

**ÇOKLU İLACA DİRENÇLİ KANSER HÜCRE HATTINA
NANOPARTİKÜLLERLE İLAÇ AKTARIMI**

**DRUG DELIVERY WITH NANOPARTICLES TO MULTI-
DRUG RESISTANCE CANCER CELL LINE**

SEMA TUNCER

Prof. Dr. MEHMET ALİ ONUR

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

NANOTEKNOLOJİ ve NANOTİP

Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2014

SEMA TUNCER'in hazırladığı "**Çoklu İlaça Dirençli Kansere Hücre Hattına Nanopartiküllerle İlaç Aktarımı**" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **NANOTEKNOLOJİ VE NANOTIP ANABİLİM DALI**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ
Başkan

.....

Prof. Dr. Mehmet Ali ONUR
Danışman

.....

Prof. Dr. Handan YAVUZ ALAGÖZ
Üye

.....

Prof. Dr. Serdar ABACI
Üye

.....

Prof. Dr. Mustafa KOCAKULAK
Üye

.....

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçlarımı bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

25.08.2014

SEMA TUNCER

ÖZET

ÇOKLU İLACA DİRENÇLİ KANSER HÜCRE HATTINA NANOPARTİKÜLLERLE İLAÇ AKTARIMI

Sema TUNCER

Yüksek Lisans, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mehmet Ali ONUR

Eş Danışmanı : Doç. Dr. Mustafa TÜRK

Ağustos 2014, 101 sayfa

Disiplinlerarası bir bilim olan Nanoteknoloji ve Nanotıp uygulamaları giderek yaygınlaşarak geleneksel tedavilerin yerini almaya başlamıştır. Bilindiği üzere kemoterapi, radyoterapi ve/veya cerrahi yöntemlerle iyileştirilmeye çalışılan kanser gibi pekçok hastalık tedavinin başarısını ve etkinliğini son derece azaltmaktadır. Klasik kemoterapi ilaçlarının vücutta istenen bölgeye gidememesinin yanısıra, kanserli hücrelerde terapötik dozlara da ulaşamamaktadır. Böylece nanoteknolojinin önemli çalışma alanlarından olan biyoyumlu taşıyıcılardan (nanopartiküllerden) yararlanılarak kanser teşhis ve tedavisinde ciddi çalışmalar yapılmaktadır.

Bu tez çalışmasında, bir kanser ilacının (doksorubisin) polimerik nanopartiküllere yüklenmesi ve salımının belirlenmesi, ilaç dirençli Küçük Hücreli Akciğer Kanser Hücresi (KHAKH) ve Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanser Hücresi (KHOAKH) hattında (H69AR ve H1299); nanopartikül ile birlikte hücrelere verilerek apoptoza uğrayan hücre oranının, hücre proliferasyonunun ve sitotoksitesinin belirlenmesi, son olarak ortamda kuersetin (bir biyoflavonoid) varlığında ilaç yüklü partiküllerin hücrelere verildiğinde apoptoz, proliferasyon ve toksitesinin karşılaştırmalı olarak tespit edilmesi amaçlanmaktadır.

Tez çalışmasında kuersetin ile ilaç dirençli küçük hücreli akciğer kanser hücrelerinde ilaç direncinin yıkılarak ve nanopartiküllerle bu hücrelere etkin dozda ilaç aktarımının sağlanarak apoptoza yönlendirilmesi hedeflenmektedir.

Bu amaçla, çalışmanın ilk kısmında kitosan nanopartiküllerin sentezi, karakterizasyonu ve ilaç salım çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Bunun için öncelikle düşük molekül ağırlıklı kitosan polimerinin, bir zayıf asit olan asetik asit içerisinde çözünmesi sağlanmış, daha sonra uygun pH'ya ayarlanarak kitosanın çapraz bağlayıcısı olan Tripolifosfat (TPP) ile etkileştirilmiş, böylelikle kitosan nanopartiküller elde edilmiştir.

Hazırlanan nanopartiküllerin fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi amacıyla boy dağılımı, parçacık yüzey yükü analizlerine bakılmış ve morfolojik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla AFM (Atomik Kuvvet Mikroskobu) tekniğinden yararlanılmıştır.

Elde edilen nanopartiküllerin optimizasyonu sağlandıktan sonra doksorubisin kanser ilacı, *in-vitro* salım profilinin belirlenmesi amacıyla partiküllere yüklenmiş ve ilaç salımının zamana bağlı olarak kontrollü salım grafiği çıkarılmıştır.

Çalışmanın ikinci aşamasında ise, hazırlanan ilaçlı nanopartiküllerin kuersetin ile birlikte hücreye verilerek, hücrelerdeki sitotoksisite, proliferasyon oranları karşılaştırılmalı olarak incelenmiştir. Ölen hücrelerin morfolojik değerlendirmelerinin yapılması amacıyla ikili boyama metodu kullanılarak hücrelerin apoptotik-nekrotik indeksleri çıkartılmıştır. Ve hücre proliferasyonlarının zamana bağlı değişimleri RTCA (Tam Zamanlı Hücre Analizi) sistemiyle desteklenmiştir. Elde edilen sonuçlar kuersetin yüklü ilaçlı nanopartikülün kanser tedavisinde olası bir kemoterapötik seçenek olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler : kitosan nanopartikül, doksorubisin, çoklu ilaç dirençliliği, kuersetin, kanser nanoterapi, apoptozis

ABSTRACT

DRUG DELIVERY WITH NANOPARTICLES TO MULTI-DRUG RESISTANCE CANCER CELL LINE

SEMA TUNCER

**Master of Science, Department of Nanotechnology and
Nanomedicine**

Supervisor: Prof. Dr. MEHMET ALİ ONUR

Co-advisor: Doç. Dr. Mustafa TÜRK

August 2014, 101 pages

Nanotechnology and Nanomedicine applications are interdisciplinary sciences that began to take the place of traditional treatments increasingly widespread. As is known, chemotherapy, radiotherapy and / or surgical methods extremely reduce the success and effectiveness of the treatment of many diseases like cancer. Classical chemotherapy drugs are incapable of reaching the desired site in the body, also they can not achieve to therapeutic doses in cancer cells. So novel studies is focused on cancer diagnostic and treatment utilizing biocompatible carrier (of nanoparticles) which are important study fields of nanotechnology.

In this thesis, loading of a cancer drug (doxorubicin) into polymeric nanoparticles and determination of its releasing studies, treating the drug-resistant Small Cell

Lung Cancer Cells (SCLC) and Non-Small Cell Lung Cancer Cells (NSCLC) (H69AR and H1299) with these nanoparticles and evaluation the apoptotic cell rate, cell proliferation and cytotoxicity and finally comparative apoptosis, proliferation and toxicity studies of the drug-loaded particles in the presence of quercetin (a bioflavonoid) were aimed.

Moreover, it was intended to direct the cells to apoptosis reducing the resistance of the drug resistant Small Cell Lung Cancer Cells via quercetin and releasing the drug at effective dose to cells via nanoparticles.

For this purpose, in the first part of the study, synthesis and characterization of chitosan nanoparticles and the drug release studies were performed.

Firstly dissolution of the low molecular weight chitosan polymer in a weak acetic acid was achieved, and then interaction of chitosan with tripolyphosphate (TPP) which is a crosslinker was carried out adjusting the appropriate pH of chitosan solution, and finally chitosan nanoparticles were obtained.

For purpose of determining of physicochemical properties, size distribution, particle surface charge analysis of prepared nanoparticles were evaluated and for determination of morphological properties, AFM (Atomic Force Microscopy) technique was utilized. After optimization has been accomplished, cancer drug doxorubicin was loaded into the resulted nanoparticles for *in vitro* release profile and the graphic of time-dependent controlled release was obtained. In the second part of the study, prepared drug loaded nanoparticles with quercetin were interacted with cells then the cytotoxicity and the proliferation rates were assessed comparatively. For morphological evaluation of dying cells, the apoptotic-necrotic index of cells have been obtained using the double staining method. And the time-dependent changes in cell proliferation in the RTCA (Real-Time Cell Analyzer) system have been analysed. Obtained results show that drug loaded nanoparticles with quercetin is a possible chemotherapeutic option for cancer therapy.

Key Words: chitosan nanoparticles, doxorubicin, multi drug resistance, quercetin, cancer nanotherapy, apoptosis

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması boyunca akademik, kültürel ve insani olgunlaşmamda bana sağladıkları büyük katkılardan ötürü;

Prof.Dr.Emir Bakı DENKBAŞ'a,

Doç.Dr.Mustafa TÜRK'e,

Prof.Dr.Mehmet Ali ONUR'a,

Mehmet Doğan AŞIK'a,

Göknur KARA'ya,

Ebru ERDAL'a,

Deniz İrem BULUT'a,

Zeynep KARAHALILOĞLU'na,

Dr.Cem BAYRAM'a,

Tayfun VURAL'a,

Dr.Tamer ÇIRAK'a,

Dr.Murat DEMİRBİLİK'e,

Dr.Doğa KAVAZ'a,

Betül Bozdoğan PALA'ya,

Soheil MALEKGHASEMI'ye,

Esra ARAT'a,

Canan ÇAKIR'a,

Rümeysa AKÇAPINAR'a,

Selçuk TOKLUCU'ya,

Özlem TUTAR'a,

Aslı AĞAR'a,

Fatih DİKMEN'e ,

Attığım her adım, verdiğim her kararda beni daima destekleyen, ne olursa olsun bana duydukları güveni ve sevgilerini her an hissettiren canım ailem; Abdülkerim YÜCEL, Emine YÜCEL, Nuriye TUNCER, Ali TUNCER, Seda TUNCER ve Eda TUNCER'e,

Tüm yaşamım boyunca karşıma çıkan herkese, en bebesinden en yaşlısına, en deneyimsizinden en bilgisine, kendilerinden tek bir harf, bir nokta dahî olsa bir şeyler öğrenebildiğim herkese teşekkürü bir borç bilirim.

Sema TUNCER

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER	x
ÇİZELGELER	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR	xv
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	2
2.1. Kanser	3
2.1.1. Hücre Döngüsü ve Kanser.....	5
2.1.2. Kanserle İlişkilendirilen Gen Sınıfları.....	7
2.1.3. Kanser Hücrelerinin Temel Özellikleri.....	8
2.1.4. Kanserde Direnç Mekanizmaları.....	11
2.1.4.1. Taşıyıcı Protein Aileleri.....	12
2.1.4.1.2. ABC Taşıyıcı Ailesi.....	12
2.1.4.1.2.1. P-Glikoprotein (ABCB1)	14
2.1.4.1.2.2. MRP1 (ABCC1)	14
2.1.4.1.2.3. BCRP (Meme Kanseri Direnç Proteini)	14
2.1.4.1.2.4. LRP (Akciğer Direnç Proteini)	15

2.1.5. Akciğer Kanseri.....	15
2.1.5.1. Küçük Hücreli Akciğer Kanseri (KHAK)	17
2.1.5.2. Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri (KHOAK).....	18
2.1.6. Kanser Tedavisinde Kullanılan Geleneksel Tedaviler.....	19
2.1.6.1. Cerrahi Girişim.....	19
2.1.6.2. İmmünoterapi.....	19
2.1.6.3. Kemoterapi.....	19
2.1.6.4. Radyoterapi.....	20
2.2. Nanoteknolojinin Doğuşu.....	21
2.2.1. Kanser Nanoteknolojisi.....	24
2.3. Kontrollü İlaç Salım Sistemleri.....	24
2.3.1. Kontrollü Salım Sistemlerinde Kullanılan Polimerler.....	25
2.3.1.1. Biyoparçalanın Polimerler.....	26
2.3.1.1.1. Kitosan.....	27
2.3.1.2. Biyoparçalanmayan Polimerler.....	28
2.3.2. İlaç Taşıyıcı Partiküler Sistemler.....	28
2.4. Kanser Tedavisinde Kullanılan Etken Maddeler.....	32
2.4.1. Doksorubisin.....	32
2.5. Flavonoidler (Kuersetin).....	33
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	35
3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Malzemeler.....	35
3.2. Kitosan Nanopartiküllerin Hazırlanması.....	35

3.3. Kitosan Nanopartiküllerin Karakterizasyonu.....	36
3.3.1. Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi.....	38
3.3.2. Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi.....	38
3.3.2.1. Boyut ve Yük Analizi.....	38
3.4. Nanopartiküllere Etken Madde Yüklenmesi ve Salım Çalışmaları.....	39
3.4.1. İlaç Yükleme Çalışmaları.....	39
3.4.2. İlaç Salım Çalışmaları.....	40
3.4.3. İlaç Tutunma Verimliliği.....	41
3.5. İlaç Yüklü Kitosan Nanopartiküllere Kuersetin Bağlanması.....	41
3.6. Hücre ile Etkileşim Çalışmaları.....	42
3.6.1. Hücrelerin Hazırlanması.....	42
3.6.2. Hücre Canlılık ve Proliferasyon Testi (WST-1).....	45
3.6.3. Hücre Proliferasyonunun xCELLigence RTCA ile Belirlenmesi.....	48
3.6.4. İkili Boyama Metodu ile Apoptoz ve Nekrozun Belirlenmesi.....	50
4. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMALAR.....	52
4.1. Kitosan Nanopartiküller.....	52
4.1.1. Morfolojik Değerlendirmeler.....	52
4.1.2. Boyut ve Yük Analizi.....	52
4.2. Nanopartiküllere Etken Madde Yüklenmesi ve Salımı.....	54
4.2.1. İlaç Yükleme Çalışmaları.....	54
4.2.2. İlaç Salım Çalışmaları.....	56
4.2.3. İlaç Yüklü Kitosan Nanopartiküllere Kuersetin Bağlanması.....	58

4.3. Hücre ile Etkileşim Çalışmaları.....	59
4.3.1. Hücre Canlılık ve Proliferasyon Testi (WST-1).....	59
4.3.2. İkili Boyama Metodu ile Apoptoz ve Nekrozun Belirlenmesi.....	65
4.3.3. Hücre Proliferasyonunun xCELLigence RTCA ile Belirlenmesi.....	75
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	84
KAYNAKLAR	87
ÖZGEÇMİŞ	98

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Tipik bir kanser hücresinin şematik görünümü	3
Şekil 2.2. Tümörün basamaklar halinde kan damarları yoluyla yayılması.....	4
Şekil 2.3. İyi huylu ve kötü huylu tümörlerin karşılaştırılması.....	5
Şekil 2.4. Bir vücut hücresinin hayat devri.....	6
Şekil 2.5. ABC taşıyıcı proteinlerinin aşırı ekspresyonu ve ilaca direnç mekanizmasının gelişimi	12
Şekil 2.6. ABC ailesindeki bazı taşıyıcı proteinlerin moleküler yapısı.....	15
Şekil 2.7. Kanserleşme sürecini gösteren şematik görüntüler.....	16
Şekil 2.8. Küçük hücreli akciğer kanseri.....	18
Şekil 2.9. Büyük hücreli akciğer kanseri.....	18
Şekil 2.10. Nanoteknoloji ile etkileşimde olan diğer disiplinler.....	21
Şekil 2.11. Çeşitli yapıların nanoölçekteki yerlerinin şematik gösterimi.....	23
Şekil 2.12. İlaç alımının ardından kandaki ilaç düzeyinin zamana bağlı değişimini gösteren grafik.....	25
Şekil 2.13. Selüloz, kitin ve kitosanın kimyasal yapıları.....	28
Şekil 2.14. Nanoküre ve nanokapsüllerin yapısı.....	29
Şekil 2.15. Çeşitli yapılardaki ilaç taşıyıcı partiküler sistemler.....	31
Şekil 2.16. Doksorubisin'in kimyasal yapısı.....	32
Şekil 2.17. İki doksorubisin molekülünün DNA içerisine interkalasyonunu gösteren şematik görünüm.....	33
Şekil 2.18. Kuersetinin moleküler yapısı.....	34
Şekil 3.1. İyonik jelleşme yöntemiyle hazırlanan kitosan nanopartiküllerin şematik gösterimi.....	37
Şekil 3.2. Doksorubisin yüklü kitosan nanopartiküllerinin self-assemble oluşumu.....	37
Şekil 3.3. Dinamik Işık Saçılımı mekanizmasının şematik gösterimi.....	39

Şekil 3.4. Doksorubisin yüklü kitosan nanopartiküllerin salım ve analiz düzeneği.....	40
Şekil 3.5. H69AR hücrelerinin morfolojik görüntüsü.....	43
Şekil 3.6. H1299 ve L929 Fibroblast hücrelerinin morfolojik görünümü.....	44
Şekil 3.7. Tetrazolyum tuzunun formazan kristaline dönüşümünün şematik gösterimi.....	46
Şekil 3.8. Çalışmalarda kullanılan otomatik hücre sayım cihazı.....	47
Şekil 3.9. Hücre ile etkileşim öncesi örneklerin hazırlanması aşamaları.....	47
Şekil 3.10. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (RTCA).....	48
Şekil 3.11. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi uygulamasının üç adımda şematik gösterimi.....	49
Şekil 3.12. Apoptoza uğrayacak hedef hücrede görülen morfolojik değişiklikler.....	51
Şekil 3.13. Apoptoz ve nekrozun morfolojik görüntüsü.....	51
Şekil 4.1. Hazırlanan kitosan nanopartiküllerin AFM görüntüsü.....	52
Şekil 4.2. Hazırlanan kitosan nanopartiküllerin Zeta-Sizer'da hacimce boy dağılımı grafiği.....	53
Şekil 4.3. Boş kitosan nanopartiküllerin zeta-potansiyeli grafiği.....	54
Şekil 4.4. Doksorubisin'e ait kalibrasyon grafiği.....	55
Şekil 4.5. Farklı dozlardaki doksorubisin derişiminin yüklenme verimliliğine etkisi.....	55
Şekil 4.6. Kitosan nanopartiküllerden kümülatif salınan ilaç miktarının zamanla değişimini gösteren grafik.....	56
Şekil 4.7. Kitosan nanopartiküllerden % salınan ilaç miktarının zamanla değişimi.....	57
Şekil 4.8. İlaç yüklü nanopartiküller ile serbest ilacın salım kinetiklerinin karşılaştırılması.....	58
Şekil 4.9. Kuersetine ait kalibrasyon grafiği.....	59

Şekil 4.10. Boş np., ilaçlı np., saf ilaç, ilaçlı kuersetin, kuersetin yüklü ilaçlı np. ve saf kuersetin formülasyonlarının H69AR hücreleri üzerine 24 ve 48 saatlik sitotoksik etkileri.....	61
Şekil 4.11. İlaçlı np., saf ilaç, ilaçlı kuersetin, kuersetin ve ilaçlı np. formülasyonlarının H1299 hücreleri üzerine 48 saatlik sitotoksik etkileri.....	62
Şekil 4.12. Boş np., ilaçlı np., saf ilaç, ilaçlı kuersetin, kuersetin yüklü ilaçlı np. ve saf kuersetin formülasyonlarının H1299 hücreleri üzerine 48 saatlik sitotoksik etkileri.....	64
Şekil 4.13. Boş np., ilaçlı np.,saf ilaç, ilaçlı kuersetin, kuersetin yüklü ilaçlı np. ve saf kuersetin formülasyonlarının L929 Fibroblast hücreleri üzerine 48 saatlik sitotoksik etkileri.....	64
Şekil 4.14. Hoechst 33342 floresan boya kullanılarak yapılan ikili boyamadan elde edilen apoptotik hücre fotoğrafları (24 saatlik etki).....	66
Şekil 4.15. Hoechst 33342 floresan boya kullanılarak yapılan ikili boyamadan elde edilen apoptotik hücre fotoğrafları (48 saatlik etki).....	67
Şekil 4.16. 50 µg/mL derişimindeki örneklerle muamele edilmiş H69AR hücrelerinde 24 saatlik % apoptotik-nekrotik değerler.....	69
Şekil 4.17. 50 µg/mL derişimindeki örneklerle muamele edilmiş H69AR hücrelerinde 48 saatlik % apoptotik-nekrotik değerler.....	70
Şekil 4.18. Hoechst 33342 floresan boya kullanılarak yapılan ikili boyamadan elde edilen nekrotik hücre fotoğrafları (48 saatlik etki)	71
Şekil 4.19. 50 µg/mL derişimindeki örneklerle muamele edilmiş H1299 hücrelerinde 48 saatlik % apoptotik-nekrotik değerler.....	73
Şekil 4.20. 50 µg/mL derişimindeki örneklerle muamele edilmiş L929 hücrelerinde 48 saatlik % apoptotik-nekrotik değerler.....	74
Şekil 4.21. H1299 ve L929 Fibroblast hücreleriyle etkileştirilen % apoptotik-nekrotik değerler.....	75

Şekil 4.22. Kontrol grubu hücrelerinin proliferasyonunu gösteren grafik.....	76
Şekil 4.23. Farklı derişimlerdeki boş kitosan nanopartiküllerin L929 Fibroblast hücreleri üzerindeki proliferatif etkisi.....	77
Şekil 4.24. Farklı derişimlerdeki saf ilacın L929 Fibroblast hücreleri üzerindeki proliferatif etkisi.....	78
Şekil 4.25. Farklı derişimlerdeki kuersetin yüklü ilaçlı nanopartiküllerin L929 Fibroblast hücreleri üzerindeki proliferatif etkisi.....	78
Şekil 4.26. Saf ilaç, kuersetin yüklü ilaçlı np., ilaçlı kuersetin, boş np. ve saf kuersetin formülasyonlarının L929 Fibroblast hücreleri üzerine proliferatif etkisi.....	79
Şekil 4.27. Kuersetin yüklü ilaçlı nanopartiküllerin H1299 kanser hücreleri üzerine proliferatif etkisi.....	80
Şekil 4.28. Boş kitosan np., saf kuersetin, kuersetin yüklü ilaçlı np.ve saf ilacın H1299 hücreleri üzerine proliferatif etkisi.....	80
Şekil 4.29. Farklı derişimlerdeki ilaçlı np. formülasyonlarının H69AR kanser hücreleri üzerine proliferatif etkisi.....	81
Şekil 4.30. Farklı derişimlerde hazırlanan kuersetin yüklü ilaçlı nanopartiküllerin H69AR kanser hücreleri üzerine proliferatif etkisi	82
Şekil 4.31. İlaçlı np., saf ilaç, ilaçlı np. ve kuersetin yüklü ilaçlı np.lerin H69AR kanser hücreleri üzerine proliferatif etkisi.....	83

ÇİZELGELER

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Bazı proto-onkogenler ve tümör baskılayıcı genler.....	7
Çizelge 2.2. İnsanda taşıyıcı proteinler.....	13
Çizelge 2.3. ABC taşıyıcı proteinleri ve üye sayıları.....	13
Çizelge 2.4. Biyoparçalanmayan ve Biyoparçalanmayan polimerler.....	26
Çizelge 2.5. Nanopartiküler sistemlerde kullanılan doğal ve sentetik polimerler	31
Çizelge 3.1. H69AR kanser hücre hattı için kullanılan kültür koşulları.....	42
Çizelge 3.2. H1299 kanser hücre hattı için kullanılan kültür koşulları.....	44
Çizelge 3.3. L929 Fibroblast hücreleri için kullanılan kültür koşulları.....	45
Çizelge 4.1. Farklı derişimlerdeki etken maddenin np.lere yüklenme oranları....	55
Çizelge 4.2. Hazırlanan boş np., ilaçlı np., saf ilaç, ilaçlı kuersetin, kuersetin yüklü ilaçlı np. ve saf kuersetinin H69AR hücreleri üzerine 24 ve 48 saatlik sitotoksik etkileri.....	60
Çizelge 4.3. Boş np., ilaçlı np., saf ilaç, ilaçlı kuersetin, kuersetin yüklü ilaçlı np. ve saf kuersetin formülasyonlarının H1299 ve L929 Fibrolast hücreleri üzerine sitotoksik etkileri (48 saatlik).....	63
Çizelge 4.4. H69AR hücrelerinde boş np., ilaçlı np., saf ilaç, ilaçlı kuersetin, kuersetin yüklü ilaçlı np. ve saf kuersetin uygulamalarının 24 saatlik etkileştirilmeleri sonucu elde edilen apoptotik-nekrotik indeks sonuçları.....	68
Çizelge 4.5. H69AR hücrelerinde boş np., ilaçlı np., saf ilaç, ilaçlı kuersetin, kuersetin yüklü ilaçlı np. ve saf kuersetin uygulamalarının 48 saatlik etkileştirilmeleri sonucu elde edilen apoptotik-nekrotik indeks sonuçları.....	68
Çizelge 4.6. H1299 hücrelerinde apoptotik-nekrotik indeks sonuçları.....	72
Çizelge 4.7. L929 Fibroblast hücrelerinde apoptotik-nekrotik indeks sonuçları	73

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%	Yüzde
°	Derece
μ	Mikron

Kısaltmalar

ABC	ATP Bağlayıcı Kaset
AFM	Atomik Kuvvet Mikroskobu
ATCC	American Type Culture Collection
BCRP	Meme Kanseri Direnç Proteini
DLS	Dinamik Işık Saçılımı
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FBS	Fetal Bovin Serumu
FITC	Fluorescein isothiocyanate
kDa	Kilo dalton
KHAK	Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
KHOAK	Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri
LRP	Akciğer Direnç Proteini
M	Molar
mL	Mililitre
mg	Miligram
MDIs	Multi-Drug Inhibitors
MDR1	Çoklu İlaç Direnci Proteini 1
MRP	Çoklu İlacı Dirençlilik

MRP1	Çoklu İlaç Direnci İle İlişkili Protein 1
NaOH	Sodyum Hidroksit
nm	Nanometre
Np	Nanopartikül
PBS	Tuzlu Fosfat Tamponu
PDGF	Platelet-Türevli Büyüme Faktörü
P-gp	P-glikoprotein (Glikoprotein permeabilitesi)
pH	Hidrojenin Gücü
PI	Propidyum İyodür
RES	Retikuloendotelial Sistem
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute-1640
RTCA	Gerçek Zamanlı Hücre Analizi
sa	Saat
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
Std	Standart Sapma
TGF α	Transforming Growth Factor α
TPP	Tripolifosfat
Tripsin-EDTA	Tripsin-Etilendiamin Tetra Asetikasit
UV	Ultraviyole
VEGF	Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü
WST	Suda Çözünebilir Tetrazolyum Tuzu

1.GİRİŞ

Dünyada en sık rastlanan ölüm nedenlerinden biri olan kanser, ülkemizde 1970'li yıllarda sebebi bilinen ölümler arasında dördüncü sırada yer alırken, son yıllarda kardiyovasküler sistem rahatsızlıklarından sonra gelmektedir [1-4].

En ölümcül kanser tiplerinden biri olarak bilinen akciğer kanseri, bugün kanserli ölümlerin başında yer almaktadır [1-5].

Günümüzde cerrahi yöntemler, kemoterapi veya radyoterapi kombinasyonları yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak kanser hücreleri çeşitli kemoterapötik ajanlara karşı direnç kazanabilir ve kemoterapi, “ **Çoklu İlaç Dirençliliği** ” mekanizmaları nedeniyle başarısız olabilir. Bu nedenle klinik uygulamalardaki başarının önündeki en önemli engellerden biri, tedavi sırasında ‘ilaca dirençli hücre popülasyonu’nun seleksiyonudur. Bu popülasyon başlangıçta çok düşük oranlarda olsa bile tedavi esnasındaki seleksiyon sonucu kısa sürede dominant hücre popülasyonu, *dirençli hücre grubu*’ndan oluşacaktır. Klinik uygulamalarda bu durum ‘**edinsel direnç**’ şeklinde karşımıza çıkmaktadır [6-8].

Bu direnç; hücre içinde ilaç birikimini sınırlandıran, membran lipitlerini etkileyen, ilaçların hücre dışına atışını hızlandıran değişikliklerle sonuçlanır ve tüm bu değişiklikler çoğu antikanser ilacının aktive ettiği apoptozu, DNA hasarı tamirini, ilaç detoksifikasyonu mekanizmalarını ve hücre döngüsündeki değişiklikleri bloke eder [9-11].

Son dönemlerde yapılan çalışmalar, apoptoz önleyici faktörlerin kanser direncinin oluşumunda çok önemli olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla apoptozu önleyici faktörleri ortadan kaldırarak direnci ortadan kaldırmak kanser tedavisinde yeni bir umut ışığı oluşturmaktadır [22,23].

Akciğer kanserinde görülen ilaç direnci, tedavinin önündeki en önemli engellerden biri olarak karşımıza çıkmaktadır.

Özellikle son yıllarda kemoterapötik ajanlar ve bitkilerden elde edilen flavonoidlerin birlikte kullanılmasıyla yapılan çalışmalarda önemli başarılar elde edilmiştir[12-16].

Kuersetin (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone), doğada yaygın olarak bulunan (özellikle elma, soğan, çilek, kiraz, brokoli ve kırmızı şarapta) flavonoidlerden biridir [12,13]. Flavonol grubunun bir üyesi olan kuersetin toksik olmamakla birlikte hücre fizyolojisi açısından da pekçok önemli fonksiyona sahiptir. Kuersetinin anti-proliferasyon, anti-oksidan, anti-ülser, apoptoz indüklenmesi

protein kinaz C inhibisyonu, hücre siklusu düzenlenmesi, anjiyogenez inhibisyonu, anti-alerjik ve anti-kanser özellikleri bulunmaktadır.

Kuersetinin MDR ailesi üyelerini (P-gp, MRP1, BCRP) inhibe ettiği gösterilmiştir. Kuersetin, MDR proteinlerinin ATPaz bölgelerini tanımaktadır. Hücre içi serbest radikalleri ortadan kaldırabileceği ve çeşitli moleküllerin oksidasyonunu engelleyerek in vivo ve in vitro antioksidan aktivite gösterebileceği belirtilmektedir.

Sunulan çalışmada, kanser tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilen ilaç yüklü taşıyıcının, bir flavonoid olan kuersetin varlığında hücrelere verilerek tümörlü hücrelerin apoptoza yönlendirilmesi ve sonuçta küçük hücreli ve küçük hücreli olmaya akciğer kanseri hücre hatlarında ilaç direncinin yıkılması hedeflenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KANSER

Kanser; vücuttaki bir hücre grubunun farklılaşarak, aşırı ve kontrolsüz şekilde çoğalmasıdır. Bu durum kromozomal, genetik ve epigenetik değişiklikler sonucunda ortaya çıkan çok basamaklı bir süreç olup, hücre bölünmesi, farklılaşması, apoptoz, DNA tamiri gibi temel hücresel işlevleri de etkilemektedir [17,18].

Kanser kelimesinin kökeni Latince'de 'yengeç' anlamına gelen 'cancer' kelimesine dayanmaktadır. İlk kez, Yunanlı hekim Hipokrat, kanserin ilerlediği safhalarda tümör yakınlarından geçen damarları yengecin bacaklarına benzer uzantılara benzettiği için bu terimi kullanmıştır [26].

Kanserler başlangıç yaşlarına, büyüme oranlarına, yayılımlarına, evrelerine ve tedaviye verdikleri tepkilere göre çeşitlilik göstermektedirler. Buna rağmen tüm kanserler moleküler seviyede ortak karakteristik özellik gösterirler [19].

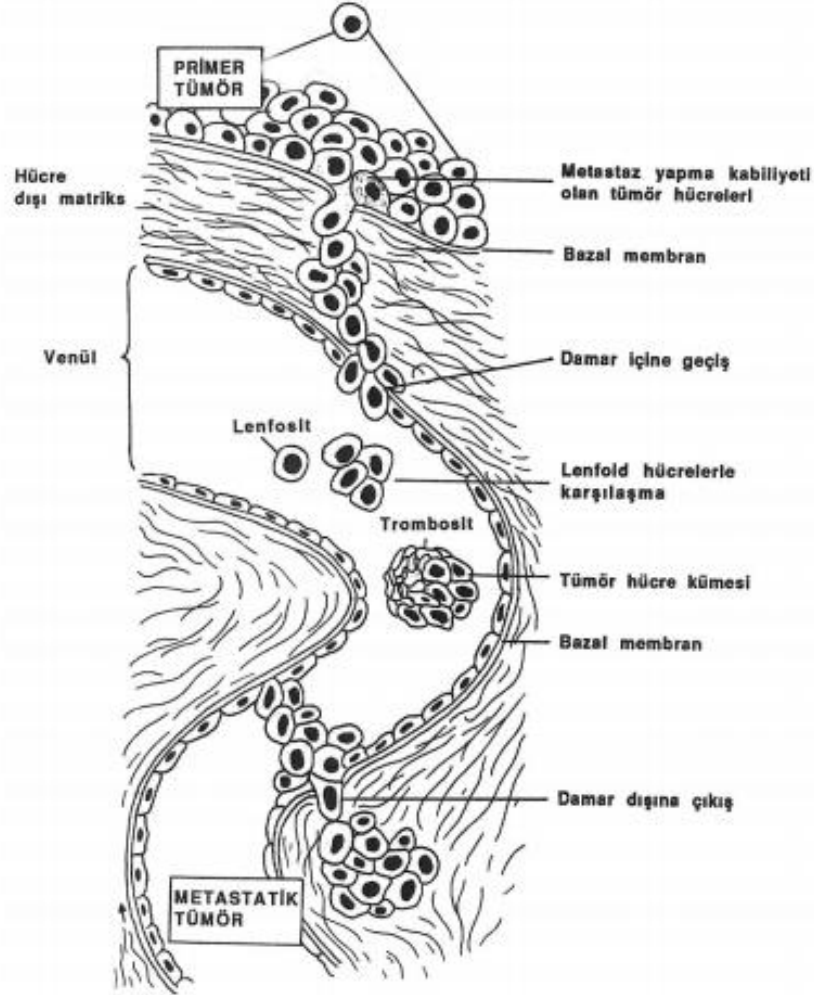


Şekil 2.1. Tipik bir kanser hücresinin şematik görünümü [27].

Tüm kanser hücreleri iki temel özelliği paylaşırlar:

- 1) Anormal hücre büyümesi ve bölünmesi (**hücre çoğalması**)
- 2) Hücrelerin vücudun diğer bölümlerine yayılması ve istilası (**metastaz**)

Kanser hücrelerini tehlikeli yapan başlıca faktörler; denetlenemeyen hücre çoğalması ve metastatik yayılmalardır [19].

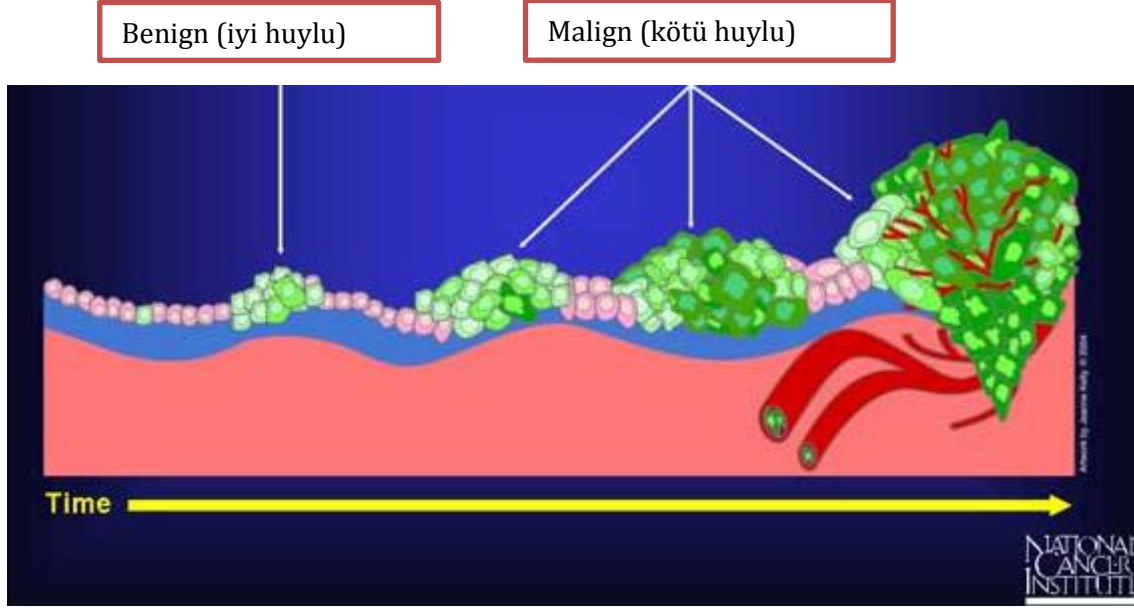


Şekil 2.2. Tümörün basamaklar halinde kan damarları yoluyla yayılması [103]

Bir hücre, hücre büyümesi üzerindeki genetik kontrolünü kaybederse, çok hücreli bir yığın, **iyi huylu tümör (benign tümör)** olabilir. Benign tümörler, çoğunlukla bir kapsül ile çevrilidir [20]. Bu tip bir tümör ameliyatla alınabilir. Uygun tedavi edilmedikleri takdirde buldukları yerde tekrarlayabilir. Kistler, siğiller, polipler iyi huylu tümörlere örnektir [21].

Buna rağmen, eğer tümördeki hücreler bu yapıdan kurtulabilme, kan dolaşımına girebilme, diğer dokuları istila edebilme ve ikincil tümörler biçimlendirebilme (metastaz) yetisini ele geçirmişlerse o zaman **kötü huylu tümör, tehlikeli tümör**

(**malign tümörler**) olurlar. Malign tümörlerin tedavileri zordur ve hayati tehlike oluşturabilirler [19].



Şekil 2.3. İyi huylu ve kötü huylu tümörlerin karşılaştırılması (NCI)

2.1.1. HÜCRE DÖNGÜSÜ VE KANSER

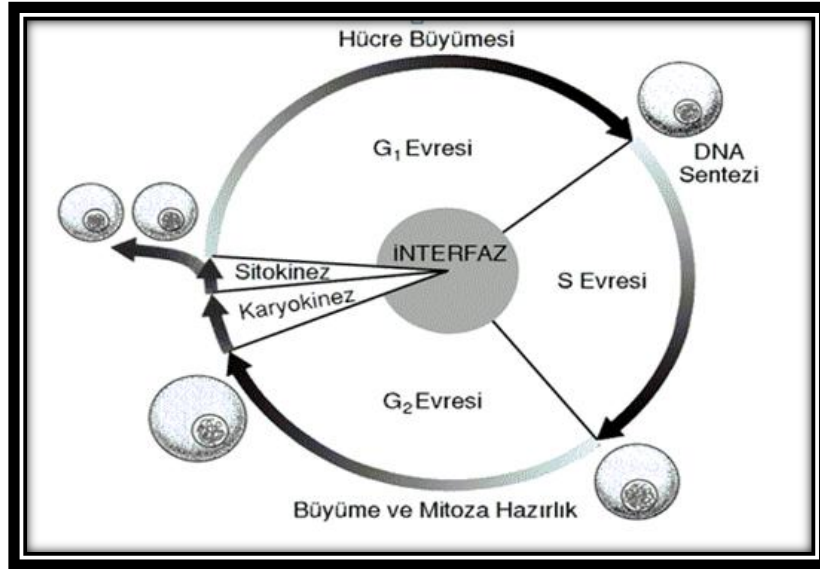
Canlı vücudunda gerçekleşen her türlü değişikliğe karşı var olan dengenin korunmaya çalışılması homeostasis olarak adlandırılmakta ve bu iç denge; hücre çoğalması, büyümenin durdurulması ve apoptozis (programlı hücre ölümü) ile sürdürülmektedir [24,25].

Bir hücre bölünmesinden bir sonrakine kadar geçen süreçte meydana gelen hücresel olaylar **hücre döngüsünü** oluşturur. Normal hücrelerde, hücre döngüsü süreci sıkı bir şekilde düzenlenmiştir. Hücre döngüsünü kontrol eden başlıca evreler ve kontrol noktaları bulunmaktadır.

