



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



**MELANOMA TEDAVİSİNE YÖNELİK İKİLİ
İLAÇ İÇEREN NANOYAPILI LİPİD
TAŞIYICILARIN HAZIRLANMASI VE
KARAKTERİZASYONU**

Yüksek Lisans Tezi

Gizem DEMİRDİŞ

Biyokimya Anabilim Dalı
Biyokimya Yüksek Lisans Programı

İzmir
2023

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

**MELANOMA TEDAVİSİNE YÖNELİK İKİLİ İLAÇ
İÇEREN NANOYAPILI LİPİD TAŞIYICILARIN
HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU**

Gizem DEMİRDİŞ

Danışman : Prof.Dr.Şenay HAMARAT ŞANLIER

Biyokimya Anabilim Dalı
Biyokimya Yüksek Lisans Programı

İzmir
2023

Gizem Demirdiş tarafından Yüksek Lisans tezi olarak sunulan “Melanoma Tedavisine Yönelik İkili İlaç İçeren Nanoyapılı Lipid Taşıyıcıların Hazırlanması Ve Karakterizasyonu” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 28/08/2023 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üveleri:

İmza

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Şenay HAMARAT ŞANLIER

Raportör Üye: Doç. Dr. Güliz AK DEMİROZ

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Habibe YILMAZ

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum Melanoma Tedavisine Yönelik İkili İlaç İçeren Nanoyapılı Lipid Taşıyıcıların Hazırlanması Ve Karakterizasyonu başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

28/08/2023

Gizem DEMİRDİŞ

ÖZET

MELANOMA TEDAVISINE YÖNELİK İKİLİ İLAÇ İÇEREN NANOYAPILI LİPID TAŞIYICILARIN HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU

DEMİRDİŞ, Gizem

Yüksek Lisans Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Şenay Hamarat Şanlıer

Ağustos 2023, 79 sayfa

Deri kanseri dünya çapında en yaygın görülen kanserlerden biridir. Melanoma tüm cilt kanseri vakalarının yaklaşık %4'ünü oluşturmakla birlikte cilt kanseri kaynaklı ölümlerinin büyük çoğunluğu (%75) oluşturur ve dünya çapında melanoma vakaları her geçen gün artmaktadır. İkili ilaç içeren nanoyapılı lipid taşıyıcıların melanoma hücrelerince seçimli ve yüksek oranda alınabilmesi için hücrelerde aşırı miktarda artan LAT-1 taşıyıcı proteininin ekspresyonu hedef alınmıştır. Bu hedefleme ile melanomanın tedavi edilebilmesi için tez kapsamında kemoterapötik ajanlar olarak doksorubisin ve trabektedin içeren ikili ilaç taşıyıcısı sistemlerin geliştirilmesi hedeflenmiştir. İkili ilaç içeren LAT-1 hedefli NLC'ler sentezlenmiştir. Hazırlanan nanopartiküllerin karakterizasyon çalışmaları sonucunda, DSPE-PEG-Tirozin konjugatının başarı ile sentezlendiği ve ikili ilaç içeren LAT-1 hedefli NLC'lerin hidrodinamik boyutu 123,77 nm, PDI değeri 0,472 ve zeta potansiyel değeri -27,89 mV olarak bulunmuştur. Bu değerler melanoma tedavisinde başarılı bir hedefleme sunan ikili ilaç içeren nanopartiküllerin sentezinin gerçekleştirildiğini göstermektedir. *In vitro* salım çalışmalarında ikili ilaç içeren hedefli NLC'lerin tümör mikroçevresi özelliği gösteren asidik koşullarda (pH 5) salım değerleri fizyolojik pH olan 7,4'e göre belirgin bir fark ile daha yüksek salım profili göstermektedir. Salım profili ayrıca kontrollü ve uzun süreli olarak gözlenmiştir.

Bu çalışma 219S788 numaralı, "Melanoma Tedavisinde İkili İlaç İçeren Hedefli Nanopartikül Sisteminin Topikal Kemoterapiye Yönelik Etkinliğinin Araştırılması" adlı proje olarak Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Melanoma, Nanoyapılı Lipid Taşıyıcı, LAT-1, Doksorubisin, Trabektedin, İlaç Taşıyıcı Sistemler



ABSTRACT

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF NANOSTRUCTURED LIPID CARRIERS CONTAINING DUAL DRUGS FOR MELANOMA TREATMENT

DEMIRDİS, Gizem

MSc in Biochemistry

Supervisor: Prof. Dr. Şenay Hamarat Şanlıer

August 2022, 79 pages

Skin cancer is one of the most common cancers worldwide. Melanoma accounts for approximately 4% of all skin cancer cases, but accounts for the vast majority (75%) of skin cancer deaths and melanoma cases are increasing worldwide. In order to selectively and highly uptake the dual drug-containing nanostructured lipid carriers by melanoma cells, we targeted LAT-1 expression, which is increased excessively in cells. With this targeting, it is aimed to develop dual drug carrier systems containing doxorubicin and trabectedine as chemotherapeutic agents in order to treat melanoma. LAT-1 targeted NLCs containing dual drugs were synthesized. As a result of the characterization studies of the prepared nanoparticles, it was found that DSPE-PEG-Tyrosine conjugate was successfully synthesized and the hydrodynamic size of LAT-1 targeted NLCs containing dual drugs was 123.77 nm, PDI value was 0.472 and zeta potential value was -27.89 mV. These values indicate the synthesis of dual drug-containing nanoparticles that offer successful targeting in melanoma treatment. In in vitro release studies, the release values of targeted NLCs containing dual drugs in acidic conditions (pH 5), which are characteristic of tumor microenvironment, show a higher release profile with a significant difference compared to the physiological pH of 7.4. The release profile was also observed in a controlled and long-term release profile

This study was supported by the Scientific and Technological Research Council of Turkey (TÜBİTAK) as a project numbered 219S788, "Investigation of the Efficacy of a Targeted Nanoparticle System Containing Dual Drugs for Topical Chemotherapy in Melanoma Treatment".

Keywords: Melanoma, Nanostructured Lipid Carrier, LAT-1, Doxorubicin, Trabectedin, Drug Delivery Systems

ÖNSÖZ

Melanoma cilt kanserleri arasında öldürücülüğü en yüksek olan tümördür. Tez kapsamında melanoma hücrelerine hedefleme gerçekleştirerek, hedefe yönelik bir tedavi imkanı sunmanın yanı sıra ayrıca mevcut tedavi yöntemlerinin yan etkilerinin azaltılmasına yönelik bir tedavi stratejisi geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda melanoma hücrelerinde aşırı eksprese olan LAT-1 taşıyıcıları hedef alan konjugatı ve kemoterapötik ajanları içeren nanoyapılı lipid taşıyıcılar sentezlenmiştir. Bu nedenle LAT-1 hedeflendirmesinin gerçekleşmesi için Tirozin aminoasidi seçilmiştir. Tirozin aminoasidinin NLC ve taşıyıcı ile etkileşiminde sterik engel oluşmaması için tirozin, DSPE-PEG molekülü ile reaksiyona sokulmuştur. Kemoterapötik ajanlar olarak kombinasyonlarının antikanser etkinliğinin daha etkin bir tedavi sağladığı bilinen doksorubisin ve trabektedin seçilmiştir. Tez sürecim boyunca, melanoma, ilaç hedefleme, LAT-1, NLC ve in vitro ilaç salım çalışmaları üzerine çok sayıda deneyim elde ettim. Elde edilen sonuçların yorumlanması ve literatür ile kıyaslanmasını tecrübe ettim.

Cilt kanserinin en ölümcül sınıfı olan melanoma olmak üzere kanser, geçmişten günümüze artan sayıda devam etmekte olan en önemli sağlık sorunlarından biridir. Kanser birçok türü için tedavi yöntemleri olmasına rağmen kanser hastaları uygulanan tedavi yöntemlerinden dolayı büyük acı çekmektedir ya da geç teşhis nedeni ile tedavi yöntemi bulunmamaktadır. Bu nedenle, tezim kapsamında melanoma tedavisine yönelik tümör hücrelerine hedefli ilaç taşıyıcı sistem geliştirdim. Bu geliştirdiğim sistem ile, melanoma ile mücadele eden, umutsuzluğa kapılan tüm insanlara ışık ve umut olmayı diliyorum.

Bu çalışma 219S788 numaralı, “Melanoma Tedavisinde İkili İlaç İçeren Hedefli Nanopartikül Sisteminin Topikal Kemoterapiye Yönelik Etkinliğinin Araştırılması” adlı proje olarak Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenmiştir.

İZMİR

28/08/2023

Gizem DEMİRDİŞ

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI	vii
ÖZET	ix
ABSTRACT.....	x
ÖNSÖZ.....	xii
İÇİNDEKİLER.....	xiv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvii
TABLolar DİZİNİ.....	xxii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİ	3
2.1 Kanser	3
2.2 Cilt Kanserleri	3
2.2.1 Bazal Hücreli Karsinom.....	6
2.2.2 Skuamöz Hücreli Karsinom	7
2.3 Melanoma.....	7
2.3.1 Melanoma Türleri	10
2.3.2. Melanoma Teşhisi.....	16
2.3.3. Melanoma Tedavi Stratejileri	17
2.4. Antikanser İlaçlar	19
2.4.1. Doksorubisin.....	19
2.4.2. Trabektedin.....	20
2.5. Nanopartiküler İlaç Taşıma Sistemleri	22
2.5.1. Lipid Nanopartiküller	22
2.6. Nanoyapılı Lipid Taşıyıcılar (NLC)	26

2.6.1. NLC Türleri.....	26
2.6.2. NLC Sentez Metodları	27
2.7. İlaç Hedefleme.....	29
2.7.1. Fiziksel Hedefleme	30
2.7.2. Pasif Hedefleme.....	30
2.7.3. Aktif Hedefleme	31
2.8. L Tipi Amino Asit Taşıyıcısı 1 (LAT-1).....	32
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	33
3.1 Materyal	33
3.2. Metot.....	34
3.2.1. DSPE-PEG-Tirozin Bileşiğinin Sentezlenmesi	34
3.2.2. Nanoyapılı Lipid Taşıyıcıların Hazırlanması ve Karakterizasyonu	35
3.2.3. LAT-1 Hedefli Nanoyapılı Lipid Taşıyıcıların Hazırlanması ve Karakterizasyonu.....	37
3.2.4. LAT-1 Hedefli ve Doksorubisin ile Trabektedin Yüklü Nanoyapılı Lipid Taşıyıcıların Hazırlanması ve Karakterizasyonu	38
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	39
4.1. DSPE-PEG-Tirozin Bileşiğinin Sentezlenmesi	39
4.2. Nanoyapılı Lipid Taşıyıcıların Hazırlanması ve Karakterizasyonu.....	47
4.3. LAT-1 Hedefli Nanoyapılı Lipid Taşıyıcıların Hazırlanması ve Karakterizasyonu.....	61
4.4. LAT-1 Hedefli ve Doksorubisin ile Trabektedin Yüklü Nanoyapılı Lipid Taşıyıcıların Hazırlanması ve Karakterizasyonu.....	68
4.3. In Vitro İlaç Salımı	72
4.3.1. DTP-NLC ilaç salımı	72
5. SONUÇLAR	76

xiii
İÇİNDEKİLER (DEVAM)

Sayfa

6. ÖNERİLER.....	77
7. KAYNAKLAR DİZİNİ.....	78
TEŞEKKÜR.....	93
ÖZGEÇMİŞ VE ESERLER LİSTESİ.....	94



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1. Cilt kanseri oluşumu ve derinin katmanları.....	4
2.2. Melanoma türleri ve deride oluşumları	4
2.3. Yumruk biyopsisi.....	6
2.4. Bazal hücreli karsinoma hasta görüntüleri	7
2.5. Clark evreleri	9
2.6. Bacakta yer alan Breslow 0.6 mm ile yüzeysel yayılan melanoma	10
2.7. Breslow kalınlığı ≤ 2 mm olan Nodüler Melanom (NM).....	11
2.8. a) Sınırları belirsiz büyük bir LM'nin klinik görüntüsü. (b) Yanakta pigmentli bir LM'nin dermoskopisi, yalancı ağ ve saç foliküllerini gizleyen koyu kahverengi, yapısız bir alanı ok ile gösteriliyor.....	12
2.9. (a) Belirgin akral lezyon örnekleri. (b) Dermoskopinin paralel bir çıkıntı paterni gösterdiği bir akral lentiginöz melanomanın klinik görünümü.	12
2.10. Büyük pigmente koroidal ve siliyer cisim melanomu.. Posterior koroidde yer alan orta büyüklükteki bir melanomun düşük büyütmesi, ve sol köşedeki görüntü tümörün çekirdekleri, belirgin nükleoller ve kohezif büyüme ile iç hücreli tipi bir uveal melanomu gösterir	13
2.11. Uveal Melanoma Gelişimi.....	14
2.12. a) lezyon içeren konjonktival melanoma, b) korneanın çoğunu tıkayan tekrarlayan konjonktival melanoma, c) 2 mm çapında yassı melanositik lezyon içeren konjonktival melanoma, d) polipoid konjonktival melanoma	14
2.13. a) Dudak mukozasında yer alan mukozal melanoma b) ağız içerisinde yer alan mukozal melanoma.....	15
2.14. a) Desmoplastik melanom b) Karışık bir desmoplastik melanomun fotomikrografisi.....	15
2.15. Doksorubisinin Yapısı.....	20
2.16. Trabektedinin Yapısı.....	21

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

Şekil	Sayfa
2.17. SLN türleri.....	25
2.18. NLC türleri	27
2.19. Pasif Hedeflendirme	33
2.20. Aktif Hedeflendirme.....	33
2.21. LAT1 ve substratlarının gösterimi	33
3.1. DSPE-PEG-COOH ile Tirozin arasında gerçekleşen reaksiyon.....	35
4.1. DSPE-PEG-COOH bileşiğine ait FTIR spektrumu.....	40
4.2. L-Tirozin'in FTIR spektrumu.	41
4.3. DSPE-PEG-Tirozin konjugatının FTIR spektrumu.	41
4.4. DSPE-PEG-COOH, L-Tirozin ve DSPE-PEG-Tirozin konjugatınınFTIR spektrumları.	42
4.5. DSPE-PEG-COOH, L-Tirozin ve DSPE-PEG-Tirozin konjugatının1800-1400 cm ⁻¹ bölgesindeki FTIR spektrumları.	42
4.6. DSPE-PEG-COOH bileşiğine ait 1H NMR spektrumu.	44
4.7. L-Tirozin yapısının 1H NMR spektrumu.	44
4.8. DSPE-PEG-Tirozin konjugatının 1H NMR spektrumu.	45
4.9. DSPE-PEG-COOH 13C NMR spektrumu.	46
4.10. L-Tirozin 13C NMR spektrumu.....	46
4.11. DSPE-PEG-Tirozin 13C NMR spektrumu.	47
4.12. 1:2 katı: sıvı yağ oranlarında (w/w) hazırlanan NLC örneğinin hidrodinamik partikül boyutu dağılımı.	50
4.13. 1:2 katı: sıvı yağ oranlarında (w/w) hazırlanan NLC örneğinin zeta potansiyel yük dağılımı.....	50
4.14. Miristik asite ait FTIR spektrumu.	51

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

Şekil	Sayfa
4.15. Tatlı badem yağına ait FTIR spektrumu.	51
4.16. Tween-80'e ait FTIR spektrumu.	52
4.17. NLC örneğine ait FTIR spektrumu.	52
4.18. NLC, badem yağı, miristik asit ve Tween 80'e ait karşılaştırmalı FTIR spektrumları.	53
4.19. Miristik asite ait TGA eğrisi.	54
4.20. Tatlı badem yağına ait TGA eğrisi.	55
4.21. Tween 80'e ait TGA eğrisi.	55
4.22. NLC örneğine ait TGA eğrisi.	56
4.23. Miristik asitin DSC eğrisi.	57
4.24. Tatlı badem yağının DSC eğrisi.	58
4.25. Tween 80'in DSC eğrisi.	58
4.26. Fiziksel karışımın DSC eğrisi.	59
4.27. NLC örneğinin DSC eğrisi.	59
4.28. NLC örneğine ait SEM görüntüsü.	60
4.29. P-NLC örneğine ait hidrodinamik boyut dağılım grafiği.	62
4.30. P-NLC örneğine ait zeta potansiyel dağılım grafiği.	62
4.31. P-NLC örneğine ait FTIR spektrumu.	63
4.32. NLC ve P-NLC örneğine ait FTIR spektrumları.	63
4.33. DSPE-PEG-Tirozin örneğine ait TGA eğrisi.	65
4.34. P-NLC'nin TGA eğrisi.	65
4.35. DSPE-PEG-Tirozinin DSC eğrisi.	66

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.36. P-NLC örneğine ait DSC eğrisi.	67
4.37. P-NLC örneğine ait SEM görüntüsü.	68
4.38. DTP-NLC örneğine ait hidrodinamik boyut dağılım grafiği.	71
4.39. DTP-NLC örneğine ait zeta potansiyel dağılım grafiği	71
4 40. Doksorubisin ve trabektedin içeren serbest ilaç çözeltisinden pH 7,4 ve pH 5 tamponlarındaki zamana bağlı doksorubisin salımı	71
4 41. Doksorubisin ve trabektedin içeren serbest ilaç çözeltisinden pH 7,4 ve pH 5 tamponlarındaki zamana bağlı trabektedin salımı	100
4.42. Doksorubisinin DTP-NLC partiküllerinden pH 7,4 ve pH 5 tamponlarındaki zamana bağlı salımı	100
4.43. Trabektedinin DTP-NLC partiküllerinden pH 7,4 ve pH 5 tamponlarındaki zamana bağlı salımı	101

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo

Sayfa

2.1. Melanoma evreleri ve açıklamaları	10
4.1. Değişen oranlarda katı yağ ve sıvı yağ içeriklerinde hazırlanan NLC örneklerinin partikül boyut, PDI ve zeta potansiyel değerleri.	61
4.2. Değişen DSPE-PEG-Tirozin konjugatı içeren P-NLC örneklerinin hidrodinamik boyut, PDI ve zeta potansiyel değerleri.	61
4.3. Farklı miktarlarda doksorubisin içeren NLC örneklerine ait Dox yüklenme verimi (%).	69
4.4. Farklı miktarlarda trabektedin içeren NLC örneklerine ait Trb yüklenme verimi (%).	69
4.5. Artan ilaç miktarı ile elde edilen hidrodinamik boyut, PDI ve zeta potansiyel değerleri.....	70
4.6. Artan ilaç miktarı ile elde edilen hidrodinamik boyut, PDI ve zeta potansiyel değerleri.....	70

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
%	Yüzde
>	Büyüktür
°C	Santigrat Derece
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
g	Gram
kDa	Kilodalton
mg	Miligram
mL	Mililitre
M	Molar
mM	Milimolar
nm	Nanometre
v	Hacim

Kısaltmalar**Açıklama**

NMSC	Melanom dışı (bazal ve skuamöz hücreli karsinom) cilt kanseri
UV	Ultraviole
FTIR	Fourier Dönüşümlü İnfrared Spektrofotometre
HH	Hedgehog
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
ROS	Reaktif Oksijen
NP	Nanopartikül
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
MSH	Melanosit uyarıcı hormon
TGA	Termogravimetrik Analiz
NM	Nodüler Melanoma
LM	Lentigo Melanoma
PDT	Fotodinamik terapi
RES	Retiküloendotelyal Sistem
DOX	Doksorubisin

LUV	Büyük Tek Katmanlı Veziküller
SUV	Küçük Tek Katmanlı Veziküller
SLN	Katı lipid nanopartiküller
NLC	Nanoyapılı Lipid Taşıyıcılar
LAT-1	L Tipi Amino Asit Taşıyıcısı 1
DMAP	N,N-dimetil aminopiridin
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DCC	Disikloheksil karbodiimid
d-su	Distile Su
HCL	Hidroklorik Asit
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre Analiz
PDI	Polidispersite İndeksi
TRB	Trabektedin
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
DSPE-PEG	1,2 -distearoil -sn-gliserol- 3 – fosfoetanolamin- N-[karboksi (polietilen glikol) – 2000]

1.GİRİŞ

Deri kanseri dünya çapında en yaygın görülen kanser türlerinden biridir. Melanoma ise cilt kanseri vakalarının en ölümcül olan türüdür. Melanoma cilt kanseri nedeniyle gerçekleşen ölümlerin yaklaşık %75'lik büyük bir çoğunluğunu oluşturmaktadır. Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler, istenilen organa veya dokuya, düşük miktarda ilaç ile etkin bir tedavi imkanı sunmaktadır. Hedefli ilaç tedavileri melanoma için daha etkili bir şekilde tedavi olmasına olanak tanır. Hedeflendirmenin amacı genel olarak; taşınımı hücrel olarak artırmak, ilaçların dolaşımında salım profillerini optimizasyonu, düşük dozlarda etkin bir tedavi yöntemi sağlamak, hedef bölgede istenilen düzeyde farmakolojik cevap elde etmektir. Nanoyapılı lipid taşıyıcılar, amorf yapıları sayesinde ilaçların yüklenmesini ve taşınmasını sağlayan, biyoyumlu partiküler sistemlerdir.

Melanoma hücrelerinin LAT-1 taşıyıcılarını aşırı eksprese ettiği bilinmektedir. Taşıyıcılar aracılığı ile kanser tedavileri, etkin sonuçlar sunmaktadır. LAT-1, hücrel büyüme, çoğalma gibi temel hücrel faaliyetler için gerekli olan dallı,aromatik amino asitleri taşır.

Tez kapsamında trabektedin ve doksorubisin kemoterapötik ajanları içeren nanoyapılı lipid taşıyıcıların melanoma hücrelerince seçimli ve yüksek oranda alınabilmesi için hücrelerde aşırı miktarda artan LAT-1 ekspresyonu hedef alınmıştır. Melanoma hücrelerine hedeflendirilmiş ikili ilaç içeren nanoyapılı lipid taşıyıcıların formülasyonu geliştirilmiştir. Literatürde, doksorubisine ait birçok çalışmanın var olmasının aksine trabektedin içeren nanopartiküler sistemlerdeki uygulamaları kısıtlıdır. İkili ilaç içeren nanopartiküler sistemlerde ise kombine şekilde doksorubisin ve trabektedine ait çalışmaların mevcut olmaması LAT-1 hedefli ikili ilaç içeren NLC'lerin sentezlenmesi literatüre yenilik katmaktadır.

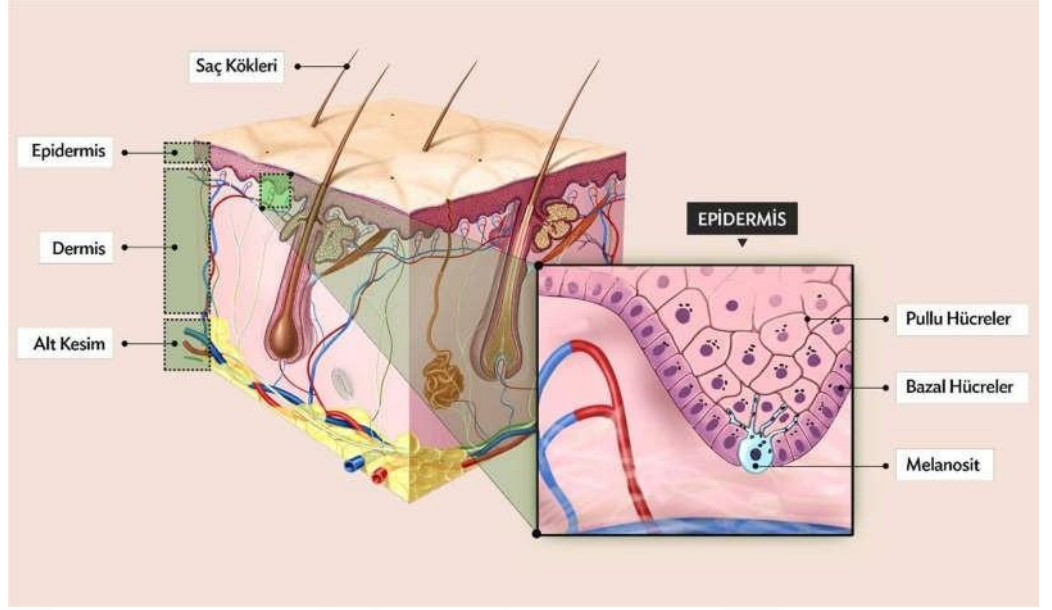
2. GENEL BİLGİ

2.1 Kanser

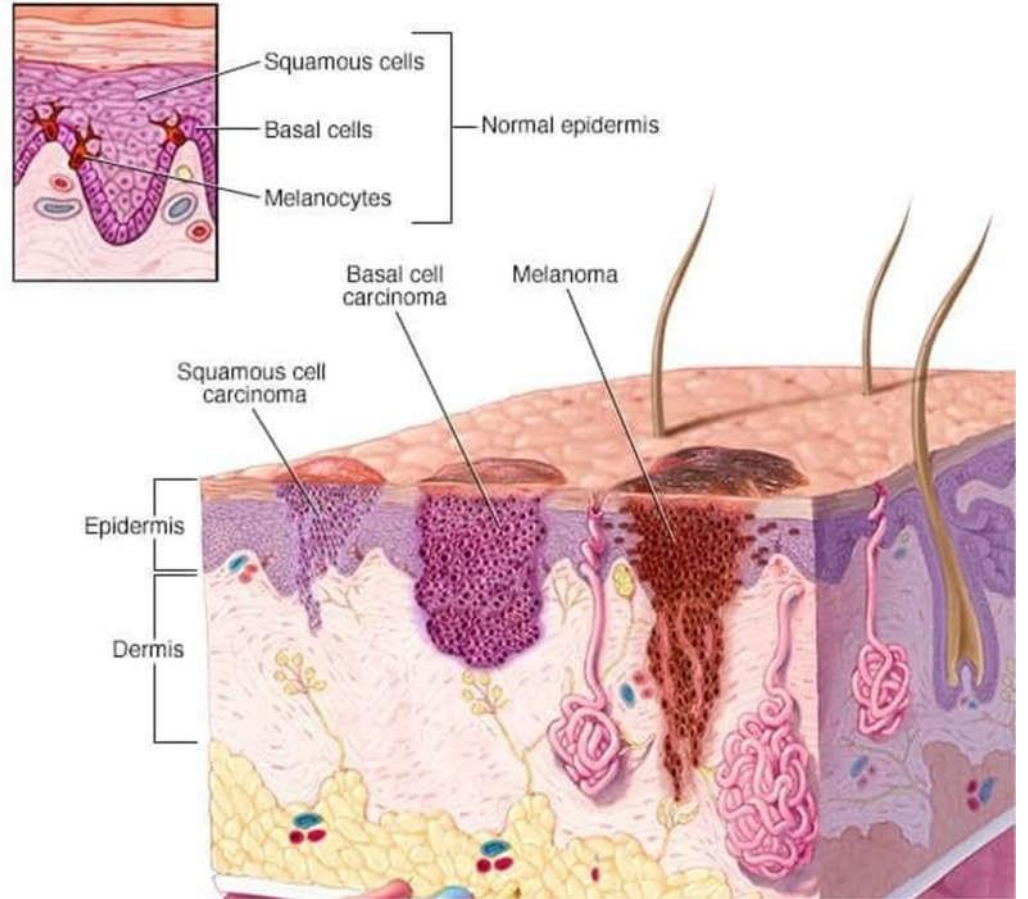
Hücre bölünmesinin doğal sürecindeki patofizyolojik değişikliklerin hastalığı olan kanser, her yıl milyonlarca ölüme neden olan dünyanın en ölümcül hastalıklarından biridir. Günümüzde 19,3 milyondan fazla yeni kanser vakası teşhis edilirken yaklaşık kanser ile ilişkili 10 milyon ölüm gerçekleştiği tahmin edilmektedir (Chhikara ve Parang, 2023). Normal insan hücreleri, vücudun ihtiyacı doğrultusunda hücreler oluşturmak için büyür ve çoğalır. Hücrelerin yaşlanması veya hasar görmesi ile ölürlere ve yeni hücreler üretilir. Bu düzenin bozulup, anormal veya hasarlı hücreler büyüyüp çoğalmamaları gerektiği halde kontrolsüz olarak çoğalırlar. Bu kontrolsüz çoğalan hücreler, tümörleri (iyi huylu veya kötü huylu) oluşturabilir. Kötü huylu tümörler kanseri oluşturmaktadır. Kanser hücrelerinin kronik proliferasyonu südürebilme yetenekleri en önemli özelliklerinden biridir. Kanser hücreleri, normal hücrelerin büyüme ve çoğalma sürecinde gerçekleştirdiği sinyallerin deregülasyonunu sağlayarak kendi kendilerine poliferasyon gerçekleştirirler.

2.2 Cilt Kanserleri

Cilt kanserleri, öncül hücre tiplerine ve çeşitli faktörlere göre değişiklik gösteren tümörlerin oluşumuna yol açan anormal deri hücrelerinin kontrolsüz çoğalmasını içerir (Pereira vd., 2023). Deri vücudun en büyük organıdır ve yaralanmaya, enfeksiyona, ısıya ve güneş ışığına karşı koruma sağlamaktadır. Deri birden fazla katmandan oluşur. Üst ve dış katman epidermis, alt ve iç katman dermis olarak adlandırılır. Epidermis skuamöz, bazal hücreler ve melanosit denilen üç çeşit hücreden oluşur. Skuamöz epidermisin büyük çoğunluğunu oluşturan düz hücrelerdir. Bazal hücreler ise skuamöz hücrelerin altında bulunan yuvarlak hücrelerdir. Melanositler derinin altında bulunan, cilde doğal rengini veren melanin pigment üretimini sağlarlar. Cilt güneş ışığına maruz kaldığında melanositler normalden daha fazla melanin pigmenti üreterek ten koyulaşmasını sağlarlar. Dermis ise kan, lenf damarları, kıl folikül ve bezlerini içermektedir.



Şekil 2.1. Cilt kanseri oluşumu ve derinin katmanları (Pereira et al., 2023).



Şekil 1.2. Melanoma türleri ve deride oluşumları (Diepgen & Mahler, 2002).

Melanoma ve melanom dışı (bazal ve skuamöz hücreli karsinom) cilt kanseri (NMSC) beyaz tenli popülasyonlarda görülen en yaygın cilt kanseri

türleridir (Diepgen ve Mahler, 2002). Melanoma dışı cilt kanserlerinin görülme sıklığı ve tedavi edilebilirliği daha yüksektir fakat melanoma türü cilt kanserinin ölüm oranı çok yüksek ve tedavi edilebilirliği geç teşhislerde çok azdır. Cilt kanserleri sıklıkla beyaz tenli insan popülasyonlarında görölse de ten rengi farketmeksizin, genetik faktörler, UV ışığa maruz kalma, güneş yanığı ve deride çok fazla sayıda ben olması gibi faktörler cilt kanserine neden olabilmektedir. Cilt kanseri deri üzerinde herhangi bir noktada oluşmaya başlayabileceği gibi bir ben üzerinde de gelişim gösterebilmektedir. Bu sebeple cilt kanserlerinde erken teşhis büyük önem taşımaktadır.

Cilt kanseri belirtileri olarak; ben formunda meydana gelen renk ve şekil değişiklikleri, deride soyulma ve kanama, ben üzerinde meydana gelen şişlik olabilir. Erken teşhiste ben takibi önemli bir noktada yer almaktadır. Ben takibinde cilt kanserini kolay tespit etmek için ABCDE kuralı olan bir metot kullanılmaktadır. ABCDE kuralında bir değişiklik gözlemlendiğinde doktor kontrolünde erken teşhis olasılığı artmaktadır.

ABCDE Kuralı

- A (Asimetri)

Benin asimetrisinde değişiklik varsa, bir yarısı diğer yarısından daha farklı bir boyutta ise

- B (Border/Sınır)

Benin sınırları normalden farklı olarak düz değil girintili ise

- C(Color/Renk)

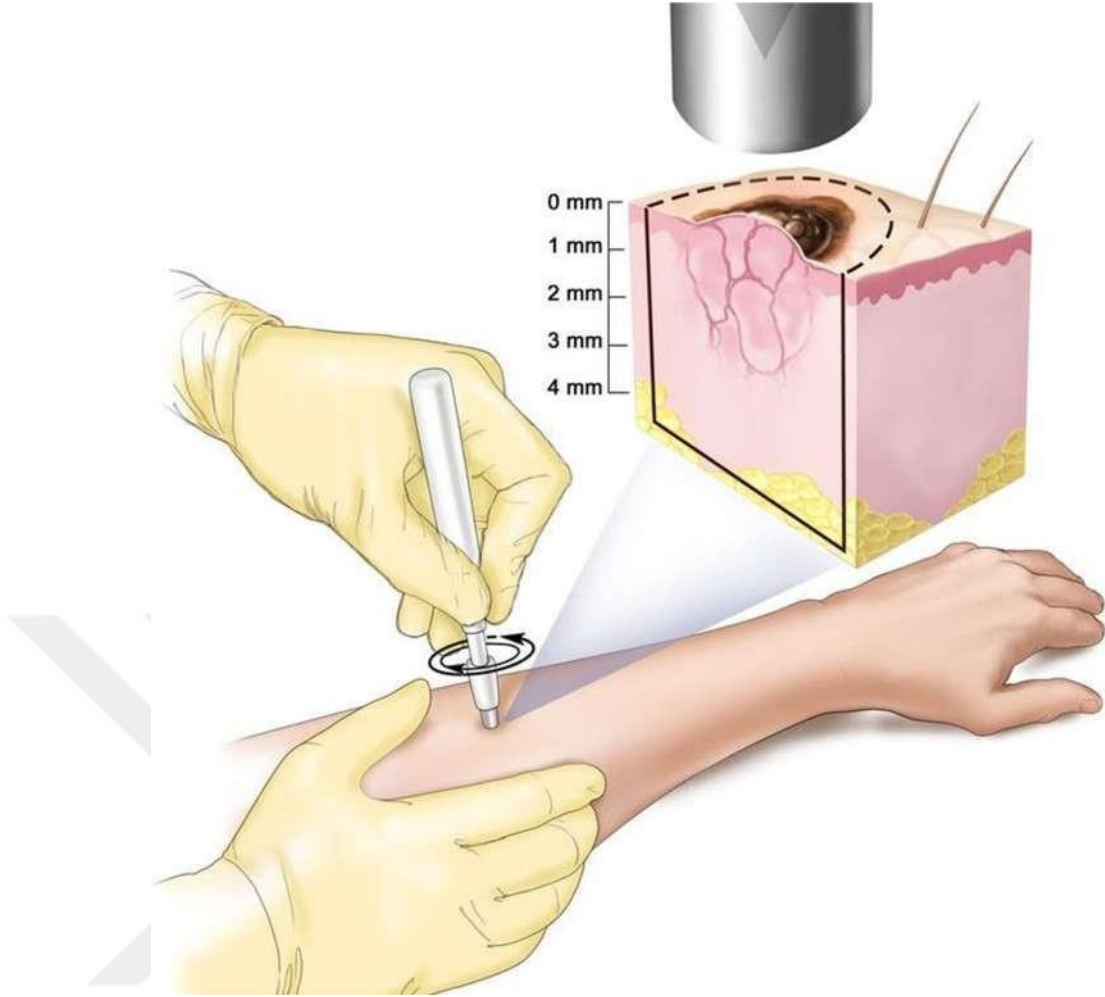
Ben rengi farklı veya bölgesel olarak birden fazla renk içeriyor ise

- D(Diameter/Çap)

Ben çapı 6mm'den büyük ise

- E(Evolution/Değişim)

Benin asimetrisi, boyutu, rengi ve başka özellikler bakımından değişim göstererek yeni bir semptom geliştirdiyse, cilt kanseri olma riski taşımaktadır. Cilt kanseri teşhisinde kullanılan bir diğer yöntem ise deri biyopsisidir. Anormal olan büyümenin tamamı veya bir kısmı ciltten kesilir ve bir uzman hekim tarafından kanser belirtilerini kontrol etmek için mikroskop altında incelenir.

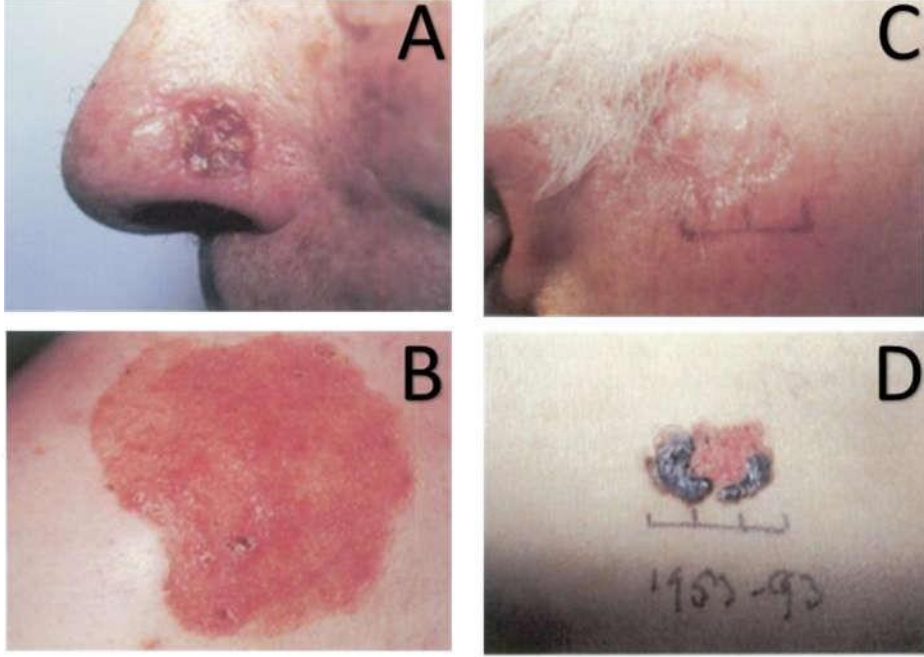


Şekil 2.2. Yumruk biyopsisi (Davis et al., 2019).

