hidrojen peroksitin neden olduğu hasarı inhibe ettiğini göstermişlerdir (Jeon ve diğ., 2006).

Çeşitli şekillerde tahıl yiyecekleri günlük diyetin önemli bir bileşenidir. Pirinç, dünyada en çok tüketilen tahıllardan biridir ve 100'den fazla ülkede yetiştirilmektedir. Dünya nüfusunun yarısından fazlasının temel gıdası olarak rol oynamaktadır (Wu ve diğ., 2013). Doğrudan kabuğu alınmış kahverengi pirinç, kepek katmanı (%6-7), embriyo (%2-3) ve endospermden (yaklaşık %90) oluşur (Chen ve diğ., 1998). Beyaz pirinç, pişirmeyi daha kolay ve daha hızlı yapmak, daha uzun bir raf ömrü sağlamak ve en önemlisi daha iyi bir kalite sağlamak için kepek ve ruşeymi giderilmiş kahverengi pirinçtir. Bununla birlikte, kepek ve ruşeymin uzaklaştırılmasında yer alan öğütme prosedürleri, aynı zamanda dengeli bir diyet için gerekli olan birçok önemli besin maddesinin dramatik bir şekilde kaybedilmesine yol açmaktadır (Zhou ve Zhang, 2002; Zhou ve diğ., 2002; Lamberts ve diğ., 2007). Kahverengi pirinç ve beyaz pirinç içindeki çeşitli besinler Tablo 1'de sunulmaktadır. Beyaz pirinç ile karşılaştırıldığında, kahverengi pirinç sadece temel besin bileşenlerinde daha zengin değil, aynı zamanda, çoğunlukla ruşeym ve kepek tabakalarında bulunan ferulik asit, γ -ozanzanol ve gama aminobütirik asit (GABA) gibi daha fazla biyoaktif bileşenler de içermektedir (Ohtsubo ve diğ., 2005; Butsat ve Siriamornpun, 2010). Bu nedenle, kahverengi pirinç, yüksek besin değeri nedeniyle sağlık bilincine sahip kişiler tarafından tercih edilmektedir. Bununla birlikte, kahverengi pirinci, zayıf dokusu, kepek kokusu, sindiriminin zorluğu ve kolay pişirilememesi özelliğinden dolayı uygun bir sofraya pirinci sayılmaz (Komatsuzaki ve diğ., 2007). Bu nedenle, esas olarak soya fasulyesi ve sirke gibi ürünlerin fermentasyonunda bir ortam olarak veya kahvaltılık gevrekleri ve kahverengi pirinç çayı gibi gıdaların işlenmesinde bir malzeme olarak kullanılır (Ohtsubo ve diğ., 2005).

Tablo 1.1. Kahverengi ve beyaz pirincin besinsel bileşenlerinin karşılaştırılması ($\mu\text{G/mL}$). (Wu ve diğ., 2013’ den uyarlanmıştır.).

Besin	Kahverengi pirinç	Beyaz pirinç
Protein	7.1–13.1	5.6–13.3
Ham yağ	1.8–4.0	0.2–1.1
Ham lif	0.2–2.6	0.1–0.6
Vitamin A	0.1	-
Vitamin B1	2.1–4.5	-1.8
Vitamin B2	0.4–0.9	0.1–0.4
Vitamin B12	0.005	0.0016
Vitamin E	13	-
Nikotinik asit/Niasin	44–62	8–26
Pirodoksol	1.6–11.2	0.4–6.2
Pantotenik asit	6.6–18.6	3.4–7.7
Biyotin	0.06–0.13	0.006–0.09
Toplam inositol	1194–1220	100–125
Serbest inositol	24–45	11
Kolin	1120–1220	450–713
Folik asit	0.20–0.60	0.06–0.16
Kalsiyum (Ca)	65–400	46–385
Klor (Cl)	203–275	163–372
Demir (Fe)	7–54	2–27
Manganez (Mn)	13–42	10–33
Fosfor (P)	2500–4400	860–420
Potasyum (K)	1200–3400	140–1200
Sodyum (Na)	31–176	22–85
Çinko (Zn)	15–22	3–21

Genel olarak, pirinç tanesi içindeki çekirdeği koruyan sert bir kabuğa sahiptir. Kabuk çıkarıldıktan sonra, kalan ürüne “kepek”, tohum ve endosperm dahil kahverengi pirinç adı verilir. Ticari pirinç öğütme işlemi, kabuğu ve kepek gibi düşük değerli fraksiyonlara sahip ürünlere yol açar. Pirinç kabuğu gıda olarak kullanılmadığı için, çeşitli gıda dışı uygulamalarda düşük değerli atık malzemeler olarak kullanılırlar. Bununla birlikte, pirinç kabukları, pirinç tohumunu oksidatif strese karşı korumak için bir antioksidan savunma sistemi içerdiklerinde değerli beslenme avantajı sunar (Ramarathnam ve diğ., 1988).

Pirinç kabuğundaki ana bileşen, selüloz, lignin vb. gibi %70-90 organik maddeye sahiptir ve içinde silika, alkaliler gibi diğer mineraller de bulunur. Pirinç kabuğunun tipik bir analizi Tablo 1.2’de gösterilmektedir. Ayrıca pirinç kabuğunun kimyasal

içeriği %50 selüloz, %25-30 lignin ve %15-20 silikadan oluşur (Ummah ve diğ., 2015).

Tablo 1.2. Pirinç kabuğu bileşimi (Tiwari ve Pradhan, 2017).

Özellik	Birim hacim ağırlığı	Sertlik derecesi	Kül %	Karbon (C %)	Hidrojen (H2 %)	Oksijen (O2 %)	Azot (N2 %)	Kükürt (S %)	Nem %
Aralık	96-460	5-9	22-29	35	4-5	31-37	0.23-0.32	0.04-0.08	8-9

Tablo 1.2’de bulunan her bir elementin bileşimi, pirinç çeşidine, toprak kimyasına, iklim koşullarına ve ayrıca kültürün coğrafi yerleşimine bağlıdır (Chakrabarti ve diğ., 1985).

1.1.1. *Oryza sativa* L.’nın kullanım alanları

Pirinç kabuğunun dünyada varlığı çok fazladır. Her yıl yaklaşık 500-600 ton pirinç üretildiği ve pirinç üretiminin yaklaşık %20sinin pirinç kabuğu olduğu ve yılda yaklaşık 120 milyon ton pirinç kabuğu üretildiği tespit edilmiştir (Tiwari ve Pradhan, 2017). Pirinç üreten ülkelerin çoğu onu endüstride yarı haşlama ajanı olarak kullanmış ve pirinç kabuğu külünü atık olarak bırakmıştır. Pirinç üretimi için 1000 kg pirinç öğütme işleminde, yaklaşık 220 kg (%22) pirinç kabuğu elde edilir ve pirinç kabuğu ayrıldıktan sonra 50-55 kg (yaklaşık %25) pirinç kabuğu külü üretilir (Patel ve diğ., 1987). Pirinç kepeği, genellikle yüksek lif içeriği ve olası kabuk kontaminasyonu nedeniyle gıda olarak tüketilmez (Luh, 1991). Ayrıca, gliseritleri yağ asitlerine parçalayan öğütmeden sonra kepek içindeki lipazın aktivasyonuna bağlı olarak hızlı oluşumu nedeniyle sınırlı gıda uygulamasına sahiptir.

Stabilizasyon tekniklerinin geliştirilmesi, ticari gıda ürünleri olarak az miktarda pirinç kepeğinin kullanılmasına neden olmuştur. Bununla birlikte, çoğu pirinç kepeği ya doğrudan hayvan yemlerinde bir bileşen olarak ya da kazanlarda yakıt olarak kullanılır. Pirinç öğütme sırasında, üretilen pirinç kabuğu uzaklaştırma sorununa neden olur. Bu nedenle, endüstriyel atık sorununa etkin bir çözüm olan malzemenin özelliklerinin artırılması için pirinç kabuğu kullanılması daha iyidir. Pirinç kabuğunun çoğu, elektrik santrallerinde yakıt olarak kullanılır. Isı şeklindeki enerji doğrudan yanma ve gazlaştırma ile elde edilir. Küçük ölçekli endüstriler, çoğunlukla düşük kapasiteli kazanları kullanır. Pirinç kabuğu

neredeyse ücretsiz ve çok büyük oranda bulunduğu için endüstriler kazanların verimliliğini artırmada bu yakıt formuna odaklanmaktadır (Krishnaro ve diğ., 1992). Pirinç kabuğu sadece organik içeriği ile bilinmemekle birlikte, yaklaşık %15-20 silisin varlığı, bu atığı SiC, Si₃N₄, SiCl₄, zeolit gibi kompleks ve saf silikon formu gibi birçok silikon bileşiğinin birincil kaynağı yapar. Silikondan elde edilen bu malzemeler çok çeşitli uygulamalara sahiptir (Matori ve diğ., 2009; Adylov ve diğ., 2003).

Pirinç kabuğu külü, yüksek kalitede yassı çelik üretiminde ara madde olarak kullanılır. Makul bir yalıtım kalitesine sahip olduğundan yalıtım malzemesi olarak kullanılır. Daha az ısı iletkenlik, yüksek erime noktası, yüksek gözenekli olması gibi önemli özelliklerden bazılarını içerir. Isı kaybını çevreye sınırlama kapasitesinin yüksek olması ve küçük kitle yoğunluğu nedeniyle kullanılır (Huang ve diğ., 2017).

Pirinç kabuğu esas olarak, aktif karbon hazırlanmasında kullanılan lignin ve selüloz gibi hidrokarbonlardan oluşur. Bu aktif karbon, karmaşık gözenekli yapıdan oluşur. Aktif karbonlar iki ayrı olay tarafından hazırlanır, biri fiziksel veya termal aktivasyon, diğeri ise kimyasal aktivasyon olarak bilinir. Fiziksel aktivasyonda, karbonizasyon ve aktivasyon ayrı ayrı gerçekleşir, ancak kimyasal aktivasyonda, bir kimyasal madde kullanılarak hem karbonizasyon hem de aktivasyon işlemi aynı anda gerçekleşir. Fiziksel aktivasyon süreci, düşük spesifik yüzey alanına sahip olan aktif karbon üretiminde çok faydalıdır. Mikro gözenekli yapısı nedeniyle bu karbon formu mükemmel adsorbanlar olarak kullanılabilir (Deiana ve diğ., 2008).

Ksilitol üretiminde etanol, sirke, sülfonik asit ve pirinç kabuğu önemli bir ham madde olarak kullanılır. Metallerin ve makine bileşenlerinin çoğu, iyi yüzey kalitesi ve daha temiz yüzey gerektirdiğinden, cilalama ve temizleme maddesi olarak da kullanılabilir. Sanayide, plastik dolgu maddeleri, inşaat malzemeleri ve panel levhası gibi bileşenlerden bazıları, ham madde olarak pirinç kabuğu tarafından yapılmıştır (Farooque ve diğ., 2009).

Çeşitli bitki protein kaynakları üzerindeki küresel araştırma eğilimi, düşük maliyetli gıda ürünlerinin besin değerini arttırmada yardımcı olabilir. Pirinç

kepeği proteini, özellikle bildirilen hipoalerjenitesi ve antikanser aktivitesi üzerine, diğer proteinlerden besinsel olarak üstün olduğu kabul edilmiştir (Helm ve Burks, 1996; Kawamura ve Muramoto, 1993; Shoji ve diğ., 2001).

1.1.2. Oryza sativa L.'nın sağlık üzerine etkileri

Fitokimyasallar, patojenlere ve herbivorlara cevap verme, sinyalleşme gibi bitki fonksiyonlarının bazı yönlerinde yer alan bitki kaynaklı bileşiklerdir, ancak birçoğu insan sağlığında önemli bir rol oynar (Namuli ve diğ., 2011; Karimi ve diğ., 2013). Fitokimyasallar son zamanlarda araştırma toplulukları tarafından çok fazla ilgi görmüştür, çünkü yapılan çalışmalar bu doğal bileşiklerin sürekli olarak tüketilmesinin fayda sağladığını göstermiştir. Bu bileşikler çok çeşitli biyolojik aktiviteler göstermişlerdir ve bu bileşiklerin hemen hemen her grubunun en iyi tarif edilen özelliği, antioksidanlar gibi davranma kapasiteleridir (Karimi ve diğ., 2011; Hendra ve diğ., 2011).

Antioksidanlar, yiyeceklerde lipit oksidasyonuna karşı koruyucu bileşenler olarak yıllardır kullanılmaktadır. Lipit oksidasyonu, ketonlara, aldehitlere ve alkollere ayrışabilen peroksitler gibi zararlı bileşikler üretir, bunun da yemeğin görünümü, tadı ve kokusu üzerinde olumsuz etkileri vardır (Ghasemi ve diğ., 2009). Bütillenmiş hidroksil tolüen, bütillenmiş hidroksianisol, tert-bütıl hidrokinon ve propil gallat dahil çeşitli sentetik antioksidanlar ve ayrıca C vitamini, tokoferol ve biberiye özütleri gibi bazı doğal antioksidanlar, gıda endüstrisinde serbest radikaller ve lipitlerin oksidatif bozulmalarının oluşumunu engellemek için kullanılır (Argolo ve diğ., 2004).

Her yıl, milyonlarca ton çeşitli lignoselülozik biyokütle, tarımsal atıklar, mesela pirinç kabuğu, şeker kamışı, küspe ve mısır lifi, küresel tarım endüstrilerinin bir sonucu olarak ortaya çıkar (Sarkar ve diğ., 2012). Pirinç kabuğu, doğal koşullar altında yüzlerce yıl süregelen organik liftir (Summers ve diğ., 2003). Pirinç kabuğu atıkları tarlalardaki tarımsal atıkların en önemlileridir. Pirinç, trombosit agregasyonunu inhibe etme, koroner kalp hastalığı ve kanser riskini azaltma ve lipid ve düşük yoğunluklu lipoproteinlerin oksidatif hasarını önleme gibi hastalık riskini azaltma potansiyeline sahip fenolik antioksidanlar dahil olmak üzere birçok biyoaktif bileşiklerin zengin bir kaynağıdır (Butsat ve diğ., 2010).

Tahıl taneleri, özellikle pirinç, meyve ve sebzelerde önemli miktarlarda bulunmayan özel fenolik asitleri (örneğin ferulik asit, p-kumarik ve diferülat) içerir (Adom ve Liu, 2002). Bu bileşiklerin çoğu, özellikle tahılların öğütülmesinde bitkilerin farklı kısımlarında bulunur (Kahkonen ve diğ., 1999; Onyeneho ve Hettiarachchy, 1992).

Bu biyolojik olarak kullanılabilir materyaller, antioksidan aktivite için potansiyel olduğunu göstermiştir. Sulak koşullar altında yaylada pirincin lignoselülozik materyalleri toprak mikroorganizmaları tarafından azaltılır ve yılda yaklaşık 60-100 milyon ton metan salınır (Lehtomaki, 2007). Birçok ülkede, hasat sonrası pirincin toprağındaki artıklar toprağın mikrobik florasını tahrip eden ve hava kirliliğine neden olan geleneksel bir prosedürle yakılır (Brouder ve Hill, 1995). Yapılan çalışmalar, bu atıkların yakılmasının milyon ton CO₂, NO₂, metil klorür ve diğ. zehirli gazlar üreteceğini göstermiştir (Yang ve diğ., 2008).

Pirinç kabuğı, çeşitli flavonlar, tanenler, fenoller, flavonoidler, steroller, tokoller, γ -orizanoller, aminoasitler ve uçucu yağlar içerir (Parrado ve diğ., 2003; Min ve diğ., 2009). Fenoller ve flavonoidler pirinç kabuğı ve pirinç tohumu kabuğından çıkarılarak gıda ve tıp endüstrisinde kullanılabilir. Çeşitli fenoller ve flavonoidler, gıdanın antioksidan potansiyeline katkıda bulunur. Oksidasyondan sorumlu serbest radikallerle reaksiyona girebilir ve daha sonra hücreleri radikallerden koruyabilirler.

Karimi ve diğ., (2014)'nin yapmış oldukları çalışmada çeşitli pirinç kabuklarından elde edilen gallik asidin, pirogallol, apigenin ve rutin tüm pirinç çeşitlerinde ana fenolik ve flavonoid bileşikler olduğunu göstermiştir. Ek olarak önemli miktarda antioksidan aktivite ve daha yüksek DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ve nitrikoksit serbest radikal temizleme faaliyetleri göstermiştir (Karimi ve diğ., 2014).

1.2. Ekstraksiyon

Bitki bileşiklerinden aktif bileşiklerin ekstraksiyonu, bitki kimyası için analitik metodların geliştirilmesinde kilit bir adımdır. Optimum ekstraksiyon yöntemi basit, güvenli, tekrarlanabilir, ucuz ve endüstriyel uygulamalar için uygun

olmalıdır (Vongsak ve diğ., 2013; Oniszcuk ve diğ., 2015). Ayrıca, ekstrakt bitki numunesi ile aynı izoflavon bileşimine ve profiline sahip olmalıdır. Analitlerin verimli izolasyonu, sıcaklık, numune miktarı, süre ve ekstraksiyon çözücüsü tipi dahil olmak üzere birçok parametrenin optimizasyonunu gerektirir.

1.2.1. Yüksek basınçlı sıcak su ekstraksiyonu (YBSSE)

Avrupa'daki gıda işleme faaliyetleri büyük miktarlarda yan ürün ve atık üretir (yaklaşık 2,5x108 ton/yıl) (Awarenet, 2004). Tarımsal gıda endüstrisi atık yönetimi ile ilgili atıkların giderilmesi ve çevresel problemler, farklı kaynaklar tarafından üretilen çok çeşitli atık maddelerin çeşitliliği nedeniyle heterojendir. Bu tür atıklar sadece farklı değerlere sahip seviyelerde (karaya yayılan, hayvan yemi, kompostlama) kısmen değerlendirilir (Federici ve diğ., 2009). Sebze ve meyve yan ürünleri ve atıkları tipik olarak, belirli uçucu ve alifatik bileşiklerle birlikte yüksek miktarlarda protein, şeker ve lipitten oluşur ve bu nedenle, ucuz ve bol miktarda ince kimyasal madde olabilirler (Waliaveetil ve Ramteke, 2003). Farmasötik, kozmetik ve gıda endüstrilerine büyük ölçüde ilgilendiği selüloz, nişasta, lipitler, proteinler gibi makromoleküller ile birlikte doğal antioksidanlar, antimikrobiyal ajanlar ve vitaminler katma değer sağlayabilirler.

Basınçlı sıcak su ekstraksiyonunun (BSSE), değerli bileşenleri bitkilerden izole etmek için güçlü bir yaklaşımı vardır. BSSE, 100 ile 374°C arasındaki sıcaklıkların uygulanmasına ve tüm ekstraksiyon prosedürü boyunca suyun sıvı halde kalmasını sağlayacak kadar yüksek basınçlara dayanmaktadır. Bu ekstraksiyon tekniği, diğer geleneksel ekstraksiyon yaklaşımlarına kıyasla sağlayabildiği avantajlar nedeniyle kullanımı artmaktadır.

Bunlar arasında BSSE yaygın ve çevresel olarak sürdürülebilir bir ekstraksiyon tekniği olarak kabul edilir, çünkü organik çözücülerin kullanımını engeller. Ayrıca, BSSE tipik olarak yaygın ekstraksiyon tekniklerine göre daha yüksek ekstraksiyon verimleri ve daha hızlı ekstraksiyon prosedürleri üretebilir (Mustafa ve Turner, 2011). Bu BSSE koşulları altında, bitki dokularının hücresel yapısı, sıcak sıvı su içinde çözünebilen ilgili bileşikler serbest bırakılarak bozulabilir. Bununla birlikte, serbest bırakılan bileşiklerin, ekstraksiyon işlemi sırasında reaksiyona girip, doğal bileşiklere kıyasla farklı yapılar ve kimyasal özellikler

sergileyen yeni bileşikler oluşturmada konusunda bir endişe vardır (Plaza ve diğ., 2013).

Basınçlı sıvı ekstraksiyonu (BSE), yüksek sıcaklık ve basınçta sıvı çözücüler kullanılan ekstraksiyonu içeren bir tekniktir; bu, oda sıcaklığına ve atmosferik basınca yakın uygulanan tekniklerle karşılaştırıldığında ekstraksiyon performansını artırır (Mustafa ve Turner, 2011). BSSE, suyun atmosferik kaynama noktası üstünde (100°C/273K, 0,1MPa) fakat kritik noktası altındaki sıcaklıkta (374°C/647K, 22,1MPa) ekstraksiyon çözücüsü olarak sıvı su kullanılan ekstraksiyon tekniğidir (Plaza ve Turner, 2015). Diğer bir deyişle, BSE gıda ve bitkilerden nutrasötiklerin ekstraksiyonu için yeşil teknolojidir (Mustafa ve Turner, 2011).

Çevre kirliliği artan bir endişe kaynağıdır. Modern teknoloji, uygun şekilde uygulanırsa, çevre üzerindeki stresi azaltmanın bir yolunu sunar. Aynı zamanda etkili, ekonomik, güvenli, çevre dostu ve pratik olan teknikleri ve süreçleri bulmak çok önemlidir. Proseslerin içindeki maddelerin ve kimyasalların geri dönüşümü bunun bir parçası olarak istenmektedir. Yeşil teknolojinin uygulanması, doğal çevreyi ve kaynağını korumayı ve insan kalıtımının/ilişkisinin olumsuz etkisini sınırlamayı amaçlamaktadır. Yeşil teknolojinin felsefesi tehlikeli maddelerin kullanımını veya üretimini azaltan ve/veya ortadan kaldıran prosedürlerin kullanımını geliştirmek ve teşvik etmektir. Yeşil kimya prensiplerine uyum sağlamanın bir yolu, sert organik çözücülerin kullanımını azaltmak ve daha çevre dostu olduğu bilinen yeni ekstraksiyon tekniklerinin kullanımını kolaylaştırmak ve teşvik etmektir.

Geleneksel ekstraksiyon teknikleri şunlardır: Soxhlet ekstraksiyonu, sonikasyon, karıştırma ve katı-sıvı ekstraksiyonu. Bu teknikler, daha uzun ekstraksiyon süreleri ve büyük miktarlarda örnek, sorbentler ve organik çözücüler gerektirir ve sonrasında olumsuz çevresel etkilerine ve diğer insan sağlığı sorunlarına ek olarak satın alma ve ortadan kaldırma konusunda genellikle maliyetlidir. Ayrıca, duyarlı, termolabil (ısıya dayanıksız) olan ve düşük konsantrasyonlarda bulunan biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonu düşünüldüğünde, geleneksel ekstraksiyon teknikleri en uygun seçenek olmayacaktır. Bu durum bu bileşiklerin olası düşük verimleri ile

seçici olmasından kaynaklanmaktadır. Biyoaktif ve gıda bileşenlerini çevre dostu bir şekilde elde etmek için yeşil ekstraksiyon yaklaşımı gerekmektedir. Çözücü olarak su kullanılan BSE geleneksel ekstraksiyon teknikleri ile karşılaştırıldığında daha yeşil bir teknoloji olarak ortaya çıkar (Mustafa ve Turner, 2011).

YBSSE, günümüzde çevre, gıda ve botanik örnekleri gibi çeşitli matriks türünde bulunan farklı bileşik sınıfları için popüler yeşil bir ekstraksiyon metodu haline gelmiştir. Ayrıca YBSSE gıda güvenliği analizleri için gıda maddelerinden organik kirletici maddeleri ve çevresel izleme amaçlı toprak ve/veya tortuları çıkarmak için numune hazırlamada da kullanılır.

Ekstraksiyon verimliliğini etkileyen ana parametreler; sıcaklık, ekstraksiyon süresi, akış oranları ve değiştirici ve/veya katkı maddelerinin eklenmesidir. Katı örneklerin analizinde ekstraksiyon, metot örneklerin hazırlanmasında kritik aşama olarak kabul edilir (Teo ve diğ., 2010).

Pratik olarak, sıvı ekstraktant kullanılarak ekstraksiyon yapımı; ilk olarak deiyonize su veya musluk suyu ekstraktant olarak kullanılır. Analitlerin oksidasyonunu engellemek için su oksijen içermemelidir. Sudan gazın ayrılması için kullanılan metotlar sonikasyon veya helyum ile ayırmadır. Eğer ultrasonik banyo mevcut ise diğerinden daha düşük maliyetlidir. Oksijen gazının çoğunun sudan ayrıldığından emin olmak için sonikasyon ile en az 60 dakika gazdan arındırma gereklidir (Plaza ve Turner, 2015).

Su, kimyasal reaksiyonlarda ve izolasyon ve saflaştırma işleminde ortam ve reaktif olarak kullanım için ilgi çekicidir. Avantajları; toksik olmayan, yanıcı olmayan, ucuz ve kolay temin edilebilir olmasıdır. Oda sıcaklığında, su birçok organik bileşikler için çok kutuplu bir çözücüdür, fakat yüksek sıcaklıklarda daha az kutuplu olur ve bu organik çözücülere çevre dostu ve ilgi çekici bir alternatif yapar. Pek çok bileşik, kritik su sıcaklığının (374°C) üstünde değeri düştüğü için, analitik uygulamalar, genellikle, suyun yararlı fizikokimyasal özelliklerinin hala yeterli derecede mevcut olduğu düşük sıcaklıklardan yararlanır. Farklı matrikslerden çok çeşitli bileşiklerin BSSE, kritik su sıcaklığının oldukça altındaki sıcaklıklarda etkili olabilir.

Sıcak su ekstraksiyonu (SSE), uzun süredir 50-100°C’de katı örnek matrikslerinden atmosferik basınçta organiklerin ekstrakte edilmesinde kullanılmaktadır (Beer ve diğ., 1997; Nakajima ve diğ., 2005; Dai ve Chung Fuel, 1996). Ekstrakte edilen bileşikler genellikle polardır ve bu nedenle bu sıcaklıklarda suda kolayca çözünür. Uçucu bileşikler genel olarak hidrodistilasyon veya başka benzer yöntemlerle geri kazanılmıştır (Hawthorne ve diğ., 1993). Aynı zamanda, uçucu organik bileşiklerin kirlenmiş topraktan ekstraksiyonunda temizleme için buhar kullanılmıştır (Chienhaworne ve Insuan, 2004).

1980’lerde kömürün çıkarılmasında kritik su (BSS) ve süper kritik su veya buhar uygulanmıştır (Graff ve Brandes, 1987). “Alt kritik su ekstraksiyonu”, YBSSE için yaygın olarak kullanılan bir eş anlamdır. Ayrıca “yüksek ısı su ekstraksiyonu”, “yüksek sıcaklık ve basınçlarda su ekstraksiyonu” ve “sıcak basınçlı su kullanarak ekstraksiyon” terimleri de kullanılmaktadır. Yüksek sıcaklıklarda (100-174°C), numuneden verimli transfer için buharın basınçlandırılması gerekir. Ekstraksiyon işleminde süper kritik koşullarda, suyun yüksek sıcaklık altında ve basınç altında kullanılması genellikle alt kritik su ekstraksiyonu olarak adlandırılır. Alt kritik su ekstraksiyonu koşulları altında, tüm ekstraksiyon prosedürü boyunca su, sıvı halde tutulur. Bu teknik, geleneksel ekstraksiyon tekniklerine kıyasla bir dizi önemli avantaj sunar; daha hızlıdır, genellikle daha yüksek verimler üretir ve çözücülerin kullanımı büyük ölçüde azalabilir. Bu özellikler temel olarak, ekstraksiyon sıcaklığındaki artıştan etkilenen ve kütle transferini artıran bileşiklerin çözünürlüğündeki artıştan kaynaklanmaktadır. Bunun yanı sıra, bu koşullar altında, suyun viskozitesi de azalmakta, bu sayede çözücünün matris içinde daha iyi nüfus etmesi sağlanmakta ve sonuç olarak ekstraksiyon oranı tercih edilmektedir (Ong ve diğ., 2006).

