

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**AKCİĞER KANSERİ TEDAVİSİNE YÖNELİK
EPİRUBİSİN TAŞIYICI POLİMERİK NANOPARTİKÜLER SİSTEMLERİN
GELİŞTİRİLMESİ VE *İN VİTRO* DEĞERLENDİRİLMESİ**

Uzm. Dyt. Evin Mizgin PARLAK KAYAŞLI

**Tek Sağlık Programı
Yüksek Lisans Tezi**

**ANKARA
2026**

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**AKCİĞER KANSERİ TEDAVİSİNE YÖNELİK
EPİRUBİSİN TAŞIYICI POLİMERİK NANOPARTİKÜLER SİSTEMLERİN
GELİŞTİRİLMESİ VE *İN VİTRO* DEĞERLENDİRİLMESİ**

Uzm. Dyt. Evin Mizgin PARLAK KAYAŞLI

**Tek Sağlık Programı
Yüksek Lisans Tezi**

**TEZ DANIŞMANI
Prof.Dr. Samiye YABANOĞLU ÇİFTÇİ**

**ANKARA
2026**

**AKCİĞER KANSERİ TEDAVİSİNE YÖNELİK
EPİRUBİSİN TAŞIYICI POLİMERİK NANOPARTİKÜLER SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ
VE *İN VİTRO* DEĞERLENDİRİLMESİ
Öğrenci: Evin Mizgin PARLAK KAYAŞLI
Danışman: Prof. Dr. Samiye YABANOĞLU ÇİFTÇİ**

Bu tez çalışması 26.12.2025 tarihinde jürimiz tarafından "Tek Sağlık Programı" nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: *Prof. Dr. Betül ARICA YEGİN* (imza)
Hacettepe Üniversitesi

Tez Danışmanı: *Prof. Dr. Samiye YABANOĞLU ÇİFTÇİ* (imza)
Hacettepe Üniversitesi

Üye: *Dr. Öğr. Üyesi Yasemin Yücel YÜCEL* (imza)
Altınbaş Üniversitesi

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur. **15 Ocak 2026**

Prof. Dr. Müge YEMİŞÇİ ÖZKAN
Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

...../...../.....

(İmza)

Dyt. Evin Mizgin PARLAK KAYAŞLI

¹“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.
Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Samiye YABANOĞLU ÇİFTÇİ danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Dyt. Evin Mizgin PARLAK KAYAŞLI

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının hazırlanması sürecinde her türlü bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, her aşamada değerli katkılarını esirgemeyen ve yanımda olan Danışman Hocam Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi, Prof.Dr. Samiye YABANOĞLU ÇİFTÇİ'ye,

Tez çalışmama bilgi birikimiyle bilimsel katkı veren Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi, Prof.Dr. Betül ARICA YEGİN'e,

Tez çalışmamda emeği geçen Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Eczane Hizmetleri Öğretim Üyesi Doç.Dr. İpek BAYSAL'a,

Tez çalışmamdaki deneylerin her aşamasında destek veren Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Arş.Gör.Ecz. Aysima SEZER'e,

Tez çalışmamda ilgi, özveri ve sevgisiyle hep yanımda olan eşim, Arş.Gör. Kemal KAYAŞLI'ya ve bu günlere gelmemde çok emek ve destekleri olan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Kayashlı Parlak, E.M., Akciğer Kanseri Tedavisine Yönelik Epirubisin Taşıyıcı Polimerik Nanopartiküler Sistemlerin Geliştirilmesi ve *In Vitro* Değerlendirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tek Sağlık Programı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2026. Akciğer kanseri, dünya genelinde hem insidans hem de kansere bağlı ölümler açısından ilk sıralarda yer almaktadır. Vakaların büyük çoğunluğunu oluşturan Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri (KHOAK), geç evrede teşhis edilmesi ve tedaviye karşı direnç geliştirmesi nedeniyle önemli bir klinik problem oluşturmaktadır. Ayrıca kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik ajanlar sağlıklı hücrelere zarar verebilmekte ve kardiyotoksisite gibi ciddi yan etkilere yol açabilmektedir. Bu nedenle, daha etkili ve hedefe yönelik yeni tedavi yaklaşımlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmada, KHOAK tedavisinde terapötik etkinliği artırmak ve yan etkileri azaltmak amacıyla Epirubisin (EPI) yüklü PLGA-b-PEG nanopartiküller hazırlanmış ve bu nanopartiküllerin *in vitro* apoptotik etkileri değerlendirilmiştir. Nanopartiküller nanoçöktürme yöntemi kullanılarak hazırlanmış; parçacık boyutu, zeta potansiyeli, polidispersite indeksi (PDI), enkapsülasyon etkinliği ve *in vitro* salım profili gibi fizikokimyasal özellikleri karakterize edilmiştir. Ön formülasyon çalışmaları sonucunda, ortalama 114,1 nm parçacık boyutuna, -24,4 mV zeta potansiyeline ve 0,224 PDI değerine sahip nanopartiküller ilaç taşıyıcı sistem olarak seçilmiştir. Enkapsülasyon etkinliği değerlendirmelerinde, EPI farklı formülasyon aşamalarında eklenmiş ve en yüksek enkapsülasyon verimliliği (%55,1) EPI'nin su fazında eklendiği koşullarda elde edilmiştir. *In vitro* salım çalışmaları sonucunda, 96 saat sonunda EPI'nin %95,4'ünün salındığı belirlenmiştir. *In vitro* biyolojik değerlendirmeler A549 ve BEAS hücre hatları kullanılarak gerçekleştirilmiş, BEAS hücre hattı kontrol olarak kullanılmıştır. Apoptotik etkinin değerlendirilmesi amacıyla p53, BAX, BCL-2 ve VEGFA gen ekspresyonlarındaki değişiklikler RNA izolasyonu ve kantitatif gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR) yöntemi ile analiz edilmiştir. Sonuçlar, EPI yüklü nanopartiküllerin A549 hücrelerinde p53 ve BAX gen ekspresyonlarını artırdığını; buna karşılık BCL-2 ve VEGFA gen ekspresyonlarını anlamlı düzeyde azalttığını göstermiştir. Bu bulgular, EPI yüklü PLGA-b-PEG nanopartiküler sistemlerin KHOAK tedavisinde potansiyel olarak umut vadeden bir yaklaşım olabileceğini ortaya koymaktadır.

Anahtar kelimeler: Epirubisin, PLGA-b-PEG, Akciğer Kanseri, Nanopartikül

ABSTRACT

Kayashlı Parlak, E.M., Development and *In Vitro* Evaluation of Epirubicin-Delivering Polymeric Nanoparticle Systems for Lung Cancer Treatment, Hacettepe University, Graduate School of Health Sciences, One Health Program, Master's Thesis, Ankara, 2026. Lung cancer is one of the leading causes of both cancer incidence and cancer-related mortality worldwide. Non-small cell lung cancer (NSCLC), which accounts for the majority of cases, represents a significant clinical problem due to late diagnosis and the development of resistance to therapy. In addition, chemotherapeutic agents used in cancer treatment may damage healthy cells and cause serious side effects, such as cardiotoxicity. Therefore, there is a need for more effective and targeted therapeutic approaches. In this study, Epirubicin (EPI)-loaded PLGA-b-PEG nanoparticles were developed to enhance therapeutic efficacy and reduce side effects in the treatment of NSCLC, and their *in vitro* apoptotic effects were evaluated. The nanoparticles were prepared using the nanoprecipitation method, and their physicochemical properties—including particle size, zeta potential, polydispersity index (PDI), encapsulation efficiency, and *in vitro* release profile were characterized. Based on preliminary formulation studies, nanoparticles with an average particle size of 114.1 nm, a zeta potential of -24.4 mV, and a PDI value of 0.224 were selected as the drug delivery system. Encapsulation efficiency was evaluated by adding EPI at different formulation stages, and the highest encapsulation efficiency (55,1%) was achieved when EPI was added during the aqueous phase. *In vitro* release studies showed that 95.4% of EPI was released within 96 hours. *In vitro* biological evaluations were performed using A549 and BEAS cell lines, with BEAS cells used as the control. To assess apoptotic activity, changes in the expression levels of p53, BAX, BCL-2, and VEGFA genes were analyzed using RNA isolation followed by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). The results demonstrated that EPI-loaded nanoparticles increased p53 and BAX gene expression in A549 cells, while significantly decreasing BCL-2 and VEGFA gene expression. These findings indicate that EPI-loaded PLGA-b-PEG nanoparticle systems may represent a promising therapeutic approach for the treatment of NSCLC.

Keywords: Epirubicin, PLGA-b-PEG, Lung Cancer, Nanoparticle

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xv
TABLOLAR	xvi
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Akciğer Kanseri Patogenezi	5
2.2. Tümör Heterojenitesi	6
2.3. Tanı	7
2.4. Risk Faktörleri	7
2.4.1. Radon Gazı	7
2.4.2. Hava Kirliliği	7
2.4.3. Mesleki Maruziyet	8
2.5. Akciğer Kanseri Tedavisi	8
2.5.1. Radyasyon Tedavisi	9
2.5.2. Sistemik Tedaviler	9
2.5.3. Hedefli Terapi	11
2.5.4. İmmünoterapi	11
2.6. Epirubisin (EPI)	12
2.7. Nanoteknoloji ve Nanopartiküller	13

2.7.1. Nanopartikül Çeşitleri	15
3. GEREÇ ve YÖNTEM	17
3.1. Gereçler	17
3.1.1. Kimyasal Maddeler	17
3.1.2. Kullanılan Cihazlar	17
3.2 Nanoçöktürme Yöntemi ile Nanopartiküllerin Hazırlanması	18
3.2.1 Boş Nanopartiküllerin Hazırlanması	18
3.2.2 EPI Yüklü Nanopartiküllerin Hazırlanması	18
3.3. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	18
3.3.1. Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyel Ölçümü	18
3.3.2. EPI Miktar Tayini İçin Kalibrasyon Eğrisi Oluşturulması	19
3.3.3. Enkapsülasyon Etkinliğinin Belirlenmesi	19
3.3.4. EPI Yüklü Nanopartiküllerin <i>İn vitro</i> Salım Profilinin Belirlenmesi	19
3.4. Hücre Kültürü Çalışmaları	20
3.4.1 Total RNA İzolasyonu, cDNA Eldesi ve RT-PCR	20
3.4.2 İstatistiksel Analiz	22
4. BULGULAR	23
4.1. Nanopartiküllerin Boyut ve Zeta Potansiyel Ölçümleri	23
4.1.1. Boş Nanopartiküllerin Boyut ve Zeta Potansiyel Ölçümleri	23
4.1.2. EPI yüklü Nanopartiküllerin Boyut ve Zeta Potansiyel Ölçümleri	25
4.2 EPI Miktar Tayini	26
4.3. Nanopartiküllerin Enkapsülasyon Etkinliklerinin Değerlendirilmesi	26
4.4. EPI Yüklü Nanopartiküllerin <i>İn vitro</i> Salım Profilinin Belirlenmesi	27
4.5. Hücre Kültürü Çalışmaları	28
4.5.1. RNA İzolasyonu ve q-RT PCR	28
5. TARTIŞMA	33
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	38
7. KAYNAKLAR	40
8. EKLER	45
EK-1: Turnitin Dijital Makbuz	

EK 2: Tez Çalışması Orjinallik Raporu

9. ÖZGEÇMİŞ

47

SİMGELER ve KISALTMALAR

A549	Adenokarsinomik İnsan Alveolar Bazal Epitel Hücre Hattı
AK	Akciğer Kanseri
ALK	Anaplastik Lenfoma Kinaz
BAX	BCL-2 İlişkili X Proteini
BCL-2	B Hücreli Lenfoma-2
BEAS	İnsan Bronş Epitelyal Hücresi
BRAF	B-Raf Proto-Onkogen
BT	Bilgisayarlı Tomografi
cDNA	Tamamlayıcı Deoksiribo-Nükleik Asit
DFS	Hastalık İçermeyen Sağkalım
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DOX	Doksorubisin
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
EPI	Epirubisin
EPR	Artırılmış geçirgenlik ve tutulum
FBS	Fetal sığır serum
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FGFR1	Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü 1
g	Gram
µg	Mikrogram

μL	Mikrolitre
mL	Mililitre
HER2	İnsan Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü 2
KHAK	Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
KHOAK	Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri
SLN	Katı Lipit Nanopartikül
MET	Mezenkimal Epiteliyal Transisyon
mRNA	Haberci Ribonükleik Asit
nm	Nanometre
NP	Nanopartikül
PBS	Fosfat tamponlu Tuz Çözeltisi
PC	Fosfatidilkolin
PCL	Polikaprolakton
PDI	Polidispersite İndeksi
PE	Fosfatidiletanolamin
PEG	Polietilen Glikol
PEI	Polietilenimin
PET	Pozitron Emisyon Tomografisi
PG	Fosfatidilgliserol
PI	Fosfatidilinositol
PLA	Polilaktik Asit
PLGA	Poli (laktik-ko-glikolik asit)
PLGA-b-PEG	Poli (laktik-ko-glikolik asit)-poli (etilen glikol) blok kopolimeri

PS	Fosfatidilserin
PTX	Paklitaksel
PVA	Polivinil Alkol
RNA	Ribonükleik Asit
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
P53	Tümör Protein 53 geni
VATS	Video Yardımlı Torakoskopik Cerrahi
VEGFA	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Dünyada en sık görülen 15 kanser türünde mortalite oranları.	4
2.2. Cinsiyete göre en sık görülen 15 kanser türünün görülme sıklığı.	4
2.3. Akciğer kanserinde risk faktörleri.	8
2.4. EPI'in kimyasal yapısı.	12
4.1. % 1,5 PLGA-b-PEG (50:50) (a/h) ile %0,02 (a/h) Pluronik F-68 kullanılarak hazırlanan boş nanopartikül formülasyonuna ilişkin boyut grafiği.	24
4.2. % 1,5 PLGA-b-PEG (50:50) (a/h) ile %0,02 (a/h) Pluronik F-68 kullanılarak hazırlanan boş nanopartikül formülasyonuna ilişkin zeta potansiyel grafiği.	24
4.3. EPI yüklü, % 1,5 PLGA-b-PEG (50:50) (a/h) ile %0,02 (a/h) Pluronik F-68 kullanılarak hazırlanan optimum nanopartikül formülasyona ilişkin boyut grafiği.	25
4.4. EPI yüklü, % 1,5 PLGA-b-PEG (50:50) (a/h) ile %0,02 (a/h) Pluronik F-68 kullanılarak hazırlanan optimum nanopartikül formülasyona ilişkin zeta potansiyel grafiği.	25
4.5. EPI kalibrasyon eğrisi.	26
4.6. EPI yüklü nanopartiküllere ilişkin <i>in vitro</i> salım grafiği.	28
4.7. A) A549 hücre hattında relatif <i>BAX</i> mRNA düzeyleri, B) BEAS-2B hücre hattında relatif <i>BAX</i> mRNA düzeyleri.	29
4.8. A) A549 hücre hattında relatif <i>P53</i> mRNA düzeyleri. B) BEAS-2B hücre hattında relatif <i>P53</i> mRNA düzeyleri.	30
4.9. A) A549 hücre hattında relatif <i>VEGFA</i> mRNA düzeyleri. B) BEAS-2B hücre hattında relatif <i>VEGFA</i> mRNA düzeyleri.	31
4.10. A) A549 hücre hattında relatif <i>BCL2</i> mRNA düzeyleri. B) BEAS-2B hücre hattında relatif <i>BCL2</i> mRNA düzeyleri.	32

TABLÖLAR

Tablo	Sayfa
3.1. Kullanılan kimyasal maddeler:	17
3.2. Kullanılan cihazlar:	17
3.3. RT-PCR'da kullanılan primer çiftlerinin sekansları.	22
4.1. Boş Nanopartiküllerin Boyut, Zeta Potansiyeli ve PDI Değerleri.	23
4.2. Farklı konsantrasyonda EPI yüklü NP formülasyonlarına ilişkin enkapsülasyon etkinlik değerleri.	27

1.GİRİŞ

Akciğer kanseri (AK), erken tanısı güç olan, çoğunlukla geç evrede teşhis edilen ve tanı anında sıklıkla metastatik tabloyla ortaya çıkan bir kanser türüdür. AK, dünya genelinde mortalite ve morbidite oranı en yüksek maligniteler arasında yer alır. Kanser hücrelerinin histolojik özelliklerine göre küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (KHOAK) olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Vakaların yaklaşık %85–90'ını KHOAK oluşturur. KHOAK; akciğer adenokarsinomu, skuamöz hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinom gibi çeşitli histolojik alt tiplere sahiptir (1).