2.2.1 Bazal Hücreli Karsinom

Cildin dıştaki üst katmanı olan bazal hücrelerde görülen bir kanserdir. Cilt kanserleri arasında en yaygın olarak görülmektedir. Her melanoma dışı cilt kanserinden yaklaşık %75'i bazal hücreli karsinomdur. Hedgehog (HH) yolu, bazal hücreli karsinomun embriyonik gelişiminde önemli bir rol oynar ve anormal işlevi, çeşitli tümörlerle ilişkilidir. HH sinyal yolunun anormal aktivasyonu, Bazal hücreli karsinomun oluşumunu, metastazını ve tedavi direncini indükleyebilir. Bazal hücreli karsinomlu hastaların yaklaşık %85'inde HH sinyal yolunda mutasyonlar görülür. Bunların %67'sinde Patched (PTCH) delesyonları ve %10'unda Smoothed (SMO) mutasyonları görülür, bu da GLI'nın aşırı ekspresyonuna, hücre bölünmesine ve tümör oluşumunun desteklenmesine yol açar (Dicker vd., 2002; H. Wu vd., 2022). Bazal hücreli karsinom çok nadiren yaşamı tehdit eder. Bazal hücreli karsinomun çok küçük bir kısmı hızla büyür, derinlemesine invaze olur ve metastaz yapar. Bazal hücreli

karsinom nodüler, yüzeysel, morfeik, bazoskuamöz ve pigmentli gibi birçok fazla klinik türü vardır (Lear ve Smith, 1997; Micantonio vd., 2011).



Şekil 2.3. Bazal hücreli karsinoma hasta görüntüleri (Lear & Smith, 1997).

2.2.2 Skuamöz Hücreli Karsinom

Skuamöz hücreli karsinom, bazal hücreli karsinomdan farklı olarak derinin orta ve dış katmanlarını oluşturan skuamöz hücrelerinde gelişmektedir. Skuamöz hücreli karsinom genellikle bazal hücre karsinom kanserinden daha hızlı büyür. Cilt kanserlerinin yaklaşık %23'ü skuamöz hücreli karsinomdur. Epidermiste bulunan keratinosit adı verilen hücrelerde başlarlar. Skuamöz hücreli karsinomun büyük bir çoğunluğu güneşe maruz kalan cilt bölgelerinde gelişir.

2.3 Melanoma

Melanoma, melanositlerde meydana gelen genetik mutasyonlar ile oluşan en agresif cilt kanseri çeşididir. Cilt kanseri ile ilgili olarak, melanoma oranı son yıllarda gittikçe artmaktadır. Cilt kanserlerinin sadece %4'sini oluşturan melanoma, cilt kanserine ilişkin ölümlerin yaklaşık %75'inden sorumludur (Ossio vd., 2017; Pópulo vd., 2012).

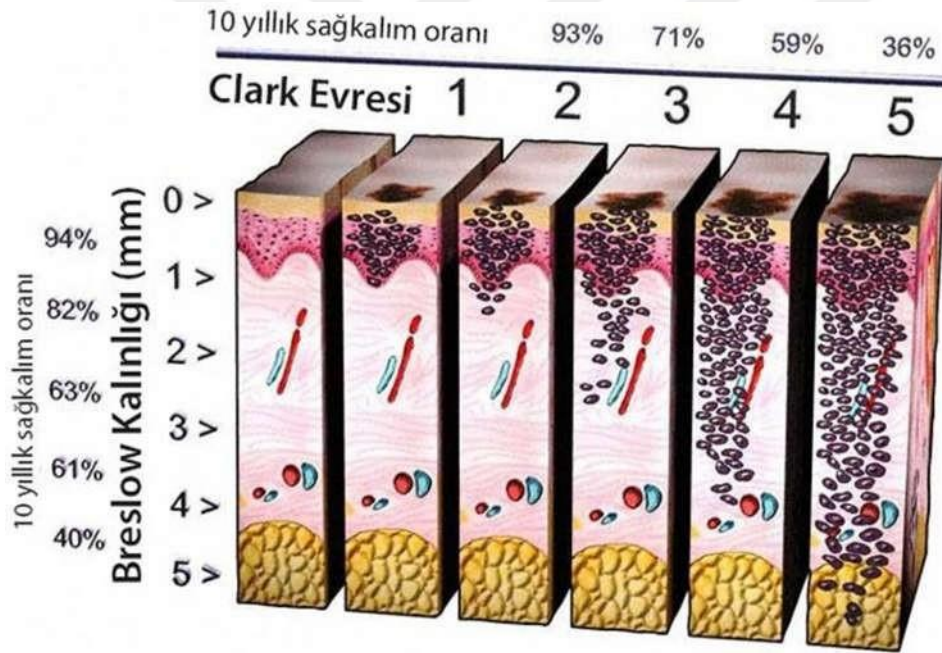
Epidermisin bazal tabakasında, UV ışınlarını emen pigment olan melanin üreten melanositler bulunur. Melanositler, epidermiste mm² başına yalnızca

1500 melanosit ile büyük çoğunluktaki hücre popülasyonunu oluşturur ve yılda ikiden az olmak üzere nadiren bölünür. Melanositlerin ürettiği iki tür melanin vardır; bunlardan biri kahverengi/siyah pigmente sahip eumelanin ve diğeri ise sarı/kırmızı pigmente sahip feomelanindir. Cilt rengini, melanositlerin sayısından daha çok deride bulunan eumelanin/feomelanin oranı belirlemektedir. Eumelanin miktarının fazla olması cilt için iyi bir ultraviyole ışın kalkanı sağlamaktadır. Feomelanin ise eumelanine kıyasla daha az ultraviyole radyasyonuna karşı koruma sağlamasına nazaran daha fazla UVA radyasyonuna karşı DNA hasarına yol açarken reaktif oksijen (ROS) ürettiği de görülmektedir. Kanser gelişimi; genetik yatkınlık, çevresel etkenler, kümülatif mutasyonlar ve epigenetik mekanizmalar ile gerçekleşmektedir. Kanser gelişiminde ve evrelerin ilerlemesinde genetik yatkınlık ve çevresel etkenlere ek, anti-tümör konakçı yanıtı da önemlidir. Melanoma hastalarının yaklaşık olarak %5-12'si kalıtsal iken kalıtsal melanoma, kalıtsal olmayan melanomadan farklı mutasyon profillerine sahip olma eğilimindedir (Davis vd., 2019).

UV maruziyeti cilt melanomu için birincil risk faktörüdür, ancak bu etki genetik, melanin ve UV dalga boyları tarafından büyük ölçüde düzenlenir. Kalıtsal olmayan melanomanın çoğu, güneşe maruz kalan ciltte ortaya çıkar. En yüksek oranlar, çok sık ve yoğun güneşe maruz kalan kişilerde görülür. Fakat ek olarak güneşe maruz kalmayan bölgelerde de melanoma oluşumu görüldüğü için güneşe maruz kalma veya güneş yanığının meydana geldiği yaş da önemli bir faktördür. UV ışını, DNA replikasyonunda hatalara, ardından hücre sinyal moleküllerinde mutasyonlara ve nihayetinde karsinogeneze neden olan, en yaygın olarak timidin-dimerler olmak üzere DNA foto-ürünlerini indüklemektedir. UV ışınları, UVA ve UVB olarak ikiye ayrılır. UVB ışını (dalga boyu: 280–320 nm), UVA (320–400 nm) ışınından foton başına yaklaşık 1000 kat daha fazla genotoksiktir. Fakat bireyin UVA maruziyeti çevresel olarak zamana, enleme, mevsime ve yüksekliğe bağlı olarak 20-40 kat daha yüksektir. Ayrıca UVA UVB'den farklı olarak, UV ışınıyla indüklenen pirimidin dimerlerinden farklı olarak (baz eksizyon onarımı) onarılan DNA'da oksidatif hasara yol açtığı görülmüştür (Saginala vd., 2021). UV ışınlarına maruz kalmanın sonucunda melanosit uyarıcı hormon (MSH) ve β -endorfin içeren biyoaktif peptitlere bölünmeyi indükleyerek melanoma hücrelerinin kontrolsüz çoğalmasına neden olmaktadır (Atkins vd., 2021). Kontrolsüz çoğalan

melanoma hücreleri ilk olarak radial yayılım gösterirken zaman içerisinde ise vertikal olarak yayılım gerçekleştirirler. Metastaz evresinde ise, vertikal yayılma ile lenf bezlerine ve diğer organlara yayılma özelliği gösterirler.

Melanoma hücrelerinin cilt yüzeyinden vertical yayılım göstermesini evreler ile tanımlayan sistem Clark seviyesi olarak adlandırılır. Clark evresi 1'den 5'e kadar tanımlanmaktadır. Clark seviyesine ek olarak ise yayılımı mm olarak ölçen bir diğer sistem ise Breslow kalınlık birimidir. Melanomanın ciltte yayılımının ve derinliğinin belirlenmesi tedavi için önemli bir noktadır. Melanoma evreleri Şekil 2.5'de verilmiştir (Davis vd., 2019; Morton vd., 1993).



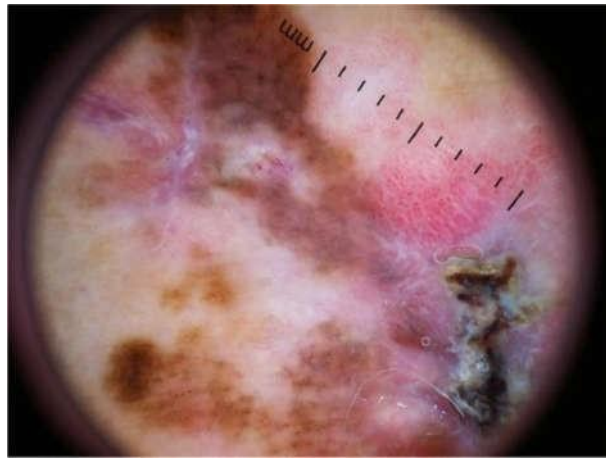
Şekil 2.4. Clark evreleri (Diepgen & Mahler, 2002).

Tablo 2.1. Melanoma evreleri ve açıklamaları

Evre	Açıklama
0	Melanoma en dış katmanda yer alan epidermis ile sınırlıdır. Bu evre in situ olarak da adlandırılmaktadır. Lenf düğümlerine ve vücutta uzak bölgelere yayılma gözlenmemektedir.
1	Tümör 2 mm'den daha azdır ve yaralara neden olabilmektedir. Lenf düğümlerine ve vücutta uzak bölgelere yayılma gözlenmemektedir.
2	Tümör 4 mm'den daha azdır ve yaralara neden olabilmektedir. Lenf düğümlerine ve vücutta uzak bölgelere yayılma gözlenmemektedir.
3	Melanoma hücreleri lenf düğümlerine yayılım gösterirken, henüz vücutta uzak bölgelere yayılma gözlenmemektedir.
4	Tümör herhangi bir boyutta olabilir. Lenf düğümlerine ve vücutta uzak bölgelere (beyin, akciğer, karaciğer gibi) yayılma gözlenmemektedir.

2.3.1 Melanoma Türleri

Deride oluşan melanoma, kutanöz melanom olarak bilinir. Kutanöz melanomanın 4 ana alt tipi vardır. Bunlar; yüzeysel yayılan melanoma, nodüler melanoma, lentigo melanoma ve akral lentiginöz melanomadır. Kutanöz melanomanın yanı sıra, tümü kutanöz melanomadan daha az yaygın olan dört melanoma türü daha vardır. Bunlar; oküler melanoma ve mukozal melanoma, sırasıyla gözde ve vücudun mukozal astarlarında gelişen kutanöz olmayan melanoma türleridir.



Şekil 2.5. Bacakta yer alan Breslow 0.6 mm ile yüzeysel yayılan melanoma (Trindade vd., 2021).

2.3.1.1. Yüzeysel Yayılan Melanoma

Yüzeysel yayılan melanom en sık görülen melanoma türüdür. Tüm melanoma cilt kanserlerinin yaklaşık %70'ini oluşturur. Yüzeysel yayılan melanoma dışı doğru büyüme ve cilt yüzeyine yayılma eğilimindedir fakat vertical büyüme de gösterebilmektedir. Genellikle kalınlığı 1 mm'den az ve düzensiz sınırlara sahip olabilir. Rengi değişiklik gösterir ve siyah, pembe kenarlı veya kahverengi olabilirler.

2.3.1.2. Nodüler Melanoma

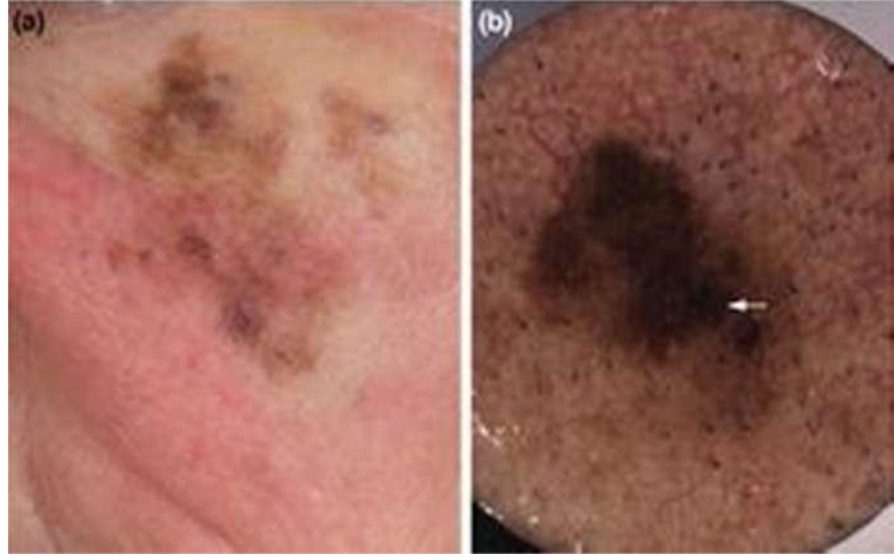
Nodüler melanom, ikinci en yaygın melanom cilt kanseri türüdür. Nodüler melanoma, tüm melanomların %12-30'unu oluşturur, ancak 2 mm'den kalın tüm melanomların en az %50'sini oluşturur; bu nedenle, en kötü prognoza ve buna bağlı sağkalıma sahiptir. Deriden dışarı çıkan kabarık bir büyüme (polipoid) veya saplı bir mantar şekline sahip olabilir. Genellikle siyahtır, ancak bazen kırmızı, pembe veya tenreğinde olabilir.



Şekil 2.6. Breslow kalınlığı ≤ 2 mm olan Nodüler Melanom (NM). (a) Lezyonun merkezinde beyaz parlak şeritler ve mavi yapısız alan (beyaz daire) ile 1.7 mm Breslow kalınlığındaki melanomun çevresinde düzensiz kahverengi noktalar ve globüller (beyaz oklar) (Sgouros vd., 2020).

2.3.1.3. Lentigo Melanoma

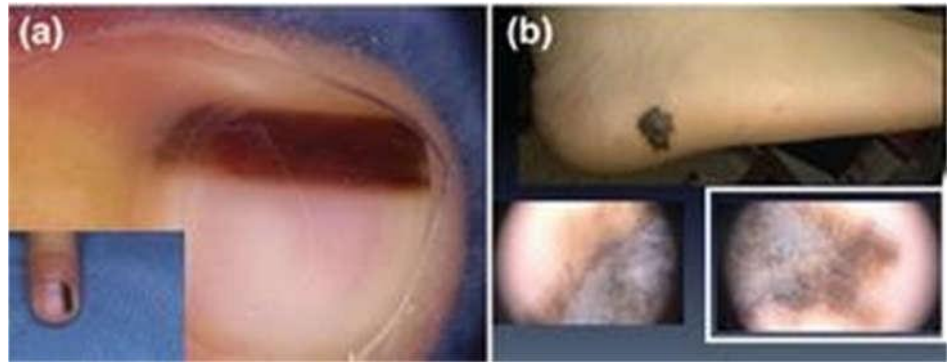
Lentigo melanoma, genellikle güneşten zarar görmüş ciltte ortaya çıkan ve bazal epidermiste melanositlerin atipik proliferasyonu ile karakterize edilmektedir. Tedavi edilmezse lentigo melanoma, diğer invaziv melanom türleri ile aynı prognozu paylaşan, lentigo maligna melanoma olarak adlandırılan invaziv melanoma dönüşebilir. Lentigo melanoma, tüm melanom cilt kanserlerinin yaklaşık %10 ila %15'ini oluşturur. Lentigo maligna melanomu genellikle düzensiz kenarlı büyük, düz ten rengi veya kahverengi bir yama olarak görünür. Büyüdükçe daha koyu olma eğilimindedir ve birçok kahverengi veya siyah tonu vardır.



Şekil 2.7. a) Sınırları belirsiz büyük bir LM'nin klinik görüntüsü. (b) Yanakta pigmentli bir LM'nin dermoskopisi, yalancı ağı ve saç foliküllerini gizleyen koyu kahverengi, yapısız bir alanı ok ile gösterilmektedir (Collgro vd., 2021).

2.3.1.4 Akral Lentijinöz Melanoma

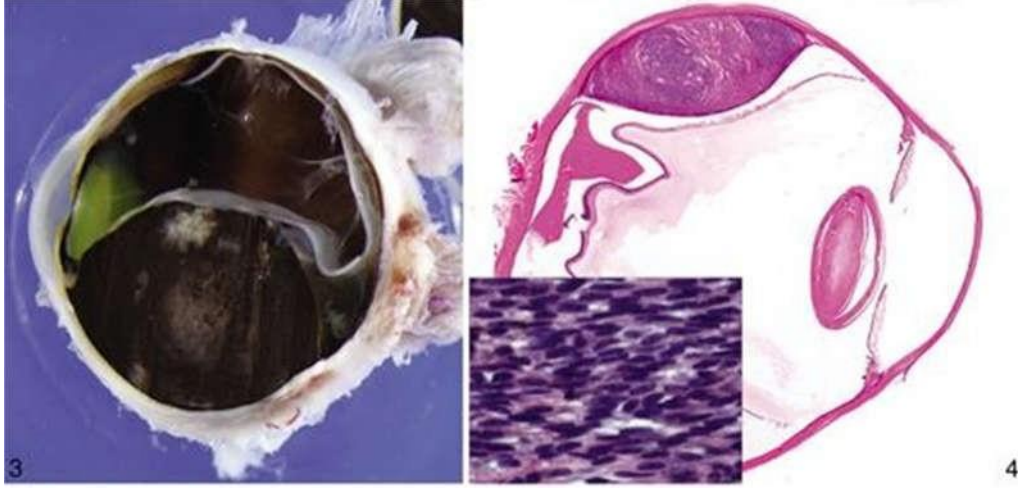
Akral lentijinöz melanoma, Afrika, Asya vb. soylardan gelenler gibi koyu tenli kişilerde en yaygın görülen melanoma çeşididir. Güneşe maruz kalma ile ilgili değildir. Dört ana alt tip arasında, akral lentijinöz melanoma Asya ülkelerinde en yüksek insidansı gösterirken, beyaz popülasyonlardaki tüm melanomaların yalnızca %1'ini oluşturur. Akral lentijinöz melanoma, genellikle koyu kahverengi, siyah olan küçük, düz bir cilt lekesi olarak görülmektedir. Genellikle vertikal büyümeye başlamadan önce uzun bir süre cildin yüzeyinde dışı doğru büyüme göstermektedir.



Şekil 2.8. (a) Belirgin akral lezyon örnekleri. (b) Dermoskopinin paralel bir çıkıntı paterni gösterdiği bir akral lentijinöz melanomanın klinik görünümü (Pereira vd., 2023).

2.3.1.5. Oküler Melanoma

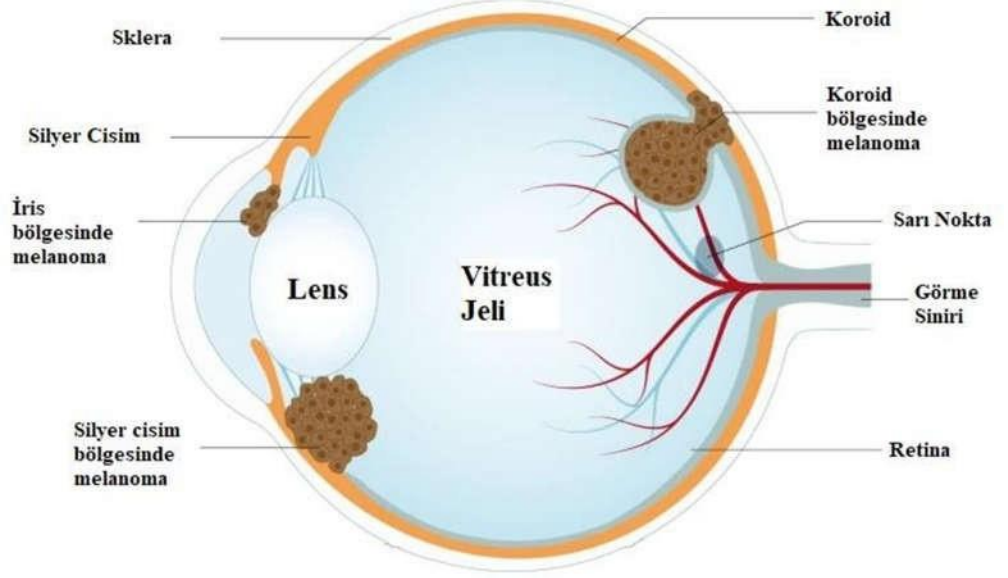
Kutanöz melanomadan sonra en sık görülen ikinci melanoma tipi oküler melanomadır. Tıpkı kutanöz melanomada olduğu gibi, oküler melanoma da melanositler kanserleşip mutasyona uğrayarak kontrolsüz çoğalırlar. Çoğu melanoma vakaları ciltte meydana geldiği için bir cilt kanseri türü olarak kabul edilir ancak melanositler, gözlerimiz dahil vücudumuzun diğer yerlerinde de bulunduğundan, melanoma gözlerimizde de oluşabilir. Gözün melanoması genellikle oküler melanoma olarak adlandırılır. Oküler melanoma en sık gözün renkli kısmı olan irisi, göz merceğinin etrafındaki kas lifleri olan silyer cismini ve gözün arkasını kaplayan kan damarı tabakası olan koroidi içeren orta tabakası olan uveayı etkiler.



Şekil 2.9. Büyük pigmente koroidal ve siliyer cisim melanomu. Posterior koroidde yer alan orta büyüklükteki bir melanomun düşük büyütmesi, ve sol köşedeki görüntü tümörün çekirdekleri, belirgin nükleoller ve kohezif büyüme ile iğ hücresi tipi bir uveal melanomu gösterir (Laver vd., 2010).

2.3.1.6. Uveal Melanoma

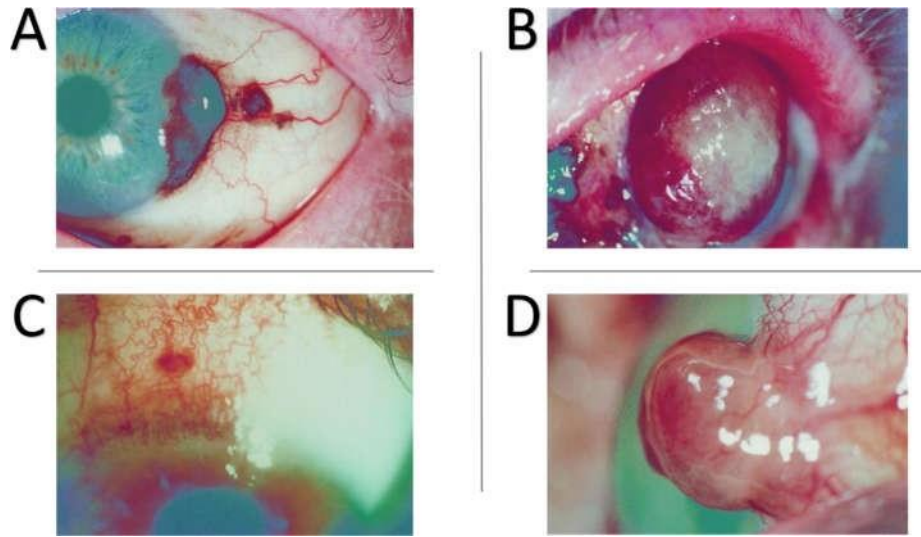
Uveal melanoma, kutanöz melanomadan çok farklı, nadir görülen bir hastalıktır. Uveal melanoma, iris, silyer cisim ve koroidin pigmentli dokularını içeren uveadaki melanositlerden kaynaklanır. Uveal melanomanın %90'ından fazlası koroidi içerir, sadece %6'sı silyer cisimle ve %4'ü irisle sınırlıdır.



Şekil 2.10. Uveal Melanoma Gelişimi (Jager vd., 2020).

2.3.1.7. Konjunktival Melanoma

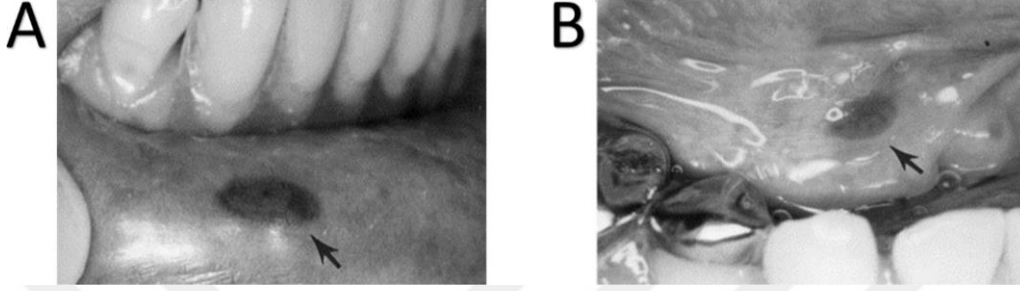
Konjunktival melanoma, tekrarlama olasılığı yüksek ve ölüm oranı yaklaşık %30 olan nadir görülen bir tümördür. Konjunktiva, gözün ön kısmının perikorneal yüzeyini kaplayan ve göz kapaklarının arka yüzeyini çizen pürüzsüz, esnek, koruyucu bir kese oluşturur. Konjunktival bazal tabakanın melanositleri, pigmentli görünümünden sorumlu olan farklı sayıda melanin granülü içerir. Konjunktival melanomada ise bu melanoma hücrelerinin kontrolsüz çoğalması ile meydana gelir.



Şekil 2.11. A) Lezyon içeren konjunktival melanoma, b) Korneanın çoğunu tıkayan tekrarlayan konjunktival melanoma, c) 2 mm çapında yassı melanositik lezyon içeren konjunktival melanoma, d) Polipoid konjunktival melanoma (Elsas vd., 1974)

2.3.1.8. Mukozal Melanoma

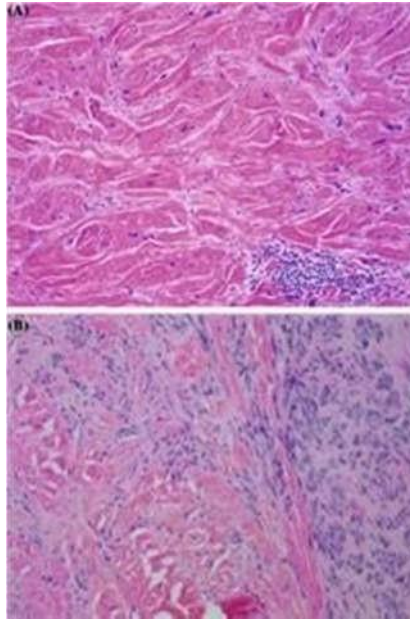
Mukozal melanomalar sinüsler, burun yolları, ağız boşluğu, vajina ve anüs gibi mukoza zarlarında gelişir. Mukozal dokular, tıpkı cilt gibi melanosit içerir ve bu melanositler kanserli melanoma hücreleri hale gelebilir. Mukozal melanomalar nadirdir, tüm melanoma vakalarının sadece yüzde birini oluşturur ancak daha agresif olma eğilimindedirler.



Şekil 2.12. a) Dudak mukozasında yer alan mukozal melanoma b) Ağız içerisinde yer alan mukozal melanoma (Hicks ve Flaitz, 2000).

2.3.1.9. Desmoplastik Melanoma

Desmoplastik melanom, kalın bir fibröz kollajen matrisi ile çevrili iğsi tümör hücrelerinden oluşan nadir bir histolojik melanoma türüdür. Sert, büyüyen bir yumru olarak başlar ve cilt rengi ile benzer bir renkte oluşabilir. Bir yara izi ile karıştırılması ve teşhis edilebilmesi zor olabilir. Derinin dermis veya submukoza bölgesinde gelişir ve derinin içine doğru büyüme eğilimindedir. Desmoplastik melanom sıklıkla baş, boyun veya vücudun mukozalı bölgelerinde gelişir (McCarthy vd., 2004; Nicolson ve Han, 2019).



Şekil 2.13. a) Desmoplastik melanoma b) Karışık bir desmoplastik melanomanın fotomikrografisi (Hawkins vd., 2005).

2.3.2. Melanoma Teşhisi

Melanoma cilt kanserinin en ölümcül formudur. Erken evrelerde, melanoma tek başına cerrahi yöntemler ile başarılı bir şekilde tedavi edilebilir ve hayatta kalma oranları yüksektir, ancak metastaz sonrası hayatta kalma oranları önemli miktarda düşer. Bu nedenle, erken ve doğru teşhis, hastaların mümkün olan en iyi prognoza sahip olmasını sağlamak için kilit rol oynamaktadır.

2.3.2.1. Temel Seviye Gözlem Yöntemleri

Melanomanın teşhis edilmesinde ABCD kuralı kullanılırken aynı zamanda evrelerinin de belirlenebilmesi için Clark seviyeleri ve Breslow kalınlık birimleri kullanılarak uygun tanı konmaktadır. ABCD kuralı evde herkesin rahatlıkla erken teşhisi sağlayabileceği yöntemler olarak belirlenir. Bu nedenle belirli aralıklarla ben kontrollerinin yapılması önerilir (Davis vd., 2019).

2.3.2.2 Dermoskopik Yöntemler

Dermoskopi, çeşitli tıbbi özelliklerin görünürlüğünü artırmak için bir büyüteç ve bir ışık kaynağı kullanan bir yöntemi ifade eder. Gizli morfolojileri çıplak gözle ortaya çıkarır. Dermoskopik yöntemlerin temel teşhis stratejisi, belirli lezyonların melanositik olup olmadığına ve biyopsi yapılması gerekip gerekmediğine karar vermeyi sağlar. Dermoskopik yöntemler ile yeni lezyon oluşumunun gözlenmesi ve tümörlü olan lezyonların pigmentli/pigmentsiz belirlenmesini de kapsamaktadır (Rigel vd., 2010).

2.3.2.3. Histopatolojik Yöntemler

Melanoma teşhisinde dermoskopik yöntemle belirlenmiş malignitenin olduğu düşünülen bölgede, tümörün derinliği, ülser oluşumunun varlığı, tümörün lateral yayılımı gibi özelliklerin teşhisini kapsamaktadır. Breslow kalınlığı ve Clark seviyelerinin belirlenmesi ve tümör evrelerindeki ilerleme ya da gerilemelerin gözlenmektedir. Ayrıca tümörün başka bir bölgeye nüksetmesi hakkında da bilgiler elde edilmektedir. Histopatolojik yöntemlerde; cilt biyopsisi, tıraş biyopsisi, yumruk biyopsisi ve optic biyopsi yöntemleri kullanılır. Elde edilen gözlemler sonucunda ise tedavi stratejileri oluşturulur (Hench vd., 2023; Słowińska vd., 2023; Swanson vd., 2002).

2.3.2.4. İleri Seviye Gözlem Yöntemleri

Tümörün ilerleme evresine bağlı olarak tümör bölgesindeki lenf nodülleri ve dokulara nüksetmesi durumunu gözlemlemek için ultrason veya film çekilebilir. Tümör ilerleme evresi ileri seviyede olan hastalar için ise uzak bölge dokulara nüksetme durumunu belirlemek için PET, bilgisayarlı tomografi, konfokal taramalı lazer mikroskopisi ve tümör boyutunu görüntüleyebilmek için MRI verileri ışığında hastalığın teşhisi konabilir (Garbe ve Eigentler, 2007). Bunun dışında son teknolojik gelişmeler sayesinde melanoma tespitinde non-invaziv görüntüleme yöntemleri de kullanılmaya başlanmıştır. Çeşitli akıllı telefon uygulamaları, geniş kapsamlı erişilebilirlik, uygun maliyetli tarama ve nihayetinde hastalar için daha fazla erken teşhis hedefleriyle geliştirilen bu yöntemler melanomanın erken teşhisi için önemlidir (Davis vd., 2019).

2.3.3. Melanoma Tedavi Stratejileri

Cilt kanseri için en uygun tedavi stratejisine tümörün tipi, boyutu, bölgesi ve gelişim aşamasına göre karar verilir. Büyük tümör boyutuna sahip cilt kanserini ilk aşamalarda yok etmek için benimsenen düzenli tekniklerden bazıları, immünoterapi veya hedefe yönelik terapi ile birlikte eksizyon cerrahisi, Mohs cerrahisi veya radyasyon tedavisidir. Bununla birlikte, küçük boyutlu cilt kanseri, elektrodikasyon, kriyoterapi, lazer tedavisi veya fotodinamik terapi ve ardından immünoterapi, ve hedefe yönelik tedavi yoluyla elimine edilir.

2.3.3.1. Eksizyonel Cerrahi

Eksizyonel cerrahi cilt kanseri tedavisinde standart bir yöntemdir. Bu teknikte 1,5-2 mm derinlikte tümör alınır ve histopatolojik inceleme için işlenir. Bu tekniğin temel avantajı, ihmal edilebilir bir yara izi, tümör sınırının histolojik olarak doğrulanması ve hızlı iyileşmedir. Bununla birlikte, sınırlamalar ise enfeksiyon, seroma, hematoma ve önemli yara oluşumu olasılığıdır.

2.3.3.2 Mohs Cerrahisi

Mohs mikroskopik cerrahisi, cilt tümörlerini çıkarmak için son teknoloji bir yöntemdir. Bu teknikte, lokal anestezi altında mümkün olan maksimum tümörü görüntülemek ve çıkarmak için mikroskop kullanılmıştır. Ayrıca normal dokulara gereksiz zarar verilmesini önlemeye yardımcı olur. Bu şekilde elde

edilen yatay kesitler, numunenin derin ve çevresel kenarlarının tam bir görünümünü sağlar.

2.3.3.3. Küretaj ve Elektrodesikasyon

Küretaj ve desikasyon olarak da adlandırılan küretaj ve elektrodesikasyon, kanser lezyonunu ve komşu normal dokuları dağlama ve küret ile kazıma yoluyla yok eden özel bir tekniktir. Sadece küçük boyutlu cilt kanserlerinde ima edilebilir; ancak büyük ve yüksek riskli cilt tümörleri için önerilmemektedir.

2.3.3.4. Radyoterapi

Radyoterapi, cerrahiye tolere edemeyen yaygın ve tekrarlayan cilt kanseri olan yaşlı hastaları veya tümörlerin cerrahi olarak çıkarılmasının mümkün olmadığı yerleri tedavi etmek için ideal bir stratejidir.

2.3.3.5. Fotodinamik Terapi

Fotodinamik terapi (PDT), cilt kanseri hücrelerini öldürmek için ışığa duyarlılaştırıcıları ve lazerleri benimseyen, kendine özgü, invaziv olmayan bir tekniktir. Başlangıçta, fotosensitizörler, tümör alanında birikmelerini sağlamak için uygulanır, ardından fotosensitizörlerden tekli oksijen ve diğer reaktif oksijen türlerini üretmek için lazer ışını ışınlaması yapılır ve sonunda tümör hücrelerini öldürür. Tekniğin dezavantajı, yüksek maliyetli ve derin köklü tümörlerin etkili bir şekilde öldürememesidir (Zeng vd., 2023).

2.3.3.6. İmmünoterapi, Hedefe Yönelik Tedavi ve Kemoterapi

İmmünoterapi, hedefe yönelik tedavi ve kemoterapi, melanomaya karşı umut verici tedavi yöntemlerindendir. Ameliyattan bağımsız olarak, radyasyon tedavisi veya PDT, immünoterapi, hedefe yönelik tedavi veya kemoterapi, melanomanın ileri evrelerinde tümörü nüksetmeden başarılı bir şekilde iyileştirmek için alternatif tedavi olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, yüksek maliyet ve düşük hasta uyumu gibi immünoterapi ve hedefe yönelik terapi ile ilişkili dezavantajlardır. Bu dezavantajlar hastaların tedavi sürecini kemoterapiye çevirmektedir. Kemoterapi, maliyetle ilgili sorunları ele alabilmesine ve tedaviyi düşük ve orta gelirli aileler için karşılanabilir hale getirmesine rağmen, kemoterapötik ajanların neden olduğu yan etkiler ve agresif tümörlerin sergilediği kemoterapiye dayanıklılıkları en büyük dezavantajlarıdır.