Organik analitlerin çevresel (ve diğer) matrikslerden çıkarılması için, BSE, süper kritik sıvı ekstraksiyonu, alt kritik su ekstraksiyonu ve diğerleri dahil olmak üzere birkaç yeni yaklaşım geliştirilmiştir (Lou ve diğ., 1997; Hawtrone ve Yang, 1994). Çeşitli yöntemlerin uygulanmasının doğru bir şekilde anlaşılmasıyla, bu yöntemlerden herhangi biri kullanılarak çoğu organik kirleticinin yüksek geri kazanımı sağlanabilir.

Günümüzde parfüm, kozmetik, ilaç gıda, biyoyakıt veya ince kimyasallar endüstrisinde, maserasyon, buhar veya hidro-damıtma, presleme, dekokdiyon, infüzyon, perkolasyon (süzme) ve soxhlet ekstraksiyonu gibi özütleme işlemleri kullanmayan bir üretim süreci bulunmamaktadır. Gıda endüstrisinde, şeker pancarı ve şeker kamışının köklü dev çıkarma işlemlerinin yanı sıra kafeinsiz çay ve kahvenin hazırlanması, bitki özleri ve nutrasötiklerin konsantreleri eklenerek birçok formülasyon geliştirilmiştir. Biyoaktif bileşikler veya bunların öncüleri (antibiyotikler, kemoönleyici ajanlar, alkaloidler, vb.) farmasötik endüstrisi tarafından geleneksel metotlar veya modern teknolojiler ile ekstrakte edilir. Ekstraksiyon tekniklerindeki son eğilimler büyük ölçüde solvent kullanımını en aza indiren çözümler bulmaya odaklanmıştır. Elbette, bu işlemin yoğunlaştırılması ve düşük maliyetli yüksek kaliteli özütlerin üretilmesi için de mümkün olmalıdır. Küreselleşen pazarın ve çevre korumanın rekabet edebilirliğinin getirdiği zorluklar, basit süreklilikten ziyade geçmişten kopan teknolojik yenilikler getirmektedir. Yeşil kimyanın 12 ilkesi, modern “sürdürülebilir” süreçlerin temelini oluşturan 12 yeşil mühendislik ilkesi ile hızla eşleştirilmiştir (Sharma ve diğ., 2009). Yeşil teknolojilerin geliştirilmesi ve yenilenebilir ham maddelerin kullanımı çevre dostu süreçlerde merkezi bir rol oynamaktadır.

1.3. Nanopartikül

Geçtiğimiz on yılda, biyomedikal uygulamalar için dağıtım sistemlerinin geliştirilmesinde önemli avantajlar sağlanmıştır. Bu uygulamaların her biri etkili terapi sağlamak için spesifik olarak fiziksel, kimyasal, biyolojik, biyomekanik ve bozunma özelliklerine karşı biyomalzemeler talep ederler. Polimer bazlı ilaç dağıtım sistemlerinin başarısı, uygun biyolojik tepkileri ortaya çıkarmak için uygun biyoyumluluk, bozulma ve uygun fiziksel özellikler elde etmek için mevcut biyomalzemeleri özel tasarım veya modifiye etme yeteneğinde yatmaktadır (Nair ve diğ., 2007).

Sağlık alanında beklenen uygulamalar arasında hem in vitro hem de in vivo teşhis, nutrasötikler ve gelişmiş biyoyumlu materyallerin üretilmesi vardır. Tasarlanmış nanopartiküller, bu uygulamaların bir kısmını gerçekleştirmek için önemli bir araçtır. Bu nanopartiküllerin tıbbi amaçlar için çekici olmasının nedeni, geniş yüzey/hacim oranı, kuantum özellikleri ve ilaç taşıma yetenekleri gibi önemli ve

benzersiz özelliklerine dayanır. İlaçlar, probalar ve proteinler gibi diğer bileşikler bağlayabilen, adsorbe edebilen ve taşıyabilen nispeten büyük ve işlevsel bir yüzeye sahiptir.

Nanopartiküllerin tanımı, boyutları 0,1µm veya 100µm'nin altında olduğu şeklinde olsa da özellikle ilaç verebilmek için nispeten daha büyük miktarda (boyut>100nm) nanopartiküller, yeterli miktarda ilaç yüklemek için gerekli olabilir. Tasarlanmış nanopartiküllerin bileşimi değişebilir. Kaynak malzemeler fosfolipitler, lipidler, laktik asit, dekstran, ksitosan gibi biyolojik kökenli olabilir veya çeşitli polimerler, karbon, silika ve metaller gibi daha fazla "kimyasal" özelliğe sahip olabilir. Fosfolipitler gibi bazı biyolojik bileşenlerin hücrelerle etkileşimi, demir veya kadmiyum gibi metaller gibi biyolojik olmayan bileşenlere kıyasla oldukça farklıdır. Her ne kadar katı nanopartiküller ilaç hedeflemesi için kullanılabilir olsa da vücutta amaçlanan hastalıklı bölgeye ulaşıldığında taşınan ilacın salınması gerekir. Bu nedenle, ilaç dağıtımı için, biyolojik olarak parçalanabilen nanoparçacık formülasyonları, ilacı taşıma ve salma niyetinde olduğu için gereklidir (Jong ve Borm, 2008).

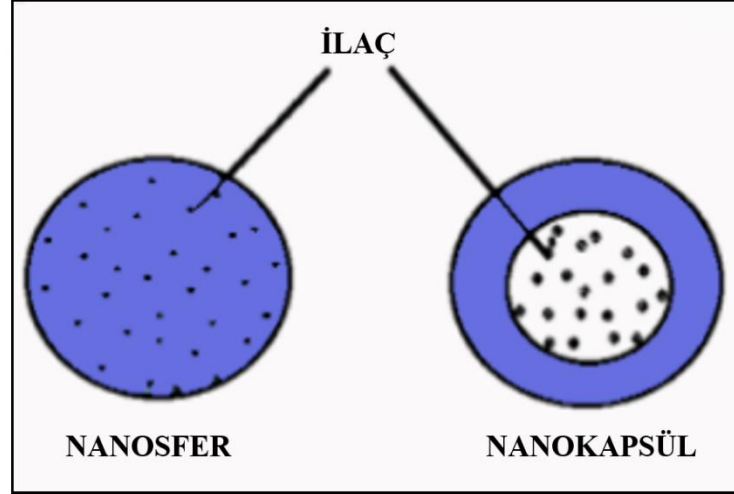
Nanopartiküller, morfolojilerine, boyutlarına ve kimyasal özelliklerine bağlı olarak tanınmış nanopartikül sınıfları; karbon bazlı nanopartiküller, metal nanopartiküller, seramik nanopartiküller, yarı iletken nanopartiküller ve polimerik nanopartiküllerdir (Khan ve diğ., 2017).

1.3.1. Mikro ve nano enkapsülasyon

Mikro kapsülleme, çok küçük damlacıkların veya sıvı veya katı madde parçacıklarının sürekli polimerik malzeme filmi ile kaplandığı bir teknolojidir (Ipemtech, 2009). Mikro kapsülleme prosedürü Bungen burg de Jon ve Kan, (1931) tarafından tanıtılmıştır. Mikro kapsülleme, sıvıların katı maddeye dönüştürülmesinde yüzey özelliklerini değiştiren, çevre koruma sağlayan ve farklı kaplanmış malzemelerin salınım özelliklerini kontrol edilmesinde rol oynar (Bakan, 1991; Khawla ve diğ., 1996; Mishra ve diğ., 2013). Mikro kapsüllenmiş ürünün çoğu, 1 ila 1000µm arasındaki boyutlara sahiptir (Umer ve diğ., 2011). Canlı hücreler, yapıştırıcılar, tatlar, agrokimyasallar, enzimler, farmasötikler vb. gibi çok sayıda malzeme kapsüllenebilir. Nano kapsülleme, çok ufak maddeleri

kapsüllemek için bir teknoloji olarak tanımlanır ve nano ölçekli aralıktaki biyoaktif paketlemeyi ifade eder (Lopez ve diğ., 2006). Herhangi bir biyoaktif bileşiğin vücut içindeki çeşitli bölgelere verilmesi, partikül boyutundan doğrudan etkilenir (Kawashima, 2001; Hughes, 2017). Böylece nano kapsülleme; biyoyararlanımı arttırma kontrollü salımı arttırma ve biyoaktif bileşiklerin mikro kapsüllemeden daha büyük oranda hassas hedeflenmesini sağlama potansiyeline sahiptir (Mozafari ve diğ., 2006).

Nanopartiküller, çapı 10 ila 1000 nm arasında değişen kolloidal büyüklükteki partiküllerdir ve hem nano kapsüller hem de nanosferler olarak ifade edilir (Konan ve diğ., 2002). Nanokapsüller, biyoaktif bileşiğin, benzrsiz bir polimer membranla çevrili bir boşluğa sınırlandırıldığı veziküler sistemlerdir, nanosferler, biyoaktif bileşiğin üniform bir şekilde dağıldığı matris sistemleridir ve şekil 1.1.'de gösterilmiştir (Couvreur ve diğ., 1995). Terapötik ajanların nano kapsülleme etkinliklerini, özgülüklerini ve hedefleme yeteneklerini arttırır (Soppimath ve diğ., 2001).



Şekil 1.1. Nanosfer ve nanokapsül yapısı (Sunayve ve Anuradha, 2017).

Mikro kapsüllemenin birincil sebebinin sürekli veya uzun süreli ilaç salımı için olduğu bulunmuştur. Bu teknik, hasta uyumunu iyileştirmek için birçok ilacın tadımı ve kokusunu maskelemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu sayede sıvı ilaçlar serbest akışlı bir toza dönüştürülebilir. Nem, ışık ve oksijene karşı hassas olan ilaçlar mikro kapsülleme ile korunabilir. İlaçlar arasındaki uyumsuzluk mikro kapsülleme ile

önlenebilir. Doğada uçucu olan ve oda sıcaklığında buharlaşan ilaçlar, mikro kapsülleme ile önlenebilir. Birçok ilaç, demir sülfat ve KCl dahil olmak üzere toksisiteyi ve gastro intestinal sistem tahrişini azaltmak için mikro kapsüllenmiştir. Absorpsiyon bölgesinde değişiklik mikro kapsülleme ile de sağlanabilir ve bu uygulama, düşük pH'da toksisiteye sahip olan ilaçlar için faydalı olmuştur.

1.3.1.1. Mikro ve nano enkapsülasyon için ham maddeler ve kaplama malzemeleri

Ham madde, doğada sıvı veya katı olabilen kaplanacak spesifik malzemedir. Ham maddenin bileşimi, sıvı çekirdeğin dağılmış ve/veya çözünmüş malzemeler içerebileceği için değişebilir. Katı çekirdek aktif bileşenler, stabilizatörler, seyrelticiler, ekspiyanlar ve salınım hızı geciktiricileri veya hızlandırıcılarıdır. Ham madde bileşimini değiştirme yeteneği kesin bir esneklik sağlar ve bu özelliğin kullanılması genellikle istenen mikro kapsül özelliklerinin etkili bir şekilde tasarlanmasına ve geliştirilmesine izin verir.

Nano kapsülleme için lipofilik ve hidrofilik nutrasötikler bileşiği gibi ham maddeler kullanılır. Hidrofilik bileşikler suda çözünür, ancak lipitler ve organik çözücülerde çözünmezler, oysa lipofilik bileşikler suda çözünmez ancak lipitler ve organik çözücülerde çözünür. Bazı nano kapsüllü hidrofilik bileşikler asit, polifenoller vb.'dir (Lakkis, 2007; Teeranachaideekul ve diğ., 2007; Dube ve diğ., 2010; Ferreira ve diğ., 2007). Nano kapsüllenmiş lipofilik bileşikler arasında likopen, beta-karoten, lutein, fitosteroller ve dokasahekzanoik asit bulunur (Lakkis, 2007; Heyang ve diğ., 2009; Zimet ve Livney, 2009; Leong ve diğ., 2011).

Kaplama malzemesi, ham madde ile kimyasal olarak uyumlu ve reaktif olmayan ve mukavemet, esneklik, geçirimsizlik, optik özellikler ve stabilite gibi istenen kaplama özelliklerini sağlayarak bir film oluşturabilir. Mikro kapsülleme yöntemlerinde kullanılan kaplama malzemeleri bir dereceye kadar yerinde modifikasyona uygundur.

Kaplama malzemesinin ideal özellikleri, çekirdek malzemenin stabilizasyonu, aktif bileşenlere karşı inert, belirli koşullar altında kontrollü salma, film oluşturma, esnek, tatsız, stabil ve higroskopik değil; yüksek viskoziteli ve ekonomik, sulu bir ortamda

veya çözücü içinde çözünür ve erime ve kaplama esnek, kırılğan, sert, ince vs.'dir. Kaplama malzemelerine örnek olarak;

Sentetik polimerler: Biyobozunur olmayan polimerler, örneğin poli metil akrilat (PMMA), Akrolein, Glisidil metakrilat epoksi polimerleri (Kreuter ve diğ., 1983; Margel ve Wiesel, 1984). Biyobozunur polimerler, örneğin laktikler, glikozitler ve bunların kopolimerleri (Wakiyama ve diğ., 1981) ve poli alkil siyanoakrilatlar polianhidritlerdir.

Doğal polimerler: proteinlerden albümin, jelatin ve kollajen (Yoshioka ve diğ., 1981), karbohidratlardan agaroz, karregan, kitosan ve nişasta ve kimyasal olarak değiştirilmiş karbohidratlardan poli dekstran ve poli nişastadır (Jain, 2000).

Nanopartiküllerin azırlanması için kullanılan polimerler adaptasyon (toksik ve antijenik olmayan) açısından vücutla uyumlu olmalı ve biyolojik olarak parçalanabilir ve biyouyumlu olmalıdır (Ghosh, 2000).

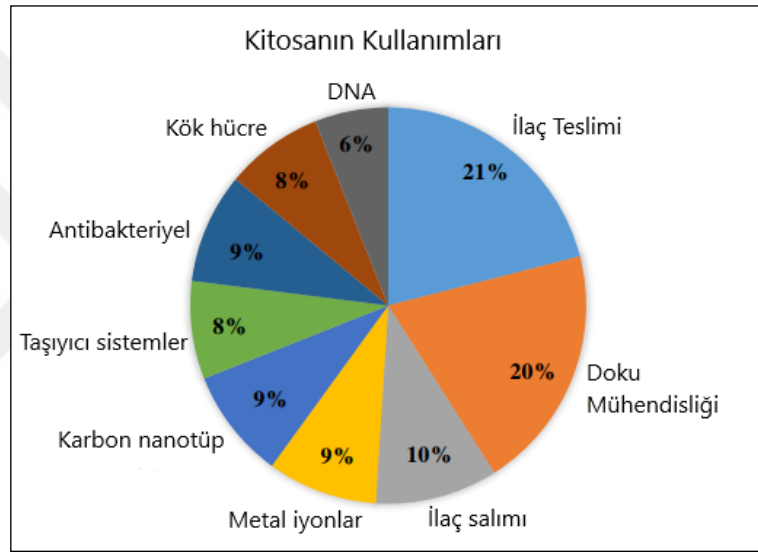
Doğal polimerler: polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında en yaygın kullanılan doğal polimerler, kitosan, jelatin, sodyum aljinat ve albümin'dir (Nagavarma ve diğ., 2012).

Sentetik polimerler: polilaktikler (PLA), poliglikolitler (PGA), poli laktik koglikolitler (PLGA), polianhidritler, poliortoesterler, polisiyanoakrilatlar, polikaprolakton, poli glutamik asit, poli malik asit, poli (N-vinil pirol), poli (metil metakrilat), poli (vinil alkol), poli (akrilik asit), poli akrilamid, poli (etilen glikol), poli (metakrilik asit) vb. gibi birçok sentetik polimer bulunmaktadır (Nagavarma ve diğ., 2012).

1.4. Kitosan

Kitosan, rastgele dağılmış β -(1-4)'e bağlı D-glukozamin (deasetillenmiş birim) ve N-asetil-D-glukozamin (asetilenmiş birimler)'den oluşan doğal, doğrusal bir karbohidrat polimeridir. İlk olarak 1859'da Rouget tarafından tanımlanmış ve 1984'te Hoppe-Seyler tarafından resmen tanımlanmıştır. Doğada kolayca temin edilebilen, biyouyumlu, biyobozunur, toksik olmayan, düşük immünojenik ve doğal farmakolojik özelliklere sahip bir polisakkarittir. Bu nedenle, farmasötik ve biyomedikal uygulamalarda ilgi gösterilmektedir.

Kitosan karides, ıstakoz veya yengeç gibi kabuklu deniz hayvanlarının dış iskeletinde, mantarların hücre duvarlarında vb. bulunan bir polisakkarittir. Polimerin çıkarılması, toplanan ham iskeletten numunelerin hazırlanmasını ve ardından 4M NaOH ile deproteinizasyonunu ve parçalara parçalanmasını içerir. Öğütümüş dış iskelet daha sonra %1 HCl kullanılarak demineralize edilir ve daha sonra kitosan elde etmek için %50 NaOH ile deasetilasyon yapılır ve kitosan asetik asit içinde çözülerek ekstrakte edilir ve pH değişikliği ile yeniden çökeltilir. Ticari olarak temin edilebilen kitosan, 3800 ila 20.000 dalton arasında değişen ortalama bir moleküler ağırlığa sahiptir ve %66 ila 95 oranında deasile edilmiştir (Saikia ve diğ., 2015).



Şekil 1.2. Kitosanın ana kullanım alanları (Gomes ve diğ., 2017).

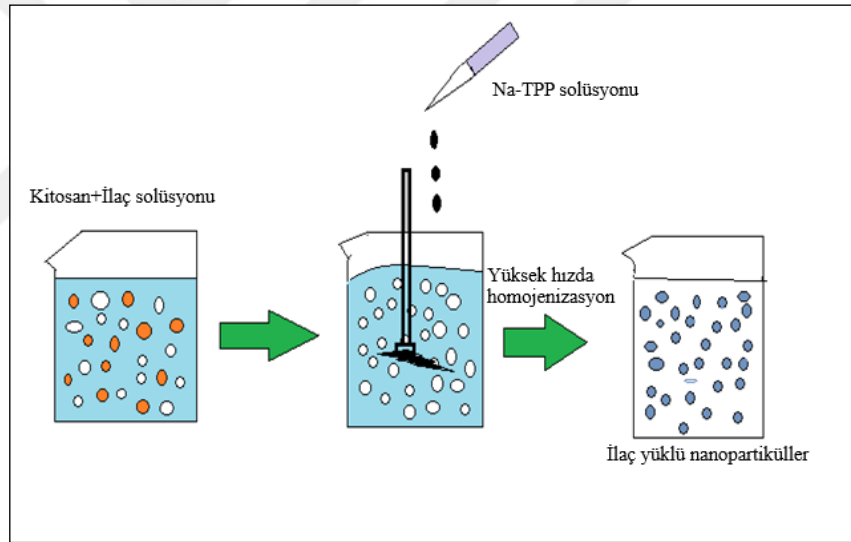
1.4.1. Kitosan nanopartiküllerinin hazırlanması

Kitosan nanoparçacıklarını (CSNP'ler) hazırlamak için farklı yöntemler kullanılmaktadır. Metotların herhangi birinin seçimi, partikül büyüklüğü gereksinimi, aktif maddenin termal ve kimyasal stabilitesi, salma kinetik profillerinin tekrar üretilirliği, son ürünün stabilitesi ve son ürünle ilişkili artı kalan toksisite gibi faktörlere bağlıdır (Agnihotri ve diğ., 2004).

Kitosan nanopartikülleri emülsiyon çapraz bağlama, koaservasyon/çöktürme, püskürtmeyle kurutma, emülsiyon-damlacık birleşme yöntemi, ters mikel yöntemi, eleme yöntemi, kitosan nanopartikülleri içine ilaç yüklemesi ve iyonik jelasyon yöntemi gibi birçok şekilde hazırlanabilmektedir (Saikia ve diğ., 2015).

1.4.1.1. İyonik jelasyon metodu

Bu yöntem 1997 yılında Calvo ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir (Calvo ve diğ., 1997). Bu yöntemde polimer çözeltileri ve polianyon çözeltileri nanopartiküller oluşturmak için karıştırılır. Kitosan nanopartikülleri, pozitif yüklü amin kitoan grubu ile negatif yüklü tripolifosfat gibi bir grup polianyon arasındaki elektrostatik etkileşim nedeniyle oluşur. Bu teknik sulu ortamda basit ve hafif bir hazırlama yöntemi sunar. İlk olarak, kitosan, polianyon ilave edilmeden önce veya sonra kitosan çözeltisine ilave edilebilen poloksamer, Tween80 gibi dengeleyici ajan yokluğunda veya varlığında asetik asit içinde çözünebilir. TPP (tripolifosfat) gibi polianyon daha sonra ilave edilir ve nanopartiküller, oda sıcaklığında mekanik karıştırma altında kendiliğinden oluşturulur. Malzeme, etkileşimden dolayı sıvıdan jel fazına geçmektedir. Bu metodu kullanarak farklı proteinler ve peptitler yüklenir (Saikia ve diğ., 2015).



Şekil 1.3. İyonik jelasyon yöntemi ile yüklü kitosan nanopartiküllerinin hazırlanması (Tyagi ve Pandey, 2016).

1.4.1.2. Kitosan nanopartiküllerinin özellikleri

Nanopartiküllerin eşsiz karakteri küçük boyutlu ve kuantum boyutları için kitosan nanopartiküllerinin üstün üstün aktiviteler sergilemesini sağlayabilir. Üretilmesi ve ölçeklendirilmesi basit ve ucuzdur, benzersiz boyutta ve geniş yüzey/hacim oranına sahiptir. Kapsüllenmiş ilaca iyi koruma sağladığından, vücutta salınım süresini ve stabilitesini arttırdığından doğada mukoz yapışkan ve hidrofiliktir. Bu nedenle küçük moleküller, proteinler ve polinükleotitler gibi geniş bir ilaç kategorisine uygulanabilirler. Bir polimer matriks içine kapsüllenene aktif maddelerin faydaları,

bunların çevre ortamından korunmalarını veya proses şartlarını ve kontrollü salınımlarını içerir. Yeni ilaçların yaklaşık %40'ının düşük sulu çözünürlüğe sahip oldukları ve zayıf dağılım profillerine sahip oldukları için hidrofobik ve lipofilik yapılarından dolayı geleneksel yöntemlerle ilgili bazı sorunlar vardır. Ayrıca, elverişsiz farmokinetikleri ile veba salgırlar e terapötik potansiyellerinin tam olarak kullanılmasını önleyen bazı dokular için toksiktirler bu da onların terapötik potansiyelinin tam olarak kullanılmasını önler. Nanopartiküler ilaç verme sistemi kullanılarak bu problemlerin üstesinden gelinebilir. Boyut küçüldüğü için nanopartiküller, insan vücudu gibi sulu bir ortamda aktif maddelerin daha hızlı çözünmesine neden olan yüzey alanını artırır ve daha hızlı çözünerek, ilacın terapötik etkisini artıran daha büyük biyoyararlanım sağlar (Saikia ve diğ., 2015).

1.5. Poaceae Familyasına ait Antikarsinojenik Aktivite Çalışmaları

Moheb ve diğlerleri (2013), çoğunlukla buğday, pirinç, arpa, yulaf ve mısır gibi tahıl tanelerinde bulunan trisinin bitkilerdeki konsantrasyonu ticari kullanım için yeterli olmadığından güvenilir, zengin bir trisin kaynağı bulmak için, buğdayın farklı kısımlarındaki (*Triticum aestivum*) dağılımını araştırmış ve izolasyonu be saflaştırılması için etkili bir yöntem tasarlamışlardır. Kış buğdayının kabuğunda en yüksek miktar (700 ± 157 mg/kg kuru ağırlık) bulmuşlardır. Bu konsantrasyon, herhangi bir bitki türünün en yükseklerinden biridir ve ucuz bir doğal trisinin kaynağı olarak kabul edilmektedir. Saflaştırılmış buğday kabuğu trisinin, normal hücreler üzerinde hiçbir yan etkisi olmamakla birlikte, karaciğer (HepG2) ve pankreas (INS832/13) kanser hücreleri için seçici bir potansiyel inhibitörü olduğu bulunmuştur. Bu seçici etki, trisinin kemopreventif bir ajan olarak klinik öncesi çalışmalar için potansiyel bir aday olarak kabul edilebileceğini göstermekte ve lif bakımından zengin ham buğday kabuğu, besin takviyesinde doğal bir kemo koruyucu madde olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmalar sonucunda buğday kabuğundan elde edilen trisin, normal NIH3T3 hücresi ve HepG2 (karaciğer karsinoma) ve INS382/12 (rat, pankreatik tümör) kanser hücreleri üzerinde farklı trisin konsantrasyonları ile (1,5, 15 ve 30 μ M) 12 ve 24 saat süre ile denenmiş ve sonucunda trisinin 7,5 μ M konsantrasyonunun güçlü bir etki sergilediği ve HepG2 ve INS382/12 hücrelerinin hücre canlılığı normal hücre olan NIH3T3 üzerine bir etkisi olmamakla birlikte sırasıyla %74,5 ve %47 olarak Moheb ve diğlerleri (2013) tarafından bulunmuştur.

Tan ve diğerkleri (2013), kırılmış pirinç, pirinç kepeğı ve pirinç tohumunun bir karışımı olan Temukut veya bira pirinci kolon kanseri (HT-29), yumurtalık kanseri (Caov-3) ve karaciğer kanseri (HepG2) hücre hatları kullanılarak temukut ekstraktının antioksidan ve büyüme inhibisyon özelliklerini araştırmayı amaçlamış ve Antioksidan aktivite, β -karoten ağartma deneyi, DPPH radikal temizleme kapasitesinin analizi ve bir FRAP deneyi ile belirlemişlerdir. Temukut'taki toplam fenolik bileşikler, orizanol, E vitamini ve fitik asit seviyelerini de incelenmişlerdir. Antiproliferatif aktivite, 3-(4,5- dimetiltiyazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) tahlili kullanılarak değerkendirmişlerdir. HT-29 ve Caov-3 hücreleri ($p < 0.05$) için iki tip temukut ekstraktının (su ve metanol) sitotoksitesinde, HepG2 hücreleri için anlamlı bir fark olmadığını ve HepG2 hücre hattı temukut'a en az duyarlı olduğunu ($IC_{50} = 55.30 \mu G/mL$), en yüksek hassasiyetin Caov-3 hücrelerinde olduğunu gözlemlemişlerdir ($IC_{50} = 36.67 \mu G/mL$). Normal hücre olan BALB/c3T3 hücrelerinde sitotoksik aktivite gözlememişlerdir.

