

**T.C.  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YAPAY KIRMIZI KAN HÜCRELERİ İLE KEMOTERAPÖTİK  
L- ASPARAGİNAZIN ENKAPSÜLASYONU VE  
KARAKTERİZASYONU**

**GÜLŞAH KARADÖL**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
KİMYA ANABİLİM DALI**

**MALATYA**

**Ağustos 2019**

**Tezin başlığı:** Yapay Kırmızı Kan Hücreleri ile Kemoterapötik L-Asparaginazın Enkapsülasyonu ve Karakterizasyonu

**Tezi Hazırlayan:** Gülşah KARADÖL

**Sınav Tarihi:** 29.08.2019

Yukarıda adı geçen tez jürimizce değerlendirilerek Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

### **Sınav Jürisi Üyeleri**

Prof. Dr. Burhan ATEŞ (Danışman) .....  
İnönü Üniversitesi

Prof. Dr. Süleyman KÖYTEPE .....  
İnönü Üniversitesi

Prof. Dr. Ülkü YILMAZ .....  
Malatya Turgut Özal Üniversitesi

Prof. Dr. Kazım TÜRK  
Enstitü Müdür V.



*Canım Kızlarım ...*

## ONUR SÖZÜ

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum ‘‘Yapay Kırmızı Kan Hücreleri ile Kemoterapötik L-Asparaginazın Enkapsülasyonu ve Karakterizasyonu’’ başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların, hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Gülşah KARADÖL

# ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

## YAPAY KIRMIZI KAN HÜRELERİ İLE KEMOTERAPÖTİK L- ASPARAGİNAZIN ENKAPSÜLASYONU VE KARAKTERİZASYONU

Gülşah KARADÖL

İnönü Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı

63+xi

2019

Danışman: Prof. Dr. Burhan ATEŞ

L-asparaginaz (L-ASNaz), Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL) hastalığının tedavisinde kullanılan birincil kemoterapötik ilaçtır. Hali hazırda L-ASNaz polietilen glikol (PEG) ile modifiye edilmiş olarak uygulanmaktadır. Bu uygulamadaki en önemli sorunlardan bir vücut tarafından geliştirilen immun yanıt ile oluşan yan etkilerdir. Bu nedenle ALL tedavisinde karşılaşılan bu tür sorunları çözmek için yeni L-asparaginaz taşıyıcı sistemlere ihtiyaç vardır. Bu noktada çalışmanın amacı yapay kırmızı kan hücrelerinden L-asparaginaz için bir taşıyıcı sistemin geliştirilmesidir.

Tez kapsamında oleik asit (OA) nişasta (ST)'ya tween 40 varlığında aşılınmış ve karakterize edilmiştir. Daha sonra ise hemoglobın ve L-asparaginaz varlığında yapay kırmızı kan hücre sistemleri oluşturulmuştur. Elde edilen bu sistemlerin her aşaması yapısal, termal ve morfolojik olarak karakterize edilmiştir. Ayrıca oluşturulan bu sistemin partikül boyutu, zeta potansiyeli ve yapıdaki L-asparaginazın ise aktivitesi, pH ve sıcaklık kararlılığı, tekrar kullanılabilirliği ve depolama kararlılığı araştırılmıştır. OA/ST ve OA/ST-Hb-L-ASNase malzemelerinin ortalama hidrodinamik parçacık boyutları sırasıyla 120 ve 295 nm olarak ölçülmüştür. OA/ST-Hb-L-ASNase ise 55 °C'de bağıl aktivitesinin % 60'ından fazlasını korumuştur. Bir hafta sonra, serbest enzim için kalan aktivite % 59 iken, immobilize enzim için %68 olarak bulunmuştur. Ayrıca OA/ST-Hb-L-ASNase tekrarlanan 15. kullanımından sonra bile başlangıç aktivitesinin yaklaşık %50'sini korumuştur.

Sonuç olarak çalışmamızda oluşturulan yapay kırmızı kan hücrelerinin L-asparaginaz enzimini taşımada kullanımına yönelik umut verici sonuçlar elde edilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Yapay kırmızı kan hücresi L-asparaginaz, nişasta, oleik asit

## ABSTRACT

Master Thesis

### ENCAPSULATION AND CHARACTERIZATION OF CHEMOTHERAPEUTIC L-ASPARAGINASE WITH ARTIFICIAL RED BLOOD CELLS

Gülşah KARADÖL

İnönü University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Chemistry Department

63+xi

2019

Supervisor: Prof. Dr. Burhan ATEŞ

L-asparaginase (L-ASNase) is the primary chemotherapeutic drug used in the treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL). Currently, L-ASNase is applied modified with polyethylene glycol (PEG). One of the most important problems in this practice is the side effect caused by the immune response developed by the body. Therefore, novel L-asparaginase delivery systems are needed to solve such problems in the treatment of ALL. The aim of this study is to develop a carrier system for L-asparaginase from artificial red blood cells.

Within the scope of the thesis, oleic acid (OA) was firstly grafted to starch (ST) in the presence of tween 40. Subsequently, artificial red blood cell systems were established in the presence of hemoglobin and L-asparaginase. Each step of the obtained systems is characterized structurally, thermally and morphologically. Also, particle size, zeta potential and L-asparaginase activity, pH and temperature stability, reusability and storage stability of this system were investigated. The average hydrodynamic particle sizes of the OA / ST and OA/ST-Hb-L-ASNase materials were measured as 120 and 295 nm, respectively. OA / ST-Hb-L-ASNase maintained more than 60% of its relative activity at 55 ° C. After one week, the remaining activity was 59% for the free enzyme and 68% for the immobilized enzyme. Furthermore, OA/ST-Hb-L-ASNase maintained approximately 50% of the initial activity even after repeated use of 15th.

As a result, promising results were obtained for the use of artificial red blood cells in transporting L-asparaginase enzyme.

**Key Words:** Artificial red blood cell L-asparaginase, starch, oleic acid

## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans öğrenimim ve tez çalışmam boyunca desteğini esirgemeyen saygıdeğer hocam Prof. Dr. Burhan ATEŞ'e şükranlarımı bir borç bilirim.

Çalışmalarım esnasında bilgisinden ve tecrübesinden yararlandığım sayın hocam Prof. Dr. Süleyman KÖYTEPE'ye çok teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım boyunca bana yardımcı olan Dr. Ahmet ULU'ya çok teşekkür ederim.

Beni akademik çalışma konusunda baştan beridir destekleyen, bana inancını hiçbir zaman kaybetmeyen çok değerli dostum Dr. Ayber YILDIRIM'a teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım esnasında evlatlarımla ilgilenip, çalışmalarımın konsantrasyonumu destekleyen başta Esma Nur YILMAZ olmak üzere değerli komşularım Kübra, Şerife, Nurgül, Küçük Zehra, Şeyma, Büyük Zehra, Cennet ve Betül'e çok teşekkür ederim.

Rektör Yardımcımız sayın Prof. Dr. İbrahim TÜRKMEN başta olmak üzere Şube müdürüm Cemal ULAŞ'a, değerli çalışma arkadaşlarım Erhan YÜCE, Ebu Talip ILKIM, Funda YETER, Zafer MENEVŞEOĞLU, Sercan TÜZER, Mustafa ALBAYRAK, İhsan KOCA, Ahmet ALĞAN, Abdullah SARIÇİÇEK, Ömer BAYSAR, Servet PEKTAŞ, Özgül KARACA, Alper GÖKÇE ve ismini sayamadıklarım bana gösterdikleri anlayış ve desteklerinden ötürü çok teşekkür ederim.

Sevgili kızlarım Şeyda Naz ve Şeyma Gökçe; umarım bu tez, size hayatın tüm zorluğuna rağmen başarının ve yeni bir şeyler yapmanın önemini, güzelliğini öğretir. Hayattaki her yenilgiden bir ders çıkarın ki yaşadığımız yenilgi, sizi başarıya taşınsın...

Beni yetiştirip bugünlere getiren, eğitim ve çalışma hayatım boyunca destek ve ilgilerini her zaman üzerimde hissettiğim değerli aileme çok teşekkür ederim.

Bu çalışmayı gerçekleştirmemde 2016/16 (446) ID nolu ve "*Yapay Kırmızı Kan Hücrreleri ile Kemoterapötik L-Asparaginazın Enkapsülasyonu ve Karakterizasyonu*" başlıklı proje ile finansal destek sunan, İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>iv</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b> .....	<b>vii</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>viii</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	<b>x</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. KURAMSAL TEMELLER</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1. L-asparaginaz</b> .....	<b>3</b>
2.1.1. L-Asparaginazın Etki Mekanizması .....	4
2.1.2.1. Bakteriyel L-Asparaginaz Kaynakları.....	5
2.1.2.2. Mantar L-Asparaginaz Kaynakları.....	5
2.1.2.3. Diğer L-Asparaginaz Kaynakları .....	6
2.1.3. L-Asparaginazın Moleküler Yapısı .....	6
2.1.4. L-Asparaginazın Optimum Koşulları .....	7
2.1.5. L-Asparaginazın Depo Kararlılığı .....	8
2.2. Enzim İmmobilizasyonu.....	9
2.3. Enzim İmmobilizasyonunun Avantajları.....	10
2.4. Enzim İmmobilizasyonunun Tarihçesi .....	11
2.5. Enzim İmmobilizasyonunda Kullanılan Destek Materyalleri .....	12
2.6. Destek Materyali Seçiminde Temel Hususlar .....	13
2.7. Enzim İmmobilizasyon Teknikleri .....	14
2.7.1. Geri Dönüşümsüz İmmobilizasyon Yöntemleri .....	15
2.7.1.1. Kovalent Bağlanma .....	15
2.7.1.2. Tutuklama (Entrapment) .....	16
2.7.1.3. Mikrokapsülleme.....	17
2.7.1.4. Çapraz bağlama .....	18
2.7.2. Geri Dönüşümlü İmmobilizasyon Yöntemleri .....	18
2.7.2.1. Fiziksel adsorpsiyon.....	19
2.7.2.2. Kimyasal Etkileşim .....	19
2.8. Kırmızı Kan Hücreleri ve İlaç Taşıma .....	20
2.8.1. Kırmızı Kan Hücrelerine Etken Madde Yükleme Yöntemleri.....	22

2.8.1.1.	Hipoosmotik Lizis Yöntemi.....	22
2.8.1.2.	Elektriksel Şok Yöntemi.....	22
2.8.2.	Taşıyıcı Sistem Olarak Kırmızı Kan Hücrelerinin Avantajları ve Dezavantajları.....	23
2.9.	Yapay Kırmızı Kan Hücresi .....	24
2.9.1.	Yapay Kırmızı Kan Hücrelerinin İlaç Taşıma Sistemi Olarak Kullanılması .....	24
2.10.	Kaynak Özetleri.....	25
<b>3.</b>	<b>MATERYAL VE METOT .....</b>	<b>29</b>
3.1.	Çalışmada Kullanılan Kimyasallar .....	29
3.2.	Çalışmada Kullanılan Cihazlar .....	30
3.3.	Çalışmada Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması .....	30
3.4.	Nessler Reaktifinin Hazırlanması .....	32
3.5.	Diyaliz Membranın Hazırlanması .....	32
3.6.	Örneklerin Sentezi .....	33
3.6.1.	Aşılınmış Nişasta .....	33
3.6.2.	Yapay Kırmızı Kan Hücresi Sentezi .....	33
3.7.	Yapay Kırmızı Kan Hücresine Enzim Enkapsülasyonu.....	34
3.8.	Karakterizasyon Çalışmaları.....	35
3.9.	Serbest Enzimin Aktivite Ölçümü.....	35
3.10.	Yapay Kırmızı Kan Hücreleri ve Aşılınmış Nişastanın Biyobozunurluk Testleri .....	36
3.11.	İmmobilize Enzimin Aktivite Ölçümü .....	36
3.12.	Serbest ve İmmobilize Enzimin Optimum pH'sının Belirlenmesi .....	37
3.13.	Serbest ve İmmobilize Enzimin Maksimum ve Optimum Sıcaklıklarının Belirlenmesi .....	37
3.14.	Yeniden Kullanılabilirlik Testi.....	37
3.15.	Serbest ve İmmobilize Enzimin Depo Kararlılıklarının Belirlenmesi .....	38
<b>4.</b>	<b>BULGULAR VE TARTIŞMA .....</b>	<b>39</b>
4.1.	Aşılınmış Nişastanın Karakterizasyonu .....	39
4.2.	Termal Analiz .....	41
4.3.	SEM analizi .....	44
4.4.	EDX Analizi .....	45
4.5.	Partikül boyut ve zeta potansiyeli analizi .....	46

4.6.	pH ve sıcaklığın enzimatik aktivite üzerine etkisi.....	48
4.7.	Tekrar kullanım ve depolanma kararlılığı .....	50
5.	<b>SONUÇ</b> .....	52
6.	<b>KAYNAKLAR</b> .....	55
	<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	64



## SİMGELER VE KISALTMALAR

FA	Folik Asit
TPP	Trifenilfosfonyum
UCNP	Unconverting nanopartikülleri
L-ASNase	L- Asparaginaz
ALL	Akut lenfoblastik lösemi
DSC	Diferensiyal taramalı kalorimetri
DTA	Diferensiyal termal analiz
IR	Infrared Spektroskopisi
TCA	Trikloroasetik asit
TGA	Termogravimetrik analiz
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
DMSO	Dimetilsülfoksit
OA/ST	Oleik Asit/ Nişasta
OA/ST-Hb-L-ASNase	Oleik Asit/ Nişasta- Hemoglobin-L-asparaginaz

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1	L-asparagin aminoasidinin L-aspartata hidroliz reaksiyonu.....	3
Şekil 2. 2	L-ASNaz reaksiyonunun genel hidroliz mekanizması.....	4
Şekil 2. 3	<i>Escherichia coli</i> bakterisinden elde edilen L-asparaginazın üç boyutlu yapısı.....	7
Şekil 2. 4	En yaygın olarak kullanılan enzim immobilizasyon yöntemlerinin şematik gösterimi .....	8
Şekil 2. 5	Enzim immobilizasyon yöntemleri.....	15
Şekil 2. 6	Kovalent bağ ile immobilizasyon.....	16
Şekil 2. 7	Tutuklama ile immobilizasyon.....	16
Şekil 2. 8	Kapsülasyon ile immobilizasyon.....	17
Şekil 2. 9	Çapraz bağlama ile immobilizasyon.....	18
Şekil 2.10	Fiziksel adsorpsiyonla ile immobilizasyon.....	19
Şekil 2.11	İyonik bağlanma.....	20
Şekil 2.12	Kırmızı kan hücreleri ve hemoglobin molekülünün görünümü.....	21
Şekil 2.13	Kırmızı kan hücresine ilaç ve manyetik nanopartiküllerinin yüklenmesi.....	22
Şekil 2.14	Elektroporasyon yöntemi ile hücelere ilaç etken maddesi yüklenmesi.....	23
Şekil 4. 1	Nişasta, Oleik asit ve OA/ST malzemelerinin FTIR spektrumları.....	39
Şekil 4. 2	Hb, saf L-ASNase ve OA/ST-Hb-L-ASNase malzemelerinin FTIR spektrumları.....	40
Şekil 4. 3	Nişasta, Oleik asit ve OA/ST malzemelerinin TGA termogramları.....	42
Şekil 4. 4	Nişasta, Oleik asit ve OA/ST malzemelerinin DTA termogramları.....	42
Şekil 4. 5	Nişasta, Oleik asit ve OA/ST malzemelerinin DSC termogramları.....	43
Şekil 4. 6	OA/ST, OA/ST-Hb ve OA/ST-Hb-L-ASNase malzemelerinin farklı büyütmelerdeki morfolojik analiz sonuçları .....	44
Şekil 4. 7	(a) OA/ST-Hb ve (b) OA/ST-Hb-L-ASNase malzemelerinin EDX analiz sonuçları.....	45
Şekil 4. 8	OA/ST-Hb ve OA/ST-Hb-L-ASNase malzemelerinin EDX haritalama analiz sonuçları.....	46
Şekil 4. 9	OA/ST ve OA/ST-Hb-L-ASNase malzemelerinin hidrodinamik partikül boyutları.....	47
Şekil 4.10	OA/ST ve OA/ST-Hb-L-ASNase malzemelerinin zeta potansiyel değerleri.....	48

<b>Şekil 4.11</b>	Serbest ve immobilize enzimin bağıl aktiviteleri: (a) farklı pH değerleri ve (b) farklı sıcaklıklarda .....	49
<b>Şekil 4.12</b>	OA/ST-Hb-L-ASNase malzemesinin tekrar kullanılabilirliği .....	50
<b>Şekil.4.13</b>	Serbest ve OA/ST-Hb-L-ASNase'ın 25 °C'de depolama kararlılığı.....	51



## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 2. 1</b>	Enzim immobilizasyonunun tarihçesi.....	11
<b>Çizelge 2. 2</b>	Destek seçimindeki temel hususlar ve immobilizasyon yapılırken dikkat edilmesi gerekenler .....	14



## 1. GİRİŞ

Dünyada 14 milyon kişi her yıl kanser teşhisi almakta ve 8,2 milyon kişi bu hastalıktan ölmektedir. Kanser insidansı yaş, cinsiyet, dil, ırk ayırımı yapmaksızın tüm insanları etkilemektedir. Kanser yayılmasının, bu oranlarla devam etmesi durumunda 2030 yılında 22 milyon kişinin kansere yakalanacağı, Dünya Sağlık Örgütü tarafından öngörülmektedir. Bununla beraber özellikle gelişecek olan kanser olgularının önemli bir bölümünün az gelişmiş ülkelerde görüleceği belirtilmektedir. Sağlık bakanlığının verilerine göre ülkemizde her yıl yaklaşık 170.000 kişi kanser teşhisi almakta ve son yılların verilerine göre kanser sıklığında herhangi bir azalış görülmemektedir. Kanser tedavisinde farklı yaklaşımlar olmakla birlikte hâlihazırda en yaygın yaklaşım kemoterapidir. Bu nedenle kemoterapinin başarısını arttırmak ve yan etkilerini sınırlamak için birçok yeni nesil ilaçlar geliştirilmekte ve buna yönelik çalışmalar hala önemini korumaktadır.

Kanser kemoterapisinde mikrobiyal kökenli enzimlerin ilaç olarak kullanılabilecekleri 1950'li yıllarda ortaya konmuştur. Bu ilaçlardan en yaygın kullanılan enzim, bazı gram negatif bakterilerden elde edilen L- asparaginazdır. L- asparaginaz (L-ASNase) çeşitli kanser vakalarında (çocuk lösemisi başta olmak üzere, lemfosarkoma, melanosarkoma, non-Hodkin vb.) yüksek kemoterapötik değeri ile bilinmektedir. L-asparaginazın etki mekanizmasının temelinde L-asparagin amino asidinin parçalanması yatmaktadır. L-asparagin, hücre içerisinde asparagin sentetazlar tarafından sentezlenebilen esansiyel olmayan bir aminoasittir. Birçok tümör hücresi hızlı malignant büyüme için çok miktarda L-asparagine ihtiyaç duymaktadırlar. Normal hücrelerden farklı olarak tümör hücreleri asparagini sentezleyememekte ve bu nedenle beslenmeleri için kan dolaşımındaki asparagine ihtiyaç duymaktadırlar (Lanvers vd., 2002). L-asparagin eksikliğinde protein sentezi engellenmekte ve bunun sonucunda tümör hücrelerinin ölümü artmaktadır. Bu nedenle, L-asparaginazın kandaki L-asparagin havuzunu yok etmesine yönelik çalışmalar kanser tedavisi açısından oldukça önem arz etmektedir. L-ASNase tedavisi görmüş hastaların kanserli hücre sayısının azaldığı tespit edilmiştir (Aydın vd., 2004).

Kemoterapötide etkili L-ASNase'lar *E. coli* ve *Erwinia* türlerinden elde edilmektedir. (Phillips R.M. vd., 2013, Warangkar vd., 2010). Bakteriyel kaynaklı

olmaları nedeniyle L-asparaginaz çok çeşitli yan etkilere sebep olabilmektedir. Bunlar arasında hayati fonksiyonlara ciddi zararlar verebilen alerjik yan etkiler oldukça önemlidir. Buna ilaveten karaciğer fonksiyonlarında bozulma, tromboz gelişimi, pankreatit, serebral disfonksiyon, parotitis ve immün fonksiyon bozukluğu sayılabilir (Gençalp vd., 2011). İlacın toksik etki nedenleri arasında, L-asparagin ve glutamin seviyelerinin azalması sonucu albümin, pıhtılaşma faktörleri, insülin, lipoprotein gibi önemli proteinlerin sentezinin inhibisyonu yatmaktadır. L-ASNase komplikasyonlarının oranı %10-39 oranında rapor edilmiştir. Bu yan etkiler verilme yolu, doz ve verilme sıklığına bağlı olarak farklılaşmaktadır (Bay vd., 2005). Enjeksiyondan sonra plazma L-asparagin seviyesi hızlı düşmekle birlikte düşük düzeylerde 10 gün kadar devam eder. Bu süreçte L-ASNase protein metabolizması tarafından yıkılmaktadır.

Kontrollü ilaç dağılım sistemleri geleneksel ilaç formlarına kıyasla birçok avantaja sahiptir. Bu avantajların başında ilacın daha uzun süre ve etkin dozda vücutta bulunması gelmektedir. Ayrıca ilaca karşı vücut tarafından geliştirilen immün yanıtın ilaç üzerindeki etkilerini azaltmak yatmaktadır. Bu bağlamda L-asparaginaz gibi protein temelli ilaçlar için halihazırdaki en yaygın uygulama pegilasyondur. Bununla beraber daha etkili yaklaşımlara ihtiyaç vardır. Bu alanda nanoyapılar, lipozomlar, polimerler, dendrimerler, karbon malzemeler ve manyetik nanopartiküller dahil olmak üzere çeşitli nanoyapılar taşıyıcılar ve destek materyalleri oldukça yaygın olarak araştırılmaktadır. Buna ilaveten protein bazlı ilaçların yan etkilerini ortadan kaldırmada ve kan ortamındaki ilacın yarı ömrünü uzatmada kırmızı kan hücreleri ve son yıllarda ise yapay olarak dizayn edilen kırmızı kan hücre mimik sistemleri ön plana çıkmaktadır. Tez çalışmasının temel amacı; L-Asparaginaz enzim-ilac sistemi için yapay kırmızı kan hücreleri ile bir taşıyıcı platform oluşturmaktır. Bu kapsamda nişasta, oleik asit ve hemoglobin kullanılarak bir taşıyıcı yapay kırmızı kan hücre platformu oluşturulmuş yapısal, morfolojik ve enzimin immobilizasyon parametreleri açısından karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

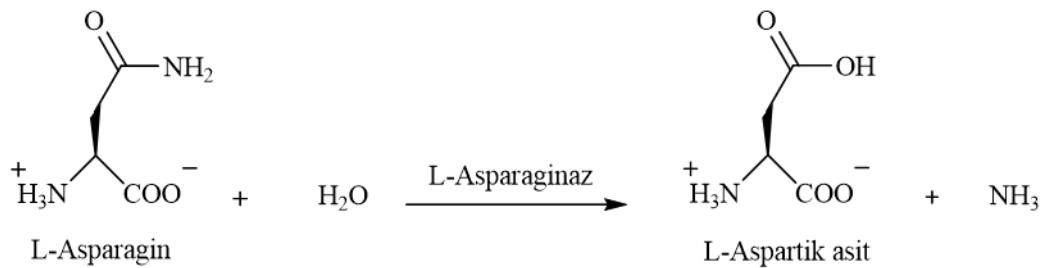
## 2. KURAMSAL TEMELLER

### 2.1. L-asparaginaz

Enzimler temel olarak protein yapısında olan ve doğal olarak canlılar tarafından hücrede sentezlenebilen, kimyasal reaksiyonların hızını artıran, hücre içerisinde oluşan birçok tepkimenin özgülüğünü düzenleyen, hücre dışında da etkinlik gösterebilen moleküllerdir. Ayrıca enzimler bilimsel birçok çalışmada, gıda endüstrisinde, aktif olarak kullanılmaktadır (Ahmad vd., 2012).