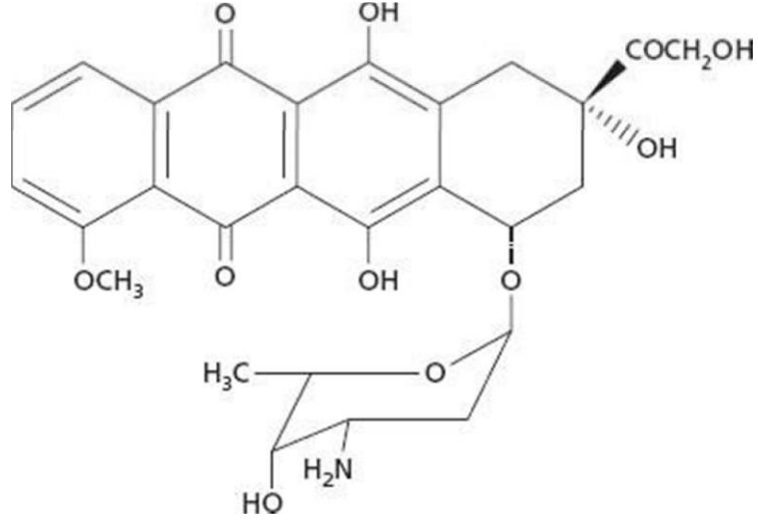
2.3.3.7. Nanoteknoloji

Melanoma tedavisine yönelik yaklaşımların dezavantajları nedeniyle araştırmacılar nanoteknolojiye yönelmişlerdir. Nanoteknoloji, nanometre aralığında çeşitli malzemeleri içeren, gelişmekte olan bir bilim alanıdır. Nanomalzemeler, hem ilaç taşıyıcıları hem de terapötik ajanlar olarak hareket ederek kanser terapötiklerinin performansını artırma konusunda dikkate değer bir potansiyele sahiptir. Cilt kanseri tedavisi genellikle tümörün tipine, boyutuna, bölgesine ve gelişme aşamasına göre seçilir. Ameliyat ve radyasyon tedavisinden bağımsız olarak, cilt kanseri, mümkün olduğunca çok sayıda kanser hücrelerini azaltmak için immünoterapi, hedefe yönelik tedavi ve kemoterapi ile tedavi edilir. Bununla birlikte, kemoterapötik ajanların geleneksel uygulaması, tümör hedeflemeyen yoksundur ve bu da yetersiz tümör alımına ve ilaçların vücutta gereksiz dağılımına yol açarak ciddi yan etkilere neden olur ve fizyolojik koşullarda yetersiz stabilite, gerekli terapötik etkinliği üretmez. Bu dezavantajlar sonucunda nanoteknoloji cilt kanserini ortadan kaldırmak için tüm bu sorunları ele alan uygun bir stratejidir. Deri kanseri durumlarının tedavisinde yer alan çok çeşitli nanomalzemeler vardır; bunların arasında nanopartiküller (NP'ler), artırılmış geçirgenlik ve tutma (EPR) etkisi yoluyla pasif tümör hedefleme, retiküloendotelial sistemden (RES) kaçma gibi benzersiz özelliklerinden dolayı önemli ilgi kazanmıştır.

2.4. Antikanser İlaçlar

2.4.1. Doksorubisin

Doksorubisin (DOX), *Streptomyces peucetius*'tan elde edilmektedir. 1960'lerden beri kemoterapötik bir ajan olarak kullanılmaktadır. Dox, çeşitli kanserlerin tedavisi için kliniklerde uygulanan güçlü bir kemoterapötik ilaçtır. Dox, aglikonik ve şeker kısımlarına sahip, seçici olmayan sınıf I antrasiklindir. Aglikon, kinin-hidrokinon bitişik grupları içeren tetrasiklik halka, metoksi sübstitüent kısa yan zinciri ve ardından karbonil grubundan oluşur. Şeker bileşenihalkalardan birine glikozidik bağla bağlıdır (Meng vd., 2014; Tacar vd., 2012).



Şekil 2.14. Doksorubisinin Yapısı (Tan vd., 2010)

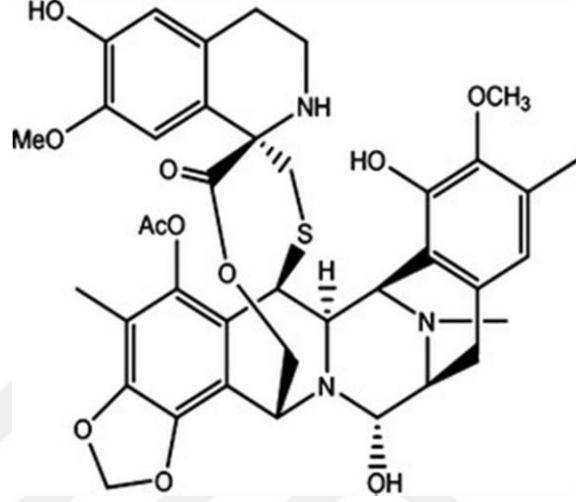
Bu sitotoksik ajan, nükleik asit sentezine müdahale etmek için DNA çift sarmalı ile etkileşime girerek S fazındaki hücreler üzerinde belirgin bir sitotoksik etki üretir. Bunun nedeni interkalasyonun nükleotid replikasyonunu ve DNA ve RNA polimerazların hareketlerini engellemesidir. Doksorubisinin hücreyi etkilediği ikinci mekanizma enzim inhibisyonudur. Doksorubisin, topoizomera II'yi bağlar ve inhibe eder ve transkripsiyonu önler. Doksorubisinin halka fenolik grupları asidik fonksiyonlara katkıda bulunurken, şeker amino grubu, molekülü amfoterik hale getirerek temel bir fonksiyona katkıda bulunur.

Klinik bir ortamda doksorubisin, akut lösemi, lenfomalar, yumuşak doku ve osteojenik sarkomlar, pediatrik maligniteler ve yetişkin katı tümörlerinde, özellikle meme ve akciğer karsinomlarında başarılı bir şekilde gerileme sağlayarak çeşitli kanserler için yaygın olarak kullanılmaktadır. Doksorubisin yaygın olarak metotreksat, sisplatin, ifosfamid, vinkristin ve etoposid gibi diğer sitotoksik ilaçlarla kombinasyonlarında kullanılmaktadır (Battaglia vd., 2014). Doksorubisin uygulamasından sonra, yorgunluk, mide bulantısı, saç dökülmesi, kusma ve ağızda oluşan yaralar gibi yan etkiler sıklıkla görülmektedir. Kemik iliği baskılanması ve sekonder malignite teşhisi riskinde artış meydana gelebilir. Dox klinik uygulamalarda tipik olarak hidroklorür tuzu olarak veya ciddi yan etkilerini azaltabilen lipozomal formlarda uygulanır (X. Wang vd., 2016).

2.4.2. Trabektedin

Trabektedin (ET-743), Ecteinascidia turbinata'dan izole edilen izole edilen ve şu anda sentetik olarak hazırlanan bir tetrahidroizokinolin alkaloididir.

Üç tetrahidroizokinolin halkası ile karakterize edilen kimyasal bir yapıya sahiptir. Bu halkalardan ikisi (alt birimler A ve B), DNA çift sarmalının küçük oluğuyla kovalent etkileşim için çerçeve sağlarken, üçüncü halka (alt birim C) DNA dupleksinden çıkıntı yaparak nükleer proteinlerle etkileşime izin verir (D’Incalci ve Galmarini, 2010).



Şekil 2.15. Trabektedinin Yapısı (Larsen vd., 2016)

Trabektedin, tümör hücrelerinde olduğu kadar tümör mikroçevresinde de anahtar hücre biyolojisi süreçlerini etkileyen karmaşık bir etki mekanizması sunar. Trans-aktive edilmiş transkripsiyonun inhibisyonu ve DNA onarım proteinleri ile etkileşim, trabektedinin antiproliferatif aktivitesinin ayırt edici özelliği olarak görünmektedir. Aktif transkripsiyonun inhibisyonu, RNA polimeraz II ile etkileşimi içeren, böylece proteazom tarafından ubiquitinasyonunu ve bozunmasını indükleyen bir ilk doğrudan mekanizma ile sağlanır. Bu daha sonra tümör ve tümörle ilişkili makrofajlar tarafından sitokinlerin ve kemokinlerin üretimini modüle eder. Aktive edilmiş transkripsiyon üzerindeki bir başka ilginç etki, onkojenik transkripsiyon faktörlerinin hedef promotörlerinden yer değiştirmesi aracılığıyla gerçekleşir ve böylece onkojenik sinyalleşme bağımlılığı etkilenir. Ek olarak, transkripsiyon-bağılı nükleotid eksizyon onarımı ve homolog rekombinasyonu içeren DNA onarım sistemlerinin, trabektedinin antitümör aktivitesinde rol oynadığı iyi bilinmektedir (Cuevas ve Francesch, 2009; Larsen vd., 2016).

Trabektedin, tek başına veya kombinasyon halinde, kanser türlerinde etkili olduğu görülmüştür. Mevcut veriler trabektedinin etki mekanizmasının

kanser tedavisi için yeni terapötik stratejiler tasarlamak için kullanılabileceğini göstermektedir.

2.5. Nanopartiküler İlaç Taşıma Sistemleri

Nanopartiküller (NP'ler), genel olarak, daha iyi ilaç dağıtımı için kullanılabilen ve ilacı bir vezikül içinde kapsülleyerek veya ilaç moleküllerini bir matris içinde dağıtarak hazırlanabilen, 1000 nm'den küçük koloidal parçacıklardır.

Nanopartiküler ilaç dağıtım sistemleri, son yıllarda, özellikle tümör ve beyin hedeflemede, mekansal ve zamansal dağıtım için kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. NP'ler, hem farmasötik hem de klinik araştırmalarda bulunduğu gibi, daha iyi ilaç dağıtımı için büyük umut vaat etmektedir. NP'ler bir ilaç taşıyıcısı olarak daha iyi biyoyararlanım, sistemik stabilite, yüksek ilaç yükleme, uzun kan dolaşım süresi ve daha uzun yarılanma ömrü ile organlarda/dokularda seçici dağılım gibi önemli avantajlara sahiptir.

Pek çok nanopartikülün, fiziksel yapıları ve küçültülmüş boyutları nedeniyle gelişmiş farmakokinetik özelliklere sahip olduğu düşünülmektedir; parçacık tipine bağlı olarak seçici eylem için istenilen hücreleri hedefleyebilirler. Bu parçacıklar, hedef hücrelere kolayca nüfuz edebilir ve diyabet, kanser ve böbrek hastalıkları gibi yaşam boyu süren hastalıkların tedavisinde faydalı olabilecek hücresel süreçleri değiştirmek için hücre altı yapılarda birikebilir. Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler ile tedavilerde fazla ilaç miktarı kullanımının önüne geçilirken bir diğer yandan istenilen dokuya istenilen miktarda tedavi olanağı sunmuş olmaktadır.

2.5.1. Lipid Nanopartiküller

Nanoemülsiyonlar o/w gibi, lipid nanoparçacık dispersiyonları, yüzey aktif madde ile stabilize edilmiş, bir iç lipid fazı ve bir dış sulu faz içeren heterojen sistemlerdir. Bununla birlikte, nanoemülsiyonların aksine, lipid nanopartiküller bir iç katı lipid fazına sahiptir, çünkü bu nanopartiküller tamamen veya oda sıcaklığında katı olan lipidlerden oluşur. Bu katı matris, kapsüllenmiş moleküllerin kontrollü salınımına izin verir ve onları bozunmaya karşı korurken, sistemin uzun vadeli stabilitesini artırır. Lipid nanopartikül dispersiyonları yüzey aktif maddeler tarafından stabilize edildiğinden ve deri penetrasyonunu arttırıcı etkileri de görülmüştür (Garcês vd., 2018).

İki tür lipid nanopartikül, SLN ve NLC, iç yapılarına göre sınıflandırılır. SLN ilk olarak geliştirilmiştir ve sadece katı lipid içermektedir. NLC ise SLN'den sonra geliştirilen, katı ve sıvı lipidlerin bir içeren karışımdan oluşmaktadır. Lipozomlar da lipid nanopartiküller sınıfına girmektedir.

Lipid nanopartiküller genellikle sıcak veya soğuk homojenizasyon ile üretilir. Yüksek basınçlı homojenizasyon, lipid NP'lerin hazırlanması için güvenilir ve güçlü bir teknik olarak ortaya çıkmıştır. Sıcak homojenizasyon işleminin kendisi de NP'lerin özelliklerini belirler. Basınç, döngü sayısı, işleme ve soğutma sıcaklığı gibi parametreler, yüksek yük ve sürekli salım özelliklerine sahip, agregasyona dayanıklı partiküllerin geliştirilmesi için kritik öneme sahiptir (Gutiérrez vd., 2013).

2.5.1.1. Lipozomlar

Lipozomlar, plazma zarının lipid çift tabakasını taklit eden fosfolipidlerden oluşur. Lipozomların fosfolipid bileşeni, kutup başı ve hidrofobik kuyruğu olan amfifiliktir. Hidrofilik grupları, her ikisi de sulu bir ortamda hidrojen bağları oluşturabilen oksijen içeren bir fosfat grubu ve gliserolden oluşur. Öte yandan hidrofobik grup, başka bir bitişik fosfolipidin hidrofobik kuyruğu ile hizalanan uzun zincirli yağ asidinden oluşur ve bu şekilde oluşturulan çift tabakada polar olmayan hidrofobik ilaçları tutabilen hidrofobik bir çekirdek oluşturur. Lipozomal yüzey kimyasının plazma membranınıniki ile uyumluluğu, lipozomun, reseptör aracılı endositoz yoluyla veya plazma membranı ile füzyon yoluyla membran invajinasyonu ve içselleştirilmesi yoluyla içselleştirildiği hücre zarına lipozomun adsorpsiyonuna izin verir (Yusuf vd., 2023). Boyutları ve hidrofobik ve hidrofilik karakterleri nedeniyle (biyouyumluluğun yanı sıra), kozmetik ve farmasötik endüstrilerinde çok sayıda molekül için taşıyıcı olarak kullanılmaktadırlar.

Lipozomlar, biyouyumlulukları, biyolojik olarak parçalanabilirlikleri, düşük toksisiteleri ve hem hidrofilik hem de lipofilik ilaçları içerebilme ve tümör dokularında bölgeye özgü ilaç salımını basitleştirmelerinden dolayı lipozomlar önemli araştırma konusudur (Alavi vd., 2017).

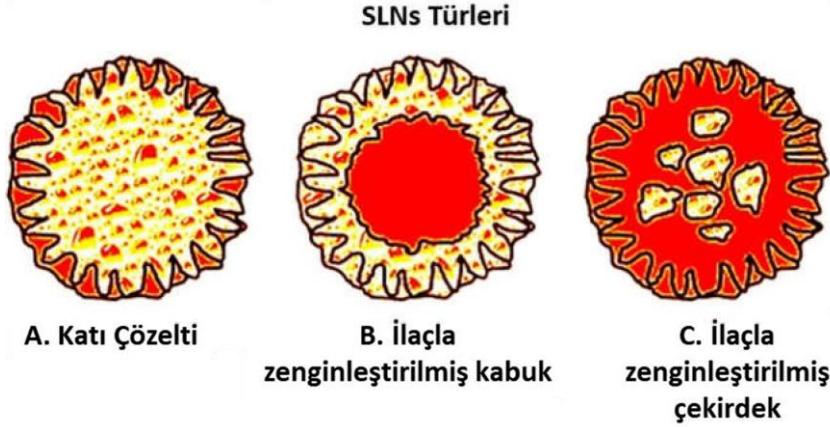
Lipozom boyutu, bir veya iki katmanlı katmanlarına göre sınıflandırılırlar. Vezikül boyutu, lipozomların sirkülasyon yarı ömrünün belirlenmesinde önemli bir parametredir. Boyutları ve çift katmanlı sayıları temelinde, lipozomlar iki kategoriden birinde sınıflandırılabilir: çok katmanlı

veziküller (MLV) ve tek katmanlı veziküller. Tek katmanlı veziküller ayrıca iki kategoriye ayrılabilir: büyük tek katmanlı veziküller (LUV) ve küçük tek katmanlı veziküller (SUV). Tek katmanlı lipozomlarda vezikül, sulu çözeltiyi çevreleyen tek bir fosfolipid çift katmanlı küreye sahiptir. Çok katmanlı lipozomlarda veziküller soğan yapısına sahiptir (Ortega vd., 2017).

2.5.1.2. Katı Lipid Nanopartiküller

Katı lipid nanoparçacıkları (SLN), 1990'larda emülsiyonlara, lipozomlara ve polimerik nanoparçacıklara alternatif bir taşıyıcı sistem olarak geliştirilmiştir. SLN, bir o/w emülsiyonunun sıvı lipidinin (yağ) bir katı lipid veya katı lipidlerin bir karışımı ile değiştirilmesiyle üretilir, yani lipid parçacık matrisi hem oda hem de vücut sıcaklığında katıdır. SLN, sulu bir ortamda dağılmış %0,1 ile %30 oranlarında katı lipidden oluşur ve gerekirse tercihen %0,5 ile %5 oranında yüzey aktif madde ile stabilize edilebilmektedir. Kozmetik ve farmasötik aktiflerin dahil edilmesi mümkündür. SLN'nin ortalama parçacık boyutu, yaklaşık 40 ila 1000 nm arasında değişen mikron altı bir aralıktadır (Pardeike vd., 2009). SLN'nin partiküllü doğası, hidrofilik ve hidrofobik ilaçları kapsüllemeye yatkınlık, dahil edilen ilacın salımını sürdürme yeteneği, ilacın kimyasal, fotokimyasal veya oksidatif bozunmasını önleme yeteneği, ilacı katı matris içinde immobilize etme kabiliyeti, kolaylık gibi çeşitli avantajları vardır. Fosfolipidler ve biyobozunur polimerlerle karşılaştırıldığında katı lipidlerin ölçek büyütmesi ve üretimi ve düşük maliyeti, SLN'ye daha önce bahsedilen koloidal taşıyıcılara göre bir avantaj sağlar (Joshi ve Müller, 2009). Bir aktif bileşenin SLN'ye dahil edilmesi, kimyasal yapısına, lipid matrisinin bileşenlerine ve üretim parametrelerine bağlıdır. Literatürde, aktif bileşenin lipid çekirdeği içindeki konumuna ve dağılımına dayalı olarak üç birleşme modeli önerilmiştir. SLN tip I veya homojen matriks modelinde, aktif bileşen lipid çekirdeğinde moleküler olarak dağılmıştır veya amorf kümeler halinde bulunur. SLN tip II veya ilaçla zenginleştirilmiş kabuk modeli, aktif bileşenin lipid fazındaki çözünürlüğü su fazındakinden daha düşük olduğunda elde edilir. Bu sınırlı çözünürlük nedeniyle, nanoemülsiyon oda sıcaklığına kadar soğutulduğunda ilaç içermeyen veya ilacı azaltılmış bir lipid çekirdek oluşur ve bu da ilaçla zenginleştirilmiş bir kabuk oluşumuna yol açar. Bu SLN modeli için, aktif bileşen esas olarak nanopartikül yüzeyinde bulunduğundan, kısa difüzyon

mesafesi hızlı bir ilk salımla sonuçlanır. SLN tip III veya ilaçla zenginleştirilmiş çekirdek, aktif bileşen konsantrasyonu eritilmiş lipidteki doygunluk çözünürlüğüne yakın veya bu değerde olduğunda oluşur. Soğutma sırasında, lipid yeniden kristalleşmeden önce aktif bileşen çöker, bu da aktif bileşenin erimiş lipid içinde aşırı doygunluğuna yol açar; daha fazla soğutma, aktif bileşeni kaplayan bir lipid kabuğunun oluşmasıyla sonuçlanır. Mekanizması katı lipid matriksindeki aktif bileşenin hareketliliği tarafından kontrol edilen bu SLN tipi için hızlı bir başlangıç salımı ve ardından daha kademeli bir salım gözlenir. Aktif bileşenin SLN matriksindeki konumunun yanı sıra, salım mekanizması lipid matriksinin polimorfik durumu, yüzey aktif maddenin türü ve konsantrasyonu ve üretim koşulları gibi diğer parametrelere de bağlıdır (De Souza Guedes vd., 2021; Ganesan ve Narayanasamy, 2017; Souto vd., 2007).



Şekil 2.16. SLN türleri (Ganesan ve Narayanasamy, 2017)

Salım mekanizması yüzey aktif maddenin türüne ve konsantrasyonuna bağlıdır. Yüzey aktif madde ile nanopartiküllerin dış yüzeyi arasındaki etkileşim SLN yapısını ve konsantrasyonunu ilk salımının kapsamını etkiler, örneğin düşük yüzey aktif madde konsantrasyonu minimum salıma yol açarken, daha yüksek yüzey aktif madde konsantrasyonu salım etkisini artırır. SLN koloidal bir taşıyıcı olarak çeşitli avantajlar göstermiş olsa da, bu ilaç taşıyıcı sisteminin bazı sınırlamaları vardır. Örneğin, moleküllerin yerleşimi için çok az yer sağlayan yoğun şekilde paketlenmiş kristal ağ nedeniyle düşük yükleme kapasitesi, polimorfik dönüşümün daha kararlı bir kristal forma dönüşmesinin bir sonucu olarak depolama sırasında aktif içeriğin dışarı atılması, alternatif koloidal yapıların varlığı, ilaç salımının ayarlanması ve depolama sırasında

ilacın dışarı atılması gibi SLN ile ilgili problemler NLC ile önlenabilmektedir (Fang vd., 2008).

2.6. Nanoyapılı Lipid Taşıyıcılar (NLC)

SLN'nin olumsuz özelliğinin üstesinden gelmek için bir NLC sistemi üretildi. NLC'ler, uzamsal olarak farklı lipid moleküllerinin bir karışımından, normalde sıvı lipid ve katı karışımından oluşur ve bu, katı lipid nanopartiküllerden daha fazla ilaç molekülünü dahil etmek için matriste daha fazla düzensizlik oluşturur. Sıvı lipid varlığına rağmen, NLC matrisi vücut/oda sıcaklığında katıdır. NLC'ler sıvı lipid ve katı lipid karışımlarını içerir ve sıvı lipid içeriğini kontrol ederek katı halde kalır. NLC'ler, emülsiyonlara kıyasla ilaçları daha kuvvetli bir şekilde hareketsiz hale getirebilir ve partikülün katı matris tarafından birleşmesini önleyebilir. NLC'ler ayrıca, düşük toksisite, biyolojik bozunma, ilaç koruması, yavaş salınım ve üretimde organik çözücülerden kaçınma dahil olmak üzere SLN'lerin avantajlarına sahiptir (Gaba vd., 2015).

2.6.1. NLC Türleri

NLC'ler üç türden oluşmaktadır. Tip I NLC: Kusursuz kristal modeli olarak adlandırılır ve boşluklu yapıya sahip bir matristen oluşur. Bu parçacıklar, katı lipidler yeterli miktarda sıvı lipidler ile karıştırıldığında elde edilir. Yağ asidinin farklı zincir uzunlukları ve mono-, di- ve triağılglicerollerin karışımı nedeniyle, NLC matrisi oldukça düzenli bir yapı oluşturamaz ve bu nedenle kullanılabilir boşluklar (yapısal kusurlar) yaratır.

Tip II NLC: Yapısız katı amorf matrise sahip NLC türüdür. Nanoemülsiyonun homojenleştirilmesi ve soğutulmasından sonra yeniden kristalleşmeyen özel lipidlerin (izopropil miristat, dibütil adipat, hidroksil oktakozanil hidroksi stearat) karıştırılmasıyla elde edilir. Bu lipidler amorf matrisler oluşturur ve böylece depolama süresi boyunca salımı en aza indirir.

Tip III NLC: Lipofilik ilacın sıvı lipidlerde çözünürlüğü, katı lipidlerde olduğundan daha yüksektir. Bu ilke, çoklu tip NLC'yi geliştirmek için kullanılmıştır. Bu tip NLC'de, katı lipidlerde daha yüksek miktarda yağ içermektedir. Düşük konsantrasyonlarda, yağ molekülleri kolayca lipid matrisine dağılır. Çözünürlüğünü aşan yağ içeriği, katı lipid matrisi ile çevrili küçük yağlı nano-bölmeler üreten faz ayırmasına yol açar. Bu tür modeller

kontrollü ilaç salımına izin verir ve lipid matrisi ilaç sızıntısını önler. Lipofilik ilaçlar yağlarda çözünebilir ve sıcak homojenleştirme işleminin soğutma işlemi sırasında çok sayıda NLC tipi oluşabilmektedir (Gaba vd., 2015; Ganesan ve Narayanasamy, 2017; Iqbal vd., 2012a).



Şekil 2.17. NLC türleri (Ganesan ve Narayanasamy, 2017)

2.6.2. NLC Sentez Metodları

NLC'lerin üretimi için çeşitli formülasyon teknikleri mevcuttur. Teknikler; çift emülsiyon, emülsifikasyon-sonifikasyon, yüksek basınçlı homojenizasyon, mikroemülsiyon, prob sonikatörü, solvent difüzyonu, solvent emülsifikasyon-buharlaştırma, solvent enjeksiyonu/solvent yer değiştirmesi ve faz ters çevirme.

Farklı üretim yöntemlerindeki değişikliklerle çeşitli fiziksel yöntemler, nanopartiküllerin kontrollü sentezi için temel olmuştur. Bu yöntemlerin ayırt edici özellikleri, enerji gereksinimleri, çok daha az tehlike oluşturma derecesi, uygulanabilirlik ve fizibilite kolaylığı ve daha yüksek verim potansiyeli arasında değişmektedir. Formülasyon tekniklerinden yüksek basınçlı homojenizasyon ve mikroemülsiyon teknikleri, endüstriyel üretim ölçeğine ölçeklendirme için güçlü bir potansiyel gösterdiği görülmüştür (Gaba vd., 2015).

2.6.2.1. Yüksek Basınçlı Homojenizasyon Yöntemi

Yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemi, önemli bir tekniktir. Yüksek basınçlı homojenizatörler, yüksek basınçta (100–2000 bar) bir sıvıyı mikron boyutlu boşluktan iter: yüksek basınç uygulayarak, sıvı yüksek hıza (1000 km/s'in üzerinde) çıkar ve bunun sonucunda kayma gerilimi oluşur ve bunun sonucunda partiküller mikron altı boyuta düşmektedir (Mehnert ve Mäder, 2012). Yüksek sıcaklıkta veya oda sıcaklığının altında sıcak/soğuk homojenizasyon gerçekleştirilebilir. Her iki durumda da ilaç, erime noktasının yaklaşık 10 °C üzerinde erimiş lipid içinde çözülür.

2.6.2.2. Sıcak Homojenizasyon Yöntemi

Sıcak homojenizasyon yönteminde ise lipidin erime sıcaklığının üzerindeki sıcaklıklarda kullanılır. Burada lipid ve ilaç eritilir ve aynı sıcaklıkta sulu bir yüzey aktif madde ile birleştirilir. Ultrasonikasyon cihazı kullanılarak sıcak bir ön emülsiyon oluşturulur. Genellikle, bir sıcak koloidal emülsiyon üretmek üzere ön emülsiyonu homojenleştirmek için bir homojenizatör kullanılır. Sıcak koloidal emülsiyonun damlacıkları, NLC'ler üretmek için emülsiyonun oda sıcaklığına soğutulmasıyla yeniden kristalleştirilir (Bunjes vd., 1996).

2.6.2.3. Soğuk Homojenizasyon Yöntemi

Soğuk homojenleştirme, sıcak homojenleştirme tekniğinin; sıcaklığa bağlı ilaç bozunması, homojenleştirme sırasında sulu faza ilaç dağılımı, kristalizasyon adımının karmaşıklığı gibi sorunlarının üstesinden gelmek için geliştirilmiştir. Soğuk homojenizasyonda, sıcak homojenizasyona benzer şekilde gerçekleşmektedir. Sadece soğuk homojenizasyon, sıcak homojenizasyonun aksine katı lipidlerin homojenizasyonunu içerir. Katı lipidlerin bu dağılımı, yüksek enerji girişi gerektirir ve bu da sert homojenizasyon koşulları gerektirmektedir.

2.6.2.4. Yüksek Hızı Homojenizasyon ve Ultrasonikasyon Yöntemi

Lipid nanopartikül dispersiyonları, erimiş lipidin yüzey aktif maddeler içeren sıcak sulu fazda yüksek hızda homojenizasyon ve ardından ultrasonikasyon işlemi ile dağıtılmasıyla elde edilir. Bu yöntem öncelikle katı bir lipidin erime noktasının yaklaşık 5–10 °C üzerine ısıtılmasını içerir. Lipid karışımı, bir emülsiyon oluşturmak üzere yüksek hızlı karıştırma altında aynı sıcaklıkta sulu bir yüzey aktif madde çözeltisi içinde karıştırılır. Sonraki sonikasyon, emülsiyonun damlacık boyutunu azaltır. Erime noktası üzerinde hazırlanan emülsiyonun lipidin kristalleşme sıcaklığının altına kademeli olarak soğutulması, bir lipid nanopartikül dispersiyonu verir. Konsantre lipid nanopartikülleri ultrasantrifüjleme ile elde edilebilir (Ganesan ve Narayanasamy, 2017).

2.6.2.5. Çift Emülsiyon Yöntemi

NLC'nin hazırlanmasındaki çift emülsiyon tekniği, hidrofilik olarak aktif farmasötik bileşenler ve peptidler için uygundur. Bu yöntemde, ilacın sulu bir

solüsyonu, birincil w/o emülsiyonunu oluşturmak için eritilmiş lipid solüsyonunda emülsifiye edilir. Bu teknikle nispeten büyük partiküller elde edilir, ancak hidrofilik moleküllerin dahil edilmesinin yanı sıra, PEG gibi moleküller ile yüzey modifikasyonu imkanı sunmaktadır.

2.6.2.6. Solvent Enjeksiyon Yöntemi

Solvent enjeksiyon yönteminin temel prensibi solvent difüzyon yöntemine benzemektedir. Solvent enjeksiyon yönteminde, lipidler suyla karışabilen bir çözücü veya suyla karışabilen çözücü karışımı içinde çözülür. Ardından bir enjeksiyon iğnesi aracılığıyla sulu bir yüzey aktif madde çözeltisine hızla enjekte edilir. NLC'lerin oluşumu suya kademeli çözücü eklenmesi ile partikül boyutunun azalmasına neden olurken aynı zamanda lipid konsantrasyonu da artışı ile gerçekleşmektedir.

2.7. İlaç Hedefleme

Çoğu kanser için mevcut tedavi stratejileri, kemoterapi, radyasyon tedavisi ve cerrahi operasyonların bir kombinasyonunu içerir. Bu tedavi stratejileri seçici değildir ve bu nedenle önemli morbidite ve mortaliteye neden olmaktadır. Bu tedavi yöntemlerinin yanı sıra kemoterapötik ajanlar sıklıkla çalışmalara konu olmaktadır. Fakat bu kemoterapötik ajanlarla ilgili en büyük sıkıntı sağlıklı ve kanserli doku arasında ayırım yapamamalarıdır. Bu ayırımı yapamamaları hastalar açısından vücutta hızlı büyüme gösteren hücreler içeren yumuşak dokular ya da saç gibi zarar görmesine yol açmaktadır. Diğer bir endişe içeren konu ise kemoterapötik ilaçların kontrollü bir şekilde salım gerçekleştirebilmesi için uygun bir ilaç miktarı ve yüksek oranda belirlenen ilaç verme sistemi ile tedavi süreci ilerlemelidir. Buradaki en büyük sorunlardan biri ilacın hasta üzerinde yarattığı yan etkilerin minimum seviyede olması için ilacın güvenli ve tedavi için gerekli olan optimum miktarlarında verilmesi gerekmektedir. Bu zararlı etkilerin ortadan kalkması ve optimum koşullarda fayda elde edebilmek için, kemoterapötik ajanların hedeflenen dokuya yönelik ve kontrollü bir şekilde salım profili göstermesi çok büyük önem taşımaktadır (Zein vd., 2020).

İlaç hedefleme, tümörlü dokulara erişebilmek ve normal dokulara kemoterapötik ajan penetrasyonunu önlemek için önem taşımaktadır. Şu anda çeşitli deneysel çalışmalarda araştırılan başlıca ilaç hedefleme stratejileri şunları

içerir: (a) ilacın hedef bölgeye doğrudan uygulanması; (b) sızdıran vaskülatür yoluyla ilacın pasif birikimi; (c) tümör veya iltihaplanma (pH ve sıcaklığa duyarlı ilaç taşıyıcıları) gibi hedef bölgedeki anormal pH veya sıcaklığa dayalı fiziksel hedefleme; (d) harici manyetik alanın etkisi altında paramanyetik taşıyıcılara bağlı ilaçların manyetik olarak hedeflenmesi; (e) etkilenen bölgeye karşı yüksek özgül afiniteye sahip vektör moleküllerinin kullanımı. Yukarıda sayılan hedefleme stratejilerinden (c) ve (d) durumları birlikte 'fiziksel hedefleme' olarak değerlendirilebilmektedir. Temel olarak ilaç hedefleme fiziksel, aktif ve pasif hedefleme olarak üçe ayrılmaktadır (Alavi ve Hamidi, 2019; Rahim vd., 2021).

2.7.1. Fiziksel Hedefleme

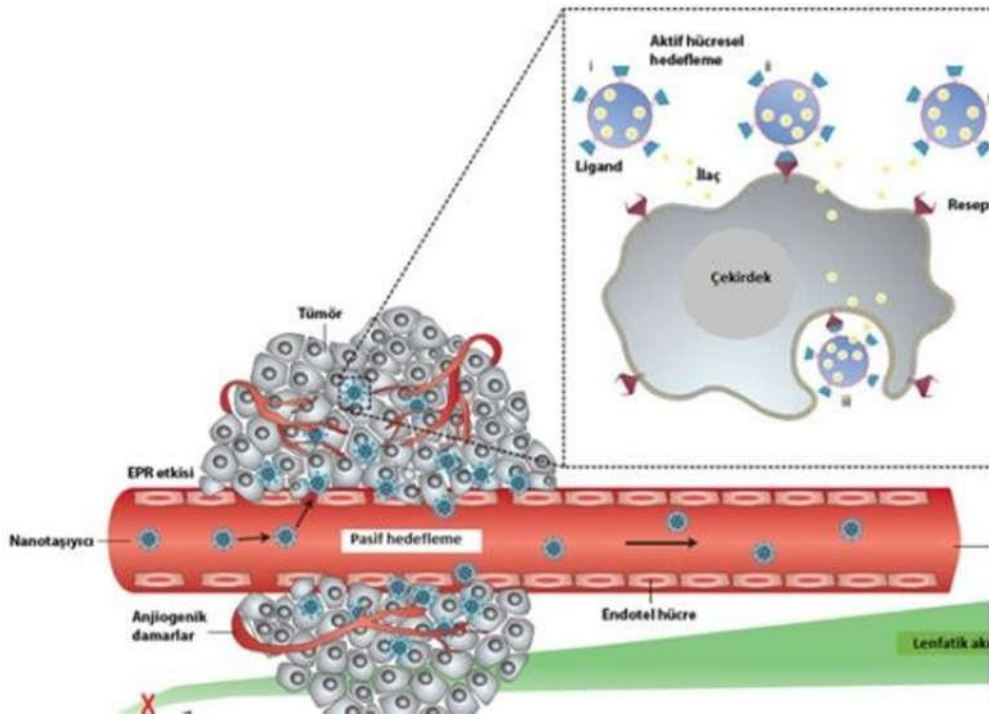
Hedeflenen ilaç dağıtımına aracılık edebilen fiziksel faktörler, endojen ve egzogen olabilmektedir. Fiziksel hedeflemede temel patolojik bölgenin sıcaklık veya pH gibi belirli özelliklerde normal dokulardan farklı olduğu gerçeğine dayanmaktadır. Bu nedenle, iltihaplı bölgelerin asidik karakterde ve hipertermi gösterdiği bilinmektedir. Bu, normal dokulara göre daha düşük pH değerlerinde veya daha yüksek sıcaklıklarda parçalanarak hapsolmuş ilacı serbest bırakabilme yeteneğine sahip belirli uyaranlara yanıt veren ilaç taşıyıcılarının kullanılmasını mümkün kılmaktadır. Taşıyıcı, yalnızca ilacın salınacağı ve birikeceği hedef alanda parçalanacaktır.

Kanserli dokunun mikroçevresine ait özellikler dışında fiziksel harici bir güç ile de hedefleme gerçekleştirilmektedir. Bunun en büyük örneği manyetik ilaç hedeflemesidir. Manyetik hedeflemede kemoterapötik ajan, ferromanyetik özelliklere sahip bir taşıyıcı sisteme immobilize edilmektedir. Manyetik parçacıkların konsantrasyon olma yeteneği, hem kan akış hızına hem de manyetik alanın yoğunluğuna bağlı olduğundan daha düşük kan akış hızına sahip daha küçük kan damarlarında verimli ilaç birikimi, çok hızlı kan akışına sahip merkezi damarlara göre daha yüksektir. Bu özellikler fiziksel hedeflemeyi desteklemektedir (Torchilin, 2000).

2.7.2. Pasif Hedefleme

Pasif hedefleme, tümörün ve normal dokunun farklı özelliklerini kullanan bir hedefleme stratejisidir. Pasif hedeflemede, ilaçlar hedef bölgeye başarılı bir şekilde iletilmektedir. Kanser hücrelerinin artışı ile vasküler

duvardaki büyük gözenekler, normal damarlara kıyasla tümör damarlarının geçirgenliğinin kötüleşmesine yol açar. Hızlı ve kusurlu anjiyogenez, makromoleküllerin ve NP'lerin tümörü besleyen kan damarlarından sızmasına ve tümör dokusu içinde birikmesine olanak tanımaktadır. Bu arada, kanserle ilişkili zayıf lenfatik drenaj, nano-taşıyıcıların içeriklerini tümör hücrelerine salmasına izin vererek NP'lerin tutulmasını arttırmaktadır. Bu süreçler, pasif hedeflemenin itici güçlerinden biri olan artırılmış geçirgenlik ve tutma (EPR) etkisine neden olur. EPR etkisi, nanopartikül boyutu ile ilişkilidir. Küçük boyuta sahip nanopartiküller daha etkin bir pasif hedefleme gerçekleştirmektedir (Clemons vd., 2018).