Yuvakkumar ve diğerkleri (2014), faz üzerinde NaOH işlemleri, pirinç kabuğı nanosilika'sının saflığı ve partikül büyüklüğü alkalın özütleme-asit çökeltme yöntemi kullanılarak incelemiş ve düşük NaOH'de (1,5N) hafif reaksiyon, orta reaksiyon hızından dolayı küçük ve ince parçacıklar (600 nm) ortaya çıkarmışlardır. İnsan meme kanseri hücre hattının (3T3) morfolojisi, düşündürücü hücre stres etkilerinin, hücre canlılığı azalması (%50) ile uyum içinde olan 500 $\mu g/ml$ silika dozajlarında daha belirgin olduğunu ortaya koymuşlardır. Farklı silika dozajları arasında 10 $\mu G/mL$ 'nin en yüksek olduğu bulunmuştur. Çözünmüş oksijen seviyesini artırabilen hücre canlılığı ($\sim 70 \pm 2$), daha yüksek SiO_2 dozunda ortaya çıkan toksik etki nedeniyle canlılık neredeyse 27 ± 5 'e düşmüş ve sürdürülebilir materyallerin geliştirilmesi yoluyla biyomedikal uygulamalar için en uygun potansiyel bir aday olabileceğı sonucuna varmışlardır.

Kim ve diğerkleri (2007), metanolik pirinç kabuğı ekstraktının (MERH) sitotoksik ve antitümör aktivitesi, sırasıyla 1,2-dimetilhidrazin (DMH) enjekte edilmiş F344 erkek sıçanlarda insan kolon kanseri hücrelerine ve kolon aberrant kript odak noktasına (ACF) karşı MTT testi ile değerkendirmişlerdir. MERH'nin yüksek sitotoksik olduğu ve IC_{50} değerkleri in vitro olarak 0,5 $\mu g/mL$ olarak bulunmuştur. 40 hafta MERH desteğı (50 mg/kg vücut ağırlığı/gün), kolonik neoplastik ACF oluşumunu %35

azaltmıştır ($p < 0.01$). Bir aktif bileşik, momilakton B, MERH'den silis jeli kromatografisi, Sephadex LH-20 kromatografisi ve HPLC ile izole edilmiştir. Momilakton B'nin sitotoksik aktivitesi, insan kolon kanseri HT-29 ve SW620 hücrelerinde MTT-boya indirgeme, laktat dehidrojenaz (LDH) ve koloni oluşturabilme yeteneği deneyleriyle değerlendirilmiştir. Sonuçlarda pirinç kabuğundan elde edilen momilakton B'nin insan kolon kanserine karşı kemoterapötik ajan için yeni bir aday olabileceğini göstermişlerdir.

Rajkumar ve diğerleri (2019), gümüş nanopartiküllerini (AgNP'ler), *Zea mays* L. (mısır) tozu özütü kullanılarak biyosentezlemişlerdir. Ayrıca, reaktif konsantrasyonunun, ekstraktın, sıcaklığın ve sentez zamanının etkisini, sitotoksikite ve radikal temizleme potansiyeli ile birlikte incelemişlerdir. AgNP'lerin UV-vis spektrumları ~420nm'de bir yüzey plazmon rezonansı vermiştir. Emilim zirvesi zamanla artışla keskinleşmiştir. Monodispers ve toplanmış küresel şekle sahip AgNP'ler, SEM görüntüsü ile gözlenmiş, ardından EDX spektrumunun gümüş bölgesinde kuvvetli sinyal ile onaylanmıştır. XRD spektrumu kristalliliğini ve yüz merkezli kübik yapısını doğrulamıştır. FT-IR spektrumları, AgNP'lerin sentezinde fito-bileşiklerin varlığını ortaya koymaktadır. Ayrıca, AgNP'ler HepG2 hücrelerine karşı güçlü sitotoksikite potansiyeli sergilemiş ve canlılığı kontrol hücrelerine göre AgNP konsantrasyonundaki artışla azalmıştır. Ayrıca, DPPH ve ABTS süpürücü ve güç testlerini azaltma açısından makul radikal süpürücü potansiyeli olduğunu göstermişlerdir. Rajkumar ve diğerlerinin (2019) çalışmasındaki veriler birlikte ele alındığında, mevcut araştırmaların bu sonuçları, AgNP'lerin özellikle kanser hastalığının tedavisi için biyomedikal uygulamalarda ve yeni ilaçların formülasyonu için ilaç endüstrisindeki uygulamalarıyla birlikte faydalı olabileceği belirtilmiştir.

Natrajan ve diğerlerinin (2015) yaptıkları çalışmada uçucu yağların enkapsülasyonu için bir kitosan-aljinat (CS-AL) nanokülatörünün geliştirilmesi çalışılmıştır. Isının etkisi, AL ve CS konsantrasyonları gibi proses parametrelerinin etkileri incelenmiştir. Taramalı elektron mikroskobu, Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi ve ultraviyole görünür spektroskopisi gibi çeşitli fizikokimyasal karakterizasyon teknikleri uygulanmıştır. Karakterizasyon çalışmalarının sonuçları, 0,3mg/mL AL ve 0,6mg/mL CS'nin iyi stabiliteye sahip minimum boyutlu parçacıklar (<300 nm) ürettiğini göstermiştir. Ayrıca, yağ yüklü nanokapsüllerin hem uyumlu olduğu hem de

gelecekteki biyomedikal ve farmasötik uygulamalarda kullanıldığını düşündürdüğü doğrulanmıştır. Ayrıca, zerdeçal yağı ve limon yağı yüklü nanokapsüllerin antiproliferatif aktivitesi, A549 hücre hatlarında 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) deneyi kullanılarak hesaplanmış ve hem nanoformülasyonların bulunduğu bulunmuş ve her iki nanoformülasyonun ham yağdan daha belirgin antiproliferatif özelliklere sahip olduğu bulunmuştur.

Alothman ve diğerlerinin (2018) yapmış oldukları çalışmada, *Cenchrus ciliaris* L. toplam alkol ve hem havada yetişen hem de kök kısımlarının art arda gelen ekstreleri, standart ilaç vinblastin sülfat ile karşılaştırılarak ve akciğer (A-549), bağırsak (CACO), kolon (HCT-116), servikal (Hela), hepatoselüler (HepG2) ve meme (MCF-7) (PC3) hücre hatlarına karşı antikanser aktiviteleri için test edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, referans standart ilaç olarak vinblastin sülfata kıyasla listelenen hücre hatlarının büyümesi üzerinde değişken inhibe edici etkisine sahip doğrudan sitotoksik etki sergilemiş, bu etkiler, $11,1 \pm 0,3$ ila $267 \pm \mu\text{g/ml}$ arasında değişen farklı IC50 değeri göstermiştir. Tüm kök ekstreleri, vinblastin sülfatın ($2,93 \pm 0,3 \mu\text{g/ml}$) etkisi ile yakından ilgili olan HepG2 (Hepatoselüler karsinoma) ($9 \pm 2,1 \mu\text{g/ml}$) hücre hattı birçok teste karşı en iyi aktiviteyi göstermiştir. *Cenchrus ciliaris* L. Hava ve kök ekstrelerinin en yüksek antikanser etkisi HepG2 (Hepatoselüler karsinom) için kaydedilmiş, IC50 değerleri sırasıyla $12 \pm 0,8$ ve $9 \pm 2,1$ dir. CACO (kolorektal karsinom) hücre hattı IC50 değeri $27,2 \pm 1,6$ ve $20,5 \pm 0,6$, A-549 (Lung karsinoması) hücre hattının IC50 değerleri sırasıyla $14,5 \pm 0,7$ ve $11,1 \pm 0,3$ olarak bulunmuştur. Özellikle CACO (kolorektal karsinoma) ve A-549 (Lung karsinom) hücre hattına olan antikanser etki standart ilaçtan daha iyi olduğu belirtilmiştir. Hem hava hem de köklerin kloroform ekstreleri, özellikle kolorektal (CACO) ve Akciğer karsinoma (A-549) ile tüm hücre hatları üzerinde en iyi antikanser aktivitesi sergilemiştir. *Cenchrus ciliaris*'in kanser hücrelerini hedef almak için kullanılan umut verici yeni kimyasal grupların kaynağı olabileceği bulunmuştur.

Khelifi ve diğerlerinin (2013) yapmış oldukları çalışmada, *Cynodon dactylon* L.'den ekstreler, petrol eteri, diklorometan, aseton, metanol/su (3:1) ve su, sıralı yöntemlerle elde edildi. Fenoliklerin kimyasal bileşimi (6,9–57,41g gallik asit eşdeğeri/kg kuru kütle), tanenler (2,49–12,32g kateşin eşdeğeri/kg kuru kütle), antosiyaninler (0-5,98g siyanidin eşdeğeri/kg kuru kütle) ve flavonoidler (0-5,02g kuersetin eşdeğeri/kg kuru

kütle) değerlendirilmiştir. Ekstreler, antioksidan (DPPH ve ABTS deneyleri), antimalaryal (*Plasmodium falciparum*) ve antikanser (MCF7) aktiviteleri; en g   l  aktivite, sırasıyla su ekstresi ($IC_{50}=57,21\pm1,47mg/L$), asetonik ekstre ($IC_{50}=38mg/L$) ve petrol eteri ekstresi ($IC_{50}=39mg/L$) ile elde edilmiştir. Sonuçlar, antosiyanin miktarı ile antimalaryal aktivite ($R^2=0,79$) ve ayrıca antikanser aktivite ($R^2=0,78$) arasında iyi bir ilişki olduğunu göstermiştir. Antikanser ve antimalaryal yönden iyi aktivitelere sahip olan ekstraktların LC MS analizi, yedi antosiyaninin (delphinidin-3-O-asetilglukozit, petunidin-3-O-caffeoylglucoside-5-O-glukozit, petunidin-3-O-kumarilglukozit-5-O-glukozit, malvidin-3-O-monoglukozit, delphinidin-3-O-asetilglukozit-piruvik asit, petunidin-3-O-asetilglukozit-5-O glukozit ve siyanidin-3,5-O-diglukozit) bu bitkide Khilifi ve diğerleri (2013) tarafından ilk kez tanımlanmıştır.

Liu ve diğerleri (2012), Buğday kepeği lipofilik ekstreleri, insan prostat adenokarsinom (PC3) hücrelerinin büyümesine karşı biyoaktivite rehberli fraksiyonlama (HPLC) kullanılarak incelemişlerdir. Doymamış serbest yağ asidi, fitosteroidler ve alkilresorinoller içeren fraksiyonlar yüksek sitotoksik aktivite göstermiştir. Alkilresorinol fraksiyonunun detaylı araştırması 5-heptadesilresorcinol ($IC_{50}=22,5\mu g/ml$), 5-(16-heneicosenil)resorcinol (trans) ($IC_{50}=13,7\mu g/ml$), 5-(14-nonadesenil)resorcinol (trans) ($IC_{50}=42,2\mu g/ml$) ve 5-(2-oxotricosanil)resorcinol ($IC_{50}=10,9\mu g/ml$) içeren PC3 hücrelerinin büyümesine karşı g   l  inhibe edici özelliklere sahip olan yedi saf bileşik izole etmişlerdir. Buğday kepeğindeki alkilresorinoller, LC-MS üzerinde geliştirilen bir Tek İyon İzleme (SIM) yöntemi kullanılarak    lm şt r. Aktif alkilresorinollerin, buğday kepeğinde küçük bileşenler olduğu bulunmuş, ancak kanser hücreleri üzerinde pozitif kontrol klorambusilden ($IC_{50}=58,7\mu g/ml$) daha yüksek sitotoksik etkiler göstermişlerdir. Bu araştırma, alkilresorinollerin, buğday kepeğinin kanseri önleyici aktivitesi için önemli olduğunu göstermiş, bazı serbest doymamış yağ asitleri ve fitosteroidler gibi diğer lipofilik bileşikler de antikanser aktivitesine katkıda bulunabileceğini  ne sürmüşlerdir.

Parduman ve diğerleri (2009), Limon otu  eşidi *Cymbopogon flexuosus*'un esansiyel yağı on iki insan kanser hücre hattına karşı in vitro sitotoksitesisi için incelemişlerdir. Ayrıca yağın in vivo antikanser aktivitesi, farelerde hem katı hem de asit Ehrlich ve

Sarcoma-180 tümör modelleri kullanılarak da incelemişlerdir. Ek olarak, tümör hücrelerinde morfolojik değişiklikler hücre ölümü mekanizmasını belirlemek için çalışmışlardır. İn vitro sitotoksikite çalışmaları, çeşitli insan kanser hücre hatlarına karşı doza bağlı etkiler göstermiştir. Yağın IC50 değerleri hücre hattına bağlı olarak 4,2 ila 79µg/ml arasında değişmiştir. 502713 (kolon) ve IMR-32 (nöroblastom) hücre hatlarında, yağın sırasıyla IC50 değerleri 4,2 ve 4,7µg/ml olan en yüksek sitotoksikite göstermiştir. Yağın periton içi uygulaması, Ehrlich ve Sarcoma-180 tümörlerinin hem asit hem de katı formlarını doza bağlı olarak önemli ölçüde inhibe etmiştir. Ehrlich Ascites karsinomasının hem asit hem de katı tümör formlarında gözlenen yağın 200mg/kg'da (i.p.) tümör büyümesi inhibisyonu sırasıyla 97,34 ve 57,83'dir. Sarcoma-180'de benzer bir yağ dozunda büyüme inhibisyonu, asit ve katı formlarda sırasıyla %94,07 ve %36,97'dir. Yağla muamele edilmiş HL-60 hücrelerinin morfolojik çalışmaları, yüzey çıkıntılarının kaybını, kromatin yoğunlaşmasını ve apoptozisi ortaya çıkarmıştır. Mitokondri apoptoz geçiren hücrelerde belirgin krista kaybı göstermiştir. Yağ ile muamele edilmiş hayvanlardan alınan Sarcoma-180 solid tümör hücrelerinin morfolojik çalışmaları, apoptozisin tipik çekirdek yoğunlaşmasını ve parçalanmasını ortaya koymuştur. Yağ ile muamele edilmiş hayvanlardan elde edilen asit (acites) hücrelerinin morfolojik çalışmaları da apoptozisin tipik değişimlerini ortaya koymuştur. Sonuçta, yağın ümit verici bir antikanser aktivitesine sahip olduğunu ve elektron mikroskobu ile tanımlandığı şekilde apoptotik işlemi aktive ederek tümör hücrelerinin yaşayabilirliğinde kayba neden olduğunu göstermişlerdir.

Thangam ve diğerlerinin (2014) yapmış olduğu çalışmada, sıcak su dekoksiyonu kullanarak sıcak suda çözünür polisakkaritlerin (HWSP'ler) *Cymbopogon citratus*'tan ekstraksiyonu yapılmıştır. Üç seviyeye dayanan Yüzey Tepki Yönetimi (RSM), üç değişken merkezi komposit karma tasarım (CCRD), maksimum HWSP'ler ekstraksiyonu için ekstraksiyon süresi (X1:30-180 dk), ekstraksiyon sıcaklığı (X2:70-100°C) ve suyun ham madde oranı (X3: 10-60) mümkün olan en iyi kombinasyonu elde etmek için kullanılmıştır. Optimum ekstraksiyon koşulları; ekstraksiyon süresi 113,81 dakika civarı, ekstraksiyon sıcaklığı 99,66°C ve suyun ham maddeye oranı 33,11g/ml olarak bulunmuştur. Bu koşullar altında, deney verimi %13,24±0,23 ve RSM model verimi (%13,19) tarafından öngörülen değer ile yakın bir uyum içinde olduğu bulunmuştur. HWSP'lerin temel karakterizasyonu FTIR kullanılarak

belirlenmiş ve ön in vitro biyolojik çalışmalar, limon otu polisakaritlerinin antikanser tedavisi için faydalı olduğunu göstermişlerdir.

Bir diğer çalışma Thangam ve diğerleri (2014) tarafından yapılan *C. citratus* kaynaklı polisakaritler ekstre edilmiş ve anyon değişimi ve jel filtrasyon kromatografisi ile fraksiyonlanmıştır. F1 ve F2 gibi iki farklı polisakarit fraksiyonu elde edilmiş ve bu fraksiyonların, moleküler ağırlık ve şeker içerikleri ile karakterize edilen farklı asidik polisakaritlere sahip olduğu bulunmuştur. NMR spektral analizi, bu polisakaritlerde (1 → 4) bağlantılı b-d-Ksilofuranos kısmının varlığını ortaya koymuştur. Bu polisakarit fraksiyonları F1 ve F2 kullanılarak, anti-enflamatuar ve antikanser aktiviteleri, in vitro kanser hücrelerine karşı değerlendirilmiş ve polisakaritlerin, kanser hücrelerinde apoptozun intrinsik yolla apoptozu indüklemedeki etki mekanizması da önerilmiştir. Siha ve LNCap gibi iki farklı üreme kanseri hücresi, sitotoksikite, apoptozun ve apoptotik DNA fragmentasyonunun indüklenmesi, mitokondriyal membran potansiyelindeki değişiklikler ve polisakarit fraksiyonları ile hücrelerin tedavisine cevap olarak gen ve protein ekspresyonunun profilleri üzerine in vitro çalışmalar için kullanılmıştır. Bu polisakarit fraksiyonları, karsinoma hücreleri üzerinde potansiyel sitotoksik ve apoptotik etkiler sergilemiş ve kaspaz 3'ün yukarı regülasyonu, bcl-2 familyası genlerinin aşağı regülasyonu, ardından sitokrom c salımı olayları yoluyla bu hücrelerde apoptozu indükledikleri sonucuna varmışlardır.

El Mola ve diğerleri (2015), dört insan kanseri hücre hattına karşı sitotoksitesini hesaplamak için Sülförödamın B testi kullanmışlar ve *Echinocloa crus-galli* L.'nin etanolik ekstrenin (%70) en çok HCT-116 ve HELA hücre hatlarına karşı aktif olduğu kanıtlamışlardır (sırasıyla, IC₅₀=11,2±0,11 ve 12,0±0,11 µg/ml). Kloroform ve etil asetat fraksiyonları, HCT-116 hücre hatlarına karşı en yüksek aktivitelerini sergilemiştir. Kloroform ve etil asetat fraksiyonları saf fenolik bileşikler (1-8) elde etmek için birkaç kromatografik ayırmaya tabi tutulmuştur. 1-8 bileşikleri; 5,7-dihidroksi-3', 4', 5'-trimetoksi flavon, 5,7,4'-trihidroksi-3', 5'-dimetoksi flavon (trisin), kersetin, flavon apigenin-8-C-sophorosit, 2-metoksi-4-hidroksi sinamik asit, p-kumarik asit ve kersetin-3-O-glukozit şeklinde tanımlamışlardır. İzole edilen tüm fenolik bileşikler, antikanser ilacı Doxorubicin ile karşılaştırılabilir şekilde, metoksile edilmiş flavonların (1 ve 2) en aktif olduğu dört insan karsinomuna karşı çeşitli önemli aktiviteler sergilemiştir. Bu nedenle, bu metoksile edilmiş flavonoidler,

E. crus-galli geleneksel kullanımının önceki iddialarını destekleyen kanser tedavisi için kurşun bileşikler olarak kabul edilebileceği sonucuna varmışlar ve fenolik bileşiklerin *E. crus-galli*'deki oluşumunu ilk kez rapor etmişlerdir.

Cheng ve diğerlerinin (2016) yaptığı çalışmada, suda çözünür bir polisakarit (BP-1), yayla arpasından (*Hordeum vulgare* L.) sıcak su ekstraksiyonu ve sefaroz kolon kromatografisinin saflaştırılması ile elde edilmiştir. BP-1, yaklaşık 6,7x10⁴Da'lık bir ortalama molekül ağırlığına ve göreceli 8,82:1,92:1,50:1,00 molar oranlar ile glukoz (Glc), ksiloz (Xyl), arabinoz (Ara) ve ramnoz (Rha)'dan oluşmuştur. BP-1'in, 48 saat 48,18µg/ml'de yarı maksimum inhibitör konsantrasyonu ile zaman ve doza bağlı bir şekilde insan kolon kanseri hücrelerinin (HT-29) çoğalmasını inhibe ettiği bulunmuştur. Western blot sonuçları, BP-1'in, c-Jun N-terminal kinazın (JNK) fosforilasyonunu arttırdığını, reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuyla ilişkili süreçleri ve sitoplazmadan çekirdeğe nükleer faktör-κB (NF-κB) translokasyonunu inhibe ettiğini göstermiştir. Ayrıca BP-1 kaynaklı apoptoz, B hücreli lenfoma-2 (Bcl-2) gibi apoptozla ilişkili proteinlerin düzenlenmesi, mitokondriden sitoplazmaya sitokrom C salınması ve kaspaz-8 ve kaspaz-9 aktivasyonu ile ilgili olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda, BP-1 kaynaklı HT-29 apoptozun ROS-JNK ve NF-κB aracılı kaspaz yolları yoluyla ortaya çıktığı gösterilmektedir.

2. MALZEME VE YÖNTEM

2.1. Örneklerin Eldesi

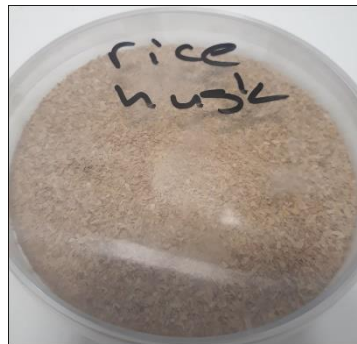
Bu çalışmada İpsala, Edirne’de faaliyet gösteren Özserhat Gıda San. Ltd. Şti.’nden temin edilen pirinç kabuğu kullanıldı.

2.2. Yüksek Basınçlı Sıcak Su Ekstraksiyonu ile Pirinç Kabuğu Ekstraktlarının Eldesi

Satın alınan pirinç kabuğundan proteinler şekil 2.1.’de gösterilen yüksek basınçlı sıcak su ekstraksiyon cihazı kullanılarak elde edildi. Kurutulmuş pirinç kabuğu şekil 2.2.’de gösterildiği gibi 5 gr olarak tartıldı ve 100 mL saf su ile cihazın haznesine aktarıldı. Ekstraksiyon işlemi 60oC sıcaklıkta, 50 bar basınç altında, 45 dakika boyunca ve solvent akış hızı saniyede 2 mL olacak şekilde ayarlanarak tamamlandı.



Şekil 2.1. Yüksek basınçlı sıcak su ekstraksiyon cihazı (Amar Equipments, India) ve ekstraksiyon sonrasında elde edilen protein lizatı.



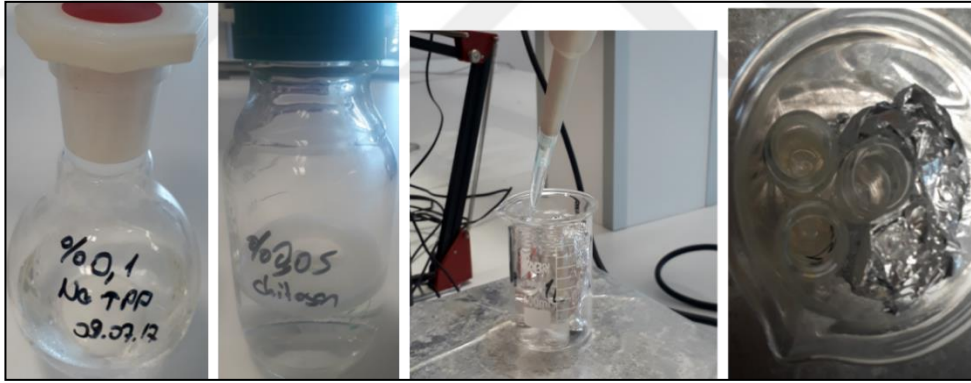
Şekil 2.2 Kurutulmuş pirinç kabuğu örneği.

2.3. Pirinç Kabuğu Ekstrelerinin Protein İçeriğinin Belirlenmesi

Ekstraksiyon sonucunda elde edilen ekstrelerin protein içeriği uv-visible spektrofotometre cihazında, Bradford (1976) metodu kullanılarak, standart eğri yardımıyla bovin serum albümin (BSA) (Sigma Aldrich) eşdeğeri olarak belirlendi.

2.4. Kitosan Nanopartiküllerinin Sentezi

Pirinç kabuğundan elde edilen protein ekstralarının fiziksel ve kimyasal özellikleri göz önünde bulundurularak, protein ekstraları iyonik jelasyon metodu ile enkapsüle edildi. Etkin bir mikronizasyon sağlanması için en yüksek biyolojik aktiviteye sahip pirinç kabuğu protein ekstresine en uygun polimerik meteryal kitosan olarak belirlendi ve sodyum tripolifosfat (Na-TPP) ile Şekil 2.3.'te gösterildiği gibi nanopartiküller oluşturuldu. Polimer oranları 1 saat ve 3 saat süreli olmak üzere %0,1, %0,2 ve %0,3 (w/v) oranlarında Na-TPP kullanılarak seri denemeler gerçekleştirildi. Oluşturulan nanopartiküllerin yüzde verimlerinin belirlenmesi için şekil 2.4.'te gösterilen karakterizasyon işlemi gerçekleştirildi.



Şekil 2.3. Elde edilen protein ekstralarının iyonik jelasyon metodu ile enkapsüle edilmesi.

2.1. Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyel Analizler

Nanopartiküllerin partikül büyüklüğü dağılımı ve zeta potansiyeli Malvern Zetasizer Nano-ZS (Malvern Inst. Ltd. UK) ile dinamik ışık saçılımı (DSL) kullanılarak belirlendi (Şekil 2.4). Bütün deneyler üç tekrar çalışıldı.



Şekil 2.4. Oluşturulan kitosan nanopartiküllerinin karakterizasyonu (Malvern Zeta-sizer Nano-ZS, Malvern, Inst. Ltd. UK).

2.1.1. Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) analizi

Termal analizler DSC (Perkin Elmer, ABD) kullanılarak yapılmıştır. Yeterli miktarda; ekstrat, kitosan yüklenmiş ekstrat ve ekstratsız boş kitosan örnekleri standart alüminyum panlara sıkıştırılarak yüklenmiştir. Sonrasında sistem saf sıvı nitrojen ile temizlenmiş ve nanopartiküller dakikada 10°C ısıtılma oranında 20-350°C'ler arasında incelenmiştir.

2.1.2. Fourier dönüşüm kızılötesi (FTIR) analizi

Ekstrakt, ham kitosan ve ekstrakt yüklü kitosan nanopartiküllerinin FTIR spektrosu 650-4000cm⁻¹ dalga boyları arasında Perkin-Elmer Spectrum 100 cihazında ölçülmüştür.

2.1.3. Taramalı elektron mikroskopi (SEM) analizi

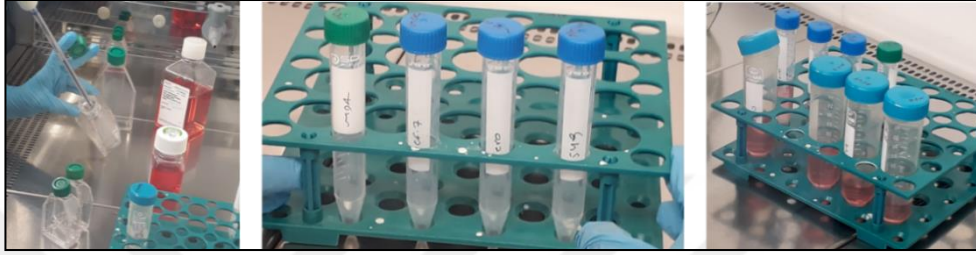
Nanopartiküllerin yüzey morfolojisinin belirlenmesi, uygun çözünürlükte ve oda sıcaklığında taramalı elektron mikroskobu (SEM, Carl Zeiss 30 VP, Almanya) kullanılarak yapılmıştır. Görüntülenmeden önce nanopartiküller Quorum Q150 RES (Quorum Technologies, UK) cihazıyla altın kaplanmıştır.

