T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KATEŞİN YÜKLÜ NANOPARTİKÜLLERİN ANTİOKSİDAN ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ

BURCU TÜRKOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI

DANIŞMAN
DOÇ. DR. BANU MANSUROĞLU

İSTANBUL, 2017

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KATEŞİN YÜKLÜ NANOPARTİKÜLLERİN ANTİOKSİDAN ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ

Burcu TÜRKOĞLU tarafından hazırlanan tez çalışması 24.05.2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Banu MANSUROĞLU

Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Banu MANSUROĞLU

Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. İsmail KOCAÇALIŞKAN

Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Yrd.Doç.Dr. Kadriye KIZILBEY

İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi _____

Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü' nün 2015-01-07-YL04 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca engin bilgi birikimi ve kıymetli tecrübelerini paylaşıp, tüm hoşgörüsüyle bendenize ve bu çalışmaya herzaman destek olan, başarılı bir çalışmayı ortaya çıkarmak için en önemli unsurun disiplin ve özveri olduğuna her daim işaret eden kıymetli hocam Sayın Doç. Dr. Banu MANSUROĞLU'na;

Çalışmam boyunca bilgi, fikir ve yardımları ile desteğini esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Serap DERMAN, Araş. Gör. Fatma Şayan POYRAZ, Tayfun ACAR ve Melike BİLGİÇ'e;

Çalışma arkadaşlarım Araş.Gör. Munise YURTSEVER, Araş.Gör. Mine KUÇAK ve Araş.Gör. Hasan DEMİRCİ'ye;

Yüksek lisans eğitimimde bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyeleri Değerli Hocalarıma;

Tez çalışmalarım süresince kendisinden bilginin ancak irfan ile kadim olacağını öğrendiğim kıymetli büyüğüm Sayın Mustafa Talat ÖLMEZ'e;

Hayatımda var olmaları ile her güzel ve zor anımı paylaşan, isim isim sayamayacağım Sevgili Dostlarım'a;

Beni bugünlere emek emek büyüterek getiren başta sevgili Annem, Babam olmak üzere Ailem'e;

Yüksek lisans eğitimim boyunca alakasını ve desteğini her daim yanımda hissettiğim Sevgili Eşim Cüneyt TÜRKOĞLU'na;

Bana ve bu teze emeği geçmiş herkese teşekkürü bir borç bilirim.

Mayıs, 2017

Burcu TÜRKOĞLU

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGE LİSTESİ....viii

KISALTMA LİSTESİ....ix

ŞEKİL LİSTESİ....xi

ÇİZELGE LİSTESİ....xiii

ÖZET....xiv

ABSTRACT....xvi

BÖLÜM 1

GİRİŞ....1

1.1 Literatür Özeti....1

1.2 Tezin Amacı....3

1.3 Hipotez....4

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER....5

2.1 Antioksidanlar....5

2.2 Antioksidan Kateşin ve Çay Bitkisi....6

2.2.1 Kateşinin Bazı Terapötik ve Koruyucu Etkileri....8

2.3 Antioksidan Maddelerin Etkinliğinin Arttırılması ve Nanopartiküler Sistem....11

2.3.1 Nanopartiküller....11

2.3.2 Bir İlaç Taşıyıcı Sistem Olarak Nanopartiküllerin Kullanılmasının Avantajları....13

2.3.3 Nanopartiküler Sistemlerde Kontrollü İlaç Salımı....14

2.3.4 Nanopartikül Sentezinde Kullanılan Polimerler 15
2.3.5 Nanopartikül Sentezinde Kullanılan Surfaktanların İşlevi 19
2.4 Kanser ve Hücre Kültürü Çalışmaları 20
2.4.1 Kanser 20
2.4.1.1 Kanser Oluşumuna Etki Eden Çevresel Faktörler; 21
2.4.1.2 Meme Kanseri 22
2.4.1.3 Beyin Kanseri 23
2.4.2 Hücre Kültürü 23
2.4.2.1 Sitotoksisite Tayini 24
2.4.2.2 Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Hücre Soyları; 26
2.4.2.3 DPPH Testi 26
2.4.2.4 MTT Testi 27
BÖLÜM 3
MATERYAL – METOD 28
3.1.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar 28
3.1.2 Kateşin Yüklü Nanopartiküllerin Karakterizasyon ve Biyolojik Etkinlik Tayininde Kullanılan Başlıca Analiz Cihazları 29
3.1.2.1 UV-Görünür Bölge Spektroskopisi 29
3.1.2.2 Zeta Sizer Cihazı 30
3.1.2.3 Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) 30
3.1.2.4 Atomik Güç Mikroskobu (AFM) 31
3.1.2.5 Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) 31
3.1.3 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasallar 32
3.1.4 Kullanılan Çözeltiler 33
3.1.4.1 Çeşitli Konsantrasyonlarda Kateşin Çözeltisi Hazırlanması 33
3.1.4.2 Polivinilalkol PVA Çözeltisi Hazırlanması 33
3.1.4.3 0.01 mol/L'lik Fosfat Tampon Çözeltisi (PBS) Hazırlanması 33
3.1.4.4 DPPH Çözeltisi Hazırlanması 34
3.1.4.5 1x Tripsin Solüsyonu Hazırlanması 34
3.1.4.6 Hücre Kültürü Solüsyonu Hazırlanması 35
3.1.4.7 Hücre Dondurma Solüsyonu Hazırlanması 35
3.1.4.8 MTT Solüsyonu Hazırlanması 35
3.2 METOT 35

3.2.1 Kateşin Uv Spektrofotometre Kalibrasyon Eğrisi 35
3.2.2 UV Spektroskopisi ile Enkapsülasyon Veriminin Hesaplanması 39
3.2.3 Reaksiyon Veriminin Hesaplanması 39
3.2.4 Etken Yükleme Veriminin Hesaplanması 39
3.2.5 Zeta Sizer Analizi 40
3.2.6 Tarama Elektron Mikroskopisi Analizi 40
3.2.7 Atomik Güç Mikroskobu Analizi 40
3.2.8 Kızılötesi Spektroskopi Analizi (FT-IR) 40
3.2.9 DPPH Metodu ile İndirekt Yöntemle Antioksidan Etkinlik Tayini 41
3.2.10 MTT Testi ile Antikanser Etkinlik Tayini 41

BÖLÜM 4

BULGULAR VE TARTIŞMA 44
4.1 BULGULAR 44
4.1.1 Enkapsülasyon Verimi Hesaplanması 44
4.1.2 Reaksiyon Verimi Hesaplanması 45
4.1.3 Etken Yüklenme Verimi Hesaplanması 45
4.1.4 Nanopartiküllerin Boyutları Z-Ave (nm) ve Zeta Potansiyelleri Sonuçları 45
4.1.5 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi 47
4.1.6 Atomik Güç Mikroskobu Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi 50
4.1.7 Kızılötesi Spektrofotometre Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi. 51
4.1.8 Kateşin Yüklü Nanopartiküllerin İn Vitro Salımının İncelenmesi 55
4.1.9 Kateşin Yüklü Nanopartiküllerin DPPH metodu ile Antioksidan Etkinliğinin İncelenmesi 57
4.1.10 Kateşin Yüklü Nanopartiküllerin MTT testi ile MCF7 ve Glioma Hücre Soyları Üzerine Anti Kanser Etkinliğinin İncelenmesi 59

BÖLÜM 5

SONUÇ VE ÖNERİLER 64
KAYNAKLAR 69
ÖZGEÇMİŞ 79

SİMGE LİSTESİ

°C	Derece Santigrat
E°’	Elektron İndirgeme Potansiyeli
g	Gram
L	Litre
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mV	Milivolt
n	Mol
nm	Nanometre
rpm	Dakikada Dönme Hızı
W	Watt
λ	Dalgaboyu
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre

KISALTMA LİSTESİ

AFM	Atomik Güç Mikroskobu
AP-1	Aktivatör protein-1
BRCA1	Göğüs Kanseri Duyarlılık1 geni
BRCA2	Göğüs Kanseri Duyarlılık2 geni
CAT	Katalaz
CG	(+)-kateşin gallat
DCM	Diklorometan
DL	İlaç Yükleme
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
EC	(-)-epikateşin
ECG	(-)-epikateşin gallat
ECG	(−)-epikateşin-3-gallat
EDX	X-ray analizi
EE	Enkapsülasyon Etkinliği
EGC	(-)-epigallokateşin
EGCG	(-)-epigallokateşin gallate
ER	Östrojen reseptörü
FBS	Fetal Bovine Serum
FDA	Food and Drug Administration
FT-IR	Kızılötesi Spektroskopisi
GCG	(+)-gallokateşin gallat
GSH-Px	Glutatyon peroksidaz
GST	Glutatyon-s-transferaz
HCl	Hidroklorik Asit
HPLC	Yüksek Basınçlı Sıvı Kramotografisi
ISO	Uluslararası Standartlar Teşkilâtı
LC	Yükleme Kapasitesi
Mn	Molekül ağırlığı
MTT	3-(4,5-dimetil triazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliumbromid
Na_2HPO_4	Sodyum fosfat dibazik

NaCl	Sodyum Klorür
NaH_2PO_4	Sodyum dihidrojen fosfat
NaOH	Sodyum Hidroksit
NF-κB	Nükleer faktör-κB
NP	Nanopartikül
NP	Nanopartikül
PAA	Poliakrilik Asit
PACA	Polisiyano-akrilat
PAL	Fenilalanin amonyak lyaz
PBCA	Polibütil-siyano-akrilat
PBS	Fosfat Tamponu
PECL	Polikaprolakton
PEG	Poli (etilen glikol)
pH	H/OH Konsantrasyonu
PLA	Polilaktik Asit
PLGA	Polilaktik-ko-glikolik Asit
PVA	Polivinil Alkol
RY	Reaksiyon verimi
SEM	Tarama Elektron Mikroskobu
SOD	Süperoksit Dismutaz
TAL	Tirozinamonyak-lyaz
UV	Ultra Viyole

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 Başlıca Kateşin türlerinin kimyasal yapısı 7
Şekil 2.2 Farmakolojik nanosistemlerin çeşitli türlerinin şematik diyagramı..... 12
Şekil 2.3 Biyobozunur nanopartikül türleri 13
Şekil 2.4 Polimerik nanopartiküllerin şematik gösterimi A) Nanoküre B) Nanokapsül ……15
Şekil 2.5 Poliglikolik asitin sentezi 17
Şekil 2.6 Polikaprolaktonun kimyasal yapısı..... 18
Şekil 2.7 Nanopartikül yüzeyinde surfaktanların işlevi 19
Şekil 2.8 Kanserleşen hücrelerin şematik gösterimi..... 21
Şekil 3.1 Ultraviyole-Görünür Bölge..... 29
Şekil 3.2 Tez çalışmalarında kullanılan çift ışık yollu spektrofotometre 30
Şekil 3.3 Kateşin UV-Vis Spektrum 36
Şekil 3.4 Kateşinin etil alkole karşı hazırlanmış kalibrasyon eğrisi 37
Şekil 4.1 Tekli emülsiyon (s/y) çözücü uçurma yöntemi ile hazırlanan K1 (a) ve K2 nanopartiküllerine (b) ait boyut dağılım analizi..... 46
Şekil 4.2 Tekli emülsiyon (s/y) çözücü uçurma yöntemi ile hazırlanan K1 (a) ve K2 (b) nanopartiküllerine ait zeta potansiyel değerleri (Z-Ave)..... 47
Şekil 4.3 K1 NP'nin 20.000 kat büyütülmüş SEM görüntüsü..... 48
Şekil 4.4 K1 NP 'nin 30.000 kat büyütülmüş SEM görüntüsü..... 49
Şekil 4.5 K1 NP 'nin 50.000 kat büyütülmüş SEM görüntüsü..... 49
Şekil 4.6 K1 nanopartiküllere ait AFM görüntüsü 50
Şekil 4.7 K2 nanopartiküllere ait AFM görüntüsü 51
Şekil 4.8 Serbest Kateşine ait FTIR spektrum analizi 52
Şekil 4.9 PLGA polimerine ait FTIR spektrum analizi..... 53
Şekil 4.10 K1 NP'lere ait FTIR spektrum analizi 54
Şekil 4.11 K2 NP'lere ait FTIR spektrum analizi 55
Şekil 4.12 Farklı pH ortamlarında etken salım miktarının(mg) zamana bağlı değişimi 56
Şekil 4.13 Farklı pH ortamlarında nanopartikülden toplam salınan madde miktarı (%) ……57
Şekil 4.14 Farklı pH ortamlarında Kateşinin enkapsüle ve serbest formlarının antioksidan aktivite etkinliklerinin karşılaştırmalı olarak gösterimi..... 58

Şekil 4.15 Farklı konsantrasyonlarda serbest Kateşin ve enkapsüle Kateşin maddesinin MCF7 hücre soyu üzerine 24-48-72.saat karşılaştırmalı % canlılık-konsantrasyon sonuç grafiği 60
Şekil 4.16 100 µg/mL konsantrasyon enkapsüle Kateşin maddesinin MCF7 hücre soyu üzerine 24-48-72.saat karşılaştırmalı % canlılık sonuç grafiği 61
Şekil 4.17 Farklı konsantrasyonlarda serbest Kateşin ve enkapsüle Kateşin maddesinin Glioma hücre soyu üzerine 24-48-72.saat karşılaştırmalı % canlılık-konsantrasyon sonuç grafiği 62
Şekil 4.18 100 µg/mL konsantrasyon enkapsüle Kateşin maddesinin Glioma hücre soyu üzerine 24-48-72.saat karşılaştırmalı % canlılık sonuç grafiği 63

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 3.1 Kateşinin farklı konsantrasyonlardaki 280 nm'deki absorbans değerleri . 36
Çizelge 4.1 K1 ve K2 nanopartiküllere ait reaksiyon verimi (RY), enkapsülasyon verimi (EE), ilaç yüklenme verimi (DL), boyut (Z-Ave), çoklu dağılım indeksi (PDI), ve zeta potansiyeli (mV) verileri 44
Çizelge 4.2 K1NP ve K2NP'nin MCF7 hücre soyları için IC50 oranları 61
Çizelge 4.3 K1NP ve K2NP'nin Glioma hücre soyları çin IC50 oranları 63

ÖZET

KATEŞİN YÜKLÜ NANOPARTİKÜLLERİN ANTİOKSİDAN ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ

Burcu TÜRKOĞLU

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Banu MANSUROĞLU

Sunulan tez çalışmasında, antikanser ve antioksidan aktivitesi daha önceki çalışmalarda gösterilmiş olan Kateşin molekülünün poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) nanopartikül taşıyıcı sistemlere yüklenmesi ile Kateşin yüklü PLGA nanaopartiküllerinin sentezlenmesi, karekterizasyonu ve biyolojik etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

Tez çalışmasının ilk aşamasında poli-laktik asit/poli-glikolik asit (PLA/PGA) (50:50) bileşimlerine sahip PLGA kopolimeri ile Kateşin yüklü nanopartiküller, tekli emülsiyon-çözücü-buharlaştırma yöntemi ile hazırlanmıştır. Nanopartiküllerin karakterizasyon çalışmaları sonucu Kateşin yüklü nanopartikül büyüklüklerinin sırasıyla yaklaşık 188.6 ve 292.6 nm olduğu saptanmıştır. Üretilen nanopartiküllerin Kateşin enkapsülasyon verimlerinin, 20mg (K1NP) ve 40 mg (K2NP) etken madde kullanılarak sentezlenen nanopartiküller için %10 olduğu üst fazdan indirekt tayin yöntemi ile UV spektrofotometre ölçümlerinden yararlanarak hesaplanmıştır. Farklı pH ortamlarında PLGA nanopartiküllerden etken madde salım çalışması 45 gün sürdürülmüş ve nanopartiküllere yüklenen Kateşinin pH 6 ortamında en yüksek salım miktarı ile % 88'nin salındığı saptanmıştır. SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu), AFM (Atomik Güç Mikroskobu) ve FTIR (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi) analizleri ile PLGA nanopartiküllerin başarıyla yüklendiği gözlenmiştir.

Tezin son aşamasında, karşılaştırmalı olarak Kateşinin enkapsüle ve serbest formlarının biyolojik etkinliği araştırılmıştır. Kateşin içeren PLGA nanopartikül sisteminin antioksidan etkinliği 2.2-Diphenyl-l-picrylhydrazyl (DPPH) yöntemi ile incelenmiştir. Antikanser etkinliği ise MCF7 meme kanser soyu ve C6 Glioma beyin kanser soyları üzerinde MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolyum bromür) yöntemi kullanılarak gösterilmiştir. Nanopartiküler sisteme yüklenen Kateşin maddesinin serbest formuna göre tüm pH ortamlarında ortalama 45 gün süre ile antioksidan etkinlik gösterdiği görülürken serbest formunun ortalama 15.gün sonunda antioksidan etkinliğini yitirdiği görülmüştür. MCF7 ve C6 Glioma hücre soyları üzerine yapılan antikanser etkinlik analizi sonucunda enkapsüle Kateşin maddesinin MCF7 hücre soyu üzerine 72 saat süreyle antikanser aktivite gösterdiği görülürken, C6 Glioma hücre soyları üzerine antikanser etkisini 48 saate varan süreyle azalarak gösterdiği görülmektedir.

Sonuçlar, PLGA polimerik nanopartiküler sistemin Kateşinin maddesinin kontrollü ve uzun dönemde salımını sağladığını göstermektedir. Ayrıca, hazırlanan sistem Kateşin maddesini biyodegredasyondan ve ortam şartlarından koruyucu özellik göstererek biyouyumluluğunu ve biyararlanımını arttırdığı tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kateşin, Polifenolik Bileşikler, Nanopartikül, poli(D,L-laktik-ko-glikolik asit), Antioksidan Etkinlik, Antikanser Etkinlik

ABSTRACT

INVESTIGATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF CATECHIN LOADED NANOPARTICLES

Burcu TÜRKOĞLU

Department of Molecular Biology and Genetics

MSc. Thesis

Adviser: Doç. Dr. Banu MANSUROĞLU

The aim of the present study was to investigate the synthesis, characterization and biological activity of Catechin loaded PLGA nanaoparticles and by loading the Catechin molecule with poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticle carrier systems, which has been shown in previous studies on anticancer and antioxidant activity.

Catechin-loaded nanoparticles with PLGA copolymer with poly-lactic acid / poly-glycolic acid (PLA / PGA) (50:50) compositions were prepared by a single emulsion-solvent-evaporation method at the first part of the thesis study. Characterization studies of the nanoparticles revealed that the resulting Catechin-loaded nanoparticle sizes were approximately 188.6 and 292.6 nm, respectively. Encapsulation efficiencies of the Catechin loaded nanoparticles produced were 10% for the nanoparticles synthesized using both 20 mg (K1NP) and 40 mg (K2NP) of the active agent, calculated from the upper phase indirect assay method using UV spectrophotometer measurements. Release study of active substance from PLGA nanoparticles at different pH media was continued for 45 days and Catechin loaded nanoparticles was found to release 88% with the highest release amount in pH 6 environment. It has been observed that PLGA nanoparticles were successfully loaded by SEM (Scanning Electron Microscopy), AFM (Atomic Force Microscopy) and FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) analyzes.

At the second part of the thesis study, the biological activity of comparatively encapsulated and free form of Catechin was investigated. The antioxidant activity of the Catechin loaded PLGA nanoparticle system was investigated by the 2.2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method. Anticancer activity was demonstrated using MTT (3- [4,5-dimethylthiazol-2-yl] -2,5-diphenyltetrazolium bromide) method on MCF7 breast carcinoma cell line and C6 Glioma brain cancer cell line. According to the free form of Catechin, Catechin loaded nanoparticulate system, the antioxidant activity was observed for 45 days in all pH conditions, whereas the free form lost its antioxidant activity nearly at the end of 15th day. Analysis of anticancer activity on MCF7 and C6 Glioma cell lines revealed that the encapsulated Catechin substance had anticancer activity on the MCF7 cell line for 72 hours while the its effect on C6 glioma cell line has been shown to have a reduced effect of anticancer activity for up to 48 hours.

The results show that the PLGA nanoparticle system provides controlled and long-term release of Catechin. In addition, it has been determined that the prepared system increases the biocompatibility and bioavailability of Catechin by protecting from biodegradation and environmental conditions.

Keywords: Catechin, Polyphenolic compunds, Nanoparticle, Poly(D,L-lactic-co-glicolic acid), Antioxidant Activity, Anticancer Activity

BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Yeşil çay, kanser önleyici ve hiperkolestrol, ateroskleroz, nöredejeneratif hastalıklar ve diğer yaşlanma ile ilişkili hastalıkların dahil olduğu hastalıkları inhibe edici mekanizmaları olduğu yaygın bir şekilde tartışılan doğu asya diyetlerinde çok miktarda tüketilen önemli bir içecektir. Kateşinler ((+)-Cyanidol-3, (*2R,3S*)-2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-1(*2H*)-benzopyran-3,5,7-triol) yeşil çayın başlıca polifenolik bileşenleridir ve yeşil çayın kuru ağırlığının yaklaşık olarak üçte ikisini oluşturmaktadırlar ve Yeşil çayın insna sağlığı üzerine faydalı etkilerinin içeriğinde en çok miktarda bulunan polifenolik Kateşin maddesi sayesinde olduğu düşünülmektedir. [1]. Kateşin antioksidan, antinflamatuar, antihipertensif, antidiyabetik, antimutajenik, antibakteriyel ve antiviral gibi çeşitli etkilere sahiptir [2]. Yapılan çalışmalarda, Kateşinin serbest radikalleri etkisiz hale getirerek, aktif geçiş metal iyonlarını şelatlama, hem redoks aktif transkripsiyon faktörleri hemde proksidan enzimleri inhibe ederek ve antioksidan enzimleri indükleyerek antioksidan etkinlik gösterdiği; lipid biyosentezinde anahtar enzimleri inhibe ettiği ve lipid absorbsiyonunu azalttığı,dolayısıyla kan lipid profilini geliştirdiği; endotelyal nitrit oksidi aktive ederek vasküler tonusu düzenlediği, aterosklerotik lezyonların gelişiminde kritik rol oynayan vasküler enflamasyonu önlediği; Kateşinin endotelyuma lökosit adezyonunun bastırılmasından ve daha sonra hem endotelyal hemde enflamatuar hücrelerde adezyon molekülleri ve sitokininlerin üretimine aracılık eden NF-kB transkripsiyonel faktörlerin inhibisyonu aracılığıyla transmigrasyondan kaynaklı olarak anti enflamatuar aktivitesi olduğu ; Kateşinin aterogenezde rol oynayan hücre büyüme faktörlerini tahrip ederek vasküler düz kas

hücrelerinin çoğalmasını inhibe ettiği; trombogenezi inhibe etmek suretiyle platelet adezyonunu baskıladığı gözlemlenmiştir [3]. Kateşin maddesinin göstermiş olduğu birçok terapotik etki ile birlikte kardiyovasküler hastalıkları ve kanseri önlemede ayrıca glikoz homeostazında kapsamlı olarak çalışılmakta olan bir maddedir [1]. Kanser riski ya da kanser gelişimi belirteçlerini kullanan birçok deneysel hayvan çalışması ile kuru ağırlığının 3'te 2'si Kateşin olan yeşil çay özünün kanser hastalığı üzerine etkileri test edilmiştir. Pek çok çalışmada yeşil çay özünün bağırsak, akciğer, karaciğer, prostat ve göğüs gibi birçok organda kimyasal karsinojenlere karşı koruyucu etkisi olduğu rapor edilmiştir [4]. Yeşil çay Kateşinleri oral uygulama ile tüketimden sonra 1.5-2.5 saatte oluşan absorpsiyon piki ile, çoğunlukla jejunum ve ileumda olmak üzere bağırsakta emilir. Kateşinin ağırlıklı olarak bağırsak epitel hücre tabakası boyunca paraselüler difüzyon yoluyla taşındığı düşünülmektedir. Ancak Kateşin maddesi, sindirim koşulları altında düşük stabilite ve absorpsiyon göstermesi ile birlikte hızlı metabolik sindirim ve boşaltım olaylarından dolayı düşük biyoyararlanıma sahiptir. Bu durum, plazmada bulunan Kateşinin tüketilen miktarın sadece % 5'i kadar olmasına neden olmaktadır [2]. Düşük biyoyararlanıma sahip olmasının başlıca sebebi ısı ve ışığa hassas olması ortam şartlarından hızlı bir şekilde etkilenmesidir [5]. Kateşin maddesi yüksek hidrofilik aynı zamanda amfifilik özellik göstermektedir. Biyofarmasotik sınıflandırmada tip 1 ve 3 grubuna giren hidrofilik ve amfilik moleküller iyi suda çözünürlüğe sahiptir ve çeşitli hastalıkların tedavisinde geniş ölçüde kullanılmaktadır. Fakat bu moleküllerin klinik uygulamaları hızlı atılım ve istenmeyen biyodağılımdan dolayı sınırlanabilmektedir [6].

Ağız yoluyla alınan antioksidan maddeler asitler ve enzimler tarafından kolaylıkla tahrip edildiğinden, tüketilen antioksidanın yalnızca küçük bir kısmı absorbe olur. Bu yüzden, hedef bölgede düşük konsantrasyonda bulunmasına ve düşük biyoyararlılık göstermesine neden olur. Bu nedenle, hedeflenen bölgeye antioksidan maddenin etkili bir şekilde iletilmesi için acil olarak etkin yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Gelişen ihtiyaca yönelik, nanopartiküler taşıyıcılara antioksidan moleküllerin yüklenmesine ile ilgili çalışmalar yapılmıştır [7]. Nanoteknolojinin farmasötik alanda kullanımı, önleyici ve terapötik olarak sayısız fayda sağlayan çok çeşitli sistem ve nano boyutlarda taşıyıcı imkanı sunmaktadır [8]. Nanopartiküller vücudun enflamasyon alanında meydana getirdikleri yığılma eğiliminden dolayı eşşsiz bir taşıma aracı kabul

edilmektedir bununla beraber nanopartiküller biyolojik sistemlerde kontrollü ilaç salım yeteneği ve antijenik olmaması, biyobozunur olması, toksik olmayan doğası ve küçük boyutlarından dolayı etkili taşıyıcılardır [9]. Nanopartikül üretiminde kullanılan nanomateryaller, nanotıp alanında çok yönlü bir araç olarak dikkat çekmekte ve yapılan araştırmalarda odak noktası haline gelmektedir. Son zamanlarda literatürde tanımlanan çeşitli nanoyapılar içerisinde, biyouyumluluk ile karakterize edilen polimerik nanopartiküller ilaç, protein, ve nükleik asit gibi biyolojik olarak aktif çeşitli maddeler için taşıyıcı olarak büyük ilgi uyandırmaktadır [8]. Çeşitli biyobozunur polimerler ilaç, makromolekül, hücre ve enzim gibi bir takım molekülleri taşımak için sentezlenmiştir. Poli laktik asit-ko-glikolik asit(PLGA) biyouyumlu ve biyobozunur özelliklerinden dolayı ilaç dağıtım uygulamaları için tasarım ve performans açısından iyi bilinen ve en çok kullanılan biyomateryallerden birisidir [10]. PLGA vücutta toksik olmayan laktik asit ve glikolik asite kadar doğal yollarla parçalanabilir ve son olarak CO_2 ve H_2O olarak vücuttan uzaklaştırılır. Hem hidrofilik hem hidrofobik ilaçlar PLGA matriksi içinde başarılı bir şekilde enkapsüle edilebilir. Buna ek olarak PLGA hem oral hemde parenteral yollarla ilaç dağıtımı için kullanılmaktadır [11]. PLGA polimerinin US Food ve Drug Administration (FDA) tarafından insanlarda kullanımı onaylanmıştır [12].

1.2 Tezin Amacı

İnsan sağlığı üzerine hastalık önleyici ve tedavici edici geniş spektrumlu etkinliğe sahip olduğu son yıllarda yapılan çalışmalar ile kanıtlanan Kateşin maddesinin, nanopartiküler sistemlere yüklenerek pH, sıcaklık, oksidasyon, alkali ortam gibi koşullarının madde üzerinde meydana getirdiği degredasyonun minimum seviyeye indirilerek maddenin biyoyaralanımının, biyouyumluluğunun arttırılması birinci amacımızdır. İkinci olarak, enkapsüle Kateşin ve serbest Kateşinin antioksidan özelliği DPPH yöntemi ile antikanser özelliği ise MCF7 meme kanser soyunda ve C6 Glioma beyin kanser soyları üzerinde MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolyum bromür) yöntemi kullanılarak incelenmesi amaçlanmıştır.

1.3 Hipotez

Bu çalışmada, Kateşin maddesinin nanopartikül sistemlere yüklenmesi sureti ile biyoyaralanımının arttırılması ve maddenin dolaşım sisteminde kontrollü salım mekanizması ile daha uzun süre bozunmadan kalarak etkinliğini uzun süre sürdürmesi hedeflenmektedir. Etken maddeyi içeren nanopartikül taşıyıcı sistem; pH, sıcaklık, oksidasyon, alkali ortam gibi insan dolaşım sistemi fiziksel ve kimyasal koşullarının madde üzerinde meydana getirdiği degredasyonun minimum seviyeye indirilmesi ile maddenin biyoyaralanımı, biyouyumluluğunun arttırılması sonucunda antioksidan ve antikanser etkinliğinin geliştirilmesi mümkün kılınır. Yapılan bu çalışmanın zengin biyolojik aktiviteye sahip fakat düşük biyoyararlanılırlık ve biyouyumluk özelliği gösteren maddeler için referans bir çalışma oluşturacağı ve geliştirilen nanopartiküler formülasyonun ülkemiz ilaç sanayisine önemli katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1 Antioksidanlar

Canlılarda hücre içi savunma sisteminin önemli bir unsuru olan ve serbest radikal oluşumunu engelleyen ya da etkilerini nötralize ederek canlı sistemlerde meydana getirdikleri hasarı azaltan antioksidan olarak isimlendirilen bir takım savunma mekanizmaları mevcuttur [13], [14]. Antioksidanların etki mekanizması direkt ve indirekt olmak üzere iki türlüdür. Direkt etki mekanizması, serbest radikalleri ve ROS'ları temizleme indirekt etki mekanizması, serbest radikalleri veya onların ara ürünlerini metabolize ederek zararsız ürünlere dönüştürerek etki göstermektedir [15].

Antioksidanlar, endojen ve ekzojen kökenli olmak üzere iki gruba ayrılırlar.

1. Endojen antioksidanlar
2. Eksojen antioksidanlar

1. Endojen antioksidanlar enzimatik ve enzimatik olmayanlar şeklinde iki gruba ayrılır.

A- **Enzimatik olanlar**; glutatyon peroksidaz (GSH-Px), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon-s-transferaz (GST), katalaz (CAT), mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemidir.

B- Enzimatik olmayanlar; β-karoten, e α-tokoferol (E vitamini), melatonin, askorbik asit, bilirubin, ürik asit, albumin, glutatyon, ferritin, seruloplazmin, transferin vs. dir.

2. Ekzojen antioksidanlar; Kateşin, folik asit, allopürinol, C vitamini, trolox- C, mannitol asetilsistein ve adenozin sayılabilir [16].

