




Araştırma Makalesi

BODIPY-Lipit Bileşiğinden Yeni Lipozomların Sentezi ve PDT Özelliklerinin Araştırılması

 Muhammed Emre Özler^{a,*},  Yasemin Bozkurt^b,  Fazlı Sözmen^a

^aSivas Cumhuriyet Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Nanoteknoloji Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Sivas/Türkiye.

^bSivas Cumhuriyet Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Sivas/Türkiye.

*Sorumlu Yazar: memreozler@gmail.com

Makale Bilgileri:

Geliş: 25/04/2024, Revizyon: 04/06/2024, Kabul: 09/06/2024.

ÖZET

Kemoterapi, radyoterapi, cerrahi müdahale gibi geleneksel kanser tedavi yöntemlerinin yüksek toksisite, ilaç direnci ve enfeksiyon gibi çeşitli yan etkilerinden dolayı, fotodinamik terapi (PDT), fototermal terapi (PTT) veya sonodinamik terapi (STT) gibi invaziv olmayan nispeten daha az yan etkilere sahip kanser tedavi yöntemlerine olan ilgi giderek artmaktadır. Bu non-invaziv terapi yöntemleri içerisinde de PDT sahip olduğu özelliklerinden dolayı literatürde en çok çalışılan terapi yöntemlerinden biridir. Bu ve benzeri terapi yöntemleri çalışılırken göz önünde bulundurulması gereken en önemli hususlardan biri fizyolojik koşullardır. Bu nedenle yapı bakımından hücre zarına benzeyen lipozomal yapılar ilaç taşıyıcı sistemler başta olmak üzere yaygın bir şekilde araştırılmaktadırlar. Genellikle nano boyutta sentezlenen lipozomal yapılar kolloidal kararlılıkları, biyoyumlu olmaları, toksik olmamaları ve etkili bir şekilde hedeflenebilmeleri gibi özellikleri nedeniyle de son derece ilgi görmektedirler. Bu çalışmada PDT özelliğine sahip BODIPY bazlı yeni lipozomal yapıların sentezlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, öncelikle BODIPY türevi bir bileşik fotoduyarlaştırıcı olarak sentezlenip karakterize edilmiştir. Daha sonra, serbest karboksil grubu içeren bu BODIPY (4,4-Difloro-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indasen) türevi, lizofosfatidilkolin ile esterleşme reaksiyonu vasıtasıyla konjuge edilmiştir. Elde edilen BODIPY-Lipit konjugatı kullanılarak ince film hidratlama yöntemiyle nano boyutta lipozomal yapılar sentezlenmiştir. Son olarak yapılarında bir fotoduyarlaştırıcı bileşik bulduran bu lipozomal yapıların PDT özellikleri 530 nm dalga boyundaki LED ışığı kullanılarak belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: BODIPY, Fotodinamik Terapi, Lipozom.

Synthesis of New Liposomes from BODIPY-Lipid Compound and Investigation of PDT Properties

ABSTRACT

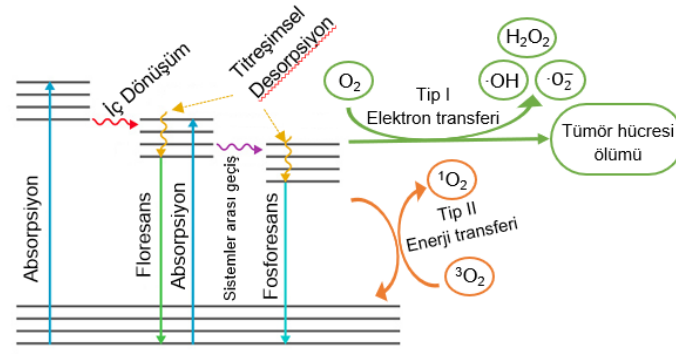
Due to the various side effects of traditional cancer treatment methods such as chemotherapy, radiotherapy and surgical intervention, such as high toxicity, drug resistance and infection, non-invasive methods such as photodynamic therapy (PDT), photothermal therapy (PTT) or sonodynamic therapy (STT) have relatively fewer side effects and interest for them in these cancer treatment methods is increasing. Among these non-invasive therapy methods, PDT is one of the most researched therapy methods in the literature due to its features. One of the most important issues to consider when researching this and similar therapy methods is physiological conditions. For this reason, liposomal

structures, which are resemble in structure to the cell membrane, are widely researched, primarily as drug delivery systems. Liposomal structures, which are generally synthesized in nanoscale, attract great attention due to their colloidal stability, biocompatibility, non-toxicity and are effective targeted. In this study, it was aimed to synthesize new BODIPY-based liposomal structures with PDT properties. For this purpose, firstly, a BODIPY-derived compound was synthesized and characterized as a photosensitizer. Then, via an esterification reaction, this BODIPY derivative which had a free carboxyl group was conjugated with lysophosphatidylcholine. Nanoscale liposomal structures were synthesized by the thin film hydration method using the obtained BODIPY-Lipid conjugate. Finally, utilizing LED light with a wavelength of 530 nm, the PDT characteristics of these liposomal structures which include a photosensitizer component in their structure were determined.

Keywords: *BODIPY, Photodynamic, Therapy, Liposome.*

I. Giriş

İyi huylu ve kötü huylu tümörlerin tedavisinde tercih edilen yöntemlerin başında kemoterapi, radyoterapi, cerrahi yöntemler ve çeşitli fototerapi uygulamaları gelmektedir. Kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi müdahale gibi yöntemlerin sebep olduğu yan etkiler, yüksek maliyet ve zorlu tedavi süreçleri nedeniyle alternatif yöntemlerin geliştirilmesine gösterilen ilgi artmaktadır. Fototerapi, genellikle görünür bölge, ultraviyole (UV) veya yakın infrared (NIR) bölgesindeki ışığın tedavi amaçlı kullanıldığı yöntemlere verilen genel isimdir. Fotodinamik terapi (PDT) ise uzun bir süredir kullanılmasına rağmen yeni yaygınlaşan en önemli fototerapi yöntemlerinden biridir (Robertson ve ark., 2009). Antik çağ uygarlıkları sedef hastalığı ve cilt kanseri gibi çeşitli hastalıkları tedavi etmek amacıyla güneş ışığını kullanmışlardır. 18. Yüzyıl başlarında Finsen'in lupus vulgaris adlı cilt hastalığının tedavisinde güneş ışığının veya ısı filtreli bir karbon ark lambasından gelen ışığın kullanılabileceğini bildirmesi modern fototerapinin başlangıcı olmuştur (Correia ve ark., 2021). PDT cilt lezyonları, akne, göz de oluşan damar tümörleri ve kanser gibi hastalıkların tedavisinde kullanılan, vücut bütünlüğünde herhangi bir bozulmaya sebep olmayan bir çeşit terapi yöntemidir (Sun ve ark., 2023). PDT seçici olarak hedef dokuda biriken, ışığa duyarlı fotoduyarlaştırıcı (PS) maddenin, moleküler oksijen varlığında, uygun dalga boyundaki ışığa maruz bırakılması prensibine dayanmaktadır. Bu yöntemde PDT bileşenlerinden olan ışık ve PS tek başına sitotoksik etki oluşturmamaktadır. Ancak ortamda bulunan moleküler oksijen gibi bileşiklerin varlığında bir araya geldiklerinde gerçekleşen fotokimyasal reaksiyon sonrası ışığın geldiği dokularda sitotoksik etkiler göstermektedirler. PDT'de gerçekleşen fotofiziksel mekanizma genellikle Jablonski diyagramı üzerinde gösterilir (Şekil 1). PDT mekanizmasının Tip I ve Tip II olmak üzere genellikle iki tip reaksiyon üzerinden gerçekleştiği belirtilir (Kamkaew ve ark., 2013, Ion, 2000). PDT'de kullanılan fotoduyarlaştırıcı maddeler, oksijen moleküllerinden reaktif oksijen türleri üretmek için uygun dalga boyundaki ışık varlığında aktive olabilen bileşiklerdir. Bu bileşiklerden hematoporfirin türevi olan Photofrin (HpD), modifiye edilmiş porfirinler, klorinler, ftalosiyeninler ve BODIPY türevleri gibi birçok fotoduyarlaştırıcı madde, PDT uygulamalarında kullanılmaktadır. Fotoduyarlaştırıcı madde olarak BODIPY boyar maddeleri sahip oldukları fotofiziksel özellikleri, kararlılıkları ve birçok farklı pozisyondan kolay fonksiyonlandırılmaları gibi öne çıkan özellikleri nedeniyle PDT'de çokça tercih edilmektedirler.