2.2. Tümör Hücrelerinin Kültür Ortamında Çoğaltılması ve Ekstrelerin İnkübasyonu

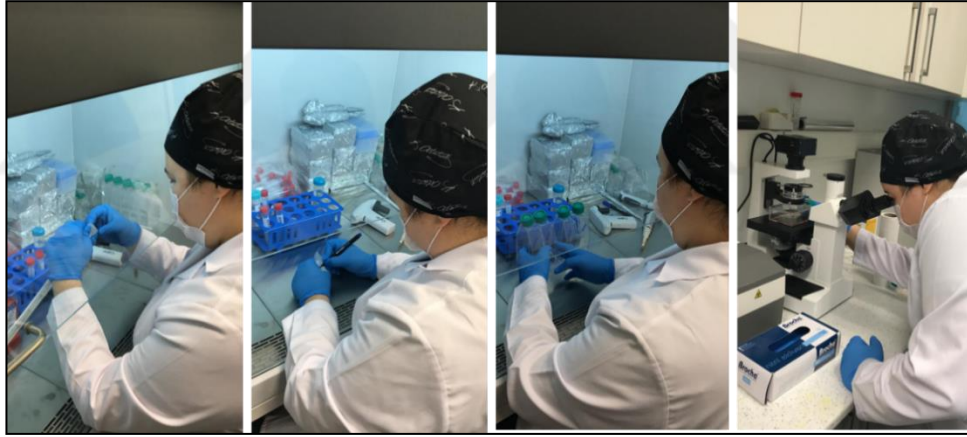
Yüksek basınçlı sıcak su yöntemi ile elde edilen ekstrelerin anti tümörojenik aktiviteleri 3 adet tümörojenik, MDA-MB-231 (insan, meme adenokarsinoma), MCF7 (insan, meme adenokarsinomu), A-549 (insan, akciğer karsinomu) ve 1 adet normal Vero (Afrika yeşil maymun, böbrek epiteli) hücre hatları %5 fötal dana serumu (Sigma, A.B.D), 100 IU/mL penisilin ve 1 µG/mL streptomisin içeren RPMI-1640

(Invitrogen, A.B.D.) besi ortamı ile, 37°C'de %5 CO₂'li ortamlarda şekil 2.5.'te gösterildiği gibi çoğaltıldı.

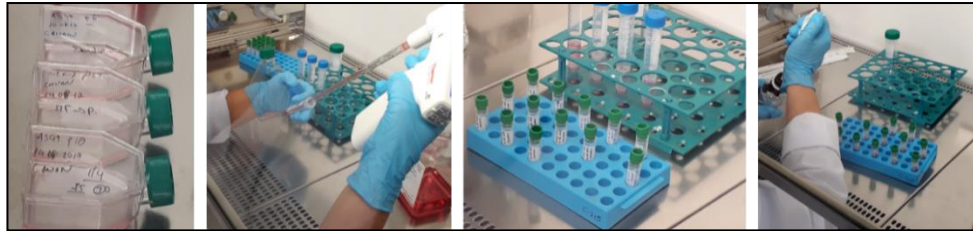
Üretilen hücre hatları testlerde kullanılmaya kadar %5 dimetilsülfoksit (DMSO) içeren üretme ortamı ve %10 DMSO içeren fötal dana serumu (Sigma, A.B.D.) ile hazırlanan dondurma vasatlarıyla -86°C derin dondurucuda ve sonrasında -196°C sıvı azot içerisinde dondurularak saklandı (Şekil 2.6. ve Şekil 2.7).



Şekil 2.5. MDA-MB-231, MCF7, A-549 ve Vero hücrelerinin çoğaltılması.



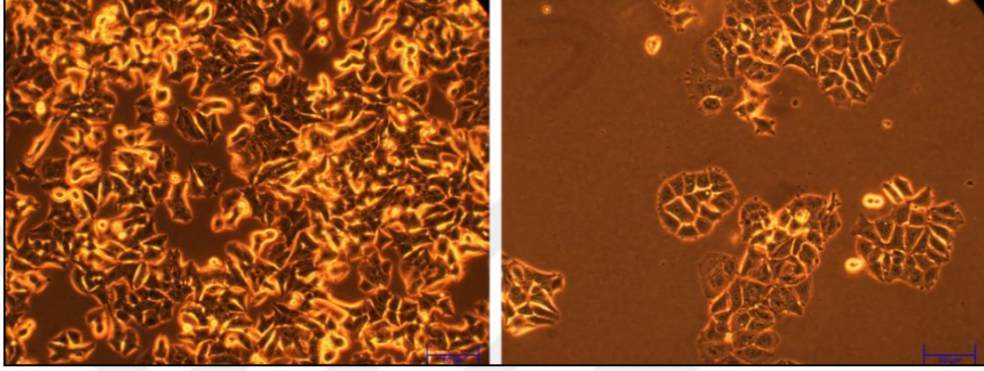
Şekil 2.6. Hücrelerin pasajlanması, çoğaltılması ve dondurulması.



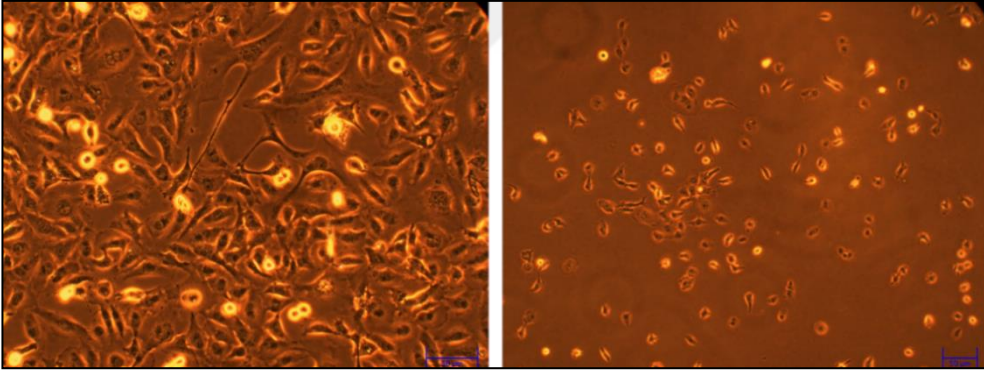
Şekil 2.7. MDA-MB-231, MCF-7, A-549 ve Vero hücrelerinin dondurulması.

2.2.1. Deneyde kullanılan hücre hatları

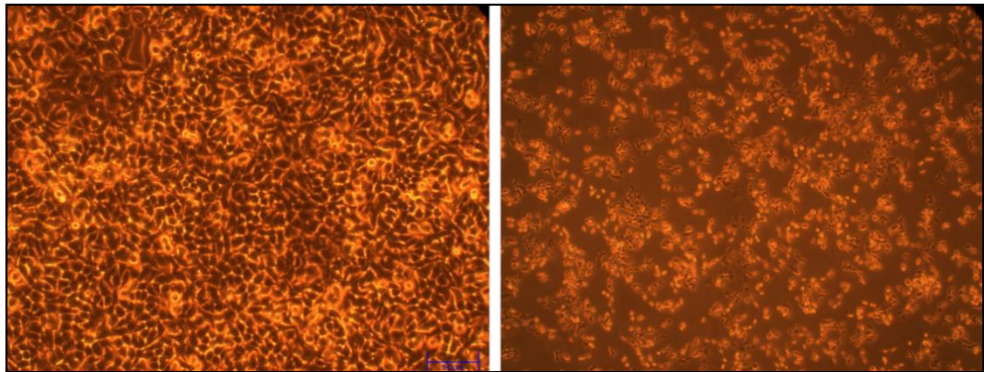
Yüksek basınçlı sıcak su yöntemi ile elde edilen ekstrelerin antitümörojenik aktiviteleri 3 adet tümörojenik, MDA-MB-231 (insan, meme adenokarsinoma), MCF7 (insan, meme adenokarsinomu), A-549 (insan, akciğer karsinomu) ve 1 adet normal Vero (Afrika yeşil maymun, böbrek epiteli) hücre hattı Amerikan Hücre Kültürü Koleksiyonundan (ATCC, Mannassas, VA) elde edildi.



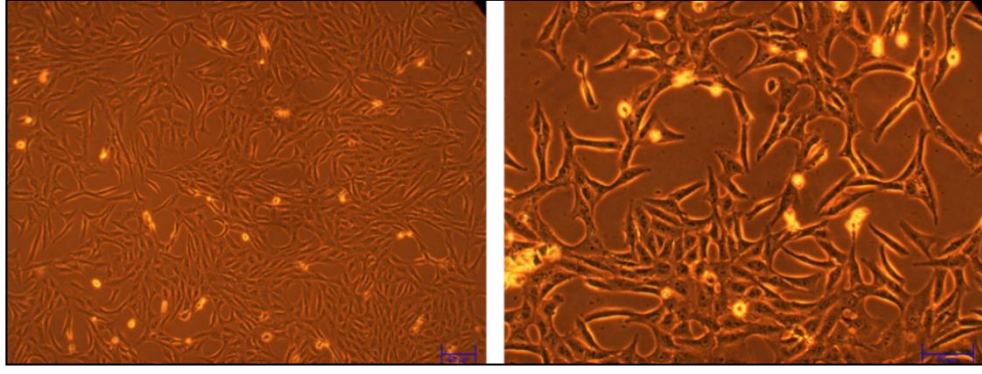
Şekil 2.8. MCF-7 (insan, meme, adenokarsinoma) hücre hattı.



Şekil 2.9. MDA-MB-231 (insan, meme, adenokarsinoma) hücre hattı.



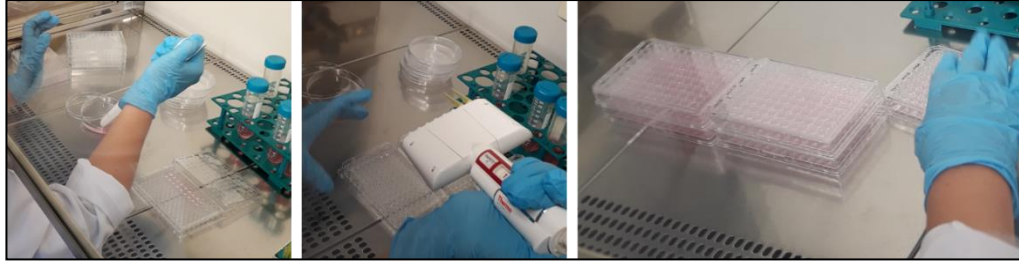
Şekil 2.10. A-549 (insan, akciğer karsinomu) hücre hattı.



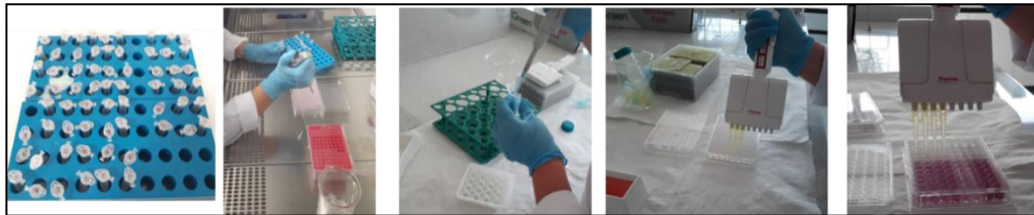
Şekil 2.11. Vero (Afrika yeşil maymun, böbrek epiteli) hücre hatı.

2.3. Hücre Canlılık Oranlarının Belirlenmesi

Hücre canlılık oranlarının belirlenmesinde kalorimetrik bir yöntem olan MTT (3- [4,5- dimetiltiazol-2-il]- 2,5- difenil- tetrazolium bromit) yöntemi kullanıldı (Şekil 2.12., 2.13. ve 2.14). Bu hücre sitotoksik aktivite testi, canlı hücrelerin mitokondrial dehidrogenazları tarafından tetrazolium tuzlarının 3-(4,5- dimethylthiazol- 2-il)- 2,5- difeniltetrazolium bromit (MTT, Sigma Chemicals, A.B.D.) bir mavi formazana hücresel indirgenmesi temeline dayanmaktadır. Oluşan mavi formazan miktarına bağlı absorbans değerleri mikropilaka okuyucu spektrofotometrede (Şekil 2.15.) ölçüldü. Hücre canlılığı, % hücre canlılığı olarak hesaplandı.



Şekil 2.12. Hücrelerin mikro platelere/mikropilakalara dağıtılması.



Şekil 2.13. Ekstrelerin hücrelerin üzerine inkübasyonu ve MTT protokolünün uygulanması.



Şekil 2.14. Hücelere MTT testi yapılması.

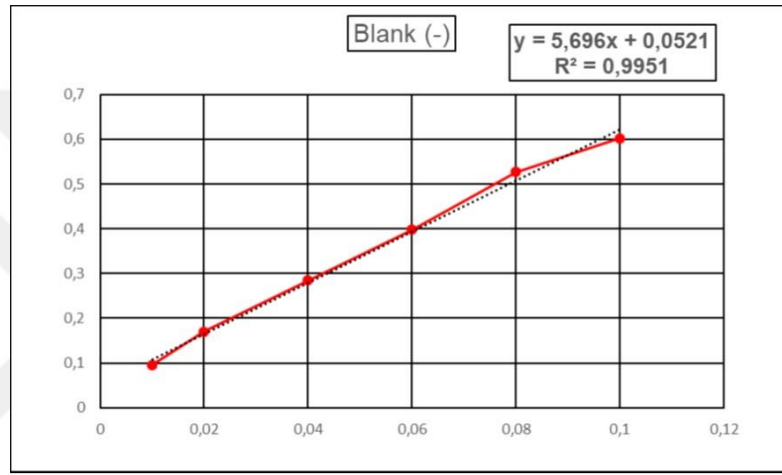


Şekil 2.15. MTT protokolü sonrası hücrelerde oluşan mavi formazan miktarına bağlı absorbans değerlerinin mikropłaka okuyucu spektrofotometrede ölçülmesi (BioTek-ELx800, UK).

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Ekstraksiyon sonrasında ekstraların protein miktarının belirlenmesi

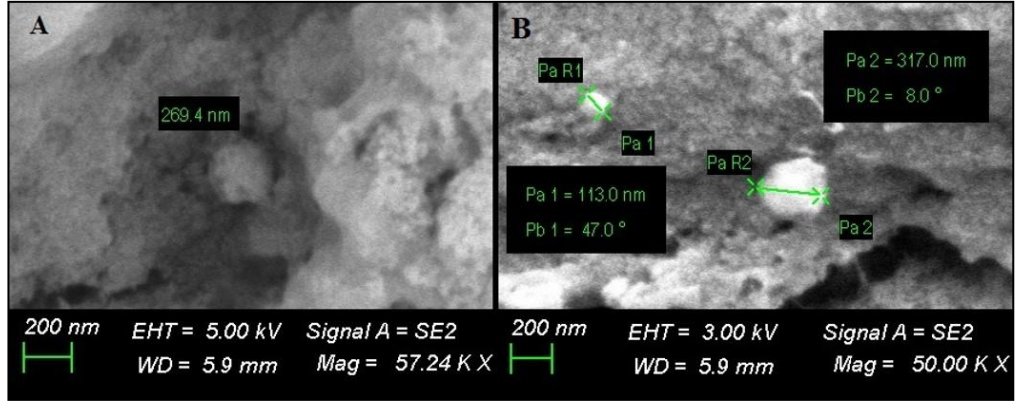
Yüksek basınçlı sıcak su ekstraksiyonu ile hazırlanan protein ekstraktlarındaki ilk protein miktarı Bradford yöntemi sonrasında çizilen standart eğri yardımıyla bovin serum albümin (BSA) eşdeğeri (Şekil 3.1.) olarak 0,12 mG/mL bulunmuştur.



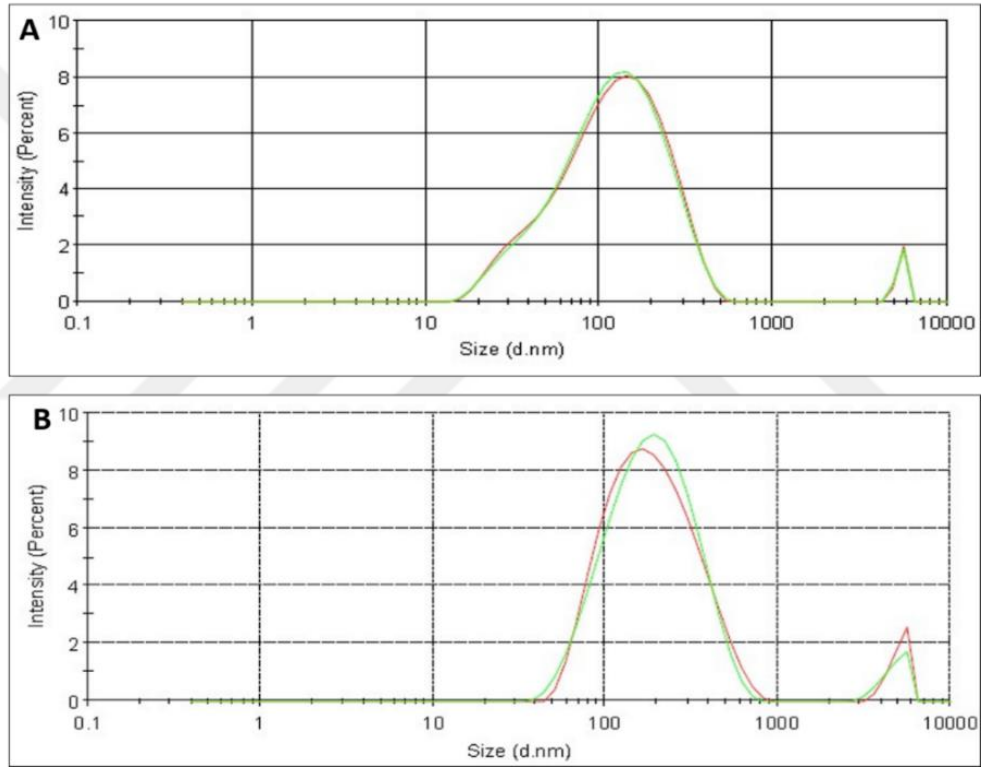
Şekil 3.1. Bradford yöntemi sonrasında çizilen standart eğri.

3.2. Ekstrakt yüklü kitosan nanopartiküllerinin sentezi

Sentezlenen nanopartiküllerin yüzey topoğrafyası, boyut dağılımı, fiziksel dağılımları gibi özellikler sırasıyla SEM, DSC, FTIR analizleriyle detaylı olarak incelenmiştir. Buna göre, ekstrat yüklü kitosan nanopartiküllerinin yüzey topoğrafyası SEM kullanılarak ölçülmüş ve partiküllerin küresel ve pürüzsüz yüzeye sahip olduğu gözlemlenmiştir. (Şekil 3.2.). Ölçülen çaplar DLS sonucuyla elde edilen boyut dağılımı raporundakiyle uyumlu olarak; yüklü nanopartiküllerde 269,4 nm (Şekil 3.3.A.) ve boş kitosan (ekstrakt yok) nanopartikülleri için 113-317,0 nm (Şekil 3.3.B) olarak ölçülmüştür.



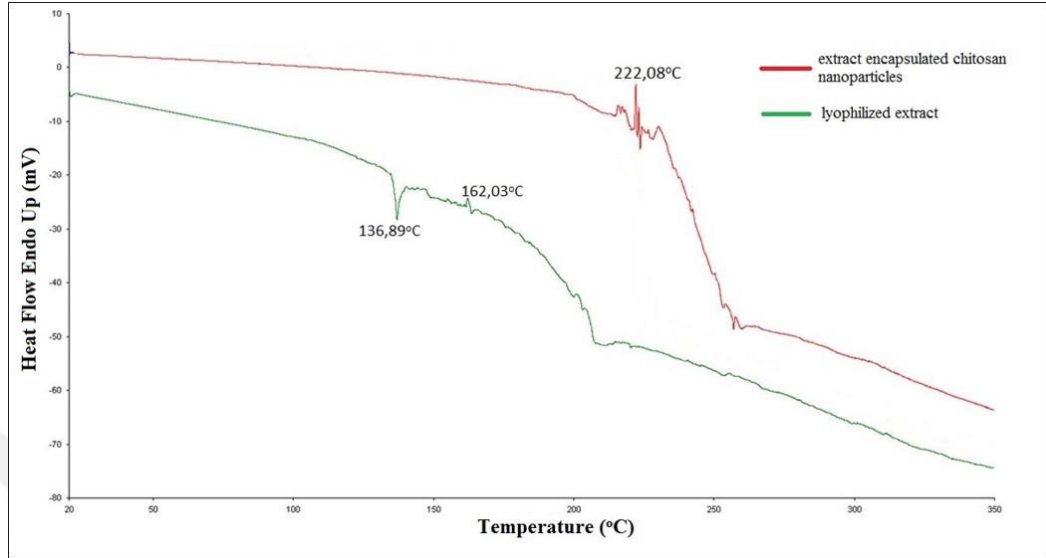
Şekil 3.2. Ekstrakt yüklenmiş kitosan nanopartiküllerinin dış yüzey betimi SEM ile gözlenmiştir.



Şekil 3.3. Enkapsüle edilmiş atık pirinç kabuğu proteininin (A), ve kitosanın (ekstrakt yok) (B) boyut dağılımı.

DSC çalışmaları kitosan nanopartiküllerinin fiziksel durumlarının incelenmesi için yapılmıştır (Şekil 3.4.) ve liyofilize ekstrakt eğrisindeki ilk termal olay örnekteki suyun buharlaşmasıyla bağlantılı olarak 136,89°C’de dar endotermik pik olarak ölçülmüştür. Geçiş sonrası liyofilize ekstratın ısı akış modeli 162,03°C’de ekzotermik parçalanma olarak başlamış ve ekstra enkapsüle kitosan nanopartiküllerinde

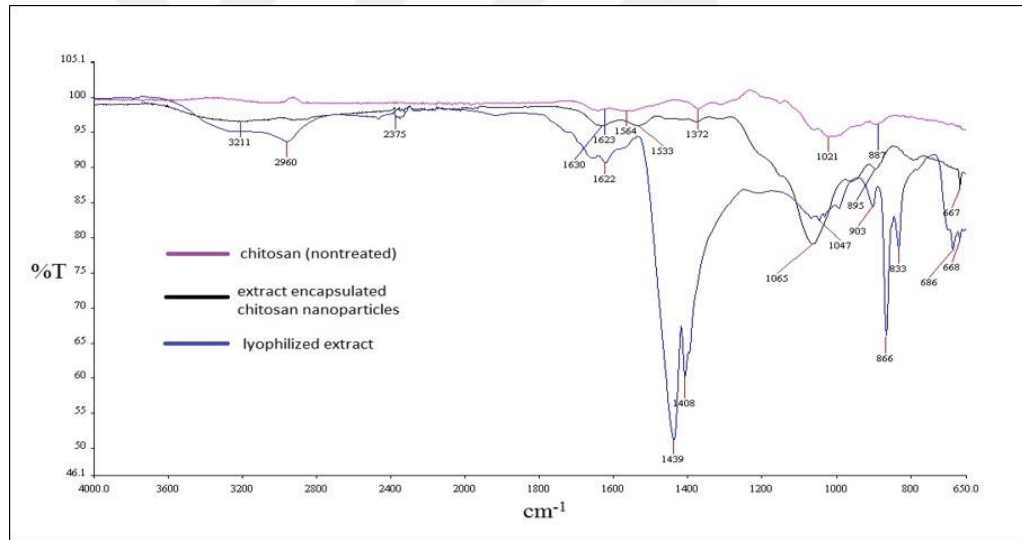
222,08°C’de çözölüm piki ölçölmüştür. Bu sonuç, enkapsölasyonun ekstratın termal stabilitesini arttırdığını göstermektedir.



Şekil 3.4. DSC çalışmaları, kitosan nanopartiküllerindeki ekstratın fiziksel durumunu araştırmak için gerçekleştirildi.

Kitosanın FTIR spektrumu (Şekil 3.5.) 1648 cm^{-1} (amid I), 1 cm^{-1} (amid II) ve 1386 cm^{-1} (amid III) dalga boylarında karakteristik absorbyonlar ortaya çıkarmıştır (Wu ve diğ., 2006). Amid I ($1600\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$) ölçümleri temel olarak C=O ve C-N gruplarının esneme sırasında çıkardığı vibrasyonlara bağlıdır. Amid II ($1510\text{--}1580\text{ cm}^{-1}$) ölçümleri temelinde düzlem içi N-H gruplarının bükülmesinden, kalan potansiyel enerji ölçümleri ise C-N ve C-C gruplarının esneme vibrasyonlarından kaynaklanmaktadır. Diğer yandan, 1021 ve 887 cm^{-1} dalga boylarındaki bantların glikosidik bağlardan kaynaklandığı düşünülmektedir (Fernandes ve diğ., 2011). Ekstra enkapsüle kitosan nanopartikülleri ile kitosanın spektrumlarının karşılaştırılmasından fark edilebilir sonuçlar çıkmaktadır. Kitosanın hidroksil gruplarındaki 3579 cm^{-1} bandı 3211 cm^{-1} 'ye kaymıştır ayrıca sadece Amid I 'in spektrası 1648 cm^{-1} 'den 1630 cm^{-1} 'ye kaymakla kalmamış Amid II'nin spektrası da 1565 cm^{-1} 'den 1533 cm^{-1} 'e kaymıştır. Bunun yanında şiddetleri de zayıflamıştır (Chen ve diğ., 2009). Piriç kabuğunun içeriğindeki maddeler ve oranları şu şekildedir; selölöz (%35), hemiselölöz (%25), lignin (%20), ham protein (%3) ve kül (%17). Piriç kabuğu içeriğindeki %15-20 silika içeriği sebebiyle özel karakteristikler göstermektedir (Maruf ve diğ., 2017).

Ham pirinç kabuğunun IR spektrasına bağlı fiziksel ölçümleri daha önce Daffalla ve arkadaşları (2010) tarafından araştırılmıştır. Buna göre, liyofizile pirinç kabuğunun FTIR spektrasında 1408 cm^{-1} ve 1439 cm^{-1} dalga boylarında gözlenen pikler $-\text{CH}_2$ ve $-\text{CH}_3$ gruplarının varlığına işaret etmektedir. 1622 cm^{-1} dalga boyunda ölçülen $\text{C}=\text{C}$ esneme vibrasyonları ise alkenlere karşılık gelir. Ayrıca, 1047 cm^{-1} ile $903\text{--}605\text{ cm}^{-1}$ dalga boyları sırasıyla Si-O-Si esnemelerine ve Si-H gruplarına denk gelmektedir (Daffalla ve diğ., 2010; Srivastava ve diğ., 2006). Bu bilgiler ışığında, bu çalışmada elde edilen kitosan nanopartiküllerine ait bulgularda 1408 , 1439 , 866 , 833 cm^{-1} civarlarındaki bağlanmaları kaybolduğu görülmekte (Şekil 3.5.), ekstrasit enkapsüle kitosan nanopartiküllerinde ise 1047 , 686 cm^{-1} bantlarından 1065 , 667 cm^{-1} bantlarına kaymalar gözlemlenmiştir. Dalga boylarında ölçülen değişiklikler, liyofilize pirinç kabuğu bağlı kitosan nanopartiküllerinde hidroksil ve eter gruplarının arasında belirgin ilişkisi olduğunu ortaya koymaktadır.



Şekil 3.5. Kitosanın FTIR spektrumu.

