

**TİMOKİNON-BAZLI MAGNETOLİPOZOM VE
FİTOZOM NANOPARTİKÜLLERİNİN
BİYOSENTEZLENMESİ, KARAKTERİZASYONU VE
GLİOBLASTOMA HÜCRELERİNİN DEMİR
METABOLİZMASINA ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**BIOSYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF
THYMOQUINONE-BASED MAGNETOLIPOSOME AND
PHYTOSOME NANOPARTICLES AND INVESTIGATION
OF THEIR EFFECTS ON IRON METABOLISM OF
GLIOBLASTOMA CELLS**

SİBEL AZİZENUR ÖZTÜRK

PROF. DR. FUNDA NURAY YALÇIN

Tez Danışmanı

PROF. DR. İSMAİL ÖÇSOY

Tez Eş Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

Canım Anneme ve Babama

ÖZET

TİMOKİNON-BAZLI MAGNETOLİPOZOM VE FİTOZOM NANOPARTİKÜLLERİNİN BİYSENTEZLENMESİ, KARAKTERİZASYONU VE GLİOBLASTOMA HÜCRELERİNİN DEMİR METABOLİZMASINA ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Sibel Azizenur ÖZTÜRK

Doktora, Nanoteknoloji ve Nanotıp Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Funda Nuray YALÇIN

Eş Danışman: Prof. Dr. İsmail ÖÇSOY

Ocak 2024, 248 sayfa

Tedaviye direnç ve nükslerle karakterize, ölümcül bir beyin tümörü olan Glioblastoma (GB) için tedaviler yetersizdir. Bu nedenle, bu çalışmada, demir-bazlı hücre ölümünü hedefleyen tedavi stratejilerine katkı amacıyla; hücrede demir işlevini arttırmak için Magnetolipozom (Mag) nanopartikül (NP)'leri; hücrede demir işlevini azaltmak için Fitozom NP'leri, GB hücrelerinde iki zıt tedaviyi test etmek amacıyla sentezlendi.

Timokinon (TQ)'un şelatlama özelliği baz alınarak, önce yeşil metodla TQ-FeNP'lerin sentezlendi. Daha sonra, etken madde olarak görev yapması için hazırlanan lipozomlara TQ-FeNP'leri yüklendi ve MagNP'leri oluşturuldu. İlaveten, TQ-bazlı FitNP'leri hazırlandı. İki NP'ün karakterizasyonları yapıldı. U87-MG GB hücrelerinde, NP'lerin,

sitotoksosite, apoptoz, serbest radikal ve lipit peroksidasyonu oluşturma etkilerine, ayrıca hücrelerde demir şelatlama aktivitelerine bakıldı.

NP'lerin, TQ, Fe ve fosfolipit içeriklerinin fonksiyonel bant ve bağlanma özellikleri (FT-IR); elementel yapıları ve saflıkları (EDX); yuvarlak görünümlü morfolojik yapıları (STEM) ve <100nm boyutlu, homojen dağılımlı (DLS/pdi) ve kararlı yapıları (zeta potansiyel) görüldü ve NP oldukları doğrulandı. NP'lerin, %EE, >%75; stabilite, orta; salım özellikleri, önce burst, sonra kontrollü olarak değerlendirildi.

NP'lerin GB hücrelerinde, IC₅₀ dozu 0,05mg/ml olarak belirlendi. U87-MG hücrelerinde, FitNP'lerinin, doza bağlı apoptozu arttırıcı etkileri ve ROS ve lipit peroksidasyon düzeylerini azaltıcı etkileri, TQ'un antioksidan özelliğinin baskınlığına atfedildi, ayrıca düşük şelatlama aktiviteleri nedeniyle, demir etkinliğini azaltıcı etkisinin az olacağı sonucuna varıldı.

MagNP'lerinin, apoptotik etkisinin görülmemesi; ROS ve lipit peroksidasyon seviyelerinde anlamlı düzeyde yüksek etkili olması; şelatör aktivitelerinin anlamlı derecede yüksek olması, GB hücrelerindeki sitotoksik etkilerinin ferroptoz yoluyla olabileceğinin öngörülmesi nedeniyle, MagNP-ferroptoz ilişkisinin ileri çalışmalarla aydınlatılması gerektiği düşünöldü.

Sonuç olarak, literatürde görülmemesi nedeniyle MagNP'leri bir ilk olma özelliğindedir. Ayrıca, GB hücrelerinde gösterdiği sitotoksitenin, yüksek düzeylerde demir aktivitesini arttırıcı şelatör özellikleri nedeniyle olabileceği düşünöldü. MagNP'lerinin demir-şelatör tedaviler açısından umut vaad edici olduğu, aynı zamanda hem bu tür şelatör tedavileri hem de demir-bazlı tanı ve tedaviyi birleştiren uygulamalar (teranostik) açısından gelecekte daha fazla araştırmalara ihtiyaç olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Magnetolipozom, Timokinon, Şelatör, Fitozom, Demir, Glioblastoma

ABSTRACT

BIOSYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF THYMOQUINONE-BASED MAGNETOLIPOSOME AND PHYTOSOME NANOPARTICLES AND INVESTIGATION OF THEIR EFFECTS ON IRON METABOLISM OF GLIOBLASTOMA CELLS

Sibel Azizenur OZTURK

Doctor of Philosophy, Department of Nanotechnology and Nanomedicine

Supervisor: Prof. Dr. Funda Nuray YALCIN

Co-Supervisor: Prof. Dr. Ismail ÖCSOY

January 2024, 248 pages

Treatments for Glioblastoma (GB), a fatal brain tumor characterized by treatment resistance and relapses are inadequate. Therefore, in this study, in order to contribute to the treatment strategies targeting iron-based cell death, Magnetoliposome (Mag) nanoparticles (NP) to increase iron function in the cell and Phytosome NPs to reduce iron function in the cell were synthesized to test two opposing treatments in GB cells.

Based on the chelating property of thymoquinone (TQ), TQ-FeNPs were first synthesized using the green method. Then, TQ-FeNPs were loaded into the prepared liposomes for acting as an active ingredient and MagNPs were created. Additionally, TQ-based FitNPs were prepared. The characterizations of the two NPs were performed.

In U87-MG GB cells, the effects of NPs on cytotoxicity, apoptosis, free radical and lipid peroxidation, as well as their iron chelating activities in the cells were examined.

The functional band and binding properties (FT-IR) of TQ, Fe and phospholipid contents of NPs; their elemental structures and purities (EDX); their round-looking morphological structure (STEM); and <100nm sized of their, their homogeneously distributed (DLS/pdi) and the stable structures of their (zeta potential) were seen and they were confirmed to be NP. %EEs of NPs are 75%, their release characteristics are as first burst and then controlled release and their stabilities are medium were evaluated

In GB cells, the IC₅₀ dose of NPs was determined as 0.05mg/ml. In U87-MG cells, the dose-dependent effects of FitNPs on enhancing apoptosis, and their reducing effects on ROS and lipid peroxidation levels were attributed to the dominance of the antioxidant properties of TQ; additionally their reducing effects on iron activity would be low due to their less chelating activities were concluded. Since the fact that not being seen of effects of MagNPs on apoptosis, significantly high effects of their on ROS and lipid peroxidation levels, and significantly high of their chelator activities were thought that the MagNP-ferroptosis relationship should be elucidated in further studies because of predicted that the cytotoxic effects of their on GB cells may be through ferroptosis.

As a result, it is a first because of not seen in the literature of NPs like TQFe-Mag. Additionally it was thought that their cytotoxicities seen in GB cells may be due to their chelator properties that increase iron activity at high levels. It was concluded that MagNPs are promising in terms of iron-chelator therapies, at the same time that further researches are needed in the future in terms of both in such chelator treatments and that applications combined of iron-based diagnosis and treatment (theranostics)

Keywords: Magnetoliposome, Thymoquinone, Chelator, Phytosome, Iron, Glioblastoma.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım süresince bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, olumlu her türlü yardımlarını ve dostluğunu benden esirgemeyen, tez çalışmalarımı gerçekleştirebilmem için her türlü imkanı sağlayan, değerli Danışman hocam Sn. Prof. Dr. Funda Nuray YALÇIN'a desteği, teşvikleri, hoşgörü ve sabrı için en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım süresince bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, olumlu her türlü yardımlarını ve dostluğunu benden esirgemeyen, tez çalışmamı gerçekleştirebilmem için her türlü laboratuvar imkanlarını sağlayan değerli Eş Danışman hocam Sn. Prof. Dr. İsmail ÖÇSOY'a desteği, teşvikleri için en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamda laboratuvar imkanlarını bana açan, bilgi, tecrübe ve dostluklarını paylaşan GENKÖK Müdürü Sn. Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL ve Müdür Yardımcısı Sn. Prof. Dr. Zuhal HAMURCU'ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarımda bilgi, tecrübe ve yardımlarını esirgemeyen Sn. Prof. Dr. Gülberk UÇAR, Sn. Dr. Öğr. Üyesi Dilek BAHAR, Sn. Doç. Dr. Kübranur ÜNAL, Sn. Prof. Dr. Turgut BAŞTUĞ, Sn. Prof. Dr. Nuhan PURALI, Sn. Prof. Dr. Emirhan NEMUTLU ve Sn. Prof. Dr. Asuman ÖZKARA hocalarıma en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez izleme kurulu hocalarım Sn. Prof. Dr. Fatma Visal OKUR ve Sn. Prof. Dr. Hakan AKBULUT hocalarıma tez süresince yardımları, destekleri ve hoşgörülerini için en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin çalışmalarımda laboratuvar bilgilerini, yardımlarını, manevi desteklerini ve dostluklarını esirgemeyen Sn. Nimet TEMUR'a, Sn. Dr. Öğr. Üyesi Kübra UZUN'a, Sn. Ahsen GÜLER'e, Sn. Sevilay ERDOĞAN KAPLAN'a ve Sn. Nazlı COŞKUN'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Başta Sn. Prof. Dr. Ayşe UZ, Dr. Öğr. Üyesi Zeynep DOĞAN, Sn. Dr. Öğr. Üyesi Murat KUTLUAY ve Sn. Dr. Öğr. Üyesi Nadire ÖZENVER ve Ecz. Seren GÜNDOĞDU başta olmak üzere Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi ABD’da tüm hocalarıma, akademik kadro ve çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmanın yürütülmesini destekleyen Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinatörlüğü’ne vermiş olduğu finansal katkılarından ötürü teşekkürlerimi sunarım.

Ve tüm eğitimim ve hayatımın her anında her türlü destek ve yardımlarını sevgi ve şefkatle daima veren Sevgili Annem Bilge ÖZTÜRK’e, Sevgili Babama Murat ÖZTÜRK’e ve Sevgili Abim İlker ÖZTÜRK’e her türlü emekleri, sabırları, hoşgörülerini ve her zaman yanımda oldukları için sonsuz sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Glioblastoma.....	6
2.1.1. Tanımlama ve Epidemiyolojisi	6
2.1.2. Risk Faktörleri	6
2.1.3. Tanısı	7
2.1.4. Moleküler Değişiklikleri.....	8
2.1.5. Sınıflandırılması.....	10
2.1.6. Geleneksel Tedavi Yöntemleri	10
2.1.7. Glioblastomada Tedavi Başarısızlığının Nedenleri	11
2.1.7.1. Kan Beyin Bariyeri	11
2.1.7.2. Glioblastoma Kanseri Kök Hücreleri.....	14
2.1.8. Glioblastomada Yeni Tedavi Strateji Arayışları.....	16
2.1.8.1. Demir Metabolizması	16
2.1.8.2. Demir Modülasyonu Yaklaşımları: Ferroptoz.....	21
2.1.8.3. Demir Modülasyonu Yaklaşımları: Şelasyon	28
2.1.9. Glioblastoma Tedavisinde Etkin Madde Arayışı	33
2.1.9.1. Fitoterapötik Etkin Madde: Timokinon	35
2.1.10. Glioblastoma Tedavisinde Yeni Strateji Arayışları	46
2.1.10.1. Nanoteknoloji ve Nanotaşıyıcılar	47

2.1.10.2. Lipozomal Yapılar.....	48
2.1.10.3. Fitozomlar	56
2.1.11. Tezin Amacı ve Hedefleri	67
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	69
3.1. Materyal	69
3.1.1. Kimyasal ve Biyokimyasal Malzemeler	69
3.1.2. Kullanılan Cihaz ve Gereçler	69
3.2. Metot 70	
3.2.1. Nanopartikülleri Sentezleme Çalışmaları.....	71
3.2.1.1. TQ-Fe Nanopartiküllerin Yeşil Biyosentezi	71
3.2.1.2. Magnetolipozom Nanopartiküllerin Sentezlenmesi	73
3.2.1.3. Fitozom Nanopartiküllerin Sentezlenmesi	73
3.2.2. Enkapsülasyon Etkinliğinin Hesaplanması	74
3.2.3. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	75
3.2.4. Nanopartiküllerin Fiziksel Stabilite Çalışmaları	76
3.2.5. Nanopartiküllerin <i>in vitro</i> Salım Çalışmaları	76
3.2.6. Glioblastoma Hücre Kültürü	76
3.2.7. Nanopartiküllerin Hücre Canlılığına Etkileri.....	77
3.2.8. Nanopartiküllerin <i>In Vitro</i> Hücre Kültürü Çalışmaları	78
3.2.8.1. Nanopartiküllerin Apoptoz Etkileri.....	78
3.2.8.2. Nanopartiküllerin Serbest Radikal Oluşumuna Etkileri.....	78
3.2.8.3. Nanopartiküllerin Lipit Peroksidasyonuna Etkileri.....	79
3.2.8.4. Nanopartiküllerin Şelatlama Etkileri.....	80
3.2.9. İstatistiksel Analiz	80
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	81
4.1. Nanopartiküllerin Karakterizasyon Analizleri	81
4.1.1. Nanopartiküllerin Enkapsülasyon Etkinliğinin Hesaplanması.....	81
4.1.2. Nanopartiküllerin FT-IR Analizi.....	84
4.1.3. Nanopartiküllerin EDX Analizi	89
4.1.4. Nanopartiküllerin Morfolojik Analizi	91
4.1.5. Nanopartiküllerin Boyutu, Dağılımı ve Zeta Potansiyel Değerleri.....	95
4.1.6. Nanopartiküllerin Stabilite Çalışmaları.....	100

4.1.7. Nanopartiküllerin <i>In Vitro</i> Salım Çalışmaları.....	105
4.1.8. Karakterizasyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi.....	108
4.2. Nanopartiküllerin <i>In Vitro</i> Hücre Kültürü Çalışmaları.....	108
4.2.2. Nanopartiküllerin Apoptoz Etkileri	113
4.2.3. Nanopartiküllerin Serbest Radikal Oluşumuna Etkileri	117
4.2.4. Nanopartiküllerin Lipit Peroksidasyonuna Etkileri	122
4.2.5. Nanopartiküllerin Şelatlama Etkileri	126
5. YORUM.....	136
KAYNAKLAR	141
EKLER.....	212
EK 1 – TQFe NP'lerinin SEM-EDX analiz raporu	212
EK 2 – Mag NP'lerinin SEM-EDX Analiz Raporu.....	213
EK 3 – Fit NP'lerinin SEM-EDX Analiz Raporu.....	214
EK 4 – Mag ve Fit NP'lerinin belli zaman aralıklarındaki <i>in vitro</i> salım konsantrasyonları (%).....	215
EK 5 – Mag ve Fit NP'lerinin başlangıç ve 60. gün (+4 °C) DLS (size ve pdi) sonuç tablosu ve analiz raporları	216
TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU	217
ÖZGEÇMİŞ	Error! Bookmark not defined.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Glioblastomanın MRI görüntüsü	7
Şekil 2.2. İnsanda a) kan-beyin bariyeri; b) kan-BOS bariyeri ve c) ependimal bariyer.....	13
Şekil 2.3. Glioblastomanın kök hücrelerden oluşumu	14
Şekil 2.4. İnsanda sistemik demir homeostazisi	17
Şekil 2.5. Hücre içi demir alım, depolama ve ihracı.....	18
Şekil 2.6. Kanserde demirin rolü	19
Şekil 2.7. Ferroptoz yolunun moleküler mekanizması	24
Şekil 2.8. Demir azaltma ve artırma stratejileri	29
Şekil 2.9. <i>Nigella sativa</i> (Çörek otu) bitkisi.....	35
Şekil 2.10. Timokinonun sağlığa etkileri ve etki mekanizmaları	36
Şekil 2.11. Timokinon'un moleküler yapısı.....	37
Şekil 2.12. Timokinonun antioksidan/prooksidan mekanizması	41
Şekil 2.13. Timokinonun antikanser etkileri	43
Şekil 2.14. Lipozomal partikül ve çeşitli kullanım amaçları	48
Şekil 2.15. Fosfolipidlerin yapısal gösterimi	49
Şekil 2.16. Lipozomların yapısal sınıflaması.....	52
Şekil 2.17. EPR etkisi ile lipozomal pasif hedefleme	54
Şekil 2.18. Magnetolipozomların şematik şekli: (a)manyetik nanopartiküllerin iç kısımda sulu fazda taşınması, (b) manyetik nanopartiküllerin lipit katmanlara bağlı taşınımı, (c) manyetik nanopartiküllerin lipozom yüzeyinde taşınımı	56
Şekil 2.19. Lipozom ve fitozom karşılaştırması	57
Şekil 2.20. Fitozomda fito-fosfolipit komplekslerinin oluşum mekanizması.....	58
Şekil 2.21. Yeşil metod ve mekanizması	64
Şekil 3.1. Tez akış şeması.....	70
Şekil 3.2. Yeşil metod ile sentezlenen TQ-Fe NP'leri kullanılarak Mag NP'lerinin hazırlanmasını gösteren şematik gösterimi.....	72
Şekil 3.3. Fit NP'lerin fitozom teknolojisi ile hazırlanmasının şematik gösterimi.....	73
Şekil 3.4. Hazırlanan nanopartikül örnekleri; (A) MagNP, (B) FitNP, (C,D) TQ-FeNP.	75

Şekil 4.1. TQ'un altı seri konsantrasyon miktarlarına karşılık gelen, $\lambda_{max}=254$ nm'deki absorbans ve pik değerlerinin UV-vis spektrofotometredeki görüntüsü (---0.5 mg/mL, ---1 mg/mL, ---1.5 mg/mL, ---2 mg/mL, ---2.5 g/mL).....	82
Şekil 4.2. TQ'un UV-Vis spektrofotometre ölçümleri ile elde edilen konsantrasyonlara karşılık absorbans değerlerinin lineer kalibrasyon doğrusu ve denklemi (n=6).	82
Şekil 4.3. TQFe NP'lerin FTIR spektrumu.	84
Şekil 4.4. Mag NP'lerinin FTIR spektrumu.	85
Şekil 4.5. Fit NP'lerinin FTIR spektrumu.	86
Şekil 4.6. Sırasıyla, TQ-Fe NP, Mag NP ve Fit NP'lerinin FTIR spektrumları.....	87
Şekil 4.7. TQFe NP'lerinin EDX görüntüsü ve içerik oranları.	89
Şekil 4.8. Mag NP'lerinin EDX görüntüsü ve içerik oranları.	90
Şekil 4.9. Fit NP'lerinin EDX görüntüsü ve elementel analiz sonuçları.....	91
Şekil 4.10. TQFe NP'lerinin STEM görüntüleri (Büyütme:200.00 KX; Ölçek:20 nm)	92
Şekil 4.11. Mag NP'lerinin STEM görüntüleri (Büyütme:200.00 KX; Ölçek:20 nm).	93
Şekil 4.12. Fit NP'lerinin STEM görüntüleri (Büyütme:100.00 KX; Ölçek:100 nm).	94
Şekil 4.13. TQ-Fe NP'lerine ait, A) size, pdi ve B) zeta analiz sonuçları.....	98
Şekil 4.14. Mag NP'lerine ait, A) size, pdi ve B) zeta analiz sonuçları.	98
Şekil 4.15. Fit NP'lerine ait, A) size, pdi ve B) zeta analiz sonuçları.....	98
Şekil 4.16. 4°C'de bekletilen Mag ve Fit NP'lerinin başlangıç ve 60. günlerdeki boyut indekslerindeki değişim değerleri.	101
Şekil 4.17. 4°C'de bekletilen Mag ve Fit NP'lerinin başlangıç ve 60. günlerdeki pdi indekslerindeki değişim değerleri.	102
Şekil 4.18. Mag ve Fit NP gruplarının zamana (saat) karşı <i>in vitro</i> salım (%) grafiği.	106
Şekil 4.19. Kontrol (A), TQ-Fe (0,05 mg/ml) (B), Mag (0,05 mg/ml) (C) ve Fit (0,05 mg/ml) (D) NP'lerinin, U87-MG hücre hattına 24 saat muamelesi sonucu kanser hücrelerinin invert mikroskopik görüntüleri (200µm büyütme).....	109

- Şekil 4.20.** U87-MG hücreleri üzerine, 0,05 ve 0,15 mg /ml dozlarında, TQ-Fe, Mag, Fit ve boş NP'lerin 24 saat boyunca muamelesi sonucu kontrole göre hücrelerdeki canlılık oranları (%). Kontrol ile karşılaştırıldığında, *, ** ve *** sırasıyla, $p<0.05$, $p<0.01$ ve $p<0.001$ anlamlılık değerlerini göstermektedir (Ortalama \pm SD, n = 4)..... 110
- Şekil 4.21.** U87-GB hücrelerine, Kontrol (A), 0,15 mg/ml dozunda uygulanan Mag (B) ve Fit (C) NP'leri ile; 0.05 mg/ml dozunda uygulanan TQ-Fe (D), Mag (E) ve Fit (F) NP'lerinin Annexin V-FITC / 7-AAD apoptoz sonuçları..... 114
- Şekil 4.22.** U87-MG hücrelerinde, TQ-Fe, Mag ve Fit NP'lerin, çeşitli konsantrasyonlardaki (her grup için 0,05 mg/ml ve 0,15 mg/ml dozda) apoptotik etkinliğinin Flow sitometre ile AnnexinV-FITC/7-AAD deney sonuçları *, ** ve *** kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, sırasıyla, $p<0,05$, $p<0.01$ ve $p<0.001$ anlamlı farkı göstermektedir (Ortalama \pm SD, n = 3). 115
- Şekil 4.23.** TQ-Fe, Mag ve Fit NP'lerinin, U87-MG hücrelerindeki ROS seviyeleri (0,05 mg/ml, 24 saat). ** ve *** kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, sırasıyla, $p<0.01$ ve $p<0.001$ anlamlı farkı göstermektedir (Ortalama \pm SD, n = 3). 117
- Şekil 4.24.** TQ-Fe, Mag ve Fit NP'lerinin, U87-MG hücrelerindeki MDA konsantrasyon (ng/ml) düzeyleri (0,05 mg/ml, 24 saat). *** kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p<0.001$ anlamlı farkı göstermektedir (Ortalama \pm SD, n = 3). 122
- Şekil 4.25.** TQ-Fe, Mag ve Fit NP'lerinin, U87-MG hücrelerindeki % şelatlama aktiviteleri (0,05 mg/ml, 24 saat). ** ve *** kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, sırasıyla $p<0.01$ ve $p<0.001$ anlamlı farkı göstermektedir (Ortalama \pm SD, n = 3). 126

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Nanopartikül grupları, içerikleri ve oransal bileşimi.....	74
Çizelge 4.1. TQ'nin (254 nm) UV spektrofotometre yöntemiyle ölçülen konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbans değerleri.	81
Çizelge 4.2. Nanopartiküllerin etken madde tutma etkinliği.	83
Çizelge 4.3. Nanopartikül gruplarının DLS-size, pdi, zeta potansiyel değerleri.	96

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

ml	mililitre
mg	miligram
μ	mikro
$^{\circ}\text{C}$	santigrad
dk	dakika
λ	dalga boyu
Da	dalton
nm	nanometre

Kısaltmalar

ABC	ATP'ye bağlanan kaset = ATP-binding cassette
BOS	Beyin omurilik sıvısı
CAT	Katalaz
CNS	Merkezi sinir sisteminin
CO ₂	Karbondioksit
DCM	Dichloromethan
DCFH-DA	Diklorofloresin diasetat
DFO	Desferrioksamin-B
DLS	Dynamic Light Scattering
DMT1	Duodenal enterositlerin apikal yüzeyindeki divalanmetal taşıyıcı 1
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EDX	Enerji Dağılımı X-Ray Spektroskopisi

EPR	Enhanced permeability retention
Fit	Fitozom
FTIR	Fourier Transform Infrared
GB	Glioblastoma
GKH	GB kök hücre
GPX4	Glutasyon peroksidaz 4
HIF	Hipoksi ile indüklenebilir faktör
İDS	İlaç dağılım sistemleri
INP	Demir nanopartiküllerinin
IONP	Demir oksit nanopartikülleri
KBB	Kan-beyin bariyeri
KKH	Kanser kök hücre
LfeH	Labil demir havuzu
LNP	Lipid bazlı nanopartiküller
LUV	Büyük tek tabakalı vezikül
MLV	Çok tabakalı veziküller
Mag	Magnetolipozom
MDA	Malondialdehid
NaOH	Sodyum hidroksit
NKH	Nöral kök hücreler
NP	Nanopartikül
OH	Hidroksil radikali
PC	Fosfatidilkolin PC
PUFA	Çoklu doymamış yağ asidi (polyunsaturated fatty acid)
PEG	Polietilen glikol
ROS	Reaktif oksijen türlerinin

Pdi	Polidispersite İndeksi
SOD	Süperoksit dismutaz
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SHH	Notch ve Sonic Hedgehog
SPC	Soya fasulyesi fosfatidilkolin
TERT	Telomerase Reverse Transcriptase
Tft	Transferrin
TfR1	Transferrin Reseptörüne
TMZ	Temozolomidin
TQ	Timokinon
TQFe	Timokinon Demir
UV	Ultraviole
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörünün
VHL	Von Hippel-Lindau
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
WT1	The Wilms tumor
Zeta	Zeta potansiyel
ZVI	Sıfır değerlikli demir

1. GİRİŞ

Glioblastoma multiforme (GB), tanı sonrası ortalama yaşam süresi bir yıldan az olan agresif bir beyin tümörüdür. Yetişkinlerde yaygın olarak görülen GB'nın, kemoterapi ve radyoterapi gibi geleneksel kanser tedavilerine karşı gösterdiği direnç ve tedavi sonrası yüksek oranda nükslerin görülmesi, agresifliğinin başlıca nedeni olarak görülmektedir (McKinnon ve ark., 2021). Bunun yanısıra, beyin homeostazisi yönünden önemli bir fizyolojik yapı olan kan beyin bariyeri (KBB)'nin varlığı, etkili ilaç dağılımının yapılamaması açısından GB tedavisinde önemli bir engel teşkil etmektedir (Steege, 2021). Ayrıca, GB tümör yapısında yüksek oranda olduğu bildirilen kanser kök hücre (KKH) popülasyonu, tedaviye direnç ve nükslerin sık görülmesinden sorumlu tutulmaktadır. (Bao ve ark., 2006a; Chalmers, 2007). Bu tedavi engellerinin varlığına ek olarak, günümüz kanser tedavilerinde kullanılan radyo/kemoterapinin yalnız kanser hücreleri için değil, aynı zamanda normal hücreler için de toksik etkili olduğu bilinmektedir (Chalmers, 2007; Yang ve ark., 2022). Dolayısı ile tüm bu sınırlamalar, hala kesin teavisi bulunamayan GB için, sadece bulunduğu bölgeye hedefli, KBB'ini aşabilecek, direnç sorununun üstesinden gelebilecek ve minimum doz ayarlamaları ile normal hücrelere toksik etkili olmayacak, daha etkin tedavi yöntemlerinin arayışlarına yol açmaktadır. (McKinnon ve ark., 2021; Steeg, 2021; Yang ve ark., 2022).

Vücutta oksijen taşınımı, hücre büyümesi, çoğalması ve farklılaşması bakımından çok önemli olan demir elementinin homeostazisini korumak için, alım, ihraç ve depolanma ile ilgili mekanizmalar sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir (Hentze ve ark., 2010; Wang ve Pantopoulos, 2011). Yapılan birçok araştırmalar, kanser hücrelerinde bu mekanizmaların değişmiş olduğunu ve belirsiz çoğalma ile birlikte gelen yoğun enerji talebini desteklemek için normal dokulardan daha fazla demir gereksinimine ihtiyaç duyduğunu ortaya koymaktadır (Torti ve Torti, 2013; Torti ve ark., 2018). Kanıtlar, demirin mutajenik potansiyelde önemli olduğunu ve normal hücrelerde aşırı demirin, serbest radikallerin üretimi sonucu kanser riskinin artmasına yol açtığını göstermektedir (Bystrom ve ark., 2014; Sun ve ark., 2018; Rinaldi ve ark., 2016; Zhang ve ark., 2009). Bununla birlikte, demirin, DNA sentezine katkıda bulunmak sureti ile kanser hücrelerinde çoğalmayı ve gelişimi teşvik ettiği de bildirilmektedir (Manz ve ark., 2016). Bu nedenle, yüksek demir ihtiyacı ve genişlemiş labil demir havuzu (LfeH),

kanser hücrelerinde belirgin bir özellik olarak görülmekte ve kanser hücrelerini normal hücrelerden ayıran dikkate değer bir farklılık olarak kabul edilmektedir (Recalcati ve ark., 2019; Bystrom ve ark., 2014; Sun ve ark., 2018). Ayrıca indüklenen demir yoksunluğuna KKH'lerinin, kanser hücre topluluğuna göre daha yüksek duyarlı olduğunun bilgisi, GB gibi KKH'leri bakımından yüksek oranlara sahip kanserlerde (Tchoghandjian ve ark., 2010; Rath ve ark., 2013; Bao ve ark., 2019), demir ile ilgili tedavi stratejilerini geliştirmenin önemli bir yaklaşım olabileceğini göstermektedir.

Artan demir birikiminin sık Fenton reaksiyonuna girmesi sonucu oluşan ROS ürünlerinin lipid peroksidasyonunu indüklemesi ile demire bağımlı bir programlı hücre ölüm formu olan "ferroptoz" gelişmektedir (Dixon ve Stockwell, 2019; Dixon ve ark., 2012; Gao ve ark., 2015a; Li ve ark., 2020; Cao ve Dixon, 2016). Salinomisin ve ironomisin gibi demir seviyelerini arttıran ajanların, kanser hücrelerinde zaten yüksek olan demir seviyelerinin daha da fazla artmasına neden olarak ferroptoz mekanizmasını indüklediği bildirilmektedir (Mai ve ark., 2017; El Hout ve ark., 2018). Böylece ilk kanıtlar, başta KKH'leri olmak üzere, kanser hücrelerinin özellikle demir seviyelerinin aşırı yükselmesine karşı savunmasız olduğunu ve ferroptoz indükleyicilerinin etkili kanser önleyici ilaçlar olabileceğini göstermektedir (Wang ve ark., 2022; Liang ve ark., 2019a; Zhang ve ark., 2022; Hassannia ve ark., 2019). Bu gözlemler demir hedefli kanser tedavisi için yeni müdahale fırsatlarını gündeme getirmektedir.

Diğer taraftan, demir yükleme hedeflemelerinin aksine, kanser hücrelerinin demir ihtiyacının önlenmesi gibi tedavi stratejileri de yeni araştırma konuları arasındadır. Bu tür tedavilerden biri, kanser hücrelerindeki demir fazlalığının çeşitli şelatörler aracılığı ile azaltılmasıdır. Bu yönlü ilk çalışmalar, klinik olarak onaylanmış spesifik bir demir şelatörü olan desferoksamin (Desferal) ile yapılmıştır ve bazı kanserlerde terapötik başarılar elde edilmiştir (Chaston ve ark., 2003; Cuccurullo ve ark., 1994). Ayrıca, çalışmalar, demir şelatörlerinin hem KKH'leri hem de farklılaşmış kanser hücreleri üzerinde önemli antiproliferatif etkilerinin olduğunu bildirirken, normal hücreler üzerinde yan etkilerinin olmadığını rapor etmektedir (Katsura ve ark., 2019; Zhao ve ark., 2018). Ancak günümüzde şelatörlerin ciddi toksik yan etkilerinin olması kullanımında kısıtlamalara neden olmaktadır. (Ellis ve ark., 2006; Feng ve ark., 1994; Faa ve ark., 1999). Bu dezavantajlar nedeniyle daha etkin demir şelatörlerinin

geliştirilmesine yönelik çalışmalar, özellikle bazı fitobileşenlerin demir-şelatör kompleksi şeklinde bağlanarak, şelatörlerin, pasif metal bağlama etkilerinin yerine, aktif olarak antikanser etkinliklerinin de olabileceğini göstermektedir (Richardson ve ark., 2002; Liu ve ark., 2002).

Son zamanlarda yeni kanser tedavi stratejilerinin oluşturulmasında çoğunlukla bitki ekstralerinden faydalanılmakta ve bu doğal fitokimyasalların kanser tedavisinde aday etken maddeler olabileceği sonucuna varılmaktadır (Dumitru ve ark., 2018; Kanarek ve ark., 2020). Yüzyıllardır halk ilacı olarak kullanılan *Nigella sativa* (Çörek otu, Black cumin) bitkisinin, yapısında barındırdığı en önemli aktif bileşen olan Timokinon (TQ), bu aday doğal bileşiklerden biri olarak görülmektedir (Gali-Muhtasib ve ark., 2006; Taborsky ve ark., 2012).

TQ, antikanser (Shoieb ve ark., 2003; Majdalawieh ve ark., 2017), antimikrobiyal (Hanafy ve ark., 1991), antienflamatuar (Taka ve ark., 2018; Chehl ve ark., 2009) ve antioksidan (Ismail ve ark., 2010) aktiviteler gibi birçok özellikleri barındıran küçük, lipofilik, monoterpenik bir kinon bileşiktir (Bourgou ve ark., 2010; Yusufi ve ark., 2013; Banerjee ve ark., 2009). TQ'nun, GB (Kolli- Bouhafs ve ark., 2012) dahil, akciğer karsinomu (Yang ve ark., 2015), meme karsinomu (Bhattacharya ve ark., 2015), kolorektal karsinom (Gali-Muhtasib ve ark., 2004a), hepatoselüler karsinom (Ahmed ve ark., 2008), pankreatik karsinom (Banerjee ve ark., 2009), gastrik karsinom (Feng ve ark., 2017), prostat karsinomu (Kaseb ve ark., 2007) ve undiferansiye tiroid karsinomu (Ozturk ve ark., 2017) gibi birçok agresif kanserde hücre ölümünü tetiklediği bildirilmektedir. Ayrıca yeni araştırmalar, TQ'un KKH'leri üzerinde de sitotoksik etkili olabileceğini ileri sürmektedir (Bashmail ve ark., 2020; Ndreshkjana ve ark., 2019; Ibiyeye ve ark., 2020). Son zamanlarda farklı formlarda TQ yüklü nanopartiküller üzerinde odaklı çalışmalar, literatürde görülmektedir (Allout ve ark., 2018; Bhattacharya ve ark., 2015). Ayrıca, yeni yapılan çalışmalar, demir ve TQ arasında çok net ve hızlı oluşan bir reaksiyon sonucu kompleks oluşumunun meydana geldiğini bildirmektedir. TQ'nun demirle bu hızlı bileşik yapma özelliği, onun iyi bir şelatör olma potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir (Kishwar ve ark., 2012). Ancak, monoterpenik ve lipofilik yapısı, tedavi uygulamalarında sorun teşkil etmektedir.

Günümüzde, kanser tedavisi yönünden yeni, etkin ve fonksiyonel ilaç taşıyıcı terapötik ürünlerin geliştirilmesine fırsat sağlayan nanoteknolojik yöntemler, TQ gibi, tedavi uygulamalarında sorun teşkil eden fitobişenlerin, uygun nano taşıyıcı sistemlerle bozunmadan, korunarak, minimal dozda ve seçici bir şekilde taşınmalarına fırsat vermektedir (Zhang ve ark., 2019d; Haglund ve ark., 2009). Nontoksik, biyouyumlu, biyobozunur ve kolay modifiye edilebilme avantajları nedeniyle, kanser araştırmalarında en çok kullanılan nanotaşıyıcı sistemlerden biri olan lipozomlar, hücre zarlarına benzeyen, çift tabakalı, kapalı sistemlerdir. Etkin maddeyi fosfolipit tabakasında ve/veya içteki sulu kısma hapsederek taşıyabilen lipozomlar, amfifilik özellikleri nedeniyle, lipofilik ve/veya hidrofilik etken maddelerin, dış etkilerden korunarak, stabil bir şekilde ve kontrollü salım yaparak taşınabilmesini mümkün kılmaktadır (Gupta ve ark., 2011; Jadhav ve ark., 2012). Son zamanlarda, fito aktif bileşenlerin lipozomal yapılara hapsedilmeden, fosfolipit tabakaya bağlanarak taşınması anlamına gelen fitozom teknolojisi ile fitobileşenlerin tedaviye yönelik uygulama dezavantajlarına çözüm sunulmaktadır (Allemailem ve ark., 2021, Saraf ve ark., 2010). Ayrıca, çevre dostu ve kolay uygulanabilen yeşil biyosentez de, toksik metallerin iyileştirilmesine fırsat veren, alternatif ve etkili bir nano metod olarak, son zamanlarda kanser tedavi uygulamalarının geliştirilmesi açısından büyük ilgi görmektedir (Singamaneni ve ark., 2011; Mahdavi ve ark., 2013; Iravani ve ark., 2011; Khan ve ark., 2017a; Makarov ve ark., 2014b).

Yukarıda verilen bilgilerin ışığında, GB'nın mevcut tedavi yetersizlikleri nedeniyle yeni bir strateji sağlayacak yöntemlerin araştırılmasına acil ihtiyaç duyulmaktadır. Özellikle GB hücrelerinde demir fonksiyonunu düzenleyecek şelatlamaya yönelik bir modülasyonun yapılması, GB tedavisinde rol oynayan önemli bir adım olacaktır. Günümüzde, GB tedavisine yönelik çok sayıda çalışma bulunmaktadır ancak, GB kanser hücrelerinde demir mekanizmasına yönelik yeni tedavi stratejilerini geliştirmek amacı ile TQ bazlı, demir nanopartikül (NP)'lerini içeren, tamamen doğal Magnetolipozom (Mag) NP'lerine benzer bir çalışma bulunmamaktadır. Bu hedef doğrultusunda, demirin kanser üzerindeki etkileri nedeniyle, demir modülasyonu için sentezlenen TQ-bazlı NP'lerin, GB hücrelerinin demir fonksiyonuna olan etkilerinin incelenmesi bu tezin amacını oluşturmaktadır.