Antioksidanlar 4 farklı mekanizma ile oksidanlar üzerine etki gösterirler. Bu mekanizmalar:

1. Temizleme (Scavenging) Etkisi: Oksidan maddeleri etkisiz bir moleküle dönüştürme etkisi enzimler tarafından gerçekleştirilir.

2. Baskılama (Quencher) Etkisi: Oksidan maddelere bir hidrojen aktararak etkisiz bir moleküle dönüştürme etkisi vitaminler ve flavonoidler tarafından meydana getirilir.

3. Onarma Etkisi: Serbest radikaller tarafından hedef moleküller üzerinde meydana getirilen hasarın tamir edilmesi ya da temizlenmesi ile gerçekleşir.

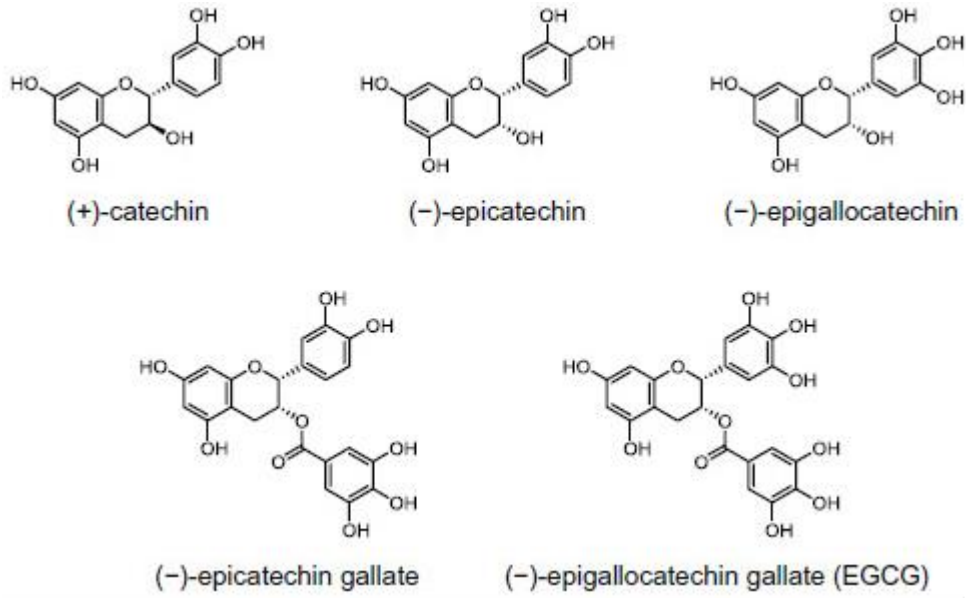
4. Zincir Koparma Etkisi: Oksidan maddeleri bağlama suretiyle fonksiyonlarını engelleyerek oluşan bu etki E vitamini, hemoglobin ve seruloplazmin tarafından gerçekleştirilir [17], [18].

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, Kateşinin oksidatif stres ile ilişkili olduğu, hem direkt bir radikal toplayıcı, hem de antioksidan özelliğe sahip olduğu gösterilmiştir. En güçlü antioksidanlardan birisi olarak bilinen Kateşinin, farklı dokularda gösterdikleri koruyucu etkisi devam eden birtakım deneysel model çalışmaları ile araştırılmaktadır [16].

2.2 Antioksidan Kateşin ve Çay Bitkisi

Tadı, aroması ve en önemlisi insan sağlığına olan faydalı etkileri geçmişten günümüze kadar bir çok çalışma ile bildirilen Çay (Camellia sinensis) dünya genelinde tüketilen en popüler içeceklerden bir tanesidir. Başta Güneydoğu Asya ve Orta Afrika olmak üzere her yıl yüzlerce farklı çay türü üretilmekte ve tüm dünyaya ihraç edilmektedir. Çay konseyi tarafından yayınlanan verilere göre 1998 yılında Dünya genelinde 2.963×10^6 ton çay üretilmiştir. İnsan sağlığı üzerine faydalı etkilerinin yaprak ve köklerinde bulunan yüksek flavanoid içeriği ile ilişkili olduğu düşünülen çayın sağlık koruyucu özelliklerine ilişkin halkın farkındalığının artması halkın içecekle ilgili genel tutumuna katkıda bulunmuştur [19]. Zengin flavanoid kaynağı olan çaya sağlık koruyucu etkisini flavanoidlerin sağladığı düşünülmektedir. Çeşitli bitkilerde 4000'den fazla farklı flavanoid tanımlanmıştır. Flavanoidler bitkisel yiyeceklerde bulunurlar ve flavan-3-oller, flavanoller, flavonlar, flavanonlar, antosiyanidinler ve isoflavanoidler olarak 6 sınıfta kategorize edilebilirler [20]. Kateşin maddeside, flavan-3-oller alt sınıfına ait bir

polifenolik bir bileşiktir [21]. Başlıca Kateşin türleri (-)-epikateşin (EC), (-)-epikateşin gallat (ECG), (-)-epigallokateşin (EGC), (−)-epikateşin-3-gallat (ECG), (-)-epigallokateşin gallate (EGCG), (+)-kateşin gallat (CG), (+)-gallokateşin gallat (GCG) tır [22].



Şekil 2.1 Başlıca Kateşin türlerinin kimyasal yapısı [23]

Epi ve nonepi Kateşinlere (cis ve trans izomer) ek olarak, B 50 pozisyonunda ilave bir OH grubu varlığına göre Kateşinler pirogallol (EGC, GC, EGCg, GCg) ve pirogallol olmayan Kateşinler (EC, C, ECg, Cg) olarak sınıflandırılırlar. Ayrıca C-3 pozisyonunda gallat parçasının yer değiştirmesine göre gallat (EGCg, GCg, ECg, Cg) ve gallat olmayan Kateşinler (EC, C, EGC, GC) olarakta sınıflandırılabilirler [24]. Flavan-3-ols alt sınıfının bir üyesi olan Kateşin; A ve B halkası olma küzere 2 tane aromatik halka, C3 pozisyonunda ve bir hidroksil grup ya da bir gallat parçasıyla bir C halkası (Dihidropiran heterosiklik) içermektedir [25]. Kateşin sentezi ya fenilalanin amonyak lyaz (PAL) ve sinnamat4-hidroksilaz (C_4H) ile fenilalaninden ya da tirozinamonyak lyaz (TAL) ile tirozinden dönüştürülerek başlar. Birinci aktif öncü p-Kumarik asit ya da Kafeik asiti oluşturmak için Kateşin sentez adımları altı enzimatik aşama ile gerçekleştirilir [26].

2.2.1 Kateşinin Bazı Terapötik ve Koruyucu Etkileri

Kateşinin Antikarsinojenik Etkisi

Epigenetik değişiklikler, özellikle beklenmedik gen sessizleşmesi ile ilişkilendirilen anormal DNA metilasyonu ve non-histon proteinlerin asetillenmesi insanda kanserin başlaması ve gelişmesine neden olmaktadır. DNTMs performansı bloke etme ve güçlü serbest radikal süpürme ve antioksidan etkinlik özelliği ile Kateşin maddesini kanser ile ilişkilendirilen aşamaları inihibe ettiği ve DNA metilasyonu üzerinde önleyici bir etki gösterdiği rapor edilmiştir. Ayrıca klinik çalışmalar, Kateşin maddesinin etkilenen hücrelerdeki reseptörleri bloke ederek tümör büyümesinin gelişimini bloke edebilen bir etkisi olduğunu desteklemektedir. Diğer olası bir mekanizma Kateşin maddesinin karsinojenlerin etkisiyle gelişen bazı kanser türlerine doğrudan bağlanmayı kolaylaştırabileceği gösterilmiştir [27]. Crespy ve Williamson (2004) yaptıkları çalışmada yeşil çayda bulunan Kateşin konsantrasyonu ve farelerde dietilnitrosamin maddesinin neden olduğu akciğer tümörleri arasındaki ilişkiyi araştırmış ve akciğer tümörünü indükleyen Dietilnitrosamin (DENA), farelere enjekte edilmiş ve eş zamanlı olarak yeşil çay ile beslenen farelerde, akciğer tümörlerinin sayısının azaldığı gözlenmiştir. Bu sonuç yeşil çayda bulunan Kateşin konsantrasyonu ve yeşil çayın antikarsinojenik etkisi arasında bir ilişki olduğunu göstermektedir [4].

Kateşinin Antimikrobiyal Etkisi

Kateşin maddesinin antimikrobiyal etki mekanizmalarından bir türünün mikrobiyal sitoplazmik membran üzerine geri dönüşümsüz hasar vermesi ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir [28]. Aynı zamanda Kateşin tamamen Kateşin enantiyomerine bağlı olarak fitotoksisite özelliğiyle güçlü bir fitotoksindir. Fitotoksisite ve antimikrobiyal aktiviteye sahip olmasından dolayı, Kateşin maddesinin doğal herbisit ve antimikrobiyal olarak kullanılabileceği rapor edilmiştir [29]. Çay yapraklarında bulunan Kateşin içeriğinin yaz, ilkbahar, sonbahar ve kış mevsimlerinde sırasıyla 22.0%, 20.1%, 19.4% ve 19.2% olduğu tespit edilmiştir. Yapılan deneyler sonucunda elde edilen veriler farklı mevsimlerde hasat edilen çayın farklı derecelerde antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. Yazın hasat edilen çay yapraklarından üretilen çay içeceğinin en güçlü

antimikrobiyal aktiviteyi gösterdiği gözlenmiştir. Çay içeceğinin yazın en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi göstermesi ile yeşil çayın yazın Kateşin maddesini en yüksek konsantrasyonda içermesi ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir [30]. Archana ve Abraham yaptıkları çalışmada, *E.coli, Enterococcus faecalis, Staphylococcus aureus, Candida albicans ve Pseudomonas aeruginosa* organizmalarının taze yeşil çay ekstrelerine ksrşı duyarlı olduğunu bildirmişlerdir [31]. Bai ve arkadaşları Kateşin maddesinin streptokokların büyümelerini inhibe ettiğini gözlemlemiş ve Kateşinin streptokok mutanslara karşı antibiyofilm aktivitesine sahip olduğunu rapor etmişlerdir [28].

Kateşinin Anti Diyabetik Etkisi

Postprandiyal hipergliseminin azaltılmasına yönelik terapötik yaklaşımlardan birisi, α-glukosidaz ve α -amilaz gibi karbonhidrat hidrolize edici enzimlerin inhibisyonu ile glikozun emilimini önlemektir. Bu enzimlerin inhibitörleri karbonhidrat sindirimini geciktirir ve genel karbonhidrat sindirminin süresini uzatır. Böylece glikoz absorbsiyon oranında azalma ve dolayısıyla postprandiyal plazma glikoz yükselmesini köreltir [32]. Anderson ve polansky (2002) yaptıkları çalışmada, Kateşinin antidiyabetik aktivitesini araştırmıştır. Kateşin maddesinin R-amilaz gibi karbonhidratları hidrolize eden enzimleri inhibe ettiği ve bununla birlikte yeşil çay Kateşinlerinin ratlarda karbonhidrat sindiriminin ardından kanda insülin ve glukagon hormonlarının artışını baskıladığını rapor etmişlerdir [33]. Sabu ve arkadaşları (2002) yaptıkları çalışmada, yeşil çay polifenollerinin antidiyabetik aktivitesini ve deneysel diyabet modellerinde oksidatif stres azaltıcı rollerini araştırmış ve Kateşinin sodyum bağlı glikoz taşıyıcı tarafından bağırsak glukoz alımını inhibe ettiğini bildirmişlerdir [34]. Zhao ve arkadaşları (2015) yaptıkları çalışmada, elde ettikleri bulgular Kateşinin pankreas beta hücrelerinden insülin sekresyonunu arttırdığı görüşünü desteklemektedir [26].

Kateşinin Antioksidan Etkisi

Antioksidanların ana fonksiyonu reaktif oksijen türlerini ve reaktif nitrojen türlerini temizlemek ve onları daha az zararlı ya da nötral ürünlere çevirmektir [7]. Daha önce yapılan çalışmalarda trihidroksi B halkasının antioksidan etkinliğin en etkili kısmı olduğu öne sürülürken yapılan son çalışmalar Kateşinin antioksidan potansiyelinin sahip olduğu

hidroksil grubunun sayısı ile ilişkili olduğunu göstermiştir [35]. Bir bileşiğin serbest radikal süpürücü olarak hareket etme kabiliyeti onun standardize edilmiş şartlar altında bir elektron ya da hidrojen vericisi olarak bir antioksidanın reaktivitesinin bir ölçüsü olan standart bir elektron indirgeme potansiyeli (E°’) ile kısmen ilişkili olduğu gözlenmiştir. Düşük bir E °', hidrojen veya elektron verme için daha az enerjinin gerekli olduğunu ve antioksidan etkinliknin belirlenmesinde bir faktör olduğunu gösterir. Çay Kateşinleri ve teaflavinler, α-tokoferol (E vitamini) ile karşılaştırılabilir, ancak çay polifenol bileşiklerine göre üstün bir hidrojen verici (antioksidan) olan askorbattan (vitamin C) daha yüksek E ° değerlerine sahiptirler [36]. Yang ve arkadaşları (2002) Kateşin maddesinin kültür hücrelerinde redoks duyarlı transkripsiyon faktörleri, nükleer faktör-κB (NF-κB) ve aktivatör protein-1'in (AP-1) aktivasyonunu inhibe edebildiği bildirilmiştir. Diğer antioksidanlar bu redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerini de inhibe edebilirken, son araştırmalar çay Kateşinleri ve polifenollerin kompleks sinyal yolaklarında kinaz inhibitörleri olarak hareket ettiğini göstermektedir [37]. Farklı insan vücudu sıvılarının ve dokularının pH'sı midede pH 1'den pankreasta pH 8.6'ya kadar değiştiği için, Kateşin epimerlerin antioksidan etkinliğindeki pH'nın etkisi özellikle önemlidir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, yeşil çay Kateşinlerinin radikal temizleme aktivitesinin, ortamın artan pH'sıyla arttığı ve bu artışın, deprotonasyona bağlı olarak Kateşinlerin artan elektron verici kabiliyetinden kaynaklandığı bildirilmiştir [38]. Janeiro ve arkadaşları (2004) siklik, diferansiyel ve kare dalga voltametrisini kullanarak antioksidan etkinlikten sorumlu elektrokimyasal mekanizmayı araştırmıştır. Bu çalışmada Kateşinin elektrod yüzeyde pH’ya bağlı absorbsiyonu ile sonuçlandığı ve elde edilen ürün elektroaktif olmadığı bununla beraber elektrod yüzeyi bloke ediyor olduğu bildirilmiştir. Kateşinin elektron/proton verme kapasitesi ve onun radikal süpürücü antioksidan etkinliği kateşol grubun deprotonasyonuna etki eder [39]. Neiva ve arkadaşları (1999) Kateşinin insan kan trombosit agregasyonu ve lipid peroksidasyonu üzerine etkilerini araştırmıştır. Sağlıklı gönüllülerden alınan örneklerden elde edilen trombosit açısından zengin plazmada, 20-200 µg/mL doz seviyesinde doza bağlı bir inhibitör etki gözlenmiştir. Kateşinin trombosit agregasyonu ve peroksidatif stresten koruyucu rolünü destekleyen, trombositlerin malondialdehid aktivite üretimini azaltmıştır [40]. Rashidinejad ve arkadaşları (2016) yaptıkları çalışmada sertleşmiş tam yağlı bir peynirin olgunlaşma

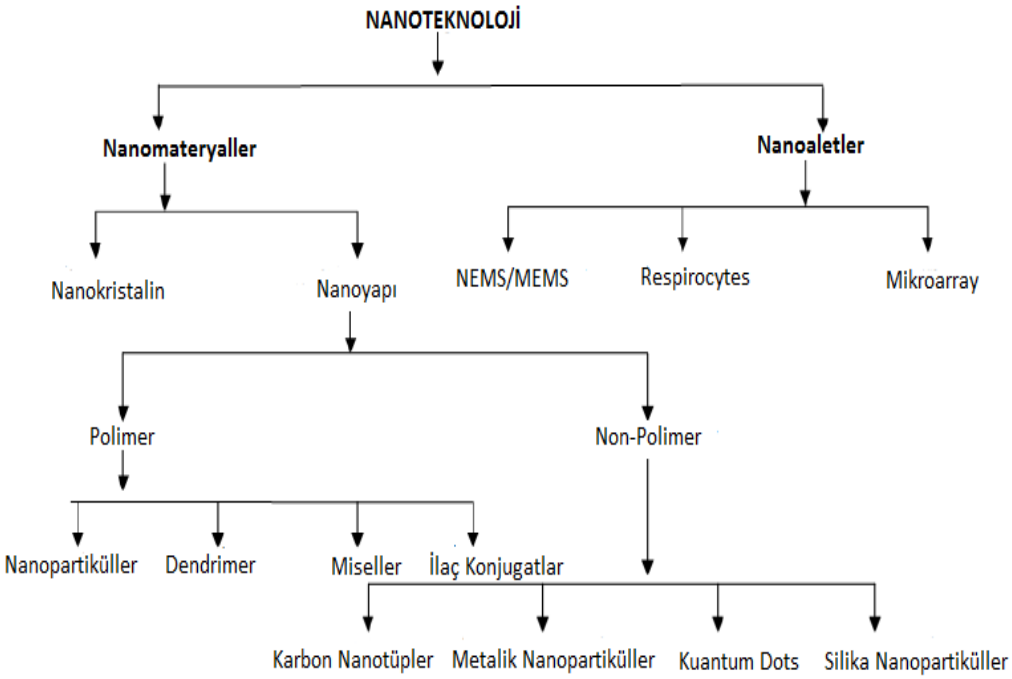
sırasındaki kompozisyonu ve fenolik içeriği üzerine Kateşinin etkilerini değerlendirmişler ve in vitro sistemde sindirim sonrası peynir matrisinden bu antioksidanların geri kazanımını ölçmüşlerdir. Elde edilen sonuçlara göre, olgunlaşma periyodu boyunca Kateşin, tam yağlı peynirin fenolik içeriğini ve antioksidan etkinliğini arttırmış olsa da, bu artışın Kateşin konsantrasyonu ile orantılı olmadığı gözlenmiştir. Bu durumun Kateşin ve süt bileşenleri arasında meydana gelen etkileşimden ve Kateşinin peynir mikroflorası üzerine olan etkilerinden kaynaklandığı ileri sürülmektedir [41].

2.3 Antioksidan Maddelerin Etkinliğinin Arttırılması ve Nanopartiküler Sistem

Ağız yoluyla alınan antioksidan maddeler asit ve enzimler tarafından çok kolay şekilde tahrip edildikten sonra tüketilen antioksidan maddenin düşük biyoyararlanılırlık ve hedeflenen bölgede düşük konsantrasyonda bulunmasına neden olan çok küçük bir kısmının absorbe edilmesidir. Bu yüzden antioksidan maddenin hedeflenen bölgeye verimli bir şekilde iletilmesi için etkili yöntemler geliştirilmesine gerek vardır [7]. Geliştirilen yöntemler içerisinde nanopartiküler sistem, antioksidan maddelerin biyoyaralanılırlığını arttırması açısından önemli üstünlüklere sahiptir. Çeşitli nano ölçekli mekanizmalar içerisinde nanoenkapsülasyon bir çözüm ve etkili bir taşıyıcı proses olarak ortaya çıkmıştır [42]. Antioksidan maddeleri nanopartiküler sistemlere yüklemek için lipozom, polimerik nanopartikül, katı lipid nanopartikül gibi çeşitli nanopartikül taşıyıcılar geliştirilmiştir [43].

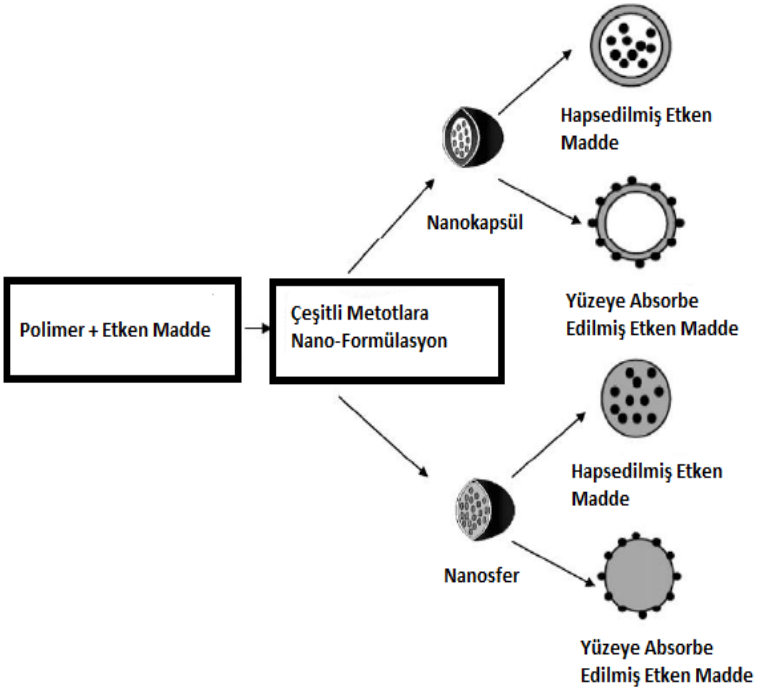
2.3.1 Nanopartiküller

Solüsyon, süspansiyon ya da emülsiyon gibi klasik yöntemler yüksek doz uygulama ve düşük yaralanılırlık, instabilite ve intolerans gibi sınırlayıcı etkilerinden dolayı sentez ve uygulama aşamalarında bir takım problemlerle karşılaşılan yöntemlerdir ve Bu yöntemler plazma etken madde seviyesinde dalgalanmalar göstermekte ayrıca sürekli etki sağlamamaktadır. Bu yüzden, etken madde taşıma sisteminin ideal gereksinimini karşılayabilecek bazı yeni taşıyıcılara ihtiyaç vardır. Nanopartiküllerin bir taşıma sistemi olarak dizayn edilmesindeki en önemli amaç, terapötik olarak optimal oran ve doz ayarlaması ile maddenin hedefe spesifik etkisini elde etmek için partikül büyüklüğünü, yüzey özelliklerini ve farmakolojik aktif maddelerin salımını kontrol etmektir.



Şekil 2.2 Farmakolojik nanosistemlerin çeşitli türlerinin şematik diyagramı [1]

Nanopartiküller (NP) çapı 10 ila 1000 nm arasında değişen parçacıkları içeren bir koloidal etken madde taşıyıcı sistemidir. Nanopartiküller boyutları ile ilişkili olarak ince partiküller ya da yığın materyallerde gözlenenlerden önemli ölçüde farklı özellikler gösterebilirler [44]. Nanopartiküler sisteme etken madde yüklenirken, önce etken madde çözülür hemen sonra nanopartikül matriksi içerisine enkapsüle edilir ya da yüzeye bağlanır. Hazırlama metoduna göre nanopartikül, nanosfer ya da nanokapsül elde edilebilir. Nanokapsüller, ilacın eşsiz bir polimer membran tarafından kuşatılmış bir boşluk ile sınırlandırıldığı sistemler iken, nanosferler ilacın fiziksel ve eşit olarak dağıldığı matris sistemleridir. Son yıllarda, biyolojik olarak bozunabilir polimerik nanopartiküllerin, özellikle de uzun süre dolaşan parçacıklar olarak bilinen poli (etilen glikol) (PEG) gibi hidrofilik polimer ile kaplanmış olanlar, potansiyel ilaç dağıtım araçları olarak kullanılmıştır [45], [46].



Şekil 2.3 Biyobozunur nanopartikül türleri [47]

İlaç üretiminde nanopartiküler sistemlerin kullanılması, istenen ilacın miktarı ve toksisite dozajının birlikte azaltılmasını sağlarken elde edilen bu olumlu sonuç, toksik terapötik ilaçların güvenli bir şekilde verilmesinin sağlanması ve hedef olmayan dokuların ve hücrelerin ciddi yan etkilerden korunmasına neden olmaktadır. Nanopartiküller kan beyin bariyeri, hücre membranı gibi organ bariyerlerini geçmek için ve etken madde taşıyıcı sistemler gibi farklı uygulamalarda kullanılmaktadır [48].

2.3.2 Bir İlaç Taşıyıcı Sistem Olarak Nanopartiküllerin Kullanılmasının Avantajları

- Parenteral uygulamadan sonra, nanopartiküllerin partikül büyüklüğü ve yüzey özellikleri hem pasif hem aktif ilaç hedeflemesini gerçekleştirmek için kolaylıkla uygulanabilir.
- Nanopartiküller, ilaç terapötik etkinliğini arttırmak ve yan etkilerini azaltmak için ilacın vücuttan atılımı ve organ dağılımını sınırlayarak hedef bölgede ve taşıma esnasında ilacın salımını sürdürür ve kontrol ederler [49].
- Kontrollü salım ve partikül degredasyonu nanopartikül matriks bileşenlerinin çoklu seçenekleri olması sebebiyle kontrol edilebilir bir durumdur.

- Nanopartiküler sisteme ilaç yükleme kapasitesi oldukça yüksektir. ve ilaçlar herhangi bir kimyasal reakasiyon olmaksızın nanopartiküler sisteme yüklenebilir. Bu ilaçların etkinliğini korumak için önemli bir fakördür.
- Dokuya ya da organa özel hedeflenmiş molekül, partiküllerin yüzeyine hedeflenmiş ligandlar bağlanarak ya da manyetik yönlendirici kullanarak yapılabilir.
- Sistem nazal, oral, parenteral ya da göz içi gibi çeşitli yollar ile ilaç verilmesi için kullanılabilir.

2.3.3 Nanopartiküler Sistemlerde Kontrollü İlaç Salımı

Yapay ya da doğal bir polimer ile kaplanan nanopartikül etken maddenin polimerik zar veya matris boyunca çekirdekten kontrollü difüzyon veya erozyon ile salımını sağlar. Kaplanan membran salım için bir bariyer olarak hareket eder. Bu yüzden, polimer membranda etken maddenin çözünürlüğü ve difüzyonu etkenin maddenin salımında belirleyici faktör haline gelir. Ayrıca salım miktarı yardımcı bileşenlerin eklenmesi ve etken madde arasında meydana gelen iyonik etkileşimindende etkilenebilir. Etken madde daha az çözünür bir kompleks oluşturmak için yardımcı bileşenlerle etkileşime girdiğinde etken madde salımı neredeyse hiçbir salım etkisi göstermeden çok yavaş olabilir [50]. Başarılı bir nanopartiküler sistem geliştirmek için, hem etken madde salımı hem polimer biyodegredasyonu önemli faktörler olarak görülmektedir.

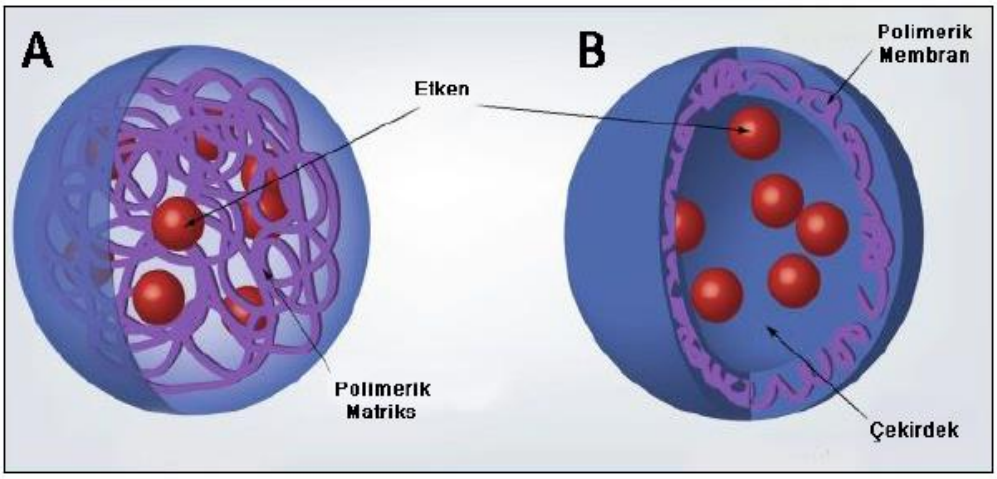
Genellikle etken madde salımı;

1. Etken madde çözünürlüğüne
2. Adsorbe edilen / yüzey bağlı ilacın desorpsiyonu
3. Nanopartikül matriksi boyunca etken madde miktarı
4. Nanopartikül matriks erozyonu/ degredasyonu
5. Erozyon/ difüzyon prosesine bağlıdır.

Bu yüzden matriks materyallerinin çözünürlük, difüzyon ve biyodegredasyonu salım prosesini yönetir [49].

2.3.4 Nanopartikül Sentezinde Kullanılan Polimerler

Nanopartikül sentezinde kullanılan polimerler doğal ve sentetik olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Doğal polimerler çok çeşitli kimyasal bileşenlerden meydana gelebildiği için fiziksel özellikleride tamamen farklı olabilir. Bu durum doğal polimerler ile hazırlanan nanopartikülleri özellik ve etkinliği bakımından daha az stabil kılmaktadır. Sentetik polimerler ise bilinen kimyasal bileşenlerin belirli bir oranda bir araya getirilmesi ile oluşur ve çözünürlük, geçirgenlik ve biyodegredasyon hızı gibi fiziksel özellikleri daha stabildir. Sonuç olarak sentetik polimerler ile hazırlanan nanopartiküller spesifik uygulamalar için daha kolay dizayn edilir [51].



Şekil 2.4 Polimerik nanopartiküllerin şematik gösterimi A) Nanoküre B) Nanokapsül [52]

Doğal Polimerler

Natürel kaynaklardan elde edilen polimerler insanlığa tarih boyunca eşlik etmişlerdir. 30000 yıl öncesinde selüloz, diğer polisakkaritler ve ligninden oluşan keten liflerinin kullanımına dair arkeolojik kanıtlar bulunmaktadır. Nanopartikül sentezinde, doğal kaynaklardan elde edilen polimerlerin kullanımı polimerik nanopartikül sistemleri için pek çok fayda getirebilir. Bu polimerler biyodegrade ve biyouyumluluk gibi faydalı bazı özelliklere sahiptir. Ayrıca büyük miktarlarda ve düşük maliyetlerde kolaylıkla temin edilebilir [53]. Fakat doğal polimerler, sentetik polimerlere kıyasla nanopartiküler formülasyon tasarlarken kolay uygulanabilir olmaması, dayanıklılığı ve stabilitesinin

düşük olması sebebiyle nanopartiküler sistemde kullanımında çok iyi sonuçlar elde edilememektedir [54].

Kitosan

Bu polimer, kabukluların dış yüzeylerinde bulunan kitinin kısmi N-deasetillenmesinden elde edilir. β 1-4 glukozidik bağlarla bağlı olan glukozamin ve N-asetil glukozaminden oluşur ve nano ilaç dağıtım sistemi için en çok çalışılan doğal polimerlerden biridir. Kitin deasetilasyonu hem konsantrasyona hem de sıcaklığa bağlıdır; optimum verimler,% 50 w / w alkali kullanılarak 600 ° C ile 80 ° C arasındaki sıcaklıklarda elde edilmiştir [55].