3.3. İn vitro Sitotoksikite Aktivite Çalışmaları

3.3.1. Protein ekstraktları ile yüklü nanopartiküllerin tümör hücreleri üzerine antitümörojenik etkileri

Pirinç kabuğu ham protein ekstresi enkapsülasyonu sonrasında oluşan kitosan nanopartiküllerinden RHECN1, RHECN2 ve RHECN3 nanopartikülleri A549 (İnsan küçük hücreli akciğer karsinomu), MCF-7 (insan meme adenokarsinom), MDA-MB-231 (insan meme adenokarsinom) kanser hücre hatları ve Vero (Afrika yeşil maymun

böbrek epiteli) normal hücre hattı kullanılarak hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi incelenmiş ve Şekil 3.7.'de gösterilmiştir. Sitotoksik deneylerinde pozitif kontrol olarak doksorubisin (10µG/mL) kullanılmıştır.

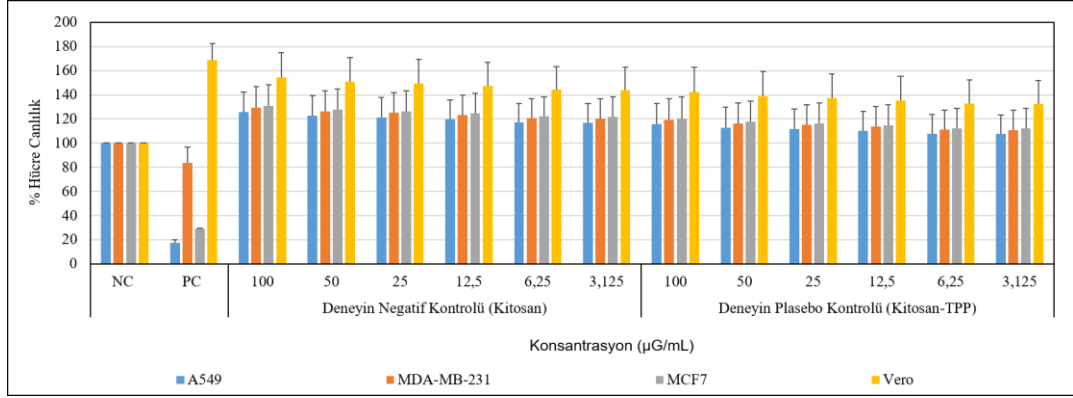
Kitosan ile enkapsüle edilen pirinç kabuğu protein ekstraktlarının sitotoksik aktivitesi MCF7, A549, MDA-MB-231 hücre hatlarında 48 saat süre ile 3,125 ile 100 µG/mL arasında değişen altı konsantrasyonda incelenmiştir. Pozitif kontrol olarak 10 µG/mL Doksorubisin, negatif kontrol olarak ise %0,1 DMSO (Dimetil sülfoksit) içeren ortam kullanılmıştır. Deneyin plasebo kontrolü ekstre yüklü olmayan boş kitosan-TPP nanopartikülü, negatif kontrolünde ise kitosan içeren ortam kullanılmıştır. Yapılan MTT testi sonucunda boş kitosan-TPP (kitosan-tripoliposfat) nanopartikülü ve kitosan'a ait doza bağlı sitotoksik aktivite bulguları Tablo 3.1 ve 3.2'de gösterilmiştir. Buna göre, test edilen dozların hiçbirinde sitotoksik etki görülmemiştir (Tablo 3.1&3.2., Şekil 3.6.).

Tablo 3.1. Kitosan'ın 48 saatin sonunda, çeşitli kanser hücre hatları üzerinde (A549, MCF7, MDA-MB-231) ve normal hücre hattında (Vero) hücre canlılıklarına olan etkisi. NK (hücre+medium+%0,1 DMSO), negatif kontrol; PK (doksorubisin 10 µG/mL), pozitif kontrol.

	NK (%0,1 DMSO)	PK (10µg/ml Doksorubisin)	100 µg/ml	50 µg/ml	25 µg/ml	12,5 µg/ml	6,25 µg/ml	3,125 µg/ml
A549	100	17,27(±2,73)	125,67(±16,84)	122,75(±16,44)	121,38(±16,26)	119,78(±16,05)	117,28(±15,71)	116,98(±15,67)
MDA-MB-231	100	83,88(±12,97)	129,44(±17,34)	126,43(±16,94)	125,02(±16,75)	123,37(±16,53)	120,8(±16,18)	120,49(±16,14)
MCF7	100	28,86(±0,68)	130,86(±17,53)	127,82(±17,12)	126,4(±16,93)	124,73(±16,71)	122,13(±16,36)	121,81(±16,32)
VERO	100	168,76(±13,67)	154,42(±20,69)	150,83(±20,21)	149,15(±19,98)	147,18(±19,72)	144,12(±19,31)	143,74(±19,26)

Tablo 3.2. Boş nanopartikülün 48 saatin sonunda, çeşitli kanser hücre hatları üzerinde (A549, MCF7, MDA-MB-231) ve normal hücre hattında (Vero) hücre canlılıklarına olan etkisi. NK (hücre+medium+%0,1 DMSO), negatif kontrol; PK (doksorubisin 10 µG/mL), pozitif kontrol.

	NK (%0,1 DMSO)	PK (10µg/ml Doksorubisin)	100 µg/ml	50 µg/ml	25 µg/ml	12,5 µg/ml	6,25 µg/ml	3,125 µg/ml
A549	100	17,27(±2,73)	115,62(±16,99)	112,93(±16,6)	111,67(±16,41)	110,2(±16,19)	107,9(±15,86)	107,62(±15,82)
MDA-MB-231	100	83,88(±12,97)	119,08(±17,5)	1116,32(±17,09)	115,02(±16,9)	113,5(±16,68)	111,14(±16,33)	110,85(±16,29)
MCF7	100	28,86(±0,68)	120,39(±17,69)	117,6(±17,28)	1116,29(±17,09)	114,75(±16,86)	112,36(±16,51)	112,07(±16,47)
VERO	100	168,76(±13,67)	142,07(±20,88)	138,76(±20,39)	137,22(±20,17)	135,41(±19,9)	132,59(±19,49)	132,24(±19,44)



Şekil 3.6. Kitosan ve boş kitosan-TPP nanopartikülünün 48 saatin sonunda, çeşitli kanser hücre hatları üzerinde (A549, MCF7, MDA-MB-231) ve normal hücre hattında (Vero) hücre canlılıklarına olan etkisi. NK (hücre+medium+%0,1 DMSO), negatif kontrol; PK (doksorubisin 10µG/mL), pozitif kontrol.

İyonik jelasyon metoduyla enkapsülasyon sonrası oluşan RHECN1, RHECN2 ve RHECN3 nanopartiküllerinin 100, 50, 25, 12,5, 6,25 ve 3,125 µG/mL konsantrasyonlarında sitotoksik aktiviteleri A549 (insan, akciğer karsinomu), MCF7 (insan, meme, adenokarsinoma), MDA-MB-231 (insan, meme, adenokarsinoma) kanser hücre hatları ve Vero (Afrika yeşil maymun, böbrek epiteli) normal hücre hatlarında MTT testi kullanılarak analiz edilmiştir. Pozitif kontrol olarak doksorubisin (10 µG/mL) ve negatif kontrol olarak %0,1 DMSO ile muamele edilmiştir.

RHECN1 (%0,1(w/v) ekstre) nanopartikülünün 100 µG/mL konsantrasyonunda 48 saat sonunda elde edilen en yüksek sitotoksik aktivite %38,84 (±4,58) hücre canlılığı ile A549 hücre hattında elde edilmiştir. Bunu takiben 100 µG/mL konsantrasyonda %47,81 (±5,64)'lik hücre canlılığı ile MCF7'de ve MDA-MB-231'de %112,78 (±13,3)'lik hücre canlılığı gözlenmiştir. Bununla birlikte aynı konsantrasyonda (100 µG/mL) Vero normal hücre hattında hücre canlılığı %202,04 (±23,84) olarak saptanmıştır (Tablo 3.3).

50 µG/mL konsantrasyonun 48 saatlik uygulamasının sonunda, en yüksek sitotoksik aktivite %45,83 (±5,4) ile A549 hücre hattında elde edilmiştir. MCF7 hücre hattında 50 µG/mL konsantrasyonda %56,4 (±6,65), MDA-MB-231 hücre hattında %133,05 (±15,7) hücre canlılığı gözlenmiştir. Bununla birlikte aynı konsantrasyonda (50 µG/mL) normal hücre hattı Vero'da %238,37 (±28,12) hücre canlılığı saptanmıştır (Tablo 3.3).

25 µG/mL konsantrasyonun 48 saatlik uygulamasının sonunda en yüksek sitotoksik aktivite %50,31 ($\pm 5,93$) hücre canlılığı olarak A549 hücre hattında elde edilmiştir. Bunu takiben %61,92 ($\pm 7,3$) hücre canlılığı ile MCF7 hücre hattında bulunmuştur. MDA-MB-231 hücre hattında %146,07 ($\pm 17,23$) hücre canlılığı gözlenmiştir. Bununla birlikte aynı konsantrasyonda (25 µG/mL) normal hücre hattı olan Vero'da hücre canlılığı %261,68 ($\pm 30,87$) olarak saptanmıştır (Tablo 3.3).

12.5 µG/mL konsantrasyonların 24 saatlik uygulamaları sonucunda en yüksek sitotoksik aktivite %56,95 ($\pm 6,72$) hücre canlılığı ile A549 hücre hattında ve bunu takiben MCF7 hücre hattında %70,09 ($\pm 8,27$) hücre canlılığı gözlenmiştir. MDA-MB-231 hücre hattında %165,35 ($\pm 19,51$) hücre canlılığı elde edilmiştir. Bununla birlikte aynı konsantrasyonda (25 µG/mL) normal hücre hattı olan Vero'da hücre canlılığı %296,22 ($\pm 34,95$) olarak saptanmıştır (Tablo 3.3).

6,25 µG/mL konsantrasyon için 48 saatlik uygulama sonrasında elde edilen en yüksek sitotoksik aktivite %62,53 ($\pm 7,37$) hücre canlılığı ile A549'dur. Öte yandan %76,96 ($\pm 9,08$) hücre canlılığı MCF7 hücre hattında elde edilmiştir. MDA-MB-231 hücre hattında hücre canlılığı %181,55 ($\pm 21,42$) olarak gözlenmiştir. Bunun yanı sıra normal hücre hattı olan Vero'da hücre canlılığı %325,25 ($\pm 38,38$) olarak saptanmıştır (Tablo 3.3).

3.125 µG/mL konsantrasyon için 48 saatlik uygulama sonrasında elde edilen en yüksek sitotoksik aktivite A549 hücre hattında %70,29 ($\pm 8,29$) hücre canlılığı olarak bulunmuştur. Bununla birlikte MCF7 hücre hattında hücre canlılığı %86,51 ($\pm 10,20$) olarak gözlenmiştir. MDA-MB-231 hücre hattında hücre canlılığı %204,07 ($\pm 24,08$) olarak bulunmuştur. Bununla birlikte aynı konsantrasyonda (3.125 µG/mL) normal hücre hattı olan Vero'da hücre canlılığı %365,59 ($\pm 43,13$) olarak saptanmıştır (Tablo 3.3.).

RHECN2 (0.2 (w/v) ekstre) nanopartiküllerinin 100 µG/mL konsantrasyonunda 48 saat sonunda elde edilen en yüksek sitotoksik aktivite %30,58 ($\pm 3,54$) hücre canlılığı ile A549 hücre hattında elde edilmiştir. Bunu takiben 100 µG/mL konsantrasyonda %37,64 ($\pm 4,36$)'lük hücre canlılığı ile MCF7'de ve MDA-MB-231'de %88,8 ($\pm 10,3$)'lik hücre canlılığı gözlenmiştir. Bununla birlikte aynı konsantrasyonda (100

$\mu\text{G/mL}$) Vero, normal hücre hattında hücre canlılığı %159,09 ($\pm 18,45$) olarak saptanmıştır (Tablo 3.4.).

Tablo 3.3. RHECN1 (%0,1 (w/v) ekstre) nanopartikülü 48 saatin sonunda, çeşitli kanser hücre hatlarının (A549, MCF7, MDA-MB-231) ve normal hücre hattının (Vero) hücre canlılıklarına olan etkisi. NK (hücre+medium+%0,1 DMSO), negatif kontrol; PK (doksorubisin 10 $\mu\text{G/mL}$), pozitif kontrol.

	NC (%0,1 DMSO)	PC (10 $\mu\text{g/mL}$ Doksorubisin)	100 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	25 $\mu\text{g/mL}$	12,5 $\mu\text{g/mL}$	6,25 $\mu\text{g/mL}$	3,125 $\mu\text{g/mL}$
A549	100	17,27($\pm 2,73$)	38,84($\pm 4,58$)	45,83($\pm 5,4$)	50,31($\pm 5,93$)	56,95($\pm 6,72$)	62,53($\pm 7,37$)	70,29($\pm 8,29$)
MDA-MB-231	100	83,88($\pm 12,97$)	112,78($\pm 13,3$)	133,05($\pm 15,7$)	146,07($\pm 17,23$)	165,35($\pm 19,51$)	181,55($\pm 21,42$)	204,07($\pm 24,08$)
MCF7	100	28,86($\pm 0,68$)	47,81($\pm 5,64$)	56,4($\pm 6,65$)	61,92($\pm 7,3$)	70,09($\pm 8,27$)	76,96($\pm 9,08$)	86,51($\pm 10,2$)
VERO	100	168,76($\pm 13,67$)	202,04($\pm 23,84$)	238,37($\pm 28,12$)	261,68($\pm 30,87$)	296,22($\pm 34,95$)	325,25($\pm 38,38$)	365,59($\pm 43,13$)

50 $\mu\text{G/mL}$ konsantrasyonun 48 saatlik uygulamasının sonunda, en yüksek sitotoksik aktivite %36,08 ($\pm 4,18$) ile A549 hücre hattında elde edilmiştir. MCF7 hücre hattında 50 $\mu\text{G/mL}$ konsantrasyonda %44,41 ($\pm 5,15$), MB-231 hücre hattında %104,77 ($\pm 12,15$) hücre canlılığı gözlenmiştir. Bununla birlikte aynı konsantrasyonda (50 $\mu\text{G/mL}$) normal hücre hattı Vero'da %187,69 ($\pm 21,77$) hücre canlılığı saptanmıştır (Tablo 3.4.).

25 $\mu\text{G/mL}$ konsantrasyonun 48 saatlik uygulamasının sonunda en yüksek sitotoksik aktivite %39,61 ($\pm 4,59$) hücre canlılığı olarak A549 hücre hattında elde edilmiştir. Bunu takiben %48,76 ($\pm 5,65$) hücre canlılığı ile MCF7 hücre hattında bulunmuştur. MDA-MB-231 hücre hattında %115,01 ($\pm 13,34$) hücre canlılığı gözlenmiştir. Bununla birlikte aynı konsantrasyonda (25 $\mu\text{G/mL}$) normal hücre hattı olan Vero'da hücre canlılığı %206,05 ($\pm 23,9$) olarak saptanmıştır (Tablo 3.4.).

12,5 $\mu\text{G/mL}$ konsantrasyonların 24 saatlik uygulamaları sonucunda en yüksek sitotoksik aktivite %44,84 ($\pm 5,2$) hücre canlılığı ile A549 hücre hattında ve bunu takiben MCF7 hücre hattında %55,19 ($\pm 6,4$) hücre canlılığı gözlenmiştir. MDA-MB-231 hücre hattında %130,19 ($\pm 15,1$) hücre canlılığı elde edilmiştir. Bununla birlikte aynı konsantrasyonda (25 $\mu\text{G/mL}$) normal hücre hattı olan Vero'da hücre canlılığı %233,25 ($\pm 27,05$) olarak saptanmıştır (Tablo 3.4.).

6,25 $\mu\text{G/mL}$ konsantrasyon için 48 saatlik uygulama sonrasında elde edilen en yüksek sitotoksik aktivite %49,24 ($\pm 5,71$) hücre canlılığı ile A549'dur. Öte yandan %60,6

($\pm 7,03$) hücre canlılığı MCF7 hücre hattında elde edilmiştir. MDA-MB-231 hücre hattında hücre canlılığı %142,95 ($\pm 16,58$) olarak gözlenmiştir. Bunun yanısıra normal hücre hattı olan Vero'da hücre canlılığı %256,1 ($\pm 29,7$) olarak saptanmıştır (Tablo 3.4.).

3.125 $\mu\text{G/mL}$ konsantrasyon için 48 saatlik uygulama sonrasında elde edilen en yüksek sitotoksik aktivite A549 hücre hattında %55,35 ($\pm 6,42$) hücre canlılığı olarak bulunmuştur. Bununla birlikte MCF7 hücre hattında hücre canlılığı %68,12 ($\pm 7,9$) olarak gözlenmiştir. MDA-MB-231 hücre hattında hücre canlılığı %160,68 ($\pm 18,63$) olarak bulunmuştur. Bununla birlikte aynı konsantrasyonda (100 $\mu\text{G/mL}$) normal hücre hattı olan Vero'da hücre canlılığı %287,86 ($\pm 33,39$) olarak saptanmıştır (Tablo 3.4.).

Tablo 3.4. RHECN2 (%0,2 (w/v) ekstre) nanopartikülü 48 saatin sonunda, çeşitli kanser hücre hatlarının (A549, MCF7, MDA-MB-231) ve normal hücre hattının (Vero) hücre canlılıklarına olan etkisi. NK (hücre+medium+%0,1 DMSO), negatif kontrol; PK (doksorubisin 10 $\mu\text{G/mL}$), pozitif kontrol.

	NC (%0,1 DMSO)	PC (10 $\mu\text{g/mL}$ Doksorubisin)	100 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	25 $\mu\text{g/mL}$	12,5 $\mu\text{g/mL}$	6,25 $\mu\text{g/mL}$	3,125 $\mu\text{g/mL}$
A549	100	17,27($\pm 2,73$)	30,58($\pm 3,54$)	36,08($\pm 4,18$)	39,61($\pm 4,59$)	44,84($\pm 5,2$)	49,24($\pm 5,71$)	55,35($\pm 6,42$)
MDA-MB-231	100	83,88($\pm 12,97$)	88,8($\pm 10,3$)	104,77($\pm 12,15$)	115,01($\pm 13,34$)	130,19($\pm 15,1$)	142,95($\pm 16,58$)	160,68($\pm 18,63$)
MCF7	100	28,86($\pm 0,68$)	37,64($\pm 4,36$)	44,41($\pm 12,15$)	48,76($\pm 5,65$)	55,19($\pm 6,4$)	60,6($\pm 7,03$)	68,12($\pm 7,9$)
VERO	100	168,76($\pm 13,67$)	159,09($\pm 18,45$)	187,69($\pm 21,77$)	206,05($\pm 23,9$)	233,25($\pm 27,05$)	256,1($\pm 29,7$)	287,86($\pm 33,39$)

RHECN3 (0.3 (w/v) ekstre) nanopartikülünün 100 $\mu\text{G/mL}$ konsantrasyonunda 48 saat sonunda elde edilen en yüksek sitotoksik aktivite %22,65 ($\pm 3,21$) hücre canlılığı ile A549 hücre hattında elde edilmiştir. Bunu takiben 100 $\mu\text{G/mL}$ konsantrasyonda %27,88 ($\pm 3,95$)'lik hücre canlılığı ile MCF7'de ve MDA-MB-231'de %65,78 ($\pm 9,34$)'lük hücre canlılığı gözlenmiştir. Bununla birlikte aynı konsantrasyonda (100 $\mu\text{G/mL}$) Vero, normal hücre hattında hücre canlılığı %117,84 ($\pm 16,73$) olarak saptanmıştır (Tablo 3.5.).

50 $\mu\text{G/mL}$ konsantrasyonun 48 saatlik uygulamasının sonunda, en yüksek sitotoksik aktivite %26,73 ($\pm 3,79$) ile A549 hücre hattında elde edilmiştir. MCF7 hücre hattında 50 $\mu\text{G/mL}$ konsantrasyonda %32,9 ($\pm 4,67$), MB-231 hücre hattında %77,6 ($\pm 11,02$) hücre canlılığı gözlenmiştir. Bununla birlikte aynı konsantrasyonda (50 $\mu\text{G/mL}$) normal hücre hattı Vero'da %139,03 ($\pm 19,74$) hücre canlılığı saptanmıştır (Tablo 3.5.).

25 µG/mL konsantrasyonun 48 saatlik uygulamasının sonunda en yüksek sitotoksik aktivite %29,34 ($\pm 4,16$) hücre canlılığı olarak A549 hücre hattında elde edilmiştir. Bunu takiben %36,11 ($\pm 5,12$) hücre canlılığı ile MCF7 hücre hattında bulunmuştur. MDA-MB-231 hücre hattında %85,19 ($\pm 12,09$) hücre canlılığı gözlenmiştir. Bununla birlikte aynı konsantrasyonda (25 µG/mL) normal hücre hattı olan Vero'da hücre canlılığı %152,63 ($\pm 21,67$) olarak saptanmıştır (Tablo 3.5.).

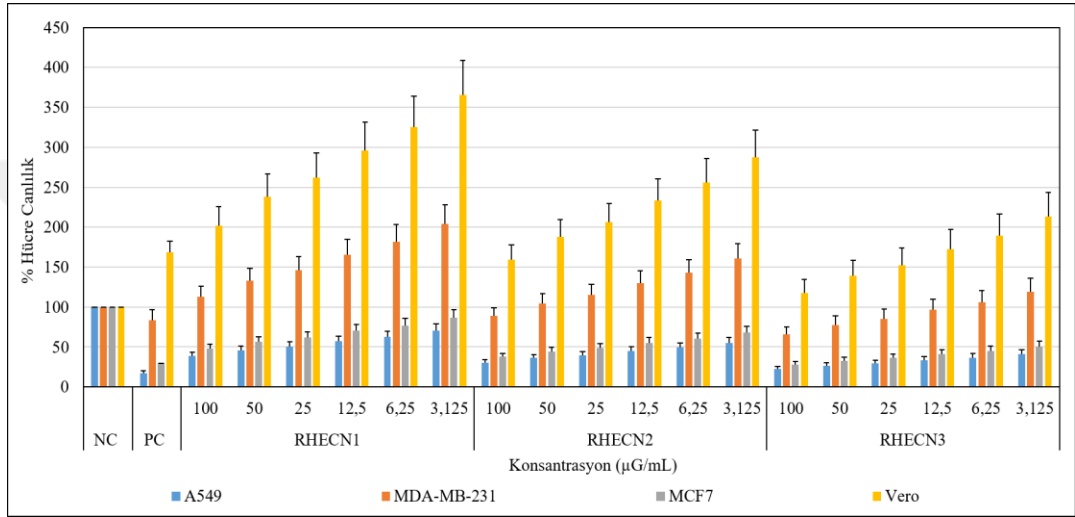
12.5 µG/mL konsantrasyonların 24 saatlik uygulamaları sonucunda en yüksek sitotoksik aktivite %33,22 ($\pm 4,71$) hücre canlılığı ile A549 hücre hattında ve bunu takiben MCF7 hücre hattında %40,88 ($\pm 5,80$) hücre canlılığı gözlenmiştir. MDA-MB-231 hücre hattında %96,44 ($\pm 13,69$) hücre canlılığı elde edilmiştir. Bununla birlikte aynı konsantrasyonda (25 µG/mL) normal hücre hattı olan Vero'da hücre canlılığı %172,77 ($\pm 24,53$) olarak saptanmıştır (Tablo 3.5.).

6,25 µG/mL konsantrasyon için 48 saatlik uygulama sonrasında elde edilen en yüksek sitotoksik aktivite %36,47 ($\pm 5,17$) hücre canlılığı ile A549'dur. Öte yandan %44,89 ($\pm 6,37$) hücre canlılığı MCF7 hücre hattında elde edilmiştir. MDA-MB-231 hücre hattında hücre canlılığı %105,89 ($\pm 15,03$) olarak gözlenmiştir. Bunun yanı sıra normal hücre hattı olan Vero'da hücre canlılığı %189,71 ($\pm 26,93$) olarak saptanmıştır (Tablo 3.5.).

3.125 µG/mL konsantrasyon için 48 saatlik uygulama sonrasında elde edilen en yüksek sitotoksik aktivite A549 hücre hattında %41 ($\pm 5,82$) hücre canlılığı olarak bulunmuştur. Bununla birlikte MCF7 hücre hattında hücre canlılığı %50,46 ($\pm 7,16$) olarak gözlenmiştir. MDA-MB-231 hücre hattında hücre canlılığı %119,02 ($\pm 16,9$) olarak bulunmuştur. Bununla birlikte aynı konsantrasyonda (100 µG/mL) normal hücre hattı olan Vero'da hücre canlılığı %213,23 ($\pm 30,27$) olarak saptanmıştır (Tablo 3.5.).

Tablo 3.5. RHECN3 (%0,3 (w/v) ekstre) nanopartikülü 48 saatin sonunda, çeşitli kanser hücre hatlarının (A549, MCF7, MDA-MB-231) ve normal hücre hattının (Vero) hücre canlılıklarına olan etkisi. NK (hücre+medium+%0,1 DMSO), negatif kontrol; PK (doksorubisin 10 µG/mL), pozitif kontrol.

	NC (%0,1 DMSO)	PC (10µg/ml Doksorubisin)	100 µg/ml	50 µg/ml	25 µg/ml	12,5 µg/ml	6,25 µg/ml	3,125 µg/ml
A549	100	17,27(±2,73)	22,65(3,21)	26,73(3,79)	29,34(4,16)	33,22(4,71)	36,47(5,17)	41(5,82)
MDA-MB-231	100	83,88(±12,97)	65,78(9,34)	77,6(11,02)	85,19(12,09)	96,44(13,69)	105,89(15,03)	119,02(16,9)
MCF-7	100	28,86(±0,68)	27,88(3,95)	32,9(4,67)	36,11(5,12)	40,88(5,8)	44,89(6,37)	50,46(7,16)
VERO	100	168,76(±13,67)	117,84(16,73)	139,03(19,74)	152,63(21,67)	172,77(24,53)	189,71(26,93)	213,23(30,27)



Şekil 3.7. Pirinç kabuğu protein ekstresi ile yüklü RHECN1, RHECN2 ve RHECN3 nanopartiküllerinin 48 saat sonunda, çeşitli kanser hücre hatlarının (A549, MCF7, MDA-MB-231) ve normal hücre hattının (Vero) hücre canlılıklarına olan etkisi. NK (hücre+medium+%0,1 DMSO), negatif kontrol. PK (doksorubisin 10µG/mL), pozitif kontrol.

Tablo 3.6. Pirinç kabuğu ekstresi yüklü nanopartiküllerin 3,125µG/mL konsantrasyonda A549, MCF7, MDA-MB-231 ve normal (Vero) hücre hatları üzerindeki hücre canlılık oranları.

	RHECN1	RHECN2	RHECN3
	3.125µg/ml	3.125µg/ml	3.125µg/ml
A549	%70.29(±8.29)	%55.35(±6.42)	%41(±5.82)
MDA-MB-231	%204.06(±24.08)	%160.68(±18.63)	%119.02(±16.90)
MCF-7	%86.51(±10.20)	%68.12(±7.90)	%50.46(±7.16)
VERO	%365.59(±43.13)	%287.86(±33.39)	%213.23(±30.27)

Tablo 3.6.'da verilen bulgular değerlendirildiğinde, pirinç kabuğu protein ekstraktı yüklü kitosan nanopartikülleri (RHECN1, RHECN2 ve RHECN3) test edilen üç farklı

kanser hücre hattı arasından en yüksek sitotoksik etkiyi sırasıyla A549 ve MCF7 hücre hatları üzerinde sergilemiş ve normal Vero hücreleri üzerinde herhangi bir toksisiteye sebep olmamışlardır. En düşük hücre canlılığı A549 ile RHECN3 (%0,3 (v/w) ml ekstrakt) nanopartikülünde 3,125 µG/mL de %41 (±5,82) olarak görülmüştür. Benzer şekilde MCF7 ile aynı konsantrasyonda hücre canlılığı %50,46 (±7,16) olarak hesaplanmıştır (Tablo 3.6.). Diğer yandan, Vero normal hücre hattı üzerinde 3,125 µG/mL’de %213,23 (±30,27)’lik canlılık ile sitotoksik aktivitenin normal hücrelerde gözlenmemiştir.