Akciğer kanserine bağlı ölümlerin yaklaşık %80'inden sigara sorumludur. Diğer risk faktörleri arasında radon gazına maruziyet, asbest, uzun süreli artmış çevresel hava kirliliği (özellikle polisiklik aromatik hidrokarbonlar), kişisel veya ailesel genetik yatkınlık yer alır. Erken tanı tümör rezeksiyonu ve tedavi başarısını artırsa da uygun tarama yöntemlerinin sınırlı olması, hastalığın metastatik eğilim göstermesi, genetik heterojenlik ve ileri evrelerde kemoterapiye düşük yanıt oranları, akciğer kanserini ölümcül bir hastalık hâline getirmektedir. Bununla birlikte, neoadjuvan ve/veya adjuvan tedaviler dahil olmak üzere kemoterapi ve radyasyon, lokal olarak ilerlemiş ve metastatik kanserler için önerilmekle birlikte, bu tedavi yöntemleri sınırlı genel sağkalım sağlamış ve toksik yan etkiler göstermiştir (2). Neredeyse tüm geleneksel kemoterapötik ajanlar, spesifik olmayan hedefleme, düşük biyoyararlanım ve zamanla gelişen ilaç direnci gibi sınırlılıklara sahiptir; bu durum ise kanser tedavisindeki etkinliklerini kısıtlamaktadır (1).

Birçok yeni terapötik yaklaşım geliştirilmesine rağmen kanser, dünya genelinde yüksek morbidite ve komplikasyonlara bağlı mortalite oranlarıyla önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Kemoterapi ve radyoterapi gibi klasik tedaviler kanser hücrelerini hedef alırken aynı zamanda sağlıklı hücrelerde de ciddi hasara yol açabilmektedir. Ayrıca, bir antikanser ajanın terapötik etkinliği yalnızca *in vitro* performansına bağlı değildir. Fizyolojik koşullarda bu ilaçların kullanımı ile; agregasyon, bozunma, istenmeyen immünojenite, zayıf çözünürlük, spesifik olmayan doku dağılımı, düşük doku penetrasyonu, yetersiz hücresel internalizasyon ve hedef

dışı toksisite gibi çeşitli biyolojik engellerle karşılaşmaktadır. Bu sınırlamaların aşılması amacıyla doğadan ilham alan, biyoyumlu nanopartikül ilaç taşıyıcıları gibi yeni stratejiler geliştirilmiştir (3).

Nanoteknoloji, kemoterapide devrim yaratma potansiyeline sahiptir. Nanoölçekli platformlar; tedavi etkinliğini artırmayı, ilaç dağılımının daha iyi lokalize edilmesini sağlamayı, sistemik yan etkileri azaltmayı, farmakokinetiği düzenlemeyi ve hasta uyumunu iyileştirmeyi hedeflemektedir. Nanoteknolojide kullanılan başlıca organik bazlı platformlar arasında karbon nanoelmaslar, nanotüpler, fulerenler, dendrimerler, polimerik partiküller, katı lipid hibrit nanopartiküller, lipozomlar, nanoemülsiyonlar ve grafen/karbon kuantum noktaları yer almaktadır (4).

Kanser tedavisinde birinci basamakta paklitaksel (PTX) ve EPI gibi antikanser ilaçlar kullanılmaktadır (5). EPI, antrasiklin sınıfına ait bir kemoterapötiktir ve aynı sınıftaki doksorubisinin, daunosamin halkasının C-4 pozisyonundaki hidroksil grubunun epimerizasyonu ile elde edilen yarı sentetik bir türevidir (6). Meme, kolon, larinks, farinks, mesane, akut lösemi ve akciğer kanseri dahil çeşitli kanser türlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Etki mekanizması tam olarak aydınlatılmamış olsa da DNA baz çiftleri arasına interkale olarak DNA ve RNA sentezini engellediği, topoizomerez II inhibitörü gibi davrandığı ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini artırdığı bilinmektedir.

Belirli bir bölgeye güvenli ve etkili ilaç iletimi için birçok polimerik nanopartikül araştırılmıştır. Bu sentetik polimerler arasında Polilaktik-ko-glikolik asit (PLGA), biyolojik olarak parçalanabilirliği, biyoyararlanımı, biyoyumluluğu ve yüzey modifikasyonlarına uygunluğu sayesinde ilaç taşıyıcı sistemlerde büyük potansiyele sahip Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration, FDA) onaylı bir polimerdir (5).

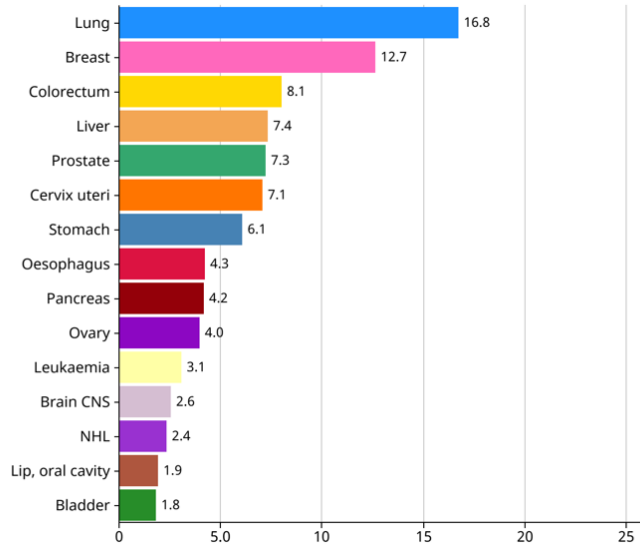
Bu tez kapsamında, EPI yüklü PLGA-b-PEG nanopartikülleri hazırlanmış ve çeşitli karakterizasyon testleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen nanopartiküllerin akciğer kanseri üzerindeki etkileri *in vitro* olarak değerlendirilmiştir

2. GENEL BİLGİLER

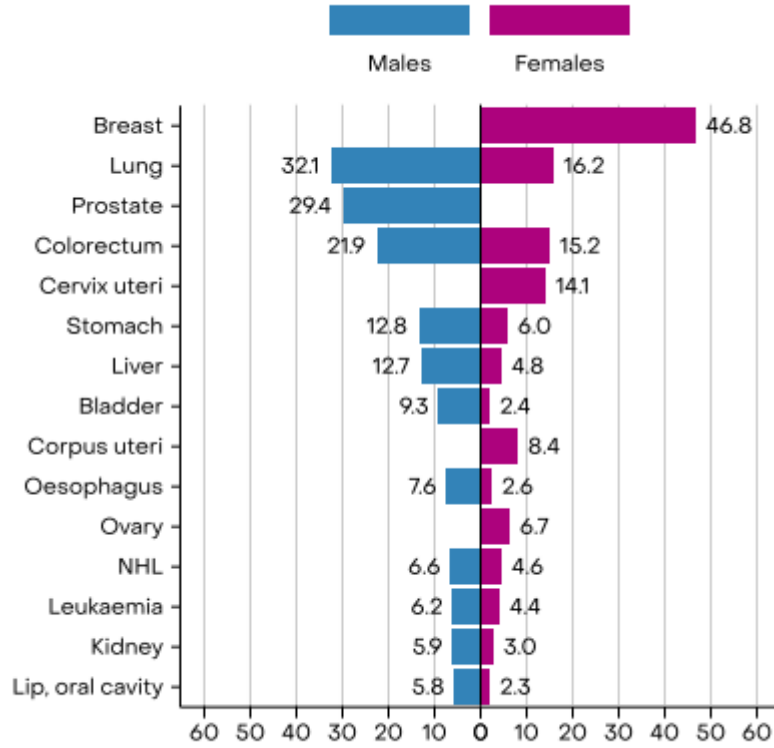
Akciğer kanseri, dünya genelinde kanser morbiditesi ve mortalitesinin önde gelen nedenlerinden biridir. Akciğer kanseri, küresel ölçekte en sık teşhis edilen (%12,4) ve en yüksek ölüm oranına sahip (%18,7) kanser tipidir (Şekil 2.1).

Akciğer kanseri insidans ve mortalite açısından erkeklerde ilk sırada yer alırken, kadınlarda ikinci sırada bulunmaktadır (Şekil 2.2). Erkek/kadın oranı yaklaşık 2 olmakla birlikte, bu oran bölgesel farklılıklar gösterebilmektedir. Kuzey Amerika ve Kuzey Avrupa'da oran 1'e yaklaşırken, Kuzey Afrika ve Doğu Avrupa gibi bölgelerde 4 ila 5 katına kadar çıkabilmektedir (7).

Erkeklerde en yüksek insidans oranları Doğu Asya'da görülmekte olup, bu bölgeleri Mikronezya/Polinezya ve Doğu Avrupa takip etmektedir. Dünya genelinde erkekler arasında en yüksek ulusal insidans oranının Türkiye'de olduğu bildirilmektedir. Kadınlarda ise Çin ve Amerika Birleşik Devletleri dahil olmak üzere birçok ülkede AK kansere bağlı ölümlerin başlıca nedenlerinden biridir. Küresel ölçekte, Kuzey Amerika, Doğu Asya ve Kuzey Avrupa'da yüksek insidans oranları gözlenirken, kadınlarda en yüksek ulusal oranın Macaristan'da olduğu tahmin edilmektedir (7).



Şekil 2.1. Dünyada en sık görülen 15 kanser türünde mortalite oranları (8).



Şekil 2.2. Cinsiyete göre en sık görülen 15 kanser türünün görülme sıklığı (8).

2.1. Akciğer Kanseri Patogenezi

Akciğer kanseri iki ana gruba ayrılır bunlar; küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (KHOAK, hastaların %85'i) ve küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK, hastaların %15'i)'dir. (9). KHOAK'nin en yaygın alt tipleri; adenokarsinom (vakaların %50'si) ve skuamöz hücreli karsinom (vakaların %20-30)'dur. Bu alt tiplerde progenitör lezyonlar periferik ve santral bronşiyal epitel bölgelerde görülür (10).

Adenokarsinomların büyük bir kısmı, terminal solunum ünitesinde gelişen ve invazyon gerçekleşmeden önce adenokarsinoma dönüşebilen atipik adenomatöz hiperplazi odaklarından köken alır. Skuamöz hücreli karsinomlar ise genellikle santral bronşiyal epitelde ortaya çıkar; bazal hücre hiperplazisi, skuamöz displazi ve skuamöz karsinom şeklinde ilerleyerek invaziv tümöre dönüşür (11). İnvaziv hale gelen kötü huylu bir tümör genomik değişiklikler biriktirmeye devam eder, subklonal gelişim gösterir ve hastalık genellikle daha agresif hâle gelir (12–14). Malign neoplazmlar; yayılım ve metastaz, sürekli anjiyogenez, bağışıklık sisteminden kaçış, apoptoz ve nekrozu tetikleme, kontrolsüz hücre proliferasyonu gibi özelliklerle karakterizedir (15,16). Genomik instabilite ve buna bağlı gen ve protein ekspresyonundaki değişiklikler, anormal hücre fenotipinin ortaya çıkmasına yol açar.

Akciğer kanserinde lezyonların ilerlemesi, genomik değişikliklerin zaman içinde birikmesiyle başlar. Klinik olarak gen duplikasyonları (örneğin gen amplifikasyonları), genomik yeniden düzenlenmeler (örneğin inversiyonlar) ve bazı kromozomal bölgelerdeki delesyonlara bağlı heterozigotluk kaybı sık görülmektedir. Buna ek olarak, gen metilasyonu, gen düzenlenmesi ve translasyon sonrası modifikasyonlar gibi epigenetik mekanizmalar da gen ekspresyonunu önemli ölçüde etkilemektedir (17). Bu değişiklikler, hücresel sinyal iletim yollarında bozulmalara yol açarak malign hücre klonlarının gelişme olasılığını artırır. Özellikle tütün kullanımına bağlı akciğer kanserlerinde genomik karmaşıklık daha belirgindir; çok sayıda genomik değişiklik tümör büyümesine ve progresyonuna katkıda bulunur (18). Bu kanserler, klonal evrim süreci nedeniyle genellikle mekânsal heterojenlik göstermektedir. Buna karşılık, bazı adenokarsinomlar tümörün tamamında saptanan tek bir aktive edici mutasyonla karakterizedir ve bu durum “sürücü onkogen” varlığı ile tanımlanan düşük genomik çeşitlilik (onkogen bağımlılığı) ile ilişkilidir. Bununla birlikte, onkogen

bağımlı akciğer kanserleri de belirli düzeyde genomik heterojenlik gösterebilmekte olup, bu durum tedavi yanıtını etkileyebilmektedir (19, 20).

KHOAK'ta rol alan temel onkogenler arasında epidermal büyüme faktörü reseptörü (*EGFR*) genindeki aktive edici mutasyonlar ile anaplastik lenfoma kinaz (*ALK*) genindeki translokasyonlar yer alır. *ALK* translokasyonları, *ALK* kinaz bölgesinde çeşitli ortak genlerin 5' dizileri ve promotörlerinin kontrolünde yürür; en yaygın ortak ekinoderm mikrotübül ilişkili protein benzeri 4 (*EMAP4*) ve kinezin-1 ağır zinciridir (*UKHC*). *EGFR* ve *ALK* kanser tetikleyici mutasyonları özellikle adenokarsinomlarda görülür (% 10–60) ve sigara içme durumuna göre belirgin farklılık gösterir; hiç sigara içmeyenlerde daha yaygındır (17). En sık görülen *EGFR* mutasyonları ekson 19 delesyon (*E746–A750*), ekson 21 *L858R* ve ekson 18 mutasyonlarıdır (*G719C/S/A*). Bu kanserlerdeki direnç gelişiminde en yaygın mutasyon *T790M*'dir. *EGFR* ve *ALK* dışındaki diğer sürücü değişiklikler arasında *RET*, *ROS1* translokasyonları; *BRAF*, *MET* ve *HER2* mutasyonları ve *MET*, *HER2* ile *FGFR1* amplifikasyonları yer almaktadır (18).

EGFR'in aktive olması, reseptör dimerizasyonuna ve çeşitli aşağı akış sinyal yollarının aktive olmasına yol açarak hücre proliferasyonu, sağ kalımı ve hücre döngüsü ilerlemesini destekler. *EGFR* mutasyonları genelde hiç sigara içmeyenlerde görülürken, sigara içenlerde *KRAS* mutasyonları baskındır ve büyüme faktörü salımını artırarak *EGFR* sinyal iletimini güçlendirir. *HER2* ise ligandı bilinmeyen bir reseptör olup homo- ve hetero-dimerizasyon ile benzer sinyal yollarını aktive eder (18).

2.2. Tümör Heterojenitesi

Akciğer tümörleri belirgin genetik heterojenite gösterir. Aynı tümör içinde ve metastazlar arasında farklı genetik anomaliler bulunabilir (13,14). Kanser tetikleyici mutasyonlar (ör. *EGFR*, *ALK*) tümör gelişiminin erken dönemlerinde ortaya çıkar ve tüm tümör hücrelerinde görülür (gövde mutasyonları). Buna karşın “dal mutasyonları (gövde mutasyonu olmayan)”, yalnızca belirli alt klonlarda bulunan ve tümör içi heterojeniteye katkı sağlayan değişikliklerdir. Bu mutasyonlar tümör gelişiminin erken ya da geç aşamalarında ortaya çıkabilir ve tedavi direncin etkilenmesinde önemli rol oynarlar (14).

2.3. Tanı

KHOAK çoğunlukla hastalığın ileri evrelerinde tespit edilmektedir. Tanıyı koyabilmek için önce dikkatli anamnez alınmalı daha sonra fiziksel muayane, temel laboratuvar testleri, biyopsi ve akciğer fonksiyon testleri yapılmalıdır. En yaygın semptom öksürüktür (vakaların %75'i). Bunu hemoptizi, dispne ve göğüs ağrısı takip eder(19,20). Pozitron Emisyon Tomografisi (PET) ve Bilgisayarlı Tomografi (BT) ise nodal evrelemenin doğru yapılabilmesi için gereklidir (20,21).

2.4. Risk Faktörleri

Akciğer kanseri gelişimiyle ilişkili birçok çevresel ve davranışsal faktör bulunmaktadır (Şekil 2.3). Bunların başında sigara kullanımı gelir ve tüm akciğer kanseri vakalarının %85–90'ından sorumludur (22). Pasif içicilik ise vakaların %1,6'sını oluşturmaktadır (23). Kapsamlı çalışmalar, pasif içicilerin akciğer kanseri riskinin hiç sigara içmeyenlere göre anlamlı derecede yüksek olduğunu göstermektedir (24).

2.4.1. Radon Gazı

Sigara içmeyenlerde akciğer kanserinin birincil nedenlerinden biri de radon gazıdır. Kapalı alanlarda birikebilen bu radyoaktif gaz, 1988'den itibaren grup-1 kanserojen olarak sınıflandırılmaktadır ve tüm akciğer kanseri vakalarının %3-14'ünden sorumlu olduğu belirtilmektedir (25).

2.4.2. Hava Kirliliği

Özellikle PM2.5 olarak bilinen 2,5 µm'den küçük partikül madde, sigara içmeyenlerde akciğer kanserinin önemli nedenlerinden biridir. PM2.5, 2013'ten beri grup-1 kanserojen olup küresel akciğer kanseri ölümlerinin yaklaşık %14'ünden sorumludur (26). Bu partiküllerin mutasyon taşıyan uykuda kalmış hücreleri aktive ederek neoplastik klonların genişlemesine yol açtığı ve *EGFR/KRAS* mutasyonları ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (27).