Jelatin

Jelatin bağ doku, kemik ve hayvanların derisinden elde edilen kollojenin parçalanması ve hidrolizinden elde edilir ve bir etken madde taşıyıcı matriks olarak bilinir [54].

Nişasta

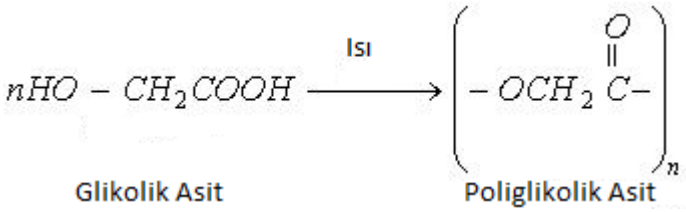
Nişasta yaygın bir polisakarittir. Çoğunlukla depolama malzemeleri olarak işlev gören bitkilerde oluşur. Kimyasal olarak, bir alfa D- (l, 4) bağı ile glikopiranozun tekrar eden birimlerinden oluşur ve hidroliz edildiğinde monosakarit, glikoz verir. Eczacılıkta nişastanın kullanımı kapsamlıdır. Kontrollü ilaç salımında polimer ve yardımcı madde olarak, doku mühendisliğinde ilaç taşıyıcı olarak, Hidrojel ve çözünürlük arttırıcı olarak kullanılır [54].

Sentetik Polimerler

Poli(glikolik Asit) (PGA)

Poliglikolid ya da poli (glikolik asit) (PGA) biyomedikal kullanım için bugüne kadar araştırılan ilk bozunabilir polimerlerden bir tanesidir. Bunun en önemli nedeni, Poli glikolik asidin oksijen karbon oranı, polimerler arasındaki en yüksek O / C değeri olan 1'e eşittir. Bu nedenle diğer polimer türlerine oranla daha yüksek bir hidrofilik özelliğe sahip olması beklenmektedir. PGA'nın kimyasal yapısına bakıldığında, $-[-(CH_2)_z-CO-O-]_n-$ türü olan en basit alifatik polyesterdir; 35-40 ° arasında bir cam geçiş sıcaklığı ve 224-227 ° C arasında değişen erime noktasına sahiptir. Yüksek kristallik özelliği ile oldukça iyi kristal yapı oluşturma eğilimi gösterir. Diğer biyolojik olarak parçalanabilir polimerlere kıyasla 224 ve 227 ° C arasında değişen en yüksek erime noktasına ve en yüksek modül

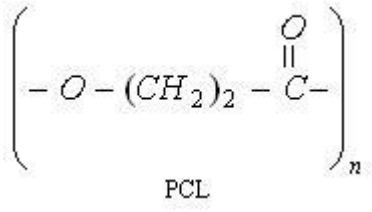
değerine sahiptir. PGA vücut sıcaklığı 35-45 ° C civarında bir cam geçiş sıcaklığına (Tg) sahiptir. Mekanik özellikler açısından, PGA hala oldukça kırılgan bir plastiktir, çünkü Tg hala oda sıcaklığının üstündedir. Bu faktör ile birlikte hidrofilik özelliği, PGA'nın sentetik polimerler arasında en kısa bozunma süresine sahip polimer olmasını sağlamaktadır [56], [57].



Şekil 2.5 Poliglikolik asitin sentezi [58]

Poli-ϵ-Kaprolakton (PCL)

Poli (ε-kaprolakton) (PCL), yarı kristalli biyobozunur bir polimer olup, poli α-hidroksi poliester ailesine aittir [59]. Poli-ε-kaprolakton (PCL), biyolojik olarak parçalanabilen, biyouyumlu ve çok düşük bir cam geçiş sıcaklığına sahip bir polimerdir. Yavaş bozulması nedeniyle PCL, bir yıldan uzun bir süre hedeflenen taşıma sistemleri için idealdir. Bu özellik mikroküreler, nanosferler ve implantlar gibi formların farklı taşıma sistemlerinin hazırlanmasında kullanımına yol açmıştır. Hedeflenmiş ilaç taşıma ve kontrollü ilaç salınımı için polimer olarak PCL kullanılarak çeşitli ilaç kategorileri enkapsüle edilmiştir. İlaç salım özelliklerini elde etmek için ya tek başına PCL veya PCL kopolimer mikrosferleri hazırlanmıştır. PCL'nin polimerizasyonunu etkileyen çeşitli mekanizmalar vardır ve bunlar anyonik, katyonik, koordinasyon ve radikaldir. PCL, kristal yapısına bağlı olarak -60 ° C'lik cam geçiş sıcaklığına ve 59 ile 64 ° C arasında değişen erime noktasına sahip yarı kristalimsi bir polimerdir. PCL numunelerinin ortalama molekül ağırlığı 10,000'den 42,500'e kadar değişebilir ve molekül ağırlığına (Mn) göre derecelendirilir. PCL oda sıcaklığında kloroform, diklorometan, karbon tetraklorür, benzen, toluen, siklohekzanon ve 2-nitropropan içinde çözünür. Aseton, 2-butanon, etil asetat, dimetilformamid ve asetonitril içinde düşük bir çözünürlüğe sahipken alkol, petrol eteri ve dietil eterde çözünmez [60].



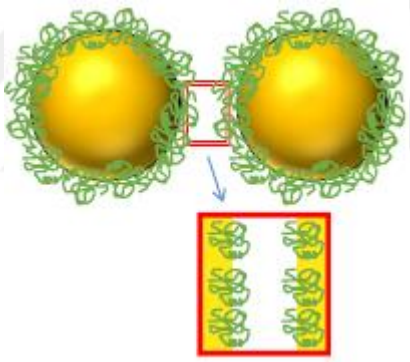
Şekil 2.6 Polikaprolaktonun kimyasal yapısı [61]

Poli(D,l-laktik-ko-glikolik asit) (PLGA)

PLGA; Tüm biyomateryaller içinde, biyaparçalanır polimer uygulamasında doku mühendisliği için bir ilaç taşıyıcı taşıyıcı ve doku mühendisliği için iskele olarak mükemmel bir potansiyel göstermiştir. PLGA, fiziksel olarak güçlü ve oldukça biyouyumlu olan, FDA onaylı, biyolojik olarak parçalanabilir polimerlerin bir üyesidir ve ilaçlar, proteinler ve DNA, RNA ve peptidler gibi çeşitli makromoleküller için dağıtım araçları olarak kapsamlı olarak incelenmiştir. PLGA üzerine yapılan uzun klinik araştırmalar, uygun biyodegredasyon özelliği ve sürekli ilaç dağıtım aracı olarak kullanılabilme olasılıklarından dolayı, çeşitli biyoparçalanır polimerler arasında en çok tercih edilen polimer olmasını sağlamıştır. İlaç türüne bağlı olarak salım aralığı ve istenen dozu ayarlamak için polimer-ilaç matrisinin genel fiziksel özelliklerini polimer molekül ağırlığı, laktik asitin glikolik asite oranı ve ilaç konsantrasyonu gibi parametreleri kontrol ederek ayarlamak mümkündür. İlaç türüne bağlı olarak arzu edilen bir dozaj ve salınım aralığını elde etmek için bununla birlikte, doz yığılımı, kontrolsüz salım ve ilaç-polimer etkileşimlerinden kaynaklanan potansiyel toksisite ayrıntılı bir değerlendirme gerektirir. Poliester PLGA; poli laktik asit (PLA) ve poliglikolik asitin (PGA) bir kopolimeridir. Tasarım ve performans bakımından ilaç dağıtımında kullanılabilen, en iyi tanımlanmış biyomalzemedir. Poli laktik asit tipik olarak sırasıyla klasik stereokimyasal terimlerle ve D veya L formunda bazen R ve S formunda tarif edilen bir asimetrik a-karbon ihtiva eder. Suda, PLGA yapısındaki ester bağlarının hidroliz olması ile biyolojik olarak ayrışmakta ve glikolik ve laktik asit son ürünleri meydana gelmektedir. Yapısında bulunan PLA'daki metil yan gruplarının varlığı onu PGA'ya kıyasla daha hidrofobik yapar. Bu sebeple laktik asitçe zengin PLGA kopolimerleri daha az hidrofiliktir, daha az su emer ve ardından daha yavaş bozunur.

2.3.5 Nanopartikül Sentezinde Kullanılan Surfaktanların İşlevi

Nanopartiküllerin farmakolojik etkinlik gösterebilmesi için tam olarak sınırlandırılmış çap ve boyut dağılımına ayrıca yeterli madde miktarına ve sürekli salım yapabilme gibi bir takım özelliklere sahip olması gerekir. Nanopartiküllerin bu özellikleri fizikokimyasal özelliklerine bağlı olarak sentez aşamasında optimize edilir. Nanopartiküler formülasyonda kullanılan herhangi bir parametre veya katkı maddeleri üretilen nanopartiküllerin özelliklerini değiştirebilir. Bu katkı maddelerinin en önemlilerinden bir tanesi surfaktanlardır. Nanopartiküllerin sentez aşamasında surfaktanlar; polimer içeren yağ fazı su (dispersiyon) fazından ayırmada anahtar bir rol oynar. Surfaktanlar ayrıca üretilen emülsiyonu stabil hale getirir, partikül agregasyonunu azaltır ve nanopartiküllerin parçacık boyutunu ve dağılımını, morfolojik özelliklerini, enkapsülasyon verimini ve ilaç salınım gibi özelliklerini etkiler [62].



Şekil 2.7 Nanopartikül yüzeyinde surfaktanların işlevi [63]

Surfaktanların nanopartiküler ara yüzeyleri stabilize etme kabiliyeti, yapılarının amfifilik özelliklerinden kaynaklanmaktadır; surfaktanların hidrofilik baş grupları su fazına çekilirken, lipofilik kuyruk yağ fazı ile etkileşime girer [64]. Surfaktanların emülsiyondaki rolü bir homojenizatörde meydana gelen majör fizikokimyasal olayları inceleyerek daha iyi anlaşılabilir. Başlangıçta, surfaktanlar genellikle sulu faz içinde eritilir (ancak bu her zaman geçerli değildir) ve daha sonra yağ ve sulu fazlar birleştirilir ve büyük yapılı emülsiyon oluşumuna yol açan yüksek hızda bir karıştırıcı kullanılarak karıştırılır. Bu emülsiyon su fazı çerisinde çözünmüş surfaktan kalıntıları ile beraber, surfaktan tarafından kaplanmış nispeten iri taneli damlacıklar içerir. Daha sonra iri taneli molekül

içeren emülsiyon yüksek basınçta daha büyük damlacıkları parçalayarak daha küçük moleküller meydana getiren kuvvetleri (kavitasyon, türbülans ve kesme) üreten homojenizatörde küçük vana aracılığıyla pompalanır [65].

Polivinil Alkol (PVA)

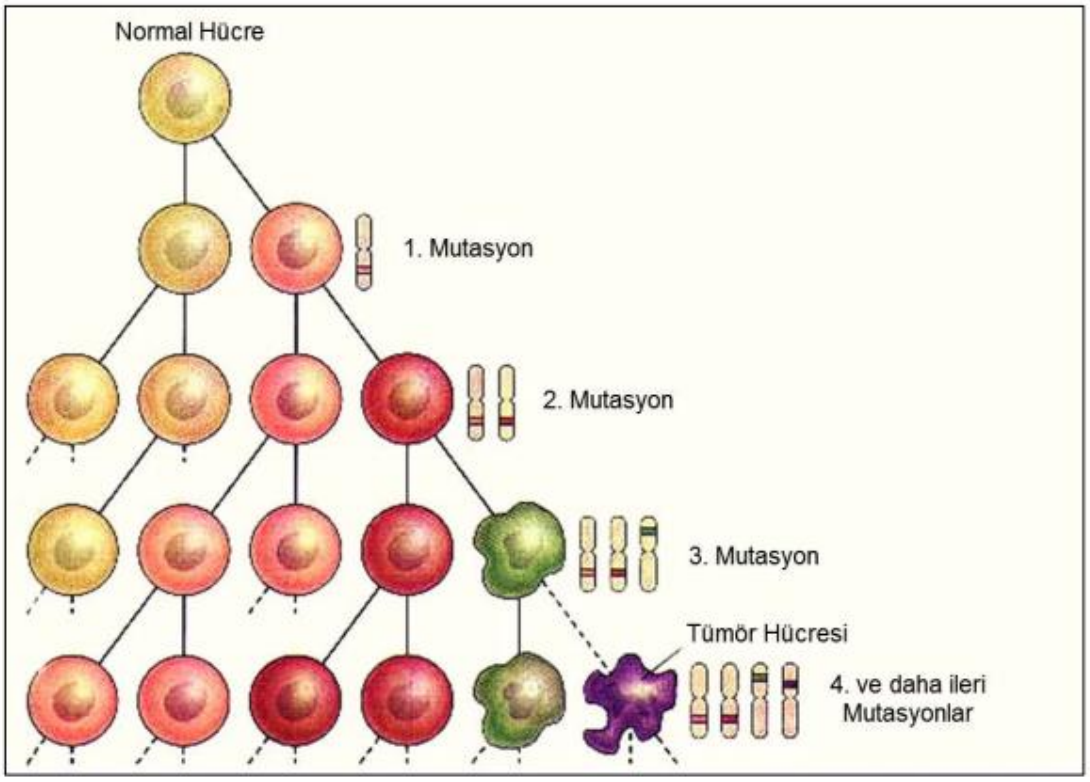
PVA suda çözünen, toksik olmayan, biyouyumlu, biyobozunur bir polimerdir. Polivinil alkolün polimerizasyonu, hidrojen bağını, kristalleşmeyi ve faz ayrımını getiren tekrarlanan donma çözülme döngüleri gibi fiziksel yöntemlerle ve yanı sıra (Glutaraldehid, asetaldehit ve formaldehit) gibi kimyasal ajanlarla çapraz bağlanarak ve γ ışınlarını kullanarak kolayca elde edilebilir. Fiziksel yöntem çoğunlukla tercih edilir, çünkü çapraz bağlayıcı ajanların ihtiyacını ortadan kaldırarak yöntem bu maddelerin toksikliği ile ilgili konuları ele alır. Buna ek olarak, fiziksel olarak çapraz bağlanmış PVA jelleri, kimyasal olarak çapraz bağlı eşdeğer parçalara karşı mikro kristaller bulunduğu için daha yüksek mekanik mukavemet ve sertliğe sahiptir. Kapsamlı fiziksel özellikleri ve yüksek biyouyumluluk özelliklerinden dolayı PVA; yara sargısı, yara yönetimi, ilaç verme sistemleri, yapay organlar ve kontakt lensler gibi biyomedikal uygulamalarda kullanılmıştır. Ayrıca, Poli laktik ve poli (d,l-laktik-ko-glikolid) (PLGA) polimerik nanopartiküller formülasyonunda en sık kullanılan emülgatörlerdir [66], [67], [68].

2.4 Kanser ve Hücre Kültürü Çalışmaları

2.4.1 Kanser

Kanser, hücrelerin kontrolsüz büyüme eğilimi ve anormal yayılımını tanımlamak için kullanılan bir terimdir. Kanser hastalığının oluşum mekanizması; hücrelerin çoğalmasını kontrol eden mekanizmaların bozulması ile kontrolsüz bir biçimde çoğalarak önce lokal doku, daha sonra dolaşım sistemi ve lenf bezlerine yayılması ile en son diğer organlara yayılması ile sonuçlanmasıdır. Hücrelerdeki bu bozulma çevresel etkenler, genetik geçiş ve bazı virüsler sebebi ile meydana gelebilmektedir. Vücutta sağlıklı hücrelerin gelişimi mitoz bölünme ve farklı doku hücrelerine dönüşerek gerçekleşmektedir. Bu süreç hücresel genler ile kontrol edilmektedir. Ancak bazı çevresel ya da genetik etkenler sonucunda hücrelere ait genlerde meydana gelen mutasyon ya da anormal aktivite göstermeleri sonucu kanser oluşumu söz konusu olabilmektedir. Mutasyon meydana

gelmesi ile farklılaşan hücreler kan ve lenf yoluyla metastaz yaparak diğer organlara taşınabilen bu hücreler, birbirine yapışmaz. Hücrelerden gelen sinyallere yanıt vermez, özelleşmez ve apoptoza uğramazlar. Kanser hücreleri mikroskop altında incelendiğinde sağlıklı hücrelere nazaran, daha büyük çekirdeğe sahip olma, kontrolsüz olarak çoğalma ile beraber meydana geldikleri dokuda yayılma gibi kanserleşmiş hücrelere ait özellikleri vardır. Kanserli hücreleri moleküler düzeyde analiz edildiğinde hücre büyümesinde sağlayan proto-onkogenlerin aktif halde bulunduğu bununla beraber hücre büyümesini kontrol eden suppressor genlerin inaktif halde olduğu görülmektedir. Kanser çeşitleri meydana geldikleri dokulara göre lenfoma, sarkom, karsinoma veya lösemi gibi özel isimlerle adlandırılmaktadır [13], [69].



Şekil 2.8 Kanserleşen hücrelerin şematik gösterimi [70]

2.4.1.1 Kanser Oluşumuna Etki Eden Çevresel Faktörler;

Kanser oluşumunda çevresel faktörlerin yanı sıra genetik faktörlerin de rol aldığı bilinmektedir. Çevresel faktörlerden kısaca söz edecek olursak [13]:

- **Ultraviyole Işınlar:** Açık tenli insanlar, açık havada çalışanlar ve kontrolsüz şekilde güneş ışığına maruz kalanlarda deri kanserleri daha sık görülmektedir.
- **İyonize Radyasyon:** Başta lösemi ve epitelyal kanserler olmak üzere iyonize radyasyonun da çeşitli kanserlere yol açtığı bildirilmektedir.
- **Kimyasal Karsinojenler:** Meslekleri dolayısıyla katran ve kömürün yanma ürünleri, benzen, naftilaminler, asbest, vinil klorür, krom vb. maddelerle temas etmek zorunda kalan insanlarda kanserin oluşabileceği bildirilmektedir. Örneğin; boya sanayiinde çalışanlarda mesane kanserlerinin, plastik sanayiinde çalışanlarda karaciğer kanserlerinin, katranla uğraşanlarda ise deri kanserlerinin görüldüğü belirtilmektedir.
- **Beslenme Faktörleri:** Sindirim sistemi kanserleri belirli beslenme alışkanlıkları ile ilişkili olduğundan düşük yağ ve yüksek lif içeren beslenme şekilleri tavsiye edilmektedir.
- **Sigara:** Akciğer kanseri ile sigaranın ilişkisi kanıtlanmış olup sigaranın larinks, ağız boşluğu, yutak, mesane ve pankreas kanserleri riskini artırdığı da belirtilmektedir.
- **Alkol:** Uzun süreli alkol alımı ağız, yutak, gırtlak ve yemek borusu kanserleri riskini arttırmaktadır. Çok alkol içenlerin genellikle aynı zamanda sigara da içiyor olması bu kişilerde kanser tehlikesini kat kat arttırmaktadır.
- **Virüsler:** Bilinen en küçük mikroorganizmalar olan virüslerin deney hayvanlarında kansere yol açtığı gösterilmiştir. İnsanlarda hepatit-B virüsünün karaciğer kanseri ile Ebstein-Barr virüsünün Burkitt lenfoma ile ilişkili olduğu da bilinmektedir.
- **Genetik Faktörler:** Kanser tek başına genetik bir hastalık değildir. Ancak çocuklarda görülen bir göz kanseri olan retinoblastom gibi bazı kanser türlerinde ailevi geçiş görülmektedir. Sonuç olarak kanser tek bir sebebe değil birden çok sebebe bağlı olarak gelişen bir hastalıktır.

2.4.1.2 Meme Kanseri

Uluslararası Kanser Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan Globocan 2012 verilerine göre meme kanseri Dünyada ve ülkemizde kadınlar arasında görülen kanser türleri arasında

ilk sıralarda yer almaktadır. Meme kanseri menopoz sonrasında görülmekle beraber genç kadınlarda meydana gelme oranıda oldukça yüksektir [69].

Meme Kanseri Oluşumuna Etki Eden Faktörler;

Meme kanserinin meydana gelme nedenin % 10-20 oranında genetik olduğu gözlenmiştir. Meme kanseri risk faktörleri arasında; BRCA1 ve BRCA2 genlerinin taşınması, ailede meme kanseri hikâyesinin olması, genetik yatkınlık, önceden meme kanseri geçirmiş olmak, alkol alımı, düşük doz radyasyon, pestisitlere maruz kalmak gibi durumlar vardır. Ayrıca erken menarş, geç menopoz, diabetes mellitus, ilerleyen yaşlar, obezite, oral kontraseptiflerin kullanımı, ilk doğumun geç yaşta yapılmış olması veya çocuk doğurmamış olmak gibi durumlar da meme kanseri oluşumuna neden olan önemli faktörler arasındadır [13].

2.4.1.3 Beyin Kanseri

Beyin tümörü neoplastik hücrelerin beyin içinde anormal gelişmesidir. Beyin tümörleri sağlıklı beyin dokusuna göre bazı farklılıklar içerir. Bu farklılıklar tümörün evresine göre değişmektedir. Düşük evreli astrositomalar veya diğer düşük evreli beyin tümörlerinde tümör kütlesi henüz oluşmamıştır ve kanser hücreleri sağlıklı hücreler arasında dağılmıştır. Genellikle tümör bölgesi sağlıklı beyin dokusundan çok az farklılık gösterir. Anaplastik astrositoma gibi 3. Evre tümörlerde ise tümör hücrelerinin bir arada bulunduğu tümör kütleleri oluşur ve damarlanmada artış görülür [70].

2.4.2 Hücre Kültürü

Hücrelerin kontrollü şartlar altında yetiştirilmesi sürecine hücre kültürü adı verilmektedir. Temel ilkesi, canlı dokulardan elde edilen parçaların in vitro şartlarda yaşama ve üremesini sağlamaktır. Laboratuvar gereçleri kullanılarak uygun besiyerleri içerisinde üretilerek kullanılan canlı dokulardır.

Bu amaç doğrultusunda; in vitro koşullarda çalışılmaya uygun özelliklere sahip canlıların (insan, fare, maymun, tavşan gibi) çeşitli dokularından (tümör dokusu, amniyon zarı, böbrek, akciğer gibi) elde edilen dokular parçalanarak hücreler açığa çıkarılır. Bu hücreler, çeşitli tampon maddeleri, tuzlar, aminoasit, vitamin, at veya dana serumu

içerikli besleyici sıvılarda steril bir biçimde muhafaza edilir. Bulundukları steril tüplerde yaklaşık 37^0C'de bekletildiklerinde, bu hücreler kabın iç çeperlerine yapışarak ürerler. Üreme ile oluşan bu yapıya hücre kültürü adı verilir [71], [72].

Hücre kültürü çalışmalarında iki tip hücre kullanılmaktadır. Bunlar; primer ve devamlı hücre hatlarıdır. Primer hücre kültürleri; organ ve dokularından ayrılan hücrelerin, 24 saatten daha uzun süre kültür edilmesiyle elde edilir. Primer hücre kültürlerinde çoğalan hücreler, çoğaltıldıkları kültürden alınıp başka kültürlere ekilip çoğaltılabilir. Bu şekilde elde edilen ilk alt kültür, sekonder hücre kültürü adını alır ve devam eden kültür işlemlerinin ardından hücre hatları elde edilir. Primer kültür hücrelerine; diş eti ve pulpa fibroblastları örnek olarak verilebilir.

Primer hücre kültürlerinin insandan izole edilmesi ve kültürün yapılması oldukça zordur. Çünkü primer kültürler farklı bireylerden alındığı için fonksiyonel durumları yansıtması da farklılık gösterir.

Devamlı hücre hatları ise; transformasyona uğramış primer hücrelerdir ve bu hücreler süresiz çoğalabilme özelliğine sahiptir. Primer hücrelere göre daha stabil bir fenotipe sahiptir. Devamlı hücreler, transformasyona uğramış olduklarından dolayı sahip oldukları in vivo özelliklerin hepsini koruyamazlar. Bu hücre hatları kolaylıkla çoğaltılabilir. En sık kullanılan devamlı hücre hatlarına; insan epitelyal hücreleri (HeLa) ve fare fibroblastları (L-929, 3T3) örnek verilebilir [73], [74].

2.4.2.1 Sitotoksisite Tayini

Bir maddenin biyouyumluluğunun belirlenmesi, o maddenin hücre yaşamına olan etkisine bağlıdır. Bir dizi moleküler reaksiyon sonucunda çeşitli makromoleküllerin sentezinin durdurulması, bunun bir sonucu olarak hücrenin yapısında ve fonksiyonunda çeşitli aksaklıklar ve hasarlar meydana gelmesiyle sitotoksik davranış meydana gelmiş olur [75], [76].

Sitotoksisite testleri, in vitro gerçekleştirilen ve hücre kültürleri üzerinde gerçekleşen muhtemel toksikolojik reaksiyonlar olarak değerlendirilir. Bu testlerde;

- Protein veya DNA sentezi

- Hücre membranı
- Hücre canlılığı ve ölümü
- Hücre bölünmesi
- Hücre organelleri ile ilgili bilgiler elde edilir.

Testlerde, hücre ve test edilecek maddenin etkinleştirme şekli (direkt, indirekt, ekstrakt) önem taşımaktadır. Bunun yanı sıra test edilecek materyalin fiziksel yöntemi de önem taşımaktadır. Örneğin; materyalin ilaç yerine biyomalzeme formatında olması, hücreler ve materyalin etkileştirilme yöntemini değiştirebilmektedir [77].

Testlerin belirli bir standartta yapılabilmesi için uluslararası standartlar geliştirilmiştir. Sitotoksisite testleri için ISO, bazı kriterler belirlemiştir. Medikal ürünlerin biyolojik olarak değerlendirilmesinde kullanılan ve farklı metotların kullanımı içeren, temelinde insanları korumayı amaçlayan test protokolü; ISO 10993'tür. Bunlar içinde in vitro sitotoksisite testleri için önerilen test protokolü; ISO 10993-5 protokolüdür. Bu standartta önerilen test metotları [75], [78]:

1) Direkt hücre kültürü

i.Direkt temas testi

ii.Ekstrakt testi

b)Bariyer test metodu

2)Filtre difüzyon testi

3)Agar difüzyon testi

4)Dentin bariyer testi

Sitotoksisite değerlendirme yöntemleri dört grupta incelenebilir [78]

- Canlılık (viability) değerlendiren testler: kısa sürede oluşan toksik reaksiyonların etkileri incelenir.
- Hücre proliferasyonunu değerlendiren testler
- Yaşam (survival) değerlendiren testler: uzun sürede oluşan toksik reansiyonların etkileri incelenir.

- Metabolik sitotoksisite değerlendirme testleri

2.4.2.2 Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Hücre Soyları;

1. MCF7 Hücre Soyu

İnsan meme adenokarsinom hücre hattı olarak bilinen MCF7, 1970 yılında ilk izole edilen ve 69 yaşında bir Kafkas kadından alınan bir hücre dizisidir. MCF7 hücreleri, in vitro meme kanseri araştırmaları için faydalıdır, çünkü hücre dizisi meme epiteline özgü birçok ideal özelliğe sahiptir. Bunlar, MCF7 hücrelerinin hücre sitoplazmasında östrojen reseptörleri vasıtasıyla estradiol formunda östrojen işleme kabiliyetini içerir. Bu MCF7 hücre hattını bir östrojen reseptörü (ER) pozitif kontrol hücre dizisi haline getirir [79].

2. C6 Glioma Hücre Soyu Sıçan C6 glioma hücreleri merkezi sinir sisteminden kökenlenmiş hücreler olup astrosit, oligodendrosit ve bunların öncüleri olan hücrelerin özelliğini taşımaktadır Bu hücreler yüksek mitotik aktivite, nükleer pleomorfizm, tümör nekroz odakları, tümör içi kanama gibi çeşitli malign glioblastoma karakteristiklerine sahip hücreler olarak primer beyin tümörü araştırmalarında kullanılmaktadır. Wistar-Furth sıçanlara N-N' nitrozometilüre uygulanmasıyla oluşturulan C6 glioma tümör hattı ilaç etkileşimi çalışmaları için tüm dünyada yaygın olarak tercih edilmektedir [80].

2.4.2.3 DPPH Testi

DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate) serbest radikal süpürme yöntemi, bir bileşiğin, bir özütün veya diğer biyolojik kaynakların antioksidan potansiyelinin değerlendirilmesi için ilk yaklaşımı sunmaktadır. Bu metot basit bir yaklaşımdır. Prospektif bileşik veya özütün DPPH solüsyonu ile karıştırıldığı ve belirli bir süre sonunda absorbans değerinin UV spektroskopisi ile kaydedildiği en basit yöntemdir. DPPH yöntemi sulu ve polar olmayan organik çözücülerde kullanılabilir ve hem hidrofilik hem de lipofilik antioksidanları incelemek için kullanılabilir. Bu yöntemin avantajı, DPPH'nin birçok molekül ile reaksiyona girmesi ve bu yöntemde yeterli süre verildiğinde (30dk), DPPH'nin zayıf antioksidanlarla bile yavaş reaksiyona girmesine olanak sağlamasıdır [81].

2.4.2.4 MTT Testi

Sitotoksisite değerlendirmelerinde çok sık kullanılan kolorimetrik MTT (3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) testi, MTT'yi çözünmeyen mavi renkli formazan bileşiğine dönüştürebilen dehidrogenaz enziminin aktivitesini ölçmektedir. Hücrede, sitotoksik etki sonucunda dehidrogenaz enzim aktivitesinin etkilenmesi sonrası mavi renkli formazan oluşmamaktadır. Formazan, yalnızca canlı ve aktif mitokondrinin bulunduğu hücrelerde oluşmaktadır. Hücrelerde formazan oluşumu, spektrofotometre ile optik yoğunluğun ölçülmesi ya da örneğin çevresinde oluşan formazan ışığın elektron mikroskobuyla belirlenmesi ile ölçülebilmektedir [78], [82].