Nanopartiküller ile 48 saat boyunca çeşitli konsantrasyonlarda (100µG/mL, 50µG/mL, 25µG/mL, 12,5µG/mL, 6,25µG/mL ve 3.125µG/mL) inkübe edilen A549, MCF-7, MDA-MB-231 ve Vero hücre hatlarına IC₅₀ değerini saptamak amacıyla MTT testi uygulanmıştır. Analizler her bir hücre hattı için üç bağımlı ve üç bağımsız analizden elde edilerek değerlendirilmiştir.

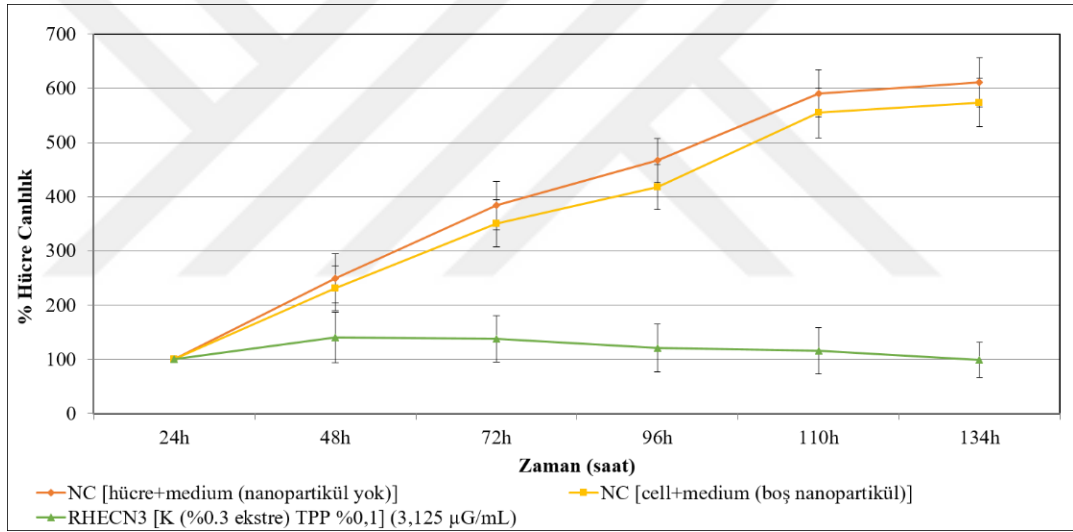
Tablo 3.7. Atık pirinç kabuğu protein ektreleri ile yüklü kitosan nanopartiküllerinin A549, MCF7, MDA-MB-231, Vero hücre hatlarındaki IC₅₀ değerleri. Pozitif kontrol (doxorubisin, 10µG/mL).

IC ₅₀ (µG/mL)				
	RHECN1 [(%0,1 ekstre) TPP%0.1)]	RHECN2 [(%0.2 ekstre) TPP%0.1)]	RHECN3 [(%0.3 ekstre) TPP %0,1]	Pozitif Kontrol (Doksorubisin, 10µG/mL)
A549	25,22	4,33	1,98	1.97 ± 0.78
MDA-MB-231	>100	>100	>100	2.00 ± 0.66
MCF7	87,43	15,41	3,58	2.31 ± 0.93
Vero	>100	>100	>100	3.84 ± 1.34

Tablo 3.7.’ye göre en düşük IC₅₀ değeri (IC₅₀=1,98 µG/mL) ile diğer bir deyişle en yüksek sitotoksik aktivite ile %0,3 ekstre yüklü RHECN3 nanopartikülünün A549 hücre hattı üzerinde hesaplanmıştır. Ayrıca A549 hücre hattından sonra MCF7 hücre hattına karşı RHECN3 nanopartikülünün IC₅₀=3,58µG/mL ile iyi bir sonuç alınmıştır. %0,2 ekstre yüklü RHECN2 nanopartikülleri de A549 ve MCF7 hücre hatlarına karşı sırasıyla 4,33µG/mL ve 15,41µG/mL’lik IC₅₀ değerini vermiştir. %0,1 ekstre yüklü RHECN1 nanopartikülünde ise A549 hücre hattına karşı IC₅₀ değeri 25,22µG/mL iken MCF7 hücre hattına karşı 87,43µG/mL’dir. Test edilen tüm nanopartiküller

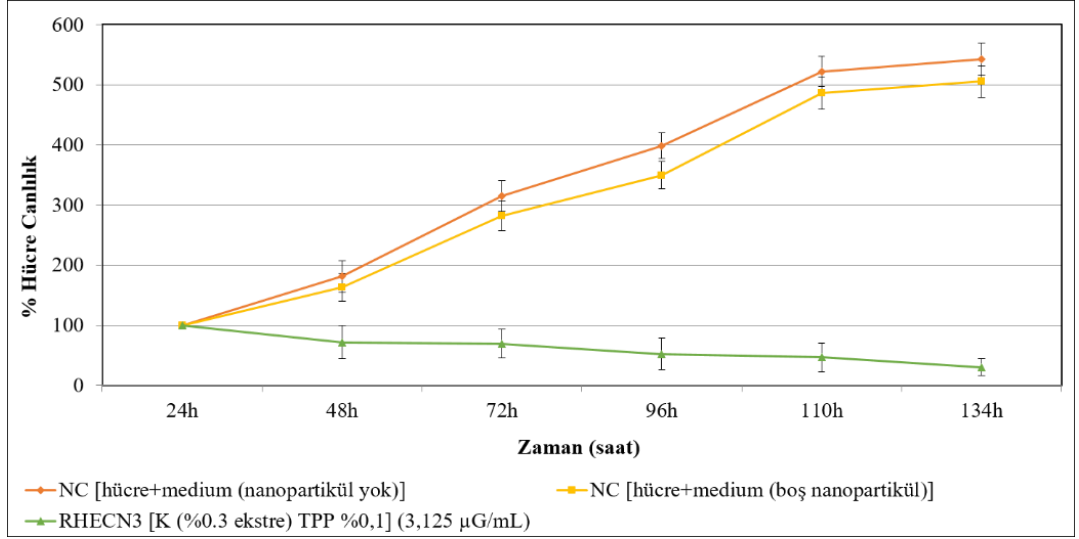
arasında en etkili olanın %0,3 ekstre yüklü olan RHECN3 olduğunu söyleyebiliriz. Bu nanopartiküle ait en hassas hücre hattı ise A459'dur.

En etkili nanopartikül (RHECN3, %0,3 ekstre) belirlendikten sonra, bunun 3 adet tümörojenik (A549, MCF-7, MDA-MB-231) ve 1 adet normal (Vero) hücre hatları üzerinde 3,125µG/mL konsantrasyonda yapılan 24, 48, 72, 96, 110 ve 134 saatlik zamana bağlı sitotoksik aktivite çalışması yapılmıştır (Şekil 3.8., 3.9. ve 3.10.). RHECN3 nanopartikülünün MDA-MB-231, MCF-7 ve A549 hücreleri üzerindeki etkileri değerlendirildiğinde A549 üzerindeki etkisinin diğer iki hücre hattına göre farklı olduğu bulunmuştur. RHECN3 nanopartikülünün MDA-MB-231 hücre hattında 3,125µG/mL konsantrasyonda 48.saate kadar artan hücre canlılığı 72. saatten itibaren sitotoksik etkiye bağlı olarak azalmaya başlamıştır (Şekil 3.8.).

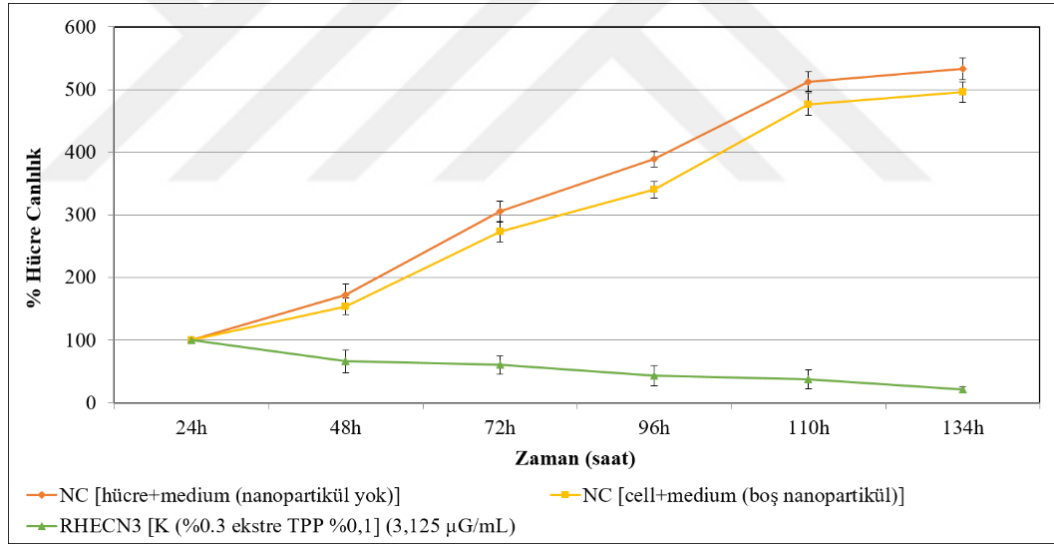


Şekil 3.8. RHECN3 nanopartikülünün MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki zamana bağlı sitotoksik aktivitesi. Her hücre hattı RHECN3 ile 24, 48, 72, 96, 110 ve 134 saat 37°C’de inkübe edilmiş ve MTT testi uygulanmış ve %hücre canlılık hesaplanmıştır.

Aynı nanopartikül MCF-7 hücreleri üzerinde aynı konsantrasyonda (3,125µg/ml), 96. saatten itibaren sitotoksik etki göstermiştir (Şekil 3.9.).



Şekil 3.9. RHECN3 nanopartikülünün MCF-7 hücre hattı üzerindeki zamana bağlı sitotoksik aktivitesi. Her hücre hattı RHECN3 ile 24, 48, 72, 96, 110 ve 134 saat 37°C’de inkübe edilmiş ve MTT testi uygulanmış ve %hücre canlılık hesaplanmıştır.



Şekil 3.10. RHECN3 nanopartikülünün A549 hücre hattı üzerindeki zamana bağlı sitotoksik aktivitesi. Her hücre hattı RHECN3 ile 24, 48, 72, 96, 110 ve 134 saat 37°C’de inkübe edilmiş ve MTT testi uygulanmıştır ve %hücre canlılık hesaplanmıştır.

Tablo 3.8. RHECN3 nanopartikülünün 3 adet tümörojenik ve 1 adet normal hücre hattı üzerindeki, 3,125µg/ml konsantrasyonda tümör hücrelerinin %canlılığına ve zamana bağlı olarak etkisi.

A549	24h	48h	72h	96h	110h	134h
A549	100	65,82(±18,11)	59,89(±14,37)	42,85(±16,49)	37,3(±14,58)	20,83(±4,48)
MDA-MB-231	100	140,36(±46,13)	137,92(±42,39)	120,87(±44,51)	115,32(±42,6)	98,85(±32,5)
MCF-7	100	71,8(±27,57)	69,35(±23,83)	52,31(±25,95)	46,76(±24,04)	30,29(±13,94)
Vero	100	218,0(±26,5)	261,0(±23,6)	448,0(±31,8)	570,0(±45,3)	757,0(±58,4)

Tablo 3.8.'de gösterildiği üzere (RHECN3 (%0,3 ekstre yüklü; en iyi nanopartikül) ile 3,125µG/mL konsantrasyonda A549, MCF-7, MDA-MB-231 ve Vero hücre hatları üzerinde yapılan 24, 48, 72, 96, 110 ve 134 saatlik zamana bağlı sitotoksik aktivite çalışmasında A549 hücre hattında 48. saatten itibaren negatif kontrollere kıyasla sitotoksik aktivite gözlenmiştir.

Zamana bağlı olarak yapılan sitotoksisite deneyleri sonunda doza bağlı çalışmalarda olduğu gibi en hassas hücre hattının A-549 hücre hattı olduğu gözlenmiştir. RHECN3 nanopartikülünün 3,125µG/mL'lik sabit konsantrasyonunda yapılan zamana bağlı sitotoksisite deneylerinde, A-549 hücre hattının 72-96. saatler arasında hücre canlılığının %50'nin altına düştüğü ve 134. saate kadar hücre canlılığının giderek azalarak %20,83'e kadar indiği belirlenmiştir. MCF7 hücre hattında ise yine zamana bağlı olarak hücre canlılığında düzenli bir azalma olduğu saptanmıştır. MCF7 hücre hattında 96-110. saatlerde hücre canlılığının %50'nin altına düştüğü ve 134. saate kadar %30,2 değerine ulaştığı belirlenmiştir. RHECN3 nanopartikülünün MDA-MB-231 hücre hattına olan zamana bağlı sitotoksik aktivitesi incelendiğinde ise diğer 2 hücre hattında (A549, MCF7) farklı olarak sitotoksik aktivitenin zamana bağlı olarak anlamlı değişmediği 134. saatin sonunda bile hücre canlılığının halen %98 oranında olduğu tespit edilmiştir. RHECN3 nanopartikülünün normal hücre hattı canlılığı etkisine bakıldığında ise hücre canlılığının düzenli arttığı hatta 134. saatin sonuna kadar %757,00'ye ulaştığı görülmüştür. Buradan RHECN3 nanopartikülünün normal hücrelere sabit konsantrasyonda (3,125µG/mL) zamana bağlı olarak herhangi bir sitotoksik aktivitesinin olmadığı, hatta hücre proliferasyonunu indükleyen bir aktiviteye sahip olduğu sonucu da çıkarılabilir.

Bu çalışmada ilk olarak katma değeri yüksek ve değerli bir gıda atığı olan pirinç (*Oryza sativa* L.) kabuğundan yüksek basınçlı sıcak su ekstraksiyonu ile pirinç kabuk ekstraktı elde edilmiştir. Elde edilen ekstreler iyonik jelasyon metodu ile enkapsüle edilerek nanopartiküller oluşturulmuştur. Oluşan nanopartiküller çeşitli tümörojenik ve sağlıklı/normal hücreler üzerinde sitotoksik aktivite taramaları yapılmıştır. RHECN3 (%0,3 ekstre) nanopartikülünün A549 hücre hattı üzerinde en yüksek sitotoksik aktivite ($IC_{50}=1,98\mu G/mL$) gösterdiği MTT testi ile belirlenmiştir. Zamana bağlı yapılan sitotoksisite çalışmalarında A549 hücre hattına karşı $3,125\mu G/mL$ konsantrasyonda 72-96. saatler arasında hücre canlılığının %50 nin altına düştüğü ve 134. saate kadar giderek azalarak, 134.saatte %20,38'lere kadar düştüğü bulunmuştur.

Bu çalışma *Oryza sativa* L. kabuğundan yüksek basınçlı sıcak su ekstraksiyonu ile elde edilen protein ekstrelerinin iyonik jelasyon metoduyla enkapsüle edilerek kitosan nanopartiküllerinin elde edilmesi ve bu nanopartiküllerin antitümörojenik aktivitesinin incelenmesinde yapılan ilk çalışmadır. Yapılan literatür incelemelerinde pirinç kabuğu ekstresi yüklü kitosan nanopartiküllerine ve bu nanopartiküllerin antitümörojenik aktivite incelemesine ait hiçbir çalışma bulunmamaktadır.

Diğer yandan farklı kaynaklardan elde edilen ham ekstakt veya saf bileşikler (protein, fenolik maddeler, vb.) çeşitli hücre hatları üzerine sitotoksik çalışmaları mevcuttur. Yapılan bir çalışmada, buğday kabuğundan elde edilen tirisin, normal NIH/3T3 hücresi ile HepG2 (karaciğer karsinoma) ve INS382/12 (rat, pankreatik tumor) kanser hücreleri üzerinde farklı trisin konsantrasyonlarında (7,5, 15 ve $30\mu M$) 12 ve 24 saat süreyle denenmiş ve sonuçta Tirisin'in $7,5\mu M$ konsantrasyonunun güçlü bir sitotoksik etki sergilediği gözlenmiştir. Bu etki normal hücre canlılığı üzerinde gözlenmemiş olup HepG2 ve INS382/12 kanser hücrelerinin canlılığında sırasıyla %74,5 ve %47 şeklinde azalma tespit edilmiştir (Moheb ve diğ., 2013). Bizim yaptığımız çalışmada da benzer şekilde farklı hücre hatları kullanımına rağmen pirinç kabuğu protein ekstresi yüklü kitosan nanopartikülünün (RHECN3) en düşük konsantrasyonunda ($3,125\mu g/ml$) Vero (normal) hücre üzerinde hiçbir etkisi olmadan A549 (insan, akciğer karsinomu) hücresi üzerinde en yüksek sitotoksik etkiyi göstererek hücre canlılığı %41 olarak bulunmuştur.

Tan ve diğerlerinin (2013) yapmış oldukları çalışmada, “Temukut” adı verilen pirinç kepeği, kırık pirinç ve pirinç tohumu karışımından iki farklı ekstraksiyon yolu (su ve metanol kullanarak) ile elde edilen ekstrenin HT-29 (kolon kanseri), Caov-3 (yumurtalık kanseri) ve HepG2 (karaciğer kanseri) kanser hücreleri ile ve BALB/c 3T3 (fare, fibroblast) normal hücre üzerindeki antiproliferatif etki araştırılmıştır. Çalışma sonucunda farklı dozlarda (5-320µG/mL) ekstre ile yapılan MTT analizleri ile IC₅₀ değerleri hesaplanmış ve su ekstraksiyonu ile elde edilen temukut ekstresinin HT-29, Caov-3 ve HepG2 hücreleri üzerindeki IC₅₀ değerleri 72 saatin sonunda sırasıyla, 38,33±6,51, 36,67±5,77 ve 55,30±5,51µG/mL olarak bulunmuştur. HT-29 ve Caov-3 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkinin su ve metanol ekstreleri açısından anlamlı bir fark yaratmadığı rapor edilirken normal hücre hatlarında sitotoksik aktivite gözlenmediği ifade edilmiştir. Bizim yapmış olduğumuz yüksek basınçlı sıcak su ekstraksiyonu metoduyla ekstrakte edilen pirinç kabuğu ekstreleri, kitosan nanopartiküllerine enkapsüle edilerek farklı konsantrasyon aralığında (3,125-100µg/ml) A549, MCF-7, MDA-MB-231 tümörojenik hücreler ve Vero normal hücre üzerinde denenmiş ve MTT analizi ile IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. Çalışma sonucunda A549 ve MCF7 hücrelerinde çok anlamlı sonuçlar bulunmuştur (sırasıyla, IC₅₀=1,98µG/mL ve 3,58µG/mL).

Yuvakkumar ve diğerleri (2014) tarafından yapılan bir çalışmada faz üzerinde NaOH işlemi, pirinç kabuğu külünden elde edilen nanosilikanın saflığı ve partikül ebadı alkalın özütleme-asit çöktürme metodu kullanılarak incelenmiş ve insan meme kanseri hücre hattının (3T3) inhibe etmeye uygun ürünün faz, saflık ve partikül büyüklüğü üzerinde NaOH tedavisine odaklanılmıştır. Çalışma sonucunda, insan meme kanseri hücre hattının (3T3) morfolojisi, hücre stres etkilerinin, hücre canlılığı azalması (yaklaşık olarak %50) ile uyum içinde olan 500 µG/mL silika dozajlarında daha belirgin olduğunu ortaya koymuş ve farklı silika dozajları arasından 10 µG/mL’nin en yüksek olduğu bulunarak çözünmüş oksijen seviyesini artırabilen hücre canlılığı (yaklaşık olarak %70 ± 2), daha yüksek silika dozunda ortaya çıkan toksik etki nedeniyle canlılık neredeyse %27±5’e düşürülmüştür. Farklı iki meme kanser hücre hattı (MCF-7 ve MDA-MB-231) kullanılarak yapmış olduğumuz çalışmada uygulanan pirinç kabuğu ekstresi yüklü nanopartiküllerin ortaya çıkartmış oldukları en yüksek konsantrasyon olan 100µG/mL’de toksik etki nedeniyle hücre canlılıkları MCF-7

üzerinde RHECN1 için %47,81($\pm$ 5,64), RHECN2 için %37,64($\pm$ 4,36) ve RHECN3 için ise %27,88($\pm$ 3,95) olarak ölçülürken, MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde MCF-7 ye kıyasla etkili olmadığı (sırasıyla %112,77($\pm$ 13,30), %88,80($\pm$ 10,30) ve %65,78($\pm$ 9,34)) bulundu. Bu durum iki kanser hücre hattının tepkisinin, sitotoksik etkiden sorumlu olan sinyal yollarındaki farklılıklardan kaynaklanıyor olabileceğini düşündürmektedir. MDA-MB-231 hücre hattı östrojen reseptörünü inhibe etmediği yani östrojen reseptörüne bağlı çalışmadığından nanopartikülün bu hücre hattında sitotoksik etki göstermediği gerçeğinin nanopartikülün etki şeklinde östrojen reseptörü sinyal yolağının gerekli olduğu belirtilmelidir (Eltayeb ve diğ., 2017). Diğer bir deyişle MDA-MB-231 hücre hattı üçlü negatif/reseptör negatif olarak adlandırılır bu durum ER (östrojen reseptörü), PgR (progesteron reseptörü) ve ERBB2 (Tirozin kinaz 2 reseptörü) reseptörlerinin olmaması durumudur. Bu durum başta hormon tedavisi olmak üzere farklı tedavilere karşı dirençlidir. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarının RHECN3 nanopartikülünün sitotoksik etkilerine karşı farklı tepkiler vermelerinin altında yatan olası moleküler mekanizmaların daha fazla araştırılması gerekir (Eltayeb ve diğ., 2017; Cleator ve diğ., 2007).

Kim ve diğerleri (2007), metanolik pirinç kabuğu ekstraktının (MERH) sitotoksik ve antitümör aktivitesini, HT-29 hücre hattı üzerinden araştırmış ve 24 saat sonunda uygulanan MTT testi sonucunda hücre canlılığının %50-70 oranında azaldığı gözlenmiştir. Hücrelerin canlılığı 500 μ G/mL konsantrasyonda %30'a düşmüştür. HT-29 hücreleri IC₅₀=0,5 μ G/mL ile 0,5-500 μ g/ml arasındaki konsantrasyonlarda MERH'e duyarlı olduğu belirtilmiştir. Aktif bir bileşik olan momilakton B, MERH'den silis jeli kromatografisi, Sephadex LH-20 kromatografisi ve HPLC ile izole edilmiştir. Momilakton B'ye 24 saat süre ile farklı dozlarda maruz bırakılan HT-29 ve SW620 hücrelerinde MTT testi sonucunda canlılıklarında %20-50 oranında düşüş gözlenmiştir. Ayrıca Momilakton B'nin kültürlenmiş HT-29 ve SW620 insan kolon kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri, ortama LDH (laktat dehidrogenaz) sızıntısının ölçülmesiyle belirlenmiştir. Buna göre, hücre içi LDH'nin kaybının ve kültür ortamına salınmasının hücre zarı hasarına bağlı olarak geri dönüşümsüz hücre ölümünün bir göstergesi olduğu ortaya konmuş ve hücre ölümün apoptotik olduğu savunulmuştur. Bu hasara bağlı olarak yapılan 72 saat boyunca momilakton B'ye maruz bırakılan hücreler kontrole kıyasla hücre hasarında %20-30

civarında artış tespit edilmiştir. Ayrıca, Momilakton B'nin hücre canlılığı üzerindeki etkileri koloni oluşturan analiz ile belirlenmiş, buna göre Momilactone B'nin, kültür ortamında HT-29 ve SW620 hücrelerine karşı çok toksik olduğu, momilacton B seviyesinin, koloni oluşumunun %50 inhibisyonu (IC_{50}) için 1mM'den az olduğu belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuç momilakton B'nin HT-29 ve SW620 insan kolon kanseri hücrelerinde sitotoksik aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Bizim çalışmalarımızda ise doza bağlı olarak farklı hücre hatları olan A549, MDA-MB-231, MCF7 kanser hücrelerinde ve normal hücre olan Vero hücresi üzerinde yapılan çalışmada 24 saat boyunca RHECN1, RHECN2 ve RHECN3 nanopariküllerine maruz bırakıldı ve en iyi etki 3,125µg/ml konsantrasyonda RHECN3 nanopartikülü için A549 hücre hattında hücre canlılığı $41 \pm 5,82$ olarak belirlendi.

Rajkumar ve diğerleri (2019), gümüş nanopartiküllerini (AgNP'ler), *Zea mays* L. (mısır) tozu özütü kullanılarak biyosentezlemiştir. Ayrıca, AgNP'ler HepG2 kanser hücrelerine karşı güçlü sitotoksikite potansiyeli sergilemiş ve canlılığı kontrole göre AgNP konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak azalmıştır. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde pirinç kabuğu ekstresi ile enkapsüle edilmiş kitosan nanopartikülleri AgNP'ye kıyasla azalan konsantrasyonlarda (3,125µg/ml) yüksek sitotoksik aktivite sergilemiştir.

Natrajan ve diğerlerinin (2015) yaptıkları çalışmada uçucu yağların enkapsülasyonu için bir kitosan-aljinat (CS-AL) nano taşıyıcının geliştirilmesi denenmiştir. Zerdeçal yağı ve limon yağı yüklü nanopartiküllerin antiproliferatif aktivitesi, A549 hücre hatlarında MTT deneyi kullanılarak hesaplanmış ve 0,4mG/mL zerdeçal yağı yüklü CS-AL nanopartikülleri ile muamele edildiğinde, canlılıkta yaklaşık %40 düşüş olduğunu görmüşlerdir. Daha düşük bir konsantrasyonda (0,2mG/mL zerdeçal yağı yüklü nanopartikül) işlem görmüş hücrelerin, canlılıklarında ise %31 oranında düşüş görmüşlerdir. Buna karşılık, aynı konsantrasyonda, limon yağı yüklü nanopartiküllerin, 0,4 ve 0,2mG/mL konsantrasyonları için sırasıyla %20 ve %17 aktiviteye sahip toksik etkiler gösterdiğini bulmuşlardır. Konsantrasyona bağlı hücre canlılığı hem serbest hem de kapsüllenmiş yağda gözlenmiş ve limon otu yağı ile karşılaştırıldığında, zerdeçal yağının etki ettiği hücre canlılığı üzerindeki inhibisyon etkisinin daha yüksek olduğu görülmüştür. Bizim çalışmamızda ise bu durum farklı konsantrasyonlarda pirinç kabuğu protein ekstreleri yüklü kitosan nanopartiküllerinde

(%0,1 ekstre yüklü RHECN1, %0,2 ekstre yüklü RHECN2 ve %0,3 ekstre yüklü RHECN3) yüksüz nanopartiküle kıyasla en iyi sonuç gösteren %0,3 ekstre yüklü RHECN3 nanopartikülü olmuş ve en düşük konsantrasyon uygulamasında (3,125µg/ml) A549 hücre hattı üzerinde %41 canlılıkla en yüksek sitotoksik aktivite sergilemiştir. Yüksüz nanopartikül 3,125µg/ml konsantrasyonda ve aynı hücre üzerinde %107,62 canlılığa sahiptir.