2.4.3. Mesleki Maruziyet

Mesleki kanserojenlere maruziyet, batı ülkelerindeki erkek akciğer kanseri olgularının %6–17’sini oluşturmaktadır (28). Asbest, kristal silika, dizel egzozu ve kaynak dumanları gibi ajanlara uzun süreli maruziyetler de riski belirgin şekilde artırmaktadır (29,30). Elektronik sigaralar, buharlaştırıcı cihazlar ve esrar kullanımı da artan kanıtlarla akciğer kanseri risk faktörleri arasında değerlendirilmektedir (31,32). WHO, özellikle gençlerde elektronik sigara kullanımının ciddi akut akciğer patolojilerine yol açabileceğine dair uyarılar yayımlamıştır (33,34).



Şekil 2.3. Akciğer kanserinde risk faktörleri.

2.5. Akciğer Kanseri Tedavisi

Erken evre KHOAK hastalarında cerrahi, temel ve en etkili tedavi yöntemi olarak kabul edilmektedir. En iyi prognoz sağlanabilmesi amacıyla, sistematik lenf nodu diseksiyonunu da içeren radikal cerrahi uygulanmalı ve tam rezeksiyon hedeflenmelidir (35).

1990’lı yıllarda video yardımcı torakoskopik cerrahi (VATS), akciğer rezeksiyonlarında geleneksel açık torakotomiye kıyasla daha az invaziv bir yaklaşım

olarak tanıtılmıştır (36). VATS; daha az postoperatif ağrı, iyi yaşam kalitesi ve yüksek fiziksel işlevsellik gibi önemli avantajlar sunmaktadır (37). 2000’li yıllarda VATS’nin gelişimini takiben robot yardımlı torakoskopik cerrahinin klinik kullanıma girmesiyle birlikte, cerrahlar üç boyutlu görüntüleme, artırılmış el becerisi ve daha yüksek cerrahi hassasiyet gibi ek avantajlara sahip olmuştur (38).

Bununla birlikte, birçok hastada uzak metastaz gelişimi veya lokal nüks riski devam ettiğinden, hastaların önemli bir kısmında cerrahi sonrası radyoterapi, kemoterapi veya hedefe yönelik tedaviler gibi adjuvan tedavilere gereksinim duyulmaktadır.

2.5.1. Radyasyon Tedavisi

Radyoterapi, yüksek enerjili ışınların kanser hücrelerindeki DNA’ya hasar vererek hücre ölümüne yol açması prensibine dayanır. Bu tedavi yöntemi tümörün ilerlemesini durdurabilir veya vücudun belirli bölgelerindeki tümörlerin ortadan kaldırılmasını sağlayabilir. Ameliyata veya kemoterapiye uygun olmayan KHOAK hastalarında yaşam kalitesini artırmak amacıyla palyatif tedavinin bir parçası olarak da kullanılabilir (39).

2.5.2. Sistemik Tedaviler

Adjuvan kemoterapi, tıbbi kontrendikasyon bulunmaması durumunda, tümör boyutu ≥ 4 cm olan veya lenf nodu tutulumu saptanan ve primer tümörü cerrahi olarak tamamen çıkarılmış KHOAK hastalarında önerilmektedir. Yapılan analizler, adjuvan kemoterapi uygulanmasının 5 yıllık genel sağkalımı %5,4 oranında artırdığını göstermektedir (HR: 0,89; %95 GA: 0,82–0,96; p = 0,005) (HR: Hazard Ratio/Tehlike Oranı; GA: Güven Aralığı). Küratif amaçlı cerrahi sonrası patolojik evre II ve III hastalarda adjuvan kemoterapi standart yaklaşım olarak kabul edilirken, evre IA için önerilmemekte, evre IB’deki rolü ise sınırlı olup daha düşük kanıt düzeylerine dayanmaktadır. KHOAK’de kemoterapötik ajanlar genellikle platin bazlı çift kombinasyonlar şeklinde uygulanmakta olup, sık kullanılan rejimler arasında sisplatin + vinorelbin ve sisplatin + dosetaksel yer almaktadır (40).

Sistemik tedaviye uyum, kemoterapinin neoadjuvan (indüksiyon) olarak uygulandığı durumlarda adjuvan tedaviye kıyasla daha yüksek bulunmuştur.

Neoadjuvan tedavi ayrıca ameliyat sonrası patolojik tam yanıtın (pCR) değerlendirilebilmesine olanak tanınması nedeniyle sağkalım açısından prognostik önem taşımaktadır (41).

Ameliyatla tamamen çıkarılmış erken evre KHOAK hastalarında, iki randomize faz III çalışma adjuvan immün kontrol noktası inhibitörlerinin etkinliğini ortaya koymuştur. Atezolizumab çalışmasında, adjuvan kemoterapiyi takiben bir yıl süreyle uygulanan atezolizumabın, evre II–III A KHOAK ve tümör PD-L1 ekspresyonu $>1\%$ olan hastalarda hastalıksız sağkalımı (DFS) anlamlı düzeyde iyileştirdiği gösterilmiştir (HR: 0,66; %95 GA: 0,50–0,88; $p = 0,039$) (42). Pembrolizumab çalışmasında ise, bir yıl süreyle uygulanan adjuvan pembrolizumabın, adjuvan kemoterapi almış veya almamış, tamamen rezeke edilmiş evre IB–III A KHOAK hastalarında DFS’yi plaseboya kıyasla anlamlı şekilde artırdığı bildirilmiştir (HR: 0,76; %95 GA: 0,63–0,91; $p = 0,0014$) (43).

EGFR mutasyonu taşıyan evre IB (≥ 3 cm)–III A KHOAK hastalarında gerçekleştirilen faz III Osimertinib çalışması, isteğe bağlı adjuvan kemoterapi sonrasında üç yıl süreyle uygulanan osimertinibin hem DFS’yi (65,8 ay vs. 28,1 ay; HR: 0,27; %95 GA: 0,21–0,34) hem de genel sağkalımı (HR: 0,49; %95 GA: 0,34–0,70; $p < 0,0001$) anlamlı biçimde iyileştirdiğini göstermiştir. Beş yıllık genel sağkalım oranları osimertinib ve plasebo kollarında sırasıyla %88 ve %78 olarak raporlanmıştır (44,45).

Ameliyat edilemeyen evre III KHOAK hastalarının önemli bir kısmı, düşük performans durumu ve eşlik eden komorbiditeler nedeniyle eş zamanlı kemoradyoterapiye uygun değildir. Bu hastalarda ardışık kemoradyoterapi veya yalnızca radyoterapi seçenekleri değerlendirilmekle birlikte, bu yaklaşımlar eş zamanlı kemoradyoterapiye kıyasla daha düşük lokal kontrol ve sağkalım oranları ile ilişkilidir (46). Faz II durvalumab çalışmasında, yaşlı (≥ 75 yıl) ve/veya performans durumu 2 olan hastalarda radyoterapi ile eş zamanlı düşük doz günlük karboplatin ve ardından durvalumab uygulanmasının fizibil olduğu gösterilmiştir. Ayrıca kemoterapiye uygun olmayan hastalarda radyoterapi sonrası durvalumab tedavisinin de uygulanabilir bir seçenek olduğu bildirilmiştir (47,48).

2.5.3. Hedefli Terapi

Hedefli tedaviler, tümör hücrelerinin büyümesini, çoğalmasını ve hayatta kalmasını destekleyen genleri, proteinleri veya tümör mikroçevresini hedef alır. Bu tedaviler, kanser hücrelerini seçici olarak etkilerken sağlıklı hücrelere az zarar verir. Çeşitli tümör tiplerinde hedefler değişiklik gösterir (49).

***EGFR* ve *ALK* İnhibitörleri**

EGFR yolunun akciğer kanserindeki rolü göz önüne alındığında, *EGFR* mutasyonu taşıyan tümörlerde bu yolu hedefleyen ilaçlar tümör büyümesini sınırlayabilir. Afatinib, entrectinib, erlotinib, gefitinib ve osimertinib dahil çeşitli *EGFR* inhibitörleri FDA tarafından onaylanmıştır. *ALK* pozitif KHOAK hastalarında ise *ALK* inhibitörleri (alektinib, brigatinib, seritinib vb.) tedavide önemli yer tutmaktadır (50). KHOAK hastalarının yaklaşık %20–25’inde *KRAS* mutasyonu bulunmaktadır. *KRAS G12C* mutasyonunu hedefleyen ve FDA onayı alan ilk ve tek ilaç sotorasib’tir (51).

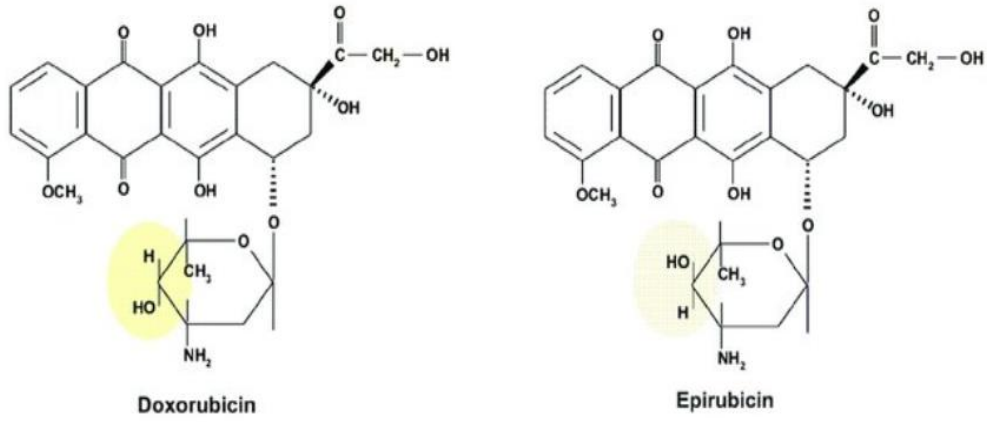
2.5.4. İmmünoterapi

İmmünoterapi, bağışıklık sisteminin kanserle savaşma doğal kapasitesini güçlendirmeyi amaçlayan biyolojik bir tedavi yöntemidir. Bağışıklık yanıtını artırmak veya yeniden düzenlemek için doğal ya da sentetik bileşikler kullanılır. Son yıllarda geliştirilen tedaviler, bağışıklık sisteminin tümör hücreleriyle etkileşim noktalarını (*PD-1*, *PD-L1*, *CTLA-4*) hedefleyen immün kontrol noktası inhibitörlerini içermektedir (52).

İmmünoterapi, KHOAK hastalarında tek başına, diğer immünoterapilerle kombinasyon hâlinde veya kemoterapi ile birlikte uygulanabilir. İleri evre hastalarda, hedefli tedaviye dirençli tümörlerde yaygın bir seçenektir (51). Kemoradyoterapi ile birlikte immünoterapi kullanımını değerlendiren keşifsel faz II çalışmalar umut verici sonuçlar bildirmiş olsa da pulmoner toksisite riskine dikkat edilmelidir. Diğer bir klinik çalışmada, durvalumabın eş zamanlı kemoradyoterapi ile kullanımında progresyonsuz sağkalım veya genel sağkalım açısından bir fayda gösterememiştir (53,54).

2.6. Epirubisin (EPI)

EPI, antrasiklin sınıfına ait bir kemoterapötik ajandır. EPI ve doksorubisin, aynı temel antrasiklin çekirdeğini paylaşan benzer türevlerdir. EPI, doksorubisinin stereokimyasal izomeridir. Aralarındaki temel fark, şeker kısmında (daunosamin) bulunan 4'-OH grubunun stereokimyasal konfigürasyonundan kaynaklanmaktadır. 4'-OH grubu doksorubisinde β -konfigürasyonunda, EPI'de ise α -konfigürasyonundadır (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. EPI'in kimyasal yapısı (55).

Doksorubisin, pirarubisin, daunorubisin ve EPI gibi antrasiklinler; meme kanseri, akciğer kanseri, hepatosellüler karsinom, mide kanseri ve çeşitli hematolojik maligniteler de dâhil olmak üzere pek çok kanser türünün tedavisinde yaygın olarak kullanılan ve oldukça etkili antineoplastik ajanlardır (56–58).

EPI, DNA ve RNA'nın baz çiftleri arasına interkale olarak nükleik asit sentezini engeller; ayrıca DNA topoizomeraz II ve DNA helikaz enzimlerini inhibe ederek DNA replikasyonunun ve transkripsiyonunun durmasına yol açar (59,60). Bununla birlikte, kronik kardiyotoksisite, nefrotoksisite ve ilaç direnci gibi yan etkiler, antrasiklin tedavilerinin önemli sınırlamaları arasında yer almaktadır (61). Ayrıca serbest antrasiklinlerle yapılan tedavilerin, proapoptotik sinyallerin ve antiapoptotik savunma mekanizmalarının aktivasyonuna neden olarak çeşitli tümör modellerinde sınırlı antitümör etkinlik göstermesine yol açtığı bildirilmiştir (62).

EPI'in yapısal modifikasyonu, onun antitümöral aktivitesini korurken daha düşük yan etki profili ile kullanılmasına imkân tanır. Bu nedenle EPI, geleneksel antrasiklinlere kıyasla daha düşük kardiyotoksisite gösterir; ancak doz sınırlayıcı toksisite, terapötik etkinliği azaltabilmektedir (63,64). EPI, meme, larinks, farinks, mesane, akciğer, yumurtalık, pankreas kanserleri ile çeşitli lenfomalar ve akut lösemi gibi birçok malignitenin tedavisinde klinik kullanım alanı bulmuştur (5,65).

EPI tedavisinin sınırlamalarını aşmak amacıyla ilaç taşıyıcı nanosistemleri geliştirilmekte olup, bu sistemler farmakokinetik parametreleri ve terapötik etkinliği iyileştirmeyi hedeflemektedir. Ayrıca tümör hücrelerine yönelik seçiciliği artırmak amacıyla fonksiyonelleştirilmiş nanosistemlerin geliştirilmesi, EPI'in terapötik etkisini artırırken yan etkileri azaltma potansiyeline sahiptir (5,59,66).

2.7. Nanoteknoloji ve Nanopartiküller

Nanoteknoloji, 1–100 nanometre (nm) aralığında yer alan yapıların tasarımı, üretimi, karakterizasyonu ve uygulamalarını konu alan disiplinlerarası bir bilim alanıdır. Bu ölçekte elde edilen ve noktasal (0-boyutlu), iki boyutlu veya üç boyutlu yapısal özellikler gösteren materyaller genel olarak nanopartikül olarak tanımlanmaktadır. Nanometre ölçeğine indirgenen malzemeler, yüksek yüzey alanı/hacim oranı, kuantum etkileri ve özgün fizikokimyasal özellikleri nedeniyle makroskobik karşılıklarından belirgin biçimde farklı davranışlar sergiler.

Nanoteknolojinin bilimsel temelleri ilk kez yaklaşık 60 yıl önce, fizikçi Richard Feynman'ın 1959 yılında gerçekleştirdiği ve "*There's Plenty of Room at the Bottom*" başlıklı konuşmasında ortaya konmuştur. Bu öncü yaklaşım, atomik ve moleküler düzeyde madde manipülasyonunun mümkün olabileceğini öngörerek modern nanoteknolojinin gelişimine zemin hazırlamıştır. Takip eden yıllarda nanofabrikasyon ve karakterizasyon tekniklerindeki ilerlemelerle birlikte, nanoteknolojinin uygulama alanları hızla genişlemiştir.

Günümüzde nanoteknoloji; tekstil, kozmetik, tarım, biyomedikal bilimler, tıp, eczacılık ve elektronik gibi birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle biyomedikal ve farmasötik uygulamalarda nanopartiküller; hedeflendirilmiş ilaç taşıma, kontrollü salım, biyoyararlanımın artırılması ve yan etkilerin azaltılması gibi avantajlar sunmaktadır. Bu yönüyle nanoteknoloji, geleneksel yaklaşımların yetersiz

kaldığı durumlarda yenilikçi ve daha etkili çözümler geliştirilmesine olanak sağlayan stratejik bir teknoloji alanı olarak öne çıkmaktadır (67,68).

Sağlık alanındaki kullanımında ise artan antibiyotik direnci, ilaçların kısa yarılanma ömrü, toksisite sorunları ve hastalıkların daha erken teşhis edilme ihtiyacı, nanoteknolojiyi son yıllarda önemli hâle getirmiştir. Geliştirilen farklı nanopartiküller; ilaç, gen, aşı gibi biyolojik ajanları hedef doku ve hücrelere taşıyabilmekte; yüzey özellikleri sayesinde hidrofobik etkin maddelerin çözünürlüğünü ve terapötik etkisini artırabilmekte; yan etkileri azaltmakta ve farmakokinetik profili iyileştirmektedir. Ayrıca hızlı degradasyona karşı etkin maddeyi koruyabilir, yarılanma ömrünü uzatabilir, kontrollü ya da sürekli salım sağlayabilir ve birden fazla ajanın birlikte verilmesine imkân tanıyabilir.