BÖLÜM 3

MATERYAL – METOD

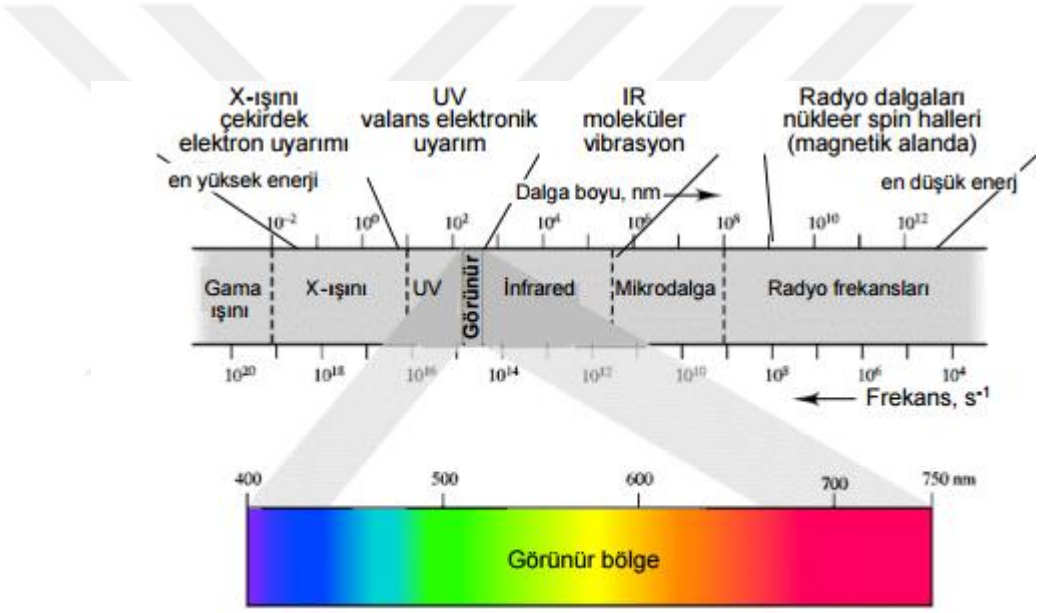
3.1.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar

- Sonikatör – Bandelin Sonoplus
- Çoklu Manyetik Karıştırıcı – IKA
- Manyetik Karıştırıcı – Variomag Mono
- Hassas Terazi – Shimadzu
- Santrifüj Cihazı – Beckmann Coulter
- UV-Vis Spektrofotometre – Shimadzu UV-1800
- Zeta Potansiyel ve Parçacık Ölçüm Cihazı – Malvern ZEN 3600 Nano ZS
- SEM – Zeiss – EVO LS 10
- FT-IR – Shimadzu IR-Prestige
- Invert Mikroskop-Olympus
- Sartorious Saf Su Cihazı
- CO^2 İnkübatör – Biosan, ES 20
- Çalkalayıcı- Biosan Environmental Shaker-Incubator ES-20
- Biyogüvenlik Kabini- Hedlab XPROII

3.1.2 Kateşin Yüklü Nanopartiküllerin Karakterizasyon ve Biyolojik Etkinlik Tayininde Kullanılan Başlıca Analiz Cihazları

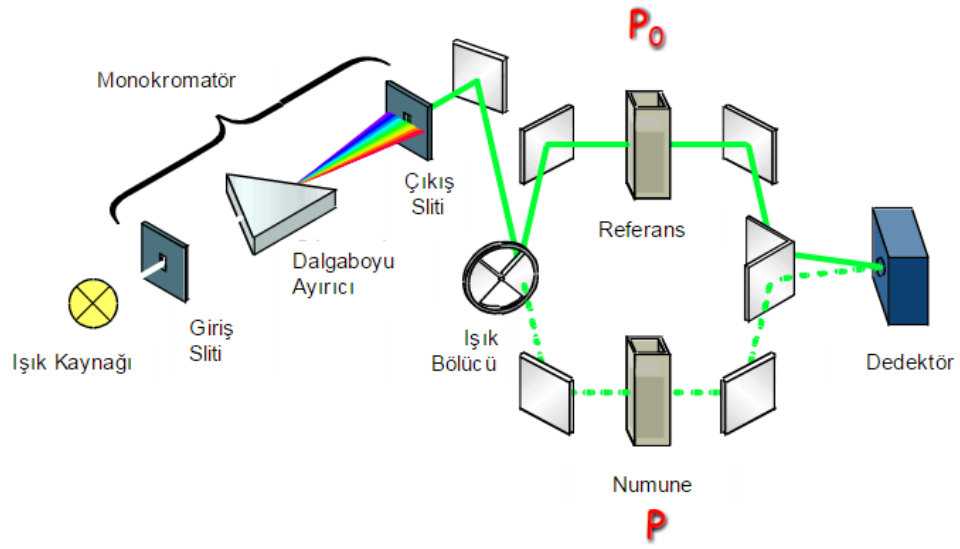
3.1.2.1 UV-Görünür Bölge Spektroskopisi

Ultraviyole ve görünür bölge spektroskopisinin bir araya getirilmesi elektronik spektroskopi olarak adlandırılır. 100-700 nm aralığı elektronik spektrum, 100-200 nm aralığı vakum ultraviyole, 200-400 nm aralığı ultraviyole (mor ötesi) ve 400-700 nm aralığı görünür bölge olarak kabul edilir [83].



Şekil 3.1 Ultraviyole-Görünür Bölge [84]

Ultraviyole veya görünür ışın absorbe edilirken, genellikle bağlı elektronlar uyarılır. ve bu uyarılma sonucunda analiz edilen maddede bulunan bağların türlerine göre belirli dalga boylarında spesifik absorbsiyon pikleri elde edilir [84]. Bir maddenin spektrofotometrik analizi yapılırken öncelikle istenen maddenin sadece absorbsiyon kısmın tayin edileceği bir dalga boyu bölgesi saptanır ve çalışmalar bu bölgede yapılır. Absorbansı ölçülecek maddeyi içermeyen çözücü (kör, blank tüpünün içeriği) ışık yoluna yerleştirilir. Bu olay sonucunda küvete gelen ışık büyük oranda geçerek dedektöre ulaşır, kısmen de çözücü ve küvet tarafından absorbe edilir [84], [85].



Şekil 3.2 Tez çalışmalarında kullanılan çift ışık yollu spektrofotometre [86]

3.1.2.2 Zeta Sizer Cihazı

Zeta sizer cihazı dinamik ışık saçma prensibi ile çalışmaktadır. Dinamik ışık saçma prensibi sıvıda çözünmüş partikül, genellikle submikron bölgede bulunan parçacıkların boyutunu belirlemek için kullanılan bir metottur. Zeta sizer cihazı kullanılarak hem yüzey zeta potansiyel analizi hemde partikül boyut analizi yapılmaktadır. Partikül ve moleküllerin zeta potansiyelleri, elektroforezden dolayı hareket ediyorlarken partikül ve moleküllerin hız ölçümleri ile belirlenmektedir. Bir zeta potansiyele sahip partiküller eğer bir alan uygulanırsa elektroda doğru hareket edecektir. Partiküllerin sahip oldukları hız zeta potansiyelleri ve alan gücü ile orantılıdır. Yüksek kaliteli veriler üretmek için dizayn edilen Zetasizer Nano cihazı, lazer ve sıcaklık kontrolünden optik tasarım ve dedektöre kadar ölçüm zincirinin her aşamasında optimize edilmiş bileşenler sağlamak üzere tasarlanmış bir analiz aracıdır [87].

3.1.2.3 Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM)

Taramalı elektron mikrosokopisi analizi partikül boyutunun yanı sıra DLS ile elde edilen sonuçların doğrulanması için kullanılmaktadır. Aslında DLS metodu her zaman özellikle

partikül boyutları düzgün olmadığı ve PDI değeri yüksek olduğu zaman gerçek fiziksel boyutu göstermez. SEM, örnek yüzeyi incelemek için yaygın olarak kullanılan bir tekniktir ve partiküllerin 2 boyutlu görünütüsünü verir.

SEM çalışma prensibi ;

Yüksek enerjili elektron demeti numuneye odaklanır ve yüzeyin içine nüfuz edince elektron ve yüzey atomları arasında bir etkileşime neden olur. İkincil olarak geri saçılma ve Auger elektronları oluşturulur ve bu üretilen sinyaller enerji dağıtıcı X-ray analizi (EDX) kullanarak belirlenebilmektedir. Yüzey taranması esnasında oluşturulan ikincil elektronlar keşfedilir ve numune ile ilgili doku, kimyasal bileşim ve numune yüzeyinin kristal yapısı gibi bilgiler edinilmektedir [88], [89].

3.1.2.4 Atomik Güç Mikroskobu (AFM)

AFM, nano ölçeğinde molekül içi kuvvetler ve yüzey topoğrafyasını ölçmek için kullanılan en doğru aletlerden biridir. AFM mikro-konsol ve prob olmak üzere iki ana bileşenden oluşmaktadır. Mikro-konsol (MC) piezoelektrik tabakadan üretilmiştir. MC AFM performansını arttırken, mikroskop üretim maliyetini düşürür, görüntüleme hızını arttırır ve cihazın boyutlarını küçültür [90]. AFM, molekül içi kuvvetler, yüzey görüntüleme ve nanopartikül manipülasyonunun ölçülmesinde etkin bir araç olarak kabul edilmiştir. Literatüre göre, nanoskalada iyi bir doğrulama avantajına sahiptir.

3.1.2.5 Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR)

Kızılötesi absorpsiyon spektroskopisi, bilim insanlarının moleküllerin yapılarını belirlemek için moleküllerin kızılötesi radyasyonun karakteristik absorpsiyonu ile kullandığı yöntemdir. Kızılötesi spektrum moleküler titreşim spektrumudur [91].

FTIR çalışma prensibi;

FTIR spektrometre, bir kaynak, interferometre, örnek bölmesi, dedektör, amplifikatör, A/D dönüştürücü ve bir bilgisayardan oluşur [92]. Kaynak, numuneyi interferometre yoluyla geçiren ve dedektöre ulaşan radyasyon üretir. Ardından sinyal çoğaltılır ve sırasıyla amplifikatör ve analog-dijital dönüştürücü ile dijital sinyal haline dönüştürülür. Sonunda, sinyal fourier dönüşümü yapılan bir bilgisayara aktarılır [91]. Kızılötesi

absorpsiyon spektroskopisini daha kullanışlı yapan şey, tüm gaz, sıvı ve katı örnekleri analiz edebilme özelliğidir. Çoğu organik bileşiğin ve inorganik iyonların absorpsiyon ışınımı bu bölgede olduğu için kızılötesi absorpsiyon spektroskopisi için ortak kullanılan bölge 4000 ~ 400 cm-1'dir [93].

3.1.3 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasallar

- (+)-Kateşin Hidrat- Sigma C1251
- Poli(laktik-ko-glikolik asit) PLGA – Sigma Aldrich 719900
- Polivinil Alkol- Sigma Aldrich 363138
- Diklorametan DCM - Sigma Aldrich 24233-2
- Etil Alkol (C_2H_5OH)-Sigma
- Sodyum Klorür (NaCl)-Sigma Aldrich 13423
- Disodyum Fosfat (Na_2HPO_4)-Sigma Aldrich 71640
- Sodyum Dihidrojen Fosfat ($NaH_2PO_4.2H_2O$)-Sigma Aldrich 04272
- Sodyum Hidroksit (NaOH)- Sigma Aldrich 71690
- Hidroklorik Asit (HCl)- Sigma Aldrich 30721
- 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)-Aldrich D9132
- Thiazoyl Blue Tetrazolium Bromide %98 (MTT) - Sigma M5655-1G
- Dulbecco's Modified of Eagle Medium/Ham's F12 50/50Mix,1X (DMEM/F12)-Multicell CAT No 319-075-CL
- Fetal Sığır Serumu – Seromed-S0115
- Tripsin EDTA – Biological Industries 03-051-5B
- Tripsin – Biochrom L2103
- Dimetil sülfoksit(DMSO) – Sigma D2650
- Penisilin-Streptomisin(PEST) – Biological Industries 03-031-IC
- L-Glutamin – Biological Industries 02-020-IC

3.1.4 Kullanılan Çözeltiler

3.1.4.1 Çeşitli Konsantrasyonlarda Kateşin Çözeltisi Hazırlanması

1 mg Kateşin 10 ml etil alkol içerisinde çözülerek 0,1 mg/ml oranında çözelti elde edildi. Seyreltme yöntemiyle 0,1 mg/ml – 0,001 mg/ml konsantrasyonları arasında 20 adet çözelti, UV-Vis Spektroskopisinde spektrum ölçümü için hazırlandı.

3.1.4.2 Polivinilalkol PVA Çözeltisi Hazırlanması

% 3 Polivinilalkol çözeltisi elde etmek için ;

30 g polivinil alkol tartıldı ve üzerine 1000 ml ultra saf su eklenip manyetik karıştırıcıda 60-70 °C'de partiküllü yapı tamamen çözünene kadar karıştırıldı ve daha sonra homojen bir çözelti elde etmek için 0.22 µm filtre yardımıyla süzüldü.

%0,1'lik polivinil alkol çözeltisi elde etmek için;

1 gr polivinil alkol tartıldı ve üzerine 1000 ml ultra saf su eklenip manyetik karıştırıcıda 60-70 °C'de partiküllü yapı tamamen çözünene kadar karıştırıldı ve daha sonra homojen bir çözelti elde etmek için 0.22 µm filtre yardımıyla süzüldü.

3.1.4.3 0.01 mol/L'lik Fosfat Tampon Çözeltisi (PBS) Hazırlanması

Fosfat Tampon Çözeltisi pH: 7.4 ;

1.1998g NaH_2PO_4, 1.7799g Na_2HPO_4 ve 8.766g NaCl tartıldı. Bütün kimyasallar karıştırılıp 1 litre saf su içerisinde manyetik karıştırıcı yardımıyla tamamen çözünene kadar karıştırıldı ve çözeltinin pH'sı ölçüldü. Üzerine NaOH çözeltisi ilave edilerek çözeltinin pH'sı pH metre yardımıyla 7.4'ye ayarlandı.

Fosfat Tampon Çözeltisi pH: 3 ;

1.1998g NaH_2PO_4, 1.7799g Na_2HPO_4 ve 8.766g NaCl tartıldı. Bütün kimyasallar karıştırılıp 1 litre saf su içerisinde manyetik karıştırıcı yardımıyla tamamen çözünene

kadar karıştırıldı ve çözeltinin pH'sı ölçüldü. Üzerine HCL asit çözeltisi ilave edilerek çözeltinin pH'sı pH metre yardımıyla 3 'e ayarlandı.

Fosfat Tampon Çözeltisi pH: 6 ;

1.1998g NaH_2PO_4, 1.7799g Na_2HPO_4 ve 8.766g NaCl tartıldı. Bütün kimyasallar karıştırılıp 1 litre saf su içerisinde manyetik karıştırıcı yardımıyla tamamen çözünene kadar karıştırıldı ve çözeltinin pH'sı ölçüldü. Üzerine HCL asit çözeltisi ilave edilerek çözeltinin pH'sı pH metre yardımıyla 6'ya ayarlandı.

Fosfat Tampon Çözeltisi pH: 9 ;

1.1998g NaH_2PO_4, 1.7799g Na_2HPO_4 ve 8.766g NaCl tartıldı. Bütün kimyasallar karıştırılıp 1 litre saf su içerisinde manyetik karıştırıcı yardımıyla tamamen çözünene kadar karıştırıldı ve çözeltinin pH'sı ölçüldü. Üzerine NaOH çözeltisi ilave edilerek çözeltinin pH'sı pH metre yardımıyla 9'a ayarlandı.

Fosfat Tampon Çözeltisi pH: 12 ;

1.1998g NaH_2PO_4, 1.7799g Na_2HPO_4 ve 8.766g NaCl tartıldı. Bütün kimyasallar karıştırılıp 1 litre saf su içerisinde manyetik karıştırıcı yardımıyla tamamen çözünene kadar karıştırıldı ve çözeltinin pH'sı ölçüldü. Üzerine NaOH çözeltisi ilave edilerek çözeltinin pH'sı pH metre yardımıyla 12'ye ayarlandı.

3.1.4.4 DPPH Çözeltisi Hazırlanması

4 mg DPPH molekülü tartıldı. Manyetik karıştırıcı yardımıyla 100 ml saf etil alkol içerisinde tamamen çözünene kadar karıştırıldı. Solüsyon her işlem için taze olarak hazırlandı. Antioksidan etkinlik tayini deneyi yapılacağı süre boyunca ışık geçirmez cam şişede +4 derecede muhafaza edildi.

3.1.4.5 1x Tripsin Solüsyonu Hazırlanması

Tripsin maddesi 62.5 mg tartıldı. 50 ml 1x PBS içerisine ilave edilerek çözüldü. Önce 0.45 µl' lik filtreden ve daha sonra 0.22 µl'lik filtreden geçirilerek steril bir solüsyon hazırlandı.

3.1.4.6 Hücre Kültürü Solüsyonu Hazırlanması

Glioma ve MCF7 hücreleri için besiyeri hazırlanması ;

DMEM medium içerisine; 1X, %1 olacak şekilde L-Glutamin, %1 antibiyotik ve Glioma hücreleri için %5 FBS (fetal bovine serum), MCF7 hücreleri için %10 FBS (fetal bovine serum) eklendi. DMEM içerisine belirtilen bu oranlarda L-Glutamin, antibiyotik ve FBS eklenmesi ile tam solüsyon hazırlanmış oldu ve hücre kültürü aşamalarında tam solüsyon kullanıldı.

3.1.4.7 Hücre Dondurma Solüsyonu Hazırlanması

%80 Fetal Sığır Serumu (FBS) ve %20 Dimetil Sülfoksit hacimlerinde karıştırılarak 5 ml hacimde dondurma solüsyonu hazırlandı. Daha sonra kullanılmak üzere küçük hacimlere ayrılarak -20 ^{0}C' de saklandı.

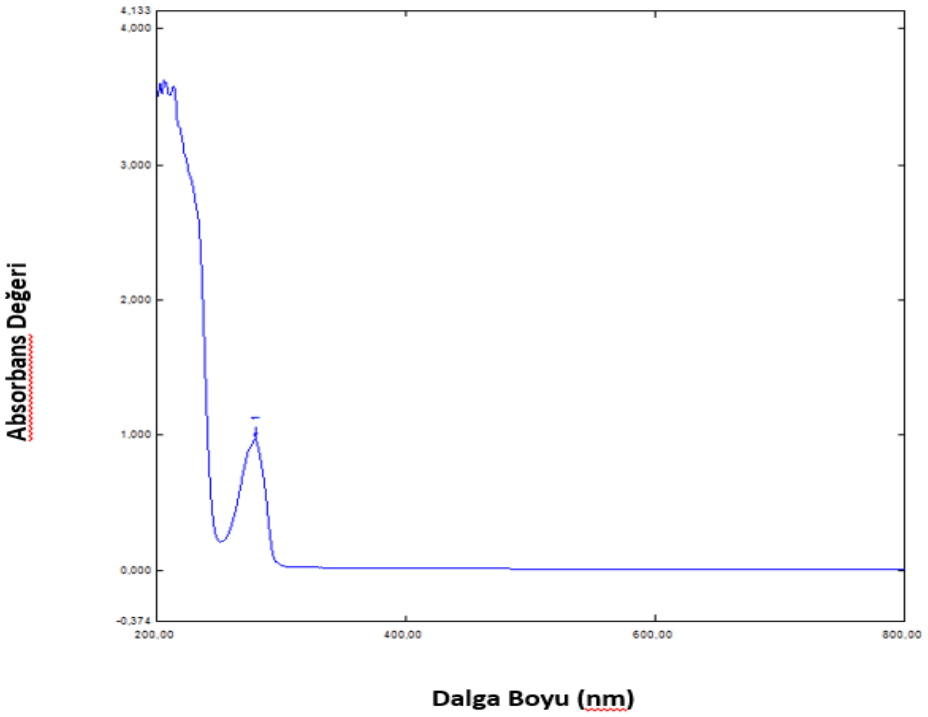
3.1.4.8 MTT Solüsyonu Hazırlanması

Bir falkon tüpü içerisine 5mg/ml konsantrasyo hazırlamak üzere 25 mg MTT tartıldı ve 5 ml 1xPBS ile vorteks ile karıştırılarak çözüldü. Önce 0,45 µl' lik filtreden ve daha sonra 0,22 µl'lik filtreden geçirilerek steril hale getirildi. Hazırlanan MTT solüsyonu +4 ^{o} C de karanlık ortamda bir aykadar saklanabilir. Kullanılacağı zaman istenilen konsantrasyon ve hazırlanacak miktarda bu stoktan alınıp kültür solüsyonu eklenerek deneylere uygulanır.

3.2 METOT

3.2.1 Kateşin Uv Spektrofotometre Kalibrasyon Eğrisi

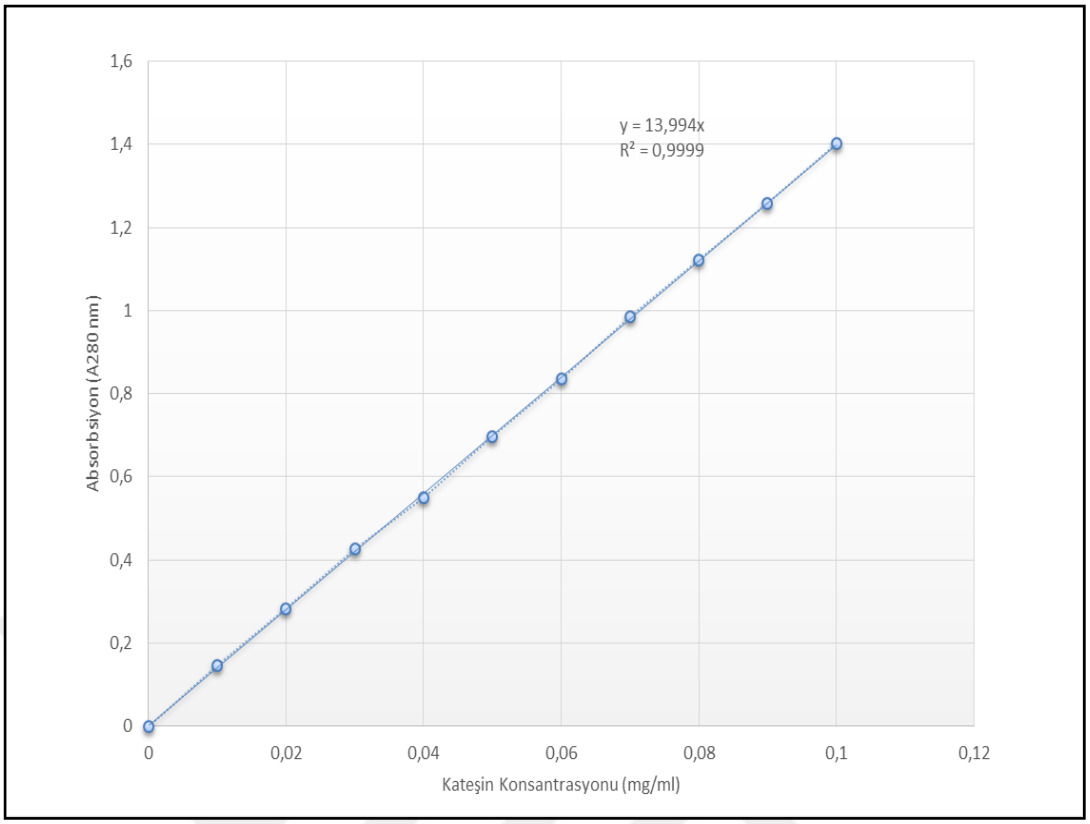
Kateşin maddesinin absorbans piki verdiği dalga boyunu belirlemek için 1mg Kateşin maddesi, 1ml Etil alkol içerisinde çözündü. UV-Vis spektroskopi cihazı ile spektrum ölçümü yapıldı. 280 nm dalga boyunda pik verdiği belirlenen Kateşin maddesinin kalibrasyon eğrisini hazırlamak için 10 mg Kateşin molekülü 10 ml Etil alkol içerisinde çözündü ve seyreltme yöntemi ile 0,1-0,001 mg/ml aralığında 19 adet farklı konsantrasyonda çözelti serisi hazırlandı. 280 nm'de ölçüm yapılarak alınan sayısal veriler ile Kateşin molekülüne ait bir kalibrasyon eğrisi hazırlandı.



Şekil 3.3 Kateşin UV-Vis Spektrum

Çizelge 3.1 Kateşinin farklı konsantrasyonlardaki 280 nm'deki absorbans değerleri

Konsantrasyon	Dalgaboyu (nm)	Konsantrasyon	Dalgaboyu (nm)
	280		280
0,001	0,018	0,01	0,147
0,002	0,027	0,02	0,281
0,003	0,037	0,03	0,426
0,004	0,049	0,04	0,549
0,005	0,065	0,05	0,696
0,006	0,077	0,06	0,836
0,007	0,087	0,07	0,985
0,008	0,098	0,08	1,121
0,009	0,102	0,09	1,257
0,01	0,117	0,1	1,402



Şekil 3.4 Kateşinin etil alkole karşı hazırlanmış kalibrasyon eğrisi

Polimerik nanopartiküller, poli laktik (PLA), poli glikolid (PLG) gibi biyobozunur ve biyouyumlu polimer ya da PLGA gibi kopolimerlerden üretilmektedir. Nanopartikül sentez yöntemine başlıca etken maddenin çözünürlüğü ve moleküler stabilitesi göz önünde bulundurularak karar verilmektedir. Nanopartikül sentezinde en yaygın olarak kullanılan metot; emülsiyon çözücü buharlaştıma, nanoçöktürme ve emülsiyon solvent difüzyon metodudur [94]. Sentez metodu seçilmeden önce Kateşin maddesinin kimyasal özelliği, moleküler stabilitesi ve bu molekül için uygun sentez metotları ile ilgili literatür araştırması yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar değerlendirilerek Kateşin maddesinin tekli emülsiyon çözücü buharlaştıma yöntemi kullanılarak sentezlenmesine karar verilmiştir.

Nanopartiküler sisteme 20 ve 40 mg olmak üzere iki farklı konsantrasyonda etken madde yüklenmesi hedeflenmiştir.

20 mg Kateşin yüklü nanopartikül sentezi;

20 mg Kateşin molekülü tartıldı. 1 ml etil alkol içerisinde çözüldü. 100mg PLGA molekülü 1,5 ml DCM organik çözücü içerisinde çözüldü. Hemen sonra Kateşin ve PLGA molekülü birbirine karıştırıldı. Oluşan karışım organik fazı hazırlamak üzere 4 ml % 3 PVA çözeltisi üzerine sonikatör cihazı (80% güç) yardımıyla eklendi ve 120 sn süre ile sonike edildi. Oluşan karışım dış faz oluşturmak üzere 35 ml 0.1% PVA çözeltisi üzerine manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılarak yavaş bir şekilde ilave edildi. Oluşan nanopartiküllerin boyut dağılımını küçültmek ve nanopartikül çözeltisindeki organik çözücüyü buharlaştırmak için 24 saat manyetik karıştırıcı üzerinde bırakıldı. Ertesi gün nanopartikül çözeltisinden katı nanopartikülü elde etmek için 9000 rpm'de 60 dk santrifüj işlemi uygulandı ve çöktürme sonrası elde edilen nanopartiküllerin dış yüzeyinde bulunan surfaktan kalıntılarını uzaklaştırmak için üzerine 35 ml saf su eklenerek 9000 rpm'de 60 dk 3 kez santrifüj edilerek yıkama işlemi yapıldı. Kalıntılardan uzaklaştırılmış katı nanopartiküller liyafilizatöre kaldırılmak üzere 10 ml saf su içerisinde homojen bir çözelti haline getirilerek -20 °C'ye konuldu.

40 mg Kateşin yüklü nanopartikül sentezi;

40 mg Kateşin molekülü tartıldı. 1 ml etil alkol içerisinde çözüldü. 100 mg PLGA molekülü 1,5 ml DCM organik çözücü içerisinde çözüldü. Hemen sonra Kateşin ve PLGA molekülü birbirine karıştırıldı. Oluşan karışım organik fazı hazırlamak üzere 4 ml 3% PVA çözeltisi üzerine sonikatör cihazı (80% güç) yardımıyla eklendi ve 120 sn süre ile sonike edildi. Oluşan karışım dış faz oluşturmak üzere 35 ml 0.1% PVA çözeltisi üzerine manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılarak yavaş bir şekilde ilave edildi. Oluşan nanopartiküllerin boyut dağılımını küçültmek ve nanopartikül çözeltisindeki organik çözücüyü buharlaştırmak için 24 saat manyetik karıştırıcı üzerinde bırakıldı. Ertesi gün nanopartikül çözeltisinden katı nanopartikülü elde etmek için 9000 rpm'de 60 dk santrifüj işlemi uygulandı ve çöktürme sonrası elde edilen nanopartiküllerin dış yüzeyinde bulunan surfaktan kalıntılarını uzaklaştırmak için üzerine 35 ml saf su eklenerek 9000 rpm'de 60 dk 3 kez santrifüj edilerek yıkama işlemi yapıldı. Kalıntılardan uzaklaştırılmış katı nanopartiküller liyafilizatörde kurutulmak üzere 10 ml saf su içerisinde homojen bir çözelti haline getirilerek -20 °C'de dondurulduu.

3.2.2 UV Spektroskopisi ile Enkapsülasyon Veriminin Hesaplanması

Enkapsüle olan Kateşin miktarını hesaplamak için üst fazdan indirekt tayin yöntemi kullanıldı. Sentezlenen nanopartikülleri katı fazda elde etmek için yapılan çöktürme işlemi sonrası ve nanopartikül yüzey kalıntılarını ayırmak için yapılan yıkama işlemi sonrası elde edilen üst fazlar bir araya toplandı ve daha sonra UV spektroskopsinde 280 nm dalga boyunda absorbans piki verdiği belirlenen Kateşin molekülünün üst fazda bulunan miktarını hesaplamak için üst fazların 280 nm dalga boyunda fotometrik ölçümü yapıldı. Üst fazların 280 nm de elde edilen absorbans değerleri kayedildi. Etken madde miktarı, etil alkol ile hazırlanan Kateşin standart eğri grafiği kullanılarak belirlendi.

Enkapsülasyon Etkinliği (EE%) aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplandı [95]:

Enkapsülasyon verimi % = $\frac{Nanopartikül\ içerisinde\ bulunan\ etken\ madde\ miktarı\ (\ mg)}{Kullanılan\ toplam\ etken\ madde\ miktarı\ (mg)} x\ 100$ (3.1)

3.2.3 Reaksiyon Veriminin Hesaplanması

Yüksek bir reaksiyon verimi ile nanopartikül hazırlama tekniği kimyasal madde kaybını ve üretim maliyetini azaltacaktır [96]. Kurutulmuş olan nanopartikül miktarının sentezde kullanılan polimer ve etken madde miktarının toplamına oranlanması ile reaksiyon verimi elde edimiştir.

Reaksiyon verimi aşağıda verilen formül kullanılarak gravimetrik olarak hesaplanmıştır [96].

Reaksiyon verimi =$\frac{Üretilen\ nanopartikül\ miktarı\ (mg)}{Polimer+Kateşin\ miktarı\ (mg)} x100$ (3.2)

3.2.4 Etken Yüklenme Veriminin Hesaplanması

Kateşin yüklü nanopartiküllerin etken yüklenme kapasitesi UV-spektroskopisi (Shimadzu UV-1800) kullanılarak belirlendi. Nanopartikül sentezinde kullanılan etken madde miktarının kurutularak katı formda elde edilen nanopartikül miktarına oranlanması ile etken yükleme kapasitesi hesaplanmıştır.

Etken yükleme kapasitesini hesaplamak için aşağıda verilen formül kullanılmıştır [12].