Son zamanlarda klinik çalışmalarda enzimler oldukça sık kullanılmaktadır. L-asparaginaz (L-asparagin amino hidrolaz, EC 3.5.1.1) enzimi klinik çalışmalarda sıklıkla kullanılan, lösemik hücreler için esansiyel bir aminoasit olan asparaginın amonyak ve aspartata bozulmasını katalizleyen, araştırmacılar ve bilim adamları tarafından geniş çapta araştırılan antineoplastik özelliklere sahip ilk terapötik enzimdir. L-asparaginaz antikanser ve antitümör özelliğine sahiptir.

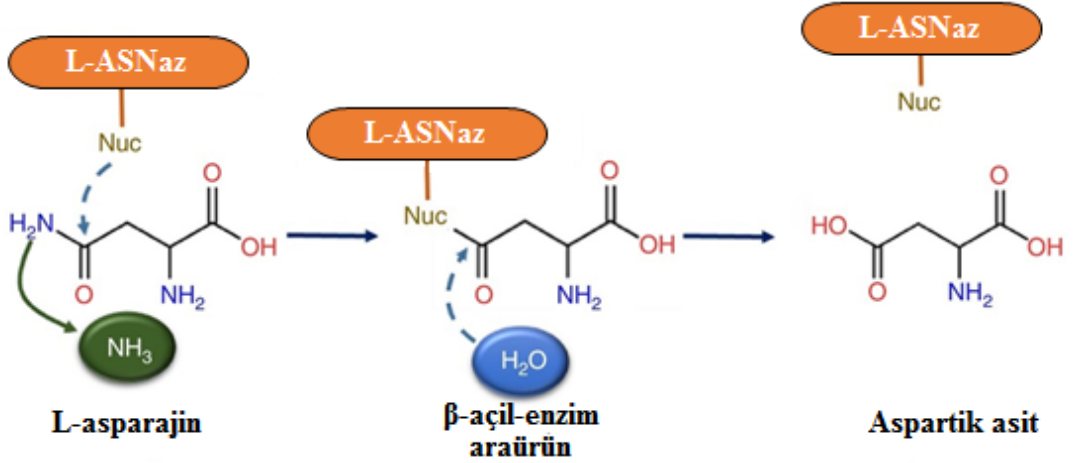
L-Asparaginaz (L-ASNase, L-asparagin amino hidrolaz, EC3.5.1.1), akut lenfoblastik lösemninin (ALL, özellikle çocuklarda ALL) ve Hodgkin hastalığı, akut dahil olmak üzere diğer malign hastalıkların tedavisinde kemoterapötik bir ilaç olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. L-asparaginaz, varlığında L-asparagin (L-Asn), L-aspartat (L-asp) ve amonyağa (NH<sub>3</sub>) hidrolize edilir.



**Şekil 2.1.** L-asparagin aminoasidinin L-aspartata hidroliz reaksiyonu

### 2.1.1. L-Asparaginazın Etki Mekanizması

L-asparaginazın temel etki mekanizması kanda bulunan L-asparagin amino asidinin hidrolizi ile bu amino asidi kanda belli bir düzeyin altına düşürmesidir. Normal hücreler, aminoasidi L-asparagin sentetaz vasıtasıyla üretebilir, ancak L-asparagin seviyesi yetersizse, amino asit kandan alınır. L-asparagin sentetaz içermeyen kanser hücreleri aminoasidi kendileri üretmediği için kandan almak zorundadırlar. L-ASNaz varlığında, L-asparagin, L-aspartat ve amonyağa hidrolize edilir. Yani, kanser hücreleri ihtiyacı olan L-asparagin amino asidini alamadıkları için yetersiz protein sentezi nedeniyle bölünemez ve ölürlür. L-asparagin hidroliz reaksiyonu, iki aşamalı serin proteaz mekanizmasına benzer ve aşağıdaki gibidir: İlk olarak, enzimin nükleofilik merkezi L-asparagin amid karbon atomuna saldırır ve ara ürün olarak olan beta-açil-enzimi oluşturur. İkinci reaksiyon adımı, bir su molekülü tarafından aktive edilen amid bağının hidroliz reaksiyonudur. L-asparaginaz, varlığında L-asparagin (L-Asn), L-aspartat (L-asp) ve amonyağa (NH<sub>3</sub>) hidroliz reaksiyonuna ait mekanizma Şekil 2.2’de verilmiştir.



Şekil 2.2. L-ASNaz reaksiyonunun genel hidroliz mekanizması (Cachumba vd., 2016)

### 2.1.2. L-Asparaginazın Kaynakları

L-Asparaginazın kemoterapötik etkisini sınırlayan faktörlerden biri üretildiği kaynaktır. Bu enzimin farklı izozimleri, insanlar hariç bitkiler, karasal ve deniz mikroorganizmaları dâhil olmak üzere çok çeşitli organizmalardan izole edilmiştir. L-asparaginaz bakteri, maya, mantar, bitki ve aktinomycetes gibi çeşitli kaynaklardan üretilse de (Ahmad vd., 2012), ticari L-asparaginaz, *Escherichia coli* (*E. coli*) ve *Erwinia chrysanthemi*'den elde edilir. Ayrıca L-asparaginaz enzimi bazı kemirgenlerin kan serumunda da yüksek yoğunlukta bulunmaktadır (Dhanam ve Kannan, 2013).

#### 2.1.2.1. Bakteriyel L-Asparaginaz Kaynakları

L- Asparaginaz kara ve deniz ortamından hem gram pozitif hem de gram negatif bakteri türlerinden üretilmektedir. Gram pozitif bakteriden üretilen L-asparaginaz enzimi gram negatiften üretilene göre miktar açısından daha önemsiz kabul edilmektedir. Gram negatif bakterilerin çoğundan iki ana tipte L-asparaginaz elde edilebilmektedir. Bu çeşitler Tip I ve Tip II olarak isimlendirilirler. Tip I, L-asparaginaz hem L-glutamin hem de L-asparagin amino asitlerinde etkinliğe sahipken, Tip II L-asparaginaz, L-asparagin üzerinde yüksek spesifik aktiviteye sahiptir ve sadece anaerobik durumda indüklenir (Shive vd., 2012). *E.coli* ve *Erwinia*'dan üretilen L-asparaginaz oldukça uzun zamandır ALL hastalığının tedavisinde etkili bir anti tümör ajanı olarak kullanılmaktadır (Hamid vd., 2018).

#### 2.1.2.2. Mantar L-Asparaginaz Kaynakları

Mantarlar, bakterilerle birlikte L-asparaginazın bir başka potansiyel kaynağıdır. Bakteriyel L-asparaginaz'lar çeşitli yan etkilere sahiptir. Bu yan etkiler uygulamalarını kısıtlayan ve süreci olumsuz etkileyen faktörlerdir. Bu durumdan ötürü yeni kaynaklardan elde edilebilecek L-asparaginaz arayışına girilmiştir. İnsanlar bakterilere kıyasla mantarlarla daha yakından ilgilidir. Bu nedenle, mantarlara karşı immünolojik reaksiyon gösterme ihtimali bakterilerden daha düşük olacaktır. Mantar kaynaklı L-asparaginaz hücre dışı üretildiği için ve hücre dışı

enzimi saflaştırmak daha kolay olduğu için önemli bir kaynak olarak görölmektedir. Bununla beraber Km değeri açısından kemoterapötik etkisi sınırlıdır.

### 2.1.2.3. Diğer L-Asparaginaz Kaynakları

Farklı kaynaklardan L-asparaginaz üretimine yönelik çalışmalar literatürde mevcuttur. *Saccharomyces sp.*, *Candida sp.*, *Pichia sp.*, *Rhodotorula sp.*, *Hansenula sp.* ve *Spobolomyces sp.* gibi mayalarda rapor edilen L-asparaginazların antitümör aktivitesi sergiledikleri ortaya konmuştur (Alternbern vd., 1954 ve Broome vd., 1965).

Aktinomisetler bakteriler ile mantarlar arası bir formdur. Aktinomisetler dünya çapında toprak su ve doğa açısından yaygındır, ancak yalnızca canlı hayvanlarda, özellikle balıklarda bulunan cinslerinin iyi enzimatik aktiviteye sahip oldukları bulunmuştur. Ayrıca aktinomisetler bakteri ve mantarlara kıyasla daha iyi bir L-asparaginaz kaynağıdır.

*Chlamydomonas sp.*, sarı ve yeşil alg, *Vaucheria uncinata*'nın L-asparaginaz üretimi ile ilgili raporlar mevcuttur.

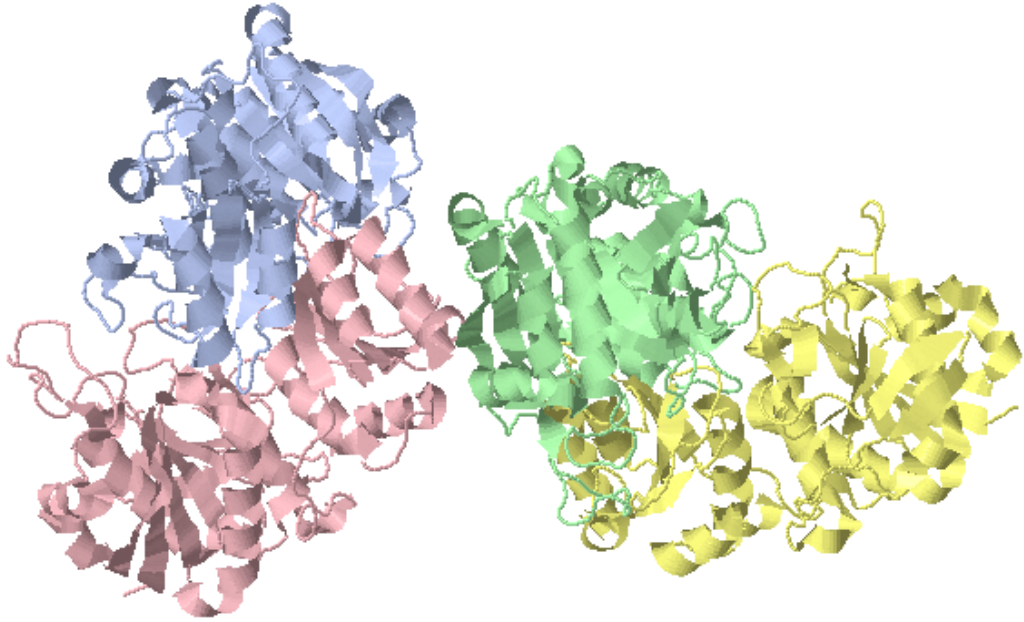
### 2.1.3. L-Asparaginazın Moleküler Yapısı

Birçok bilim adamı L-asparaginazın moleküler yapısını aydınlatmak için çeşitli araştırmalar yapmıştır. Bu araştırmaların en dikkat çekeni 1967 yılında Chambell ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadır. Bu alışma sonucunda *Escherichia coli B*'de iki L-asparaginaz (L-asparagin amidohidrolaz) bulunmuştur ve Tip I ve Tip II olarak isimlendirilmiştir. İki enzim, çözünürlükleri ve kromatografik davranışları ve ayrıca pH'ın bir fonksiyonu olarak aktiviteleri bakımından farklılık gösterir. Tip I adı verilen L- asparaginaz enzimi daha çok hücre sitoplazmasında bulunur. Tip II adı verilen L-asparaginaz enzimi ise hücre duvarı ve membranlar arasında bulunan periplazmik boşluklarda bulunur.

Genellikle L-asparajinaz enzimi tetramer yapıda bulunur ancak farklı kaynaklardan elde edilen asparaginaz örneklerinin hegzamerik, dimerik ve monomerik formları da tespit edilmiştir. Çoğu bakteriyel L-asparaginaz kuarternler ve tersiyer yapılar gösterir (Ramya vd., 2011). Bakteriyel L-asparaginazlar genellikle

benzer kuarterner ve tersiyer yapıda bulunup, aynı zamanda ortak birçok biyokimyasal özellik göstermektedir.

*E.coli* bakterilerinden elde edilen L-asparaginazların moleküler ağırlığı 133-144 KDa civarında olup diğer kaynaklardan elde edilen L-asparaginazlar ise 140-150 KDa moleküler ağırlıktadır. Bakteriyel kökenli L-asparaginazın, her biri sekiz  $\beta$ -heliks yapı ve 14  $\alpha$ -ipliksi yapı 330 amino asit uzunluğunda geniş N-terminal zinciri ve daha küçük C-terminal zincirden oluştuğu gözlenmiştir. L-asparaginaz 4 özdeş monomerden oluşan biyolojik olarak aktif olan, homotetramerik bir yapıdadır. Homotetramerik yapıyı oluşturan her bir monomer, komşu monomerle dimer oluşturarak kuarterner yapı göstermektedir (Ramya vd., 2012).



**Şekil 2.3.** *Escherichia coli* bakterisinden elde edilen L-asparaginazın üç boyutlu yapısı (Anonymous, 2019a).

#### **2.1.4. L-Asparaginazın Optimum Koşulları**

L-asparaginaz enziminin saflaştırıldığı kaynak, enzimin optimum pH koşullarının değişmesinde etkilidir. Bazı kaynaklardan elde edilen L-asparaginaz

enzimi alkali, bazıları nötral ve bazıları da asidik pH da kararlılıklarını devam ettirirler.

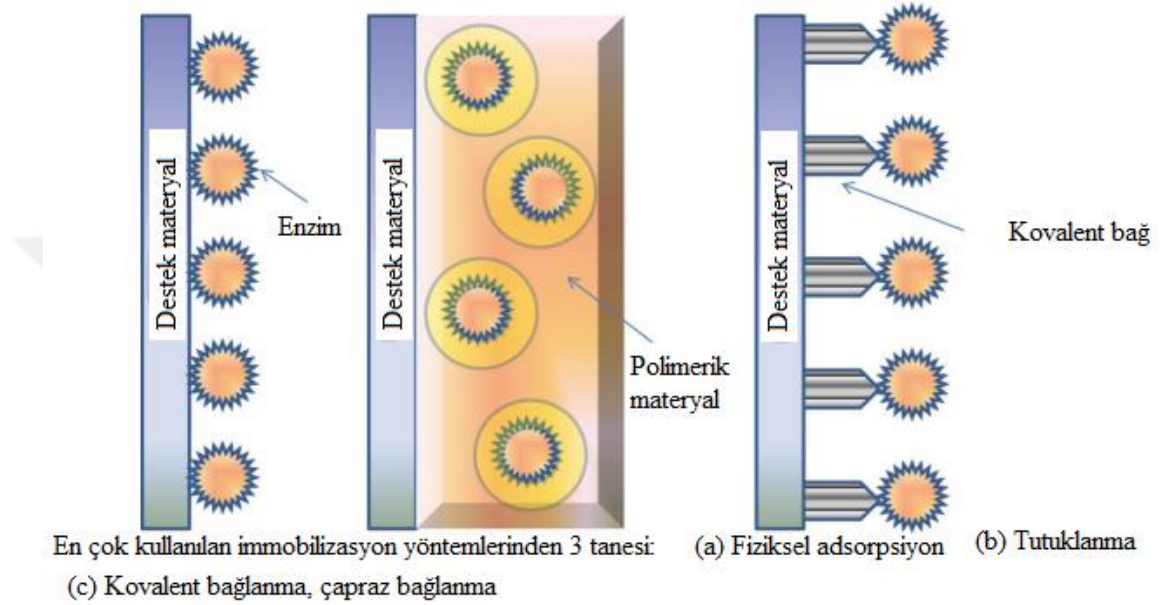
Başka bir örnekte ekstraselüler L-asparaginaz topraktan izole edilen *Bacillus* sp.'den elde edilmiş ve 37 °C'de optimum pH'sı 7 olarak ölçülmüştür (Yadav vd., 2014). L-asparaginaz enziminin sıcaklık değerleri de pH değerleri gibi kaynağın değişmesiyle farklılaşır, çünkü amino asit dizilimi ve yapısı değişiklik gösterir. Enzim üretimi inkübasyon sıcaklığındaki artışla yavaş yavaş azalmıştır. Bu, oksijen seviyesinde daha fazla düşüşe neden olabilecek ve böylece test organizmasının büyümesini azaltabilecek zayıf ısı dağılımı nedeniyle ortamda biriken ısı etkili olduğu şeklinde yorumlanmıştır. L-asparaginaz aktivitesi için optimum sıcaklık, 30 ila 75 ° C arasındaki geniş bir sıcaklık aralığındadır. Aktivitenin en yüksek olduğu sıcaklık ise 37 ° C' dir (Maladkar, 1993 ve Gallogher, 1989).

#### **2.1.5. L-Asparaginazın Depo Kararlılığı**

L-asparaginaz gibi kemoterapötik ajan olarak kullanılan enzimlerin depo kararlılıkları, raf ömürleri oldukça önemli bir faktördür. L-asparaginaz enziminin depolanması ve uygun koşullarda saklanması en önemli endişelerden biridir. Farklı mikrobiyal kaynaklardan gelen enzim, değişken depolama stabilite gösterir. Law ve ark., 1971'de *Bacillus coagulans* L-asparaginaz'ın donmuş halde 6 ay veya daha uzun süre stabil kalabileceğiyle ilgili bir çalışma yapmışlardır. Bir diğer çalışmada 1968 yılında Robert ve ark. liyofilize formundaki *E. coli* L-asparaginazın 5°C'de saklanabildiğini ve en az birkaç hafta boyunca stabil kalabildiğini, yüksek spesifik aktiviteye sahip steril bir enzim çözeltisinin de aktivite kaybı olmadan 5°C'de saklanabileceğini bildirmiştir. Tosa ve ark. tarafından 1972'de bildirildiği gibi *Proteus vulgaris* kaynaklı L-asparaginaz -20°C'de saklandığında 1 ay boyunca stabil kalabilirken, 3.5M amonyum sülfatta süspansiyon olarak 5 °C'de saklandığında 1 yıl boyunca stabil kaldığını ortaya koymuşlardır (Tosa vd.,1972). *E.coli* L-asparaginaz enzimi ayrıca aktivitede bir düşüş olmadan -40 ° C'de plazma çözeltisinde 1 yıl boyunca 1000U / ml olarak depolanabilir (Nath vd., 2009).

## 2.2. Enzim İmmobilizasyonu

Enzim immobilize edilmesi, enzimin, kinetik aktivitesini kaybetmeden belli bir bölgeye hapsedilmesi, tutuklanması anlamına gelmektedir (Chibata v.d., 1978). Enzim immobilizasyonunun birincil amacı, enzimi çözünmez hale getirmek ve böylece ayrılmasını ve yeniden kullanımını kolaylaştırmak olmuştur (Cao vd., 2003).



**Şekil 2.4.** En yaygın olarak kullanılan enzim immobilizasyon yöntemlerinin şematik gösterimi (Mohamad vd., 2015).

Enzimler veya “biyokatalizörler”, biyoteknoloji alanında dikkat çekici keşiflerdir. Biyokataliz, üretim kolaylığı, substrat özgüllüğü ve yeşil kimyası nedeniyle çeşitli sektörlerde yaygın olarak kabul görmüştür. Bununla birlikte, bu biyolojik olarak geliştirilmiş katalizörlerin büyük ölçüde ticarileştirilmesi için, yeniden kullanılabilirlik özelliklerin sağlanması oldukça önemlidir. Herhangi bir biyokimyasal reaksiyon sırasında yapısal stabilitesinin korunması oldukça zordur. Sonuç olarak, fonksiyonel verimliliğe ve arttırılmış tekrar kullanıma sahip immobilize edilmiş enzimler, maliyetlerine rağmen alternatif olarak kullanılmaktadır.

Enzim immobilizasyonu, enzimin substratlar ve ürünler için olandan farklı bir faza (matris/destek) bağlanmasıdır. Immobilize edilmiş enzimlerin özellikleri hem enzimin hem de destek malzemelerinin özellikleri tarafından yönetilir. İkisi

arasındaki etkileşim pratik uygulaması için belirleyici olabilecek immobilize edilmiş bir enzime özgü fizikokimyasal ve kinetik özellikleri verir. Bu nedenle makul şekilde seçilen bir destek, immobilize edilmiş sistemin operasyonel performansını önemli ölçüde artırabilir. Bu alanda inert polimerler ve inorganik malzemeler genellikle taşıyıcı matrisler olarak kullanılmaktadır.

Tüm enzimler ve bunların uygulamaları için evrensel bir destek olmadığı kabul edilmekle birlikte, enzimlerin immobilize edilmesi için düşünülen herhangi bir malzemede istenilen özellikler aşağıdaki gibi sıralanabilir (Krajewska v.d., 2004):

- Biyotransformasyon için proteinlere yüksek affinite,
- Enzimlerle doğrudan reaksiyonlar ve kimyasal modifikasyonlar için reaktif fonksiyonel grupların bulunması,
- Hidrofiliklik, mekanik stabilite, rijitlik, yenilenebilirlik ve sisteme geçirgenliği, uygun yüzey alanını sağlayan farklı geometrik konfigürasyonlarda hazırlık kolaylığı,
- İnertlik, fiziksel güç, stabilite, enzim özgüllüğü/aktivitesini artırma,
- Ürün inhibisyonunu, spesifik olmayan adsorpsiyon ve mikrobiyal kontaminasyonu azaltma,
- Gıda, ilaç, tıbbi ve tarımsal uygulamalar için malzemelerin toksisite ve biyouyumlu olması,
- Halk sağlığı ve çevre bilincine yanıt vermek için, materyallerin biyolojik olarak parçalanabilir olması,
- Ekonomik olarak ise ucuz olmasıdır.

### **2.3. Enzim İmmobilizasyonunun Avantajları**

Enzim immobilizasyonunun avantajları aşağıda sıralanmıştır (Krajewska v.d., 2004, Ateş v.d., 2018).