Bu amaçla, GB hücrelerinde demir bazlı ölümün geliştirilmesi için önce, yeşil metod uygulanarak, TQ-Fe NP'leri sentezlenmiştir. Bu sentezlenen TQ-Fe NP'lerini, etken madde görevi görmesi için doğal fosfolipitlere bağlamak suretiyle Mag NP'leri elde edilmiştir. Ek olarak, demir bazlı olmayan, fitozom teknolojisiyle hazırlanan TQ bazlı Fitozom (Fit) NP'leri sentezlenmiştir. Böylece, Mag NP'leri demir işlevini artırma yönünden, Fit NP'leri ise demir işlevini azaltma yönünden, birbirlerine zıt etkili görevler için sentezlenerek, GB hücrelerinde demir fonksiyonu üzerine olan etkileri araştırılmış ve karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. TQ-Fe NP'leri ise, sadece Mag NP'lerini konfirme amacıyla kullanılmıştır. NP'lerin sentez ve karakterizasyon işlemlerinin ardından, U87-MG GB hücre hattı üzerinde *in vitro* olarak, hücre canlılığı, apoptozu indüklemeye, serbest radikal oluşturma ve lipit peroksidasyonunu başlatma üzerine olan etkileri ve GB hücrelerinde demir şelatlama yönündeki aktiviteleri incelenerek, istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve yorumlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Glioblastoma

2.1.1. Tanımlama ve Epidemiyolojisi

Beyindeki hücre ve yapılardan köken alarak büyüyen glial tümörler, beynin en sık görülen tümör grubudur. Bu glial tümör grubundan olan astrositomaların IV. evresi olarak kabul edilen glioblastoma multiforme (GB), en agresif ölümcül karakterli malignitelerden biri olup, aynı zamanda erişkinlerde en sık görülen primer malign beyin tümörüdür (McKinnon ve ark., 2021; Sung ve ark., 2021).

GB, tüm santral sinir sistemi tümörlerinin % 14,5'ini ve primer beyin tümörlerinin % 3-15'ini oluşturmaktadır. Erkeklerde kadınlara göre 1,6 kat daha fazla olmak üzere, ortalama yılda 100.000 kişide 5,2 oranında görülmekte olup, ileri dekadlarda (ortalama 60 yaş) görülme sıklığı artmaktadır. Ancak çocukluk yaşlarında nadir olmakla birlikte (pediyatrik popülasyonda 0,85/100.000) her yaşta görülebilmektedir. GB'nın genel sağkalımı düşüktür, tanısı konulduktan sonra hastaların sağkalım süresi, 12-18 ay kadar olduğu bildirilmektedir (Finch ve ark., 2021; Bray ve ark., 2020).

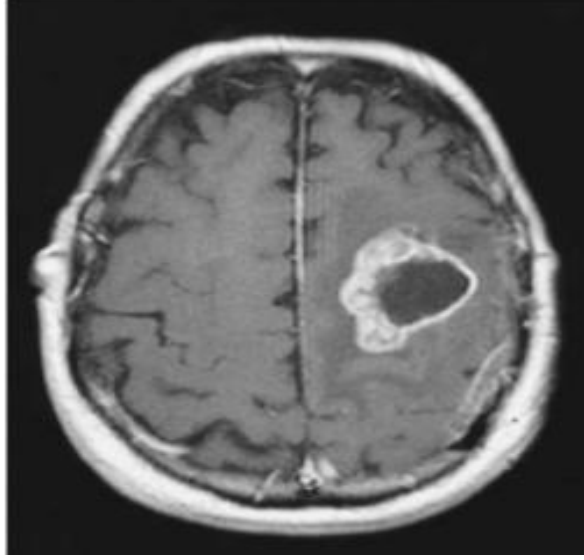
2.1.2. Risk Faktörleri

Melatoninin EZH2-NOTCH-1 sinyalleme yoluyla, radyoterapi ile tedavi edilen GB'li hastaların hayatta kalma süresini arttırdığı bildirilmektedir. Ayrıca uyku bozuklukları ve melatonin eksikliği, tümörün ilerleme potansiyelini şiddetlendiren faktörler olarak görülmektedir (Samanic ve ark., 2021; Oreskovic ve ark., 2021).

İyonlaştırıcı radyasyon, hücrelerde mutasyonların görülme sıklığını arttırmaktadır. 1-2 Gy'lik dozların nöronal tümör riskinde 8,1 ila 52,3 kat artışa neden olduğu belgelenmiştir. Çocukluk çağında beyine uygulanan radyoterapi sonrası, merkezi sinir sistemi tümörlerinde dozla orantılı olarak artış gösterdiği tespit edilmiştir (Pearce ve ark., 2012; Baan ve ark., 2011). Mobil telefon kullanımına fazla maruziyetin, glioma geliştirme riskinde % 40'lara kadar artış olduğunun bildirilmesi, fazla maruziyetin kümülatif etkisi nedeniyle olabileceğini göstermektedir (Villeneuve ve ark., 2021; Baan ve ark., 2011).

2.1.3. Tanısı

GB tanısı, MRI görüntülemenin ardından histopatolojik ve moleküler bilgilerin birleştirilmesine dayanmaktadır. Genetik ve fenotipik olarak heterojen tümör gruplarından oluşan GB, nekroz ve vasküler proliferasyon özellikleri göz önüne alınarak tanı konulabilmektedir (Reuss ve ark., 2023; Komori ve ark., 2021).



Şekil 2.1. Glioblastomanın MRI görüntüsü

(<https://images.app.goo.gl/uYDkwdYMfGZhDtie7>).

Günümüzde, klinik belirtilerden önce GB'yı, asemptomatik olan başlangıç seviyesinde teşhis edebilecek tanı yöntemi veya tarama belirteci bulunmamaktadır. GB'ya tanı koydurabilecek görüntüleme yöntemi karakteristik MRI bulgusudur. En sık tuttuğu lokalizasyon frontal ve temporal loblar, olduğu bildirilmektedir. MRI'da merkezde bir kontrast varlığı ve çevresinde aşırı yoğun parlak bir halka yapısının görülmesi, parmak izi niteliğini taşımaktadır. Bu merkezin, nekrotik dokudan oluştuğu ve kötü prognozun büyük ölçüde göstergesi olduğu bildirilmektedir (Şekil 2.1). Parlak halka kısım ise, hızla çoğalan, agresif hücrelerin ve sağlam bir kan-beyin bariyerinin varlığının göstergesi olarak kabul edilmekte ve mikrovasküler hiperplazinin, endotelial proliferasyonun ve anjiyogenezin belirtisi niteliğini taşımaktadır (Şekil 2.1). GB'da anjiyogenezin oldukça yüksek oranlarda olması nedeniyle, tümör proliferasyon oranı büyük ve buna bağlı olarak tümör merkezi, nekrotik olarak görülmektedir (Brat, 2012; DeAngelis, 2001).

GB tanısı, yüksek vaskülarite, psödopalisading nekroz ve çevredeki normal beyin dokusuna infiltrasyon gibi histolojik özelliklere dayanmaktadır. GB'lar makroskopik olarak normal çevre dokulardan iyi sınırlarla ayrılmış olarak gözükmesine rağmen, mikroskopik yönden tümör kitlesinden uzaktaki dokuya infiltre olduğu görülmektedir. Bu nedenle, GFAP (glial fibriler asidik protein) histokimyasal metodu ile boyamada, farklılaşmamış hücrelerin görülmesi, GB'nın tanısında önemli bir kriter olarak görülmektedir (Brat, 2012; Brat, 2004; DeAngelis, 2001).

2.1.4. Moleküler Değişiklikleri

GB'nın moleküler belirteçleri, spesifik tümör tiplerinin farklılaşması ve progresyonu hakkında bilgi vererek, prediktif bilgilere ulaşmamızı kolaylaştırmaktadır (Zhu ve Parada, 2002; Brat, 2012). GB'nın gelişmesi, yayılması ve ilerlemesinde etkili olan ve tanı, tedavi ve prognoz hakkında bilgi veren önemli moleküler değişiklikler aşağıda özetlenmiştir:

IDH (İzositrat Dehidrogenaz); mutasyonu, sekonder GB'lar olan düşük dereceli astrositom ve oligodendrogliom için tipiktir ve çok daha iyi bir prognoz göstergesi olarak kabul edilmektedir. GB'da kötü prognoz belirteci olan izositratdehidrogenaz (IDH)-wildtip, % 90 gibi yüksek oranlarda görülmektedir. Bu durum tedaviye yanıtın takibini mümkün kılması açısından önem taşımaktadır (Reuss ve ark., 2023; Yan ve ark., 2009). IDH, IDH1 ve 2 genleri tarafından kodlanan metabolik enzimler olup, krebs siklusunda izositratın alfa-ketoglutarat'a dönüşümünü kataliz etmektedir. Mutasyonlarında, krebs siklusundaki ara bileşik olan alfa-ketoglutarat üretimi yerine, bir onkometabolit olan 2-hidroksiglutaratın (2-HG) aşırı düzeyde üretimi görülmektedir. Bu nedenle IDH mutasyonu, hücre mikroçevresinin değişmesi, epitelmezenkimal geçişin uyarılması, protoonkogenlerin ifadesinin artması, DNA onarım mekanizmasının bloke edilmesi, epigenetik düzenlemelerin değişmesi ve hücre farklılaşma döngüsünün bozulması ile sonuçlanmaktadır. Bunlarla birlikte hücrelerin daha az oksijen ortamında yaşamalarını destekleyecek genlerin aktif hale gelmesine ve tümör oluşumuna katkıda bulunan anjiogenezisin hızlanmasına da aracılık etmektedir (Garrett ve ark., 2018; Liu ve ark., 2012; Reuss ve ark., 2023; Chaurasia ve ark., 2016).

MGMT (O6 - Metilguanin DNA Metiltransferaz); geni, kromozom 10q26 üzerinde bulunur ve guaninin O6 pozisyonundaki alkil grubunu çıkarmak suretiyle DNA onarımı

yapan bir proteini kodlamaktadır. GB kemoterapisinde alkilleyici bir ajan olan Temozolomid (TMZ), DNA'yı guanin için N7 ve O6 ve adenin için N3 atomlarından metilleyerek hasar oluşturmak suretiyle çalışmaktadır ve bu ajana karşı farklı hasta yanıtlarının olduğu bildirilmektedir. TMZ etkinliğinin artışı, MGMT ekspresyonunun ve aktivitesinin azlığı ile ilişkili olması nedeniyle bu enzim, GB tedavi hassasiyetinin bir belirteci olarak kabul edilmektedir (Johannessen ve Bjerkgvig, 2012; Krakstad ve Chekenya, 2010).

ATRX (A - Thalasemi / Mental Retardasyon Sendrom – X); mutasyonu, primer GB'ya göre sekonder GB'da daha sık (yaklaşık %57) meydana gelmektedir. ATRX mutasyonları, TP53 mutasyonları ile ve yüksek oranlarda IDH mutasyonu ile birlikte görülmektedir. Xq21.1'de bulunan ATRX geni, kromatin yeniden düzenlemesine neden olmakta ve ekspresyon kaybı, pozitif prognostik faktör olarak kabul edilmektedir (Liu ve ark., 2012; Chaurasia ve ark., 2016).

EGFR (Epidermal Büyüme Faktörü); 7p12 gen lokusunda lokalize EGFR, EGF (epidermal büyüme faktörü) tarafından aktive edilen bir reseptördür. En yaygın mutasyonu olan EGFRvIII, neredeyse sadece amplifikasyona yol açmakta ve hücre proliferasyonu, transformasyonu, migrasyonu ve anjiogenezini artırıcı, apoptozu ise azaltıcı etkiler göstermektedir (Heimberger ve ark., 2005; Krakstad ve ark., 2010). EGFR amplifikasyonu, primer GB'da % 40 gibi sık görülen genetik değişikliklerin başında gelmekte ve çoğunlukla daha kısa sağkalımla ilişkili olarak kötü prognoz belirteci olarak kabul edilmektedir (Heimberger ve ark., 2005; Johannessen ve Bjerkgvig, 2012; Simmons ve ark., 2001).

TP53 (Tumor Protein P53); mutasyonu, %81 oranında IDH-mutant sekonder GB'da yaygın olarak bulunmakta ve prognoz ile ilişkili olarak görülmesine rağmen, primer GB'da prognostik bir değere sahip görülmemektedir. Ancak MGMT ekspresyonunu arttırarak DNA'ya zarar veren kemoterapötiklere karşı daha fazla direnç gelişmesine ve sonuç olarak TMZ duyarlılığının azalmasına neden olmaktadır (England ve ark., 2013; Chaurasia ve ark., 2016; Ohgaki, 2005 Liu ve ark., 2012; Brat, 2012).

PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog); kromozom 10q23 bölgesinde yer alan, bir tümör supressör genidir ve DNA tamirinde, kromozom stabilitesinde ve apoptotik hücre

ölümünde düzenleyici olarak görev yapmaktadır. PTEN ifadesinin kaybı (LOH), IDH-wild tip (primer) GB olgularında % 60-80 oranında görülmekte ve çoğunlukla kötü prognoz ile ilgili olarak kabul edilmektedir (Ohgaki, 2005; Hopkins ve ark., 2014; Knobbe ve Merlo, 2002; Koul, 2008; Krakstad ve Chekenya, 2010).

1p/19q t(1;19) (q10;p10) ko-delesyonu; IDH mutasyonu ile birlikteliği, radyo/kemoterapiye daha iyi yanıt verme ve iyi prognoz işareti olarak kabul edilerek, oligodentrogliomalar için tanısal bakımdan önemli kabul edilmekte ve GB'da ayırıcı tanı yönünden değerlendirilmektedir (Reuss ve ark., 2023; Komori ve ark., 2021).

2.1.5. Sınıflandırılması

Santral Sinir Sistemi Tümörleri'nin WHO tarafından 2021'deki yeniden gözden geçirme (5.baskı) sonuçlarına göre, beyin tümörleri için uluslararası standart sınıflandırmaya (WHO CNS5) genetik mutasyonlar da dahil edilmiştir. WHO CNS5'de gliomalar için neredeyse tüm sınıflama, IDH-mutant ve 1p/19q ko-delesyonun olup-olmamasına dayanmakta ve GB, "IDH wild-type 4. derece astrositomalar" olarak adlandırılmaktadır. Dikkat çekici bir şekilde, "glioblastoma" terimi yalnızca IDH-wild tip tümörler için kullanılmaya devam etmekte ve derece 4 tümörler malignite spektrumunun en üst ucunu temsil etmektedir (Reuss ve ark., 2023; Komori ve ark., 2021).

Ayrıca WHO CNS5'de, "yayılma" veya "anaplastik" gibi ek terimler, artık kullanılmamaktadır. CNS5 sınıflandırması, tümör büyümesi ve ilerlemesindeki genetik faktörlerin önemini yansıtmakla birlikte, tümör sınıflandırması, tedavisi ve prognozunun takibinde hastalığın bireyselleştirilmesi bakımından daha fazla genetik analiz kullanımını teşvik etmektedir (Reuss ve ark., 2023; Komori ve ark., 2021).

2.1.6. Geleneksel Tedavi Yöntemleri

Günümüzde GB'nın tedavisi için uygulanan yaklaşımlar; olabilecek en geniş rezeksiyon operasyonuna ilaveten, radyo/kemoterapi kombinasyonudur. Tedavideki son yenilik, tedavi protokoluna, alkilleyici bir ajan olan TMZ'in ilave edilmesi (75 mg/m²) yönündedir. TMZ, DNA'nın kritik bölgelerine metil grubu eklemek suretiyle kanser hücrelerinde apoptozu indüklemektedir. Bu etki TMZ'in aktif metaboliti olan MTIC (5-(3-metiltriazin-1-yl(imidazol-4-karboksamide) tarafından gerçekleştirilmekte ve en

fazla, O6 pozisyonundaki guaninin metillenmesi ile epigenetik susturma meydana gelmektedir. Eklenen metil grubu, MGMT enzimi tarafından kaldırılarak DNA tamiri yapılabilmektedir. Dolayısıyla, kanser hücrelerinde DNA tamirinin yüksek olacağına bir belirtisi olması nedeniyle, MGMT enziminin fazla sentezlenmesi, tedavi direnci ile ilişkilendirilmekte ve MGMT mutasyonu, tedavi ve prognoz takibinde, kemoterapiden fayda sağlama yönünden kuvvetli bir belirteç olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle TMZ direncinin, tümör rekürrensine de zemin hazırladığı bildirilmektedir (Johannessen ve Bjerkgvig, 2012; Krakstad ve Chekenya, 2010; Ohka ve ark., 2012). Ayrıca GB kanser hücrelerinde yüksek oranda bulunduğu bildirilen glioma kök hücrelerinin de TMZ direncinden sorumlu olduğu ve sık görülen rekürrenslere yol açtığı düşünülmektedir (Bao ve ark., 2006a). Ek olarak TMZ tedavisinde kemik iliği toksisitesi, ülser, bulantı-kusma, halsizlik, baş ağrısı gibi birçok yan etkiler de görülmektedir. Bu nedenle GB ortalama sağ kalım 12 ila 18 ay kadar olup, hala tedavi edilemeyen bir kanser olarak günümüzde uygun tedavi stratejilerinin geliştirilmesini beklemektedir (Stupp ve ark., 2014; Ramirez ve ark., 2013).

2.1.7. Glioblastomada Tedavi Başarısızlığının Nedenleri

Yapılan yoğun araştırmalara rağmen GB gibi sınırlamaları olan kanserlere karşı mücadeleyi kazanmak için mevcut terapi stratejilerinin sonuçları hala tatmin edici olmaktan uzaktır. GB'nın bulunduğu fizyolojik bölge ve sahip olduğu kan-beyin bariyeri nedeniyle hem cerrahi tedavi hem de sistemik kemoterapi açısından kısıtlamaları bulunmaktadır. Bununla birlikte, GB hücrelerinin oldukça yüksek oranda kanser kök hücre özellikli olma gibi nedenlerinden dolayı tedaviye direnç gelişmesine ve nüklere engel olunamamaktadır. Ayrıca günümüzde kanser tedavisinde kullanılan kemoterapi, radyoterapi ve immünoterapi gibi terapötik yöntemlerin etkinliği sınırlıdır ve birçok yan etkileri mevcuttur. İlave olarak, bu sistemik tedavilerin normal hücrelere de toksik olması, GB tedavi başarısızlıklarının ana nedenlerindedir (McKinnon ve ark., 2021; Steeg, 2021; Yang ve ark., 2022).

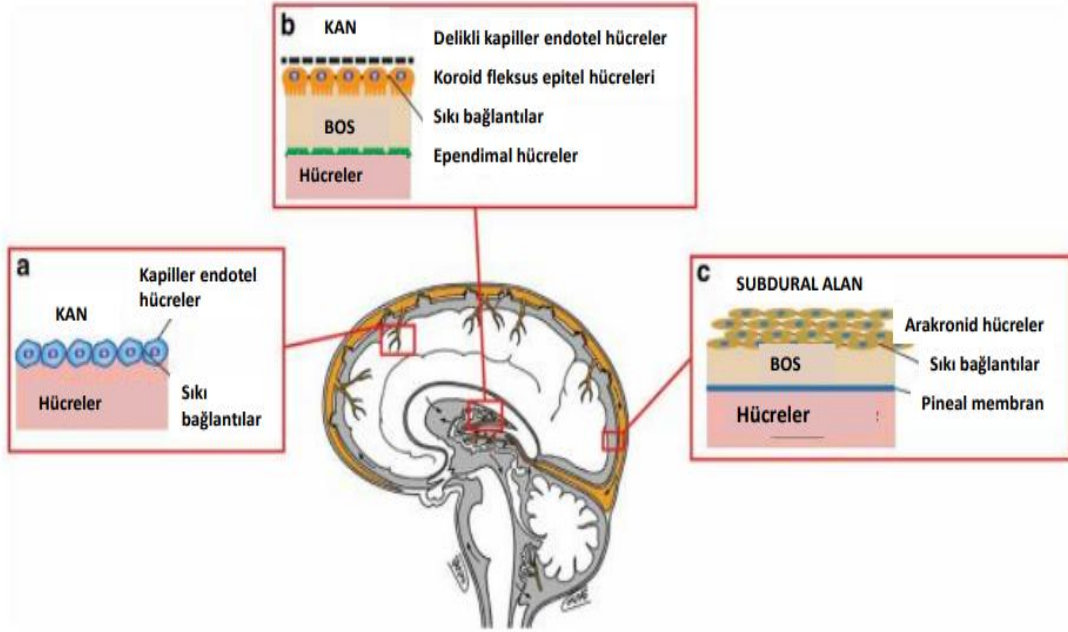
2.1.7.1. Kan Beyin Bariyeri

Merkezi sinir sisteminin (MSS) normal işleyişini desteklemek için yüksek düzeyde kontrol edilen bir mikro ortam gerekmektedir. Beyin, ancak çok iyi kontrol edilen, dinamik bir ortamda işlev görebilmesi nedeniyle, periferik dolaşımdan izole edilmelidir.

Bu nedenle, periferik dolaşımdan üç bariyer sistemi ile ayrılmaktadır. Bunlar; kan-beyin bariyeri (KBB), kan-beyin omurilik sıvısı (BOS) bariyeri ve ependimal bariyer olup, bu üç bariyer birlikte hareket etmektedir (Şekil 2.2) (Kadry ve ark., 2020; Rip ve ark., 2009; Daneman ve Prat, 2015; Ballabh ve ark., 2004). Bu bariyerler temel besinlerin ve nörotransmitterlerin serbest geçişine izin verirken toksinlerin istilasına engel olarak seçici geçirgen bir özellik göstermektedir. Sıkı bağlantılarla birbirine bağlanan sürekli endotel hücreleri tarafından oluşturulan KBB’i, maddelerin periferik kan dolaşımından beyin parankimine serbest difüzyonunu kısıtlamakta; ventriküllerdeki koroid pleksus epiteli tarafından oluşturulan kan-BOS bariyeri, dolaşımdaki kandan BOS’a serbest difüzyonu kısıtlamakta; ventriküllerdeki epitel hücrelerinden oluşan ependimal bariyer ise, BOS'tan beyne difüzyonu düzenlemektedir (Şekil 2.2) (Kadry ve ark., 2020; Chen ve ark., 2012a; Rip ve ark., 2009; Abbott, 2005). Asıl spesifik olan KBB, dolaşımdaki kan ile beyin parankimi arasında geniş bir arayüz (20 m²) oluşturduğu için beyine ilaç taşınmasında ana hedef olarak kabul edilmektedir (Hawkins ve Davis, 2005; Rip ve ark., 2009; de Vries ve ark., 2006).

Vücuttaki normal endotel hücreleriyle karşılaştırıldığında, beyin endotel hücreleri, yapışık bağlantılar (adherens junctions) ve daha önemlisi sıkı bağlantılar (tight junctions) şeklinde iki tip hücresel bağlantı ile sıkı bir şekilde kapatılmıştır. Adherens bağlantılar hücreler arası teması başlatıp sürdürürken, sıkı bağlantılar, çözünür bileşiklerin parasellüler geçişindeki taşınmayı düzenlemektedir. Yalnızca çapı 4 Å'dan küçük olan çözünür bileşikler, sıkı dokudaki sulu gözenekten geçebilmektedir. Ayrıca, sıkı bağlantıların sızıntısı, çevredeki astrositler, perisitler, mikroglialar, nöronlar ve hücre dışı matris tarafından da aktif bir şekilde düzenlenerek, kontrol edilmektedir (Anderson ve Van Itallie , 2009; Bhowmik ve ark., 2015; Hawkins ve Davis, 2005; Wolburg ve ark., 2002; Chen ve ark., 2012a). Ek olarak, periferik endotel hücrelerine göre daha düşük endositoz veya transsitoz aktivitelerine sahip olması nedeniyle, transendotelial taşınmayı kısıtlayan beyin endotel hücreleri, geçişi engelleyen diğer faktörlerden birini oluşturmaktadır (Daneman ve Prat, 2015; Ballabh ve ark., 2004; Abbott ve ark., 2010). Bunların dışında, terapötik ajanların transselüler yollardan beyine iletilmesi, aynı zamanda, ilacı temizleyen veya ilacı tekrar kana pompalayan taşıyıcılar ve ilacı metabolize eden enzimler tarafından da engellenmektedir. Böylece, sıkı bağlantı bölgeleri, büyük bir kısıtlayıcı engel oluşturarak küçük moleküler ilaçların % 98'inden fazlasının, büyük moleküler ilaçların ise % 100'ünün, beyine nüfuz etmesini

engellemektedir (Liebner ve ark., 2011; Anderson ve Van Itallie , 2009; Bhowmik ve ark., 2015).



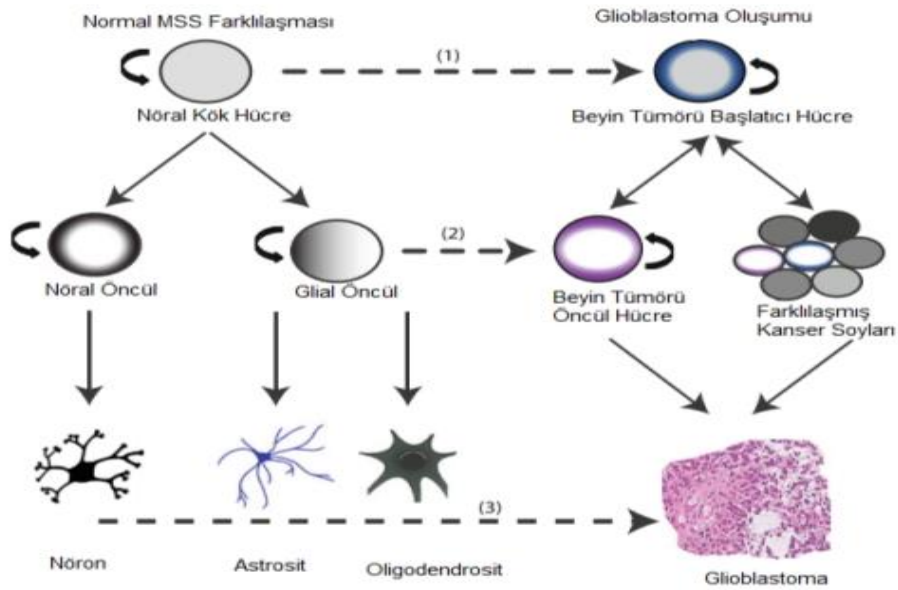
Şekil 2.2. İnsanda a) kan-beyin bariyeri; b) kan-BOS bariyeri ve c) ependimal bariyer (Kadry ve ark., 2020).

Bu nedenle KBB, merkezi sinir sisteminin homeostazisini korumada temel mekanizmadır ve aynı zamanda patojenlere ve eksojen bileşiklere karşı da koruma sağlamaktadır (Bhowmik ve ark., 2015; Hawkins ve Davis, 2005). Ancak beyin tümörlerinde, etkili ilaç dağıtımı için büyük bir engel teşkil etmektedir. Örneğin parenteral uygulamayı takiben terapötik ilaçların beyindeki seviyeleri plazmadakilerin yalnızca % 0,01-0,1'ine karşılık geldiği görülmektedir. Bu nedenle, GB prognozu aynı zamanda KBB'yi boyunca ilaç dağıtım geçirgenliğini de yansıtmaktadır (Steeg, 2021; Bhowmik ve ark., 2015; Chen ve ark., 2012a). Moleküller, KBB'ni, endojen, reseptör aracılı, taşıyıcı aracılı veya adsorptif aracılı taşıma sistemleri dahil olmak üzere spesifik yollardan geçebilmektedir. Bu nedenle biyomolekül etkileşimlerinin ve parçacık boyutunun taşıma türünde önemi vurgulanmaktadır (Rip ve ark., 2009; de Vries ve ark., 2006). Sonuç olarak, 400 Da'dan düşük, lipofilik moleküllerin ve 200 nm boyutun altındaki nano yapıların, pasif difüzyon yoluyla endotel hücrelerinden endositoza bağlı olarak ya da bağlantı noktalarına nüfuz ederek kanser hücrelerine girebilmeleri, lipid bazlı nanomateryallerin KBB'yi için kritik yapılar olduğunu göstermektedir. (Rip ve ark., 2009; de Vries ve ark., 2006; Steeg, 2021; Chen ve ark., 2012a).

Dolayısıyla nanotıp, KBB'nin üstesinden gelmek ve ilaç moleküllerini belirli bir beyin bölgesine ulaştırmak için temel bir strateji oluşturmaktadır. Bu nedenle ilaç dağıtımına aracılık edebilen nanomateryaller, beyin tümörlerini tedavi etmek için etkili ve invaziv olmayan bir sistem olarak gözükmemektedir (Rip ve ark., 2009; de Vries ve ark., 2006; Steeg, 2021; Chen ve ark., 2012a).

2.1.7.2. Glioblastoma Kanser Kök Hücreleri

Beyin hücreleri, nöral kök hücrelerinden köken alan, nöral (nöronlar ve oligodendrositler) ve glial (oligodendrositler ve astrositler) olmak üzere iki tip projenitör hücrelerinden farklılaşmaktadır. GB'lar primer (de novo) ve sekonder olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Histopatolojik olarak tanı konulan GB'ların %90'ı glial öncül hücrelerinden direkt olarak gelişen primer tümörlerdir (Şekil 2.3) (Reuss ve ark., 2023; Komori ve ark., 2021; Zhu ve Parada, 2002). Primer GB'nın hikayesinde düşük evreli gliom öyküsü bulunmamakta ve hücresel düzeyde, çok çekirdekli, anaplastik, yuvarlak veya pleomorfik hücreler şeklinde zayıf farklılaşma göstermektedir (Dolecek, 2012; Brat, 2012). Geri kalan %10'luk kesimi oluşturan sekonder GB'ların ise, bu düşük dereceli gliomalardan geliştiği bildirilmektedir (Reuss ve ark., 2023; Zhu ve Parada, 2002; Komori ve ark., 2021).



Şekil 2.3. Glioblastomanın kök hücrelerden oluşumu (Agnihotri ve ark., 2013).

GB kök hücre (GKH)'leri, kültürde kendini yenileme, farklılaşma ve nörosferler oluşturma yeteneklerine ek olarak, Notch, Sox, Sonic-Hedgehog (SHH), Nestin ve CD133 gibi nöral kök hücre belirteçlerini eksprese etmeleri de dahil olmak üzere, NKH'leri ile birçok ortak özellikleri paylaşmaktadır (Jin ve ark., 2021; Kristoffersen ve ark., 2013; Hagerstrand ve ark., 2011; Zhang ve ark., 2008). Bununla birlikte, GKH'lerinin genetik mutasyon profilleri ile tümör oluşumu açısından NKH'lerden farklılıklar göstermektedir (Ghods ve ark., 2007; Beier ve ark., 2007;).

GKH'lerinde, SHH yolağının, kendini yenileyebilme kapasitesini düzenlemekle birlikte, kemoterapide MGMT'nin ifade artışını sağlayarak ilaç direncine neden olduğu (Melamed ve ark., 2018; Ferruzzi ve ark., 2012; Skoda ve ark., 2018); Wnt/ β -katenin sinyal yolağının, kendini yenileme yeteneği ve farklılaşmanın düzenlenmesini ve tümör popülasyonunun sürdürülmesini sağladığı (Zhang ve ark., 2011; Rajakulendran ve ark., 2019; Parker ve ark., 2020); Notch yolağının, angiogenez, farklılaşma ve metastaz oluşumuyla ilgili olduğu (Parmigiani ve ark., 2020; Guan ve ark., 2020a;); JAK/STAT sinyal yolağının ise, tümör başlatma ve malign dönüşümde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Shi ve ark., 2018; Masliantsev ve ark., 2018).

GB tümörlerinin büyük çoğunluğu, primer tümör bölgesinin 2 cm kadar yakınında nüksmekte ve bu nükslerde tümörler sıklıkla nodüler bir patern göstermektedir. Bu da, nükslerin primer tümör oluşumundan ziyade, klonal olarak, primer tümör hücrelerinin bir alt kümesinden türetildiği sonucunu vermektedir (Clement ve ark., 2007). Ayrıca GKH'lerinin, nude farelere *in vivo* transplantasyonunun orijinal tümörün oluşumu ile sonuçlanması, kök hücre özelliğinin bir delili olarak kabul edilmekte ve teşhiste kullanılmaktadır (Folkins ve ark., 2007).

Tümör oluşumunu başlatma yeteneğine sahip GKH'leri, genellikle hareketsiz hücrelerdir ve bu özelliği ile uzun süre hayatta kalma avantajını sağlamanın yanı sıra, genetik mutasyonların birikme ihtimalini de arttırmaktadır (Tang ve ark., 2007). DNA onarım (MGMT upregülasyonu) (Chakravarti, 2006; Kanzawa ve ark., 2003), ilaç direnci (ABC superfamily taşıyıcılarının ekspresyonu) (Kim ve Morshead; 2003; Deeley ve ark., 2006) ve apoptoza karşı direnç (Ghods ve ark., 2007; Hagerstrand ve ark., 2011) mekanizmalarının artması ile birlikte, düşük proliferatif aktivite göstermesi sonucu, normal tümör hücrelerinin ölümüne neden olan kemo/radyoterapilerden

etkilenmeyerek sağ kalabilmesini sağlamaktadır (Bao ve ark., 2006a; Kang ve Kang, 2007; Liu ve ark., 2006a). Ayrıca, vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF) ekspresyonunu arttırmak gibi tümör anjiyogenezini, dolayısı ile metastazları teşvik etmekte ve bunun sonucu, tümörün tekrarlanması ile sonuçlanan hızlı agresif yapı, hasta ölümlerinin görülmesine neden olmaktadır (Bao ve ark., 2006b; Liu ve ark., 2007). Ancak, tümör popülasyonları ameliyat, kemoterapi veya radyoterapi gibi nedenlerle ölmesi durumunda uyarılmakta ve katlanarak sayılarını arttırmaktadır (Liu ve ark., 2007; Kang ve Kang, 2007). Böylece, GKH'lerin, GB nüksünün ve tedavi direncinin arkasındaki itici güç olduğu ileri sürülmektedir (Bao ve ark., 2006a; Kang ve Kang, 2007; Liu ve ark., 2007).

2.1.8. Glioblastomada Yeni Tedavi Strateji Arayışları

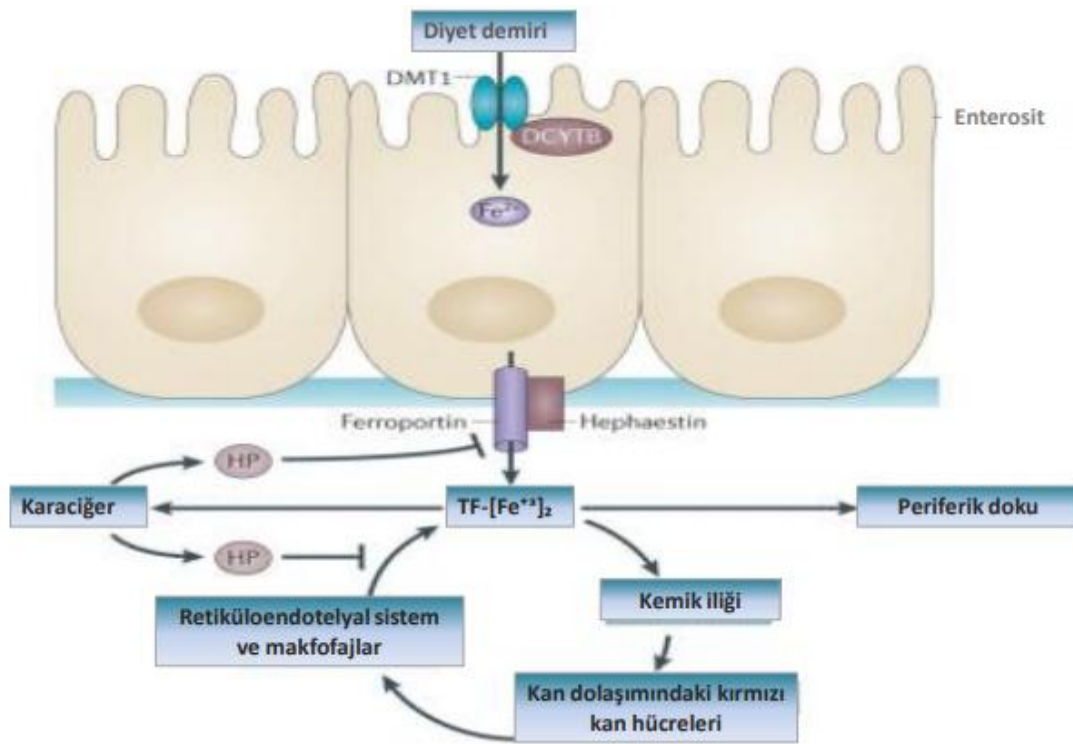
Kanser tedavilerinde büyük ilerlemeler kaydedilmesine rağmen özellikle GB gibi agresif kanser hücrelerine yönelik çeşitli yaklaşımların sonuçları hala tatmin edici olmaktan uzaktır. Mevcut kemoterapötiklerin ve diğer tedavilerin yetersizliği nedeniyle, GB tedavisi için genel bir strateji sağlayabilecek ortak bir hedef arayışı devam etmektedir. Demirin hücre içindeki rolünün, öngörülenden çok daha etkili olduğu, daha önce bilinmeyen mekanizmalarının keşfinden sonra anlaşılmaktadır. Günümüzde, demir ve kanser arasında daha önce tanımlanmış ilişkilerin yeni bağlantılarının bulunması ve demirin mekanistik temellerinin ortaya çıkarılması, tümör davranışını ve ilaç yanıtını etkileyen, demir içeren kanser tedavileri yönünden yeni müdahale fırsatlarının doğmasına yol açmaktadır (Silantyev ve ark., 2019; Bystrom ve ark., 2014).

2.1.8.1. Demir Metabolizması

Demir, solunum metabolizmasına ilaveten, hücre metabolizmasında gördüğü birçok görevleri nedeniyle canlılık için çok önemli bir elementtir. Organizmada üç-beş gram kadar en fazla bulunan demir, toksik etki göstermesi nedeniyle sınırlı bir aralıkta ve çok sıkı kontrol altında tutulması gerekmektedir (Bystrom ve Rivella, 2015; Winter ve ark., 2014). Demir metabolizması, demir alımı, depolama ve demir atılımı şeklinde üç ana bölümden oluşmaktadır. Ancak insanlar için, hücrelerinin dökülmesi ve kan kaybı dışında demir atılımı için fizyolojik yolların bulunmaması, alım ve depolama işlevlerinin düzenlenerek sistemik ve hücrel demir homeostazisinin sürdürülmesi daha önemli hale gelmektedir. Bu durum, vücutta demirin sirküle edilerek tekrar kullanımını

gerektirmektedir. (Pantopoulos ve ark., 2012; Hentze ve ark., 2010; Torti ve Torti, 2013).