Etken Yüklenme Kapasitesi=$\frac{Enkapsüle\ etken\ madde\ miktarı(mg)}{Elde\ edilen\ katı\ nanopartikül\ miktarı(mg)} x100$ (3.3)

3.2.5 Zeta Sizer Analizi

Dinamik ışık saçma tekniği kullanılarak nanopartiküllerin ortalama parçacık boyutu (Z-Ave), zeta potansiyel ve polidispersite indeksi (PDI) değerleri belirlendi. Analizler Zetasizer (Zetasizer Nano ZS, Malvern, İngiltere) cihaz ve 4.0 mV He-Ne lazer (633 nm) ekipmanı ile yapıldı. Ölçümler çözeltiler için 0.8872 cP viskoziteli ve 1.330 kırılma indeksi değerleri kullanıarak 25 ± 0.1 °C koşullarında üç kez gerçekleştirildi. Koşuların sayısı ve çalışma süreleri otomatik olarak seçildi. Nanoparçacıkların Zeta potansiyeli (ζ) değeri elektroforetik ışık saçılması (ELS) tekniği ile belirlendi ve taşınır kıvrılmış kılcal hücrede 25 ± 0.1 °C gerçekleştirildi. Ölçümler üçlü olarak viskozite, 0.8872 cP; dielektrik sabiti, 79; f (ka), 1.50 (Smoluchowski) şartları altında gerçekleştirildi. Ölçüm süreleri ve voltaj seçimleri otomatik olarak ayarlandı. Tüm numuneler ölçümden önce 0.20 um RC-membran filtre (Sartorius) edilip, fosfat tamponunda seyreltilerek hazırlandı.

3.2.6 Tarama Elektron Mikroskopisi Analizi

Kateşin yüklü nanopartiküllerin yüzey morfolojisi ve şekilleri tarama elektron mikroskopisi kullanılarak gözlenmiştir. Nanopartikül süspansiyonunun bir damlası iki taraflı siyah karbon şerit üzerine yerleştirildi. Kurutulduktan sonra, nanopartiküller vakum altında altın tabaka ile kaplandı ve SEM (Zeiss EVO LS 10, Almanya) ile 5 kV'de analiz edildi.

3.2.7 Atomik Güç Mikroskobu Analizi

Y/S tekli emülsiyon çözücü uçurma yöntemi ile oluşturulan katı nanopartiküllerin morfolojik incelemeleri Atomik güç mikroskobunda (AFM) gerçekleştirilmiştir.

3.2.8 Kızılötesi Spektroskopi Analizi (FT-IR)

Fourer dönüşüm spektrofotometre yöntemi 1980'li yıllardan beri kullanılan fizikokimyasal bir yöntemdir. Bu yöntem, kızıl ötesi (IR) radyasyonun absorbsiyonu ile nanopartikül yüzeyinde bulunan moleküllere ait kimyasal bağların titreşiminin ölçülmesi prensibine dayanmaktadır [97]. Kateşin molekülü, PLGA polimer ve nanopartiküllerde bulunan fonksiyonel grupların kimyasal analizleri IR-Prestige 21 FTIR spektrofotometre (Shimadzu, Japan) kullanılarak yürütülmüştür [98].

3.2.9 DPPH Metodu ile İndirekt Yöntemle Antioksidan Etkinlik Tayini

Kateşin yüklü nanopartiküllerin antiradikal aktivitesi 2.2-Diphenyl-l-picrylhydrazyl (DPPH) serbest radikali kullanılarak tayin edilmiştir. DPPH serbest radikalinin antiradikal bileşeni indirgeyici etkisi UV-spektroskopik yöntemiyle 515 nm dalga boyunda görünen absorbsiyon bandı ile tayin edilmektedir [99]. Kateşin yüklü nanopartiküllerin antioksidan etkinlik tayini için salım reaksiyonu deneylerinde elde edilen 1.gün, 2.gün, 3.gün, 5.gün, 7.gün, 9.gün, 12.gün 15.gün, 21. Gün, 28.gün, 35.gün ve 45.gün üst fazları kullanıldı. Antioksidan etkinlik tayini için öncelikle etanol ile 0,1 mM DPPH çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiden 4 ml hacim 1 ml hacim 1.gün, 2.gün, 3.gün, 5.gün, 7.gün, 9.gün, 12.gün, 15.gün, 21.gün, 28.gün, 35.gün ve 45.gün üst fazları ile hazırlanan çözeltiler ve 1ml etanol- 4ml DPPH çözeltisi ile hazırlanan kontrol numunesi üzerine ilave edildi. Hazırlanan karışım homojen bir çözelti elde etmek için çalkalandı ve karanlık bir ortamda, oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. Daha sonra spektrofotometre (UV-VIS 1800 Shimadzu) kullanılarak absorbans değerleri 515 nm'de ölçüldü. Elde edilen değerler ile zamana bağlı antioksidan etkinlik tayini için hesaplamalar yapıldı.

DPPH indirgeyici etkisinin yüzdesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı [99].

$$\text{İnhibisyon yüzdesi} = \frac{A0-A1}{A0} x100 \quad (3.4)$$

A_0; kontrol reaksiyonun absorbans değeri

A_1; Örnek absorbans değeri

3.2.10 MTT Testi ile Antikanser Etkinlik Tayini

MTT analizi, formazon boyalarının ya da MTT azalmasına bağlı olarak enzimatik aktivitenin kolorimetrik ölçümüne dayanan hücre çoğalma miktarının tespit edildiği bir yöntemdir. Bu yöntemle kullanılacak olan herhangi bir terapotik ajanın hücre üzerindeki sitotoksik ya da proliferatif etkileri belirlenebilmektedir. Bu çalışmada, antikanser etkinlik analizi için uygulanan MTT testi birkaç adımda gerçekleştirilmiştir. Bunun için öncelikle hücreler sayılıp ekilmiş, daha sonra hücreler üzerinde etkisi incelenecek olan madde uygulanmış ve son olarak da MTT analizi belirlenen saat (24-48-72 saat) aralıklarıyla yapılmıştır.

1. Hücre sayımı:

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan MCF7 (ATCC-HTB-22) hücre soyu ve C6 Glioma (ATCC-CCL-107) hücre soyu İstanbul Bilim Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümünden temin edilmiştir. Daha önce canlandırılmış ve pasajlanmış olan Glioma ve MCF7 hücreleri, yapışmış oldukları flask yüzeyinden enzimatik muameleyle kaldırılmıştır. Bu işlem için yaklaşık 1ml tripsin, hücreler üzerine hassas bir şekilde uygulanmış ve ölü hücrelerin, atıkların uzaklaştırılmasını sağlamak için yıkama sonrası atılmıştır. Ardından yeniden 1 ml tripsin, hücreler üzerinde tüm yüzeylere temas edecek şekilde uygulanmıştır. Flask, yaklaşık 3 dakika inkübatörde (%5 CO_2, 37^0C) bekletilerek hücrelerin tripsinle yüzeyden tamamen kalkması sağlanmıştır. Hücrelerin tutunduğu flask yüzeyi, 10 ml solüsyon ile yıkanarak tüm hücreler, içerisine önceden 5 ml solüsyon konmuş olan falkon tüpe aktarılmıştır. Hücreleri içeren falkon tüpü, santrifüj cihazına yerleştirilerek 1000 rpm 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süreç sonunda hücreler dipte pelet oluşturacak şekilde çökmüştür. Süpernatant kısım atıldıktan sonra hücreler üzerine 5 ml solüsyon eklenmiş ve hücreler nazikçe solüsyon ile karıştırılmıştır. Eppendorf tüp içerisine; solüsyonla karıştırılmış olan hücre solüsyonundan 20 µl konulmuş, üzerine 20 µl triphan blue boyası eklerek (1:1) hafifçe pipetaj yapılmıştır. Thoma lamı üzerine lamel yerleştirilmiş ve sayım alanlarını tam kaplayacak şekilde boya/hücre karışımı bu alana aktarılmıştır. Işık mikroskop altında hücre sayımı yapılmıştır. Canlı hücreler renksiz, ölü hücreler ise mavi renkte gözlenmiştir. Canlı hücrelerin sayısına göre hücre konsantrasyonu hesaplanmış ve buna göre MTT testi için gereken hücre konsantrasyonu belirlenmiştir.

2. Hücre ekimi: MTT çalışması C6 Glioma ve MCF7 hücreleri üzerinde 24, 48 ve 72. Saat olmak üzere uygulanacaktır. Bu nedenle çalışmada, 3 adet 96 kuyucuklu steril plate kullanılmıştır. Belirlenen hücre konsantrasyonu doğrultusunda, tüm platelerin her kuyucuğuna çoklu mikropipet yardımıyla 100 µl hücre solüsyonu ekilmiştir. Hücre ekilen 3 adet plate, 24 saat boyunca inkübatörde bekletilmiştir. 24 saat sonunda, hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi bakılacak olan K1NP ve K2NP ve serbest Kateşin molekülü, ilgili oranlarda seyreltilerek plate kuyucuklarına konulmuştur. 24 saat ölçümü alınacak olan plate için; her kuyucuk içerisindeki medium çekilerek atılmış, yerine 50 µl MTT solüsyonu eklenmiş ve 2 saat boyunca inkübe edilmiştir. MTT, ölü hücrelerin

oluşturduğu formazan kristallerini boyayacak özelliktedir. Hücrelerdeki boya yoğunluğu ile canlılık analizi sağlanmış olacaktır.

3. % Canlılık ve % 50 Baskılayıcı Konsantrasyon Değeri (IC50) Hesaplama: İnkübasyonun ardından plate kuyucuklarında bulunan MTT solüsyon çekilerek yerine 100 µl DMSO eklenmiştir. Ardından plate hızlıca elisa reader cihazına konularak 570 nm'de absorbans ölçümü yapılmıştır. 48 ve 72 saat için hazırlanan hücreler için de aynı işlemler kendi süreleri dahilinde uygulanmıştır. Bu metot hem MCF7 hemde C6 Glioma hücre soyları için ayrı ayrı uygulanmıştır.

24, 48 ve 72 saat için alınan ölçümler; canlılık oranı formülasyonu [100] kullanılarak hesaplanmıştır. Buna göre;

$$\%\text{Canlılık} = 100 \times OD_{570e} / OD_{570} \quad (3.5)$$

OD_{570e}: Test numunelerinin %100 ekstraktının 570 nm'deki absorbansı

OD_{570b}: Kontrol grubu numunelerin 570 nm'deki absorbansı

Düşük %canlılık; yüksek toksisite anlamına gelmektedir. Buna göre; canlılık oranı %50'den az ise test edilen madde, hücreler için toksik olmaktadır. Bu verilere dayanarak Kateşin maddesinin hücreler üzerinde canlılık oranı hesaplanmıştır.

BÖLÜM 4

BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 BULGULAR

Bu tez kapsamında gerçekleştirilen deneysel çalışmalarda kullanılan nanopartiküler sistemler tekli emülsiyon (w/o) çözücü uçurma yöntemi ile üretilmiştir. Üretilen nanopartiküllerin karakterizasyon çalışmalarında elde edilen sonuçlar aşağıda paylaşılmıştır.

Çizelge 4.1 K1 ve K2 nanopartiküllere ait reaksiyon verimi (RY), enkapsülasyon verimi (EE), ilaç yüklenme verimi (DL), boyut (Z-Ave), çoklu dağılım indeksi (PDI), ve zeta potansiyeli (mV) verileri

Nanopartikül Adı	Reaksiyon verimi (RY)	Enkapsülasyon Etkinliği % (EE)	Etken Yüklenme verimi % (DL)	Boyut Z-Ave (nm)	Çoklu Dağılım Indeksi (PDI)	Zeta Potansiyel (mV)
K1NP (20 mg NP)	43.47	10	3.71	186.2	0,122	-35.9
K2NP (40mgNP)	53.59	10	5.29	292.6	0,186	-27.1

4.1.1 Enkapsülasyon Verimi Hesaplanması

Serbest ve nanopartiküler sisteme yüklenmiş etken maddenin antioksidan etkinliği ve nanopartiküler sistemin maddenin antioksidan etkinliği üzerine etkisi incelenmek üzere

K1NP ve K2NP olmak üzere iki farklı konsantrasyonda nanopartikül sentezi gerçekleştirilmiştir. İndirekt metot tayin yöntemi kullanılarak üst fazda bulunan madde miktarı hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde etken madde miktarının arttırılması ile enkapsülasyon verimi arasında anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir. 20 ve 40 mg miktarda etken madde kullanılarak üretilen nanopartiküllerin enkapsülasyon verimi (3.1) kullanılarak % 10 olarak hesaplanmıştır.

4.1.2 Reaksiyon Verimi Hesaplanması

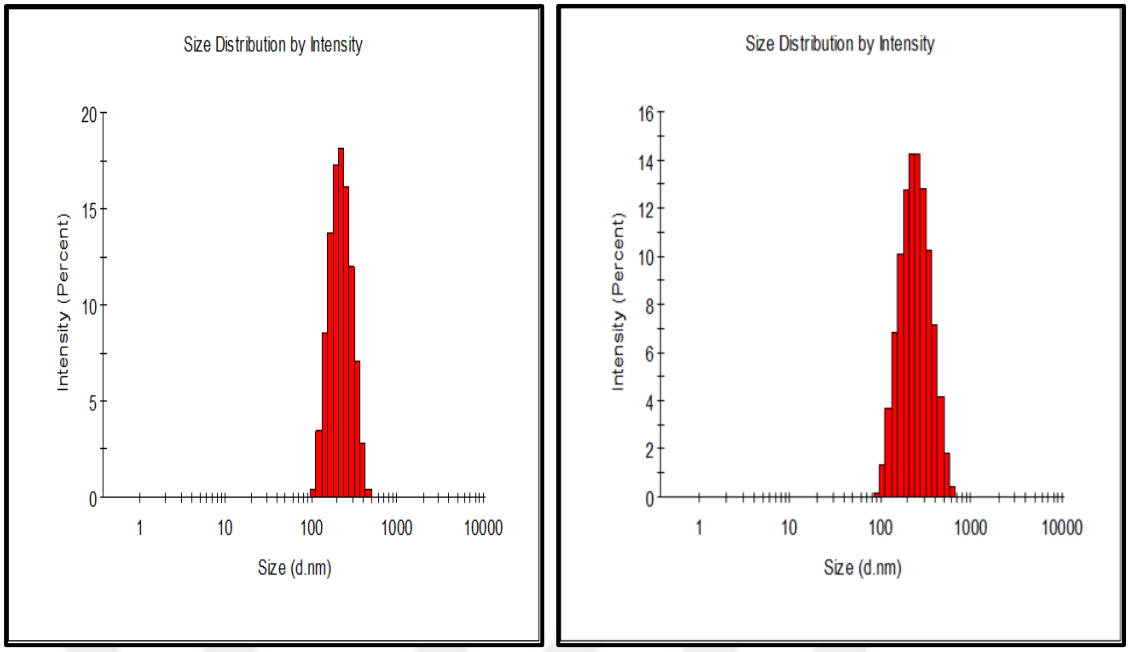
Reaksiyon verimi (3.2) kullanılarak hesaplanmıştır. Etken madde miktarı 20 mg'dan 40 mg'a arttırıldığında reaksiyon veriminin % 43.47'den % 53,95 yükseldiği gözlenmiştir. Etken madde miktarının artışı reaksiyon verimi üzerine olumlu bir etki göstermektedir.

4.1.3 Etken Yüklenme Verimi Hesaplanması

Etken yüklenme verimi (3.3) kullanılarak enkapsüle olan etken madde miktarının elde edilen kuru nanopartikül miktarına oranlanması ile hesaplanmıştır.

4.1.4 Nanopartiküllerin Boyutları Z-Ave (nm) ve Zeta Potansiyelleri Sonuçları

Üretilen nanopartiküllerin zetasizer cihazı kullanılarak boyut analizleri yapılmıştır. Nanopartiküler sisteme yüklenen etken madde miktarı 20 mg'dan 40 mg'a arttırıldığında nanopartikül boyutu 188.6 nm'den 292.6 nm'ye çıkmış ve partikül boyutlarının büyüdüğü gözlenmiştir (Şekil 4.1).

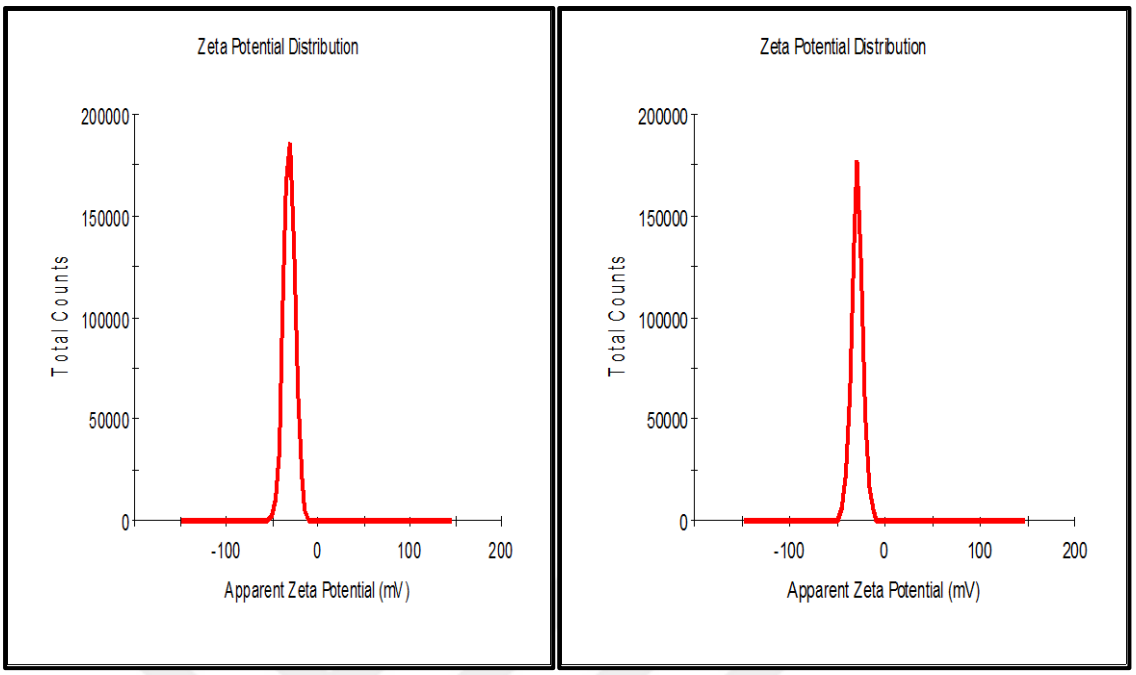


(a) **(b)**

Şekil 4.1 Tekli emülsiyon (s/y) çözücü uçurma yöntemi ile hazırlanan K1 (a) ve K2 nanopartiküllerine (b) ait boyut dağılım analizi

Nanopartiküllerin Zeta Potansiyel Analiz Sonuçları

Nanopartiküllerin yüzey özellikleri hakkında önemli bir analiz sağlayan yüzey zeta potansiyel değerleri zetasizer cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Elde edilen verilere göre, 20 mg etken maddenin kullanıldığı nanopartiküler sistem zetapotansiyel değeri -35.9 iken 40 mg etken maddenin kullanıldığı nanopartiküler sistemde -27.1 olarak kaydedilmiştir (Şekil 4.2). Nanopartikül yüzey yüklerinin oluşturduğu potansiyel değeri, hücre yüzey yükü bakımından önemlidir. Hücre yüzey yükü, sitoplazmik membranın bileşimine ve hücrelerin fizyolojik durumuna bağlı olan anahtar biyofiziksel parametredir. Hücre yüzeyi yükü, nanopartikül yüzey yükü ölçümüne benzer şekilde hücre yüzeyindeki elektrikli çift katmanlı potansiyeli karakterize eden elektrokinetik potansiyelini (zeta potansiyeli) ölçerek değerlendirilir [101].



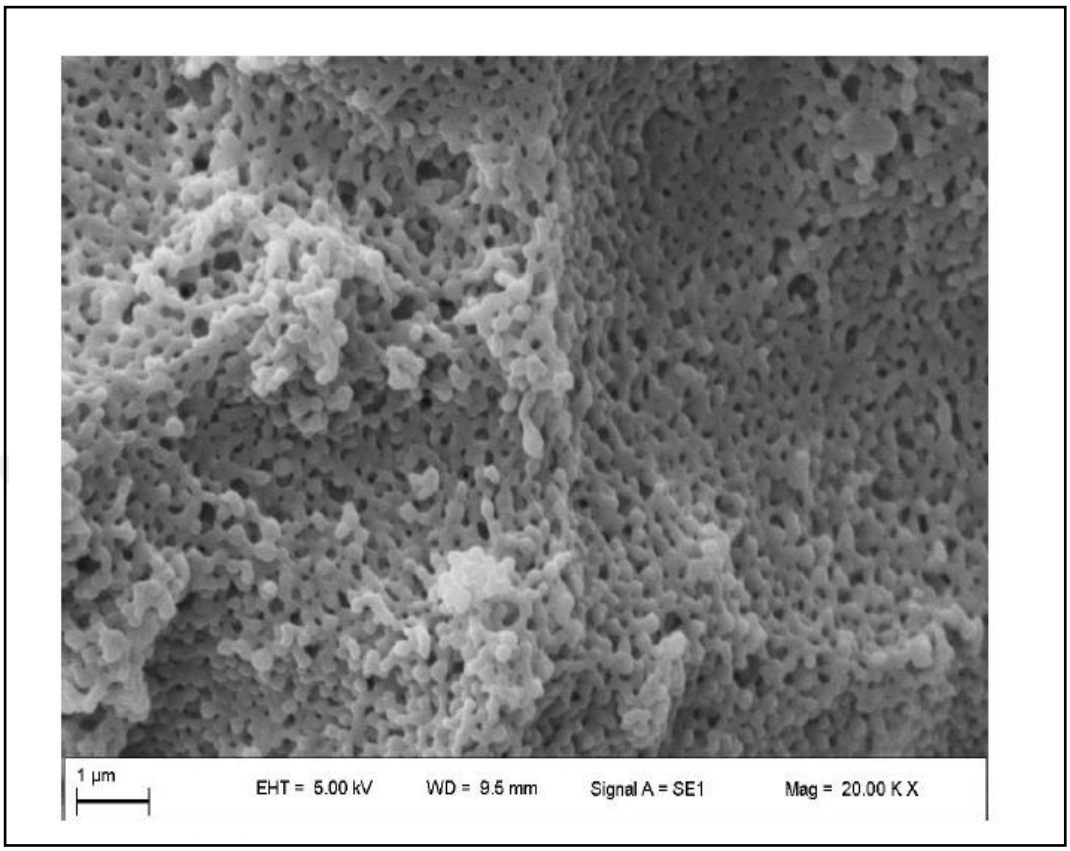
(a) **(b)**

Şekil 4.2 Tekli emülsiyon (s/y) çözücü uçurma yöntemi ile hazırlanan K1 (a) ve K2 (b) nanopartiküllerine ait zeta potansiyel değerleri (Z-Ave)

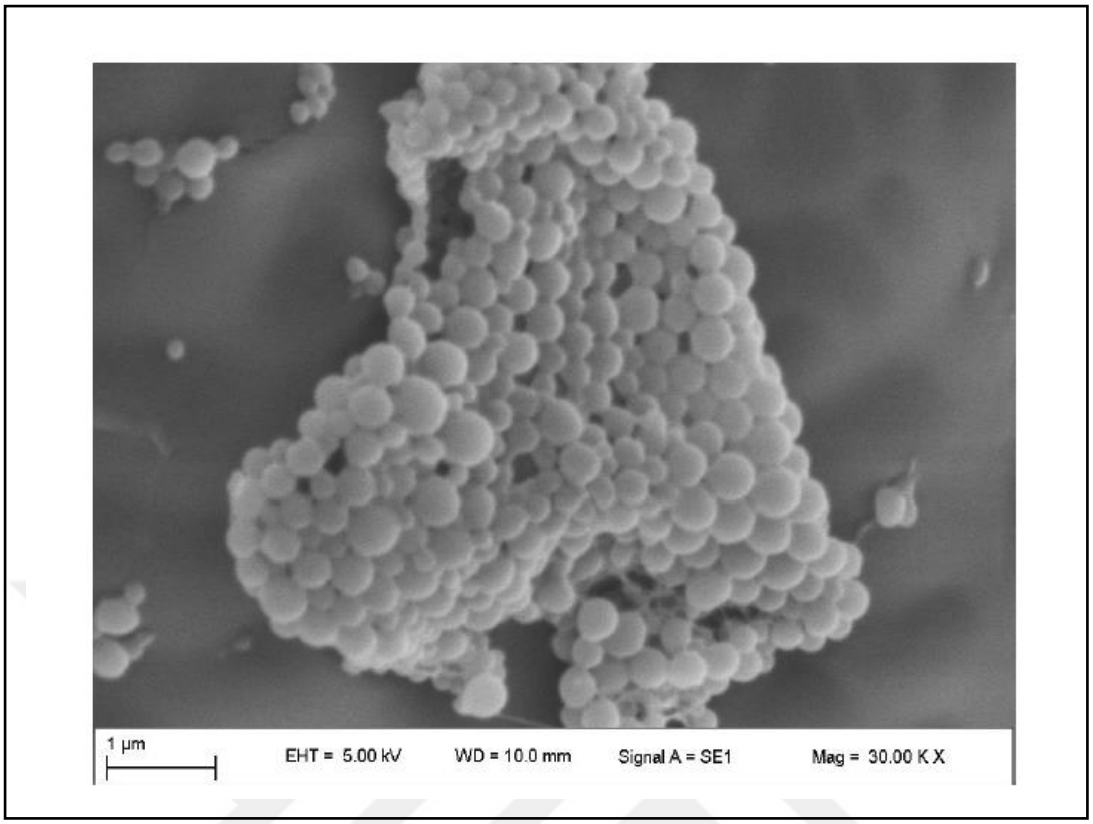
4.1.5 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Antioksidan aktivite etkinliğini araştırma amacıyla üretilen nanopartiküllerin yüzey morfoloji, şekil ve boyut analizleri taramalı elektron mikroskobu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Görüntü analizi öncesinde, nanopartiküllere, altın püskürtültülerek yüzeyi altın ile kaplanmıştır. Bu tabaka yaklaşık olarak 20-30 nm kalınlığındadır. Bu işlemin yapılma sebebi, altın tabakanın elektron demetinin yüzeye nüfuzunda azalma sağlaması ile beraber nanopartiküllerin yüzey morfolojisinin hatasız bir şekilde incelenmesidir. Analiz için Altın metalinin kullanılma sebebi, yüksek ikincil yayılma katsayısı, elektronların ve sıcaklığın yüksek iletkenliği, oksitlenmezlik özelliğine sahip olmasıdır [102], [103]. Yapılan analizler sonucunda K1 nanopartiküllerin x20.000, x30.000 ve x50.000 kat büyütülmüş SEM görüntüleri kaydedilmiştir. Kaydedilen SEM görüntüleri Şekil 4.3-Şekil 4.5'te görülmektedir. Elde edilen görüntüler ile nanopartiküllerin yüzey özellikleri, tanecik şekli ve boyutları değerlendirildiğinde,

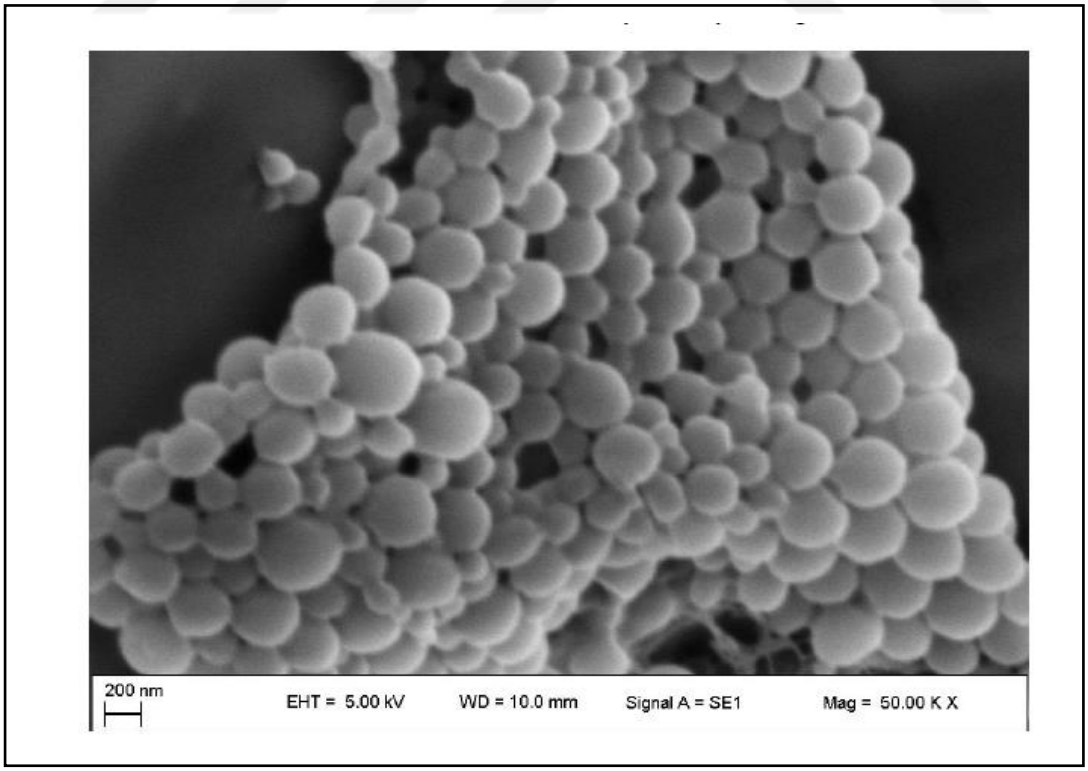
yüzeyde herhangi bir etken madde kalıntısı görülmemektedir. Tanecik şekli hedeflendiği gibi küresel olup, boyut dağılımı düzenli ve homojen görülmektedir.