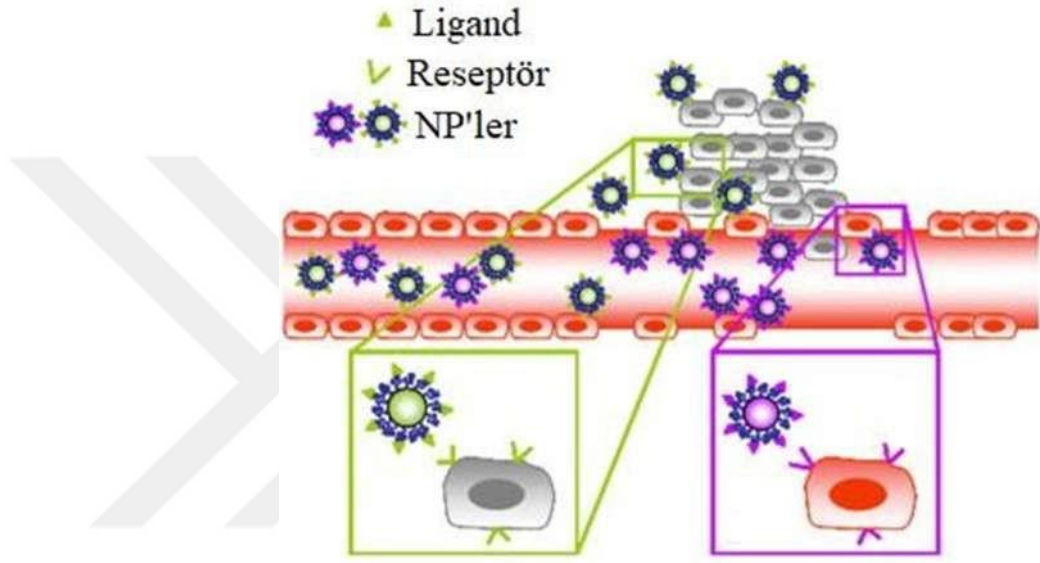


Şekil 2.19. Pasif Hedeflendirme (Peer vd., 2007)

2.7.3. Aktif Hedefleme

Tümörlü doku veya organ hem sağlıklı hem de kanser hücrelerini bir arada içerdiğinden dolayı, hedeflendirmede sağlıklı hücre ile kanserli hücrenin ayırt edilmesi büyük önem taşımaktadır. Aktif hedefleme, ligandlar ve reseptörler arasındaki doğrudan etkileşimler yoluyla spesifik olarak belirlenen bölgedeki kanser hücrelerini hedefler. NP'lerin yüzeyindeki ligandlar, kanser hücrelerinin yüzeyinde aşırı eksprese edilen molekülleri hedeflemek üzere seçilir ve bu hedefleme, hücreleri sağlıklı hücrelerden ayırt etmelerine olanak

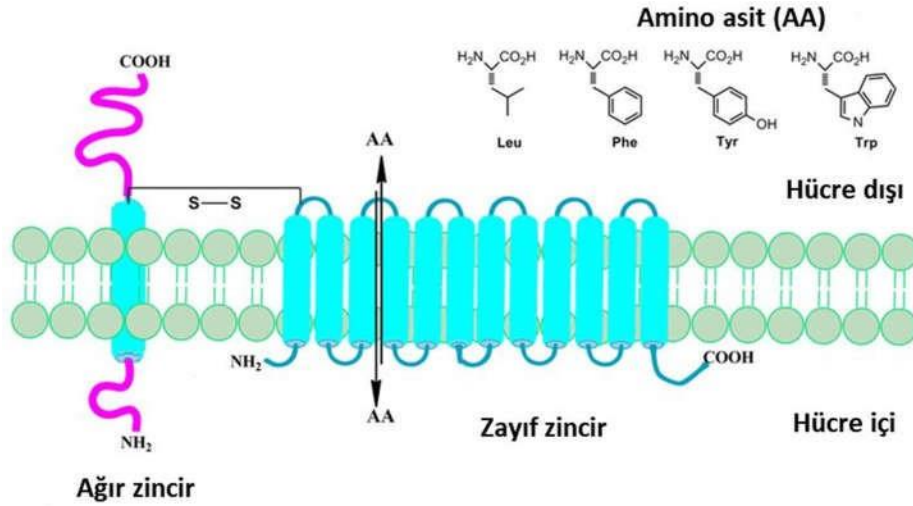
tanır. Aktif hedeflemede, sağlıklı hücelere kıyasla kanserli hücelerde daha fazla miktarda bulunan reseptörler ile etkileşerek istenen dokuda etki göstermektedir. NP'ler üzerindeki ligandlar ile kanser hücrelerinin yüzeyindeki reseptörler arasında gerçekleşen etkileşim, NP'lerin terapötik ilaçları başarıyla salmasına izin veren reseptör aracılı endositozu indüklemektedir. Hedefleme parçalarının türleri arasında monoklonal antikolar, peptitler, amino asitler, vitaminler ve karbonhidratlar bulunmaktadır (Raj vd., 2021; Yao vd., 2020).



Şekil 2.20. Aktif Hedeflendirme (Danhier vd., 2010)

2.8. L Tipi Amino Asit Taşıyıcısı 1 (LAT-1)

Kanserin önemli bir ayırt edici proliferatif sinyalleridir. Bu sinyaller, tümör hücrelerinin bölünmesini başlatarak, kontrolsüz bir şekilde hızlı büyümesinin gerçekleşmesi ile sonuçlanır. Hücrenin çoğalması yüksek oranda enerji gerektirir ve tümör mikroçevresindeki besinlerin varlığına bağlıdır. Bu besinlerin en önemlisi, tümörleri ve metastazları kanıtlamak için glukoz alım görüntülemesinin kullanılmasına yol açan glukozdur. Glukoz dışında, esansiyel amino asitler de hücre proliferasyonun da önemli rol oynamaktadır (Häfliger ve Charles, 2019). L tipi amino asit taşıyıcısı 1 (LAT1, SLC7A5 olarak da bilinmektedir), büyük nötr amino asitlerin, tiroid hormonlarının ve farmasötik ilaçların plazma zarı boyunca pH'tan ve sodyumdan bağımsız taşınmasına aracılık etmektedir (Yan vd., 2021).



Şekil 2.21. LAT1 ve substratlarının gösterimi (Ikotun vd., 2013).

LAT-1, hücresel büyüme, proliferasyon ve bakım gibi temel hücrenin ihtiyaç duyduğu faaliyetler için gerekli olan dallı veya aromatik amino asitleri taşır. Bu amino asit taşıyıcısı, normal dokulardaki sınırlı dağılımı ve düşük seviyeli ekspresyonunun aksine, kanser hücrelerinde aşırı eksprese olabilmektedir (Higuchi vd., 2019). Tirozin aminoasiti LAT-1 substratlarından biridir. Pocasap ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada L-tirozinin klorambusil ile bağlanmasıyla elde edilen konjugatın LAT-1 hedeflemesinde hücresel alım ve antiproliferatif deney sonuçlarına göre tirozinin önemini vurgulanmaktadır (Pocasap vd., 2020). 2019 yılında yapılan bir çalışmada LAT1 ekspresyonunun, kanser ilerledikçe arttığı, yüksek dereceli tümörlerde ve metastazlarda daha yüksek ekspresyon seviyelerine yol açtığı görülmüştür. Ek olarak, LAT1, tümör hücrelerine esansiyel amino asitler sağlayarak kanserle ilişkili yeniden programlanmış metabolik ağlarda çok önemli bir rol oynadığı da gösterilmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1 Materyal

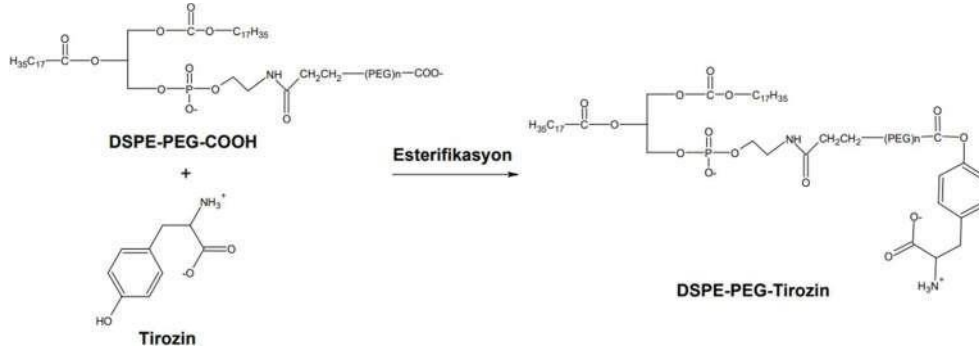
L-Tirozin, N,N-dimetil aminopiridin (DMAP), dimetil sülfoksit (DMSO), disikloheksil karbodiimid (DCC), Tween 80, miristik asit ve tatlı badem yağı (Prunus dulcis'den elde edilen) Sigma Aldrich markasından temin edilmiştir. 1,2-distearoil-sn-gliserol-3-fosfoetanolamin-N-[karboksi(polietilen glikol)-2000] (sodyum tuzu) (DSPE-PEG2000-COOH) Biochempeg firmasından satın alınmıştır. Doksorubisin-HCl (CAS 25316-40-9) Chemos firmasından; Trabektedin (CAS 114899-77-3) BOC Sciences firmasından temin edilmiştir. Deneyde kullanılan cihazlar ise hassas terazi (Ohaus), viskozimetri (Brookfield DV-II+Pro, İzmir Ege Üniversitesi İlaç Geliştirme ve Farmakokinetik Araştırma- Uygulama Merkezi(ARGEFAR)), çoklu ısıtıcılı manyetik karıştırıcı (Velp Scientifica), mekanik karıştırıcı (WiseStir HS-100D), Taramalı elektron mikroskobu (SEM)(Kritik Nokta Kurutucu Leica EM CPD300, Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi (MATAL)), pH metre (HANNA Edge), Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) (TA Instruments Q20 DSC, Ege Üniversitesi MATAL), santrifüj (Sigma, 2-16KL), Zetasizer (Malvern Panalytical ZSU3305, İzmir Ege Üniversitesi ARGEFAR), Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)(İzmir Ege Üniversitesi ARGEFAR), stabilite kabinleri (Nüve TK 600, İzmir Ege Üniversitesi İlaç Geliştirme ve Farmakokinetik Araştırma-Uygulama Merkezi), su banyosu (Mettler), orbital karıştırıcı (Heidolph Unimax 1010), UV-Vis spektrofotometre (Agilent Technologies Cary 60 UV-Vis), santrifüj (Hettich 1204).

3.2. Metot

3.2.1. DSPE-PEG-Tirozin Bileşiğinin Sentezlenmesi

L-aminoasit transporterların substratı ile etkileşime girerek transporter yapabilmesi için serbest amino ve karboksil gruplarının substratlarda korunmuş olması gerektiği görülmektedir (L. Li vd., 2016). Bu sebeple ligand olarak

tirozin aminoasidinin hidroksil grubu ve DSPE-PEG-COOH ile reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Esterifikasyon reaksiyonu için 2004 yılında yapılan çalışmada uygulanan yöntem temel alınmıştır (Jiao vd., 2004). 0,05 mmol L-tirozin distile su (d-su) içerisinde 3 M hidroklorik asit (HCl) çözeltisinden eklenerek, ısıtma koşulları altında çoklu manyetik karıştırıcıda çözülmüştür. İçerisine d-suda çözülmüş 0,025 mmol DMAP eklenmiştir ve 30 dakika boyunca oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Ayrıca 0,01 mmol DSPE-PEG-COOH ultrasonikör ile d-su ortamında çözülmüştür. 0,01 mmol DCC ve 1 mL d-su: DMSO (1:1, v/v) ortamında çözülmüştür. DSPE-PEG-COOH çözeltisine DCC çözeltisi eklenmiş ve orbital karıştırıcıda oda sıcaklığında 400 rpm'de 30 dakika karıştırılmıştır. Sonunda hazırlanan DSPE-PEG-COOH ve DCC çözeltisi karışımı tirozin ve DMAP çözeltisi karışımına eklenmiştir. Oluşan çözelti 2 gün boyunca oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Sentezlenen DSPE-PEG-tirozin bileşiği MWCO 2000 Da diyaliz membranı ile 24 saat oda sıcaklığında, d-suya karşı diyaliz edilmiştir. Bu aşamada senteze katılmayan maddelerin diyaliz ile uzaklaştırılması amaçlanmıştır. Diyaliz sonrasında konjugat 50 °C'de etüvde kurutularak sonraki deney ve analizler için +4 °C'de saklanmıştır. DSPE-PEG-COOH ile Tirozin arasında meydana gelen reaksiyon Şekil 3.1'de görülmektedir.



Şekil 3.1. DSPE-PEG-COOH ile Tirozin arasında gerçekleşen reaksiyon.

Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR); DSPE-PEG-Tirozin bileşiği ATR-FTIR cihazı ile analiz edilmiştir.

Nükleer manyetik rezonans (NMR); NMR analizleri için örnekler DMSO-d₆ içerisinde çözülmüştür. Ester oluşum reaksiyonunun olması için farklı çözgen ve sıcaklık denemeleri de uygulanmıştır.

3.2.2. Nanoyapılı Lipid Taşıyıcıların Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Nanoyapılı lipid taşıyıcılar katı ve sıvı yağlar ile sulu fazın farklı oranlarda kombinasyonu ile sentezlenmiştir (Borges vd., 2019; Hajipour vd., 2019; Pinto vd., 2018a). Miristik asit (14:0) katı yağ olarak tatlı badem yağı ise bitkisel kaynaklı bir sıvı yağ olarak, sürfaktan ise Tween 80 olacak şekilde kullanıldı. İlk olarak DSPE-PEG-Tirozin konjugatı ortama eklenmeden önce nanoyapılı lipid taşıyıcılar (NLC) hazırlanmaya ve farklı koşullarda sentez ortamı optimize edilmeye çalışılmıştır. Ağırlıkça lipid faz %4, Tween 80 %2,5 ve sulu faz %93,5 oranı ile sentez gerçekleştirilmiştir. 120 mg lipid (katı ve sıvı yağ ağırlığı), 75 mg Tween 80 ve 2,805 g d-su miktarı ile farklı katı ve sıvı yağ oranları denenmiştir. Ağırlıkça katı lipid/ sıvı lipid; 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 oranlarında denemeler yapılmıştır. Miristik asit ve tatlı badem yağı erime sıcaklıklarından yüksek olan 70 °C’de su banyosunda eritilmiştir. Tween 80 ‘in sulu çözeltisi hazırlanarak 70 °C’de inkübe edilmiştir. Aynı sıcaklık koşullarında lipid faz sulu fazın içerisine yavaşça eklenirken bir yandan yüksek hızlı homojenizatör ile 8000 rpm’de 10 dakika karıştırarak homojenize edilmiştir. Ardından 70°C sıcaklıkta prob-tip sonikatör ile %10 amplitud ve 55 saniye çalıştırma 5 saniye bekleme koşullarında 10 dakika boyunca dispersiyon işlemi yapılmıştır. Yapılar oda sıcaklığında soğutulduktan sonra kristalizasyon işlemi için +4 °C’de 24 saat bekletilmiştir (Luo vd., 2011). Karakterizasyon çalışmaları yapılarak optimum sentez koşulları belirlenmiştir.

Partikül boyut ve polidispersite indeksi

NLC’ler 0,22 µm por çaplı filtre membrandan d-su ile geçirilerek seyreltilmiştir. NLC bir miktar d-su eklenerek seyreltilmiş ve prob-tip sonikatör ile 1 dakika boyunca homojenize edilmiştir. Örnek zeta ölçümlerine uygun olması için 20.000 kat seyreltilmiştir. Partikül boyut ve polidispersite analizleri Sarstedt polystyrol/ polystyrene küvet, zeta potansiyel analiz ise Malvern DTS 1061 küvet kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Materyal absorpsiyonu için 0,001; çözücü refraktif indeksi için 1,33 değerleri kullanılmıştır (Eiras vd., 2017). Boyut ölçümleri için açı 90° olarak belirlenmiştir. Tüm ölçümler 3 tekrarlı olacak şekilde ve oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

Termal Gravimetrik Analiz (TGA)

Kurutulan NLC örneği, miristik asit, tatlı badem yağı ve Tween 80’nin sıcaklığa bağlı ağırlığının ve yapılarının değişiminin izlenmesi için TGA

analizleri gerçekleştirilmiştir. Azot gazı altında 30 °C-600 °C sıcaklıkları arasında, dakikada 10 °C sıcaklık artışıyla TGA analizleri yapılmıştır.

Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi

Kurutulan NLC ve miristik asitin DSC analizleri gerçekleştirilmiştir. Badem yağı, tween 80 ve fiziksel karışımının (NLC sentezi oranlarında miristik asit, badem yağı ve tween 80 içeren) DSC analizleri 10 °C/dk'lık bir tarama hızında 20-250 °C sıcaklık aralığında, azot gazı altında gerçekleştirilmiştir.

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

Örneğin morfolojisinin belirlenmesi için SEM analizi yapılmıştır. Su içerisinde disperse edilerek dilüe edilen NLC örneği uygun plakalara damlatılıp kurutulmuştur. Ardından Au/Pd kaplama yapılarak mikroskopta incelenmiştir.

3.2.3. LAT-1 Hedefli Nanoyapılı Lipid Taşıyıcıların Hazırlanması ve Karakterizasyonu

NLC için optimum sentez koşulları belirlendikten sonra LAT-1 hedeflendirebilme amaçlı yapılara DSPE-PEG-Tirozin konjugatı eklenmiştir. Bu amaçla 120 mg lipid (optimum olarak belirlenen 40 mg miristik asit ve 80 mg badem yağı), 75 mg Tween 80 ve 1, 2, 3 ve 5 mg konjugat ile toplam miktarı 3 g'a tamamlayacak şekilde d-su kullanılarak ile çalışmalar yapılmıştır. NLC sentezinde anlatıldığı gibi miristik asit ve tatlı badem yağı 70 °C'de su banyosunda eritildi. DSPE-PEG-Tirozin konjugatı da sulu fazda çözülerek Tween 80 'in sulu çözeltisine eklenmiştir. 70 °C'de çalışma koşullarında lipid faz sulu fazın içerisine yavaşça eklenerek yüksek hızlı homojenizatör ile 10 dakika karıştırılmıştır. Ardından yine aynı sıcaklıkta prob-tip sonikatör ile 10 dakika boyunca disperse edilmiştir. Yapılar oda sıcaklığına soğutulduktan sonra kristalizasyon amacıyla +4 °C'de 24 saat bekletilmiştir. Konjugat miktarının optimizasyonu için karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Optimum miktar belirlendikten sonra örneğin ileri analizleri yapılmıştır.

Partikül boyut, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel analizi

Hidrodinamik boyut, polidispersite indeksi (PDI) ve zeta potansiyel ölçümleri için DSPE-PEG-Tirozin konjugatı takılı nanoyapılı lipid taşıyıcılar (P-NLC) üzerine 7 mL d-su eklenmiştir ve prob-tip sonikatör ile 1 dakika boyunca homojenize hale getirdikten sonra 20.000 kat seyreltilmiştir. Analizler 3 tekrarlı

olarak gerçekleştirilmiştir.

FTIR analizi

FTIR analizi için P-NLC örneği etüvde 40 °C’de kurutulmuştur.

Termal gravimetrik analiz (TGA)

Kurutulan P-NLC ve DSPE-PEG-Tirozin örneklerini TGA analizi gerçekleştirilmiştir. Azot gazı altında 30°C- 600°C sıcaklıkları arasında, dakikada 10 °C sıcaklık arttırılmasıyla TGA analizleri yapılmıştır.

Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) analizi

Kurutulan P-NLC ve DSPE-PEG-Tirozin örneklerinin DSC analizleri gerçekleştirilmiştir.

Taramalı elektron mikroskopu (SEM) analizi

Su içerisinde disperse edilip dilüe edilen P-NLC örneği uygun plakalara damlatılıp kurutulmuştur. Ardından Au/Pd kaplama yapılarak mikroskopta SEM görüntüleri incelenmiştir.

3.2.4. LAT-1 Hedefli ve Doksorubisin ile Trabektedin Yüklü Nanoyapılı

Lipid Taşıyıcıların Hazırlanması ve Karakterizasyonu

DSPE-PEG-Tirozin konjugatı taşıyan NLC için optimum sentez koşulları belirlendikten sonra doksorubisin (Dox) ve trabektedin (Trb) yüklenme aşamasına geçilmiştir. Konjugat takılı NLC sentezi sırasında ortama enkapsüle edilecek olan etken maddeler, Dox ve Trb eklenmesi yoluyla nanotaşıyıcılara ilaç yükleme gerçekleştirilmiştir. Literatür çalışmalarında doksorubisin ile birlikte trabektedinin kullanıldığı oranlar dikkate alındığında trabektedin doksorubisine göre daha düşük konsantrasyonda olacak şekilde başlangıç ilaç miktarları hazırlanmıştır (Blay vd., 2008; Di Giandomenico vd., 2013; Germano vd., 2013). Etken maddelerin ışık duyarlılığı olduğu için çalışmalar sırasında ışık almayan koşullar oluşturulmasına dikkat edilmiştir. 120 mg lipid (katı ve sıvı yağ toplam ağırlığı) üzerine 100 µL DMSO içerisinde hazırlanan 2,5; 5; 7,5; 10 mg Dox ve 100 µL DMSO içerisinde hazırlanan 50; 100; 150; 200 µg Trb eklenerek 70 °C’de su banyosunda eritildi. 2 mg DSPE-PEG-Tirozin konjugatı sulu fazda çözülerek Tween 80 ‘in sulu çözeltisine eklendi. Aynı sıcaklıktaki çalışma koşullarında lipid faz sulu fazın içerisine yavaşça eklenerek yüksek hızlı homojenizatör ile 10 dakika karıştırılmıştır, devamında prob-tip sonikatör ile 10

dakika boyunca disperse edilmiştir. Yapılar oda sıcaklığına soğutulduktan sonra kristalizasyon amacıyla +4 °C’de 24 saat bekletilmiştir. Süre sonunda nanotaşıyıcılar MWCO 12.000-14.000 Da olan selüloz diyaliz membranına (Dialysis tubing cellulose membrane, D9777-100FT, Sigma Aldrich) alınarak 50 mL d-suya karşı oda sıcaklığında 4 saat süre (2. saat sonunda diyaliz suyu değiştirilmiştir) ile diyaliz yapılmıştır (Borges vd., 2019; Elmowafy vd., 2018; Garg vd., 2016; Hatem vd., 2018; Malik ve Kaur, 2018; Pinto vd., 2018a). Diyaliz yöntemiyle lipid taşıyıcıya yüklenmeyen ilaçların ortamdaki ayrılması hedeflenmiştir. Bu şekilde doksorubisin ve trabektedin yüklü DSPE-PEG-Tirozin taşıyan nanoyapılı lipid taşıyıcılar (**DTP-NLC**) hazırlanmıştır.

İlaç yüklenme miktarının belirlenmesi

Diyaliz ortamına salınan ilaçların HPLC analizleri ile miktar tayinleri yapılarak ilaçların nanotaşıyıcıya yüklenme verimleri (%) belirlenmiştir. (Eşitlik 1 ve 2) İlaç miktarlarının optimizasyonu için HPLC analizleri yanısıra karakterizasyon çalışmaları da yapılmıştır. Yüklenen optimum ilaç miktarı belirlendikten sonra örneğin ileri analizleri yapılmıştır.

Partikül boyut, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel analizi

Hidrodinamik boyut, polidispersite indeksi (PDI) ve zeta potansiyel ölçümleri için değişen oranlarda ilaç yüklü DTP-NLC örnekleri NLC örneklerinde olduğu gibi d-su ile 20.000 kat seyreltilmiştir. Analizler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

FTIR analizi

Optimum olarak belirlenen örneğin ilaç yüklenmesiyle birlikte yüzey fonksiyonel gruplarındaki değişim FTIR analizi ile belirlenmiştir. DTP-NLC örneği etüvde 40 °C’de kurutularak FTIR analizi gerçekleştirilmiştir.

Termal gravimetrik analiz (TGA)

Optimum olarak belirlenen DTP-NLC örneğinin termal bozunma davranışının belirlenmesi için TGA analizi gerçekleştirilmiştir. Azot gazı altında 30 °C-600 °C sıcaklıkları arasında, dakikada 10 °C sıcaklık arttırılmasıyla TGA analizleri yapılmıştır.

Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) analizi

Optimum olarak belirlenen DTP-NLC örneğinin erime noktasının ve kristal formunun incelenmesi için DSC analizi gerçekleştirilmiştir.

Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi

Optimum olarak belirlenen DTP-NLC örneği su içerisinde disperse edilip dilüe edildikten sonra uygun plakalara damlatılıp kurutulmuştur. Ardından Au/Pd kaplama yapılarak SEM analizi yapılmıştır.



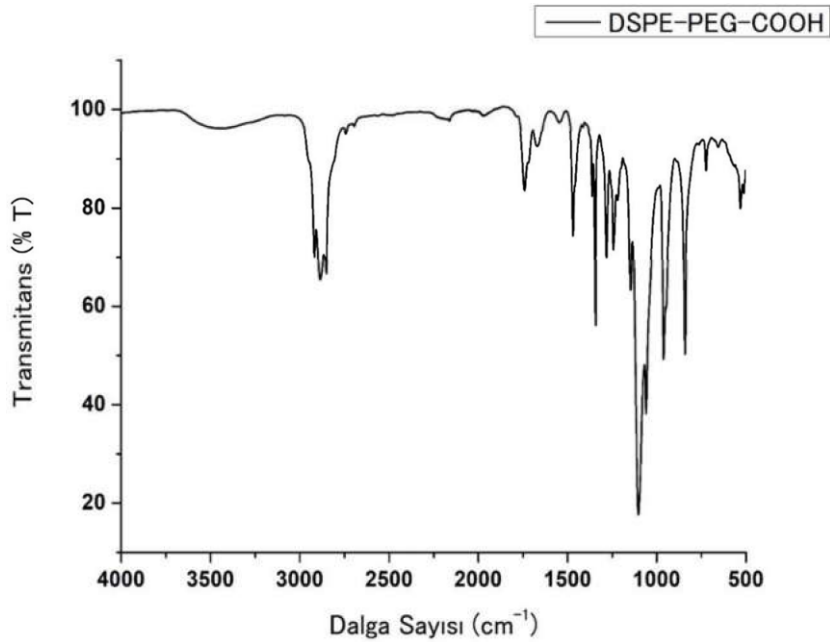
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. DSPE-PEG-Tirozin Bileşiğinin Sentezlenmesi

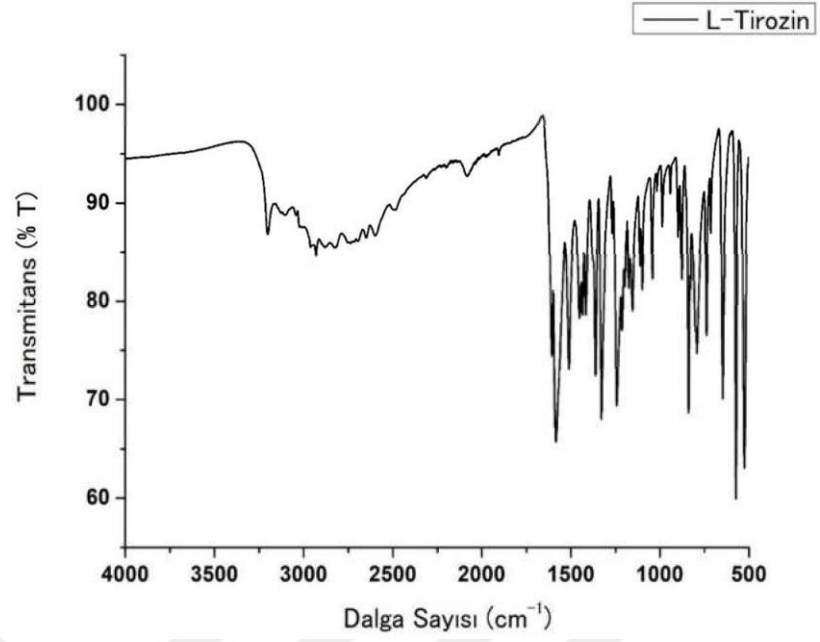
LAT-1 ile tirozin etkileşimi için tirozinin amino ve karboksil gruplarının korunması gerektiği literatürlerde belirtilmiştir (Augustyn vd., 2016; Uchino vd., 2002). Literatür çalışmaları göz önüne alınarak tirozinin -OH grubu üzerinden esterifikasyon reaksiyonu ile DSPE-PEG-COOH yapısına katılması

sağlanmıştır. Katalitik miktarda DMAP'nin DCC ile aktive edildiği esterleşme reaksiyonlarında reaktivite büyük ölçüde artmakta ve ürün verimi de iyileşmektedir (Neises ve Steglich, 1978). Dolayısıyla Steglich esterifikasyonunda DMAP ve DCC kullanılarak reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Ester oluşum reaksiyonu için proje önerisinde belirtildiği üzere çözücü olarak DMSO kullanılmış ve ayrıca DMSO çözügeninde geri soğutucu altında sıcaklık 45°C'ye de artırılarak da denemeler yapılmıştır. Reaksiyon sonunda elde edilen yapı FTIR ve ^1H NMR ile ^{13}C NMR analizleri ile kontrol edilmiştir.

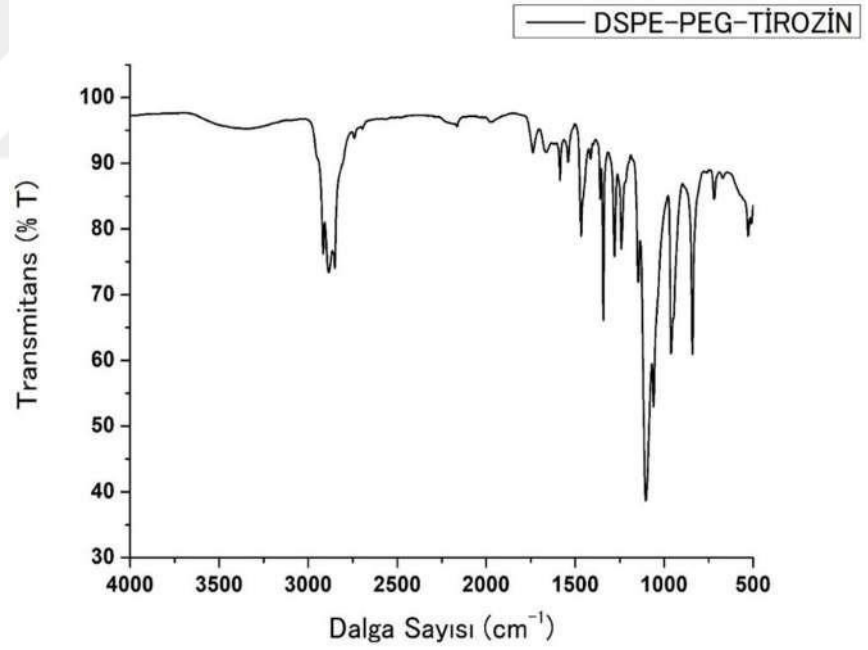
DSPE-PEG-COOH bileşiği ve L-tirozine ait FTIR spektrumları Şekil 4.1 ve 4.2'de verilmektedir. DSPE-PEG-Tirozin konjugatına ait FTIR spektrumu ise Şekil 4.3'de gösterilmektedir. Tüm yapılar Şekil 4.4 ve 4.5'te karşılaştırmalı olarak verilmiştir.



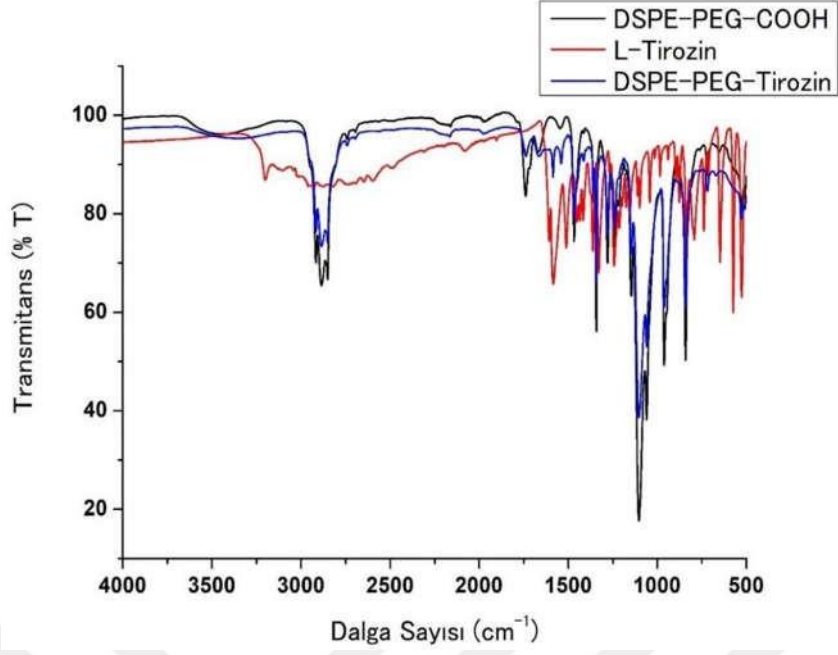
Şekil 4.1. DSPE-PEG-COOH bileşiğine ait FTIR spektrumu.



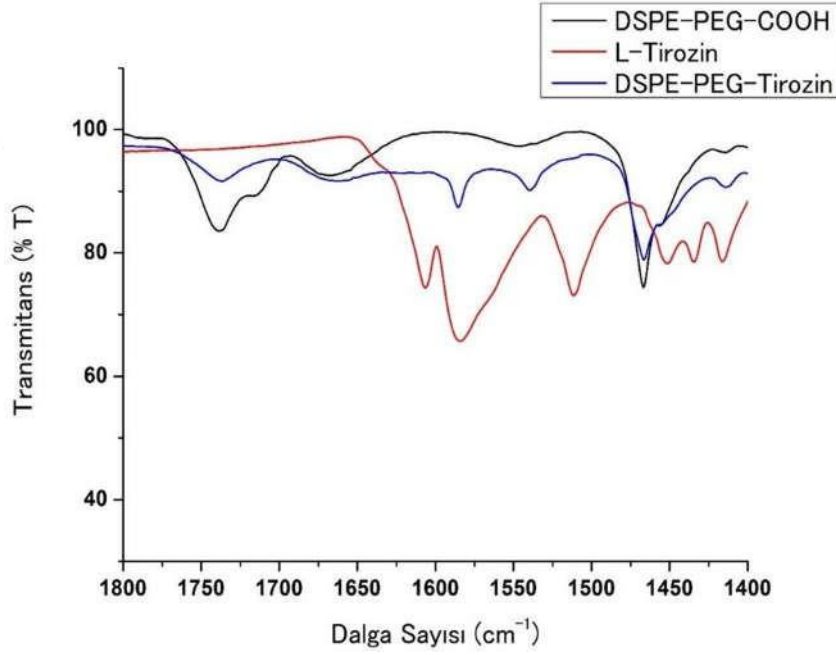
Şekil 4.2. L-Tirozin'in FTIR spektrumu.



Şekil 4.3. DSPE-PEG-Tirozin konjugatının FTIR spektrumu.



Şekil 4.4. DSPE-PEG-COOH, L-Tirozin ve DSPE-PEG-Tirozin konjugatının FTIR spektrumları.

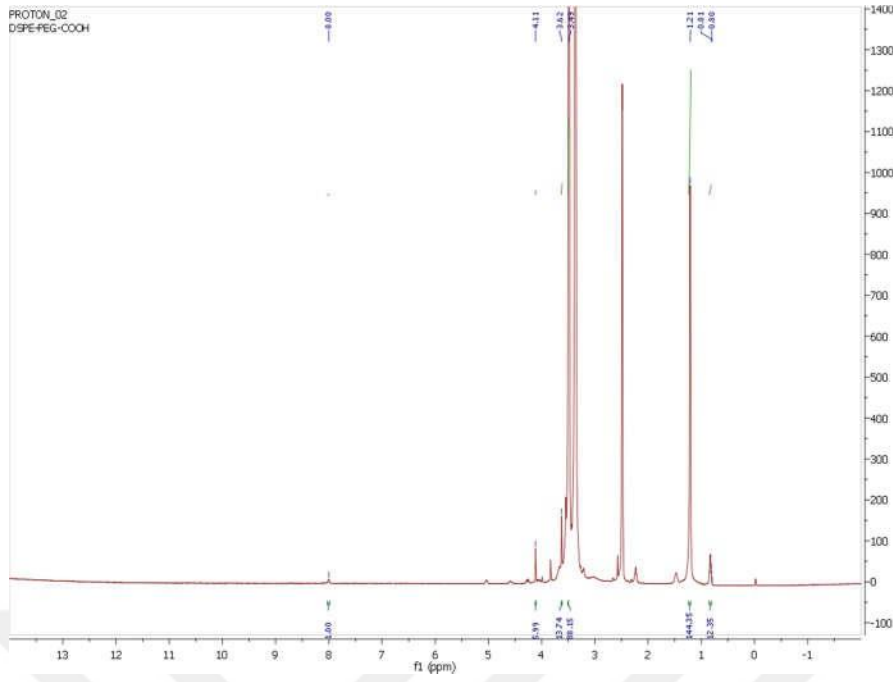


Şekil 4.5. DSPE-PEG-COOH, L-Tirozin ve DSPE-PEG-Tirozin konjugatının 1800-1400 cm^{-1} bölgesindeki FTIR spektrumları.

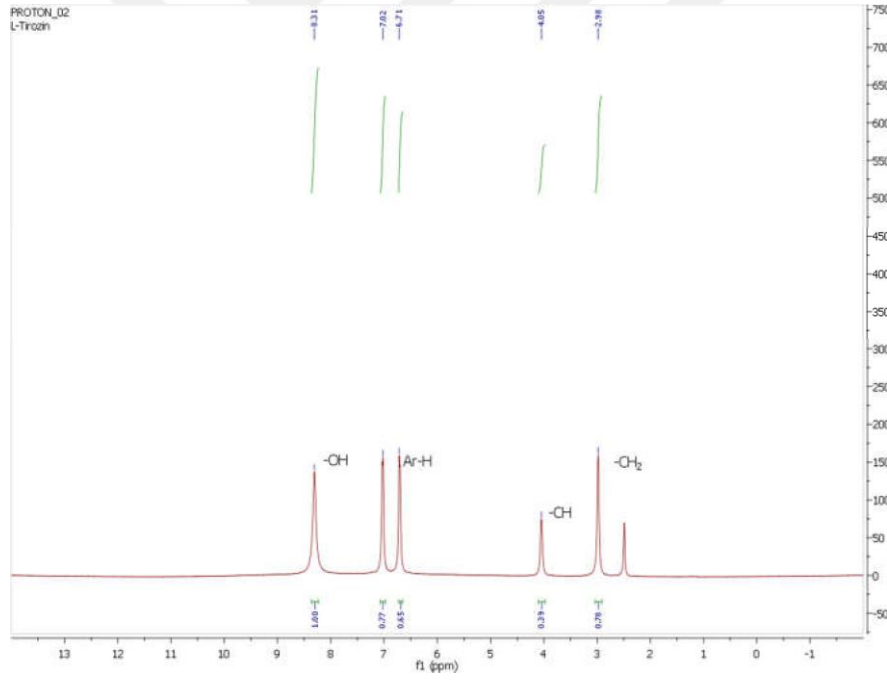
DSPE-PEG-Tirozin konjugatı yapısında DSPE-PEG-COOH yapısından farklı olarak 1597 cm^{-1} 'de aromatik halka C=C bağı gerilmesi sinyali saptanmıştır. 1511 cm^{-1} 'de ise yayvanlaşmış olarak aromatik halka C=C bağı

gerilmesi bulunmuştur. Bu sinyallerin oluşumu da yapıya tirozinin katıldığını doğrulamaktadır. Ayrıca konjugat yapısında 1586 cm^{-1} 'de görülen sinyal NH eğilmesine (primer amin) ve COO^- antisimetrik gerilmesine ve 1540 cm^{-1} 'de belirlenen sinyal ise COO^- antisimetrik ve C-N bağı gerilmelerine ait olabilmektedir (Vichi vd., 2018). Tirozin yapısında 1412 cm^{-1} 'de bulunan COO^- simetrik gerilmesi DSPE-PEG-Tirozin konjugatında artmış sinyal olarak belirlenmiştir. Tüm bu bantlar da yine DSPE-PEG-COOH yapısına tirozin katıldığını doğrulamaktadır. Ek olarak NH_3^+ ve COO^- gruplarının serbest kaldığını da işaret etmektedir. Sonuç olarak tüm FTIR spektrumları göz önüne alındığında DSPE-PEG-COOH ile tirozinin esterleşme reaksiyonu üzerinden DSPE-PEG-Tirozin konjugatı oluşumunun başarıyla gerçekleşmiş olduğu söylenebilmektedir.