Demir diyetten, duodenal enterositlerin apikal yüzeyindeki divalanmetal taşıyıcı 1 (DMT1) ve duodenal sitokrom b (DcytB) tarafından Fe^{+3} 'ün Fe^{+2} 'ye indirgenmesi şeklinde alınmakta ve eritrositlerin parçalanması sonucu açığa çıkan demir, dalak retiküloendotelial makrofajlar tarafından tekrar kullanımı sağlanmaktadır. Ancak, asıl hücre içine dengeli bir şekilde girip çıkma trafiği ile kontrol edilmektedir (Şekil 2.4) (Pantopoulos ve ark., 2012; Torti ve Torti, 2013).

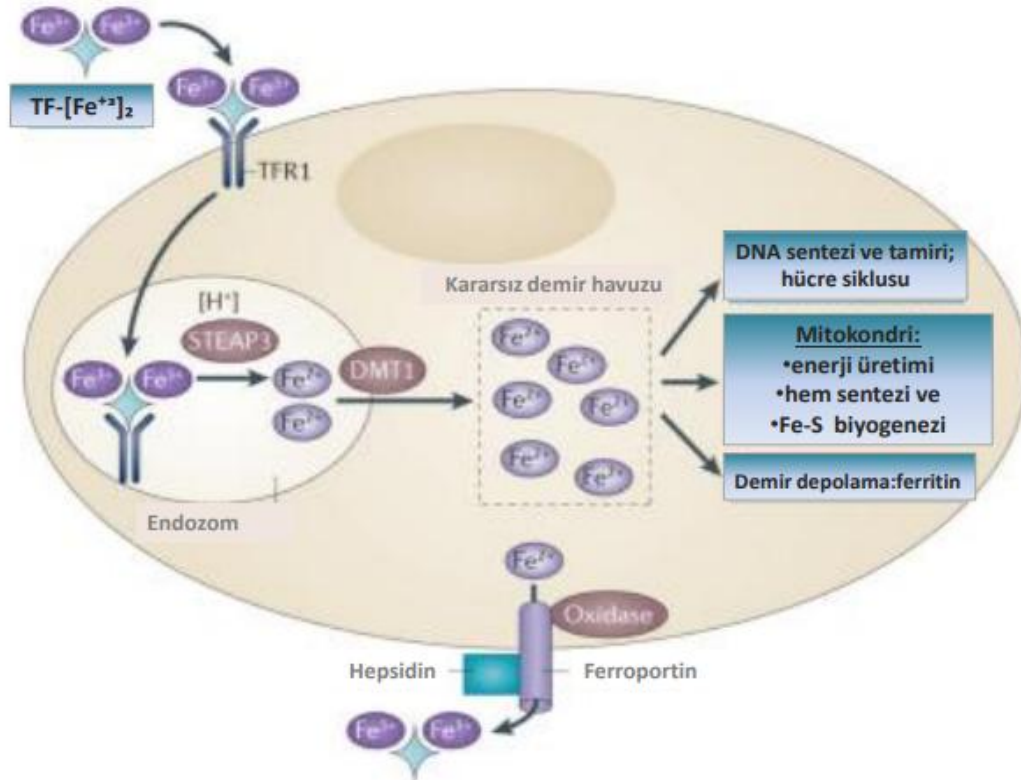


Şekil 2.4. İnsanda sistemik demir homeostazisi (Torti ve Torti, 2013).

Demir, hücreye transferrin (Tf) ile taşınmak suretiyle hücre zarına getirilmekte ve Tf'nin hücre zarı üzerindeki reseptörüne (TfR1) bağlanması ile reseptör aracılı endositoz yoluyla hücre içine alınmaktadır. Hücre içinde asitleşen endozom ortamında demir, Tf'den Fe^{+3} olarak ayrılmakta; Prostat 3'ün altı transmembran epitelyal antijeni (STEAP3) tarafından Fe^{+3} , Fe^{+2} 'ye indirgenmekte; DMT1 aracılığıyla Fe^{+2} , sitoplazmaya taşınmakta ve ardından, kullanılmak üzere sitozolik "kararsız demir havuzuna" (LfeP) depolanmaktadır. Hücresel demirin fazlası ya ferritinde depolanmakta

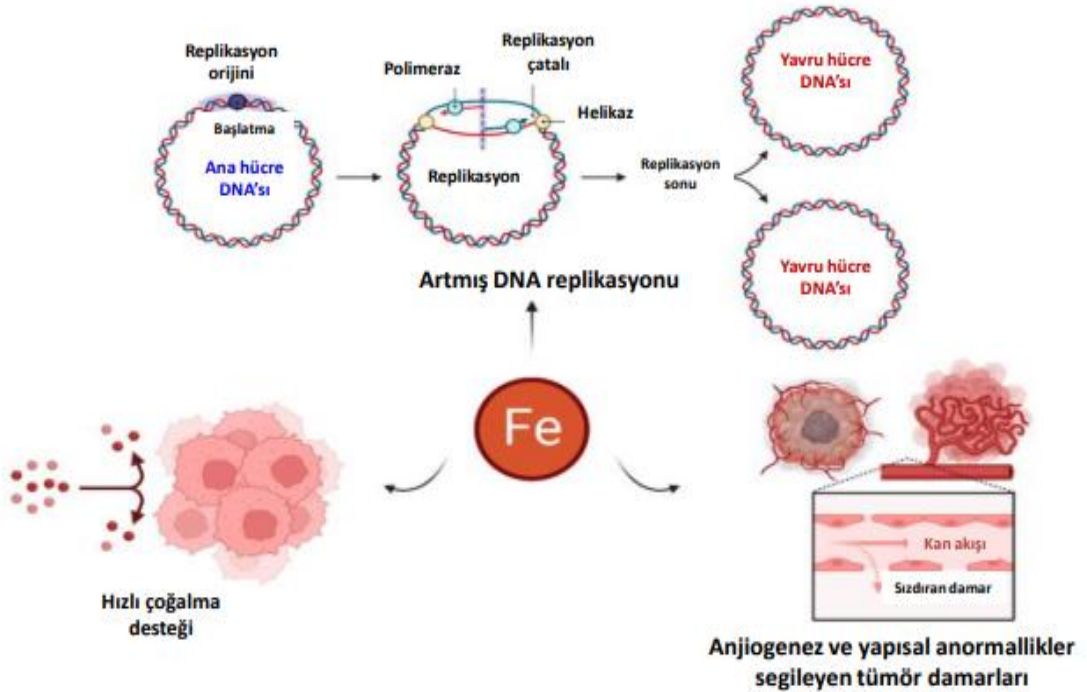
ya da ferroportin (Fpn) yoluyla dışarıya aktarılmaktadır (Şekil 2.5) (Anderson ve Vulpe, 2009; Pantopoulos ve ark., 2012)

Demir sirkülasyonu, DNA stabilitesi ve hücre döngüsü ilerlemesinde rol oynayan enzimler, solunum komplekslerinde rol oynayan mitokondriyal enzimler ve peroksidaz ve katalaz gibi detoksifiye edici enzimler dahil olmak üzere, çeşitli heme demiri ve heme olmayan demiri içeren proteinler tarafından kontrol edilmektedir (Torti ve Torti, 2013). Heme demiri, oksijen bağlama ve taşıma gibi oksijen metabolizma süreçleri için hemoglobin ve miyoglobin moleküllerinin yapısı içinde yer alan demiri ifade eden; heme-olmayan demir, DNA sentezi ve hücre döngüsünde yer alan birçok önemli enzimin kofaktörü olarak, enzim aktif merkezlerinde yer alan demiri temsil etmektedir (Pantopoulos ve ark., 2012; Hentze ve ark., 2010; Wang ve Pantopoulos, 2011). Ancak, demir homeostazisi yalnızca demir içeren protein fonksiyonları için gerekli değildir, aynı zamanda sinyal iletimi ve hücrel mikroi ortamı için de kritik olarak önemde ve gereklidir (Torti ve Torti, 2013).



Şekil 2.5. Hücre içi demir alım, depolama ve ihracı (Torti ve Torti, 2013).

Demirin asıl biyolojik aktivitesi, elektronları kabul etme yeteneğinde yatmaktadır. Elektronlara gösterdiği ilgi nedeniyle elektron transferini verimli bir şekilde yapabilmekte ve bunun için Fenton gibi redoks özellikli reaksiyonlara kolaylıkla katılabilmektedir (Torti ve Torti, 2013). İnsan vücudunda demir biyolojik olarak, ferröz demir (Fe^{+2}) ve ferrik demir (Fe^{+3}) şeklinde, bulunmaktadır (Pantopoulos ve ark., 2012). Fe^{+2} 'nin hidrojen peroksit (H_2O_2) ile reaksiyona girerek bir elektron vermesi sonucu bir reaktif oksijen türü (ROS) olan hidroksil radikalleri ($\bullet HO$) oluşmaktadır (Pantopoulos ve ark., 2012; Torti ve Torti, 2013). Bu radikal türlerinin, oksidatif olarak değiştirilmiş bazlar, abazik alanlar ve DNA iplikçik kırılmalarına neden olarak DNA'ya doğrudan zarar verebilmeleri, kanser gelişimine neden olabilmektedir. Dolayısıyla, fazla demir miktarının DNA'ya zarar vermesi, Fenton reaksiyonu ile aşırı üretilen serbest radikallerin DNA hasarına yol açması sonucudur. Böylece aşırı demir, normal hücrelerde DNA hasarı oluşturmak suretiyle kanser gelişimine katkıda bulunurken, kanser hücrelerinde ise, DNA sentezine katılma yoluyla hücrelerin çoğalmasını ve büyümesini teşvik etmekte ve bu yönü ile kanser gelişimi için önemli bir rol oynamaktadır (Pasricha ve ark., 2021; McLean ve ark., 2008).



Şekil 2.6. Kanserde demirin rolü (Kawak ve ark., 2023).

Kanserde değişen demir metabolizması üzerine yapılan çalışmalar, kanser hucelerinde, demir alımı, depolanması ve düzenlenmesiyle ilgili yolların tümünün bozulduğunu göstermektedir. Bu durum, kanserde, demire bağlı huce döngüsünün, DNA replikasyonu ve onarım süreçlerinin yanı sıra, hipoksi ile indüklenebilir faktör (HIF), P53, Wnt gibi kanserde önemli moleküllerin değişimi aracılığıyla gelişen sinyal iletimi ve mikro çevrenin de demir ile ilişkilendirilebileceğini göstermektedir (Torti ve Torti, 2013) Ayrıca kanser hucelerinde, çoğalma ile ilgili demire bağlı proteinlerde artış gözlenmesi ve birçok kanser hastasının nedeni henüz tam belirlenememiş demir eksikliğine bağlı bir anemiye sahip olduğunun görülmesi, bu durumu destekler niteliktedir (Bystrom ve Rivella; 2015; Pantopoulos ve ark., 2012; Hentze ve ark., 2010). nemli fare modeli çalışmalarda, demir tükenmesinin metastazları inhibe ettiği gösterilmiş, boylce demirin metastazdaki rolünün önemi vurgulanmıştır (Alvarez ve ark., 2017). Bunlara ek olarak, elde edilen son veriler, KKH'lerinin, demire daha fazla ihtiyaç duyduğu ve demir alımı, ihracı ve depolanması ile ilgili proteinlerin KKH'lerinde, kanser huce topluluğuna göre daha çok değişmiş olduğunu göstermektedir. Yine dikkat çekici bir şekilde, KKH'lerinin, indüklenen demir yoksunluğuna artmış duyarlılık göstermesi de, KKH'lerinde demir bağımlılığının belirgin olduğuna işaret etmektedir (Wang ve ark., 2022).

Bu nedenle, kanser hucelerinde demir miktarlarının aşırı olması ve yüksek demir ihtiyacının yaygın olarak görülen bir durum haline gelmesi şaşırtıcı olmamaktadır. Yapılan birçok çalışmalarda çok sayıda kanser oluşumundan demirin sorumlu olduğu rapor edilmektedir (Torti ve Torti, 2013). Bu da demir metabolizmasının tümör hücresinin hayatta kalması için çok önemli olduğunu vurgulayan başka bir göstergedir (Torti ve Torti, 2013). Boylce aşırı demir, normal hucelerde DNA hasarı oluşturmak suretiyle kanser gelişimine katkıda bulunurken, kanser hucelerinde, DNA sentezine katılma yoluyla hucelerin çoğalmasını ve büyümesini teşvik etme yönüyle önemli bir rol oynamaktadır (Pasricha ve ark., 2021; McLean ve ark., 2008). Bu nedenle, demir, kanser sürecinde iki ucu keskin bir kılıç olarak görülmekte; bir yandan insan sağlığı açısından hayati öneme sahipken, diğer yandan, fazlalığında, tümör oluşumu, büyümesi ve metastazına katkı sağlamak suretiyle, kanser savunucusu olarak çalışabilmektedir (Thevenod, 2018). Ancak, demir, hucelerde ROS artımı ile lipitlere zarar vermek suretiyle lipid peroksidasyonunu da indukleyebilmekte ve indüklenen bu lipid hasarı nedeniyle kanserdeki protmrijenik faaliyetlerine zıt olarak, programlı bir huce ölüm

formu olan ferroptoz oluşumu ile hücre ölümünden de sorumlu tutulmaktadır (Bystrom ve Rivella, 2015; Winter ve ark., 2014; Cao ve Dixon., 2016). Böylece, günümüzde, demir ve kanser arasında daha önce tanımlanmış ilişkilerin altındaki bağlantıların yanı sıra, demirin farklı mekanizmatik temelleri ortaya çıkarılmış ve bu nedenle, hücrel demir seviyesi ve demir mekanizması hedefli kanser tedavisi için yeni müdahale fırsatları gündeme gelmiştir (Torti ve ark., 2018; Ninomiya ve ark., 2017; Recalcati ve ark., 2019).

2.1.8.2. Demir Modülasyonu Yaklaşımları: Ferroptoz

2012 yılında Stockwell, membranlarda oksitlenmiş lipitlerin birikimi ile karakterize, demire bağımlı programlı bir hücre ölümü formunu tanımlamak için “ferroptoz” terimini kullanmıştır. Ferroptoz, ferro = ferröz iyon (Fe^{+2}) ve ptosis = düşme ifadelerinin birleşimi ile, hücrel demirin, hücre ölümünde oynadığı önemli rolü ifade etmektedir (Li ve ark., 2020; Dixon ve ark., 2012). Bu nedenle, ferroptoz, diğer hücre ölümü formlarından morfolojik, genetik ve biyokimyasal olarak farklılık gösteren demire bağımlı, programlı bir hücre ölüm şeklidir (Dixon ve ark., 2012; Yang ve Stockwell, 2016). Diğer hücre ölümü formlarıyla karşılaştırıldığında, apoptozdaki apoptotik cisimler ve otofajinin ilişkili olduğu otofagozomlar gibi, küçülmüş görünümün aksine, ferroptoz geçiren hücreler, genişlemiş, boş sitoplazmalı, karakteristik bir “balon” fenotipine sahip olduğu gösterilmiştir (Dixon ve ark., 2012; Battaglia ve ark., 2020; Tang ve ark., 2019a). Mitokondriyal hacmin azalması, mitokondriyal membran yoğunluğunun artması ve mitokondriyal kristallerin yokluğu, ferroptozda görülen diğer morfolojik değişikliklerdir (Cao ve Dixon, 2016; Dixon ve ark., 2012).

Ferroptoz; apoptotik, nekrotik, otofajik gibi programlanmış hücre ölümü yollarından farklı olmakla birlikte, büyük ölçüde reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikimiyle karakterize hücre ölüm şekli olan oksitoza çok benzemektedir (Emerit ve ark., 2001). Ferroptozun temel özelliği, perokside olmuş membran fosfolipidlerin birikimi gibi, membran lipid bileşimindeki değişikliklere (peroksil radikalleri) ve membran hasarına duyarlı olmasıdır. (Cao ve Dixon, 2016; Dixon ve ark., 2012). Bu nedenle lipit peroksidasyonu, fosfolipidlerin demir katalizli aşırı peroksidasyonu olarak da kabul edilmekte ve ferroptoz, lipit peroksitlerin birikiminin tespiti ile diğer hücre ölümü

formlarından ayırt edilebilmektedir (Cao ve Dixon, 2016; Dixon ve ark., 2012; Gaschler ve Stockwell, 2017; Stockwell ve ark., 2017).

Ferroptoz üç ana düzenleyici yol tarafından tetiklenmektedir: Bunlar, demir metabolizması, GPX4 yolu ve lipid metabolizmasıdır. Demir metabolizmasında Fe^{+3} , TfR1 tarafından hücre içine taşınmakta veya HMOX1 aktivitesi ile hem grubunun biliverdine dönüştürülmesi yoluyla elde edilmektedir. Daha sonra Fe^{+3} , STEAP3 ile Fe^{+2} 'ya indirgenmektedir. NCOA4'ün otofaji yoluyla ferritin bozunması da kararsız demir havuzuna katkıda bulunmaktadır. Fe^{+2} sitozole girdiğinde hidrojen peroksit (H_2O_2) ile Fenton reaksiyonuna girerek serbest radikallerin üretiminde rol oynamakta, en çok da yüksek derecede reaktif olan hidroksil radikallerini ($\bullet OH$) üretmektedir (Şekil 2.6). Hidroksil radikalleri, kısa ömürlü olması sebebiyle, ancak yakın çevresinde hasar oluşturabilmekte ve çevresindeki birkaç nanometre aralığındaki tüm organik materyale, ayırım gözetmeksizin zarar vererek hücre hasarına neden olabilmektedir (Ayala ve ark., 2014). Böylece, hidroksil radikalleri, hücre savunma sistemlerini aşan düzeylere gelmesi ile birlikte artan oksidatif stres sonucu, DNA ve diğer biyomoleküllere zarar vermeye, en fazla da hücre zarlarına zarar vererek lipid peroksidasyonunun tetiklenmesine neden olmaktadır (Gaschler ve Stockwell, 2017). Dolayısı ile hücre içi kararsız demirin artması lipid peroksidasyonunun artması ile ferroptozu tetiklemektedir (Ayala ve ark., 2014). Demir, yalnızca Fenton reaksiyonlarını tetikleyen katalizör olarak değil, aynı zamanda hidroperoksitleri alkoksil fosfolipid radikaline ayrıştırması bakımından ferroptoz indüksiyonunda da hayati bir rol oynamaktadır (Gaschler ve ark., 2018).

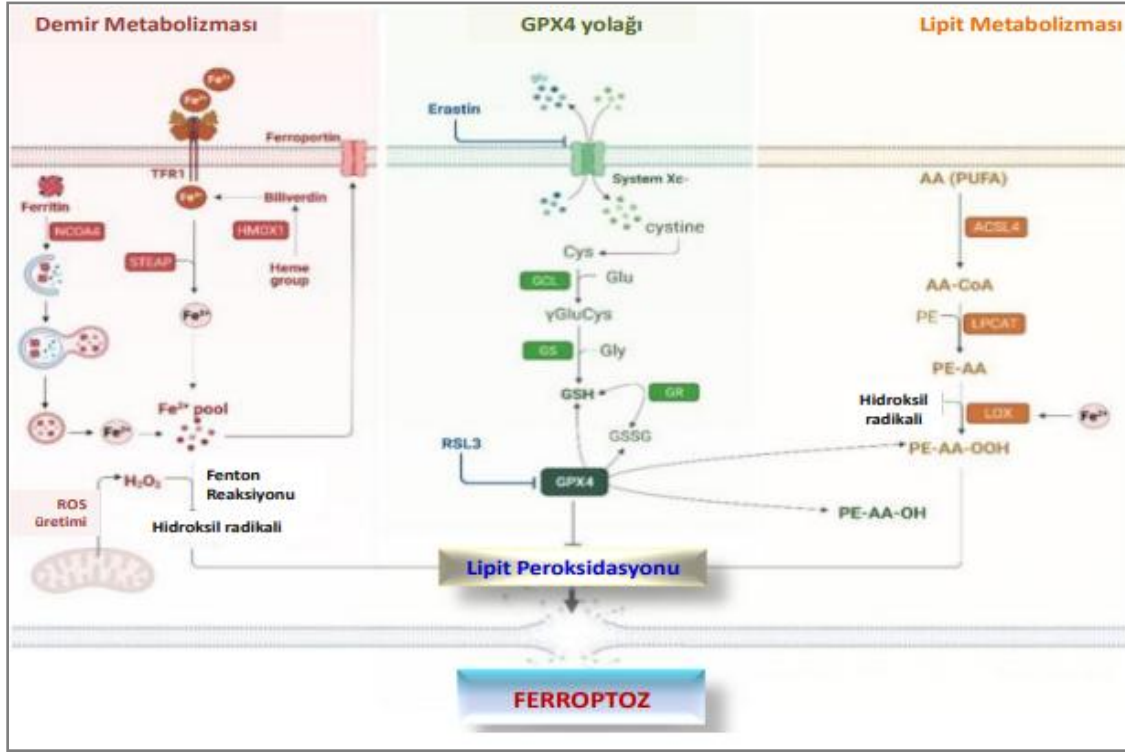
Ferroptozda önemli olan lipid metabolizması yolunda, araşidonik asit (AA) (ve PUFA'lar) ACSL4 tarafından metabolize edilerek açıl Co-A üretilmekte ve LPCAT3 tarafından esterleştirilmektedir (PE-AA). Daha sonra LOX'ler, lipid peroksitleri üreten kofaktör olarak Fe^{+2} 'yi kullanarak PUFA (çoklu doymamış yağ asidi)'ları oksitlemektedir (PE-AA-OOH) (Şekil 2.6) (Dixon ve Stockwell, 2019). PUFA içeren fosfolipitlerin tekli doymamış yağ asitleri (MUFA) içerenlere göre daha kolay oksitlenebilmesi, lipid peroksidasyonunun daha çok gelişmesine yol açmakta ve bu nedenle lipid metabolizmasını, doğrudan ferroptoz yolu ile ilişkilendirilmektedir (Stockwell ve ark., 2017; Gaschler ve Stockwell, 2017). Bir lipid radikal zincir reaksiyonu olan lipid peroksidasyonu, hücre zarının parçalanması ile sonuçlanan,

birbirini takip eden otoamplifikasyon reaksiyonlarını oluşturmaktadır (Chen ve ark., 2006).

Lipid peroksidasyonu ferroptozu tetiklemek için gereklidir ve başlangıç, yayılma ve sonlanma olarak üç aşamadan meydana gelmektedir: Başlangıç aşamasında, hidroksil radikalleri (OH) ve hidroperoksil radikalleri (OOH) gibi reaktif oksijen türleri (ROS), reaktif nitrojen türleri (RNS) ve yüksek seviyelerde reaktif lipit türleri, membranın alilik karbonundan bir hidrojen atomu ile reaksiyona girmekte ve PUFA'lar, bir lipit radikaliyle sonuçlanmaktadır. Yayılma aşaması sırasında, lipit radikali, yeni bir lipit radikali ve lipit peroksit (LOOH) oluşturmak için PUFA'lardan başka bir alilik karbon ile etkileşime girebilen bir peroksil radikali (LOO) oluşturarak oksijenle reaksiyona girmeye duyarlılık göstermektedir. Sonlandırma fazı, iki veya daha fazla lipit peroksil radikalinin, radikal olmayan ürünler oluşturmak üzere GSH (glutatyon) ve GPX4 gibi antioksidanlarla reaksiyona girmek üzere yüksek konsantrasyonlara ulaşmasıyla meydana gelmekte ve fizyolojik koşullarda bu sürecin sonlandırılmasına yol açarak ferroptotik hücreyi inhibe etmektedir (Yin ve ark., 2011; Ayala ve ark., 2014; Dev ve Babitt, 2017). Sonlandırma fazı ferroptoz indükleyiciler tarafından kesilirse, lipit peroksitler malondialdehite (MDA) ve 4-hidroksi-2-nonenal'e (4-HNE) parçalanabilmektedir. Bu moleküller, anahtar proteinlerde toksisiteyi teşvik ederek hücre ölümünde başlangıç olayların sinyallenmesinde görev almaktadır. Aldehid yapılı son ürünlerden biri olan MDA (malondialdehit)'in uzun yaşam süreli olmaları ve zarları geçebilme özellikleri nedeniyle, bu toksik etkiler ferroptozun gelişmesinden sorumlu olmaktadır (Higdon ve ark., 2012). Bu nedenle lipid peroksidasyonu, biyolojik sistemlerde çok önemli oksidatif-radikal hasar türüdür ve diğer programlanmış hücre ölümü formlarından ayırt edilmesinde, ferroptozun en karakteristik özelliği olarak kabul edilmektedir (Dixon ve ark., 2012; Friedmann ve ark., 2014).

Lipit hidroperoksitlerini ortadan kaldıran onarım sistemindeki kusur, ferroptozun bir diğer önemli özelliğidir. Glutatyon peroksidaz 4 (GPX4) ile ilişkili yollar, membranları peroksidasyon hasarına karşı korumak için ferroptozu karşı savunma kalkanı olarak kabul edilmektedir. GPX ailesinin bir enzim üyesi olan GPX4, fosfolipid hidroperoksidaz aktivitesi nedeniyle ön plana çıkmaktadır. GPX, lipit peroksitlerin (PE-AA-OOH) lipit alkole (PE-AA-OH) indirgenmesi yoluyla lipoperoksidasyon seviyelerini kontrol altına alarak, hücreleri ROS'un neden olduğu oksidatif hasardan

korumakta ve böylece hücrel lipit homeostazisini sağlamak için görev yapmaktadır (Şekil 2.6) (Dixon ve Stockwell, 2019; Bochkov ve ark., 2010). Bu nedenle GPX4, lipit hidroperoksitleri lipit alkole dönüştürdüğü ve bu moleküllerin lipit peroksidasyon sürecini tetiklemesini önlediği için ferroptozun önemli bir düzenleyicisi olarak görülmektedir (Shah ve ark., 2018; Forcina ve ark., 2019; Friedman ve ark., 2014).



Şekil 2.7. Ferroptoz yolunun moleküler mekanizması (Souza ve ark., 2022)

Ayrıca, lipit peroksidasyonunu indükleyen başka yöntemler de vardır; örneğin hem içermeyen demir olan lipoksijenaz ailesi aracılığıyla demir içeren enzimler PUFA'ları çeşitli lipit hidroperoksitlere katalize edebilmektedir (Kuhn ve ark., 2015). Lipoksijenazlar (LOX) olarak bilinen, lipit peroksidasyonuna aracılık eden bu grup enzimin demire bağımlı olması nedeniyle, demirin bu enzimler üzerindeki etkisi ferroptozda rol oynayabilmektedir (Stockwell ve ark., 2017; Shintoku ve ark., 2017). Enzimatik lipid peroksidasyonunda, Fe^{+2} , lipoksijenazın çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) deoksijenasyonunu katalize etmekte ve hidroperoksitlerin oluşmasında önemli bir indirgeyici olarak çalışmaktadır (Gaschler ve ark., 2018). Ayrıca, ferroptoz duyarlılık, lipit doymunluk derecesi, fosfolipitlerin hücrel konumu ve PUFA içeren fosfolipitlerin sayısı ile de ilişkilendirilmektedir (Stockwell ve ark., 2017).

Demir bağımlılığı nedeniyle ferroptozu, demir şelatörlerinin inhibe etmesi, yüksek demir seviyelerinin ise indüklemesi diğer hücre ölümü formlarından ayırt edici bir özellik olarak görülmektedir (Cao ve Dixon, 2016). Bu nedenle demir, ferroptoz indüksiyonunda hayati bir rol oynamaktadır (Thevenod, 2018 Dixon ve ark., 2012). Demir, ROS artışı ile apoptoz ve nekroz gibi diğer hücre ölüm formlarına da katılmaktadır, ancak, hücre ölüm yolu mekanizmasının bir bileşeni olmamaktadır; oysa, ROS artışı ile lipit peroksidasyonunu tetikleyerek, ferroptozun bir bileşeni olmaktan öte, başlatıcı olarak anahtar rol oynamaktadır (Thevenod, 2018; Ayala ve ark., 2014). Dolayısıyla, hücre içi demir artışının yanı sıra ROS artışının tetiklenmesinin de ferroptozu indüklemeye önemli bir role sahip olduğu görülmekte ve demir ve ROS artışını manipüle eden araştırmalar ön plana çıkmaktadır (Katsura ve ark., 2019; Ayala ve ark., 2014).

Bugüne kadar etkili kanser tedavisi için araştırılan, hatta bazıları kanser endikasyonları açısından onaylanmış olan çeşitli terapötik stratejiler olmasına rağmen bunlar, temel olarak apoptotik hücre ölümüne odaklanmaktadır. Son zamanlarda, apoptoz bazlı terarötik rejimler kanser hücreleri üzerinde tatmin edici sitotoksik etkileri görülmemektedir (Dixon ve Stockwell, 2019; Katsura ve ark., 2019). Bu nedenle, apoptoz ve nekroptoz indüksiyon tedavisinde başarısız olan hastalar ferroptoz indüksiyon tedavisinden fayda sağlayabileceği görülmektedir (Liang ve ark., 2019a). Kanser hücreleri, artan metabolik ve büyüme hızları nedeniyle daha yüksek ROS düzeylerine sahip olduğu için, ROS seviyelerini daha da yükselten ferroptoz gibi hücre ölüm mekanizmaları, kanserin tedavisi yönünde özellikle etkili ve spesifik olabilmektedir (Chiang ve ark., 2018).

Hücre içi demiri modüle ederek kanseri hedeflemeye yönelik yaklaşımlar iki karşıt stratejiyi içermektedir. Bu stratejiler, bir yandan şelasyon tedavisi ile demir tükenmesini, diğer yandan toksik serbest radikaller üretmek için aşırı demir yüklemesini kapsamaktadır. Bu iki karşıt yaklaşımdan biri olan, demir yükleme stratejisi, kanser hücrelerine ek demir miktarları sağlamak suretiyle, tümör hücrelerinde zaten yüksek olan kararsız demir seviyelerini daha da arttırarak, aşırı demirin hücreleri ortadan kaldırmak için yeterli oksidatif stresi üretebileceği görüşüne hakimdir (Breuer ve ark., 2008; Liu ve Hider, 2002; Katsura ve ark., 2019). Özellikle direnç mekanizmalarının ortaya çıkmasına karşı savaşmak için ferroptozu tetiklemeyi amaçlayan diğer bir

strateji, demir fonksiyonunu arttırarak, ROS ve lipid peroksidasyonu arttırmak suratiyle, ferroptozu tetikleme yi hedeflemektedir (Mai ve ark., 2017; Hassannia ve ark., 2019).

Tüm kanser hücrelerinin, çoğalmayla birlikte gelen yoğun enerji talebini desteklemek için demire normal dokulardan daha fazla bağımlılığının artmış olması, genişlemiş LFeH ile sonuçlanmakta ve kanser hücrelerini normal hücrelerden ayıran dikkate değer bir özellik olarak kabul edilmektedir (Torti ve ark., 2018; Zhao ve ark., 2021). Ferroptoz kanser hücreleri ile sınırlı değildir. Ayrıca, tüm hücreler ferroptoz potansiyel olarak katkıda bulunabilecek demir depolarına ve LFeH'a sahiptir. Bununla birlikte, çeşitli faktörler, ferroptoz indükleyicilerinin kanser hücrelerine doğru tercihli sitotoksositeye neden olacağını göstermektedir (Katsura ve ark., 2019). Bunun birinci nedeni olarak, LFeH seviyeleri demir alımına bağılı olduğundan ve bu özellikleri düzenleyen proteinler genellikle kanser hücrelerinde labil demirini arttıracak şekilde ifade edildiğinden, kötü huylu hücrelerde, daha yüksek olacaktır (Dixon ve Stockwell, 2019; Katsura ve ark., 2019). Hücrel olarak redoks aktif demir, genellikle LFeH olarak adlandırılmakta ve metabolik olarak kullanılabilir bölümünü oluşturmaktadır. LFeH, doğrudan veya dolaylı olarak proferroptotik süreçler için kullanılan demir formu olup, toplam hücre içi demirin küçük bir kısmını ifade etmektedir. LFeH, geçirgen düşük moleküler ağırlıklı demir şelatörlerle bağlanma yeteneği ile işlevsel olarak tanımlanabilmektedir. LFeH, Fenton kimyası yoluyla oksijen ve lipid radikallerinin üretimine doğrudan katılabilmektedir. Demirin, LFeH'na girip çıkması ferroptozu etkilemektedir. Bu nedenle kanserde, ferroptozu tetiklemek için oksidatif stresi indükleyen LFeH hedefli tedaviler araştırılmaktadır (Mai ve ark., 2017; Dixon ve Stockwell, 2019; Katsura ve ark., 2019). Ferroptozun çeşitli indükleyicileri keşfedilmiştir. Bu bileşikler membran geçirgenliğini değiştirmekte ve hücrel redoks metabolizmasında büyük bozulmalara neden olarak ferroptozu neden olmaktadır (Mai ve ark., 2017).

Günümüzde ferroptoz indükleyicileri olarak doğal fitobileşenlerin kullanılması ile yapılan çalışmalarda etkili sonuçların olduğu bildirilmiştir. Bunlardan biri, doğal bitki *Artemisia annua*'nın aktif bir bileşeni olan artemisindir. Bu fitobileşenin *in vivo* olarak en fazla potansiyel etkiye sahip olan metabolik formu olan dihidroartemisin (DHA)'ın U87 ve A172 hücre hatlarıyla yapılan bir çalışmada, GB'da artan hücre içi ROS ve lipid peroksidasyon seviyelerinin ferroptoz etkili olduğu sonucuna varılarak, ferroptozu aktive ettiği bildirilmiştir (Yi ve ark., 2020). Yine, U251 ve U373 hücre hatları

kullanılarak DHA ile yapılan başka bir çalışma da, bu molekülün, glioma hücrelerinde endoplazmik retikulumda (ER) strese neden olarak *in vitro* ve *in vivo* olarak ferroptozu indüklemeye etkisine sahip olduğu gösterilerek, bu yolla antitümör aktivitesinin gerçekleştiği bildirilmiştir (Chen ve ark., 2019).

Yine bitki bileşenleri ile yapılan diğer bir çalışmada, bir biyoflavonoid olan polifenol amentoflavon (AF), U251, U373 hücrelerinde, hidroksil radikali indüklenmesi ile sonuçlanan hücre demirini artırmak suretiyle ferroptozu indüklediği gösterilmiştir (Chen ve ark., 2020) Başka bir doğal bitkisel bileşik, *Salvia miltiorrhiza bunge*'nin etken maddesi olan dihidrotanshinone I (DHI)'dir. Şu anda kardiyovasküler hastalıkları tedavi etmek için kullanılmakla birlikte, DHI, U251 ve U87 hücre hatları gibi bazı kanser hücre türleri üzerindeki terapötik etkileri araştırılarak, hücre proliferasyonunu doza ve zamana bağlı olarak azalttığı ve ferroptozu teşvik ettiği gösterilmiştir (Tan ve ark., 2020). Bir kurkumin analogu olan ALZ003 ile U87-MG GB hücre hattı üzerinde yapılan bir çalışmada, lipit peroksidasyonu ve yüksek ROS seviyelerinin ferroptozu açtığı bildirilmiştir (Chen ve ark., 2020).

Günümüzde, ferroptoz indüksiyonu için demir bazlı NP'ler gündemde olup, demir seviyelerini ve ROS üretimini artırarak kanser hücrelerinde ferroptozu indüklemek için demir oksit NP'leri kullanılmıştır. Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi, umut verici moleküller olarak kabul edilen ferroptoz indükleyici bileşiklerin, dirençli kanserlerin tedavisi için klinik kullanımına onay vermiştir (Hassannia ve ark., 2019). Demir eksikliğini tedavi etmek için kullanılan klinik olarak onaylanmış bir demir oksit NP olan ferumoxytol (Feraheme) ile yapılan çalışmalar, oksidatif stresi artırarak etkili olduğunu bildirilmiştir (Torti ve Torti, 2019; Singamaneni ve ark., 2011; Turcu ve ark., 2020). Ayrıca, PEGlenmiş tek atomlu demir içeren nanokatalizörlerin, asidik tümör mikroçevresi (TME) altında bol miktarda toksik hidroksil radikalleri üretmek için Fenton reaksiyonunu etkili bir şekilde tetiklediği gösterilmiştir (Huang ve ark., 2019). Demir bazlı NP'ler çalışmalar, asidik lizozomlarda ferröz (Fe²⁺) veya ferrik (Fe³⁺) iyonlarını oluşturabileceği ve tümör hücrelerinde ROS seviyelerini hızla artırabileceği gösterilmiş ve demir bazlı NP'lerin ferroptozu bazlı kanser tedavisi için büyük potansiyele sahip olduğu sonucuna varılmıştır (Ma ve ark., 2017). Ek olarak, Fenton reaksiyonu tarafından üretilen hidroksil radikallerinin miktarı büyük ölçüde Fe⁺² ve Fe⁺³ dönüşüm hızına bağlı olması nedeniyle, demir konsantrasyonunun yanı sıra, Fe⁺² /

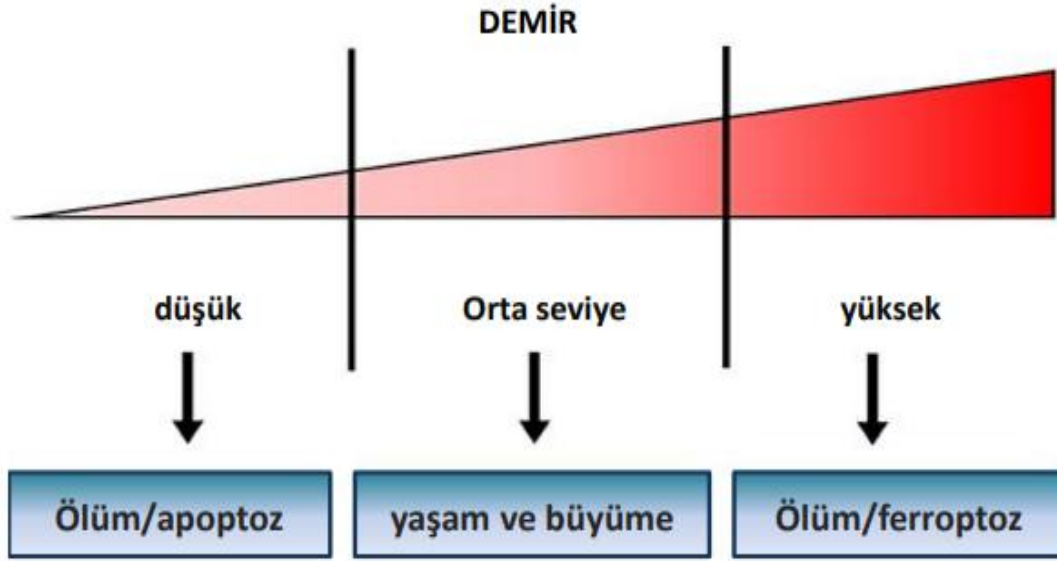
Fe⁺³ oranının da enzim katalizlemeli veya enzim katalizlemesiz demirle ilişkili lipid peroksidasyonunda çok önemli olduğu belirtilmiş (Hassannia ve ark, 2019) ve ferroptoz aktivitesinin temel olarak biyoyararlı ferröz demir (Fe⁺²) miktarına bağlı olduğu bildirilmiştir (Xie ve ark, 2016).