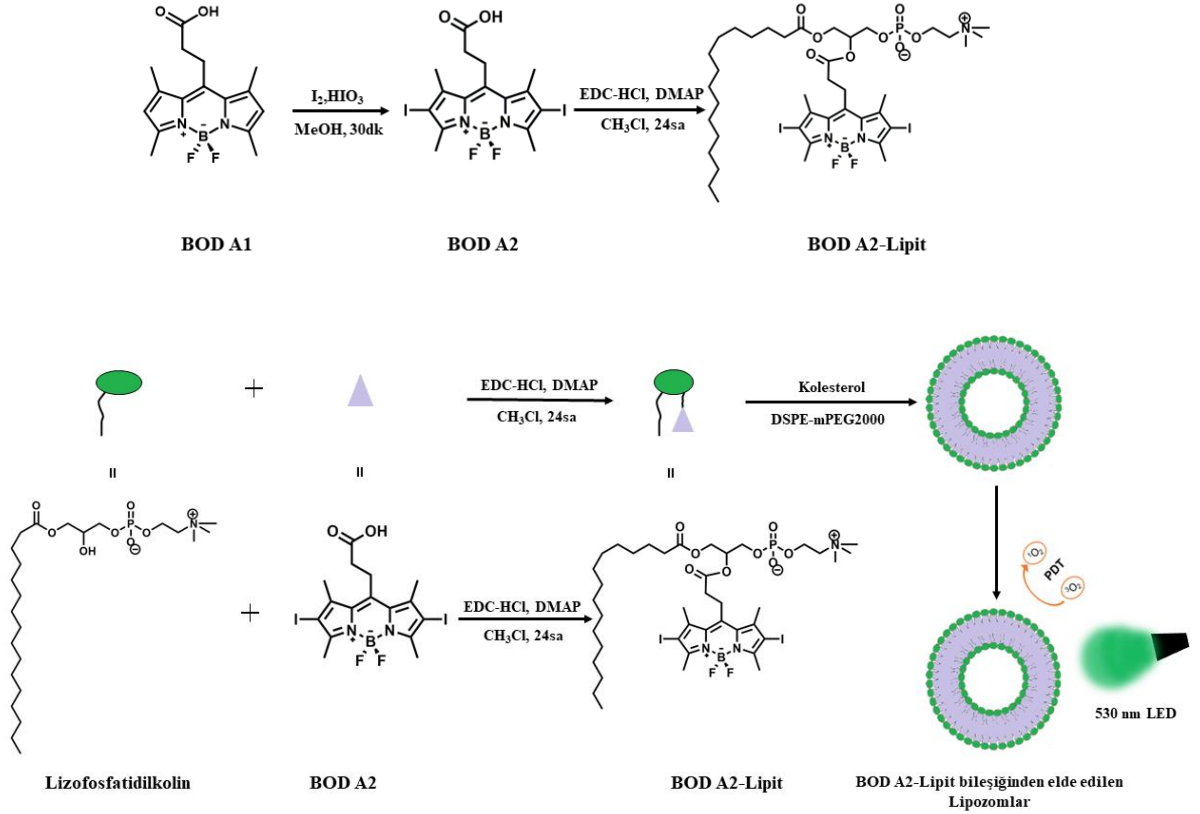
Şekil 1. PDT'de gerçekleşen fotofiziksel süreçleri gösteren Jablonski diyagramı.