Alothman ve diğerlerinin (2018) yapmış oldukları çalışmada, *Cenchrus ciliaris* L. toplam alkol ve hem havada (toprak üstünde) hem de kök kısımlarının art arda gelen ekstreleri, standart ilaç vinblastin sülfat ile karşılaştırılarak ve akciğer (A-549), bağırsak (Caco), kolon (HCT-116), servikal (Hela), hepatoselüler (HepG2) ve meme (MCF-7) ve prostat (PC3) hücre hatlarına karşı antikanser aktiviteleri için test edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, referans standart ilaç olarak vinblastin sülfata kıyasla listelenen hücre hatlarının büyümesi üzerinde değişken inhibe edici etkisine sahip doğrudan sitotoksik etki sergilemiş; bu etkiler, $11,1 \pm 0,3$ ila $267 \pm \mu\text{G/mL}$ arasında değişen farklı IC_{50} değerleri göstermiştir. Tüm kök ekstreleri, vinblastin sülfatın ($2,93 \pm 0,3 \mu\text{G/mL}$) etkisi ile yakından ilgili olan HepG2 (hepatoselüler karsinoma) ($9 \pm 2,1 \mu\text{G/mL}$) hücre hattı birçok teste karşı en iyi aktiviteyi göstermiştir. *Cenchrus ciliaris* L. hava ekstresi ve kök ekstrelerinin en yüksek antikanser etkisi HepG2 (hepatoselüler karsinom) için kaydedilmiş, IC_{50} değerleri sırasıyla $12 \pm 0,8$ ve $9 \pm 2,1 \mu\text{G/mL}$ dir. CaCo (kolorektal karsinom) hücre hattı üzerindeki IC_{50} değerleri sırasıyla $27,2 \pm 1,6 \mu\text{G/mL}$ ve $20,5 \pm 0,6 \mu\text{G/mL}$, A-549 (akciğer karsinomu) hücre hattı üzerinde IC_{50} değerleri sırasıyla $14,5 \pm 0,7 \mu\text{G/mL}$ ve $11,1 \pm 0,3 \mu\text{G/mL}$ olarak bulunmuştur. Özellikle CaCo (kolorektal karsinoma) ve A-549 (akciğer karsinoma) hücre hattına olan antikanser etkinin standart ilaçtan daha iyi olduğu belirtilmiştir. Hem toprak üstü hem de köklerin kloroform ekstreleri, özellikle kolorektal (CaCo) ve akciğer karsinoma (A549) ile tüm hücre hatları üzerinde en iyi antikanser aktivitesi sergilemiştir. Bizim çalışmamızda ise aynı familyadan (*Poaceae*) *Oryza sativa* L. ile çalışıldı. En iyi sonuçlar RHECN3 nanopartikülü için en düşük konsantrasyonda (3,125µg/ml) A549 için $\text{IC}_{50}=1,98 \mu\text{g/ml}$; MCF-7 için aynı konsantrasyonda $\text{IC}_{50}=3,58 \mu\text{g/ml}$ iken MDA-MB-231 hücre hattı için $\text{IC}_{50} > 100$ olarak bulunmuştur. Bu durumda aynı familyaya ait *Cenchrus ciliaris*'den elde edilen eksterler ve *Oryza sativa* kabuğundan elde edilen ekstre ile yapılan RHECN3 nanopartikülün A549 hücre

hattına karşı yapılmış olan sitotoksik aktivite çalışmalarında Alothman ve diğerlerinin (2018) yapmış olduğu çalışmaya kıyasla bizim çalışmamızın daha etkili olduğu bulunmuştur.

Khelifi ve diğerlerinin (2013) yapmış oldukları çalışmada, *Cynodon dactylon* L.'den ekstreler, petrol eteri, diklorometan, aseton, metanol/su (3:1) ve su, sıralı yöntemlerle elde edilmiş ve elde edilen ekstrelerin antikanser etkileri insan meme adenokarsinom (MCF-7) hücre hattına karşı değerlendirilmiştir ve *C. datcylon* ekstresinin önemli sitotoksik etki gösterdiğini bulmuşlardır. Petrol eteri ile ekstrakte edilen ekstrelerin sitotoksik etkisinin ($IC_{50}=39\text{mG/L}$) test edilen diğer numunelerden daha üstün olduğunu belirtmişlerdir. Aseton ile ekstrakte edilen ekstraktların sitotoksik etkisi $IC_{50}=44\text{mG/L}$ olarak hesaplanmışken diklorometan, su ve metanol ekstrelerinin %75'inin aktif olmadığını bulmuşlardır ($IC_{50}\Rightarrow 100\text{mG/L}$). Bu çalışmada ise yüksek basınçlı sıcak su ekstraksiyonu ile elde edilen pirinç kabuğu ekstresinin enkapsülasyonu ile hazırlanan ve farklı miktarlarda ekstre yüklenen nanopartiküller (RHECN1, RHECN2 ve RHECN3) MCF7 hücre hattına karşı sitotoksik aktivite sergilemiş ve bu sitotoksik etki sırasıyla $87,43\mu\text{G/mL}$, $15,41\mu\text{G/mL}$ ve $3,58\mu\text{G/mL}$ olarak bulunmuştur. Sonuç olarak Khelifi ve diğerlerinin (2013) yapmış olduğu çeşitli ekstraksiyon yöntemleriyle elde ettikleri *Cynodon dactylon* ekstresinin sitotoksik aktivite bulguları ile bizim yapmış olduğumuz çalışmada *Cynodon dactylon* ile aynı familyaya ait olan *Oryza sativa* kabuğunun yüksek basınçlı sıcak su ekstraksiyonu ile elde ettiğimiz ekstrelerin iyonik jelasyon metodu ile enkapsüle edilerek oluşturulan nanopartiküllerin sitotoksik aktivitesi MCF-7 hücre hattına karşı kıyaslanacak olursa yapmış olduğumuz çalışmada RHECN3 nanopartikülünün IC_{50} 'nin $3,58\mu\text{G/mL}$ 'lik değer ile daha yüksek sitotoksik aktivite sergilediğini saptadık.

Liu ve diğerleri (2012), buğday kepeği lipofilik ekstreleri, insan prostat adenokarsinom (PC3) hücrelerinin büyümesine karşı biyoaktivite rehberli fraksiyonlama (HPLC) kullanılarak incelemişlerdir. Doymamış serbest yağ asidi, fitosteroidler ve alkilresorinoller içeren fraksiyonlar yüksek sitotoksik aktivite göstermiştir. Alkilresorsinol fraksiyonunun detaylı araştırması 5-heptadesilresorsinol ($IC_{50}=22,5\mu\text{g/ml}$), 5-(16-heneicosenil)resorsinol (trans) ($IC_{50}=13,7\mu\text{G/mL}$), 5-(14-nonadesenil)resorsinol (trans) ($IC_{50}=42,2\mu\text{G/mL}$) ve 5-(2-oxotricosanil)resorsinol ($IC_{50}=10,9\mu\text{G/mL}$) içeren PC3 hücrelerinin büyümesine karşı güçlü inhibe edici

özelliklere sahip olan yedi saf bileşik izole etmişlerdir. Aktif alkilresorsinollerin, buğday kepeğinde küçük bileşenler olduğu bulunmuş ve kanser hücreleri üzerinde pozitif kontrol klorambusilden ($IC_{50}=58,7\mu\text{G/mL}$) daha yüksek sitotoksik etkiler göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz ekstraktlarla yüklü nanopartiküller ve farklı hücre hatları ile yapılan MTT analizinde bulunan sonuçlar RHECN1 için A549 hücre hattında $IC_{50}=25,22\mu\text{G/mL}$, RHECN2 için $IC_{50}=4,33\mu\text{G/mL}$, RHECN3 için $IC_{50}=1,98\mu\text{G/mL}$ olarak elde edildi ve en yüksek sitotoksik etki RHECN3 nanopartikülünde sergilenmiştir. Bu sonuçlara göre, Liu ve diğerlerinin (2012) yapmış olduğu çalışma prostat kanser hücre hattı üzerinde etkili olurken, bizim çalışmamızda akciğer kanser hücre hattı üzerinde etkili olmuştur.

Parduman ve diğerleri (2009), limon otu çeşidi olan *Cymbopogon flexuosus*'un esansiyel yağı on iki insan kanser hücre hatlarına (kolon, HT-29, HCT-15, SW-620 ve 502713; akciğer, A549, HOP-62 ve H-226; serviks, SiHa; oral/ağız, KB; prostat, DU-145; promiyelositik lösemi, HL-60; nöroblastoma, IMR-32 ve karaciğer, HepG2) karşı *in vitro* sitotoksitesi için incelemişlerdir. *In vitro* sitotoksite çalışmaları, çeşitli insan kanser hücre hatlarına karşı doza bağlı etkiler göstermiş ve yağın IC_{50} değerleri hücre hattına bağlı olarak 4,2 ile $79\mu\text{G/mL}$ arasında değişmiştir. 502713 (kolon) ve IMR-32 (nöroblastom) hücre hatlarında, yağın sırasıyla IC_{50} değerleri 4,2 ve $4,7\mu\text{G/mL}$ olan en yüksek sitotoksite göstermiştir. Yağın periton içi uygulaması, Ehrlich ve Sarcoma-180 tümörlerinin hem asit hem de katı formlarını doza bağlı olarak önemli ölçüde inhibe etmiştir. Ehrlich Ascites karsinomasının hem asit hem de katı tümör formlarında gözlenen yağın 200mg/kg 'da (i.p.) tümör büyümesi inhibisyonu sırasıyla %97,34 ve %57,83'tür. Sarcoma-180'de benzer bir yağ dozunda büyüme inhibisyonu, asit ve katı formlarda sırasıyla %94,07 ve %36,97'dir. Yağla muamele edilmiş HL-60 hücrelerinin morfolojik çalışmaları, yüzey çıkıntılarının kaybını, kromatin yoğunlaşmasını ve apoptozisi ortaya çıkarmıştır. Mitokondri apoptoz geçiren hücrelerde belirgin krista kaybı göstermiştir. Yağ ile muamele edilmiş hayvanlardan alınan Sarcoma-180 solid tümör hücrelerinin morfolojik çalışmaları, apoptozisin tipik çekirdek yoğunlaşmasını ve parçalanmasını ortaya koymuştur. Yağ ile muamele edilmiş hayvanlardan elde edilen asit (acites) hücrelerinin morfolojik çalışmaları da apoptozisin tipik değişimlerini ortaya koymuştur. Sonuçta, yağın ümit verici bir antikanser aktivitesine sahip olduğu ve elektron mikroskobu ile tanımlandığı şekilde

apoptotik işlemi aktive ederek tümör hücresinin yaşayabilirliğinde kayba neden olduğu gösterilmiştir. Bizim yapmış olduğumuz *in vitro* çalışmalar sonucunda A549 hücre hattına karşı RHECN3 nanopartikülü IC₅₀ 1,98µG/mL lik değer ile Parduman ve diğerlerinin (2009) elde etmiş olduğu sitotoksik aktiviteden daha yüksektir.

Thangam ve diğerlerinin (2014) gerçekleştirmiş olduğu çalışmada, sıcak su dekoksiyonu kullanarak sıcak suda çözünür polisakkaritlerin (HWSP'ler) *Cymbopogon citratus*'tan ekstraksiyonu yapılmıştır ve elde edilen ekstratlar normal hücre olan HBL-100 ve HeLa, SiHa, PC3, LNCap, MDA-MB-231 ve MCF7 kanser hücre hatları üzerinde yapılan 24, 48 ve 72 saat boyunca 50-1000µG/mL konsantrasyon aralığında inkübasyon sonrası hücrelerin çoğalmasına karşı inhibisyon yüzdesi belirlemiş ve hücre canlılığı % değer olarak 24, 48 ve 72 saat boyunca belirlenmiştir. HWSPS'lerin zamana bağlı sitotoksik aktivitesinin artan konsantrasyona bağlı olarak artmakta olduğu bulunmuş ve MDA-MB-231 hücre hattına karşı 24, 48 ve 72. saatte elde edilen IC₅₀ değerleri sırasıyla, 450±0,87µG/mL, 400±0,51µG/mL ve 250±0,19µG/mL olarak, MCF7 hücre hattına karşı sırasıyla 300±0,97µG/mL, 250±0,25µg/ml ve 200±0,61µg/ml olarak bulunmuştur. Bizim çalışmamızda ise doza bağlı olarak seçilen en iyi nanopartikül olan RHECN3 nanopartikülü 24, 48, 72, 96, 110 ve 134 saat aralığında zamana bağlı olarak yapılan çalışmada MDA-MB-231 hücre hattına karşı % hücre canlılığı MTT analizi ile belirlenmiş ve zamana bağlı olarak sırasıyla %140,36(±46,13), %137,92(±42,39), %120,87(±44,51), %115,32(±42,60) ve %98.85(±32,50) olarak bulunmasına rağmen bu değerler MCF-7 hattına karşı sırasıyla, %71,80(±27,57), %69,35(±28,83), %52,31(±25,95), %46,76(±24,04) ve %30,29(±13,94) olarak bulundu. Bu değerler, Thangam ve diğerlerinin (2014) *C. citratus* ekstresi ile yapmış oldukları 24, 48 ve 72 saatlik çalışmada elde ettikleri sonuçlardan sitotoksik aktivite açısından daha etkili olduğunu kanıtlar niteliktedir.

Aynı grup tarafından yapılan bir diğer çalışmada, bizim yaptığımız çalışmada kullandığımız ham madde olan *Oryza sativa* L. ile aynı familyadan olan *C. citratus* kaynaklı polisakkaritler ekstre edilmiş ve sonrasında anyon değişimi ve jel filtrasyon kromatografisi ile fraksiyonlanmıştır. F1 ve F2 gibi iki farklı polisakkarit fraksiyonu elde edilmiş ve bu fraksiyonların, moleküler ağırlık ve şeker içerikleri ile karakterize edilen farklı asidik polisakkaritlere sahip olduğu bulunmuştur. Bu polisakkarit

fraksiyonları F1 ve F2 kullanılarak, antienflamatuar ve antikanser aktiviteleri, *in vitro* kanser hücrelerine karşı değerlendirilmiş ve polisakkaritlerin, kanser hücrelerinde apoptozun intrinsik yolla apoptozu indüklemesindeki etki mekanizması önerilmiştir. SiHa ve LNCap gibi iki farklı üreme kanseri hücresi, sitotoksikite, apoptozun ve apoptotik DNA fragmentasyonunun indüklenmesi, mitokondriyal membran potansiyelindeki değişiklikler ve polisakkarit fraksiyonları ile hücrelerin tedavisine cevap olarak gen ve protein ekspresyonunun profilleri üzerine *in vitro* çalışmalar için kullanılmıştır. Bu polisakkarit fraksiyonları, karsinoma hücreleri üzerinde potansiyel sitotoksik ve apoptotik etkiler sergilemiş, bu fraksiyonların sitotoksik etkisi MTT testi ile zamana bağlı olarak hesaplanmış ve 48.saatın sonunda SiHa hücre hattı için F1'de $300 \pm 0,64 \mu\text{G/mL}$, F2'de ise $450 \pm 0,41 \mu\text{G/mL}$ bulunurken LNCap hücrelerine karşı F1 $200 \pm 0,37 \mu\text{G/mL}$, F2 $250 \pm 0,89 \mu\text{G/mL}$ olarak bulunmuştur. Ayrıca kaspaz 3'ün yukarı regülasyonu, bcl-2 familyası genlerinin aşağı regülasyonu, ardından sitokrom c salımı olayları yoluyla bu hücrelerde apoptozu indükledikleri sonucuna varmışlardır. Bizim çalışmamızda ise RHECN3 nanopartikülü 48.saatın sonunda MDA-MB-231 hücre hattına karşı $>100 \mu\text{g/mL}$, MCF-7 hücre hattına karşı $3,58 \mu\text{g/mL}$ hesaplanmış fakat en iyi sonuç A549 hücre hattına karşı $1,98 \mu\text{g/mL}$ olarak elde edilmiştir. Çalışmalarımız sonucunda elde etmiş olduğumuz nanopartikülün ham maddesi *Oryza sativa* L. dir. *Oryza sativa* içeriğinde bulunan ferulik asit, α -orzanol, fitik asit, p-kumarik asit, pektin, trisin ve tocotrienol-tokoferoller gibi pirinç kepeğinde bulunan sayısız biyoaktif bileşiğin, apoptozun indüklenmesinden sorumlu olduğuna inanılmaktadır (Tan ve diğ., 2017). α -tocotrienol ile indüklenen apoptoz, Hep3B hücrelerinde, kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9 aktiviteleri yoluyla Bax ve Bid'in katılımıyla da gösterilmiştir (Kannappan ve diğ., 2010). Bir diğer vitamin E izomeri α -tocotrienol dönüştürücü büyüme faktörü- β , Fas ve c-Jun N-terminal kinaz (JNK) sinyal yollarının katılımıyla insan meme kanserinde apoptozu indüklediği Ahn ve diğerleri (2007) tarafından kanıtlanmıştır. Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz nanopartiküllerin hücreler üzerinde sitotoksikiteden sorumlu mekanizmanın apoptoz olabileceği düşünülmektedir. Dolayısıyla, bu nanopartikülün hücreler üzerindeki sitotoksik etkisindeki apoptoz mekanizmasının rolü daha fazla araştırılmalıdır.

El Mola ve diğerleri (2015), dört insan kanseri (HeLa, HepG2, HCT-116 ve MCF7) hücre hattına karşı sitotoksikitesini hesaplamak için Sülförödamın B testi kullanmışlar

ve *Echinochloa crus-galli* (L.)'nin etanolik ekstresinin (%70) en çok HCT-116 ve HeLa hücre hatlarına karşı aktif olduğu kanıtlamışlardır (sırasıyla $IC_{50}=11,2\pm0,11$ ve $12,0\pm0,11\mu\text{g/ml}$). Kloroform ve etil asetat fraksiyonları, HCT-116 hücre hatlarına karşı en yüksek aktivitelerini sergilemiştir. Kloroform ve etil asetat fraksiyonları saf fenolik bileşikler (1-8) elde etmek için birkaç kromatografik ayırmaya tabi tutulmuştur. 1-8 bileşikleri; 5,7-dihidroksi-3', 4', 5'-trimetoksi flavon, 5,7,4'-trihidroksi-3', 5'-dimetoksi flavon (trisin), kersetin, flavon apigenin-8-C-sophorosit, 2-metoksi-4-hidroksi sinamik asit, p-kumarik asit ve kersetin-3-O-glukozit şeklinde tanımlamışlardır. İzole edilen tüm fenolik bileşikler, antikanser ilacı doxorubisin ile karşılaştırılabilir şekilde, metoksile edilmiş flavonların (1 ve 2) en aktif olduğu dört insan karsinomuna karşı çeşitli önemli aktiviteler sergilemiştir. Bu nedenle, bu metoksile edilmiş flavonoidler, *E. crus-galli* geleneksel kullanımının önceki iddialarını destekleyen kanser tedavisi için kurşun bileşikler olarak kabul edilebileceği sonucuna varmışlar ve fenolik bileşiklerin *E. crus-galli*'deki oluşumunu ilk kez rapor etmişlerdir. Bizim çalışmamızda elde edilen nanopartiküller üç insan kanser hattına (A549, MCF-7, MDA-MB-231) ve bir normal (Vero) hücre hattına karşı MTT analizi ile elde edilen sitotoksik aktivite sonuçlarında El molla ve diğerleri (2015) tarafından MCF-7 hücre hattı üzerinde denenen 1. ve 2. metoksile edilmiş flavonlar için etkili sonuçlara rastlanmamasına rağmen bizim çalışmamızda en iyi sonucu RHECN3 nanopartikülünde ve $IC_{50}=3,58\mu\text{g/mL}$ lik değer ile daha yüksek sitotoksik aktivite sergilediğini bulduk.

Cheng ve diğerlerinin (2016) yaptığı çalışmada, suda çözünür bir polisakarit (BP-1), yayla arpasından (*Hordeum vulgare* L.) sıcak su ekstraksiyonu ve sefaroze kolon kromatografisinin saflaştırılması ile elde edilmiştir. BP-1, yaklaşık $6,7\times10^4\text{Da}$ 'lık bir ortalama molekül ağırlığına ve göreceli 8,82:1,92:1,50:1,00 molar oranlar ile glukoz (Glc), ksiloz (Xyl), arabinoz (Ara) ve ramnoz (Rha)'dan oluşmuştur. BP-1'in, 48 saat $48,18\mu\text{g/ml}$ 'de yarı maksimum inhibisyon konsantrasyonu ile zaman ve doza bağlı bir şekilde insan kolon kanseri hücrelerinin (HT-29) çoğalmasını inhibe ettiği bulunmuştur. Western blot sonuçları, BP-1'in, c-Jun N-terminal kinazın (JNK) fosforilasyonunu arttırdığını, reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuyla ilişkili süreçleri ve sitoplazmadan çekirdeğe nükleer faktör- κB (NF- κB) translokasyonunu inhibe ettiğini göstermiştir. Ayrıca BP-1 kaynaklı apoptoz, B hücreli lenfoma-2 (Bcl-

2) gibi apoptozla ilişkili proteinlerin düzenlenmesi, mitokondriden sitoplazmaya sitokrom C salınması ve kaspaz-8 ve kaspaz-9 aktivasyonu ile ilgili olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda BP-1 kaynaklı HT-29 apoptozun ROS-JNK ve NF- κ B aracılı kaspaz yolları yoluyla ortaya çıktığı gösterilmektedir. Bizim çalışmamızda farklı hücre hatları kullanılmış olsa da yüksek basınçlı sıcak su ekstraksiyon metodu ile elde ettiğimiz *Oryza sativa* L. kabuğu protein ekstresi yüklü RHECN3 nanopartikülünün A549 hücre hattına karşı 48 saat 1,98 μ g/ml’de yarı maksimum inhibisyon konsantrasyonu ile zamana ve doza bağlı olarak inhibe ettiği bulundu.



SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada yüksek basınçlı sıcak su ekstraksiyonu ile elde edilen *Oryza sativa* L. kabuğu protein ekstresi, farklı yükleme oranları ile enkapsüle edilerek kitosan nanopartikülleri elde edilmiş ve hem doza bağlı olarak hem de zamana bağlı olarak 3 tümörojenik (A-549, MCF-7 ve MDA-MB-231), 1 normal (Vero) hücre hattına karşı sitotoksik aktivite değerleri belirlenmiştir.

Sitotoksik aktivite testi sonucunda yüksek basınçlı sıcak su ekstraksiyonu ile elde edilip *Oryza sativa* L. kabuğunun protein ekstresi yüklü kitosan nanopartikülleri arasında en iyi sonucu RHECN3 nanopartikülü 3,125µg/ml konsantrasyonda ve A549 hücre hattına karşı en yüksek sitotoksik aktivite $IC_{50}=1,98\mu G/mL$ olarak hesaplandı.

Tüm bu çalışmalar sonucunda yüksek basınçlı sıcak su ekstraksiyonu ile elde edilen pirinç kabuğu protein ekstresi yüklü kitosan nanopartikülünün, çeşitli kanser hücrelerinin çoğalmasına karşı olan bu çalışma ilk kez yapılmış ve A549 hücre hattına olan yüksek sitotoksik aktivite nedeniyle bu nanopartikül akciğer kanseri tedavisinde biyoyararlanımı yüksek bir terapötik ilaç olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

- Adom K. K., Liu R. H., Antioxidant Activity of Grains, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, **50**, 6182–6187.
- Adylov G. T., Faiziev Sh. A., Paizullakhanov M. S., Mukhsimov S., Nodirmatov E., Silicon Carbide Materials Obtained from Rice Husk, *Technical Physics Letters*, 2003, **29**(3), 221-223.
- Agnihotri S. A., Mallikarjuna N. N., Aminabhavi T. M., Recent Advances on Chitosan- Based Micro and Nanoparticles in Drug Delivery, *Journal of Controlled Release*, 2004, **100**(1), 5– 28.
- Aguilar-Garcia C., Gavino G., Baragano-Mosqueda M., Hevia P., Gavino V., Correlation of Tocopherol, Tocotrienol, C-Oryzanol and Total Polyphenol Content in Rice Bran with Different Antioxidant Capacity Assays, *Food Chemistry*, 2002, **102**, 1228– 1232.
- Allothman E. A., Awaad A. S., Al-Qurayn N. A., Al-Kanhal H. F., El-Meligy R. M., Zain Y. M., Alasmary F. A., Alqasoumi S. I., Anticancer Effect of *Cenchrus ciliaris* L., *Saudi Pharmaceutical Journal*, **26**(7), 952-955.
- Argolo A. C. C., Sant-Ana A. E. G., Pletsch M., Coelho L. C. B. B., Antioxidant Activity of Leaf Extracts from *Bauhinia monandra*, *Bioresource Technology*, 2004, **95**, 229–233.
- Asamarai A. M., Addis P. B., Epley R. J., Krick T. P., Wild Rice Hull Antioxidants, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 1996, **44**, 126–130.
- Awarenet, *Handbook for The Prevention and Minimization of Waste and Valorization of by-Products in European Agro-food Industries*, Deposito, LegalBI-223-04, 2004.
- Bakan J. A., Microencapsulation, *The theory and practice of industrial pharmacy*, 3rd ed., Part III Varghese Publishing House, Bombay, 1991.
- Beagle E. C., Rice-husk Conversion to Energy, *FAO Agricultural Service Bulletein*, **31**, 175-180.
- Beer M. U., Wood, P. J., Weisz J., Molecular Weight Distribution and (1→3) (1→4)- β -d Glucan Content of Consecutive Extracts of Various Oat and Barley Cultivars, *Cereal Chemistry*, 1997, **74**(4), 476-480.
- Bhutia S. K, Maiti T. K., Targeting Tumors with Peptides from Natural Sources, *Trends Biotechnology*, 2008, **26**, 210–217.
- Bowadt S., Hawthorne S. B., Super Critical Fluid Extraction in Environmental Analysis, *Journal of Chromatography A*, 1995, **703**, 549-571.
- Brouder S. M., Hill J. E., Winter Flooding of Ricelands Provides Waterfowl Habitat, *California Agriculture*, 1995, **49**, 58–64.

Butsat S., Siriamornpun S., Antioxidant Capacities and Phenolic Compounds of The Husk, Bran and Endosperm of Thai Rice, *Food Chemistry*, 2010, **119**, 606–613.

Calvo P., Remunan-Lopez C., Vila-Jata J. L., Alonso M. J., Chitosan and Chitosan: Ethylene Oxide- Propylene Oxide Block Copolymer Nanoparticles as Novel Carriers for Protein and Vaccines, *Pharmaceutical Research*, 1997, **14**, 1431– 143.

Çam M., Işıl Y., Basınçlı Solvent Ekstraksiyonu ve Uygulamaları, *Teknolojik Araştırmalar GTED*, 2006, **3**, 79-86.

Chakrabarti M., Virkar A. N., Maiti H. S., Formation of Forsterite Using Rice Husk Ash for High Frequency Isolation, *Transactions of the Indian Ceramic Society*, 1984, **44**(1), 1-9.

Chen H., Siebenmorgen T. J., Griffin K., Quality Characteristics of Long- Grain Rice Milled in Two Commercial Systems, *Cereal Chemistry*, 1998, **75**, 560–565.