G0 evresi: İstirahat fazı olarak da bilinir. Hücre burada metabolik olarak aktiftir; fakat bir bölünme sinyali almadıkları sürece bölünemezler. G0 fazı normalde hücre

döngüsü içerisinde bulunmayan, döngüsünü tamamlayarak çıkan hücrelerin bekledikleri uzun ve sessiz bir evredir. Kanser hücreleri bu evreyi hızlıca atarlar.

G1 evresi: Bu evrede hücre, DNA'sının kopyalanması için gerekli olan enzim, protein ve molekülleri biriktirerek DNA sentezi için hazırlık yapar.



Şekil 2.4. Bir vücut hücresinin hayat devri: Temelde interfaz ve mitoz evrelerinden oluşur. G1, S ve G2 evreleri interfazı oluştururken; karyokinez ve sitokinez aşamaları mitoz bölünmeyi oluşturur [28].

S evresi: DNA sentezinin gerçekleştirildiği evredir.

G2 evresi: Hücre büyümeye ve mitoz bölünmeye hazırlanır. Bunun için gerekli olan RNA ve protein sentezine devam edilir.

M evresi: Çoğalmış olan kromozomlar yoğunlaştırılır, eş kromozomlar kutuplara ayrılır ve hücre ikiye bölünür (mitoz).

Hücre çoğalması, tüm gelişim ve doku onarımı için gerekli olan hücre büyüme ve bölünme sürecidir. Hücrelerin büyümesi ve farklılaşması kesin bir şekilde düzenlenmelidir; aksi takdirde organların ve dokuların bütünlüğü uygunsuz hücre tipleri ve hücre miktarları tarafından bozulabilmektedir.

Hücre çoğalması üzerindeki normal düzenleme, hücre döngüsü aşamalarını, hücre ölümlerinin programlanmasını ve aşırı büyüme sinyallerine karşı hücrelerin cevaplarını kontrol eden çok sayıdaki gen ve ürünlerinin varlığını gerektirir.

Kanserli hücrelerde, bu işlevleri kontrol eden birçok gen mutasyona uğramıştır ya da yanlış ifade edilirler ve kontrol edilemeyen hücre çoğalmasına yol açarlar [49].

2.1.2. Kanserle İlişkilendirilen Gen Sınıfları

Kanser hücrelerinde proto-onkogenler ve tümör süpresör (baskılayıcı) genler olmak üzere iki genel gen kategorisi mutasyona uğrar ya da yanlış ifadelenir (Çizelge 2.1.).

Proto-onkogenler, büyümeyi uyan, hücre büyümesi ve bölünmesini ilerleten genlerdir. Bu görevlerini; diğer genlerin ifadelerini uyan transkripsiyon faktörlerini kodlayarak, hücre bölünmesini uyan sinyal iletim moleküllerini ya da hücrenin döngü boyunca ilerlemesini sağlayan hücre döngüsü düzenleyicilerini kodlayarak yaparlar [49,50]. Bir proto-onkogen; mutasyona uğradığında ya da hatalı ifade edilerek kanser gelişimine katkıda bulunduğunda *onkogen* (kansere sebep olan gen) olarak bilinir. Kontrol edilemeyen hücre büyümesini uyarabilmesi için sadece bir proto-onkogenin allel'inin mutasyona uğramış ya da yanlış ifade edilmiş olması gerekmektedir. Bu yüzden onkogenler, baskın bir kanser fenotipine sebep olurlar. Onkogen özelliği kazanmış genlerin ürünlerine de *onkoprotein* denir. [50,51]

Çizelge 2.1. Bazı proto-onkogenler ve tümör baskılayıcı genler [49]

Proto-onkogen	Normal Fonksiyonu	Kanserdeki Değişiklik
c-myc	Transkripsiyon faktörü, hücre döngüsü ve apoptozisi düzenler	Translokasyon, nokta mutasyonlar amplifikasyon
c-kit	Tirozin kinaz, sinyal iletimi	Mutasyon
Ha-ras	Sinyal iletimini yapan molekül GTP ve GDP'ye bağlanır	Nokta mutasyonları
Siklinler	CDK'lara bağlanır, hücre döngüsünü düzenler	Gen çoğalımı ve aşırı ifade
CDK2, 4	Siklin bağımlı kinazlar, hücre döngüsü fazlarını düzenler	Aşırı ifade, mutasyon
MDM2	p53'e bağlanır ve inaktive eder	Gen çoğalımı ve aşırı ifade

Tümör Baskılayıcılar	Normal Fonksiyonu	Kanserdeki Değişiklik
p53	Hücre döngüsü kontrol noktaları, apoptozis	Mutasyon, viral onkogenlerin ürünleri ile inaktivasyon
Rb1	Hücre döngüsü kontrol Noktaları, E2F'ye bağlanır	Mutasyon, delesyon, viral onkogenlerin ürünleri ile inaktivasyon
Bcl2	Apoptozis düzenlenmesi	Aşırı ifade apoptozisi durdurur
APC	Hücre-hücre etkileşimi	Mutasyon
BRCA2	DNA tamiri	Nokta mutasyonları

Tümör baskılayıcı genler, ürünleri hücre döngüsü kontrol noktalarını düzenleyen ve apoptozis sürecini başlatan genlerdir. Tümör baskılayıcı genler mutasyona uğradıklarında ya da inaktive olduklarında; hücreler, hücre döngüsü kontrol noktalarına yanıt verme ya da DNA hasarı arttığında ölüm programına geçme yeteneklerini kaybederler. Bu da sonuçta, mutasyonlardaki bir artışa, hücrenin hücre döngüsünü terk edebilme ve sessiz döneme girme yetisinin yitirilmesine yol açar.

2.1.3. Kanser hücrelerinin temel özellikleri

Kanserle ilişkili genlerin hücre fizyolojisini 'malign fenotip'e ilerletmesinde ortaya konan temel değişiklikler şu şekilde özetlenebilir:

- 1) **Büyüme Faktörü Üretiminde Kendi Kendine Yeterlilik**: Sağlıklı hücreler çoğalmak için büyüme faktörü, ekstrasellüler matriks bileşenleri ve hücre-hücre adezyon molekülleri gibi büyüme sinyallerine ihtiyaç duyarlar. Tümör hücreleri ise aktif proliferasyon durumuna geçebilmek ve sürekli çoğalmak için gelişme sinyallerini kendileri üretirler ve bağımsız birer hücreye dönüşürler. Normal biyolojik işleyişte büyüme faktörleri dokulardaki farklı kökenli hücreler tarafından üretilir ve salgılanır (*heterotipik sinyalizasyon*). Göç yolu ile gelen inflamasyon hücreleri ve stromada yer alan fibroblastlar bu mekanizmada aktif rol alırlar. Kanser hücrelerinin kendi büyüme faktörlerini normal gereksiniminin ötesinde üretip sonra da bu uyarılara kulak vererek büyüme ve proliferasyonlarına örnek olarak bazı glioblastoma ve sarkomaların aşırı

miktarda PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) ve TGF α (Transforming Growth Factor α) üretmeleri verilebilir [52,53].

- 2) **Hücre Yüzeyi Büyüme Faktörü Reseptörlerinde Değişiklikler:** Hücre membranında yer alan ve çoğu sitoplazmik kısımdaki tirozin kinaz aktivitesine sahip (RTK) büyüme faktörü reseptörleri birçok kanserde değişikliklere uğramaktadır. Bu reseptör değişiklikleri sayesinde kanser hücreleri çevrelerindeki düşük büyüme faktörü konsantrasyonlarını bile algılayarak nükleusa proliferasyon ve büyüme sinyali olarak iletebilmekte ya da 'ligand etkisinden bağımsız' uyarılar oluşturabilmektedir [52].
- 3) **Hücre İçi Sinyal İleti Zincirleri Proteinlerinde Değişiklikler:** Hücre membranından algılanan sinyallerin sitoplazma boyunca hücre nükleusuna iletilmesini sağlayan zincirde yer alan proteinlerin mutasyonları kanser hücrelerinin erken saptanan nitelikleri olarak sayılabilir. Hücre çoğalmasını yöneten 'proto-onkogen' genlerinin bu fonksiyonlarının abartılı boyut kazanmalarına neden olan (*gain-of-function*) mutasyonları hemen her malign transformasyona uğramış hücrede gözlenir. Hücre yüzeyinden mitojenik sinyalleri ras-raf-MAPK yoluna aktarmada kilit bir rol oynayan ras proteini epitelyal kanserlerin %25'inde mutasyona uğrar ve proliferasyon hızının önemli ölçüde artmasına neden olur (Bu artmış bölünme hızı vitesi 'beşinci viteste takılı kalmış bir otomobile' benzetilebilir). [52-54].
- 4) **Büyüme İnhibitörü (anti-büyüme) Uyarılarına Duyarsızlık:** Bir anlamda tümör baskılayıcı gen 'loss-of-function' mutasyonları olarak da bilinmektedir. Büyüme ve çoğalmayı teşvik eden sinyallerin yanısıra hücreler, bu fonksiyonları durdurucu sinyaller de alırlar. Bu sinyaller, hücre proliferasyonunu iki farklı mekanizma ile engeller. A) Hücreleri G0 istirahat fazına sokarak; B) Hücrelerin proliferatif niteliklerinin tümüyle kaybına neden olacak, sadece özel işlevleri gerçekleştirilecek farklılaşmaya yönlendirerek (*terminal diferansiyasyon*). Bu inhibitör uyarılarının sonlanım noktası Retinoblastoma Proteinidir (pRb). pRb, fizyolojik koşullarda G1 fazından S fazına geçişin, yani geri dönülemez hücre bölünmesi aşamasının en önde gelen kontrolüdür. pRb inhibitör yolunun en iyi bilinen uyarıcısı TGF β (Transforming Growth Factor-Beta) dir. TGF β çeşitli şekillerde pRb fosforilasyonunu engelleyerek antiproliferatif etki gösterir. Kanser hücrelerinin TGF β blokajından kurtulmalarını sağlayan mekanizmalara şu örnekler verilebilir; TGF β uyarılarının sitoplazmik taşıyıcısı olan Smad

proteinlerinin mutasyonel kaybı (ör. Smad 4 mutasyonları) veya p15 inhibisyonundan etkilenmeyen mutant CDK proteinleri (ör. CDK4 mutasyonları) [51-54].

- 5) **Apoptozise Direnc:** Programlanmış hücre ölümüne karşı gelişen edinsel direnç hemen hemen tüm kanser hücrelerinin ortak özelliğidir. Eğer DNA replikasyonu, DNA onarımı ya da kromozom düzenlenmesinde hata ya da sapma olursa; hücreler, döngüdeki ilerlemelerini koşullar düzelinceye dek durdururlar. Buna rağmen, eğer DNA hasarı ya da kromozomal hasar onarımı imkansız derecede ciddi ise, hücre apoptozise yönlendirilir. DNA hasarı, hipoksi ve yetersiz sağ kalım faktörü gibi intraselüler olumsuzluklar p53 tümör baskılayıcı proteini tarafından saptanır. Bcl-2 protein ailesi adı verilen bir dizi proteinlerin ekspresyonu p53 proteini tarafından düzenlenir. p53 proteini hücre hasara yanıt olarak Bax proteininin ekspresyonunu artırarak apoptozisi indüklerken, artmış Bcl-2 proteini düzeyleri apoptozise karşı önemli bir direnci destekler. Bunun yanısıra p53 proteininin etkisini ortadan kaldıran p53 mutasyonları hemen tüm kanserlerin yarısından fazlasında gözlenir.
- 6) **Sınırsız Replikasyon Potansiyeli:** Normal hücreler, belirli sayıda bir mitotik bölünmenin ötesinde bölünemezler. Bunun nedeni de kromozomların sonunda 'telomer' olarak adlandırılan 6 baz çiftinden oluşan ve ardısıra birkaç bin kez tekrarlayan birimlerin varlığıdır. Her mitotik bölünme sonucu 50-100 baz çiftinden oluşan bir DNA bölümü kayba uğrar ve kromozomlar her bölünme ile kısalır. Bu kısalmanın nedeni, DNA polimeraz enziminin kromozomlarının 3' ucunu tamamıyla sentez edememesidir. Birçok kanser hücresi, bu kısıtlamayı; bu birimlerin sentezini gerçekleştirebilen 'telomeraz' enzimini sürekli eksprese ederek aşar ve sınırsız bölünebilme yeteneğine kavuşur. Telomeraz ekspresyonu, klinikte gözlenen kanser çeşitlerinin %90'ından fazlasında gözlenmektedir [52,53].
- 7) **Tümör Anjiogenezisi:** Bir tümör kitlesi belli bir çapın ötesinde büyüebilmekte ve besin-oksijen gereksinimlerini karşılayabilmek için mutlaka damarsal alt yapıya gerek duyar. Damar endotel proliferasyonu doku hasarı ve yaralanmış dokuların rejenerasyonu esnasında aktive olur. Öte yandan, oksijen eksikliği içerisine giren tümör dokusunda, hipoksiyi algılayan HIF (hypoxia-inducible factor) proteininin etkisiyle oluşan bir dizi reaksiyon, güçlü anjiyogenik faktörlerin salımına yol açar. VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) bu

aracılardan en önemlilerindendir. Damar endotel yüzeylerinde bulunan reseptörlerine bağlanarak tirozin kinaz aktivitesi ile endotelial proliferasyonu ve damar geçirgenliğini aktive eder. VEGF düzeyleri ile tümörlerin saldırganlığı ve metastatik potansiyeli arasında direkt bir bağlantı olduğu hem laboratuvar hem de klinik olarak gösterilmiştir [52-54].

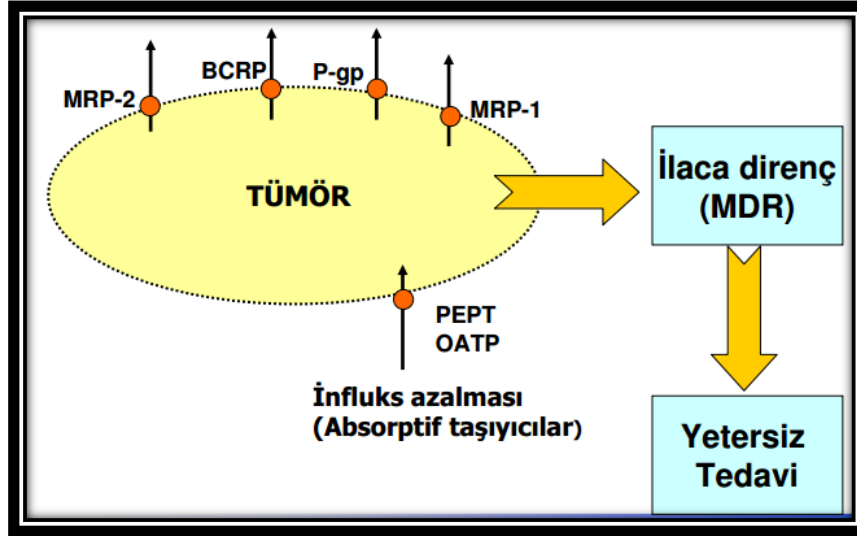
8) **Doku İnvazyonu ve Metastaz:** Belli bir büyüklüğe erişen tümör kitleleri çevrelerindeki stromayı aşarak uzak dokulara yayılmayı gerçekleştirecek öncü hücreleri oluştururlar (invazyon ve metastaz). İnvazyon ve metastaz gelişiminde kanser hücrelerini komşu aldıkları stroma ve bağ dokusuna bağlayan hücre-hücre ve hücre-stroma bağlantıları büyük önem taşır. Bu ilişkiler, dokuların statik yapılarını oluşturmanın çok ötesinde bireysel hücre fonksiyonlarını denetleyen sinyal kaynaklarıdır. Epitelial tümörlerin invazyonu ve metastazında temel rol oynayan mekanizmalardan biri e-kaderin kaybıdır. Yapılan çalışmalarda mobilite kazanan tümör hücrelerinde, hücresel adezyonu sağlayan kaderin ailesinin bir üyesi olan e-kaderin ekspresyonunun azaldığı bildirilmiştir [55-57]. İnvazyonun gerçekleştirilmesinde ise ekstraselüler proteaz ekspresyonları da rol oynar. Bu enzimler aracılığıyla ekstraselüler matriks ve bağ dokusu eritilerek kanser hücrelerinin stromada ilerlemesi gerçekleşir [52-55].

2.1.4. Kanserde Direnç Mekanizmaları

Kanserde direnç mekanizmaları adı altında pek çok kuramsal temel önemi sürülmüştür. Sitotoksik ajanlara karşı tümör hücrelerinin geliştirdiği ilaç direnç mekanizmaları şu şekilde sıralanabilir; P-glikoprotein (P-gp) ya da multi-drug resistance protein (MDR-1) [58]. MDR-related protein (MRP), Breast-cancer resistance protein (BCRP) ve lung resistance-related proteinleri (LRP) [59] gibi ilaç taşıma proteinlerinin aracılık ettiği mekanizma bunlardan ilkidir. Bir diğeri tümör hücrelerinde sitotoksik etkenler ve radyasyon tarafından indüklenen apoptoza dirençle ilgilidir.

İlk defa 1976'da 170 kDa'luk hücre membran proteini olarak tanımlanan P-glikoprotein (P-gp) hücre içi ilaç birikimini azalttığı saptanmış ve bu artıştan yedinci kromozom üzerinde bulunan MDR-1 geninin fazla ifadesi (ekspresyonu) sorumlu tutulmuştur. Birçok kanser hücresi bu proteini taşımakla birlikte, daha

sonra yapılan çalışmalarda sadece P-gp'nin sorumlu olmadığı, çoklu ilaç direncine sebep olan ve ksenobiyotiklerin taşınmasında görevli ATP bağımlı taşıyıcı proteinlerin (ABC proteinleri) sorumlu olduğu saptanmıştır [60].



Şekil 2.5. ABC taşıyıcı proteinlerinin aşırı ekspresyonu ve ilaca direnç mekanizmasının gelişimi [63]

2.1.4.1. Taşıyıcı Protein Aileleri

2.1.4.1.2. ABC Taşıyıcı Ailesi

Taşıyıcı proteinler, çok sayıda taşıyıcıyı içerisinde barındıran çok geniş bir ailedir. İnsanda; *ATP bağımlı taşıyıcılar*, *iyon kanalları*, *sekonder taşıyıcılar* ve *sınıflanmamış taşıyıcılar* olmak üzere dört ana grup taşıyıcı protein bulunmaktadır (Çizelge 2.2. ve 2.3.) Yaklaşık 49 gen tarafından kodlanan ABC taşıyıcı ailesi, sekans benzerliklerine göre ABCA (12 üye), ABCB (11 üye), ABCC (13 üye), ABCD (4 üye), ABCE (1 üye), ABCF (3 üye), ABCG (5 üye) olarak 7 alt aileye ayrılmıştır [64,65]. Bunların içerisinde 14 tanesinin ilaç taşınmasında görevli olduğu bilinmektedir. Bu proteinlerin membrana bağlandığı bölge “transmembran bölgesi”; sitoplazmik ATP'nin hidrolize olduğu bölgeler ise “ATP-bağlanma bölgeleri” diye adlandırılır [66,67].

ABC taşıyıcıları, hücre membranında lokalize olan ve substratlarını membranlardan pompalayan, ATP'ye bağımlı olarak çalışan primer aktif taşıyıcılar

olup çeşitli ilaçların, ksenobiyotiklerin ve endojen bileşiklerin, membranlardan taşınmasını sağlayan proteinlerden oluşmaktadır. ABC proteinleri, sağlıklı dokuların yanı sıra birçok tümör dokusunda eksprese olmaktadır. Bu taşıyıcılar, antineoplastik ilaçları tümör hücrelerinden dışarı atarak, ilacın tümör dokusunda toplanmasını engellemekte ve böylece uygulanan kemoterapinin başarısız olmasına yol açmaktadır [63]. ABC taşıyıcı proteinleri, antineoplastik ilaçlara karşı gelişen ilaç direncinde görev almaları nedeniyle ve ilaç farmakokinetiğini değişik aşamalarda etkilediği için dikkat çekici olmuştur. *Çoklu ilaç direnci* (MDR; multipl drug resistance) olarak tanımlanan bu süreç sebebiyle antineoplastik ilaçlar tümör hücrelerinin dışına itilmekte ve ilaçların hedef yerde toplanmaları azaldığı için düşük aktivite göstermektedirler.



Çizelge 2.2. İnsanda taşıyıcı proteinler [61]

	<u>ABC1</u>	<u>MDR</u>	<u>MRP</u>	<u>ALD</u>	<u>OABP</u>	<u>GCN20</u>	<u>White</u>
Alt ailya	ABCA	ABCB	ABCC	ABCD	ABCE	ABCF	ABCG
Üyeler	12	11	13	4	1	3	6

Çizelge 2.3. ABC Taşıyıcı Proteinleri ve Üye Sayıları [61]

Aşağıda bazı taşıyıcı protein ailesi üyelerinden söz edilmiştir:

2.1.4.1.2.1. P-glikoprotein (P-gp, ABCB1, MDR1, Çoklu İlaç Direnci Proteini 1)

Hücre membranında taşıyıcı protein olarak tanımlanan P-gp, yedinci kromozomdaki (7q21) MDR-1 geni tarafından kodlanmakta olup 170 kDa büyüklüğüne sahiptir. P-gp enerjiye bağımlı olarak çalışır ve hücre içine giren ilacın dışarı pompalanmasını sağlayarak, hücre içi ilaç konsantrasyonunu azaltmaya çalışır. P-gp artışı ile hidrofobik olan doksorubisin, daunorubisin, etoposid, taxol, vinkristin, vinblastin gibi birçok kemoterapötik ilaca karşı direnç gelişebilmektedir [62]. P-gp, ilaç ve diğer ksenobiyotikleri vücuttan uzaklaştırarak doğal bir savunma mekanizması işlevi görmektedir. P-gp'nin anatomik lokalizasyonu ve efluks fonksiyonu göz önüne alındığında ilaçların emilimi, dağılımı ve eliminasyonunda önemli rol oynadığı görülmektedir.

Kanser hastalarına uygulanan kemoterapinin başarısız olmasının temel nedenlerinden biri P-gp aracılığı ile gelişen çoklu ilaç direncidir. Kanser etkili kimyasal tedavisinde bir engel olarak ortaya çıkan P-gp aracılı çoklu ilaç direncini yenmek ve antikanser ilaçların tümör hücrelerinde birikmelerini sağlamak amacıyla P-gp işlevini bloke eden moleküller elde etmeye yönelik birçok çalışma yapılmıştır [68]. P-gp'yi inhibe eden moleküller, P-gp modülatörleri olarak da adlandırılmaktadır. P-gp ekspresyonunun ve/veya aktivitesinin modülasyonunun, kanser tedavilerinde P-gp substratı olan antikanser ilaçların farmakolojik profillerini geliştirmek adına yararlı bir strateji olabileceği ileri sürülmüştür [69,70].

2.1.4.1.2.2. MRP-1 (ABCC1, Çoklu İlaç Direnci İle İlişkili Protein 1)

MRP-1 (Multidrug Resistance Associated Protein 1), ABC taşıyıcı ailesinin ABCC alt ailesine dahil bir üyesidir. Bu protein, 16. kromozom tarafından kodlanmakta ve 190 kDa büyüklüğüne sahiptir. MRP-1'in aşırı ekspresyonu sonucu vinka alkaloidleri, doksorubisin, daunorubisin ve epirubisine karşı belirgin direnç oluşturulmaktadır [71]. MRP'ler genel olarak organik anyonik ilaçları taşımaktadır.

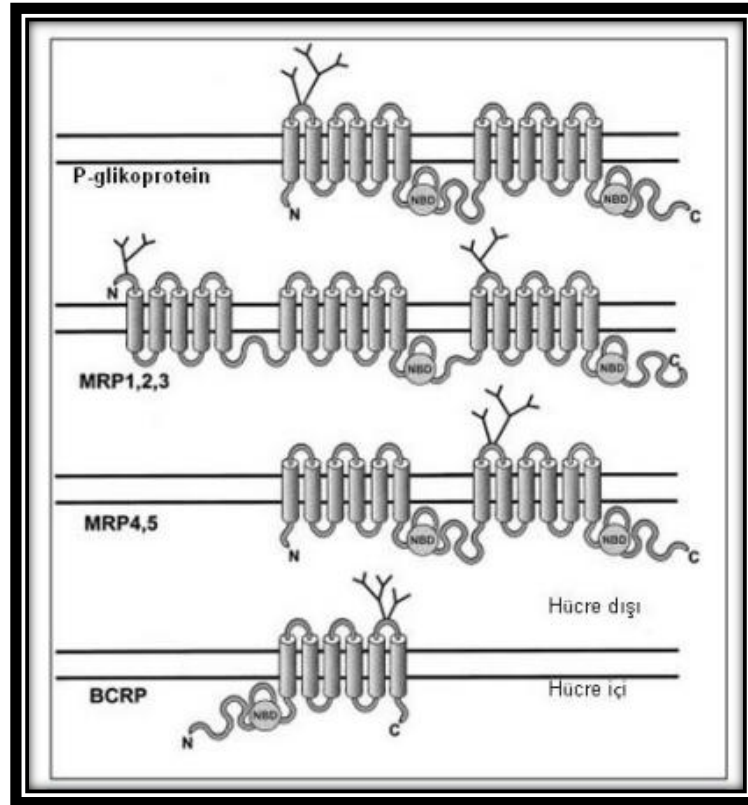
2.1.4.1.2.3. BCRP (Meme Kanseri Direnç Proteini)

4. kromozom tarafından kodlanmakta olan BCRP; P-gp ve MRP'ler gibi ATP bağımlı taşıyıcı protein ailesinden olup, bu proteinin aşırı ekspresyonu hücre içi

ilaç konsantrasyonunu azaltır ve dolaylı olarak ilaç direncine sebep olur. ABC protein ailesinden olduğu için ABCG2 olarak da isimlendirilmiştir [Çizelge 2.3].

2.1.4.1.2.4. LRP (Akciğer Direnç Proteini)

İlk defa Scheper ve arkadaşları tarafından 1993 yılında çoklu ilaç direnci saptanan akciğer kanseri hücre dizisinde varlığı ispatlanan LRP, taşıyıcı proteinlerin bir üyesidir. Fakat ATP bağımlı taşıyıcı protein ailesinden değildir. 110 kDa ağırlığındadır ve 16. kromozom tarafından kodlanmaktadır [71]. LRP, çoklu ilaç direncinden sorumlu bir molekül olup, birçok farklı ilaca karşı dirence neden olmaktadır. LRP ekspresyonu diğer moleküllere kıyasla direncin daha fazla olduğunu ve MDR ile ilişkili olmayan ilaçlara karşı da direnç geliştiğini göstermektedir [6].

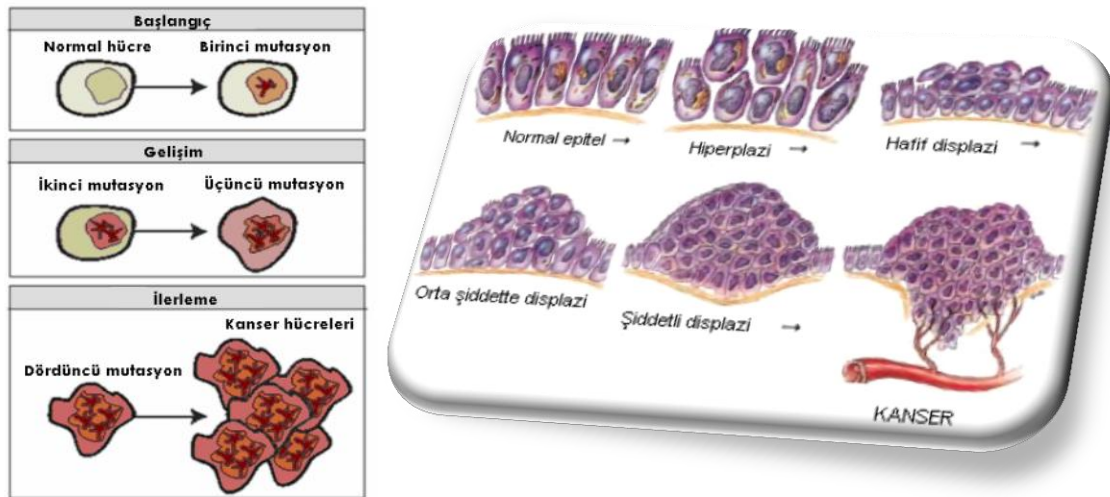


Şekil 2.6. ABC ailesindeki bazı taşıyıcı proteinlerin moleküler yapısı [63]

2.1.5. Akciğer Kanseri

Tüm kanser türleri arasında en ölümcül kanser türü olan akciğer kanseri tüm dünyada kanser türleri arasında, erkeklerde en sık ölüme neden olan birinci, kadınlarda ise ikinci kanser türüdür [104].

Akciğer kanseri, akciğer dokularındaki hücrelerin kontrolsüz çoğaldığı bir hastalık olup; bu kontrolsüz çoğalma, hücrelerin çevredeki dokuları istila etmeleri veya akciğer dışındaki organlara yayılmaları ile sonuçlanabilir. Akciğeri döşeyen hücrelerden biri kanserleştiğinde, vücut bu hücrenin çoğalmasını önleyemez. Normal hücrelerin kanserleşmesi bir dizi mutasyon (genetik şifrenin bozulması) sonucu olur. Hücrenin mutasyonlar sonrası kanserleşmesi için belli bir süreçten geçmesi gerekir (Şekil 2.7.). Önce iç yüzeyi döşeyen hücreler (epitelyum hücreleri) normal olmayan bir şekilde çoğalmaya başlarlar (*hiperplazi*) daha sonra bu hücreler normalin dışında büyüme özellikleri (*displazi*) gösterirler ve sonuçta kanserleşirler. Bu kanserleşme olduktan sonra bile, hücrelerin normal özelliklerinde değişme, şifrelerinde bozulma (mutasyon) devam eder. Bu mutasyonlardan iki tanesi önemlidir.



Şekil 2.7. Kanserleşme sürecini gösteren şematik görüntüler [107]

- **Birinci Mutasyon:**

Bu mutasyonla kanser hücresi, köken aldığı yerin dışına çıkıp, vücudun diğer kısımlarına yayılma (metastaz) özelliği kazanır. Akciğerden köken alan kanser hücreleri, bu mutasyondan sonra genellikle kemik, beyin, karaciğer, böbreküstü bezi ve lenf bezlerine yayılırlar. Kanser akciğerden farklı organa yayıldığında hastalar yanlışlıkla oranın kanseri olduğunu düşünürler, ama bu tamamen farklı bir durumdur. Örneğin; beyin kanseri ile beyne metastaz yapmış akciğer kanseri farklı hastalıklardır ve tedavileri de farklı şekilde olur, bunların karıştırılmaması gerekir [105].

- **İkinci Mutasyon:**

Bu mutasyonla kanser hücresi tedaviye dirençli hale gelir. Bunun nedeni, ilaçların zarar verdiği kanser hücrelerinin, normal hücrelere oranla çok daha hızlı tamir olabilmeye özelliğine sahip olmalarıdır. Verilen ilaçlar, hem kanser hücrelerini hem de normal hücreleri etkilediğinden, kanser hücrelerinin bu özelliğini bozacak dozda ilaç verilmesi, normal hücreleri daha fazla etkileyeceğinden mümkün değildir. Bu duruma “ilaca direnç gelişmesi” adı verilir [106].

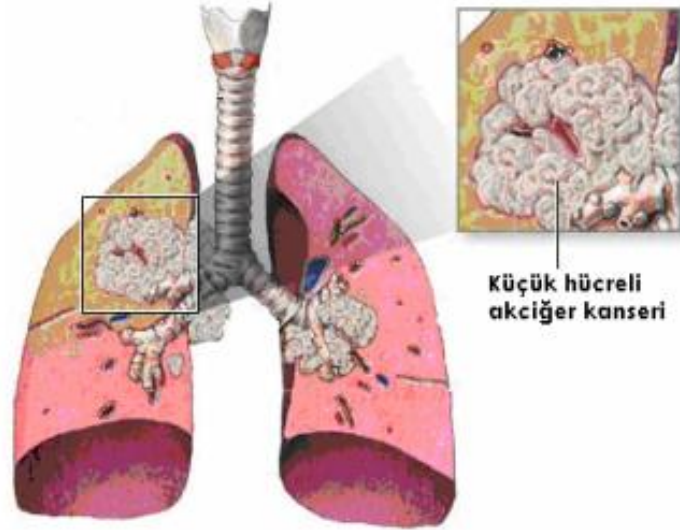
Hücrelerin mikroskop altındaki görüntülerine dayanarak başlıca iki tip akciğer kanseri mevcuttur:

2.1.5.1. Küçük Hücreli Akciğer Kanseri (KHAK)

En saldırgan seyirli akciğer kanseri tipi olan küçük hücreli akciğer kanserinin görülme sıklığı %16.8'dir. Bu grup tümör hücreleri, akciğerlerdeki hormonal hücrelerden köken alırlar ve çok hızla büyüyen tümörlerdir.

Akciğer kanseri türleri içerisinde tedavisi en zor olan küçük hücreli akciğer kanseri, kişinin bronşlarındaki çok küçük hücrelere müdahale etmek zor olduğundan oldukça tehlikeli bir yapıda gelişir. Ayrıca akciğer kanserinin en büyük tehlikesi, diğer organlara çok hızlı bir şekilde yayılabilesidir. Uzak-yakın fark etmeden hemen hemen her organa sıçrayabilen akciğer kanseri, genellikle beyne geçmektedir. Hekimler için tedavisi çok zor olan ve fazla bilgi sahibi olmadıkları beyin üzerinde gelişen kanser, kişinin tedavisinin daha da zor bir hal almasına

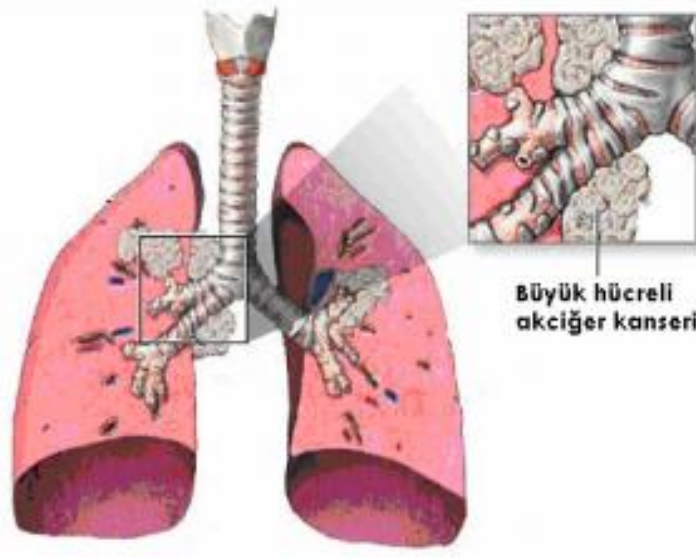
neden olur. Bu tümör grubu sıklıkla kemoterapi ve/veya radyoterapi ile tedavi edilir [105,107,108].



Şekil 2.8. Küçük Hücreli Akciğer Kanseri [107]

2.1.5.2. Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri (KHOAK)

Tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %80'ini küçük hücreli olmayanlar oluşturur. Küçük hücreli olmayan akciğer kanserinin 3 ana türü bulunmaktadır (Skvamöz Hücreli Karsinom, Adenokarsinom, Büyük Hücreli Karsinom). Bu alttür hücreleri, mikroskop altında bakıldığında boyut, biçim ve kimyasal yapı açısından farklılık gösterir. Ancak, tedavi yaklaşımı ve prognoz (seyri) çok benzer olduğundan birlikte gruplandırılmışlardır.



Şekil 2.9. Büyük Hücreli Akciğer Kanseri [107]

2.1.6. Kanser Tedavisinde Kullanılan Geleneksel Yöntemler

2.1.6.1. Cerrahi Girişim

Kanser tedavisinde uygulanan geleneksel yöntemlerden en eski ve en başarılı yaklaşımlardan biri olan cerrahi tedavide temel amaç, kanserli bölgenin güvenli bir şekilde kesilip çıkartılması ve çevresinin temizlenmesidir. Tümörlü dokunun, hayati öneme sahip organlara sıçramadan ve önemli fonksiyonel problemlere neden olmadan uzaklaştırılması önemlidir.

Kanser tedavisinde cerrahi girişim tek başına uygulanabileceği gibi kemoterapi ve radyoterapi ile birleştirilerek de uygulanabilir. Öncelikle tümöral kitlenin iyi veya kötü huylu olup olmadığı öğrenilir, ardından kitlenin kesilip çıkartılması ve tamamının alınamaması durumunda kemoterapi ve radyoterapiye başvurulur [72].

2.1.6.2. İmmünoterapi

Vücuttaki immün sistem (bağışıklık sistemi), yabancı madde olarak adlandırılan maddelere karşı (patojenler, tümörlü hücre, ksenobiyotikler gibi) savaşan, bu maddeleri tanıyarak vücuttan elimine etme rolü üstlenen bir savunma sistemidir. Bu sistem antijen-antikor ilişkisine dayalı olarak işlev görür. Normal koşullarda bir insanın vücudunda yaşamı boyunca oluşan kanser hücreleri immün sistemin

hücreleri tarafından algılanıp ortadan kaldırılarak kanser oluşumu engellenir; fakat immün sistemdeki geçici bir duraksama ya da zayıflık kanser hücrelerinin bağışıklık sisteminden kaçarak çoğalmalarına ve tümör oluşumuna neden oluyor. Yapılan bir araştırmada, immün sistemi zayıflatılmış farelerin tümör oluşumuna daha duyarlı olduğu gösterilmiştir [73].

Günümüzde immünoterapinin temel stratejileri, hastalara sitokin (interferon, interlökin-2) ve antikoları içeren immün sistem proteinlerinin birlikte verilerek hastanın kendi anti-tümör yanıtını uyarmayı amaçlar. Kemoterapi ve radyasyon tedavisinin aksine immün yanıtın son derece özgül olması nedeniyle hastaya zarar vermeden seçici olarak tümörün yok edilmesi amaçlanmaktadır [74].

İmmünoterapi de diğer geleneksel tedavi yöntemleri gibi eksik basamaklara sahiptir. Bu durum, kanser tedavisi için yeni yöntemlere yönelmeye teşvik etmiştir.

2.1.6.3. Kemoterapi

Herhangi bir hastalığın tedavisi için kimyasal ajanlar (ilaçlar) kullanılarak gerçekleştirilen tedavi şeklidir. Kanser kemoterapisinde amaç, kanser hücrelerinin büyüme ve çoğalmalarını önlemek ve yok edilmelerini sağlamaktır.

Cerrahi veya radyasyon yöntemi, belirli bir bölgede büyümekte olan kanseri tedavi etmekte iken (lokal tedavi); kemoterapide genellikle lenf sistemi veya kan yoluyla vücudun pek çok bölgesini dolaşan kanserin tedavisinde kullanılmaktadır (sistemik tedavi). Geçmişte kemoterapi, cerrahi veya ışın tedavisinin uzun süreli etkin olmadığı durumlarda kullanılırdı. Fakat günümüzde kemoterapi, çeşitli kanserlerin özellikle de lokalize kanserin tedavisinde cerrahi ve radyasyon tedavisiyle birleştirilerek kullanılmaktadır. Kanser tedavisinde de, diğer bazı hastalıkların tedavisinde olduğu gibi iki veya daha fazla ilaç kombinasyonları kullanılmaktadır. Bunlar, toksik etkileri farklı olan sitotoksik ilaçlar ve etkilerini farklı bölgelerde, farklı mekanizmalarla gösteren ilaçlar olup, kanserli hastalarda daha güçlü etki göstermeleri amacıyla uygulanırlar [75].