BODIPY bileşiği ilk olarak 1960'lı yılların sonlarında Treibs ve Kreuzer'in çalışmaları sonucunda elde edilmiştir (Treibs ve Kreuzer, 1968). İlk çalışmalardan sonra çok çeşitli BODIPY türevleri sentezlenmiş ve başta biyolojik görüntüleme ve etiketleme gibi biyolojik uygulamalar olmak üzere sensör uygulamaları ve PDT uygulamaları gibi birçok alanda kullanılmaktadırlar (Loudet ve Burgess, 2007). BODIPY türevi bileşiklerin bir PS'ye dönüştürülmesi amacıyla bu bileşikler genellikle Ir, Pd, Pt, Br, I gibi çeşitli ağır atomlarla modifiye edilirler. Ancak literatürde ağır atom içermeyen PS özellik gösteren farklı BODIPY türevleri de vardır (Çakmak ve ark., 2011). PDT'de kullanılan PS'lerin sulu ortamlarda kullanılabilir olması hem biyoyoumluluk açısından hem de PS'lerin genellikle biyolojik ortamlarda kullanılması sebebiyle son derece önemlidir (Li ve ark., 2020). Ps'lerin biyoyoumlu olması ve biyolojik ortamlarda kullanılabilmesi amacıyla çeşitli taşıyıcı sistemler ile birlikte kullanılması son zamanlarda sıklıkla tercih edilmektedir (Simões ve ark., 2020, Abrahamse ve Hamblin 2016). PS'lerin taşıyıcı yapıya bağlanması ya da yüklenmesiyle tümör dokulara seçici olarak taşınması ve PDT etkinliğinin biyolojik ortamlarda artırılması ile ilgili çeşitli çalışmalar son derece ilgi görmektedir. Bingham'ın 1960'lı yıllarda yaptığı çalışmalarla bu taşıyıcı sistemlerden biri olan lipozomlar keşfedilmiştir (Nsairat ve ark., 2022). Taşıyıcı sistemler olarak lipozomlar, lipofilik, hidrofilik ve amfilik karakterdeki farklı bileşenleri taşıyabilme kapasitelerinden dolayı çokça tercih edilmektedir (Nsairat ve ark., 2022). Son zamanlarda, lipozomal taşıyıcı sistemlerin nanotıp uygulamaları içerisinde kullanımında artış gözlemlenmektedir (Lombardo ve Kiselev, 2022). Genellikle bir çift lipit tabakadan oluşan lipozomların, membran lipitlerinin sulu bir ortama konulmasıyla küresel bir formda lipit bileşenlerin kendiliğinden bir araya gelmesiyle oluştuğu görülmektedir. Küresel yapıda olan lipozomların sulu ortamda hidrofilik baş kısmının su ile temas halinde dışa doğru olduğu ve hidrofobik kuyrukların ise sulu ortamdan kaçınacak şekilde birbirlerine doğru yönlenecek şekilde çift lipit tabakasını oluşturdukları bilinmektedir (Watson, 2015). Lipozomlar temel yapı bileşeni olan fosfolipitlerin modifikasyonu ile çeşitli formlarda sentezlenebilmektedir. Bu modifikasyonlar hidrofilik baş grubu ile sağlanacağı gibi hidrofobik yan zincirin işlevselleştirilmesiyle de gerçekleştirilebilir. Bu çalışmada BODIPY bazlı yeni lipozomal yapıların sentezi, karakterizasyonu ve PDT özelliklerinin araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla sentezlenen lipozomal yapılar, bir PS olan BODIPY bileşiğinin lipozomal yapıya doğrudan yüklenmesi yoluyla değil, BODIPY bileşiği ile bir lipit bileşiğinin konjuge edilmesiyle sentezlenen BODIPY-Lipit konjugatı kullanılarak elde edilmişlerdir. Bu şekilde sentezlenen lipozomal yapıların sayısı literatürde oldukça sınırlıdır (Lombardo ve Kiselev, 2022).

II. MATERYAL METOT

Bu çalışma kapsamında kullanılan kimyasallar ve çözücüler aşağıda da verilmiştir. Bu çalışmada kullanılan, 2,4- dimetilpirol, ve süksinik anhidrit, magnezyum sülfat ($MgSO_4$), hekzan, etil asetat (EtOAc), 1-etil-3-3-dimetilaminopropil karbodiimid (EDC), 4-dimetilamino piridin (DMAP), diklorometan (DCM), kloroform, sodyum klorür (NaCl) ve 9,10-Anthracenediyl-bis(methylene)dimalonic acid (ABDA) Sigma Aldrich'den, metanol (MeOH) ve bortriflorürün dietiler kompleksi ($BF_3 \cdot OEt_2$) Merck'den, toluen,

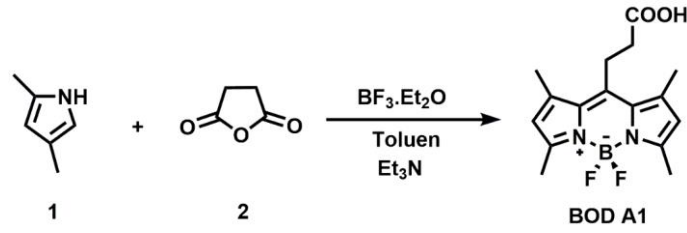
triethylamin (Et_3N) ve iyot (I_2) Carlo Erba'dan, iyodik asit (HIO_3) Acros Organic'den, kolesterol, 1,2 distearoil-sn-glisero-3-fosfoetanolin-n-methoxy polietilen glikol-2000 (DSPE mPEG-2000) ve lizofosfatidilkolin (1-palmitoyl-2-hidroksi-sn-glisero-3-fosfokolin) Avanti'den temin edilmiştir. Tüm kimyasallar analitik saflıkta ve alındığı gibi kullanılmıştır.



Şema 1. BOD A2-Lipit konjugatının ve lipozomal yapıların sentezi ve çalışma prensibi.

A. BOD A1 Bileşiğinin Sentezi

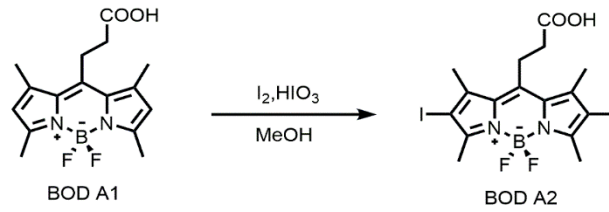
BOD A1 bileşiğinin sentezi literatüre göre yapılmıştır (Lim ve ark., 2010, Niu ve Aisa, 2017, Ambroz ve ark., 2019). 40 mL toluen içerisinde 2,4-dimetilpirol (1.0 mL, 10 mmol) ve süksinik anhidrit (400 mg, 4.0 mmol) eklenerek reaksiyon karışımı 80°C 'ye ısıtılmıştır. Daha sonra, argon atmosferinde 5 saat karışmaya bırakılmıştır. Ardından, oda sıcaklığına gelmesi beklenmiş ve reaksiyona sırayla $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (5 mL, 40 mmol) ve triethylamin (Et_3N) (10 mL, 80 mmol) eklenerek oda sıcaklığında 16 saat karıştırılmaya devam edilmiştir. Sonrasında 0.1 M HCl sulu çözeltisi ile reaksiyon durdurulmuş ve reaksiyon karışımı DCM ile ekstrakte edilmiştir. Son olarak DCM evaporatörde uzaklaştırılmış ve elde edilen karışım kolon kromatografisiyle etil asetat/hekzan (v/v) çözücü sistemi kullanılarak ürün saflaştırılmıştır (%27) (Şekil 2). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 6.06 (2H, s), 3.30 (2H, t), 2.63 (2H, t), 2.51 (6H, s), 2.43 (6H, s) (Şekil 6). MS HRMS (TOF-ESI): m/z hesaplanan: 321.1586; bulunan: 321.1580 $[\text{M}+\text{H}]^+$, $\Delta = 1.8$ ppm (Şekil 7).



Şekil 2. BOD A1 bileşiğinin sentez şeması.