Ayrıca, KKH'leri ve demir birçok kanser türünde birbirine bağlanmakta ve KKH'leri de özellikle ferroptozu karşı savunmasız olduğu bildirilmektedir. Bu yöndeki en iyi örneklerden biri, meme KKH'lerinin salinomisin veya sentetik bir türevi olan ironomisin tedavisinin, demiri lizozomlarda tutarak sitozolik tükenmesine ve lizozomal bozulma sonucunda demirin ferritinden kurtulması sonucu demir homeostazisinin bozulması ile çok etkili bir şekilde ferroptozun gelişmesine neden olduğu gösterilmiştir. Böylece ferroptozu indükleyen tedavilerin, geleneksel antikanser tedavilerine dirençli olduğu bilinen KKH'lerini öldürebildiği anlaşılmaktadır (Mai ve ark., 2017; Zang ve ark., 2015; Richardson, 2002). Başka bir örnek de, salinomisin tedavisi ile KKH'lerinde lizozomal bozunmanın ferritine bağlı demirin salınmasına neden olması, bunun da sitozolik demir miktarındaki artışa bağlı olarak ferroptotik hücre ölüm yolunu tetiklemesidir. Ayrıca, KKH'lerinin de özellikle ferroptozu karşı savunmasız olduğu bildirilmektedir (Mai ve ark., 2017; Zang ve ark., 2015). KKH'leri gibi tedaviye dirençli kanser hücrelerini öldürmede gözlemlenen etkinliği ile daha da güçlenen veriler, ferroptozun potansiyel bir kanser tedavi yolu olabileceğinin altını çizmektedir ve ferroptozun, yüksek demir seviyeleri tarafından indüklenebilirken, demir şelatörleri tarafından inhibe edilebilir olması, demir metabolik yollarını hedefleyen, yeni kanser tedavi yaklaşımlarını gündeme getirmektedir. Tüm bu sonuçlar, ferroptoz yoluyla kanser savaşını kazanma fırsatını vermekte ve kanser tedavisi için ferroptoz indükleyicilerini aramaya teşvik etmektedir (Bystrom ve ark., 2014; Li ve ark., 2020). Son on yılda, ferroptozun kanserdeki birçok farklı yönünü tanımlayan yayınlar katlanarak artmaktadır (Li ve ark, 2022).

2.1.8.3. Demir Modülasyonu Yaklaşımları: Şelasyon

Şelatörler; metal iyonu ile bağ yapabilecek ligandları vasıtasıyla metal iyonlarını içine alarak halkalı kompleks yapılar oluşturabilen moleküllerdir (Dixon ve ark., 2012). İlk demir şelatörleri 1990'larda geliştirilmiştir. (Nekhai ve ark., 2012). Kanser hücrelerinin demire olan tutkusu, toksik metal detoksifikasyonu için spesifik olan demir

şelatörlerinin kanser tedavisinde kullanılabileceğini düşündürerek, demir için yüksek bağlanma afinitesine sahip spesifik şelatörler günümüzde, çoklu transfüzyon yapılan tüm kanser türlerinde genel bir olumsuz prognostik faktör olan fazla demirin bağlanarak uzaklaştırılması ve oksidatif stres süreçlerini engellemek için düzenli ve yaygın olarak kullanılmaktadır (Kontoghiorghe ve ark., 2021; Kontoghiorghe ve ark., 2015; Timoshnikov ve ark., 2020; Timoshnikov ve ark., 2021; Pasricha ve ark., 2021).



Şekil 2.8. Demir azaltma ve artırma stratejileri. (Recalcati ve ark, 2019).

Kanser şelatör tedavi stratejileri için iki genel yaklaşımdan biri kanser hücrelerindeki demiri tüketmek, diğeri demiri aktive etmektir. Bunlardan ilki, demir şelatör ilaçları olup, özellikle deferasiroks ve deferoxamin gibi klinikte onaylanmış, etkili ve spesifik demir şelatörleri, ilk olarak talasemi ve diğeri aşırı demir yüklemesi durumu olan hastalıkları tedavi etmek amacıyla kullanılmış (Kolnagou ve ark, 2017; Kontoghiorghe ve ark, 2010; Porreca ve ark, 1994), ancak, serbest radikal reaksiyonlarını inhibe edebileceğinin anlaşılması üzerine kanser hücrelerindeki demiri tüketmek de kullanılmaya başlanmıştır. İkinci ve daha yeni olan demiri aktive etme stratejisinin asıl amacı, (Kontoghiorghe ve ark, 2020b; Timoshnikov ve ark, 2020), demir etkinliğinin artması ile birlikte ROS oluşumunun da artarak kanser hücre ölümünün gelişmesidir. Bu nedenle burada kullanılacak olan şelatörlerin, demirin redoks döngüsünü kolaylaştıran şelatörler olması önemlidir. Şu anda her iki yaklaşım da sürdürülmektedir Şelasyon tedavisi esas olarak aşırı demir yükünü azaltmak için uygulanırken, birçok

çalışmada, çeşitli demir şelatör sınıflarının antitümör aktivitesinin olduğu da gözlenmiştir. (Hatcher ve ark, 2009; El-Hout ve ark., 2018; Manz ve ark., 2016; Raggi ve ark., 2017). Ancak, şelatörlerin ağızdan alındığında inaktif oluşu, yarılanma ömrünün kısalığı ve toksisite aralığının dar olması ciddi toksisitelerin görünmesine ve kullanımlarında kısıtlamalara neden olmaktadır (Liu ve Hider, 2002; Kontoghiorghes ve ark, 2005; Whitnall ve ark, 2006). Ayrıca, bazı kanserler düşük membran geçirgenlik özelliklerinden dolayı demir şelatörlerine dirençlidir. Bu sınırlamalara rağmen şelatörlerine olan ilgi ortadan kalkmamıştır (Khansefid ve ark, 2018; Liu ve Hider, 2002; Kalinowski ve Richardson, 2005). Günümüzde, kanser tedavisi için geliştirilmesi gereken uygun şelatörlere ihtiyaç olup, daha etkin demir şelatörlerin geliştirilmesine yönelik çalışmalar artmakta, ancak, sonuçlar tatmin edici düzeylerde olmadığı için, kanser tedavisinde klinik kullanım için ideal bir demir şelatörü arama çabaları hala gündemini korumaktadır. (Kontoghiorghes ve ark, 2020b; Timoshnikov ve ark, 2020)

FDA onaylı deferipron şelatörünün, demiri hızla temizleyebilme yeteneklerinin yanı sıra, hemosiderin ve ferritin birikintileri de dahil olmak üzere toksik demir havuzlarına erişilebilme, demiri indirgeme ve serbest radikal reaksiyonlarını inhibe etme gibi yetenekleri, şelatörlerin kanserde, sadece demir bağlama etkili değil, aynı zamanda antikanser etkili de olabileceğini göstermektedir. Düşük molekül ağırlığı, lipofilik yapısı, membranlardan ve KBB'ini kolayca geçmesini sağlayarak, oluşturduğu demir şelat kompleksiyle antikanser etki göstermesini mümkün kılmaktadır. Ancak deferipronun da ciddi yan etkileri kullanımını kısıtlamaktadır. (Kolnagou ve ark, 2018; Simoes ve 2017; Fiorillo ve ark, 2020; Orfanou ve ark, 2021).

Günümüzde, redoks aktivitesine dayalı antikanser hedeflemeler ve kanser tedavileri gündeme gelmektedir. Biyolojik sistemlerdeki normal redoks aktivitesi, kanser hücrelerinde, çoğunlukla farklı fonksiyon ve etkilere sahiptir (Kontoghiorghes ve ark, 2019; Kontoghiorghes, 2020b; Gaur ve ark, 2018). Dolayısıyla, kanser hücrelerinde demirin redoks aktivitesinin modülasyonu için şelatörlerin kullanımı ana hedeflerden birini oluşturmaktadır (Gao ve ark, 2022; Lei ve ark, 2022). Son zamanlarda, kanser şelatör tedavi stratejileri yönünde metal, şelatör veya şelatör-metal kompleksleri adı altında ilgili yeni farmasötiklerin tasarımları uygulanmaktadır (Kontoghiorghes ve Kontoghiorghes, 2020c). Metal iyonları, şelatlayıcı ajanlar ve şelatör-metal kompleksleri, moleküler ve redoks özellikleri bakımından birbirinden oldukça farklılık

göstermektedir. Bunlardan özellikle şelatör-metal komplekslerinin, Fenton reaksiyonu indüksiyonunu ile ROS üretimi, kanser hücrelerinin büyümesini önlemek için kanser şelatör stratejilerinin yeni ve farklı bir sınıfını oluşturmaktadır (Kontoghiorghes, 2020b; Sacco ve ark, 2021; Ke ve ark, 2022).

Bu sonuçlar, demir şelatörlerinin anti-kanser etkileri olduğunu ve demir tükenmesinin kanser tedavisi için terapötik bir potansiyele sahip olduğunu bildirmektedir (Manz ve ark., 2016). Farelerde demir şelatör tedavisi, insan metastatik meme kanseri hücrelerinin kemik metastazını azaltmış, nude farelerde oluşturulan metastatik bir modelde ise, akciğer tümörlerinin oluşumu inhibe edilmiştir. Demir şelatör ile yapılan başka çalışmalarda, pankreas kanseri hücre invazyonunun ve metastatik kanser hücre büyümesinin inhibisyonları da bildirilmiştir (Chifman ve ark., 2017; Alvarez ve ark., 2017). Ayrıca sadece kanser hücrelerinin çoğalmasını değil, aynı zamanda invazyon ve metastaz yeteneklerini de bastırdığını göstermektedir. Gerçekten de çalışmalar, demir şelatörlerin hem KKH'leri hem de farklılaşmış kanser hücreleri üzerinde önemli antiproliferatif etkilere sahip olduğunu, normal fibroblastlar üzerinde ise olmadığını rapor etmektedir (Raggi ve ark., 2017).

Genel olarak şelatlayıcı ajanların, geçiş metali iyonlarıyla ilişkili redoks reaksiyonlarının seyrini etkileyen, farklı fizikokimyasal, biyolojik, farmakolojik ve toksikolojik özelliklere sahip olabilecekleri bildirilmektedir. Yapılan son araştırmalarda, demir gibi geçiş metallerine bağlanma yönünden, artmış lipofilik (dokuya nüfuz etmesinin daha iyi olmasını sağlama bakımından) ve diğer spesifik özelliklere sahip bazı şelatörlerin, şelatör-metal kompleksi oluşturarak ROS'u artırabildiği bildirilmektedir. Ancak, kanserli hücreleri hasara götürebilme etkinliği bakımından bu şelatörlerde gerekli temel unsur; belirli bir metale karşı yüksek afinite yeteneğine sahip olmaları, biyoyararlanımlı olmaları ve oluşan şelat komplekslerinin yüksek stabiliteli, ancak düşük toksisiteli olmalarıdır (Kontoghiorghes, 2015a; Ke ve ark, 2022; Bouvard ve ark, 2015; Toyokuni ve ark, 2013; Kontoghiorghes, 2021). Şelatör-metal komplekslerinin terapötik etkinliklerinin, dolayısıyla toksisitelerinin merkezinde redoks özellikleri bulunmaktadır. Demirin katalitik aktivitesinin neden olduğu oksidatif stres durumunda, bu metal iyonlarının redoks aktivitesini inhibe etmek için birinci grup şelatörler (demir yükünü azaltıcı) gerekliken, kanser tedavisi durumlarında, tersine, redoks aktivitesine sahip olan ve bağlı metal iyonlarının redoks özelliklerini

geliştirebilen şelatör-metal komplekslerine ihtiyaç vardır (Sung ve ark, 2021; Chen ve ark, 2022). Birinci grup şelatörler, radikal temizleyicileri (fenol içeren bileşikler) olarak yani, sadece elektron alıcısı olarak görev yapabilirken (de Souza ve ark, 2022; Ganeshaguru ve ark, 1992), ikinci grup şelatörler, hem elektron alıcısı hem de vericisi özellikleri ile redoks reaksiyonlarına katılabilmekte ve kompleks oluşturdukları metal iyonlarını daha reaktif duruma dönüştürebilmektedir (Kontoghiorghe ve ark, 2014). Bu özellikli şelatörler arasında kinon grupları yer almaktadır, ancak, bu kimyasal grubun olduğu, metal şelatlama potansiyeline sahip antikanser özellikte olan çok az fitokimyasal ajan bilinmektedir (Monks ve Jones, 2002; Jablonska-Trypuc ve ark, 2017).

Literatüre bakacak olursak, kinon özellikli bazı ajanların (antrakinonlar, mitomisin-c, adriamisin (doksorubisin), benzokinonlar gibi), yüksek antikanser aktiviteye sahip oldukları ve lösemi, lenfoma ve meme kanseri gibi çeşitli kanser türlerine yönelik tedavi rejimlerinin ayrılmaz bileşenleri haline geldikleri bilinmekte, aynı zamanda şelatör etkinlik gösteren bu kinon ajanları, şelatör-metal kompleks etkinliği ile ROS üretimi de yaptığı bildirilmektedir (Kontoghiorghes ve ark, 2008; Jablonska-Trypuc ve ark, 2017; Feng ve ark, 2000; Barnabe ve ark, 2002).

Kinon şelatörlerinin katılımıyla redoks reaksiyonları genellikle bir kinon molekülünün bir semikinon radikalinin oluşumu ile indirgenmesi şeklinde başlatılabilmektedir. Bu bağlamda sitokrom P450 enzim sistemi ve mitokondriyal elektron transfer zinciri, kinonun tek elektron indirgenmesinin ana kaynakları arasındadır. Ortaya çıkan semikinon radikali daha sonra moleküler oksijene bir elektron vererek onu süperoksit anyon radikaline indirgeyebilmekte ve semikinon radikali orijinal kinon molekülüne geri oksitlenebilmektedir. Dolayısı ile bu süreç, süperoksit anyon radikalinin ve ikincil reaktif oksijen türlerinin (hidrojen peroksit, hidroksil radikali) oluşumuna yol açan bir redoks döngüsü haline gelmektedir (Monks ve Jones, 2002; Brock ve ark, 1990). Metal iyonlarının varlığında semikinon radikalleri ve ROS veriminde tespit edilen artış, sadece kinon-şelatlayıcılarda görülmekte, ancak şelatlayıcı gruplar içermeyen kinonlarda bu artış görülmemektedir (Chekhun ve ark, 2014; Kontoghiorghes, 1986a; Timoshnikov ve ark, 2022).

Bu özellik yönünden kinon grupları arasında da farklılıklar olduğu bildirilmekte olup, sadece demir bağlama ile demir fazlalığını azaltma yönünde etkili olan serbest kinonlar ile, demir ile metal kompleks oluşturmak suretiyle redoks aktivitesine katılan kinonların farklı aktivitelere sahip oldukları belirtilerek, çok az fitokimyasal ajanların, metallerle kompleks oluşturabilme özelliğine sahip olan kinon bileşenleri olduğu bildirilmektedir. Bu nedenle, seçici kinon-metal komplekslerini oluşturan kinonların, serbest kinonlardan daha yüksek etkinliğe sahip yeni potansiyel antikanser ajanları olabileceği belirtilmektedir (Kontoghiorghes, 2020a; Gaur ve ark, 2018; Sacco ve ark, 2021; Kontoghiorghes ve ark, 2019).

Ancak ana sitotoksik etkisi, DNA sentezini bozmak olduğu bildirilen kinonlar, elektron transfer sistemlerinde ROS salınımı ile birlikte dögüsel indirgenme/oksidasyon reaksiyonlarına da katılabilmektedir. Ayrıca, kinon şelatörlerinin ana özelliği, metal iyonları ile reaksiyonlarda serbest radikallerin (özellikle hidroksil radikallerin) oluşumunun arttırılmasıdır (Moore ark, 2013; Lalueza ve ark, 2020; Seyhan ve ark, 2014; Chekhun ve ark, 2014). Aynı zamanda, bu şelatörlerin, hücre zarındaki doymamış lipitlerin oksidasyonu üzerindeki etkileri gibi ek faktörlerin de var olduğunu bildiren çeşitli raporlar da yayınlanmaktadır. Bu da kinonların ferroptoz yönlü hücre ölümüne götürme yeteneğini göstermektedir (Chekhun ve ark, 2014; Giemza-Stoklosa ve ark, 2019; Seyhan ve ark, 2014).

Kinon lipofilitesi ile lipit çift katmana nüfuz etme yetenekleri arasında korelasyon olduğu bildirilmektedir. Ayrıca bazı sonuçlar, hücre zarından geçebilecek kemoterapötiklerin, ilaç direnci sorununun üstesinden gelebileceğini göstermektedir. Lipofilik şelatörler ve bunların demir kompleksleri, etkili tedavilerin bulunmadığı metastaz, ilaca direnç veya tekrarlayan tümörlerde ferroptozun indüklenmesi için önerilmektedir. Bu nedenle, kanser tedavisini yeniden ele almaya, demir şelatörleri ve demir şelatör komplekslerini içeren çok hedefli ve çok faktörlü süreçleri içine alan terapötik stratejileri uygulamaya ihtiyaç olduğu belirtilmektedir (Kontoghiorghes ve ark.,2021; Li ve ark, 2022).

2.1.9. Glioblastoma Tedavisinde Etken Madde Arayışı

Geleneksel tedavilerin olumsuz etkileri ve direnç gelişimi, yeni tedavi arayışlarına neden olmaktadır. Bu durum, oldukça agresif olan GB için daha da aciliyet

arzemektedir. Şu anda, GB için FDA tarafından onaylanan kemoterapötik ilaçlar, alkilleyici ajanlar (Temozolomid (TMZ) ve Nitrosourea) gibi etki göstermekte olup, bunlar GB ile mücadelede yeterli görölmemektedir (Aliferis ve Trafalis, 2015; Anjum ve ark., 2017). GB'nın, KBB ve KKH'leri gibi iki büyük sınırlamaya sahip olması, tedavi edilememesine ve yüksek oranda nökslerin görölmesine neden olmaktadır.

Günümüzdeki geleneksel tedavi başarısızlıklarına karşı yeni tedavi strateji arayışları, yüksek biyolojik aktiviteleri ve düşük sistemik toksisiteyi nedeniyle, araştırmaları, geleneksel terapötik ilaçlara üstünlük sağlayan fitokimyasallara odaklandırmakta ve doğal ürünlerin kanser önleyici özelliklerinin araştırılması giderek artmaktadır. Bu fitoterapötiklerin, kanserlerin gelişmesini veya tekrarlamasını önlemek için doğal bir potansiyele sahip olmasının yanı sıra, normal hücrelere zarar vermeden kanserli hücreye karşı seçici ve spesifik sitotoksikite sergilemeleri, onları, özellikle kanser tedavileri bakımından ilgi odağı haline hale getirmektedir. Ayrıca ucuz ve kolay bulunur olmaları, araştırmaların bu doğal bileşenler üzerine odaklanmasında teşvik edici olmaktadır. Bu nedenle, son yirmi yılda sunulan ilaçların %25'inden fazlası doğrudan bitkilerden elde edilmekte, diğer %25'i de kimyasal olarak değiştirilmiş doğal ürünleri içermektedir (Anjum ve ark., 2017; Ashour ve ark., 2016).

TQ'nun insan kanser hücreleri için seçici sitotoksikite gösterdiği moleküler mekanizma geniş çapta rapor edilmektedir (Gali-Muhtasib ve ark., 2004a). alışmalar, TQ'nun seçici olarak kanser hücresi ölümüne neden olduğunu ve tümör büyümesini, anjiyogenezi ve metastazı önleyici aktivitelere sahip olduğunu göstermektedir (Peng ve ark., 2013; Khan ve ark., 2015). TQ, tümör oluşumunun veya ilaç direncinin gelişmesinin (Kundu ve ark., 2014) yanı sıra, direnç mekanizmaları yoluyla kanser hücrelerinin kemoterapötik ajanlara ve radyasyon tedavisine duyarlı hale getirilmesinde de rol oynadığı bildirilmektedir (Zhang ve ark., 2016a).

Bu nedenle, GB dahil olmak üzere kanserlerde TQ'nun yararlılığı artık bir spekülasyondan daha fazlasıdır ve GB'nın farklı özelliklerini hedefleyebileceği düşünülebilir (Hanahan ve Weinberg, 2011). Tek başına TQ ile tedavinin çeşitli *in vitro* ve *in vivo* alışmalarda antitümör etkinliği gösterilmiştir (Majdalawieh ve ark., 2016; Khan ve ark., 2017a) ve ayrıca karsinogenezi önlemek için (Rahmani ve ark., 2014) veya geleneksel terapötik yöntemlerin etkinliğini arttırmak için adjuvan tedavide olduğu

gibi (Mostofa ve ark., 2017) kombine tedavilerde de etkinliğini bildiren çalışmalar mevcuttur. Ayrıca, TQ'un GB hücrelerinde telomeraz inhibisyonu ile sitotoksik etkili olduğu (Gurung ve ark., 2010) yine, *in vitro* olarak, insan GB hücrelerinin göçünü, yapışmasını ve istilasını inhibe ettiği ve antimetastatik aktivitelere sahip olabileceği bildirilmektedir (Gali-Muhtasib ve ark., 2008). Bu nedenle GB tedavi stratejilerinin geliştirilmesi için TQ'un etken madde olarak seçilmesi, tedavi yönünden bir çok avantaj sağlayabileceğini düşündürmektedir.

2.1.9.1. Fitoterapötik Etken Madde: Timokinon



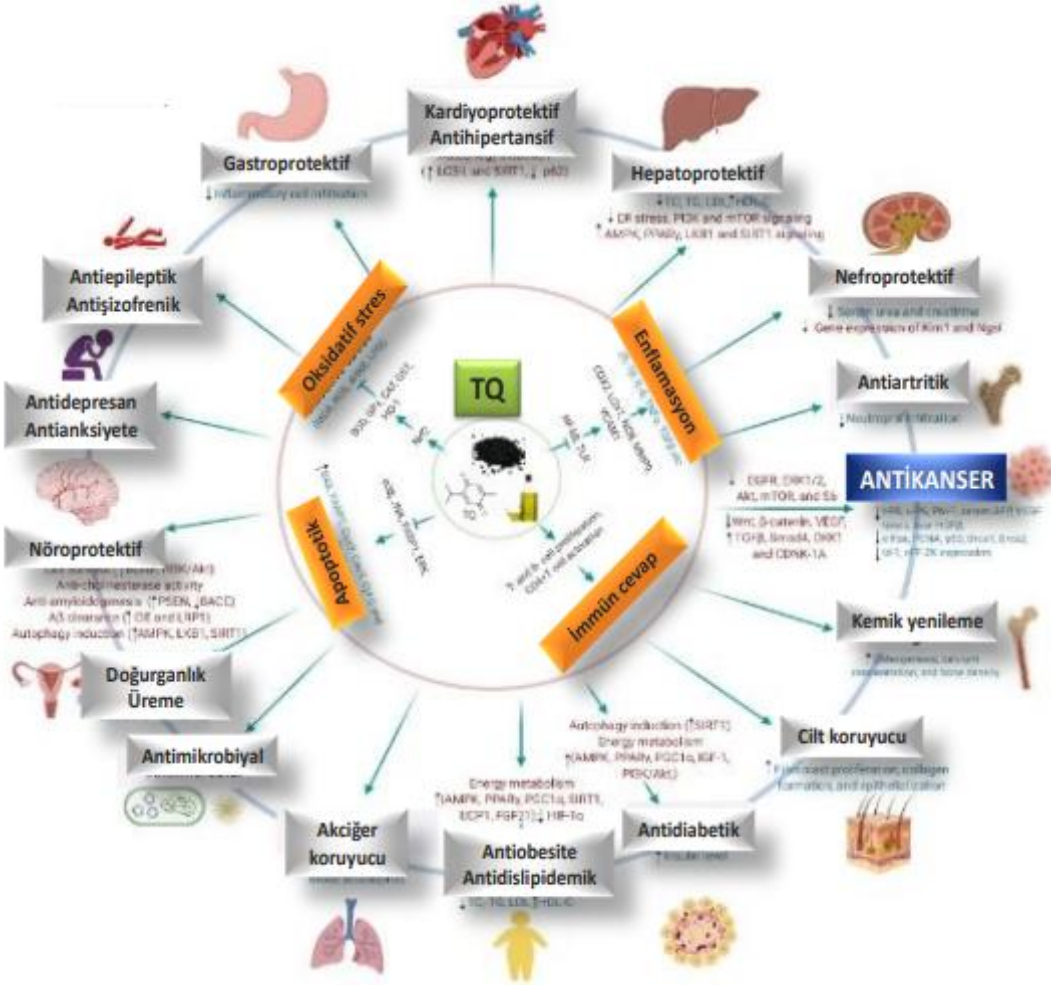
Şekil 2.9. *Nigella sativa* (Çörek otu) bitkisi, tohumu ve yağı

(<https://images.app.goo.gl/GjqdmrJLPtcdxn87>,
<https://images.app.goo.gl/U5su67vHPQH4jGMY6>,
<https://images.app.goo.gl/A7y5EEoqX3qNPza8>)

Familya	: Ranunculaceae
Latince adı	: <i>Nigella sativa</i>
Türkçe adı	: Çörek otu, Cocce, Karaca, Kara çörek, Siyah kimyon
İngilizce adı	: Black cumin, Black seed, Fennel flower
Kullanılan kısımları	: Tohumlar

2000 yıldan fazla bir süredir Orta Doğu ve Uzak Doğu'da doğal bir ilaç olarak kullanılan *Nigella sativa* tek senelik çiçekli bir bitki olup, Akdeniz'e kıyısı olan

ülkelerde yaygın olarak yetişmektedir (Bourgou ve ark., 2010). *Nigella sativa* uçucu yağının ana fraksiyonu monoterpenlerin bir karışımı olup, içeriğinde en çok bulunan (% 30) ve en önemli biyoaktif bileşeni timokinondur (TQ) (Ballout ve ark., 2018).



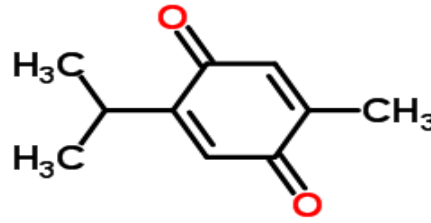
Şekil 2.10. Timokinonun sağlığa etkileri ve etki mekanizmaları (Hannan ve ark., 2021).

TQ'un, antioksidan (Mansour ve ark., 2001), antiinflamatuvar (Hannan ve ark., 2021), antimikrobiyal (Shoieb ve ark., 2003), antibakteriyel (Chaieb ve ark., 2011), antifungal, gasrtoprotektif, kardiyoprotektif, antiülser, nefroprotektif, antidiyabetik, hepatoprotektif ve nöroprotektif (Hannan ve ark., 2021) (Şekil 2.10), özellikleri gibi birçok aktiviteleri bilinmektedir. TQ, immünomodülatör etkisi ile bağışıklık sistemini güçlendiren aktiviteler (Gurung ve ark., 2010); ROS üretimi yoluyla, gram (+) ve gram (-) birçok bakteriye karşı önemli antibakteriyel etkiler (Goel ve Mishra, 2018; Chaieb ve ark., 2011) göstermektedir. Ayrıca TQ'nun kardiyovasküler rahatsızlıklar, diyabet, üreme bozuklukları ve solunum rahatsızlıkları ile kemik komplikasyonlarının yanı sıra fibrozis

tedavisinde de olumlu etkiler göstermektedir. Ek olarak, TQ'nun çok düşük yan etkilere sahip olduğunu ve normal hücelere ciddi bir toksisiteye sahip olmadığını bilinmektedir (Şekil 2.10) (Shoieb ve ark., 2003; Mansour ve ark., 2001; Bourgo ve ark., 2010;).

2.1.9.1.1. Timokinonun Moleküler Yapısı ve Özellikleri

TQ, (C₁₀H₁₂O₂, 2 - izopropil - 5 - metil 1, 4 - benzokinon), (C₁₀H₁₂O₂), 164,201 g/mol ağırlığında, küçük, parlak sarı renkli bir moleküldür (Shoieb ve ark., 2003; Bourgo ve ark., 2010). TQ, doğada enol, keto veya karışımlarını içeren tautomerik formlarda bulunur. Keto formu majör fraksiyondur (~% 90) ve bu bileşiğin ana farmakolojik özelliklerinden sorumludur (Almajali ve ark., 2021; Ahmad ve ark., 2019; Darakhshan ve ark., 2015). TQ, uçucu yağ yapısında, lipofilik ve monoterpenik özellikte bir kinondur. (Yusufi ve ark., 2013; Marsik ve ark., 2005; Shoieb ve ark., 2003; Bourgo ve ark., 2010).



Şekil 2.11. Timokinon'un moleküler yapısı

(<https://images.app.goo.gl/zh9xSVD4rzFDbFYy6>).

Monoterpen grubu (C₁₀H₁₆) bileşikler, mevalonat-yolağından türeyen, izopren molekülünde iki ünitenin kondenzasyonu sonucu oluşan, bitkilerin sekonder metabolitleridir. Birçok kimyasal çeşitliliğe sahip olan bu çok önemli moleküller, bitkinin biyotik ve abiyotik stres faktörlerine karşı kendini savunmasını ve çevresiyle iletişim kurmasını sağlayan kimyasal sinyal görevi görmektedir. Monoterpenler, neredeyse tüm uçucu yağlarda bulunan yapılardır. Bu bileşikler, kolayca hücre membranından geçebilen, hava ve ısı değişikliklerinde hızlı reaksiyona girmeleri nedeniyle kolaylıkla oksitlenebilen, lipofilik özellikte yapılardır (de Sousa, 2015; Bakkali ve ark., 2008; Yusufi ve ark., 2013).

Monoterpenlerin mekanizması iki ana yaklaşıma dayanmaktadır; kemoprevantif ve kemoterapötik etkiler. Kemoprevantif etki genellikle, karsinojeni detoksifiye eden faz I ve II enzimlerinin indüksiyonunu hızlandırmak yoluyla DNA ile kimyasal karsinojenin etkileşimini önleyerek, karsinogenezin başlangıç faz sırasındaki hasarlamalarına karşı engelleyerek etki göstermektedir. Kemoterapötik etki ise, tümör hücrelerinin ölüm oranlarını hızlandırarak, tümör hücre proliferasyonunu ise inhibe ederek ilerleyen faz sırasında etki göstermektedir. Monoterpenlerin kanserin ilerleme fazında, tümör baskılayıcı ve kimyasal olarak önleyici etkinliğinin, apoptozun indüklenmesi ve/veya hücre büyümesini düzenleyen proteinlerin posttranslasyonel inhibisyonuna bağlı olabileceği bildirilmiştir. Hayvan kanser modellerinin kullanıldığı deneysel çalışmalar, bazı monoterpenlerin farklı hücre ve moleküler seviyelerde rol alan antikarsinojenik özelliklere sahip olduğunu göstermektedir. Böylece, monoterpenlerin kanserin önlenmesinde ve kemoterapisinde çoklu mekanizmalar yoluyla etki edebileceği kanısına varılmaktadır. Tüm bu sonuçlar, etkili, toksik olmayan, antikarsinojenik ajanlar olarak değerlendirilebileceği önerilen monoterpenlerin, yeni bir antikanser ilaç sınıfı olarak ümit vaatettiğini göstermektedir (de Sousa, 2015; Bakkali ve ark., 2008; Yusufi ve ark., 2013).

Bir monosiklik (tek halkasal yapı) monoterpen türevi olan TQ'un monoterpen özelliğinin yanı sıra, özellikle antikanser, antioksidan ve şelatlama gibi etkilerinin kinon yapısından kaynaklandığı bildirilmektedir (Marsik ve ark., 2005; Yusufi ve ark., 2013; Shoieb ve ark., 2003; Bourgo ve ark., 2010). Kinonlar, suda az, alkol, eter gibi organik çözücülerde iyi çözünebilen; buhar basıncı oldukça yüksek; erime noktası 115-116 °C olan ve su buharıyla destillenebilen aromatik yapılardır. Normalde aromatik halkalarda, eşlenik 3 çifte bağ bulunduğu halde, kinonlarda 2 eşlenik çifte bağ bulunmaktadır (Marsik ve ark., 2005; Bolton ve ark.,1994). Kinonlar, birçok bitki, bakteri ve mantarlarda bulunan endojen kimyasal bileşiklerdir (O'Brien, 1991). Fotosentetik ve mitokondriyal elektron taşıma zincirine katılarak görev yapabilen kinonlar, bitkilerde doğal olarak bulunabilirken, oksidatif metabolizmanın yan ürünleri olarak da üretilmektedirler. Bir dizi geleneksel ilaç ve bitkisel takviye, kinonları içeren aktif bileşikler olduğu bilinmektedir (Monks ve Jones, 2002; Bolton ve ark, 2000; Bolton ve Dunlap, 2017).

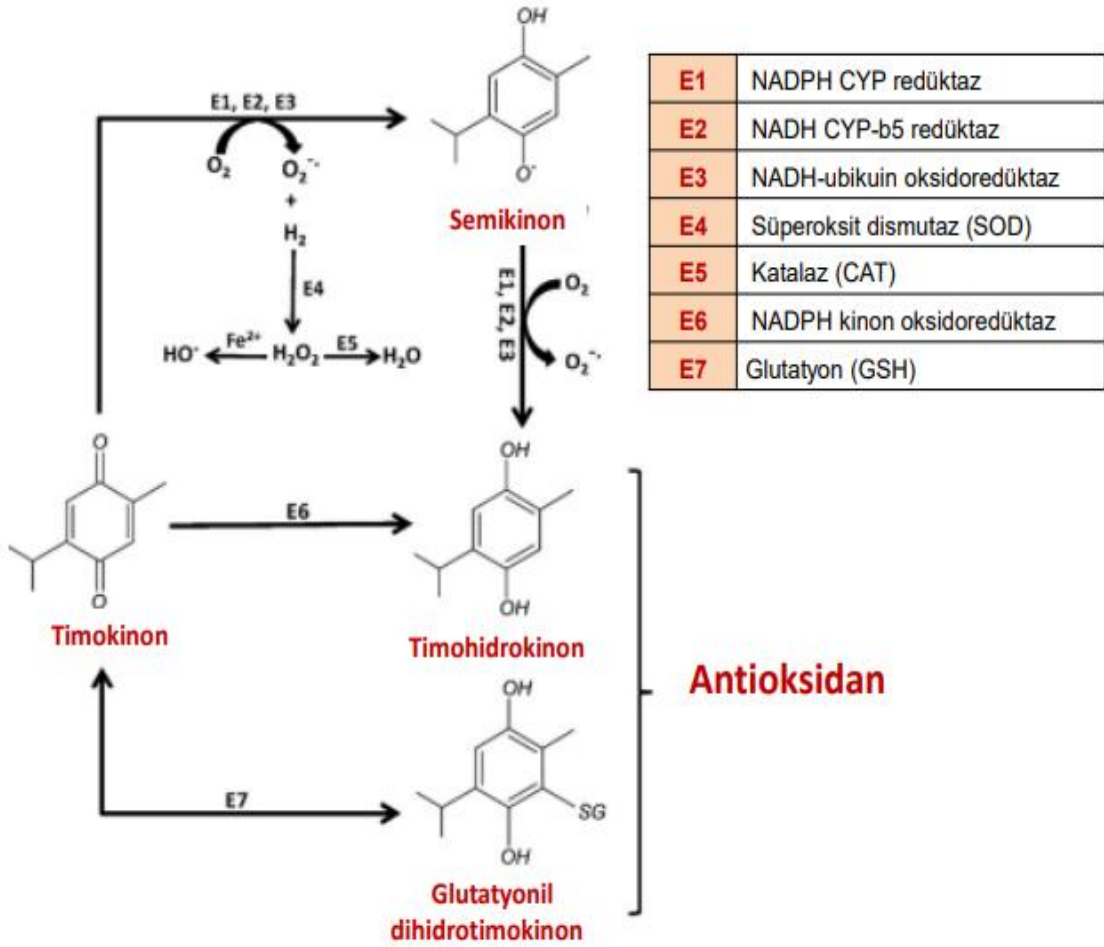
Bu bitkisel aktif bileşiklerden biri olan TQ da, *p*-benzokinon yapısında bir kinon bileşiğidir. Yonca, buğday tohumu gibi bazı bitkilerin, benzokinonları içerdikleri, bazı böceklerin korunma amaçlı, kötü kokulu ve basit benzokinonları sentezledikleri ve bazı bakterilerin biyolojik yönden önemli kinonları ürettikleri bilinmektedir (Monks ve Jones, 2002; Bolton ve ark., 2000). Daha stabil olan *p*-enzokinonlar, asit, amin gibi reaktiflerle, aktif hidrojen atomlarına sahip bileşiklerin 1,4-katılmaları ile bir hidrokinon bileşiği oluşturabilmektedir (Schwartz ve ark., 1985; Bolton ve Dunlap, 2017).