- Enzimin üründen daha kolay ayrılabilmesi (Enzimin üründen kolayca ayrılması, enzim uygulamalarını basitleştirir ve güvenilir ve verimli bir reaksiyon teknolojisini destekler.),
- Enzimin tekrar kullanılabilmesi (Enzimlerin tekrar kullanılması, ilk başta bir enzim katalizli işlemin oluşturulması için çoğunlukla gerekli bir önkoşul olan maliyet avantajları sağlar.),

- Enzim immobilizasyonunun, enzimin yapısını stabilize etmesi yani enzim kararlılığının artması,
- pH, sıcaklık gibi değişken ortamlarda enzimin dayanıklılığının artması,
- Enzimin birçok kere kullanılabilmesi ve bu durumun maliyeti düşürmesi,
- Oluşan ürünlerde enzim kalıntısının bulunmaması (Özellikle gıda sektöründe),
- Ürünün kolayca ayrılması,
- Atık sıvı miktarının azalması,
- Bazı durumlarda enzimin aktivitesinin artması,
- Enzimin yarılanma ömrünün uzaması,
- İmmobilize enzimin yarılanma ömründe ve serbest enzime kıyasla alerjik reaksiyonlarda belirgin bir şekilde daha yüksek bir stabilite göstermesidir.

#### 2.4. Enzim İmmobilizasyonunun Tarihçesi

Enzim immobilizasyonunun tarihçesinde 4 adım söz konusu olup Çizelge 2.1'de verilmiştir.

**Çizelge 2.1.** Enzim immobilizasyonunun tarihçesi.

<b>1.adım</b>	<b>1815</b>	Asetik asit ve atık su arıtma gibi işlemlerde ampirik kullanım,
<b>2.adım</b>	1960 lar	Tek enzim immobilizasyonu: L-aminoasit üretimi,glukoz izomerizasyonu vb.,
<b>3.adım</b>	1985-1995	Kofaktör rejenerasyonu ve hücre immobilizasyonu dahil çoklu enzim immobilizasyonu. Örnek: membran reaktörlerinde keto asitlerden L-aminoasit üretimi,
<b>4.adım</b>	1995 ten günümüze	Sürekli genişleyen multidisipliner gelişmeler, farklı araştırma ve endüstri alanlarında uygulamalar.

19. yüzyılın başlarındaki ilk adımda, mikroorganizmalar deneysel olarak endüstriyel anlamda kullanılmıştır. Örnek olarak, sirke üretiminde ve atık suyun arıtılmasında bakterilerin kullanılması verilebilir.

Modern enzim immobilizasyon tarihi 1940'lı yılların sonlarına dayanır ancak ilk çalışmaların çoğu diğer disiplinlerin dergilerinde yayınlanmıştır. 1960'lı yılların başında immobilize edilmiş enzimler üzerindeki öncü çalışmaların mevcut teknolojilerin temelini geliştirdiği için bu konuda 10.000'den fazla makale ve patent yayınlanmıştır. Bu durum da bilim camiasının ve endüstrinin bu alandaki yoğun ilgisini göstermektedir. İkinci aşamada sadece immobilize edilmiş tek enzimler kullanılmıştır ancak 1970'lerdeki kofaktör rejenerasyonu ve canlı hücreler ile iki enzim reaksiyonu dahil olmak üzere daha karmaşık sistemler geliştirilmiştir.

Bu adımın bir örneği olarak L-aminoasit dehidrojenaz ile stereoselektif indirgeyici aminasyon ile  $\alpha$ -keto asitlerden L-aminoasitlerin üretilmesinden bahsedilmektedir. Son birkaç on yılda immobilize edilmiş enzim teknolojisi klinik, endüstriyel ve çevresel örneklere uygulamalar ile multidisipliner bir araştırma alanı haline gelmiştir (Brena v.d., 2013).

## **2.5. Enzim İmmobilizasyonunda Kullanılan Destek Materyalleri**

Enzimler destek ve enzim arasında zayıf etkileşimlerin olduğu ve fiziksel olarak kovalent bağların enzim ile oluşturulduğu kimyasal ve fiziksel olarak sınıflandırılacak çeşitli yöntemlerle immobilize edilebilirler. Ancak her enzim için kabul edilen genel bir yöntem bulunmamaktadır. Organik taşıyıcılar enzim immobilizasyonunda genel itibariyle ön plandadır.

Enzimin immobilize edildiği yüzey, elektron geçiş kompleksleri oluşturarak veya matris ile hidrojen veya kovalent bağlar oluşturarak enzimin üç boyutlu yapısını koruyacak şekilde oynayacak birkaç temel role sahiptir (Mohamad v.d., 2015 ve Orhan, 2018). Bir enzimin bir yüzey üzerinde hareketsizleştirilmesinde kilit husus, matris yüzeyinde reaktif gruplar ile substrat bağlanması veya enzimin aktif bölgesi dışındaki kalıntılar arasında seçilen bağlanma yönteminin iyi seçilmesidir.

Matrisin özellikleri immobilize edilmiş enzim sisteminin performansının belirlenmesinde çok büyük önem taşır. Matrislerin fiziksel özellikleri (ortalama parçacık çapı, şişme davranışı, mekanik dayanım, sıkıştırma davranışı gibi), immobilize edilmiş sistemlerin performansını olumlu yönde değiştirir. Özellikle, gözenek parametreleri ve partikül büyüklüğü toplam yüzey alanını belirler ve böylece enzimlerin bağlanma kapasitesini kritik derecede etkiler.

Kullanılan matrisler aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir:

***Organik doğal polimerler***

- Polisakaritler: Nişasta, selüloz, dekstrans, agar, agaroz, kitin, aljinat gibi.
- Proteinler: Kollajen, albümin gibi.
- Karbon

***Sentetik polimerler***

- Polistiren
- Diğer polimerler: Poliakrilat, polimetakrilatlar, poliakrilamid, poliamitler, vinil ve allil-polimerler

***İnorganik doğal mineraller***

Bentonit, silika

***İşlenmiş malzemeler***

Cam (gözeneksiz ve kontrollü gözenek), metaller, kontrollü gözenekli metal oksitleri

**2.6. Destek Materyali Seçiminde Temel Hususlar**

Enzimlerin immobilizasyonunda destek materyalin seçiminde dikkat edilecek hususlar Çizelge 2.2’de verilmiştir.

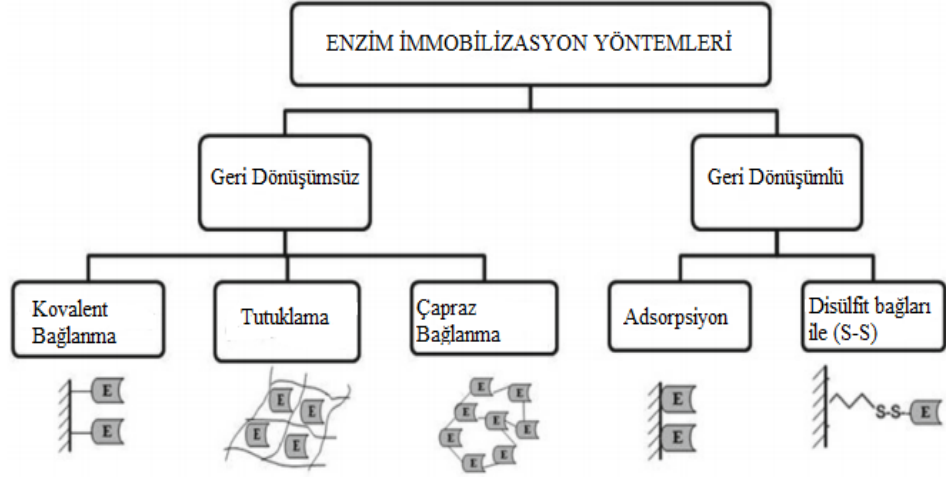
**Çizelge 2.2.** Destek seçimindeki temel hususlar ve immobilizasyon yapılırken dikkat edilmesi gerekenler.

Özellik	Dikkat Edilecek Noktalar
Fiziksel	Güç (mukavemet derecesi), mevcut yüzey alanı, gözeneklilik derecesi, gözenek hacmi, geçirgenlik, yoğunluk, artan biyokütle için boşluk, akış hızı ve basınç düşüşü.
Kimyasal	Hidrofiliklik (desteğin suya bağlanması), enzim hücreye karşı inertlik, modifikasyon için mevcut fonksiyonel gruplar ve desteğin yeniden kullanılması
Kararlılık	Depolama, enzim aktivitesi, hücre verimliliği, enzim aktivitesinin tekrarlanabilirliği, hücre kullanılabilirliğinin sürdürülmesi ve destek malzemesinin mekanik stabilitesi
Direnç	Bakteriyel/fungal kontaminasyon, kimyasallar, pH, sıcaklık, organik çözücü, proteazlar ve hücre savunma mekanizması, biyouyumluluk, bileşen reaktifinin toksisitesi
Toksisite	Proses çalışanları ve son ürün kullanıcıları için biyouyumluluk
Ekonomik	Endüstriyel ölçekli kimyasal hazırlama, ölçek büyütme, sürekli işleme, etkin çalışma ömrü, yeniden kullanılabilir destek malzemesi, kolay rejenerasyon
Tepkime	Kofaktörlerin difüzyon sınırlamaları, substratların ve ürünlerin kütle transferleri

## 2.7. Enzim İmmobilizasyon Teknikleri

Enzim immobilizasyon yöntemlerini genel olarak ikiye ayırmak mümkündür.

- 1- Geri dönüşümsüz immobilizasyon yöntemleri
- 2- Geri dönüşümlü immobilizasyon yöntemleri



Şekil 2.5. Enzim immobilizasyon yöntemleri (Brena vd., 2013)

### 2.7.1. Geri Dönüşümsüz İmmobilizasyon Yöntemleri

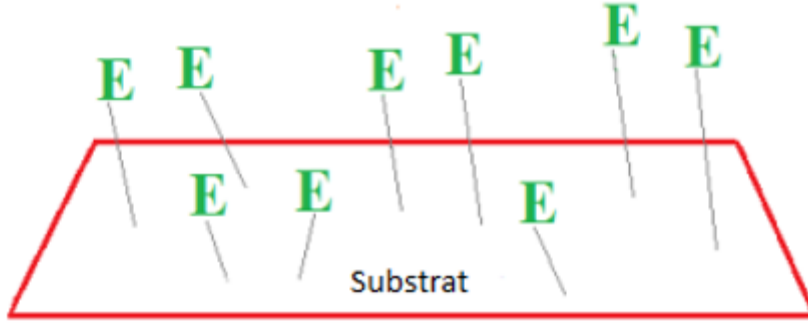
Geri dönüşümsüz immobilizasyon kavramı, biyokatalizör desteğe bir kez eklendiğinde, enzimin biyolojik aktivitesini veya desteğini tahrip etmeden ayrılmayacağı anlamına gelir. Geri dönüşümsüz enzim immobilizasyonunun en yaygın prosedürleri kovalent bağlanma, tutuklama veya mikro kapsülleme ve çapraz bağlanmadır (Brena v.d., 2013).

#### 2.7.1.1. Kovalent Bağlanma

Kovalent bağların oluşumuna dayanan yöntemlerle proteinlerin immobilizasyonu en yaygın kullanılan tekniklerden biridir. Enzim ve destek fonksiyonel grupları arasındaki kimyasal bağlanma olarak açıklanabilir. Enzim salımının olmaması ve enzim stabilizasyon potansiyelinin oluşu avantajları olarak sayılabilir. Matrisin ve enzimin yenilenebilir olmaması ve aktivite kaybı başlıca dezavantajlarıdır (Brena v.d., 2013).

Kovalent bağlanma güçlü ve stabildir. Enzimlerin destek malzemesi poliakrilamid, gözenekli cam, agaroz ve gözenekli silika içerir. Kovalent immobilizasyon metodu esas olarak, bir reaksiyon prosesi üründe enzim

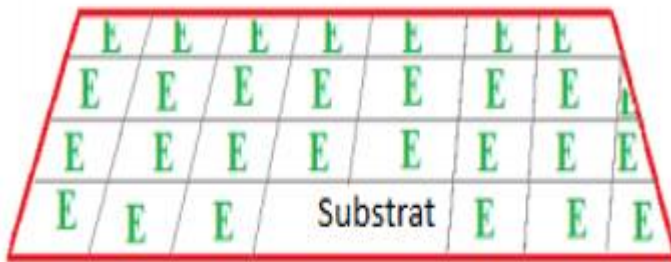
gerektirmediginde kullanilir. Bu durum kovalent immobilizasyon metodunu secme kriteridir. Enzimin destek malzemesine kovalent baglanmasi, destek malzemesinin reaktif bilesinin eklenmesiyle etkinlestirilmesi ve ikincisi ise matrisin aktive edilmesi icin polimer omurgasinin modifikasyonu gibi ana unsurlara sahiptir (Nisha v.d., 2012).



Şekil 2.6. Kovalent bağ ile immobilizasyon (Mohamed vd., 2016)

#### 2.7.1.2. Tutuklama (Entrapment)

Tutuklama yöntemi, substrat ve ürünlerin geçmesine izin veren ancak enzimi koruyan polimerik bir ağ içinde bir enzimin alıkonmasına dayanır. Enzim bağlanmasını kovalent bağ ile ya da fiziksel bağlanma ile yapma durumuna göre, tutuklanma yöntemi fiziksel ve kimyasal tutuklama yöntemi olarak ta sınıflandırılabilir.



Şekil 2.7. Tutuklama ile immobilizasyon (Mohamed vd., 2016)

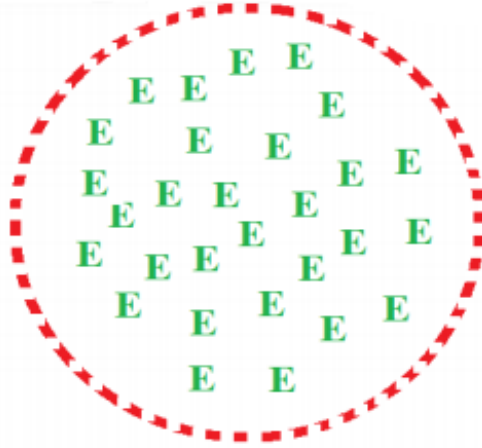
Ayrıca suda çözünmeyen polimer jellerde enzimin hareketi kısıtlanarak jel tutuklama gerçekleştirilir. Suda çözünmeyen polimer jeller jelatin, kalsiyum aljinat

ve kollajen gibi maddelerden elde edilir. Jel tutuklama esnasında sıcaklığın ve pH değerlerinin değiştiği gözlemlenebilir (Costa vd., 2005).

### 2.7.1.3. Mikrokapsülleme

Bu yöntemin amacı yarı geçirgen bir membran içerisine enzimin tutuklanmasıdır (Akova, Aylin., 2002). Enzim yarı geçirgen membran içerisine hapsediği için serbest hareket edemez (Ulu., 2014). Mikrokapsüller 1 ile 100 µm çapındadır. Yapı genellikle küre şeklinde yarı geçirgen bir membran içine hapsedildiğinden, yöntem, kapsülleme ya da mikrokapsülasyon olarak adlandırılır. Böylece enzimin yüzey alanı artmış olur. Yöntemin, hızlı olması, reaksiyonun rahat ve kolay olması gibi avantajlarının yanı sıra enzim aktivitesinin düşük olması, gereğinden fazla enzim kullanılmasını gerektirmesi gibi dezavantajları da mevcuttur.

Kapsülasyon tekniğine en iyi örneklerden biri lipozomlar olup hidrofilik ve hidrofobik bileşikleri kapsüllemeye kullanılan ve lipitlerden oluşan iki tabakalı küresel kesecikleridir. Lipozomların en büyük avantajlarından biri hem su hem de yağda çözünebilen bileşenleri kapsüle edebilmesidir (Uygun, Murat., Yüksek Lisans 2006; Tanaka vd., 1999).

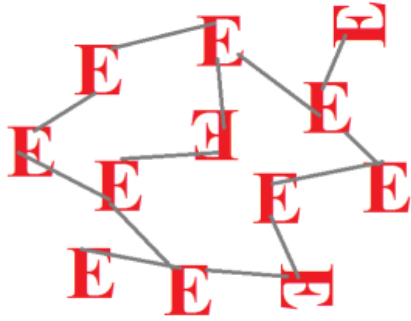


Şekil 2. 8. Kapsülasyon ile immobilizasyon (Mohamed vd., 2016)

#### 2.7.1.4. Çapraz bağlama

1960'ların başında katı faz protein kimyası çalışmaları, enzim kristallerinin ya da çözülmüş enzimin, glutaraldehit gibi iki fonksiyonlu bir kimyasal çapraz bağlayıcı ile çapraz bağlanmasının enzim immobilizasyonunda kullanılabileceğini ortaya koymuştur (Cao vd.,2003).

Çapraz bağlama, enzim moleküllerini kovalent olarak bağlayarak üç boyutlu enzim agregalarının yapımını ifade eder. Bu metodolojinin ana dezavantajı, agregaların boyutunu kontrol etme zorluğunu, agregaların çekirdeklerine substrat erişilebilirliğini ve çapraz bağlı enzimin mekanik mukavemetinin bulunmamasını içerir. Bu problem, bu yaklaşımı, diğer enzim immobilizasyon teknikleriyle birleştirerek aşılabılır. Örneğin, bir enzim, üç boyutlu bir ara bağlantı kafesleri ağında fiziksel olarak adsorbe edilebilir (X.S. Zhao v.d.,2006).



Şekil 2.9. Çapraz bağlama ile immobilizasyon (Mohamed vd., 2016).

#### 2.7.2. Geri Dönüşümlü İmmobilizasyon Yöntemleri

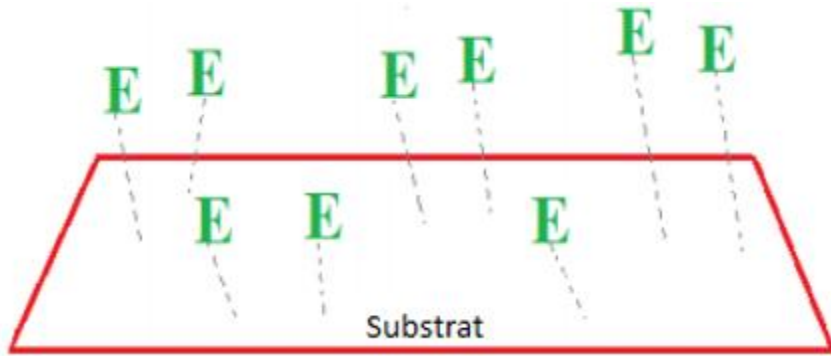
Geri dönüşümlü immobilize enzimler, enzim-taşıyıcı bağlarından ötürü farklı koşullarda taşıyıcıdan ayrılabilir. Enzim immobilizasyonunda geri dönüşümlü metodlar maliyetin daha düşük olması sebebiyle daha kullanışlıdır. Çünkü destek tekrar kullanılabilir. Destek maliyeti immobilizasyonun maliyetini belirlemede esas olan durumlardan biridir.

### 2.7.2.1. Fiziksel adsorpsiyon

Fiziksel adsorpsiyon yöntemi, enzimlerin fiziksel olarak adsorbe edilmesini veya destek malzemesine tutturulmasını içeren geri dönüşümlü immobilizasyon yöntemlerinden biri olarak tanımlanabilir (Mohamad v.d.,2014).

Fiziksel adsorpsiyon yöntemi, enzim immobilizasyonunda kullanılan en basit ve en eski yöntem olarak kabul edilmektedir (Nelson v.d., 1916). Adsorpsiyonun gerçek amacı enzimin immobilizasyonundan ziyade enzim saflaştırmaktır. Yöntemde enzim, suda çözünmeyen bir taşıyıcının üzerine adsorplanır. Adsorpsiyon, Van der Waals, hidrofobik etkileşimler ve hidrojen bağları gibi zayıf spesifik olmayan kuvvetlerle oluşabilir (Nelson v.d., 1916, Flor v.d., 1983).

Enzim immobilizasyonunda en fazla kullanılan adsorbanlar; nişasta, aktif karbon, kalsiyum fosfat, gözenekli cam, silika jeldir. Fiziksel adsorpsiyon yönteminin avantajı değişik şekil ve yükteki destek materyallerini seçme olanağı sunması, enzim immobilizasyon işleminin basit olması, enzimin immobilizasyonu oluşurken diğer taraftan enzimin saflaşmasına imkan vermesi olarak sayılabilir. Yöntemle ilgili dezavantajlar ise immobilizasyon işlemi kolay olmasına rağmen immobilizasyon işlemleri sırasındaki koşulları saptamak oldukça zordur.

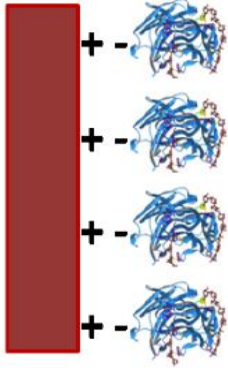


Şekil 2.10. Fiziksel adsorpsiyonla ile immobilizasyon (Mohamed vd., 2016).

### 2.7.2.2. Kimyasal Etkileşim

Enzim immobilizasyonunda geri dönüşümlü farklı kimyasal etkileşimler kullanılmaktadır. Bunlardan biri iyonik etkileşimler olup önemli bir yere sahiptir. Yöntem basit ve geri dönüşümlüdür ancak genel olarak, enzimin hem güçlü bir

şekilde bağlı hem de tamamen aktif kaldığı koşulları bulmak zordur. Enzim ve destek malzemeleri arasındaki bağ tuz köprüleri ya da iyonik etkileşimlerdir.



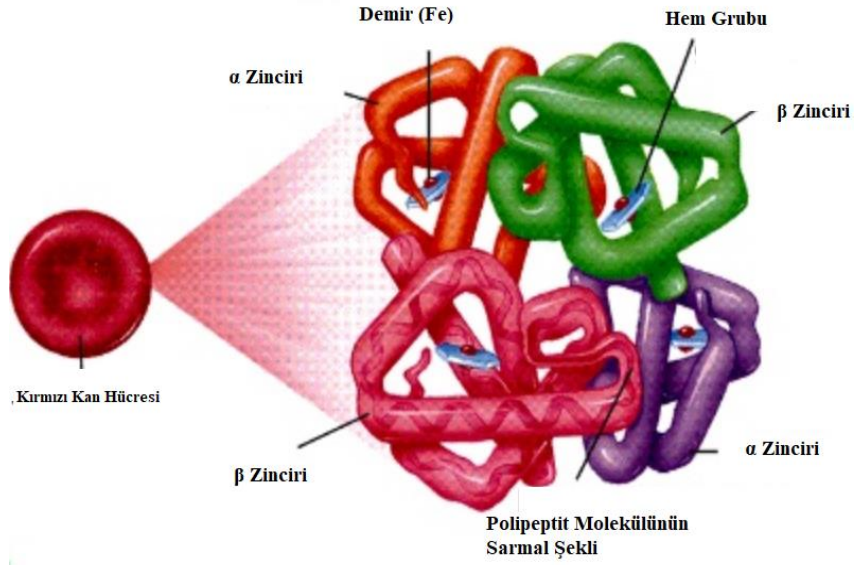
**Şekil 2.11.** İyonik bağlanma (Nisha S.v.d., 2012).