B. BOD A2 Bileşiğinin Sentezi

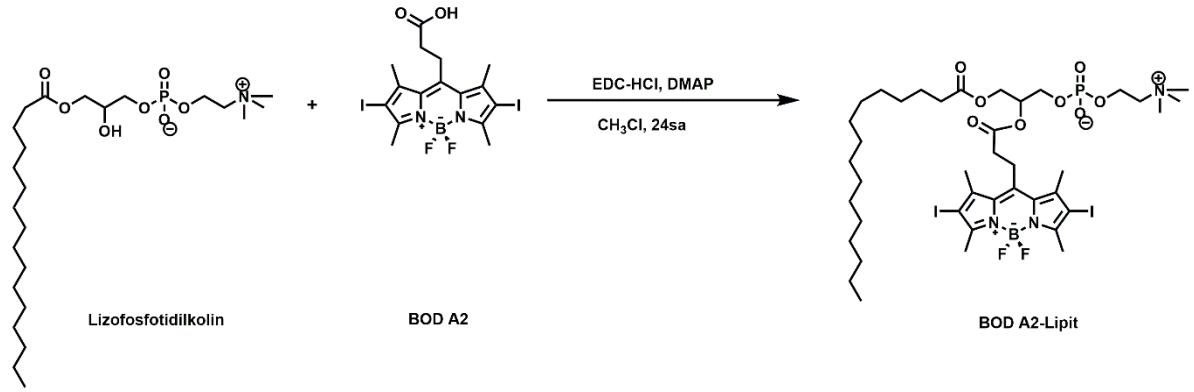
BODIPY A1 (600 mg, 1.87 mmol) bileşiği, 50 mL MeOH içerisinde çözülmüştür. Sonrasında çözeltiye sırasıyla iyot (I_2) (1.24 g, 4.87 mmol) ve iyodik asit (HIO_3) (660 mg, 3.75 mmol) ilave edilmiştir. Daha sonra karışım oda sıcaklığında 30 dk karışmaya bırakılmıştır. Ardından MeOH evaporatörde uzaklaştırılmış, BODIPY A2 bileşiği flaş silika kolon kromatografisi kullanılarak saflaştırılmıştır (Etil Asetat/Hekzan, v/v) (Şekil 3) (Lim ve ark., 2010). 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ H 3.38 (2H, t), 2.64 (2H, t), 2.60 (6H, s), 2.49 (6H, s) (Şekil 8). ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ C 174.12, 156.44, 142.54, 142.38, 131.26, 87.03, 34.50, 29.78, 24.34, 19.13, 16.29 (Şekil 9). MS HRMS (TOF-ESI): m/z hesaplanan: 570.9362; bulunan: 570.9523 [M-H]⁻, Δ = 28.2 ppm (Şekil 10).



Şekil 3. BOD A2 bileşiğinin sentez şeması.

C. BOD A2-Lipit Konjugatının Sentezi

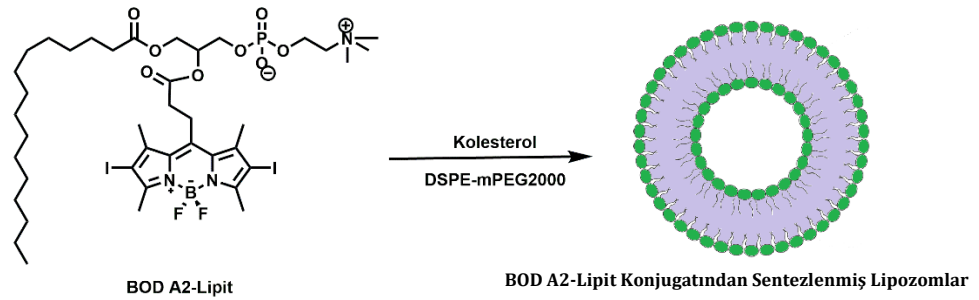
1 mL kloroform içine, 100 nmol Lizofosfatidilkolin, 100 nmol BOD A2, 50 nmol 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid (EDC) ve 25 nmol 4-dimetilamino piridin (DMAP) sırayla eklenmiş ve 24 saat argon atmosferinde karıştırmaya bırakılmıştır. Daha sonra organik solvent indirgenmiş basınç altında uzaklaştırılmıştır. Son olarak BOD A2-Lipit konjugatı diol modifiyeli silika kolonu kullanılarak saflaştırılmıştır (%1, %5 ve %10 MeOH/DCM, v/v) (Şekil 4) (Lovell ve ark., 2011, Cheng ve ark., 2019). 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ H 4.56- 4.33 (2H, m), 4.32- 4.05 (2H, m), 4.03-3.89 (2H, m), 3.86-3.68 (2H, m), 3.66-3.46 (1H, m), 3.38-3.22 (11H, m), 2.63-2.53 (8H, m), 2.51- 2.45 (6H, s), 2.32-2.23 (2H, m) 1.62- 1.50 (2H, m), 1.32-1.17 (24H, m), 0.90- 0.81 (3H, m) (Şekil 11a). ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ C 173.63, 170.76, 156.29, 142.95, 87.01, 70.66, 63.46, 62.75, 54.84, 39.05, 35.30, 34.21, 32.01, 29.79, 29.64, 29.61, 29.44, 29.30, 24.99, 24.58, 22.77, 19.15, 16.28, 14.21) (Şekil 11b). MALDI-TOF: m/z hesaplanan: 1049.266; bulunan: 1049.878 [M]⁺, Δ = 583.2 ppm (Şekil 12).



Şekil 4. BOD A2-Lipit konjugatının sentez şeması.

D. BOD A2-Lipit Konjugatından Lipozomların Sentezi

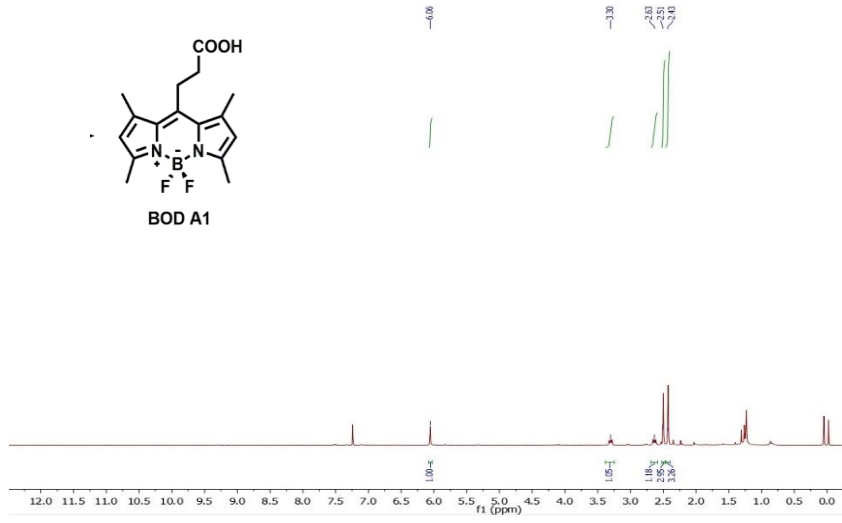
Öncelikle BOD A2-Lipit konjugatı, kolesterol ve DSPE mPEG-2000'nin her biri ayrı ayrı kloroform içerisinde çözülmüştür. Ardından, yüzde birleşim oranları olarak sırasıyla %90, %5 ve %5 olacak şekilde karıştırılmışlardır. Karışım vorteks ile iyice dispersiye edilmiş ve ardından, lipit film oluşturmak amacıyla organik solvent evaporatörde uzaklaştırılmıştır. Lipit film hidratlanana kadar inert gaz atmosferinde -20 °C'de saklanmıştır. Daha sonra lipit filme PBS tamponu (pH 7.4) eklenerek hidratlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Lipozom yapılarını elde etmek amacıyla hidratlanmış karışım, sıvı azot içerisinde tamamen dondurulup daha sonra 65 °C hızlıca yeniden ısıtılmış ve bu işlem seri biçimde tekrarlanmıştır (minimum 5 defa). Yapıların düzenli bir şekilde oluşumunu sağlamak için ayrıca karışıma sonikasyon uygulanmıştır. Lipozom yapılarını oluşturmak için 65°C'de ısıtılan manyetik karıştırıcı üzerinde içerisinde 200 nm'lik bir polikarbonat membran bulunan mini-extruder kullanılarak karışım 10 defa ekstrüde edilmiştir. Sonrasında elde edilen lipozomlar argon atmosferinde +4 °C saklanmıştır (Şekil 5) (Liu ve ark., 2010, Jin ve Lovell, 2013, Jin, 2015).