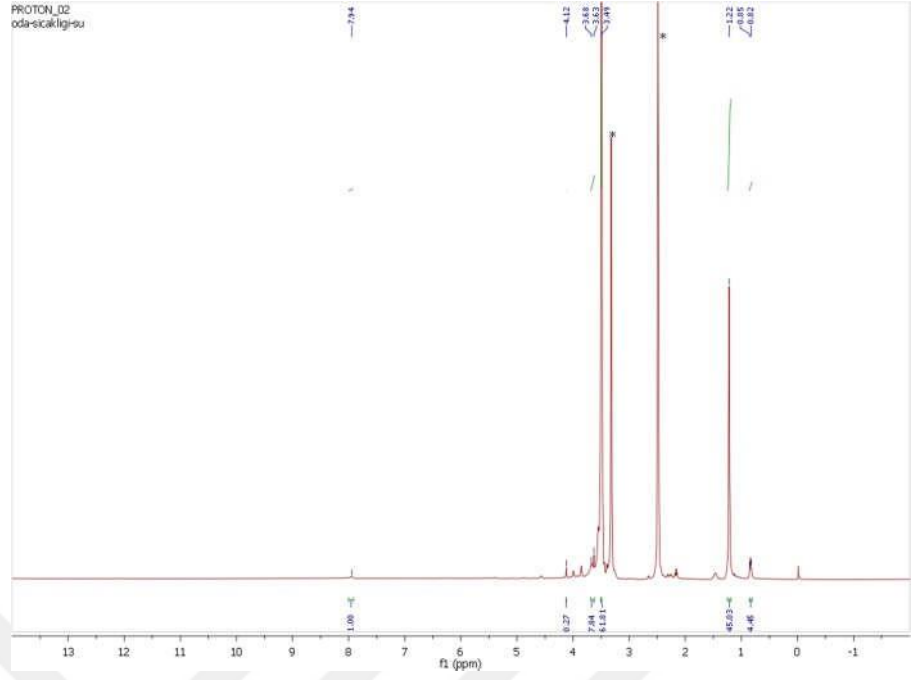
DSPE-PEG-COOH bileşiği ve L-tirozine ait ^1H -NMR spektrumları sırasıyla Şekil 4.6 ve 4.7'de verilmektedir. DSPE-PEG-Tirozin konjugatına ait ^1H -NMR spektrumu ise Şekil 4.8'da gösterilmektedir. Tüm ^1H NMR spektrumlarında $2,5\text{ ppm}$ 'de çözügene ait DMSO- d_6 piki görülmüştür. Şekil 4.8'de verilen DSPE-PEG-Tirozin ^1H -NMR spektrumuna bakıldığında ise DSPE-PEG-COOH ve tirozin yapılarında olduğu gibi $0,85\text{-}0,82$; $1,22$; $3,49$; $3,68\text{-}3,63$ ve $4,12\text{ ppm}$ 'lerde alifatik CH_3 , CH_2 ve CH proton rezonansı sinyali saptanmıştır. $7,94\text{ ppm}$ 'de aromatik proton ve amid NH proton sinyali görülmektedir. Patel ve arkadaşları yaptıkları çalışmada $7,94\text{ ppm}$ 'de görülen sinyalin aromatik protona ait olduğunu belirtmektedir (H. S. Patel vd., 2005). Ek olarak, Tirozin yapısından gelen fenolik -OH'in ($8,31\text{ ppm}$) kaybolması, tirozin yapısının -OH kısmının DSPE-PEG-COOH molekülünün karboksil grubu ile birleşerek, su ayrılması üzerinden DSPE-PEG-Tirozin sentezinin gerçekleştiğini göstermektedir. Elde edilen bu spektrum molekülün (DSPE-PEG-Tirozin konjugatı) oluşumunu ve doğrulamıştır.



Şekil 4.6. DSPE-PEG-COOH bileşiğine ait ^1H NMR spektrumu.

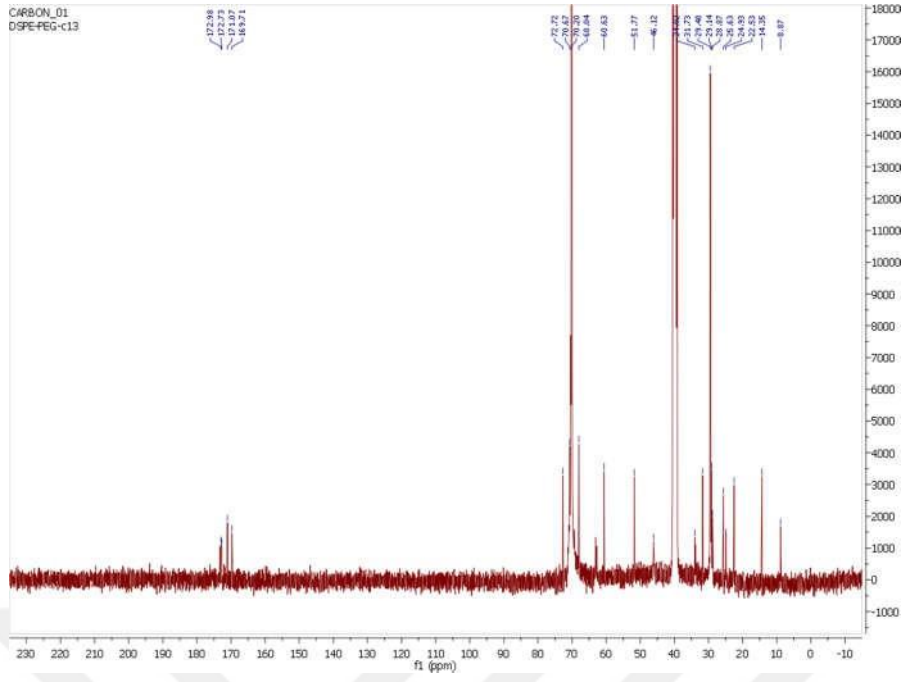


Şekil 4.7. L-Tirozin yapısının ^1H NMR spektrumu.

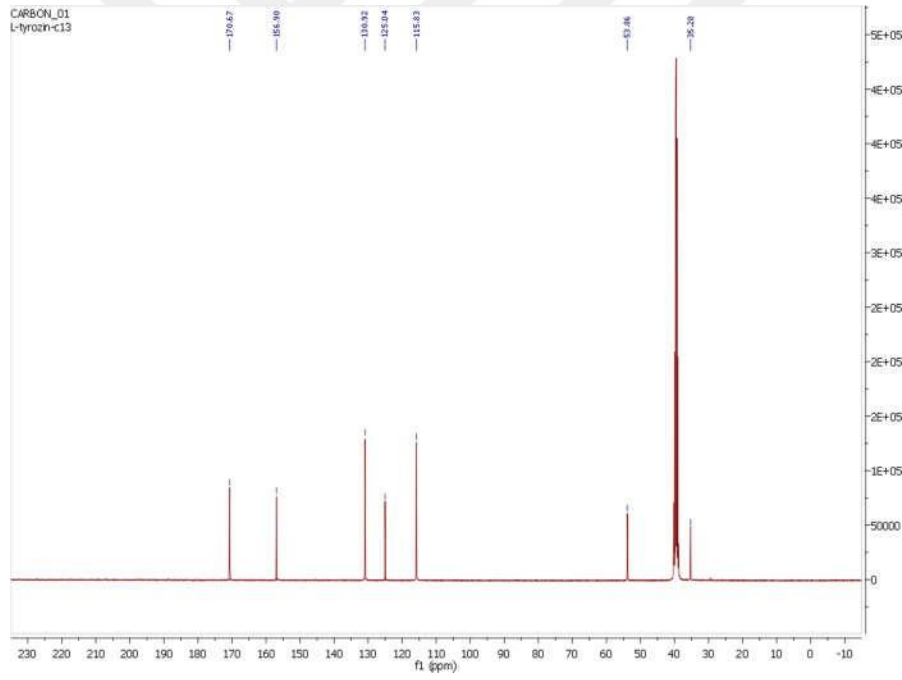


Şekil 4.8. DSPE-PEG-Tirozin konjugatının ^1H NMR spektrumu.

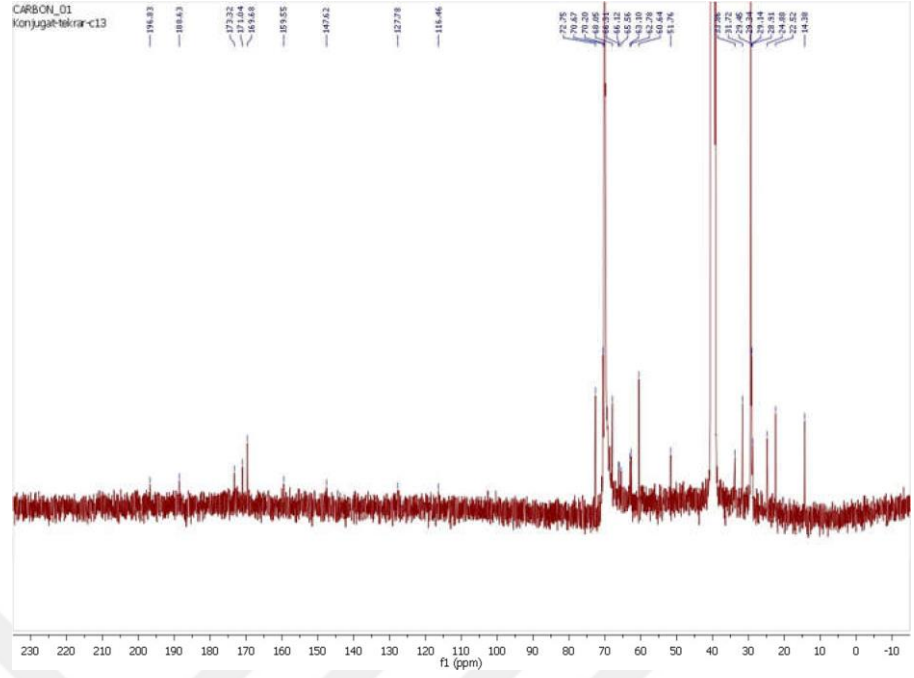
DSPE-PEG-COOH bileşiği ve L-tirozine ait ^{13}C -NMR spektrumları Şekil 4.9 ve 4.10'da verilmektedir. DSPE-PEG-Tirozin konjugatına ait ^{13}C -NMR spektrumu ise Şekil 4.11'de gösterilmektedir. Tüm ^{13}C -NMR spektrumlarında 40 ppm'de çözügene ait DMSO- d_6 piki görülmüştür. Şekil 4.11'de görüldüğü üzere 196,83-169,68 ppm aralığında esterik, karboksil ve keton karbonlarına ait 5 karbon sinyali, 159,55-116,46 ppm aralığında tirozin halkasına ait 4 karbon sinyali ve 72,75-14,38 ppm aralığında ise, $(-\text{CH}_2 + -\text{CH}_3)$ karbonlarına ait sinyallerin varlığı DSPE-PEG-Tirozin yapısını doğrulanmıştır.



Şekil 4.9. DSPE-PEG-COOH ^{13}C NMR spektrumu.



Şekil 4.10. L-Tirozin ^{13}C NMR spektrumu.



Şekil 4.11. DSPE-PEG-Tirozin ^{13}C NMR spektrumu.

Elde edilen tüm FTIR, ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrum sonuçlarına göre DSPE-PEG-Tirozin bileşiğinin başarıyla sentezlendiği söylenebilmektedir. Ayrıca reaksiyonun DSPE-PEG-COOH molekülünün karboksil grubu ile tirozinin fenolik OH grubu üzerinden gerçekleştiği de görülmüştür.

4.2. Nanoyapılı Lipid Taşıyıcıların Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Nanoyapılı lipid taşıyıcı (NLC) katı lipid ve sıvı lipid olmak üzere farklı lipid formlarının kullanılmasıyla elde edilir ve düzensiz kristal yapıların oluşması sağlanır. Düzensiz kristal yapılar sayesinde ilaç yükleme kapasitesi artar ve kontrollü ilaç salımının gerçekleşmesi sağlanır. Bunun yanı sıra düşük toksisite, biyolojik olarak parçalanabilirlik ve üretim sırasında organik solventlerden kaçınma gibi avantajlar NLC'yi ön plana çıkarmıştır (Iqbal vd., 2012b). NLC bileşenleri olarak tatlı badem yağı, miristik asit ve sürfaktan olarak ise tween 80 seçilmiştir. NLC lipid fazında sıvı lipid olarak seçilen tatlı badem yağı bitkisel bir yağ olup doymamış yağ asiti olarak en fazla oleik asiti (C18:1) (~% 65) ardından linoleik asiti (C18:2) ve palmitik asiti (C16:0) içerir (G. D. Fernandes vd., 2017). Katı lipid olarak seçilen miristik asit ise hindistan cevizi yağı, palmye çekirdeği yağları ve süt yağlarından elde edilen 14 karbonlu doymuş organik yağ asitidir (Acid ve Acid, 1987). Sulu fazda bulunan ve sürfaktan olarak seçilen tween 80'in amfifilik karakteriyle lipid karışımlarının

iyice emülsifiye olmasını sağladığı ve birlikte kullanımında kararlı ve düşük boyutlu partiküllerin elde edilebildiği bilinmektedir (de Souza vd., 2019; Kanwar vd., 2019). Sonikasyon süresi Fernandes ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada olduğu gibi 10 dakika uygulanmıştır (R. S. Fernandes vd., 2016). Hazırlanan nanopartiküller 30 dakika oda sıcaklığında bekletilmesi sonrası +4°C’de saklanmıştır.

Partikül boyut, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel analizi

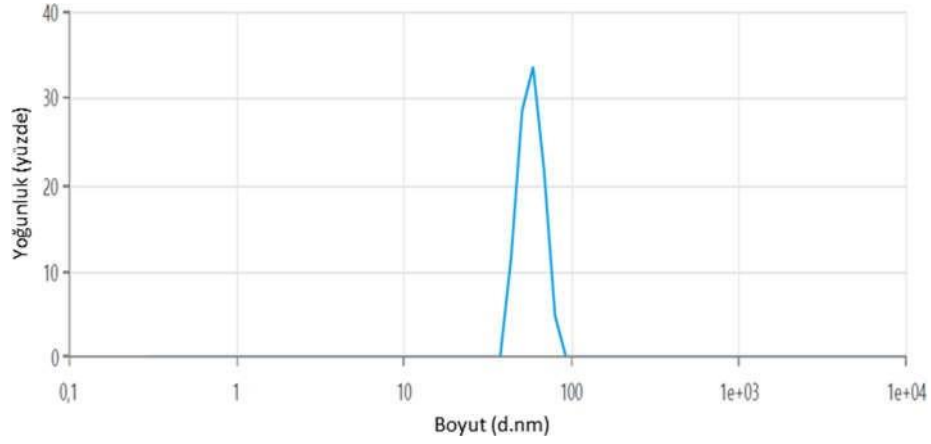
Zeta potansiyel ölçümü nanopartiküllerin dispersiyon ve agregasyon prosesleri hakkında genellikle bilgi vermektedir. Yüksek zeta potansiyele sahip nanopartiküller birinin bir diğerini itmesiyle ve doğasından kaynaklı agregasyona eğilimin üstesinden gelmesiyle daha stabil kalırlar. Elektrostatik stabilizasyon için zeta potansiyel değerlerinin $|30|$ mV civarında olması gereklidir. Zeta potansiyel değerleri $|5|$ and $|15|$ mV arasında olan partiküllerin flokulasyon sınırında olduğu; potansiyel değerleri $|5|$ and $|3|$ mV arasındaki partiküllerin ise maksimum flokulasyona uğrayabildiği bildirilmiştir (Heurtault vd., 2003). PDI değerinin 0,5 ten yukarıda olması partiküllerin boyut dağılımının geniş olduğunu gösterdiği bilinmektedir (L. Wu vd., 2011).

Hazırlanan NLC örneklerinin hidrodinamik boyut, PDI ve zeta potansiyel değerleri Tablo 4.1’de verilmektedir. Elde edilen sonuçlara göre içerikte sıvı yağ oranı arttıkça (1:2 oranına kadar) zeta potansiyelin mutlak değeri artmakta ve boyutlar bir miktar küçülmektedir. 1:2 (katı yağ: sıvı yağ, w/w) oranında en yüksek zeta potansiyel değeri olan $-32,21$ mV değeri, ayrıca en küçük boyut değeri (62,80 nm) saptanmıştır. Bu oran için PDI 0,294’tür. PDI farklı oranlar için değişkenlik göstermektedir. Elmowafy ve arkadaşları tarafından farklı katı lipidler ve Miglyol (sıvı lipid) kullanılarak yapılan çalışmada artan sıvı lipid oranında daha düşük boyutlu ve daha yüksek potansiyele sahip NLC grupları elde edilmiştir (Elmowafy vd., 2016). Pinto ve arkadaşları tarafından 2018 yılında yapılan bir diğer çalışmada tatlı badem yağı ve miristik asit dahil farklı katı ve sıvı lipidler ile nanoyapılı lipid taşıyıcılar hazırlanmıştır. Genellikle sıvı lipid miktar artışının zeta potansiyel mutlak değerinde artışa ve partikül boyutlarında azalmaya sebep olduğu ifade edilmektedir. Bu durum, sıvı yağın sulu fazda kolaylıkla disperse olmasından kaynaklı daha küçük partikül oluşumuna yol açması ile açıklanmıştır. Ayrıca belirli oranlardan sonra ise boyutta artışların olabildiği partiküllere de

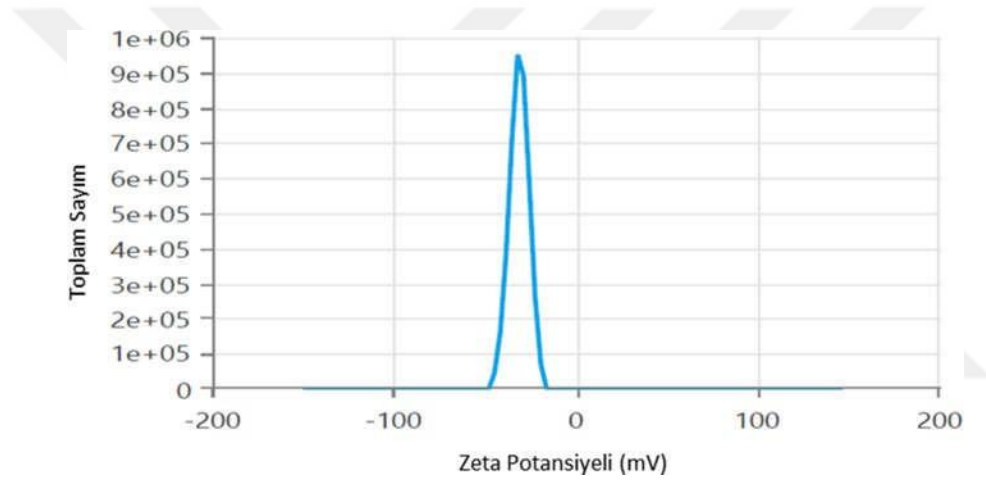
rastlanılmıştır (Pinto vd., 2018a). Sıvı yağ oranı arttıka daha kk ve uniform yapıların oluştuğu anlaşılmaktadır. Hidrodinamik boyutu ve PDI değeri en düşük olan 1:2 oranı ile hazırlanan NLC grubu optimum NLC olarak seçilmiştir. 1:2 katı: sıvı yağ oranlarında elde edilen NLC örneğinin hidrodinamik partikül boyut ve zeta potansiyel yük dağılımı sırasıyla şekil 4.12 ve 4.13'te gösterilmektedir. zellikleri dolayısıyla ileri optimizasyona gerek duyulmamıştır ve örneğin diğer karakterizasyon analizleri gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4.1 Değişen oranlarda katı yağ ve sıvı yağ içeriklerinde hazırlanan NLC rneklerinin partikül boyut, PDI ve zeta potansiyel değerleri.

Katı yağ: Sıvı yağ oranı (w/w)	Hidrodinamik boyut (nm)	PDI	Zeta potansiyel (mV)
4:1	89,69±12,71	0,558±0,165	-20,11±3,86
3:1	89,48±10,82	0,471±0,077	-20,25±4,43
2:1	79,18±8,96	0,295±0,097	-27,35±0,29
1:1	72,50±3,44	0,378±0,111	-29,46±3,25
1:2	62,80±3,55	0,294±0,030	-32,21±1,48
1:3	84,20±3,35	0,330±0,048	-28,23±1,81
1:4	85,65±9,53	0,337±0,009	-28,91±1,73



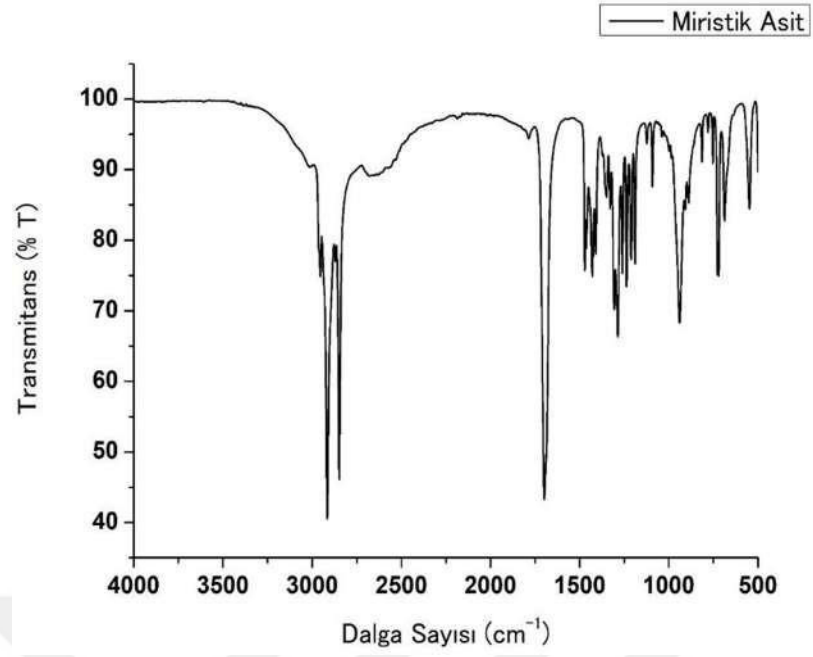
Şekil 4.12. 1:2 katı: sıvı yağ oranlarında (w/w) hazırlanan NLC örneğinin hidrodinamik partikül boyutu dağılımı.



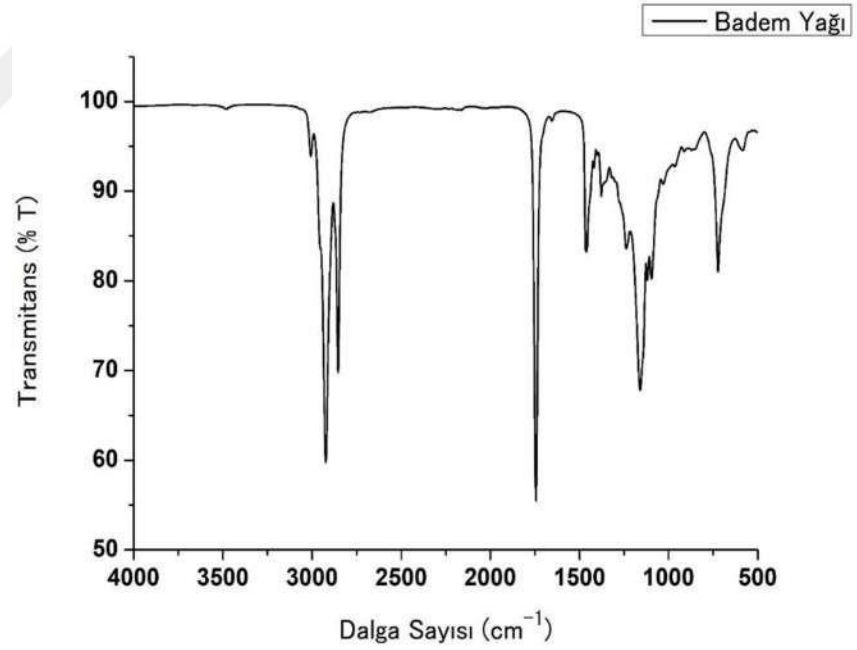
Şekil 4.13. 1:2 katı: sıvı yağ oranlarında (w/w) hazırlanan NLC örneğinin zeta potansiyel yük dağılımı.

FTIR analizi

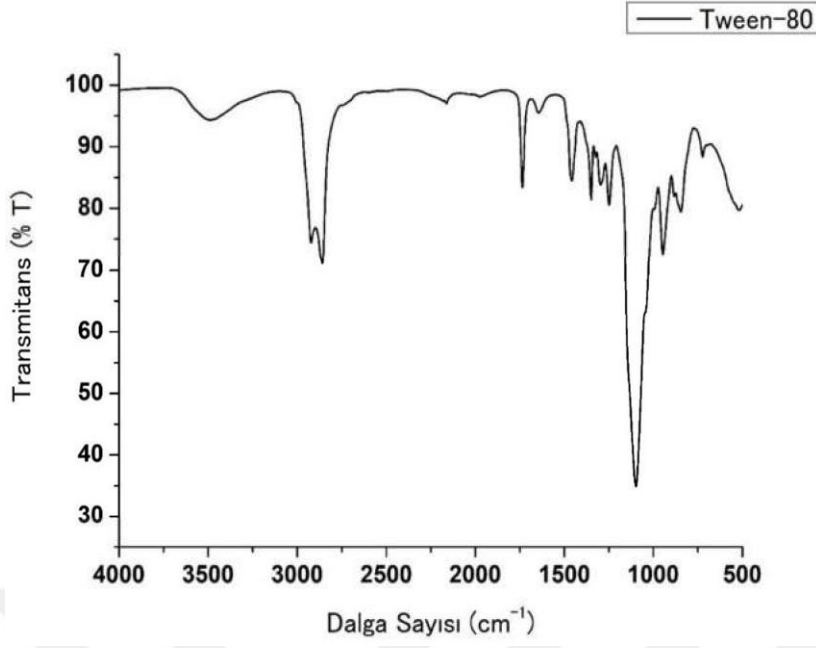
Miristik asit ve tatlı badem yağına ait FTIR spektrumları Şekil 4.14 ve Şekil 4.15'te, Tween-80'e ve NLC örneğine ait FTIR spektrumları Şekil 4.16 ve 4.17'te verilmektedir. Tüm yapılar Şekil 4.18'de karşılaştırmalı olarak verilmiştir.



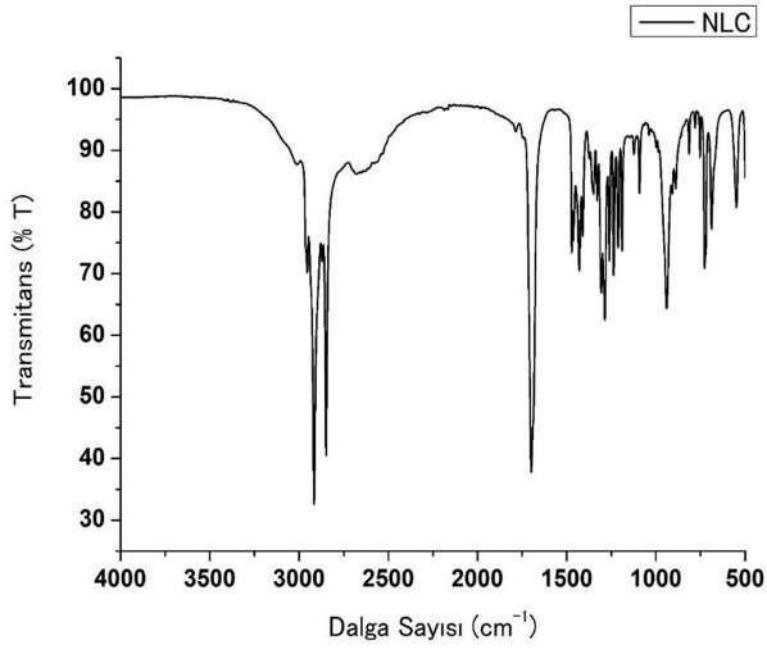
Şekil 4.14. Miristik aside ait FTIR spektrumu.



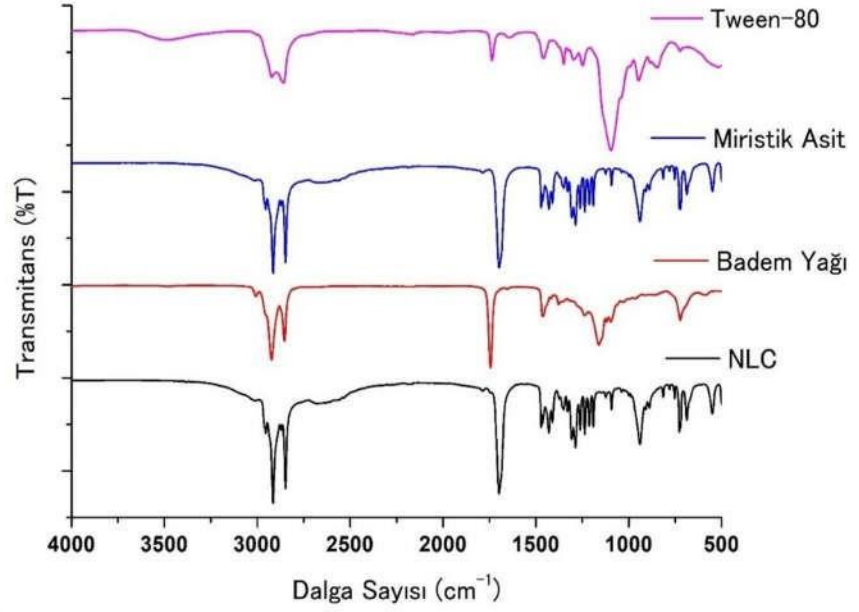
Şekil 4.15. Tatlı badem yağına ait FTIR spektrumu.



Şekil 4.16. Tween-80'e ait FTIR spektrumu.



Şekil 4.17. NLC örneğine ait FTIR spektrumu.



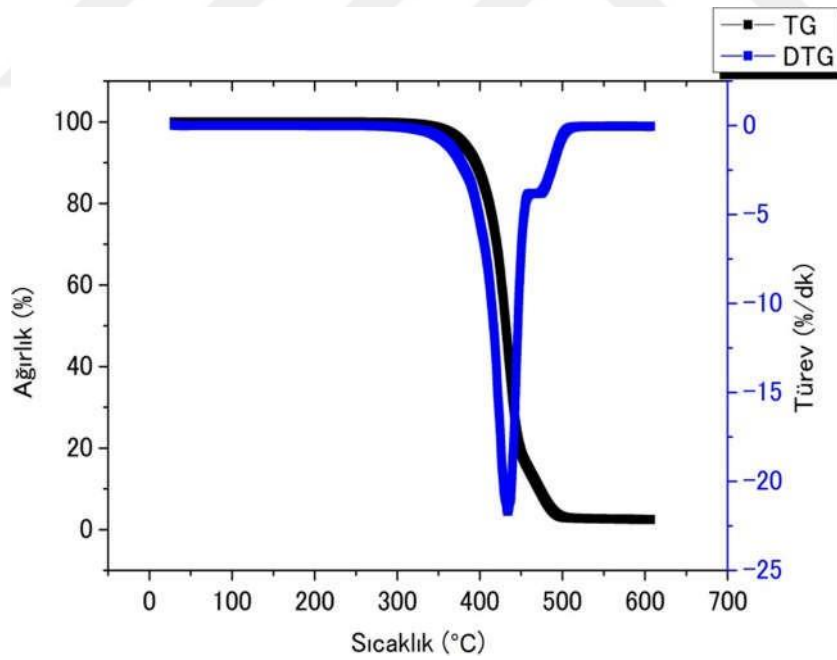
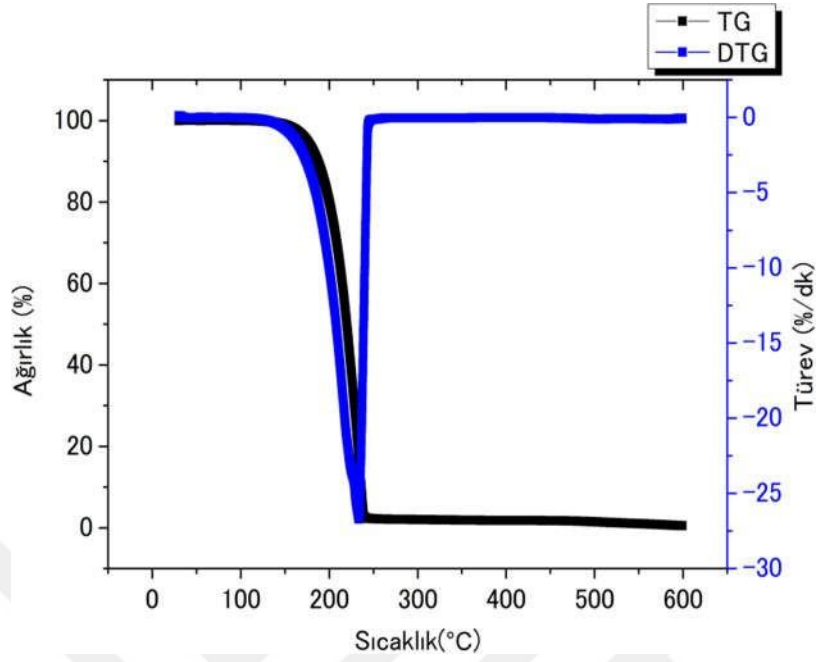
Şekil 4.18. NLC, badem yağı, miristik asit ve Tween 80'e ait karşılaştırmalı FTIR spektrumları.

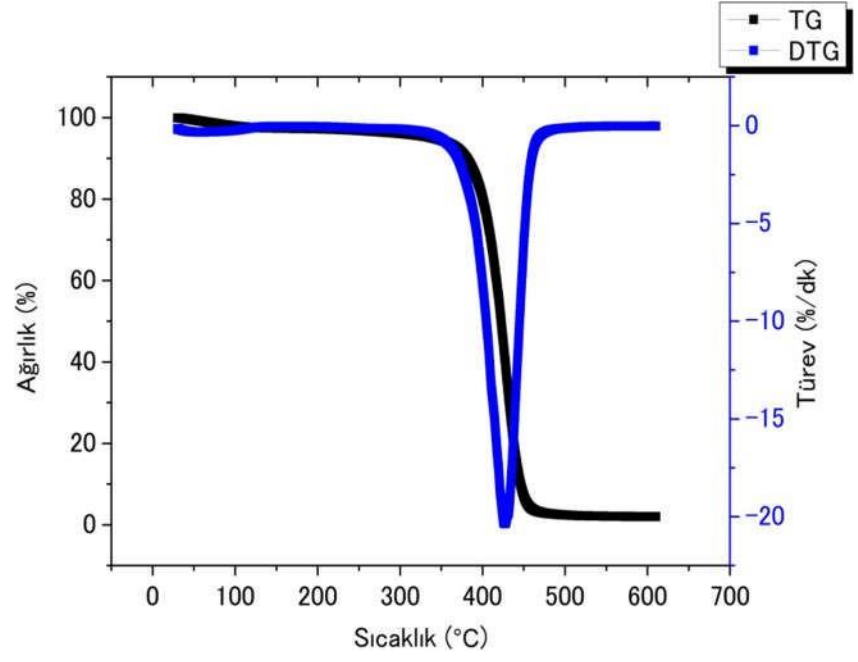
Şekil 4.17'de verilen nanopartikül FTIR spektrumunda $3100-2800\text{ cm}^{-1}$ 'de C-H gruplarına ait gerilme bantlarının olduğu görülmektedir (Saupe vd., 2006). 1743 cm^{-1} 'de belirlenen ester bağı C=O gerilmesi sinyalinin NLC bileşenleri olarak badem yağı ve Tween-80 yapısından gelebilecek olduğu düşünülmektedir. 1699 cm^{-1} 'deki keskin pikin miristik asit yapısındaki karboksil grubu C=O gerilmesine ait olduğu ve 1161 cm^{-1} 'deki küçük bantın badem yağı içeriğinden kaynaklı C-OH gerilme bantı olduğu söylenebilmektedir. Ribeiro ve arkadaşlarının 2017 yılındaki çalışmasında tatlı badem yağı içeren NLC formülasyonunun FTIR spektrumunda $\sim 2900\text{ cm}^{-1}$ 'de C-H grupları gerilmesi görülürken aynı zamanda $\sim 1700\text{ cm}^{-1}$ 'de ester bağına ait C=O gerilmesi olduğu ifade edilmektedir (Ribeiro vd., 2017). Tüm bu sonuçlara bakıldığında NLC yapısında miristik asit ağırlıklı olmak üzere bileşenlerinden kaynaklı IR sinyalleri olduğu görülmektedir.