Kinonların, aromatik hidrokinon oluşturma sistemine eğilimi, pek çok özelliğinde etkili olmaktadır. Kinonlar, enzimatik ve enzimatik olmayan şekilde oluşabilmektedir. Elektrofilitik/redoks aktivitelerinde görülen farklılıklar, kinon reaktivitesini geniş bir aralıkta modüle edebilmektedir. Bu, kinonların biyolojik hedeflerinde ve hücre içi etkilerinde önemli farklılıklar olduğunu göstermektedir. Kinonların, proteinlerin ve DNA'nın kovalent modifikasyonlarını ve detoksifikasyon mekanizmalarını etkileyebildiği ve sitotoksik ve sitoprotektif tepkileri indükleyebildiği bilinmektedir (Bolton ve ark., 1994). Bazı güçlü kemoajanlar (daunorubisin, doksorubisin, mitomisin-C ve mitoksantron gibi) redoks mekanizması ile kanser hücrelerine toksik etkilerine katkıda bulunan reaktif oksijen türlerini indükleyen *p*-kinon yapısına sahiptirler. (Bolton ve ark., 2000; Monks ve Jones, 2002; Schwartz ve ark., 1985)

Bu nedenle TQ'un, kimyasal olarak ikili yapı farklılığına girebilmesi, kinon ailesinin bir üyesi olmasına bağlanmaktadır (Darakhshana ve ark., 2015; Zubair ve ark., 2013). TQ, enzimatik ya da enzimatik olmayan bir biçimde redoks döngüsüne girebilmektedir. TQ, dimerik ve indirgenmiş formları olan dihidrotimokinon ve timohidrokinon ile birlikte ortaya çıkabilmektedir ve enerji yönünden hidrokinonlardan daha dengeli olduğu bilinmektedir. Ancak, TQ, çok çabuk konjuge (bir çift, bir tek bağ) olmasından dolayı elektron transferi ile birçok reaksiyonlara katılabilmekte, hemen hemen her türlü oksidasyonla katalizlenebilmekte ve çok kolay yükseltgeme-indirgeme sistemi oluşturabilmektedir (Darakhshana ve ark., 2015; Yusufi ve ark., 2013; Zubair ve ark., 2013). Redoks reaksiyonları genellikle bir TQ molekülünün bir semikinon radikalinin oluşumu ile indirgenmesi şeklinde başlatılabilmektedir. Bu bağlamda TQ, iki aşamalı tek elektronlu indirgeme veya tek aşamalı iki elektronlu indirgeme yoluyla, mikrozomal NADPH sitokrom P450 redüktaz, mikrozomal NADH sitokrom-b5 redüktaz ve mitokondriyal NADH ubikinon oksidoredüktaz aracılığı ile oluşan enzimatik reaksiyon

tek elektron indirgenmesinin ana kaynaklarını oluşturmaktadır. Ortaya çıkan semikinon radikali daha sonra moleküler oksijene bir elektron vererek onu süperoksit anyon radikaline indirgeyebilmekte ve semikinon radikali orijinal kinon molekülüne geri oksitlenebilmektedir. Dolayısı ile bu süreç, süperoksit anyon radikalının ve ikincil reaktif oksijen türlerinin (hidrojen peroksit, hidroksil radikali) oluşumuna yol açan bir redoks döngüsü haline gelmektedir. TQ'un bir elektron indirgenmesi ile oluşan semikinon, daha sonra bir elektron indirgenmesi ile timohidrokinona dönüşebilmektedir (Darakhshana ve ark., 2015; Monks ve Jones, 2002; Brock ve ark, 1990) (Şekil 4.24).

Alternatif olarak doğrudan timohidrokinon oluşumuna neden olan tek adımlı, iki elektron indirgenmesi olan bir reaksiyon ile de gerçekleşebilmektedir (Şekil 4.24). TQ, ayrıca, glutatyonil-dihidro-TQ oluşturmak için GSH ile etkileşim yoluyla enzimatik olmayan bir reaksiyonla da indirgenebilmektedir (Şekil 4.24). TQ'nun indirgenmiş ürünleri, glutatyonil-dihidro-TQ ve timohidrokinon, antioksidan aktivitesiyle bilinmektedir. Tek elektron indirgemesiyle üretilen semikinon, sitotoksik potansiyele sahip, son derece reaktif bileşiklerdir ve TQ'nun prooksidan etkisine katkıda bulunmaktadır (Zubair ve ark., 2013; Darakhshana ve ark., 2015; Racoma ve ark., 2013; Aslan ve ark., 2021). Metal iyonlarının varlığında semikinon radikalleri ve ROS veriminde tespit edilen artış, sadece kinon-şelatlayıcılarda görülmekte, ancak şelatlayıcı gruplar içermeyen kinonlarda bu artış görülmemektedir (Chekhun ve ark, 2014; Kontoghiorghes, 1986).



Şekil 2.12. Timokinonun antioksidan/prooksidan mekanizması (Darakhshana ve ark., 2015).

TQ, kinon yapısı nedeniyle oldukça reaktiftir ve Fenton benzeri reaksiyonlara katılmak suretiyle serbest radikallerin oluşmasını sağlamaktadır. Oluşan serbest radikaller prooksidan etkinlik ile DNA hasarına neden olmakta ve kanser hücrelerinin büyümesi ve çoğalmasını etkili bir şekilde önlenmiş olmaktadır. Ayrıca, TQ'un Fenton reaksiyonu, demir ve hidrojen peroksit arasındaki reaksiyon olup, canlı hücreler için oldukça reaktif ve toksik olan hidroksil radikalının yüksek oranlarda üretilmesine neden olmaktadır. Bu nedenle, oluşan DNA hasarı, apoptozun tetiklenmesine ve kanser hücrelerinin çoğalmasının önlenmesiyle sonuçlanmaktadır (Abe ve diğerleri, 2022; Darakhshana ve ark., 2015; Aslan ve ark., 2021).

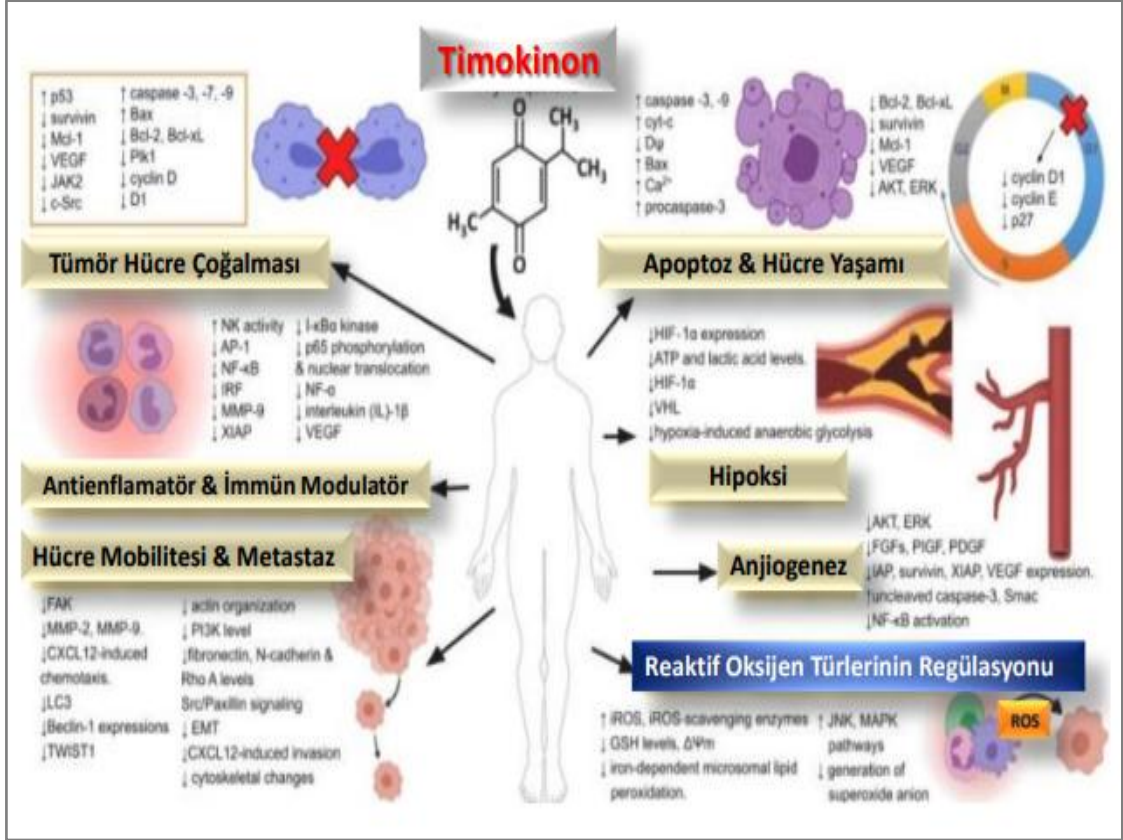
2.1.9.1.2. Timokinonun Antikanser Aktiviteleri

İdeal bir kanser terapötik ajanı, antikanser etkisini, normal hücelere zarar vermeden, kanserli hücreye karşı seçici ve spesifik olarak sergilemelidir. TQ, normal hücelere toksik olmadan, tümör hücelerine etkili bir şekilde sitotoksik aktivite sergilemekle, bu özelliklere sahip olduğunu göstermektedir (Ashour ve ark., 2016). TQ'nun, geniş fitokimyasal yelpazesi arasında; hücre siklus arresti (Gali-Muhtasib ve ark., 2008), apoptotik (Ozturk ve ark., 2017), antimitojenik ve kemopreventif (Badary ve ark., 2003; Badary ve ark., 2007) gibi birçok aktiviteleri bulunmaktadır. Bu nedenle, Bu etkileriyle TQ fitokimyasalı, kemoterapötik potansiyelli bir antikanser ajanı olarak, birçok aktivitesi ile istisnai bir özelliğe sahip olabileceğini ve kanser tedavisinde sentetik ilaçlara değerli bir alternatif olabileceğini veya bunların etkilerini arttırmak, dozlarını azaltmak ve toksisitesini sınırlamak için kullanılabilceğini göstermektedir (Sethi ve ark., 2008; Woo ve ark., 2012; Abe ve diğerleri, 2022; Aslan ve ark., 2021; Pal ve ark., 2021; Darakhshana ve ark., 2015).

Önceki verilerden, TQ'un, meme karsinomu (Aslan ve ark., 2021), over karsinomu (Shoieb ve ark., 2003), kolorektal karsinom (Gali-Muhtasib ve ark., 2004b), prostat karsinomu (Kaseb ve ark., 2007), keratinosit (Gali-Muhtasib ve ark., 2004a), osteosarkom (Roepke ve ark.,2007), hepatoselüler karsinom (Ahmed ve ark., 2008) ve tiroid karsinomu (Ozturk ve ark., 2017) olarak, çeşitli hücre hatlarında hücre çoğalması üzerine inhibe edici etki gösterdiği; kanserli hücelerin etrafındaki, normal osteoblastlar (Roepke ve ark., 2007), normal böbrek hüceleri (Shoieb ve ark., 2003) ve normal insan akciğer fibroblastları (Gurung ve ark., 2010) gibi sağlıklı olan hücelere toksik etki göstermeyerek, seçici sitotoksitesinin olduğu (Czene ve ark., 1997; Gali- Muhtasib ve ark., 2004; Shahein ve ark., 2019); aynı zamanda, antineoplastik maddeler ile kemoterapötik kombinasyon halinde kullanıldığında kemosenstizan etki gösterdiği bilinmektedir (Bhattacharjee ve ark., 2020; Ibiyeye ve Zuki, 2020).

TQ'un farklı kanser hücelerinin büyümesi ve çoğalması üzerindeki inhibe edici etkilerini (Fatfat ve ark., 2019; Almajali ve ark., 2021); P27 ve P21 proteinlerinin indüksiyonu (Alhmied ve ark., 2021); kaspaz-9 ve -3'ün aktivitesi ve BAX/bcl2 oranının indüksiyonu (Samarghandian ve ark., 2019); PPAR- γ aktivitesinin indüksiyonu (Woo ve ark., 2011); p53 ve pTEN indüksiyonu (Woo ve ark., 2012); siklinlerin inhibisyonu

ile hücre döngüsünün (G1/S'de) durdurulması ve apoptoz indüksiyonu (Homayoonfal ve ark., 2022; Ahmed ve ark., 2008); ayrıca ROS oluşumunun indüksiyonu (Abe ve ark., 2022; Wang ve ark., 2018; Zhou ve ark., 2021; Aslan ve ark., 2021) gibi birçok mekanizmalar yoluyla yaptığı görülmektedir.



Şekil 2.13. Timokininin antikanser etkileri (Phua ve ark., 2021).

TQ'nun önemli bir bulgusu, güçlü antianjiyogenik etkiye sahip olmasıdır. TQ'un, tip 4 kollojenazı, metalloproteinazı, anjiyogenik protein-fibroblastik büyüme faktörünü, doku tip/ürokinaz tipi plazminojen aktivatörlerini inhibe ettiği, endotelial koloni oluşturan hücrelerin çoğalmasını, tüp oluşumunu ve önemli bir proanjiyogenik molekül olan VEGF'i seçici olarak inhibe ettiği (Ozturk ve ark., 2017; Peng ve ark., 2013); insan endotel hücrelerinin (HUVEC) göç ve istilasını etkili bir şekilde inhibe ettiği ve kanser hücrelerinin invazyonu ve metastazını kontrol ettiği (Kolli-Bouhafs ve ark., 2012; Sethi ve ark., 2008) ve böylece antianjiyogenik, antimetastatik etkili olduğu görülmektedir.

TQ, ayrıca, telomerazın inhibisyonu ve telomer kısalması ile (Ozturk ve ark., 2017; Gurund ve ark., 2010; Gali-Muhtasib ve ark., 2008), p53 ve Bax'ın birikimi ile Kaspaz-

3 ve -9 aktivasyonu ile (Phua ve ark, 2021), apoptozu indüksiyonu; matris metaloproteinaz-2 ve -9'un ve Fokal Adezyon Kinazın'da azalması ile (Kolli-Bouhafis ve ark., 2012) hücre göçü ve istilasının inhibisyonu sonucu, GB hücrelerinde antiproliferatif ve antimetastatik aktivite göstermektedir.

Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, DOX ve TQ'nun ACNP'de birlikte verilmesi, meme KKH'lerinin kendi kendini yenileme potansiyelini, mammosfer oluşturma verimliliğinde, CD44 ve CD24 ekspresyonunda ve aldehit dehidrojenaz 1 aktivitesinde azalmanın eşlik ettiği, ayrıca, KKH'lerini göçünü ve istilasını baskıladığı ve etkili bir şekilde yok ettiği bildirilmiştir (Ibiyeye ve Zuki, 2020). Kolorektal kanserde, TQ ve 5-FU'nun hibrit kombinasyonu, Wnt/ β -katenin ve PI3K/Akt'yi aşağı regüle ederek kolorektal KKH'lerin kendini yenileme potansiyelini etkili bir şekilde azalttığı, köklüğü teşvik eden transkripsiyon faktörleri Oct4 ve SOX2'yi aşağı regüle ettiği ve CD133+ popülasyonunu ortadan kaldırdıkları görülmüştür (Bhattacharjee ve ark., 2020).

2.1.9.1.3. Timokinonun Antioksidan Aktiviteleri

Doğal bir bileşik olarak TQ, güçlü antioksidan, antiinflamatuvar ve immün güçlendirme kapasitesi nedeniyle farmakolojik toksisite çalışmalarında önemli bir ajan haline gelmiştir (Salem, 2005). TQ'un, süperoksit anyonu, hidroksil radikali ve tekli moleküler oksijen dahil olmak üzere çeşitli ROS'lara karşı temizleme aktivitesi ve yüksek ROS seviyelerini antagonize edebilme yeteneği nedeniyle güçlü bir antioksidan olduğu (Mansour ve ark., 2002); ayrıca, hücrel antioksidan savunmada ve/veya elektrofilik karsinojenlerin etkisizleştirilmesinde rol oynayan sitoprotektif proteinlerin ekspresyonunu ve/veya aktivitelerini indükleyerek oksidatif stresi önlediği, süperoksit radikal anyonu ve hidroksil radikallerini içeren birçok reaktif oksijen türlerinin süpürücüsü olduğu (Pari ve Sankaranarayanan, 2009; Shoieb ve ark., 2003; Bourgo ve ark., 2010); çeşitli dokularda ksenobiyotik ajanların neden olduğu oksidatif hasara karşı terapötik potansiyelinin olduğu (Nili-Ahmadabadi ve ark., 2018; Bilgic ve ark., 2023) bildirilmekte ve TQ'nun antioksidatif potansiyelinin, molekülün kinon yapısının redoks özellikleri ve TQ'nun fizyolojik bariyerlerden geçebilmesinin kısıtlanamaması sonucu hücre altı bölmelere kolay erişim ile ilişkili olabileceği ve bu etkilerinden dolayı, radikal temizleme etkinliğinin görülebileceği bildirilmiştir (Badary ve ark., 2003).

TQ, ROS üretmek, survival genlerin düşük ekspresyonuna, proapoptotik proteinlerin konformasyonel değişikliklerine, kaspaz-9, -3 ve PARP aktivasyonu ile apoptoz indüksiyonuna neden olarak (Paramasivam ve ark., 2012; Lei ve ark., 2012; Jafri ve ark., 2010), prooksidan özellikler de sergileyen bir antioksidan olduğu görülmektedir. Böylece, TQ, konsantrasyona ve hücrel mikroyortama bağı olarak antioksidan veya prooksidan gibi görev yapabilen, ikili role sahip bir fitobiyoleşen olduğu anlaşılmaktadır. TQ, düşük konsantrasyonlarda antioksidan, yüksek konsantrasyonlarda prooksidan olarak etkili olabilmekte, amino asitlerin amino veya tiyol grupları ile reaksiyona girmek suretiyle bir dizi oksido-redüksiyon reaksiyonuna katılarak, semikinon veya timohidrokinona metabolize olabilmekte ve ROS üretimini sağlayan bir prooksidan olarak görev yapabilmektedir. Bu durum, TQ'un, tümör hücrelerinde, hücre ölümünü ROS üretimi yoluyla gerçekleştirebildiğini göstermektedir (Gurung ve ark., 2010; Zubair ve ark., 2013; El-Najjar ve ark., 2010). Ayrıca TQ, oksidan/antioksidan özelliklerinin, geniş bir kanser yelpazesine karşı, farklı terapötik yöntemlerin antineoplastik etkilerini arttırabilme yönünde olması, büyük bir antikanser potansiyeline sahip olabileceğine işaret etmektedir (Edris, 2009; Almatroodi ve ark., 2020; Darakhshan ve ark., 2015; Martinovich ve ark., 2016; Pal ve ark., 2021).

Önceleri TQ'un, toksik kinona (semikinona) ve ardından timohidrokinona biyotransformasyonu ile önemli miktarda süperoksit radikali oluşturduktan sonra, katalaz (CAT) ve süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesini arttırdığı (Darakhshan ve ark., 2015; Martinovich ve ark., 2016; Woo ve ark., 2013; Trawczynska, 2020) ve artan SOD aktivitesinin TQ'nun neden olduğu hidroksil radikalleri ve süperoksit radikallerini inhibe ettiğine dair mekanizma bilgileri (Martinovich ve ark., 2016; Shoieb ve ark., 2003; Bourgou ve ark., 2010), moleküler yerleştirme bulguları ile, TQ'nun, SOD/CAT moleküllerinin yapısına kimyasal müdahalesiyle ilişkili olmadığını anlaşılması üzerine, TQ'un etki mekanizmasının, düşük TQ konsantrasyonlarında H₂O₂'e maruz kalmanın, kanser hücrelerinin hayatta kalma oranını artırma yönünde, tersine, yüksek konsantrasyonlarda ise, H₂O₂'in neden olduğu sitotoksitesiyi güçlendirme yönünde olabileceği şeklinde değişmiştir. Aynı zamanda, TQ ve H₂O₂'in kanser hücrelerinde serbest radikal oluşumu üzerindeki etki mekanizmasının, fenton reaksiyonu indüksiyonu ile TQ etkinliğinin artması sonucu, kanser hücrelerinin proliferasyonunu önlenmesi şeklinde olabileceği vurgulanmıştır. (Ghelichkhani ve ark., 2023)

2.1.9.1.4. Timokinonun Şelatör Etkinliği

TQ'un, Cu (II)'yi Cu (I)'e indirgemesinin, bakır ile kompleksinde, redoks aktif özellikli bir şelatör gibi de davranabileceği (Zubair ve ark., 2013); kinon grubu bileşik sınıfından bir üye olan TQ'un, Cr(VI), Cu(II), V(IV) ve Co(II) dahil, birçok metallere başarılı bir şekilde kompleks oluşturabileceği (Kishwar ve ark, 2012); yine Fe⁺³ ile TQ'un çok net ve hızlı bir reaksiyona girebilmesi ve Fe⁺²'yi Fe⁺³'e, zıt olarak Fe⁺³'ü Fe⁺²'ye dönüştürebilme yeteneği ile Fenton reaksiyonuna benzer bir reaksiyona katılabileceği (Kishwar ve ark, 2012) sonuçları, TQ'un metallere kompleks oluşturma potansiyeline sahip bir şelatör olabileceğine işaret etmektedir. TQ'un metal-şelatör kompleks oluşturabilme özelliği, halen tam olarak bilinmemekle birlikte, bu özelliğe sahip istisnai bir biyoaktif doğal kaynak olabilme ihtimali yönünden ilgi çekmektedir.

2.1.10. Glioblastoma Tedavisinde Yeni Strateji Arayışları

Son yıllarda, sağlıklı hücrelere minimum toksik, ancak, kanser hücrelerine spesifik hassasiyette konsantrasyonları sağlayan, farmakodinamiği ve biyoyararlanımı gelişmiş, yeni ilaç dağıtım sistemlerinin oluşturulmasında önemli ilerlemeler olmaktadır. Bu nedenle, kanser tedavisinde bitkisel aktif bileşenlerin kullanımının, geleneksel kanser tedavisinin etkinliğini artırma konusunda muazzam bir potansiyele sahip olduğu görüşü hakimdir. Doğal fitoaktif bileşenlerin *in vitro* olarak güçlü farmakolojik aktiviteye sahip olduğu ancak, *in vivo* emilimin dar olduğu rapor edilmektedir. Biyoaktif fitobileşenlerin zayıf biyoyararlanım ve emilim gibi dezavantajlarının ve olumsuz etkilerinin üstesinden gelmek için kullanılan nanoteknolojik metodlar, nano ilaç dağıtım sistemleridir (Khan ve Younus, 2018; Laskar ve ark., 2016; Mostafa ve ark., 2018).

Yukarıda görüldüğü gibi, TQ gibi doğal kaynaklı ajanların, kanser tedavi modellerinde terapötik etkilere sahip olduğu birçok araştırmada gösterilmekle (Gurung ve ark., 2010; Sethi ve ark., 2008) birlikte, düşük çözünürlüğü ve biyoyararlanımı nedeniyle klinik kullanımındaki kısıtlılık problemi (Rajput ve ark., 2015), nanoteknolojik ürünlerin verdiği avantajlarla çözülmeye çalışılmaktadır (Khan ve ark., 2018). Bu nedenle terapötik etkinliğini arttırmak için TQ'nun nanopartikül (NP) formülasyonlarının, GB gibi agresif kanser hücrelerine karşı daha fazla etkinliğe sahip olabileceği düşünülmektedir.

2.1.10.1. Nanoteknoloji ve Nanotaşıyıcılar

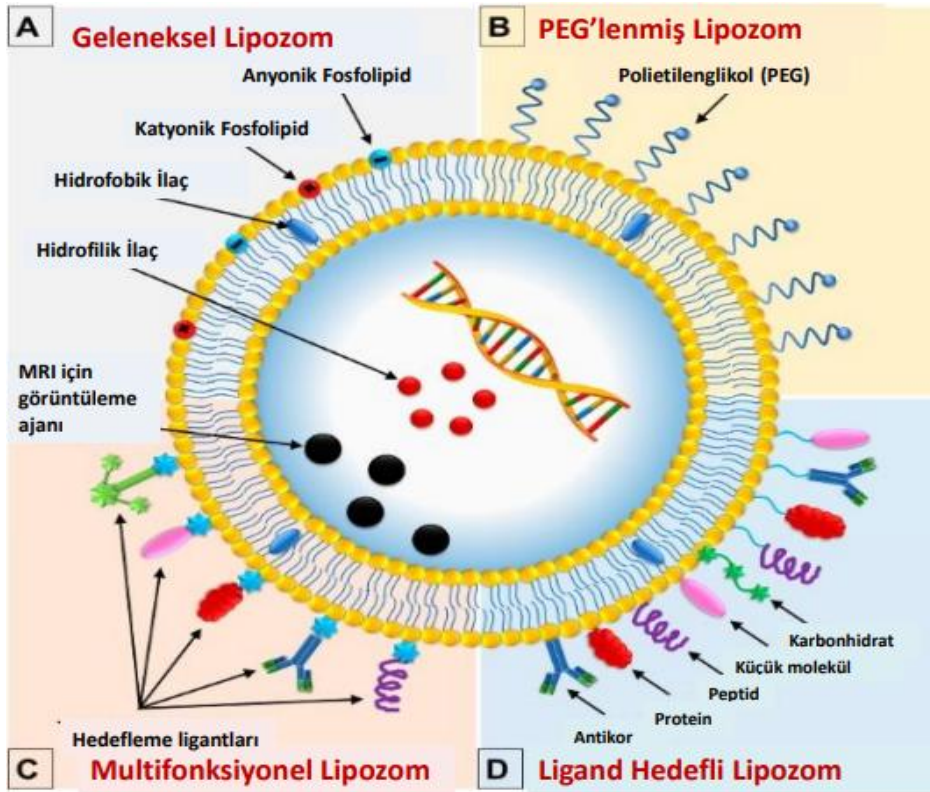
NP'ler, nano ölçekli boyut, yüksek yüzey-kütle oranı ve yüksek reaktivite gibi birçok önemli özelliğe sahiptir. Bu özellikler, yaygın terapötik ve tanısal ajanlarda bulunan sınırlamaların çoğunun üstesinden gelmek için kullanılabilir. NP'lerin, son yıllarda ön plana çıktığı en önemli alanlardan biri de sağlık olup, özellikle kanser tedavisinde nanoteknolojik bazlı tedaviler, ilacın çözünürlüğünü, stabilitesini geliştirmek, çoklu ilaç direncini azaltmak ve kanser tedavisinin güvenliğini ve etkinliğini artırmak için nano ilaç dağıtım sistemleri üzerinde yoğunlaşmaktadır (Attama ve ark., 2012; Barani ve ark., 2021; Tan ve ark., 2017; Liu ve ark., 2022; Kurisawa ve ark., 2017).

Etkin alanına kontrollü teslimini sağlayabilmek amacıyla bir ilacın bir karışıma dahil edildiği preparatlara ilaç dağılım sistemleri denilmektedir (İDS). İDS'leri, nano düzeyde genelde veziküler sistemler olmak üzere çok çeşitlidir. Taşınacak etken madde değişmeden ya da taşınacak sisteme dahil edilerek İDS'inde taşınabilmektedir. Ancak taşıyıcı sistemin birincil görevi ilacı teslim etmekle birlikte, ikincil önemli görevi de etken maddenin terapötik etkilerini arttırmaktır (Barani ve ark., 2021; Liu ve ark., 2022; Kurisawa ve ark., 2017).

NP'lerin boyutu, şekli ve yüzey özellikleri, hedeflenen antikanser aktivitesinin minimum karmaşıklıkla elde edilmesi için çok önemlidir. NP'ler, çoğunlukla küresel şekillidir ve kullanım amacına bağlı olarak, 10 ila 200 nm arasında değişen boyutlarda olması uygundur. Bu boyutlar aynı zamanda, KBB'nin aşılması için de gerekli olan boyutlardır. NP'lerin yüzey özellikleri, epitel fenestrasyonunu başarılı bir şekilde geçerek biyoyararlanımı ve yarı ömrü etkileyebilmektedir. Ayrıca olağanüstü koruma özelliklerine ve iyi mikrobiyolojik dirence sahiptirler (Le ve ark., 2019; Barani ve ark., 2021; Kurisawa ve ark., 2017). Eksozomlar, niozomlar, polimerozomlar, dendrimerler, polimerik ilaç konjugatları, polimerik miseller, nanoteknoloji bazlı ilaç dağıtım sistemlerinde kullanılan etkili taşıyıcıların birkaç örneğidir (Liu ve ark., 2022; Tan ve ark., 2017) Bu amaçla, nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler olarak en çok kullanılanlar lipozomal nanopartiküller olup, geliştirmek için bitki bazlı (fitozomal) ve metal bazlı (manyetolipozom) formları, araştırmalarda kullanılmaktadır.

2.1.10.2. Lipozomal Yapılar

Yunanca yağ anlamına gelen lipos ve vücut anlamına gelen soma kelimelerinden oluşan lipozomlar, 1960'ların başında Alec D. Bangham tarafından keşfedilmelerinden bu yana benzersiz özellikleri nedeniyle büyük ilgi toplamıştır (Kumara ve ark., 2015). Lipit yapı taşlarının amfifilik doğasından dolayı lipozomlar, hidrofilik bir merkezi boşluk etrafında eşmerkezli olarak kendi kendine birleşerek düzenlenen, membran benzeri çift katlı lipit tabaka ile çevrelenmiş, kapalı, kolloidal, küresel şekilli keseciklerdir (Şekil 2.13). Hidrofilik (çekirdek) ve hidrofobik (zar içinde) ortamları birlikte içeren bu özel yapısal organizasyon, biyoyumlu, biyobozunur ve nonimmünojenik özellikleri ile nanobiyoteknolojinin temel taşlarından biri haline gelmiştir (Le ve ark., 2019; Kumara ve ark., 2015; Shaji ve Bhatia, 2013; Sezgin ve Yüksel, 2015).



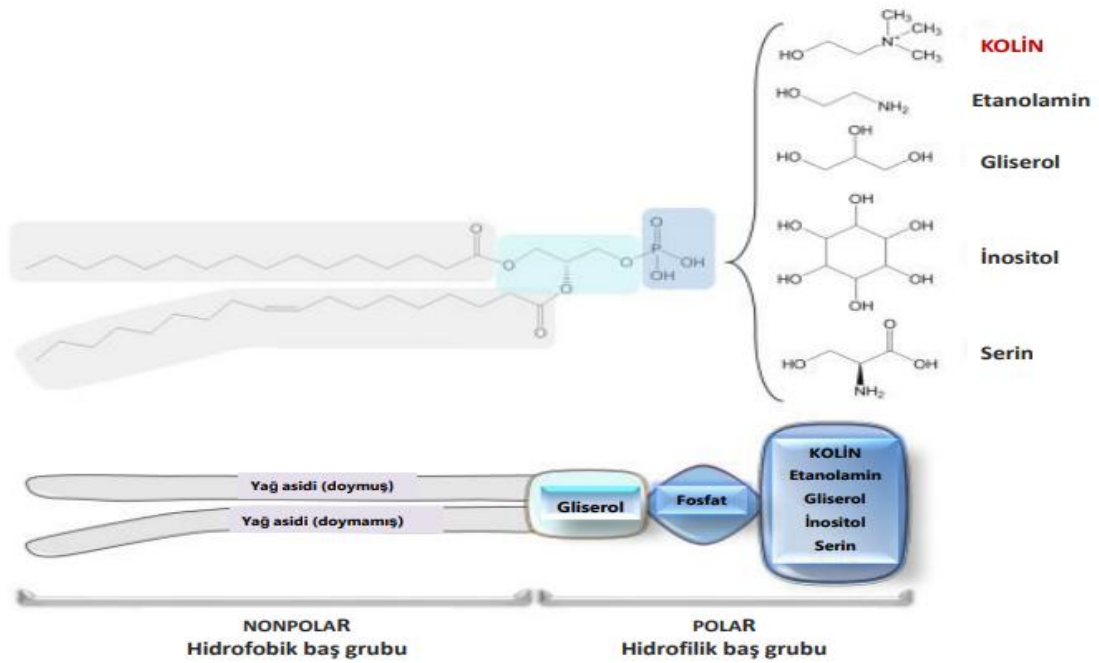
Şekil 2.14. Lipozomal partikül ve çeşitli kullanım amaçları (Le ve ark., 2019).

2.1.10.2.1. Lipozomal Nanopartiküllerin Lipit Yapıları

Lipozomal NP'lerin sentezlenmeleri için yapılarında genellikle fosfolipit molekülleri kullanılmaktadır. Fosfolipitler, biyolojik membranların ana yapı taşları olarak görev yapan hem hidrofilik hem de hidrofobik kısım içeren ve sulu ortamlarda kendi kendine

toplanma özellikleri sayesinde hücre zarını taklit edebilecek şekilde çift katman oluşturabilen amfifilik moleküllerdir. Genel olarak, yağ asitleri, bir gliserol veya sfingozin ve bir fosfat omurgası ile bu omurgaya fosfat yapılarından bağlı bir alkol bileşeninden oluşmaktadır (Şekil 2.14) (Le ve ark., 2019; Tang ve ark., 2019; Torchilin ve Weissig, 2003).

1972'de Singer ve Nicholson, fosfolipitlerin amfifilik özelliği nedeniyle, baş grupların hidrofilik doğası gereği sulu ortamlara maruz kalabilecek şekilde dış kısma yönelmelerini; yağ asit kuyruklarının ise hidrofobik yapısı nedeniyle birbirlerine doğru yönelerek kapandıklarını bildirmiştir. Fosfolipitlerin suya olan bu ikili tercihin nedeni, sulu çözeltilerde su-hidrokarbon etkileşimlerinin artan olumsuz entropisinden dolayıdır ve bu nedenle kuyruk kısımları kovalent olmayan bir lipit mimarisi ile kendiliğinden bir araya gelme eğilimi göstermektedir (Le ve ark., 2019; Tang ve ark., 2019; Torchilin ve Weissig, 2003).



Şekil 2.15. Fosfolipidlerin yapısal gösterimi (Veiga, 2014).

Lipitlerin kimyasal özellikleri, geometrik şekilleri ve termodinamik etkileşimlerinin yanı sıra, sıcaklık, pH, tuzluluk ve basınç gibi fiziksel koşullar, lipozom yapılarını etkileyen belirleyici faktörlerdir. Erime sıcaklığı, katı-jel fazından sıvı faza değiştiren geçiş sıcaklığıdır ve lipid yapıları etkileyen kritik bir değişkendir. Katı-jel fazlarda

lipitler düzenli ve bir arada paketlenirken, sıvı fazlarda membrandaki düzensizlik artmaktadır (Le ve ark., 2019; Torchilin ve Weissig, 2003). Yine, sulu faz içeriği de lipozom yapıları için diğer önemli bir parametredir. Ayrıca sulu çözeltideki lipit konsantrasyonu ve hidrokarbon lipit zincirlerinin boyutu da lipozomun moleküller organizasyonu üzerinde büyük etkisi vardır. Örneğin, lipit zincir uzunluğunun, fazların oluşumunu kolaylaştırması bakımından ve hidrofobiklik üzerinde güçlü bir etkisi vardır. Ek olarak, hidrokarbon zincirlerinde cis- veya trans-çift bağların varlığı, zincirin erime geçiş sıcaklığında ciddi bir düşüşe yol açmaktadır (Veiga, 2014; Lei ve ark., 2022; Zang ve ark., 2017; Torchilin ve Weissig, 2003).

Lipozomal formülasyonların en büyük sorunu stabilitedir. Bu nedenle, lipitlerin kimyasal yapısı, stabilite ve agregat yapısını etkileyen en önemli parametrelerden biridir. Lipitlerin yağ asitlerinde bulunan çift bağlar, oksidasyona yatkınlık nedeniyle lipozomlarda erken bozunmalara neden olmaktadır. Dolayısıyla, lipozomların hazırlanmasında kullanılacak lipitlerin olabildiğince doymuş olmaları, daha stabil partiküllerin elde edilmesi bakımından önemlidir (Lei ve ark., 2022; Zang ve ark., 2017). Lipid polaritesi, yükü ve sterik özellikleri, fosfolipitlerin baş grubunun yapısından kaynaklanmakta ve agregat oluşturma açısından önemli görülmektedir. Yüklü baş grupları ile su molekülleri arasındaki çekici-itici kuvvetler (iyon-dipol), lipozomların toplanma süreci ve stabilizasyonunda önemli rol oynamaktadır. Bu nedenle, hücre zarlarının % 50-90 oranında doğal yapısını oluşturan fosfatidilkolin, hem yağ asit yapısında tek çift bağ bulunması ile stabilite açısından hem de kolin baş yapısının özellikleri bakımından, lipozomların hazırlanmasında kullanılan en önemli ve en yaygın fosfolipit türüdür (Lei ve ark., 2022; Zang ve ark., 2017; Tang ve ark., 2019).

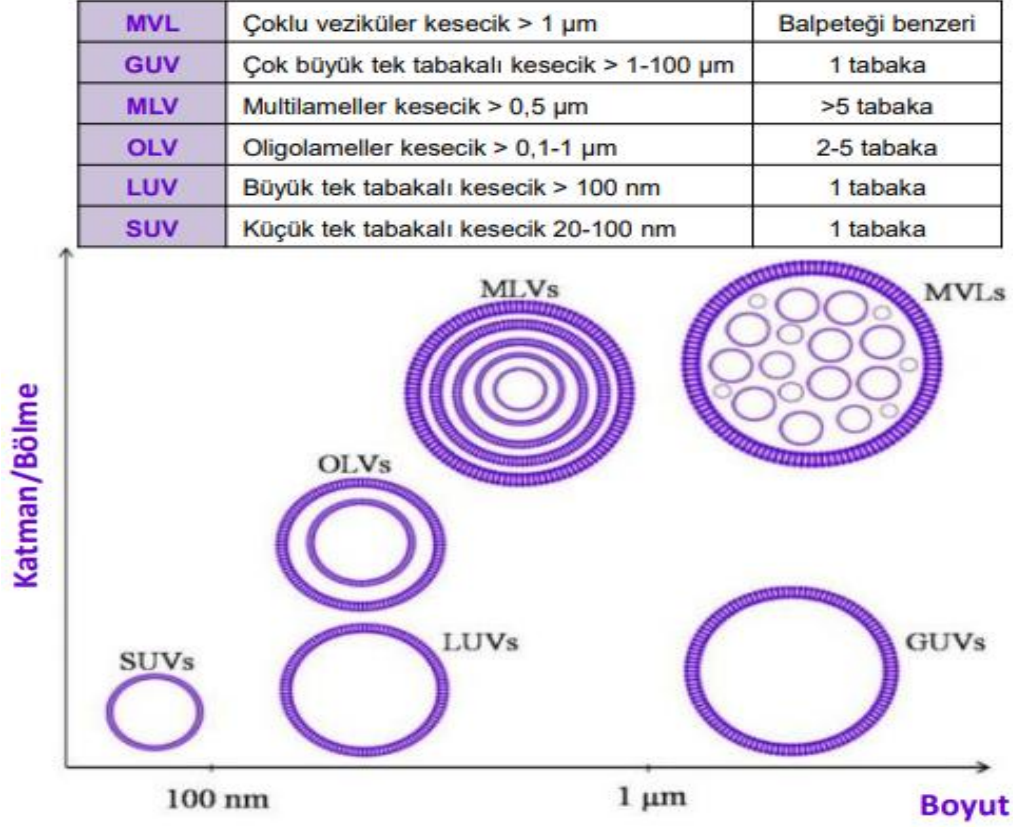
Ancak doğal nanoyapılı ilaç taşıyıcı sistemlerin sentezi için kullanılacak maddelerin de doğal yapılı olmaları önem arz etmektedir. Bu nedenle, soya fasulyesi kaynaklı fosfatidikolinin (lesitin) kullanılması tercih edilmektedir. Doğal fosfatidilkolin soya fasulyesi gibi bitkisel kaynaklı veya sığır ve yumurta gibi hayvansal kaynaklı olabilmektedir. Ancak, sığır ve yumurtadan türetilen lesitinler (yumurta ve süt lesitinleri), allerji bakımından, ayrıca, hem mikroorganizma hem de protein kontaminasyonu bakımından (ilave kontaminasyon testlerinin yapılması gibi) dezavantajlara sahiptir. Bu nedenle, soya fasulyesinden elde edilen lesitin, doğal lipozomal partiküllerin üretimi için daha ekonomik, daha güvenli, daha stabil ve daha

hijyenik olması bakımından tercih edilmektedir (Lei ve ark., 2022; Gürsoy, 2002; Zhang, 2017; Mendez ve Banerjee, 2017; Liu ve ark., 2022; Tang ve ark., 2019).