Kanserli hücreler bir ya da daha fazla kanser ilacına karşı istenilen yanıt vermeyebilir veya başlangıçta yanıt verdiği halde sonradan ilaca karşı direnç kazanabilirler. Hücrede meydana gelen direnç, daha çok kanser hücrelerindeki mutasyonlar sonucu oluşmaktadır. Kanserli hücrelerin membran transportundaki aktivitenin azalması veya ilacın hücrede etki etmesini sağlayan proteinlerde meydana gelen mutasyonlar ilaç direncinin oluşmasını sağlar [76]. Tedavi

etkinliğini kısıtlayan bu türden olumsuz sonuçlar, kanser tedavisi için yeni yaklaşımlara yönelmeyi zorunlu kılmıştır.

2.1.6.4. Radyoterapi

Diğer adıyla ışın tedavi olarak bilinen bu yöntemde, kanser hücrelerini tahrip etmek veya yok etmek amacıyla x-ışınları, gama ışınları, elektron veya protonlar gibi yüksek enerjili parçacıklar veya dalga akımları kullanılır. Hedef, oluşturulacak iyonizasyonlarla hücrenin genetik materyalini (DNA) bozarak bölünmelerini engellemek ve apoptozis yolu ile hücre ölümüne yol açmaktır. Radyoterapi, hastaya dıştan (eksternal) ve içten (internal) olmak üzere iki şekilde uygulanır. Eksternal terapide radyasyon ışını dışarıdan hedeflenen tümör dokusuna gönderilir. İnternal radyoterapide (brakiterapi = iç ışın terapisi) radyoaktif madde kapsül ya da tel şeklindeki bir implanta yerleştirilerek ya da direk radyoaktif madde (iyot, fosfor) hastaya ağızdan veya kan damarından enjeksiyon yoluyla verilir.

Radyoterapide radyasyon ışını belirli doz ve aralıklarla verilmektedir. Çok yüksek dozdaki radyasyon kanserli hücreleri öldürürken sağlıklı hücrelere geriye dönülmez şekilde zarar verebilir. Bundan dolayı uygulanan radyasyonun dozu sağlıklı hücrelerin radyasyona gösterdikleri toleransa, tümörün yeri ve büyüklüğüne, hastanın fizyolojik özelliklerine göre belirlenir. Ayrıca sağlıklı dokulara kendilerini tamir etmeleri için gerekli süreyi sağlamak adına tedavi belirli aralıklarla uygulanır [77].

2.2. Nanoteknolojinin Doğuşu

“Nano” sözcük olarak, bir fiziksel büyüklüğün bir milyarda biri anlamına gelir. 1 nanometre içine, yan yana ancak 2-3 atomun dizilebildiği düşünülürse, yaklaşık 100-1000 atom bir araya gelerek nanoölçeklerde bir nesneyi oluşturduğu söylenebilir. Bildiğimiz birçok molekül de bu nanoyapı tanımına girmektedir [78]. Nanoteknoloji, atomik ve moleküler boyutlardaki yapıların ticari bir amaca hizmet edebilecek şekilde düzenlenmesidir. Bu amaçla nanoteknoloji; nanometre ölçeğindeki malzemelerin tasarımı, üretimi, montajı, karakterizasyonu ve bu malzemelerden elde edilmiş minyatür fonksiyonel sistemlerin uygulamalarını inceleyen ve hızla gelişen disiplinler arası araştırma-geliştirme faaliyetlerinin tümünü temsil etmektedir diyebiliriz.



Şekil 2.10. Nanoteknoloji ile etkileşimde olan diğer disiplinler [142]

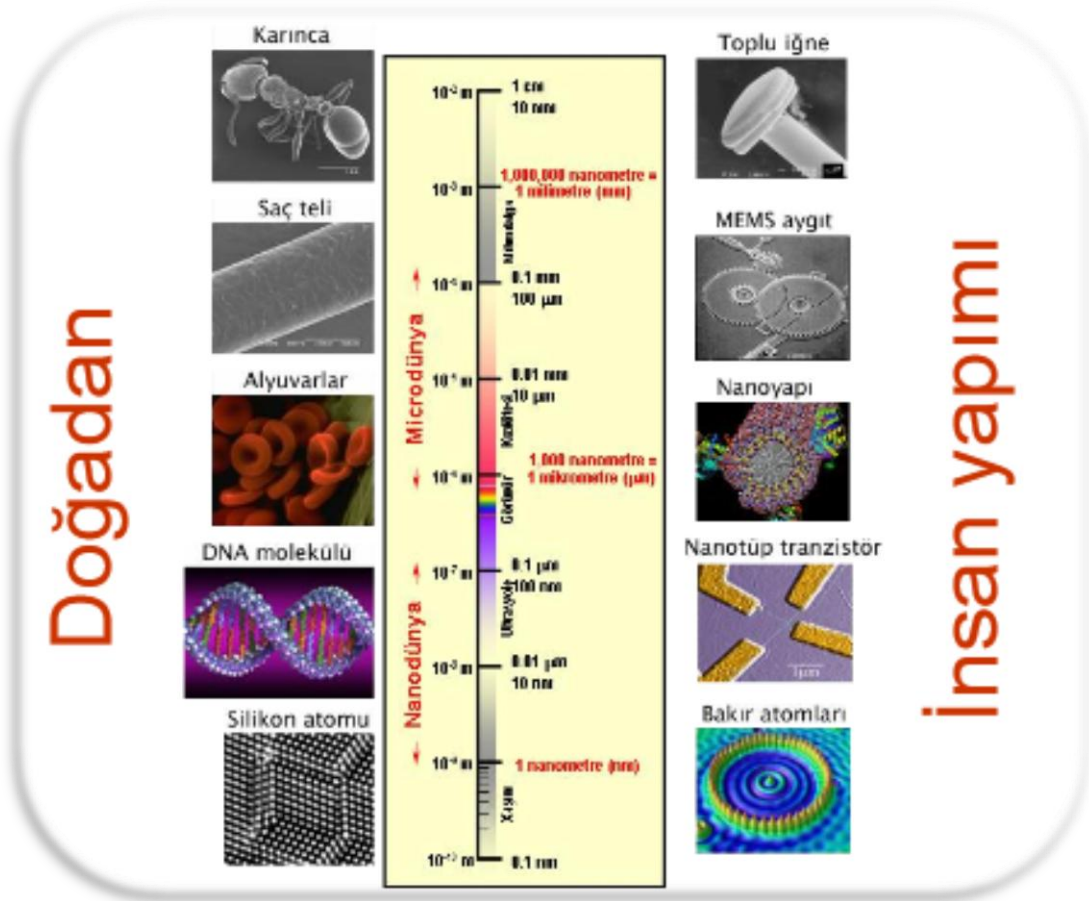
Nanotıpta Kilometre Taşları;

- 1905 , Einstein şeker molekülünün yaklaşık 1 nm boyutunda olduğunu hesapladı.
- 1931, Max Knoll ve Ernst Ruska nanometre boyutunda görüntüleme yaratan elektron mikroskopi tekniğini geliştirdiler.
- **1959**, Feynman'ın ünlü "Aşağıda daha çok yer var" başlıklı konuşması
- 1974, Aviram ve Rattner tarafından ilk moleküler elektronik çalışmalarının başlaması
- **1974**, Norio Tanaguchi tarafından "Nanoteknoloji" teriminin ortaya atılması
- 1979, immüno kimya ve elektron mikroskop çalışmalarında elektronca yoğun problemler olarak koloidal altın nanopartiküllerin kullanımı
- 1981, Enzim ve ribozom analogları olarak moleküler makinelerin tasarlanması fikri (Drexler)
- 1984, ilk defa poli amidoamin molekülü ile dendrimer tipi yapıların sentezi (Tomalia vd.)
- 1985, Fullerenlerin (Buckyballs) keşfi (Smalley, Curl ve Kroto)

- 1986, Yaradılışın Makineleri (Engines of Creation) yayımlanması ve moleküler mekanik ile ilgili ilk çalışma (Drexler)
 - 1987, Monoklonal antikor kaplı nanopartiküller ile kanser hedeflemesi (Douglas vd.)
 - 1988, Supramoleküler kimya ile birbiriyle etkileşebilen yapay bileşiklerin sentezi (Lehn)
 - 1990, Taramalı Tünellemeli Mikroskop ile atomların IBM Zürich Laboratuvarlarında ilk defa görüntülenmesi (Eigler ve Schweizer)
 - 1991, Karbon nanotüplerin keşfi (Iijima)
 - **1994**, Nanopartikül temelli ilaç taşıma sistemleri (Kreuter)
 - 1995, Doxil (Doxorubisinin liposomal formülasyonu) FDA tarafından onayı
 - **1997**, ilk moleküler nanoteknoloji şirketinin kuruluşu, Zyvex.
 - 1998, Biyolojik etiket olarak nanokristallerin kullanımı (Bruchez vd.)
 - 1998, DNA-jelatin nanokürelerin kullanımı (Truong-Le vd.)
 - **1998**, “Nanotıp”, teriminin kullanımı (Freitas)
 - 2000, NNI’ın kuruluşu
 - 2004, NIH, Nanoteknoloji Yol Haritası’nı yayınlaması
 - 2005, Meme kanseri için geliştirilen nanoilaç – Abraxane – ın FDA tarafından onaylanması
-

Ulusal Nanoteknoloji Birliği (NNI)’nden yapılan tanımlamaya göre ‘nanoteknoloji’ adı altında yapılan çalışmalarda şu özellikler aranmaktadır:

- Yaklaşık 1-100 nm boyut skalasında madde ile kontrol edilebilir bir biçimde araştırma geliştirme faaliyetlerinde bulunmak,
- Nanoboyutlu yapısı sayesinde yeni özellikler kazanmış yapılar, cihazlar, sistemler meydana getirmek ve kullanmak ya da var olanların işleyişlerini anlamak,
- Maddenin bu boyuttaki özelliklerinden istifade etmek amacıyla üzerinde görüntüleme, ölçme, modelleme ve işleme yapılması,
- Bütün bu özellik ve fonksiyonların kontrol edilebilir sistemler olarak nano boyuttan makroskopik skalaya taşınması gerekmektedir.



Şekil 2.11. Çeşitli yapıların nano boyuttaki yerlerinin şematik gösterimi [142]

2.2.1. Kanser Nanoteknolojisi

Kanser nanoteknolojisi; biyoloji, kimya, mühendislik ve tıp gibi disiplinlerin kanser teşhis ve tedavisi için nanoölçekteki uygulamalar ile ortak kesişme noktasını oluşturan disiplinlerarası bir alandır. Nanoteknolojinin kanser uygulamaları **Nanoonkoloji** olarak adlandırılmaktadır. Nanoonkolojide, kanserin teşhis ve tedavisi amacıyla, nanokabuk, lipozomlar, dendrimer, fuleren, karbon nanotüp, kuantum noktalar (Q-Dots), nanogözenekler, nanoteller, polimerik nanoparçacıklar, nükleik asit bazlı nanoparçacıklar, nanogözenekler, manyetik nanoparçacıklar gibi çok çeşitli malzemeler kullanılmaktadır.

Nanomateriyaller, çeşitli moleküller ile etkileşim şeklinde ortaya çıkan fizikokimyasal özelliklere ve hacimsel oranda geniş yüzey oranına sahip olup diğer eşdeğer materyallerden farklıdır. **Ulusal Kanser Enstitüsü**, kanser ölüm oranını azaltmak için nanoteknolojinin gelişimi açısından altı farklı alanı kapsayan imkanlar tanımlamıştır. Bunlar: (1) hastalığın gelişiminden sorumlu moleküller

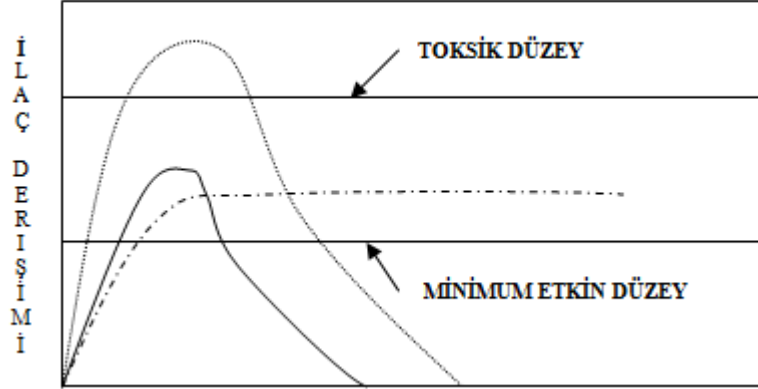
değişimin bulunması, (2) hastalığın teşhisi ve tanımlanması, (3) ilaç salımı ve terapi, (4) terapötik ve teşhis uygulamalarını birleştiren çok fonksiyonlu sistemler, (5) terapötik ajanların *in vivo* etkinliğini kaydeden cihazlar, (6) temel araştırmaları ve bilimsel gelişmeleri hızlandıracak teknolojiyi sağlayacak nanoölçeklerdir [79].

Günümüzde kanser tedavisinde kullanılmaya başlanan onaylanmış iki ürün mevcuttur, bunlar; (1) **Doxil** (Doksorubisin içeren lipozomal bir formülasyon); (2) **Abraxane** (Paklitaksel içeren nanopartikül formülasyonu) isimli ilaçlardır.

2.3. Kontrollü İlaç Salım Sistemleri

Son yıllarda, farmasötik alanda yapılan gelişmelerin en önemlilerinden biri, kontrollü ilaç taşıyıcı sistemler üzerine yapılan çalışmalardır. Uzun zamandır ilaç alanındaki çalışmaların başlıca amacı, çeşitli hastalıkları tedavi edici yeni bir molekül geliştirmek olmuştur. Ancak bu araştırmaların uzun zaman alması ve her zaman beklenen sonucu vermemesi alternatif araçların doğmasına sebep olmuştur. Bu arayışlardaki amaç, hastalığın tedavisinin yanısıra hastanın yaşam kalitesini arttırmaktır [80]. İlaç dozunu azaltma, dozlama aralığını uzatma, yan ve zararlı etkilerden arındırma, kokuyu ve tadı maskeleyme, çevre koşullarından koruma ve hatta ilacı hedef bölgeye gönderme çalışmaları bu amaca yöneliktir ve bu beklentilere en iyi yanıt veren sistem, kontrollü salım sistemleridir [80]. Etkin maddeyi hemen salan, alışılmış dozaj şekillerine karşın (konvansiyonel yöntem), salım işlemini daha uzun bir süreçte yapan dozaj şekillerine *Kontrollü Salım Dozaj Şekilleri* adı verilmektedir. Bilindiği üzere her etken maddenin kendine özgü bir farmakokinetik davranışı vardır; kimi etken maddenin biyolojik yarı ömrü birkaç dakika iken (nitrogliserin), kimininki de bir haftadan fazla (220 saat, fluoksetin) olmaktadır [81]. Diğer taraftan her etken maddenin etkili olduğu bir plazma aralığı vardır ki, buna **terapötik pencere** adı verilir. Kan düzeyleri bu pencere içinde kaldığı sürece tutarlı ve yararlı bir tedavi söz konusudur [82]. Dozaj şeklinden salım olayı hızlı veya yavaş oluşuna göre, etken madde derişimleri bu pencere içinde olabilir, taşabilir veya yetersiz kalabilir. Hazırlanan preparatın gerçekleştirilmesi gereken hedef parametreler belirlendikten sonraki yapılan kontrollü salım sistemi ile; hasta daha az sıklıkla ilaç alacak, kaçırıldığı dozlar azalacak veya ortadan kalkacak; kan düzeyi, dozlamalar arasında etkisiz bölgeye

düşmeyecek ve sürekli pencere içinde kalacaktır. Diğer taraftan, kan düzeyi aşırı doruklara da çıkmayıp, istenmeyen yan etkiler de oluşmayacaktır [83].



Şekil 2.12. İlaç alımının ardından kandaki ilaç düzeyinin zamana bağlı değişimini gösteren grafik

2.3.1. Kontrollü Salım Sistemlerinde Kullanılan Polimerler

Kontrollü salım sisteminin en temel konularından biri de polimerlerdir. Polimerler, çok sayıda aynı veya farklı atomların kimyasal bağlarla bağlanarak oluşturduğu uzun zincirli (yüksek molekül ağırlıklı) bileşiklerdir [80].

Vücuda yerleştirilen etkin madde taşıyan polimer sistemlerde bulunması istenen özelliklerin başında biyolojik uyum gelir. Biyolojik uyum, polimerin vücutta kaldığı sürece bulunduğu yerde olumsuz etki yapmamasını ifade eder. Kontrollü salım sistemlerinde kullanılan polimerlerin seçiminde, kullanılış yolu, etken maddenin cinsi, dozu ve salım süresi dikkate alınır. Polimerleri genel bir sınıflandırmaya tabi tutarak başlıca iki gruba ayırabiliriz: a) Biyoparçalanmayan Polimerler ve b) Biyoparçalanmayan Polimerler (Çizelge 2.4.).

Çizelge 2.4. Biyoparçalanmayan ve biyoparçalanmayan polimerler [80]

Biyoparçalanmayan Polimerler	Biyoparçalanmayan Polimerler
<ul style="list-style-type: none">• Poli (laktik asit)• Poli (glikolik asit)• Poli (kaprolakton)• Poli (ortoester)• Poli (aminoasitler)• Polianhidrit• Poliamit• Poliüretan• Pektin• Dekstran• <u>Kitosan</u>	<ul style="list-style-type: none">• Hidrojeller<ul style="list-style-type: none">- PHEMA- PVA- PEG- PEGA• Hidrofob Polimerler<ul style="list-style-type: none">- Silikonlar- Poli (etilen vinil asetat)- Poli (dimetil siloksan)

2.3.1.1. Biyoparçalanmayan Polimerler

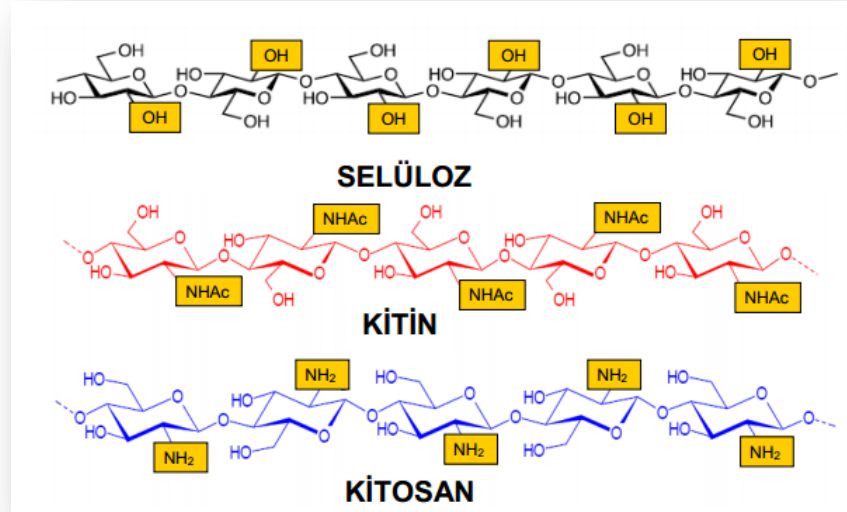
Biyoparçalanmayan polimerler suda çözünmezler; fakat biyolojik sıvılarla temas edince kimyasal ve fiziksel değişime uğrarlar. Biyolojik parçalanmada özellikle yığın parçalanmada iki aşama vardır. Birinci aşama, moleküler bağların rastgele kopmasıdır; bunun sonucunda değişen molekül ağırlığı polimerin mekanik özelliklerinde ve morfolojisinde değişimlere neden olur [84]. İkinci aşamada polimerin molekül ağırlığı iyice azalır ve yapıdan koparak çözünen en küçük birim oligomerler oluşur. Bu oligomerler en yakın dokuya difüze olacaklarından biyolojik olarak uyumlu olmaları istenir [Çizelge 2.4]. Polimerlerin parçalanması, hidrolitik veya enzimatik mekanizmalarla veya her ikisiyle birden olabileceği gibi parçalanma, bu mekanizmalardan biri ile başlayıp diğerine dönüşebilir. Bu parçalanma sonucu oluşan ürünler vücut tarafından tekrar absorbe edilir veya normal biyolojik yoldan elimine edilir [80, 85].

2.3.1.1.1. Kitosan

Doğada bulunan kaynaklardan bol miktarda elde edilebilen bir biyopolimer olan kitosan, canlılara karşı toksik özelliğinin olmaması, biyolojik olarak parçalanabilirliği, biyoyumluluğu, kimyasal ve fiziksel özellikleri bakımından diğer biyopolimerlere göre üstün özellikler göstermesi nedeniyle birçok alanda uygun bir madde olarak karşımıza çıkmaktadır [88].

Kitin, doğada selülozdan sonra en fazla bulunan, N-asetil-D-glukozaminden oluşmuş önemli polisakkaritlerden biridir. Kitinin deasetillenmiş bir türevidir olan kitosan, katyonik bir polisakkarittir ve β - (1,4)- 2-asetoamido-2-deoksi-D-glikoz ve β -(1,4)-2-amino-2-deoksi-D-glikoz ünitelerinin bir kopolimeridir. Kitosan da yapı olarak selüloza benzemektedir ve selüloz gibi bir fiberdir [29, 89].

Şekil 2.13.'te kitin, kitosan ve selülozun kimyasal yapıları verilmiş olup görüldüğü üzere, kitosan ve selüloz arasındaki tek fark C-2 pozisyonundaki hidroksil grubu (-OH) yerine amin grubunun (-NH₂) bulunmasıdır. Kitin ile selüloz arasındaki tek fark ise; C-2 pozisyonundaki hidroksil grubu yerine asetamido (NHCH₃CO) grubunun bulunmasıdır [93]. Kitosan suda çözünmez, ancak asidik ortamda (pH<6.5) oldukça iyi çözünür. Formik, tartarik, sitrik ve asetik asitin seyreltik çözeltilerinde iyi çözünür. Kitosanın; kitin ve selülozdan farklı olarak sahip olduğu amin grubu, çözünme sırasında protonlanır ve bundan dolayı da kitosan pozitif yüklenmiş olur [91]. Bu özellik, kitosanın katyonik bir polisakkarit olduğunu gösterir. Diğer polimerlerin aksine kitosan, pozitif yüklü (zayıf bazik gruplardan dolayı) hidrofilik bir polimerdir [92]. Sahip olduğu bu özelliklerden dolayı, negatif yüklü polimerlerle, makromoleküllerle, polianyonlarla vs. etkileşme yeteneğine sahiptir.



Şekil 2.13. Selüloz, kitin ve kitosanın kimyasal yapıları [90]

Genel olarak bakıldığında kitosan aşağıda belirtilen özelliklerden dolayı birçok endüstriyel uygulamada kullanıma sahiptir;

- yenilenebilir özelliktedir, bol miktarda bulunmaktadır,
- toksik değildir, biyouyumludur ve biyobozunurdur,
- asit giderici, antitümör, antioksidan, antibakteriyel gibi biyoetkileri vardır,
- çözünmesi için zararlı organik çözücülere gerek duyulmaz,
- katyonik polimer olup negatif yüklü yüzeyler ile kolayca etkileşir,
- güçlü elektrostatik özellik ve uygun biyoadhesif özellikler gösterir.

2.3.1.2. Biyoparçalanmayan Polimerler

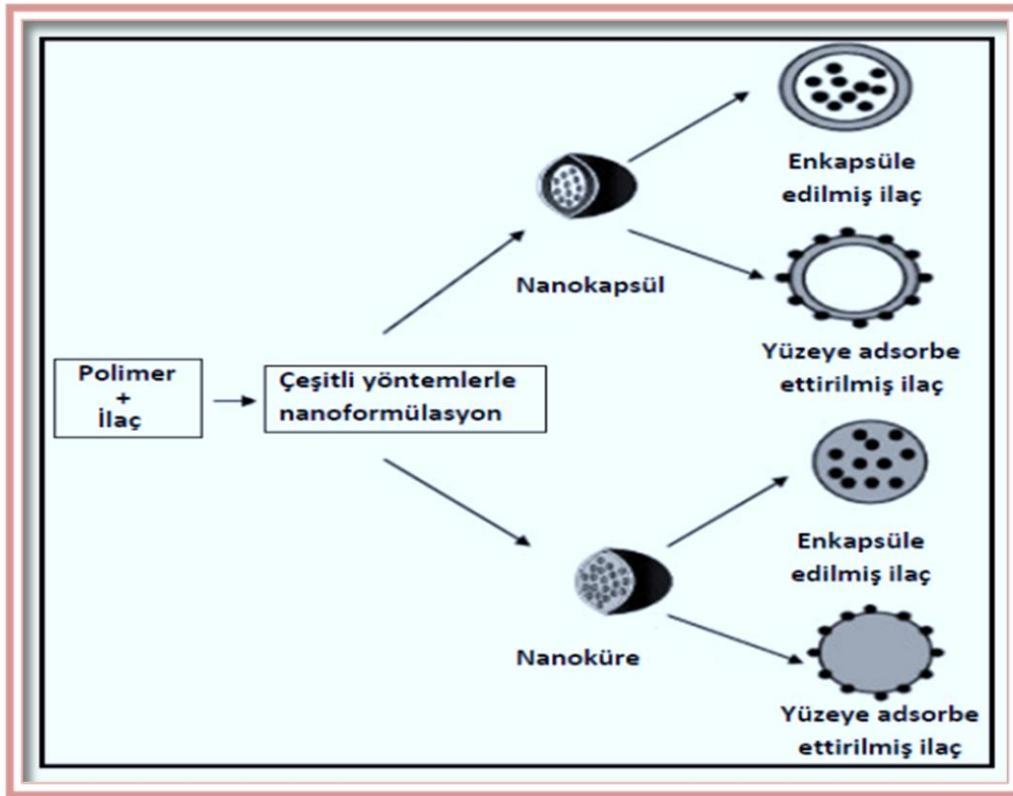
Biyoparçalanmayan polimerler, biyolojik ortamda parçalanmazlar. Bunlar hidrofil ya da hidrofob yapıda olurlar. Hidrofil polimerler hidrojeller olarak adlandırılırlar, suda çözünmez ama suda şişerler. Hidrofob polimerler ise suda çözünmez ve şişmezler (Çizelge 2.4.) [86, 87].

2.3.2. İlaç Taşıyıcı Partiküler Sistemler

İlaç taşıyıcı sistemler, bir bileşenin bir başka kimyasal ile, bir ilaç uygulama aygıtı ile salım hızını kontrol eden sistemler olarak tanımlanırlar [80]. Konvansiyonel

ürünlerin ya da yeni moleküllerin güvenlik ve etkinliğini artırmak, yan ve istenmeyen etkileri azaltıp, biyoyararlanım ve terapötik indeksi artırarak hasta uyuncunu artırmak ilaç taşıyıcı yeni sistemler üzerinde çalışma nedenlerinin başında gelmektedir.

Partikül büyüklükleri 1-100 nm arasında değişen çözünmüş, hapsedilmiş veya adsorbe haldeki etkin maddeyi kontrollü olarak açığa çıkaran, doğal ya da sentetik yapıdaki polimerlerle hazırlanan katı koloidal polimerik partiküler sistemlere “nanopartikül” adı verilmektedir. Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler, uygulanan hazırlama yöntemine bağlı olarak kendi içinde “nanoküreler” ve “nanokapsüller” olarak ikiye ayrılırlar. **Nanoküreler**, etkin maddenin polimerik matris yapı içinde çözündüğü, disperse olduğu ya da kısmen adsorbe edildiği sistemler iken **nanokapsüller** etkin maddenin polimerik bir membran tarafından çevrelenmiş sulu veya yağlı bir çekirdek içinde bulunduğu veziküler sistemlerdir ve rezervuar sistem olarak da tanımlanmaktadırlar [94]. (Şekil 2.14.)



Şekil 2.14. Nanoküre ve nanokapsüllerin yapısı [94]

Etken madde taşıyıcı sistem olarak hazırlanan ve kullanılan polimerik nanopartiküller sahip oldukları çeşitli avantajlar ile diğer nano-boyutlu taşıyıcı sistemlerden ayrılmaktadırlar. Bunlar;

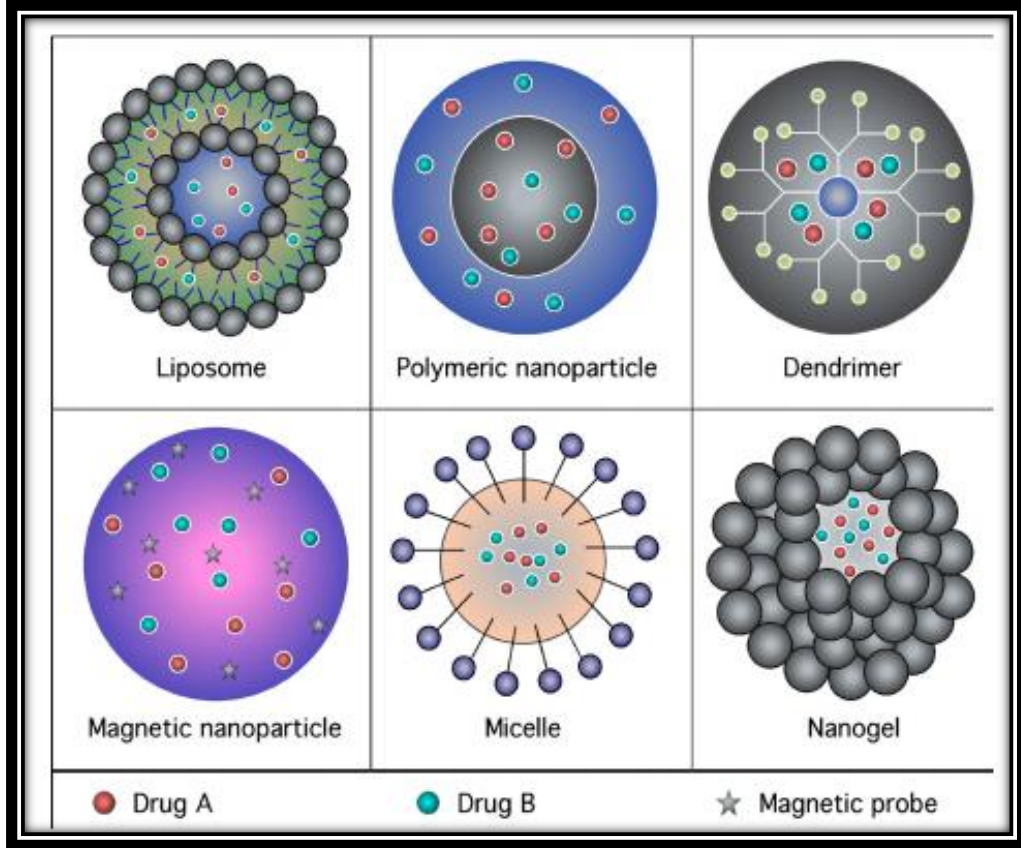
- Yüksek etken madde yükleme kapasitesine sahiptirler. Bu şekilde, etken maddenin intraselüler dağılımı artar [95].
- Polimerik partiküler yapı katı matriks içine hapsedilmiş etken maddeyi degradasyondan korur. Böylece etken maddenin hedef dokuya ulaşma olasılığı artar [95,96].
- Nanopartiküllerin polimerik yapıları etkin maddenin hedeflendirilmesini, salımının kontrolünü ve sürdürülmesini temin ederler. Hedeflenen bölgede uygulamayı takiben günler hatta haftalar süren bir etkin madde salımına imkan verirler [97,98].
- Nanopartiküllerin yüzey özellikleri çeşitli ajanlarla kaplama yapılmak suretiyle değiştirilerek nanopartiküllerin retiküloendotelial sistem (RES) makrofajları tarafından tanınması engellenir. Bu şekilde nanopartiküllerin hedef bölgeye ulaşılabilirliği artırılır [99].
- Diğer kolloidal taşıyıcı sistemlerle kıyaslandıklarında polimerik nanopartiküller biyolojik sıvılarda çok daha yüksek stabiliteye sahiptirler [96].
- Taşıdıkları etkin maddenin hedef bölgede salımına imkan sağladıkları için etkin maddenin sistemik toksisitesini azaltırlar [100].
- Etkin maddenin vücuttaki dağılımını ve terapötik etkinliğini düzenlerler.

İlk defa 1970'li yıllarda Birrenbach ve Speiser tarafından geliştirilen nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler başlangıçta aşı ve antineoplastik etken maddeler için taşıyıcı sistemler olarak tasarlanmışlardır. Günümüzde nanoteknoloji ve nanomedikal alanda özellikle hedefleme mekanizmaları yardımıyla kanser tedavisinde kullanımları ağırlık kazanmıştır.

Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin kanser tedavisindeki önemini vurgulayan araştırmalar, özellikle antikanserojen etken maddelerin nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler şeklinde uygulandıklarında, hedef neoplastik dokudaki antitümoral

etkinliklerinin arttığını, doku ve hücre dağılım profillerinin de kontrol edilebildiğini göstermektedir [94].

Nanopartikül hazırlamada kullanılan doğal ve sentetik polimerler Çizelge 2.5.'te sunulmuştur.



Şekil 2.15. Çeşitli yapılardaki ilaç taşıyıcı partiküler sistemler [101]

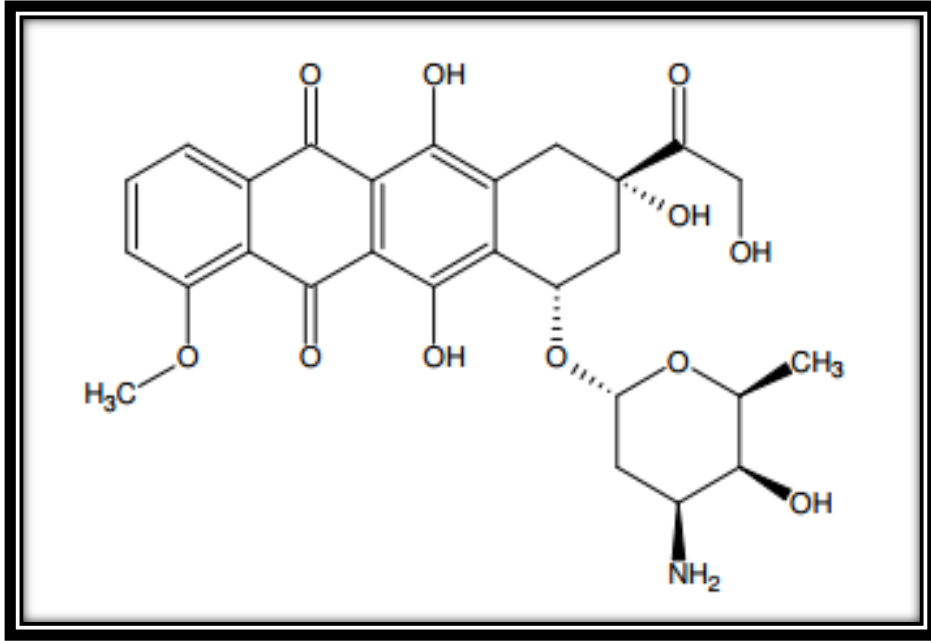
DOĞAL POLİMERLER	SENTETİK POLİMERLER
Agar	Akrilik polimerler
Albumin	Alifatik poliesterler
Aljinat	CMC
Arap zamkı	PEG
Dekstran	Poli amitler
Gluten	Poli orto esterler
Hyaluronik asit	Poli üretanlar
Jelatin	Poli lizin
Kazein	Poli stiren
Kitosan	Poli aminoasitler
Kollajen	Poli fosfozenler
Niřasta	Poli fosfoesterler
Selüloz	PVA
Mum	PVP
Pektin	Silikonlar
Zein	řellak

Çizelge 2.5. Nanopartiküler sistemlerde kullanılan doğal ve sentetik polimerler [80]

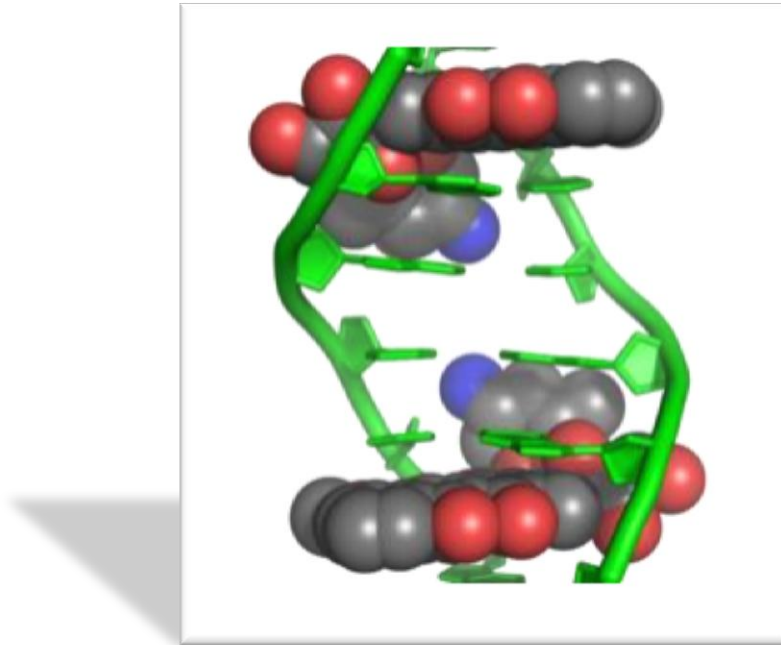
2.4. Kanser Tedavisinde Kullanılan Etken Maddeler

2.4.1. Doksorubisin

Antrasiklin bir antibiyotik olan doksorubisin, en geniş kullanım alanına sahip ve gerek tek bir ajan gerekse kombinasyonlu biçimde intravenöz olarak hastaya uygulanan antikanser ilaçlardan biridir. Diğer tüm antrasiklinler gibi DNA içine interkalasyon yapar. Başta over kanseri olmak üzere, meme, akciğer, tiroid kanseri vs., bazı yumuşak doku sarkomaları ve bazı tür lösemilerin tedavisinde kullanılır. Geniş spektrumlu ve etkin bir antineoplastik olmasına karşın oldukça toksiktir. Şekil 2.6.'da gösterildiği gibi yapısında tetrasiklin halkası ve bu halkaya glikozidik bağı ile bağlı daunozamin şekeri içerir [102].