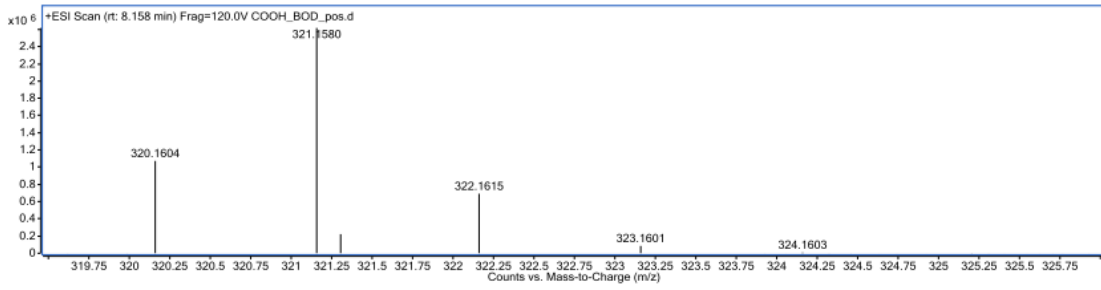
Şekil 5. BOD A2-Lipit konjugatından lipozomların sentezi.

III. BULGULAR VE TARTIŞMA

Çalışmanın ilk aşamasında sentezlenen BOD A1 bileşiği ¹H-NMR spektroskopisi (Şekil 6) ve yüksek çözünürlüklü kütle spektroskopisi (HRMS) (Şekil 7) kullanılarak karakterize edilmiştir. İlgili sonuçlar materyal metot kısmında verilmiştir. ¹H-NMR spektrumu ve kütle spektroskopisinin sonuçları BOD A1 bileşiğinin başarılı bir şekilde sentezlendiğini göstermektedir.

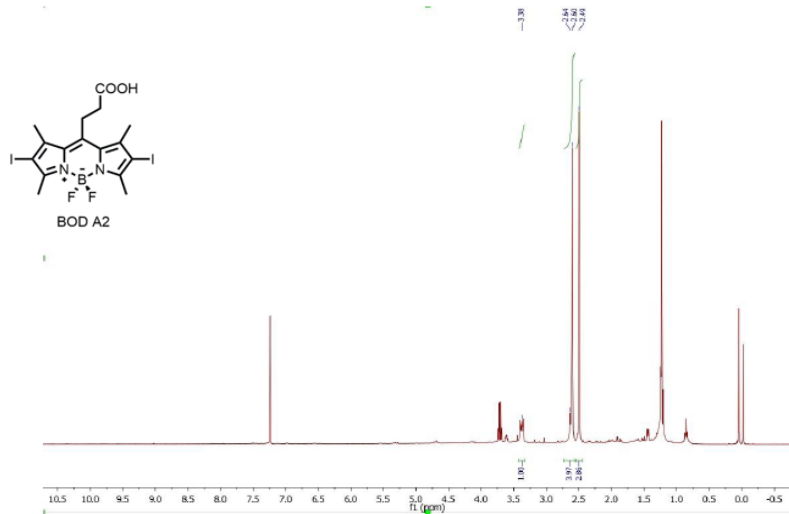


Şekil 6. BOD A1 bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu.

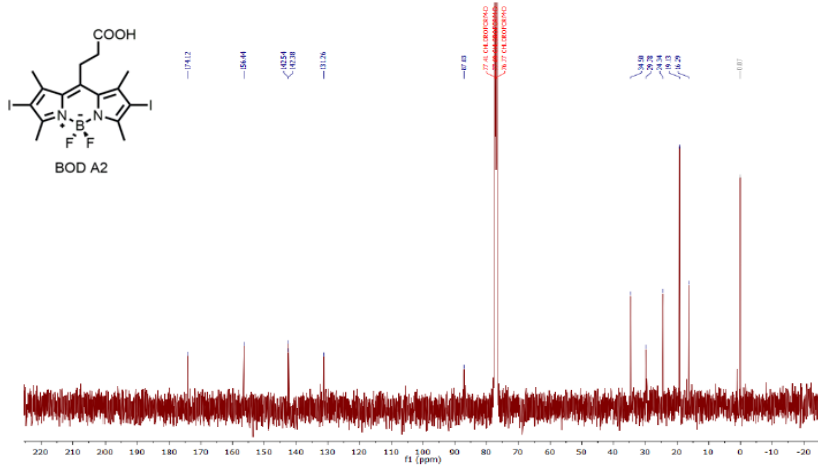
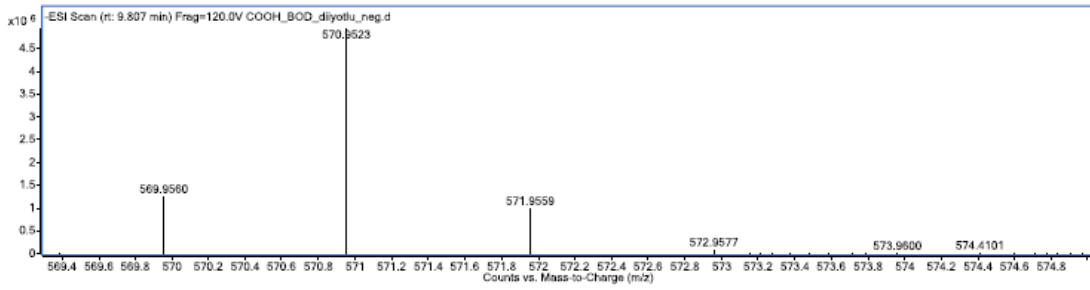


Şekil 7. BOD A1 bileşiğinin kütle spektrumu.