Destek ile enzim arasında geri dönüşümlü kovalent bağ olan S-S bağlarının oluşması için, enzimler çeşitli destek materyallerine immobilize edilebilirler. Burada disülfid bağı oluşumu için, uygun ajanlar kullanılarak bağlarının kolay kopması nedeniyle oldukça farklıdır (Brena ve Batista-Viera, 2006).

## 2.8. Kırmızı Kan Hücreleri ve İlaç Taşıma

Kırmızı kan hücreleri, diğer adıyla eritrositler (RBC) kanın hücre bölümünün neredeyse tamamını oluştururlar. Çoğu hücrelerin aksine çekirdekleri bulunmadığı için esnektirler. Esnek yapıda bulunmalarından ötürü vücutta kan damarları aracılığıyla her alana kolaylıkla ulaşırlar. Ancak bu durum hücrelerin ömrünü sınırlamış olur.

Kırmızı kan hücreleri, içlerindeki hemoglobin sayesinde oksijen ve karbondioksit taşınmasında rol oynar. Ayrıca kana kırmızı rengini veren hücredir. (Taşımakta oldukları hemoglobin ve merkezlerindeki Fe sayesinde kan kırmızı görünür.)



**Şekil 2.12.** Kırmızı kan hücreleri ve hemoglobin molekülünün görünümü (Banerjee and Aniyery 2017)

Mikroküreler, lipozomlar ve nanopartiküllerde olduğu gibi kırmızı kan hücrelerinin de ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılabileceği, böylece içine yüklenmiş etken maddelerin *in vivo* koşullarda hızlı bir şekilde parçalanarak inaktive olmaktan korunabileceği, uzatılmış etki sağlanabileceği, ayrıca hedef hücre ve dokulara etken maddenin taşınabileceği rapor edilmiştir. Kırmızı kan hücreleri 8  $\mu\text{m}$  çapında, disk biçiminde, iki tarafı çukur bikonkav biçimdedir. Bu yapı kırmızı kan hücrelerine geniş bir yüzey/hacim oranı sağlamaktadır. Bu özel yapı sayesinde eritrositlerin membranı fazla gerilmeden şişebilmekte ve bol miktarda oksijen ve karbondioksit taşıyabilmektedir. Küçük kan damarlarından geçerken kolayca şekil değiştirebilmektedirler ancak bu değişiklik geçicidir. Bu özellikleri ile kırmızı kan hücrelerine çeşitli teknikler kullanarak birçok ilaç etken maddesi yüklenebilmektedir.

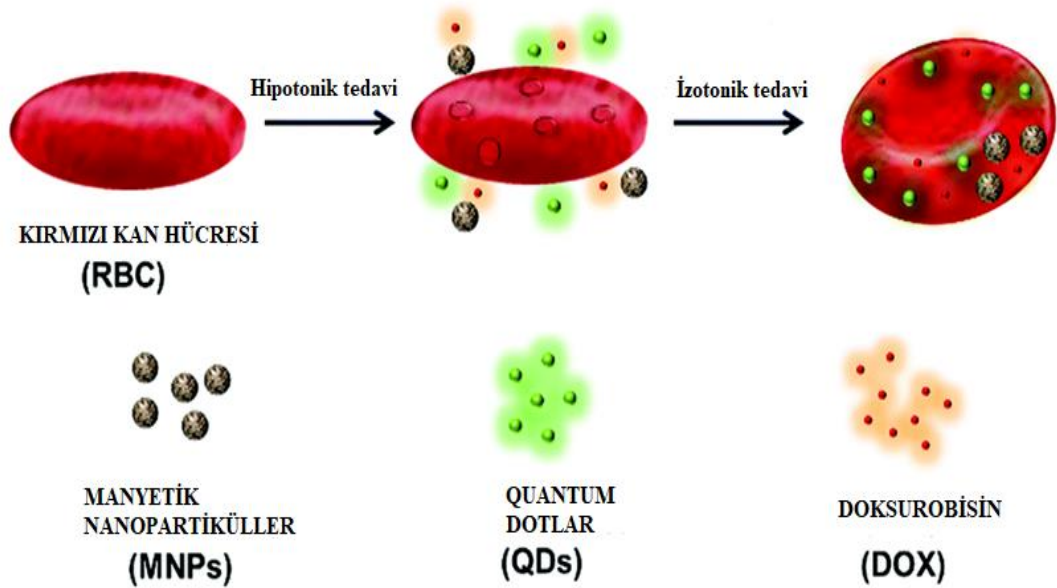
## 2.8.1. Kırmızı Kan Hücrelerine Etken Madde Yükleme Yöntemleri

Kırmızı kan hücrelerine iki farklı etken madde yükleme yöntemi göze çarpar. Bunlar;

- *Hipoosmotik lizis yöntemi*
- *Elektriksel şok yöntemi*

### 2.8.1.1. Hipoosmotik Lizis Yöntemi

Hücre hipotonik bir çözeltiye konursa su dışarıdan hücreye girer. Hücre şişer hatta membranın yırtılmasıyla lizis olabilir. Hücredeki yapılar hipoosmotik çözeltiye doğru geçer. Hücrenin dış yüzeyinde porlar oluşur. Bu oluşan porlardan istenilen ilaçlar kırmızı kan hücrelerine yüklenebilir (Şekil 13).

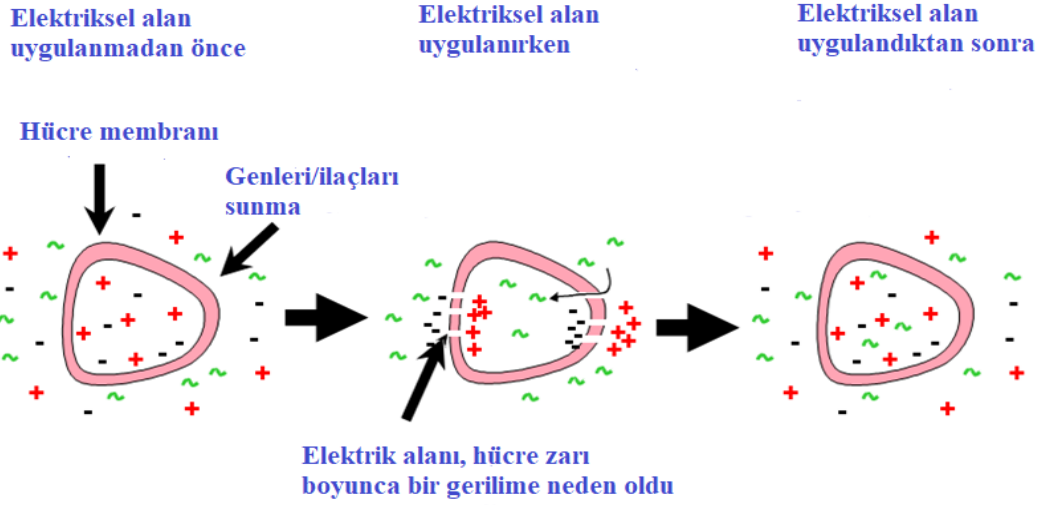


Şekil 2.13. Kırmızı kan hücresine ilaç ve manyetik nanopartiküllerinin yüklenmesi (Wu vd., 2015).

### 2.8.1.2. Elektriksel Şok Yöntemi

Elektroporasyon olarak ta bilinen bu yöntem, hücelere kısa süreli yüksek güçte elektriksel alan uygulayarak hücre zarında nanometre boyutunda geçici

gözenekler açılması mantığına dayanmaktadır. Bu sayede ilaç ve biyolojik materyaller kolayca hücre içine yüklenebilmektedir.



Şekil 2.14. Elektroporasyon yöntemi ile hücrelere ilaç etken maddesi yüklenmesi (Anonymous, 2019b).

## 2.8.2. Taşıyıcı Sistem Olarak Kırmızı Kan Hücrelerinin Avantajları ve Dezavantajları

Kırmızı kan hücrelerinin taşıyıcı sistem olarak kullanılmasının avantajları aşağıda sıralanmıştır.

- Biyolojik sistemlerde biyogeçimliliği yüksektir.
- Etken maddede kimyasal modifikasyona gerek yoktur.
- Genelde hastanın kendi kırmızı kan hücresi kullanıldığından alerjik reaksiyon meydana getirmezler.
- Kırmızı kan hücresi içinde taşınan etken madde enzimatik parçalanmadan korunur.

Kırmızı kan hücrelerinin taşıyıcı sistem olarak kullanılmasının dezavantajlar aşağıda sıralanmıştır.

- Kullanılan etken madde yükleme yöntemine bağlı olarak kırmızı kan hücrelerinin biyokimyasal yapısında meydana gelen küçük değişiklikler,

Örneğin; glikoproteinlerin ayrılması, membran sertliğinin artması, membrandaki sülfidril gruplarının oksidasyonu gibi,

- Bu hücrelerin organizmada genel dolaşımdaki kalış sürelerinin ve biyolojik davranışlarının değişmesi,
- Kan bankalarında saklanmalarında *in vitro* stabilite probleminin olmasıdır. Normal transfüzyon kanındaki kırmızı kan hücrelerinin saklanma süreleri birkaç hafta iken, etken madde yükleme işlemi sırasında kısmen zarar görmüş kırmızı kan hücrelerinin saklanma süreleri daha da kısalmaktadır.

## 2.9. Yapay Kırmızı Kan Hücresi

Yapay kırmızı kan hücreleri kırmızı kan hücre membran ve sisteminin taklit edildiği sentetik yapılardır. Nanopartiküller, nanotübüller, lipozomlar, polimer bağlanmış lipid vezikülleri, polimerler, mikrokapsüller ve sentetik hücreler örnek verilebilir. Yapay kırmızı kan hücreleri kan ikame malzemeleri olarak da bilinir. Yapay kırmızı kan hücrelerinin kullanılmasının avantajları vardır.

- Kan yerine kullanılıp aynı zamanda kan grubu farkına bakılmaksızın her insana verilebilmesi,
- Uzun raf ömrü,
- Kan yoluyla bulaşabilecek herhangi bir hastalığın bulaşabilme ihtimalinin ortadan kaldırılması olarak sayılabilir.

### 2.9.1. Yapay Kırmızı Kan Hücrelerinin İlaç Taşıma Sistemi Olarak Kullanılması

İlk yapay kırmızı kan hücreleri, alyuvarların oksijen taşıması, karbondioksit taşıması ve antioksidan aktivite gibi fonksiyonlarını yerine getirmiştir. 1980'li yıllarda HIV virüsünün ortaya çıkmasıyla kırmızı kan hücrelerinin ilaç taşımaya ilişkin çalışmalar sektöre uğramıştır. Bu nedenle yapay hücrelerle gen ya da ilaç gibi taşıma sistemlerinin geliştirilmesi önemli bir konu olmuştur. Bunun için tamamen yapay bir kapsülasyon membranı oluşturma veya kırmızı kan hücresi gibi biyolojik canlılığı olan bir hücrenin içerisi tamamen boşaltılıp hücre membranı, geliştirilecek nano ilaç taşıyıcılar için bir yüzey kaplama materyali olarak kullanma yoluna gidilmiştir. Özellikle yapay kan hücresi oluşturmada biyolojik olarak uyumlu

biyopolimerlerden veya sentetik polimerlerden yararlanılmıştır. Özellikle nişasta gibi bir biyopolimer ve PLA gibi sentetik biyoyumlu polimerler bu alanda en yaygın kullanıma sahip yapılardır. Yapay olarak dizayn edilen bu sistemlerin vücut immün sistem yanıtından daha az etkilenmesi ya da gizlenmesi amacıyla farklı yüzey modifikasyonları yapılmaktadır.

Yüzey modifiye olmayan veya hidrofobik nanopartiküller dolaşımında iken büyüklük ve yüzey karakteristiklerine bağlı olarak başlıca karaciğer ve dalak olmak üzere mononükleer fagositik sistem (MPS) tarafından yakalanırlar. Bu sorunu ortadan kaldırmak için nanopartiküller hidrofilik polimerler ile kaplanabilirler, böylece partiküller makrofajlarca yakalanmaktan korunurlar. Hidrofilitenin artırılması ayrıca partikülü suda daha çözünür yapmasının yanında enzimatik degradasyona karşı daha az hassas olmasını ve böylece biyoyumluluğunun artmasını sağlar.

## **2.10. Kaynak Özetleri**

L-Asparaginaz akut lenfoblastik lösemi (ALL) tedavisinde geniş bir şekilde kullanılmaktadır. Ancak yüksek terapik etkisine karşın L- Asparaginaz'ın terapötik kullanımı ateş, cilt isiliği, alerjik reaksiyonlar gibi ciddi yan etkilere sebep olabilir (Mate vd., 1970 ve Jaffe vd., 1973). Ayrıca L- asparaginaz kısa bir zaman için kan sisteminde dolaşır ve vücuttaki proteazlar tarafından parçalanabilir. Bu enzimin sebep olduğu immünolojik yanıtları azaltmak, enzimin etki zamanını uzatmak ve kandaki ilaç etkilerini arttırmak için, immobilize edilmiş çeşitli L- asparaginaz kullanımı önemlidir. L-asparaginaz immobilizasyonunda albümin (Poznansky vd., 1982) dextran (Wileman, 1991) polietilenglikol (PEG) (Ashihara vd., 1978) ve polivinil alkol (Nambu, 1986) gibi doğal ve yapay polimerler kullanırlar. Sadece çözünen bir biyoyumlu polimer olan PEG modifiyeli L-Asparaginaz (pegaspargase) Enzon Inc (Piscataway, NJ, USA) tarafından ticari olarak üretilmektedir (Holle, 1997). Diğer yandan kollojen (Alvarez, 2000) CM-selüloz (Jefferies vd., 1977) ve poliakrilamid ve poli 2-hidroksietil metakrilat jeller (Hasselberger vd., 1970 ve Mori vd., 1974) gibi matriks destekli suda çözünmeyen immobilize sistemler ortaya konmuştur. Bu bağlamda L- asparaginazı immün sistemin etkilerinden kurtaracak ve

daha uzun ve etkin bir tedavi sunacak biyopolimerik taşıyıcıların ortaya konması oldukça önemlidir.

Son yıllarda özellikle kırmızı kan hücreleri ilaç taşınımı veya yapay olarak dizayn edilen biyobenzer kırmızı kan hücre sistemleri ile kan ikamesi ve ilaç taşınımı ilgi çekmektedir. Bu alanda ilk çalışma Gardos'un 1953 yılındaki kırmızı kan hücrelerinin içini boşaltıp (eritrosit ghost) ve ATP molekülü yüklemesi gerçekleştirdiği çalışmasıdır (Xia vd., 2019). Daha sonraları bu alanda farklı çalışmalar yapılmaya başlanmış ve özellikle 1970'lerde  $\beta$ -glukosidaz ve  $\beta$ -galaktosidaz kırmızı kan hücreleri ile taşınarak Gaucher's hastalığının tedavi edilmesi ile ilgili çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Haley vd., 1961). Bilimsel çalışmalarda L-asparaginazı'da içeren birçok enzim için kırmızı kan hücreleri taşıyıcı sistem olarak kullanılmaya başlanmıştır. 1994 yılında Lejeune vd., farklı bir çalışma ile kırmızı kan hücre membranı kullanarak lipozomlar oluşturmuşlar ve bunları "nanoeritrozomlar" olarak tanımlamışlardır (Lejeune vd., 1994). Bu sistemlerde lipozomlar kırmızı kan hücre membranının ezilmesi, yeniden düzenlenmesi ve basit aktif moleküllerin oluşturulan lipozom yapısına entegrasyonu ile işlemler gerçekleştirilmektedir. Bu sistemlerin de özellikle kan ortamında yarı ömür ve kümelenme gibi sorunları mevcuttur. Bu nedenle son yıllarda yapay kırmızı kan hücreleri veya biyouyumlu polimerler ile kırmızı kan hücre membranlarını içeren kombine yapılar oldukça güncelliğini korumaktadır. Bu yapılar hem kırmızı kan hücre takviyesi anlamında oksijen taşıyıcı sistem olarak hem de ilaç taşıyıcısı olarak kullanılmaktadır.

Xu vd., çalışmalarında, hemoglobinin (Hb) uzun zincirli yağ asidi aşılınmış nişastasını kullanarak oksijen taşıyıcısı olarak, yapay kırmızı kan hücreleri oluşturmuşlar; fiziksel, kimyasal ve sıçan hemorajik şok modelinde biyolojik özellikleri ile terapötik etkilerini değerlendirmişlerdir. Elde edilen ürünlerin partikül boyutu yaklaşık 250 nm olarak bulunmuştur. Oluşturulan yapıların *in vitro* hemoliz ve prokoagülatif özellikte olmadıkları tespit edilmiştir. Nanopartiküller farelere kuyruk damarı yoluyla enjekte edildiğinde, toplam trombosit sayıları azalmamıştır. Hemorajik şoku olan sıçanlar iyileşmiş ve yapay kırmızı kan hücre takviyesi sonrasında ana organların histolojik yapıları değişmemiştir. Birlikte ele alındığında bu çalışmada, iyi oksijen taşıma kapasitesine sahip yapay kırmızı kan hücreleri hazırlanmıştır (Xu vd., 2015).

Liu vd., çalışmalarında PEG-PLA-nano yapay kırmızı hücre hazırlamışlar ve sıçanlarda karaciğer ve dalak üzerindeki uzun vadeli etkilerini incelemişlerdir. Kan örnekleri, infüzyondan önce ve analiz için infüzyondan sonra 1, 7 ve 21. günlerde alınmıştır. Nano yapay kırmızı kan hücrelerinin alanin aminotransferaz, aspartat aminotransferaz, alkalik fosfat, kreatin kinaz, amilaz ve kreatin kinaz üzerinde önemli bir olumsuz etkisi olmadığını belirlemişlerdir. Stroma içermeyen hemoglobin grubunda, karaciğerlerde hemoglobin, merkezi damarlarda ve sinüzoidlerde ve hepatik steatozda birikmiştir. Sonuç olarak, enjekte edilen nano yapay kırmızı kan hücreleri, endotelial sistem tarafından verimli bir şekilde metabolize edilmiş ve karaciğerlerde ve dalaklar üzerinde herhangi bir biyokimyasal veya histolojik toksik etki oluşturmamıştır (Liu vd., 2008).

Agrawal vd., kırmızı kan hücresine L-asparaginaz enzimini yüklemişler ve pre-klinik çalışmalarda enzimin oldukça aktif olarak bu sistemde çalıştığını tespit etmişlerdir. L-ASNase yüklü kırmızı kan hücreleri, biyoreaktör sisteminde kan akımında substratını tükettiğini ortaya koymuşlardır. Bu sonuçlarla oluşturulan taşıyıcı ilaçların akut miyeloid lösemi hastalarına potansiyel olarak etkili ve güvenli bir tedavi sunabileceğini öne sürmüşlerdir (Agrawal vd., 2018).

Sun vd. kan damarlarındaki “doğuştan taşıyıcılar” olarak nitelendikleri kırmızı kan hücrelerinin (RBC)’leri kullanarak kemoterapötik doksorubisin taşıyıcı ve NIR uyarımı ile ilaç salabilen hedefli bir ilaç taşıyıcı sistem geliştirmişlerdir. İlaç hedeflemesi için peptidler kullanmışlardır. RBC’lerin zarı NIR’a bağlı fototermal ısıtma ile tahrip edilmiş ve etkin ilaç salınımını sağlamıştır. Çalışmada 2 tip kanser hücresi kullanılmış ve oluşturulan sistemde daha fazla terapötik etki gözlenmiştir. Bu çalışma biyolojik olarak uyumlu olan ve hedefli kanser tedavisi için ümit vaat eden akıllı RBC taşıyıcılarının yeni bir tasarımı açısından önemlidir (Sun vd., 2015).

Aryal vd., Doksorubisin (Dox) ilacı için iki farklı taşıyıcı sistem tasarlamışlar. Birinci sistemde Dox ilacı PLA ile kimyasal modifikasyonla nanopartikül halinde hazırlanmıştır. İkinci sistemde ise bu yapı kırmızı kan hücre membranları ile kaplanmıştır. Polimer kapsüle formülasyon ilk 2 saat içinde % 20 Dox ilacını salarken daha sonraki salımı sadece % 5 düzeyinde gerçekleştirmiştir. Bununla beraber kırmızı kan hücre membranı kaplı nanopartikülde %20 salım 72 saatte gerçekleşmiştir. Bununla beraber daha sonraki sürelerde salım %40'lara ulaşmıştır.

Bu sonuçlar RBC kaplı nanopartikül formülasyonlarının daha uzun süreli ilaç salımı için önemli aday yapılar olduğunu ortaya koymuştur (Aryal vd., 2018)

Ding vd, folik asit (FA) ve trifenilfosfonyum (TPP) ile modifiye edilmiş RBC membranları ile kaplanmış, çekirdekler halinde Unconverting nanopartikülleri (UCNP) kullanan fotoduyarlı nanotaşıyıcılar geliştirmişlerdir. Diğer geleneksel kaplamalarla karşılaştırıldığında, RBC membranı kaplanmış formülasyon hücre içine oksijen girişini 4 kat arttırarak uygulamadan 20 gün sonra, tümör hacmini onda birine düşürmüştür. Bu özellikle kan dolaşımındaki tümör hücrelerinin RBC membran ile kaplanmış UCNP nanopartikülleri ile hücrelere daha fazla oksijen girişinin sağlanması ve bu hücrelerin patlatılarak dokularda tümör hücrelerinin birikiminin önlenmesi açısından önemlidir (Shen vd., 2015).

Yukarıda bazı örnekleri verilen kırmızı kan hücreleri, membranları ve biyopolimerlerle oluşturulan yapay kırmızı kan hücre sistemleri oksijen ve ilaç taşıyıcı olarak gelecek vaat eden uygulamalardır. L-asparaginaz önemli bir kemoterapötik ilaç olup yapay kırmızı kan hücreleri ile taşınımına yönelik herhangi bir çalışma mevcut değildir. Bu tez çalışması önemli bir enzim ilaç olan L-ASNase için Nişasta-Oleik asit temelli bir membran ile hemoglobün içeren yapay kırmızı kan hücre sisteminin oluşturulması ve bu sistemde L-ASNase'in etkinliğinin araştırılmasını içermektedir.

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Araştırmada kullanılan tüm reaktifler analitik saflıkta olup kullanılan kimyasallar şunlardır:

- L-asparaginaz (Leunase),
- L-asparagin (Sigma),
- Trikloroasetik Asit (Riedel De Haen),
- Nişasta (Merck),
- Asetik Asit (Sigma),
- Sodyum Hidroksit (Merck),
- Sodyum Klorür (Merck),
- Tris (Merck),
- Hidroklorik Asit (Merck),
- Potasyum Persülfat (Riedel De Haen),
- Etil Alkol (Sigma),
- Dimetilsülfoksit (Merck),
- Etil Asetat (Merck)
- Oleik Asit(Aldrich),
- Tween 20 (Sigma-Aldrich),
- Tween 40 (Sigma),
- İnsan Hemoglobini (Sigma),
- n-Hekzan (Merck),
- Aseton (Carlo Erba),

### 3.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

- Ph Metre (Cyberscan 1000),
- Etüv (Heraeus),
- Shaker (Wiseshake SHO-1D),
- Su Banyosu (Wisebath),
- Santrifüj (Hettich Universal 320R),
- Terazi (Shimadzu ATX224),
- Mikroplate reader (Biotek)
- Manyetik Karıştırıcı Isıtıcı (IKA C-MAG HS7),
- Sonikasyon Cihazı (Bandelin Sonopuls)
- Vorteks (Fision Whırlı Mixer),
- FT-IR-ATR (Perkin Elmer),
- DSC-60 (Shimadzu),
- DTA-50 (Shimadzu),
- TGA-50 (Shimadzu),
- SEM, LEO Evo-40 VPX
- DLS, Malvern Instruments, Zetasizer Nano S

### 3.3. Çalışmada Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

0.05 M pH:4 asetat tamponu: 4.1 g sodyum asetat ( $M_A:82.03$  g/mol) biraz distile suda çözülmüştür. Derişik glasiyel asetik asit çözeltisi eklenerek pH 4'e ayarlanmış ve distile su ile toplam hacim 1 L'ye tamamlanmıştır.