Şekil 2.16. Dokсорubisin'in kimyasal yapısı [102]



Şekil 2.17. İki dokсорubisin molekülünün DNA içerisine interkalasyonunu gösteren şematik görünüm [124]

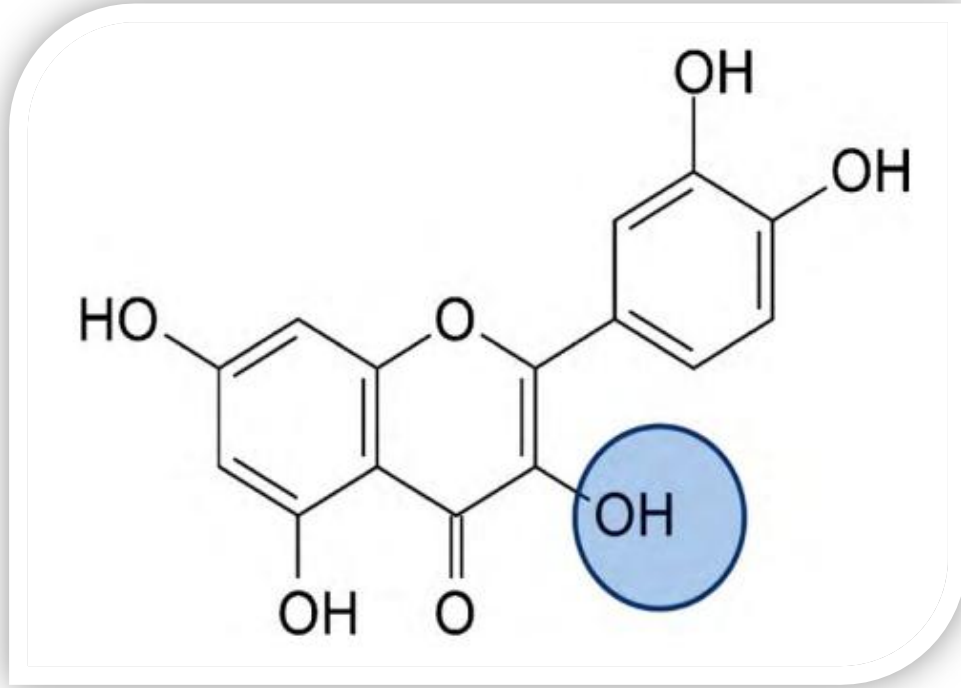
2.5. Flavonoidler (Kuersetin)

Flavonoidler bitkisel gıdalarda bol ve yaygın olarak bulunan, çiçekli bitkilere renk veren, bitkinin büyüme, gelişme ve savunmasında rol alan bitkilerin ikincil metabolitlerindedir. Antikanserojen ve diğer yararlı özellikler içeren bu bileşikler diyetel antioksidanlar olarak da adlandırılmaktadır [118]. Onların koruyucu etkisinin en önemli nedeni antioksidan aktiviteye sahip olmaları ve serbest radikal yakalama kapasiteleri yüzündendir. Bu fitokimyasalların antioksidan özelliklerinin yanında, anti-inflamatuar, anti alerjik, anti platelet, anti tümoral, anti viral gibi biyolojik aktiviteleri olduğu bilinmektedir. Sayıları 4000'in üzerinde olduğu tahmin edilen flavonoidler çay, elma, soğan, baklagiller, domates ve kırmızı şarapta bol miktarda bulunmaktadır [119-121].

Flavonoidlerin son yıllarda üzerinde en çok çalışılan özelliklerinden biri de kanser hücrelerinin gösterdiği çoklu ilaç direncinin (MDR) özelliklerini değiştirmesidir. Kanser hücrelerinde birçok ilaca karşı gelişen direnç nedeniyle kemoterapötik ilaçların tedavi etkinliği zayıflamaktadır. Flavonoidlerin, hücresel direncin kırılmasında önemli rollerinin olduğu artık bilinmektedir [122, 123].

Kuersetin (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone), doğada yaygın olarak bulunan flavonoidlerden biridir. Flavonol grubunun bir üyesi olan kuersetin, toksik değildir ve hücre fizyolojisi açısından birçok önemli fonksiyona sahiptir. Kuersetinin, antiproliferasyon, antioksidan, antiülser, apoptoz indüklenmesi, protein kinaz C inhibisyonu, lipooksijenaz inhibisyonu, hücre siklusu düzenlenmesi, anjiyogenez inhibisyonu, anti alerjik ve antikanser özellikleri bulunmaktadır [125].

Kuersetinin MDR ailesi üyelerini (P-gp, MRP1, BCRP) inhibe ettiği bildirilmiştir (Scambia ve ark. 1994, Van Zanden ve ark., 2005). Kuersetin MDR proteinlerinin ATPaz bölgelerini tanımaktadır. Hücre içi serbest radikalleri ortadan kaldıracak ve çeşitli moleküllerin oksidasyonunu engelleyerek *in vivo* ve *in vitro* antioksidan aktivite gösterebileceği belirtilmektedir [126].



Şekil 2.18. Kuersetinin moleküler yapısı [127]

Kuersetin'in anti-tümör etki mekanizması şu başlıklar altında değerlendirilebilir;

- Hücreler arası iletişimi artırmakla,
- Ornitin dekarboksilazı ve timidinin DNA'nın yapısına katılmasını inhibe etmek suretiyle hücre proliferasyonunu inhibe ederek,
- İlgili reseptörleri bloke ederek antiproliferatif etki göstererek,
- Laktat transportunu inhibe ederek,
- Kalmodulini inhibe ederek vasküler dokunun endotelyumundaki nitrikoksit (NO) sentezinin regülasyonunu düzenlemek suretiyle antitümör etkisi gösterir [118, 143]

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalar başlıca şu kısımlardan oluşmaktadır:

1. Kitosan nanopartiküllerin sentez aşamasında iyonik jelasyon yöntemi kullanılmıştır. Elde edilen nanopartiküllerin morfolojik ve fizyolojik özelliklerinin değerlendirilmesi amacıyla AFM, Zeta-Sizer ve SEM tekniklerinden yararlanılmıştır.
2. Hazırlanan nanopartiküllerin optimizasyonu sağlandıktan sonra, kanser tedavisinde sıklıkla kullanılan etken maddelerden biri olan doksorubisin, nanopartiküllerde tutuklanarak, *in vitro* salım çalışmaları yapılmıştır.
3. Elde edilen ilaç yüklü kitosan nanopartiküllerin yüzeyine, ilaç direncini kırmaya yardım eden bir flavonoid (kuersetin) bağlanmıştır.
4. Doksorubisin ve kuersetin yüklü kitosan nanopartiküllerin *in-vitro* kanser hücreleri ile etkileşimlerinin değerlendirilmesi amacıyla, sitotoksite çalışmaları (WST-1 testi), ikili boyama metodu ile apoptoz ve nekroz oranlarının tayini, gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile hücre proliferasyonu belirlenmiştir.

3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Malzemeler

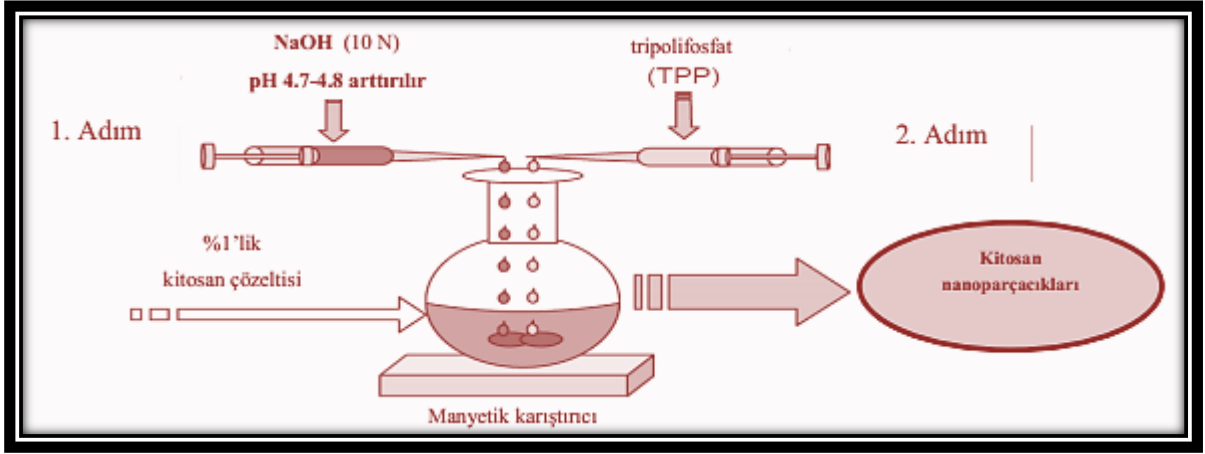
Düşük molekül ağırlığına sahip kitosan (Sigma-Aldrich, ABD), %100 ultra saf asetik asit (Riedel-de Haën, Almanya) kitosan çözeltilerini hazırlamak amacıyla kullanılmıştır. Çapraz bağlayıcı olarak Tripolifosfat (TPP; Sigma, ABD) kullanılmış olup çözeltinin pH'sını ayarlamak için Sodyum hidroksit (NaOH; Fluka, İsviçre) kullanılmıştır. Hazırlanan kitosan nanopartiküllerinin yüzeyine, antikanser ajan olarak sıklıkla kullanılan Doksorubisin Hidroklorür (Adrimisin; 10 mg) uygulanmış ve Kuersetin (Sigma Q0125) ile etkileştirilmiştir.

Hücre kültürü çalışmaları için, Çoklu İlaça Dirençli Küçük Hücreli Akciğer Kanseri Hücre Hattı (ATCC, H69AR CRL-11351); Doksorubisin'e Dirençli Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri Hücre Hattı (H1299) ve Fibroblast L929 hücreleri seçilmiştir. H1299 hücreleri Uludağ Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalı Prof. Dr. Engin Ulukaya tarafından hediye edilmiştir. Fibroblast L929 hücreleri ise Şap

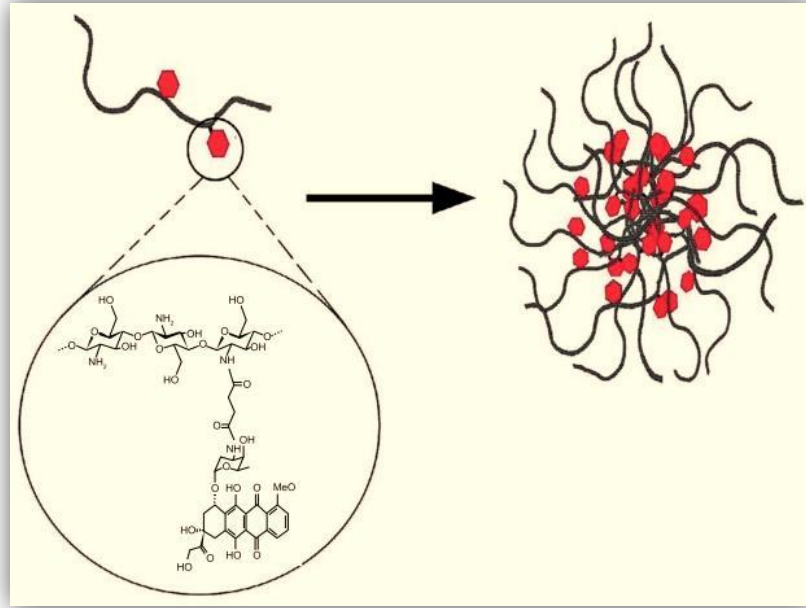
Enstitüsü'nden temin edilmiştir. Hücrelerin komplet (tam) kültür ortamı olarak RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute-1640; ATCC), Fetal Bovin Serum (FBS; ATCC 30-2020), L-glutamin, Penisilin/Streptomisin, 2-merkaptotanol ve Sodyum pirüvat kullanılmıştır. Hücrelerin bulunduğu kültür kaplarından uzaklaştırılması Tripsin-EDTA (Tripsin-Etilendiamin tetraasetik asit) ile yıkamalar Fosfat tamponu (PBS) ile gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin sayımı, tripan mavisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sitotoksisite testinde bir tetrazolyum tuzu olan WST-1 kimyasalından yararlanılarak hücre canlılığı tespit edilmiştir. İkili boyamada Ribonükleaz-A, Propidyum İyodür (Serva, İsrail), Hoechst 33342 (Serva, İsrail) kullanılarak apoptoz/nekroz oranları belirlenmiştir. Hücre kültür çalışmalarının tamamı, kültür kapları ve çoklu kuyucuklu plakalarda (Corning, ABD) gerçekleştirilmiştir.

3.2. Kitosan Nanopartiküllerinin Hazırlanması

Kitosan nanopartiküllerin hazırlanması için düşük molekül ağırlıklı kitosan (30 mg %0.3 w/v) öncelikle sulu asetik asit çözeltisinde (%1 v/v) çözülmüş ve böylece kitosan, katyonik hale getirilmiştir. Hazırlanan bu kitosan çözeltisinin pH'sı, 1 M NaOH kullanılarak 4.6 - 4.8 aralığına ayarlanmıştır. Daha sonra bu kitosan çözeltisinden 10 mL alınarak maksimum hıza ayarlı (1200 rpm) manyetik karıştırıcı üzerine konulmuştur. Üzerine kitosanın çapraz bağlayıcısı olan Tripolifosfat (TPP) çözeltisi (%0.055) 12 mL olacak şekilde damla damla ilave edilmiş, böylece kitosan nanopartiküller oluşturulmuştur. Bu karışım oda sıcaklığında yaklaşık 1 saat kadar bekletilmiştir. Oluşan süspansiyon, 12000 rpm ve 4°C'de 30 dakika santrifüjlenmiştir. Çöken kısmın üzerindeki süpernatant atılmıştır, kalmış olabilecek NaOH'ı uzaklaştırmak amacıyla üzerine distile su ilave edilip tekrar santrifüj yapılmıştır. Böylelikle kitosan nanopartiküller karakterizasyon işlemlerinin yapılabilmesi için hazır hale gelmiştir.



Şekil 3.1. İyonik jelleşme yöntemiyle hazırlanan kitosan nanopartiküllerin şematik gösterimi [29].



Şekil 3.2. Doksorubisin yüklü kitosan nanopartiküllerinin self assemble oluşumu [117]

3.3. Kitosan Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

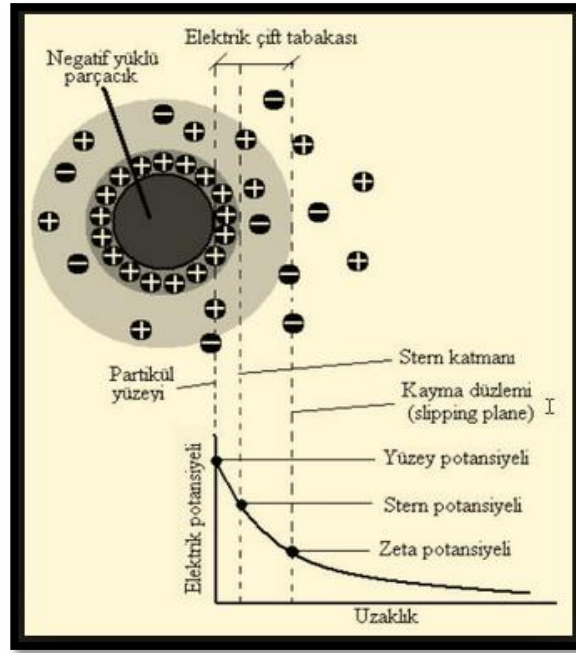
3.3.1. Morfolojik Özelliklerin Belirlenmesi

Kitosan nanopartiküllerinin morfolojik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) (Nanomagnetics, UK) ve Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) (FEI, Quanta 200 FEG, ABD) tekniklerinden yararlanılmıştır. Nanopartiküllerin AFM görüntülerinin elde edilmesi için, hazırlanan örnekten 10 µL alınmış ve mika yüzey üzerine damlatılarak azot gazı altında kurutulmuştur. Kurutulan partiküller, doğrudan AFM örnek tutucu ünitesine yerleştirilerek partiküllerin oda koşullarında görüntüleri alınmıştır. Bunun yanında, kitosan nanopartiküller ince bir altın film tabakasıyla kaplanarak SEM görüntüleri alınmış, böylelikle örnekler şekil, geometri ve boyut dağılımı açısından değerlendirilmiştir.

3.3.2. Fizikokimyasal Özelliklerin Belirlenmesi

3.3.2.1. Boyut ve Yük Analizi

Sentezlenen kitosan nanopartiküllerin ve ilaç yüklü partiküllerin boyut dağılımlarını belirlemek ve AFM çalışmalarında elde edilen bulgular ile karşılaştırmak amacıyla Zeta Sizer (Malvern, İngiltere) cihazı kullanılmıştır. Zeta Sizer, bir çözelti içindeki parçacıkların boyut dağılımını ve zeta potansiyellerini ölçmekte kullanılan bir teknik olup Dinamik Işık Saçılımı (DLS) prensibine göre çalışmaktadır. Dinamik Işık Saçılımı metodu, seyreltik çözelti içerisindeki küçük parçacıklardan saçılan ışığın şiddetinin ve değişiminin ölçülmesi temeline dayanır. Saçılan ışığın şiddetindeki değişim, parçacığın hareketine; buna bağlı olarak da parçacığın büyüklüğüne, ortamın viskozitesine ve sıcaklığa bağlıdır.



Şekil 3.3. Dinamik Işık Saçılımı mekanizmasının şematik gösterimi [30].

Sentez sonrası yıkanarak çöktürülen nanopartiküller, deiyonize su ile seyreltilmiş ve yaklaşık 2 mL hacimli örnek çözeltisi, polistren küvet içerisine konularak gerekli ölçümler gerçekleştirilmiştir.

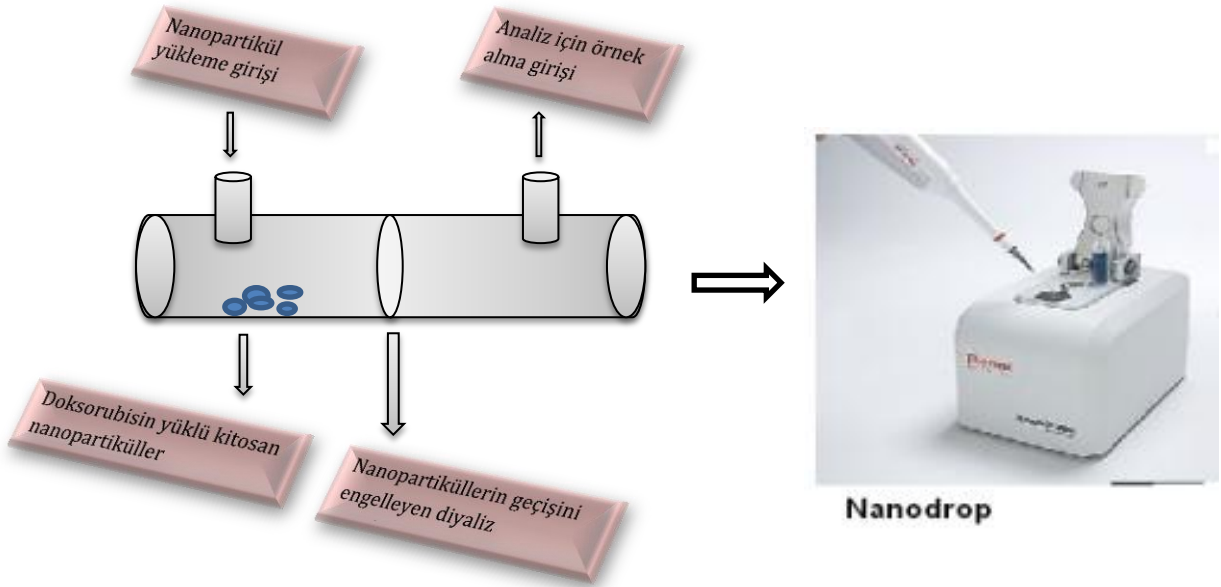
3.4. Nanopartiküllere Etken Madde Yüklenmesi ve Salım Çalışmaları

3.4.1. İlaç Yükleme Çalışmaları

Kitosan nanopartiküllere ilaç yükleme çalışmalarında antikanser ajan olarak doksorubisin kullanılmıştır. Polimer çözeltisine 10/2, 10/1, 10/0.5 mg polimer/mg etken madde oranlarında doksorubisin yüklenerek ilacın polimer çözeltisi içerisinde homojen şekilde dağılması için 1 gün boyunca rotatorda bekletilmiştir. Polimer içerisine adsorbe edilemeyen ilaçların giderilmesi için nanopartiküller 3 defa distile su ile yıkanarak her yıkamada dışarı çıkan ilaç miktarı hesaplanarak polimer içerisine yüklenen toplam ilaç miktarı hesaplanmıştır.

3.4.2. İlaç Salım Çalışmaları

Kitosan nanopartiküllerden ilaç salımının yapılabilmesi amacıyla öncelikli olarak, doksorubisin etken maddesi farklı derişimlerde çözülmüş ve 488 nm'de bu çözeltilerin absorbanları ölçülerek standart kalibrasyon eğrisi hazırlanmıştır. Çözeltilerin absorbanları Nano-drop (Thermo Scientific, Nanodrop 1000) kullanılarak ölçülmüştür.



Şekil 3.4. Doksorubisin yüklü kitosan nanopartiküllerin salım ve analiz düzeneği

Doksorubisin yüklü kitosan nanopartiküllerden salınacak etken madde miktarını tayin etmek amacıyla Şekil 2.6.'da görülen ilaç salım deney düzeneği kurulmuştur. Düzeneđin orta kısmına nanopartiküllerin geçişine izin vermeyen diyaliz membranı yerleştirilmiştir (12-14 kDa ağırlığında). Sistemin bir tarafına sadece 2 mL fosfat tamponu (PBS), diğer tarafına ise 2 mL fosfat tamponu içerisinde dağıtılmış ilaç yüklü partiküller konulmuştur. Sistem, 37°C çalkalamalı su banyosunda sabit hızda inkübe edilmiştir. Belirli zaman aralıklarında (0.5.sa, 1.sa, 3.sa, 5.sa, 24.sa, 48.sa, 72.sa, 96.sa) ölçümler alınarak, salım ortamındaki ilaç derişimleri hesaplanarak grafiğe geçirilmiştir. Tüm ölçümlerin absorban değerleri nanodrop kullanılarak okunmuştur.

3.4.3. İlaç Tutunma Verimliliği

Doksorubisin yüklü kitosan nanopartiküller 12000 rpm +4°C'de 30 dakika santrifüjlendikten sonra bağlanmayan ilaç miktarı süpernatandan ölçüm alınarak tespit edilmiştir. Partiküller 3 defa yıkanıp her defasında süpernatandaki doksorubisin miktarı ölçülerek belirlenmiştir. Başlangıçta polimer içerisine kattığımız ilaç miktarı, toplam ölçülen süpernatandaki ilaç miktarlarından çıkarılarak ilaç tutunma etkinliği hesaplanmıştır.

- İlaç tutunma etkinliği (% TE), aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\%TE = \frac{(\text{Toplam ilaç miktarı} - \text{Serbest ilaç miktarı})}{\text{Toplam ilaç Miktarı}} \times 100 \quad \text{Eşitlik 3.1.}$$

3.5. İlaç Yüklü Kitosan Nanopartiküllere Kuersetin Bağlanması

Doksorubisin yüklü kitosan nanopartiküllere hapsedilen ilaç verimi hesaplandıktan sonra, bu kompleks 1mg/mL derişiminde kuersetin ile muamele edilerek bu kez kuersetin etken maddesinin ilaç ile etkileştirilmesi ve nanopartiküllü yapıda tutuklanması sağlanmıştır. Bunun için kuersetin yüklenmiş nanopartikül bir gece boyunca oda sıcaklığındaki rotatorda inkübe edilmiştir.

Partikül içerisine hapsedilen kuersetin miktarını bulmak amacıyla UV spektrofotometrede 370 nm dalga boyunda, "bağlanma öncesi örnek" ve "bağlanma sonrası örnek" şeklinde ölçülen absorbans değerleri farkından yararlanılarak kuersetin etken maddesinin nanopartiküllere bağlanma kapasitesi yüzde bağlanma şeklinde hesaplanmıştır.

3.6. Hücre ile Etkileşim Çalışmaları

3.6.1. Hücrelerin Hazırlanması

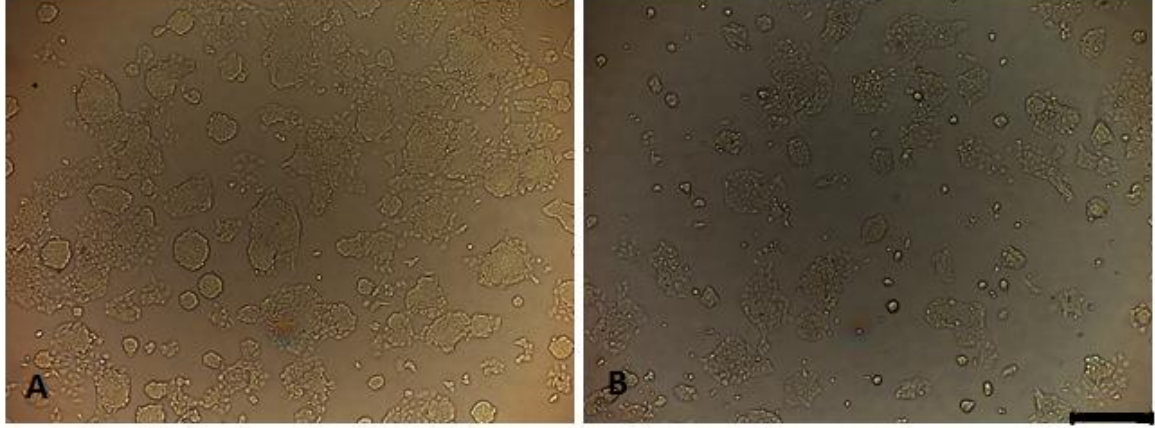
Çalışmada kullanılan H69AR ilaca dirençli kanser hücreleri, ATCC (American Type Culture Collection) firmasından temin edilmiştir. H1299 hücreleri Uludağ Üniversitesi Prof. Dr. Engin Ulukaya tarafından hediye edilmiş olup, Fibroblast L929 hücreleri ise Şap Enstitüsü'nden temin edilmiştir. H69AR hücreleri, Çizelge 3.1.'de verilen hücre kültür ortamında çoğaltılmış ve iki günde bir hücre kültür ortamı değiştirilerek tazelenmiştir. Hücreler, hücre kültür kabı zeminini kapladıklarında pasajlanarak yeni kaplara aktarılmıştır. Herhangi bir kontaminasyon riskine karşı her gün mikroskopik incelemeye tabi tutularak kontrol edilmiştir.

Çizelge 3.1. H69AR kanser hücre hattı için kullanılan kültür koşulları

Hücre Türü	H69AR (Çoklu İlaça Dirençli Küçük Hücreli Akciğer Kanseri Hücre Hattı)
Kültür Kabı	25 cm ³ 'lük polistren flask
Kültür Vasadı	%10 Fetal sığır serumu içeren RPMI1640 ; %0.5 penisilin-streptomisin, 4 mM L-glutamine, 50 mM 2-merkaptotanol, 1 mM sodyum piruvat
Rutin sub-kültür	1/3
Kültür Özelliği	Monolayer
Toplam Hacim	4 mL
pH	7.2-7.4
Sıcaklık	37± 0.5 °C
İnkübasyon Ortamı	%5'lik CO ₂ etüvü

Çoklu ilaca dirençli küçük hücreli akciğer kanser hücreleri (H69AR), %89'luk RPMI, %10'luk fetal bovin serum, %0.5'lik antibiyotik, 4 mM L-glutamine, 50 mM 2-merkaptotanol ve 1 mM sodyum piruvat kullanılarak üretilmiştir. Klasik hücre kültür metodlarıyla hazırlanan besiyeri ortamında H69AR hücrelerinin çoğalmasının oldukça yavaş olduğu ve antibiyotik kullanılmaması durumunda da

kontaminasyona uğradığı görülmüştür. Bu nedenle daha düşük oranda antibiyotik kullanımının yanısıra besiyeri ortamına sodyum pirüvat ve 2-merkaptoetanol kimyasalları ilave edilerek çoğaltılma yoluna gidilmiştir [113,114].

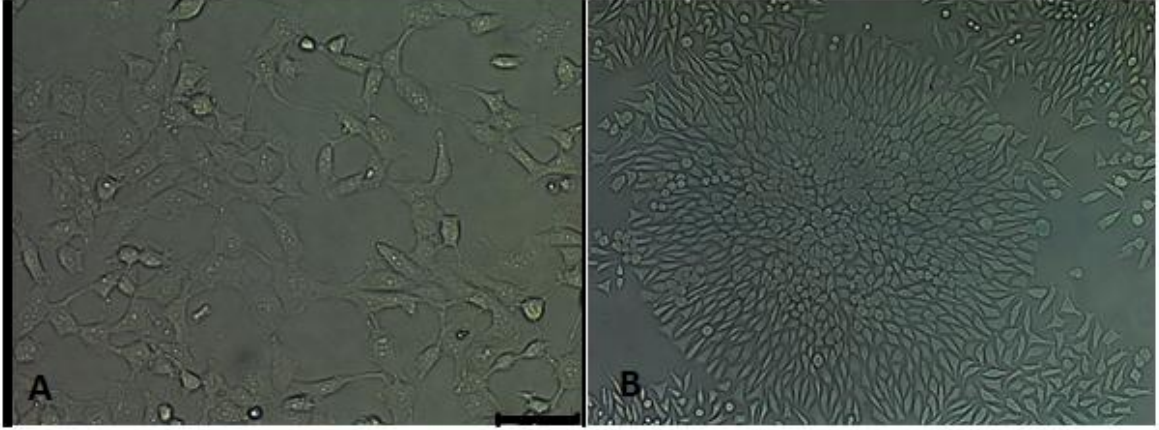


Şekil. 3.5. H69AR hücrelerinin morfolojik görüntüsü; (A) yüksek yoğunluk; (B) düşük yoğunluk; Fotoğraflar Leica inverted floresan mikroskobu ile 200X büyütmede çekilmiştir. Ölçek 50 µm mesafeyi göstermektedir.

Kültür ortamında, normal hücreler komşu hücrelere yapışarak ilişkilerini devam ettirirler. Bu yapışma (adhezyon) noktalarında hücrelerde elektronca yoğun bir plak oluşur. Bununla birlikte, hücrelerin ameboid uzantılarında yavaşlama ve durma görülür. Bu olaya kontak inhibisyon denir. Bu şekilde, hücre bölünmesi kontrol edilir. Deneysel olarak, normal hücreler bir kültür ortamında kendilerine sağlanan ortam şartları ne kadar iyi olursa olsun kontak inhibisyon nedeniyle tek tabaka oluşturduktan sonra daha fazla çoğalmazlar. Çünkü, bölünme sınırlı sayıda olur. Fakat, kanser hücreleri sürekli çoğalarak birkaç tabakalı düzensiz kitleler oluştururlar. Bu da kanser hücrelerinde kontak inhibisyon kaybı olduğunu göstermektedir [48].

Çalışmada H1299 hücre hattı ve L929 fibroblast hücreleri de deneysel çalışmalara tabi tutulmuştur. Küçük hücreli olmayan kanser hücre hattı H1299, temin edilen yerden alınan raporda, 48 saat doksorubisin muamelesinden sonra %100 canlı olarak tesbit edildiği ibaresi yer almaktadır. Sadece tek bir ilaca dirençli olan

(doksorubisine dirençli) H1299 kanser hücre hattının, H69AR hücre hattının çoklu ilaca dirençli olması özelliği ile karşılaştırmalı değerlendirilmesi yapılmış ve bu iki hücre hattının uygulamaya verdiği yanıtta yola çıkarak bir ön bakış açısı kazanılması amaçlanmıştır. Bu iki hücre hattı ile yapılan uygulamalar eş zamanlı olarak sağlıklı hücrelerde (L929 Fibroblast) de uygulanmıştır.



Şekil 3.6. H1299 ve L929 fibroblast hücrelerinin morfolojik görünümü; (A) H1299 kanser hücreleri; (B) L929 Fibroblast hücreleri; Fotoğraflar Leica inverted floresan mikroskobu ile 200X büyütmede çekilmiştir. Ölçek 50 µm mesafeyi göstermektedir.

Çizelge 3.2. H1299 kanser hücre hattı için kullanılan kültür koşulları

Hücre Türü	H1299 (Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri Hücre Hattı)
Kültür Kabı	25 cm ³ 'lük polistren flask
Kültür Vasadı	%10 Fetal siğir serumu içeren RPMI1640 ; %1 penisilin-streptomisin, 200 mM L-glutamine
Rutin sub-kültür	1/3
Kültür Özelliği	Monolayer
Toplam Hacim	4 mL
pH	7.2-7.4
Sıcaklık	37 ± 0.5 °C
İnkübasyon Ortamı	%5'lik CO ₂ etüvü

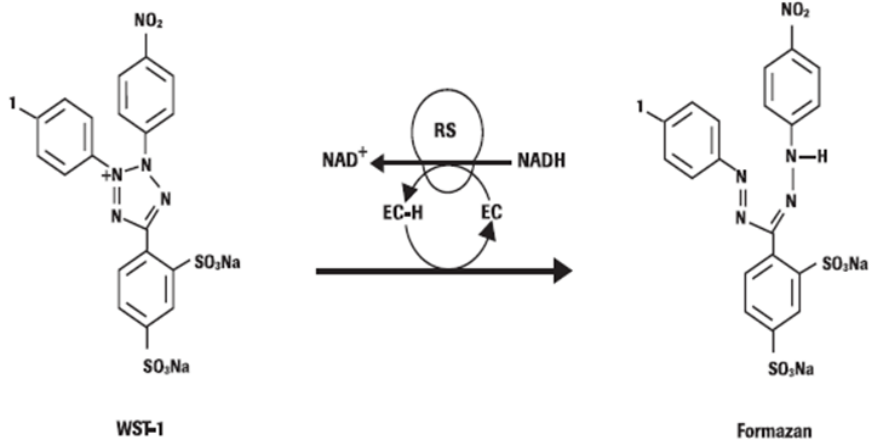
Çizelge 3.3. L929 Fibroblast hücreleri için kullanılan kültür şartları

Hücre Türü	L929 Fibroblast hücreleri
Kültür Kabı	25 cm ³ lük polistren flask
Kültür Vasadı	%10 Fetal sığır serumu içeren DMEM-F12 ; %1 penisilin-streptomisin
Rutin sub-kültür	1/3
Kültür Özelliği	Monolayer
Toplam Hacim	4 mL
pH	7.2-7.4
Sıcaklık	37 ± 0.5 °C
İnkübasyon Ortamı	%5'lik CO ₂ etüvü

3.6.2. Hücre Canlılık ve Proliferasyon Testi (WST-1)

Kolorimetrik yöntem için kullanılan temel parametre canlı hücrelerin metabolik aktiviteleri olup bunun için hücreler çoğunlukla bir kolorimetrik substrat ile inkübe edilir (MTT, XTT, INT, WST-1 gibi).

WST-1 [2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium] substratı kullanılarak canlı veya apoptozun erken evresindeki hücrelerin mitokondrileri aracılığıyla oluşturduğu reaksiyonda, solüsyonlarda bulunan tetrazolyum halkası hücre mitokondrilerinde bulunan dehidrogenaz enzimlerince parçalanarak renkli formazan kristallerini oluşturur [31]. Formazan oluşumu, yalnızca aktif mitokondrinin bulunduğu canlı hücrelerde görülmektedir. Bu da hücre canlılığının bir belirteci olarak kabul edilmekte ve spektrofotometrik olarak belirlenen değer, yaşayan hücre sayısı ile ilişkilendirilmektedir [32].



Şekil 3.7. Tetrazolyum tuzunun formazan kristaline dönüşümünün şematik gösterimi [31].

Hazırlanan örnekler (boş nanopartikül, dokсорubisin yüklü kitosan nanopartikül, serbest ilaç, ilaç-kuersetin kompleksi, ilaç-kuersetin yüklü kitosan nanopartikül ve serbest kuersetin) H69AR, H1299 ve fibroblast hücreleriyle inkübe edilerek WST-1 hücre canlılık testine tabi tutulmuştur.

Bu amaçla 1×10^4 hücre/mL derişiminde hazırlanan hücreler 96 kuyucuklu plakalara ayrı ayrı ekilerek 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda hazırlanan örnekler besiyeri ile farklı derişimlerde (50, 25, 12.5, 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) seyreltilmiştir. Taze besiyeri eklenip üzerlerine de WST-1 çözeltisi (10 μL) ilave edilerek etüvde 4 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda kuyucuklardaki sıvı kısımlar temiz başka bir plaka içerisine alınarak 440 nm ELİSA mikro-plaka (Biotek, İngiltere) okuyucuda okutulmuştur.

Elde edilen absorbans değerlerinin ortalamaları alınıp, hücre canlılığı aşağıdaki Eşitlik 3.2. ile hesaplanmıştır.

$$\text{Hücre Canlılığı (\%)} = \frac{\text{absorbans 440 (örnek)}}{\text{absorbans 440 (kontrol)}} \times 100 \quad \text{Eşitlik 3.2.}$$



Şekil 3.8. Çalışmalarda kullanılan otomatik hücre sayım cihazı



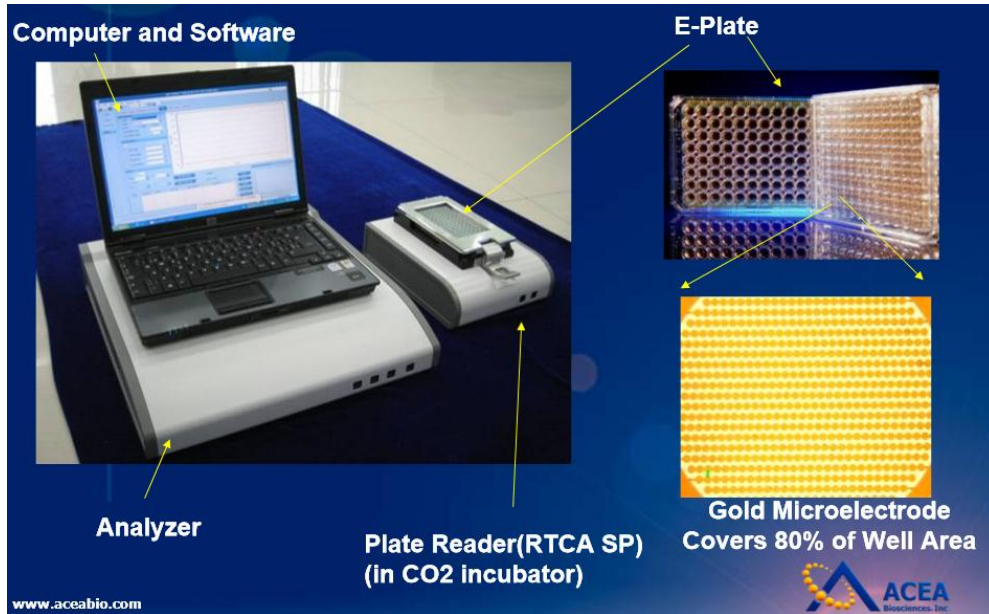
Şekil 3.9. Hücre ile etkileşim öncesi hazırlık aşamaları

3.6.3. Hücre Proliferasyonunun xCELLigence RTCA ile Belirlenmesi

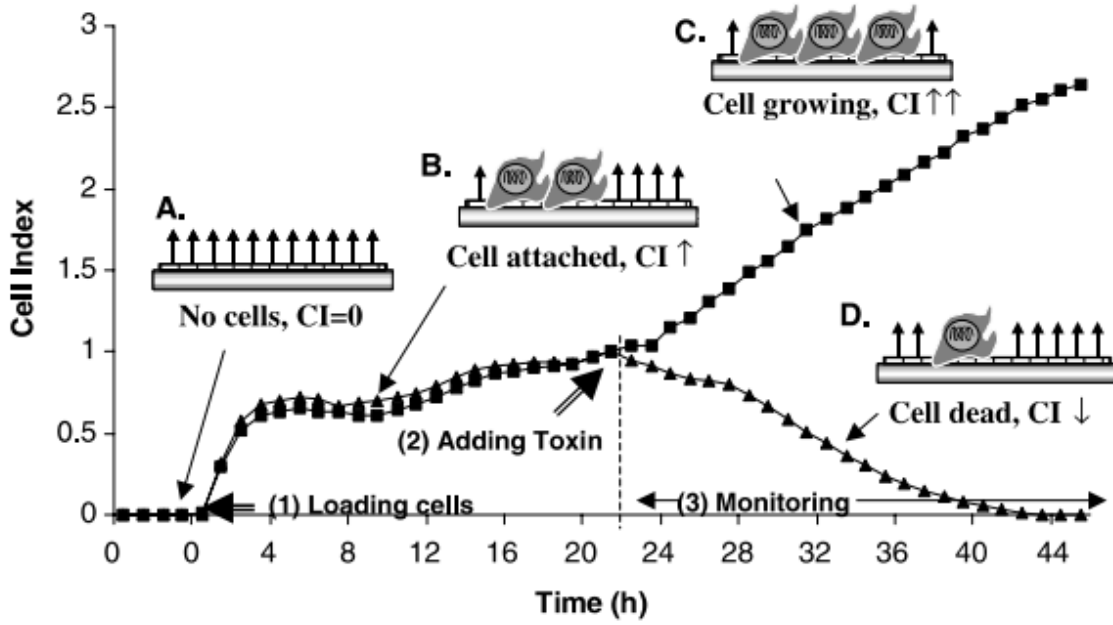
xCELLigence sistemi, hücre çoğalmasını gerçek zamanlı olarak analiz edebilen bir hücre sayım cihazı olup e-plakalarının zeminine yerleştirilmiş mikro-elektrodlar

sayesinde elektriksel empedans ölçme tekniğine dayanmaktadır [33]. Empedans ölçümü, hücre kalitesi, proliferasyonu, adezyonu, canlılığı, sitotoksitesi, morfolojisi ve hareketi dahil olmak üzere hücrelerin biyolojik durumu hakkında kantitatif bilgiler verir [34-36].