Termal gravimetrik analiz (TGA)

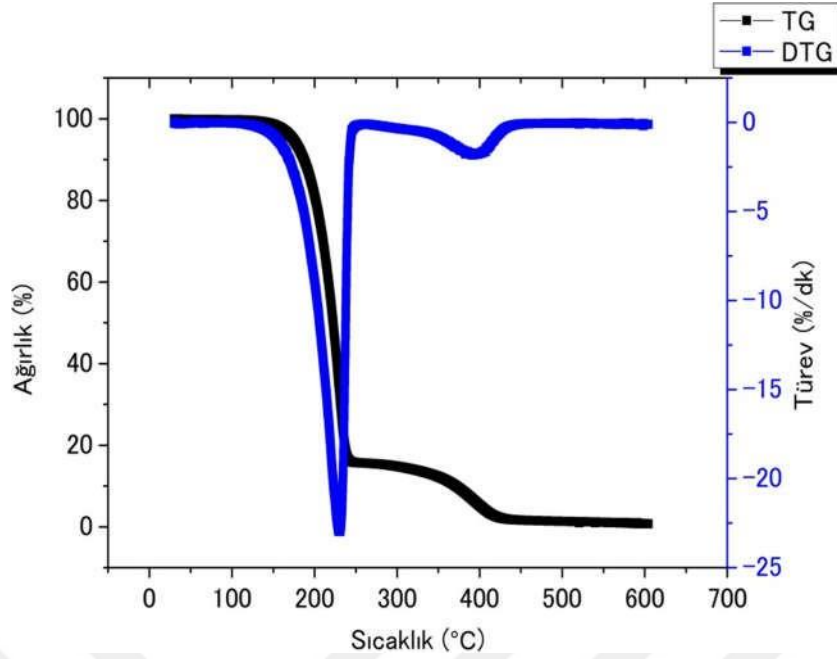
TGA analizi, zaman ve sıcaklığa bağlı olarak bilinen miktarda örneğin ağırlığındaki değişikliklerin izlenmesini sağlar. Katı lipid olan miristik asit'e ait TGA eğrisi Şekil 4.19'de, sıvı lipid olan tatlı badem yağına ait TGA eğrisi Şekil

4.20’de, sürfaktan olarak kullanılan Tween 80’e ait TGA eğrisi Şekil 4.21’de ve hazırlanan NLC örneğine ait TGA eğrisi ise Şekil 4.22’te verilmektedir.





Şekil 4.21. Tween 80'e ait TGA eğrisi.



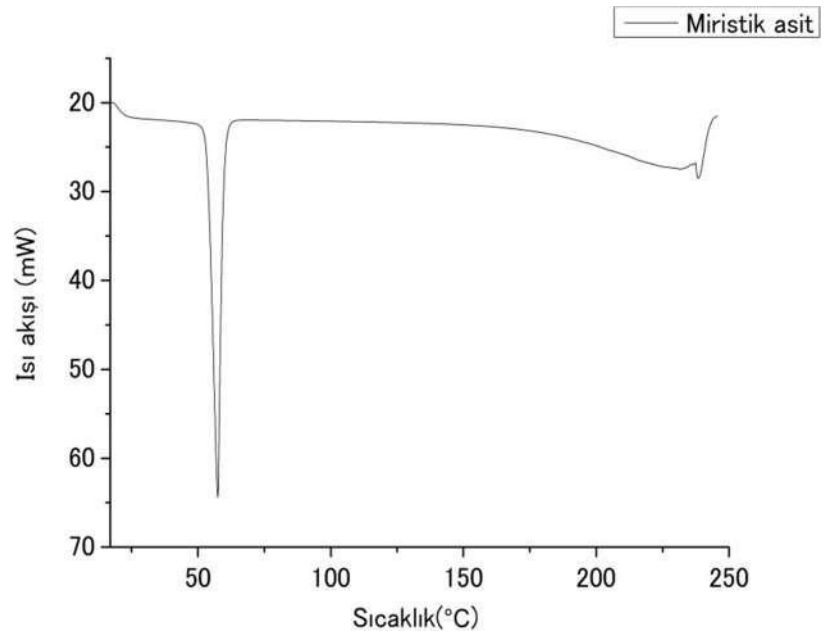
Şekil 4.22. NLC örneğine ait TGA eğrisi.

NLC'nin termal gravimetrik analizinde 120 °C'de başlayıp 250 °C'ye kadar ağırlık kaybı yaşanmıştır ve maksimum ağırlık kaybı 229.91 °C'de meydana gelmiştir. Ayrıca 250 °C- 430 °C aralığında da 396,60 °C'nin tepe noktası olduğu başka bir ağırlık kaybı daha yaşanmıştır. Azizi ve arkadaşlarının 2018 yılında yaptığı çalışmada, katı lipid olarak laurik asit, palmitik asit, stearik asit ve sıvı lipid olarak echium yağı kullanarak hazırladıkları NLC örneklerinin termal özelliklerini incelemek için TG analizi uygulanmıştır. 140 °C'de başlayıp yaklaşık olarak 200 °C'ye kadar devam eden ağırlık kaybının serbest yağ asitlerinin bozunmasıyla ilgili olduğu ve yaklaşık 300 °C'deki ağırlık kaybının kapsüllenmiş yağ asitlerinin salınmasından ve salınan yağ asitlerini sıvı yağın bozulması tetiklemesinden kaynaklandığı belirtilmiştir. Ayrıca bu sıcaklıktan sonra partikülün stabil olmadığı bildirilmiştir (Azizi vd., 2018). Soleimanifard ve arkadaşlarının 2019 yılındaki yayınında, katı lipid olarak gliserol monostearat ve sıvı lipid olarak soya yağı kullanarak hazırladıkları NLC örneklerinde TG analizi yapılmış ve 120°C'de başlayıp 370°C'ye kadar süren sıcaklık aralığındaki ekzotermik tepenin, bileşenlerin oksijenle reaksiyonu sonucunda su ve karbondioksit dönüşmesi ve ayrışmasıyla ilgili olduğu belirtilmiştir (Soleimanifard vd., 2019). Khorrami ve arkadaşları 2021 yılında yaptıkları çalışmada, stearik asit, palmitik asit, linoleik, miristik asit, linolenik asit lipidleri ve Tween 80 sürfaktanı kullanarak hazırladıkları NLC örneklerinin TGA analizi

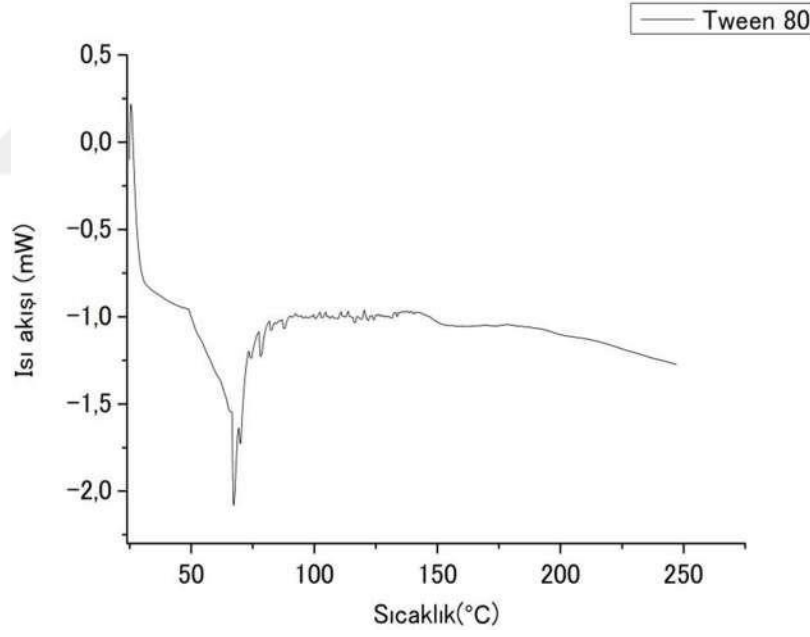
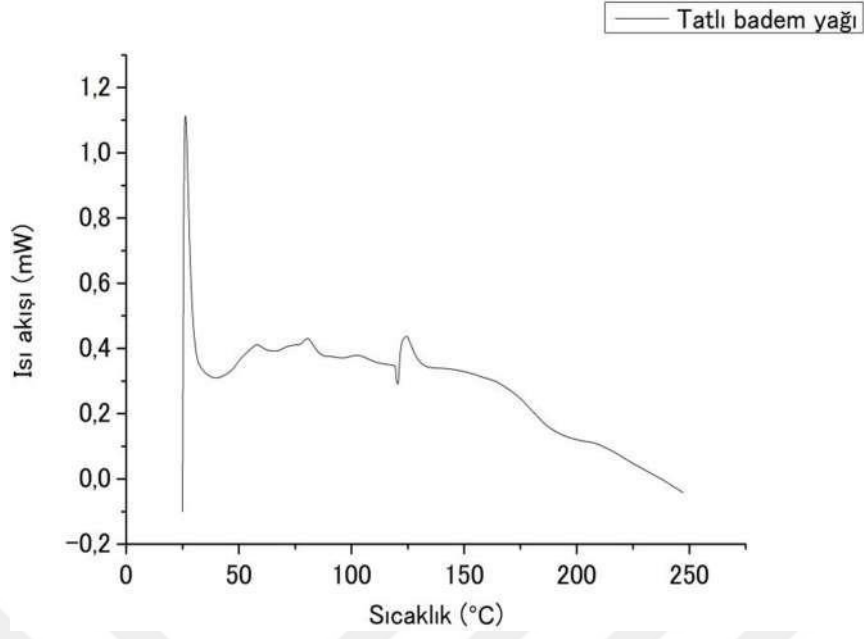
sonucunda 120 °C'nin altındaki sıcaklıklardaki önemsenmeyecek düzeydeki ağırlık kaybının suyun buharlaşmasından kaynaklandığı ifade edilmiştir. Bunun yanısıra 300 °C- 400 °C aralığındaki ağırlık kaybının Tween 80'nin uçucu hale gelmesinden kaynaklandığı ve maksimum ağırlık kaybının 224 °C'de meydana geldiği de bildirilmiştir (Karimi Khorrami vd., 2021). Literatür bulguları ve elde edilen sonuçların, 120 °C'ye kadar olan önemsenmeyecek miktardaki ağırlık kaybının yapıdaki suyun buharlaşmasından kaynaklandığı, 120 °C'den 250 °C'ye kadar olan ağırlık kaybının miristik asitin ayrışmaya başlamasından ve 250 °C'den 430 °C'ye kadar olan ağırlık kaybının ise tatlı badem yağının ve Tween 80'nin bozunmasından kaynaklandığı göstermektedir.

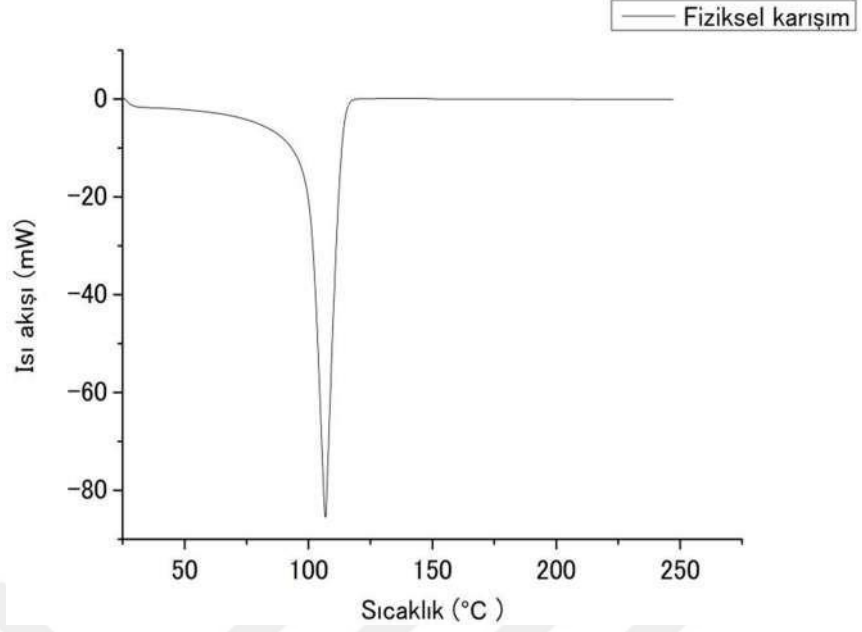
Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) analizi

Diferansiyel tarama kalorimetrisi, nanopartikül preparatlarında lipid moleküllerinin ve ilaçların erime ve kristalleşme davranışını incelemek için etkili bir yöntemdir. Katı lipid olan miristik asitin DSC eğrisi Şekil 4.23'te, sıvı lipid olan tatlı badem yağının DSC eğrisi Şekil 4.24'te, sürfaktan olan tween 80'in DSC eğrisi Şekil 4.25'de, NLC sentezleme aşamasındaki oran kullanılarak hazırlanan, lipid fazı ve su fazından oluşan fiziksel karışımın DSC eğrisi Şekil 4.26'de ve sentezlenen NLC örneğinin DSC eğrisi Şekil 4.27'de verilmektedir.

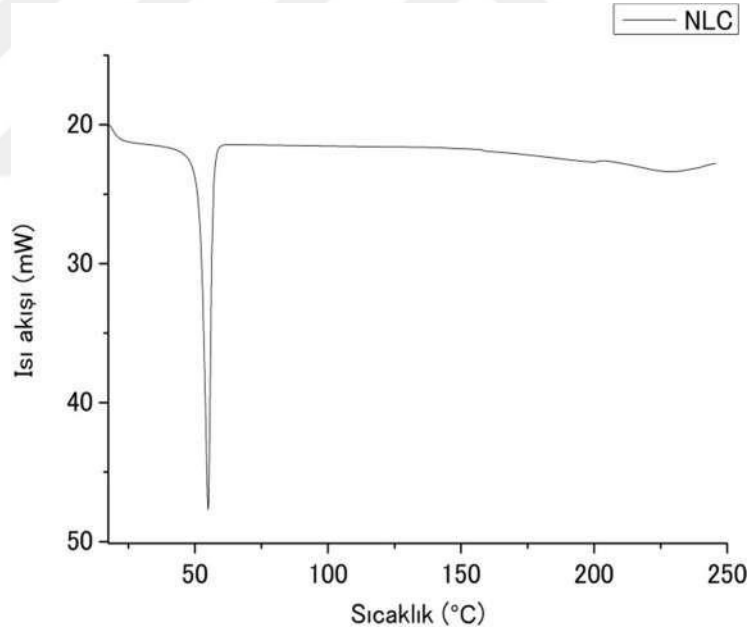


Şekil 4.23. Miristik asitin DSC eğrisi.





Şekil 4.26. Fiziksel karışımın DSC eğrisi.



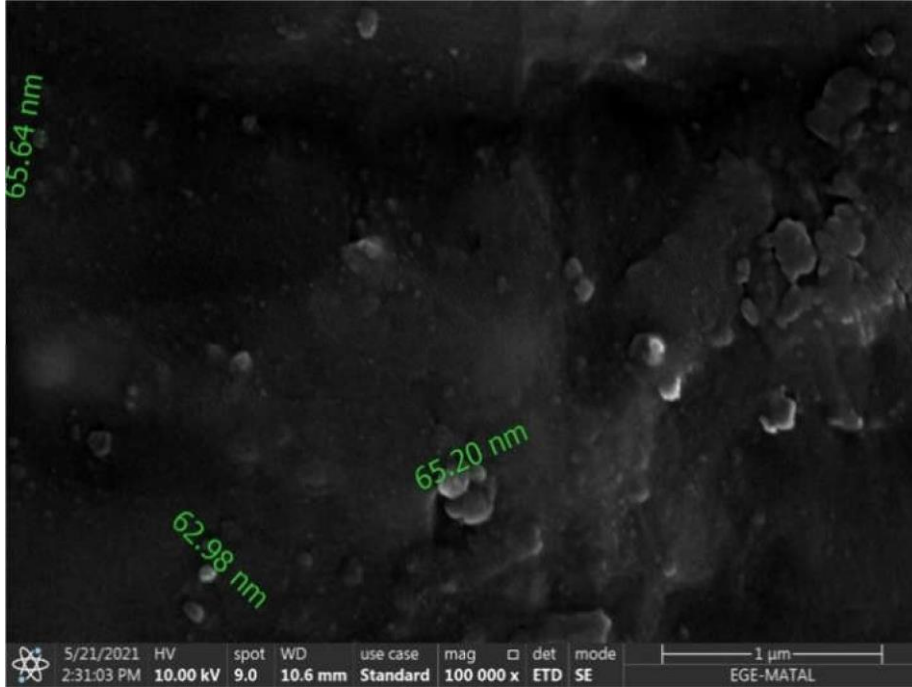
Şekil 4.27. NLC örneğinin DSC eğrisi.

DSC analiz verilerine göre miristik asitin erime sıcaklığı 57,46 °C, Tween 80'nin erime sıcaklığı 67,27 °C, hazırlanan fiziksel karışımın erime sıcaklığı 106,8 °C ve NLC örneğinin erime sıcaklığı 54,99 °C'dir. Tatlı badem yağı ise belirgin bir erime sıcaklık noktası göstermemiştir. Literatürde de benzer sonuçlara ulaşılmıştır. Pinto ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada miristik asitin erime sıcaklığı 56,8 °C olarak belirlenmiştir (Pinto vd., 2018b). Badr-Eldin ve

arkadaşları ile Gallarate ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda tatlı badem yağının 250 °C'ye kadar belirgin bir erime sıcaklığı göstermediğini ve doymamış yağ asidi zincirlerini içeren oksidasyon sebebiyle daha yüksek sıcaklıklarda pik verebileceğini belirtmişlerdir (Badr-Eldin vd., 2019; Gallarate vd., 2009). Zheng ve arkadaşları 2013 yılında NLC üzerine yaptıkları çalışmalar sonucunda, kristal yapılar meydana geldikçe erime sıcaklığının düştüğünü ve bu düşüşün sebebinin sıvı lipidin katı lipid matrisinde moleküler olarak dağılmasından ve iki lipidin birbirine karışmasından kaynaklandığını ifade edilmiştir (Zheng vd., 2013). Literatür verileri ve elde edilen sonuçlar, NLC yapılarının kristal formunu doğrulamaktadır.

Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi

SEM, bir elektron demeti ile tarayarak örneğin görüntülerini üreten bir mikroskopik tekniktir (Pinto vd., 2018a). Katı lipid olarak miristik asit, sıvı lipid olarak tatlı badem yağı ve sürfaktan olarak Tween 80 kullanılarak hazırlanan NLC'lerin SEM görüntüleri Şekil 4.28'da verilmiştir. Boyutları 60-70 nm aralığında olan küresele yakın morfolojiye sahip yapılar elde edilmiştir.



Şekil 4.28. NLC örneğine ait SEM görüntüsü.

NLC örneğine ait SEM görüntülerinde nanopartiküller morfolojisinin küresel ve boyutlarının yaklaşık 65nm olduğu görülmektedir. Das ve arkadaşları

katı lipid olarak Compritol 888 ATO ve sıvı lipid olarak Labrafac CC kullanarak NLC hazırlamışlar ve SEM görüntüsünde 50-150 nm aralığında değişen parçacık boyutuna sahip küresel morfolojide yapılar elde etmişlerdir (Das vd., 2012). Literatür verileri elde edilen sonuçları desteklemektedir.

4.3. LAT-1 Hedefli Nanoyapılı Lipid Taşıyıcıların Hazırlanması ve Karakterizasyonu

NLC sisteminin hedef transporterla (LAT-1) etkileşebilmesi için DSPE-PEG-Tirozin konjugatı NLC sistemine yüklenmiştir. Konjugatı içeren NLC, boş NLC örneğinde olduğu gibi karakterize edilerek optimum hazırlanma koşulları belirlenmiştir.

Partikül boyut, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel analizi

Değişen miktarlarda DSPE-PEG-Tirozin konjugatı içeren P-NLC örneklerinin hidrodinamik boyut, PDI ve zeta potansiyel değerleri ölçülmüştür ve veriler Tablo 4.2’de sunulmaktadır.

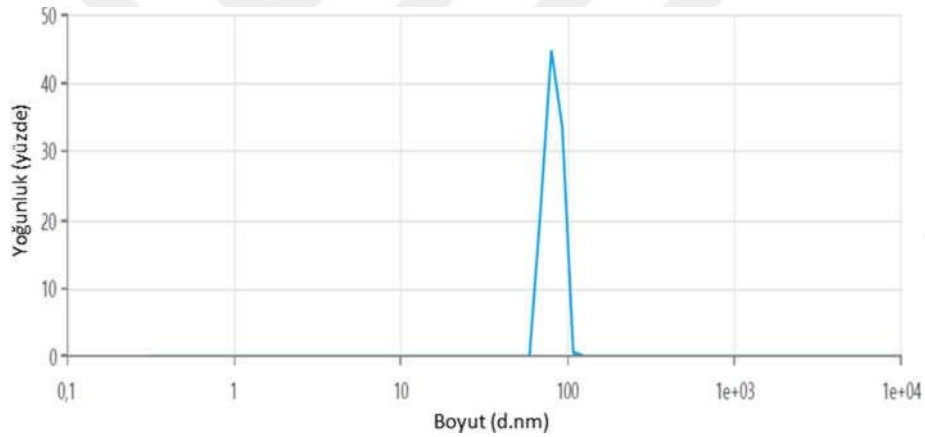
Tablo 4.2. Değişen DSPE-PEG-Tirozin konjugatı içeren P-NLC örneklerinin hidrodinamik boyut, PDI ve zeta potansiyel değerleri.

DSPE-PEG-Tirozin miktarı (mg)	Hidrodinamik boyut (nm)	PDI	Zeta potansiyel (mV)
1	80,62±2,29	0,372±0,140	-31,20±1,56
2	82,03±2,02	0,370±0,124	-30,16±1,45
3	82,61±0,84	0,484±0,151	-26,01±1,89
5	90,62±1,44	0,561±0,130	-15,99±1,23

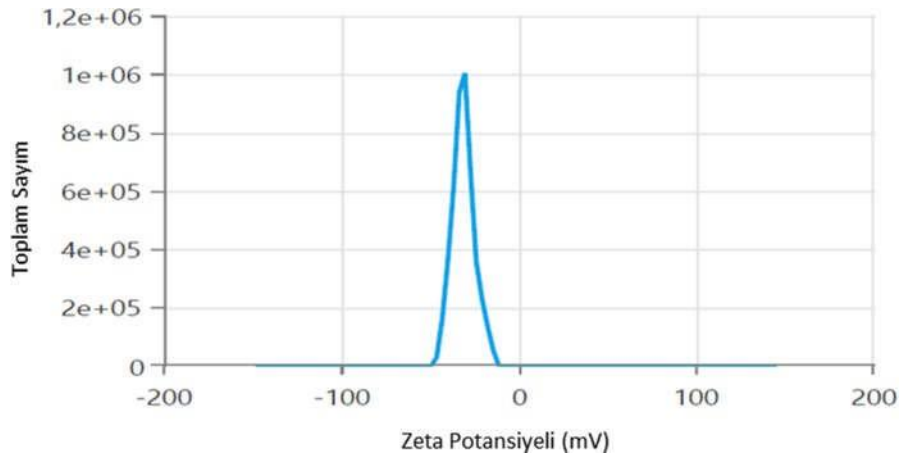
DSPE-PEG-Tirozin konjugatı içeren P-NLC örneklerinde yukarıdaki tablodan da görüleceği üzere konjugat miktarı arttıkça boyutta bir miktar artış görülmektedir. 5 mg konjugat kullandığında elde edilen partikül dağılımı homojenitesini kaybetme sınırındadır, PDI değeri 0,561 olarak bulunmuştur. 3 mg konjugat varlığında ise PDI değeri yine 0,5 değerine çok yakındır fakat boyut olarak belirgin bir farklanma görülmemektedir. Zeta potansiyel değerleri artan

konjugat miktarları ile birlikte azalmaktadır. Wong ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, lipid bazlı nanopartikülün PEG₂₀₀₀ ile kaplanması sonucunda boyut artarken potansiyel değerinin azaldığı sonucuna varılmıştır (Wong vd., 2007). 2014 yılında yapılan bir çalışmada Glycyrrhetic Acid-PEG-DSPE konjugatı takılı NLC yapılarında artan konjugat konsantrasyonlarında (%5-15) boş yapıya göre partikül boyutları artmış ve zeta potansiyel değerleri ise azalmıştır (Chu vd., 2014). Literatürde verileri elde edilen sonuçları destekler niteliktedir.

PDI, boyut ve zeta potansiyel verileri sonucunda 2 mg konjugat miktarı optimum olarak seçilmiştir. Optimum olarak seçilen P-NLC örneğine ait hidrodinamik boyut ve zeta potansiyel dağılım grafikleri sırasıyla Şekil 4.29 ve 4.30'de verilmektedir.



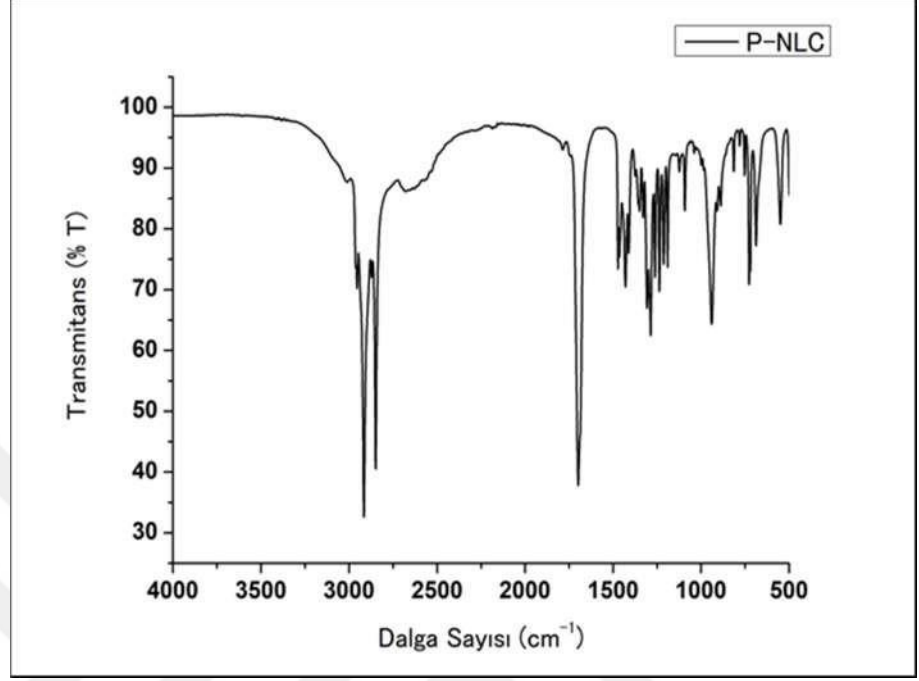
Şekil 4.29. P-NLC örneğine ait hidrodinamik boyut dağılım grafiği.



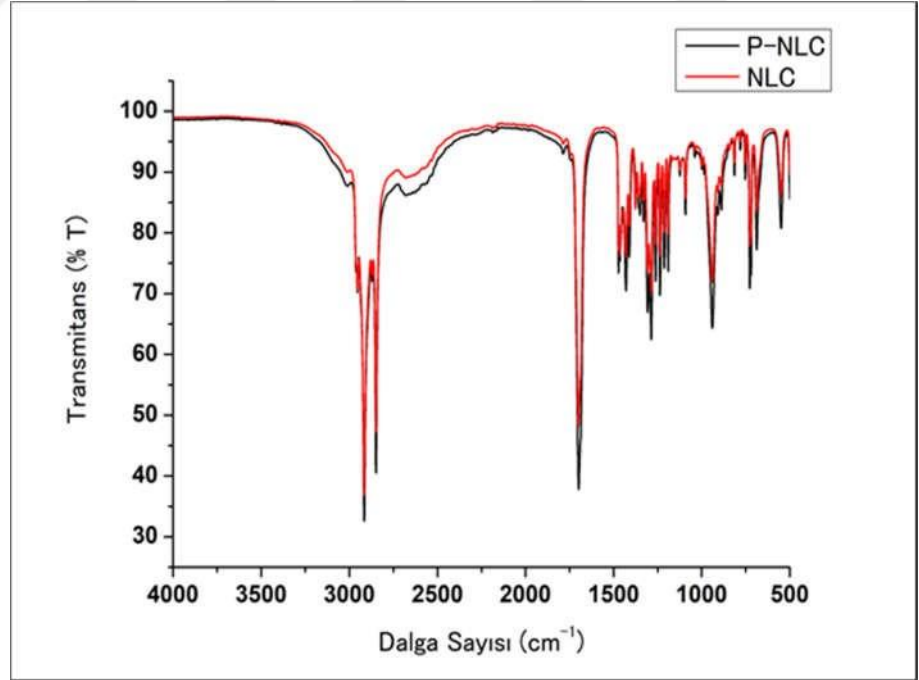
Şekil 4.30. P-NLC örneğine ait zeta potansiyel dağılım grafiği.

FTIR analizi

P-NLC örneğine ait FTIR spektrumu Şekil 4.31’de verilmektedir. NLC ve P-NLC yapıları Şekil 4.32’te karşılaştırmalı olarak verilmiştir.



Şekil 4.31. P-NLC örneğine ait FTIR spektrumu.



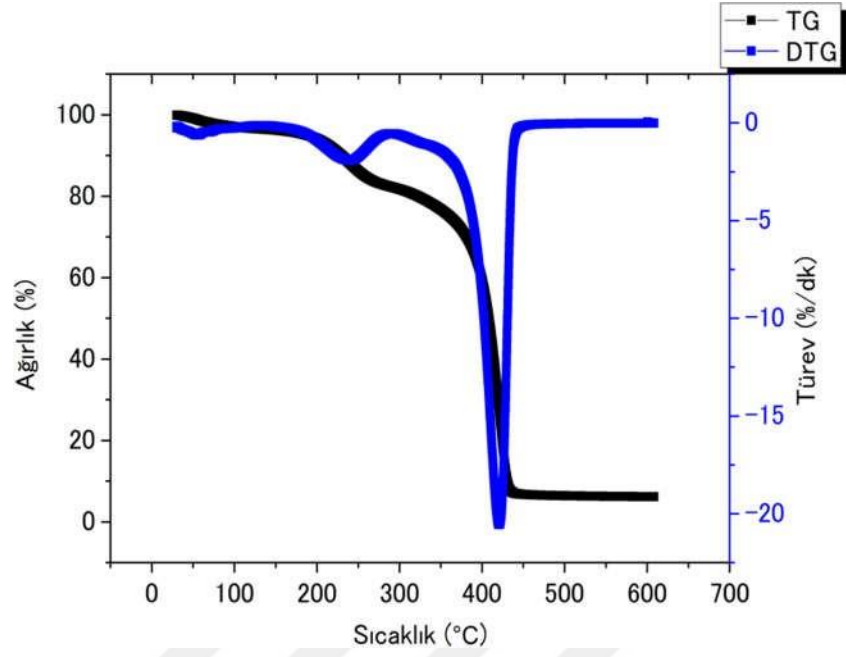
Şekil 4.32. NLC ve P-NLC örneğine ait FTIR spektrumları.

P-NLC örneği FTIR spektrumu genel olarak NLC örneğinin spektrumuna benzemektedir. Bununla birlikte, 1742 cm^{-1} ’de görülen ester karbonil grubu gerilmesi NLC örneğine göre hafif artış göstermektedir. Mann ve

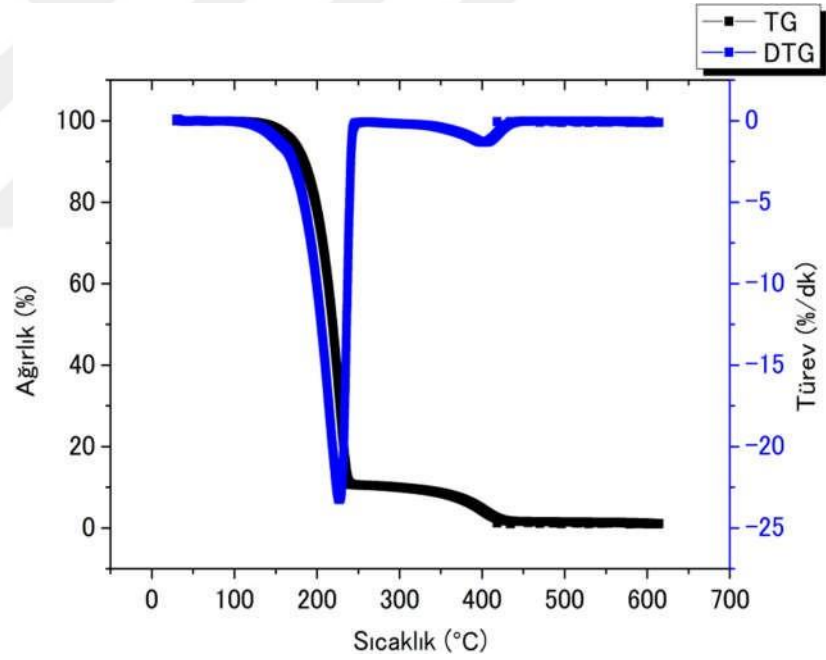
arkadaşları tarafından yapılan çalışmada lipozom yapısına DSPE-PEG eklenmesi ile oluşan yapının FTIR spektrumunda DSPE-PEG yapısından gelen ester bağı C=O gerilmesinin $\sim 1700 \text{ cm}^{-1}$ 'de artış meydana getirdiği görülmektedir (Mann vd., 2011). P-NLC örneği FTIR spektrumunda 1462, 1470 cm^{-1} 'de ve 1375, 1357 cm^{-1} 'deki CH grupları eğilme sinyallerinin NLC örneğine göre arttığı görülmektedir. DSPE-PEG-Tirozin yapısında bulunan C-H gruplarının NLC örneğine göre P-NLC örneğinde artışa sebep olduğu düşünülmektedir. Haghirsadat ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, DSPE-PEG içeren lipozomal yapının FTIR analizinde DSPE-PEG yapısına ait C-H gruplarının 1343-1465 cm^{-1} aralığında artmış sinyali görülmektedir (Haghirsadat vd., 2018). NLC yapısına DSPE-PEG-Tirozin konjugatı eklenmesi ile 1166, 1146 ve 1090 cm^{-1} 'de C-OH gerilmesi sinyallerinde artış olduğu söylenebilmektedir. Marasini ve arkadaşları tarafından DSPE-PEG içeren nanopartiküllerin FTIR analizinde 1170-1050 cm^{-1} aralığında C-OH gerilmesi sinyal artışının yapıya katılan DSPE-PEG yapısından kaynaklandığı ifade edilmektedir (Marasini vd., 2020). Literatür sonuçları da dikkate alındığında DSPE-PEG-Tirozin konjugatının NLC yapısına katıldığı ve P-NLC sentezinin başarıyla gerçekleştirildiği düşünülmektedir.

Termal gravimetrik analiz (TGA)

Hazırlanan NLC sisteminin LAT-1 hedefli olması için DSPE-PEG-Tirozin bileşiği partikül oluşum sırasında yapıya yüklenmiştir. Geliştirilen DSPE-PEG-Tirozin bileşiğine ait TGA eğrisi Şekil 4.33'te, DSPE-PEG-Tirozin yüklenmiş NLC olan P-NLC örneğine ait TGA eğrisi Şekil 4.34'te verilmiştir.



Şekil 4.33. DSPE-PEG-Tirozin örneğine ait TGA eğrisi.



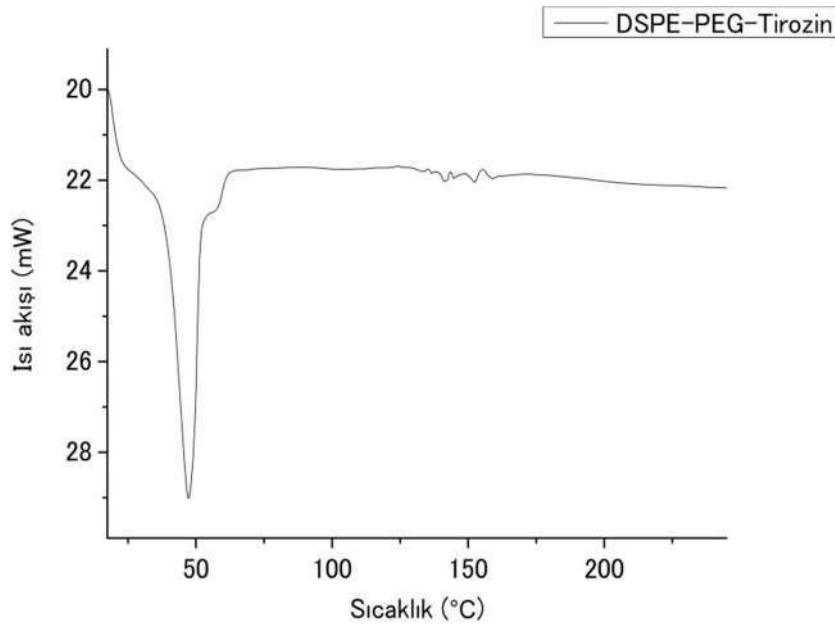
Şekil 4.34. P-NLC'nin TGA eğrisi.