0.05 M pH:5 asetat tamponu: 4.1 g sodyum asetat ( $M_A:82.03$  g/mol) biraz distile suda çözünmüştür. Derişik glasiyel asetik asit çözeltilisi eklenerek pH 5'e ayarlanmış ve distile su ile toplam hacim 1 L'ye tamamlanmıştır.

0.05 M pH:6 asetat tamponu: 4.1 g sodyum asetat ( $M_A:82.03$  g/mol) biraz distile suda çözünmüştür. Derişik glasiyel asetik asit çözeltilisi eklenerek pH 6'ya ayarlanmış ve distile su ile toplam hacim 1 L'ye tamamlanmıştır.

0.05 M pH:7 Tris-HCl tamponu: 6.06 g Tris ( $M_A:121.14$  g/mol) biraz distile suda çözünmüştür. Derişik hidroklorik asit çözeltilisi eklenerek pH 7'ye ayarlanmış ve distile su ile toplam hacim 1 L'ye tamamlanmıştır.

0.05 M pH:8 Tris-HCl tamponu: 6.06 g Tris ( $M_A:121.14$  g/mol) biraz distile suda çözünmüştür. Derişik hidroklorik asit çözeltilisi eklenerek pH 8'e ayarlanmış ve distile su ile toplam hacim 1 L'ye tamamlanmıştır.

0.05 M pH:8.5 Tris-HCl tamponu: 6.06 g Tris ( $M_A:121.14$  g/mol) biraz distile suda çözünmüştür. Derişik hidroklorik asit çözeltilisi eklenerek pH 8.5'a ayarlanmış ve distile su ile toplam hacim 1 L'ye tamamlanmıştır.

0.05 M pH:9 Tris-HCl tamponu: 6.06 g Tris ( $M_A:121.14$  g/mol) biraz distile suda çözünmüştür. Derişik hidroklorik asit çözeltilisi eklenerek pH 9'a ayarlanmış ve distile su ile toplam hacim 1 L'ye tamamlanmıştır.

0.05 M pH:10 Tris-HCl tamponu: 6.06 g Tris ( $M_A:121.14$  g/mol) biraz distile suda çözünmüştür. Derişik hidroklorik asit çözeltilisi eklenerek pH 10'a ayarlanmış ve distile su ile toplam hacim 1 L'ye tamamlanmıştır.

0.01 M L-asparagin çözeltilisi: 1.32 g L-asparagin ( $M_A:132.12$  g/mol) biraz distile suda çözünmüş ve distile su ile toplam hacim 1 L'ye tamamlanmıştır.

1.5 M TCA çözeltilisi: 2.45 g TCA katısı ( $M_A:163.39$  g/mol) biraz distile suda çözünmüş ve distile su ile toplam hacim 10 mL'ye tamamlanmıştır.

%0,9(w/v)'luk NaCl çözeltilisi: 9 g NaCl katısı biraz distile suda çözünmüş ve distile su ile toplam hacim 1 L'ye tamamlanmıştır.

### 3.4. Nessler Reaktifinin Hazırlanması

Nessler ayırıcı çözelti A ve B adı verilen iki çözeltinin karıştırılmasıyla hazırlanmaktadır.

A Çözeltisi: 35 g KI + 50 g HgI<sub>2</sub> alınıp distile su içerisinde çözünüp çözeltinin son hacmi 200 mL olacak şekilde distile su ile tamamlanmıştır.

B Çözeltisi: 50 g NaOH alınıp son hacim 250 mL olacak şekilde distile su içerisinde çözünerek hazırlanmıştır.

Soğutulmuş A ve B çözeltilerinden B çözeltisinin A çözeltisine eklenmesiyle hazırlanmıştır. Bu karışık çözelti az 1 hafta presipitasyon için karanlıkta bekletildikten sonra çözelti şişesinin etrafı alüminyum folyo ile kapatılarak karanlık bir yerde saklanmıştır. Kullanılmak istendiği zaman üstte kalan kısımdan alınarak kullanılmış ve gerektiği zamanlar cam pamuğu ile süzölmüştür.

### 3.5. Diyaliz Membranının Hazırlanması

Diyaliz membranının hazırlanacağı çözelti A ve B çözeltilerinin karıştırılmasından oluşmaktadır.

A çözeltisi: %2'lik Sodyum Bikarbonat (NaHCO<sub>3</sub>) hazırlamak için 20 g NaHCO<sub>3</sub>(84,01 g/M<sub>A</sub>) alındı ve distile suyla 1000 mL'ye tamamlanmıştır.

B çözeltisi: 1 mM EDTA (292,4 g/M<sub>A</sub>) çözeltisi hazırlamak için 0,29 g EDTA alındı ve distile suyla 1 L'ye tamamlanmıştır.

Her iki çözeltiden 250 mL alınarak karıştırılmıştır. Diyaliz membranlar içine konulmuş ve 10 dakika kaynatılmıştır. Soğuduktan sonra 2 defa distile suyla yıkanmıştır. Tekrar 10 dakika 1 mM'lık EDTA çözeltisinde kaynatılmıştır. Daha sonra kullanılacak olan diyaliz membranlar 1 mM'lık EDTA çözeltisinde saklanmıştır.

### 3.6. Örneklerin Sentezi

#### 3.6.1. Aşılınmış Nişasta

6 g nişasta, 250 mL'lik balon içerisinde 60 mL saf su eklenerek karıştırılmıştır. Üzerine 12 mL tween 40 ilave edilmiştir. 31.2 g oleik asit ve ortamı alkalileştirip katalizör görevi yapması amacıyla 1M 12 mL NaOH eklenmiştir. Vorteks yardımıyla karıştırılan malzemeler 8 saat boyunca 80<sup>0</sup>C'de 500 rpm hızla manyetik karıştırıcılı ısıtıcı ile karıştırılmıştır. Yağı uzaklaştırmak için önce alkolle (4 saat) daha sonra n-hekzanla (12 saat) muamele edilmiştir. Daha sonra etil asetat ile tween 40'ın ortamdaki uzaklaştırılması için muamele edilmiştir.

Çöken polimer yapı süzgeç kâğıdı ile süzölmüştür. Süzölen kısım vakumlu etüvde 1 gün kurumaya bırakılmıştır. Vakumlu etüvde kurutulan nişastalı polimerlerin FT-IR ile yapısal karakterizasyonu, TGA, DTA, DSC analizleri ile termal karakterizasyonu ve DLS cihazı ile boyut analizi ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

#### 3.6.2. Yapay Kırmızı Kan Hücresi Sentezi

Cam tüpte 500 mg aşılınmış nişasta, 1,5 mL dimetilsülfoksit (DMSO) ve 7,5 mL saf su vorteks yardımıyla karıştırılmıştır ve karışım 80 <sup>0</sup>C'de yaklaşık 1 saat ısıtılmıştır.

50 mL'lik bir tüpte 25 mL %0,9(w/v)'luk NaCl çözeltisi, 1,5 mL tween 20 karıştırılmıştır. 50 mg insan hemoglobini eklenip tüpün kapağı kapatılmıştır. Bekletilmeden sonikasyon cihazında 20 dakikalık sürede inert ortam elde etmek için içinden azot gazı geçirilerek dakikada 0,75 mL olacak şekilde damla damla ilk hazırlanan çözelti ilave edilmiştir.

İşlem tamamlandıktan sonra hazırlanan karışım, diyaliz membrana aktarılmıştır. Diyaliz membran saf su içinde her iki saatte bir, suyu değiştirilmek üzere 10 saat bekletilmiştir. Diyaliz membranındaki örnekler mikrosantrifüj tüplerine alınarak 14000 rpm hızlı santrifüj cihazında 90 dakika işlem yapılmıştır. Sonrasında mikrosantrifüj tüplerinin içindeki süpernatantlar ayrılmış ve %0,9(w/v)'luk NaCl çözeltisi ile mikrosantrifüj tüpünün dibinde kalan kalıntı yıkanarak tekrar 14000 rpm hızlı santrifüj cihazında 90 dakikalık bir işleme tabi tutulmuştur. 1 gün kurumaya

bırakılmıştır. Kurutulan saf polimerlerin FT-IR ile yapısal karakterizasyonu, TGA, DTA, DSC analizleri ile termal karakterizasyonu ve DLS cihazı ile boyut analizi ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

### **3.7. Yapay Kırmızı Kan Hücrelerine Enzim Enkapsülasyonu**

Cam tüpte 500 mg aşılınmış nişasta, 1,5 mL dimetilsülfoksit (DMSO) ve 7,5 mL saf su vorteks yardımıyla karıştırılmıştır. Gerekli çözünme sağlanmadığından, karışım 80 °C'de yaklaşık 1 saat ısıtılmıştır.

50 mL'lik bir tüpte 25 mL %0,9(w/v)'luk NaCl çözeltisi, 1,5 mL tween 20 karıştırılmıştır. 50 mg insan hemoglobini ve 125 Ünite L-asparagin eklenmiş ve tüpün kapağı kapatılmıştır. Bekletilmeden sonikasyon cihazında 20 dakikalık sürede inert ortam elde etmek için içinden azot gazı geçirilerek dakikada 0,75 mL olacak şekilde damla damla ilk hazırlanan çözelti ilave edilmiştir.

İşlem tamamlandıktan sonra hazırlanan karışım, diyaliz membrana aktarılmıştır. Diyaliz membran saf su içinde her iki saatte bir, suyu değiştirilmek üzere 10 saat bekletilmiştir. Diyaliz membranındaki örnek sonra mikrosantrifüj tüplerine alınarak 14000 rpm hızlı santrifüj cihazında 90 dakika işlem yapılmıştır. Sonrasında mikrosantrifüj tüplerinin içindeki süpernatantlar ayrılmış ve %0,9(w/v)'luk NaCl çözeltisi ile mikrosantrifüj tüpünün dibinde kalan kalıntı yıkanarak tekrar 14000 rpm hızlı santrifüj cihazında 90 dakikalık bir işleme tabi tutulmuştur. 1 gün kurumaya bırakılmıştır. Kurutulan saf polimerlerin FT-IR ile yapısal karakterizasyonu, TGA, DTA, DSC analizleri ile termal karakterizasyonu ve DLS cihazı ile boyut analizi ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

Tez kapsamında sentezlenen OA/ST ve OA/ST-Hb-L-ASNase malzemelerinin kimyasal yapısını doğrulamak amacıyla bir Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR –Perkin-Elmer) kullanılmıştır. Dalga sayısı aralığı 400 ila 4000 cm<sup>-1</sup> olarak ayarlanmıştır.

### **3.8. Karakterizasyon Çalışmaları**

#### **FTIR**

Tez kapsamında sentezlenen OA/ST ve OA/ST-Hb-L-ASNase malzemelerinin kimyasal yapısını doğrulamak amacıyla Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR –Perkin-Elmer) kullanılmıştır. Dalga sayısı aralığı 400 ila 4000  $\text{cm}^{-1}$  olarak ayarlanmıştır.

#### **Termal analiz**

OA/ST malzemesinin termal kararlılığını incelemek için TGA-DTA-DSC termal analiz sistemi (Shimadzu JA) kullanılmıştır. Yaklaşık 10 mg örnek kullanılmış olup ölçümler 10  $^{\circ}\text{C}/\text{dakika}$  ısıtma hızıyla gerçekleştirilmiştir.

#### **SEM ve EDX analizi**

Sentezlenen OA/ST, OA/ST-Hb ve OA/ST-Hb-L-ASNase malzemelerinin yüzey morfolojisi bir taramalı elektron mikroskobu (SEM, LEO Evo-40 VPX) kullanılarak analiz edilmiştir. EDX analizleri SEM cihazına entegre edilen Rontech Xflash dedektör analiz cihazı ile yapılmıştır.

#### **Partikül boyut ve zeta potansiyeli analizi**

OA/ST malzemesinin ve enzim enkapsüle edildikten sonra elde edilen OA/ST-Hb-L-ASNase malzemelerinin ortalama partikül boyutu ve zeta potansiyeli dinamik ışık saçma cihazı (DLS-Malvern Instruments, Zetasizer Nano S) ile ölçülmüş olup numuneler damıtılmış su içinde seyreltilerek hazırlanmıştır.

### **3.9. Serbest Enzimin Aktivite Ölçümü**

L asparaginaz enziminin aktivitesinin tayini Nessler yöntemi ile yapılmıştır. Bu yöntem; L-asparaginaz enziminin L-asparagini aspartik asit ve amonyağa yıkması sonucu açığa çıkan amonyağın ölçülmesi temeline dayanan ve yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. L-asparaginaz enzim stok çözeltisinden 0.05 mL alınıp, 0.05 M Tris-HCl (pH:8.6) tamponuyla taze hazırlanmış 0.01 M 1 mL L-asparagin (substrat) çözeltisi ile 37  $^{\circ}\text{C}$ 'de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. 1.5 M 0.1 mL trikloroasetik asit (TCA) eklenerek reaksiyon durdurulmuştur. Sonrasında toplam

hacim 1 mL olacak şekilde 0.25 mL örnek, 0.5 mL distile su ve 0.25 mL Nessler reaktifi eklenip karıştırıldıktan sonra 10 dakika oda sıcaklığında tutulmuş ve 480 nm'de köre(blank'e) karşı okuma yapılmıştır. Her bir ölçüm 2 tekrarlı yapılmış olup hesaplamalarda ortalaması alınmıştır. 1 L-asparaginaz ünitesi (U), 37 °C'de 1 dakikada 1 µmol amonyak açığa çıkararak enzim miktarı olarak tanımlanmıştır (Ateş, 2007).

### **3.10. Yapay Kırmızı Kan Hücreleri ve Aşılınmış Nişastanın Biyobozunurluk Testleri**

Yapay kırmızı kan hücrelerinin ve aşılınmış nişastanın biyobozunurluk uygulamasını yapmak için belirli miktarda hassas olarak tartılan malzemeler 5 mL fosfat tamponu (pH:7) ile beraber darası alınmış olan deney tüplerine konulmuştur. Deney tüplerinin ağzı sıkıca kapatılarak örnekler sıcaklığı +37 °C'de sabitlenen etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Bir hafta sonra deney tüpleri etüvden çıkarılarak üstteki tampon çözelti atılıp örnekler vakumlu etüvde kurumaya bırakılmıştır. Örnekler kurutulduktan sonra hassas bir şekilde tartılıp başlangıç miktarı baz alınarak % bozunma oranı hesaplanmıştır. Aynı işlemler hem yapay kırmızı kan hücrelerine hem de aşılınmış nişastaya 1. 2. 3. ve 4. haftalarda da uygulanmıştır.

### **3.11. İmmobilize Enzimin Aktivite Ölçümü**

Enzim immobilize edilmiş örneklerden 5 mg tartılıp üzerine, 0.05 M Tris-HCl (pH:8.6) tamponuyla taze hazırlanmış 0.01 M L-asparagin çözeltisinden 1 mL eklenerek 37 °C' de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübe işlemini takiben örnekler 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Sonrasında süzüntüler başka bir mikrosantrifüj tüpüne transfer edilmiştir. Elde edilen süzüntülere 1.5 M 100 µL trikloroasetik asit (TCA) ilave edilmiştir. Sonrasında toplam hacim 1 mL olacak şekilde 0.25 mL süzüntü, 0.5 mL distile su ve 0.25 mL Nessler reaktifi eklenip karıştırıldıktan sonra 10 dakika oda sıcaklığında tutulmuş ve 480 nm'de köre karşı okuma yapılmıştır. Örneklerdeki amonyak konsantrasyonu, belirli konsantrasyonlarda hazırlanan amonyum sülfat standart eğri yardımıyla hesaplanmıştır.

### **3.12. Serbest ve İmmobilize Enzimin Optimum pH'sının Belirlenmesi**

L-asparaginaz enziminin ve enzim immobilize edilmiş örneklerin optimum aktivite gösterdiği pH değerini belirlemek için pH 5-6 aralığında 0.05 M asetat tamponu, pH 7-9 aralığında ise 0.05 M Tris-HCl tamponu kullanılmıştır. Her bir pH'daki tampon çözeltiyle 0.01 M L-asparagin çözeltisi hazırlanmış ve enzim aktivitesi ölçümleri yapılmıştır. Ölçümler sonucunda enzim aktivitesinin en fazla olduğu değer optimum pH değeri olarak belirlenmiştir.

### **3.13. Serbest ve İmmobilize Enzimin Maksimum ve Optimum Sıcaklıklarının Belirlenmesi**

L-asparaginaz enziminin ve enzim immobilize edilmiş örneklerin optimum ve maksimum aktivite gösterdiği sıcaklığı belirlemek amacıyla 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 °C'de ayrı ayrı enzim aktivitesi ölçülmüştür. Enzim aktivitesini ölçmek için 0.05 M pH 8.6 Tris-HCl tamponu ve 0.01 M L-asparagin çözeltisi kullanılmıştır. Enzimin enzim immobilize edilmiş örneklerin maksimum ve optimum sıcaklığının belirlenmesinde enzim, örnek ve substrat çözeltisi reaksiyon başlamadan önce aktivitenin belirleneceği sıcaklıkta 15 dk. bekletilerek aktivitenin belirleneceği sıcaklığa gelmeleri sağlanmıştır. 15 dk. sonunda reaksiyon başlatılarak enzim aktivitesi ölçülmüştür.

### **3.14. Yeniden Kullanılabilirlik Testi**

L-asparaginaz enziminin immobilize edildiği yapay kırmızı kan hücrelerinin tekrar tekrar kullanılabilirliğini gösteren deneyde 20 mg'lık örnek tartılarak 15 dakika 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübe işleminden hemen sonra 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süzüntü başka bir mikrosantrifüj tüpüne alınmıştır. Bu süzüntülere 1,5 M 100 µL TCA eklenip, sonrasında enzim aktivitesi ölçülmüştür.

### 3.15. Serbest ve İmmobilize Enzimin Depo Kararlılıklarının Belirlenmesi

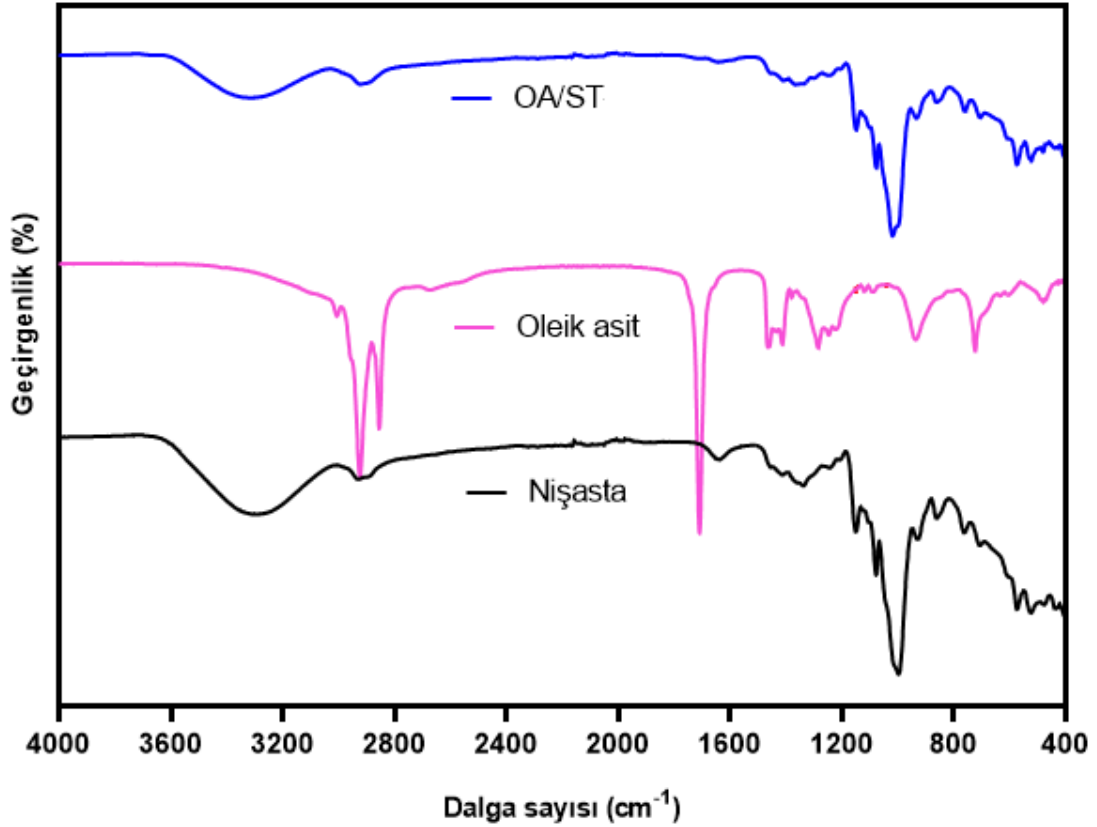
Serbest ve immobilize enzimin aktivitesine depolanma koşullarını belirlemek amacıyla enzim hacmi (50 $\mu$ L), örnek miktarı (5mg) ve depolanma koşulları sabit tutularak her iki enzim de + 4 ve +25 °C'de muhafaza edilmiştir. Belirli günlerde her iki enzim içinde aktivite tayini yapılarak başlangıç aktivitesi üzerinden % aktivitesi hesaplanarak enzimlerin aktivitelerini ne kadar koruyabildiği araştırılmıştır.



## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1. Aşılınmış Nişastanın Karakterizasyonu

Nişasta, oleik asit ve OA/ST malzemelerinin FTIR spektrumları Şekil 4.1’de gösterilmiştir.