Bilindiği üzere hücre membranı birçok protein içeren çift tabakalı lipit yapısındadır ve lipit moleküllerinin polar grupları akuatik çevreye bakarken, hidrofobik hidrokarbon zincirleri membranın iç kısmına bakmaktadır. Hücrenin iç kısmı kompleks bir yapıya sahip olup pekçok membranla çevrili partikül içermektedir (mitokondri, vakuol, nukleus v.b.) Bu sebeple hücre membranı yüksek olarak yalıtıkan hücrenin iç kısmı iletkendir [37]. Hücreler büyüme esnasında, ortamdaki yüksüz veya zayıf yüklü maddeleri yüksek yüklü maddelere dönüştürerek iletkenliği artırır ve bu iletkenlik ortamla ilişkili olan elektrodlarla ölçülerek empedans hesaplanır [38].



Şekil 3.10. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (RTCA)



Şekil 3.11. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi Uygulamasının 3 Adımda Şematik Gösterimi (1) Hücrelerin Ekimi, (2) Toksik Ajanın Eklenmesi, (3) Otomatik Görüntüleme [39].

Mikro-elektronik sensör üzerindeki hücre deteksiyonu prensibi: (A) Hücrelerin ekimi yapılmadan önce hücre indeksi (CI) değeri sıfırdır; (B) Hücrelerin varlığı elektrot veya ara-yüzey empedansındaki lokal iyonik ortamı etkiler, böylelikle elektrot empedansında ve hücre indeksinde artışa yol açar; (C) Kontrol hücreleri [■] devamlı olarak çoğalır ve elektrotlara daha fazla hücre tutunursa elektrot empedansında daha çok artış olur ve daha büyük hücre indeksi değerine neden olur; (D) Hücreler, toksik ajana maruz kalması sonucu öldükleri zaman hücre indeksi değeri azalır [▲] [39].

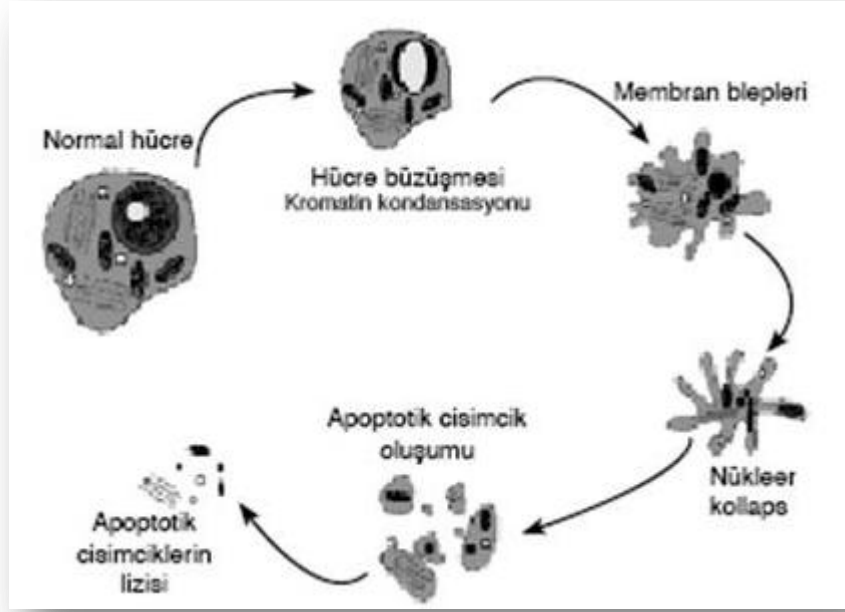
Çalışmada kullanılacak olan hücrelerin (H69AR, H1299 ve L929 Fibroblast) hazırlanan formülasyonlarla muamelesi sonucu proliferasyonunu incelemek için gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA SP instrument, Roche, Almanya) kullanılmıştır. Bu amaçla altın kaplı 96 kuyucuklu e-plakanın her bir kuyucuğuna 100 µL besiyeri konur ve e-plaka etüv içerisinde bulunan RTCA cihazına yerleştirilir. Plaka ile cihazın aynı sıcaklığa gelmesi için 10 dakika beklenir. Daha sonra e-plaka cihazdan çıkarılarak kuyucuklara hücrelerin ekimi yapılır. (10000 hücre/kuyucuk) E-plaka tekrar etüve yerleştirilerek 10 dakika bekletilir ve 10 dakika sonunda okuma başlatılır. Hücrelerin e-plaka'ya tutunması ve çoğalması için

yaklaşık 12 saat bekletilir. 12 saat sonunda hücreler büyüme fazına geçtiği esnada farklı oranlarda nanopartikül, serbest ilaç, serbest ilaç/kuersetin, ilaç yüklü nanopartikül, serbest kuersetin ve ilaç yüklü nanopartikül/kuersetin formülasyonları hücrelerin üzerine ilave edilir. Plaka etüve yerleştirilir; Sistem, 10 dakika ara ile gerçek zamanlı empedans ölçümü alınacak şekilde ayarlanıp 120 saat süre boyunca kültürü yapılmak üzere bırakılır. Sonuç olarak hücrelerin zamana bağlı proliferasyonunu gösteren bir grafik elde edilir.

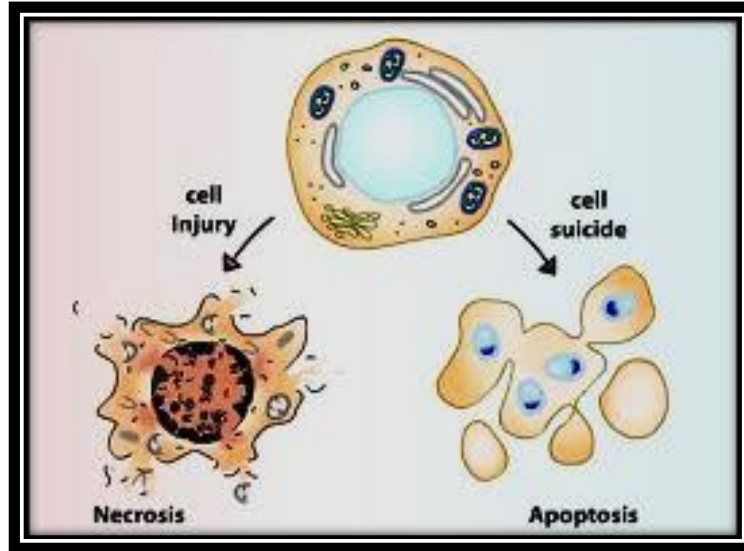
3.6.4. İkili Boyama Metodu ile Apoptoz ve Nekrozun Belirlenmesi

Eski bir Yunan terimi olan apoptoz, kelime anlamı olarak yaprakların ağaçtan, petallerin çiçekten doğal olarak düşmesi anlamına gelmektedir. Dolayısıyla apoptozis, fizyolojik nedenlerden kaynaklanan hücre ölümüyle ilişkilendirilir [40]. Apoptozis; tek bir hücrede büzüşme ve çevre hücrelerle olan temasın kaybolması ile karakterizedir. Hücresel büzüşmenin nedeni, Na, K, Cl taşıyıcı sisteminin durması nedeniyle hücre içi ve dışı arasındaki sıvı hareketinin olmamasıdır [41,42]. Apoptoza uğramış hücrelerde, hücrenin kromatini nükleus membranının çevresinde toplanır ve yoğunlaşır. Hücre membranı intakt yapısını korumakla birlikte üzerinde küçük cepçikler oluşur. Apoptotik cisimcikler membranla kaplıdır ve değişen miktarlarda nükleus veya diğer hücre içi yapıları içerir. Apoptozisde apoptotik hücre veya cisimcikler, komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosit edildiklerinden inflamasyon görülmez [43-45].

Nekroziste ise, apoptozdan farklı olarak hücresel büzüşme yerine şişme olur; apoptozun organizmaya genelde yararlı etkileri olurken nekrozun etkileri her zaman zararlı ve ölümcüldür [46]. Nekrozis; hücre tarafından genlerle programlanmayan ve çeşitli dış etkenlerle gerçekleşen (enfeksiyon, toksinler veya hücresel bileşiklerin kontrolsüz yıkımına sebebiyet verecek travmalar gibi) olaylar sonucu meydana geldiği için patolojik hücre ölümü şeklinde de anılır. Ayrıca hücreyle birlikte mitokondirilerde de şişme gözlenir, diğer organeller ise plazma içinde dağılır. Şişme sonucunda hücre zarı patlar ve bütünlüğünü kaybeder, proteolitik enzimler içeren plazma, hücreler arası boşluğa sızar, doku çevresinde inflamasyon ile birlikte zedelenme oluşturur [41, 47].



Şekil 3.12. Apoptoza uğrayacak hedef hücrede görülen morfolojik değişiklikler [128]



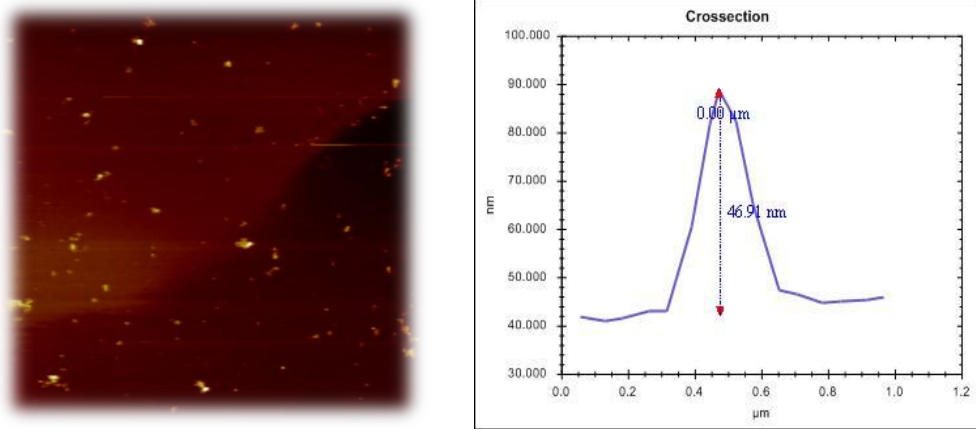
Şekil 3.13. Apoptoz ve Nekrozun Morfolojik Görüntüsü [31]

4.DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMALAR

4.1. Kitosan Nanopartiküller

4.1.1. Morfolojik Değerlendirmeler

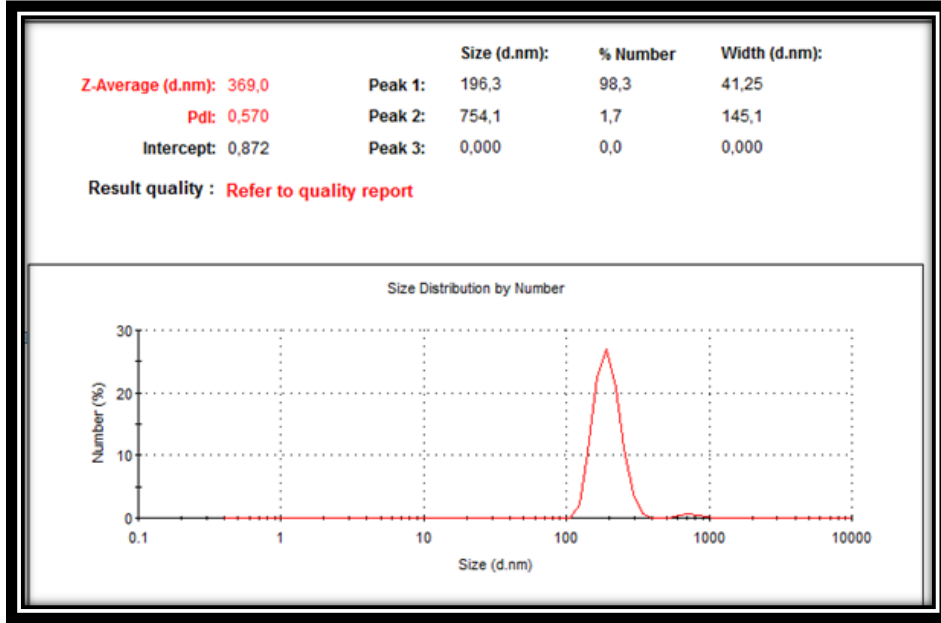
Bu kısımda iyonik jelasyon yöntemi ile hazırlanan kitosan nanopartiküller sentezlenmiştir. Elde edilen nanopartiküllerin morfolojik değerlendirmelerinin yapılabilmesi amacıyla AFM (Atomik Kuvvet Mikroskobu) görüntüsünden yararlanılmıştır. Şekil 4.1.'de kitosan nanopartiküllerinin AFM görüntüleri sunulmuştur. Buna göre, AFM ile alınan görüntülerde boyutların 45-170 nm aralığında olduğu görülmüştür.



Şekil 4.1. Hazırlanan kitosan nanopartiküllerin AFM görüntüsü

4.1.2. Boyut ve Yük Analizi

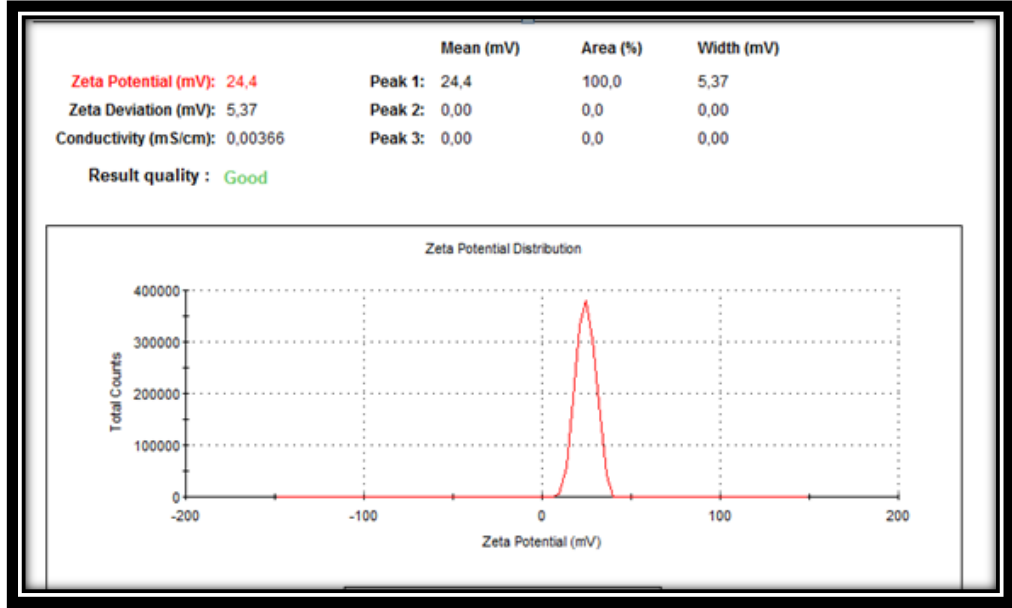
Hazırlanan nanopartiküllerin Zeta-Sizer ile yapılan ölçümler sonrasında boyutların 150- 370 nm aralığında olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Hazırlanan kitosan nanopartiküllerin Zeta-Sizer'da hacimce boy dağılımı grafiği

Grafiğe bakıldığında nanopartiküllerin sayıca %98.3'ünün 196 nm büyüklüğünde olduğu, %1.7'sinin ise 754 nm olduğu anlaşılmaktadır. Bu durum, partiküllerin zamanla agregasyona uğrayarak topaklaşma yaptığını ve partikül boyutunun büyümesine yol açtığını göstermektedir [129]. Bu da ortalama partikül büyüklüğüne etki ederek ortalamanın 369 nm olarak görünmesinde etkili olmuştur.

Kitosan nanopartiküllerinin zeta-potansiyellerinin (yüzey yükü) hesaplanması için yine Zeta-Sizer cihazından yararlanılmıştır. Sonuçlar Şekil 4.3.' te sunulmuştur.



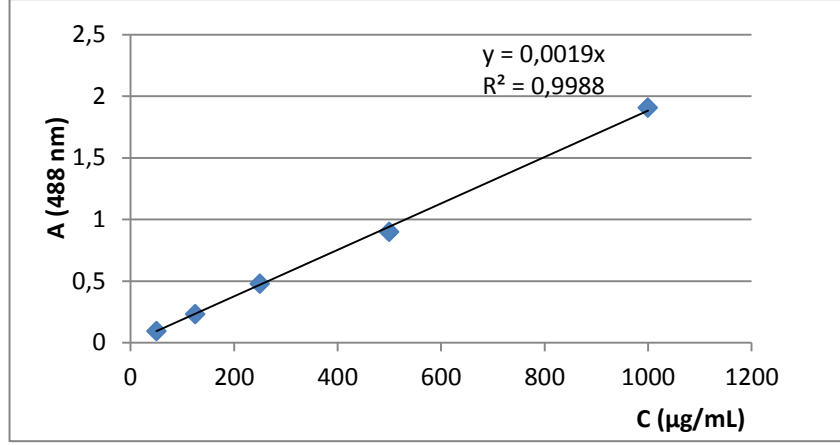
Şekil 4.3. Boş kitosan nanopartiküllerin zeta-potansiyeli grafiği

Elde edilen zeta-sizer sonuçlarına göre, boş nanopartikülün zeta-potansiyeli 24.4 mV olarak ölçülmüştür (Şekil 4.3.) Sonuçlar, kitosan nanopartiküllerinin yüzey yükünün beklendiği üzere pozitif yüke sahip olduğunu göstermektedir [115,116].

4.2. Nanopartiküllere Etken Madde Yüklenmesi ve Salımı

4.2.1. İlaç Yükleme Çalışmaları

Kitosan nanopartiküllere doksorubisin etken maddesinin yüklenmesi amacıyla öncelikle doksorubisine ait bir kalibrasyon grafiği çıkarılmıştır (Şekil 4.4). Bunun için öncelikle Uv/Vis. Spektrofotometre (Nanodrop) kullanılarak 488 nm'de doksorubisinin maksimum absorban verdiği saptanmış ve 50-1000 µg/mL aralığında doksorubisin etken maddesi kullanılarak her aralıktaki konsantrasyonlarda dalga boyları saptanmıştır.

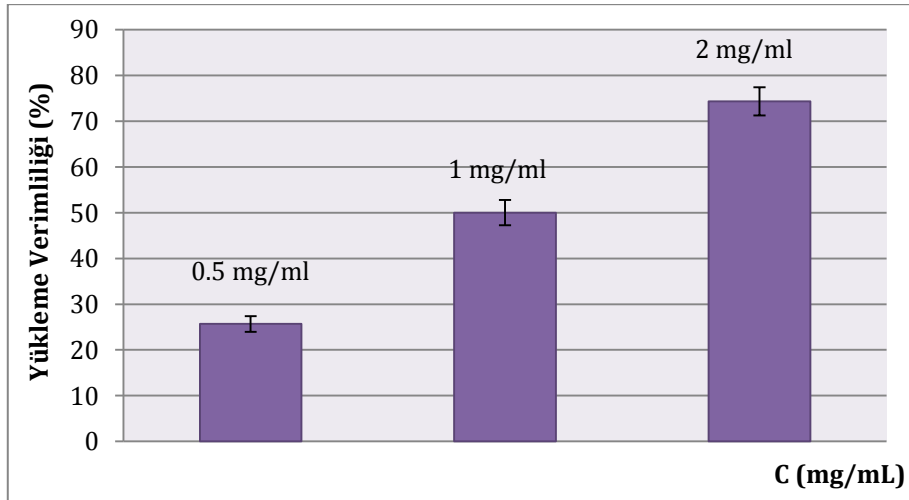


Şekil 4.4. Doksorubisine Ait Kalibrasyon Grafiği

Etken maddenin kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak partiküllere yüklenen madde miktarları hesaplanmıştır (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Farklı derişimlerdeki etken maddenin nanopartiküllere yüklenme oranları

Polimer/ilaç (w/w)	% Hapsedilen ilaç
10/0.5	% 25.6
10/1	% 50.0
10/2	% 74.3

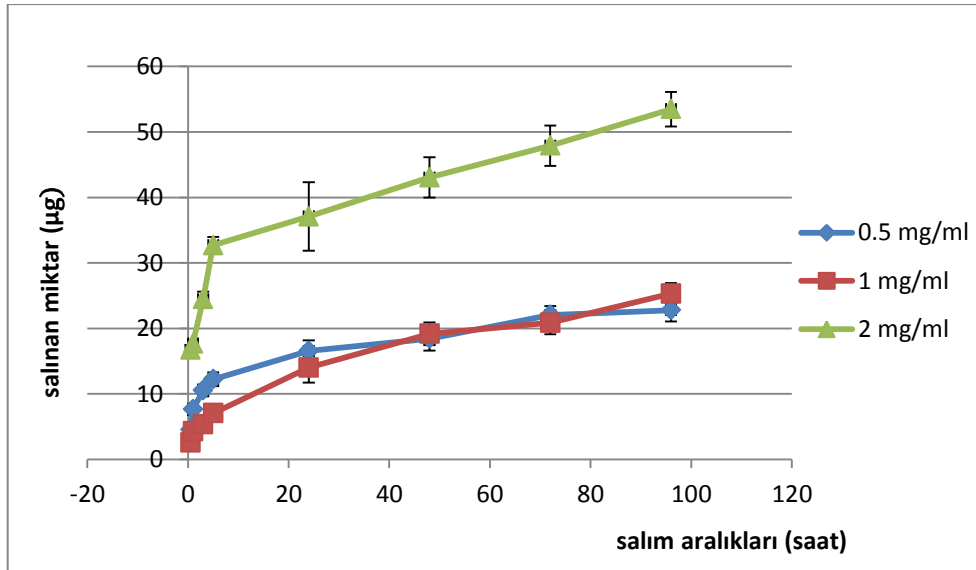


Şekil 4.5. Farklı dozlardaki doksorubisin derişiminin yükleme verimliliğine etkisi

Sunulan çalışmada, sabit miktarda polimer (10 mg) kullanılıp farklı miktarlarda doksorubisin etken maddesi yüklenerek (0.5, 1 ve 2 mg/mL) hazırlanan nanopartiküllerde ilacın tutunma verimleri incelendiğinde; 0.5 mg/mL derişimine sahip doksorubisinin partiküle tutunma verimi % 25.6; 1 mg/mL derişimine sahip doksorubisinin tutunma verimi % 50.0 ve 2 mg/mL derişimine sahip doksorubisinin partiküle tutunma verimi % 74.3 olarak hesaplanmıştır. Görüldüğü gibi partiküle eklenen ilaç miktarının derişimi arttıkça yüklenme verimliliğinin de aynı oranda arttığı saptanmıştır [109, 110].

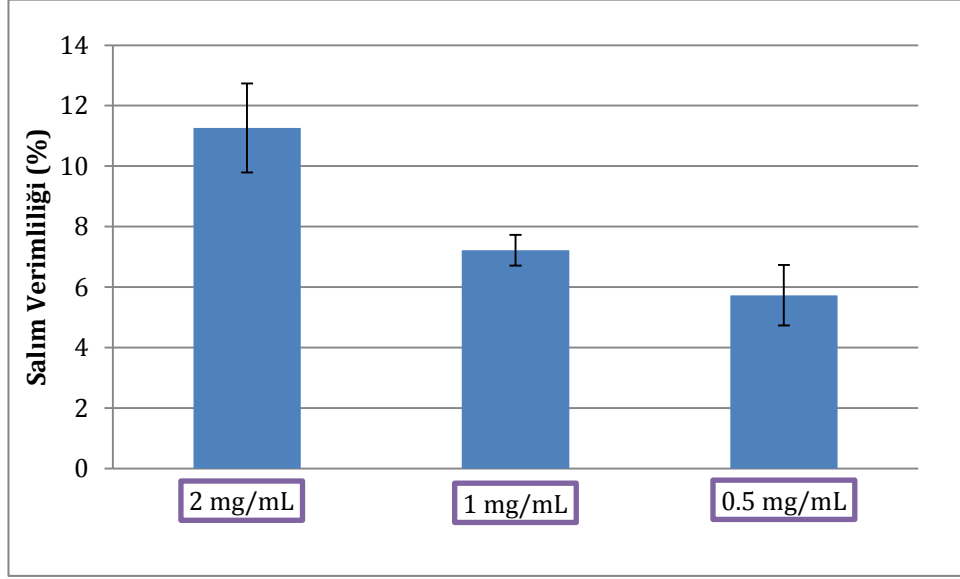
4.2.2. İlaç Salım Çalışmaları

Sunulan çalışmada, etken madde salım kinetiklerinin değerlendirilebilmesi açısından kitosan nanopartiküllere polimer miktarı her birinde sabit tutulmak üzere, 10/0.5, 10/1 ve 10/2 mg polimer/mg doksorubisin oranlarında hazırlanan nanopartiküllerden salınan ilaç miktarlarını tayin etmek amacıyla absorbands ölçümleri nanodrop kullanılarak gerçekleştirilmiştir ve farklı süreler için absorbands değerleri elde edilmiştir. Doksorubisin için elde edilen kalibrasyon eğrisi, absorbands değerleri ve yüzde hapsedilen ilaç miktarları kullanılarak salınan ilacın mikrogram cinsinden değeri bulunmuştur ve farklı konsantrasyonlardaki ilacın zamana karşı % kümülatif değerleri grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.6.)



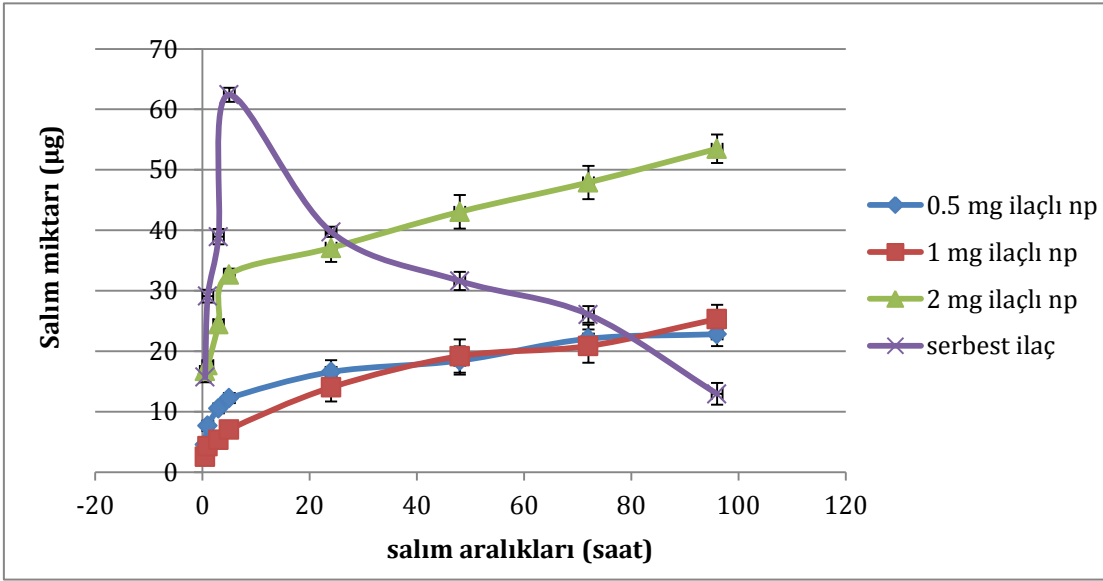
Şekil 4.6. Kitosan nanopartiküllerden kümülatif salınan ilaç miktarının zamanla değişimini gösteren grafik

İlaç yüklü kitosan nanopartiküllerin ilaç salımları 96 saat süreyle (4 gün) takip edilmiştir. Şekil 4.6.'da görüldüğü gibi kitosan nanopartiküllerden birim zamanda salınan etken madde miktarı partiküllere yüklenen oran ile doğru orantılı olarak değişmektedir. 2 mg/mL oranında hazırlanan partiküllere yüklenen etken madde miktarı 0.5 mg/mL oranında hazırlanan partiküllerden fazla olduğu için, 2 mg/mL oranında hazırlanan partiküllerden salınan etken madde miktarı daha yüksektir.



Şekil 4.7. Kitosan nanopartiküllerden % salınan ilaç miktarının zamanla değişimi

Salım profilleri incelendiğinde, kümülatif salınan ilaç miktarının nanopartiküle yüklenen ilaç miktarıyla doğru orantılı olduğu gibi % salınan ilaç miktarlarıyla da doğru orantılıdır. Şekil 4.7.'ye bakıldığında; 2 mg/mL derişimindeki ilaç yüklü nanopartiküllerden salınan ilaç verimliliği %11.26; 1 mg/mL derişimine sahip partikülden salınan ilaç verimliliği % 7.21 ve 0.5 mg/mL derişimindeki nanopartiküllerden salınan ilaç verimliliği % 5.73 olarak hesaplanmıştır. Görüldüğü gibi partiküllerin ilaç tutunma verimliliği yüksek iken (Şekil 4.5.) %salınan ilaç miktarının oldukça düşük olması dikkat çekicidir.



Şekil 4.8. İlaç yüklü nanopartiküller ile serbest ilacın salım kinetiklerinin karşılaştırılması

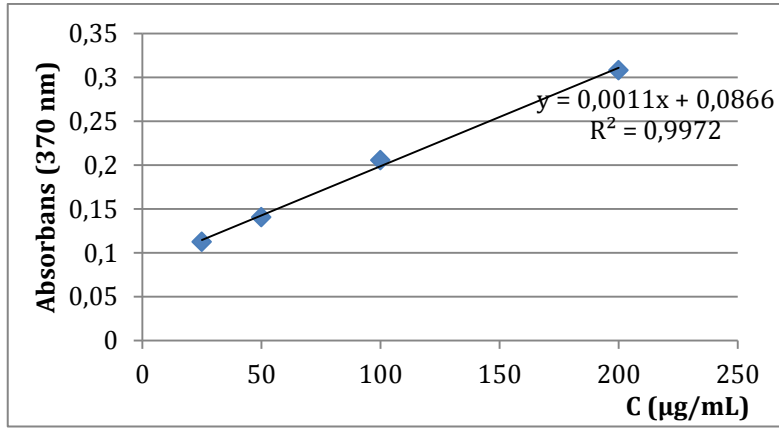
Doksorubisin yüklü partiküllerin zamana bağlı salım profillerini serbest ilaç salımı ile karşılaştırmak amacıyla doksorubisin partiküle hapsedilmemiş haliyle (serbest ilaç formunda) salım kinetiği incelenmiştir (Şekil 4.8).

Şekil 4.8.'deki grafikten anlaşılacağı üzere, nanopartikül içerisine hapsedilmeyen serbest doksorubisin yaklaşık 9 saat içerisinde ortama verilerek salımının gerçekleştiği, ancak nanopartikül içerisine hapsedilen doksorubisin salımının 96 saat süre ile gerçekleşerek kontrollü ve uzun süreli salım yaptığı görülmektedir [111]. Bu durum, etken maddenin hemen salındığı türlere göre emilim olayının uzaması ve ilacın biyolojik etkisinin de artmış olması bakımından önem arz etmektedir [112].

4.2.3. İlaç Yüklü Kitosan Nanopartiküllere Kuersetin Bağlanması

Doksorubisin yüklü kitosan nanopartiküllere hapsedilen ilaç verimi hesaplandıktan sonra, bu kompleks 1mg/mL derişiminde kuersetin ile muamele edilerek kuersetin etken maddesinin ilaç ile etkileştirilmesi ve nanopartiküllü yapıda tutuklanması sağlanmıştır. Bunun için öncelikle kuersetine ait bir kalibrasyon grafiği çıkarılmıştır (Şekil 4.9). Uv/Vis. Spektrofotometre (Nanodrop) kullanılarak 370 nm'de kuersetinin maksimum absorbans verdiği saptanmış ve 25-200 µg/mL aralığında

kuersetin etken maddesi kullanılarak her aralıktaki konsantrasyonlarda dalga boyları saptanmıştır.



Şekil 4.9. Kuersetine Ait Kalibrasyon Grafiği

Partikül içerisine hapsedilen kuersetin miktarını bulmak amacıyla UV spektrofotometrede 370 nm dalga boyunda, “bağlanma öncesi örnek” ve “bağlanma sonrası örnek” şeklinde ölçülen absorbans değerleri farkından yararlanılarak kuersetin etken maddesinin nanopartiküllere bağlanma kapasitesi yüzde bağlanma şeklinde hesaplanmıştır.

Yapılan deneysel çalışmalar sonunda doksorubisin yüklü kitosan nanotaşıyıcılara ortalama kuersetin bağlanma kapasitesi yaklaşık olarak %57 olarak hesaplanmıştır.

4.3. Hücre ile Etkileşim Çalışmaları

4.3.1. Hücre Canlılık ve Proliferasyon Testi (WST-1)

Çalışmanın bu bölümünde farklı derişimlerde hazırlanan boş kitosan nanopartikül, ilaçlı nanopartikül, saf ilaç, ilaçlı kuersetin, kuersetin yüklü ilaçlı nanopartikül ve saf kuersetin şeklindeki formülasyonların H69AR, H1299 ve L929 Fibroblast hücreleri üzerine sitotoksik etkileri incelenmiştir.

Bunun için hücreler, öncelikle 96 kuyucuklu plaklara 7×10^3 hücre/ mL derişiminde ekilmiştir, 24 ve 48 saat olmak üzere ayrı ayrı ekilip etüvde inkübe edilmiştir. Hücre canlılığının kontrolü için WST-1 testi yapılmıştır. Plaklar 37°C, %5 CO₂'li etüvde inkübe edildikten sonra kuyucuklardaki vasat atılıp yerine taze besiyeri ve üzerine

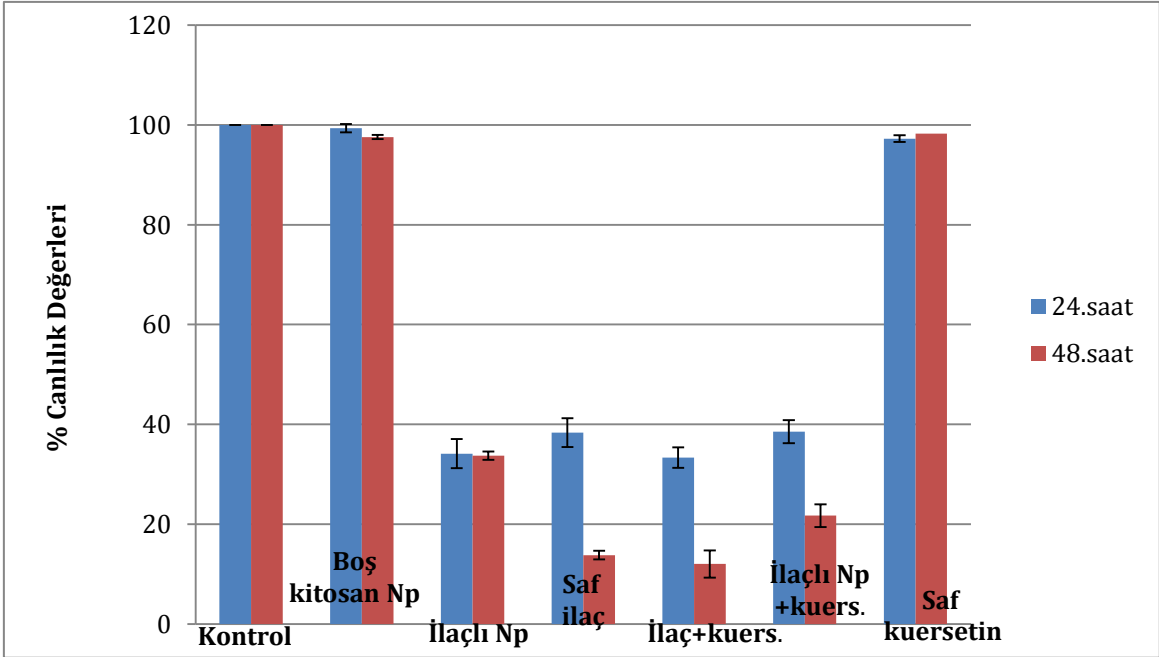
WST-1 çözeltisi eklenmiştir. Daha sonra bu plaka 4 saat karanlıkta , etüvde inkübe edilmek üzere bekletilmiştir. Bu 4 saat sonunda kuyucuklardaki vasat alınarak 440 nm’de absorbans ölçümü yapılmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.2.’deki gibidir.