BOD A1 bileşiği bu şekliyle singlet oksijen üretmez ancak bileşiğe iyot gibi bir element eklenirse ağır atom etkisi nedeni ile elde edilen bileşik singlet oksijen üretebilir. Bu yöntem çoğu zaman BODIPY türevi bileşikleri bir PS' e dönüştürmek için sıklıkla tercih edilir. Bu nedenle BOD A1 bileşiğine iyot bağlanarak BOD A2 bileşiği sentezlenmiştir. Bu şekilde sentezlenen BOD A2 bileşiği de yine ¹H-NMR, ¹³C-NMR (Şekil 8, Şekil 9) ve yüksek çözünürlüklü kütle spektroskopisi (HRMS) (Şekil 10) ile karakterize edilmiştir. İlgili sonuçlar materyal metot kısmında verilmiştir. Buna göre BOD A2 bileşiği de başarılı bir şekilde sentezlenmiştir.

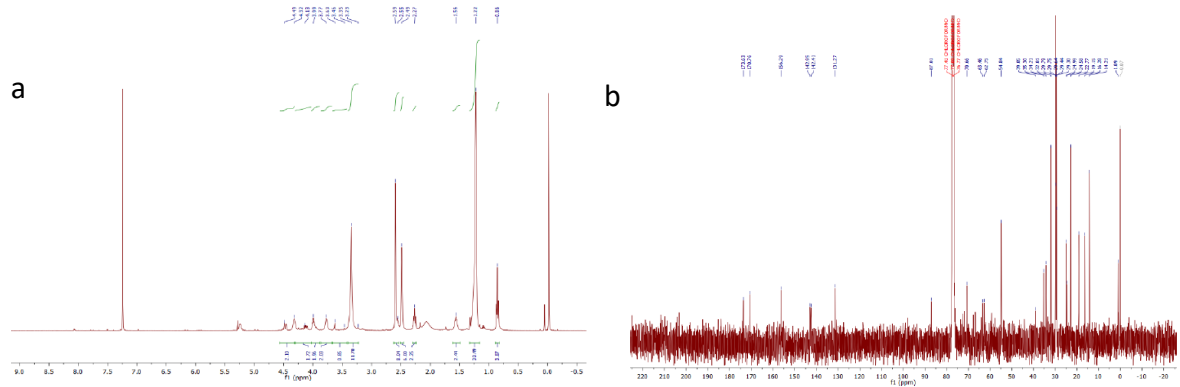


Şekil 8. BOD A2 bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu.

Şekil 9. BOD A2 bileşiminin ¹³C-NMR spektrumu.

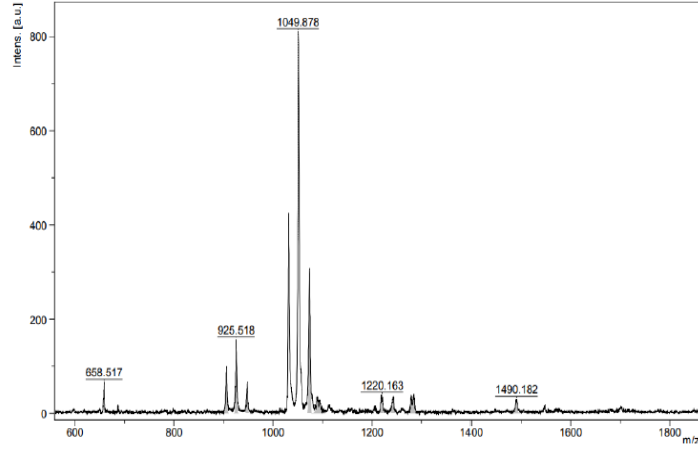
Şekil 10. BOD A2 bileşiminin kütle spektrumu.

Bu çalışmada PS'lerin sentezlenmesi planlanan lipozomları oluşturan lipit bileşenlerinin bir parçası olarak, lipozomlar tarafından taşınması hedeflenmiştir. Bu amaçla karboksilik asit fonksiyonel grubu taşıyan BOD A2 bileşiği ile EDC, DMAP varlığında lizofosfatidilkolinin hidroksil grubu arasında meydana gelen eşleşme (coupling) reaksiyonu üzerinden bir ester yapısı oluşturularak BOD A2-Lipit konjugatı sentezlenmiştir. BOD A2-Lipit konjugatı da, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, MALDI-TOF kütle spektrometresi ve FT-IR spektroskopisi kullanılarak karakterize edilmiştir. İlgili sonuçlar materyal metot kısmında verilmiştir ve BOD A2-Lipit konjugatının ¹H-NMR ve ¹³C-NMR spektrumları literatür ile uyumludur (Cheng ve ark., 2019) (Şekil 11).

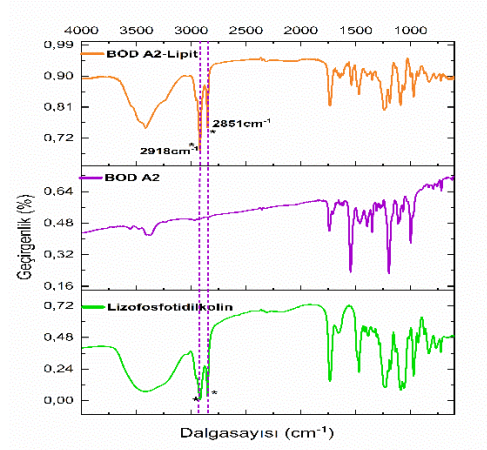
Şekil 11. BOD A2-Lipit konjugatının ¹H-NMR (a), ¹³C-NMR (b) spektrumları.

Yine BOD A2-Lipit konjugatına ait MALDI-TOF kütle spektrumu da (Şekil 12) BOD A2-Lipit konjugatının sentezlendiğini teyit etmektedir. Ayrıca konjugata ait FT-IR spektrumu (Şekil 13) incelendiğinde de BOD A2-Lipit konjugatının, konjugatı oluşturan tüm bileşiklere ait piklerin neredeyse

tamamını içerdiği görülmektedir. Bu sonuçlardan BOD A2-Lipit konjugatının başarılı bir şekilde sentezlendiği anlaşılmıştır.

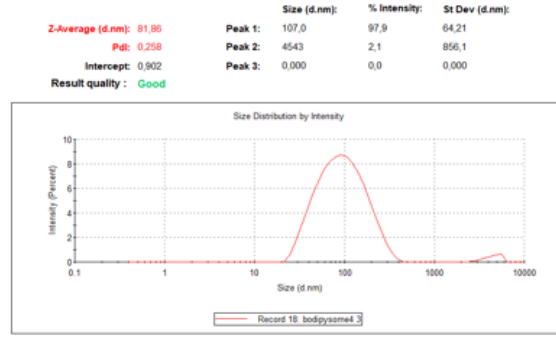


Şekil 12. BOD A2-Lipit konjugatının MALDI-TOF kütle spektrumu.