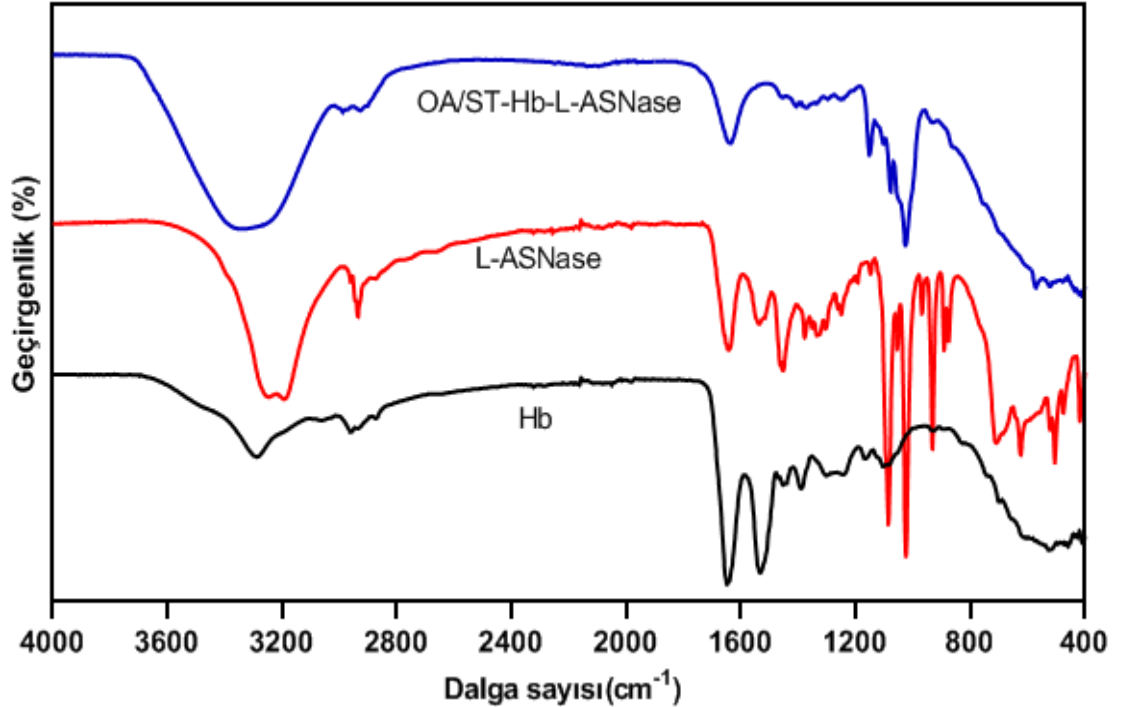


Şekil 4.1. Nişasta, Oleik asit ve OA/ST malzemelerinin FTIR spektrumları

Nişasta'nın FTIR spektrumu incelendiğinde karbohidratlara ait karakteristik pikler görülmektedir. Bu pikler 3300  $\text{cm}^{-1}$ 'de O-H piki, 2922  $\text{cm}^{-1}$ 'de alifatik grupların C-H gerilme piki, 1650  $\text{cm}^{-1}$ 'de adsorbe edilen nemden kaynaklanan O-H piki, 1150  $\text{cm}^{-1}$ 'de C-C ve C-O titreşimleri ve 1010  $\text{cm}^{-1}$ 'de C-O-H bükülme titreşim pikleridir (Guilherme vd., 2012). Oleik asit için, 2922 ve 2854  $\text{cm}^{-1}$ 'de görülen metilen gruplarının asimetric ve simetric gerilme titreşimleri, 1708  $\text{cm}^{-1}$ 'de CO titreşim piki ve 1460  $\text{cm}^{-1}$ 'de görülen karboksil gruplarına ait simetric gerilme titreşim pikleri karakteristiktir (Kowalik vd., 2017). Yine aşılınmış nişastada hem

nişasta hem de oleik aside ait karakteristik pikler mevcuttur. Özellikle  $1708\text{ cm}^{-1}$ 'de görülen CO titreşim piki oleik aidin aşılındığının bize göstermektedir.

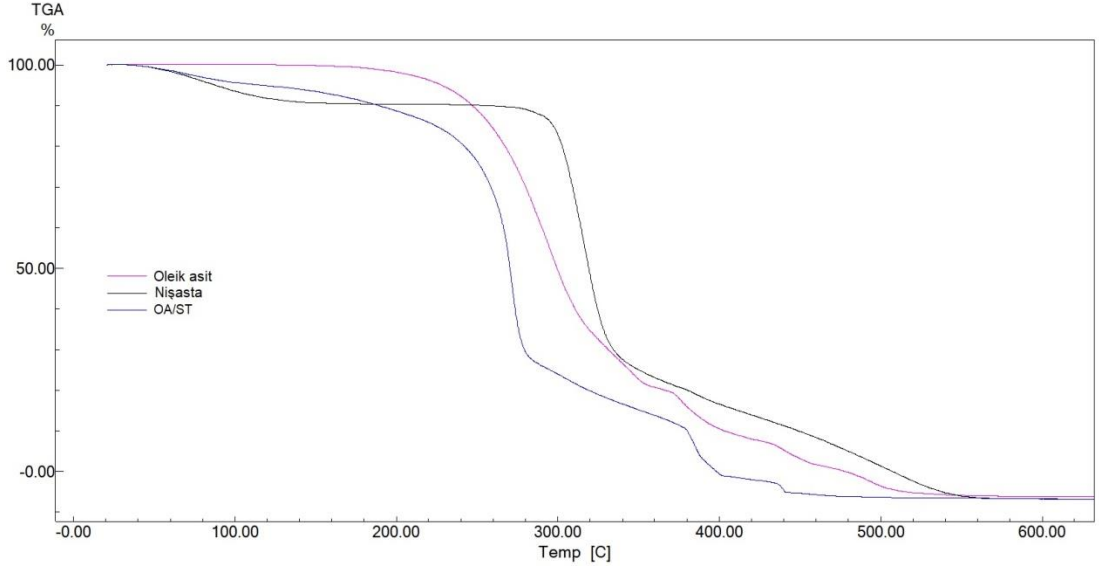
Enzim enkapsülasyonun başarılı olduğunu göstermek için enkapsülasyondan sonra malzemelerin FTIR spektrumları elde edilmiş ve sonuçlar Şekil 4. 2'de sunulmuştur. Hb'ye ait spektrumda, amid I bandı ( $1650\text{ cm}^{-1}$ ) peptit bağlarının C=O gerilme titreşiminden kaynaklanmaktadır. Amid II bandı ( $1536\text{ cm}^{-1}$ ) ise peptit gruplarının C-N gerilme titreşimleri ve N-H titreşimlerinin birleşiminden kaynaklanmaktadır (He vd., 2011)  $2963\text{ cm}^{-1}$  ve  $3300\text{ cm}^{-1}$  absorpsiyon pikleri sırasıyla alifatik  $\text{CH}_2$  ve OH piklerini temsil etmektedir (Yarrow vd., 2011) Saf enzimin spektrumunda,  $3200\text{ cm}^{-1}$ 'deki pik O-H ve N-H bağlarını,  $1600$  ve  $1530\text{ cm}^{-1}$ 'deki pikler amid I ve amid II bağı göstermektedir (Bahreini vd., 2014). Enzim enkapsüle edilmiş malzeme olan OA/ST-Hb-L-ASNase'nin FTIR spektrumu incelendiğinde, malzemenin hem Hb hem de saf enzimin karakteristik piklerini göstermektedir. Bundan dolayı, istenilen hedef malzemenin hazırlandığı ve enzimin başarılı bir şekilde enkapsüle edildiği yapısal olarak kanıtlanmıştır.



**Şekil 4.2.** Hb, saf L-ASNase ve OA/ST-Hb-L-ASNase malzemelerinin FTIR spektrumları.

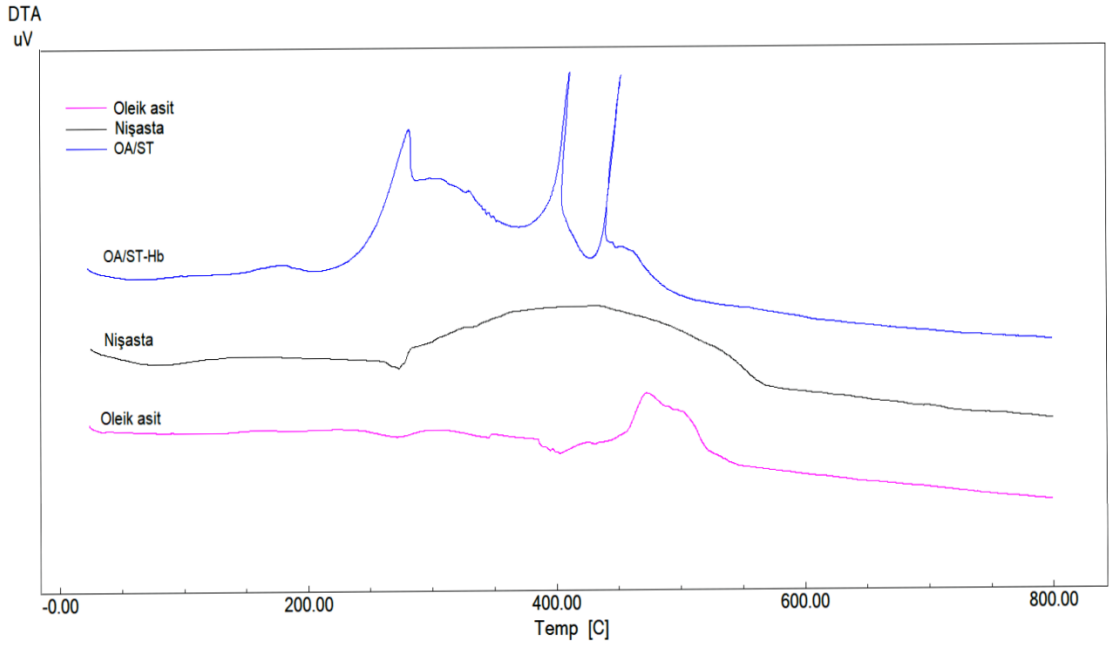
## 4.2. Termal Analiz

Şekil 4.3’de nişasta, oleik asit ve OA/ST malzemelerinin TGA termogramları görülmektedir. Nişastaya ait TGA termogramı incelendiğinde 3 adet bozunma bölgesi görülmektedir. İlk bozunma 30-150 °C arasında olup adsorbe olan nemden kaynaklanmaktadır. 300-350 °C arasındaki ikinci bozunma bölgesinde büyük bir kütle kaybı (yaklaşık %60) görülmektedir. Bu kütle kaybı nişastanın ana bozunma pikidir ve nişastadaki amilopektin çift sarmallarının geri dönüşümsüz olarak bozunmasından kaynaklanmaktadır. 350-550 °C arasındaki kütle kaybı literatürde nişastanın bozunması sonucu ortaya çıkan uçucu bileşiklerin salınmasından kaynaklandığı şeklinde yorumlanmıştır (Wahyuningtiyas vd., 2017 ve Shen vd., 2015). Oleik asitin TGA’sı incelendiğinde 200 °C’de başlayan tek bir bozunma bölgesi görülmüştür (Li vd., 2012). Sentezlenen OA/ST malzemesinin TGA termogramı incelendiğinde 3 temel kütle kaybı görülmektedir. Birinci kütle kaybı 30-200 °C arasında olup adsorbe olan nemden kaynaklanmaktadır. İkinci kütle kaybı 200-300 °C arasında olup nişastaya ait olan nişasta ve oleik asitten kaynaklanmaktadır. Üçüncü kütle kaybı nişastanın bozunması sonucu ortaya çıkan uçucu bileşiklerin salınmasından kaynaklanmaktadır. Oleik asitin termal kararlılığı nişastaya oranla daha düşüktür. Bu nedenle sentezlenen OA/ST malzemesinin bozunma bölgeleri daha düşük sıcaklık değerlerine kaymıştır. Elde edilen bu sonuç her iki monomeri içeren OA/ST malzemesinin başarılı bir şekilde hazırlandığını göstermektedir.

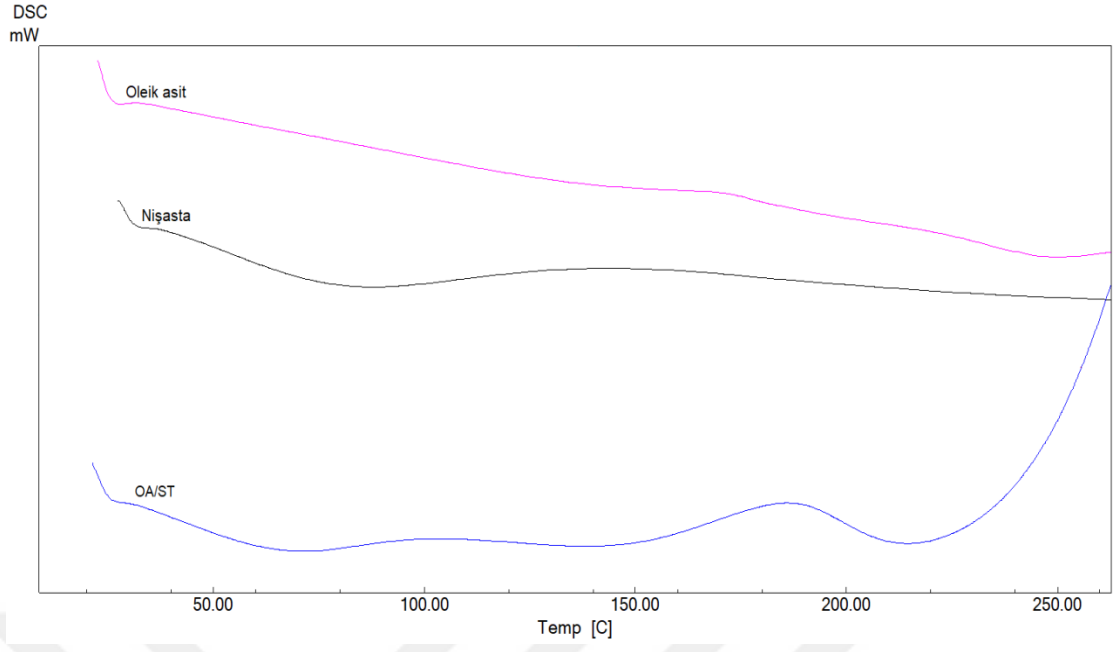


**Şekil 4.3.** Nişasta, Oleik asit ve OA/ST malzemelerinin TGA termogramları.

Nişasta, oleik asit ve OA/ST malzemelerinin DTA ve DSC termogramları Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'te gösterilmiştir. Elde edilen DTA ve DSC termogramları yukarıda detaylı bir şekilde yorumlanan TGA termogramları ile paralellik göstermektedir.



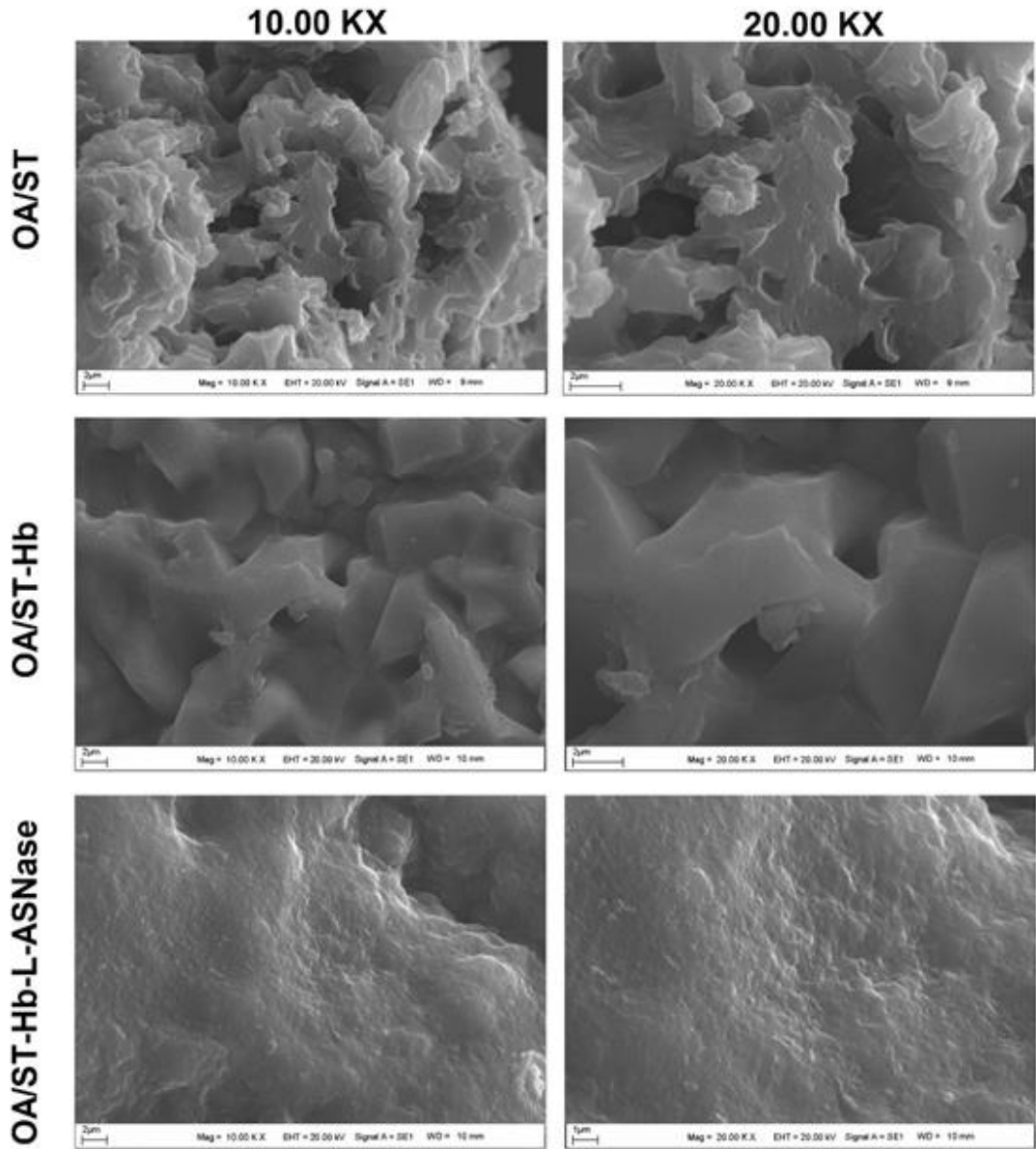
**Şekil 4.4.** Nişasta, Oleik asit ve OA/ST malzemelerinin DTA termogramları.



**Şekil 4.5.** Nişasta, Oleik asit ve OA/ST malzemelerinin DSC termogramları.

### 4.3. SEM analizi

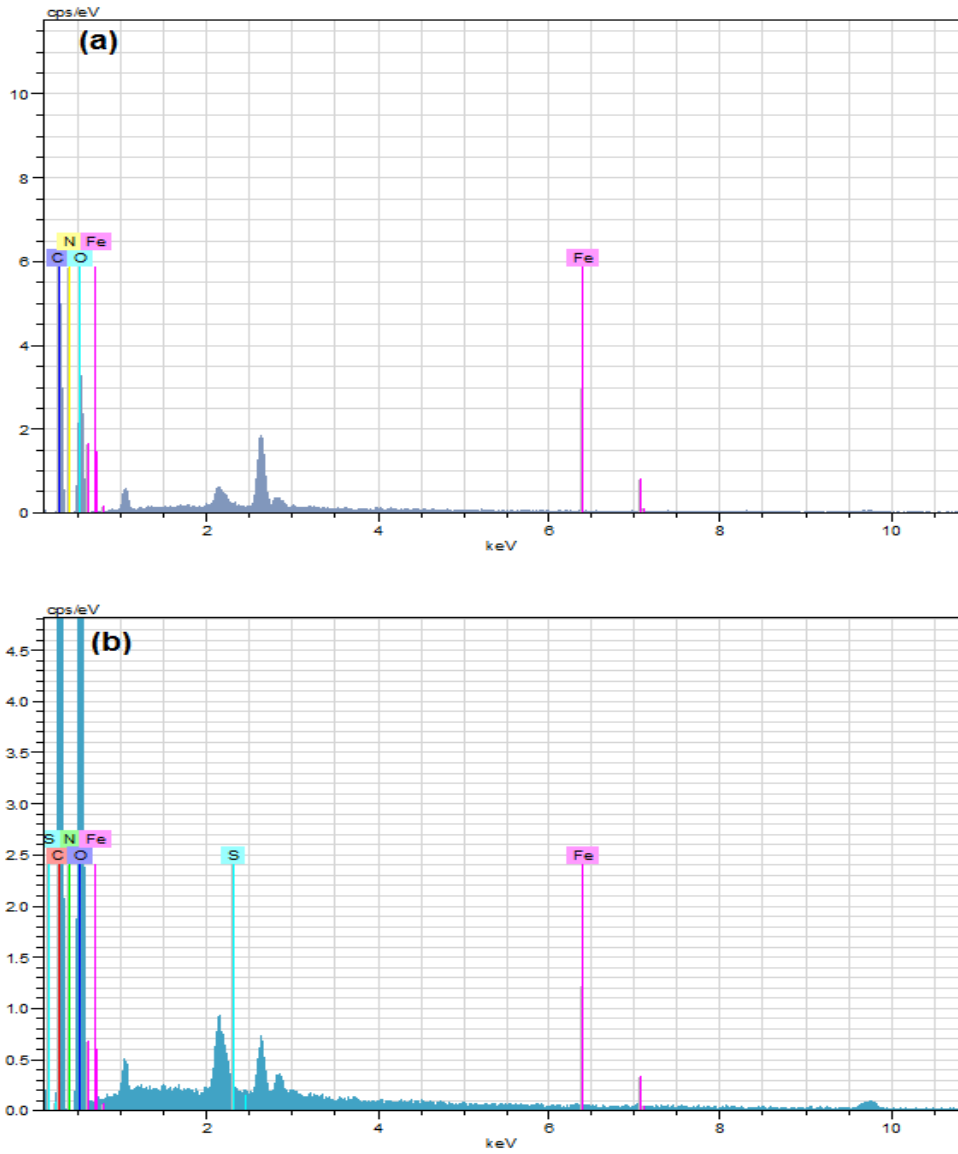
OA/ST malzemesinin yüzey morfolojisi SEM ile incelenmiştir. Şekil 4.6'deki farklı büyütmelelerdeki SEM verileri sentezlenen malzemenin büyük oranda gözenekli bir yapıda olduğunu kanıtlamıştır. Ancak, Hb ve L-ASNase eklendikten sonra malzemenin gözenekli yapısı kademeli bir şekilde azalmaya başlamıştır. Bu azalmanın nedeni olarak; var olan gözeneklere Hb ve L-ASNase enziminin yerleşerek gözeneklerde azalmaya yol açması şeklinde yorumlanabilir. Literatürde benzer sonuçlar rapor edilmiştir. (Anvar vd., 2017 ve Miletic vd., 2011).



Şekil 4.6. OA/ST, OA/ST-Hb ve OA/ST-Hb-L-ASNase malzemelerinin farklı büyütmelelerdeki morfolojik analiz sonuçları.