DSPE-PEG-Tirozin bileşiğinin termal gravimetrik analizi sonucunda 440 °C'ye kadar bozunma meydana geldiği görülmektedir. Tepe noktası 236,29 °C'de olan bir miktar bozulmanın devamında 421,19 °C'de maksimum bozunma gerçekleşmiştir. Emanet ve arkadaşlarının 2020 yılında yaptığı bir çalışmada, DSPE-PEG-NH₂ bileşiğinin TGA analizi sonucunda 240 °C-400 °C sıcaklık aralığında ağırlık kaybı meydana geldiği bildirilmiştir (Emanet vd.,

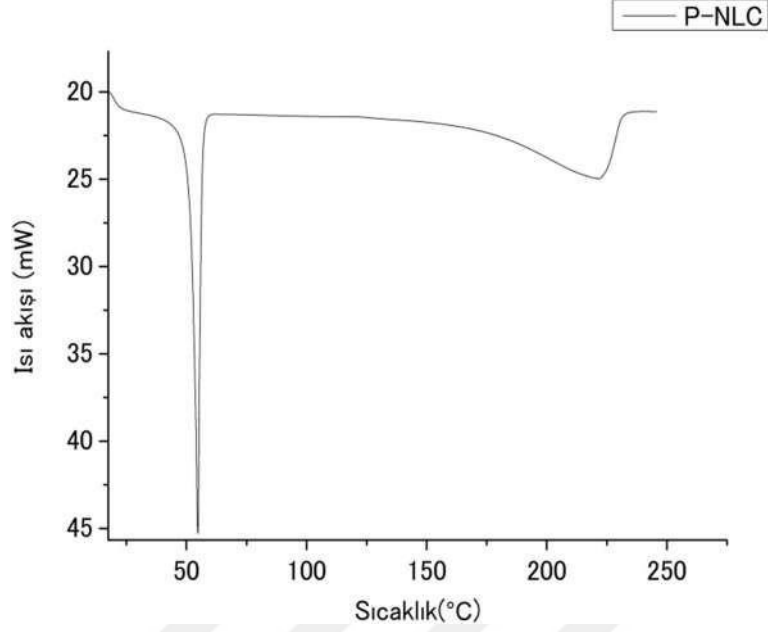
2020). Ramachandran ve Natarajan tarafından yapılan çalışmada ise L-tirozin'in TGA analizi sonucu 260 °C-300 °C aralığında CO₂ ve NH₃ açığa çıkmasından dolayı büyük bir ağırlık kaybı meydana geldiği belirtilmiştir. 300 °C- 420 °C arasında L-tirozin'in yanması ile hidrojenin su buharına dönüşmesi sonucunda daha az bir ağırlık kaybı gözlemlenmiştir(Ramachandran ve Natarajan, 2002). Çalışmamızdaki DSPE-PEG-Tirozin bileşiğindeki bozunma sıcaklıkları, literatürlerde verilen bozunma sıcaklıkları ile benzer aralıklarda olduğu gözlemlenmiştir. P-NLC örneğine ait TG analizi sonucunda ilk maksimum bozunmanın 227,20 °C'de meydana geldiği ve ~%22'lik bir ağırlığın maksimum 404,08 °C'de bozunmaya uğradığı tespit edilmiştir. Boş NLC örneğine göre ikinci basamak maksimum bozunma sıcaklığındaki bir miktar kaymanın yapıdaki DSPE-PEG-Tirozin'den kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu ikinci basamak bozunmadaki ağırlık kaybının boş NLC örneğine göre biraz daha fazla olması bu sonucu destekler niteliktedir.

Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) analizi

Hazırlanan P-NLC nanopartiküllerin erime ve kristalleşme davranışını incelemek için DSC analizi yapılmıştır. DSPE-PEG-Tirozin bileşiğine ait DSC eğrisi Şekil 4.35'da, DSPE-PEG-Tirozin ile hedeflenmiş NLC örneğine ait DSC eğrisi Şekil 4.36'de gösterilmektedir.



Şekil 4.35. DSPE-PEG-Tirozinin DSC eğrisi.

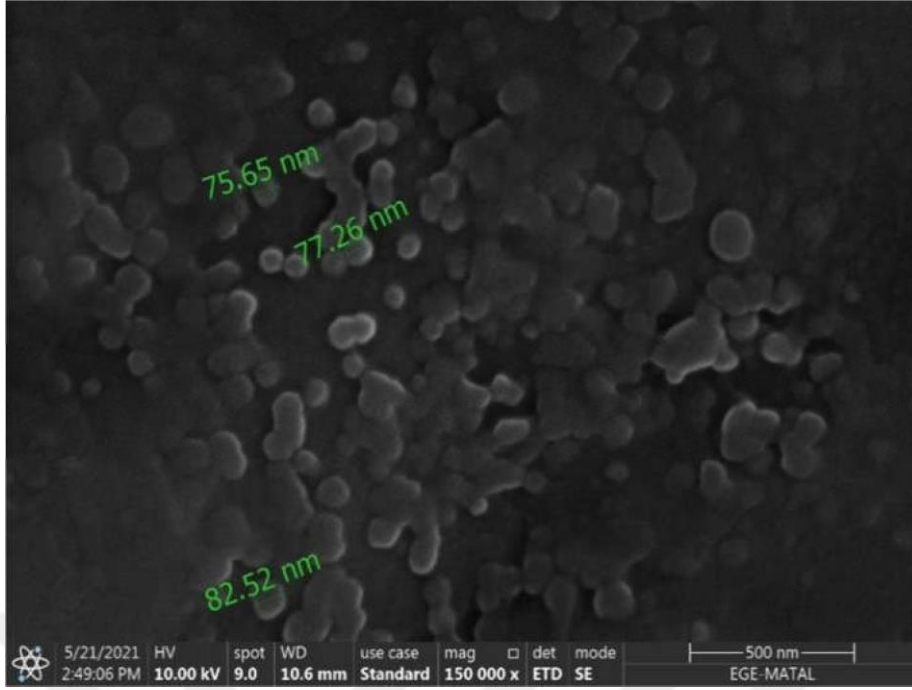


Şekil 4.36. P-NLC örneğine ait DSC eğrisi.

DSPE-PEG-Tirozin bileşiğinin erime sıcaklığı 47,21 °C ve P-NLC örneğinin erime sıcaklığı ise 54,70 °C olarak ölçülmüştür. NLC yapısına göre P-NLC yapısının erime sıcaklığında oldukça az bir miktar düşüş meydana geldiği belirlenmiştir. Cunningham ve arkadaşlarınca yapılan çalışmada DSPE-PEG (2000) bileşiğinin erime sıcaklığının 50,3 °C olduğu bildirilmiştir (Cunningham vd., 2020). Kumbhar ve Pokharkar ile Patel ve arkadaşları yaptıkları NLC çalışmalarında, NLC'lere yüzey kaplamaları eklenmesiyle birlikte erime sıcaklığında düşüşün meydana geldiğini, bu düşüşün ilaç yükleme çalışmalarında avantajlar sağlayabildiğini ifade etmişlerdir (Kumbhar ve Pokharkar, 2013; D. Patel vd., 2012). Literatür verileri elde edilen sonuçları desteklemektedir.

Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi

Hazırlanan NLC'lerin LAT-1 hedefli yapılar olabilmesi için DSPE-PEG-Tirozin bileşiği yüklenmiş ve SEM görüntüsü Şekil 4.37'de verilmiştir. Boş NLC örneklerine göre daha düzenli ve küresel yapılar elde edilmiştir.



Şekil 4.37. P-NLC örneğine ait SEM görüntüsü.

P-NLC örneğine ait SEM analizi sonucunda nanopartiküllerin küresel morfolojide ve yaklaşık 78nm boyutlarında olduğu görülmüştür. Wang ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, PEG ile kaplanmış NLC'lerin morfolojisi hakkında bilgi edinmek için SEM analizi yapılmış ve küresel şekilde yapılar elde edildiği görülmüştür (L. Wang vd., 2015). Yapılan bu çalışmaların sonuçları çalışma sonuçlarımızla uyumlu niteliktedir.

4.4. LAT-1 Hedefli ve Doksorubisin ile Trabektedin Yüklü Nanoyapılı Lipid Taşıyıcıların Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Doksorubisin, topoizomerez II'yi inhibe ederek DNA'ya bağlanan ve bu şekilde topoizomerez II-DNA kompleksine müdahale eden bir antikanser ilaçtır (HELVACIOĞLU vd., 2018). Doğrudan interkalasyon yoluyla çift sarmallı DNA kırılmalarının oluşumuna yol açar ve dolayısıyla DNA duplikasyonunu ve mRNA'ya transkripsiyonu inhibe eder (Liao vd., 2005). Li vd. Dox ikili ilaç sistemiyle, PEG ile modifiye edilmiş NLC yapısına yüklendiğinde, ilacın stabilitesi ve dolaşım süresinin arttığını, EPR etkisiyle tümör dokusunda artan biçimde biriktiğini ve bu şekilde tümör büyümesini engellediğini ortaya koymuşlardır (X. Li vd., 2018). Trabektedin, guanin ve sitozin açısından zengin dizilerde alkilasyonu tercih ederek N2 pozisyonunda bulunan DNA minör oluştuktaki guanin kalıntılarına kovalent bağlanarak etki eden antikanser bir

ilaçtır. Mikromolar konsantrasyonlardaki trabektedin, topoizomeraz I ve bir dizi transkripsiyon faktörünü inhibe eder ve bu şekilde tümör hücrelerindeki DNA hasarının onarılmasını da engeller (Chuk vd., 2009; David-Cordonnier vd., 2005). Yapılan bir çalışmada trabektedinin nanopartiküle yüklenmesiyle ilaç salınımının ve tümör hücresinde ilaç tutulmasının arttığı sonucuna varılmıştır (Sponchioni vd., 2017).

İlaç yüklenme miktarının belirlenmesi

Farklı ilaç miktarlarında hazırlanan NLC örneklerinde bağlanmayan ilaç yapıdan uzaklaştırılarak HPLC analizleri yapıldı. Analiz verilerine göre ilaçların nanotaşıyıcıya yüklenme verimleri (%) Eşitlik 1 ve 2'deki formül ile belirlendi. Farklı miktarlarda ilaç içeren NLC örneklerine ait doksorubisin ve trabektedin % yüklenme verimleri sırasıyla Tablo 4.3 ve 4.4'te verilmektedir.

$$\text{Dox Yüklenme Verimi(\%)} = \frac{\text{Başlangıç Dox miktarı (mg)} - \text{Yüklenmeyen Dox miktarı (mg)}}{\text{Başlangıç Dox miktarı (mg)}} \times 100$$

(1)

$$\text{Trb Yüklenme Verimi(\%)} = \frac{\text{Başlangıç Trb miktarı (\mu g)} - \text{Yüklenmeyen Trb miktarı (\mu g)}}{\text{Başlangıç Trb miktarı (\mu g)}} \times 100$$

(2)

Tablo 2.3 Farklı miktarlarda doksorubisin içeren NLC örneklerine ait Dox yüklenme verimi (%).

Doksorubisin miktarı (mg)	Yüklenme verimi (%)
2,5	88,50
5	60,01
7,5	43,45
10	34,39

Tablo 4.4. Farklı miktarlarda trabektedin içeren NLC örneklerine ait Trb yüklenme verimi (%).

Trabektedin miktarı (μg)	Yüklenme verimi (%)
50	98,00
100	95,00
150	95,62
200	97,16

Veriler sonucunda trabektedinin yüklenme veriminin doksorubisine kıyasla daha yüksek olduğu görülmüştür. Trabektedinin yüksek konsantrasyonlarında yüklenme veriminin %95'in üzerine çıkabileceği de söylenebilmektedir. Doksorubisin ise yükselen konsantrasyonlarında yüklenme verimi belirli konsantrasyonların üstünde azalış gösterdiği görülmüştür. Ying ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, farklı konsantrasyonlarda doksorubisin içeren NLC yapılarının % bağlanma veriminin, artan doksorubisin miktarlarında azaldığı gösterilmektedir (Ying vd., 2008). Moraes ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada Dox enkapsüle edilmiş NLC'lerin bağlanma verimini %60 olarak bulduğu görülmüştür (Moraes vd., 2021). Abdolahpour ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise benzer şekilde doksorubisinin NLC enkapsülasyon verimi yaklaşık %65 olarak belirtilmektedir (Abdolahpour vd., 2017). Dolayısıyla literatürde de bulduğumuz oranlara yakın çalışmalar olduğu görülmektedir.

Partikül boyut, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel analizi

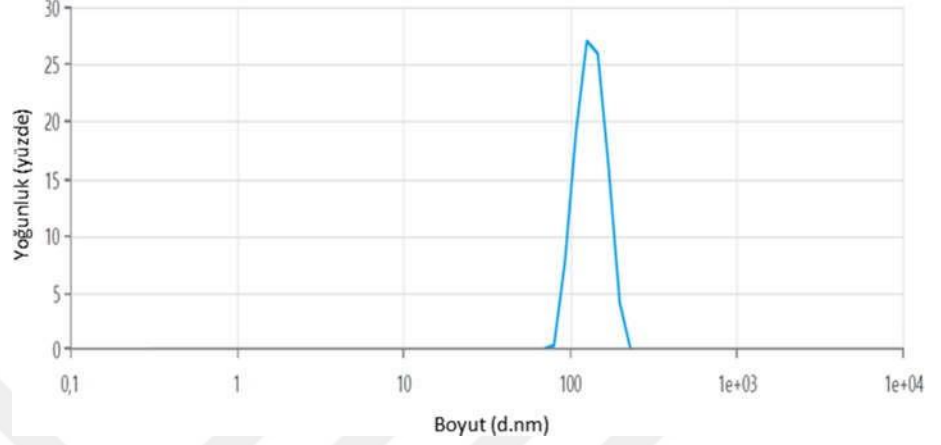
Artan ilaç miktarı ile elde edilen hidrodinamik boyut, PDI ve zeta potansiyel değerleri Tablo 4.5'te verilmektedir.

Tablo 4.5. Artan ilaç miktarı ile elde edilen hidrodinamik boyut, PDI ve zeta potansiyel değerleri.

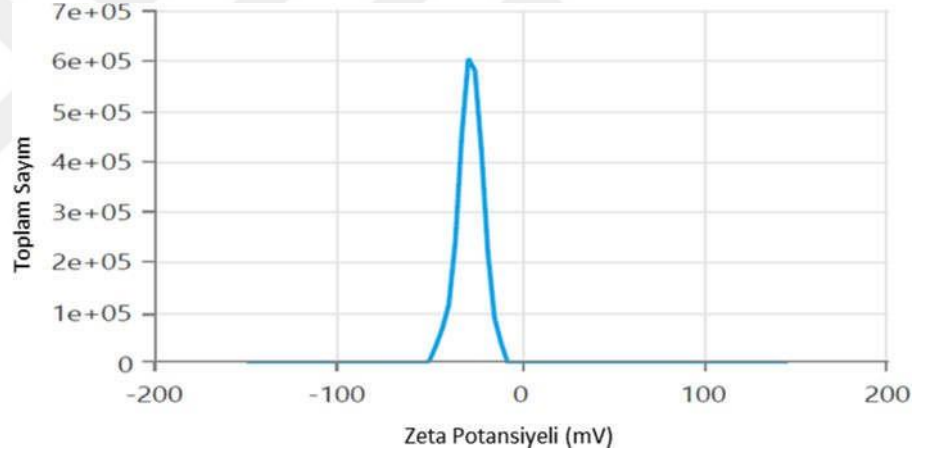
Başlangıç ilaç miktarı		Hidrodinamik boyut (nm)	PDI	Zeta potansiyel (mV)
Dox (mg)	Trb (µg)			
2,5	50	114,07±9,85	0,475±0,135	-29,74±0,59
5	100	123,77±9,69	0,472±0,126	-27,89±1,12
7,5	150	136,83±6,69	0,538±0,245	-23,28±1,24
10	200	187,90±15,51	0,778±0,164	-16,91±0,70

Elde edilen sonuçlara bakıldığında enkapsüle edilen ilaç miktarı artışı ile doğru orantılı olarak boyutların da arttığı görülmüştür. PDI değerleri incelendiğinde ise 5mg DOX ve 200ug TRB miktarlarının üstüne çıkıldığında 0,5 değerini aştığı görülmüştür. Zeta potansiyel değerlerinde görüldüğü üzere ilaç miktarı artışı ile düştüğü görülmüştür. Tüm veriler yorumlandığında optimum koşulların 5mg DOX ve 100ug TRB içeren NLC olarak kabul

edilebileceği görülmektedir. Optimum Bu koşullarda hazırlanan DTP-NLC örneğine ait hidrodinamik boyut ve zeta potansiyel dağılım grafikleri Şekil 4.38 ve 4.39'ta sırasıyla verilmektedir.



Şekil 4.38. DTP-NLC örneğine ait hidrodinamik boyut dağılım grafiği.



Şekil 4.39. DTP-NLC örneğine ait zeta potansiyel dağılım grafiği.

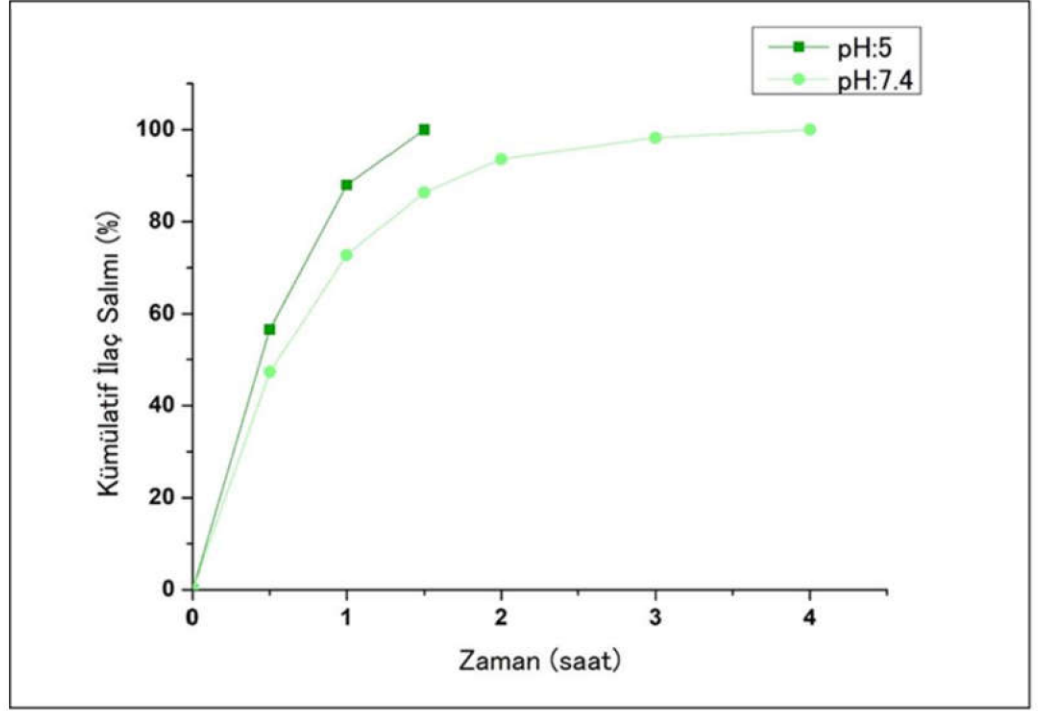
Ying ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, artan DOX konsantrasyonlarında sentezledikleri NLC boyutlarının arttığını ve zeta potansiyel değerlerinde azalış gözlemlemişlerdir. belirtilmektedir (Ying vd., 2008). Fernandes ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, boş nanopartikül ile DOX yüklü nanopartikülleri incelemiş ve DOX yüklü NLC'lerin zeta potansiyel değerinin azaldığını gözlemlemiştir (R. S. Fernandes vd., 2016). Li ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, ikili ilaç enkapsüle edilmiş ve PEG ile modifiye edilmiş NLC'lerin boyutunun 100 nm civarı olduğu görülmüştür. İkili ilaç içeren NLC % bağlanma verimi ise %83,8-92,3 aralığında belirlenmiştir. Çalışma ikili ilaç sistemlerinin etkinliğinin umut verici olduğu da belirtilmiştir

(X. Li vd., 2018).Otarola ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, melanoma tedavisinde deri uygulamalarında penetrasyonu arttırıcı etki olarak negatif yüke sahip nanopartiküllerin daha etkin olacağını ileri sürdüğü görülmüştür (Otarola vd., 2021).

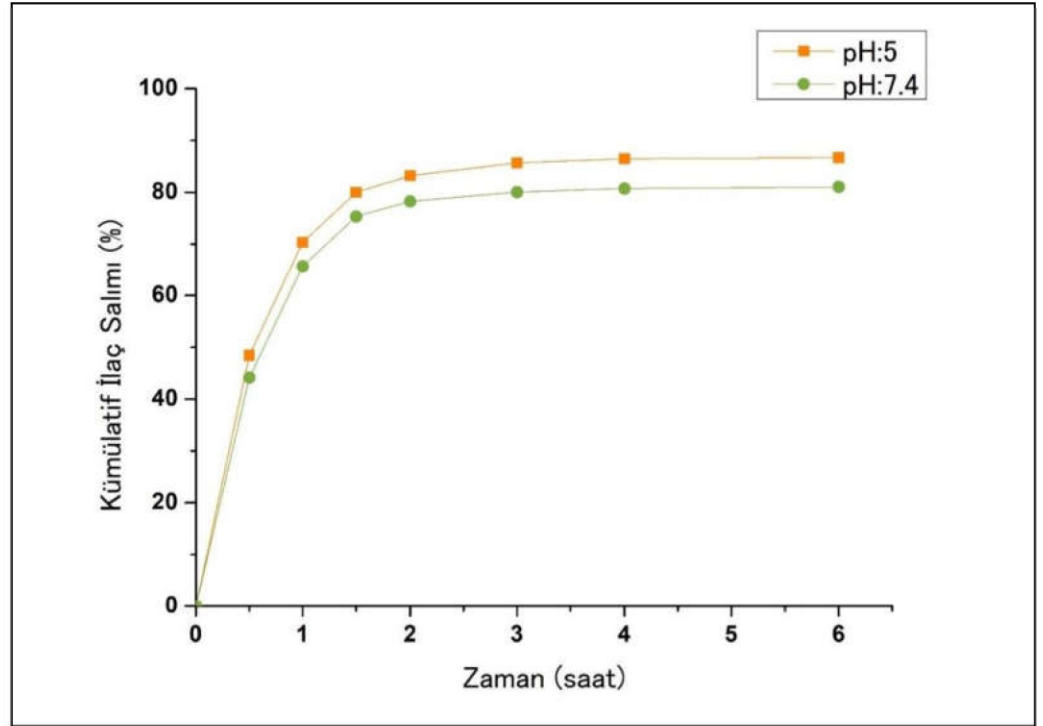
4.3. In Vitro İlaç Salımı

4.3.1. DTP-NLC ilaç salımı

Doksorubisin ve trabektedin içeren serbest ilaç çözeltisinin, DTP-NLC partiküllerinin ve DTP-NLC jelin ilaç salım çalışmaları fizyolojik pH değerindeki pH 7,4 fosfat tamponu ve asidik pH'a sahip pH 5 asetat tamponuna karşı yapılmıştır. Serbest ilaç karışımının Dox ve Trb % salım değerleri sırasıyla Şekil 4.40 ve 4.41'te gösterilmektedir. Serbest formda pH 5 tamponunda doksorubisin miktarının tamamı 1,5 saatte salım gösterirken pH 7,4 tamponunda 1,5. saatte %86,38 ve 4. saatte %100 salım görülmektedir. 2018 yılında yapılan bir çalışmada, serbest Dox salımının pH 7,4'te 7 saatte yaklaşık %100 salım gösterdiği bulunmuştur (R. S. Fernandes vd., 2018). Yuan ve arkadaşlarının çalışmasında, serbest doksorubisinin 4 saatte yaklaşık % 90'ının salım gösterdiği tespit edilmiştir (Yuan vd., 2017). Ayrıca Sadighian ve arkadaşlarının çalışmasında, serbest Dox için pH 5'te pH 7,4'e göre daha fazla salım olduğu görülmektedir (Sadighian vd., 2014). Çalışmamızda serbest ilaç çözeltisinde trabektedin salımı 4. saatte pH 5'te % 86 iken pH 7,4'te % 80 olduğu görülmektedir. Doksorubisinde olduğu gibi trabektedinde de pH 5'te daha iyi bir salım olduğu görülmektedir fakat doksorubisine göre çözünürlüğü daha düşük olduğundan daha yavaş salım gösterdiği düşünülmektedir.

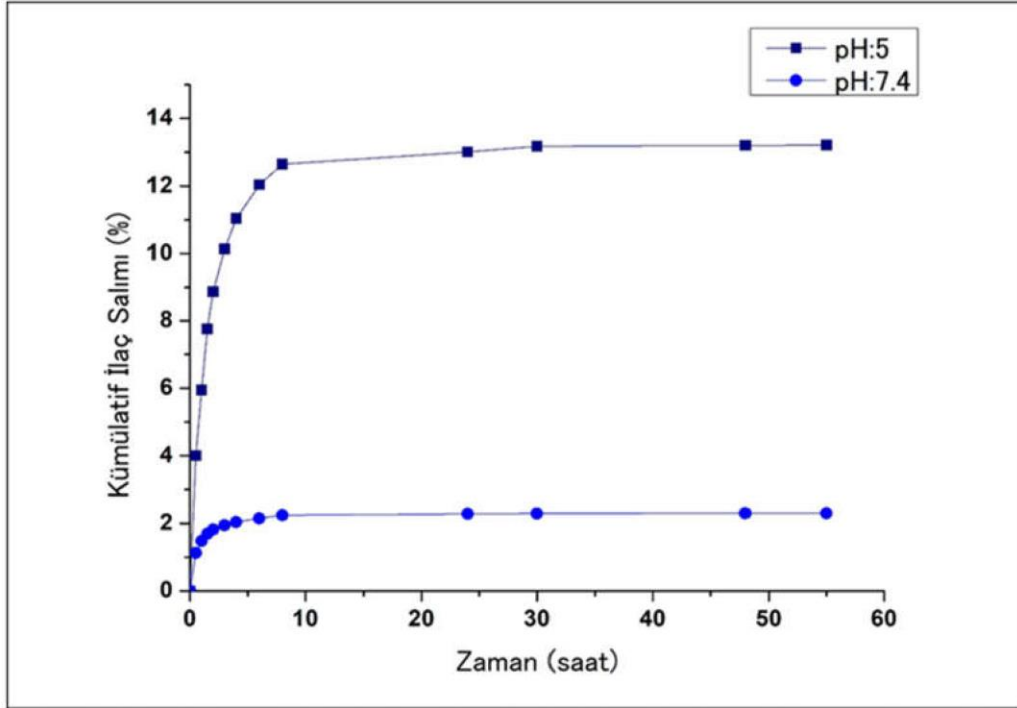


Şekil 4.40. Dokсорubisin ve trabektedin içeren serbest ilaç çözeltisinden pH 7,4 ve pH 5 tamponlarındaki zamana bağlı dokсорubisin salımı.

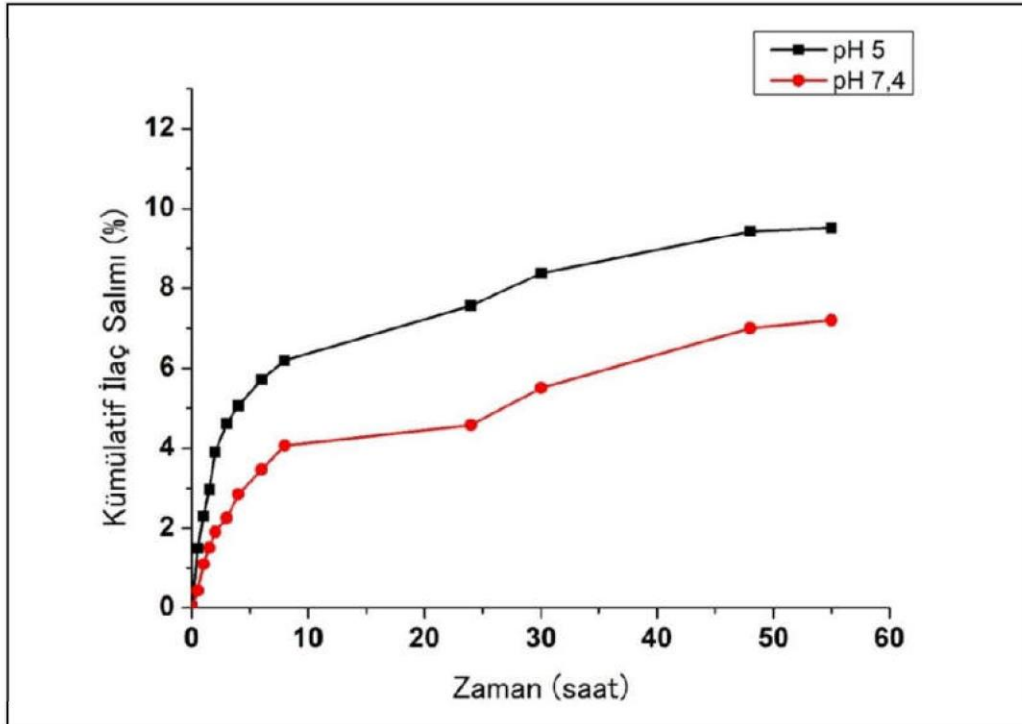


Şekil 4.41. Dokсорubisin ve trabektedin içeren serbest ilaç çözeltisinden pH 7,4 ve pH 5 tamponlarındaki zamana bağlı trabektedin salımı.

DTP-NLC yapısından pH 7,4 ve pH 5'teki kümülatif Dox salım verileri (%) sırasıyla Şekil 4.42 ve 4.43'te verilmektedir.



Şekil 4.42. Dokсорubisinin DTP-NLC partiküllerinden pH 7,4 ve pH 5 tamponlarındaki zamana bağlı salımı.



Şekil 4.43. Trabektedinin DTP-NLC partiküllerinden pH 7,4 ve pH 5 tamponlarındaki zamana bağlı salımı.

Salım verileri incelendiğinde LAT-1 hedefli trabektedin ve dokсорubisin yüklü nanoyapılı lipid taşıyıcılardan ilaçların serbest forma göre çok daha düşük olduğu görülmektedir. Nanopartikül formülasyonunda

doksorubisinin asidik ortamdaki salımı fizyolojik pH ortamına göre daha fazladır. Nanopartiküllerden Dox pH 5'te 1. saatte yaklaşık % 6 salım gösterirken pH 7,4'te 3 saat sonunda %2 salım tespit edilmiştir. 24. Saatte Dox salımı pH 5 ortamında % 13 iken pH 7,4 tamponunda % 2,3 olarak elde edilmiştir. Daha hızlı başlayan ardından yavaş devam eden salım profili görülmektedir. Literatürde de nanopartiküllerden Dox salımları asidik ortamda daha fazla olduğu bulunmuştur. Fernandes ve arkadaşlarının çalışmasında doksorubisinin NLC yapısından pH 7,4'te 2 saatte %5 oranında salımı meydana gelmiştir (R. S. Fernandes vd., 2018). Wang ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, NLC içerisine yüklenen doksorubisinin formülasyondan 48 saatlik bir süre boyunca kademeli olarak salındığını göstermektedir (Y. Wang vd., 2016). 2017 yılındaki bir çalışmada pH 7,4 ve pH 5'te Dox enkapsüle NLC sisteminin ilaç salımı incelemişler ve pH 5 ortamındaki salımın pH 7,4 ortamına göre daha fazla olduğu görülmektedir. Çalışmada ayrıca, asidik ortamda ilacın salım hızının düşük pH ortamında daha hızlı olduğu ve kapsüllenmiş bir ilacın salım profillerinin salım ortamının iyonik gücüne bağlı olduğu gösterilmiştir. Asidik ortam, ilacın nanotaşıyıcılardan salım hızını artırabilir. Doksorubisinin pKa değeri 8,3'tür ve bu nedenle pH ve protonasyon durumuna bağlı olarak değişen çözünürlüğe sahiptir. Doksorubisinin temel yapısı nedeniyle daha düşük pH'da daha yüksek çözünürlüğü söz konusudur. Bu nedenle, daha düşük pH'lı salım ortamında, NLC içerisinde tutulan Dox, nanoparçacık matrisinden dışarı çıkma eğilimine sahiptir (Abdolahpour vd., 2017). Nanopartiküllerin gerek melanoma asidik mikroçevresi gerekse hücre içi asidik yıkım prosesleri dikkate alındığında düşük pH ortamında daha fazla ilaç salımı sağlaması proje hedefine uygun bir sonuçtur. İlaç taşıma sisteminin salım profili göz önüne alındığında formülasyonun özellikle in vivo uygulamalarda avantaj yaratacağı düşünülmektedir.

5. SONUÇLAR

Deri kanseri dünya çapında en yaygın görülen kanserlerden biridir. Melanoma ise cilt kanseri vakalarının en ölümcül olan türüdür. Öldürücülüğü ise geçmişten günümüze artarak katlanmaktadır. Nanotaşıyıcı sistemler, ilaçların daha düşük dozlarda etki göstermesini ve istenilen doku veya organa hedeflenmesini sağlamaktadır. Bu sayede kemoterapötik ajanların yan etkileri azalmaktadır. Nanoyapılı lipid taşıyıcılar, düzensiz kristal yapılar sayesinde ilaç yükleme kapasitesi artar ve kontrollü ilaç salımının gerçekleşmesi sağlanır. Bunun yanı sıra düşük toksisite, biyoparçalanabilir/biyouyumlu özelliktedir. NLC'lerin içerdiği katı ve sıvı lipidler ile kemoterapötik ajanlar etkileşime girerek enkapsülasyonu arttırmaktadır. LAT-1 melanoma hücrelerinde aşırı eksprese olduğu için hedeflendirme LAT-1 taşıyıcıları üzerinden ön plana çıkmaktadır.

Tez kapsamında kemoterapötik ajanların yan etkilerini olabildiğince azaltmak ve etkinliğini arttırmak için DSPE-PEG-Tirozin yapısı ile melanoma hücrelerinde aşırı eksprese olan LAT-1 taşıyıcıları hedefleyerek nanoyapılı lipid taşıyıcılara doksorubisin ve trabektedin enkapsülasyonu gerçekleştirerek kullanılmıştır (DTP-NLC). İlaç salım profilleri incelendiğinde tümör mikroçevresine uygun olan asidik koşullarda daha yüksek salım profili görülmüştür. Doksorubisin ve trabektedinin serbest ilaç formları saatte neredeyse tamamına yakını salım gösterirken DTP-NLC formülasyonu 50 saatin üstünde bile az bir kısmının salım gösterdiği ve uzun süreli, kontrollü salım profili gerçekleştirdiği sonucuna varılmıştır. DTP-NLC formülasyonunun hidrodinamik boyutu 123,77 nm, PDI değeri 0,472 ve zeta potansiyel değeri -27,89 mV olarak bulunmuştur. Tüm bu veriler sonucunda melanoma tedavisi için hedeflendirilmiş ve kemoterapötik ajanların ikili kullanımı ile etkinliğinin arttırıldığı bir nanoyapılı lipid taşıyıcı sistemi geliştirildiği sonucuna varılmıştır.

6.ÖNERİLER

Tez kapsamında ikili ilaç içeren hedefli nanoyapılı lipid taşıyıcıların hazırlanması ve karakterizasyonu ile dünyada sık görülen kanser türü olan deri kanserinin en ölümcül türü olan melanomanın tedavisini amaçlamamaktadır. İkili ilaç içeren hedefli nanoyapılı lipid taşıyıcı sistemler ile hücresel düzeylere ilaç taşınımını arttırmak, düşük dozlarda etkin ve güvenli tedavi sağlamak amaçlanmıştır. L-tipi amino asit taşıyıcısı 1 (LAT-1), melanoma hücrelerinde aşırı eksprese olduğu bilindiği üzere hedef olarak DSPE-PEG-Tirozin konjugatı ile kemoterapötik ajanları içeren nanoyapılı lipid taşıyıcı formülasyonu geliştirilmiştir. Geliştirilen nanoyapılı lipid taşıyıcılarla çeşitli karakterizasyon çalışmaları yapılarak optimum sentez koşulları belirlenmiştir. Elde edilen veriler literatür ile kıyaslanarak formülasyonun biyouyumluluğu, boyutları ve çeşitli sentez koşulları geliştirilmiştir. Geliştirilen nanoyapılı lipid taşıyıcıların salım profilleri incelenerek literatürle kıyalanmıştır. Nanoyapılı lipid taşıyıcıların, tümör mikroçevresi ile uyumlu olarak daha fazla salım yaptığı ve yavaş, kontrollü bir salım profili gerçekleştirdiği görülmüştür.

Tez kapsamında sadece hedeflendirilmiş kemoterapötik ajanları içeren nanoyapılı lipid taşıyıcıların sentezi ve karakterizasyonunu içeren veriler verilmiş olsa da 219S788 no'lu TÜBİTAK 1001 projesi çerçevesinde jel formülasyonlarının geliştirilmesi, in vitro ve in vivo çalışmaları yürütülmüştür. Tüm çalışmalardan elde edilen veriler sonucunda hazırlanan nanoyapılı lipid taşıyıcıların hedeflendirilmiş şekilde metastazın önlediği ve tedavi etkinliğinin literature kıyasla iyi olduğu belirlenmiştir. Bir sonraki aşamalarda faz çalışmalarının gerçekleştirilerek yüksek ölçekli üretime geçilip, insanlığa faydalı olacak bir formülasyonun piyasaya sürülmesi önerilmektedir.