2.1.10.2. 2. Lipozomların Hazırlanması ve Yapısal Özellikleri

Lipozomların hazırlanmasında, lipitlerin ve kapsüllenecek maddenin fizikokimyasal özellikleri ve konsantrasyonları, keseciklerin boyutlarında, polidispersitesinde ve katmanlı yapılarında etkili olacağı için, doğru seçim yapılması gerekmektedir. Genellikle lipozomlar, Bangham yöntemi olarak bilinen, hazırlanması kolay ve nispeten ucuz olan, “ince lipit film” yöntemine dayanarak sentezlenmektedir. Bu yöntemde, yüksek kapsülleme verimliliğine sahip MLV (çok tabakalı lipozomlar) oluşturulmakta, daha sonra değişen boyut ve şekillerde heterojen popülasyonlar sağlanabilmektedir. Yöntemde, önce bir lipit karışımı, homojenizasyon tamamlanana kadar organik bir çözücü içerisinde çözüldükten sonra, organik çözücü buharlaştırılmakta ve bir cam şişede kurutulmuş bir lipit film oluşturulmaktadır. Daha sonra, kurutulmuş lipit filmi, kuvvetli çalkalama ve vorteksleme altında kapsüllenecek molekülleri içeren sulu bir çözelti ile hidratlandıktan sonra oluşturulan heterojen MLV’ler, sonikasyon ve iyi tanımlanmış boyutta, homojen ve tek katmanlı kesecikler elde etmek için ekstrüzyona tabi tutulmaktadır (Lei ve ark., 2022; Gürsoy, 2002; Zhang, 2017; Mendez ve Banerjee, 2017; Liu ve ark., 2022).

Lipozomlar yapısal olarak, lipit çift katmanlarının (lameller) sayısına ve vezikülün boyutuna bağlı olarak, tek katmanlı lipozomlar ve çok katmanlı lipozomlar olarak sınıflandırılabilir. Tek katmanlı lipozomlar, kolay hazırlanabilmeleri ve membran özelliklerinin anlaşılmasındaki basitlik nedeniyle araştırmalarda büyük ilgi görmektedir. Bu tek-çift katmanlı kesecikler aynı zamanda üç boyutta alt tipe ayrılabilir. 100 nm’den küçük keseciklere, küçük tek tabakalı kesecikler (SUV); $100 \text{ nm}^{-1} \mu\text{m}$ arasında değişen keseciklere, büyük tek tabakalı kesecikler (LUV) ve 1 μm ’dan daha büyük olanlara, dev tek tabakalı kesecikler (GUV) adı verilmektedir. Tek katmanlı kesecikler birçok alanda, büyük ölçüde çalışılmış olmasına rağmen, 200 nm’den küçük olanlar kanser tedavi araştırmalarında en çok kullanılanlarıdır ve farmasötik uygulamalarda ilaç/gen taşıyıcıları olarak özellikle ilgi çekmektedir (Liu ve ark., 2022; Gürsoy, 2002; Zhang, 2017; Mendez ve Banerjee, 2017).



Şekil 2.16. Lipozomların yapısal sınıflaması (Liu ve ark., 2022).

2.1.10.2.3. Lipozomların Uygulama Alanları

Lipozomal nano ilaç dağılım sistemleri, hem hidrofilik hem de lipofilik maddeleri ayrı ayrı ya da birlikte enkapsüle ederek; etken maddelerin toksik yan etkilerini önleyerek; etken maddeleri dış etkenlerden koruyarak; kontrollü uzun salım ve spesifik hedefleme ile etken madde etkinliğini arttırarak ve terapötik doz miktarını azaltarak taşıma gibi birçok avantajlar sunmaktadır (Lei ve ark., 2022; Liu ve ark., 2022; Torchilin ve Weissig, 2003). Yapısal ve fizikokimyasal özelliklerini kolaylıkla modüle etme konusundaki esnek uygulamaları nedeniyle çok yönlülüğe sahip olmaları, araştırmacılara lipozom özelliklerini belirli uygulamalara göre ayarlama fırsatını vermektedir. Lipozomlar, çoğu zaman yapısal parametrelere göre sınıflandırılrsa da, diğer alternatif sınıflandırmalar, bileşimine veya hassasiyetine dayanarak yapılmaktadır (Liu ve ark., 2022; Torchilin ve Weissig, 2003).

Nötr veya negatif yüklü fosfolipidlerin birinden veya bunların bir karışımından oluşan geleneksel lipozomlar; vezikülün net yükü pozitif olan ve negatif yüklü DNA/RNA ile

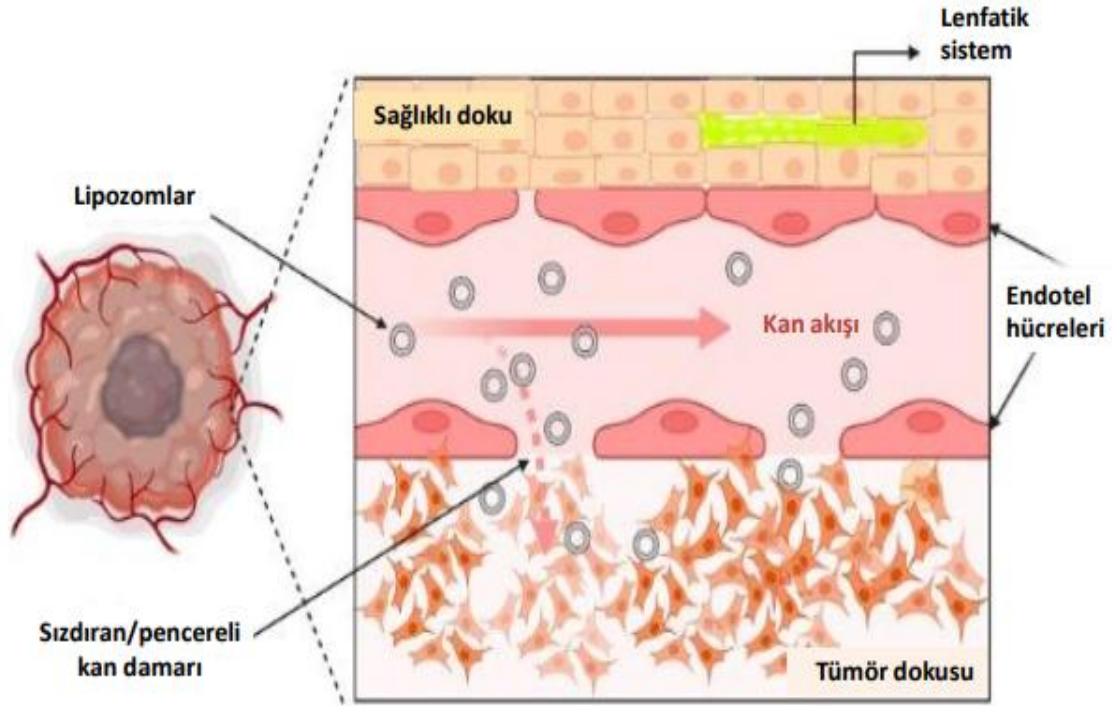
etkileşime girebilmesi nedeniyle, daha çok genetik yönden önemli olan katyonik lipozomlar; belirli bir reseptöre doğru yönlendirmek için bazı ligandlarla işlevselleştirilen hedeflenmiş lipozomlar; fagositler tarafından vücuttan hızlı bir şekilde temizlenmelerini büyük ölçüde azaltmak için, hidrofilik polietilen glikol (PEG) zincirlerinin fosfolipidlerin dış kısmına kovalent olarak bağlanması ile oluşan stearik lipozomlar veya gizli lipozomlar gibi uygulama alanları için büyük bir çeşitlilik sunan birçok lipozomal ilaç dağıtım sistemleri (Şekil 2.13), araştırmaların temel yapı taşlarını temsil etmektedir (Lei ve ark., 2022; Liu ve ark., 2022; Fulton ve Najahi-Missaoui, 2023; Torchilin ve Weissig, 2003; Tang ve ark., 2019).

Lipozom araştırmaları temel olarak tıbbi ve farmakolojik uygulamalara dayanmaktadır. Lipozomal taşıyıcı sistemleri, kanser önleyici kemoterapötikler, bakterisitler, fungusitler, hormonlar, enzimler ve genetik materyaller dahil olmak üzere çok çeşitli farklı maddelerin taşınmasında kapsamlı bir şekilde kullanılmaktadır (Lei ve ark., 2022; Lui ve ark., 2022). Ayrıca, aşı alanında (immünolojik adjuvanlar), kozmetik alanda (transdermal geçiş), genetik materyalin taşınmasında (gen terapisi) etkili adaylar olmaları nedeniyle son zamanlarda araştırmalarda büyük ilgi görmektedir. Terapötik amaçlara ek olarak lipozomlar, teşhis için görüntüleme araçları olarak da geniş çapta uygulanmaktadır. Lipozomların, bilgisayarlı tomografi (BT) ve manyetik rezonans (MR) gibi hastalıkların etkili bir şekilde taranması için görüntü bazlı teşhisin, hedef özgüllüğünü arttırması bakımından değerli araçlar olarak görülmektedir (Lei ve ark., 2022; Lui ve ark., 2022; Fulton ve Najahi-Missaoui, 2023).

2.1.10.2.4. Kanser Hedeflemede Lipozomlar

Günümüzde, çeşitli teknikler uygulanarak lipozomal nano taşıyıcı sistemler, birçok kanser tedavi metodlarında kullanılmaktadır. Doksorubisin, paklitaksel gibi antikanser ajanların lipozomlar yoluyla taşınması, kanser hücrelerine gelişmiş emilim ve daha fazla antikanser aktivite sergilenmesine neden olurken, normal hücrelerin toksik etkilerden korunması sağlanmış olmaktadır. İlk lipozomal antikanser ilacı olan Doxil®'in 1995'te FDA tarafından klinik olarak onaylanmasının ardından, lipozomlar önemli oranda kabul görmeye ve önde gelen ilaç dağıtım platformları olarak tanınmaya başlamıştır (Fulton ve Najahi-Missaoui, 2023; Lei ve ark., 2022; Lui ve ark., 2022).

Terapötik etkinin gerçekleşebilmesi için hedef hücredeki biyoyararlanım, ilacın lipozomlardan salınmasına ve hücreler tarafından daha fazla alınmasına bağlıdır. Çeşitli stratejiler, zarın bozulmasını ve dolayısıyla kargonun salınmasını tetikleyen spesifik uyaranlara dayanmaktadır. Bu stratejilerden biri olan pasif hedefleme, tümör dokularının geçirgen ve sızıntılı doğaları nedeniyle, 200 nm'den küçük NP'lerin artmış ekstravazasyon ve tutma etkisi yoluyla tümör dokusunda artan birikimlerinden faydalanılmaktadır. NP'lerin ERP etkisi de denilen tutma etkisi (EPR, Enhanced permeability retention: arttırılmış geçirgenlik ve alıkonma), tümör dokusunun oluşturduğu damarlanma yapısının artan damar geçirgenliği nedeniyle NP'lerin tümör hücrelerine, kolaylıkla pasif bir şekilde geçerek, tümör dokusunun düşük pH ortamında (pH ~ 6) ve endozomal giriş ile kanser hücrelerinin düşük pH'daki lizozom yapısında bozularak etken maddeyi teslim edebilmesini ifade etmektedir (Krasnici ve ark., 2003; Deshpande ve ark., 2013, Haley ve ark., 2008; Lei ve ark., 2022; Lui ve ark., 2022; Fulton ve Najahi-Missaoui, 2023).



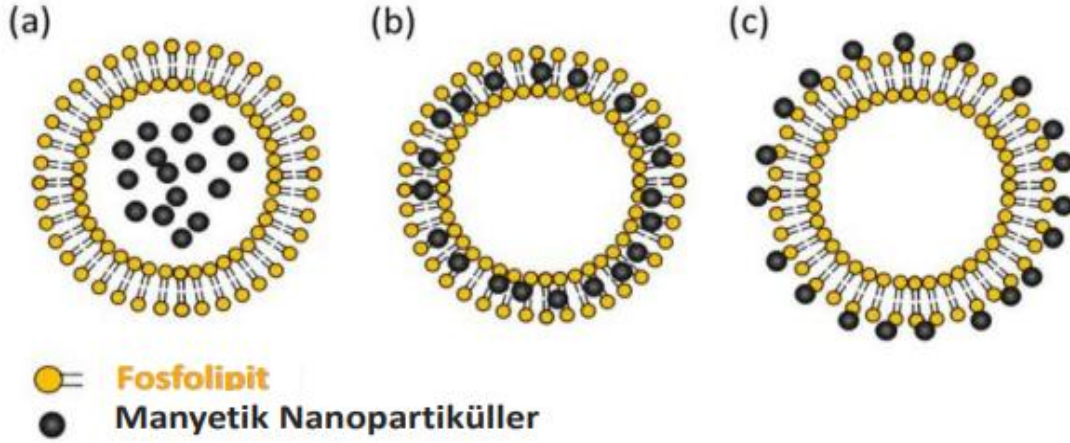
Şekil 2.17. EPR etkisi ile lipozomal pasif hedefleme (Fulton ve Najahi-Missaoui, 2023).

Pasif hedeflemenin yanı sıra, aktif hedeflemeye dayanan diğer metodolojiler, hedefe spesifik olarak bağlanmak ve spesifik olmayan etkileşimleri en aza indirmek için lipozom yüzeyinin modifikasyonunu ima etmektedir. Lipozomlara proteinler, peptidler,

polisakkaritler, glikolipitler, glikoproteinler, antikorlar ve ilaç ön molekülleri dahil olmak üzere, farklı hedef ligandları bağlanarak, lipid membranlarının işlevselleştirilebilmesini, biyodağılım modellerinin aktif olarak değiştirilebilmesini ve hücrel işelleştirmelerin geliştirilebilmesini sağlayan lipozomal modifikasyonlar, kanser araştırmalarında büyük avantajlar sunmaktadırlar (Liu ve ark., 2022; Lei ve ark., 2022; Fang ve ark., 2011; Maruyama, 2011; Fulton ve Najahi-Missaoui, 2023).

2.1.10.2.5. Metalik Lipozomlar

Manyetolipozomlar, ilk olarak De Cuyper ve arkadaşları tarafından 1988'de tanıtılmış ve laurik asit kaplı manyetik nanopartiküller, manyetoforez için lipozomların lipit çift katmanlarının içine dahil edildiği bildirilmiştir (Gluer ve ark., 2015; Tomitakaa ve ark., 2019). Manyetolipozomlar olarak bilinen, lipozomlar ve metalik nanopartiküllerin kombinasyonu ile oluşan hibrit bir sistem olup, tümöre özgü ligandlar, antikorlar, antikanser ilaçları ve görüntüleme problemleri de dahil olmak üzere çok sayıda fonksiyonel molekülle birleştirilerek nano ölçekli cihazların pratik tasarımına fırsatlar sağlamaktadır (Tomitakaa ve ark., 2019; Garcia-Ribeiro ve ark., 2018). 1988'den bu yana, ilaç dağıtımı, MRI görüntüleme ve hipertermi için geliştirildiği bildirilen manyetolipozomlar, manyetik nanopartiküllerin ve lipozomların işlevlerinin birlikteliği ile elde edilen çok yönlü, ilaç dağıtımı, manyetik görüntüleme, hipertermi ve düşük sıcaklıkla tetiklenen kontrollü salım özelliklerine sahip akıllı ilaç dağıtım sistemlerinin geliştirilmesine fırsat sağlanmıştır (Garcia-Ribeiro ve ark., 2018; Joneic ve ark., 2016; Garnier ve ark., 2012; Ito ve ark., 2007). Chitchrani ve ark., (2010), kanser hücrelerine 1,4 nm altın nanoparçacıkları iletmek için lipozomları bir "Truva atı" olarak kullanmışlardır. Amaçları, küçük nanopartiküller için enerji açısından elverişsiz endositoz sürecinin üstesinden gelmek olan araştırmacılar, fabrikasyon nanoyapıların alım ve hücre içi taşınmasının verimliliğini incelemişlerdir. Sonuç olarak, lipozom sistemi kullanılarak küçük metal NP'leri işelleştirmenin 1000 kat arttığı gözlenmiştir.



Şekil 2.18. Magnetolipozomların şematik şekli: (a)manyetik nanopartiküllerin iç kısımda sulu fazda taşınması, (b) manyetik nanopartiküllerin lipit katmanlara bağlı taşınımı, (c) manyetik nanopartiküllerin lipozom yüzeyinde taşınımı (Tomitakaa ve ark., 2019).

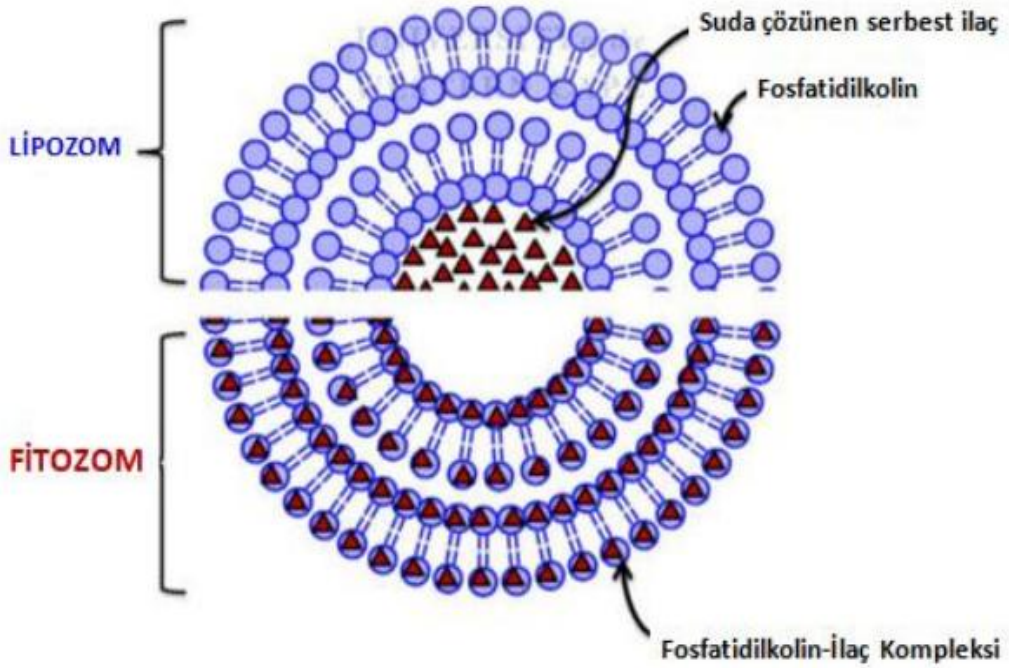
2.1.10.3. Fitozomlar

Hem bitkilerle hem de hücre benzeri yapılarla ilgili olduğunu ifade etmek amacıyla, "fito" ve "some" kelimeleri birleşerek (bazı literatürde "herbozom" olarak da geçer), "fitozom" terimi oluşturulmuştur. Indena şirketi (Milano, İtalya), 1980'lerin sonlarında, ilaçların biyoyararlılığını fosfolipitlerle kompleksleştirerek arttırmak amacıyla ilk fitozomları oluşturmuştur (Karpuz ve ark., 2020; Alharbi ve ark., 2021). Fitozomlarda bitki materyalleri, aktif farmasötik bileşenler olarak hizmet etmektedir ve bitkisel aktif bileşenlerin, dezavantajlarını ve olumsuz etkilerini ortadan kaldırmak, biyoyararlanımlarını, emilimlerini ve stabilitesini arttırmak için yeni geliştirilen, benzersiz özellikleri olan, veziküler ilaç dağıtım sistemleridir (Lu ve ark., 2019; Azeez ve ark., 2018).

Lipofilik bileşiklerin polar fonksiyonel grupları, hidrojen bağları ve polar etkileşim yoluyla fosfolipidlerin yüklü fosfat başlığı ile birleşerek bir misel düzenlemesi oluşturmakta ve bileşikler bu miseller içerisinde kapsüllenmektedir. Böylece, farklı fiziko-kimyasal ve spektroskopik özelliklere sahip fosfolipit-fitobileşik konjugatlarından oluşan bir nano dağıtım sistemleri olarak karşımıza çıkan fitozomlar, fitobileşenleri fosfolipitlere dahil edilme teknolojisidir (Karpuz ve ark., 2020; Vu ve ark., 2018). Fitozom teknolojisi, çoğu ilaç taşıyıcı preparattan daha basit, kolay,

ekonomik ve güvenli olmasının yanı sıra, biyoyumlu, biyobozunur, kontrollü salım yapabilen ve hedeflenebilen dağıtım sistemleri olarak, doğal ürünlerin uygulanabilir yenilikçi stratejilerinin geliştirilmesi için büyük avantajlara sahip yenilikçi bir sistemdir (Azeez ve ark., 2018; Vu ve ark., 2018). Günümüzde, fitozomlar, patentli bir teknik olup, farmakokinetik araştırmalarda çeşit bitkisel ekstraktların formülasyonunu geliştirmek için etkili bir şekilde kullanılmıştır (silybin, kurkumin, ginkgolidler gibi) (Mirzaei ve ark., 2017; Lu ve ark., 2019).

Aslında fitozomlar ve lipozomlar oldukça benzerdir. Lipozomlar, biyoaktif bileşikler ile kimyasal bir bağ oluşturmadan sadece taşıma amaçlı lipit yapıları iken; fitozomlar, biyoaktif bileşik moleküllerin kimyasal bağlar yoluyla fosfolipidlerin kutup başlarına sabitlendiği miselin ayrılmaz bir parçasını oluşturmaktadır. Lipozomlardaki aktif bileşenin boşlukta veya membran katmanlarında bulunan ortamda dağıtılması; fitozomlarda ise fitokimyasal moleküllerin hidrojen bağı ile stabil hale getirilmesi, lipozom ve fitozom arasındaki temel farkı oluşturmaktadır (Lu ve ark., 2019; Vu ve ark., 2018).

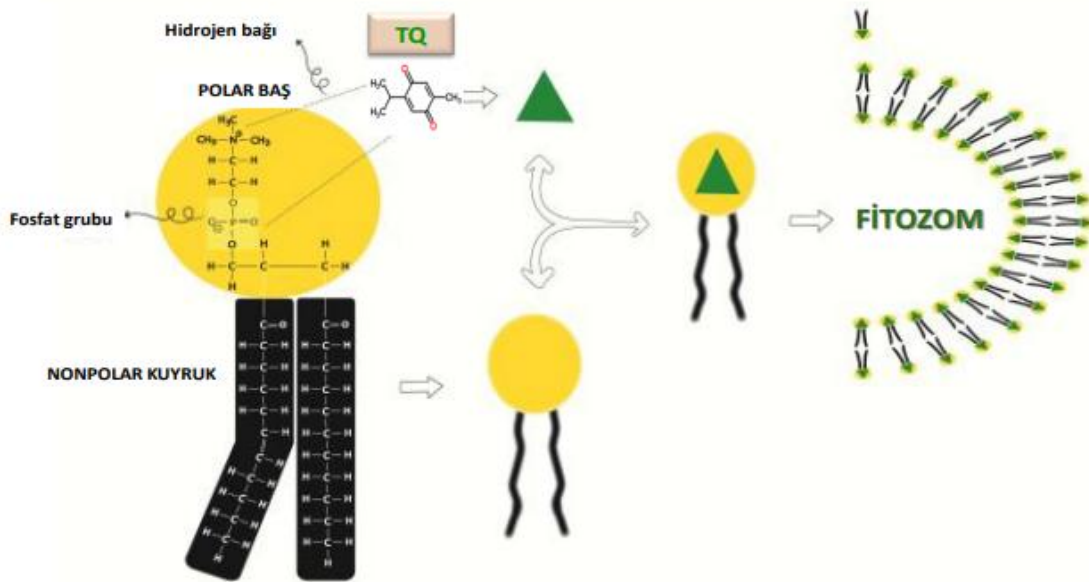


Şekil 2.19. Lipozom ve fitozom karşılaştırması (Singh ve ark., 2014).

2.1.10.3.1. Fitozomların Hazırlanması

Fito-fosfolipit komplekslerinin sentezi basittir, zor veya pahalı ekipman gerektirmez ve diğer kompleks türlerine göre daha üstün bir ilaç kompleksleşme oranına sahiptirler. Ek olarak fosfatidilkolin ve bitki ekstraktları arasındaki kimyasal bağların olması nedeniyle daha fazla stabilite sergilerler. Fitozomlar, biyoaktif fitobileşenlerin lipit açısından zengin biyozarları ve kan dolaşımından geçme yeteneğinin gelişmiş olması nedeniyle bariyerlerdeki zayıf biyoyararlanımlarının üstesinden gelmek için kullanılabilir, büyüyen nanoteknolojilerden biridir (Alharbi ve ark., 2021).

Fitozom kompleksleri oluşturmak için standartlaştırılmış bitki özleri, fosfolipidlerle stokiometrik etkileşimleri gerektirir. Molar oranlar 0,5 ile 3 arasında olabilir (fosfolipit: fitobileşenler). Ancak tercih edilen molar oran tipik olarak 1:1 olarak verilmiştir (Zadeh ve ark., 2018). Biyoaktif bileşenleri çözmek için aprotik çözücüler olarak dioksan, aseton, metilen klorür, tetrahidrofuran veya etil asetat kullanılır. Ek olarak, biyoaktif bileşenlerin çözündürülmesi için n-heksan gibi çeşitli aprotik çözücüler, başlangıç çözücüsü için kullanılabilir (Karpuz ve ark., 2020). Çözücü, aktif bileşenlerin stokiometrik oranı, reaksiyon sıcaklığı ve reaksiyon süresi, fito-fosfolipit komplekslerinin oluşumunu etkileyen başlıca değişkenlerdir (Lu ve ark., 2019).



Şekil 2.20. Fitozomda fito-fosfolipit komplekslerinin oluşum mekanizması (Barani ve ark., 2021).

Fosfolipit kompleksleri yapmak için günümüzde birçok teknik geliştirilse de yaygın olarak çözücünün vakum altında buharlaştırılarak fito-fosfolipit kompleksi içeren ince film tabaka elde edilmesi yöntemi, geleneksel ve en çok kullanılan yöntemdir.

Hazırlama süreci beş temel adımı içerir (Zadeh ve ark., 2018) (Şekil 2.).

- 1- Biyomateryallerin karıştırılması, fosfolipidler inorganik solventte karıştırılması,
- 2- Karışımların biraraya getirilerek berrak bir homojen çözeltisinin yapılması,
- 3- Solventin buharlaştırılması ve ince bir film tabaka oluşturulması,
- 4- Karışımın sulandırılması ve
- 5- Karışımın sonikasyona tabi tutulması.

Günümüzde fitozomların kanser için veziküler ilaç dağıtım sistemi olarak kullanılması gittikçe artmaktadır (Lu ve ark., 2019). Zhenqing Hou ve arkadaşlar, solvent buharlaştırma yöntemiyle mitomisin C (MMC) soya fasulyesi fosfatidilkolin kompleksi ile yüklü fitozomlar geliştirmişlerdir. Bunun içinde 12,5 mL tetrahidrofur (THF), 10 mg MMC tozu ve 30 mg soya fasulyesi fosfatidilkolin (SPC) birlikte çözmüşler ve elde edilen çözelti daha sonra bir su içinde 4 saat kuvvetli bir şekilde karıştırarak bir cam basınçlı kaba aktarmışlar (Paiva-Santos ve ark., 2021; Barani ve ark., 2021). Alhakamy ve arkadaşları (2020), geri akışta anti-çözücü çökeltme yoluyla icariin (ICA) fitozomunu formüle etmek için kullandılar. Deneyde, ICA (27 mg) ve Phospholipon® 90H (32, 64 veya 96 mg), diklorometan (20 mL) içerisinde çözülmüş ve çözeltinin deney tasarımında belirtilen sıcaklıkta ve süre boyunca geri akışla yaklaşık 5 mL'lik bir konsantre üretilmiş. Fitozomal kompleks, konsantrenin 72 saat boyunca liyofilize edilmesiyle elde edilmiştir

2.1.10.3.2. Kanser Hedeflemede Fitozomlar

Başlangıçta kozmetikte kullanılan fitozomlar, kalp hastalığı, osteoartrit ve romatizmal iltihaplanmalar ve karaciğeri etkileyen diğer hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Doğal ve sentetik antikanser ajanlarının nanofitozomlara dahil edilmesinin, biyoyararlanımı önemli ölçüde artırdığı ve tümör büyümesini yavaşlattığı ortaya çıkarılmıştır. Böylece, bitki kiyasallarının kanser tedavisinde kullanılabilirliğinin sağlanması, çağdaş ilaç hedefleme yaklaşımlarında bitkisel ilaçların önemini yeniden

ortya çıkarması yönünden çok önemlidir (Kumar ve ark., 2020). Fitozomların diğer fitokimyasallarla kombinasyon halinde kullanılması veya bir nanokesecek içinde bir ilaç ve bir fitokimyasalın kombinasyonunun kullanılması, sinerjistik etki bakımından daha uyarıcı olabileceği vurgulanmaktadır. Fito-fosfolipid kompleksleri, kanser tedavisinde pasif hedeflemenin yanı sıra hücre sel yapılar a belirli ligandları ve antijenleri bağlayarak aktif hedefleme için de etkili adaylar haline getirilebilmektedir. Ayrıca, en yüksek düzeyde hapsetme verimliliğine ve en iyi ilaç salım profiline ulaşmak için, fosfolipitli ilaç adaylarının molar oranlarının yanı sıra sıcaklık ve diğer değişkenlere dikkat edilmesi gerekmektedir. Süperkritik akışkan sistemleri gibi daha yeni yöntemler kullanılarak ve sıcaklık, basınç ve diğer bazı faktörler optimize edilerek ürünün boyutu değiştirilebilmektedir. Geliştirilmiş penetrasyonları ve artan tutulmaları nedeniyle, bu tür boyut kontrollü ürün, kanser tedavi alanında daha spesifik olarak hedeflenmesinde faydalı olmaktadır (Kumar ve ark., 2020; Lu ve ark., 2019; Karpuz ve ark., 2020).

Alhakamy ve ark. (2020), TQ yüklü soya fosfolipit fitozomları geliştirdi ve bunların insan akciğer kanseri hücrelerine karşı antikanser aktivitelerini gösterdiğini ve TQ'u taşımak için, bu fitozomal nanotaşıyıcı sistemlerin avantajını bildirdiler. Ayrıca diğer araştırmalar, kuersetinin anti-solvent çökmesi tekniği ile sentezledikleri fitozomal formülasyonunun meme kanserini (MCF-7) tedavi etme potansiyeline sahiptir olduğu (Alhakamy ve ark., 2022), döner buharlaştırma tekniği ile kurkumin yüklü fitozomların ilaç salınımını etkili bir şekilde kontrol etme kapasitesine sahip olduğu da bildirilmiştir (Sachin ve ark., 2019). Bununla birlikte fitozom teknolojisi, hem pasif hem de aktif ilaçları hedef alan ilaç verme kabiliyeti nedeniyle ilaç endüstrisinde büyümektedir. (Lu ve ark., 2019; Vu ve ark., 2018).

Fitozom içeren formülasyonlar, antiinflamatuar, antioksidan ve nöroprotektif özellikler gibi önemli farmakolojik faydalara sahiptir ve birçok tümör tipinin tedavisinde antikanser ajanı olarak çalışılmıştır (Karpuz ve ark., 2020). Geleneksel kemoterapinin zararlı etkilerini azaltmak ve farmakolojik etkilerini arttırmak için bitkisel bitki ekstraktından elde edilen fitokimyasalların fosfolipitlerden oluşan bir taşıyıcıyla birleştirilmesiyle yeni bir kanser tedavi yaklaşımı gelişmektedir. Vesiküler ilaç dağıtım sistemleri genel olarak bağışıklık sisteminden kaçarak ilaç taşıyıcılarını pasif olarak hedef alırlar. (Lu ve ark., 2019). Bununla birlikte, tümör terapisi durumunda, moleküler ağırlığı 40 kDa'dan büyük ve nano-metrik boyut aralığı 100-1200 nm olan fitozomlar,

artan geçirgenlik ve tutulma nedeniyle aktif olarak tümör hücrelerini hedefler. Pasif hedefleme, ilacın biyoyararlanımını artırırken, aktif hedefleme, ilaçları özellikle etki alanına iletir. Bu stratejiler biyoaktif bileşikleri sağlamak için fitozomlarda birleştirilir (Azeez ve ark., 2018). Ayrıca, günümüzde çevre dostu formülasyon arayışında en çok ilgi çeken metodlardan biri ise, yeşil metod olup, bitki bazlı metalik NP sentezi için kullanılmaktadır.

2.1.10.4. Demir Nanopartiküller ve Yeşil Sentez

Manyetik NP'ler, özellikle demir oksit NP'lerinin (Fe_3O_4 ve $\gamma-Fe_2O_3$), stabilite, biyoyumumlulukları ve mükemmel manyetik özellikleri nedeniyle biyomedikal uygulamalar için büyük yetenek sergilemektedir (Herlekar ve ark., 2014; Guo ve ark., 2012). Eşsiz kimyasal, fiziksel ve mekanik özellikleri nedeniyle demir oksit NP'leri (IONP'ler), farklı biyolojik amaçlar için kullanılan en bilinen/belirgin metalik NP'lerdir. IONP'ler, ilaç dağıtım stratejileri, manyetik hipertermi uygulamaları, foto-termal tedavi ve manyetik rezonans görüntüleme (MRI) için kontrast madde olarak ve hedefe yönelik olarak yaygın kullanılmaktadır. Demir oksit NP'leri, ROS'un oluşmasına yol açan tehlikeli uyaranlar tarafından kolayca emilen zararsız dalga boyunda radyasyon yayarak hem doğrudan hem de dolaylı olarak antikanser aktivite sergilemektedir (Sun ve ark., 2021; Anjum ve ark., 2021).

Demir bazlı NP'ler, demir salabilmekte ve endositozdan sonra lizozomdaki demiri serbest bırakabilmektedir. Bu ise, Fenton reaksiyonu ile ROS üretimini ve lipid peroksidasyonunu indüklemeye yolu ile ferroptozu teşvik etmektedir. Kanser hücrelerindeki demir içeriği normal hücrelerdekinden çok daha yüksek olması nedeniyle hücre içi daha yüksek ROS seviyelerine sahiptir ve redoks dengesi daha kırılgandır. Bu nedenle, demir NP'ler, artan demir sonucu Fenton reaksiyonu ile ROS üretimini yükseltebilmeleri nedeniyle ferroptozu indükleyebilmektedir (Cao ve Dixon, 2016). Ayrıca, hipoksik durumdaki zayıf perfüzyon ve artan anaerobik glikoliz nedeniyle çoğu tümör hücresindeki pH normal hücreye göre daha asidiktir. Önceki çalışmalar, insan ve hayvan tümörlerinde 6.0'a yaklaşan hücre dışı pH değerlerinin olduğunu bildirmektedir. Bundan dolayı, demir bazlı NP'ler tümör bölgesinde Fe iyonlarını tümörün hafif asidik mikroçevresinde, normal dokuya göre daha belirgin bir şekilde serbest bırakabileceği ve tümör hücresinde ferroptozu indükleyebileceği ön görülmektedir (Niu ve ark., 2018).

Ayrıca, anjiyogenez ile üretilen tümörlerin kan damarları, her zaman zayıf ve yüksek fenestrasyonlara sahip olması nedeniyle, dolaşım sırasında NP'lerin tümörde birikmesine izin vermektedir. Demir içeren nanotaşıyıcıların EPR etkisi gibi zayıf hedeflemeler ile tümörde birikimi mümkün olabilmektedir (Farokhi ve ark., 2019). NP'lerin uzun dolaşım ve KBB'ini aşabilmeleri için ideal çapın 30 nm ile 200 nm arasında olduğu da bildirilmektedir (Jain ve Stylianopoulos, 2010). Demir oksit NP'lerinin ortalama boyutu 66 nm kadar olup, yaklaşık 10 nm ile 120 nm arasında değişmektedir. Biyotıp, tarım ve çevre gibi yaşam bilimleri alanlarında demir oksit çok büyük bir potansiyele sahiptir. Nanometre boyutunda kuantum noktaları, manganez fosfat NP'leri, asil metaller, karbon nanotüpleri, silika NP'leri ve manyetik NP'ler, inorganik NP'lerin birkaç örneğidir. (Sun ve ark., 2021; Anjum ve ark., 2021).

IONP'lerle ilgili, sınırlı stabilite, parçacık toplanması, hızlı bozulma ve manyetik özellik değişikliklerini içeren çeşitli sorunlar vardır. Zeta potansiyeli, NP süspansiyonlarının stabilitesini değerlendirmek için kullanılır. Süspansiyondaki tüm parçacıkların büyük negatif veya pozitif zeta potansiyeli varsa, birbirlerini itme eğiliminde olacaklar ve parçacıkların bir araya gelme eğilimi olmayacaktır. -5 mV ile +5 mV aralığındaki değerler, hızlı toplanma anlamına gelmektedir (Ostolska ve Wiśniewska, 2014).

Yeşil kimyaya yönelik yeni ve sürdürülebilir bir yaklaşım geliştirmek için bitki ekstraktları kullanılarak demir NP'lerinin (FeNP'ler) sentezi artık büyük ilgi görmektedir. FeNP'lerinin kimyasal sentezi genellikle yüksek sıcaklıklarda ve korumalı atmosfer altında yapılmaktadır (Ebrahimezhad ve ark., 2014a). Oysaki bu yöntemde kimyasal bileşikler ve organik çözücüler sırasıyla fitokimyasallar ve sulu matrislerle değiştirilmektedir. Son zamanlarda nano yapılar çeşitli bilim ve teknolojilerde uygulama alanı kazanmıştır (Ebrahimezhad ve ark., 2014a; Reguyal ve ark., 2017) FeNP'leri, yüksek katalitik aktivite, yüksek manyetizma, düşük toksisite ve mikrodalga absorbe etme yeteneği gibi benzersiz fizikokimyasal özelliklerinden dolayı en ilginç yeni malzemeler arasındadır (Herlekar ve ark., 2014; Huber, 2005; Guo ve ark., 2012).