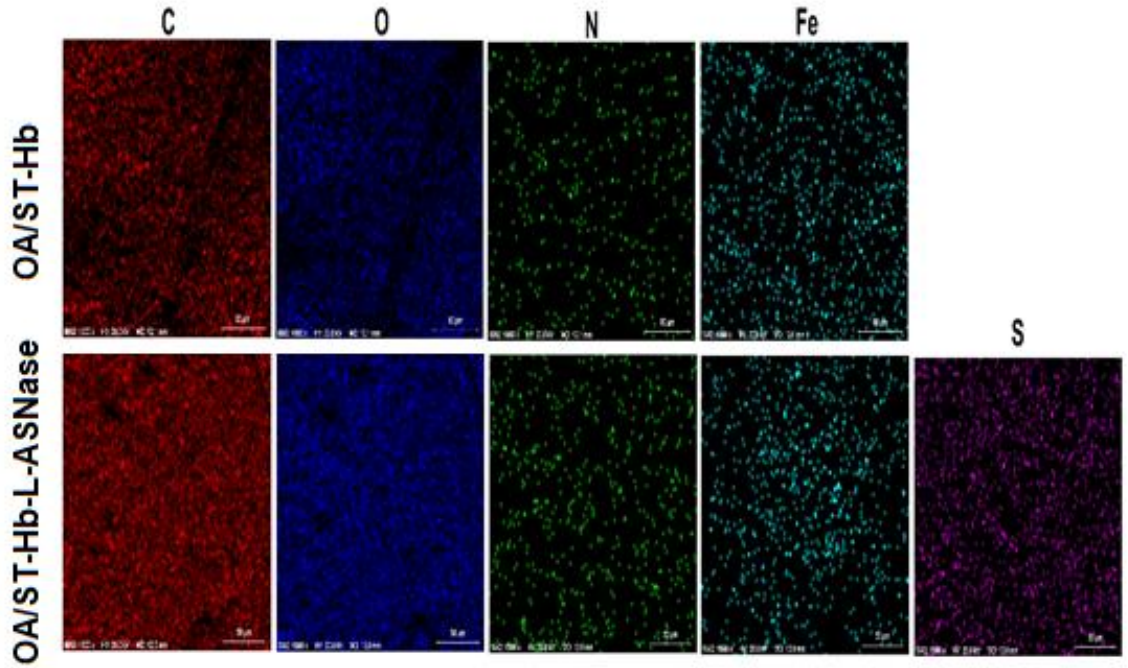
#### 4.4. EDX Analizi

OA/ST-Hb ve OA/ST-Hb-L-ASNase malzemelerinin EDX sonuçları Şekil 4.7'de sunulmuştur. Şekil 4.7(a) incelendiğinde OA/ST ve Hb malzemelerinden kaynaklı karbon (C), oksijen (O), azot (N) ve demir (Fe) elementel pikleri görülmektedir. Enzim içeren OA/ST-Hb-L-ASNase malzemesinin EDX spektrumunda ise (Şekil 4.7b) C, O ve N piklerinin şiddeti arttığı görülmektedir. Bunun nedeni L-ASNase enziminin protein yapısından kaynaklanmaktadır. Ayrıca, yine kükürt (S) elementel pikinin varlığı da bize enzimin enkapsüle işleminin doğruluğunu kanıtlamaktadır.



Şekil 4.7. (a) OA/ST-Hb ve (b) OA/ST-Hb-L-ASNase malzemelerinin EDX analiz sonuçları.

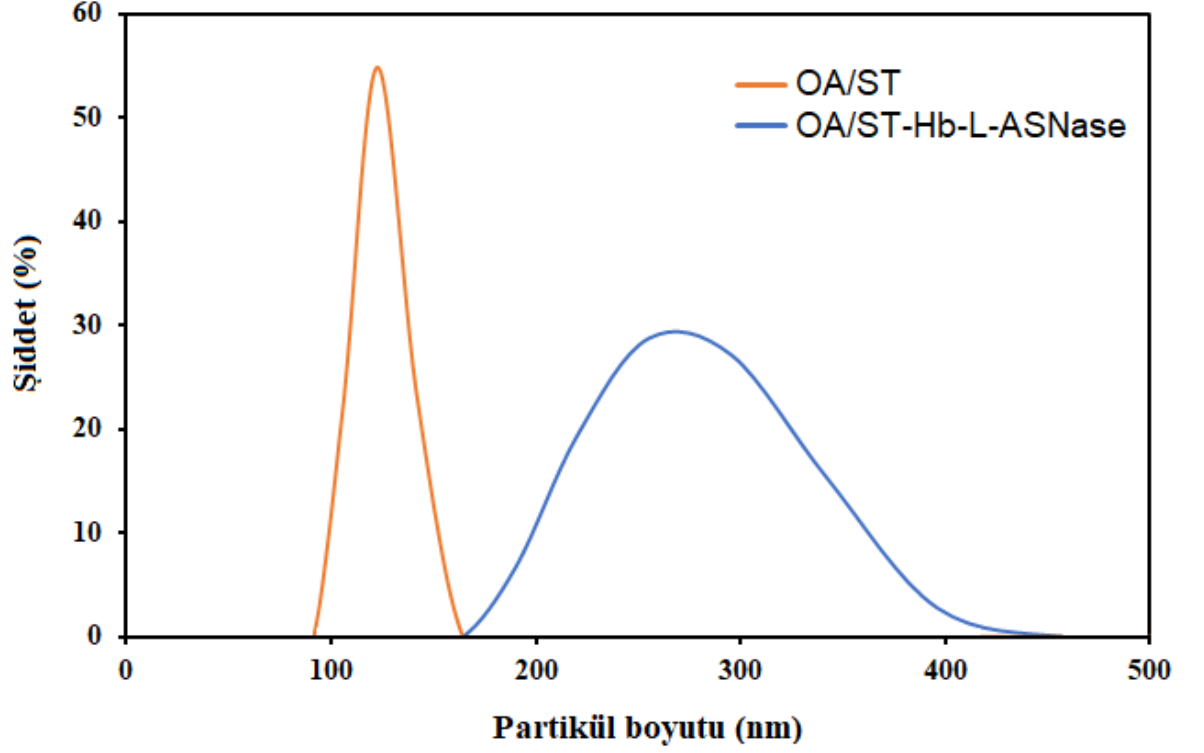
EDX haritalama analiz sonuçları da yukarıda verilen EDX spektrum sonuçlarını büyük oranda desteklemektedir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. OA/ST-Hb ve OA/ST-Hb-L-ASNase malzemelerinin EDX haritalama analiz sonuçları.

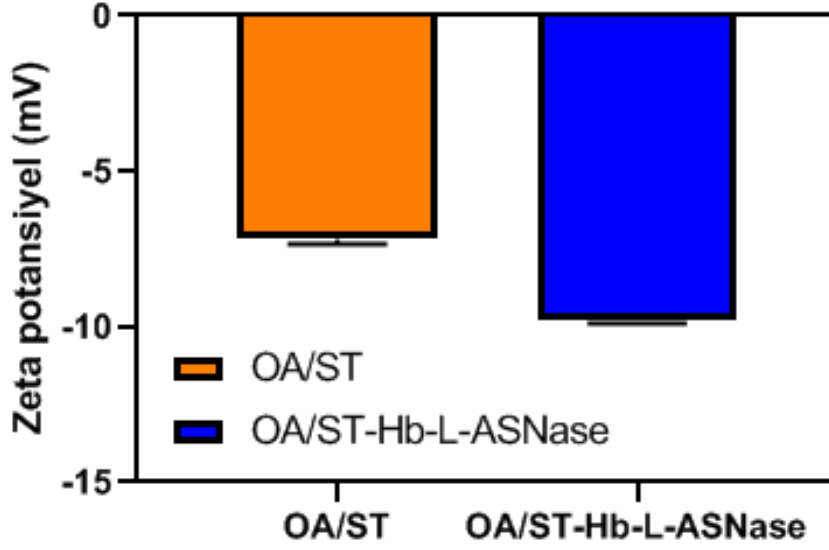
#### 4.5. Partikül boyut ve zeta potansiyeli analizi

OA/ST ve OA/ST-Hb-L-ASNase malzemelerinin ortalama hidrodinamik parçacık boyutları sırasıyla 120 ve 295 nm olarak ölçülmüştür (Şekil 4.9). Enzimin kapsülasyonundan sonra OA/ST-Hb malzemesinin hidrodinamik büyüklüğündeki artış, enzimin makromolekül yapısının bir sonucudur. Elde edilen bu sonuç literatürle uyum içerisindedir. Örneğin, Gebreyohannes ve ark., 200 nm olan manyetik nanopartiküllerine pektinaz enzimi immobilize edildikten sonra partikül boyutunun 216-250 nm arasında olduğunu rapor etmiştir (Gebreyohannes vd., 2016). Bir başka çalışmada ise Samui ve Sahu sentezledikleri metal-organik malzemelerine lakkaz enzimi immobilize edildikten sonra partikül boyunun arttığını ve gözenek çapının azaldığını belirtmişlerdir (Samui vd., 2018).



**Şekil 4.9.** OA/ST ve OA/ST-Hb-L-ASNase malzemelerinin hidrodinamik partikül boyutları.

OA/ST ve OA/ST-Hb-L-ASNase malzemelerinin zeta potansiyel değerleri Şekil 4.10'da sunulmuştur. OA/ST için zeta potansiyel değeri -7.19 olarak ölçülmüştür. Zeta potansiyelinin negatif çıkması malzemenin ana yapısında var olan OA'dan kaynaklanmaktadır. OA/ST-Hb-L-ASNase için ise zeta potansiyeli -9.82 olarak ölçülmüştür. Görüldüğü üzere zeta potansiyeli enzim enkapsülasyonundan sonra azalmıştır. Bu azalmanın sebebi enzimin protein yapısında var olan aminoasit rezidülerinden kaynaklanmaktadır.

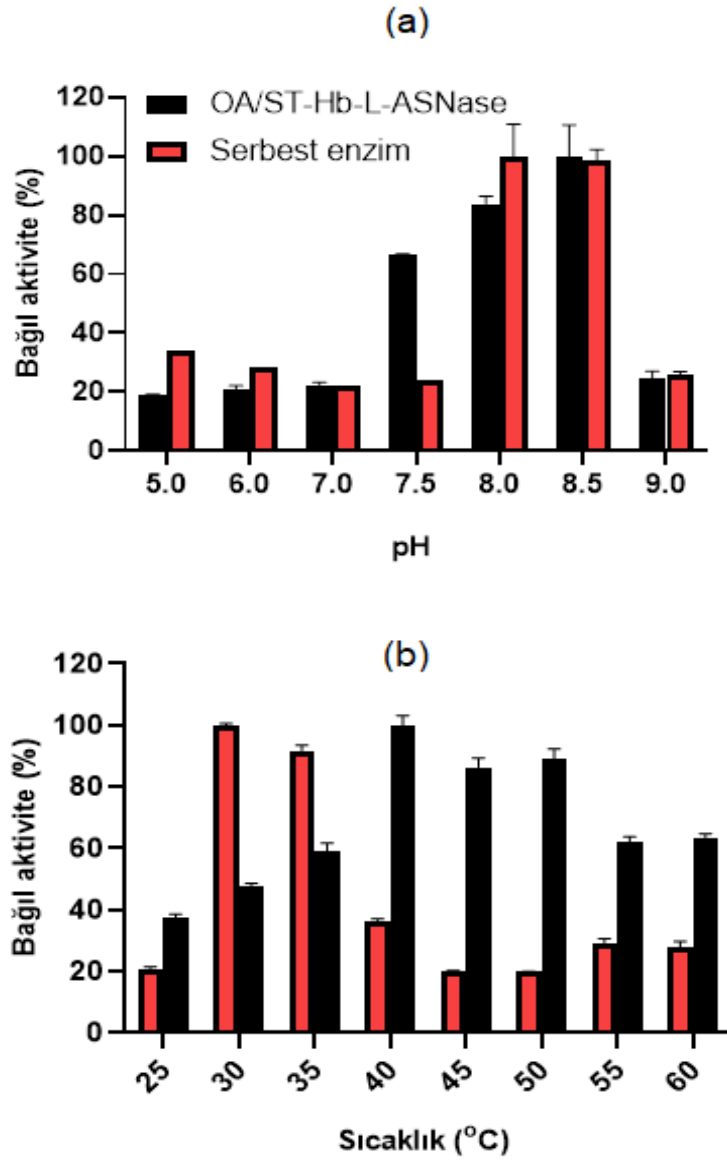


**Şekil 4.10.** OA/ST ve OA/ST-Hb-L-ASNase malzemelerinin zeta potansiyel değerleri.

#### 4.6. pH ve sıcaklığın enzimatik aktivite üzerine etkisi

pH'in serbest ve immobilize enzim aktivitesi üzerine etkisi 5.0 ila 9.0 aralığında incelenmiş optimum pH değeri serbest enzim için 8.0, immobilize enzim için 8.5 olarak bulunmuştur (Şekil 4.11a). Şu ana kadar yapılan çalışmalar incelendiğinde L-ASNase için optimum pH aralığı 7.0-9.0 arasında değişebilmekte olup genellikle alkali pH'da daha aktif olduğu belirtilmiştir ( Bahreini vd.,2014, Ulu vd., 2016 ve Agrawal vd., 2018). İmmobilizasyondan sonra optimum pH'nın azaldığı veya arttığı rapor edilmiştir. Optimum pH'daki bu değişiklik hazırlanan malzeme ve enzim arasında gerçekleşen hidrojen bağı veya elektrostatik etkileşimlerden kaynaklanmaktadır (Asmat vd., 2017).

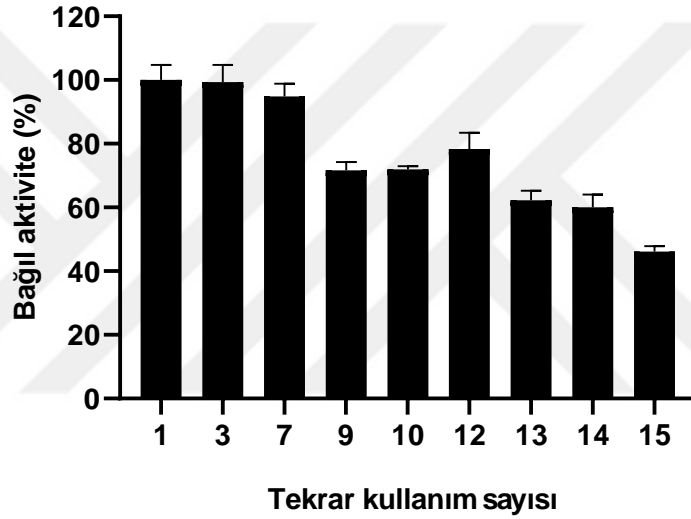
Serbest ve immobilize enzimin sıcaklık kararlılık deneyi, 25 ila 60 °C aralığında gerçekleştirilmiştir. Optimum sıcaklık değeri serbest enzim için 30 °C, immobilize enzim için 40 °C olarak bulunmuştur (Şekil 4.11b). Sıcaklığın 50 °C'ye yükseltilmesiyle, serbest enzimin bağıl aktivitesi hızlı bir şekilde düşmüş ve 55 °C'de bağıl aktivitesinin yaklaşık olarak %30'unu korumayı başarmıştır. OA/ST-Hb-L-ASNase ise 55 °C'de bağıl aktivitesinin %60'ından fazlasını korumuş hatta 60 °C'de bu aktiviteyi sürdürmüştür. Bu sonuçlar, immobilizasyondan sonra enzimin üstün bir termal direncine sahip olduğunu göstermiştir.



**Şekil 4.11.** Serbest ve immobilize enzimin bağlı aktiviteleri: (a) farklı pH değerleri ve (b) farklı sıcaklıklarda.

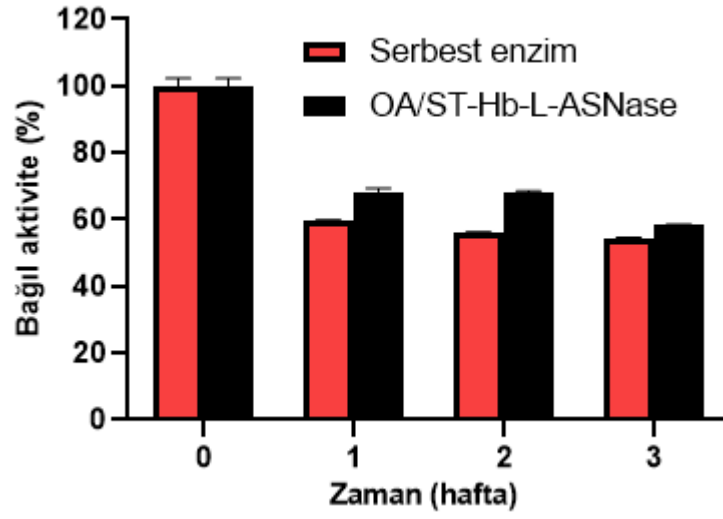
#### 4.7. Tekrar kullanım ve depolanma kararlılığı

Endüstriyel amaçlar için kullanılan enzimlerin yüksek maliyeti immobilize edilmiş enzimlerin yeniden kullanılma avantajı sayesinde azalmıştır. Tez kapsamında hazırlanan OA/ST-Hb-L-ASNase tekrarlanan 15. kullanımından sonra bile başlangıç aktivitesinin yaklaşık %50'sini korumuştur (Şekil 4.12). Bundan dolayı, OA/ST-Hb-L-ASNase malzemesinin yüksek oranda yeniden kullanılabilirliği, endüstriyel uygulamalar için uygun maliyet avantajı sağlayabilir. Enzim aktivitesindeki kademeli azalmalar, her kullanımdan sonra santrifüjleme sırasında enzim aktivitesinde meydana gelen kayıplar nedeniyle olabilir (Husain vd., 2017).



Şekil 4.12. OA/ST-Hb-L-ASNase malzemesinin tekrar kullanılabilirliği.

Serbest ve immobilize edilmiş enzimin depolama kararlılığını araştırmak için her iki örnek 25 °C'de 3 hafta boyunca saklanmıştır. Şekil 4.13, hem serbest hem de immobilize edilmiş enzimin aktivitesi üzerine depolama süresinin etkisini göstermektedir. Bir hafta sonra, serbest enzim için kalan aktivite %59 iken, immobilize enzim için %68 olarak bulunmuştur. Üç hafta sonra ise, kalan aktiviteler serbest enzim için %54, immobilize enzim için %58'dir. Bu sonuçlar immobilizasyonun L-ASNase katalitik aktivitesini korumaya yardımcı olduğunu ve immobilizasyon işleminin enzimin kararlılığını arttırdığını göstermektedir.



Şekil 4.13. Serbest ve OA/ST-Hb-L-ASNase'nin 25 °C'de depolama kararlılığı

## 5. SONUÇ

L-asparaginaz bazı lösemi türlerinde kemoterapötik ajan olarak yaygın bir şekilde kullanılan bir ilaçtır. L-asparaginazın yan etkilerini azaltmak ve yarı ömrünü artırmak için polietilen glikol (PEG) gibi polimerik yapılara immobilize edilerek uygulanmaktadır. İlaçların yan etkilerini ortadan kaldırmada ve kan ortamındaki ilacın yarı ömrünü uzatmada kırmızı kan hücreleri ve son yıllarda ise yapay olarak dizayn edilen kırmızı kan hücre mimik sistemler olarak ön plana çıkmaktadır. Özellikle gelecekte yapay kırmızı kan hücreleri ile oluşturulacak ilaç formülasyonlarının, yaygın kullanım alanı bulacağı ve biyoyumluluk açısından önemli avantajlar sağlayacağı açıktır. Literatürde kırmızı kan hücreleri ile L-asparaginaz taşınmasına yönelik çalışmalar mevcuttur. Bununla beraber yapay kırmızı kan hücreleri ile L-asparaginaz taşınmasına yönelik bir boşluk mevcuttur. Bu noktada çalışmanın amacı biyopolimerlerle hazırlanacak membranların kullanıldığı yapay kırmızı kan hücrelerinin oluşturulması ve L-asparaginaz enzim-ilacı için taşıyıcı sistem olarak kullanılabilirliğin test edilmesidir.

Bu bağlamda öncelikle nişasta, oleik asit, tween 40 kullanılarak aşılınmış nişasta oluşturulmuş ve FTIR ile karakterize edilmiştir. Hazırlanan bu membran materyali hemoglobin ve L-ASNase varlığında uygun koşullar sağlanarak yapay kırmızı kan hücrelerine dönüştürülmüştür. Elde edilen formülasyona (OA/ST-Hb-L-ASNase) ait FTIR spektrumu incelendiğinde, malzemenin hem Hb hem de saf enzimin karakteristik piklerini gösterdiği tespit edilmiştir. EDX analizlerinde OA/ST-Hb malzemelerinden kaynaklı karbon (C), oksijen (O), azot (N) ve demir (Fe) elementel pikleri ilaveten enzim içeren OA/ST-Hb-L-ASNase malzemesinde kükürt (S) elementel pikinin varlığı da bize yapının oluştuğunu kanıtlamaktadır. OA/ST-Hb-L-ASNase formülasyonuna ait termal analiz sonuçlarına bakıldığında yapının 300-350 °C aralığında bozulmaya başladığı ve vücut uygulaması düşünüldüğünde oldukça dayanıklı olduğu tespit edilmiştir. OA/ST ve OA/ST-Hb-L-ASNase malzemelerin yüzey morfolojisi SEM ile incelenmiş ve OA/ST malzemenin büyük oranda gözenekli bir yapıda olduğu, Hb ve L-ASNase eklendikten sonra malzemenin gözenekli yapısının kademeli olarak azaldığı tespit edilmiştir. Bu azalmanın nedeni olarak enkapsülleme esnasında var olan gözeneklerin Hb ve L-ASNase enzimi ile etkileşerek yeniden düzenlendiği ve gözeneklerin kapanmasına yol açması olarak düşünülmüştür. OA/ST ve OA/ST-Hb-

L-ASNase malzemelerinin ortalama hidrodinamik parçacık boyutları sırasıyla 120 ve 295 nm olarak ölçülmüştür. Enzimin kapsülasyonundan sonra OA/ST-Hb malzemesinin hidrodinamik büyüklüğündeki artış, enzimin makromolekül yapısının bir sonucudur. L-ASNase enzim-ilacının kullanım amacı düşünüldüğünde kan damarlarında kalma süresini uzatmak önemli bir avantaj sağlayacak olup formülasyona ait hidrodinamik çap büyümesi (~300 nm) bu duruma katkı sağlayabilir.

Geliştirilen formülasyonun yapısal, termal ve morfolojik karakterizasyonu sonrası yapıdaki L-ASNase enziminin aktivitesi, pH ve sıcaklık kararlılığı, tekrar kullanılabilirliği ve depolama kararlılığı da araştırılmıştır. pH'ın serbest ve immobilize enzim aktivitesi üzerine etkisi 5.0 ila 9.0 aralığında incelenmiş optimum pH değeri serbest enzim için 8.0, immobilize enzim için 8.5 olarak bulunmuştur. Genellikle L-ASNase için optimum pH aralığı 7.0 - 9.0 arasında değişebilmekte olup bu aralıkla uyum içindedir. Serbest ve enkapsüle enzimin sıcaklık kararlılık deneyi, 25 ila 60 °C aralığında gerçekleştirilmiş olup optimum sıcaklık değeri serbest ve enkapsüle enzim için sırasıyla 30 ve 40 °C olarak bulunmuştur. Sıcaklığın 50 °C'ye yükseltilmesiyle, serbest enzimin bağıl aktivitesi hızlı bir şekilde düşmüş ve 55 °C'de bağıl aktivitesinin yaklaşık olarak %30'unu korumayı başarmıştır. OA/ST-Hb-L-ASNase ise 55 °C'de bağıl aktivitesinin %60'ından fazlasını korumuş hatta 60 °C'de bu aktiviteyi sürdürmüş olup termal kararlılık açısından önemlidir.