Şekil 4.3 K1 NP'nin 20.000 kat büyütülmüş SEM görüntüsü



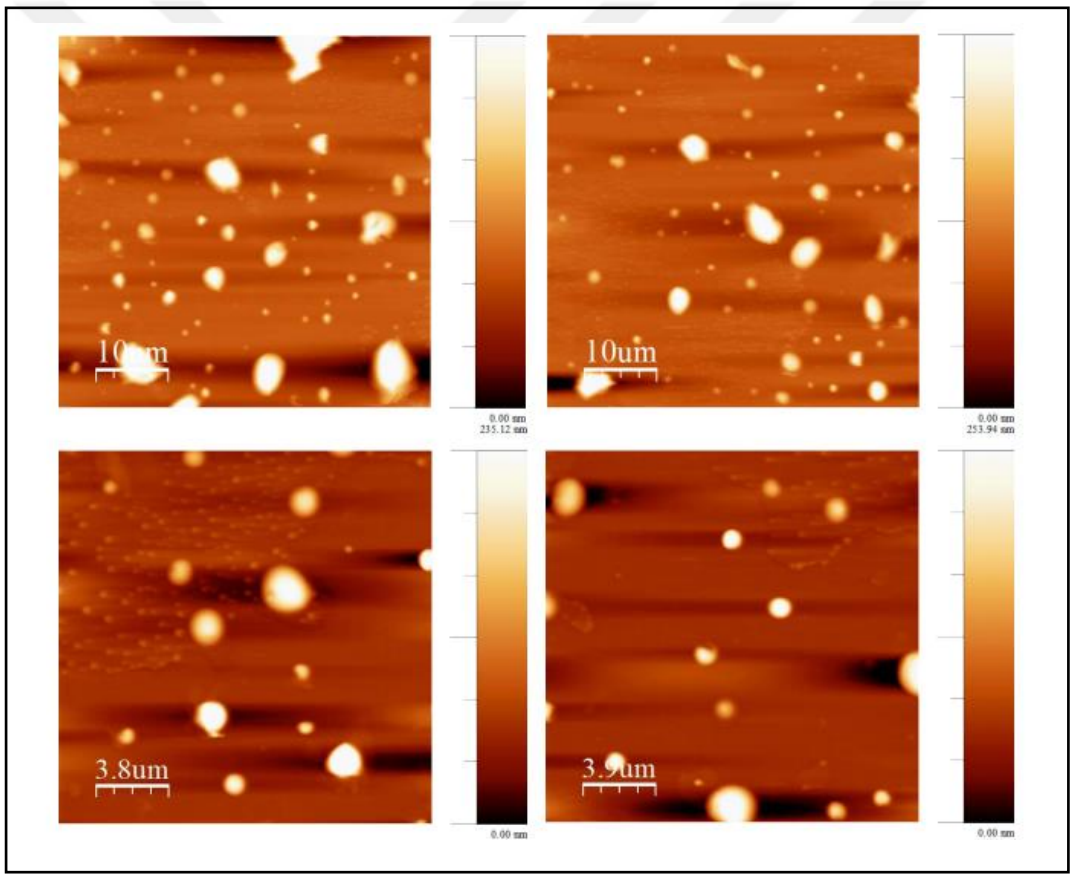
Şekil 4.4 K1 NP ’nin 30.000 kat büyütülmüş SEM görüntüsü



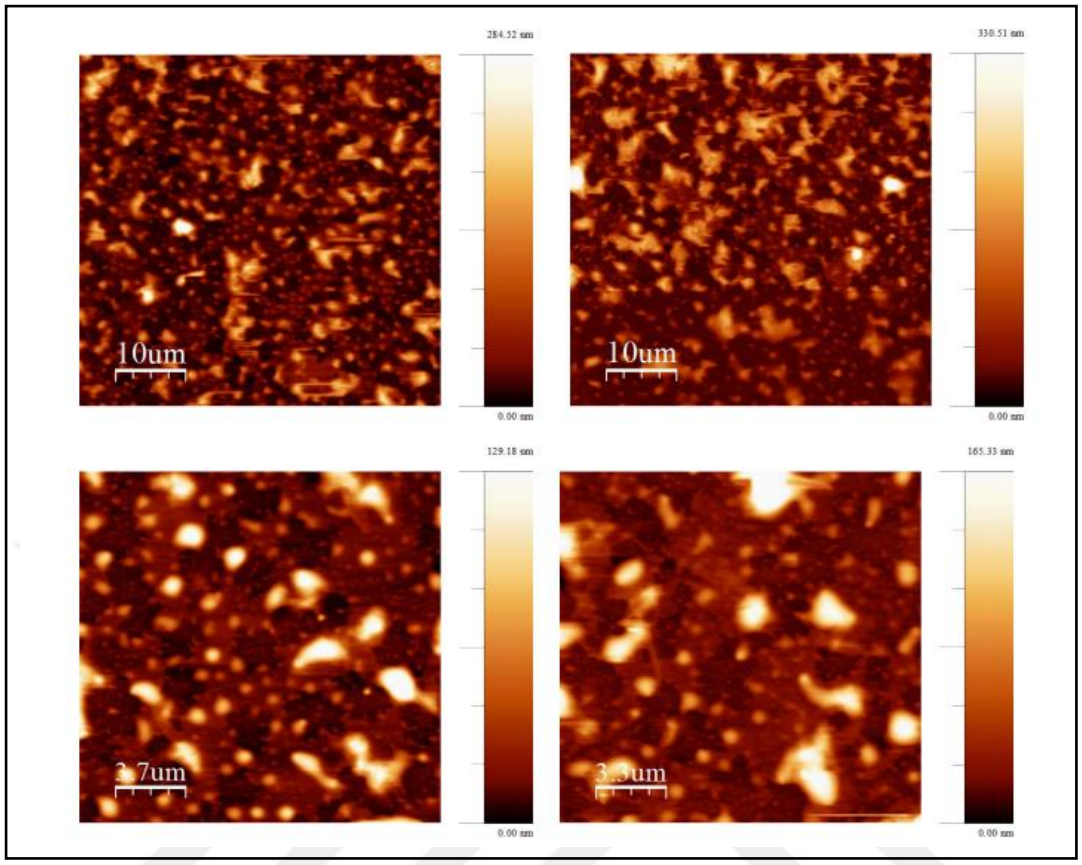
Şekil 4.5 K1 NP ’nin 50.000 kat büyütülmüş SEM görüntüsü

4.1.6 Atomik Güç Mikroskobu Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Nanopartikül boyut analizleri SEM analizline ek olarak atomik güç mikroskobu kullanılarakta gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizler sonucunda nanopartiküllerin boyutları ve yüzey morfolojileri incelenmiştir. Elde edilen AFM görüntüleri Şekil 4.6-Şekil 4.7'de verilmiştir. Nanopartiküllerin boyut ölçü ve dağılımları incelendiğinde 20 mg etken madde yüklenmiş K1 nanopartikül için 20-200 nm, 40 mg etken madde yüklenmiş K2 nanopartikül için 10-300 nm boyutlarında olduğu, K1 nanopartikül için boyut dağılımının homojen olduğu K2 nanopartikülü için ise yoğun bir agregat oluşumu gözlenmiştir.



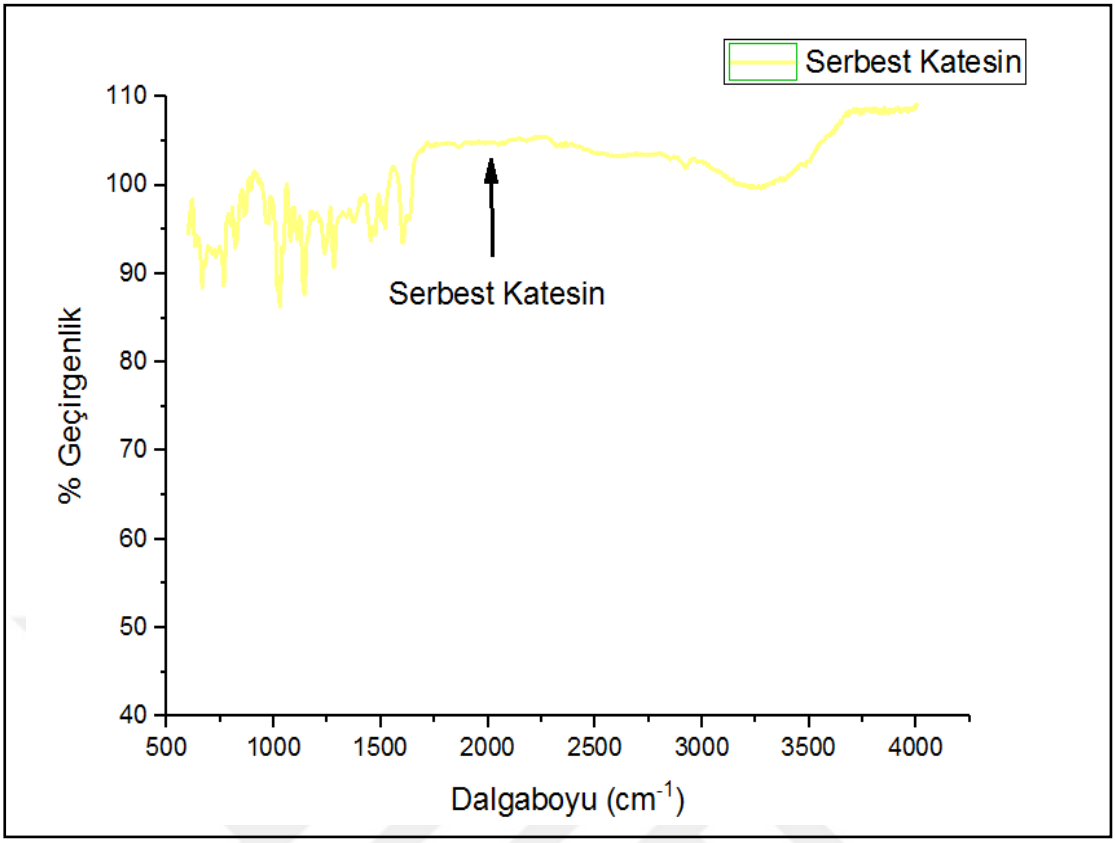
Şekil 4.6 K1 nanopartiküllere ait AFM görüntüsü



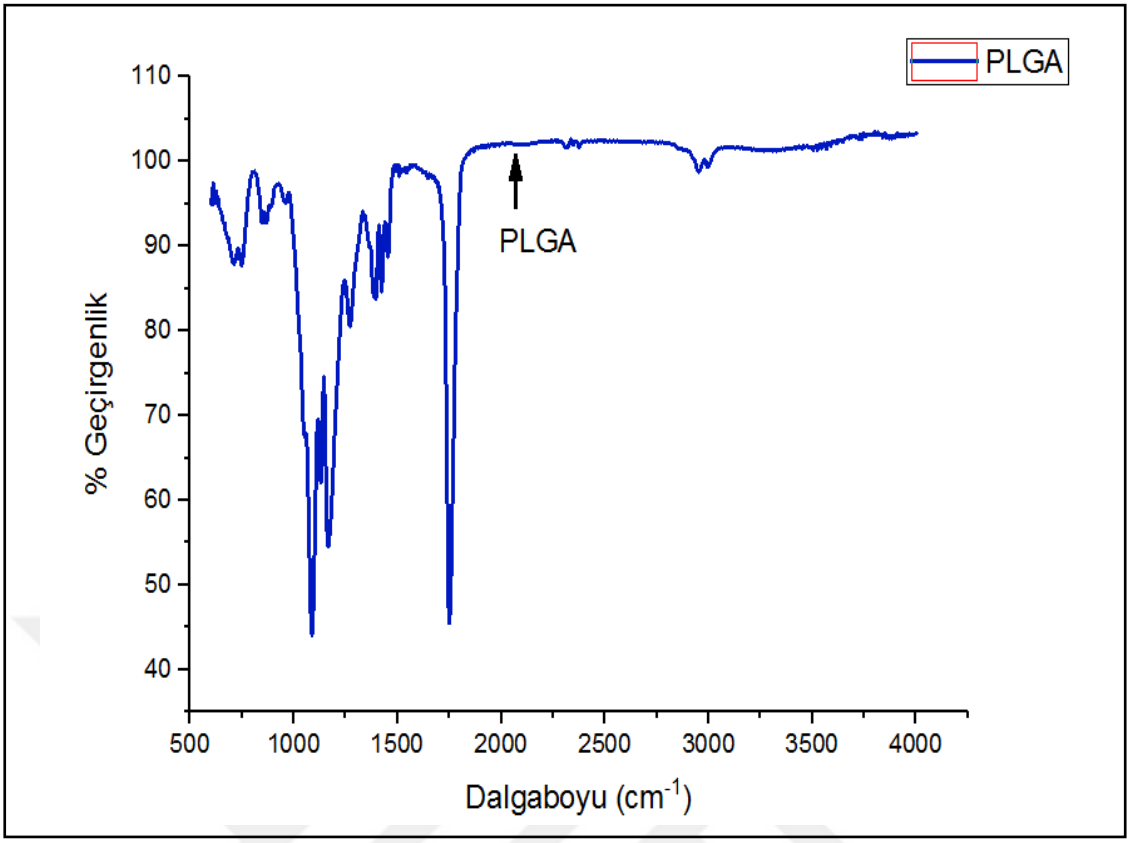
Şekil 4.7 K2 nanopartiküllere ait AFM görüntüsü

4.1.7 Kızılötesi Spektrofotometre Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

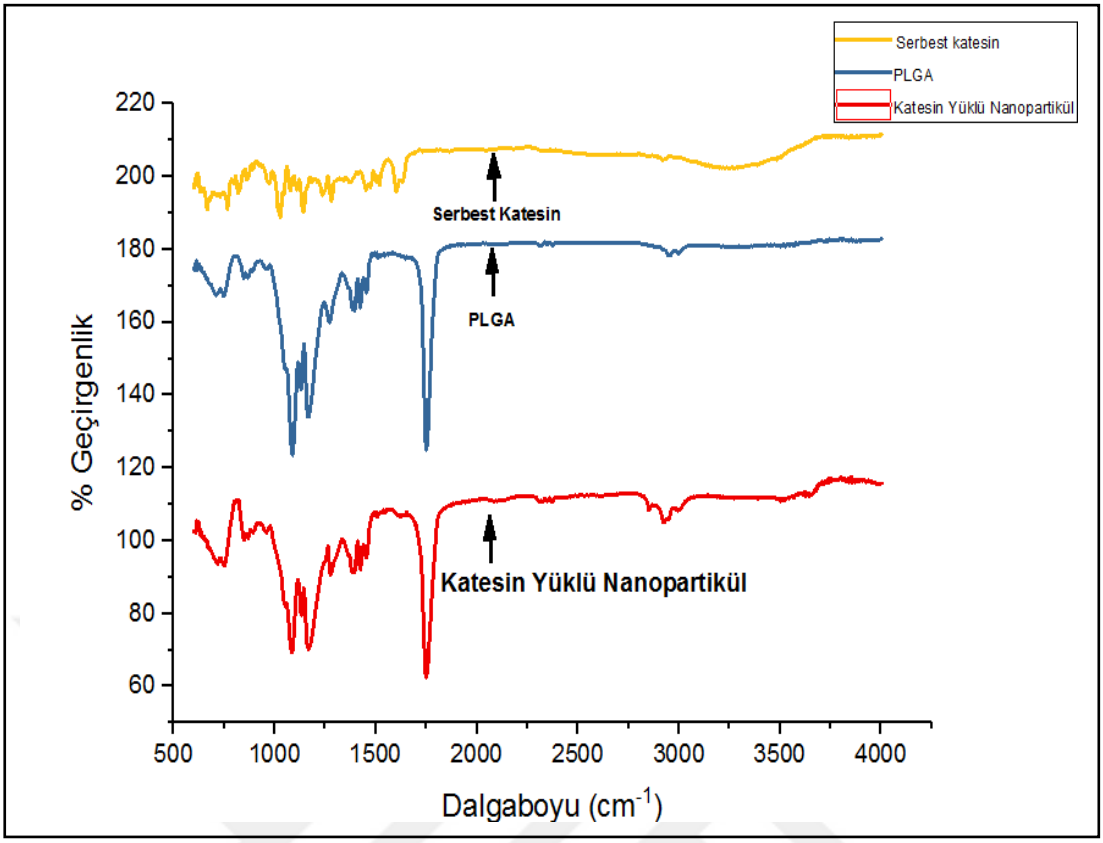
Serbest Kateşin molekülü, PLGA polimeri ve Nanopartiküllerde bulunan fonksiyonel grupların kimyasal analizleri FTIR spektrofotometre cihazı kullanılarak Kızılötesi spektrofotometre yöntemi ile incelenmiştir. Serbest Kateşin molekülü, PLGA polimeri ve nanopartiküllere özgü olan FTIR spektrumları verilmiştir (Şekil 4.8-Şekil 4.11). 965.3, 1020.1, 1144.1, 1285.0, 1474.4, 1514.5,1610.5 cm^{-1} ve 3412.0 cm^{-1}'de daki Serbest Kateşine özgü FTIR spektrumunun nanopartiküllere ait spektrumda görülmediği belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde üretilen nanopartiküllerin yüzeyinde bulunan fonksiyonel grupların PLGA polimeri ile uyumlu pikler verdiği gözlenmiş ve yüzey özelliklerinin PLGA karakteristiğinde olduğu görülmüştür.



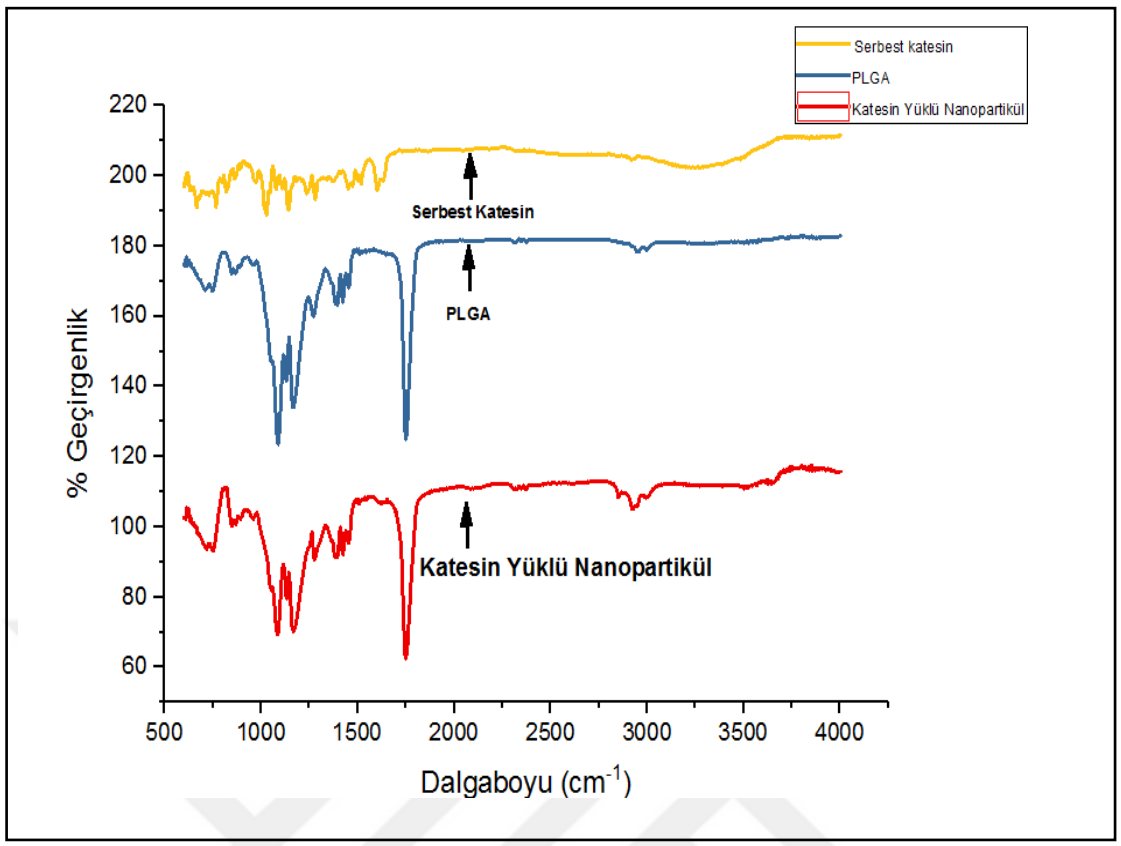
Şekil 4.8 Serbest Kateşine ait FTIR spektrum analizi



Şekil 4.9 PLGA polimerine ait FTIR spektrum analizi



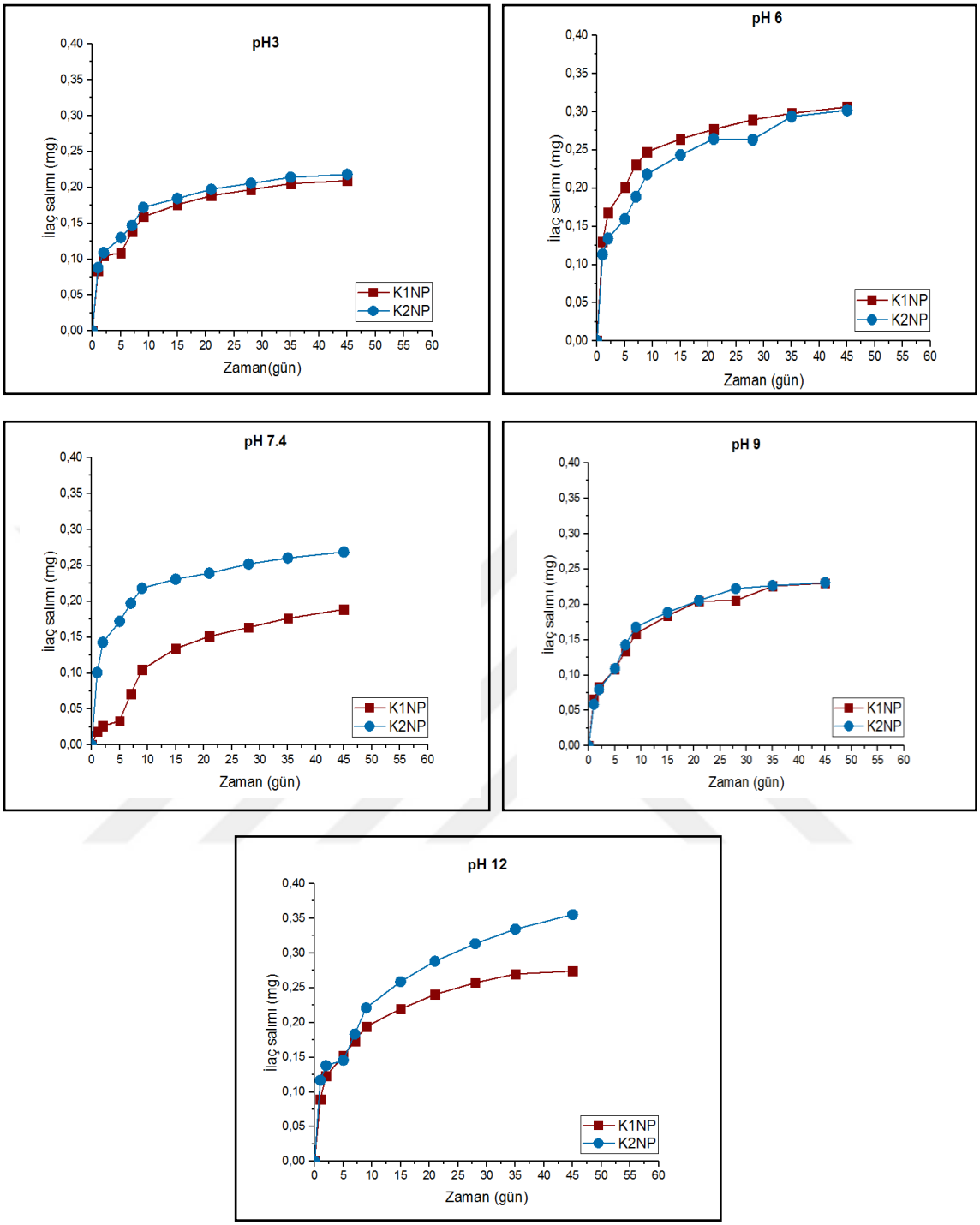
Şekil 4.10 K1 NP'lere ait FTIR spektrum analizi



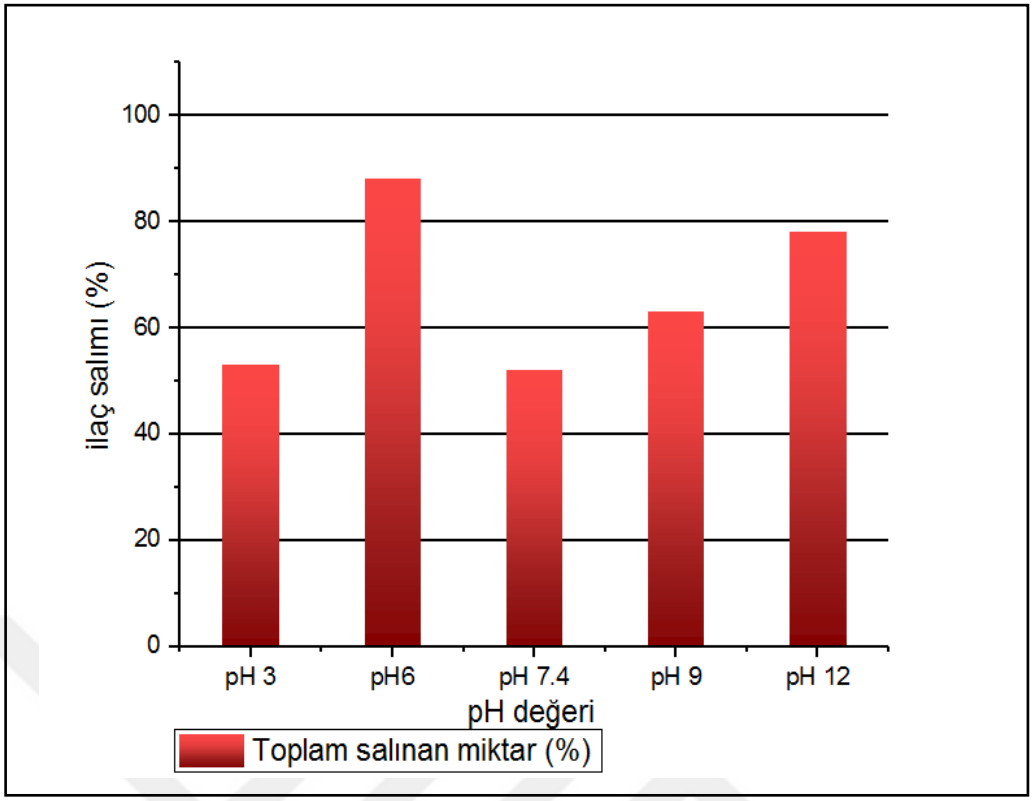
Şekil 4.11 K2 NP'lere ait FTIR spektrum analizi

4.1.8 Kateşin Yüklü Nanopartiküllerin İn Vitro Salımının İncelenmesi

Serbest Kateşin ve Kateşin yüklü nanopartiküllerin salım kinetiği ve stabilitesi pH 3, pH 6, pH 7.4, pH 9 ve pH 12 olmak üzere 5 farklı pH ortamında 45 gün süreyle belirli periyotlarla analiz edilmiştir. Farklı pH ortamlarında etken salım miktarının (mg) zamana bağlı değişiminin gösterildiği grafik Şekil 4.12'de, farklı pH ortamlarının toplam salınan madde miktarı (%) üzerine etkisi Şekil 4.13'de verilmiştir. Farklı pH değerlerine sahip PBS ortamında bekletilen K1NP ve K2NP partiküllerinden salınan Kateşin miktarının farklı pH ortamlarında değiştiği, K1NP'nin K2NP'ye göre daha stabil ve daha kısa sürede fazla miktarda salım gerçekleştirdiği, K1NP'den Kateşinin en fazla miktarda pH 6 ortamında salındığı ve yaklaşık olarak 45 gün süre ile nanopartikülden salımının gerçekleştiği gözlenmiştir.