Bu parçacıklar, ilaç dağıtımını (Yang ve ark., 2008), manyetik hedefleme (Ebrahimi ve ark., 2016), hipertermi (Laurent ve ark., 2011), termal ablasyon (Hilger ve ark., 2002), kök hücre sınıflandırma ve manipülasyonu (Pan ve ark., 2012), gen terapisi (Dobson, 2006), negatif MRI kontrast güçlendirmesi (Lee ve Hyeon, 2012), gıdanın korunması

(Busulo ve Lagaron, 2012), biyoproses yoğunlaştırılması (Ebrahiminezhad ve ark., 2015), antimikrobiyal ajanlar (Ebrahiminezhad ve ark., 2015), biyolojik ayırma (Yang ve ark., 2004), çevresel iyileştirme (Reguyal ve ark., 2017) dahil olmak üzere geniş bir uygulama yelpazesini kapsamaktadır. Günümüze kadar FeNP'lerin üretimi için farklı fiziksel ve kimyasal prosesler geliştirilmiştir. Bu işlemler, yukarıdan aşağıya ve aşağıdan yukarıya yöntemleri içeren iki genel tekniğe ayrılır. Yukarıdan aşağıya yöntemlerde, dağlama, lazer ablasyon, mekanik frezeleme ve püskürtme yöntemleri yer almaktadır. Her ne kadar bu yaklaşımlar saf ve iyi türde nanoparçacıkları başarılı bir şekilde üretebilse de, ekonomik olarak sürdürülebilir değildirler ve genellikle kapsamlı ekipman kullanımı gerektirirler (Panigrahi ve ark., 2004).

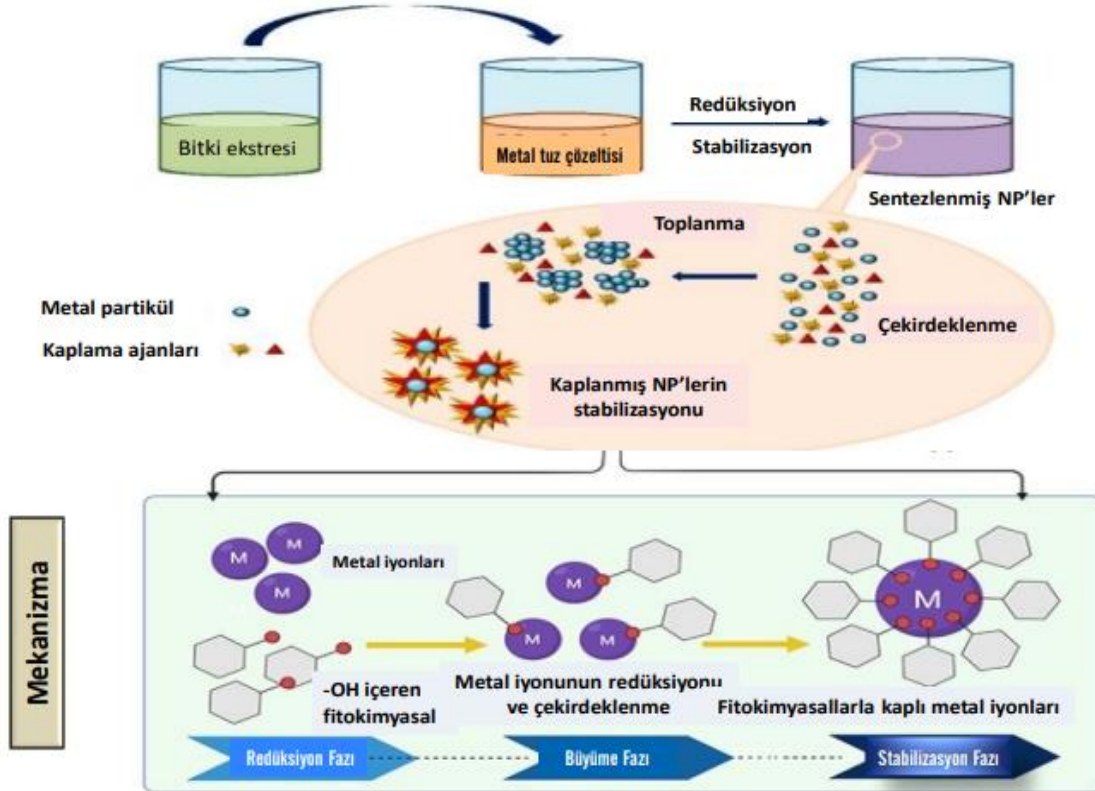
Bugüne kadar birçok araştırmacı, bitkiler (Mahakham ve ark., 2016) algler ve farklı mikroorganizmalar (maya, mantarlar, diatomlar ve bakteriler) (Herlekar ve ark., 2014) dahil olmak üzere biyolojik sistemler kullanılarak FeNP'lerin sentezini bildirmişlerdir. Geliştirilen biyolojik sistemler arasında bitki aracılı sentez, önemli bir bilimsel ilgi çekmektedir (Mahakham ve ark., 2016). Ancak canlı bitkilerin FeNP üretiminde kullanılması, üretilen NP'lerin boyut ve şeklinin heterojen olması gibi büyük dezavantajlara sahiptir. Öte yandan, FeNP'lerin bitki gövdesinden izolasyonu zor ve meşakkatli bir prosedürdür ve sonuçta düşük geri kazanım ve saflık ile sonuçlanır (Herlekar ve ark., 2014).

Aşağıdan yukarıya yaklaşımlarda, NP'leri üretmek için katı, sıvı veya gaz fazlarında metal öncüleri (yani metal iyonları) kullanılır. Bu prosedürler aerosol prosesi, atomik yoğunlaşma, sol jel fazları, buhar biriktirme, termal ayrışma, birlikte çöktürme ve yeşil sentez yoluyla gerçekleştirilebilir (Hoeppener ve ark., 2002).

Herhangi bir kimyasal ve biyokimyasal reaksiyona benzer şekilde reaksiyon sıcaklığı, demir öncülünün konsantrasyonu, yaprak ekstraktının konsantrasyonu ve reaksiyon süresi gibi faktörlerin reaksiyon verimi üzerinde kritik etkileri vardır. Artık meyve ekstreleri, tohum tozu ekstreleri, tohum eksüdası, kabuk ekstreleri, kepek ekstreleri, ağaç kabuğu ekstreleri ve çoğunlukla yaprak ekstreleri gibi bitkilerin çeşitli kısımlarının ekstreleri NP'lerin yeşil sentezi için kullanılmaktadır (Kozma ve ark., 2015). Ekstreler, çok adımlı sentez uygulama sorunlarını ve kimyasal reaktiflerin maliyetlerini ortadan kaldıran, tek kaptaki sentez reaksiyonunda ajanı indirgemek ve kapatmak için doğal bir

kaynak olarak kullanılmaktadır (Ebrahiminezhad ve ark., 2014b). Bilim adamları genellikle üretim maliyetlerini azaltmak amacıyla endüstriyel yeşil sentez reaksiyonları için hammadde olarak otlar ve ağaçlar gibi gıda dışı kaynaklardan elde edilen ekstreleri kullanmaya çalışmaktadırlar. Ayrıca tekno-ekonomik fırsatları arttırmak amacıyla yeşil sentez reaksiyonları genellikle ortam sıcaklığı ve atmosferde yapılmaktadır (Ebrahiminezhad ve ark., 2016).

Bu üretim tekniğinde, demir öncüsü olarak çeşitli demir tuzlarından birinin [Örneğin, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, FeSO_4 veya $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$] ve ekstre olarak genellikle bitki ekstrelerinin bir karışımını içermektedir. Reaksiyon genellikle oda sıcaklığında, kendiliğinden meydana gelmektedir. Reaksiyon hızı hızlıdır ve genellikle birkaç dakika içinde tamamlanır. Bitki ekstrelerindeki fitokimyasallar, demir iyonlarını basitçe FeNP'lere dönüştürür. Bu biyomoleküller, biyosentez reaksiyonunda indirgeyici ve stabilize edici maddeler olarak görev yapabilen çeşitli suda çözünür metabolitleri (örneğin, polifenoller, şekerler, alkaloidler, fenolik asitler ve proteinler) ve koenzimleri içermektedir (Jassal ve ark., 2016).



Şekil 2.21. Yeşil metod ve mekanizması (Khan ve ark., 2022).

“Fitosentez” olarak da bilinen yeşil-sentez, kolay, ucuz, güvenli, çevre dostu, tek adımda basit, hızlı ve etkili uygulama ile boyut ve şekilleri daha kontrollü ve daha kararlı NP’lerin hazırlanması gibi birçok avantajları bulunmaktadır. Yeşil biyosentez metodu ile bitki ekstraktlarından metalik NP’lerin biyosentezi, üç süreç aşamasında gerçekleşmektedir (Şekil 2.21) (Singh ve Dutta ve ark., 2018).

Redüksiyon (Aktivasyon) aşaması: Metal tuzlarının (iyonlarının) redüksiyon fazında, indirgenmiş metal iyonları nötral atomlar haline dönüştürüldüğü süreçtir.

Büyüme aşaması: Oluşan nötral atom çekirdeklerinin, “Ostwald olgunlaşması” olarak da bilinen (Lochhead, 2017), metal atomlarının toplanarak, agregatlar oluşturduğu ve daha büyük parçacıklar üzerinde birikmesiyle daha kararlı yapılara dönüştüğü bir fazdır.

Stabilizasyon aşaması: NP’lerin bitki özütleri ile kaplanarak sonlandığı süreçtir.

FeNP’ler üç ana gruba ayrılabilir. Bunlar; (1) demir oksit NP’leri (ION’ler) (yani manyetit; Fe_3O_4 , hematit: $\alpha-Fe_2O_3$, maghemit; $\gamma-Fe_2O_3$), (2) demir oksit hidroksit ($FeOOH$) NP’leri ve (3) sıfır değerlikli demir (ZVI) nanoparçacıklarıdır (Babay ve ark., 2015; Yang ve ark., 2008). Reaksiyon koşulları (örn. sıcaklık, demir öncülünün konsantrasyonu, bitki ekstresi miktarı ve zaman) ve bitki ekstresinin kimyasal özellikleri (Örn. hazırlama sıcaklığı, konsantrasyon, pH ve fitokimyasal moleküller) fizikokimyasal özellikler üzerinde önemli etkilere sahiptir ve sıfır değerlikli (ZVI), ferro ferrik oksit (Fe_3O_4), ferrik oksit (Fe_2O_3), demir oksit hidroksit ($FeOOH$) ve demir mineral kompleksi NP’lerini içeren çeşitli FeNP’ler bu sentez yaklaşımı kullanılarak üretilmektedir (Jassal ve ark., 2016). FeNP’lerin bitki aracılı sentezi, bitki ekstresinin hazırlanmasını ve kontrollü durumda sulu demir iyonu çözeltilerine karıştırılmasını içeren tek adımlı bir yöntemdir (Makarov ve ark., 2014). Kısmen yeşil yöntem olarak kabul edilen bu teknikte, kimyasal ve biyolojik indirgeyici ajanların kombinasyonu ile NP’ler üretildiğinden, kimyasal sentez yollarına göre daha az toksik ve daha uygun maliyetlidir (Kozma ve ark., 2015).

Birçok yazar, yarı yeşil sentez yöntemleri yoluyla demir nanoparçacıklarının oluşumunu bildirmiştir. Yapılan bir çalışmada, *Mimosa pudica* kökü ekstresinin demir sülfat ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) çözeltilisine ve NaOH’ye maruz bırakılması, metal iyonlarının hızlı bir

şekilde azalmasına (reaksiyon 60 °C'de 20 dk sonra tamamlanır) ve süperparamanyetik INP'lerin oluşumuna neden olduğu ve solüsyonun pH'ı NaOH ile 9'a ayarlanmasının, ION'ların süperparamanyetik davranışının artırılmasıyla sonuçlandığı bildirilmiştir (Niraimathee ve ark., 2016). *P. tripartita* meyvelerinin metanolik ekstresi kullanılarak INP'lerin yarı yeşil sentezi Kumar ve arkadaşları (2014), tarafından denenmiştir. 0,1 M NaOH ve 1 mM demir (III) klorür kullanılarak 80 °C'de dört saatlik inkübasyonun ardından Fe₃O₄ NP'lerinin oluştuğunu tespit etmişlerdir. Manyetit NP'leri, onları biyoteknolojik, biyomedikal ve çevresel iyileştirme için ideal bir aday haline getiren benzersiz ve kullanışlı manyetik özellikler sergilemektedir. Fe₃O₄ parçacıklarının boyut dağılımları, şekli ve biyouyumluluğu tıbbi uygulamalar için büyük önem taşımaktadır. Çeşitli bitkilerin ekstreleri, sulu bir demir iyonu çözeltisinden manyetit NP'leri üretebilmektedir (Reguyal ve ark., 2017).

Wang ve arkadaşları (2013), ilk kez demir-polifenol kompleksi NP'lerinin oluşumunu bildirmişlerdir. Ortam koşullarında sulu çözeltide Fe-polifenol NP'leri üretmek için Okalipütüs yaprakları ekstrelerini kullanmışlardır. Okalipütüs yaprakları ekstrelerinin redoks potansiyeli ölçülmüş ve + 0,4 V'de geniş bir zirve göstermiştir. Bu, Fe⁺³'ün sulu yaprak ekstresi ile Fe⁺²'ye indirgenebileceğini ima ettiğini bildirmişlerdir. Ancak yaprak ekstresi yoluyla Fe⁺²'nin ZVI'ya indirgenmesi zor bir işlem olduğu için Fe⁺²-polifenol kompleksleri, genellikle "otoksidasyon" olarak adlandırılan bir süreçte oluşturulmuştur.

Yapılan bazı çalışmalarda, TQ ile hazırlanan demir NP'lerinin antikanser etkinliklerinin araştırıldığı görülmektedir. Literatürdeki bu verilere bakılacak olursa, yapılan bir çalışmada, demir oksit NP'lerinin kanser ve diğer birçok tedavi için nanotaşıyıcılar olarak potansiyel biyomedikal uygulamalarının yanı sıra minimal toksisite göstermesi nedeniyle, Fe₃O₄ NP'leri üzerine yüklenen bitkisel antikanser ajanı TQ'un yüklü olduğu Polivinilpirolidon (PVP)'lanmış Fe₃O₄ manyetik nanopartiküllerin (TQPVP-Fe₃O₄ NP'ler) oluşturularak üçlü negatif meme kanseri (TNBC) (MDA-MB-231) hücrelerine karşı etkinliğini araştırmak için sitotoksosite, apoptoz indüksiyonu, ROS üretimindeki değişiklikleri içeren antikanser potansiyeli değerlendirilmiştir. TQ-PVP- Fe₃O₄ NP ile tedavi edilen hücrelerin ROS seviyelerini etkili bir şekilde artırılarak hücre ölümünü indüklemek için hücre ortamında pH'a bağlı ilaç salınımı sergilediği gösterilmiştir. Dolayısıyla hazırlanan TQ-PVP- Fe₃O₄ NP'leri antikanser tedavisi için uygun bir ilaç formülasyonu olabileceği sonucuna varılmıştır (Kumar ve ark., 2020).

2.1.11. Tezin Amacı ve Hedefleri

Yukarıda verilen genel bilgilerden anlaşılacağı üzere, GB kanser hücrelerinde direnç gelişimini engelleyen, KBB'yi sorununu çözümlleyen ve normal sağlıklı hücrelere toksik etkilerin en aza indirildiği seçici toksik etkili, daha etkin tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu hedef doğrultusunda, demirin kanser üzerindeki etkileri nedeniyle, demir modülasyonu için sentezlenen TQ-bazlı NP'lerin, GB hücrelerinin demir fonksiyonuna olan etkilerinin incelenmesi bu tezin amacını oluşturmaktadır.

Bu amaçla, şelatlama özelliğini incelemek için TQ baz alınarak ilk defa bu çalışmada sentezlenen Mag NP'leri demir işlevini arttırma yönünden, yine TQ baz alınarak literatüre göre sentezlenen Fit NP'leri ise demir işlevini azaltma yönünden, birbirlerine zıt etkili görevlerle, GB hücrelerinde demir fonksiyonuna olan etkileri incelenmiştir. Böylece, bilime katkı sağlamak amacıyla bir ön çalışma niteliğinde olan bu araştırmada, kanser hücrelerinin demir fonksiyonu üzerinde etkili olabilecek, tamamen doğal, yeni bir nanopartiküler hedefleme sunulmuştur.

Bu tez çalışmasının hedefleri aşağıda kısaca özetlenmiştir (çalışmanın metod planı Şekil 3.2'de akış şeması şeklinde özetlenmiştir);

- TQ-Fe NP'lerinin yeşil sentezle hazırlanması ve Mag NP'lerinin oluşumunda etken madde olarak kullanılması,
- TQ-Fe NP'lerini soya fasülyesi fosfatidilkolinine (SPC) bağlanmak suretiyle TQ-bazlı Mag NP'lerinin ilk sentezinin tarafımızdan yapılması,
- TQ-bazlı Fit NP'lerinin literatüre göre fitozom teknolojisiyle hazırlanması,
- TQ'un karakteristik dalga boyu Uv-Vis spektrofotometre ile; TQ-Fe, Mag ve Fit NP'lerinin, morfoloji (boyut ve şekil) ve dağılımları STEM ile; elementel yapıları SEM-EDX ile; fonksiyonel bant ve grupları, FTIR spektroskopisi ile; çapları, dağılımları (DLS) ve yüzey yükleri (zeta potansiyel) ise Zetasizer cihazı ile belirlenerek, partiküllerin karakterizasyonlarının yapılması ve nano yapılarının teyid edilmesi,
- Mag ve Fit NP'lerinin stabilite ve *in vivo* salım özelliklerinin belirlenmesi,

- TQ-Fe, Mag ve Fit NP'lerinin, U87-MG GB hücre hattı üzerinde *in vitro* olarak, hücre canlılığının, MTS Deneyi ile; apoptoz etkinliği, 7- FITC/Annexin V Apoptoz Tespit Deneyi ile; serbest radikal seviyesi, Reaktif Oksijen Türleri (ROS) Tespit Deneyi ile ve lipit peroksidasyon düzeyi, MDA Ölçüm Deneyi ile test edilerek belirlenmesi, istatistiksel olarak değerlendirilerek yorumlanması,
- TQ-Fe, Mag ve Fit NP'lerinin, GB hücrelerinde demir şelatlama aktivitesi Ferrozin Deneyi ile incelenerek, istatistiksel olarak değerlendirilip yorumlanması,
- Mag NP'lerinin Fit NP'leri ile istatistiksel olarak karşılaştırılmasının yapılması; TQ-Fe NP'lerinin ise sadece Mag NP'lerini teyit amacı için kullanılması, bu tezin hedeflerini oluşturmaktadır.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Materyal

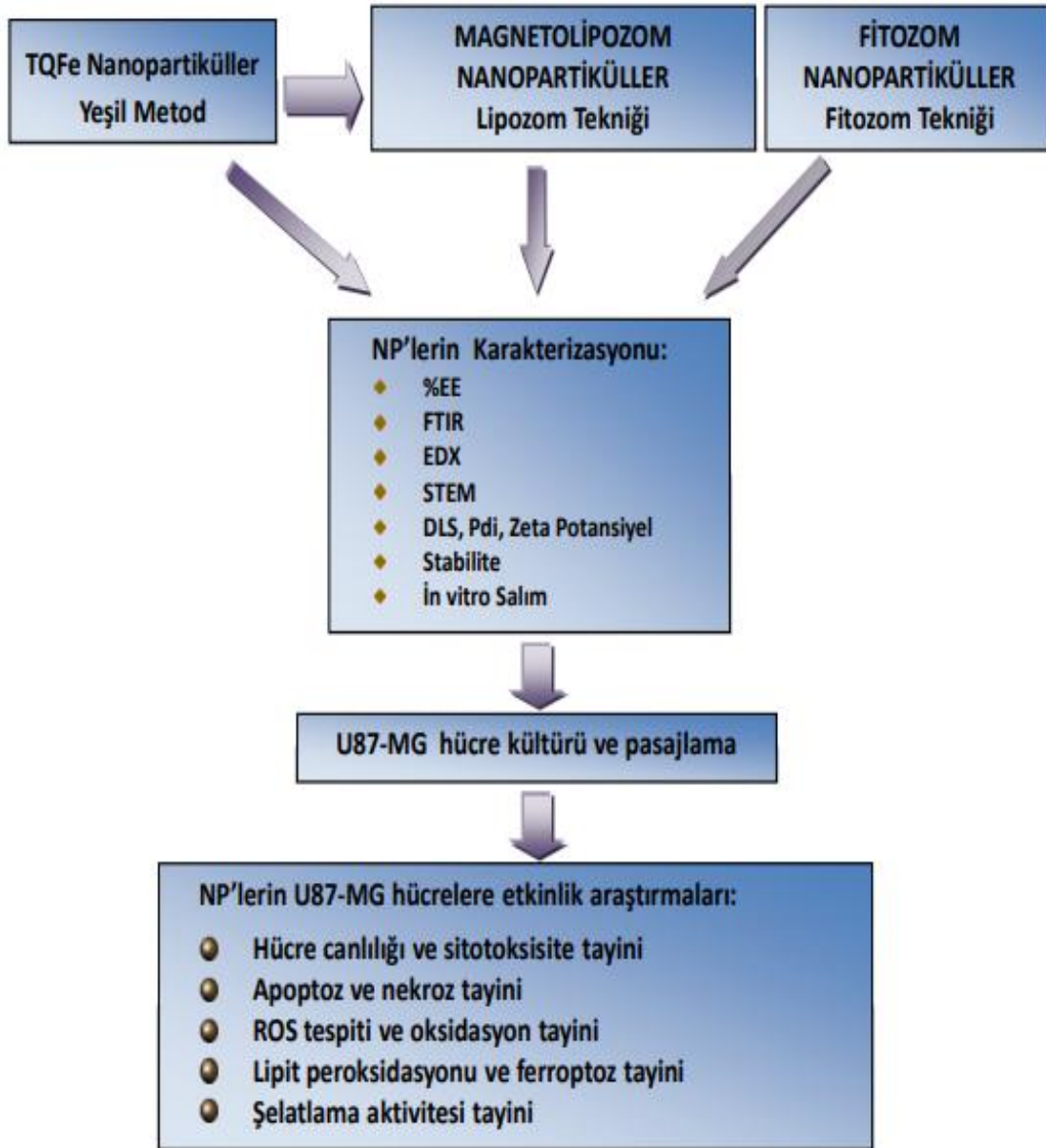
3.1.1. Kimyasal ve Biyokimyasal Malzemeler

Thymoquinone (Cayman), Phosphatidylcholine (Lecithin) (Sigma), MTS Kit (Sigma), 7- FITC Annexin V Apoptoz Tespit Kit (BioLegend 640922), Lipid Peroksidasyon-MDA Ölçüm kiti (Elabscience), Reactive Oxygen Species (ROS) Detection Assay Kit (Elabscience), Ferrozin (Sigma), FeCl₃ (Merk), FeCl₂ (Merk), U87-MG glioblastoma hücre hattı (Genkök-Kayseri), DMEM Besiyeri (Sigma), L-Glutamin (Biochrom K0282), FeCl₃ (Merk), Penisilin/Streptomisin (Biochrom A213), Steril PBS (Ca⁺² ve Mg⁺² içermeyen) (SigmaAldrich), Fetal dana serumu (Biochrom S0113), DiMetil Sülfoksit (Aplchem A3670), Diyaliz selüloz membran 12 KDa MWCO (Sigma), Dichloromethane (Merk), Deionize edilmiş H₂O (Merk), NaOH (1 N) (Sigma), Etanol (Sigma), Metanol (Sigma).

3.1.2. Kullanılan Cihaz ve Gereçler

Sonikatör (Ultrasonik Banyo) (Bandelin Sonorex), Hot&Stirrer (MS300HS), Hassas Terazi (Ohaus), PH Metre (Starter 3100), Vorteks (Biovortex), Termal Çalkalayıcı İnkübatör (FinePCR), UV Spektrometreler (Shimadzu UV-1601) (Agilent 8453) (Bio-Tek), Rotavapor (Heidolph), CO₂ İnkübatörü (Nüve FN500), Otomatik çalkalayıcı (Lab-line), Hücre Sayma Kamarası (Hycor), Akım Sitometri Cihazı (BD Accuri C6), Soğutmalı Santrifüj (2.0 RS Biofuge stratos, Heraeus), Laminar Air Flow (Nüve), Inver Mikroskop (Olympus), Işık Mikroskobu (Nikon E400), Taramalı Geçirimli Elektron Mikroskobu (STEM) (ZEISS – Gemini 500), EDX (ZEISS – EVO LS10), Zeta Sizer (Malvern Nano – ZS90), FT-IR Spektrometre (Perkin Elmer - 400), Buzdolabı (4°C) (Arçelik), Motorlu Pipet (Isalab), Nukleopor polikarbonat membran filtre (0.1, 0.2, 0.3 , 0.4 ve 0.8 µm) (Whatman), Rotavapor (Heidolph), 25/75 cm² hücre kültür Flaskları (Biofil CFT 025/075), Pipet Uçları (mavi ve sarı) (Barrier100), Steril Pipetler (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml) (Greiner), Ependorf tüpleri (2mL) (Greiner), 50 ml vida kapaklı Konik Tüp (Falkon), 15 ml vida kapaklı Konik Tüp (Falkon).

3.2. Metot



Şekil 3.1. Tez akış şeması.

3.2.1. Nanopartikülleri Sentezleme Çalışmaları

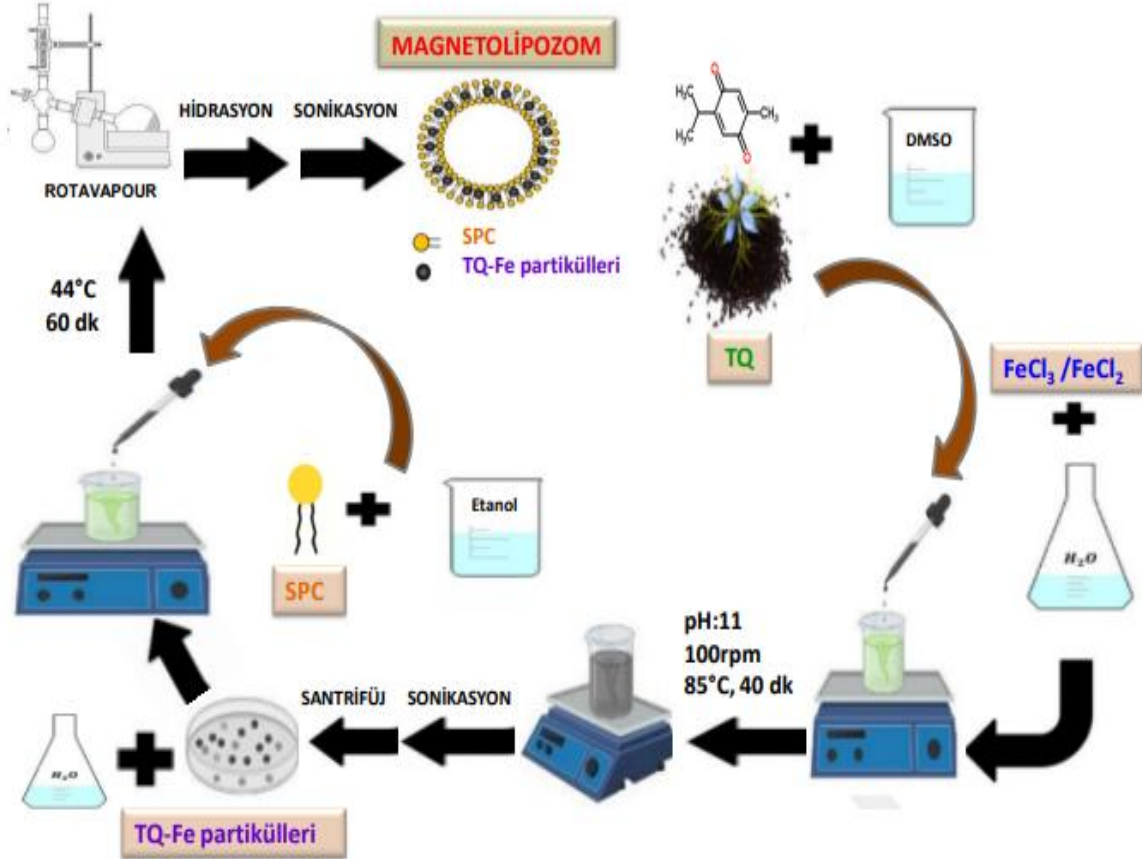
Bu tez projesinde, önce yeşil-biyosentez yoluyla TQ-Fe nanopartikül (NP)'leri üretildikten sonra, bu NP'lerin lipozomlanmaları yoluyla Magnetolipozom (Mag) NP'leri sentezlenmiştir. Ayrıca diğer grup partiküllerimiz olan TQ-bazlı Fitozom (Fit) NP'leri de fitozom teknolojisi ile sentezlenmiştir. Böylece iki grup doğal NP oluşturulurken, Mag NP'lerinin oluşturulması için sentezlenen TQ-Fe NP'leri ise, sadece Mag NP'lerini konfirme etmek amacıyla deneylerde kullanılmıştır. Yine, etken madde yüklü olmayan boş lipozomal NP'ler de hazırlanmış olup, bu NP'ler, etken madde yokluğunda, lipozomal yapıların kendisinden kaynaklanan, kanser hücrelerine bir etkisinin veya ek bir katkısının varlığını tespit edebilmek amacıyla deney grubu olarak ilave edilmiş ve kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Deneyler en az üç tekrarlı olarak yapılmıştır.

Bu amaçla, doğal NP'lerin hazırlanması için; $\geq 98\%$ saflıktaki Timokinon (2-izopropil-5-metil-1, 4-benzokin-non) (TQ) (Cayman) fitokimyasalı, FeCl₃ (Demir (III) klorür hekza-hidrat) (%99,99 metal baz) (Merk), FeCl₂ (Demir (II) klorür tetra-hidrat) (%99,99 metal baz) (Merk) ve Soybean phosphatidylcholine (SPC) (Lesitin) (Sigma) sentez maddeleri olarak kullanılmıştır.

3.2.1.1. TQ-Fe Nanopartiküllerin Yeşil Biyosentezi

TQ-Fe NP'leri, yeşil sentez yoluyla hazırlamak için literatür referans alındı (Fathy, 2020) ve birlikte çöktürme yöntemi kullanılarak sentezlendi. İlk olarak, demir (III) klorid heksahidrat ve demir (II) klorür tetrahidrat ağırlık oranı 2:1 olacak şekilde, 200 mg/100 mg olarak tartıldı ve üzerine 40 ml distile su (dW) ilave edilerek çözüldü ve vortekslendi. Daha sonra bu çözeltinin içine; 16 mg/ml konsantrasyonda TQ çözeltisi hazırlamak için, 24 mg tartılan TQ üzerine 1,5 ml dimetil sülfoksit (DMSO) ilavesi ile çözdürüldükten sonra vortekslendi ve ultrasonik banyo (sonikatör) içine yerleştirilen demir çözeltisine damla damla ilave edildi. Daha sonra ortamı alkali yapmak için, pH metre ile takip edilerek 1M NaOH çözeltisi, karışımın rengi sarıdan siyaha dönüşene kadar damla damla ilave edilerek pH:11'e getirildi. Daha sonra çözelti, 40 dakika süreyle, 85 °C'de, 100 rpm'ya ayarlı sıcak plaka karıştırıcısında bekletilerek TQ-Fe NP'leri oluşturuldu (Şekil 3.2). Ortaya çıkan siyah çöktürmeler, güçlü bir harici mıknatıs kullanılarak toplanmak suretiyle, sulu kısmın şeffaflaşması sağlanarak oluşumun NP

olduğu teyid edildi. Daha sonra, 14.000 rpm'de, 30 dk. boyunca santrifüjleme yoluyla çöktürülen NP'lerin üstte kalan süpernatant daha sonra ölçümlemek üzere başka bir yerde biriktirilerek, alttaki pellet dW ile yıkanmak suretiyle alkali pH düşürülene kadar yıkama adımı (4-5 kez) gerçekleştirildi. Peletin bir kısmı, yeniden deiyonize suda süspansiyon edildi ve güneş ışığından uzak bir yerde izolasyonu yapılarak, kullanılıncaya kadar +4 °C'de saklandı. Pelletin diğer kısmı ise, kristalleşmeyi önlemek için kurutularak toz haline getirildi ve güneş ışığından uzak bir yerde izolasyonu yapılarak, daha sonra Mag NP'lerini hazırlamak için ve diğer araştırmalar (karakterizasyon ve hücre deneyleri) için kullanılmak üzere saklandı. Tüm NP sentezlerinin öncesi ve sonrasında, TQ ışığa duyarlı olduğundan, santrifüj tüplerinin yanlarının alüminyum folyo ile kapatılarak TQ'un bozunmasına yönelik tedbirler azami derecede alındı.

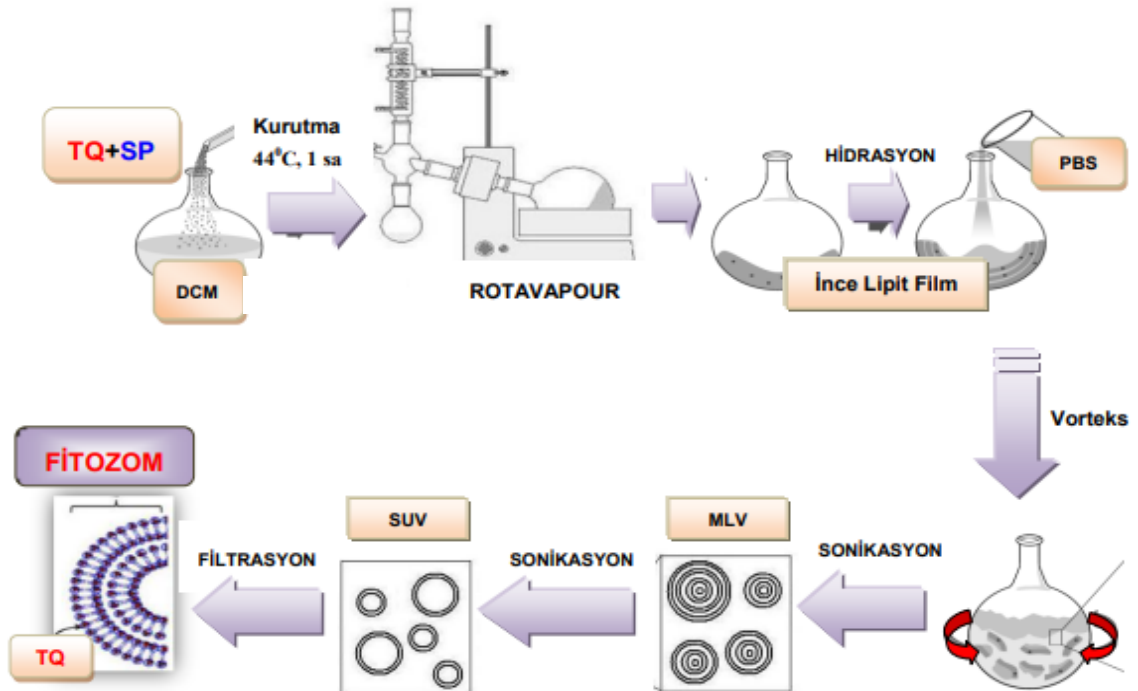


Şekil 3.2. Yeşil metod ile TQ-Fe NP'lerinin biyosentezinin ve TQ-Fe NP'leri ile Mag NP'lerinin hazırlanışının şematik gösterimi.

3.2.1.2. Magnetolipozom Nanopartiküllerin Sentezlenmesi

Mag NP'lerini sentezlemek için, daha önce hazırlanmış ve kurutulmuş olan TQ-Fe NP'leri kullanıldı. Önce kuruttuğumuz TQ-Fe NP'leri dW içinde çözdürüldü. Daha sonra TQ-Fe/SPC 2:1 olacak şekilde soya fosfatidilkolini (lesitin) (soybean phosphatidylcholine: SPC) tartıldı ve etanol içinde homojen oluncaya kadar vortekslenerek çözdürüldü. Çözünen SPC, ultrasonik banyo içine yerleştirilmiş olan TQ-Fe NP çözücüsüne damla damla ilave edildi, pH kontrolü yapıldı ve rotavaporda düşük basınçta altında 44 °C 'de, 1 saatte boyunca, çözücü buharlaşım uzaklaştırılıncaya kadar tutuldu. Yuvarlak tabanlı cam flaskın alt duvarında oluşan ince, kuru film tabakası 40 ml dW içinde hidrate edilerek 1 saat boyunca hafif çalkalama ile karıştırılarak lipid film tabakasının kalkmasıyla oluşan çok tabakalı veziküller (MLV) görüldü ve önce uzun vortekslenerek LUV lipozomlarının elde edilmesi sağlandı. Daha küçük nanopartikül eldesi için 10 dk ultrasonikatörde tutuldu (Şekil 3.2) ve güçlü bir harici mıknatıs kullanılarak toplanma görülerek oluşumun NP olduğu teyid edildi karakterizasyon ve diğer tez çalışmaları yapılmaya kadar +4 °C 'de saklandı.

3.2.1.3. Fitozom Nanopartiküllerin Sentezlenmesi



Şekil 3.3. Fit NP'lerin fitozom teknolojisi ile hazırlanışının şematik gösterimi.

Tez çalışmamızda, TQ tabanlı fitozomal nanopartiküllerin bileşiminde fosfolipit olarak Soybean phosphatidylcolin (SPC) (lesitin) kullanılmıştır. Fitozom dispersiyonları literatürdeki tekniği ile oluşturulmuştur (Nangare ve ark, 2020; Karthivashan ve ark, 2016). TQ ve SPC'ler, 3:1 oranında olacak şekilde (15 mg : 5mg) tartıldı ve oran, 1:2 olacak şekilde, TQ+SPC (toplamı; 15 mg + 5 mg = 20) mg) ve diklorometan (DCM) (20 °C 'de dansitesi 1,32 g/cm³ olduğu için 30 ml) ilave edilerek, çözücü, rotavaporda düşük basınçta altında 44 °C 'de, 1 saatte boyunca, çözücü buharlaşıp uzaklaştırılıncaya kadar tutuldu. Yuvarlak tabanlı cam balonun alt duvarında ince, kuru film tabakası oluşması sağlandı. Tüm formülasyon 25 °C vakumlu etüvde bir gün bekletildi. Daha sonra, ince film tabakası 40 ml PBS içinde hidrate edilerek 2 saat boyunca hafif çalkalama ile karıştırılarak lipid film tabakasının kalkmasıyla oluşan çok tabakalı veziküller (MLV) görüldü. Daha sonra, önce uzun vortekslenerek LUV lipozomlarının elde edilmesi sağlandı. Bu aşamadan sonra, daha küçük nano fitozomların eldesi için 10 dk ultrasonikatörde tutularak şeffaf bir sıvı elde edildi (Şekil 3.3). Elde edilen sıvının şeffaf olması, partiküllerin nano boyutlu olduğunun bir göstergesidir. Hazırlanan formüller kullanılıncaya kadar, ışıktan korunacak şekilde +4 °C 'de saklandı.