Çizelge 4.2. Hazırlanan boş nanopartikül, ilaçlı nanopartikül, saf ilaç, ilaçlı kuersetin, kuersetin yüklü ilaçlı nanopartikül ve saf kuersetinin H69AR hücreleri üzerine 24 ve 48 saatlik sitotoksik etkileri

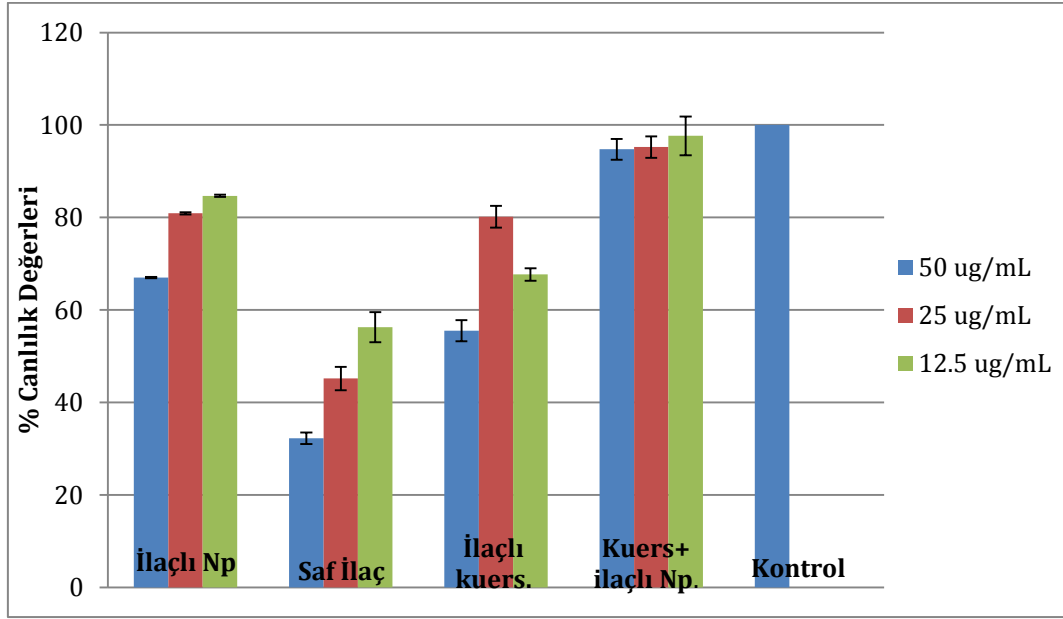
	Derişim ($\mu\text{g/ml}$)	(24sa) H69AR hücreleri %canlılık \pm Std	(48sa) H69AR hücreleri %canlılık \pm Std
Kontrol	0	100	100
Boş Np	50	102.5 \pm 1.4	98.46 \pm 2.7
	25	97.58 \pm 3.7	101.9 \pm 3.0
	12.5	105.1 \pm 1.9	99.58 \pm 2.8
İlaçlı Np	50	34.13 \pm 2.3	33.73 \pm 3.2
	25	71.84 \pm 1.5	50.81 \pm 3.5
	12.5	96.20 \pm 2.7	57.17 \pm 1.4
Saf İlaç	50	38.34 \pm 3.2	13.81 \pm 5.4
	25	32.65 \pm 4.1	21.53 \pm 4.7
	12.5	29.10 \pm 2.5	32.41 \pm 5.8
İlaçlı Kuersetin	50	33.34 \pm 4.8	12.03 \pm 1.9
	25	33.73 \pm 5.9	20.36 \pm 4.8
	12.5	33.84 \pm 4.8	90.64 \pm 7.2
Kuersetin Yüklü İlaçlı Np	50	38.52 \pm 4.1	21.71 \pm 5.0
	25	43.88 \pm 2.5	36.27 \pm 2.9
	12.5	73.89 \pm 3.2	48.67 \pm 1.7

Saf Kuersetin	50	97.54±5.8	95.48±2.9
	25	103.5±4.7	103.9±3.7
	12.5	105.8±3.8	103.89±2.8

Bu çalışmada 50, 25 ve 12.5 µg/mL derişimlerinde boş nanopartikül, ilaçlı nanopartikül, saf ilaç, ilaçlı kuersetin, kuersetin yüklü ilaçlı nanopartikül ve saf kuersetin formülasyonları H69AR hücreleri üzerine uygulanarak sitotoksik etkileri incelenmiştir. Çizelge 4.2.'de görüldüğü gibi boş kitosan nanopartiküller ile etkileşen H69AR hücrelerinin % 102.5'i canlı kalmıştır. Bu da kullanılan kitosan polimerinin hücreler için herhangi bir toksik etkisi olmadığını göstermektedir [115,130-132]. (Diğer sonuçlar apoptotik/nekrotik indeks değerleriyle birlikte açıklanmıştır).



Şekil 4.10. Boş nanopartikül, ilaçlı nanopartikül, saf ilaç, ilaçlı kuersetin, kuersetin yüklü ilaçlı nanopartikül ve saf kuersetin formülasyonlarının H69AR hücreleri üzerine 24 ve 48 saatlik sitotoksik etkileri

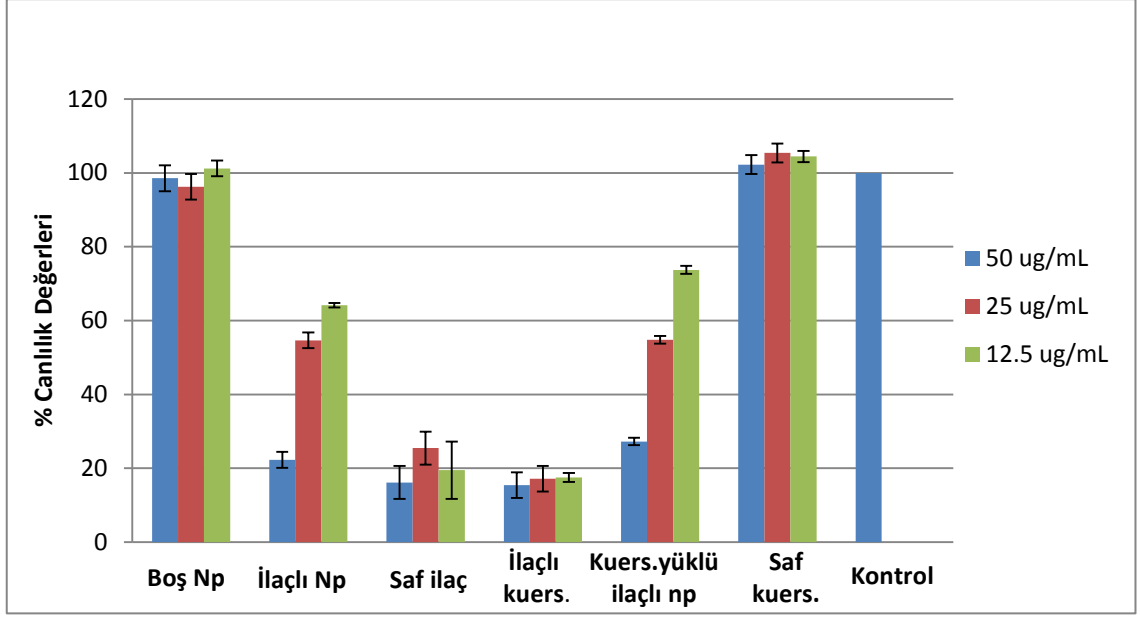


Şekil 4.11. İlaçlı nanopartikül, saf ilaç, ilaçlı kuersetin, kuersetin ve ilaçlı nanopartikül formülasyonlarının H69AR hücreleri üzerine sitotoksik etkileri

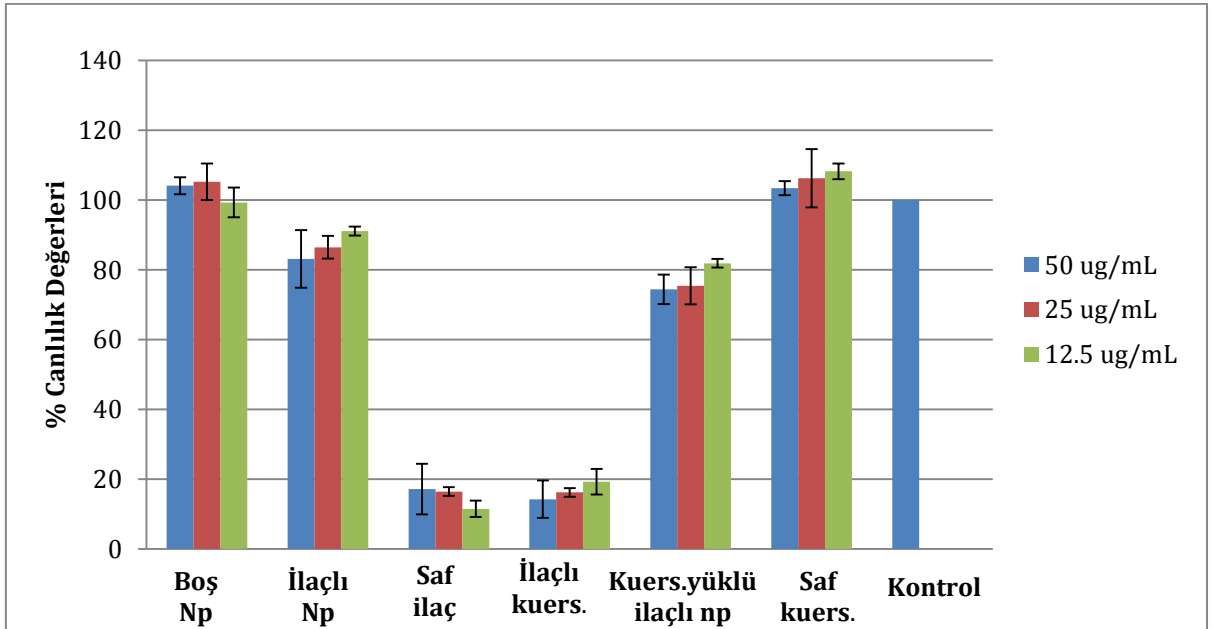
Yapılan deneyler neticesinde kuersetin yüklü ilaçlı nanopartiküllerin H69AR kanser hücrelerinin canlılığını önemli ölçüde düşürdüğü görülmektedir. 24 saatlik etki sonucunda hücre canlılığı %38'lerde iken, 48 saatin sonunda bu etkinin %21'lere düştüğü görülmüştür. Bu noktada yapılan değerlendirmede kuersetin ve ilacın kombine edilerek nanopartiküle yüklenmesi ve bu şekilde hücrelere uygulanması birbirleriyle sinerjistik etki yaptığı fikrini doğurmuştur [101]. Çünkü ilaçlı nanopartikülün hücrelere tek başına verilip ardından kuersetin uygulanması sonucunda, benzer etkinin görülmediği saptanmıştır. Bu şekilde yapılan bir dizi deney sonucunda hücre canlılığının hep %90'ların üzerinde olduğu, kontrole hemen hemen aynı oranda olduğu görülmüştür. Yani nanopartiküllerin içerisine kuersetin ve doksorubisinin aynı anda yüklenerek hücrelere verilmesi ile hücre canlılığı 48 saatin sonunda %21 iken ayrı ayrı verilmesi durumunda ise bu oran %94 düzeyinde olduğu gözlenmiştir [101,134].

Çizelge 4.3. Boş nanopartikül, ilaçlı nanopartikül, saf ilaç, ilaçlı kuersetin, kuersetin yüklü ilaçlı nanopartikül ve saf kuersetin formülasyonlarının H1299 ve L929 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri (**48 saatlik**)

	Derişim ($\mu\text{g/ml}$)	H1299 Hücreleri %Canlılık \pm Std	L929 Fibroblast Hücreleri %Canlılık \pm Std
Kontrol	0	100	100
Boş Np	50	98.56 \pm 1.5	104.12 \pm 2.5
	25	96.25 \pm 2.9	105.25 \pm 3.8
	12.5	101.2 \pm 3.5	99.33 \pm 2.3
İlaçlı Np	50	22.25 \pm 4.8	83.12 \pm 2.1
	25	54.65 \pm 3.8	86.45 \pm 4.1
	12.5	64.14 \pm 2.4	91.11 \pm 5.3
Saf İlaç	50	16.14 \pm 1.9	17.14 \pm 5.2
	25	25.45 \pm 2.5	16.45 \pm 2.8
	12.5	19.47 \pm 3.6	11.48 \pm 3.5
İlaçlı Kuersetin	50	15.41 \pm 2.8	14.25 \pm 4.9
	25	17.14 \pm 3.1	16.18 \pm 5.2
	12.5	17.47 \pm 2.9	19.26 \pm 2.7
Kuersetin Yüklü İlaçlı Nanopartikül	50	27.25 \pm 1.4	74.41 \pm 1.4
	25	54.78 \pm 2.5	75.45 \pm 1.9
	12.5	73.71 \pm 3.0	81.87 \pm 4.3
Saf Kuersetin	50	102.25 \pm 1.3	103.45 \pm 2.5
	25	105.40 \pm 4.5	106.25 \pm 4.9
	12.5	104.45 \pm 1.7	108.26 \pm 3.5



Şekil 4.12. Boş nanopartikül, ilaçlı nanopartikül, saf ilaç, ilaçlı kuersetin, kuersetin yüklü ilaçlı nanopartikül ve saf kuersetin formülasyonlarının H1299 hücreleri üzerine 48 saatlik sitotoksik etkileri



Şekil 4.13. Boş nanopartikül, ilaçlı nanopartikül, saf ilaç, ilaçlı kuersetin, kuersetin yüklü ilaçlı nanopartikül ve saf kuersetin formülasyonlarının L929 Fibroblast hücreleri üzerine 48 saatlik sitotoksik etkileri

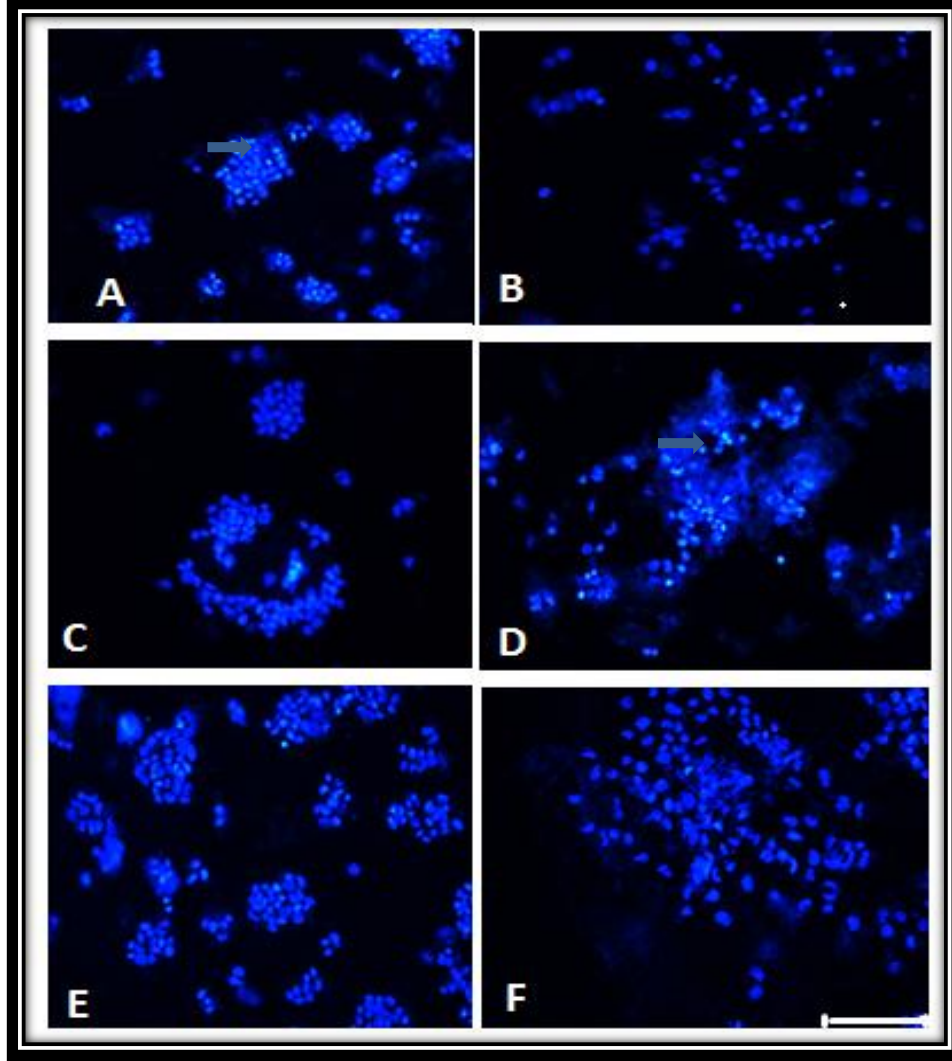
Yapılan bu çalışmada, 50, 25, 12.5 µg/mL derişimlerde hazırlanan boş nanopartikül, ilaçlı nanopartikül, saf ilaç, ilaçlı kuersetin, kuersetin yüklü ilaçlı nanopartikül ve saf kuersetinden oluşan formülasyonların H1299 ve L929 Fibroblast hücreleri üzerine olan sitotoksik etkileri incelenmiştir. Bunun için H1299 ve L929 hücreleri 7×10^3 hücre/mL derişimde 96 kuyucuklu plaklara ekilmiş ve bir gece 37°C, %5 CO₂ etüvde inkübe edildikten sonra bölüm 3.6.2.'de anlatıldığı üzere WST-1 testi yapılmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.3.'teki gibidir.

Bu sonuçlara göre, H1299 ve L929 hücrelerine uygulanan farklı formülasyonların karşılaştırılması yapılmıştır. Örneğin, 50 µg/mL derişimdeki ilaçlı nanopartikül ile etkileşen H1299 hücrelerinin %22.25'i canlı iken, aynı derişimdeki L929 hücrelerinin %83.12'si canlı kalmıştır. Aynı şekilde 50 µg/mL derişimdeki saf ilaçla etkileşen H1299 hücrelerinin %16.14'ü canlı iken aynı derişimdeki L929 hücrelerindeki canlılık oranı %17.14 olarak görülmüştür. Bu iki karşılaştırmadan yola çıkarak ilaçlı nanopartikülün H1299 hücreleri üzerine sitotoksitesi oldukça yüksek iken L929 hücreleri üzerindeki sitotoksik etki oldukça düşük olarak gözlemlenmiştir. Yine aynı şekilde 50 µg/mL derişimindeki kuersetin yüklü ilaçlı nanopartikül ile etkileşen H1299 kanser hücrelerinin %27.25'i canlı iken aynı derişime sahip L929 hücrelerindeki canlılık oranı %74.41 olarak görülmüştür. Burada nanopartikül içerisinde hapsolmuş olan ilaç ve kuersetinli ilaç formülasyonunun kanserli hücrelerde %canlılık değerini oldukça düşürdüğü; ancak fibroblast hücrelerinde bu değer kanser hücrelerine göre oldukça yüksek olduğu görülmektedir.

4.3.2. İkili Boyama Metodu ile Apoptoz ve Nekrozun Belirlenmesi

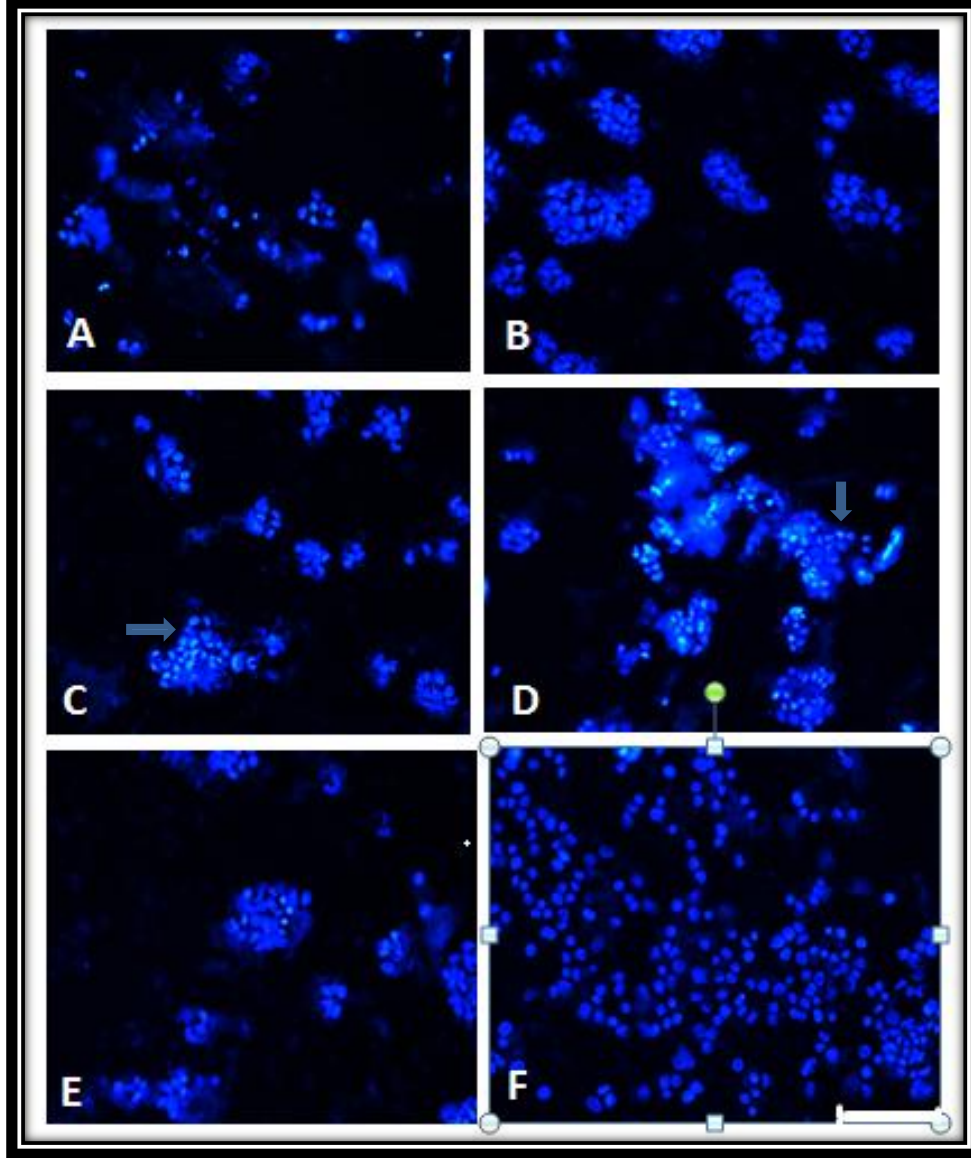
İkili boyama metodunda kullanılan Hoechst 33342 floresan boyası canlı hücrelerin zarlarından geçerek çekirdeği boyar ve floresan mikroskopta DAPI filtresi ile çekirdeklerin mavi görünmesini sağlar. Ayrıca çekirdek morfolojisinin değerlendirilmesi de bu yöntemle anlaşılır. Floresan boyalar DNA'ya bağlanabildiklerinden hücrenin kromatini dolayısıyla nukleusu görünür hale gelir. İkili boyama metodunda kullanılan, ölü ve/veya plazma membranı hasarlı hücrelerin zarlarından geçerek çekirdeklerin floresan ışık altında kırmızı görünmelerini sağlayan bir diğer boya propidyum iyodür (PI) boyasıdır. Bu boya membranı sağlam olan (canlı) hücreleri boyamağı için canlı hücre ile yaşayan

hücrenin ayırımına olanak tanirlar. Sağlıklı ve apoptotik hücre çekirdekleri mavi renkte olup FITC floresan filtresi ile görüntülediğinde yeşil görünürlerken, nekrotik hücreler PI boyası ile boyandıklarından kırmızı görünürler. Yapılan nekrotik indeks çalışmasında 480-520 nm dalga boyunda inceleme yapılmış olup bu dalga boyunda aynı anda nekrotik hücrelerin çekirdeği kırmızı; apoptotik veya sağlıklı hücrelerin çekirdekleri yeşil olarak elde edilmiştir.



Şekil 4.14. Hoechst 33342 floresan boya kullanılarak yapılan ikili boyamadan elde edilen apoptotik hücre fotoğrafları (**24 saatlik etki**); (A) 10/2 mg polimer/mg etken madde oranında ilaçlı nanopartikül ile muamele edilmiş H69AR hücreleri, (B) Yalnız ilaç (doksorubisin) ile muamele edilmiş H69AR hücreleri, (C) İlaçlı kuersetin ile muamele edilmiş H69AR hücreleri, (D) Kuersetin yüklü ilaçlı nanopartiküllerin H69AR hücreleri ile etkileşimi, (E) Yalnız kuersetin ile etkileştirilen H69AR hücreleri, (F) İlaç, kuersetin ve/veya nanopartiküllerle muamele edilmemiş H69AR hücreleri (Kontrol Grubu), hücreler komplekslerle etkileştirilmediğinden hücreler apoptoza uğramamış, çekirdek sınırları normal ve çekirdek parçalanmamış görülmektedir. Oklar apoptotik hücrelerden bazılarını göstermektedir. Apoptoza

uğramış hücre çekirdekleri parlak, parçalanmış, apoptoza uğramayanlar soluk mavi görünmektedir. Fotoğraflar Leica inverted floresan mikroskobu ile 200X büyütmede çekilmiştir. Ölçek 50 µm mesafeyi göstermektedir.



Şekil 4.15. Hoechst 33342 floresan boya kullanılarak yapılan ikili boyamadan elde edilen apoptotik hücre fotoğrafları (**48 saatlik etki**); (A) Saf ilaç (doksorubisin) ile etkileştirilmiş H69AR hücreleri, (B) Saf kuersetin ile etkileştirilmiş H69AR hücreleri, (C) 10/2 mg polimer/mg etken madde oranında ilaçlı nanopartikül ile muamele edilmiş H69AR hücreleri (D) Kuersetin yüklü ilaçlı nanopartikül ile etkileştirilen H69AR hücreleri, (E) İlaçlı kuersetin ile muamele edilmiş H69AR hücreleri, (F) İlaç, kuersetin ve/veya nanopartiküllerle muamele edilmemiş H69AR hücreleri (Kontrol Grubu); Fotoğraflar Leica inverted floresan mikroskobu ile 200X büyütmede çekilmiştir. Ölçek, 50 µm mesafeyi göstermektedir.

İkili boyama ile elde edilen apoptotik/nekrotik indeksler Çizelge 4.2.'de ve floresan inverted mikroskopta çekilen fotoğraflar Şekil 4.13. ve Şekil 4.14.'te; 24 ve 48 saatlik etkileri olarak verilmiştir.

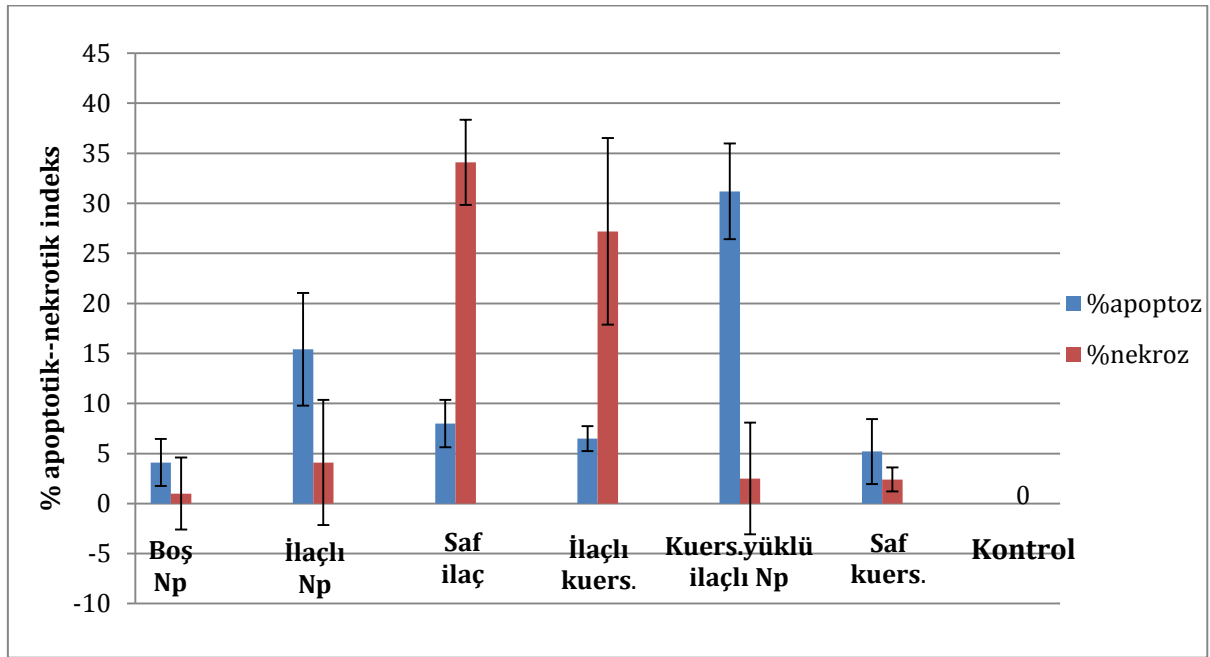
Buna göre, düşük derişimlerde nekrotik indeks çok yüksek değildir; ancak derişimin artması toksisiteyi de artırdığı için nekrozun da artmasına sebep olmuştur. Özellikle saf ilacın kullanılarak hücreye uygulandığı örnekler nekrotik indeksin en fazla görüldüğü örnek grubu olup, örneğin 24 saatlik etki sonunda 50 µg/mL derişimine sahip örneklerde yaklaşık nekrotik indeks değeri %34.1 olarak bulunmuştur. Çizelge 4.2.'den de anlaşılacağı üzere nekrotik indeksin en düşük olduğu örnek grupları ise boş nanopartikül, saf kuersetin ve kuersetin yüklü ilaçlı nanopartiküllerin olduğu gruplardır. Örneğin, kuersetin yüklü ilaçlı nanopartiküllerin nekrotik indeks değeri 50 µg/mL olan örnek gruplarında %2.5 olarak saptanmış olup, boş nanopartikülün aynı derişimdeki nekrotik indeks değeri % 1.0 ve saf kuersetinin olduğu örnek grubunda yine bu değer %2.4 olarak bulunmuştur. Yapılan sitotoksosite testi ve ikili boyama sonuçları birbirleriyle uyumludur.

Çizelge 4.4. H69AR hücrelerinde boş nanopartikül, ilaçlı nanopartikül, saf ilaç, ilaçlı kuersetin, kuersetin yüklü ilaçlı nanopartikül ve saf kuersetin uygulamalarının 24 saatlik etkileştirilmeleri sonucu elde edilen apoptotik/nekrotik indeks sonuçları

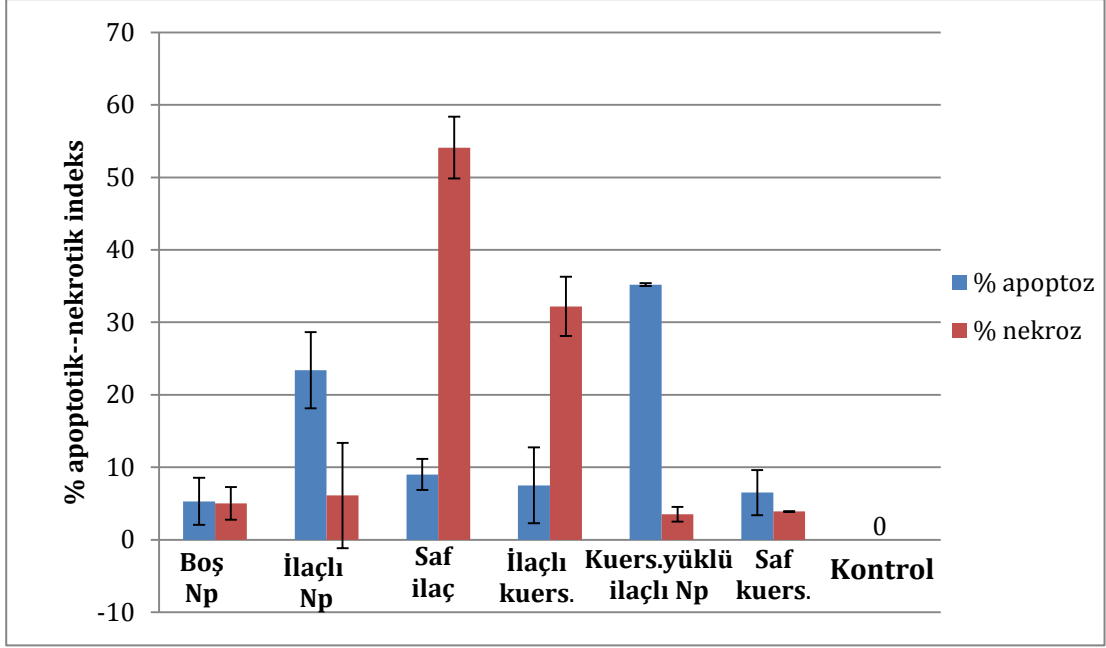
Derişim (µg/ml)	Boş Nanopartikül		İlaçlı Nanopartikül		Saf ilaç		İlaçlı kuersetin		Kuersetin yüklü ilaçlı nanopartikül		Saf kuersetin	
	%apop toz	%nek roz	%apop toz	%nek roz	%apop toz	%nek roz	%apop toz	%nek roz	%apop toz	%nek roz	%apop toz	%nek roz
0	1.2	0	2.3	1.5	0.8	1.6	2.5	1.4	3.2	4.2	1.5	1.8
50	4.1	1.0	15.4	4.1	8	34.1	6.5	27.2	31.2	2.5	5.2	2.4
25	3.8	0	7.8	2.1	4.8	29.2	4.5	21.5	25.7	2.3	4.1	2.7
12.5	1.2	0	4.3	1.4	5.2	19.1	4.1	22.3	17.2	1.7	2.5	3.6

Çizelge 4.5. H69AR hücrelerinde boş nanopartikül, ilaçlı nanopartikül, saf ilaç, ilaçlı kuersetin, kuersetin yüklü ilaçlı nanopartikül ve saf kuersetin uygulamalarının 48 saatlik etkileştirilmeleri sonucu elde edilen apoptotik/nekrotik indeks sonuçları

Derişim (µg/ ml)	Boş Nanopartikül		İlaçlı Nanopartikül		Saf ilaç		İlaçlı kuersetin		Kuersetin yüklü ilaçlı nanopartikül		Saf kuersetin	
	%apop toz	%nek roz	%apop toz	%nek roz	%apop toz	%nek roz	%apop toz	%nek roz	%apop toz	%nek roz	%apop toz	%nek roz
0	0.2	0	1.3	1.5	0.8	0.6	1.5	1.4	1.2	0.2	2.5	2.8
50	5.3	5.0	23.4	6.1	9	54.1	7.5	32.2	35.2	3.5	6.5	3.9
25	8.8	2.4	9.8	2.5	7.6	12.2	6.5	11.6	23.7	4.3	5.1	3.7
12.5	3.2	0	7.1	2.4	4.2	9.1	4.3	22.3	17.5	1.9	1.6	2.7

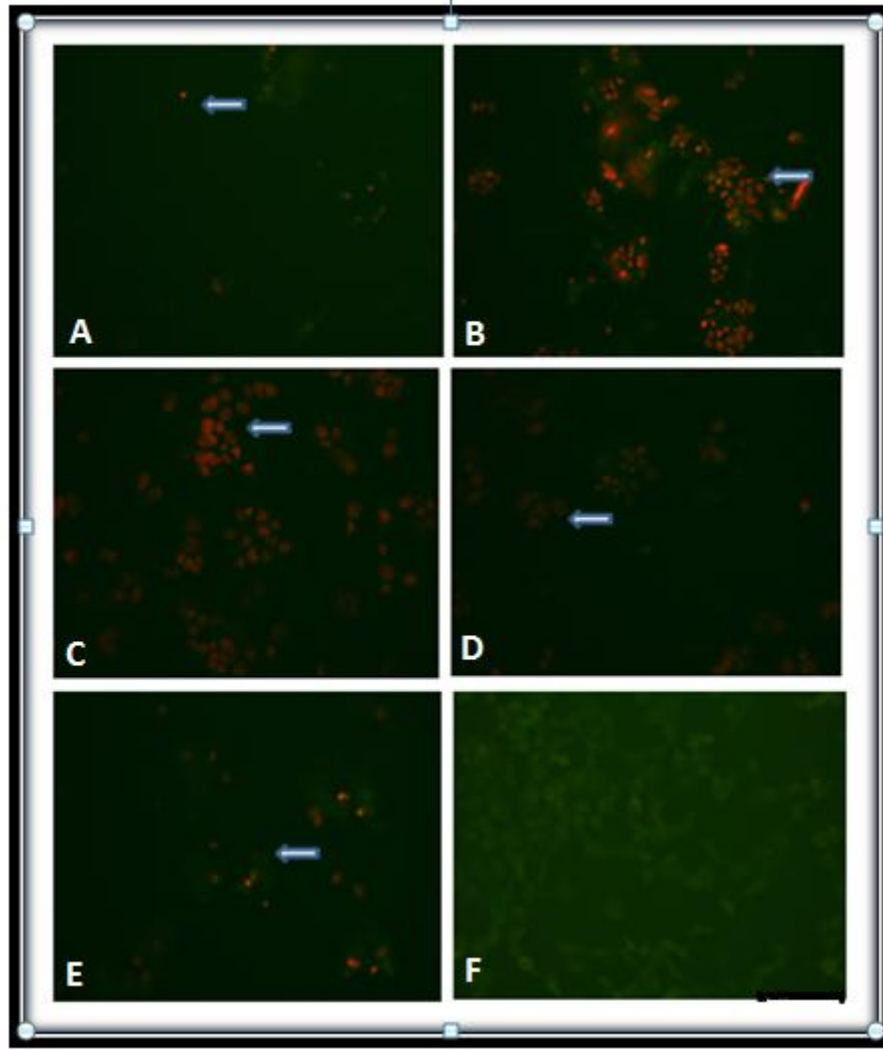


Şekil 4.16. 50 µg/mL derişimindeki örneklerle muamele edilmiş H69AR hücrelerinde 24 saatlik % apoptotik-nekrotik değerler



Şekil 4.17. 50 µg/mL derişimindeki örneklerle muamele edilmiş H69AR hücrelerinde 48 saatlik % apoptotik-nekrotik değerler

Şekil 4.15. ve 4.16.'daki grafiklerde, sitotoksisite ve ikili boyama sonucu elde edilen % apoptotik/nekrotik indekslerden elde edilen bulgulara göre hücrelerde en etkin dozun 50 µg/mL derişimine sahip örneklerde olduğu görülmüştür. Grafiklerde de bu dozdaki derişim üzerinden değerlendirme yapılmıştır.



Şekil 4.18. Hoechst 33342 floresan boya kullanılarak yapılan ikili boyamadan elde edilen nekrotik hücre fotoğrafları (48 saatlik etki); (A) Kuersetin yüklü ilaçlı nanopartiküller ile muamele edilmiş H69AR hücreleri, (B) Yalnız ilaç (doksorubisin) ile muamele edilmiş H69AR hücreleri, (C) İlaçlı kuersetin ile muamele edilmiş H69AR hücreleri, (D) 10/2 mg polimer/mg etken madde oranında ilaçlı nanopartikül ile muamele edilmiş H69AR hücreleri, (E) Yalnız kuersetin ile etkileştirilmiş H69AR hücreleri, (F) İlaç, kuersetin ve/veya nanopartiküllerle muamele edilmemiş H69AR hücreleri (**Kontrol Grubu**); Fotoğraflar Leica inverted floresan mikroskobu ile 200X büyütmede çekilmiştir. Ölçek, 50 µm mesafeyi göstermektedir.