Nanoteknolojinin sunduğu benzersiz fizikokimyasal özellikler, özellikle kanser tedavisinde yenilikçi yaklaşımların geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Nanopartikül tabanlı ilaç taşıyıcı sistemler, terapötik ajanların hedef dokuya seçici olarak iletilmesini, kontrollü salımını ve sistemik toksisitenin azaltılmasını mümkün kılarak tedavi etkinliğini artırmaktadır. Bu nedenle nanoteknoloji, modern onkolojide kişiselleştirilmiş ve daha güvenli tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde önemli bir rol oynamaktadır.

İdeal bir nanopartikülün biyouyumlu, biyobozunur, non-immünojenik ve yüksek stabilitede olması beklenir. Nanopartiküller, çekirdek, kabuk ve yüzey tabakasından oluşan çok katmanlı ve karmaşık bir yapıya sahiptir. Yüzey tabakasından küçük moleküller, yüzey aktif maddeler, metal iyonları ve polimerler yer alabilir. Kabuk tabakası, kimyasal ve fizikokimyasal özellikleri bakımından çekirdekte farklılık gösterir ve genellikle işlevsel modifikasyonların gerçekleştirildiği bölge olarak görev yapar. Çekirdek ise nanopartikülün yapısal bütünlüğünü ve temel özelliklerini belirleyen ana bileşendir. Nanopartiküller yapısal özelliklerine göre gözeneksiz veya mezo-gözenekli formda bulunabilir. Bu yapısal çeşitlilik, nanopartiküllerin parenteral, oral ve inhalasyon gibi farklı uygulama yollarında ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanılmasına olanak tanımaktadır. Ayrıca bu partiküller, aptamerler, proteinler veya antikolar ile fonksiyonelleştirilebilmekte ve böylece hedef dokuya özgül bağlanma kapasiteleri artırılabilir. Yüksek yüzey alanı/hacim oranları sayesinde daha yüksek miktarlarda etkin madde taşıyabilen nanopartiküller,

ilaçların minimum kayıp ile hedef bölgeye taşınmasına olanak sağlayarak tedavi etkinliğini artırmaktadır (69–71).

2.7.1. Nanopartikül Çeşitleri

Nanoteknolojide kullanılan nanopartiküller temel olarak organik ve inorganik olmak üzere iki grupta sınıflandırılır. Organik tabanlı nanopartiküller; karbon nanoelmaslar, karbon nanotüpler, grafen ve grafen oksit, fullerenler, dendrimerler, polimerik nanopartiküller, lipid bazlı sistemler (lipozomlar, katı lipit hibrit nanopartiküller, nanoemülsiyonlar) ve karbon/grafen kuantum noktalarını kapsar. İnorganik nanopartiküller ise başlıca metal ve metal oksit nanopartikülleri (örneğin altın ve manyetik nanopartiküller), metalik kuantum noktaları ve gözenekli nanomalzemelerden oluşmaktadır (4).

Polimerik Nanopartiküller

Bu geniş nanopartikül sınıfları içerisinde polimerik nanopartiküller, ayarlanabilir yapıları, biyoyumlulukları ve kontrollü ilaç salımına olanak tanıyan özellikleri nedeniyle özellikle farmasötik uygulamalarda öne çıkmaktadır. Doğal veya sentetik polimerlerden üretilen bu sistemler, etkin maddelerin korunarak taşınmasını, hedef dokuya yönlendirilmesini ve tedavi etkinliğinin artırılmasını mümkün kılmaktadır. Bu özellikleri sayesinde polimerik nanopartiküller, modern ilaç taşıyıcı sistemlerin temel bileşenlerinden biri olarak değerlendirilmektedir (72).

Kullanılan polimerler doğal (ör. albümin, jelatin, aljinat, kollajen, siklodekstrin, kitosan) veya sentetik (ör. polilaktik asit – PLA, poli-laktik-ko-glikolik asit – PLGA, polikaprolakton – PCL, poliakrilatlar, polietilenimin – PEI, polietilen glikol – PEG, polianhidritler, poli-L-lizin) olabilir. Bu polimerler temel olarak biyoyumluluk ve biyobozunurluk özellikleriyle karakterize edilir (69–71).

Katı-Lipit Nanopartiküller

Katı lipit nanopartikülleri (KLN'ler), hidrofobik karakterde kararlı bir katı lipit çekirdeğinden oluşan iyi bilinen nanotaşıyıcılardır. KLN'ler polimerik nanopartiküllerin ve lipozomların bir füzyonudur. Etkin madde bu çekirdek içerisinde dağıtılır. Üretimleri genellikle mikroemülsifikasyon veya yüksek basınçlı

homojenizasyon yöntemleriyle gerçekleştirilir. KLN'ler yüksek biyoyumluluk, yüksek enkapsülasyon verimi ve kontrollü salım özelliklerine sahiptir. Etken madde yükleme verimleri birçok nanomalzemeye kıyasla daha yüksektir ve ilaç salımını haftalarca sürdürebilir. Yüzeylerinin lipit kökenli olması biyoyumluluğu artırır. Genellikle fizyolojik olarak güvenli katı lipitler (mumlar, yağ asitleri, trigliseritler) kullanılarak hazırlanırlar (71,73).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereçler

Tez çalışması kapsamında kullanılan kimyasal maddeler ve cihazlar aşağıdaki tablolarda verilmiştir (Tablo 3.1 ve Tablo 3.2).

3.1.1. Kimyasal Maddeler

Tablo 3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.

Kimyasalın Adı	Üretici Firma
(PLGA-b-PEG) (50:50) (Mw: 38.000-54.000)	S. Aldrich, Almanya
Aseton	Merck, Almanya
Tripsin-EDTA	Thermo-Gibco, ABD
DMEM-HG	Pricella, Çin Halk Cumhuriyeti
Penisilin-Streptomisin	S. Aldrich, Almanya
PBS 1X Ca, Mg free	S. Aldrich, Almanya
Dimetilsülfoksit	Merck, Almanya
Pluronic-f 68	S. Aldrich, Almanya

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Tablo 3.2. Kullanılan Cihazlar.

Cihaz Adı	Üretici Firma
Hassas Terazi	Schimadzu, Japonya
Ultra Hassas Terazi	Schimadzu, Japonya
Ultra Saf Su Düzenegi	Millipore, ABD
Çok Noktalı Manyetik Karıştırıcı	Thermo Scientific, ABD
Vorteks	IKA, Almanya
Ultrasantrifüj	Hettich, Almanya
UV-Vis spektrofotometre	BMG Labtech, Almanya
FLUOstar Omega spektrofotometre	
Partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel tayin cihazı	Malvern Instruments, UK
Karbondioksitli inkübatör	MCO-20AIC, Sanyo, ABD

3.2 Nanoçöktürme Yöntemi ile Nanopartiküllerin Hazırlanması

3.2.1 Boş Nanopartiküllerin Hazırlanması

Yüklü olmayan nanopartiküller, yaklaşık 160–170 nm'lik polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında yaygın olarak kullanılan nanopresipitasyon yöntemiyle hazırlanmıştır (74). Organik faz, PLGA-b-PEG'nin (%0,75 a/h ve %1,5 a/h) 5 mL asetonda çözülmesiyle hazırlanmıştır. Bu organik faz, manyetik karıştırıcı altında, Pluronic F-68 (%0,02 a/h) içeren 10 mL damıtılmış suya bir şırınga ile damla damla eklenmiştir. Organik fazın tamamen uzaklaştırılması için çözelti 24 saat boyunca manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılmıştır. Son nanopartikül süspansiyonu 30 dakika boyunca 50.000×g'de santrifüjlenmiştir. Süpernatant atılmıştır ve nanopartiküller damıtılmış suda yeniden süspansiyon haline getirilmiştir. Yüzey aktif maddenin fazlasının uzaklaştırılması için iki kez daha damıtılmış su ile yıkanmıştır.

3.2.2 EPI Yüklü Nanopartiküllerin Hazırlanması

Tüm EPI yüklü nanopartiküller, %1,5 (a/h) PLGA-b-PEG ve %0,02 (a/h) Pluronic F-68 konsantrasyonları kullanılarak boş nanopartiküllerin hazırlanma yöntemine uygun olarak hazırlanmıştır. EPI'in nanopartikül formülasyonuna farklı aşamalarda eklenmesiyle farklı formülasyonlar oluşturulmuştur. İlk aşamada, EPI yüklü nanopartiküller nanoçöktürme yönteminde 400 µg EPI PLGA-b-PEG içeren organik faza eklenerek hazırlanmıştır. Sonraki denemelerde EPI, organik faza ve inorganik faza ayrı ayrı eklenerek formülasyon denemeleri yapılmıştır. Bu kapsamda 200 µg ve 400 µg EPI kullanılarak toplam dört farklı EPI yüklü nanopartikül formülasyonu hazırlanmıştır.

3.3. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

3.3.1. Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyel Ölçümü

Hazırlanan nanopartiküllerin ortalama partikül boyutu, polidispersite indeksi (PDI) ve zeta potansiyelleri; Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK) cihazında distile su içinde ölçülmüştür.

3.3.2. EPI Miktar Tayini İçin Kalibrasyon Eğrisi Oluşturulması

EPI miktar tayini için 8 farklı konsantrasyonda (0, 0.0049, 0.00975, 0.0195, 0.039, 0.078, 0.156, 0.312 mg/mL) standart çözelti hazırlanmıştır. Numunelerin absorbans ölçümleri UV-Vis spektrofotometre (BMG Labtech FLUOstar, Almanya) kullanılarak gerçekleştirilmiş ve regresyon doğrusu Lambert-Beer yasasına göre hesaplanmıştır. 96 kuyucuklu plakaya her standart ve örnekten 200 µl eklenmiştir. 450 nm'de (EPI λ_{max}) absorbans ölçümü yapılmıştır.

3.3.3. Enkapsülasyon Etkinliğinin Belirlenmesi

Hazırlanan nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinliği (%) aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{Enkapsülasyon Etkinliği (\%)} = \frac{K_1 - K_2}{K_1} \times 100 \text{ (Eşitlik 1)}$$

K1: Nanopartikül formülasyonunun hazırlanmasında kullanılan toplam EPI derişimi

K2: Ultrasontrifüj sonrasında nanopartiküllere yüklenmeden su fazında serbest kalan EPI derişimi

3.3.4. EPI Yüklü Nanopartiküllerin *In vitro* Salım Profilinin Belirlenmesi

EPI yüklü nanopartiküllerin *in vitro* salım profili, fizyolojik ortamı taklit edebilmek adına %1 (a/h) fetal bovin serum (FBS) içeren fosfat tamponlu salin (PBS) çözeltisi içerisinde diyaliz yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Elde edilen EPI yüklü nanopartikül süspansiyonu, yarı geçirgen diyaliz membranı (MW: 10kDa) içerisine alınmış ve diyaliz membranı salım ortamı olan FBS içeren PBS çözeltisi içerisine yerleştirilmiştir. Belirlenen zaman noktalarında (15, 30, 45 dakika; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 ve 168. saatlerde) dış ortamdan 200 µl örnek alınarak 1,5 ml'lik Eppendorf tüplerine aktarılmış ve örnekler -20 °C'de saklanmıştır. Her örnek alımından sonra, ortama aynı hacimde (%1 a/h) PBS ilave edilmiştir. Deneyle 3 defa tekrarlanarak sonuçlar ortalama \pm SD olarak sunulmuştur.

3.4. Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücre kültürü çalışmalarında A549 (insan akciğer adenokarsinom alveolar bazal epitel hücre hattı, ATCC: CCL-185, ABD) ve BEAS-2B (sağlıklı insan bronşiyal epitelyal hücre hattı, ATCC: CRL-3588, ABD) hücre hatları kullanılmıştır. Hücreler, %10 (a/h) FBS ve %1 (a/h) penisilin/streptomisin (100 U/mL penisilin, 100 µg/mL streptomisin) içeren DMEM-HG besiyeri içerisinde, 37°C’de %5 CO₂ içeren inkübatörde kültüre edilmiştir. Hücrelerin besiyeri iki günde bir yenilenmiştir.

Yaklaşık %70-80 doyumluk seviyesine ulaşan hücreler tripsin ile pasajlanmıştır. Bu amaçla, hücreler üzerindeki besiyeri tamamen uzaklaştırılarak 1 ml tripsin ilave edilmiştir. Hücreler inkübatörde 37°C’de 3–5 dakika inkübe edildikten sonra hücre süspanasyonu steril tüplere alınmış ve santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılmış, hücre pelleti yeni besiyeri ile süspanse edilerek aşağıda sunulan deney protokollerine uygun şekilde hücre sayısı hesaplanarak hücre kültürü plakalarına alınmıştır.

3.4.1 Total RNA İzolasyonu, cDNA Eldesi ve RT-PCR

EPI yüklü nanopartiküller ile 24 saat süreyle muamele edilen A549 ve BEAS-2B hücrelerinden total RNA izolasyonu, RNA izolasyon kiti (Hybrid-R, GeneALL, Güney Kore) kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

Hücrelerin üzerine 1 mL RiboEX (Hybrid-R, GeneALL, Güney Kore) solüsyonu eklenmiş ve hücreler hücre kazıyıcı yardımıyla dikkatlice kazınmıştır. Elde edilen hücre lizati steril tüplere alınarak oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmiştir. Ardından, lizata 200 µL kloroform eklenmiş, 15 saniye kuvvetlice çalkalanmış ve oda sıcaklığında 2 dakika inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonrası örnekler 12.000×g’de, 4°C’de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Üst faz yeni bir tüpe aktarılmış ve üzerine 1 ml RBI solüsyonu eklenerek ters çevrilip karıştırılmıştır. Örnekler 700 µL’lik hacimler halinde spin kolona aktarılmış ve 10.000×g’de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Bu işlem, tüm örnek kolonlardan geçirilene kadar tekrarlanmıştır.

Kolonlar sırasıyla 500 µL SWI (Hybrid-R, GeneALL, Güney Kore) tampon çözeltisi ve 500 µL RNW (Hybrid-R, GeneALL, Güney Kore) tampon çözeltisi ile 10.000×g'de 30 saniye santrifüj işlemleri gerçekleştirilmiştir. Son santrifüj işleminin ardından, kolonda kalan tampon solüsyonunu uzaklaştırmak amacıyla 1 dakika ek santrifüj yapılmıştır. Kolonlar steril 1,5 mL mikrosantrifüj tüplerine yerleştirilmiş, üzerlerine 100 µL nükleaz içermeyen su eklenmiş ve 1 dakika inkübasyondan sonra 10.000×g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Total RNA izolasyonunu takiben tamamlayıcı DNA (cDNA) elde edilmiştir.

cDNA, RNA'dan ters transkriptaz kiti kullanılarak sentezlenmiş, bu işlem kit üretici firma yönergeleri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Negatif kontroller aracılığıyla örneklerde kontaminasyon olmadığı doğrulanmıştır. RT-PCR analizi, (ViiA 7 Real-Time PCR (Applied Biosystems, A.B.D.) sistemi ile SYBR Green PCR Master Mix ve 96 kuyucuklu plaklar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Üretici firmanın yönergeleri doğrultusunda amplifikasyon reaksiyonu hazırlanmıştır. Her deneyde hedef genin (*P53*, *BAX*, *BCL2* ve *VEGFA*) değeri, iç kontrol genin (housekeeping gene; *GAPDH*) değerine oranlanıp normalize edilmiştir. Her bir hedef gen için özgüllüğü blastlama yapılarak doğrulanmış primer çiftleri kullanılmıştır. Kullanılan primer çiftlerinin sekansları Tablo 3.3.'de gösterilmiştir. Hesaplamalarda karşılaştırmalı Ct ($\Delta\Delta Ct$) yaklaşımı kullanılmıştır. Her sonuç, bağımsız olarak gerçekleştirilen en az 3 deneyin ortalaması olarak sunulmuştur.

Tablo 3.3. RT-PCR’da kullanılan primer çiftlerinin sekansları.