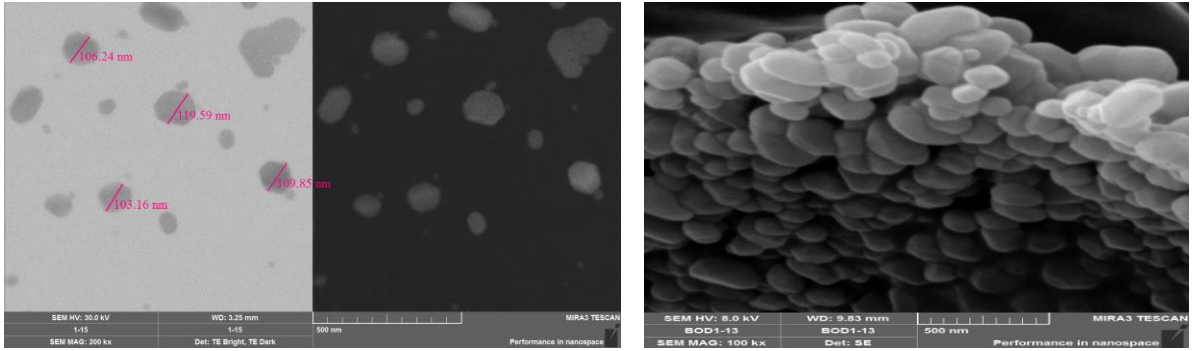


Şekil 13. BOD A2-Lipit konjugatının FT-IR (b) spektrumu.

Çalışmanın nihai hedefi olarak BOD A2-Lipit konjugatından lipozomal yapılar ince film hidrasyon yöntemi kullanılarak sentezlenmişlerdir. Bu lipozomal yapılar sentezlenirken, kullanılan BOD A2-Lipit konjugatı, kolesterol ve DSPE mPEG-2000 bileşiklerinin yüzde oranları ve reaksiyon koşulları çeşitli denemeler yapılarak materyal metot kısmında verildiği gibi optimize edilmiştir. BOD A2-Lipit konjugatından sentezlenmiş olan bu lipozomal yapıların DLS analizi (Şekil 14) lipozomal yapıların ortalama 107 nm boyutunda olduklarını göstermiştir. Ayrıca bu yapıların S-TEM görüntüleri sentezden hemen sonra lipozomlar %2 uranil asetat çözeltisiyle boyanarak alınmış ve lipozomal yapıların oluşumu gözlenmiştir (Şekil 15). Daha sonra bu lipozomlar, bozulmadan saklanması amacıyla sükröz varlığında liyofilize edilerek kurutulmuşlardır. Elde edilen toz haldeki bu lipozomların SEM görüntüleri alınmıştır (Şekil 15). SEM görüntülerinden de lipozomların sentezlendiği açıkça görülmektedir.

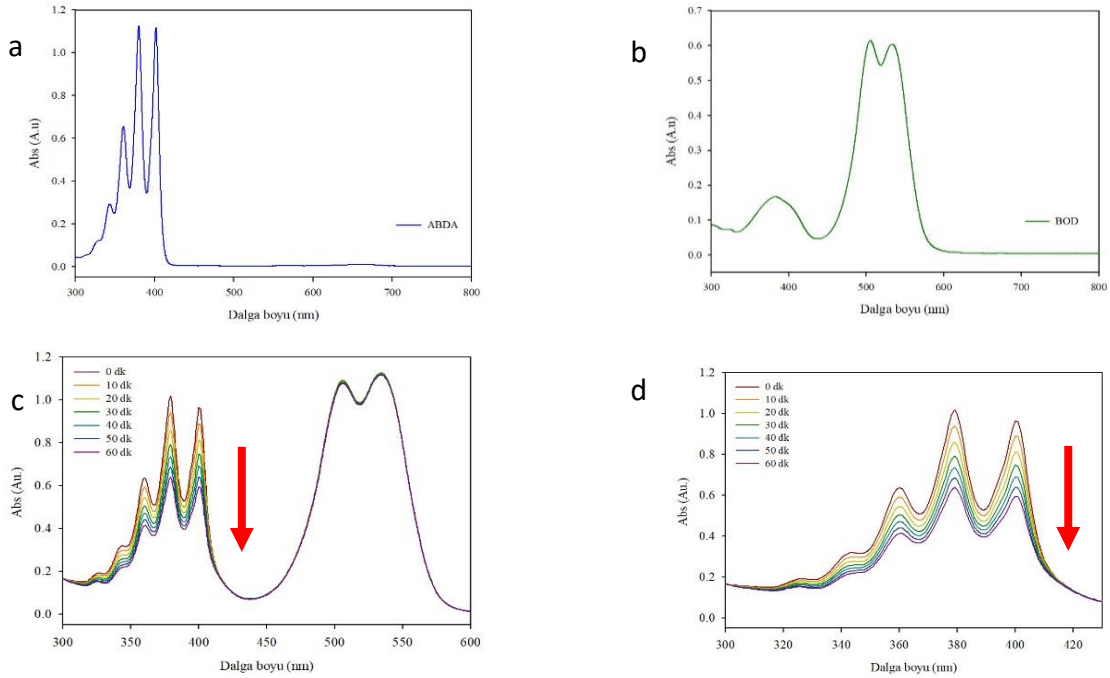


Şekil 14. BOD A2-Lipit konjugatından sentezlenmiş lipozomların DLS analizi.



Şekil 15. BOD A2-Lipit konjugatından sentezlenmiş lipozomların S-TEM ve SEM görüntüleri.

Son olarak BOD A2-Lipit konjugatından sentezlenmiş lipozomların PDT özellikleri araştırılmıştır. Bir tuzak molekülü (ABDA) kullanılan çalışmada, lipozomlar tuzak molekülü varlığında belirli süreler boyunca 530 nm dalga boyundaki LED ışığına maruz bırakılarak tuzak molekülün spesifik absorpsiyon piklerindeki düşüş UV-Vis spektrumunda izlenmiştir (Şekil 16).



Şekil 16. ABDA tuzak molekülünün (a), BOD A2-Lipit konjugatından sentezlenmiş lipozomların (b) UV-Vis spektrumları. BOD A2-Lipit konjugatından sentezlenmiş lipozomların 10 dk aralıklarla 530 nm dalga boyundaki LED ışığına maruz bırakıldıktan sonra tuzak molekülün absorpsiyondaki düşüşü (c) ve (c) 'de ki spektrumun 300-450 nm dalgaboyu aralığını (d) gösteren UV-Vis spektrumları.