Çizelge 4.6. H1299 hücrelerinde apoptotik/nekrotik indeks sonuçları

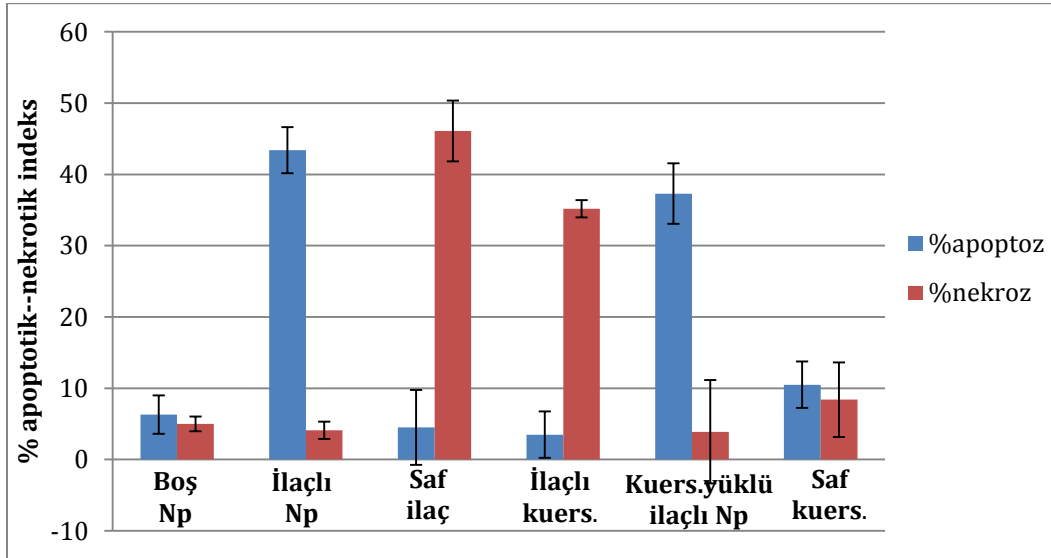
Derişim (µg/ml)	Boş Nanopartikül		İlaçlı Nanopartikül		Saf ilaç		İlaçlı kuersetin		Kuersetin yüklü ilaçlı nanopartikül		Saf kuersetin	
	%apop toz	%nek roz	%apop toz	%nek roz	%apop toz	%nek roz	%apop toz	%nek roz	%apop toz	%nek roz	%apop toz	%nek roz
0	1.2	0	2.3	0.5	1.8	2.6	1.5	1.4	3.2	3.2	2.5	2.8
50	6.3	5.0	43.4	4.1	4.5	46.1	3.5	35.2	37.3	3.9	10.5	8.4
25	7.8	1.4	18.8	2.5	1.6	32.2	4.5	28.5	13.9	1.3	8.4	3.1
12.5	5.2	0	9.3	1.4	1.7	18.1	3.3	12.3	11.5	1.4	1.9	3.6

İkili boyama yöntemi ile yapılan H1299 kanser hücrelerinde ve L929 fibroblast sağlıklı hücrelerdeki apoptotik/nekrotik indekslerin sonuçlarına bakıldığında; 50 µg/mL derişiminde kuersetin yüklü ilaçlı nanopartiküller ile etkileşen H1299 kanser hücrelerinin %37.3'ü apoptotik; %3.9'u nekrotik etki göstermiştir. Oysaki aynı derişimde saf ilacın H1299 kanser hücreleri ile etkileşimi sonucunda hücrelerin %4.5'i apoptotik; %46.1'i nekrotik etki göstermiştir. Dolayısıyla kuersetin yüklü ilaçlı nanopartiküllerin doksorubisin dirençli H1299 kanser hücrelerini apoptoza yönlendirme oranının saf ilaca göre oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Saf ilaç ile etkileşen kanser hücrelerinin büyük çoğunluğunda nekrotik etki gözlenirken, kuersetin yüklü ilaçlı nanopartiküllerde bu oran oldukça düşüktür. Elde edilen sonuçlardan hareketle kuersetin yüklü ilaçlı nanopartikülün kanser tedavisinde olası bir kemoterapötik seçenek olduğu fikri uyanmaktadır [135]. Bununla beraber, L929 fibroblast sağlıklı hücrelerdeki apoptotik/nekrotik etkiye bakıldığında; 50 µg/mL derişimine sahip kuersetin yükü ilaçlı nanopartiküllerin fibroblast hücreleriyle etkileşimi sonucunda apoptotik etki %3'lerde ve nekrotik etki %0'larda gözlenmiştir. Sağlıklı hücrelerdeki apoptotik ve nekrotik değerler dikkate alındığında, kuersetin yüklü ilaçlı nanopartiküllerin fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkinin düşük olması oldukça önem arz etmektedir; çünkü bu durumda sağlıklı hücreler herhangi toksik etkiye maruz kalmayacağından olası yan etkilerin oluşturacağı pekçok zarardan da kaçınmış olacaklardır.

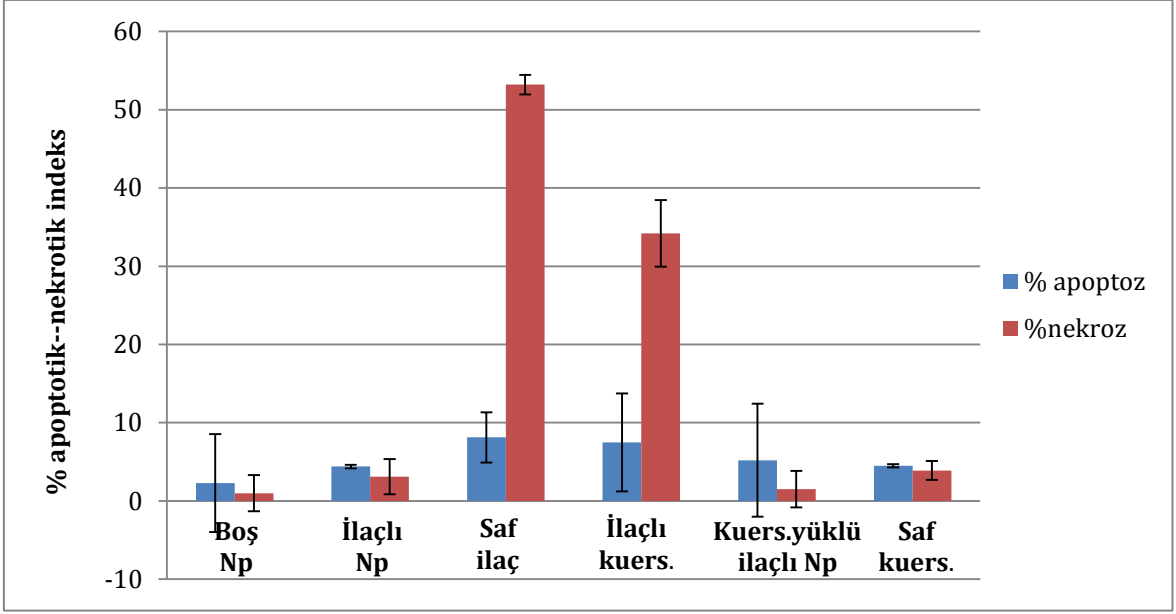
Çizelge 4.7. L929 fibroblast hücrelerinde apoptotik/nekrotik indeks sonuçları

Derişim m (µg/ mL)	Boş Nanopartikül		İlaçlı Nanopartikül		Saf ilaç		İlaçlı kuersetin		Kuersetin yükklü ilaçlı nanopartikül		Saf kuersetin	
	%apop toz	%nek roz	%apop toz	%nek roz	%apop toz	%nek roz	%apop toz	%nek roz	%apop toz	%nek roz	%apop toz	%nek roz
0	0.2	0	1.3	1.5	2.8	1.6	0.5	1.4	2.2	1.2	2.5	0.8
50	2.3	1.0	4.4	3.1	8,12	53.2	7.5	34.2	5.2	1.5	4.5	3.9
25	1.8	1.4	4.8	1.5	4.6	31.2	5.5	21.6	4.6	1.3	5.2	2.7
12.5	0.2	0.7	1.1	0.4	4.5	19.1	2.4	22.5	3.3	1.7	1.9	0.7

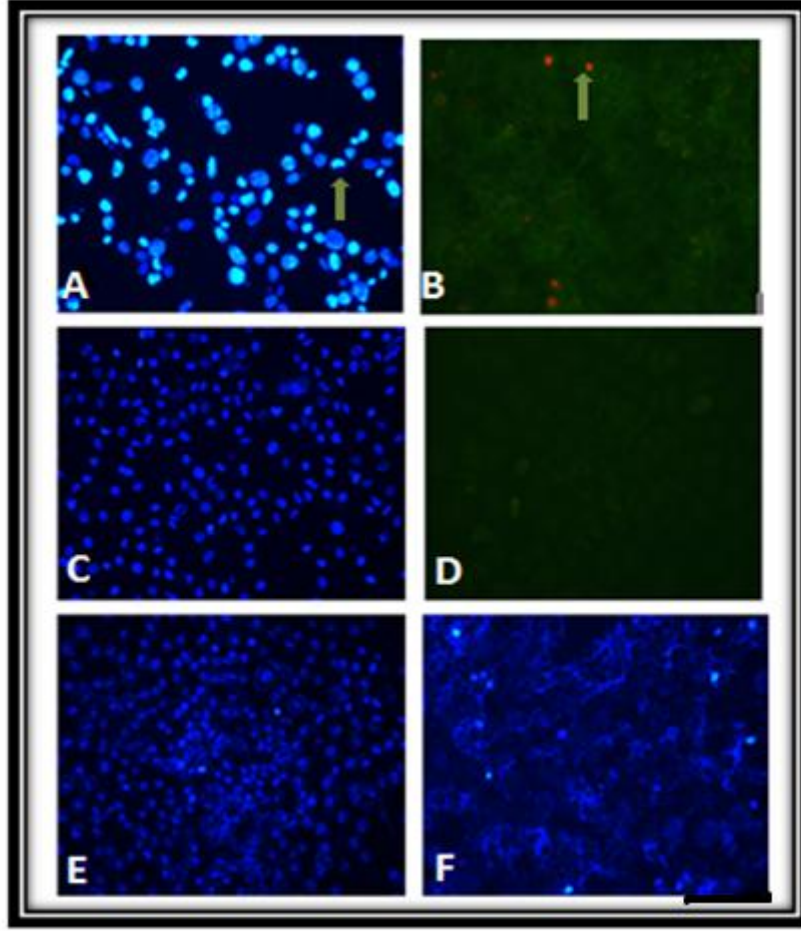
Şekil 4.17. ve 4.18.'deki grafiklerde 50 µg/mL derişimine sahip örnek gruplarının H1299 ve L929 Fibroblast hücreleri üzerindeki 48 saatlik % apoptotik/nekrotik değerleri verilmiştir. Yine burada da H69AR hücrelerinde olduğu gibi 50 µg/mL derişimindeki dozun sitotoksisite ve apoptotik-nekrotik indekslerden elde edilen bulgulara göre hücreler üzerindeki en etkin doz olduğu tesbit edilmiştir.



Şekil 4.19. 50µg/mL derişimindeki örneklerle muamele edilmiş H1299 hücrelerinde 48 saatlik % apoptotik-nekrotik değerler



Şekil 4.20. 50µg/mL derişimindeki örneklerle muamele edilmiş L929 hücrelerinde 48 saatlik % apoptotik-nekrotik değerler



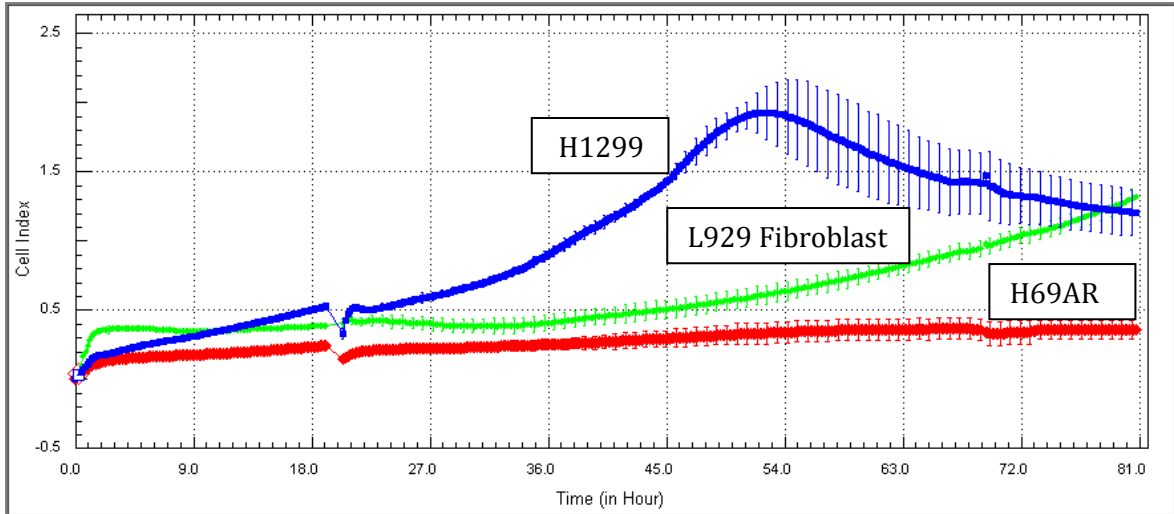
Şekil 4.21. (A) Kuersetin yüklü ilaçlı nanopartiküllerin H1299 kanser hücreleri ile etkileşimini gösteren apoptotik hücre fotoğrafı, (B) Kuersetin yüklü ilaçlı nanopartiküllerin H1299 hücreleri ile etkileşimlerinin nekrotik fotoğrafı, (C) Kuersetin yüklü ilaçlı nanopartiküllerin L929 Fibroblast sağlıklı hücreler ile etkileşimini gösteren apoptotik hücre fotoğrafı, (D) Kuersetin yüklü ilaçlı nanopartiküllerin fibroblast hücreleri ile etkileşimleri sonucundaki nekrotik hücre fotoğrafı, (E) Hiçbir aktif ajan ile muamele edilmemiş H1299 hücreleri (Kontrol grubu) (F) Hiçbir aktif ajan ile muamele edilmemiş L929 fibroblast hücreleri (Kontrol grubu) Fotoğraflar Leica inverted floresan mikroskobu ile 200X büyütmede çekilmiştir. Ölçek, 50 μ m mesafeyi göstermektedir.

4.3.3. Hücre Proliferasyonunun xCELLigence RTCA ile Belirlenmesi

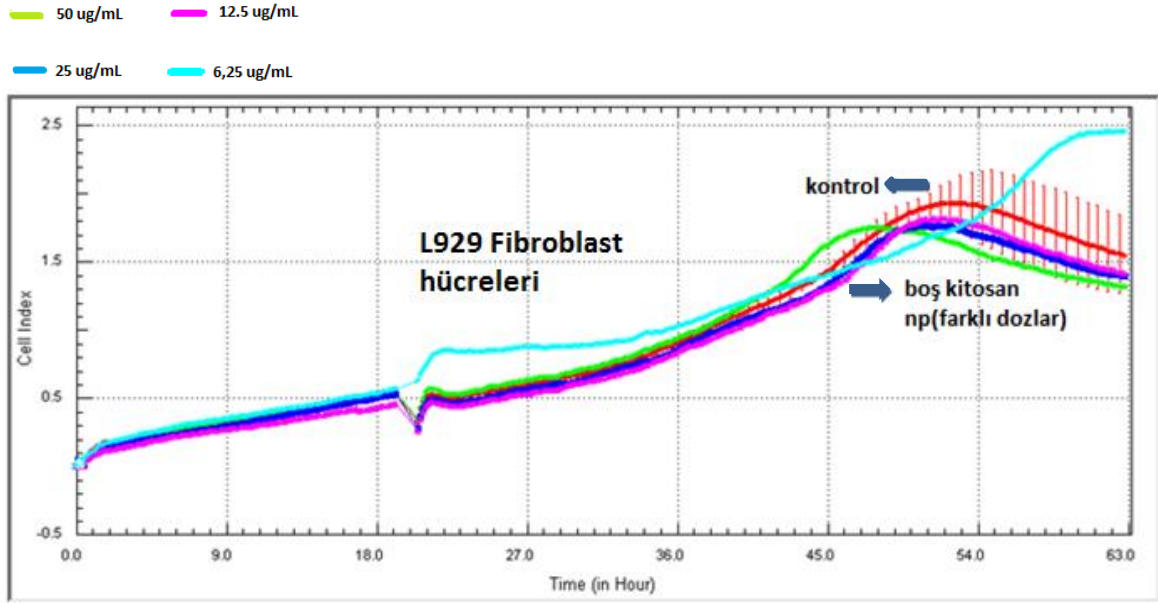
Hücrelerin zamana bağlı olarak çoğalmalarını gözlemlemek amacıyla xCELLigence RTCA sisteminden yararlanılmıştır; sistemin işleyişi Şekil 3.5. ve

3.6.'da gösterilmiştir. Bunun için hücreler altın kaplı 96 kuyucuklu e-plakanın her bir kuyucuğuna 10000 hücre/kuyucuk olacak şekilde hücre ekimi yapılmıştır. E-plaka etüve yerleştirilerek 10 dakika bekletilmiş ve 10 dakika sonunda okuma başlatılmıştır. Hücrelerin e-plaka'ya tutunması ve çoğalması için yaklaşık 12 saat bekletilmiştir. 12 saat sonunda hücreler büyüme fazına geçtiği esnada farklı oranlarda nanopartikül, serbest ilaç, serbest ilaç/kuersetin, ilaç yüklü nanopartikül, serbest kuersetin ve ilaç yüklü nanopartikül/kuersetin formülasyonları hücrelerin üzerine ilave edilmiş ve plaka etüve yerleştirilmiştir. Sistem, 10 dakika ara ile gerçek zamanlı empedans ölçümü alınacak şekilde ayarlanıp 120 saat süre boyunca kültürü yapılmak üzere bırakılmıştır. Sonuç olarak hücrelerin zamana bağlı proliferasyonunu gösteren grafik elde edilmiştir.

Grafikte (Şekil 4.22.) kontrol grupları hiçbir aktif madde ile etkileştirilmemiş olup yaklaşık 3.5 gün süren proliferasyon eğrisi görülmektedir.



Şekil 4.22. Kontrol grubu hücrelerinin (H1299, H69AR ve L929 fibroblast) proliferasyonunu gösteren grafik

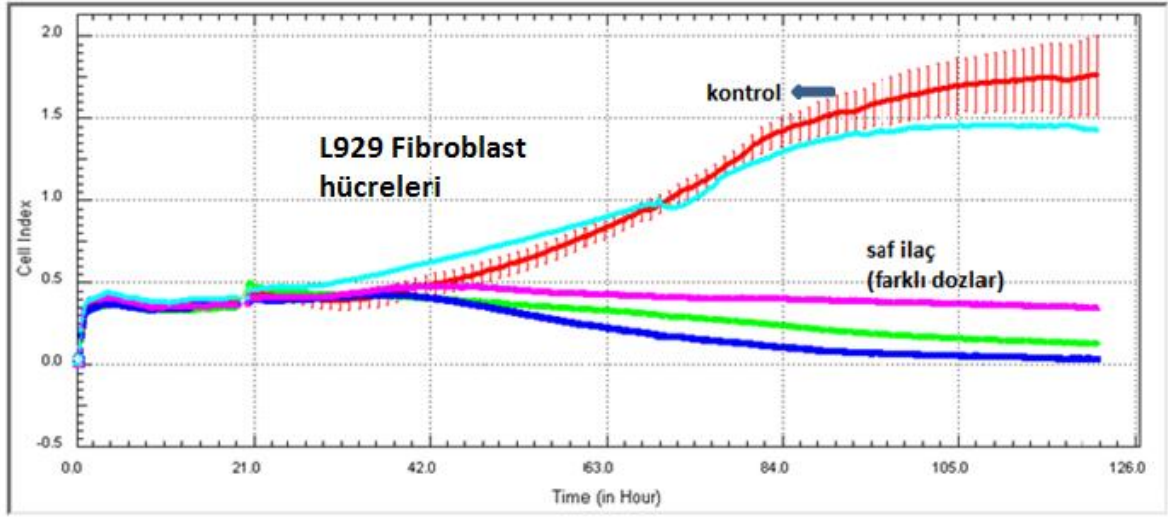


Şekil 4.23. Farklı derişimlerdeki boş kitosan nanopartiküllerin L929 fibroblast hücreleri üzerindeki proliferatif etkisi

Şekil 4.21.'de farklı derişimlerdeki boş kitosan nanopartiküllerinin L929 Fibroblast hücreleri üzerindeki proliferatif etkisine bakıldığında, hücreler kontrolle paralel büyüme eğrisi göstermekte ve hücre canlılığı indeksinde kayda değer herhangi bir şekilde canlılığı azaltıcı yönde etki görülmemektedir. Bu da bize taşıyıcı polimer olarak kullandığımız kitosanın hücrelerde çoğalmayı engelleyen bir etkisinin olmaması yanısıra sitotoksik olmadığını da bir kanıttır [130,131].

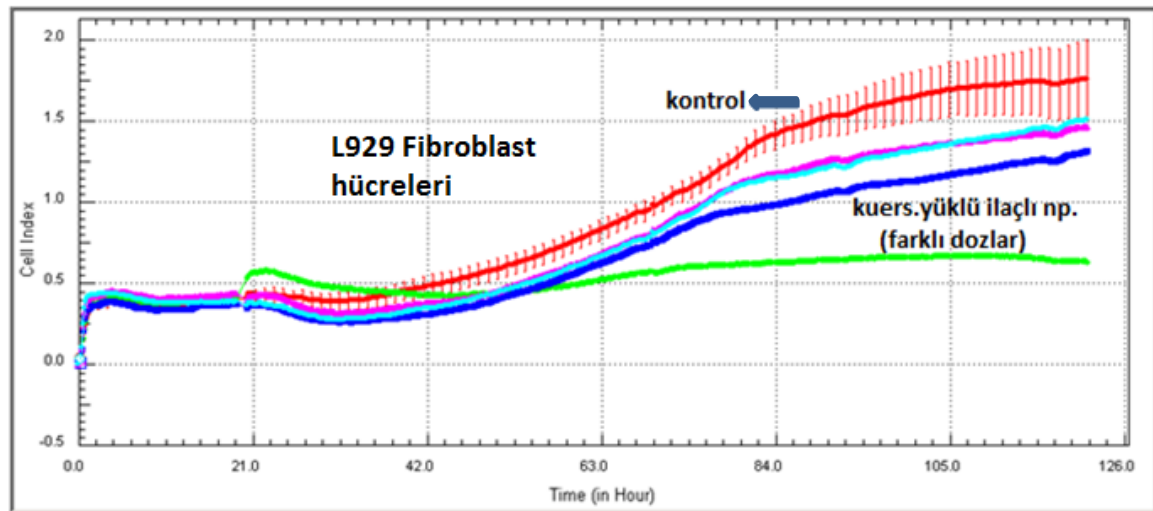
Şekil 4.24.'te farklı derişimlerdeki serbest ilacın L929 Fibroblast sağlıklı hücreler üzerindeki proliferatif etkisi görülmektedir. Serbest ilaç sağlıklı hücrelere 50, 25 ve 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dozlarında verildiğinde hücre indeksi eğrisinde önemli oranda düşüş gözlenmiştir. Buradan hareketle serbest halde verilen ilacın sağlıklı hücrelerde toksik etki yaptığı ve hücre proliferasyonunu azalttığı söylenebilir. Sonuçlar, sitotoksisite (WST-1) ve ikili boyamada elde edilen bulgularla paralellik göstermektedir.

50 ug/mL 12.5 ug/mL
25 ug/mL 6,25 ug/mL



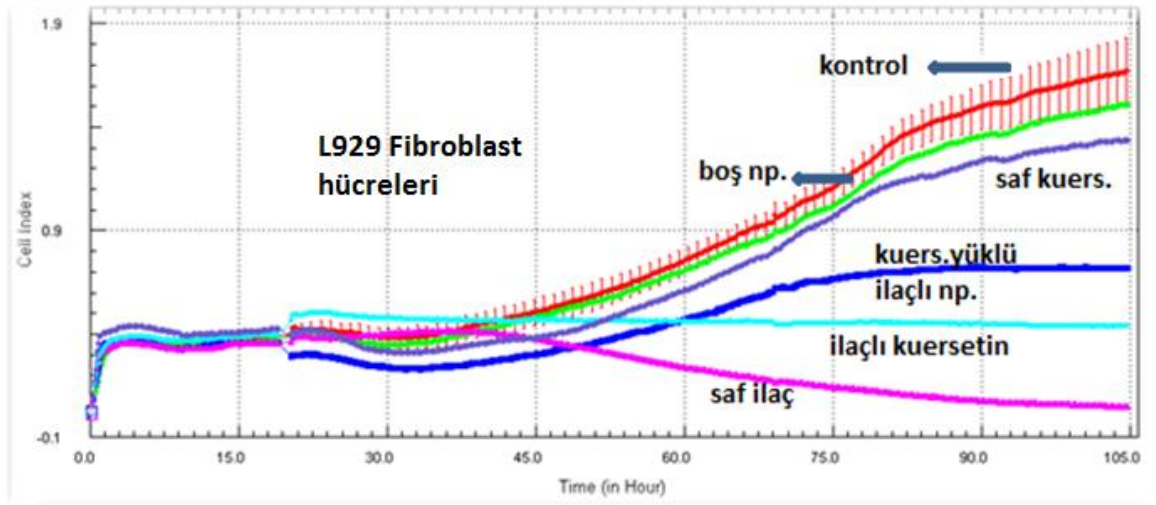
Şekil 4.24. Farklı derişimlerdeki saf ilacın L929 fibroblast hücreleri üzerindeki proliferatif etkisi

50 ug/mL 12.5 ug/mL
25 ug/mL 6,25 ug/mL



Şekil 4.25. Farklı derişimlerdeki kuersetin yüklü ilaçlı nanopartiküllerin L929 fibroblast hücreleri üzerindeki proliferatif etkisi

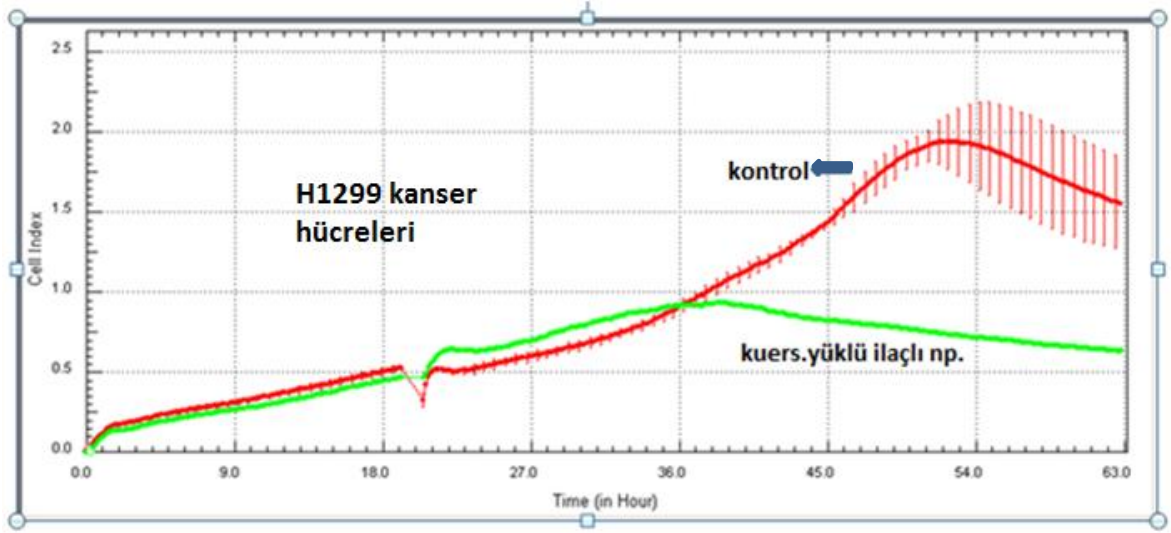
Şekil 4.23.'te Fibroblast hücreleri üzerine uygulanan farklı dozlardaki kuersetin yüklü ilaçlı nanopartikül formülasyonlarının hücre canlılığı üzerine etkileri görülmektedir. 50 µg/mL derişimine sahip örnekteki sitotoksik etki en fazla olup bu durum WST-1 testi ile de uygunluk göstermektedir. Ayrıca ikili boyama sonuçlarıyla birlikte değerlendirildiğinde de en fazla apoptotik etkinin gözleendiği örnek grubudur.



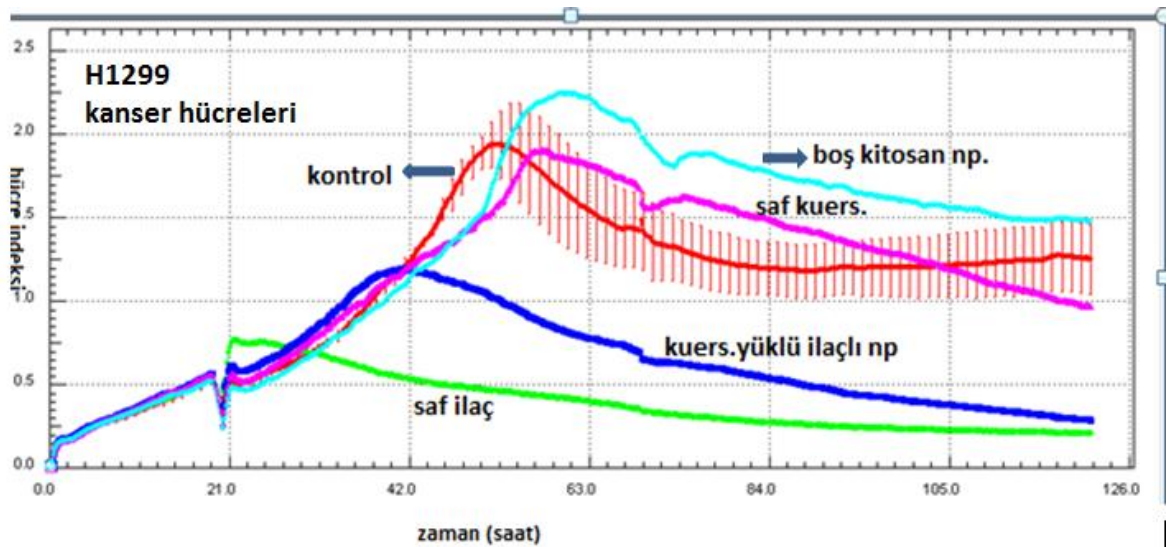
Şekil 4.26. Saf ilaç, kuersetin yüklü ilaçlı nanopartikül, ilaçlı kuersetin, boş nanopartikül ve saf kuersetin formülasyonlarının L929 Fibroblast hücreleri üzerine proliferatif etkisi

Fibroblast hücrelerinde gerçekleştirilen RTCA analiz sonuçlarında görüldüğü üzere, boş kitosan nanopartikül formülasyonunun uygulandığı hücrelerde, canlılık kontrole yakın bir çoğalma eğrisi şeklinde karşımıza çıkmaktadır. Bu durum, kullanılan polimerin sitotoksik olmadığını ve vücutla uyumlu bir biyopolimer olduğunu destekler niteliktedir [115,133]. Tek başına uygulanan kuersetinin de yine çoğalmayı azaltıcı yönde herhangi bir etkisinin olmadığı ve sitotoksik olmadığı görülmektedir. Bu durumun normal sağlıklı hücrelerde kullanımının herhangi olumsuz bir yan etkiye sebebiyet vermemesi yönünden önem arz etmektedir. Kuersetin yüklü ilaçlı nanopartikül formülasyonunun ise, ilacın serbest formda kuersetinle birlikte ve tek başına verildiği örnek gruplarıyla karşılaştırmalı olarak değerlendirildiğinde kuersetin yüklü ilaçlı nanopartikülün sağlıklı hücrelerdeki

canlılık yüzdesi daha yüksek oranlarda seyretmektedir. Serbest halde verilen ilacın sağlıklı hücreler üzerindeki olumsuz etkisinin oldukça fazla olması dolayısıyla bu durum, ilacın biyouyumlu bir polimer içerisinde verilerek olası etkinin en aza indirgenmesi şeklinde önüne geçilebileceği fikrini uyandırmaktadır [135].

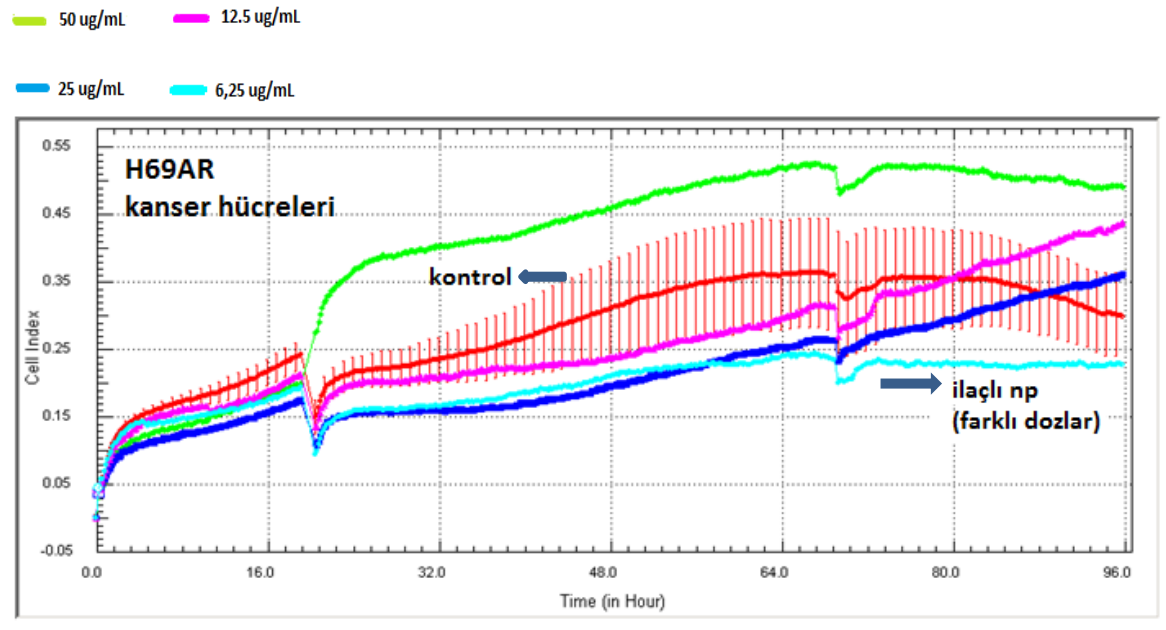


Şekil 4.27. Kuersetin yüklü ilaçlı nanopartiküllerin H1299 kanser hücreleri üzerine proliferatif etkisi



Şekil 4.28. Boş kitosan nanopartikül, saf kuersetin, kuersetin yüklü ilaçlı nanopartikül ve saf ilacın H1299 hücreleri üzerine proliferatif etkisi

H1299 kanser hücreleri, doksorubisine dirençli hücrelerdir. Yapılan RTCA analizi sonuçlarına bakıldığında, kuersetin yüklü ilaçlı nanopartiküllerinin bu hücreler ile etkileşmeleri sonucu kontrol grubuna göre H1299 hücrelerinde dirençliliğin önemli ölçüde kırıldığını ve % canlılık değerinin azaldığını görmekteyiz. Doksorubisine dirençli H1299 kanser hücrelerinin, çoklu ilaca dirençli H69AR kanser hücreleriyle karşılaştırılması yapıldığında kuersetin yüklü ilaçlı nanopartiküllerin H1299 hücrelerindeki hücre indeksi değerinin oldukça aşağılara çekildiği gözlemlenmiştir. Bu durum H69AR hücrelerinde beklenenden çok daha üst seviyelerde kalmıştır.



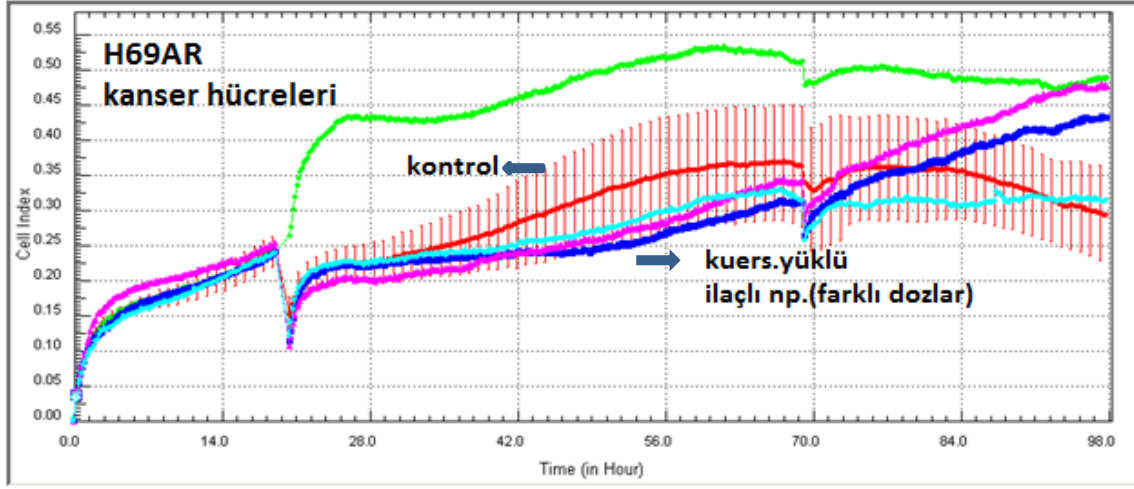
Şekil 4.29. Farklı derişimlerdeki ilaçlı nanopartikül formülasyonunun H69AR kanser hücreleri üzerine proliferatif etkisi

H69AR hücreleri, çoklu ilaca dirençli hücreler olduğundan, pekçok antrasiklin analoglarıyla (daunomycin, epirubicin, menogaril, mitoxantrone, etoposide gibi) çapraz direnç gösterme eğilimindedir. Bu durumda başlangıçta çoklu yolakları etkileyen 'tekli ilaç inhibitörleri' (single drug inhibitor-SDIs) kullanılarak direnç kırılmaya çalışılmak istenmiştir. Ancak bu durumun H69AR hücrelerinde yeterince efektif olmadığı saptanmıştır. Bu durumda kombinasyonel ve/veya birbirleriyle sinerjistik etki oluşturan 'çoklu ilaç inhibitörleri' (multi-drug inhibitor-MDIs) kullanımı

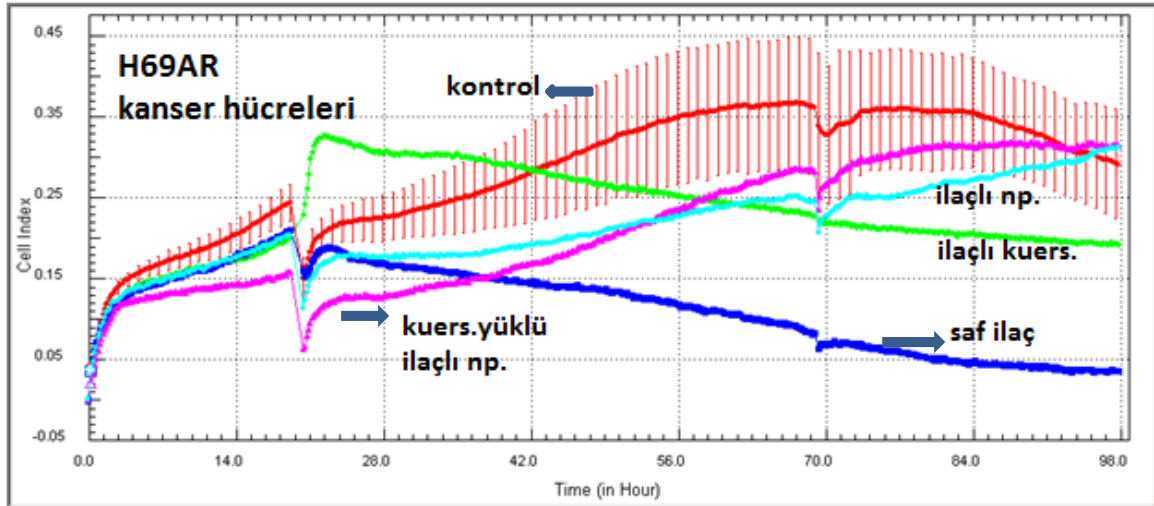
neticesinde bu etkinin çok daha anlamlı oranlara ulaşılacağı yönünde çalışmalar mevcuttur [136-139]. Kanseri tedavisinde giderek artan bir önem kazanan sinerjistik ilaç kombinasyonları, sadece tek bir yolağı hedefleyen ilaç tedavilerine göre çok daha avantajlı durumdadır. Kanseri hücrelerinde mevcut olan spesifik kinazları inhibe etmek için 'rasyonel ilaç tasarımı' geliştirilme çabaları bu yönde atılması gereken öncelikli adım olmalıdır [136, 137, 140].