Gen	Sekans (5’-3’)
<i>BAX</i>	F: TCAGGATGCGTCCACCAAGAAG R: TGTGTCCACGGCGGCAATCATC
<i>BCL2</i>	F: ATCGCCCTGTGGATGACTGAGT R: GCCAGGAGAAATCAAACAGAGGC
<i>P53</i>	F: CCTCAGCATCTTATCCGAGTGG R: TGGATGGTGGTACAGTCAGAGC
<i>VEGFA</i>	F: GCCAATCACACTTCCTGCCGAT R: AGGTCTTGTTTCGCTGCCTGACA
<i>GAPDH</i>	F: GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG R: ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA

F: İleri yöndeki primerin sekansı, R: Ters yöndeki primerin sekansı

3.4.2 İstatistiksel Analiz

Sonuçlar ortalama \pm SD olarak rapor edilmiştir. Deney grupları Student’s t-test veya oneway ANOVA testleri ile karşılaştırılmıştır. Kontrol grupları 1’e normalize edilmiştir. İkili grupların karşılaştırılması için Student’s t-test, üçlü gruplar için ANOVA testi kullanılmıştır. $P < 0.05$ değeri anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Nanopartiküllerin Boyut ve Zeta Potansiyel Ölçümleri

4.1.1. Boş Nanopartiküllerin Boyut ve Zeta Potansiyel Ölçümleri

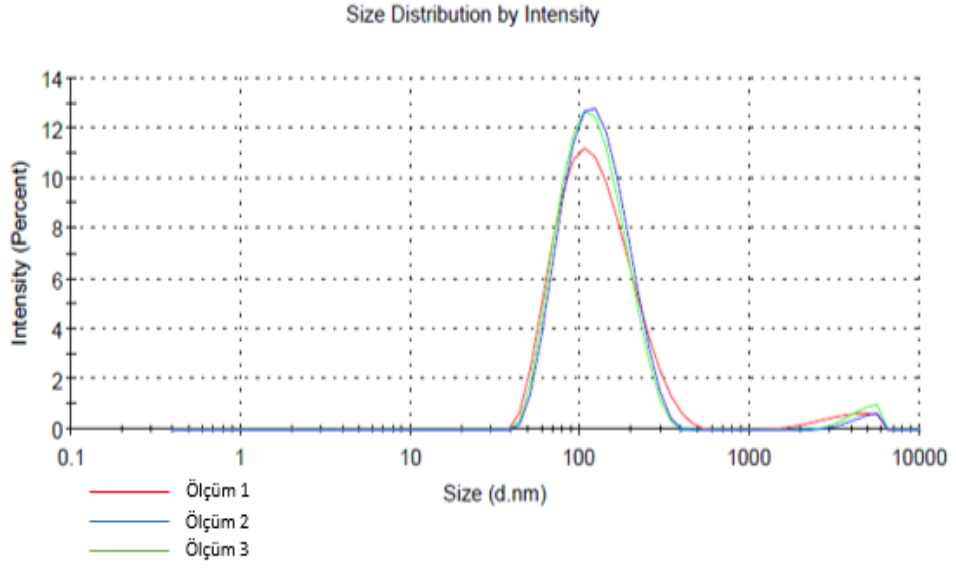
Farklı konsantrasyonlarda PLGA-b-PEG (50:50) ve Pluronik F68 kullanılarak hazırlanan nanopartiküllerin ortalama partikül boyutu, zeta potansiyeli ve PDI değerleri, standart sapmaları ile birlikte hesaplanmış ve sunulmuştur (Tablo 4.1, Şekil 4.1, Şekil 4.2).

Hazırlanan tüm nanopartikül formülasyonlarının partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli değerleri birlikte değerlendirildiğinde, %1,5 PLGA-b-PEG (a/h) (50:50) ve %0,02 (a/h) Pluronik F68 içeren formülasyonun istenilen fizikokimyasal özellikleri sağlaması nedeniyle optimum formülasyon olduğu sonucuna varılmıştır.

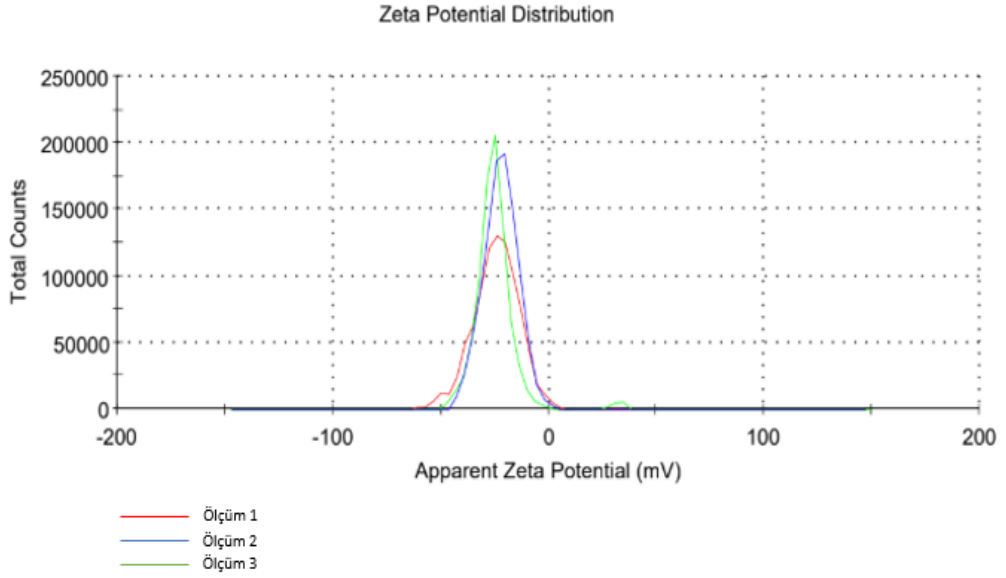
Tablo 4.1. Boş Nanopartiküllerin Boyut, Zeta Potansiyeli ve PDI Değerleri.

<i>PLGA-b-PEG</i> (50:50)	<i>Pluronik F68</i> %(a/h)	<i>Boyut</i> (nm)*	<i>Zeta Potansiyeli</i> (mV)*	<i>PDI*</i>
0,75	0,01	78,24±2,53	-13,2±0,15	0,114±0,01
0,75	0,02	92,58±1,45	-1,01±0,12	0,257±0,02
0,75	0,03	76,63±0,75	-1,96±0,11	0,132±0,01
1,5	0,01	128,5±2,65	-17,7±0,18	0,247±0,01
1,5	0,02	114,1±0,45	-24,4±0,22	0,224±0,02
1,5	0,03	150,9±3,22	-22,5±0,13	0,260±0,01

*(n=3, x±SD)



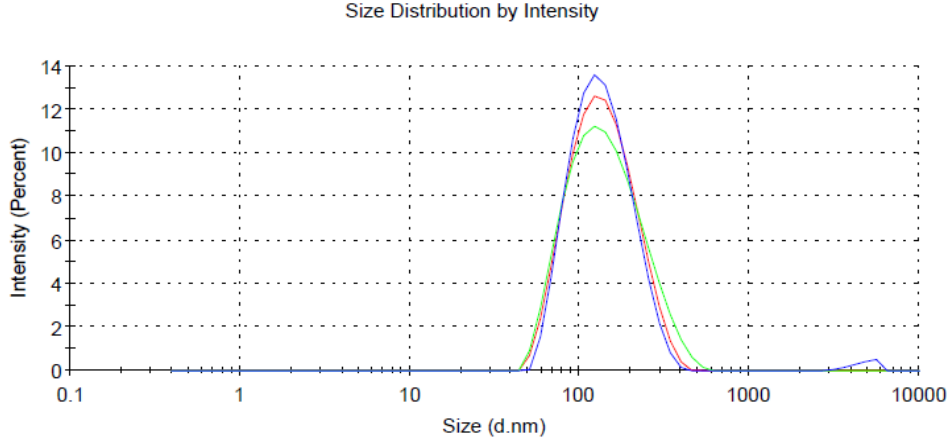
Şekil 4. 1. % 1,5 PLGA-b-PEG (50:50) (a/h) ile %0,02 (a/h) Pluronic F-68 kullanılarak hazırlanan boş nanopartikül formülasyonuna ilişkin boyut grafiği (n=3, x+SD).



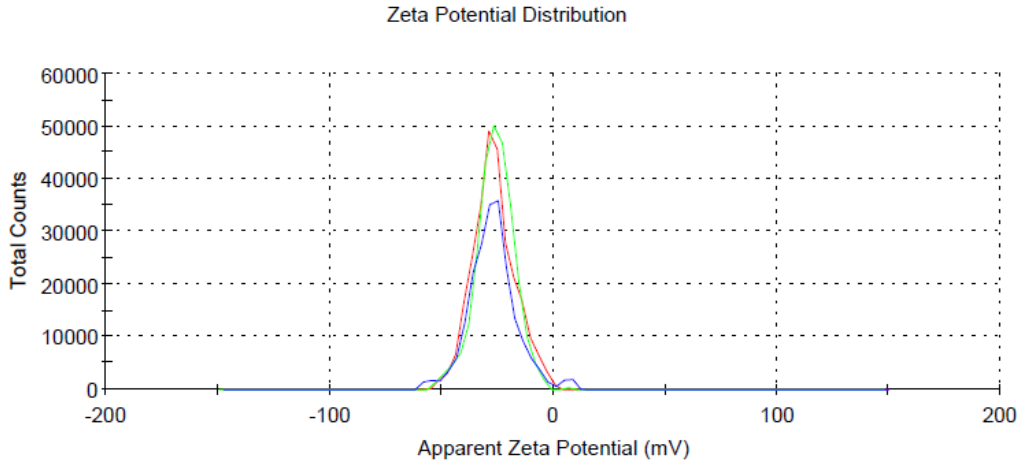
Şekil 4. 2. % 1,5 PLGA-b-PEG (50:50) (a/h) ile %0,02 (a/h) Pluronic F-68 kullanılarak hazırlanan boş nanopartikül formülasyonuna ilişkin zeta potansiyel grafiği (n=3, x+SD).

4.1.2. EPI yüklü Nanopartiküllerin Boyut ve Zeta Potansiyel Ölçümleri

EPI yüklü, %1,5 PLGA-b-PEG (50:50) (a/h) ile %0,02 (a/h) Pluronik F-68 kullanılarak hazırlanan optimum nanopartikül formülasyonuna ilişkin boyut ve zeta potansiyel grafiği sırasıyla Şekil 4.3 ve Şekil 4.4’de verilmiştir.



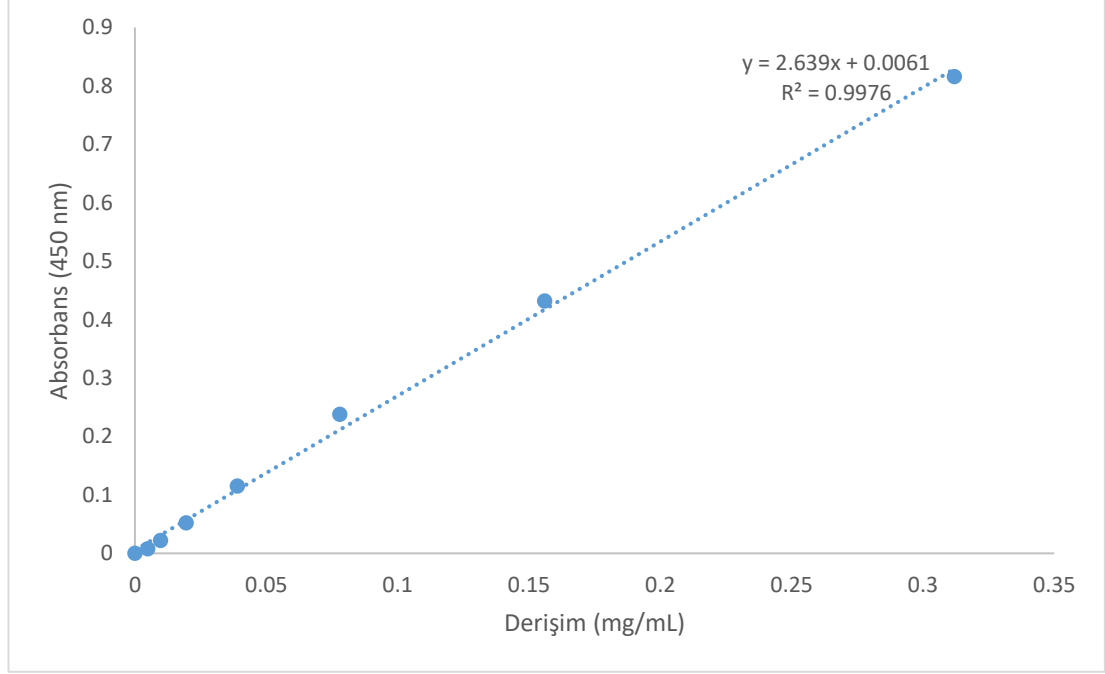
Şekil 4. 3. EPI yüklü, %1,5 PLGA-b-PEG (50:50) (a/h) ile %0,02 (a/h) Pluronik F-68 kullanılarak hazırlanan optimum nanopartikül formülasyona ilişkin boyut grafiği (n=3, x+SD).



Şekil 4. 4. EPI yüklü, %1,5 PLGA-b-PEG (50:50) (a/h) ile %0,02 (a/h) Pluronik F-68 kullanılarak hazırlanan optimum nanopartikül formülasyona ilişkin zeta potansiyel grafiği (n=3, x+SD).

4.2 EPI Miktar Tayini

Bölüm 3.3.2’de açıklandığı üzere elde edilen EPI kalibrasyon eğrisi Şekil 4.5’de sunulmuştur.



Şekil 4. 5. EPI kalibrasyon eğrisi.

4.3. Nanopartiküllerin Enkapsülasyon Etkinliklerinin Değerlendirilmesi

Organik faza eklenen 400 µg EPI yüklü nanopartikül formülasyonunda yeterli enkapsülasyon yüzdesine ulaşılamadığı için, organik ve inorganik faz aşamalarında 200 µg ve 400 µg EPI eklenerek 4 farklı nanopartikül formülasyonu elde edilmiştir. Bu formülasyonlara ait enkapsülasyon etkinlik değerleri Tablo 4.2’de gösterilmiştir. En yüksek enkapsülasyon etkinliği 400 µg EPI’nin, inorganik faza eklenmesi ile elde edilen nanopartikül formülasyonu ile elde edilmiştir.

Tablo 4.2. Farklı konsantrasyonda EPI yüklü NP formülasyonlarına ilişkin enkapsülasyon etkinlik değerleri.

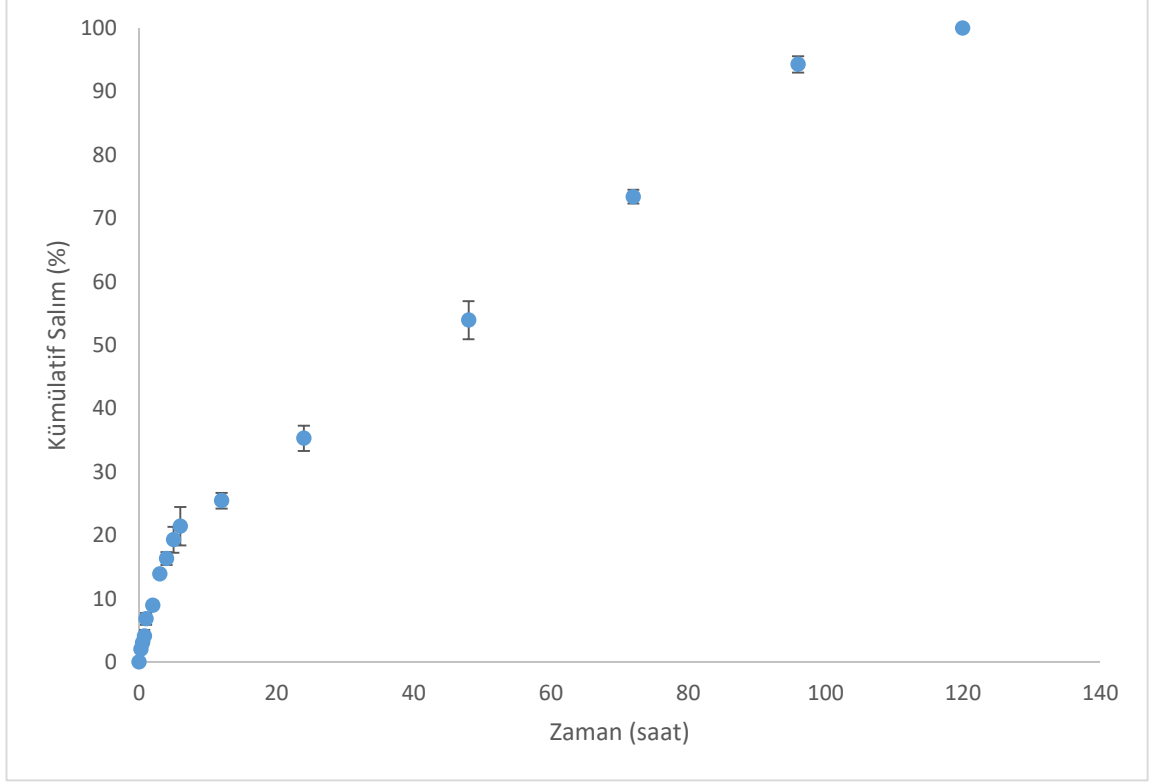
EPI'nin Eklendiği Faz	EPI Miktarı (µg)	Enkapsülasyon etkinliği (%)*
İnorganik	200	49,81±0.4737
İnorganik	400	55,106±0.094
Organik	200	53,789±0.378
Organik	400	49,990±0.947

*(n=3, x±SD)

4.4. EPI Yüklü Nanopartiküllerin *İn vitro* Salım Profilinin Belirlenmesi

Bölüm 3.3.4'de açıklandığı üzere EPI yüklü nanopartiküllerin, *in vitro* salım profili, belirli zaman aralıklarında (15 dk, 30 dk, 45 dk, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168. saatlerde) %1 (a/h) FBS içeren PBS çözeltisi içerisinde diyaliz metodu ile elde edilmiştir.