Şekil 4.12 Farklı pH ortamlarında etken salım miktarının(mg) zamana bağlı değişimi

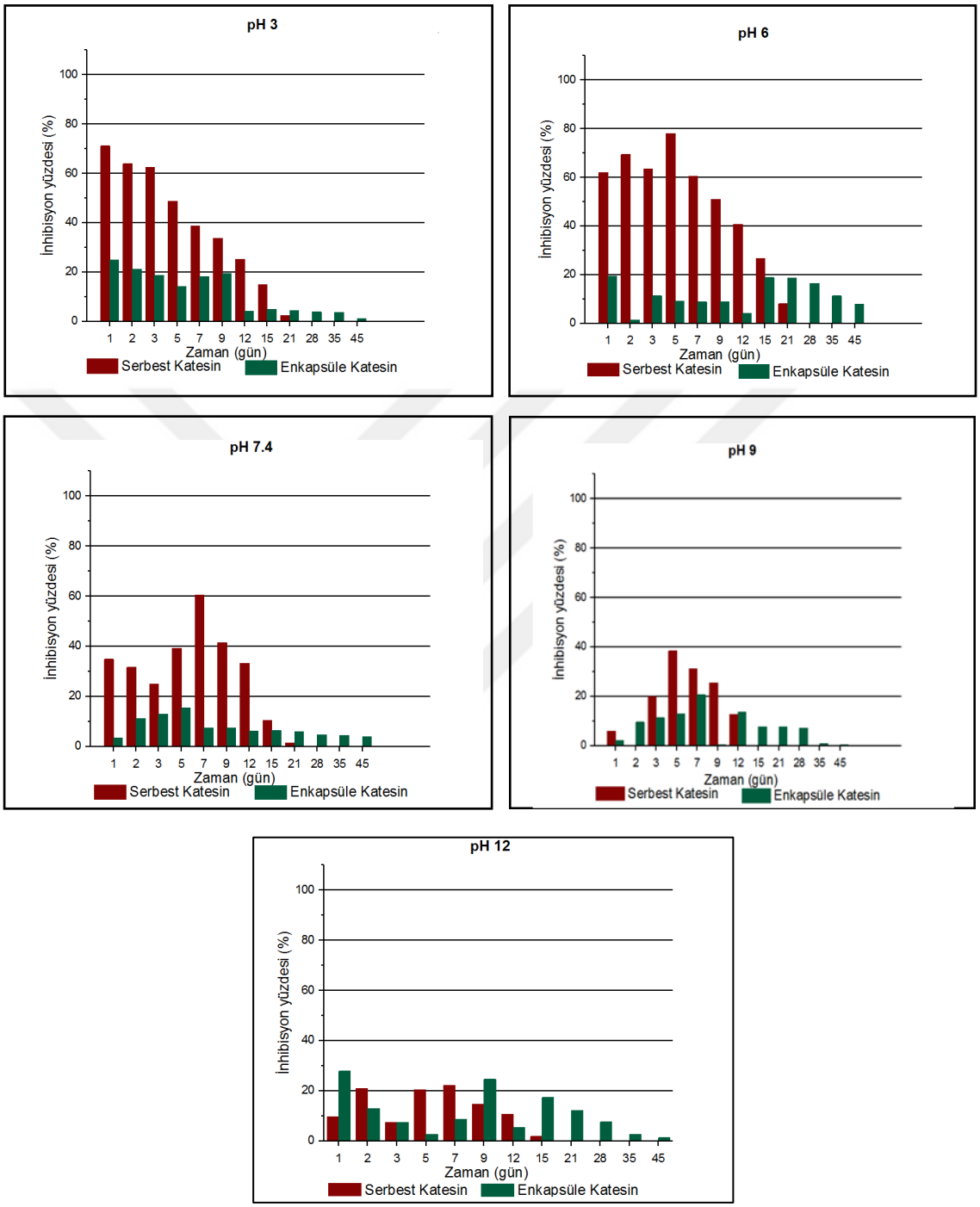


Şekil 4.13 Farklı pH ortamlarında nanopartikülden toplam salınan madde miktarı (%)

4.1.9 Kateşin yüklü Nanopartiküllerin DPPH metodu ile Antioksidan Etkinliğinin İncelenmesi

Nanopartiküllerin antioksidan etkinliğini analiz etmek için, DPPH metodundan yararlanılmıştır. Nanopartiküllerin inhibisyon yüzdeleri (3.4) kullanılarak hesaplanmıştır. Antioksidan etkinliği analiz etmek için farklı pH değerine sahip PBS ortamına konmuş serbest ve enkapsüle edilmiş Kateşin maddesinin santrifüj ile çöktürme işleminden sonra toplanan üst fazları kullanılmıştır. Bu işlem 45 gün boyunca belirli periyotlar ile yapılmıştır. Üst fazda bulunan serbest Kateşin maddesinin farklı pH ortamlarında 12-21. gün arasında değişen süre itibariyle PBS ortamında degrade olması ve tükenmesi sebebi ile antioksidan etkinlik göstermediği gözlenmiştir. Diğer taraftan enkapsüle edilen Kateşin maddesinin tüm pH ortamlarında ortalama 45 gün boyunca düşük miktarlarda salındığı ve üst fazda düşük konsantrasyonlarda bulunduğu ve antioksidan etkinliğini sürdürdüğü gözlenmiştir. Elde edilen veriler karşılaştırıldığında, Serbest Kateşin maddesinin pH 3; 21 gün-pH 6; 21gün-pH 7.4; 21 gün-pH 9; 12 gün- pH 12; 15 gün boyunca azalarak antioksidan etkinliğini sürdürdüğü, Kateşin yüklü nanopartiküllerin

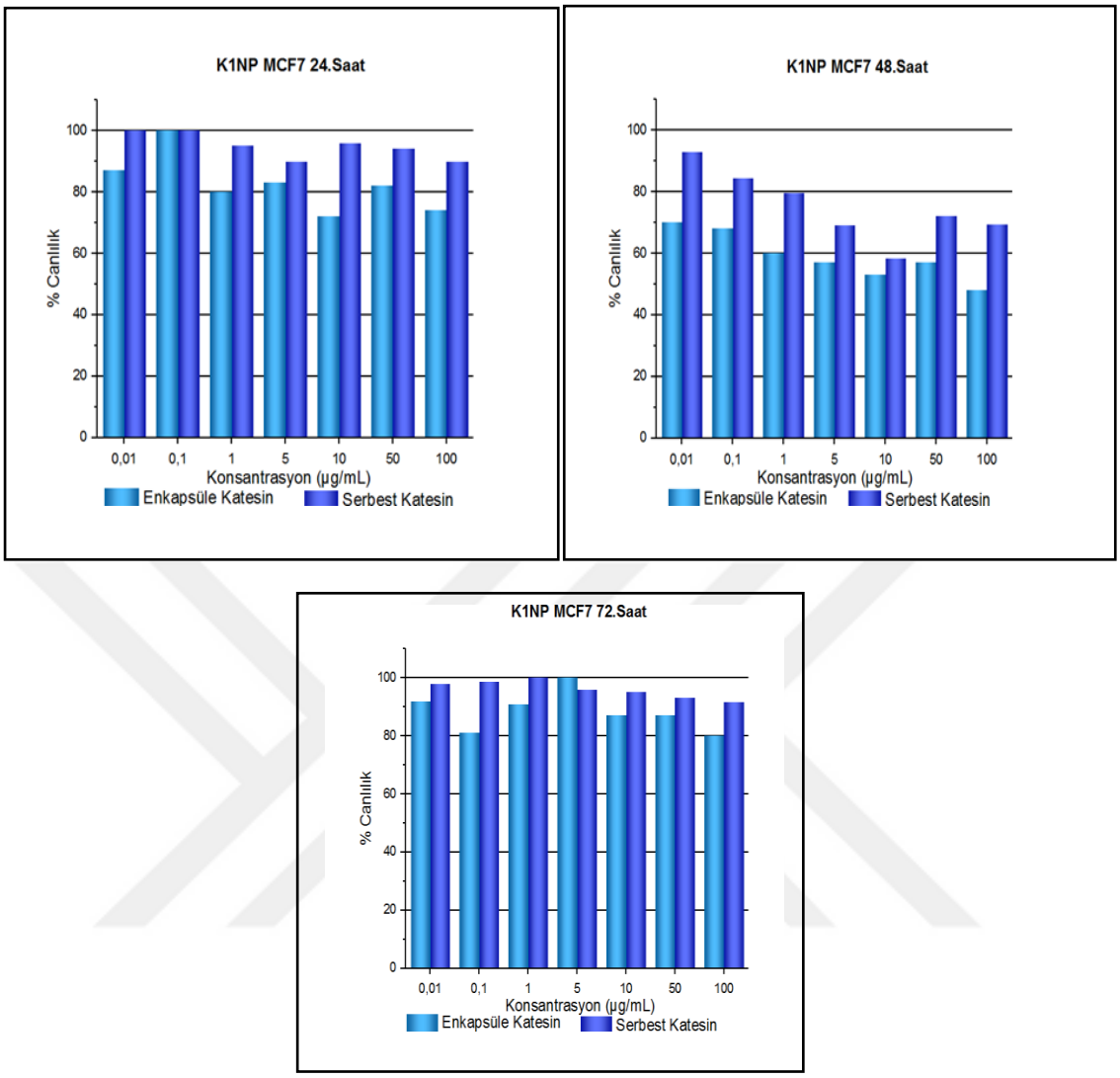
radikal süpürücü etkinliğini 45 gün süre boyunca azalarak sürdürdüğü gözlenmiştir (Şekil 4.14).



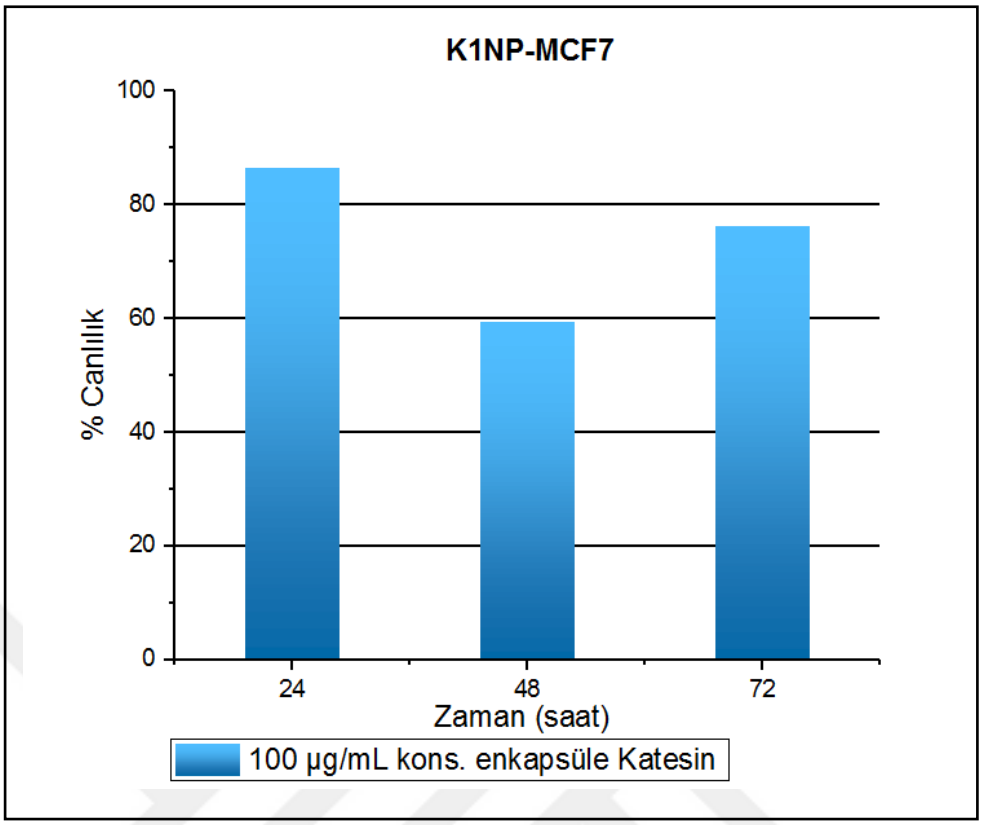
Şekil 4.14 Farklı pH ortamlarında Kateşinin enkapsüle ve serbest formlarının antioksidan aktivite etkinliklerinin karşılaştırmalı olarak gösterimi

4.1.10 Kateşin Yüklü Nanopartiküllerin MTT testi ile MCF7 ve Glioma Hücre Soyları Üzerine Anti Kanser Etkinliğinin İncelenmesi

Kateşin yüklü nanopartiküllerin MCF7 ve C6 Glioma hücre soyları üzerine antikanser etkinliği, yapılan MTT analizi ile (3.5) eşitliği yardımıyla belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan canlı hücrelerin mitokondri organeli MTT tetrazolyum bileşenini indirgemiş ve formazan kristallerine dönüştürmüştür. Oluşan bu kristaller çözündükten sonra meydana gelen mor renkli çözeltinin absorbans değeri belirlenmiştir. Elde edilen absorbans değerleri, üremesini, dolayısıyla canlılığı devam eden hücre miktarı ile doğru orantılı olduğu gözlenmiştir. Şekil 4.15-Şekil 4.18' de Kateşin yüklü nanopartiküllerin farklı konsantrasyonlarda (0,01-0,1-1-5-10-50-100-200 µg/mL) MCF7 ve C6 Glioma hücreleri ile yapılan anti kanser etkinliği testlerinde 24-48-72. saatlik izleme sonucunda elde edilen hücre canlılık oranlarının uygulanan konsantrasyon aralığına karşı grafikleri verilmiştir. Elde edilen grafikler ile yapılan hesaplama sonucu Çizelge 4.2 ve 4.3' de verilen IC50 sonuçları elde edilmiştir. Şekil 4.15-Şekil 4.18'de Kateşin yüklü nanopartiküllerin MCF7 ve C6 Glioma hücre soyları üzerine antikanser etki grafikleri incelendiğinde Kateşin molekülünün polimer bir membran ile kaplanarak enkapsüle edilmesininin MCF7 ve Glioma hücre soyları üzerine antikanser etkisini arttırdığı görülmektedir. Kateşin yüklü nanopartikül-MCF7 hücre soyu grafiklerine bakıldığında konsantrasyon artışı ile birlikte hücre canlılık oranında anlamlı bir azalma gözlenmektedir. Kateşin yüklü nanopartikül-C6 Glioma hücre soyu grafiklerine bakıldığında ise Kateşin nanopartiküllerin sadece 24.saatte ve azalarak 48.saatte hücre canlılık oranında anlamlı bir etki gösterdiği 72.saatte ise herhangi bir etkinlik göstermediği görülmüştür. Serbest Kateşin maddesi ise hızlı bir şekilde biyodegrade olması ve ortam koşullarından etkilenmesi sebebiyle güçlü bir antioksidan madde olmasına rağmen antikanser etkinlik gösterememiştir. Aynı zamanda degrade olması sebebiyle serbest Kateşinin sitotoksik etkiye sahip olmadığı görülmüştür.



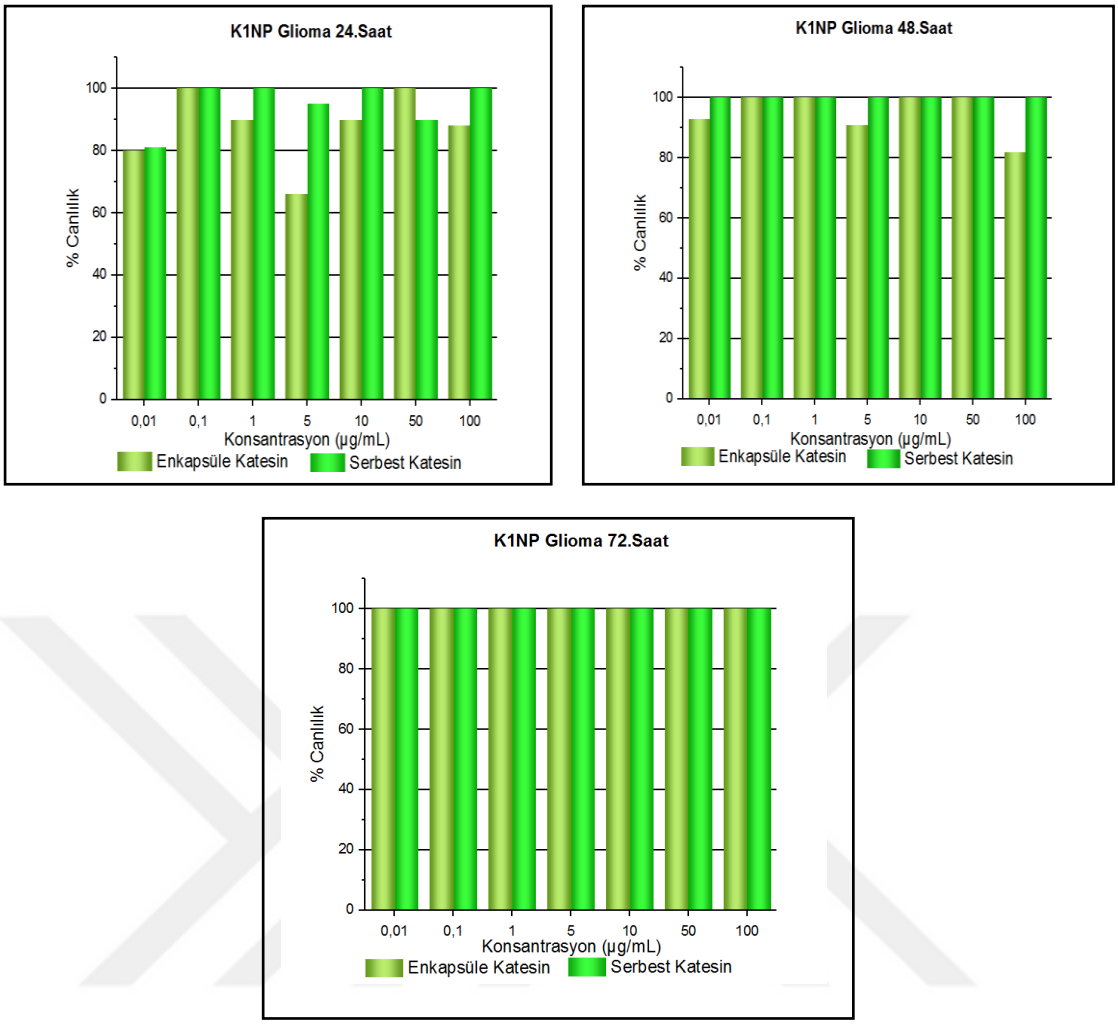
Şekil 4.15 Farklı konsantrasyonlarda serbest Kateşin ve enkapsüle Kateşin maddesinin MCF7 hücre soyu üzerine 24-48-72.saat karşılaştırmalı % canlılık-konsantrasyon sonuç grafiği



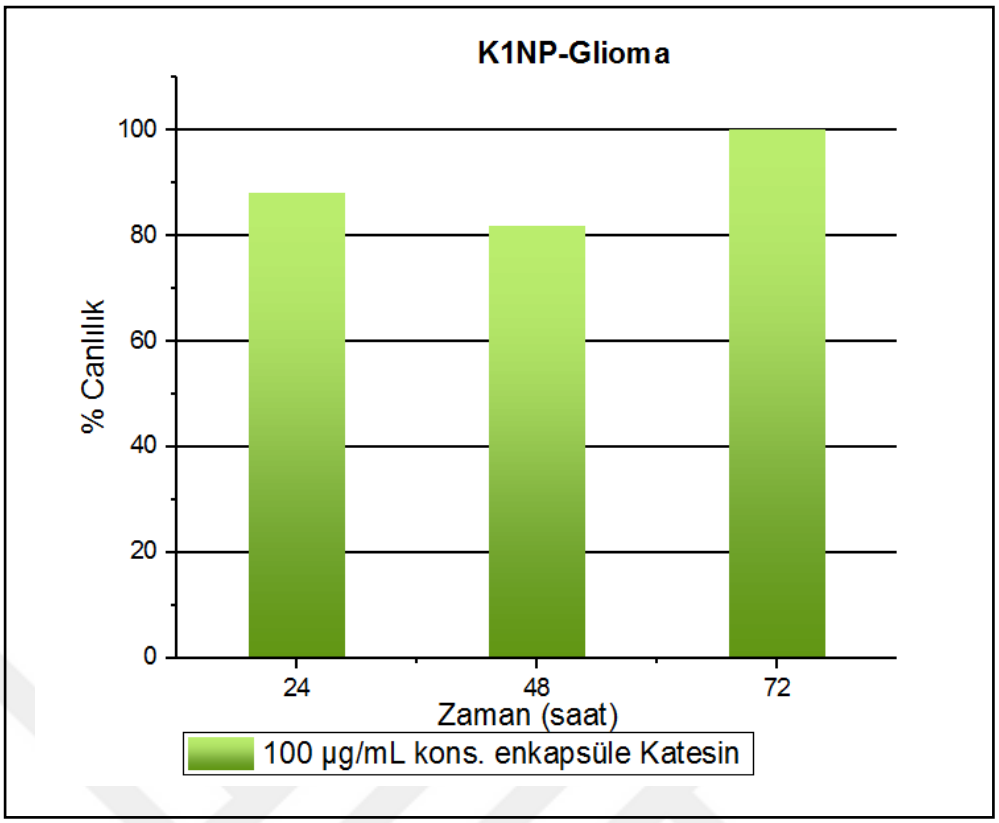
Şekil 4.16 100 µg/mL konsantrasyon enkapsüle Kateşin maddesinin MCF7 hücre soyu üzerine 24-48-72.saat karşılaştırmalı % canlılık sonuç grafiği

Çizelge 4.2 K1NP ve K2NP'nin MCF7 hücre soyları için IC50 oranları

Hücre Hattı / IC50	**Serbest Kateşin IC50**	**K1 Kateşin NP IC50**	**K2 Kateşin IC50**
MCF7	180 µg/ml	140 µg/ml	105 µg/ml



Şekil 4.17 Farklı konsantrasyonlarda serbest Kateşin ve enkapsüle Kateşin maddesinin Glioma hücre soyu üzerine 24-48-72.saat karşılaştırmalı % canlılık-konsantrasyon sonuç grafiği



Şekil 4.18 100 µg/mL konsantrasyon enkapsüle Kateşin maddesinin Glioma hücre soyu üzerine 24-48-72.saat karşılaştırmalı % canlılık sonuç grafiği

Çizelge 4.3 K1NP ve K2NP'nin Glioma hücre soyları çin IC50 oranları

Hücre Hattı / IC50	**Serbest Kateşin IC50**	**K1 Kateşin NP IC50**	**K2 Kateşin IC50**
Glioma(C6)	180 µg/ml	120 µg/ml	80 µg/ml

BÖLÜM 5

SONUÇ VE ÖNERİLER

- Bu tez kapsamında Kateşin maddesinin antioksidan ve antikanser etkinliğini arttırmak üzere nanopartiküler formülasyon geliştirilmiştir.
- Nanopartikül formülasyonlarının geliştirilmesinde 2 farklı konsantrasyon kullanılmış ve ön konsantrasyon çalışmaları ile en uygun konsantrasyon belirlenmiştir.
- Enkapsülasyon etkinliği çalışmaları sonucunda K1NP ve K2NP'nin 10% enkapsülasyon etkinliğine sahip olduğu gözlenmiştir.
- Nanopartikül formülasyon çalışmaları ile madde konsantrasyon parametresinin formülasyonların partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel değerlerini değiştirirken enkapsülasyon etkinliği üzerine bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir.
- Taramalı elektron mikroskobu görüntülemeleri sonucu K2NP' ile karşılaştırıldığında, K1NP'nin dairesel ve düzgün bir yapıya sahip olduğu tespit edilmiştir.
- Yaptığımız çalışmada, K1NP ve K2NP'nin kontrollü bir ilaç salım profili gösterdikleri, K1NP'nin tüm pH değerlerinde taşıdığı Kateşin maddesini 45 gün süre ile saldığı, farklı pH değerlerinde salım yaptığı toplam madde miktarı karşılaştırıldığında en yüksek madde miktarının pH 6 ortamında olduğu gözlemlenmiştir. Düşük pH ortamlarında daha stabil bir salım reaksiyonu gözlemlenirken yüksek pH değerlerine doğru gidildikçe daha heterojen dağılımı olan bir salım reaksiyonu gözlenmiştir. 45 gün sürdürülen salım reaksiyonları ile partikül stabilitesi ve etkinliği çalışmalarında K1NP'nin 45 gün boyunca herhangi bir agregasyon oluşturmadan stabil bir şekilde kaldığı gözlenirken ve K2NP nanopartiküllerin elde edilen AFM görüntüleri, salım

reaksiyonları ve antioksidan etkinlik analizleri sonuçları değerlendirildiğinde agregasyon oluşturduğu ve etken maddenin kontrollü bir şekilde salınmadığı ve biyolojik etkisini göstermediği gözlenmiştir. K2NP'nin agregasyon oluşturması ve farmakokinetik özellik göstermemesinin nedeni her etken madde için maksimum yüklenme oranı olmasıdır. Bu oran etken madde /polimer konsantrasyonuna bağlı olarak değişmektedir. Genellikle tüm etken maddeler için 10-20% 'dir. Silva vd. [104] de yaptıkları çalışmada, PBS ortamında PLGA'nın bozulma oranının 19. günden 28. güne kadar belirgin şekilde arttığını, bununla birlikte ortam sıcaklığına bağlı olarak polimer degredasyonun 40-55 gün sürdüğünü ortamın pH değerinin kopolimer degredasyonu üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu gözlemlemişlerdir. Elde ettikleri sonuçları değerlendirdiklerinde pH değeri azalmasıyla birlikte hızlanmış degredasyon süreci ve pH'ya bağlı polimer degredasyonunun ilaç salım sistemleri için yararlı olabileceğini tespit etmişlerdir. Zolnik ve Burgess [105] te yaptıkları çalışmada, PLGA polimerinin pH 2.4'te pH 7.4'teki degredasyonundan daha homojen bir şekilde meydana geldiğini, bunun sebebinin yüksek pH değerlerinde inkübe edilen asidik PLGA polimerinin gözenekli porlar oluşturarak düzensiz heterojen bir degredasyon mekanizması ile bozunduğunu gözlemlemişlerdir. pH 2.4'te ilaç salınımının% 80'ine ulaşma zamanı, 52 gün iken pH 7.4'te 84 gün olduğunu bildirmişlerdir.

- Nanopartiküler formülasyonların antioksidan etkinlik analizleri, DPPH yöntemi ile Kateşinin K1 ve K2 enkapsüle formlarının serbest formu ile farklı pH ortamlarında karşılaştırılmış, elde edilen sonuçlar Serbest Kateşinin farklı pH ortamlarında değişkenlik göstermekle beraber 15.gün itibari ile ortamda maddeninin biyodegrade olarak bozunması sonucu etkinliğini kaybettiğini gösterirken K1NP'nin in vitro tüm pH ortamlarında antioksidan etkinliğini 45 gün boyunca sürdürdüğü gözlenmiştir. 45 günlük periyotta azalan artan bir antioksidan etkinlik göstermesinin bazı konsantrasyon aralıklarında ve pH ortamlarında prooksidan özellik göstermesi olduğu düşünülmektedir.
- Çalışmamızda kullandığımız (+) - Kateşin Hidrat 5 hidroksil grubu içerir. Antioksidan etkinliğini ROS ile doğrudan bağlanarak ya da oksidasyon sırasında lipid peroksidasyonunu sınırlayarak ortadan kaldırarak göstermektedir. Birçok avantajlı özelliği olmasına rağmen, asidik ortamda stabil olduğu görülürken pH 7.4'teki kan ve

vücut sıvısı içerisinda stabil olmadığı gözlenmiştir [106]. Kateşin antioksidan özelliğinin yanı sıra prooksidan özellikte göstermektedir. Kateşinin prooksidan özelliği üzerine yapılan bir çalışmada, bir antioksidan olarak hareket etmesinin yanı sıra, düşük konsantrasyonlarda Hemoglobin-H_2O_2 kaynaklı protein oksidasyonunda bir prooksidan aktivitesi sergilediği, konsantrasyonun artması ile birlikte antioksidan etkinlik gösterdiği rapor edilmiştir [107].

- Kateşinin terapötik etkinliği üzerine yapılan çalışmalar çay Kateşininin oral biyoyararlanımı ve antitümör etkilerini iyileştirmek için sindirim sisteminde stabilize edilmesine yönelik yöntemlerin geliştirilmesi gerekliliğini ortaya çıkarmıştır. Bu probleme yönelik çözüm olarak geliştirilen nanopartiküler sistem ile yaptığımız bu çalışmada, MCF7 hücre soyları üzerine MTT yöntemi ile yapılan hücre kültürü çalışmaları ile K1NP'nin % 10 gibi düşük bir enkapsülasyon verimi ile serbest Kateşin molekülüne göre MCF7 hücre soyları üzerine 72 saat süre ile çok daha yüksek antikanser etki gösterdiği ve meme kanseri tümör hücrelerinin (MCF7) ölümüne neden olduğu gözlenmiştir. Yapılan çalışmalarda, kanser hücre kolonilerinin inhibisyonu ve canlılığını azaltmak yanı sıra apoptozu indüklemek için etkili serbest Kateşin miktarından 10 kat düşük dozda Kateşin yüklü PLGA nanopartikülü kullanılmış ve 10 kat düşük dozla prostat tümör gelişiminde önemli bir azalma kaydedilmiştir [108]. Kateşin maddesinin meme kanseri üzerine etkilerinin araştırıldığı birçok çalışmada, yeşil çay polifenolleri yaygın olarak araştırılmış ve yeşil çay tüketimi ile kanser insidansı ve mortalite riski arasındaki ilişkiyi değerlendiren 1.6 milyon katılımcıyla 51 prospektif kontrollü girişimsel ve gözlemsel çalışma yapılmıştır. Bu çalışma ve diğer birçok çalışmada elde edilen sonuçlar Kateşinin MCF7 hücre soyu ile beraber birçok meme kanseri hücre soylarına karşı antikanser etkinliğe sahip olduğunu göstermektedir [109], [110], [111], [112], [113], [114], [115]. Bununla birlikte başka bir çalışmada, Kateşinin östrojene duyarlı MCF-7 meme kanseri hücre hattının proliferasyonunu inhibe ederek etki gösterdiği ve antiproliferatif etkinliği östrojen reseptörleri vasıtasıyla gösterdiği gözlemlenmiştir [116].

- C6 Glioma hücre soyları üzerine MTT yöntemi ile yapılan hücre kültürü çalışmalarında ise K1NP'nin % 10 gibi düşük bir enkapsülasyon verimi ile serbest Kateşin molekülüne göre C6 Glioma hücre soyları üzerine ilk 48 saat süre ile antikanser etki gösterirken

48.saate azalan bir etki gösterip 72.saatte yapılan analizlerde serbest formuna göre anlamlı bir etki göstermediği tespit edilmiştir. Beyin kanseri tümör hücrelerinin (C6 Glioma) ilk 48 saatte ölümüne neden olurken 72.saatte herhangi bir etkinlik gözlenmemiştir. Kateşin yüklü nanopartiküllerin C6 Glioma hücre soyu üzerinde anlamlı bir etkinlik gösterememesinin sebebi C6 glioma hücre soyunun agresif yayılım göstermesi ve enkapsüle Kateşin miktarının 24. ve 48. saatte hücre çoğalmasına tesir ederken, 72. saatteki hücre çoğalmasını tesir edemeyecek konsantrasyonda kalmasıdır. Glioma, insanda en iyi vaskülerize olan tümördür ve farklı hücre yolaklarını kullanıyor olması gliomayı agresif bir tümör olma özelliğini kazandırmaktadır. Bu sebeple Glioma mevcut tedavilere oldukça dirençli bir tümör çeşididir. Tez çalışmaları kapsamında kullanılan C6 Glioma hücre soyu yüksek derecede invasyon göstermesi Gliomayı iyi temsil eden bir model olmasını sağlamıştır [117].

- K2NP formülasyonu ise K1NP'lerine göre daha fazla etken madde içermesine rağmen MCF7 ve C6 Glioma hücre soyları üzerine herhangi bir anlamlı antikanser etki göstermemiştir. Bunun sebebinin nanopartikül içerisine yüklenen madde miktarı arttıkça agregasyon artışı gözlenmesi ve herhangi bir pH ortamında çözünmez kompleksler oluşturması olduğu düşünülmektedir.
- İn vitro antioksidan ve antikanser etkinlik çalışmaları sonucunda K1 nanopartikül formülasyonunun Kateşin'nin etkisini artırdığı ve MCF7 hücre soyları üzerinde 72 saaat süre ile etkili olduğu görülürken C6 Glioma hücre soyları üzerine sadece ilk 48 saatte anlamlı bir etki gösterdiği görülmüştür.

Yapılan bu çalışmadan elde edilen bulgu ve sonuçların değerlendirilmesi, başta kanser olmak üzere vücudumuzda birçok hastalığa neden olduğu bilinen serbest radikallerin zararlı etkisini ortadan kaldıracak aynı zamanda meme, beyin kanser tedavisinde kullanılacak yeni nesil ilaç ve tedavi ajanlarının geliştirilmesine, bunun sonucunda terapötik yeni açılımların oluşumuna katkıda bulunabilecektir. Bu sebeple antioksidan ve antikanser etkinliği olan doğal bileşiklerin tedavi amaçlı ilaç olarak geliştirilmesi ve kullanılması önem arzetmektedir.

Çalışmamızdan elde edilebilecek çıkarımları özetlediğimizde ise;

Farklı polimerik nanomalzemeler ile sentezlenen Kateşin yüklü NP'lerin kanser hücre soylarına etkisi üzerine yapılan çalışmalarda, enkapsüle edilmiş Kateşin ile serbest formları karşılaştırılmıştır. Enkapsüle Kateşinin polimer matrisi içine yüklenmesinin farmakokinetiğini ve farmakodinamik özelliklerini geliştirdiği gözlenmiştir ayrıca bu çalışmalarda elde edilen sonuçlar, çalışmamızda elde ettiğimiz morfolojik ve biyokimyasal bulgular ile karşılaştırıldığında sonuçlarımızı desteklemektedir. [118], [119], [120], [121], [122], [123]. Bizim çalışmamız, güçlü antioksidan ve antikanser özelliğe sahip düşük biyoyararlanım gösteren doğal bileşiklerin terapötik ve hastalık önleyici etkisinin artırılması ile serbest radikallerin zararlı etkisinin bertaraf edilmesi, DNA hasarlarının önlenmesi ve birtakım ilaç dirençlerinin gelişiminin ortadan kaldırılmasında etkili olabilecek ve kanser tedavisinde düşük yan etkilere sahip yeni terapötik ajanların geliştirilmesine katkıda bulunabilecektir. Ayrıca, mevcut nanopartiküler sistemlerde düşük enkapsülasyon verimine sahip hidrofilik ve amfifilik özelliğe sahip doğal bileşiklerin daha yüksek enkapsülasyon verimi ile üretilebilecek nanopartiküler sistemlerin geliştirilmesine imkan veren yeni formülasyonlar sağlayacak ve yapılacak olan daha detaylı çalışmalara kaynak teşkil edecektir.