BOD A2-Lipit konjugatından elde edilen lipozomal yapılar bu çalışma ile ilk defa sentezlenmiş ve PDT özellikleri incelenmiştir. PDT özelliğine sahip lipozomlarla ilgili literatürde yapılan çalışmalar sınırlıdır (Derycke ve de Witte, 2004). Bu çalışmada bir PS olan BOD A2 bileşiği ile bir lipit bileşiği konjuge edilmiş ve böylece elde edilen BOD A2-Lipit konjugatından sentezlenen lipozomlar, taşıyıcı bir sistem olarak kullanılmak yerine, kendi PDT özelliğine sahip lipozomal yapılar olarak sentezlenmişlerdir. Böylece lipozomların biyolojik koşullarda göstermiş oldukları avantajları sürdüren ve PS'lerini bünyesinde taşıyan, PDT özelliklerine sahip lipozomlar elde edilmiştir. Bu çalışma ile elde edilen lipozomlara ait PDT sonuçları değerlendirildiğinde, lipozomların sulu ortamda 530 nm dalga boyundaki LED ışığına maruz kaldıklarında singlet oksijen oluşturarak PDT özelliğine sahip oldukları belirlenmiştir. Genellikle PDT'de kullanılan PS'ler ile ilgili başlıca sorunlardan biri de bunların fizyolojik koşullarda çalışmaması veya düşük verime sahip olmalarıdır. İlk defa BOD A2-Lipit konjugatından elde edilen lipozomların sulu ortamda PDT özelliklerine sahip oldukları da belirlenmiştir.

IV. SONUÇLAR

Bu çalışmada BODIPY türevi bir PS ile fonksiyonlandırılmış yeni bir lipit konjugatı sentezlenmiş ve bu lipit konjugatından da lipozomal yapılar elde edilmiştir. Ayrıca sentezlenen BODIPY-Lipit konjugatı bu çalışma ile ilk kez sentezlenmiştir. Böylece bu BODIPY-Lipit konjugatlarından elde edilen lipozomlar da BODIPY türevi bir PS'yi taşıyan lipit bileşiklerinden sentezlendikleri için son derece özgündürler. Ayrıca bu lipozomlar PDT uygulamaları ile birlikte ilaç taşıyıcı sistemler olarak da yeniden tasarlanabilirler. Bu bakımdan bu çalışma ile elde edilen lipozomların son derece umut verici özelliklere sahip oldukları düşünülmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı 121Z810 numaralı proje kapsamında destekleyen TÜBİTAK'a teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- Abrahamse, H., & Hamblin, M. R. (2016). New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochemical Journal*, 473(4), 347-364.
- Ambroz, F., Donnelly, J. L., Wilden, J. D., Macdonald, T. J., & Parkin, I. P. (2019) Carboxylic acid functionalization at the meso-position of the bodipy core and its influence on photovoltaic performance. *Nanomaterials*, 9(10), 1346.
- Cakmak, Y., Kolemen, S., Duman, S., Dede, Y., Dolen, Y., Kilic, B., Kostereli, Z., Tatar Yildirim, L., Dogan, A. L., Guc, D. & Akkaya, E. (2011). Designing excited states: theory-guided access to efficient photosensitizers for photodynamic action. *Angewandte Chemie-International Edition*, 50(50).
- Cheng, M. H., Harmatys, K. M., Charron, D. M., Chen, J., & Zheng, G. (2019) Stable J-Aggregation of an aza-BODIPY-Lipid in a Liposome for Optical Cancer Imaging. *Angewandte Chemie - International Edition*, 58(38), 13394–13399.
- Correia, J. H., Rodrigues, J. A., Pimenta, S., Dong, T., & Yang, Z. (2021). Photodynamic therapy review: principles, photosensitizers, applications, and future directions. *Pharmaceutics*, 13(9), 1332.
- Derycke, A. S., & de Witte, P. A. (2004). Liposomes for photodynamic therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56(1), 17-30.
- Ion, R. M. (2000). Porphyrins for tumor destruction in photodynamic therapy. *Current Topics in Biophysics*, 24(1), 21-34.
- Jin, C. S. (2015). Porphyrin-based Nanostructure-Dependent Photodynamic and Photothermal Therapies, PhD Thesis, University of Toronto, Canada.
- Jin, C. S., Lovell, J. F. & Zheng, G. (2013). One minute, sub-one-watt photothermal tumor ablation using porphyrins, intrinsic multifunctional nanovesicles. *Journal of Visualized Experiments*, (79), 1–6.
- Kamkaew, A., Lim, S. H., Lee, H. B., Kiew, L. V., Chung, L. Y., & Burgess, K. (2013). BODIPY dyes in photodynamic therapy. *Chemical Society Reviews*, 42(1), 77-88.
- Li, Q., Li, Y., Min, T., Gong, J., Du, L., Phillips, D. L., ... & Tang, B. Z. (2020). Time-dependent photodynamic therapy for multiple targets: a highly efficient AIE-active photosensitizer for selective bacterial elimination and cancer cell ablation. *Angewandte Chemie*, 132(24), 9557-9564.
- Lim, S. H., Thivierge, C., Nowak-Sliwinska, P., Han, J., van den Bergh, H., Wagnieres, G., ... & Lee, H. B. (2010). In vitro and in vivo photocytotoxicity of boron dipyrromethene derivatives for photodynamic therapy. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53(7), 2865–2874.
- Liu, X. Y., Ruan, L. M., Mao, W. W., Wang, J. Q., Shen, Y. Q., & Sui, M. H. (2010). Preparation of RGD-modified long circulating liposome loading matrine, and its in vitro anti-cancer effects. *International Journal of Medical Sciences*, 7(4), 197–208.

- Lombardo, D., & Kiselev, M. A. (2022). Methods of liposomes preparation: Formation and control factors of versatile nanocarriers for biomedical and nanomedicine application. *Pharmaceutics*, 14(3), 543.
- Loudet, A., & Burgess, K. (2007). BODIPY dyes and their derivatives: syntheses and spectroscopic properties. *Chemical Reviews*, 107(11), 4891-4932.
- Lovell, J. F., Jin, C. S., Huynh, E., Jin, H., Kim, C., Rubinstein, J. L., ... & Zheng, G. (2011). Porphysome nanovesicles generated by porphyrin bilayers for use as multimodal biophotonic contrast agents. *Nature Materials*, 10(4), 324– 332.
- Niu, C. & Aisa, H. A. (2017). Upregulation of melanogenesis and tyrosinase activity: potential agents for vitiligo. *Molecules*, 22(8), 1303.
- Nsairat, H., Khater, D., Sayed, U., Odeh, F., Al Bawab, A., & Alshaer, W. (2022). Liposomes: Structure, composition, types, and clinical applications. *Heliyon*, 8(5).
- Robertson, C. A., Evans, D. H., & Abrahamse, H. (2009). Photodynamic therapy (PDT): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 96(1), 1-8.
- Simões, J. C., Sarpaki, S., Papadimitroulas, P., Therrien, B., & Loudos, G. (2020). Conjugated photosensitizers for imaging and PDT in cancer research. *Journal of Medicinal Chemistry*, 63(23), 14119-14150.
- Sun, B., Lovell, J. F., & Zhang, Y. (2023). Current development of cabazitaxel drug delivery systems. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 15(2), e1854.
- Treibs, A., & Kreuzer, F. H. (1968). Difluorboryl-komplexe von di-und tripyrrylmethenen. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 718(1), 208-223.
- Watson, H. (2015). Biological membranes. *Essays in Biochemistry*, 59, 43-69.