Cheng D., Zhang X., Meng M., Han L., Li C., Hou L., Qi W., Wang C., Inhibitory Effect on HT-29 Colon Cancer Cells of A Water-Soluble Polysaccharide Obtained from Highland Barley, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, **92**, 88-95.

Chienthavorn O., Insuan W., Superheated Water Extraction of Lime Peel: a Comparison with Conventional Methods, *Analytical Letter*, 2004, **37**(11), 2393-2409.

Couvreux P., Dubernet C., Puisieux F., Controlled Drug Delivery with Nanoparticles: Current Possibilities and Future Trends, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 1995, **41**, 2–13.

Dai Q., Chung K. H., Hot Water Extraction Process Mechanism Using Model Oil Sands, *Fuel*, 1996, **75**(2), 220-226.

Dai Q., Chung K. H., Hot Water Extraction Process Mechanism Using Model Oil Sands, *Fuel*, 1996, **75**(2), 220-226.

Danielski L., Zetzel C., Hense H., Brunner, G. A., Process Line for The Production of Refined Rice Oil from Rice Bran, *Journal of Supercritical Fluids*, 2005, **34**, 133-141.

Deiana C., Granados D., Venturini R., Amaya A., Sergio M. I., Tancredi N., Activated Carbons Obtained from Rice Husk: Influence of Leaching on Textural Parameters, *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 2008, **47**, 4754-4757.

Devi R. R. and Arumugham C., Antiradical Efficacy of Phytochemical Extracts from Defatted Rice Bran, *Food and Chemistry Toxicology*, 2007, **45**, 2014–2021.

Dube A., Ken N., Nicolazzo J. A., Ian L., Effective Use of Reducing Agents and Nanoparticle Encapsulation in Stabilizing Catechins in Alkaline Solution, *Food Chemistry*, 2010, **122**(3), 662– 667.

El-Molla S. G., Motaal A. A., Hefnawy H. E., Fishawy A. E., Cytotoxic Activity of

Phenolic Constituents from *Echinochola crus-galli* Against Four Human Cancer Cell Lines, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2015, **26**, 62-67.

Farooque K. N., Zaman M., Halim E., Islam S., Hossain M., Mollah Y. A., Mahmood A. J., Characterization and Utilization of Rice Husk Ash (RHA) from Rice Mill of Bangladesh, *Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research*, 2009, **44**(2), 157-162.

Ferreira I., Rocha S., Coelho M., Encapsulation of Antioxidants by Spray-drying, *Chemical Engineering Transactions*, 2007, **11**(9), 713–717.

Ghasemi K., Ghasemi Y., Ebrahimzadeh M., Antioxidant Activity, Phenol and Flavonoid Contents of 13 *Citrus* Species Peels and Tissues, *Pakistan Journal of Pharmaceutical Science*, 2009, **22**, 277–281.

Ghosh P. K., Hydrophilic Polymeric Nanoparticles as Drug Carriers, *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 2000, **37**, 273-282.

Gök M., Rozendaal L., Berkhof J., Visser O., Meijer C. J. L. M., van Kemenade F. J., Cytology History Preceding Cervical Cancer Diagnosis: A Regional Analysis of 286 Cases, *British Journal of Cancer*, 2011, **104**, 685–692.

Gomes A. C., Mohsen M., Bachmann M. F., Harnessing Nanoparticles for Immunomodulation and Vaccines, *Vaccines*, 2017, **5**(6), 2-15.

Gottesman M. M., Mechanism of Cancer Drug Resistance, *Annual Review of Medicine*, 2002, **53**, 615–627.

Graff R. A., Brandes S. D., Modification of Coal by Subcritical Steam: Pyrolysis and Extraction Yields, *Energy Fuels*, 1987, **1**(1), 84-88.

Hawkins M. J., Friedman M. A., National Cancer Institute's Evaluation of Unconventional Cancer Treatments, *Journal of the National Cancer Institute*, 1992, **84**(22), 1699-1702.

Hawthorne S. B., Riekkola M. L., Screnius K., Holm Y., Hiltunen R., Hartonen, K., Comparison of Hydrodistillation and Supercritical Fluid Extraction for The Determination of Essential Oils in Aromatic Plants, *Journal of Chromatography A*, 1993, **634**(2), 297-308.

Helm R. M., Burks A. W., Hypoallergenicity of Rice Bran Protein. *Cereal Foods World*, 1996, **41**, 839–843.

Hendra R., Ahmad S., Sukari A., Shukor M. Y., Oskoueian E., Flavonoid analyses and antimicrobial activity of various parts of *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl Fruit. *International Journal of Molecular Science*, 2011, **12**, 3422–3431.

Heyang J., Fei X., Cuilan J., Yaping Z., Lin H., Nanoencapsulation of Lutein with Hydroxypropylmethyl Cellulose Phthalate by Supercritical Antisolvent, *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 2009, **17**(4), 672–677.

- Huang H., Gao A., Wang H., Ye H., Influence of Rice Husk Ash on Strength and Permeability of Ultra-High Performance Concentrate, *Constriction and Building Materials*, 2017, **149**, 621-628.
- Hughes G. A., Nanostructure-mediated Drug Delivery, *Nanomedicine in Cancer*, 2017, **1**(1), 22–30.
- Jain R. A., The Manufacturing Techniques of Various Drug Loaded Biodegradable Poly (lactidecoglycolide) Devices, *Biomaterials*, 2000, **21**, 2475-2490.
- Jeon K. I., Park E., Park H. R., Jeon Y. J., Cha S. H., Lee S. C., Antioxidant activity of Far-Infrared Radiated Rice Hull Extracts on Reactive Oxygen Species Scavenging and Oxidative DNA Damage in Human Lymphocytes, *Journal of Medicinal Food*, 2006, **9**(1), 42-48.
- Jong W. H. D., Borm P. J. A., Drug Delivery and Nanoparticles: Applications and Hazards, *International Journal of Nanomedicine*, 2008, **3**(2), 133-149.
- Jordan M. A., Wilson L., Microtubules as A Target for Anticancer Drugs. *Nature*, 2004, **4**, 253–265.
- Kahkonen M. P., Hopia A. I., Vuorela H. J., Raucha J. P., Pihlaja K., Kujala T. S., Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999, **47**, 3954–3962.
- Karimi E., Jaafar H., Ahmad S., Antifungal, Anti-inflammatory and Cytotoxicity Activities of Three Varieties of *Labisia pumila* Benth: From Microwave Obtained Extracts, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2013, **13**(20), 1–10.
- Karimi E., Jaafar H., Ahmad S., Phytochemical Analysis and Antimicrobial Activities of Methanolic Extracts of Leaf, Stem and Root from Different Varieties of *Labisia pumila* Benth. *Molecules*, 2011, **16**, 4438–4450.
- Karimi E., Mehrabonjoubani P., Keshavarzian M., Oskoueian E., Jaafara H. Z. E., Abdolzadeh A., Identification and Qualification of Phenolic and Flavonoid Components in Straw and Seed Husk of Some Rice Varieties (*Oryza sativa* L.) and Their Antioxidant Properties, *Journal of The Science of Food and Agriculture*, 2014, **94**, 2324-2330.
- Katyama M., Yoshimi N., Yamada Y., Sakata K., Kuno T., Yoshida K., Qiao Z., Vihn P. Q., Iwasaki T., Kobayashi H., Mori H., Preventive Effect of Fermented Brown Rice and Rice Bran against Colon Carcinogenesis in Male F344 Rats. *Oncology Report*, 2002, **9**, 817-822.
- Kawamura Y., Muramoto M., Anti-tumorigenic and Immunoactive Protein and Peptide Factors in Foodstuff. 2. Antitumorigenic Factors in Rice bran, *Food and Cancer Prevention*, 1993, 331-401.
- Kawashima Y., Nanoparticulate System for Improved Drug Delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001, **47**, 1–2.

Khan W. A., Irfan M., Khan M., Alshomrani A. S., Alzahrani A. K., Alghamdi M. S., Impact of Chemical Process on Magneto Nanoparticle for the Generalized Burgers Fluid, *Journal of Molecular Liquids*, 2017, **234**, 201-208.

Khawla A. A. I., Garcia-Contreras L., Lu R. D., Selection of Better Method for The Preparation of Microspheres by Applying Hierarchy Process, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1996, **85**, 144-149.

Khelifi D., Hayounu E. A., Valentin A., Cazaux S., Moukarzel B., Hamdi M., Bouajila J., LC-MS Analysis, Anticancer, Antioxidant and Antimalarial Activities of *Cynodon dactylon* L. Extracts, *Industrial Crops and Products*, 2013, **45**, 240-247.

Kim S. J., Park H. R., Park E., Lee S. C., Cytotoxic and Antitumor Activity of Momilactone B from Rice Hulls, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 2007, **55**, 1702-1706.

Komatsuzaki N., Tsukahara K., Toyoshima H., Suzuki T., Shimizu N., and Kimura T., Effect of soaking and gaseous treatment on GABA content in germinated brown rice. *J. Food Eng.*, 2007, **78**, 556–560.

Kreuter J., Nefzger M., Liehl E., Czok R., Voges R., Distribution and Elimination of Poly (methyl methacrylate) Nanoparticles after Subcutaneous Administration to Rats, *Journal of Pharmaceutical Science*, 1983, **72**(10), 1146-1149.

Krishnarao R. V., Godkhindi M. M., Distribution of Silika in Rice Husks and Its Effect on The Formation of Silicone Carbide, *Ceramics international*, 1992, **18**(4), 185-191.

Lakkis J. M., *Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems*, 2nd ed., Willey Blackwell, Barcelona, Spain, 2007.

Lamberts L., De Bie E., Vandeputte G. E., Veraverbeke W. S., Derycke V., De Man W., Delcour J. A., Effect of Milling on Colour and Nutritional Properties of Rice, *Food Chemistry*, 2007, **100**, 1496–1503.

Lee S. C., Kim J. H., Jeong S. M., Kim D. R., Ha J. U., Nam K. C., Ahn D. U., Effect of Far- infrared Radiation on The Antioxidant Activity of Rice Hulls, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 2003, **51**, 4400-4403.

Lehtomaki A., Huttunen S., Rintala J. A., Laboratory investigations on Co-digestion of Energy Crops and Crop Residues with Cow Manure for Methane Production: Effect of Crop to Manure Ratio, *Resources, Conservation and Recycling*, 2007, **51**(3), 591-609.

Leong W. F., Lai O. M., Long K., Yaakob B., Mana C., Misran M., Tan C. P., Preparation and Characterization of Water-soluble Phytosterol Nanodispersions, *Food Chemistry*, 2011, **129**(1), 77– 83.

Liu L., Winter K M., Stevenson L., Morris C., Leach D. N., Wheat Bran Lipophylic Compounds with *in vitro* Anticancer Effects, *Food Chemistry*, 2012, **130**(1), 156-164.

Liu R. H., Whole Grain Phytochemicals and Health, *Journal of Cereal Science*, 2007, **46**, 207- 219.

Lopez A., Gavara R., Lagaron J., Bioactive Packaging: Turning Foods into Healthier Foods through Biomaterials, *Trends in Food Science and Technology*, 2006, **17**(10), 567–575.

Lou X., Janssen H. G., Cramers C. A., Temperature and Pressure Effects on Solubility in Supercritical Carbon Dioxide and Retention in Supercritical Fluid Chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1997, **785**, 57-64.

Luh B. S., Rice Production, Editor: Luh B. S., *Rice Utilization Vol.II*, 2nd ed., AVI Book, Van Nostrand Reinhold, New York, 1-8, 1991.

Margel S., Wiesel E., Acrolein Polymerization: Monodisperse, Homo and Hybrid Microspheres, *Journal of Polymer Science*, 1984, **22**, 145-148.

Martinez J. D., Parker M. T., Fultz K. E., Ignatenko A. N., Gerner E. W., Molecular Biology of Cancer, Editor: Abrham D. J., *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*, 1st ed., 1–50, 2003.

Matori K. A., Haslinawati M. M., Wahab Z. A., Sidek H. A. A., Ban T. K., Ghani W. A. W. A. K., Producing Amorphous White Silica from Rice Husk, *MASAUM Journal of Basic and Applied Sciences*, 2009, **1**(3), 512-515.

Mazlum F., Pirinç Kabuğu Külünün Puzzolanik Özellikleri ve Külün Çimento Harcının Dayanıklılığına Etkisi, Doktora Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 1989, 14096.

Miller A., Engel K. H., Content of C-Oryzanol and Composition of Steryl Ferulates in Brown Rice (*Oryza sativa* L.) of European Origin, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, **54**, 8127–8133.

Min B., Chen M. H., Green B. W., Antioxidant Activities of Purple Rice Bran Extract and Its Effect on The Quality of Low-NaCl, Phosphate Free Patties Made from Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) Belly Flap Meat, *Journal of Food Science*, 2009, **74**, 268–277.

Mishra D. K., Ashish J. K., Prateek J. K., A Review on Various Techniques of Microencapsulation, *International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences*, 2013, **2**(2), 962-977.

Moheb, A., Grondin M., Ibrahim R. K., Roy R., Sarhan F., Winter Wheat Hull (husk) is a Valuable Source for Tricin, A Potential Selective Cytotoxic Agent, *Food Chemistry*, 2013, **138**, 931-937.

Moure A., Cruz J. M., Franco D., Dominguez J. M., Sineiro J., Dominguez H., Nunez M. J., Parajo J. C., Natural Antioxidants from Residual Sources, *Food Chemistry*, **72**(2), 145-171.

- Mozafari M. R., Flanagan J., Matia-Merino L., Awati A., Omri A., Suntres Z. E., Singh H., Recent Trends in The Lipid Based Nanoencapsulation of Antioxidants and Their Role in Foods, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2006, **86**(13), 2038– 2045.
- Mustafa A., Turner C., Pressurized Liquid Extraction as A Green Approach in Food and Herbal Plant Extraction: A Review, *Analytica Chimica Acta*, 2011, **703**, 8-18.
- Mustafa A., Turner C., Pressurized Liquid Extraction as A Green approach in Food and Herbal Plants Extraction: A Review, *Analytica Chimica Acta*, 2011, **70**(1), 8-18.
- Nagavarma B. V. N., Hemant K. S. Y., Ayaz A., Vasudha L. S., Shivakumar H. G., Different Techniques for Preparation of Polymeric Nanoparticles: A Review, *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 2012, **5**(3), 16-23.
- Nair L. S., Laurencin C. T., Biodegradable Polymers as Biomaterials, *Progress in Polymer Science*, 2007, **32**, 762–798.
- Nakajima T., Kanda T., Fukuda T., Takanashi H., Ohki A., Characterization of Eluent by Hot Water Extraction of Coals in Terms of Total Organic Carbon and Environmental Impacts, *Fuel*, 2005, **84**, 783-789.
- Nam S. H., Choi S. P., Kang M. Y., Kozukue N., Friedman M., Antioxidative, Antimutagenic, and Anticarcinogenic Activities of Rice Bran Extracts in Chemical and Cell Assays, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, **53**, 816–822.
- Namuli A., Abdullah N., Sieo C., Zuhainis S., Oskoueian E., Phytochemical Compounds and Antibacterial Activity of *Jatropha curcas* Linn. Extracts, *J Med Plants Res*, 2011, **5**, 3982–3990.
- Natrajan D., Srinivasan S., Sundar K., Ravindran A., Formulation of Essential Oil-Loaded Chitosan-Alginate Nanocapsules, *Journal of Food and Drug Analysis*, 2015, **23**(3), 560-568.
- Nicolosi R. J., Rogers E. J., Ausman L. M., Orthoefer F. T., Rice Bran Oil and Its Health Benefits, *Rice Science and Technology*, Editors: Marshall W. E., Wadsworth J. I., Marcel Dekker, New York, 350–421, 1994.
- Norton R. A., Quantitation of Steryl Ferulate and P-Coumarate Esters from Corn and Rice, *Lipid*, 1995, **30**, 269–274.
- Ohtsubo K. I., Suzuki K., Yasui Y., and Kasumi T., Bio-functional Components in The Processed Pre-germinated Brown Rice by A Twin-screw Extruder, *Journal of Food Composition and Analysis*, 2005, **18**, 303–316.
- Ong E S., Cheong J. S. H., Goh D., Pressurized Hot Water Extraction of Bioactive or Marker Compounds in Botanicals and Medicinal Plant Material, *Journal of Chromatography A*, 2006, **1112**, 92-102.

- Oniszczyk A., Podgórski R., Influence of Different Extraction Methods on The Quantification of Selected Flavonoids and Phenolic Acids from *Tilia cordata* Inflorescence, *Industrial Crops and Production*, 2015, **76**, 509–514.
- Onyeneko S. N., Hettiarachchy N. S., Antioxidant Activity of Drum Wheat Bran, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1992, **49**, 1496–1500.
- Palacio-Mejía L. S., Lazcano-Ponce E., Allen-Leigh B., Hernández-Avila M., Diferencias Regionales en la Mortalidad por Cáncer de Mama y Cérvix en México Entre 1979 y 2006, *Salud Publica de Mexico*, 2009, **51**, 208–219.
- Parduman R. S., Mondhe D. M., Muthial S., Pal H. C., Shahi A. K., Saxena A. K., Qazi G. N., Anticancer Activity of an Essential Oil from *Cymbopogon flexuosus*, *Chemico-Biological Trends*, 2009, **179**, 160-168.
- Paredes-Lopez O., Cervantes-Ceja M. L., Vigna-Perez M., Hernandez-Perez T., Berries: Improving Human Health and Healthy Aging, and Promoting Quality Life, *Plant Foods for Human Nutrition*, 2010, **65**(3), 299-308.
- Park S. M., Lee S. C., Effect of Hydrothermal Treatment on The Antioxidant Activity of Rice Hull Extracts, *Food Science and Biotechnology*, 2009, **18**, 1435-1438.
- Parrado J., Miramontes E., Jover M., M'arquez J. C., Angeles-Mejias M., Collantes-De T. L., Absi E., Bautista J., Prevention of Brain Protein and Lipid Oxidation Elicited by Water-soluble Oryzanol Enzymatic Extract Derived from Rice Bran, *European Journal of Nutrition*, 2003, **42**, 307–314.
- Patel, M., A. Karera, Prasanna P., Effect of Thermal and Chemical Treatments on Carbon and Silica Contents in Rice Husk, *Journal of Materials Science*, 1987, **22**(7), 2457- 2464.
- Plaza M., Abrahamsson V., Turner C., Extraction and Neoformation of Antioxidant Compounds by Pressurized Hot Water Extraction from Apple Byproducts, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, **61**(23), 5500-5510.
- Plaza M., Turner C., Pressurized Hot Water Extractions of Bioactives, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2015, **71**, 39-54.
- Rajkumar T., Sapi A., Das G., Debnath T., Ansari A. Z., Patra J. K., Biosynthesis of Silver Nanoparticle Using Extract of *Zea mays* (Corn Flour) and Investigation of Its Cytotoxicity Effect and Radical Scavenging Potential, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2019, **193**, 1-7.
- Ramarathnam N., Osawa T., Namiki M., Kawakishi S., Chemical studies on novel rice hull antioxidants. 2. Identification of isovitexin, a c-glycosyl flavonoid, *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 1989, **37**, 316-319.
- Ramarathnam N., Osawa T., Namiki M., Kawakishi S., Chemical Studies on Novel Rice Hull Antioxidants: 1. Isolation, Fractionation, and Partial Characterization, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1988, **36**, 732–737.

- Saha B. C., Cotta M. A., Lime Pretreatment, Enzymatic Saccharification and Fermentation of Rice Hulls to Ethanol, *Biomass and Bioenergy*, 2008, **32**(10), 971-977.
- Saikia C., Gogoi P., Maji T. K., Chitosan: A Promising Biopolymer in Drug Delivery Applications, *Molecular and Genetic Medicine*, 2015, **4**, 2-10.
- Sarkar N., Ghosh S. K., Bannerjee S., Aikat K., Bioethanol Production from Agricultural Wastes: An Overview, *Renew Energy*, 2012, **37**, 19–27.
- Seetharamaiah G. S., Prabhakar J. V., Oryzanol Content of Indian Rice Bran Oil and Its Extraction from Soap Stock, *Journal of Food Science Technology*, 1986, **23**, 270–273.
- Sharma V. K., Yngard R. A., Lin Y., Silver Nanoparticles: Green Synthesis and Their Antimicrobial Activities, *Advances in Colloid and Interface Science*, 2009, **145**, 83-96.
- Shoji Y., Mita T., Isemaru M., Mega T., Hase S., Isemura S., and Aoyagi Y., A Fibronectin-Binding Protein from Rice Bran with Cell Adhesion Activity for Animal Tumor Cells, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2001, **65**, 1181–1186.
- Soppimath K. S., Aminabhavi T. M., Kulkarni A. R., Rudzinski W. E., Biodegradable Polymeric Nanoparticles as Drug Delivery Devices, *Journal of Controlled Release*, 2001, **70**, 1-20.
- Sosulski F., Krygier K., Hogge L., Free, Esterified, and Insoluble-bound Phenolic Acids. 3. Composition of Phenolic Acids in Cereal and Potato Flours, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1982, **30**, 337–340.
- Summers M. D., Jenkins B. M., Hydeb P. R., Williams J. F., Mutters R. G., Scardaccie S. C., Biomass Production and Allocation in Rice with Implications for Straw Harvesting and Utilization, *Biomass and Bioenergy*, 2003, **24**, 163–173.
- Tan B. L., Norhaizan M. E., Suhaniza H. J., Lai C. C., Norazalina S., Antioxidant Properties and Proliferative Effect of Brewers' Rice Extract (Temukut) on Selected Cancer Cell Lines, *International Food Research Journal*, 2013, **20**(5), 2117-2124.
- Teeranachaideekul V., Muller R. H., Junyaprasert V. B., Encapsulation of Ascorbyl Palmitate in Nanostructured Lipid Carriers (NLC) Effects of Formulation Parameters on Physicochemical Stability, *International Journal of Pharmaceutics*, 2007, **340**, 198–206.
- Teo C. C., Tan S. N., Yong J. W. H., Hew C. S., Ong E. S., Pressurized Hot Water Extraction (PHWE), *Journal of Chromatography A*, 2010, **1217**(16), 2484-2494.
- Thangam R., Sathuvan M., Poongodi A., Suresh V., Pazanichamy K., Sivasubramanian S., Kanipandian N., Ganesan N., Rengasamy R., Thirumurugan R., Soundarapandian K., Activation of Intrinsic Apoptotic Signaling Pathway in Cancer Cells by *Cymbopogon citratus* Polysaccharide Fractions, *Carbohydrate Polymers*, 2014, **107**, 138-150.

Tiwari S., Pradhan M. K., Effect of Rice Husk Ash on Properties of Aluminium Alloys: A Review, *Materials Today: Proceedings*, 2017, **4**, 486–495.

Umer H., Nigam H., Asif T. M., Nainar S. M., Microencapsulation: Process, Techniques and Applications, *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 2011, **2**(2), 474-481.

Ummah H., Suriamihardja D. A., Selintung M., Wahab A. W., Analysis of Chemical Composition of Rice Husk Used as Absorber Plates Sea Water into Clean Water, *Journal of Engineering and Applied Sciences*, 2015, **10**, 6046-6050.

URL-1: <http://www.gate2tech.com/article> (Ziyaret Tarihi: 18 Nisan 2019).

URL-2: <http://www.irri.org> (Ziyaret Tarihi: 18 Nisan 2019).

Vongsak B., Sithisarn P., Mangmool S., Thongpraditchote S., Wongkrajang Y., Gritsanapan W., Maximizing Total Phenolics, Total Flavonoids Contents and Antioxidant Activity of *Moringa oleifera* Leaf Extract by The Appropriate Extraction Method, *Industrial Crops and Products*, 2013, **44**, 566–571.

Wakiyama N., Juni K., Nakano M., Preparation and Evaluation *in vitro* of Polylactic Acid Microspheres Containing Local Anesthetics, *Chemistry and Pharmaceutical Bulletin*, 1981, **29**(11), 3363-3368.

Wu F., Yang N., Toure, A., Jin, Z., Xu, X., Germinated Brown Rice and Its Role in Human Health, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2013, **53**, 451–463.

Yang S., He H., Lu S., Chen D., Zhu J., Quantification of Crop Residue Burning in The Field and Its Influence on Ambient Air Quality in Suqian, China, *Atmospheric Environment*, 2008, **42**(9), 1961–1969.

Yawadio R., Tanimori S., Morita N., Identification of Phenolic Compounds Isolated from Pigmented Rices and Their Aldose Reductase Inhibitory Activities, *Food Chemistry*, 2007, **101**(4), 1616-1625.

Yoshioka T., Hashida M., Muranishi S., Sezaki H., Specific Delivery of Mitamycin C to The Liver, Spleen and Lung: Nano-and Microspherical Carriers of Gelatin, *International Journal of Pharmaceutical*, 1981, **8**(2), 131-141.

Yu S., Nehus Z. T., Badger T. M., Fang N., Quantification of Vitamin E and Gamma-oryzanol Components in Rice Germ and Bran, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, **55**, 7308-7313.

Yuvakkumar R., Nathanael A. J., Rejendran V., Hong S. I., Rice Husk Ash Nanosilica to Inhibit Human Breast Cancer Cell Line (3T3), *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 2014, **72**(1), 198-205.

Zhou H. M., Zhang M. P., Study the Functional Component of Brown Rice. *Traditional Chinese Food Technology and Cuisine*, 2002, **5**, 17–19.

Zhou Z. K., Robards K., Helliwell S., Blanchard C., Composition and Functional Properties of Rice, *International Journal of Food Science and Technology*, 2002, **37**, 849– 868.

Zimet P., Livney Y. D., Beta-lactoglobulin and Its Nanocomplexes with Pectin as Vehicles for ω -3 Polyunsaturated Fatty Acids, *Food Hydrocolloid*, 2009, **23**(4), 1120-1126.



KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER

Zengin M., **Budak G.**, Turker-Kaya S., Kanser Tedavisinde Kullanılan Gemzar'ın Fosfatidil Hücre Zarı Lipidleri ile Etkileşmesinin Biyofiziksel Yöntemlerle İncelenmesi, *4. İlaç Kimyası Kongresi*, Kuşadası, Türkiye, 17-23 Mart 2016.

Budak G., Ilhan E., Gulce-Iz S., Yesil-Celiktas O., Sevimli-Gur C., Growth Inhibitory Effects of Protein Extracts of Waste Rice Husk in Chitosan Nanoparticles on Various Tumor Cells, *International Conference on Technology, Engineering and Science, ICONTES*, Antalya, Türkiye, 26-29 October 2017.

Budak G., Ilhan E., Betts Z., Gulce-Iz S., Yesil-Celiktas O., Sevimli-Gur C., Anticancer Efficiency of Rice Husk Protein Extracts Loaded Chitosan Nanoparticles: Promising for Lung Carcinoma, *4th International Applied Biological Sciences, ICABS*, Eskişehir, Türkiye, 3-5 May 2018.

Barulay V., **Budak G.**, Yesil-Celiktas O., Sevimli-Gur C., Research on Cytotoxic Effects of Rice Husk Biomass on Various Tumor Cell Lines by Using Bioassay Guided Extraction Optimization, *International Eurasian BioChem*, Ankara, Türkiye, 26-27 April 2018.

ÖZGEÇMİŞ

1992 yılında Kocaeli’de doğdu. İlk ve orta öğretimini Kocaeli’de tamamladı. 2012 yılında girdiği Kocaeli Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden 2017 yılında mezun oldu. 2017 yılında Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı.