Nanopartiküllere ilişkin *in vitro* salım grafiği Şekil 4.6'da sunulmuştur.

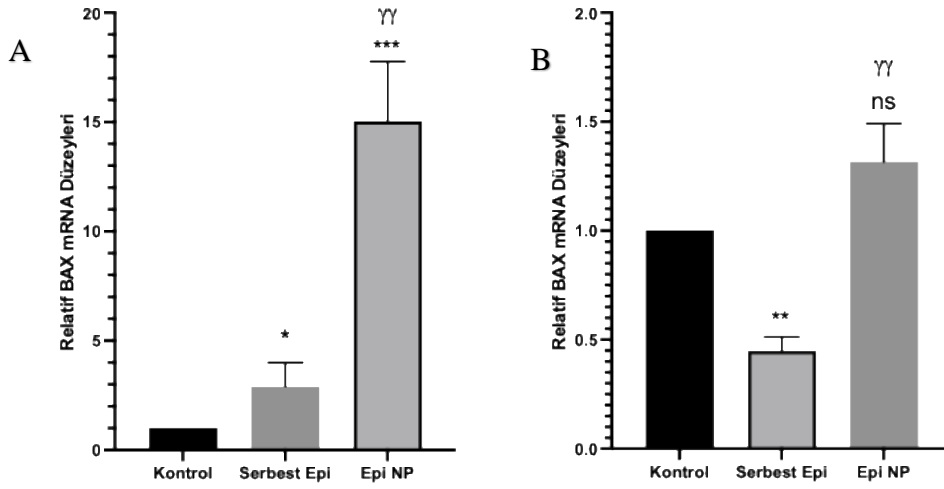


Şekil 4. 6. EPI yüklü nanopartiküllere ilişkin *in vitro* salım grafiği (n=3, $x \pm SD$).

4.5. Hücre Kültürü Çalışmaları

4.5.1. RNA İzolasyonu ve q-RT PCR

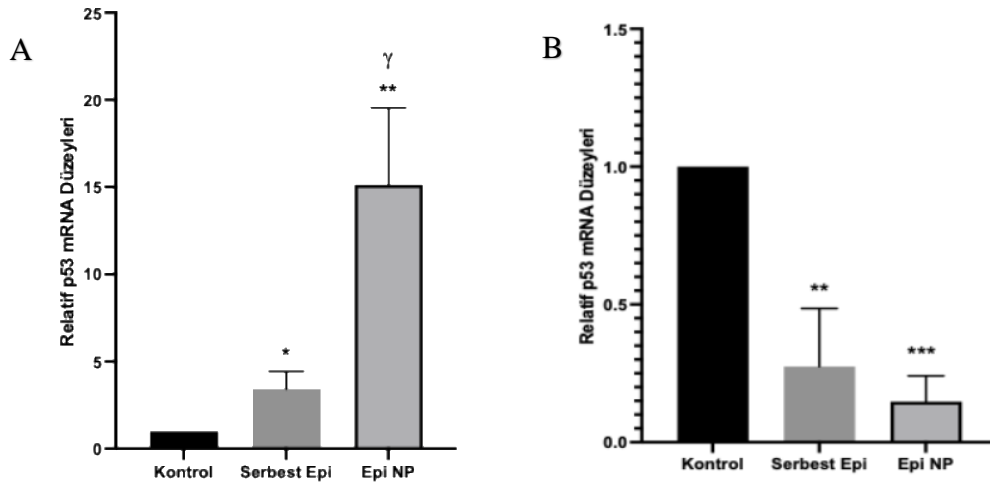
EPI yüklü nanopartiküllerin ve serbest EPI'nin apoptotik yolakla ilişkili *BAX*, *P53*, *BCL2* il anjiyogeneze rol oynayan *VEGFA* geni üzerindeki etkileri A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında değerlendirilmiştir. Her iki hücre hattında da kontrol grubu gen ifade düzeyleri 1'e normalize edilerek serbest EPI ve EPI yüklü nanopartikül uygulanan grupların gen ekspresyonları kontrol grubu ile ayrı ayrı karşılaştırılmıştır. Deney gruplarında hücrelere 200 μ g serbest EPI ve EPI yüklü nanopartikül uygulanmış uygulamayı takiben 24. Saatte total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. *BAX*, *P53*, *BCL2* ve *VEGFA* genlerine ait ifade düzeyleri q-RT PCR yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar istatistiksel değerlendirmeye tabi tutulmuş, bunlara ilişkin veriler Şekil 4.7 - 4.10'da sunulmuştur.



Şekil 4. 7. A) A549 hücre hattında relatif *BAX* mRNA düzeyleri (n=3, $x \pm SD$, *** $P < 0,001$, * $P < 0,05$ kontrole karşı, $\gamma\gamma$ $P < 0,01$ Serbest EPI'ye karşı). **B)** BEAS-2B hücre hattında relatif *BAX* mRNA düzeyleri (n=3, $x \pm SD$, ** $P < 0,01$ kontrole karşı, $\gamma\gamma$ $P < 0,01$ Serbest EPI'ye karşı).

A549 hücre hattında EPI yüklü nanopartikül uygulanması sonrası *BAX* gen ifade düzeyinde; kontrol grubuna ($P < 0,001$) ve Serbest EPI uygulanan gruba ($P < 0,01$) kıyasla anlamlı bir artış saptanmıştır.

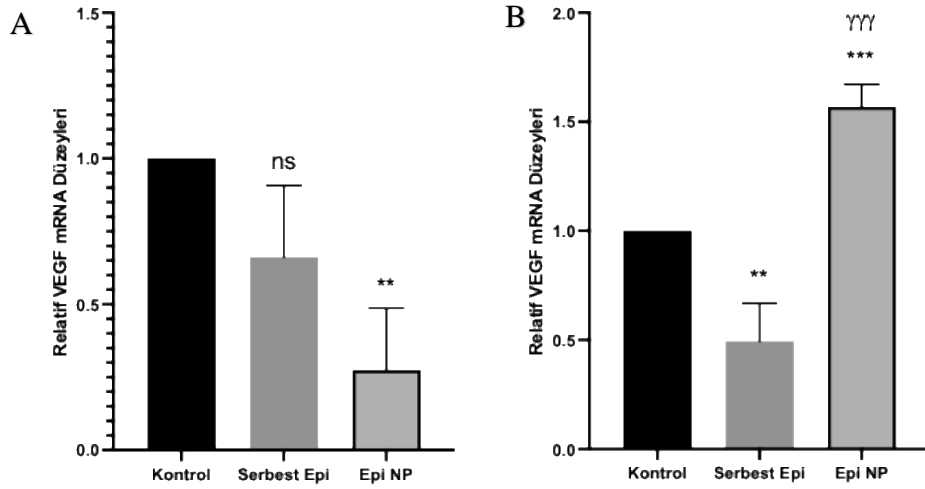
BEAS-2B hücre hattında EPI yüklü nanopartikül uygulanan grupta *BAX* gen ifade düzeyinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Ancak, serbest EPI uygulanan grupta kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($P < 0,05$). EPI yüklü nanopartikül uygulanan grupta ise serbest EPI uygulanan gruba kıyasla anlamlı bir artış saptanmıştır ($P < 0,01$).



Şekil 4. 8. A) A549 hücre hattında relatif *P53* mRNA düzeyleri (n=3, $x \pm SD$, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ kontrole karşı, γ $P < 0,05$ Serbest EPI'ye karşı). **B)** BEAS-2B hücre hattında relatif *P53* mRNA düzeyleri (n=3, $x \pm SD$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, kontrole karşı).

A549 hücre hattında serbest EPI ve EPI yüklü nanopartikül uygulaması sonrası, *P53* gen ifade düzeyinde her iki grupta da kontrole kıyasla anlamlı derecede artış olduğu görülürken (sırasıyla $P < 0,05$, $P < 0,01$), EPI yüklü nanopartikül uygulanan grupta *P53* gen ifade düzeyinde, serbest EPI uygulanan gruba kıyasla anlamlı bir artış saptanmıştır ($P < 0,05$).

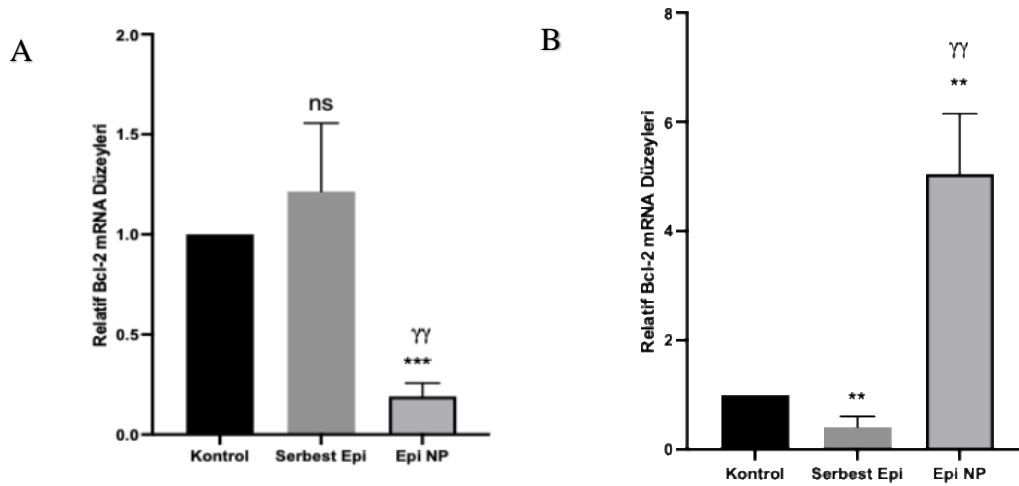
BEAS-2B hücre hattında serbest EPI ve EPI yüklü nanopartikül uygulaması sonrası *P53* gen ifade düzeyinde her iki grupta da kontrole kıyasla anlamlı derecede azalma olduğu görülürken (sırasıyla $P < 0,01$, $P < 0,001$), Epi yüklü nanopartikül uygulanan grupta *P53* gen ifade düzeyinde, serbest Epi uygulanan gruba kıyasla anlamlı bir fark saptanamamıştır.



Şekil 4. 9. A) A549 hücre hattında relatif *VEGFA* mRNA düzeyleri (n=3, $x \pm SD$, **P<0,01 kontrole karşı). **B)** BEAS-2B hücre hattında relatif *VEGFA* mRNA düzeyleri (n=3, $x \pm SD$, ***P<0,001, **P<0,01 kontrole karşı, $\gamma\gamma\gamma$ P<0,001 Serbest EPI'ye karşı).

A549 hücre hattında EPI yüklü nanopartikül ve serbest EPI uygulaması sonrası *VEGFA* gen ifade düzeyinde, serbest EPI uygulanan grupta kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir fark görülememiştir. EPI yüklü nanopartikül uygulanan grupta ise kontrole kıyasla anlamlı bir azalma olduğu saptanmıştır (P<0,01). EPI yüklü nanopartikül uygulanan grup ile serbest EPI uygulanan grup arasında anlamlı bir fark görülememiştir.

BEAS-2B hücre hattında serbest EPI ve EPI yüklü nanopartikül uygulaması sonrası *VEGFA* gen ifade düzeyinde, serbest EPI uygulanan grupta kontrole kıyasla anlamlı bir azalma olduğu görülürken (P<0,01), EPI yüklü nanopartikül uygulanan grupta kontrole kıyasla anlamlı bir artış olduğu saptanmıştır (P<0,001). Ayrıca EPI yüklü nanopartikül uygulanan grupta *VEGFA* gen ifade düzeyinde, serbest EPI uygulanan gruba kıyasla anlamlı bir artış olduğu saptanmıştır (P<0,001).



Şekil 4. 10. A) A549 hücre hattında relatif *BCL2* mRNA düzeyleri (n=3, $x \pm SD$, ***P<0,001 kontrole karşı, $\gamma\gamma$ P<0,01). **B)** BEAS-2B hücre hattında relatif *BCL2* mRNA düzeyleri (n=3, $x \pm SD$, **P<0,01 kontrole karşı, $\gamma\gamma$ P<0,01 Serbest EPI'ye karşı).

A549 hücre hattında EPI yüklü nanopartikül ve serbest EPI uygulaması sonrası *BCL2* gen ifade düzeyinde, serbest EPI uygulanan grupta kontrole kıyasla anlamlı bir fark görülmezken, EPI yüklü nanopartikül uygulanan grupta kontrole kıyasla anlamlı derecede bir azalma olduğu saptanmıştır (P<0,001). EPI yüklü nanopartikül uygulanan grupta *BCL2* gen ifade düzeyinde, serbest EPI uygulanan gruba kıyasla anlamlı azalış görülmüştür (P<0,01).

BEAS-2B hücre hattında EPI yüklü nanopartikül ve serbest EPI uygulaması sonrası *BCL2* gen ifade düzeyinde, serbest EPI uygulanan grupta kontrole kıyasla anlamlı bir azalma olduğu görülürken (P<0,01), EPI yüklü nanopartikül uygulanan grupta kontrole kıyasla anlamlı derecede bir artış olduğu saptanmıştır (P<0,01). Ayrıca EPI yüklü nanopartikül uygulanan grupta *BCL2* gen ifade düzeyinde, serbest EPI uygulanan gruba kıyasla anlamlı bir artış olduğu gözlenmiştir (P<0,01).

5. TARTIŞMA

Kanser immünoterapisinde kullanılan nanopartiküler ilaç taşıma sistemlerinin, gelişmiş biyoyararlanım yoluyla terapötik ajanların etkinliğini artırdığı gösterilmiştir. Nanoteknoloji; kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik ajanlar, bağışıklık kontrol noktası inhibitörleri ve kanser aşuları gibi çeşitli terapötik moleküllerin nanoölçekte hazırlanmasına olanak sağlamakta; bu sayede söz konusu ajanların stabilite sürelerini uzatarak tümör bölgelerine kontrollü taşınımını ve salımını mümkün kılmaktadır. Böylece hedefli uygulama sayesinde istenmeyen sistemik toksisite ve hedef dışı etkiler minimize edilerek kanser tedavisinin etkinliği artırılabilmektedir (75).

KHDAK; kemoterapiye direnç gelişimi, yüksek metastatik potansiyeli ve tedaviye bağlı ciddi sistemik toksisiteler nedeniyle, nanopartikül temelli ilaç taşıma sistemlerinin yoğun olarak araştırıldığı kanser türlerinden biridir.

PLGA-b-PEG, sahip olduğu fizikokimyasal ve biyolojik özellikler nedeniyle nanopartikül üretiminde yaygın olarak tercih edilen bir polimerdir. PLGA-b-PEG'in en önemli avantajları arasında biyoyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilir bir yapıya sahip olması yer almaktadır (75). PLGA-b-PEG'in nanopartikül formuna dönüştürülmesi, taşıdığı etkin maddenin kontrollü salımını sağlarken, sistemik yan etkilerin azaltılmasına da katkı sunmaktadır (76).

Bu tez çalışması kapsamında, EPI yüklü PLGA-b-PEG nanopartiküllerinin eldesi, fizikokimyasal karakterizasyonu ve KHDAK üzerindeki etkileri, A549 ve BEAS-2B hücre hattı kullanılarak *in vitro* koşullarda belirlenmiştir.

Nanopartikül eldesi için nanoçöktürme yöntemi kullanılmış; farklı PLGA-b-PEG konsantrasyonları ile formülasyonlar geliştirilmiştir. Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda, %1,5 PLGA-b-PEG ve %0,02 Pluronik F68 ile hazırlanan formülasyon optimum olarak belirlenmiştir. Bu formülasyonla hazırlanan nanopartiküllerin ortalama partikül boyutu $114,1 \pm 0,45$ nm, zeta potansiyeli $-24,4 \pm 0,22$ mV ve PDI $0,224 \pm 0,02$ olarak saptanmıştır (Bkz.Tablo 4.1).

EPI yüklü nanopartiküllerin hazırlanması sürecinde enkapsülasyon etkinliğinin değerlendirilmesi amacıyla dört farklı formülasyon geliştirilmiştir. Organik ve inorganik faz aşamalarında 200 µg ve 400 µg olacak şekilde EPI eklemeleri

yapılmıştır. En yüksek enkapsülasyon etkinliği, %55,106±0.094 oranı ile 400 µg EPI'in inorganik faza eklendiği koşulda elde edilmiştir (Bkz.Tablo 4.2).

PVA, nanopartikül formülasyonlarında yaygın olarak kullanılan bir yüzey aktif maddedir. Literatürde PVA'nın nanopartikül yüzeyine güçlü şekilde adsorbe olabildiği ve yüzeyde kalan PVA kalıntılarının hücre nanopartikül etkileşimlerini olumsuz yönde etkileyebileceği rapor edilmiştir (77). Bu nedenlerle yüzey aktif ajan olarak PVA yerine Pluronik F68 tercih edilmiştir.