Biyolojik ve endüstriyel olarak önemli olan enzimlerin yüksek maliyetini enkapsüle edilmiş enzimlerin yeniden kullanılma avantajı sayesinde azaltmak oldukça önemlidir. Geliştirilen OA/ST-Hb-L-ASNase tekrarlanan 15. kullanımından sonra bile başlangıç aktivitesinin yaklaşık %50'sini koruduğu çalışma sonucumuzda tespit edilmiştir. Enzim aktivitesindeki kademeli azalmalar, her kullanımdan sonra santrifüjleme sırasında enzim aktivitesinde meydana gelen kayıplar nedeniyle olabilmekte olup ve bu durum kabul edilebilir bir durumdur. Yine serbest ve enkapsüle edilmiş enzimin depolama kararlılığını araştırmak için her iki örnek 25 °C'de 3 hafta boyunca saklanmıştır. Bir hafta sonra, serbest enzim için kalan aktivite %59 iken, immobilize enzim için %68 olarak bulunmuştur. Üç hafta sonra ise, kalan aktiviteler serbest enzim için %54, immobilize enzim için %58'dir. Bu sonuçlar yapay kırmızı kan hücresi formülasyonunun L-ASNase katalitik aktivitesini korumaya azda olsa yardımcı olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak birçok ilacın biyo-yararlanımını arttırmak için farklı immobilizasyon teknikleri ile yeniden hazırlanması önemli bir alandır. Bu alanda birçok farklı teknik ve materyal kullanılmakta olup her yöntem ve materyalin kendine göre avantaj/dezavantajı mevcuttur. Son yıllarda bu yöntemlerde özellikle biyouyumluluk nedeniyle biyopolimerlerin kullanılması ve biyobenzer sistemlerin geliştirilmesi ön plana çıkmaktadır. Yapay kırmızı kan hücreleri de bu alanda son yıllarda kullanılan bir yaklaşımdır. Bu alışma ile önemli bir enzim-ilaç olan L-ASNase için bir yapay kırmızı kan hücre sistemini içeren bir formülasyon hazırlanarak literatüre yenilik getirilmiştir. Çalışma sonuçlarımız bu formülasyonun L-ASNase taşınmasında kullanılabilirliği ile ilgili olarak umut verici sonuçlar doğurmuştur.

## 6. KAYNAKLAR

- Agrawal S., Sharma I., Prajapati B.P., Suryawanshi R.K., Kango N., (2018) Catalytic characteristics and application of l-asparaginase immobilized on aluminum oxide pellets, *Int. J. Biol. Macromol.* **114**, 504–511.
- Ahmad, N., Pandit, N.P., Maheshwari, S.K. (2012). L-asparaginase gene - a therapeutic approach towards drugs for cancer cell . *International Journal of Biosciences (IJB)*. **2 (4)**, 1-11.
- Akova A. (2002). *Çörekotu Lipaz Enziminin İmmobilizasyonu ve Teknolojik Uygulamaları*. Doktora Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul.
- Alvarez O.A., Zimmerman G., (2000) Pegaspargase-induced pancreatitis. *Med Pediatric Oncol*, **34**, 200–205.
- Anonymous (2019b) <http://www.socmucimm.org/bacterial-transformation-electroporation/> (on-line erişim on 20 Augustos, 2019).
- Anonymous (2019b) [https://www.brendaenzymes.org/enzyme.php?ecno=3.5.1.1&Suchword=asparinas e&reference=&UniProtAcc=&organism%5B%5D=&show\\_tm=0#PD/](https://www.brendaenzymes.org/enzyme.php?ecno=3.5.1.1&Suchword=asparinas e&reference=&UniProtAcc=&organism%5B%5D=&show_tm=0#PD/)(on-line erişim on 20 Augustos, 2019).
- Anwar M.Z., Kim D.J., Kumar A., Patel S.K.S., Otari S., Mardina P., Jeong J.H., Sohn J.H., Kim J.H., Park J.T., Lee J.K., (2017) SnO<sub>2</sub> hollow nanotubes: A novel and efficient support matrix for enzyme immobilization, *Sci. Rep.* **7**, 15333
- Aryal B., Pokrzywinski K.L., Biel T.G., Rosen E.T., Bonanno J.L., Mascia F., Moshkelani D., Mog S., Rao V.A. (2018) Doxorubicin-induced cardiotoxicity is suppressed by estrous-staged treatment and exogenous 17 $\beta$ -estradiol in female tumor-bearing spontaneously hypertensive rats. *Biology of Sex Differences*, **9**, 9-25
- Ashihara Y., Kono T., Yamazaki S., (1978) Modification of E. coli lasparaginase with polyethylene glycol disappearance of binding ability to anti-l-asparaginase serum. *Biochem Biophys Res Commun*, **83(2)**, 385.

- Asmat S., Husain Q., Azam A., (2017) Lipase immobilization on facile synthesized polyaniline-coated silver-functionalized graphene oxide nanocomposites as novel biocatalysts: stability and activity insights, *RSC Adv.* **7**, 5019–5029.
- Aydın S., Geçkil H., Çaylak E., Kılıç N., (2004) Use of microorganisms in cancer therapy. *Fırat Tıp Dergisi* **9-2**, 30-34
- Bahreini E., Aghaiypour K., Abbasalipourkabir R., Mokarram A.R., (2014) Preparation and nanoencapsulation of L-asparaginase II in chitosan-tripolyphosphate nanoparticles and in vitro release study, *Nanoscale Res Lett.* **9**, 1–13.
- Banerjee T. and Aniyery Y.B., (2017) Thalassemia and its management during pregnancy, *World Journal of Anemia*, **1**, 5-17.
- Batool, T., Makky, E. A., Jalal, M., Yusoff, M. M. (2016) A comprehensive review on L-asparaginase and its applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **178(5)**, 900-923.
- Bay A., Öner A.F., Cesur Y., Demir C., Mukul Y., Açıkgöz M., (2005) Çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemi olgularında L-Asparajinaza bağlı toksisite. *Van Tıp Dergisi* **12-2**, 149-152
- Berikkhanovaa K., Omarbaev R., Gulyayeva A., Shulgauc Z., Ibrashevaa D., Adilgozhinaa G., Sergazy S., Zhumadilova Z., Askarovaa S., (2016) Red blood cell ghosts as promising drug carriers to target wound infections *Medical Engineering and Physics* **38 (9)**, 22-33
- Brena B., Gonzales-Pombo P., Batista- Viera F., (2013 )Immobilization of Enzymes: A Literature Survey. Immobilization of Enzymes and Cells, *Methods in Molecular Biology*, **1051**, 15-31
- Broome, J.D. (1961) Evidence that the L-asparaginase activity of guinea pig serum is responsible for its anti-lymphoma effects. *Nature*, **191**, 1114–1115.
- Cachumba J.J.M., Antunes F.A.F., Peres G.F.D., Brumano L.P., Dos Santos J.C., Da Silva S.S., (2016) Current applications and different approaches for microbial L-asparaginase production, *Brazilian J. Microbiol.*, **47**, 77–85

- Cao L., Luuk L., Roger S., (2003) Immobilised enzymes: carrier- bound or carrier free? *Current Opinion in Biotechnology* **14**, 387-394
- Chibata I., Tosa T., Sato T., (1978) Immobilized Aspartase-Containing Microbial Cells: Preparation and Enzymatic Properties. *Applied Microbiology* **27**, 878-885
- Datta S., Christena L.R., Rajaram Y.R.S., (2013) Enzyme immobilization: an overview on the techniques and support materials. *Biotech* **3**, 1-9
- Dhanam, J.G., Kannan, S. (2013). L-asparaginase- types, perspectives and applications. *Advanced Bio Tech.* ISSN: 2319-6750 Vol.13 Issue 05.
- Dong L., Zhang C., Zhang Y., Bai Y., Gu J., Sun Y., Chen M., (2015) Improving CO<sub>2</sub> /N<sub>2</sub> separation performance using nonionic surfactant Tween containing polymeric gel membranes, *RSC Adv.* **5**, 4947–4957.
- Gebreyohannes A.Y., Mazzei R., Poerio T., Aimar P., Vankelecom I.F.J., Giorno L., (2016) Pectinases immobilization on magnetic nanoparticles and their anti-fouling performance in a biocatalytic membrane reactor, *RSC Adv.* **6**, 98737–98747.
- Gençalp G., Tavil B., Olcay L., (2011) Çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemi tedavisinde L-Asparaginaz kullanımına bağlı alerjik reaksiyon sıklığı ve alerjik reaksiyonlara yaklaşım. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* **54**, 197-203
- Guilherme M.R., Oliveira R.S., Mauricio M.R., Cellet T.S.P., Pereira G.M., Kunita M.H., Muniz E.C., Rubira A.F., (2012) Albumin release from a brain-resembling superabsorbent magnetic hydrogel based on starch, *Soft Matter* **8**, 6629-6637
- Haider T., Husain Q., (2008) Concanavalin A layered calcium alginate- starch beads immobilized  $\beta$ -galactosidase as a therapeutic agent for lactose intolerant patients. *Int J Pharm* **359**, 1-6
- Haley E.E., Fischer G.A., Welch A.D., (1961) The requirement for L-asparagine of mouse leukemia cells L5178Y in culture, *Cancer Res.*, **21**, 532-536.

- Hamid Z.A.A., Tham C.Y., Ahmad Z. (2018) Preparation and optimization of surface-engineered poly(lactic acid) microspheres as a drug delivery device. *J Mater Sci.* **53**, 4745–58.
- Hasselberger F.X., Brown H.D., Chattopadhyay S.K., Mather A.N., Stasiw R.O., Patel A.B., Pennington S.N. (1970) The preparation of insoluble, matrix-supported derivatives of l-asparaginase for use in cancer therapy. *Cancer Res*, **30(11)**, 2736–2768.
- He Y., Sheng Q., Zheng J., Wang M., Liu B., (2011) Magnetite-graphene for the direct electrochemistry of hemoglobin and its biosensing application, *Electrochim. Acta.* **56**, 2471-2476
- Ho L.F., Li S.Y., Lin S.C., Hsu W.H., (2004) Integrated enzyme purification and immobilization processes with immobilized metal affinity adsorbents. *Process Biochem* **39**, 1573-1581
- Holle L.M., (1997) Pegaspargase: an alternative? *Ann Pharmacother* **31(5)**, 616–624.
- Husain Q., Asmat S., Azam A., (2017) Lipase immobilization on facile synthesized polyaniline-coated silver-functionalized graphene oxide nanocomposites as novel biocatalysts: stability and activity insights, *RSC Adv.* **7**, 5019–5029.
- Jaffe N., Traggis D., Das L., Frauenberger G., Hann H.W., Kim B.S., Bishop Y. (1973) Favorable remission induction rate with twice weekly doses of l-asparaginase. *Cancer Res* **33(1)**, 1–4.
- Jefferies S.R., Richards R., Bernath F.R., (1977) Preliminary studies with Lasparaginase bound to implantable bovine collagen heterografts: a potential long-term, sustained dosage, antitumor enzyme therapy system. *Biomat Med Dev Art Org*, **5(4)**, 337–354.
- Kasavi C. (2006). *Kovalent Bağlanma ve Fiziksel Adsorpsiyon Metotları ile Proteaz Enziminin İmmobilizasyonu*. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul.

- Kidd, J. G. (1953) Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum. I. course of transplanted cancers of various kinds in mice and rats given guinea pig serum, horse serum or rabbit serum. *Journal of Experimental Medicine*, **98**, 565–582.
- Kırtıl E., Öztop M.H., (2014) Enkapsülasyon Maddesi Olarak Lipozom ve Gıdalarda Kullanımı: Yapısı, Karakterizasyonu, Üretimi ve Stabilitesi *Akademik Gıda* **12-4**, 41-57
- Kowalik P., Elbaum D., Mikulski J., Fronc K., Kamińska I., Morais P.C., Eduardo de Souza P., Nunes R.B., Veiga-Souza F.H., Gruzef G., Minikayev R., Wojciechowski T., Mosiniewicz-Szablewska E., Szewczyk M., Pawlyta M., Sienkiewicz A., Łapiński M., Zajdel K., Stępień P., Szczepkowski J., Jastrzębski W., Frontczak-Baniewicz M., Paszkowicz W., Sikora B., (2017) Upconversion fluorescence imaging of HeLa cells using ROS generating SiO<sub>2</sub>-coated lanthanide-doped NaYF<sub>4</sub> nanoconstructs, *RSC Adv.* **7**, 30262–30273.
- Krajewska B., (2004) Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review *Enzyme and Microbial Technology* **35**, 126–139
- Lanvers-Kaminsky C., Schrey D., Borghorst S., ve diğerleri (2002). Therapeutic drug monitoring of asparaginase in the ALL-BFM 2000 protocol between 2000 and. *Pediatr Blood Cancer*. 2007;2010, **54**:952–958.
- Law A.S., Wriston Jr. J.C., (1971) Purification and properties of Bacillus coagulansl-asparaginase *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **147**, 744-752.
- Lejeune A., Moorjani M., Gicquaud C., Lacroix J., Poyet P., Gaudreault R. (1994) Nanoerythroosome, a new derivative of erythrocyte ghost: preparation and antineoplastic potential as drug carrier for daunorubicin. *Anticancer Res*, **14**, 915–9
- Li N., Guo P., Lou W.J., Chen S., (2012) Tribological Properties of Oleic Acid Capped Copper Nanoparticles Prepared by the Solventless Thermolysis of Single-Source Precursor, *Adv. Mater. Res.* **557–559** 1131–1139.

- Li T., Jing X., Huang Y., (2011) Polymer/Hemoglobin Assemblies: Biodegradable Oxygen Carriers for Artificial Red Blood Cells *Macromol. Biosci.* **11**, 865–874
- Liu Z.C. and Chang T.M.S., (2008) Long-term Effects on the Histology and Function of Livers and Spleens in Rats after 33% Toploading of PEG-PLA-nano Artificial Red Blood Cells *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, **36**, 513-524
- Lorent J.H., Leclercq J.Q. and Leclercq M.P.M., (2014) The amphiphilic nature of saponins and their effects on artificial and biological membranes and potential consequences for red blood and cancer cells *Org. Biomol. Chem.* **12**, 8803–8822
- Machado L.C., Da Costa D.M., Perotti G.F., Henriques R.R., De Couto R.A., Amim J., Shiguihara A.L., (2016) Characterization of Cellulose Ether Films Containing Tween 20 and Tween 40, *J. Chem. Pharm. Res.* **8**, 159–166.
- Mathe G., Amiel J.L., Clarysse A., Hayat M., Schwarzenberg L. (1970) The place of the l-asparaginase in the treatment of acute leukemias. *Recent Results Cancer* **33**, 278–87.
- Miletić N., Vuković Z., Nastasović A., Loos K., (2011) Effect of *Candida antarctica* Lipase B Immobilization on the Porous Structure of the Carrier, *Macromol. Biosci.* **11**, 1537-1543
- Mohamad N.R., Marzuki N.H.C., Buang N.A., Huyop F., Wahab R.A., (2015) An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, **29-2**, 205–220
- Mori T., Tosa T., Chibata I. (1974) Preparation and properties of lasparaginase entrapped in the lattice of polyacrylamide gel. *Cancer Res*, **34(11)**, 3066–3068.
- Nambu M., (1986) Process for producing immobilized l-asparaginase preparations for the therapy of leukemia. *US Patent* 4617271

- Nisha S., Arun Karthick S. and Gobi N., (2012) Review on Methods, Application and Properties of Immobilized Enzyme *Che Sci Rev Lett*, **1-3**, 148-155
- Orhan H. (2018). *Kanser Tedavisinde Kullanılan L-Asparaginazın Manyetik Nanopartiküllere İmmobilizasyonu*. Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın.
- Phillips R.M., Saleem M.U., Williams A., Morgan J. (2013). Kinetic analysis of the glutaminase activity of L-asparaginases derived from *Erwinia chrysanthemi* (Erwinase) and *Escherichia coli* (Kidrolase). *Mol Cancer Ther* **12**: C154.
- Poznansky M.J., Shandling M., Salkie M.A., Elliott J., Lau E. (1982) Advantages in the use of l-asparaginase-albumin polymer as an antitumor agent. *Cancer Res*, **42(3)**, 1020–5.
- Ramya, L.N., Doble, M., Rekha, V.P.B., Pulicherla, K.K. (2011). In silico engineering of Lasparaginase to have reduced glutaminase side activity for the effective treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, **33**, 617–621.
- Ramya, L.N., Doble, M., Rekha, V.P.B., Pulicherla, K.K. (2012). L-Asparaginase as potent anti-leukemic agent and its significance of having reduced glutaminase side activity for better treatment of acute lymphoblastic leukaemia. *Appl Biochem Biotechnol*. **167**: 2144–2159.
- Roche V.F., (1995) "Cancer and Chemotherapy", *Foye's Principles of Medicinal Chemistry, Part III* (pp: 1149-1151) Lemke T.L.(Ed); Williams D.A. (Ed) Wolters Kluwer/Lippincott Williams and Wilkins Baltimore- Philadelphia- New York- London- Buenos Aires- Hong Kong- Sydney- Tokyo
- Salzer, W. L., Asselin, B. L., Plourde, P. V., Corn, T., Hunger, S. P. (2014) Development of asparaginase *Erwinia chrysanthemi* for the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1329**, 81–92.
- Samui A., Kumar Sahu S., (2018) One-pot synthesis of microporous nanoscale metal organic frameworks conjugated with laccase as a promising biocatalyst, *This J. Is Cite This New J. Chem.* **42**, 4192.

- Sardar M., Gupta M.N., (2005) Immobilization of tomato pectinase on Con A-Seralose 4B by bioaffinity layering. *Enzyme Microb Tech* **37**, 355-359
- Sardar M., Roy I., Gupta M.N., (2000) Simultaneous purification and immobilization of *Aspergillus niger* xylanase on the reversibly soluble polymer Eudragit(TM) L-100. *Enzyme Microb Tech* **27**, 672-679
- Shen J., Wang L., Men Y., Wu Y., Peng Q., Wang X., Yang R., Mahmood K., Liu Z., (2015) Effect of water and methanol on the dissolution and gelatinization of corn starch in [MMIM][MeO]HPO<sub>2</sub> ], *RSC Adv.* **5**, 60330–60338.
- Shen S., Wang S., Zheng R., Zhu X., Jiang X., Fu D., ve ark. (2015) Magnetic nanoparticle clusters for photothermal therapy with near-infrared irradiation. *Biomaterials*, **39**, 67–74.
- Shi Q.H., Tian Y., Dong X.Y., Bai S., Sun Y., (2003) Chitosan- coated silica beads as immobilized metal affinity support for protein adsorption. *Biochem Eng J* **16**, 317- 322
- Shive M.S., Anderson J.M. (2012) Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv Drug Deliv Rev* **64**, 5–24
- Sun X., Wang C., Gao M., Hu A., and Liu Z., (2015) Remotely Controlled Red Blood Cell Carriers for Cancer Targeting and Near-Infrared Light-Triggered Drug Release in Combined Photothermal–Chemotherapy *Adv. Funct. Mater.* **25:16**, 2386-2394
- Ulu A. (2014). *Kemoterapötik Bir Ajan Olan L-asparaginaz'ın Farklı Polimerik Yapılara İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu*. Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi, Malatya.
- Ulu A., Ateş B., (2017) Immobilization of L-Asparaginase on Carrier Materials: A Comprehensive Review *Bioconjugate Chemistry*. **28**, 1598-1610
- Ulu A., Koytepe S., Ates B., (2016) Synthesis and characterization of PMMA composites activated with starch for immobilization of L-asparaginase, *J. Appl. Polym. Sci.* **43421**, 1-11

- Uygun M. (2006) *Aspergillus niger* ATCC 9642'nin alginat küreleri üzerine immobilizasyonu ve bazı tekstil boyaları ile zeytin karasuyunun renk gideriminde kullanımının araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın
- Wahyuningtiyas N.E., Sutyanto H., Rudiyanto E., Sukarni S., Puspitasari P., (2017) Thermogravimetric and Kinetic Analysis of Cassava Starch Based Bioplastic, *J. Mech. Eng. Sci. Technol.* **1**, 69-77.
- Warangkar S.C., Khobragade C.N. (2010). Purification, characterization, and effect of thiol compounds on activity of the *Erwinia carotovora* L-asparaginase. *Enzyme Res* 2010:165878.
- Wileman T.E., (1991) Properties of l-asparaginase-dextran conjugates. *Adv Drug Delivery Rev* **6(2)**, 167–80.
- Wu Z., Esteban B. Ávila F, Martín A., Christianson C., Gao W., Thamphiwatana SK., Escarpa A., He Q., Zhang L., Wang J. (2015) RBC micromotors carrying multiple cargos towards potential theranostic applications *Nanoscale*, **7**, 13680-13686
- Xu R., Zhang J., Zhou P., Yang R., Feng X. and Xu L., (2015) A novel artificial red blood cell substitute: grafted starch-encapsulated hemoglobin *RSC Adv.*, **5**, 43845–43853
- Yadav, S., Verma, S.K., Singh, J., Kumar, A. (2014). Industrial production and clinical application of l-asparaginase: a chemotherapeutic agent. World Academy of Science, Engineering and Technology International Journal of Medical, *Pharmaceutical Science and Engineering* **8(1)**, 40-61
- Yarrow F., Rice J.H., (2011) Localized IR spectroscopy of hemoglobin, *European Biophysics Journal* **40**, 217-219
- Zhao X.S., Bao X.Y., Guo W., Lee F. Y., (2006) Immobilizing catalysts on porous materials *Materials today* **9**, 32-39.

## ÖZGEÇMİŞ

**Ad Soyad:** Gülşah KARADÖL

**Doğum Yeri ve Tarihi:** Sarız-20/05/1979

**Adres:** İnönü Üniversitesi Rektörlük İdari Bina BAP Koordinasyon Birimi

**E-Posta:** gulsah.karadol@inonu.edu.tr

**Lisans:** Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü

**Yüksek Lisans (Varsa):** İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü

**Mesleki Deneyim ve Ödüller:**

### Yayın Listesi:

- 1- Erdoğan S, Karlıdag S, Basgel S, Ulu A, Yilmaztekin M, Karadol, Yılmaz Ugur G, Ates B (2018) The effect of heat treatment on sugar, hmf and antioxidant properties of honey obtained from different regions in Turkey. *Journal of Apicultural Research* Cilt:1 Sayı:2, 32-45.

### Bildiriler:

- 1- Erdoğan S, Köytepe S, Cengiz A, Karadöl G, Önal Y, Seckin T., Poliimit-V2O5 Hibrit Materyalin Sentezi ve Yakıtlarda Kükürt Uzaklaştırılması İçin Optimizasyon Çalışmaları. XII. Ulusal Spektroskopi Kongresi, ANTALYA. 2011.