H1299 hücreleri sadece doksorubisine dirençli hücreler olduğundan deneyde kullandığımız ilaç formülasyonunun etkisi H69AR hücrelerine göre çok daha anlamlı bulunmuştur. Uygulanan kuersetin yüklü ilaçlı nanopartikülün hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığını ve hücrelerin çoğunu apoptoza yönlendirdiğini görmekteyiz (Şekil 4.28). Bu hücrelerdeki etkinin H69AR hücrelerine göre daha fazla olması, H1299 hücrelerinin sadece doksorubisine dirençli olması ve bizim de etken madde olarak sadece doksorubisini kullanmış olmamız yorumuna ulaşılabilir. Zira bu hücreler başka antrasiklin türevleriyle çapraz direnç göstermemektedir. Dolayısıyla H69AR hücrelerine yönelik çoklu hedef inhibitörlerinin kombine kullanımı ve bu hücrelerin çapraz direnç gösterdiği ilaçların da sinerjistikten faydalanılarak yeni, akıllı ilaç-inhibitör tasarımları hayata geçirilebilir [136, 141].

50 ug/mL 12.5 ug/mL
25 ug/mL 6,25 ug/mL



Şekil 4.30. Farklı derişimlerde hazırlanan kuersetin yüklü ilaçlı nanopartiküllerin H69AR kanser hücreleri üzerine proliferatif etkisi



Şekil 4.31. İlaçlı nanopartikül, saf ilaç, ilaçlı nanopartikül ve kuersetin yüklü ilaçlı nanopartiküllerin H69AR kanser hücreleri üzerine proliferatif etkisi

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Sunulan tez kapsamında elde edilen bulgular ve sonuçlar aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir.

- Çalışmanın ilk kısmında iyonik jelasyon yöntemiyle hazırlanan kitosan nanopartiküllerin fizikokimyasal ve morfolojik karakterizasyonu yapılmıştır.
- Kitosan nanopartiküllerin boyut ve yük analizinin belirlenebilmesi için Zeta-Sizer cihazı kullanılmıştır. Optimizasyon çalışmaları sonucunda elde edilen kitosan nanopartiküllerin boyutları 196-360 nm aralığında bulunmuş olup Yine Zeta-sizer cihazı ile yapılan zeta-potansiyel analiz sonuçlarına göre partiküllerin yüzey yükü +24.4 mV olarak bulunmuştur.
- AFM'de alınan görüntüler neticesinde partikül büyüklüğünün 47-170 nm aralığında olduğu görülmüştür.
- Kitosan nanopartiküllere etken madde yükleme çalışmalarında, partiküle yüklenen ilaç miktarının derişimi arttıkça yüklenme verimliliğinin de aynı oranda arttığı saptanmıştır. Farklı dozlardaki doksorubisin derişiminin yüklenme verimliliğine etkisi incelendiğinde 0.5, 1 ve 2 mg/mL derişimlerinde etken madde kullanımı sonucuna bağlı olarak en yüksek verimliliğin 2 mg/mL derişiminde olduğu gözlenmiştir. Buna göre, 10 mg polimer içerisine yüklenen 2 mg/mL derişimine sahip etken maddenin partiküle tutunma verimi %74.3 olarak hesaplanmıştır.
- Kitosan nanopartiküllerden etken madde salım çalışmaları sonucunda farklı derişimlerde etken madde yükleme oranlarına bakılarak salım profilleri elde edilmiştir. 0.5, 1 ve 2 mg/mL oranlarında partiküllere yüklenen etken maddenin 96 saat süre boyunca salım profilleri takip edilmiştir. Kümülatif

salınan ilaç miktarının nanopartiküle yüklenen ilaç miktarıyla doğru orantılı olduğu gibi % salınan ilaç miktarlarıyla da doğru orantılı bilgisine ulaşılmıştır.

- Kitosan nanopartiküllerin kuersetin ile etkileştirilmesi çalışmalarında nanopartiküle tutuklanan kuersetin bağlanma kapasitesi %57 olarak bulunmuştur.
- Hücre ile etkileşim çalışmalarında, hücre canlılığının ve proliferasyonunun incelenmesi amacıyla WST-1 testi yapılmıştır. Bu amaçla H69AR (Çoklu İlaça Dirençli Küçük Hücreli Akciğer Kanseri Hücre Hattı), H1299 (Doksorubisine Dirençli Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri Hücre Hattı) ve L929 Fibroblast sağlıklı hücreler kullanılmıştır.
- Yapılan WST-1 sitotoksikite testi ile 50, 25, 12.5 µg/mL derişimlerde hazırlanan boş nanopartikül, ilaçlı nanopartikül, saf ilaç, ilaçlı kuersetin, kuersetin yüklü ilaçlı nanopartikül ve saf kuersetinden oluşan formülasyonların H69AR, H1299 ve L929 Fibroblast hücreleri üzerine olan sitotoksik etkileri incelenmiştir. En yüksek sitotoksik etkinin 50 µg/mL derişiminde olduğu görülmüştür. Kullanılan formülasyonlardan boş nanopartikül ve saf kuersetinin sağlıklı veya kanserli hücrelerde hücre canlılığını azaltıcı yönde herhangi bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Bununla birlikte saf ilacın hücrelerdeki sitotoksik etkisi hem kanserli hücrelerde hem de sağlıklı hücrelerde en düşük düzeyde olduğu görülmüştür.
- Apoptotik ve nekrotik indeksler ikili boyama metodu ile tesbit edilmiştir. 50 µg/mL derişimindeki örneklerle muamele edilmiş H69AR, H1299 ve L929 Fibroblast hücrelerinde % apoptotik –nekrotik değerler incelenmiştir. Buna göre kuersetin yüklü ilaçlı nanopartiküllerin H69AR kanserli hücreleriyle muamelesi sonucunda apoptotik indeks %35.2 iken nekrotik indeks %3.5 olarak bulunmuştur. Aynı şekilde saf ilaçla muamele edilen H69AR

hücrelerindeki apoptotik oranın %9 ve nekrotik oranın ise %54.1 olduğu saptanmıştır. Görüldüğü gibi, kuersetin yüklü ilaçlı nanopartiküllerin kanser hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi saf ilaca göre çok daha fazladır. Saf ilaçtaki etki ise nekrozisin artması yönünde kendini göstermiştir.

- Hücrelerin zamana bağlı proliferasyonlarını gözlemek amacıyla xCELLigence RTCA sisteminden yararlanılmıştır. Bu amaçla hücrelerin (H69AR, H1299 ve L929 Fibroblast) E-plate üzerine ekimi yapıldıktan sonra üzerlerine boş nanopartikül, ilaçlı nanopartikül, saf ilaç, ilaçlı kuersetin, kuersetin yüklü ilaçlı nanopartikül ve saf kuersetin formülasyonları uygulanarak hücreler, yaklaşık 120 saat boyunca kültüre alınmıştır. Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde, H1299 kanser hücrelerine uygulanan kuersetin yüklü ilaçlı nanopartiküller, zamanla hücre proliferasyonunu önemli ölçüde düşürürken, L929 Fibroblast hücrelerinde bu etki çok daha üst düzeyde kalmıştır. Bununla birlikte sağlıklı hücrelere saf ilacın uygulanması durumunda hücre canlılığının oldukça azaldığı görülmüştür. H69AR hücrelerinde ise kuersetin yüklü ilaçlı nanopartikül uygulanması hücre canlılığında önemli bir düşüş meydana getirmemiştir. Yine burada da hücre canlılığındaki önemli düşüşün saf ilaç formülasyonunda olduğu gözlenmiştir.

ÖNERİLER

- Kuersetin yüklü ilaçlı nanopartiküller ile etkileştirilen H1299 doksorubisine dirençli kanser hücrelerindeki sitotoksitenin ve proliferasyonun anlamlı değerlerde bulunması neticesinde; çalışmanın daha da netlik kazanması amacıyla bu hücrelerin membranlarında mevcut olan P-gp (MDR-1) proteininin büyüklüğündeki azalışının western-blot analizi ile gösterilmesi çalışmayı daha da efektif hale getirecektir. Hatta, yine bu proteine yönelik olan genin ifade düzeylerindeki azalışın Real-Time PCR sistemi ile ispatlanması sonucunda çalışma tam anlamıyla netlik kazanacaktır.

- Kuersetin yüklü ilaçlı nanopartiküllerin H69AR hücreleri ile etkileştirilmeleri sonucunda bu hücrelerde anlamlı bir proliferasyonun gözlenememesi dolayısıyla, H69AR hücrelerinin birden fazla ilaca direnç gösteren hücreler olması hasebiyle (daunomycin, epirubicin, vincristine gibi ilaçlarla çapraz direnç) bu noktada birden fazla ilaç kombinasyonlarının kullanımının etkilerine bakılarak ilaç direncinin kırılıp kırılmadığı test edilmelidir. Tekli ilaç/inhibitör kullanımının çoklu ilaç/ inhibitör kullanımıyla birlikte karşılaştırılması yapılarak daha makul bir çıkarımda bulunabilmesi yoluna gidilebilir.

KAYNAKLAR

- [1] Bozkurt B., Selçuk Z.T., Fırat P., Kalyoncu, A.F., Artvinli M., '1972-2002 Döneminde Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde Akciğer Kanseri Tanısı Konulan Hastaların Histolojik ve Epidemiyolojik Değerlendirmesi', *Toraks Dergisi*, Cilt 5, Sayı 3, Aralık **2004**.
- [2] World Health Organization, The World Health Report, **2004**.
- [3] Swaminathan R. et al., World Health Organization, Temmuz **2008**.
- [4] Köktürk N., Yeğın D., Çiftçi U. T., Mullaoglu S. B., Öztürk C., 'Akciğer Kanselerinde Epidemiyolojik Özellikler Yıllar İçinde Değişim Gösteriyor mu?' Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, *Toraks Dergisi*, Aralık **2004**.
- [5] Roy S. Herbst, M.D., Ph.D., John V. Heymach, M.D., Ph.D., and Scott M. Lippman, M.D., 'Molecular Origins of Cancer, Lung Cancer', *The New England Journal of Medicine*, September, 25, **2008**.
- [6] Özgüroğlu M. 'Akciğer Kanselerinde İlaç Direnci' İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı, *Solunum*, 180-183, **2003**.
- [7] Şen, G. P. 'Fabrication of Poly (DL-Lactic-Co-Glycolic Acid) Nanoparticles and Synthetic Peptide Drug Conjugate for Anti-Cancer Drug Delivery' Natural and Applied Sciences of Middle East Technical University, December, **2009**.
- [8] Szakács G., Paterson, J.K., Ludwig, J.A., Genthe C.B., Gottesman M.M., 'Targeting multidrug resistance in Cancer' *Nature Reviews Drug Discovery*, 219-234, December **2010**.
- [9] Çekin N., 'Hif-1 Proteininin Kansere İlaçlarına Karşı Direnç Gelişmesindeki Rolünün Araştırılması' Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, **2007**.
- [10] Liu YY., Han TY., Giuliano A.E., Cabot M.C., 'Ceramide Glycosylation Potentiates Cellular Multidrug Resistance 1', John Wayne Cancer Institute at Saint John's Health Center, Santa Monica, CA 90404, USA, March, **2001**.
- [11] Huesker M., Folmer Y., Schneider M., Fulda C., Blum H.E., Hafkemeyer P., 'Reversal of Drug Resistance of Hepatocellular Carcinoma Cells by Adenoviral Delivery of Anti-MDR1 Ribozymes', *Hepatology*, Vol. 36, No. 4, **2002**.
- [12] Borska S., Chmielewska M., Wysocka T., Drag-Zalesinska M., Zabel M., Dziegiel P., 'In vitro effect of quercetin on human gastric carcinoma: Targeting cancer cells death and MDR' , *Food and Chemical Toxicology*, 50 , 3375–3383, **2012**.

- [13] Chen C., Zhou J., Ji C., 'Quercetin: A potential drug to reverse multidrug resistance', *Life Sciences* 87 , 333–338, **2010**.
- [14] Borska S., Sopol M., Chmielewska M., Zabel M., Dziegiel P., 'Quercetin as a Potential Modulator of P-Glycoprotein Expression and Function in Cells of Human Pancreatic Carcinoma Line Resistant to Daunorubicin', *Molecules* 15, 857-870, **2010**.
- [15] Borska S., Gebarowska E., Wysocka T., Drąg-Zalesińska M., Zabel M., 'The effects of quercetin vs cisplatin on proliferation and the apoptotic process in A549 and SW1271 cell lines in in vitro conditions', *Via Medica*, Vol. 63, No. 1, pp. 103–105, **2004**.
- [16] Priyadarsini R.V., Murugan R.S., Maitreyi S., Ramalingam K., Karunagaran D., Nagini S., 'The flavonoid quercetin induces cell cycle arrest and mitochondria-mediated apoptosis in human cervical cancer (HeLa) cells through p53 induction and NF-κB inhibition', *European Journal of Pharmacology*, 649, 84–91, **2010**.
- [17] Prof. Dr. Erol Ç., Prof. Dr. Onat H., 'Onkoloji' Kitabı, MN Medikal & Nobel Tıp Kitabevi.
- [18] Prof. Dr. Serdengeçti S., Prof. Dr. Büyükcunal E., Prof. Dr. Mandel N.M., Prof. Dr. Papilla Ç., Prof. Dr. Demirelli F., Prof. Dr. Demir G., Doç. Dr. Özgüröglu M., Uz. Dr. Turna H., "Medikal Onkoloji" ders kitabı, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi.
- [19] Klug W.S., Cummings M.R., Spencer C.A., *Palme Yayıncılık*, 'Genetik Kavramlar' **2009**.
- [20] Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, 'Neoplazi'.
- [21] Akbal O, 'Kanser tedavisinde kullanılmak üzere protein ve polisakkarit bazlı nanokürelerin hazırlanması ve karakterizasyonu', yüksek lisans tezi, **2012**.
- [22] Kasibhatla S., Tseng B., 'Why Target Apoptosis in Cancer Treatment?', *Molecular Cancer Therapeutic*, 573 Vol. 2, 573–580, June **2003**.
- [23] Gerl R., Vaux D. L., 'Apoptosis in the development and treatment of cancer' *Carcinogenesis*, vol.26 no.2 pp.263--270, **2005**.
- [24] Cabadak H., 'Hücre Siklusu ve Kanser', *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 9(3): 51 61, **2008**.
- [25] Dr. Ulukaya E., 'Hücre Siklusu ve Apoptosis'.
- [26] Yarımca G., Semih DURMUŞ Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi, 'Kanserin tarihçesi', **2013**.
- [27] www.kanseroloji.com

- [28] www.torpil.com
- [29] Gökçe Y., 'Kitosan Nanoparçacıklarının Sentezi' Ankara Üniversitesi Yüksek Lisans Tezi, **2008**.
- [30] www.biyoküre.org
- [31] Demircan P.Ç., Kocaeli Üniversitesi, Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi (KÖGEM), 'Hücre Canlılık ve Proliferasyon Testleri Çalışma Yöntemleri', **2013**.
- [32] Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Tıp Dergisi, **2012**.
- [33] www.xcelligence.roche.com
- [34] Kustermann S., Boess F., Buness A., Schmitz M., Watzele M., Weiser T., Singer T., Suter L., Roth A., 'A label-free, impedance-based real time assay to identify drug-induced toxicities and differentiate cytostatic from cytotoxic effects', *Toxicology in Vitro* 27 ,1589–1595, **2013**.
- [35] Kramer A.H., Julia Joos-Vandewalle, Adrienne L. Edkins, Carminita L. Frost, Earl Prinsloo, 'Real-time monitoring of 3T3-L1 preadipocyte differentiation using a commercially available electric cell-substrate impedance sensor system', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 443 1245–1250, **2014**.
- [36] Kriebashne Moodley, Catherine E. Angel, Michelle Glass, E. Scott Graham, 'Real-time profiling of NK cell killing of human astrocytes using xCELLigence technology', *Journal of Neuroscience Methods* 200, 173– 180, **2011**.
- [37] Yang, L., 'Electrical impedance spectroscopy for detection of bacterial cells in suspensions using interdigitated microelektrodes.' *Talanta*, 74, 1621-1629, **2008**.
- [38] Varshney, M., Li, Y. 'Double interdigitated array microelectrode-based impedance biosensor for detection of viable Escherichia coli O157:H7 in growth medium' *Talanta* 74. 518-525. **2008**.
- [39] James Z. Xing, Lijun Zhu, Stephan Gabos, Li Xie, 'Microelectronic cell sensor assay for detection of cytotoxicity and prediction of acute toxicity' *Toxicology in Vitro* 20, 995–1004, **2006**.
- [40] Altunkaynak B.Z., Özbek E., 'Programlanmış Hücre Ölümü: Apoptoz Nedir?' *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 93 -104, **2008**.
- [41] Tomatır A.G., 'Apoptoz: Programlı Hücre Ölümü', *T Klin Tıp Bilimleri*, 23:499-508, **2003**.
- [42] Büyükgebiz O, Caferler J.S., Apoptoz. *Sendrom*, 13:102-7, **2001**.

- [43] Ulukaya E., 'Apoptozis Ders Notları' Biyokimya Anabilim Dalı, **2003**.
- [44] Kimberly McCall, 'Genetic control of necrosis—another type of programmed cell death', *Current Opinion in Cell Biology*, 22:882–888, **2010**.
- [45] Robert Gerl and David L.Vaux, 'Apoptosis in the development and treatment of cancer', *Carcinogenesis* vol.26 no.2 pp.263--270, **2005**.
- [46] Danial N. N., Korsmeyer S. J., Cell death: critical control points, *Cell*, 116(2), 205-219, **2004**.
- [47] Aimee L. Edinger, Craig B. Thompson, 'Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy', *Current Opinion in Cell Biology*, Volume 16, Issue 6, December, Pages 663–669, **2004**.
- [48] Franks, L.M., Teich, N., 'Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer', **1996**.
- [49] Klug W.S., Cummings M.R., Spencer C.A., *Palme Yayıncılık*, 'Genetik Kavramlar', **2009**.
- [50] Bitiren M., Tıp Fak. Patoloji AD. 'Karsinogenezis (Onkogenezis) Kanserin Moleküler Temeli, **2013**.
- [51] Raffaella_Iurlaro, Clara Lucía León-Annicchiarico, Cristina Muñoz-Pinedo, 'Regulation of Cancer Metabolism by Oncogenes and Tumor Suppressors' *Methods in Enzymology* Volume 542, Pages 59–80, **2014**.
- [52] Serdengeçti S., Büyükcünal E., Mandel N.M., Papilla Ç., Demirelli F., Demir G., Özgüroğlu M., Turna H., 'Medikal Onkoloji' ders kitabı, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
- [53] Berkardo B., Hatemi H., 'Medikal Onkoloji' ders kitabı
- [54] Erol Ç., Onat H., 'Onkoloji', MN Meidkal&Nobel Tıp Kitabevi
- [55] Turan N., Ergen A., Arıkan S., Yaylım İ., İşbir T., 'Mmp-3 ve E-kaderin Polimorfizmlerinin Meme Tümörlerindeki Rolü', İstanbul Üniversitesi, *Deneyisel Tıp Araştırma Enstitüsü*, Moleküler Tıp Anabilim Dalı, İstanbul, Cilt:2 Sayı:4 Sayfa:30-37.
- [56] Angst B.D., Marozzi C., Magee A.I., 'The Cadherin Superfamily', *J Cell Sei* 114 , 625-626, **2001**.
- [57] Berx G., Becker K.F., Höfler H., Van Roy F., 'Mutations of the Human E-Cadherin (CDH1) Gene', *Hum Mutat*, 12(4): 226-37, **1998**.
- [58] Gottesman, M. M., Pastan, I. 'Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter', *Annu Rev Biochemistry*, 62; 385-427, **1993**.

- [59] Scheffer, G. L., Schroeijers, A. B., Izquierdo, M. A., et. al. 'Lung resistance-related protein/major vault protein and vaults in multidrug resistant cancer', *Curr Opin Oncol.* 12; 550-556, **2000**.
- [60] Jean-Pierre M., 'Drug resistance in hematologic malignancies', *Curr Opin Oncol*; 13(6):463-469, **2001**.
- [61] Okyar A., 'İlaç Taşıyıcı Proteinler', İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, 20. Ulusal Farmakoloji Kongresi, Antalya, **2009**.
- [62] Gregory D. Leonard, Tito Fojo, Susan E. Bates, 'The Role of ABC Transporters in Clinical Practice', *The Oncologist*, 411-424, **2003**.
- [63] Kara Z.P., Öztürk N., Öztürk D., Okyar A., 'ABC Taşıyıcı Proteinleri: Sirkadiyan Ritimler ve Cinsiyete Bağlı Farklılıklar', İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, *Müşbed* ;3(1):1-13, **2013**.
- [64] Brunton, LL, Parker, KL, Buxton, I.L.O. and Blumenthal, D.K.(Eds) Goodman & Gilman's, 'The Pharmacological Basis of Therapeutics', 11.baskı www.accessmedicine.com, **2006**.
- [65] Yıldırım M., Şahin E., 'Veteriner Farmakoloji ve Toksikolojide Transport Proteinleri', *İstanbul Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 34 (3), 9-17, **2008**.
- [66] Mealey, K.L., 'Therapeutic Implications of the MDR-1 Gene', *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, 27, 257-264, **2004**.
- [67] Takano, M., Yumoto, R., Murakami, T., 'Expression and Function of Efflux Drug Transporters in the Intestine', *Pharmacol Therapeut*, 109, 137-161, **2006**.
- [68] Marchetti S., Mazzanti R., Beijnen J.H., Schellens J.H., 'Clinical relevance of drug-drug and herb-drug interactions mediated by the ABC transporter ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein)', *Oncologist*. 12: 927-941, **2007**.
- [69] Vaalburg W., Hendrikse N.H., Elsinga P.H., Bart J., Van Waarde A. 'P-glycoprotein activity and biological response', *Toxicol Appl Pharmacol*, 207: 257-260, **2005**.
- [70] Morjani H., Madoulet C., 'Immunosuppressors as multidrug resistance reversal agents', *Methods Mol Biol.* 596: 433-446, **2010**.
- [71] Avcu F., 'Hematolojik Malignitelerde İlaç Direnç Mekanizmaları', Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Hematoloji Bilim Dalı, Ankara, Moleküler Hematoloji ve Sitogenetik Alt Komitesi.

- [72] Alp E., 'Hedeflendirilmiş Kanser Tedavisi İçin Biyopolimerik Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu', Hacettepe Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, **2010**.
- [73] Shankaran V., Ikeda H., Bruce A.T., White J.M., Swanson P.E., Old L.J., Schreiber R.D., 'IFN and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity' *Nature*, 410-1107, **2004**.
- [74] Abbas A.K., Lichtman A.H., 'Immune Response Against Tumor and Transplants: Immunity to Noninfectious Transformed and Foreign Cells: Basic Immunology Functions and Disorders of the Immune System', 1st ed. Philadelphia: W.B., Saunder Company Philadelphia: 183-190, **2001**.
- [75] Gilman A., Goodman L.S., 'Chemotherapy of Neoplastic Diseases', *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 8.th edition, Pergamon Press, USA, 1240-1306, **1991**.
- [76] Lisovitch M., Lavie Y., 'Cancer multidrug resistance: A review of recent drug discovery research', **2002**.
- [77] Millan G.J., 'Radiation therapy in the elderly: More side effects and Complications', *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 70-78, **2009**.
- [78] Çıracı S., Özbay E., Gülseren O., Demir H.V., Bayındır M., Oral A., Senger T., Aydınlı A., Aykutlu D., 'Türkiye'de Nanoteknoloji', Bilkent Üniversitesi, Massachusetts Teknoloji Enstitüsü, Ağustos **2005**.
- [79] Alexis F., Rhee J.W., Richie J.P., Radovic-Moreno A.F., Langer R., Farockhzad O.C., 'New Frontiers in Nanotechnology for Cancer Treatment', *Urologic Oncology*, Seminars and Original Investigations, 26; 74-85, **2008**.
- [80] Gürsoy A.Z., 'Kontrollü Salım Sistemleri', *Kontrollü Salım Sistemleri Derneği*, İstanbul, **2002**.
- [81] De Vane C.L., Jarecke C.R., 'Cyclic antidepressants' Applied Pharmacokinetics Eds.: W.E. Evans., J.J.Schentag. W.J.Jusko, Applied Therapeutics, Inc., Vancouver, W.A., 33-147, **1999**.
- [82] Mantripragada S., 'Depofoam Technology for Sustained Release Injectable Drug Delivery', *Drug Delivery and System Science*, 1, 13-16, **2001**.
- [83] Lordi N.G., 'Sustained Release Dosage Forms', *The Theory and Practice of Industrial Pharmacy*, Eds.: L.Lachman H.A., Lieberman J.L., Kanig, Lea and Febiger, Philadelphia P.A., 430-456, **1986**.
- [84] Brannon-Peppas L., 'Polymers in Controlled Drug Delivery', *Medicinal Plastics and Biomaterials*, 4, 34-44, **1997**.

- [85] Brannon-Peppas L., 'Recent Advances On The Use of Biodegradable Microparticles and Nanoparticles in Controlled Drug Delivery', *International Journal of Pharmaceutics*, 116, 1-9, **1995**.
- [86] Kumar S., Haglund B.O., Himmelstein K.J., 'In Situ-Forming Gels For Ophthalmic Drug Delivery', *Journal of Ocular Pharmacology*, 10, 47-56, **1994**.
- [87] Peppas N.A., 'Controlling Protein Diffusion in Hydrogels', *Trends and Future Perspectives in Peptide and Protein Drug Delivery*, 23-37, **1995**.
- [88] Demir A., Seventekin N., 'Kitin, Kitosan ve Kullanım Alanları', *Tekstil Teknolojileri Elektronik Dergisi Cilt: 3, No: 2*, 92-103, **2009**.
- [89] Rao, M.S., Kanat, S.R., Chander, R. and Sharma, A. 'What makes radiation processed chitosan a novel food preservative', *Times Food Processing Journal.*, Dec **2005**-Jan **2006**.
- [90] <http://www.mpikg-golm.mpg.de/kc/scripts/Polysaccharide.pdf>
- [91] Lee, D.W., Powers, K. and Baney, R., 'Physicochemical properties and blood compatibility of acylated chitosan nanoparticles', *Carbohydrate Polymers*, 58, 371-377, **2004**.
- [92] Lopez-Leon, T., Carvalho, E.L.S., Seijo, B., Ortega-Vinuesa, J.L. and Bastos-Gonzalez, D., 'Physicochemical Characterization of Chitosan Nanoparticles: Electrokinetic and Stability Behavior', *Journal of Colloid and Interface Science*, 283, 344-351, **2005**.
- [93] C. B. Li, S. Hein and K. Wang, 'Biosorption of chitin and chitosan', School of Chemical and Biomedical Engineering Nanyang Technological University, 637459, Singapore, *Materials Science and Technology*, Vol:24 No:9, **2008**.
- [94] C. Tuba Şengel-Türk, Canan Haşçıçek, 'Polimerik Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerde Yüzey Modifikasyonu', *Ankara Ecz. Fak. Derg.*, 38 (2) 137-154, **2009**.
- [95] Kreuter, J. 'Nanoparticulate Systems For Brain Delivery of Drugs' *Adv. Drug Del. Rev.*, 47, 65-81, **2001**.
- [96] Kreuter, J., 'Application of Nanoparticles For The Delivery of Drugs to The Brain' *Int. Cong. Ser.*, 1277, 85-94, **2005**.
- [97] Kaş, H.S., 'İlaç Taşıyıcı Partiküler Sistemler', *Kontrollü Salım Sistemleri*, Gürsoy, A.Z. (Ed.), İstanbul, 65-82, **2002**.

- [98] Garcia-Garcia, E., Andrieux, K., Gil, S., Couvreur, P., 'Colloidal Carriers and Blood-Brain Barrier (BBB) Translocation: A Way to Deliver Drugs to The Brain?', *Int. J. Pharm.*, 298, 274-292, **2005**.
- [99] Liu, G., Garrett, M., Men, P., Zhu, X., Perry, G., Smith, M.A., 'Nanoparticle and Other Metal Chelation Therapeutics in Alzheimer Disease', *Bioch. et Bioph. Acta*, 1741, 246-252, **2005**.
- [100] Rao, J.P., Geckeler, K.E., 'Polymer Nanoparticles: Preparation Techniques and Size-Control Parameters', *Prog. Polym. Sci.*, 36, 887-913, **2010**.
- [101] Raghavendra Gowda, Nathan R Jones, Shubhadeep Banerjee and Gavin P. Robertson, 'Use of Nanotechnology to Develop Multi-Drug Inhibitors for Cancer Therapy', *Nanomedicine & Nanotechnology*, Gowda et al., *J Nanomed Nanotechnol*, 4:6, **2013**.
- [102] Waterhouse, D.N., Tardi, P.G., Mayer, L.D. and Bally M.D., 'A Comparison of Liposomal Formulations of Doxorubicin With Drug Administered in Free Form-Changing Toxicity Profiles', *Drug Safety*, 24 (12): 903-920, **2001**.
- [103] Robbins Pathologic Basis of Disease, s. 256, 1989.
- [104] Mutlu N., 'Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri Olgularında İmmünohistokimyasal Boyama İle Kemil İliğinde ve Mediastinoskopi İle N₀ Olan Lenf Nodlarında Mikrometastaz Araştırılması ve Sağkalıma Olan Etkisi', *Yedikule Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi*, İstanbul, **2005**.
- [105] Çetinkaya E, Yıldız P, Turna A, Dodurgalı R, Ürer N, Gürses A, Yılmaz V. 'Akciğer Tümörlerinde Ameliyat Öncesi İnvazif Tanı Yöntemlerinin Hücre Tipini Belirlemedeki Doğruluğu', *Türk Toraks Dergisi*, Cilt 3, Sayı 3, 284-288, Aralık **2003**.
- [106] Creixella M., Peppas N. A., Co-delivery of siRNA and therapeutic agents using nanocarriers to overcome cancer resistance, *Nano Today*, 7(4) , 367-379, **2012**.
- [107] Arınç S, Saltürk C, Ertuğrul M, Sulu E, Tuncer L, Nergis S, Selvi U. *Primer akciğer kanserinde bronkoskopik biyopsi ve torakotomi materyalleri arasında hücre tipi uyumu*. *Tuberk Toraks.*, 55(4):378-82, **2007**.
- [108] <http://akciğerkanseriievreleri.com>
- [109] Li F., Hurley B., Liu Y., Leonard B., Griffith B., 'Controlled release of bevacizumab through nano-spheres for extended treatment of age-related macular degeneration', *Open Ophthalmol. J.*, **2012**.

- [110] Aşık M.D., Uğurlu N., Yülek F., Tuncer S., Türk M., Denkbaş E.B., 'Hacettepe J. Biol. & Chem'. , 41(1), **2013**.
- [111] Chenguang Liu, Wenwen Fan, Xiguang Chen, Chengsheng Liu, Xianghong Meng, Hyun Jin Park, 'Self-assembled nanoparticles based on linoleic-acid modified carboxymethyl-chitosan as carrier of adriamycin (ADR)', *Current Applied Physics* 7S1, e125–e129, **2007**.
- [112] Ağabeyoğlu İ., 'Kontrollü Salımın Farmakokinetik Temelleri', İstanbul, **2002**.
- [113] Shelagh E. L. Mirski, James H. Gerlach, Susan P. C. Cole, 'Multidrug Resistance in a Human Small Cell Lung Cancer Cell Line Selected in Adriamycin' , *Cancer Research* 47, 2594-2598, May 15, **1987**.
- [114] Shelagh E. L. Mirski and Susan P. C. Cole², 'Antigens Associated with Multidrug Resistance in H69AR, a Small Cell Lung Cancer Cell Line', *Cancer Research* 49, 5719-5724, October 15, **1989**.
- [115] Illum L., 'Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient', *Pharmaceutical Research*, 15, 9, 1326-1331, **1998**.
- [116] Kevin A. Janes, Marie P. Fresneau, Ana Marazuela, Angels Fabra, Maria Jose Alonso, 'Chitosan nanoparticles as delivery systems for doxorubicin', *Journal of Controlled Release*, 73, 255–267, **2001**.
- [117] Yousefpour P., Atyabi F., Vasheghani-Farahani E., Mousavi A., Dinarvand M., 'Targeted delivery of doxorubicin-utilizing chitosan nanoparticles surface-functionalized with anti-her2 trastuzumab', *International Journal of Nanomedicine*, 1977–1990, **2011**.
- [118] Kahraman A., , Serteser M., Köken T., 'Flavonoidler', *Kocatepe Tıp Dergisi*, 01-08, **2002**.
- [119] Stavric B., 'Quercetin in our diet: from potent mutagen to probable anticarcinogen' *Clin. Biochem*, 27(4):245-248, **1994**.
- [120] Bors W, Heller W, Michel C, Saran M. 'Flavonoid as antioxidants: Determination of radical- scavenging efficiencies', *Methods in Enzymology*, 186:343-355, **1990**.
- [121] Pütün E.A. 'Centaurea thracica (Janka) Hayek ve Centaurea Pichleri Boiss. Subsp. Pichleri Flavonoidleri', *Anadolu Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Esk şehir*, **1987**.
- [122] Borska S., Chmielewska M., Wysocka T., Drag-Zalesinska M., Zabela M., Dziegiel P., 'In vitro effect of quercetin on human gastric carcinoma: Targeting cancer cells death and MDR', *Food and Chemical Toxicology* 50, 3375–3383, **2012**.

- [123] Thangasamy T., Sittadjody S., Burd R., 'Quercetin: A Potential Complementary and Alternative Cancer Therapy', *Complementary and Alternative Therapies in the Aging Population*, USA.
- [124] Zeybek A., 'The effect of doxorubicin-albumin magnetic nanoparticles on prostate and lung cancer cells', December, **2012**.
- [125] Xie X., Yin J., Jia Q., Wang J., Zou C., Brewer K.J., Colombo C., Wang Y., Huang G., Shen J., 'Quercetin induces apoptosis in the methotrexate-resistant osteosarcoma cell line U2-OS/MTX300 via mitochondrial dysfunction and dephosphorylation of Akt', *Oncology Reports* 26: 687-693, **2011**.
- [126] Sasaki M, Nakamura H, Tsuchiya S, Horie S, Kashiwayanagi M, Saito T, Murayama T , 'Quercetin-Induced PC12 Cell Death Accompanied by Caspase-Mediated DNA Fragmentation', *Biol. Pharm. Bull.*, 30: 82-686, **2007**.
- [127] Zhang Y., Yang Y., Tang K., Hu X., Zou G., 'Physicochemical Characterization and Antioxidant Activity of Quercetin-Loaded Chitosan Nanoparticles', *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 107, 891–897 **2008**.
- [128] Gültekin N., Karaoğlu K., Küçükateş E., 'Hücrede apoptoz ve sağkalım mekanizmalarının keşfedilmesi ve yeni potansiyel tedavi stratejileri', *Türk Kardiyol Dern Arş*, Cilt:26, Sayı:2, Mart, **2008**.
- [129] Maria de la Fuente, Begoña Seijo, and Maria J. Alonso, 'Novel Hyaluronic Acid-Chitosan Nanoparticles for Ocular Gene Therapy', *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, Vol. 49, No. 5, May, 2008.
- [130] Maria de la Fuente, Manuela Raviña, Patrizia Paolicelli, Alejandro Sanchez, Begoña Seijo, Maria Jose Alonso 'Chitosan-based nanostructures: A delivery platform for ocular therapeutics', *Advanced Drug Delivery Reviews* 62, 100–117, 2010.
- [131] G. Di Colo, Y. Zambito, S. Burgalassi, I. Nardini, M.F. Saettone, 'Effect of Chitosan and of n-carboxymethylchitosan on intraocular penetration of topically applied ofloxacin', *Int. J. Pharm.* 273, 37–44, **2004**.
- [132] JalehVarshosaz, Farshid Hassanzadeh, Hojjat Sadeghi, Zahra GhelichKhan and Mahboobeh Rostami, 'Retinoic Acid Decorated Albumin-Chitosan Nanoparticles for Targeted Delivery of Doxorubicin Hydrochloride in Hepatocellular Carcinoma', *Journal of Nanomaterials*, **2013**.
- [133] Horsman M.R., Overgaard J., Hyperthermia: A potent enhancer of radiotherapy, *Clinical Oncology*, 19, 418-426, **2007**.
- [134] Ju-Ichi M. Chemical study of citrus plants in the search for cancer chemopreventive agents. *Yakugaka Zasshi*, 125(3), 231–254, **2005**.

- [135] C. Moorthi, C. Moorthi, 'Curcumin–Piperine/Curcumin–Quercetin/Curcumin–Silibinin Dual Drug-Loaded Nanoparticulate Combinationtherapy: A Novel Approach to Target and Treat Multidrug-Resistant Cancers', *Journal of Medical Hypotheses and Ideas*; 7, 15–20, **2013**.
- [136] Raghavendra Gowda, Nathan R. Jones, Shubhadeep Banerjee, Gavin P.Robertson, 'Use of Nanotechnology to Develop Multi-Drug Inhibitors For Cancer Therapy', *J Nanomed Nanotechnol.* ; 4(6), **2014**.
- [137] Meyerson M, Gabriel S, Getz G. Advances in understanding cancer genomes through second-generation sequencing. *Nat Rev Genet*; 11:685–696, **2010**.
- [138] Shi J, Votruba AR, Farokhzad OC, Langer R. Nanotechnology in drug delivery and tissue engineering: from discovery to applications. *Nano Lett*; 10:3223–3230, **2010**.
- [139] Paolini GV, Shapland RH, van Hoorn WP, Mason JS, Hopkins AL. 'Global mapping of pharmacological space', *Nat Biotechnol.*, 24:805–815., **2006**.
- [140] Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, et al. 'BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis.' *Cancer Res.*; 64:7099–7109, **2004**.
- [141] Greco F, Vicent MJ. 'Combination therapy: opportunities and challenges for polymer-drug conjugates as anticancer nanomedicines', *Adv Drug Deliv Rev.* **2009**.
- [142] <http://www.fen.bilkent.edu.tr>
- [143] Formica JV , Regelson W., 'Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids.' *Fd. Chem.Toxic.* 33 (12):1061-1080., **1995**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : SEMA TUNCER

Doğum Yeri : İskenderun

Medeni Hali : Bekar

E-Posta : sematuncer89@hacettepe.edu.tr

Adresi : Ankara Cad. Erenler Mah. No: 10/4 Yahşihan/Kırıkkale

Eğitim

Lise : İskenderun Süper Lise (2004-2007)

Lisans : Kırıkkale Üniversitesi, Fen Edebiyat Fak., Biyoloji (2007-2011)

Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı (2011-2014)

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce – İyi

İş Deneyimi ---

Deneyim Alanları

Kontrollü İlaç Salım Teknolojisi

Kanser Terapi

Hücre-Kültür Çalışmaları

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

Proje No : BAB 2013/40

Proje adı : Akciğer Kanser Hücrelerine Nanopartiküllerle İlaç Aktarımı

Bütçesi : 23.700 TL

Tezden Üretilmiş Yayınlar ---

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

1. Uğurlu N, Aşık MD, Yülek F, **Tuncer S**, Türk M, Denkbaş EB, 'Ketorolac Loaded Chitosan Nanoparticles for Ocular Drug Delivery', Hacettepe J. Biol. & Chem., 41 (1) (2013)
2. Uğurlu N, **Tuncer S**, Aşık MD, Türk M, Denkbaş EB, 'Bevacizumab Loaded Chitosan Nanoparticles for Ocular Uses' The 8th Nanoscience and Nanotechnology Congress, Hacettepe University, Ankara, Turkey (25-29 June 2012)
3. Kara G., **Tuncer S.**, Türk M., Denkbaş EB, 'Combined Application of siRNA Loaded Lipid Nanocarriers and Therapeutic Agents for Treatment of Lung Cancer',