Nanopartikül boyutu, KHDAK gibi solid tümörlerde artırılmış geçirgenlik ve tutulum (EPR) etkisi açısından kritik bir parametredir. EPR etkisi; belirli boyutlardaki moleküllerin normal dokulara kıyasla tümör dokusunda çok daha fazla birikme eğiliminde olduğu tartışmalı bir kavramdır (78). Bu bağlamda, elde edilen nanopartiküllerin uygun boyut aralığında olması, tümör hedeflemesi ve terapötik etkinlik açısından önemli bir avantaj sağlamaktadır.

Düşük polidispersite indeksi (PDI) değerleri (<0,3) (Bkz.Tablo 4.1), nanopartiküllerin homojen bir dağılıma sahip olduğunu göstermektedir. Çalışma kapsamında optimum olarak belirlenen formülasyonun düşük PDI değerine sahip olması, elde edilen nanopartiküllerin biyolojik uygulamalar açısından güvenilirliğini desteklemektedir. Zeta potansiyelinin negatif yönde olması ise nanopartiküller arasındaki elektrostatik itmenin artmasına bağlı olarak agregasyon eğiliminin düşük olduğunu ve sistemin kolloidal stabilitesinin yüksek olduğunu göstermektedir.

Enkapsülasyon çalışmalarında, EPI'in inorganik faz aşamasında eklenmesiyle en yüksek enkapsülasyon veriminin elde edilmesi (Bkz.Tablo 4.2), EPI'in amfifilik yapısı sayesinde sulu ortamda PLGA-b-PEG matrisi içerisine etkin bir şekilde dağılabilmesi ile açıklanabilir. Yüksek enkapsülasyon verimi, nanopartiküllerin terapötik etkinliğini artırırken serbest ilaca bağlı ani ve doz-bağımlı toksisite riskini azaltmaktadır (79-80). Bu durum, özellikle kardiyotoksisite gibi ciddi yan etkilerle ilişkilendirilen antrasiklin grubu ilaçlar açısından klinik uygulamalarda büyük önem taşımaktadır.

EPI yüklü nanopartiküllerin *in vitro* salım profilleri, olası klinik uygulamalar açısından kritik bir değerlendirme parametresidir. Salım çalışmaları, *in vivo* koşulları taklit etmek amacıyla %1 FBS (a/h) içeren PBS çözeltileri içerisinde diyaliz yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. *In vitro* salım deneyleri sırasında, nanopartiküllerin

içerdikleri EPI'in yaklaşık %20'sini ilk 6 saat içerisinde saldığı gözlemlenmiştir. Bu başlangıçtaki hızlı salımın, literatürde "patlama etkisi" (burst effect) olarak tanımlanan, nanopartikül yüzeyine zayıf şekilde bağlı ilacın hızlı salımı ile ilişkili olduğu değerlendirilmiştir. Bunu takiben, EPI'in yaklaşık %50'sinin salımı 50. saatte gerçekleşmiş ve bunu takiben daha yavaş, kontrollü bir salım profili izlenmiştir (Bkz.Şekil 4.6).

Genel olarak PLGA-b-PEG nanopartiküller, başlangıçtaki hızlı salım fazını takiben polimerin hidrolitik bozunmasına bağlı olarak uzun süreli ve sürekli bir salım fazına geçmektedir (81). Bu çalışmada elde edilen salım verileri, PLGA'nın bilinen salım profilleri ile uyumluluk göstermektedir. Özellikle uzun süreli kontrollü salım, ilacın tümör dokusuna veya sistemik dolaşıma yavaş ve düzenli şekilde geçişini sağlayarak serbest formdaki ilacın neden olduğu sistemik toksisiteyi azaltma ve terapötik etkinin süresini uzatma potansiyelini desteklemektedir.

Hücre kültürü çalışmalarında, EPI yüklü nanopartiküllerin etkinliğini karşılaştırmalı olarak incelemek amacıyla A549 hücrelerine 200 µg (80 µL) serbest EPI ve 200 µg (160 µL) EPI yüklü nanopartiküller uygulanmış; 37°C'de 24 saatlik inkübasyonun ardından hücreler apoptotik ve anjiyogenik gen ekspresyonları açısından analiz edilmiştir (Bkz. Şekil 4.7 – Şekil 4.10).

Tümör baskılayıcı bir gen olan *P53*, birçok insan tümöründe yüksek sıklıkta mutasyona uğramakta olup, tümör gelişimi ve progresyonu *P53* mutasyonları ile doğrudan ilişkilidir. *p53* proteini; hücre döngüsünün durdurulması, DNA hasarının onarımı, apoptoz ve otofaji gibi temel hücresel süreçlerde kritik rol oynamakta ve hücrelerin stres koşulları altında kaderini belirlemektedir. Tümörlerdeki yüksek *P53* mutasyon sıklığı ve *P53*'ün güçlü tümör baskılayıcı fonksiyonu göz önünde bulundurulduğunda, *p53* proteini kanser tedavileri açısından önemli ve umut verici bir hedef molekül olarak kabul edilmektedir (82–84).

BCL2 geni, anti-apoptotik özellik gösteren bir gendir ve apoptozun inhibisyonunda rol oynamaktadır. *p53* proteini ile ilişkili sinyal yollarında görev almaktadır. *p53* aktivasyonu, *BAX* transkripsiyonunun artışı yoluyla *BCL2*'nin fonksiyonel olarak baskılanmasına neden olmaktadır. Bu moleküler etkileşim, mitokondriyal apoptoz yolunun aktivasyonu açısından kritik bir basamağı temsil etmektedir (85).

Bu tez kapsamında gerçekleştirilen gen ekspresyon analizlerinde, EPI yüklü nanopartiküllerin, apoptotik genler (*BAX*, *P53*, *BCL2*) ve anjiyogenik gen olan *VEGFA* üzerindeki etkileri, A549 ve BEAS-2B hücre hatlarına serbest EPI ve EPI yüklü nanopartikül uygulanması ve sonuçların kontrol grubu ve serbest EPI uygulanan grupla kıyaslanması yoluyla değerlendirilmiştir. Hücrelere 0. Saatte tek doz olacak şekilde 200µg serbest EPI ve EPI yüklü nanopartikül uygulaması yapılarak 24. Saatin sonunda toplanan hücrelerde q-RT PCR ile değerlendirme yapılmıştır.

A549 hücre hattında, serbest EPI ve EPI yüklü nanopartikül uygulanan gruplarda *BAX* ve *P53* gen ekspresyonlarının kontrol grubu ve serbest EPI uygulanan gruba kıyasla anlamlı düzeyde arttığı gözlemlenmiştir (sırasıyla Şekil 4.7A ve Şekil 4.8A). Bu bulgu, EPI yüklü nanopartikül formülasyonunun *p53*-bağımlı apoptotik yanıtı etkin bir şekilde tetiklediğini göstermektedir. Nanopartikül formülasyonunun, ilacın hücre içine alımını artırması ve hücrel hedeflenmeyi iyileştirmesi yoluyla bu etkiyi güçlendirmiş olabileceği sonucuna varılmıştır.

A549 hücrelerinde, *VEGFA* gen ekspresyonunda gözlenen anlamlı baskılanma (Şekil 4.9A, $P < 0,05$), EPI yüklü nanopartiküllerin anti-anjiyogenik bir etki sergilediğini düşündürmektedir. *VEGFA*, tümör anjiyogenezi, tümör büyümesi ve metastaz süreçlerinde kritik rol oynayan bir faktördür (86). Bu genin baskılanması, tümör progresyonunun yavaşlatılmasına katkı sağlayabilecek ek bir terapötik avantaj sunmaktadır.

Benzer şekilde A549 hücrelerinde, EPI yüklü nanopartikül uygulanan grupta *BCL2* gen ekspresyonundaki anlamlı azalma (Şekil 4.10A, $P < 0,001$), anti-apoptotik mekanizmaların baskılandığını ve hücrelerin apoptoz yoluna etkin şekilde yönlendirildiğini göstermektedir. Bu sonuçlar, EPI yüklü nanopartikül formülasyonunun apoptotik sinyal yollarını kanser hücrelerinde tercihli olarak aktive ettiğini desteklemektedir.

BEAS-2B hücre hattında gerçekleştirilen analizlerde ise EPI yüklü nanopartiküllerin apoptotik genler üzerindeki etkilerinin sınırlı veya ters yönde olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum, nanopartiküllerin kanser hücrelerine karşı görece seçicilik gösterdiğini ve normal hücrelerde düşük toksisite potansiyeline sahip olabileceğini göstermiştir.

BEAS-2B hücre hattında, *BAX* gen ekspresyonunun serbest EPI grubunda kontrole kıyasla azalmasına karşın, EPI yüklü nanopartikül grubunda anlamlı bir değişiklik göstermemesi (Şekil 4.7B, $P<0,05$); nanopartikül formülasyonunun normal hücrelerde pro-apoptotik bir yanıtı tetiklemediğini veya serbest ilaca kıyasla düşük hücrel stres oluşturduğunu fikrini desteklemektedir.

BEAS-2B hücre hattında, *P53* gen ekspresyonunun EPI yüklü nanopartikül uygulanan grupta ($P<0,001$) ve serbest EPI uygulanan grupta ($P<0,05$) kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde baskılanması (Şekil 4.8B); normal hücrelerde apoptoz yollarının inhibe edilmesi yoluyla ilaca bağlı toksisiteye karşı koruyucu bir etki oluşturabileceğini göstermiştir. Bu durum, kanser hücrelerinde gözlenen artışın aksine, nanopartikül formülasyonunun normal hücreler üzerinde seçici ve düşük toksisiteli bir etki sergilediğine işaret etmektedir.

VEGFA gen ekspresyonunun BEAS-2B hücrelerinde EPI yüklü nanopartikül uygulaması sonrasında kontrole ve serbest EPI uygulanan gruba kıyasla artış göstermesi (Şekil 4.9B, $P<0,001$) dikkat çekici bir bulgudur. Normal hücrelerde *VEGFA* ekspresyonundaki artış, hücre büyümesi, doku onarımı ve hücrel sağkalım mekanizmalarının desteklenmesi ile ilişkilendirilebilir. Bu sonuç, nanopartikül formülasyonunun normal hücrelerde hayatta kalma yanıtlarını destekleyerek sistemik toksisite riskini azaltabileceğini düşündürmektedir.

Son olarak, *BCL2* gen ekspresyonunun BEAS hücrelerinde EPI yüklü nanopartikül uygulanan grupta kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde artış göstermesi (Şekil 4.10B); *BAX* ekspresyonunda anlamlı bir değişiklik olmaması (Şekil 4.7B) ve *P53* baskılanması (Şekil 4.8B) ile birlikte değerlendirildiğinde, normal hücrelerde anti-apoptotik bir yanıtın aktive edildiğini göstermektedir. Bu durum, sağlıklı hücrelerin nanopartikül kaynaklı apoptotik strese karşı korunabildiğini ve EPI yüklü nanopartiküllerin hücrel seçicilik özelliğini destekleyen önemli bir bulgu sunmaktadır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez kapsamında, KHOAK tedavisine yönelik anti-tümöral etkiye sahip EPI'in, PLGA-b-PEG nanopartikül sistemleri içerisine yüklenmesi hedeflenmiş ve nanopartiküller hazırlanmış, fizikokimyasal olarak karakterize edilmiş, kontrollü salım potansiyelleri değerlendirilmiş ve *in vitro* koşullarda apoptotik etkileri incelenmiştir. Elde edilen bulgular doğrultusunda aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır:

Nanoçöktürme yöntemi ile elde edilen nanopartiküllerde stabilizatör olarak Pluronic F-68 kullanımı, literatürde sıkça bildirilen PVA kalıntılarının hücrel etkileşimler üzerindeki olumsuz etkilerine karşı avantajlı bir yaklaşım sunduğunu göstermektedir. Bu bağlamda, %1,5 (a/h) PLGA-b-PEG ve %0,02 (a/h) Pluronic F-68 içeren formülasyon, kolloidal stabilite ve biyolojik uyumluluk açısından ideal bir sistem olarak belirlenmiştir.

Elde edilen nanopartiküllerin ortalama $114,1 \pm 0,45$ nm partikül boyutuna sahip olması, solid tümörlerde artırılmış EPR etkisinden yararlanmak için uygun bir aralıkta olduğunu göstermektedir. Ayrıca, $0,224 \pm 0,02$ olarak belirlenen düşük PDI homojen bir partikül dağılımını işaret ederken, $-24,4 \pm 0,22$ mV zeta potansiyeli, formülasyonun uzun süreli kolloidal stabiliteye sahip olduğunu desteklemektedir (Tablo 4.1).

EPI'in inorganik faz aşamasında eklenmesiyle elde edilen $55,106 \pm 0,094$ oranındaki enkapsülasyon etkinliği, ilacın amfifilik yapısının PLGA-b-PEG polimer matrisi ile uyumlu olduğunu ve etkin bir şekilde enkapsüle edilebildiğini göstermektedir (Tablo 4.2). *In vitro* salım çalışmalarında gözlemlenen başlangıçtaki patlama etkisi (burst effect) ve bunu takiben yaklaşık 50 saatlik kademeli ve kontrollü salım profili, formülasyonun hızlı başlangıç etkisi oluşturma ve uzun süreli terapötik etki sağlama potansiyeline sahip olduğunu ortaya koymaktadır (Şekil 4.6).

BEAS-2B hücreleri üzerinde yapılan gen ekspresyon analizlerinde kontrol grubuna kıyasla gözlemlenen *P53* baskılanması (Şekil 4.8B) ile birlikte *BCL2* (Şekil 4.10B) ve *VEGFA* (Şekil 4.9B) gen ekspresyonlarındaki artış, EPI yüklü nanopartiküllerin normal hücrelerde sağkalım mekanizmalarını desteklediğini, buna bağlı olarak sistemik toksisite riskini azaltabilecek hücrel seçiciliğe sahip olabileceğini düşündürmektedir.

A549 hücre hattında gerçekleştirilen analizlerde ise, EPI yüklü nanopartikül uygulamasının apoptotik ve anjiyogenik genler üzerinde belirgin biyolojik etkiler oluşturduğu görülmüştür. Kontrol grubuna kıyasla *BAX* ve *P53* gen ekspresyonundaki anlamlı artış (Şekil 4.7A ve Şekil 4.8A), EPI yüklü nanopartiküllerin hücrelerde apoptozu etkin biçimde indüklediğini; *VEGFA* ve *BCL2* düzeylerindeki anlamlı düşüş (Şekil 4.9A ve Şekil 4.10A), tedavinin hem anjiyogenez hem de anti-apoptotik sinyaller üzerinde baskılayıcı etki gösterdiğini ortaya koymaktadır. Bu sonuçlar, EPI'nin nanopartikül formülasyonunun güçlü ve hedeflenmiş bir terapötik potansiyele sahip olabileceğini göstermektedir.

Genel olarak, bu tez kapsamında geliştirilen EPI yüklü PLGA-b-PEG yapıları nanopartikül sistemlerinin, KHOAK tedavisine yönelik etkin, kontrollü salım sağlayan ve kanser hücrelerine seçici etki gösterme potansiyeline sahip umut verici bir ilaç taşıyıcı sistem olduğu sonucuna varılmıştır.