7.KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abdolahpour, S., Mahdieh, N., Jamali, Z., Akbarzadeh, A., Toliyat, T. ve Paknejad, M.** 2017, Development of Doxorubicin-Loaded Nanostructured Lipid Carriers: Preparation, Characterization, and In Vitro Evaluation on MCF-7 Cell Line. *BioNanoScience*, 7(1), 32-39.
- Acid, L. ve Acid, P.** 1987, 3 Final Report on the Safety Assessment of Oleic Acid, Lauric Acid, Palmitic Acid, Myristic Acid, and Stearic Acid. *International Journal of Toxicology*, 6(3), 321-401.
- Alavi, M. ve Hamidi, M.** 2019, Passive and active targeting in cancer therapy by liposomes and lipid nanoparticles. *Drug Metabolism and Personalized Therapy*, 34(1).
- Alavi, M., Karimi, N. ve Safaei, M.** 2017, Application of Various Types of Liposomes in Drug Delivery Systems . *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 7(1), 3-9.
- Atkins, M. B., Curiel-Lewandrowski, C., Fisher, D. E., Swetter, S. M., Tsao, H., Aguirre-Ghiso, J. A. ve ... Merlino, G.** 2021, The State of Melanoma: Emergent Challenges and Opportunities . *Clinical Cancer Research*, 27(10), 2678-2697.
- Augustyn, E., Finke, K., Zur, A. A., Hansen, L., Heeren, N., Chien, H. C. ve ... Thomas, A. A.** 2016, LAT-1 activity of meta-substituted phenylalanine and tyrosine analogs . *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 26(11), 2616-2621.
- Azizi, M., Kierulf, A., Lee, M. C. ve Abbaspourrad, A.** 2018, Improvement of Physicochemical Properties of Encapsulated Echium Oil Using Nanostructured Lipid Carriers Morteza Azizi, Arkaye Kierulf, Michelle Connie Lee, Alireza Abbaspourrad Department | of Food Science, Cornell University, Ithaca, NY , 1(607).
- Babazadeh, A., Ghanbarzadeh, B. ve Hamishehkar, H.** 2017, Formulation of food grade nanostructured lipid carrier (NLC) for potential applications in medicinal-functional foods . *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 39, 50-58.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Badr-Eldin, S. M., Labib, G. S. ve Aburahma, M. H.** 2019, Eco-Friendly Tadalafil Surfactant-Free Dry Emulsion Tablets (SFDETs) Stabilized by In Situ Self-Assembled Aggregates of Natural Oil and Native Cyclodextrins . *AAPS PharmSciTech*, 20(7).
- Battaglia, L., Gallarate, M., Peira, E., Chirio, D., Muntoni, E., Biasibetti, E. ve ... Riganti, C.** 2014, Solid Lipid Nanoparticles for Potential Doxorubicin Delivery in Glioblastoma Treatment: Preliminary In Vitro Studies . *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 103(7), 2157-2165.
- Blay, J. Y., Von Mehren, M., Samuels, B. L., Fanucchi, M. P., Ray-Coquard, I., Buckley, B. ve ... Cesne, A. Le.** 2008, Phase I combination study of trabectedin and doxorubicin in patients with soft-tissue sarcoma . *Clinical Cancer Research*, 14(20), 6656-6662.
- Borges, G. S. M., Silva, J. de O., Fernandes, R. S., de Souza, Â. M., Cassali, G. D., Yoshida, M. I. ve ... Ferreira, L. A. M.** 2019, Sclareol is a potent enhancer of doxorubicin: Evaluation of the free combination and co-loaded nanostructured lipid carriers against breast cancer . *Life Sciences*, 232(February), 116678.
- Brito Raj, S., Chandrasekhar, K. B. ve Reddy, K. B.** 2019, Formulation, in-vitro and in-vivo pharmacokinetic evaluation of simvastatin nanostructured lipid carrier loaded transdermal drug delivery system . *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 5(1).
- Bunjes, H., Westesen, K. ve Koch, M. H. J.** 1996, Crystallization tendency and polymorphic transitions in triglyceride nanoparticles . *International Journal of Pharmaceutics*, 129(1-2), 159-173.
- Chhikara, B. S. ve Parang, K.** 2023, Global Cancer Statistics 2022: the trends projection analysis .
- Chu, Y., Li, D., Luo, Y. F., He, X. J. ve Jiang, M. Y.** 2014, Preparation and in vitro evaluation of glycyrrhetic acid-modified curcumin-loaded nanostructured lipid carriers . *Molecules*, 19(2), 2445-2457.
- Chuk, M. K., Balis, F. M. ve Fox, E.** 2009, Trabectedin . *The Oncologist*, 14(8), 794-799.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Clemons, T. D., Singh, R., Sorolla, A., Chaudhari, N., Hubbard, A. ve Iyer, K. S. 2018**, Distinction Between Active and Passive Targeting of Nanoparticles Dictate Their Overall Therapeutic Efficacy . *Langmuir*, 34(50), 15343-15349.
- Collgros, H., Rodriguez-Lomba, E., Regio Pereira, A., Lo, S. N., Scolyer, R. A. ve Guitera, P. 2021**, **Lentiginous** melanoma (lentigo maligna and lentigo maligna melanoma) in Australia: clinicopathological characteristics, management and recurrence rates after 10-year follow-up at a tertiary centre . *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 35(6), 1315-1322.
- Cuevas, C. ve Francesch, A. 2009**, Development of Yondelis® (trabectedin, ET-743). A semisynthetic process solves the supply problem . *Natural Product Reports*, 26(3), 322.
- Cunningham, A. J., Gibson, V. P., Banquy, X., Zhu, X. X. ve Jeanne, L. C. 2020**, Cholic acid-based mixed micelles as siRNA delivery agents for gene therapy . *International Journal of Pharmaceutics*, 578(January), 119078.
- Danhier, F., Feron, O. ve Préat, V. 2010**, To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery . *Journal of Controlled Release*, 148(2), 135-146.
- Das, S., Kiong, W., Tan ve R. B. H. 2012**, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* Are nanostructured lipid carriers (NLCs) better than solid lipid nanoparticles (SLNs): Development , characterizations and comparative evaluations of clotrimazole-loaded SLNs and NLCs . *European Journal Of Pharmaceutical Sciences*, 47(1), 139-151.
- David-Cordonnier, M. H., Gajate, C., Olmea, O., Laine, W., De La Iglesia-Vicente, J., Perez, C. ve ... Mollinedo, F. 2005**, DNA and non-DNA targets in the mechanism of action of the antitumor drug trabectedin . *Chemistry and Biology*, 12(11), 1201-1210.
- Davis, L. E., Shalin, S. C. ve Tackett, A. J. 2019**, Current state of melanoma diagnosis and treatment . *Cancer Biology & Therapy*, 20(11), 1366-1379.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- De Souza Guedes, L., Martinez, R. M., Bou-Chacra, N. A., Velasco, M. V. R., Rosado, C. ve Baby, A. R.** 2021, An Overview on Topical Administration of Carotenoids and Coenzyme Q10 Loaded in Lipid Nanoparticles . *Antioxidants*, 10(7), 1034.
- de Souza, I. D. L., Saez, V., de Campos, V. E. B. ve Mansur, C. R. E.** 2019, Size and Vitamin E Release of Nanostructured Lipid Carriers with Different Liquid Lipids, Surfactants and Preparation Methods . *Macromolecular Symposia*, 383(1), 1-7.
- D’Incalci, M. ve Galmarini, C. M.** 2010, A Review of Trabectedin (ET-743): A Unique Mechanism of Action . *Molecular Cancer Therapeutics*, 9(8), 2157-2163.
- Di Giandomenico, S., Frapolli, R., Bello, E., Ubaldi, S., Licandro, S. A., Marchini, S. ve ... D’incalci, M.** 2013, Mode of action of trabectedin in myxoid liposarcomas . *Oncogene*, 33(44), 5201-5210.
- Dicker, A. J., Serewko, M. M., Russell, T., Dahler, A. L., Saunders, N. A., Rothnagel, J. A. ve Strutton, G. M.** 2002, Isolation (From a Basal Cell Carcinoma) of a Functionally Distinct Fibroblast-Like Cell Type that Overexpresses Ptch . *Journal of Investigative Dermatology*, 118(5), 859-865.
- Diepgen, T. L. ve Mahler, V.** 2002, The epidemiology of skin cancer . *British Journal of Dermatology*.
- Eiras, F., Amaral, M. H., Silva, R., Martins, E., Lobo, J. M. S. ve Silva, A. C.** 2017, Characterization and biocompatibility evaluation of cutaneous formulations containing lipid nanoparticles . *International Journal of Pharmaceutics*, 519(1-2), 373-380.
- Elmowafy, M., Samy, A., Raslan, M. A., Salama, A., Said, R. A., Abdelaziz, A. E. ve ... Viitala, T.** 2016, Enhancement of Bioavailability and Pharmacodynamic Effects of Thymoquinone Via Nanostructured Lipid Carrier (NLC) Formulation . *AAPS PharmSciTech*, 17(3).
- Elmowafy, M., Shalaby, K., Badran, M. M., Ali, H. M., Abdel-Bakky, M. S. ve Ibrahim, H. M.** 2018, Multifunctional carbamazepine loaded nanostructured lipid carrier (NLC) formulation . *International Journal of Pharmaceutics*, 550(1-2), 359-371.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Elsas, F. J., Green, W. R. ve Ryan, S. J.** 1974, Benign Pigmented Tumors Arising in Acquired Conjunctival Melanosis . American Journal of Ophthalmology, 78(2), 229-232.
- Emanet, M., Şen ve Ö., Çulha, M.** 2020, Transferrin-Mediated Glioblastoma Cell Targeting of Hexagonal Boron Nitrides . Plasmonics, 15(6), 1543-1549.
- Fang, J.-Y., Fang, C.-L., Liu, C.-H., Su ve Y.-H.** 2008, Lipid nanoparticles as vehicles for topical psoralen delivery: Solid lipid nanoparticles (SLN) versus nanostructured lipid carriers (NLC) . European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 70(2), 633-640.
- Fernandes, G. D., Gómez-Coca, R. B., Pérez-Camino, M. D. C., Moreda, W. ve Barrera-Arellano, D.** 2017, Chemical Characterization of Major and Minor Compounds of Nut Oils: Almond, Hazelnut, and Pecan Nut . Journal of Chemistry, 2017, 5-7.
- Fernandes, R. S., Silva, J. O., Monteiro, L. O. F., Leite, E. A., Cassali, G. D., Rubello, D. ve ... de Barros, A. L. B.** 2016, Doxorubicin-loaded nanocarriers: A comparative study of liposome and nanostructured lipid carrier as alternatives for cancer therapy . Biomedicine and Pharmacotherapy, 84, 252-257.
- Fernandes, R. S., Silva, J. O., Seabra, H. A., Oliveira, M. S., Carregal, V. M., Vilela, J. M. C. ve ... Barros, A. L. B.** 2018, α - Tocopherol succinate loaded nano-structed lipid carriers improves antitumor activity of doxorubicin in breast cancer models in vivo . Biomedicine and Pharmacotherapy, 103(February), 1348-1354.
- Gaba, B., Fazil, M., Ali, A., Baboota, S., Sahni, J. K. ve Ali, J.** 2015, Nanostructured lipid (NLCs) carriers as a bioavailability enhancement tool for oral administration . Drug Delivery, 22(6), 691-700.
- Gallarate, M., Mittone, E., Carlotti, M. E., Trotta, M. ve Piccerelle, P.** 2009, Formulation of dry emulsion for topical applications . Journal of Dispersion Science and Technology, 30(6), 823-833.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Ganesan, P. ve Narayanasamy, D.** 2017, Lipid nanoparticles: Different preparation techniques, characterization, hurdles, and strategies for the production of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for oral drug delivery . *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 6, 37-56.
- Garbe, C. ve Eigentler, T. K.** 2007, Diagnosis and treatment of cutaneous melanoma: state of the art 2006* . *Melanoma Research*, 17(2), 117-127.
- Garcês, A., Amaral, M. H., Sousa Lobo, J. M. ve Silva, A. C.** 2018, Formulations based on solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) for cutaneous use: A review . *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 112, 159-167.
- Garg, N. K., Tyagi, R. K., Singh, B., Sharma, G., Nirbhavane, P., Kushwah, V. ve ... Katare, O. P.** 2016, Nanostructured lipid carrier mediates effective delivery of methotrexate to induce apoptosis of rheumatoid arthritis via NF- κ B and FOXO1 . *International Journal of Pharmaceutics*, 499(1-2), 301-320.
- Germano, G., Frapolli, R., Belgiovine, C., Anselmo, A., Pesce, S., Liguori, M. ve ... Allavena, P.** 2013, Role of Macrophage Targeting in the Antitumor Activity of Trabectedin . *Cancer Cell*, 23(2), 249-262.
- Gutiérrez, F. J., Albillos, S. M., Casas-Sanz, E., Cruz, Z., García-Estrada, C., García-Guerra, A. ve ... Mussons, M.-L.** 2013, Methods for the nanoencapsulation of β -carotene in the food sector . *Trends in Food Science & Technology*, 32(2), 73-83.
- Häfliger, P. ve Charles, R.-P.** 2019, The L-Type Amino Acid Transporter LAT1—An Emerging Target in Cancer . *International Journal of Molecular Sciences*, 20(10), 2428.
- Haghiralsadat, F., Amoabediny, G., Helder, M. N., Naderinezhad, S., Sheikhha, M. H., Forouzanfar, T. ve Zandieh-doulabi, B.** 2018, A comprehensive mathematical model of drug release kinetics from nano-liposomes, derived from optimization studies of cationic PEGylated liposomal doxorubicin formulations for drug-gene delivery . *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 46(1), 169-177.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Hajipour, H., Ghorbani, M., Kahroba, H., Mahmoodzadeh, F., Eameh, R. Z. ve Taheri, R. A. 2019**, Arginyl-glycyl-aspartic acid (RGD) containing nanostructured lipid carrier co-loaded with doxorubicin and sildenafil citrate enhanced anti-cancer effects and overcomes drug resistance . *Process Biochemistry*, 84(June), 172-179.
- Hatem, S., Nasr, M., Moftah, N. H., Ragai, M. H., Geneidi, A. S. ve Elkheshen, S. A. 2018**, Clinical cosmeceutical repurposing of melatonin in androgenic alopecia using nanostructured lipid carriers prepared with antioxidant oils. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 15(10), 927-935.
- Hawkins, W. G., Busam, K. J., Ben-Porat, L., Panageas, K. S., Coit, D. G., Gyorki, D. E. ve ... Brady, M. S. 2005**, Desmoplastic Melanoma: A Pathologically and Clinically Distinct Form of Cutaneous Melanoma. *Annals of Surgical Oncology*, 12(3), 207-213.
- Helvacioğlu, S., Charehsaz, M. ve Aydin, A. 2018**, A Review on Doxorubicin Related Genotoxicity and Protective Effects of Phytochemicals. *Journal of Literature Pharmacy Sciences*, 7(3), 237-250.
- Hench, J., Mihic-Probst, D., Agaimy, A., Frank, S., Meyer, P., Hultschig, C. ve ... Massi, D. 2023**, Clinical, histopathological and molecular features of dedifferentiated melanomas: An EORTC Melanoma Group Retrospective Analysis . *European Journal of Cancer*, 187, 7-14.
- Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B., Proust, J. E. ve Benoit, J. P. 2003**, Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials*, 24(23), 4283-4300.
- Hicks, M. J. ve Flaitz, C. M. 2000**, Oral mucosal melanoma: epidemiology and pathobiology. *Oral Oncology*, 36(2), 152-169.
- Higuchi, K., Sakamoto, S., Ando, K., Maimaiti, M., Takeshita, N., Okunushi, K. ve ... Anzai, N. 2019**, Characterization of the expression of LAT1 as a prognostic indicator and a therapeutic target in renal cell carcinoma. *Scientific Reports*, 9(1), 1-10.
- Ikotun, O. F., Marquez, B. V., Huang, C., Masuko, K., Daiji, M., Masuko, T. ve ... Lapi, S. E. 2013**, Imaging the L-Type Amino Acid Transporter-1 (LAT1) with Zr-89 ImmunoPET. *PLoS ONE*, 8(10), e77476.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Iqbal, M. A., Md, S., Sahni, J. K., Baboota, S., Dang, S. ve Ali, J.** 2012, Nanostructured lipid carriers system: Recent advances in drug delivery. *Journal of Drug Targeting*, 20(10), 813-830.
- Jager, M. J., Shields, C. L., Cebulla, C. M., Abdel-Rahman, M. H., Grossniklaus, H. E., Stern, M.-H. ve ... Damato, B. E.** 2020, Uveal melanoma. *Nature Reviews Disease Primers*, 6(1), 24.
- Jiao, Y., Fu, Y. ve Jiang, Z.** 2004, The Synthesis and Characterization of Poly(Ethylene Glycol) Grafted on Pullulan . *Journal of Applied Polymer Science*, 91(2), 1217-1221.
- Joshi, M. D. ve Müller, R. H.** 2009, Lipid nanoparticles for parenteral delivery of actives. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 71(2), 161-172.
- Kanwar, R., Gradzielski, M., Prevost, S., Appavou, M. S. ve Mehta, S. K.** 2019, Experimental validation of biocompatible nanostructured lipid carriers of sophorolipid: Optimization, characterization and in-vitro evaluation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 181(June), 845-855.
- Karimi Khorrami, N., Radi, M., Amiri, S. ve McClements, D. J.** 2021, Fabrication and characterization of alginate-based films functionalized with nanostructured lipid carriers. *International Journal of Biological Macromolecules*, 182, 373-384.
- Kumbhar, D. D. ve Pokharkar, V. B.** 2013, Engineering of a nanostructured lipid carrier for the poorly water-soluble drug, bicalutamide: Physicochemical investigations. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 416(1), 32-42.
- Larsen, A. K., Galmarini, C. M. ve D’Incalci, M.** 2016, Unique features of trabectedin mechanism of action. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 77(4), 663-671.
- Laver, N. V., McLaughlin, M. E. ve Duker, J. S.** 2010, Ocular Melanoma. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 134(12), 1778-1784.
- Lear, J. T. ve Smith, A. G.** 1997, Basal cell carcinoma. *Postgraduate Medical Journal*, 73(863), 538-542.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Li, L., Di, X., Zhang, S., Kan, Q., Liu, H., Lu, T. ve ... He, Z.** 2016, Large amino acid transporter 1 mediated glutamate modified docetaxel-loaded liposomes for glioma targeting. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 141, 260-267.
- Li, X., Jia, X. ve Niu, H.** 2018, Nanostructured lipid carriers co-delivering lapachone and doxorubicin for overcoming multidrug resistance in breast cancer therapy. *International Journal of Nanomedicine*, 13, 4107-4119.
- Liao, L. B., Zhou, H. Y. ve Xiao, X. M.** 2005, Spectroscopic and viscosity study of doxorubicin interaction with DNA. *Journal of Molecular Structure*, 749(1-3), 108-113.
- Luo, Q., Zhao, J., Zhang, X. ve Pan, W.** 2011, Nanostructured lipid carrier (NLC) coated with Chitosan Oligosaccharides and its potential use in ocular drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutics*, 403(1-2), 185-191.
- Malik, D. S. ve Kaur, G.** 2018, Nanostructured gel for topical delivery of azelaic acid: Designing, characterization, and in-vitro evaluation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 47(June), 123-136.
- Mann, A. P., Bhavane, R. C., Somasunderam, A., Montalvo-Ortiz, B. L., Ghaghada, K. B., Volk, D. ve ... Tanaka, T.** 2011, Thioaptamer conjugated liposomes for tumor vasculature targeting. *Oncotarget*, 2(4), 298-304.
- Marasini, R., Nguyen, T. D. T., Rayamajhi, S. ve Aryal, S.** 2020, Synthesis and characterization of a tumor-seeking LyP-1 peptide integrated lipid-polymer composite nanoparticle. *Materials Advances*, 1(3), 469-480.
- McCarthy, S. W., Scolyer, R. A. ve Allan Palmer, A.** 2004, Desmoplastic melanoma: a diagnostic trap for the unwary. *Pathology*, 36(5), 445-451.
- Mehnert, W. ve Mäder, K.** 2012, Solid lipid nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 83-101.
- Meng, F., Zhong, Y., Cheng, R., Deng, C. ve Zhong, Z.** 2014, pH-sensitive polymeric nanoparticles for tumor-targeting doxorubicin delivery: concept and recent advances. *Nanomedicine*, 9(3), 487-499.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Micantonio, T., Gulia, A., Altobelli, E., Di Cesare, A., Fidanza, R., Riitano, A. ve ... Peris, K.** 2011, Vascular patterns in basal cell carcinoma: Vascular patterns in BCC. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 25(3), 358-361.
- Moraes, S., Marinho, A., Lima, S., Granja, A., Araújo, J. P., Reis, S. ve ... Nunes, C.** 2021, Targeted nanostructured lipid carriers for doxorubicin oral delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 592(October 2020), 120029.
- Morton, D. L., Davtyan, D. G., Wanek, L. A., Foshag, L. J. ve Cochran, A. J.** 1993, Multivariate analysis of the relationship between survival and the microstage of primary melanoma by clark level and breslow thickness. *Cancer*, 71(11), 3737-3743.
- Neises, B. ve Steglich, W.** 1978. Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids . *Angewandte Chemie International Edition in English*, 17(7), 522-524.
- Nicolson, N. G., Han, D.** 2019. Desmoplastic melanoma . *Journal of Surgical Oncology*, 119(2), 208-215.
- Ortega, V., Giorgio, S. ve de Paula, E.** 2017, Liposomal formulations in the pharmacological treatment of leishmaniasis: a review. *Journal of Liposome Research*, 27(3), 234-248.
- Ossio, R., Roldán-Marín, R., Martínez-Said, H., Adams, D. J. ve Robles-Espinoza, C. D.** 2017, Melanoma: a global perspective. *Nature Reviews Cancer*, 17(7), 393-394.
- Otarola, J., Molina, P. G., Garrido, M. ve Correa, N. M.** 2021, Spectroscopic characterization and general features of piroxicam encapsulated in nanostructured lipid carriers. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 616(February), 126340.
- Pardeike, J., Hommoss, A. ve Müller, R. H.** 2009, Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *International Journal of Pharmaceutics*, 366(1-2), 170-184.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Patel, D., Dasgupta, S., Dey, S., Roja Ramani, Y., Ray, S. ve Mazumder, B.** 2012, Nanostructured lipid carriers (NLC)-based gel for the topical delivery of aceclofenac: Preparation, characterization, and in vivo evaluation. *Scientia Pharmaceutica*, *80*(3), 749-764.
- Patel, H. S., Patel, N. B. ve Patel, K. C.** 2005, Studies on synthesis and characterization of some novel aromatic copolyesters based on s-triazine. *Iranian Polymer Journal (English Edition)*, *14*(12), 1090-1098.
- Peer, D., Karp, J. M., Hong, S., Farokhzad, O. C., Margalit, R. ve Langer, R.** 2007, Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature Nanotechnology*, *2*(12), 751-760.
- Pereira, I., Monteiro, C., Pereira-Silva, M., Peixoto, D., Nunes, C., Reis, S. ve ... Paiva-Santos, A. C.** 2023, Nanodelivery systems for cutaneous melanoma treatment. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *184*, 214-247.
- Pinto, F., de Barros, D. P. C. ve Fonseca, L. P.** 2018, Design of multifunctional nanostructured lipid carriers enriched with α -tocopherol using vegetable oils. *Industrial Crops and Products*, *118*(March), 149-159.
- Pocasap, P., Weerapreeyakul, N., Timonen, J., Järvinen, J., Leppänen, J., Kärkkäinen, J. ve Rautio, J.** 2020, Tyrosine–chlorambucil conjugates facilitate cellular uptake through L-type amino acid transporter 1 (LAT1) in human breast cancer cell line MCF-7. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(6).
- Pópulo, H., Soares, P. ve Lopes, J. M.** 2012, Insights into melanoma: targeting the mTOR pathway for therapeutics. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, *16*(7), 689-705.
- Rahim, M. A., Jan, N., Khan, S., Shah, H., Madni, A., Khan, A. ve ... Thu, H. E.** 2021, Recent Advancements in Stimuli Responsive Drug Delivery Platforms for Active and Passive Cancer Targeting. *Cancers*, *13*(4), 670.
- Raj, S., Khurana, S., Choudhari, R., Kesari, K. K., Kamal, M. A., Garg, N. ve ... Kumar, D.** 2021, Specific targeting cancer cells with nanoparticles and drug delivery in cancer therapy. *Seminars in Cancer Biology*, *69*, 166-177.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Ramachandran, E. ve Natarajan, S.** 2002, Crystal growth of some urinary stone constituents: I. In-vitro crystallization of L-tyrosine and its characterization . *Crystal Research and Technology*, 37(11), 1160-1164.
- Ribeiro, L. N. M., Breitzkreitz, M. C., Guilherme, V. A., da Silva, G. H. R., Couto, V. M., Castro, S. R. ve ... de Paula, E.** 2017, Natural lipids-based NLC containing lidocaine: from pre-formulation to in vivo studies. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 106(May), 102-112.
- Rigel, D. S., Russak, J. ve Friedman, R.** 2010, The Evolution of Melanoma Diagnosis: 25 Years Beyond the ABCDs. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 60(5), 301-316.
- Sadighian, S., Rostamizadeh, K., Hosseini-Monfared, H. ve Hamidi, M.** 2014, Doxorubicin-conjugated core-shell magnetite nanoparticles as dual-targeting carriers for anticancer drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 117, 406-413.
- Saginala, K., Barsouk, A., Aluru, J. S., Rawla, P. ve Barsouk, A.** 2021, Epidemiology of Melanoma. *Medical Sciences*, 9(4), 63.
- Saupe, A., Gordon, K. C. ve Rades, T.** 2006, Structural investigations on nanoemulsions, solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers by cryo-field emission scanning electron microscopy and Raman spectroscopy. *International Journal of Pharmaceutics*, 314(1), 56-62.
- Sgouros, D., Lallas, A., Kittler, H., Zarras, A., Kyrgidis, A., Papageorgiou, C. ve ... Stratigos, A.** 2020, Dermatoscopic features of thin (≤ 2 mm Breslow thickness) vs. thick (> 2 mm Breslow thickness) nodular melanoma and predictors of nodular melanoma versus nodular non-melanoma tumours: a multicentric collaborative study by the International Dermoscopy Society. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 34(11), 2541-2547.
- Słowińska, M., Czarnecka, I., Czarnecki, R., Tatara, P., Nasierowska-Guttmejer, A., Lorent, M. ve ... Owczarek, W.** 2023, Clinical, Dermoscopic, and Histological Characteristics of Melanoma Patients According to the Age Groups: A Retrospective Observational Study. *Life*, 13(6), 1369.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Soleimanifard, M., Sadeghi Mahoonak, A., Sepahvand, A., Heydari, R. ve Farhadi, S.** 2019, Spanish olive leaf extract-loaded nanostructured lipid carriers: Production and physicochemical characterization by Zetasizer, FT-IR, DTA/TGA, FE-SEM and XRD. *Journal of Food Processing and Preservation*, 43(7), 1-13.
- Souto, E. B., Almeida, A. J. ve Müller, R. H.** 2007, Lipid Nanoparticles (SLN[®], NLC[®]) for Cutaneous Drug Delivery: Structure, Protection and Skin Effects. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 3(4), 317-331.
- Sponchioni, M., Morosi, L., Lupi, M. ve Capasso Palmiero, U.** 2017, Poly(HPMA)-based copolymers with biodegradable side chains able to self assemble into nanoparticles . *RSC Advances*, 7(80), 50981-50992.
- Swanson, N. A., Lee, K. K., Gorman, A. ve Lee, H. N. 2002, Biopsy techniques Diagnosis of melanoma. *Dermatol Clin*.
- Tacar, O., Sriamornsak, P. ve Dass, C. R.** 2012, Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 65(2), 157-170.
- Tan, M. L., Choong, P. F. M. ve Dass, C. R.** 2010, Review: doxorubicin delivery systems based on chitosan for cancer therapy. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 61(2), 131-142.
- Torchilin, V. P.** 2000, Drug targeting. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11, S81-S91.
- Uchino, H., Kanai, Y., Kim, D. K., Wempe, M. F., Chairoungdua, A., Morimoto, E. ve ... Endou, H.** 2002, Transport of amino acid-related compounds mediated by L-type amino acid transporter 1 (LAT1): Insights into the mechanisms of substrate recognition. *Molecular Pharmacology*, 61(4), 729-737.
- Vichi, A., Eliazyan, G. ve Kazarian, S. G.** 2018, Study of the Degradation and Conservation of Historical Leather Book Covers with Macro Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared Spectroscopic Imaging. *ACS Omega*, 3(7), 7150-7157.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Wang, L., Luo, Q., Lin, T., Li, R., Zhu, T., Zhou, K. ve ... Zhu, G.** 2015, PEGylated nanostructured lipid carriers (PEG-NLC) as a novel drug delivery system for biochanin A . Drug Development and Industrial Pharmacy, 41(7), 1204-1212.
- Wang, X., Nakamoto, T., Dulińska-Molak, I., Kawazoe, N. ve Chen, G.** 2016, Regulating the stemness of mesenchymal stem cells by tuning micropattern features. Journal of Materials Chemistry B, 4(1), 37-45.
- Wang, Y., Zhang, H., Hao, J., Li, B., Li, M. ve Xiuwen, W.** 2016, Lung cancer combination therapy: co-delivery of paclitaxel and doxorubicin by nanostructured lipid carriers for synergistic effect. Drug Delivery, 23(4), 1398-1403.
- Wong, H. L., Bendayan, R., Rauth, A. M., Li, Y. ve Wu, X. Y.** 2007, Chemotherapy with anticancer drugs encapsulated in solid lipid nanoparticles. Advanced Drug Delivery Reviews, 59(6), 491-504.
- Wu, H., He, P., Xie, D., Wang, J. ve Wan, C.** 2022, Long-Noncoding RNA ANCR Activates the Hedgehog Signaling Pathway to Promote Basal Cell Carcinoma Progression by Binding to PTCH. Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology, Volume 15, 955-965.
- Wu, L., Zhang, J. ve Watanabe, W.** 2011, Physical and chemical stability of drug nanoparticles. Advanced Drug Delivery Reviews, 63(6), 456-469.
- Yan, R., Li, Y., Müller, J., Zhang, Y., Singer, S., Xia, L. ve ... Zhou, Q.** 2021, Mechanism of substrate transport and inhibition of the human LAT1-4F2hc amino acid transporter. Cell Discovery, 7(1), 16.
- Yao, Y., Zhou, Y., Liu, L., Xu, Y., Chen, Q., Wang, Y. ve ... Shao, A.** 2020, Nanoparticle-Based Drug Delivery in Cancer Therapy and Its Role in Overcoming Drug Resistance. Frontiers in Molecular Biosciences, 7, 193.
- Ying, X. Y., Du, Y. Z., Chen, W. W., Yuan, H. ve Hu, F. Q.** 2008, Preparation and characterization of modified lipid nanoparticles for doxorubicin controlled release. Pharmazie, 63(12), 878-882.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Yuan, W., Kuai, R., Dai, Z., Yuan, Y., Zheng, N., Jiang, W. ve ... Schwendeman, A.** 2017, Development of a Flow-Through USP-4 Apparatus Drug Release Assay to Evaluate Doxorubicin Liposomes. *AAPS Journal*, 19(1), 150-160.
- Yusuf, A., Almotairy, A. R. Z., Henidi, H., Alshehri, O. Y. ve Aldughaim, M. S.** 2023, Nanoparticles as Drug Delivery Systems: A Review of the Implication of Nanoparticles' Physicochemical Properties on Responses in Biological Systems. *Polymers*, 15(7), 1596.
- Zein, R., Sharrouf, W. ve Selting, K.** 2020, Physical Properties of Nanoparticles That Result in Improved Cancer Targeting. *Journal of Oncology*, 2020, 1-16.
- Zeng, L., Gowda, B. H. J., Ahmed, M. G., Abourehab, M. A. S., Chen, Z.-S., Zhang, C. ve ... Kesharwani, P.** 2023, Advancements in nanoparticle-based treatment approaches for skin cancer therapy. *Molecular Cancer*, 22(1), 10.
- Zheng, M., Falkeborg, M., Zheng, Y., Yang, T. ve Xu, X.** 2013, Formulation and characterization of nanostructured lipid carriers containing a mixed lipids core. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 430, 76-84.

TEŞEKKÜR

Akademiye ilk adımlarımı attığım yüksek lisans eğitimimin sonuna gelmiş bulunuyorum. Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarımı yaptığım süre boyunca edindiğim tüm bilgi birikimlerimi, bugün Araştırma Görevlisi olarak öğrencilerimle tıpkı değerli hocalarımdan öğrendiğim gibi hoşgörü ve sabırla paylaşacağım ve onlara her zaman bilim yolunda ışık tutmaya çalışacağım.

Değerli bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile kendime örnek aldığım, yanında çalışmaktan ve öğrencisi olmaktan onur ve gurur duyduğum değerli hocam Prof. Dr. Şenay HAMARAT ŞANLIER'e, tez çalışmalarım süresince benden değerli bilgi ve tecrübelerini hiç esirgemeyen, sabır ve hoşgörü ile bilim yolunda ilerlememi sağlayan, bana yol gösteren Doç.Dr. Güliz AK DEMİROZ'a, çalışmalarım süresince tüm zorluklarda yanımda olup, desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen başta canım çalışma arkadaşım Hande BALYAPAN TİRELİ olmak üzere, Tuğba KARAKAYALI KAVRUK, Ayça EREK ve Kübra AKTAŞ'a, hem maddi ve hem manevi olarak desteğini asla esirgemeyen, her zaman her koşulda sevgisini eksik etmeyen, hoşgörü ve sabır ile hep yanımda olduklarını bildiğim canım babam Serkan TUTAR ve canım annem Aysel TUTAR'a, akademiye attığım tüm adımlarımda benimle birlikte yolunu paylaşan arkadaşım Nilay EKİZ YAZICI'ya ve bilim yolculuğumda beni asla yalnız bırakmayan, her zaman desteğini hissettiğim, en büyük destekçim canım eşim Fatih DEMİRDİŞ'e çok teşekkür ederim.

Bu çalışma 219S788 numaralı, “Melanoma Tedavisinde İkili İlaç İçeren Hedefli Nanopartikül Sisteminin Topikal Kemoterapiye Yönelik Etkinliğinin Araştırılması” adlı proje olarak Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenmiştir. Destekleri için TÜBİTAK'a teşekkürler.

28/08/2023

Gizem DEMİRDİŞ

ÖZGEÇMİŞ VE ESERLER LİSTESİ

Adı Soyadı: Gizem DEMİRDİŞ

Doğum Tarihi:

Öğrenim Durumu:

Derece	Alan	Üniversite	Yıl
Lisans	Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü	Ege Üniversitesi, İzmir	2015-2020
Yüksek Lisans	Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Bölümü	Ege Üniversitesi, İzmir	2020-devam ediyor

Görevler:

Görev Unvanı	Görev Yeri	Yıl
Araş. Gör.	Eskişehir Teknik Üniversitesi	2022 – devam ediyor
Ar-Ge Stajyeri	Biota Laboratuvarları	2019 – 2019

Yüksek Lisans Tez Başlığı (özetinde ekte) ve Tez Danışman(lar)ı: Melanoma Tedavisinde İkili İlaç İçeren Nanoyapılı Lipid Taşıyıcıların Biyouyumluluğunun İncelenmesi ve Nanoyapılı Lipid Taşıyıcı İçeren Jelin Formülasyonu ve Karakterizasyonu, Prof.Dr.Şenay HAMARAT ŞANLIER

ESERLER

B. BİLDİRİLER

B. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceedings) basılan bildiriler

- B1.** Ak Demiroz G., Tutar G., Balyapan H. Development of Nanostructured Lipid Carriers for Melanoma Treatment, Sözlü bildiri, 3rd. Eurasia Biochemical Approaches & Technologies Congress (3. EBAT 2021) Antalya/Turkey, 04-07 Kasım 2021
- B2.** Ak Demiroz G., Güler G., Tutar G., Balyapan H. Synthesis of LAT1 Targeting Conjugate For Targeted Melanoma Treatment Strategy, Poster bildiri, 3rd. Eurasia Biochemical Approaches & Technologies Congress (3. EBAT 2021), Antalya/Turkey, 04-07 Kasım 2021
- B3.** Ak Demiroz G., Balyapan H., Tutar G., Yıldız Türkyılmaz G. Gel Formulation of Nanostructured Lipid Carriers Developed For Topical

Treatment of Melanoma, Poster bildiri, 3rd. Eurasia Biochemical Approaches & Technologies Congress (3. EBAT 2021), Antalya/Turkey, 04-07 Kasım 2021

- B4.** Balyapan H., Tutar G., Ak Demiroz G., Biocompatibility and in vitro drug release tests of dual drug loaded nanostructured lipid carriers, Sözlü bildiri (online), 3rd International Eurasian Conference on Science, Engineering and Technology (EurasianSciEnTech 2021), Ankara/Turkey, 15-17 Aralık 2021
- B5.** Ak Demiroz G., Balyapan H., Tutar G., Arslan Y.E., Derkuş B., Evaluation of the Cytotoxic and Anti-inflammatory Effects of Melanoma-Targeted Nanostructured Lipid Carriers on Melanocytes, Macrophages, and 3D-Cancer Cell Spheroids, Sözlü bildiri (online), 8th International Conference on Engineering and Natural Science, Istanbul/Turkey, 18-22 Mayıs 2022
- B6.** Tutar G., Ersöz A., Lipozom Tabanlı Sentetik Hücre Geliştirilmesi ve Karakterizasyonu, Poster bildiri, 34. Ulusal Kimya Kongresi, Yalova/Turkey, 1-6 Eylül 2022

C. Ulusal kuruluşlarca desteklenen araştırma projeleri

- C1.** Melanoma Tedavisinde İkili İlaç İçeren Hedefli Nanopartikül Sisteminin Topikal Kemoterapiye Yönelik Etkinliğinin Araştırılması, TÜBİTAK 1001, 219S788 nolu proje, **Bursiyer**, 04/11/2020-01/07/2022
- C2.** Gliadin Safılaştırmasına Yönelik Kriyojel Kolonlar Hazırlanması, 102-Araştırma Destek Projesi (ADP), **Araştırmacı**, 24/10/2022- Devam Ediyor
- C3.** Proteinlerin ELISA Kuyucuklarda Etkin İmmobilizasyonu İçin Yeni Bir Yöntem Geliştirilmesi, 102-Araştırma Destek Projesi (ADP), **Araştırmacı**, 01/01/2023- Devam Ediyor

E. Ulusal Bilimsel Toplantılar ve Sertifikalar

3rd Eurasia Biochemical Approaches & Technologies Congress (3. EBAT 2021)
Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası- Ege Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (EÜHADYEK) – 2021
Uygulamalı – Soru Çözümlü NMR Kursu- 2021
Laboratuvar Güvenliği, Tehlikeli Atık ve Sıfır Atık Uygulamaları -2021

Arom Araştırmacı Öğrenci Oryantasyon Eğitimi– 2021

Biyomühendislikte Güncel Yaklaşımlar- 2021

ISO 17025 – Nanolab Laboratuvar Grupları - 2020

ISO 13485- Taksim Danışmanlık Hizmetleri- 2020

ISO 27001- EN Kalite Danışmanlık – 2020

F. Bilimsel Toplantı Düzenlemek (Seminerler)

F.1. Melanoma Tedavisine Yönelik İkili İlaç İçeren Nanoyapılı Lipid Taşıyıcıların Hazırlanması ve Karakterizasyonu, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü, 9 Şubat 2022.

G. Ulusal Bilimsel Etkinliklerde Düzenleyici Olarak Görev Alma

G.1. Klinik Biyokimyada Nanoteknoloji ve Uygulamaları Kursu, **Düzenleme Kurulu**, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon/ Türkiye, 08-11 Ağustos 2022.