KAYNAKLAR

[1] Deusing, D.J. Winter, S. Kler, A. Kriesl, E. Bonnländer, B. Wenzel, U. ve Fitzenberger, E., (2015). "A Catechin-Enriched Green Tea Extract Prevents Glucose-İnduced Survival Reduction İn Caenorhabditis Elegans Through Sir-2.1 and Uba-1 Dependent Hormesis", Fitoterapia, 102: 163-170.

[2] Moore, R.J. Jackson, K.G. ve Minihane, A.M., (2009). "Green Tea (Camellia Sinensis) Catechins and Vascular Function", British Journal Of Nutrition, 102: 1790-1802.

[3] Babu, A. Pon, V. ve Liu, D., (2008). "Green Tea Catechins and Cardiovascular Health: An Update", Current Medicinal Chemistry, 15: 1840-1850.

[4] Crespy, V. ve Williamson, G., (2004). "A Review Of The Health Effects Of Green Tea Catechins İn İn Vivo Animal Models", The Journal Of Nutrition, 134: 3431S-3440S.

[5] Liu, M. Zheng, Y. Wang, C. Xie, J. Wang, B. Wang, Z. Han, J. Sun, D. ve Niu, M., (2016). "Improved Stability Of (+)-Catechin and (−)-Epicatechin By Complexing With Hydroxypropyl-B-Cyclodextrin: Effect Of Ph, Temperature and Configuration", Food Chemistry, 196: 148-154.

[6] Ramazani, F. Chen, W. Van Nostrum, C.F. Storm, G. Kiessling, F. Lammers, T. Hennink, W.E. ve Kok, R.J., (2016). "Strategies For Encapsulation Of Small Hydrophilic and Amphiphilic Drugs İn PLGA Microspheres: State-Of-The-Art and Challenges", International Journal Of Pharmaceutics, 499: 358-367.

[7] Sandhir, R. Yadav, A. Sunkaria, A. ve Singhal, N., (2015). "Nano-Antioxidants: An Emerging Strategy For İntervention Against Neurodegenerative Conditions", Neurochemistry İnternational, 89: 209-226.

[8] Moritz, M. ve Geszke-Moritz, M., (2015). "Recent Developments İn The Application Of Polymeric Nanoparticles As Drug Carriers", Adv Clin Exp Med, 24: 749-758.

[9] Mukherjee, A., (2015). "Nanoencapsulated Polymeric Antioxidants İn Combating Neuronal Oxidative Damage", Austin J Mult Scler & Neuroimmunol, 2: 1015.

[10] Pillai, O. ve Panchagnula, R., (2001). "Polymers İn Drug Delivery", Current Opinion İn Chemical Biology, 5: 447-451.

[11] Zhou, Y.Z. Alany, R.G. Chuang, V. ve Wen, J., (2013). "Optimization Of PLGA Nanoparticles Formulation Containing L-DOPA By Applying The Central Composite Design", Drug Development and İndustrial Pharmacy, 39: 321-330.

[12] Srivastava, A.K. Bhatnagar, P. Singh, M. Mishra, S. Kumar, P. Shukla, Y. ve Gupta, K.C., (2013). "Synthesis Of PLGA Nanoparticles Of Tea Polyphenols and Their Strong İn Vivo Protective Effect Against Chemically İnduced DNA Damage", Int J Nanomedicine, 8: 1451-1462.

[13] Gedikli, S., (2013). Melatoninin Mcf-7 Hücre Kültüründeki Apoptoz Aktivasyonunun ve Sitotoksisitesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), Mtt Hücre Canlılık Testi ve İmmunsitokimya Yöntemleriyle Araştırılması., Doktora Tezi, T.C. Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum

[14] Aruoma, O.I., (1998). "Free Radicals, Oxidative Stress, and Antioxidants İn Human Health and Disease", Journal Of The American Oil Chemists' Society, 75: 199-212.

[15] Reiter, R.J., (2000). "Melatonin: Lowering The High Price Of Free Radicals", Physiology, 15: 246-250.

[16] Koçyiğit, A. ve Selek, Ş., (2016). "Eksojen Antioksidanlar İki Yönü Keskin Kılıçlardır", Bezmialem Science, 4: 70-75

[17] Young, I. ve Woodside, J., (2001). "Antioxidants İn Health and Disease", Journal Of Clinical Pathology, 54: 176-186.

[18] Memişoğulları, R., (2005). "Diyabette Serbest Radikallerin Rolü ve Antioksidanların Etkisi", Düzce Tıp Fakültesi Dergisi, 3: 30-39

[19] Khokhar, S. ve Magnusdottir, S., (2002). "Total Phenol, Catechin, and Caffeine Contents Of Teas Commonly Consumed İn The United Kingdom", Journal Of Agricultural and Food Chemistry, 50: 565-570.

[20] Arts, I.C. Hollman, P.C. Feskens, E.J. De Mesquita, H.B.B. ve Kromhout, D., (2001). "Catechin İntake Might Explain The İnverse Relation Between Tea Consumption and İschemic Heart Disease: The Zutphen Elderly Study", The American Journal Of Clinical Nutrition, 74: 227-232.

[21] Li, X. ve Hao, Y., (2015). "Probing The Binding Of (+)-Catechin To Bovine Serum Albumin By İsothermal Titration Calorimetry and Spectroscopic Techniques", Journal Of Molecular Structure, 1091: 109-117.

[22] Trnková, L. Ricci, D. Grillo, C. Colotti, G. ve Altieri, F., (2013). "Green Tea Catechins Can Bind and Modify Erp57/PDIA3 Activity", Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 1830: 2671-2682.

[23] Miyoshi, N. Pervin, M. Suzuki, T. Unno, K. Isemura, M. ve Nakamura, Y., (2015). "Green Tea Catechins For Well-Being and Therapy: Prospects and Opportunities", Botanics: Targets Therapy, 5: 85-96.

[24] Braicu, C. Ladomery, M.R. Chedea, V.S. Irimie, A. ve Berindan-Neagoe, I., (2013). "The Relationship Between The Structure and Biological Actions Of Green Tea Catechins", Food Chemistry, 141: 3282-3289.

[25] Fan, F.-Y. Shi, M. Nie, Y. Zhao, Y. Ye, J.-H. ve Liang, Y.-R., (2016). "Differential Behaviors Of Tea Catechins Under Thermal Processing: Formation Of Non-Enzymatic Oligomers", Food Chemistry, 196: 347-354.

[26] Zhao, S. Jones, J.A. Lachance, D.M. Bhan, N. Khalidi, O. venkataraman, S. Wang, Z. ve Koffas, M.A., (2015). "Improvement Of Catechin Production İn Escherichia Coli Through Combinatorial Metabolic Engineering", Metabolic Engineering, 28: 43-53.

[27] Singh, B.N. Shankar, S. ve Srivastava, R.K., (2011). "Green Tea Catechin, Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG): Mechanisms, Perspectives and Clinical Applications", Biochemical Pharmacology, 82: 1807-1821.

[28] Lanlan, B. Takagi, S. Tasuke, A. Yoneyama, H. Kumiko, I. Mizugai, H. ve Isogai, E., (2016). "Antimicrobial Activity Of Tea Catechin Against Canine Oral Bacteria and The Functional Mechanisms", Journal Of veterinary Medical Science, 78: 1439-1445.

[29] Veluri, R. Weir, T.L. Bais, H.P. Stermitz, F.R. ve Vivanco, J.M., (2004). "Phytotoxic and Antimicrobial Activities Of Catechin Derivatives", Journal Of Agricultural and Food Chemistry, 52: 1077-1082.

[30] Chou, C.-C. Lin, L.-L. ve Chung, K.-T., (1999). "Antimicrobial Activity Of Tea As Affected By The Degree Of Fermentation and Manufacturing Season", International Journal Of Food Microbiology, 48: 125-130.

[31] Archana, S. ve Abraham, J., (2011). "Comparative Analysis Of Antimicrobial Activity Of Leaf Extracts From Fresh Green Tea, Commercial Green Tea and Black Tea On Pathogens", Journal of Applied Pharmaceutical Science, 1(8): 149-152.

[32] Liu, J. Lu, J.-F. Kan, J. Wen, X.-Y. ve Jin, C.-H., (2014). "Synthesis, Characterization and İn Vitro Anti-Diabetic Activity Of Catechin Grafted İnulin", International Journal Of Biological Macromolecules, 64: 76-83.

[33] Anderson, R.A. ve Polansky, M.M., (2002). "Tea Enhances İnsulin Activity", Journal Of Agricultural and Food Chemistry, 50: 7182-7186.

[34] Sabu, M. Smitha, K. ve Kuttan, R., (2002). "Anti-Diabetic Activity Of Green Tea Polyphenols and Their Role İn Reducing Oxidative Stress İn Experimental Diabetes", Journal Of Ethnopharmacology, 83: 109-116.

[35] Zhu, N.S., S. HUANG, T.C. Bai, N. Yang, C.S. ve HO, C.T., (2000). "Antıoxıdant Chemıstry Of Green Tea Catechıns: Oxıdatıon Products Of (-)-Epıgallocatechın Gallate and (-)-Epıgallocatechın Wıth Peroxıdase", Journal Of Food Lipids: 7:275-282.

[36] Frei, B. ve Higdon, J.V., (2003). "Antioxidant Activity Of Tea Polyphenols İn Vivo: Evidence From Animal Studies", The Journal Of Nutrition, 133: 3275S-3284S.

[37] Yang, C.S. Maliakal, P. ve Meng, X., (2002). "Inhibition Of Carcinogenesis By Tea", Annual Review Of Pharmacology and Toxicology, 42: 25-54.

[38] Muzolf-Panek, M. Gliszczyńska-Świgło, A. Szymusiak, H. ve Tyrakowska, B., (2012). "The İnfluence Of Stereochemistry On The Antioxidant Properties Of Catechin Epimers", European Food Research and Technology, 235: 1001-1009.

[39] Janeiro, P. ve Brett, A.M.O., (2004). "Catechin Electrochemical Oxidation Mechanisms", Analytica Chimica Acta, 518: 109-115.

[40] Neiva, T. Morais, L. Polack, M. Simoes, C. ve D'amico, E., (1999). "Effects Of Catechins On Human Blood Platelet Aggregation and Lipid Peroxidation", Phytotherapy Research, 13: 597-600.

[41] Rashidinejad, A. Birch, E.J. ve Everett, D.W., (2016). "Effects Of (+)-Catechin On The Composition, Phenolic Content and Antioxidant Activity Of Full-Fat Cheese During Ripening and Recovery Of (+)-Catechin After Simulated In Vitro Digestion", Antioxidants, 5: 29.

[42] Modi, G. Pillay, V. Choonara, Y.E. Ndesendo, V.M. Du Toit, L.C. ve Naidoo, D., (2009). "Nanotechnological Applications For The Treatment Of Neurodegenerative Disorders", Progress İn Neurobiology, 88: 272-285.

[43] Watal, G. Watal, A. Rai, P.K. Rai, D.K. Sharma, G. ve Sharma, B., (2013). "Biomedical Applications Of Nano-Antioxidant", Oxidative Stress and Nanotechnology: Methods and Protocols: 147-151.

[44] Buzea, C. Pacheco, I.I. ve Robbie, K., (2007). "Nanomaterials and Nanoparticles: Sources and Toxicity", Biointerphases, 2: MR17-MR71.

[45] Sivasankar, M. ve Kumar, B.P., (2010). "Role Of Nanoparticles İn Drug Delivery System", International Journal Of Research İn Pharmaceutical and Biomedical Sciences, 1: 41-66.

[46] Wehrle, P. Magenheim, B. ve Benita, S., (1995). "The İnfluence Of Process Parameters On The PLA Nanoparticle Size Distribution, Evaluated By Means Of Factorial Design", European Journal Of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 41: 19-26.

[47] Kumari, A. Yadav, S.K. ve Yadav, S.C., (2010). "Biodegradable Polymeric Nanoparticles Based Drug Delivery Systems", Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 75: 1-18.

[48] Mudshinge, S.R. Deore, A.B. Patil, S. ve Bhalgat, C.M., (2011). "Nanoparticles: Emerging Carriers For Drug Delivery", Saudi Pharmaceutical Journal, 19: 129-141.

[49] Mohanraj, V. ve Chen, Y., (2006). "Nanoparticles-A Review", Tropical Journal Of Pharmaceutical Research, 5: 561-573.

[50] Chen, Y. Mcculloch, R. ve Gray, B., (1994). "Synthesis Of Albumin-Dextran Sulfate Microspheres Possessing Favourable Loading and Release Characteristics For The Anticancer Drug Doxorubicin", Journal Of Controlled Release, 31: 49-54.

[51] Chakravarthi, S.S. Robinson, D.H. ve De, S., (2007). Nanoparticles Prepared Using Natural and Synthetic Polymers, Ed. Nanoparticulate Drug Delivery Systems. CRC Press, 51-60.

[52] Bei, D. Meng, J. ve Youan, B.-B.C., (2010). "Engineering Nanomedicines For İmproved Melanoma Therapy: Progress and Promises", Nanomedicine, 5: 1385-1399.

[53] Wurm, F.R. ve Weiss, C.K., (2014). "Nanoparticles From Renewable Polymers", Frontiers İn Chemistry, 2: 49.

[54] Anwunobi, A. ve Emeje, M., (2011). "Recent Applications Of Natural Polymers İn Nanodrug Delivery", J Nanomed Nanotechnol, 4: 2-7.

[55] Sabnis, S. ve Block, L.H., (2000). "Chitosan As An Enabling Excipient For Drug Delivery Systems: I. Molecular Modifications", International Journal Of Biological Macromolecules, 27: 181-186.

[56] Singh, V. ve Tiwari, M., (2010). "Structure-Processing-Property Relationship Of Poly (Glycolic Acid) For Drug Delivery Systems 1: Synthesis and Catalysis", International Journal Of Polymer Science, 2010:23.

[57] Jiang, L. ve Zhang, J., (2012). "Biodegradable Polymers and Polymer Blends", Handbook Of Biopolymers and Biodegradable Plastics: Properties, Processing and Applications: 109-128.

[58] Pandey, A. Pandey, G.C. ve Aswath, P.B., (2008). "Synthesis Of Polylactic Acid–Polyglycolic Acid Blends Using Microwave Radiation", Journal Of The Mechanical Behavior Of Biomedical Materials, 1: 227-233.

[59] Li, W.J. Danielson, K.G. Alexander, P.G. ve Tuan, R.S., (2003). "Biological Response Of Chondrocytes Cultured İn Three-Dimensional Nanofibrous Poly (ϵ-Caprolactone) Scaffolds", Journal Of Biomedical Materials Research Part A, 67: 1105-1114.

[60] Sinha, V. Bansal, K. Kaushik, R. Kumria, R. ve Trehan, A., (2004). "Poly-ϵ-Caprolactone Microspheres and Nanospheres: An Overview", International Journal Of Pharmaceutics, 278: 1-23.

[61] Kweon, H. Yoo, M.K. Park, I.K. Kim, T.H. Lee, H.C. Lee, H.-S. Oh, J.-S. Akaike, T. ve Cho, C.-S., (2003). "A Novel Degradable Polycaprolactone Networks For Tissue Engineering", Biomaterials, 24: 801-808.

[62] Saadati, R. ve Dadashzadeh, S., (2014). "Marked Effects Of Combined TPGS and PVA Emulsifiers İn The Fabrication Of Etoposide-Loaded PLGA-PEG Nanoparticles: İn Vitro and İn Vivo Evaluation", International Journal Of Pharmaceutics, 464: 135-144.

[63] Mali, A.D. ve Bathe, R.S., "Updated Revıew On Nanopartıcles As Drug Delıvery Systems", International Journal of Analytical, Pharmaceutical and Biomedical Sciences, 4:9-18.

[64] Gülseren, İ. ve Corredig, M., (2012). "Interactions At The İnterface Between Hydrophobic and Hydrophilic Emulsifiers: Polyglycerol Polyricinoleate (PGPR)

and Milk Proteins, Studied By Drop Shape Tensiometry", Food Hydrocolloids, 29: 193-198.

[65] Mcclements, D.J. ve Gumus, C.E., (2016). "Natural Emulsifiers—Biosurfactants, Phospholipids, Biopolymers, and Colloidal Particles: Molecular and Physicochemical Basis Of Functional Performance", Advances İn Colloid and İnterface Science, 234: 3-26.

[66] Sahoo, S.K. Panyam, J. Prabha, S. ve Labhasetwar, V., (2002). "Residual Polyvinyl Alcohol Associated With Poly (D, L-Lactide-Co-Glycolide) Nanoparticles Affects Their Physical Properties and Cellular Uptake", Journal Of Controlled Release, 82: 105-114.

[67] Ye, M. Mohanty, P. ve Ghosh, G., (2014). "Morphology and Properties Of Poly Vinyl Alcohol (PVA) Scaffolds: Impact Of Process Variables", Materials Science and Engineering: C, 42: 289-294.

[68] Jalvandi, J. White, M. Gao, Y. Truong, Y.B. Padhye, R. ve Kyratzis, I.L., (2017). "Polyvinyl Alcohol Composite Nanofibres Containing Conjugated Levofloxacin-Chitosan For Controlled Drug Release", Materials Science and Engineering: C, 73: 440-446.

[69] Akkaya, T.S., (2015). 18f-Fdg-Grayanotoksin-Gadolinyum- Nanoparçacıkların Sentezi ve İn Vitro Biyoetkinliklerin İncelenmesi, Nükleer Bilimler Anabilim Dalı. Fen Bilimleri Enstitüsü- İzmir: Ege Üniversitesi

[70] Varan, C., (2013). Beyin Glioma Tedavisinde Dosetaksel Yüklü Katyonik Nanopartiküllerin Tasarımı ve İn Vitro Değerlendirilmesi,Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara

[71] Tuncer, S. ve Demirci, M., (2011). "Dental Materyallerde Biyouyumluluk Değerlendirmeleri", Atatürk Üniv Diş Hek Fak Derg, 21: 141-149.

[72] Çiçek, C. ve Bilgiç, A., (2006). "Klinik Viroloji Laboratuvarında Uzmanlık Öğrencisine Verilen Hücre Kültürü Eğitim Programı: Bir Model", İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal Of Infection), 20: 231-241.

[73] Freshney, R.I., (2005). Culture Of Specific Cell Types: Wiley Online Library.

[74] Schmalz, G., (2009). Resin-Based Composites, Ed. Biocompatibility Of Dental Materials. Springer, 99-137.

[75] Murray, P.E. García Godoy, C. ve García Godoy, F., (2007). "How İs The Biocompatibilty Of Dental Biomaterials Evaluated?", Medicina Oral, Patología Oral Y Cirugía Bucal (Internet), 12: 258-266.

[76] Aldridge, W., "The Biochemical Principles Of Toxicology.", Exp Toxicol,: P. 56-78.

[77] Nicholson, J.W., (2002). The Chemistry Of Medical and Dental Materials: Royal Society Of Chemistry.

[78] Instrumentation, A.F.T.A.O.M., (2009). "Biological Evaluation Of Medical Devices: Part 5 Tests For In Vitro Cytotoxicity", AAMI/ISO: 10993-10995.

[79] Human Breast Cancer Line Information, M.-C., Source Of The MCF-7 Cell Line, 15 Mayıs 2017.

[80] Grobben, B. De Deyn, P. ve Slegers, H., (2002). "Rat C6 Glioma As Experimental Model System For The Study Of Glioblastoma Growth and İnvasion", Cell and Tissue Research, 310: 257-270.

[81] Kedare, S.B. ve Singh, R., (2011). "Genesis and Development Of DPPH Method Of Antioxidant Assay", Journal Of Food Science and Technology, 48: 412-422.

[82] Moharamzadeh K, B.I., Noort RV. . . , (2009;). "Biocompatibility Of Resin-Based Dental Materials", Materials Science and Engineering: 2(2): 514-548.

[83] Biyoküre Biyomühendislik Sitesi, Uv-Görünür Bölge Spektroskopisi, Http://Biyokure.Org/Uv-Gorunur-Bolge-Spektroskopisi/5276/, 30 Mart 2017.

[84] Beşergil, P.D.B., (2015). Enstrümantal Analiz, http://www.bayar.edu.tr/besergil/1_enstrumental_analiz_giris.pdf, 02.02.2017.

[85] İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimyada Temel Hesaplamalar, Http://İstanbultip.İstanbul.Edu.Tr/Wp-Content/Uploads/Attachments/390_Biyokimya%20da%20Temel%20Hesaplamalar.Pdf, 20 Mart 2017.

[86] Kara, D.D.H.E.Ş., Spektrokimyasal Yöntemlere Giriş, http://slideplayer.biz.tr/slide/10280621/, 11 Mayıs 2017.

[87] Zetasizer Cihazları, Malvern Zeta Sizer Data Sheet, http://www.malvern.com/en/products/product-range/zetasizer-range/zetasizer-nano-range/defaultb.aspx?gclid=CjwKEAjwsLTJBRCvibaW9bGLtUESJAC4wKw1lLuNmd8ir6KODMJXVXdPaYpXc8O47JYNaM6HTFb_wRoCQPbw_wcB, 30 Ocak 2017.

[88] Ngoh, Y.-Y. Lim, T.S. ve Gan, C.-Y., (2016). "Screening and Identification Of Five Peptides From Pinto Bean With Inhibitory Activities Against A-Amylase Using Phage Display Technique", Enzyme and Microbial Technology, 89: 76-84

[89] Yıldız Teknik Üniversitesi Nanokon, Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscope-SEM), Http://Www.Nanokon.Yildiz.Edu.Tr/Nanoteknoloji/Taramali-Elektron-Mikroskobu-Scanning-Elektron-Microscope-Sem/, 28 Nisan 2017.

[90] Korayem, M.H. ve Korayem, A.H., (2017). "Modeling Of AFM With A Piezoelectric Layer Based On The Modified Couple Stress Theory With Geometric Discontinuities", Applied Mathematical Modelling, 45: 439-456.

[91] Gao, S. ve Hu, M., (2010). "Bioavailability Challenges Associated With Development Of Anti-Cancer Phenolics", Mini Reviews İn Medicinal Chemistry, 10: 550.

[92] Griffiths, P.R. ve De Haseth, J.A., (2007). Fourier Transform İnfrared Spectrometry: John Wiley & Sons, Turkey.

[93] Harwansh, R.K. Mukherjee, P.K. Kar, A. Bahadur, S. Al-Dhabi, N.A. ve Duraipandiyan, V., (2016). "Enhancement Of Photoprotection Potential Of Catechin Loaded Nanoemulsion Gel Against UVA İnduced Oxidative Stress", Journal Of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 160: 318-329.

[94] Cohen-Sela, E. Chorny, M. Koroukhov, N. Danenberg, H.D. ve Golomb, G., (2009). "A New Double Emulsion Solvent Diffusion Technique For Encapsulating Hydrophilic Molecules İn PLGA Nanoparticles", Journal Of Controlled Release, 133: 90-95.

[95] Mohammadi, G. Namadi, E. Mikaeili, A. Mohammadi, P. ve Adibkia, K., (2017). "Preparation, Physicochemical Characterization and Anti-Fungal Evaluation Of The Nystatin-Loaded Eudragit RS100/PLGA Nanoparticles", Journal Of Drug Delivery Science and Technology, 38: 90-96.

[96] Derman, S., (2015). "Caffeic Acid Phenethyl Ester Loaded PLGA Nanoparticles: Effect Of Various Process Parameters On Reaction Yield, Encapsulation Efficiency, and Particle Size", Journal Of Nanomaterials, 16: 318.

[97] Kılıç, G.B. ve Karahan, A.G., (2010). "Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi ve Laktik Asit Bakterilerinin Tanısında Kullanılması", Gıda Dergisi, 35(6): 445-452.

[98] Arasoglu, T. Derman, S. ve Mansuroglu, B., (2015). "Comparative Evaluation Of Antibacterial Activity Of Caffeic Acid Phenethyl Ester and PLGA Nanoparticle Formulation By Different Methods", Nanotechnology, 27: 025103.

[99] Tailor, C.S. ve Goyal, A., (2014). "Antioxidant Activity By DPPH Radical Scavenging Method Of Ageratum Conyzoides Linn. Leaves", American Jouenal of Ethnomedicine,4:244-249

[100] Edmondson, J.M. Armstrong, L.S. ve Martinez, A.O., (1988). "A Rapid and Simple MTT-Based Spectrophotometric Assay For Determining Drug Sensitivity İn Monolayer Cultures", Methods İn Cell Science, 11: 15-17.

[101] Bondar, O.V. Saifullina, D. Shakhmaeva, I. Mavlyutova, I. ve Abdullin, T., (2012). "Monitoring Of The Zeta Potential Of Human Cells Upon Reduction İn Their Viability and İnteraction With Polymers", Acta Naturae (Англоязычная Версия), 4.

[102] Yan, S. Adegbule, A. ve Kibbey, T.C., (2017). "A Hybrid 3D SEM Reconstruction Method Optimized For Complex Geologic Material Surfaces", Micron, 99:26-31.

[103] Javidparvar, A. Ramezanzadeh, B. ve Ghasemi, E., (2016). "Effects Of Surface Morphology and Treatment Of İron Oxide Nanoparticles On The Mechanical Properties Of An Epoxy Coating", Progress İn Organic Coatings, 90: 10-20.

[104] Silva, A.T.C.R. Cardoso, B.C.O. E Silva, M.E.S.R. Freitas, R.F.S. ve Sousa, R.G., (2015). "Synthesis, Characterization, and Study Of PLGA Copolymer İn Vitro Degradation", Journal Of Biomaterials and Nanobiotechnology, 6: 8.

[105] Zolnik, B.S. ve Burgess, D.J., (2007). "Effect Of Acidic Ph On PLGA Microsphere Degradation and Release", Journal Of Controlled Release, 122: 338-344.

[106] Man, G.C.W. Chu, K.O. ve Wang, C.C., (2016). "Of Green Tea Catechıns And Its Effıcacy".

[107] Lu, N. Chen, P. Yang, Q. ve Peng, Y.-Y., (2011). "Anti-and Pro-Oxidant Effects Of (+)-Catechin On Hemoglobin-İnduced Protein Oxidative Damage", Toxicology İn Vitro, 25: 833-838.

[108] Singh, R. Kumari, P. ve Kumar, S., (2016). "Nanotechnology For Enhanced Bıoactıvıty Of Bıoactıve Phytomolecules", Nutrient Delivery: 413.

[109] Sinha, D. Biswas, J. Nabavi, S.M. ve Bishayee, A., (2017). "Tea Phytochemicals For Breast Cancer Prevention and İntervention: From Bench To Bedside and Beyond", Elsevier Seminars in Cancer Biology, 43:1-180.

[110] Arumugam, A. Subramani, R. Nandy, S. Powell, S. velazquez, M. Orozco, A. Galvez, A. ve Lakshmanaswamy, R., (2016). "Desacetyl Nimbinene İnhibits Breast Cancer Growth and Metastasis Through Reactive Oxygen Species Mediated Mechanisms", Tumor Biology, 37: 6527-6537.

[111] Koňariková, K. Ježovičová, M. Keresteš, J. Gbelcová, H. Ďuračková, Z. ve Žitňanová, I., (2015). "Anticancer Effect Of Black Tea Extract İn Human Cancer Cell Lines", Springerplus, 4: 127.

[112] Berletch, J.B. Liu, C. Love, W.K. andrews, L.G. Katiyar, S.K. ve Tollefsbol, T.O., (2008). "Epigenetic and Genetic Mechanisms Contribute To Telomerase İnhibition By EGCG", Journal Of Cellular Biochemistry, 103: 509-519.

[113] Meeran, S.M. Patel, S.N. Chan, T.-H. ve Tollefsbol, T.O., (2011). "A Novel Prodrug Of Epigallocatechin-3-Gallate: Differential Epigenetic Htert Repression İn Human Breast Cancer Cells", Cancer Prevention Research, 4: 1243-1254.

[114] Mirza, S. Sharma, G. Parshad, R. Gupta, S.D. Pandya, P. ve Ralhan, R., (2013). "Expression Of DNA Methyltransferases İn Breast Cancer Patients and To Analyze The Effect Of Natural Compounds On DNA Methyltransferases and Associated Proteins", Journal Of Breast Cancer, 16: 23-31.

[115] Zhou, Y.-D. Kim, Y.-P. Li, X.-C. Baerson, S.R. Agarwal, A.K. Hodges, T.W. Ferreira, D. ve Nagle, D.G., (2004). "Hypoxia-İnducible Factor-1 Activation By (−)-Epicatechin Gallate: Potential Adverse Effects Of Cancer Chemoprevention With High-Dose Green Tea Extracts", Journal Of Natural Products, 67: 2063-2069.

[116] Baker, K.M. ve Bauer, A.C., (2015). "Green Tea Catechin, EGCG, Suppresses PCB 102-İnduced Proliferation İn Estrogen-Sensitive Breast Cancer Cells", International Journal Of Breast Cancer, 2015:7.

[117] Orunoğlu, M., (2014).,Deneysel Sıçan Beyin Tümörü Modelinde Polilaktik–Ko-Glikolik Asit (Plga) Nanopartikülüne Yüklü Curcuminin Etkisinin Izlenmesi, Uzmanlık Tezi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara.

[118] Ramadass, S.K. Anantharaman, N.V. Subramanian, S. Sivasubramanian, S. ve Madhan, B., (2015). "Paclitaxel/Epigallocatechin Gallate Coloaded Liposome: A Synergistic Delivery To Control The İnvasiveness Of MDA-MB-231 Breast Cancer Cells", Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 125: 65-72.

[119] Rocha, S. Generalov, R. Do Carmo Pereira, M. Peres, I. Juzenas, P. ve Coelho, M.A., (2011). "Epigallocatechin Gallate-Loaded Polysaccharide Nanoparticles For Prostate Cancer Chemoprevention", Nanomedicine, 6: 79-87.

[120] Saeki, K. Hayakawa, S. Isemura, M. ve Miyase, T., (2000). "Importance Of A Pyrogallol-Type Structure İn Catechin Compounds For Apoptosis-İnducing Activity", Phytochemistry, 53: 391-394.

[121] Sanna, V. Pintus, G. Roggio, A.M. Punzoni, S. Posadino, A.M. Arca, A. Marceddu, S. Bandiera, P. Uzzau, S. ve Sechi, M., (2011). "Targeted Biocompatible Nanoparticles For The Delivery Of (−)-Epigallocatechin 3-Gallate To Prostate Cancer Cells", Journal Of Medicinal Chemistry, 54: 1321-1332.

[122] Siddiqui, I.A. ve Sanna, V., (2016). "Impact Of Nanotechnology On The Delivery Of Natural Products For Cancer Prevention and Therapy", Molecular Nutrition & Food Research, 60: 1330-1341.

[123] Siddiqui, I.A. Adhami, V.M. Bharali, D.J. Hafeez, B.B. Asim, M. Khwaja, S.I. Ahmad, N. Cui, H. Mousa, S.A. ve Mukhtar, H., (2009). "Introducing Nanochemoprevention As A Novel Approach For Cancer Control: Proof Of Principle With Green Tea Polyphenol Epigallocatechin-3-Gallate", Cancer Research, 69: 1712-1716.