Gelecekte yapılacak çalışmalarda, PLGA-b-PEG nanopartiküllerinin yüzeyi, KHOAK hücrelerinde aşırı eksprese edilen özgül reseptörlere yönelik ligandlar veya monoklonal antikolar ile modifiye edilerek aktif hedefleme sağlanabilir. Bu tür yüzey modifikasyonları, nanopartiküllerin tümör hücrelerine seçici bağlanmasını sağlayarak terapötik etkinliği artırma potansiyeline sahiptir. Hücre kültürü ortamında elde edilen biyoetkinlik ve gen ekspresyon bulgularının, *in vivo* hayvan modellerinde tümör büyümesi, metastaz ve sistemik toksisite üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu aşama, geliştirilen nanopartikül sistemlerinin klinik translasyon potansiyelinin ortaya konulması açısından kritik önem taşımaktadır. Ayrıca, EPI yüklü nanopartikül sistemlerinin immünoterapötik ajanlar ve/veya diğer kemoterapötik ilaçlar ile kombine edilerek kullanılması yoluyla sinerjik terapötik etkilerin araştırılması mümkündür. Bu tür kombinasyon stratejileri, özellikle tedaviye dirençli kanser türleri için yeni ve daha etkili tedavi protokollerinin geliştirilmesine katkı sağlayabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Li Y, Yan B, He S. Advances and challenges in the treatment of lung cancer. *Biomed Pharmacother.* 2023 Dec;169:115891.
2. Lahiri A, Maji A, Potdar PD, Singh N, Parikh P, Bisht B, et al. Lung cancer immunotherapy: progress, pitfalls, and promises. *Mol Cancer.* 2023 Feb;22(1):40.
3. Solanki R, Rostamabadi H, Patel S, Jafari SM. Anticancer nano-delivery systems based on bovine serum albumin nanoparticles: a critical review. *Int J Biol Macromol.* 2021 Dec;193(Pt A):528–40.
4. Taghavizadeh Yazdi ME, Qayoomian M, Beigoli S, Boskabady MH. Recent advances in nanoparticle applications in respiratory disorders: a review. *Front Pharmacol.* 2023;14:1059343.
5. Sharma N, Kumari RM, Gupta N, Syed A, Bahkali AH, Nimesh S. Poly(lactic-co-glycolic) acid nanoparticles for synergistic delivery of epirubicin and paclitaxel to human lung cancer cells. *Molecules.* 2020 Sep;25(18):4192.
6. Luiz MT, Dutra JAP, Di Filippo LD, Junior AGT, Tofani LB, Marchetti JM, et al. Epirubicin: biological properties, analytical methods, and drug delivery nanosystems. *Crit Rev Anal Chem.* 2023;53(5):1080–93.
7. Zhou J, Xu Y, Liu J, Feng L, Yu J, Chen D. Global burden of lung cancer in 2022 and projections to 2050: incidence and mortality estimates from GLOBOCAN. *Cancer Epidemiol* [Internet]. 2024;93:102693. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1877782124001723>
8. Cancer Today. GLOBOCAN 2022 v1.1 [Internet]. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2022. Available from: <https://gco.iarc.fr>
9. Nicholson AG, Tsao MS, Beasley MB, Borczuk AC, Brambilla E, Cooper WA, et al. The 2021 WHO classification of lung tumors: impact of advances since 2015. *J Thorac Oncol.* 2022 Mar;17(3):362–87.
10. Hendriks LEL, Remon J, Faivre-Finn C, Garassino MC, Heymach JV, Kerr KM, et al. Non-small-cell lung cancer. *Nat Rev Dis Primers.* 2024 Sep;10(1):71.
11. Tsao MS, Nicholson AG, Maleszewski JJ, Marx A, Travis WD. Introduction to 2021 WHO classification of thoracic tumors. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2022 Jan;17(1):e1–4. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2021.09.017>
12. Venkatesan S, Swanton C. Tumor evolutionary principles: how intratumor heterogeneity influences cancer treatment and outcome. *ASCO Educ Book.* 2016;35:e141–9.
13. Zhang J, Fujimoto J, Zhang J, Wedge DC, Song X, Zhang J, et al. Intratumor heterogeneity in localized lung adenocarcinomas delineated by multiregion sequencing. *Science.* 2014 Oct;346(6206):256–9.

14. de Bruin EC, McGranahan N, Mitter R, Salm M, Wedge DC, Yates L, et al. Spatial and temporal diversity in genomic instability processes defines lung cancer evolution. *Science*. 2014 Oct;346(6206):251–6.
15. Kotton DN, Fine A. Lung stem cells. *Cell Tissue Res*. 2008 Jan;331(1):145–56.
16. Giangreco A, Groot KR, Janes SM. Lung cancer and lung stem cells: strange bedfellows? *Am J Respir Crit Care Med*. 2007 Mar;175(6):547–53.
17. Pao W, Miller VA. Epidermal growth factor receptor mutations, small-molecule kinase inhibitors, and non-small-cell lung cancer: current knowledge and future directions. *J Clin Oncol*. 2005 Apr;23(11):2556–68.
18. Gridelli C, Rossi A, Carbone DP, Guarize J, Karachaliou N, Mok T, et al. Non-small-cell lung cancer. *Nat Rev Dis Primers*. 2015 May;1:15009.
19. Kocher F, Hilbe W, Seeber A, Pircher A, Schmid T, Greil R, et al. Longitudinal analysis of 2293 NSCLC patients: a comprehensive study from the TYROL registry. *Lung Cancer*. 2015 Feb;87(2):193–200.
20. Saettele TM, Ost DE. Multimodality systematic approach to mediastinal lymph node staging in non-small cell lung cancer. *Respirology*. 2014 Aug;19(6):800–8.
21. Fischer BM, Mortensen J, Hansen H, Vilmann P, Larsen SS, Loft A, et al. Multimodality approach to mediastinal staging in non-small cell lung cancer: faults and benefits of PET-CT. *Thorax*. 2011 Apr;66(4):294–300.
22. Ellis PA, Smith IE, Hardy JR, Nicolson MC, Talbot DC, Ashley SE, et al. Symptom relief with MVP chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer*. 1995 Feb;71(2):366–70.
23. Boffetta P. Human cancer from environmental pollutants: the epidemiological evidence. *Mutat Res*. 2006 Sep;608(2):157–62.
24. Whitrow MJ, Smith BJ, Pilotto LS, Pisaniello D, Nitschke M. Environmental exposure to carcinogens causing lung cancer. *Respirology*. 2003 Dec;8(4):513–21.
25. Zeeb H, Shannoun F. WHO handbook on indoor radon. Geneva: World Health Organization; 2009.
26. GBD 2017 Risk Factor Collaborators. Global comparative risk assessment of 84 risks, 1990–2017. *Lancet*. 2018 Nov;392(10159):1923–94.
27. Hill W, Lim EL, Weeden CE, Lee C, Augustine M, Chen K, et al. Lung adenocarcinoma promotion by air pollutants. *Nature*. 2023 Apr;616(7955):159–67.
28. Steenland K, Burnett C, Lalich N, Ward E, Hurrell J. Dying for work: occupational mortality in the US. *Am J Ind Med*. 2003 May;43(5):461–82.
29. Ge C, Peters S, Olsson A, Portengen L, Schüz J, Almansa J, et al. Respirable crystalline silica exposure and lung cancer risk. *Am J Respir Crit Care Med*. 2020 Aug;202(3):412–21.
30. Ge C, Peters S, Olsson A, Portengen L, Schüz J, Almansa J, et al. Diesel engine exhaust exposure and lung cancer risk. *Am J Respir Crit Care Med*. 2020 Aug;202(3):402–11.
31. Betser L, Glorion M, Mordant P, Caramella C, Ghigna MR, Besse B, et al. Cannabis use and lung cancer. *Eur Respir J*. 2021;57:2001843.

32. eClinicalMedicine. E-cigarette use among adolescents. *eClinicalMedicine*. 2022;50:101623.
33. Henry TS, Kanne JP, Kligerman SJ. Imaging of vaping-associated lung disease. *N Engl J Med*. 2019;381:1486–7.
34. Christiani DC. Vaping-induced acute lung injury. *N Engl J Med*. 2020;382:960–2.
35. Heiden BT, Eaton DBJ, Chang SH, Yan Y, Baumann AA, Schoen MW, et al. Surgical quality metrics and survival in NSCLC. *JAMA Surg*. 2023 Mar;158(3):293–301.
36. Whitson BA, D’Cunha J, Maddaus MA. Minimally invasive cancer surgery and survival. *Med Hypotheses*. 2007;68(6):1328–32.
37. Lim E, Harris RA, McKeon HE, Batchelor TJ, Dunning J, Shackcloth M, et al. VIOLET RCT. *Health Technol Assess*. 2022 Dec;26(48):1–162.
38. Savonitto E, Yasufuku K, Wallace AM. Robotic segmentectomy for early-stage lung cancer. *Front Surg*. 2023;10:1090080.
39. Amini A, Yeh N, Gaspar LE, Kavanagh B, Karam SD. SBRT for lung cancer. *Radiat Oncol*. 2014 Sep;9:210.
40. Artal Cortés Á, Calera Urquizu L, Hernando Cubero J. Adjuvant chemotherapy in NSCLC. *Transl Lung Cancer Res*. 2015 Apr;4(2):191–7.
41. Hellmann MD, Chaft JE, William WN Jr, et al. Pathological response after neoadjuvant chemotherapy. *Lancet Oncol*. 2014 Jan;15(1):e42–50.
42. Felip E, Altorki N, Zhou C, et al. IMpower010 trial. *Lancet*. 2021 Oct;398(10308):1344–57.
43. O’Brien M, Paz-Ares L, Marreaud S, et al. PEARLS/KEYNOTE-091. *Lancet Oncol*. 2022 Oct;23(10):1274–86.
44. Wu YL, Tsuboi M, He J, et al. Osimertinib in resected EGFR-mutated NSCLC. *N Engl J Med*. 2020 Oct;383(18):1711–23.
45. Tsuboi M, Herbst RS, John T, et al. Overall survival with osimertinib. *N Engl J Med*. 2023 Jul;389(2):137–47.
46. Aupérin A, Le Péchoux C, Rolland E, et al. Radiochemotherapy meta-analysis. *J Clin Oncol*. 2010 May;28(13):2181–90.
47. Filippi AR, Dziadziuszko R, García Campelo MR, et al. DUART study. *Future Oncol*. 2021 Dec;17(34):4657–63.
48. Mouri A, Kisohara A, Morita R, et al. NEJ039A study. *ESMO Open*. 2024 Oct;9(10):103939.
49. Pao W, Girard N. New driver mutations in NSCLC. *Lancet Oncol*. 2011 Feb;12(2):175–80.
50. Bennati C, Paglialunga L, Ricciuti B, et al. Targeting EGFR and ALK in NSCLC. *Lung Cancer Manag*. 2016 Jun;5(2):79–90.
51. Alduais Y, Zhang H, Fan F, et al. NSCLC: review. *Medicine (Baltimore)*. 2023 Feb;102(8):e32899.

52. Garon EB, Ciuleanu TE, Arrieta O, et al. REVEL trial. *Lancet*. 2014 Aug;384(9944):665–73.
53. Peters S, Felip E, Dafni U, et al. NICOLAS Phase II Trial. *J Thorac Oncol*. 2021 Feb;16(2):278–88.
54. Jabbour SK, Lee KH, Frost N, et al. KEYNOTE-799 trial. *JAMA Oncol*. 2021 Jun;7(9):1–9.
55. Chouquet T, Benoit G, Morand K. Analytical control of pediatric cytotoxic drugs. *Pharm Technol Hosp Pharm*. 2016;1.
56. Llovet JM, Bruix J. Chemoembolization in HCC. *Hepatology*. 2003 Feb;37(2):429–42.
57. Minko T, Batrakova EV, Li S, et al. Pluronic copolymers and apoptosis. *J Control Release*. 2005 Jul;105(3):269–78.
58. Garcia AA, Kempf RA, Rogers M, Muggia FM. Phase II study of Doxil. *Ann Oncol*. 1998 Oct;9(10):1131–3.
59. Liu L, Mu LM, Yan Y, et al. Epirubicin liposomes. *Int J Nanomedicine*. 2017;12:4163–76.
60. Fathian Kolahkaj F, Derakhshandeh K, Khaleseh F, et al. Epirubicin-loaded nanoparticles. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2019;53:101136.
61. Ma P, Mumper RJ. Anthracycline nano-delivery systems. *Nano Today*. 2013 Jun;8(3):313–31.
62. Kabanov AV, Batrakova EV, Alakhov VY. Pluronic copolymers. *Adv Drug Deliv Rev*. 2002 Sep;54(5):759–79.
63. Feng L, Mumper RJ. Lipid-based nanoparticles. *Cancer Lett*. 2013 Jul;334(2):157–75.
64. Wang Y, Hao J, Li Y, et al. Pluronic P105 micelles. *Biomaterials*. 2012 Jun;33(18):4741–51.
65. Tariq M, Alam MA, Singh AT, et al. Oral epirubicin nanoparticles. *Drug Deliv*. 2016 Oct;23(8):2990–7.
66. Lakshmi N, Popuri S, Lee CH, Terbish N. pH-sensitive epirubicin delivery. *Int J Polym Mater Polym Biomater*. 2020;70:1–14.
67. Sanna V, Pala N, Sechi M. Targeted therapy using nanotechnology. *Int J Nanomedicine*. 2014;9:467–83.
68. Mittal M, Juneja S, Pandey N, Mittal R. Nanoparticle-based drug delivery systems. *Curr Drug Targets*. 2025 Sep.
69. Forest V, Pourchez J. Nano-delivery to the lung. *Adv Drug Deliv Rev*. 2022 Apr;183:114173.
70. Luo MX, Hua S, Shang QY. Nanotechnology in respiratory drug delivery. *Mol Med Rep*. 2021 May;23(5).
71. Hynes NRJ, Sankaranarayanan R, Kumar JPS. Nanoparticles and medicine. In: Verpoort F, et al., editors. *Nanomedicine Manufacturing and Applications*. Elsevier; 2021. p. 21–37.

72. Korucu Aktas P, Baysal I, Yabanoglu-Ciftci S, et al. Drug delivery systems for TKIs. *Int J Pharm.* 2024;650:123703.
73. Kim SJ, Puranik N, Yadav D, et al. Lipid nanocarriers in lung cancer. *Int J Nanomedicine.* 2023;18:2659–76.
74. Barichello JM, Morishita M, Takayama K, Nagai T. PLGA nanoprecipitation method. *Drug Dev Ind Pharm.* 1999 Apr;25(4):471–6.
75. Theivendren P, Kunjiappan S, Pavadai P, et al. Nanotechnology-driven immunotherapy. *ACS Meas Sci Au.* 2025 Feb;5(1):31–55.
76. Alsaab HO, Alharbi FD, Alhibs AS, et al. PLGA-based nanomedicine. *Pharmaceutics.* 2022 Dec;14(12):2628.
77. Menon JU, Kona S, Wadajkar AS, et al. Surfactants and PLGA nanoparticles. *J Biomed Mater Res A.* 2012 Aug;100(8):1998–2005.
78. Nakamura Y, Mochida A, Choyke PL, Kobayashi H. Nanodrug delivery and EPR effect. *Bioconjug Chem.* 2016 Oct;27(10):2225–38.
79. Klojdová I, Milota T, Smetanová J, Stathopoulos C. Encapsulation strategies. *Pharmaceutics (Basel).* 2023 Feb;16(3):367.
80. Rafiyath SM, Rasul M, Lee B, et al. Liposomal doxorubicin toxicity. *Exp Hematol Oncol.* 2012 Apr;1(1):10.
81. Makadia HK, Siegel SJ. PLGA as drug delivery carrier. *Polymers (Basel).* 2011 Sep;3(3):1377–97.
82. Kasthuber ER, Lowe SW. Putting p53 in context. *Cell.* 2017 Sep;170(6):1062–78.
83. Levine AJ. p53 evolution and discovery. *Nat Rev Cancer.* 2020 Aug;20(8):471–80.
84. Muller PAJ, Vousden KH. p53 mutations in cancer. *Nat Cell Biol.* 2013 Jan;15(1):2–8.
85. Wei H, Wang H, Wang G, et al. p53/BCL-2 complex. *Nat Commun.* 2023 Jul;14(1):4300.
86. Zhao Y, Guo S, Deng J, et al. VEGF/VEGFR-targeted therapy in NSCLC. *Int J Biol Sci.* 2022;18(9):3845–58.

8. EKLER

EK-1: Turnitin Dijital Makbuz



Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Evin Mizgin Parlak Kayaşlı
Ödev başlığı: Quick Submit
Gönderi Başlığı: AKCİĞER KANSERİ TEDAVİSİNE YÖNELİK EPİRUBİSİN TAŞIYICI P...
Dosya adı: AKC_ER_KANSER_TEDAV_S_NE_Y_NEL_K_Evin_Mizgin_Parlak_Ka...
Dosya boyutu: 2.33M
Sayfa sayısı: 63
Kelime sayısı: 12,125
Karakter sayısı: 82,911
Gönderim Tarihi: 15-Oca-2026 02:33ÖS (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 2857230525

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AKCİĞER KANSERİ TEDAVİSİNE YÖNELİK
EPİRUBİSİN TAŞIYICI POLİMERİK NANOPARTİKÜLER SİSTEMLERİN
GELİŞTİRİLMESİ VE İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ

Dr. Evin Mizgin PARLAK KAYAŞLI

Tek Sağlık Programı
Yüksek Lisans Tezi

TEZ DANIŞMANI
Prof.Dr. Saime VARANOĞLU ÇİFTÇİ

ANKARA
2025

Copyright 2026 Turnitin. Tüm hakları saklıdır.

EK 2: Tez Çalışması Orjinallik Raporu

AKCİĞER KANSERİ TEDAVİSİNE YÖNELİK EPİRUBİSİN TAŞIYICI POLİMERİK NANOPARTİKÜLER SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ VE İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 18	% 14	% 11	% 9
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Hacettepe University Öğrenci Ödevi	% 5
2	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 2
3	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 1
4	Submitted to Ege Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<% 1
5	avesis.hacettepe.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
6	ALTIN, Emine and ERTEKİN, Ali. "Amoksisilin Klavulanik Asit, Amoksisilin Klavulanik Asit+Vitamin Uygulamasının Ratların Böbrek ve Karaciğer Dokularındaki Malondialdehit ve Antioksidan Düzeylerine Etkisi#", Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi, 2017. Yayın	<% 1

9. ÖZGEÇMİŞ