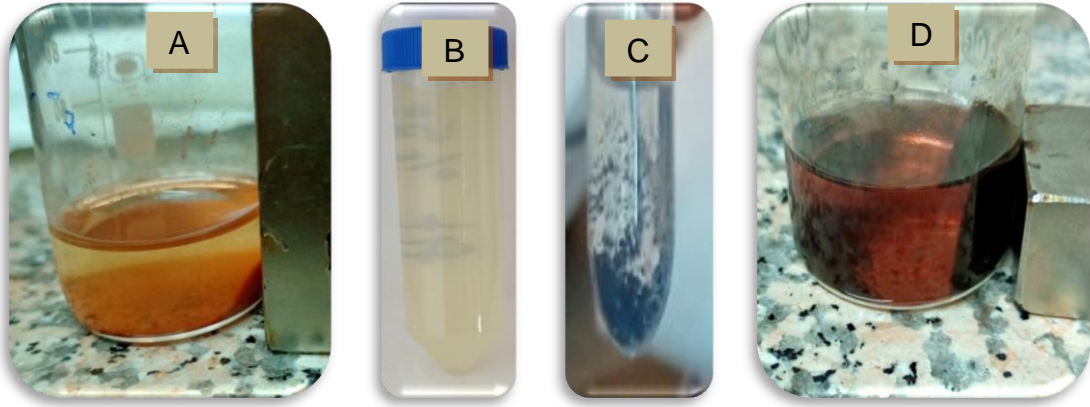
Çizelge 3.1. Nanopartikül grupları, içerikleri ve oransal bileşimi.

Nanopartikül Grupları			Nanopartikül İçerikleri	Oran
Sayı	Kodu	Adı		
1	TQ-Fe NP	Timokinon-demir	TQ / FeCl ₃ / FeCl ₂	6:25:50
2	Mag NP	Magnetolipozom	TQ-Fe / SPC	2:1
3	Fit NP	Fitozom	TQ / SPC	3:1

3.2.2. Enkapsülasyon Etkinliğinin Hesaplanması

Önce TQ miktar tayininin belirlenmesi için kalibrasyon grafiğini çizmek amacıyla UV spektrometre analizi kullanılmıştır. Kalibrasyon eğrisi, hazırlanan numunedeki etken madde miktarının belli bir aralığının içerisindeki derişimi ile elde edilen yanıtın orantılı olduğunun ifadesidir. Bu amaçla, UV spektrofotometrede 200-400 nm arasında dalga boyu taraması yapılarak, TQ için olan dalga boyu ($\lambda = 254$ nm) bulunmuştur. Dalga boyu taraması yapmak amacıyla TQ (1 mg), ethanol (10 ml) içerisinde çözülerek, 0,1 mg/ml'lik çözeltisi elde edilmiştir. Daha sonra 1:9 olacak şekilde etanol:dW olacak

şekilde hazırlanan stok solüsyonundan dilue edilerek 5 ayrı seri çözeltisi (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 mg) hazırlanmış ve UV-Vis spektrofotometrede pik alanları tespit edilmiştir. TQ derişimlerine karşılık elde edilen pik alanları ile standart kalibrasyon eğrisi ve denklemi elde edilmiştir. Böylece daha sonra hazırlanan NP'ler içindeki enkapsüle TQ miktarlarının hesaplanması yapılmıştır.



Şekil 3.4. Hazırlanan nanopartikül örnekleri; (A) MagNP, (B) FitNP, (C,D) TQ-FeNP.

Sentezlenen nanoformülasyonlara yüklenen etken maddelerin belirlenmesi, NP'lerin yükleme etkinlik kapasitelerini anlamak açısından önemlidir. TQ-Fe NP'lerinde, yukarıda anlatıldığı gibi; sentez sonrasındaki belirli orandaki çözelti, 14.000 rpm'de, 30 dk. boyunca santrifüjleme yoluyla çöktürülmüş ve üstte kalan süpernatant kısım, UV-Vis spektrofotometre kullanılarak ($\lambda = 254$ nm), TQ kalibrasyon eğrisi çizilmiş ve serbest TQ konsantrasyonu belirlenerek, NP'deki TQ verimliliğinin yüzdesi hesaplanmıştır. NP'lerin etken madde yüklenme etkinliği (% EE) aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% EE = \frac{\text{Toplam etkin madde miktarı} - \text{Serbest etkin madde miktar}}{\text{Toplam etkin madde miktarı}} \times 100$$

3.2.3. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Tüm NP'lerin, karakteristik absorbans noktaları Uv-Vis spektrofotometre ile; morfoloji (boyut ve şekil) ve dağılımları STEM ile; elementel yapıları SEM-EDX ile; fonksiyonel bant ve grupları, FTIR spektroskopisi ile; çapları, dağılımları (DLS) ve yüzey yükleri ise Zetasizer cihazları ile belirlenerek karakterizasyonları yapılmıştır.

3.2.4. Nanopartiküllerin Fiziksel Stabilite Çalışmaları

Hazırlanan Mag ve Fit NP'lerin 60 gün boyunca +4 °C'de bekletildikten sonra, partikül büyüklüklerinin zamanla ve sıcaklıkla değişip değişmediği, stabilite çalışması ile incelendi. Örneklerin stabilitesini belirlemek için boyut ölçümü 60. günde örnek alınarak Malvern Zetasizer cihazı ile partikül büyüklükleri ve polidispersite indeksleri ölçüldü.

3.2.5. Nanopartiküllerin *in vitro* Salım Çalışmaları

Çözelti içindeki NP içeriklerin partikülden salınım özelliklerinin belirlenmesi için, uygun por aralığındaki (12 KDa MWCO) diyaliz membranda *in vitro* geçiş çalışması yapılmıştır. Kullanılan diyaliz membran 1 saat boyunca pH 7.4 fosfat tamponunda ıslatıldı. Ortam, vücut sıcaklığını taklit etmesi açısından 37 °C'de, tüm örnekler için 100 ml PBS içindeki dializ membranda, deney sonlanıncaya kadar 100 rpm sabit hızdaki bir termal çalkalayıcı inkübatörde yapıldı. Deney, önceden belirlenen sürelerde (15., 30., 45. dakikalarda ve 1., 2., 4., 6., 8., 12., 24., 48. ve 72. Saatlerde) üst kısımdan 1.5 ml örnek alınma ve alınan miktar kadar ortama PBS ekleme şeklinde devam etti. Alınan örnek içeriklerindeki maddelerin miktarına karşı gelen absorbansları UV spektrometre ile ölçüldü. Deney 72 saat sonunda sonlandırılarak, membrandan geçen madde miktarlarının zamana karşı grafiği % kümülatif olarak hesaplandı ve grafiğe geçirildi.

3.2.6. Glioblastoma Hücre Kültürü

Bu çalışmada, U87-MG GB hücre hattı, NP'lerin *in vitro* test edileceği hücre hattı olarak seçilmiş olup, Erciyes Üniversitesi Genkök Araştırma Merkezi'nden temin edilmiştir.

U87-MG GB hücreleri, kültür kabına yapışma özelliğinde olan, iğsi yapıda hücrelerdir. Hücreler, DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) besiyeri içerisine, % 10 fetal bovine serum (FBS), % 1 penisilin / streptomisin ve 2 mM L-glutamin ilaveli olacak şekilde hazırlanan besiyerleri kullanılarak, 37 °C'de, % 5 CO₂'li inkübatörde çoğaltılmış ve pasajlanmaları yapılmıştır. Hücrelerin kültüre edilme işlemleri sırasında tüm çalışmalar, steril biyogüvenlik sınıf 2 kabinetin içerisinde gerçekleştirilmiştir.

Hücre kültür flaskları % 80 oranında hücre ile kaplandıktan sonra pasajlama işlemleri yapılmıştır. Kültürler günlük olarak kontrol edilerek, besiyerinin rengi, morfolojisi ve hücrelerin yoğunluğu gözlemlenmiştir. Konfluent olan hücreler, güvenlik önlemlerine dikkat edilerek pasajlamaları yapılmıştır. Öncelikle flask üzerinde bulunan eski besiyeri çekilerek 3 ml PBS şle yıkandıktan sonra, 25 cm² lik flasklar için 0.5 ml, 75 cm² lik flasklar için 1ml Tripsin eklenmiş ve flasklar 37 °C'de inkübatörde 5 dakika kadar inkübe edilmiştir. Daha sonra etüvden alınan flasklardaki tripsin enziminin etkisini durdurmak için tripsin miktarının en az iki katı miktarda besi yeri eklenmiş ve hücreler bir falkon tüpe alınarak 1100 rpm'da 5 dakika santrifüj yapılmıştır. Daha sonra süpernatant atıldıktan sonra hücre pelleti taze medyum ile resüspanse edilip, sayılarak ve T3 (25 ml) ve T4 (75 ml) steril kültür flasklarına uygun miktarlarda transfer edilmiş ve CO₂ etüvüne (37 °C; % 5 CO₂) konulmuştur. Böylece hücrelerin, laboratuvar şartlarına uyumlanarak tekrar çoğalmaları için uygun ortam sağlanmıştır.

Hücrelerin sayımı için hücreler taze besi yeri ortamı/PBS ile seyreltildikten, 1:1 oranında olacak şekilde Tripan Blue boyası ile bir ependorf tüpün içinde iyice pipetaj yaparak karıştırıldıktan sonra Neuber–hemositometreye alınmış, dört karedeki hücreler sayılıp ortalaması alındıktan sonra canlı hücreler hesaplanarak pasajlamaya devam edilmiştir.

3.2.7. Nanopartiküllerin Hücre Canlılığına Etkileri

Hazırlayıp karakterize ettiğimiz TQ-Fe, Mag ve Fit NP grupları ve boş NP grubu, U87-MG hücrelerine çeşitli dozlarda muamele edilerek, GB kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri, dört tekrarlı olarak test edilip, ölçümlenmiş ve istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve IC₅₀ değerleri belirlenerek, bundan sonraki tüm deneylerde uygulanmak üzere, NP'lerin doz miktarı olarak kullanılmıştır.

MTS analizi hücre canlılığını tespit etmek için kullanılan bir yöntemdir. MTS (3 - (4,5 - dimethyl - tiazol - 2 - yl) - 5 - (3 - carboxymetoxyphenyl) - 2 - (4 - sülfophenyl) - 2H - tetrazolium, inner salt) deneyi, bir kolorimetrik testtir. Bu tahlil, bir tetrazolyum tuzunun canlı hücrelerin mitokondriyal aktivitesi ile renkli bir formazana dönüştürülmesine dayanmaktadır. Dehidrogenaz enzimlerinin ürettiği formazon miktarı, kültürdeki canlı hücre sayısı ile direkt orantılıdır ve 490 nm'de spektrofotometre ile ölçülebilmektedir.

Deney kısaca; 1×10^5 /ml olarak seyreltilen hücreler 96'lık kaplara, kuyu başına 100 µl ekim yapıldıktan sonra, üzerine 150 µl besiyeri konularak hücrelerin tutunması için 4 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra kuyucuklardaki besiyeri ayrılmış ve NP'lerin çeşitli konsantrasyonları ile 24 saat boyunca, 37 °C de inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra MTS eklenerek 4 saat daha inkübe edildikten sonra hücrelerin inkübasyonları sonlandırılmış ve ELISA okuyucuda 490 nm'deki absorbans değerleri bulunarak istatistik değerleri belirlenmiştir. Deney sonunda canlılık/ölüm oranlarına göre % 50'sinin canlı olduğu (IC_{50}) uygun konsantrasyonlar belirlenmiş ve bundan sonra uygulanacak tüm deneyler için doz olarak kullanılmıştır.

3.2.8. Nanopartiküllerin *In Vitro* Hücre Kültürü Çalışmaları

Hazırlanan Mag ve Fit NP'leri ile konfirme amaçlı TQ-Fe NP'lerinin, U87-MG kanser hücre dizileri üzerine 24 saat muamelesi sonucu, "Annexin V-FİTC Deneyi" ile hücrelerdeki apoptoz düzeyi; "ROS Analizi" ile hücrelerdeki serbest radikal miktarı; "MDA Deneyi" ile hücrelerdeki lipid peroksidasyon seviyesini ve "Ferrozin Deneyi" ile hücrelerdeki şelatlama aktivitesi *in vitro* olarak en az üç kez tekrarlı olarak test edilip, ölçümlenmiş ve istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

3.2.8.1. Nanopartiküllerin Apoptoz Etkileri

Sentezlediğimiz nanopartiküllerin GB kanser hücrelerine sitotoksik etkilerinin apoptotik yolla olup olmadığı, Annexin V – FİTC deneyi ile test edilmeye çalışılmıştır. U87-MG hücrelerine (5×10^5 cells/ml) NP'lerin (TQ-Fe, Mag ve Fit NP'ler ve boş NP'ler) belirlediğimiz konsantrasyonları 24 saat boyunca 37 °C'de % CO₂'li inkübatörde inküde edildikten sonra, hücreler Annexin V-FITC / 7-AAD Apoptoz Tespit Kit (Elabscience) protokolü uygulanarak, binding buffer ile yıkama yapılmış, hücreler boyanarak 15 dakika boyunca boya ile inkübe edildikten sonrası BD FACSAria III Flow Cytometry cihazında ölçümler alınmıştır.

3.2.8.2. Nanopartiküllerin Serbest Radikal Oluşumuna Etkileri

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) seviyesi, "Oxygen Species (ROS) Detection Assay Kit" (Elabscience) test protokolüne göre yapılmıştır. ROS seviyesini tespit deneyinde bulunan DCFH-DA (2,7 - diklorofloresin diasetat), membranı serbestçe geçebilen ve hücre içindeki hidroksil, peroksil gibi ROS aktivitesini ölçen bir floresan probdur.

Hücreye girdikten sonra, hücre içi esteraz ile hidrolize edilerek DCFH (diklorofluoresin) oluşturmaktadır. ROS varlığında DCFH, hücre zarından geçemeyen güçlü yeşil floresan bir madde olan DCF'ye (diklorofloresin) oksitlenmektedir. DCF, 502 nm'lik uyarma dalga boyuna ve 525 nm'lik emisyon dalga boyuna yakın bir maksimum dalga zirvesine sahiptir ve yoğunluk, hücre içi ROS seviyeleri ile orantılıdır.

Önce 96 kuyucuklu siyah mikropalakaya hücreler (5×10^5 cells/ml) ekildikten sonra NP'ler eklenerek, 24 saat boyunca 37°C 'de % CO_2 'li inkübatörde inkübe edilmiştir. Pozitif kontrol olarak kit içinden çıkan Reaktif 2 (TBHP yani tert-butyl hydroperoxide) ve negatif kontrol için hiçbir NP ve etken madde olmadan inkübe edilmiş olan hücreler kullanılmıştır. Yine kit içinden çıkan Reaktif 1'den (DCFH-DA) ($10\mu\text{M}$) eklenerek, oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 30 dk inkübe edilmiş ve . DCFH-DA (Reaktif 1), hücreye diffüze olduktan sonra ROS ile oksitlenerek DCF'ye dönüşmesi ve 525 nm'de okutulmuş absorpsiyon değeri olarak ölçülmüştür.

3.2.8.3. Nanopartiküllerin Lipit Peroksidasyonuna Etkileri

Lipit peroksidasyonunu ölçümlemenin bir deneyi olarak, bir ELİSA kiti olan "MDA Ölçüm Kit" (Elabscience) protokolu kullanılmıştır. Önce, hücreler (5×10^5 cells/ml) ekildikten sonra NP'ler eklenerek, 24 saat boyunca 37°C 'de % CO_2 'li inkübatörde inkübe edilmiştir. Bu kit içeriğinden sağlanan mikro ELİSA plaka, MDA ile önceden kaplanmıştı. Kuyucuklara $50\mu\text{l}$ standart eklenerek, her kuyucuğa $50\mu\text{l}$ Biotinlenmiş Tespit Ab hemen arkasından eklenmiş ve 37°C 'de, 45 dk inkübe edilmiştir. Reaksiyon sırasındaki numunedeki MDA, MDA'ya özgü Biotinlenmiş Tespit Ab üzerindeki alanlar için rekabet etmektedir. Daha sonra plaka üç kez aspire edilerek fazla konjugat ve bağlanmamış numune veya standart, yıkanarak uzaklaştırıldı. Daha sonra, $100\mu\text{l}$ Avidin-Horseradish Peroxidase (HRP) konjugatı, her bir mikro plaka kuyucuğuna eklenmiş ve 37°C 'de, 30 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra aspire edip, beş kez yıkandıktan sonra, her kuyucuğa TBM substrat çözeltisinden $90\mu\text{l}$ eklenip, 37°C 'de, 15 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra $50\mu\text{l}$ durdurma solüsyonunun eklenmesi ile enzim-substrat reaksiyonu sonlandırılmış ve rengin maviden sarıya döndüğü gözlenerek, optik yoğunluk (OD), 450 ± 2 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Test edilen numunelerdeki MDA konsantrasyonu, numunelerin OD'sinin standart eğrisi ile karşılaştırma yoluyla hesaplanmıştır.

3.2.8.4. Nanopartiküllerin Şelatlama Etkileri

“Ferrozin” (Sigma) kullanılarak uygulanan deney ile NP’lerin U87-MG hücreleri üzerindeki şelatlama aktivitelerinin seviyesi belirlenmiştir. Özellikle Fe^{+2} iyonlarını şelatlama aktivitesini ölçen bu metodda, kullanılan ferrozin reaktifi, kuvvetli bir demir şelatlayıcısıdır. Test edilecek olan NP’lerin demir bağlama kapasiteleri, ferrozin reaktifi ile hücre ortamında yarışmaya girerek oluşturduğu demir kompleks miktarının hesaplanması ile ölçümlenmiştir. Şayet şelatlama güçlü ise, kırmızı renkli Fe^{+2} -Ferrozin kompleksinin oluşumu engellenerek, renk miktarına etki etmektedir.

Hücelere (5×10^5 cells/ml) ekildikten sonra NP’ler eklenerek, 24 saat boyunca $37^\circ C$ ’de % CO_2 ’li inkübatörde inküde edildikten sonra, 3,7 ml dW su ve 100 μ l 2 mM $FeCl_2$ çözeltisi eklenerek, oda sıcaklığında 30 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra 200 μ l 5 nM ferrozin çözeltisi iyice karıştırılarak eklenmiş ve 10 dk sonra karışımların absorbanans değeri 562 nm’de ölçülmüştür. Daha sonra kontrol çalışmasında, test edilen NP’ler yerine, blank olarak 1 ml dW su, standart olarak 10/1000 μ l/ml EDTA çözeltisi kullanılmıştır. Ferrozin- Fe^{+2} kompleksini inhibe etme yüzdesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Şelatlama Aktivitesi} = \frac{(562 \text{ nm'de örnek absorbanansı})}{(562 \text{ nm'de kontrol absorbanansı})} \times 100$$

3.2.9. İstatistiksel Analiz

Tüm deneyler en az üç tekrar halinde gerçekleştirilmiş ve sonuçlar GraphPad Prism 6 programı ile ANOVA ve t testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Anlamlılık derecesi, $P < 0.05$; $p < 0,01$ ve $p < 0,001$ olarak kabul edilerek grafiğe geçirilmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Nanopartiküllerin Karakterizasyon Analizleri

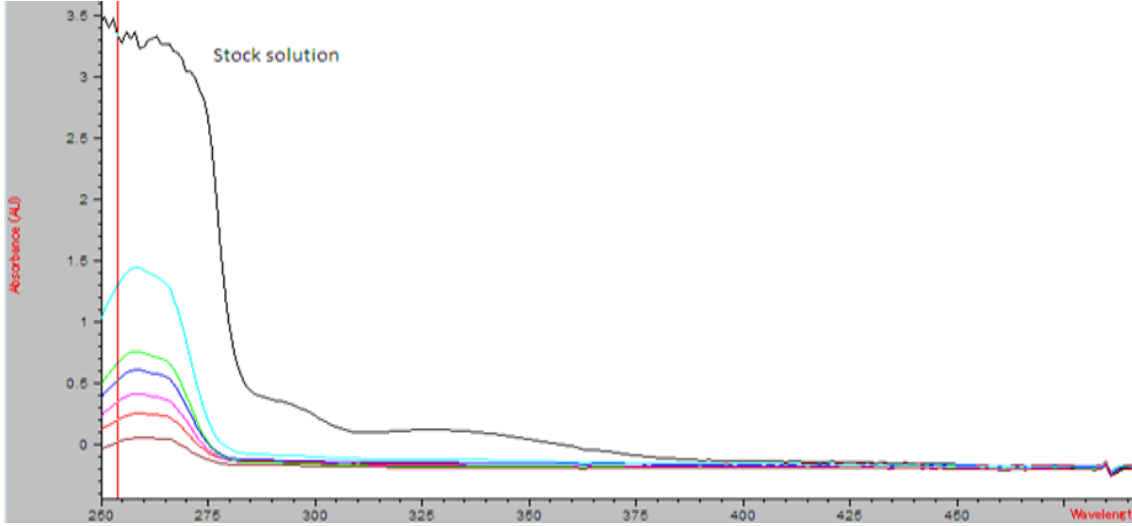
Bu tez projesinde, farklı formülasyon metodları ile oluşturulan TQ-Fe, Mag ve Fit olmak üzere, üç adet doğal içerikli NP'lerin sentezlenmesinin ardından, karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Karakterizasyon çalışmalarında, TQ-Fe, Mag ve Fit NP'lerin, etken madde hapsedme, yükleme oranları; STEM analizi ile NP'lerin yüzey uygunlukları, yuvarlak, küresel morfolojileri; FTIR spektrometre ile NP'lerin bant özellikleri ve bağlanma yapıları; SEM-EDX analizi ile NP'lerin elementel yapıları ve saflıkları; DLS ve zeta potansiyel analizleri ile NP'lerin boyutları, homojen dağılımları, yüzey yükleri; stabilite çalışmaları ile NP'lerin kararlılıkları, raf ömürleri; salım çalışmaları ile NP'lerin etken madde salım özellikleri analiz edilerek, karakterizasyonları tespit edilmiş, nanopartikül özellikleri teyid edilmiş ve karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

4.1.1. Nanopartiküllerin Enkapsülasyon Etkinliğinin Hesaplanması

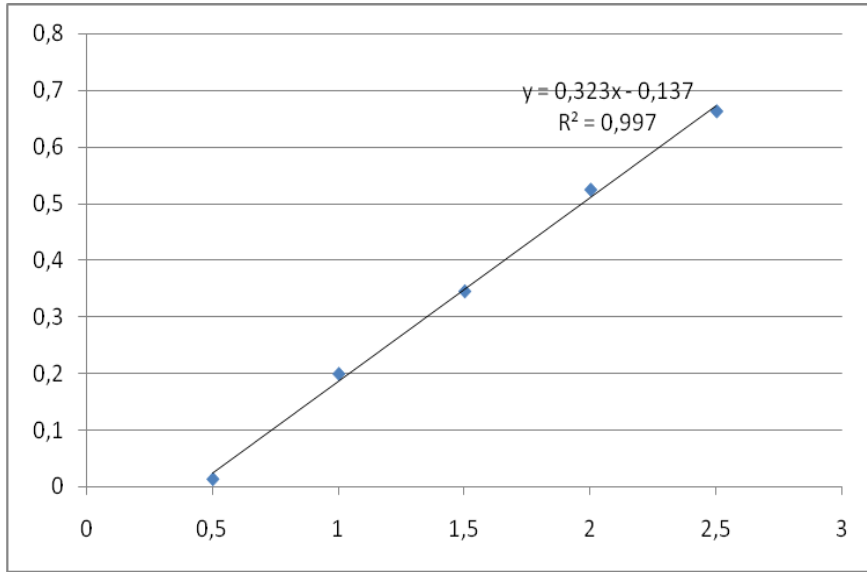
TQ'un stok ve 5 seri çözeltisinin UV-vis spektrometredeki dalga boyu pikleri Şekil 4.1'de, absorbans değerleri çizelge halinde Tablo 4.1'de ve kalibrasyon grafiği ve denklemi Şekil 4.2'de sunulmuştur.

Çizelge 4.1. TQ'nin (254 nm) UV spektroskopi yöntemiyle ölçülen konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbans değerleri.

Grup	Konsantrasyon(mg/ml)	Absorbans
1	0.5	0,01425
2	1	0,19968
3	1,5	0,34502
4	2	0,52387
5	2,5	0,66202



Şekil 4.1. TQ'un altı seri konsantrasyon miktarlarına karşılık gelen, $\lambda_{max}=254$ nm'deki absorbans ve pik değerlerinin UV-vis spektrofotometredeki görüntüsü (---0.5 mg/mL, --1 mg/mL, ---1.5 mg/mL, ---2 mg/mL, ---2.5 g/mL).



Şekil 4.2. TQ'un UV-Vis spektrofotometre ölçümleri ile elde edilen konsantrasyonlara karşılık absorbans değerlerinin lineer kalibrasyon doğrusu ve denklemi (n=6).

TQ stok çözeltisinden, her birinde 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 mg/ml konsantrasyonda TQ olan 5 seri çözelti kullanılarak, Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı gibi UV-Vis Spektrofotometre ile TQ'a ait dalga boyu taraması sonucunda bulunan ve literatür ile uyumlu olan (Fathy ve ark, 2020; Gilani ve ark, 2004; Fahmy ve ark, 2019), 254 nm'deki maksimum dalga boyu (λ_{maks}) referans alınarak, çözeltilerden elde edilen maksimum pik alanları ve bu pik alanlarına karşılık gelen absorbans miktarları, Şekil 4.1'de görüldüğü gibi tespit

edildikten sonra, konsantrasyon değerlerine karşılık gelen pik alanlarının absorbans değerleri grafiğe geçirilmiş ve kalibrasyon doğrusuna ait denklem lineer regresyon ile bulunmuştur (Şekil 4.2).

TQ'un UV-Vis spektrofotometre ile tayin edilen regresyon verileri (n=6):

Konsantrasyon aralığı: 0,5 – 2,5 mg/ml,

Eğim: 0,323,

İntersept: 0,137,

Korelasyon katsayısı (R²): 0,997'dir.

Çizelge 4.2. Nanopartiküllerin etken madde tutma etkinliği.

Grup		Nanopartiküller	EE (%)
Sayı	Kodu		
1	TQ-FeNp	Timokinon-Demir	% 89
2	MagNp	Magnetolipozom	% 76
3	FitNp	Fitozom	% 81

Bölüm 3.2.2.1'de anlatıldığı gibi, TQ-Fe, Mag ve Fit NP'lere yüklenen TQ miktarı tayin edildikten sonra enkapsülasyon etkinliği hesaplanarak bulunmuştur. NP'lerin santrifüj sonrası elde edilen süpernatant kısımları enkapsülasyon etkinliği hesaplaması için UV spektrometrede absorbans değerleri, 254 nm'de okunarak, kalibrasyon eğrisi ve denklem yardımı ile enkapsülasyon etkinliği (EE) hesaplanmış ve NP'lerin % EE Tablo 4.2'de sunulmuştur. Çalışmamızda, TQ-Fe NP'leri, Mag NP'leri ve Fit NP'leri sırasıyla, %89, %76 ve % 81 oranlarında enkapsülasyon etkinliği bulunmuş olup, TQ-Fe ve Fit NP'leri açısından (Mag NP'lerine literatürde rastlanmadığı için) literatürle uyumlu oldukları görülmektedir (Fathy ve ark, 2020; Imam ve ark., 2022).

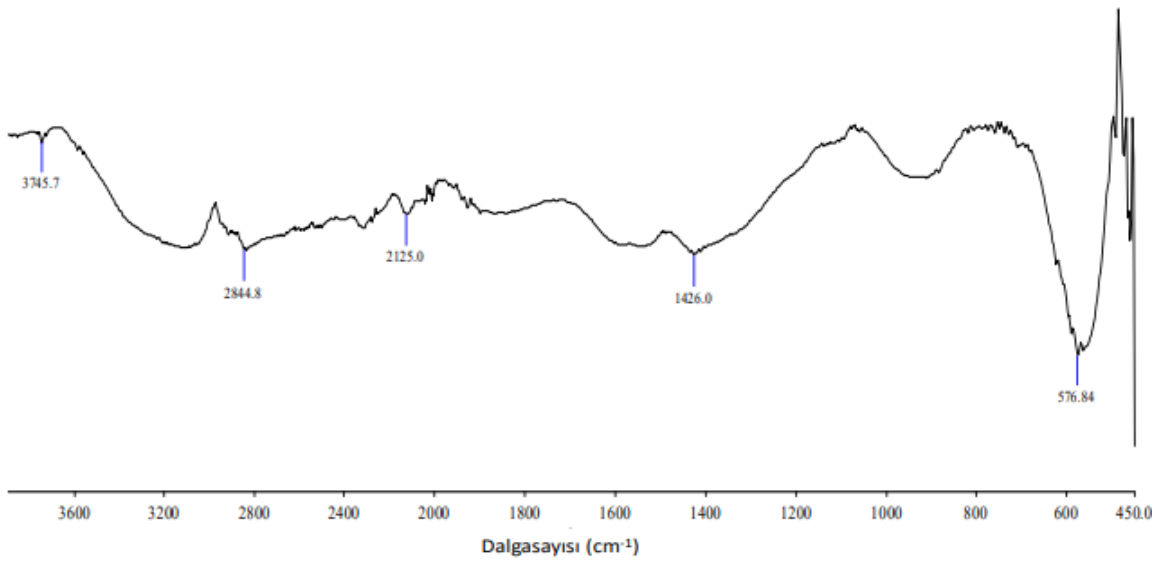
NP'ler arasında enkapsülasyon etkinliği yönünden büyük farklılık bulunmasa da, her üç NP'ün sentezlenme tekniklerinin farklı olması, %EE farklılığına neden olabilir. TQ-Fe NP'lerinin yeşil metod kullanılarak biyosentezlenme tekniğinin, diğer iki lipit karakterli NP'lerin enkapsülasyon etkinliği yönünden daha avantaj sağladığı görülmektedir. Mag NP'lerinin, diğer iki gruba göre en az enkapsülasyon etkinliğinin görülmesini, TQ-Fe NP'lerin tekrar etken madde olarak lipozomlara bağlanması sırasında meydana gelen

olası kayıplar nedeniyle olabileceğini düşünmekteyiz. Fit NP'lerinin, Mag NP'lerine göre daha fazla görülen %EE oranı, Mag ve Fit NP'lerinin benzer sentezlenme tekniklerinin olması nedeniyle, aradaki farkın, Mag Nplerinde TQ-Fe NP'lerinin tekrar etken madde olarak kullanıldığı için, Mag NP'lerindeki etken madde miktarlarının % 100 değil, % 89 oranında olmasına bağlamaktayız. Bu durumda Mag NP'lerini de %EE oranının da oldukça yüksek olduğu anlaşılmaktadır.

4.1.2. Nanopartiküllerin FT-IR Analizi

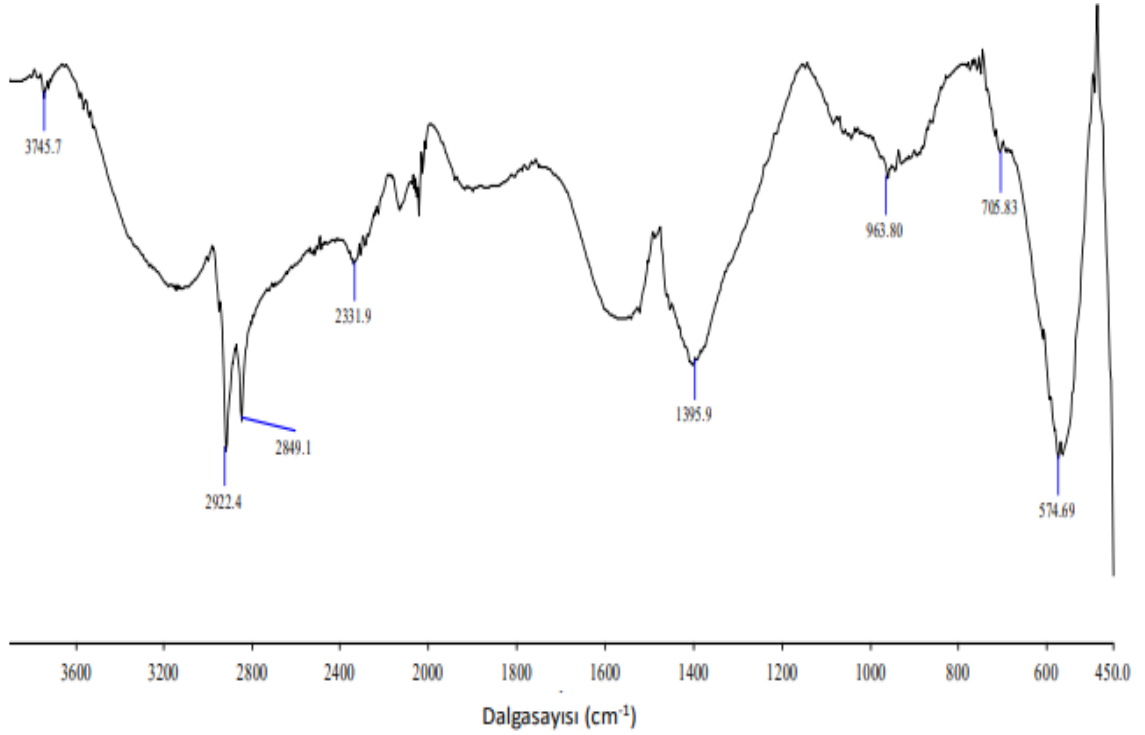
Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (Fourier Transform İnfrared Spectroscopy, FTIR) (Perkin Elmer - 400), bir numunedeki belirli band ve pik varlığını tespit etmek amacıyla, yüksek çözünürlükte spektrumların elde edildiği bir cihazdır. FTIR tekniği, kızılötesi radyasyon (IR) uygulamaları ile absorbe edilen IR dalga boyları aralıklarının ölçümü yapılarak, aktif biyomoleküllerin yapısındaki bağların ve fonksiyonel grupların tanımlanmasını sağlayan hızlı bir analiz yöntemidir (Berthomieu ve ark., 2009).

TQ-Fe, Mag ve Fit NP'lerine ait FTIR spektrumları Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'de sunmuştur. FTIR analizinde $400-4000\text{ cm}^{-1}$ aralığındaki spektrumlar alınarak içerdiği fonksiyonel bandların belirlenmesi suretiyle elde edilen grafiklerin standart tepe noktaları, referanslar (Rani ve diğerleri, 2018; Pagola ve ark, 2004; Alhakamy ve ark,2020; Imam ve ark, 2022) ile karşılaştırılmak suretiyle sonuçlar değerlendirilmiştir.



Şekil 4.3. TQFe NP'lerin FTIR spektrumu.

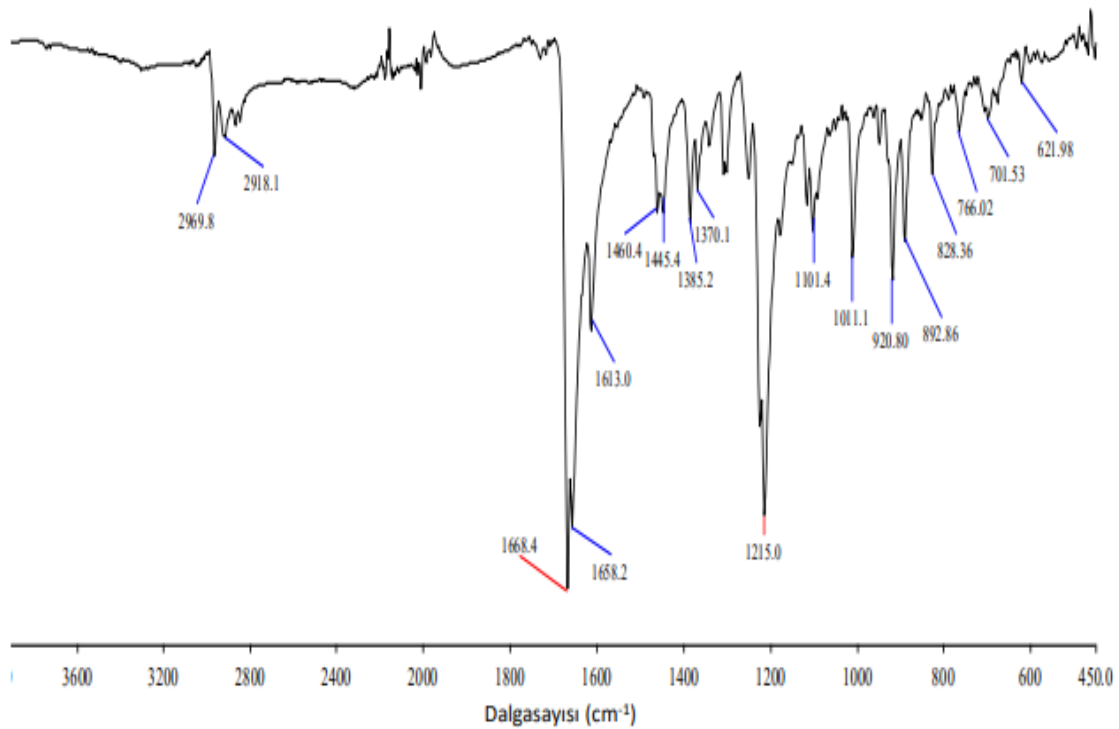
Şekil 4.3’de TQ-Fe NP’lerinin FTIR spektrumuna baktığımızda, 576.84 cm^{-1} ’de oldukça derin pik varlığında görülen bant, Fe-O için karakteristik olup, demir varlığını ifade etmektedir (referans: 576 cm^{-1}). 1426.0 cm^{-1} ’de görülen geniş pik varlığındaki bant, CH_3 ’ün asimetrik bağından kaynaklanabileceğini ifade etmektedir (referansa: 1459 cm^{-1}). 2844.8 cm^{-1} ’de görülen nispeten geniş pik varlığında görülen bant, CH_3 ’ün esneme titreşimini göstermektedir (referans: 2856 cm^{-1}). 1426.0 cm^{-1} ve 2844.8 cm^{-1} bantları, TQ’un moleküler yapısında görülen metil grubu ile uyumlu olarak TQ varlığını ifade etmektedir.



Şekil 4.4. Mag NP’lerinin FTIR spektrumu.

Mag NP’lerinin Şekil 4.4’de görülen FTIR spektrumuna baktığımızda, $574,69\text{ cm}^{-1}$ ’deki oldukça derin pik varlığında görülen bant, Fe-O için karakteristik olup, demir varlığını ifade etmektedir (referans: 576 cm^{-1}). 963.80 cm^{-1} ’de görülen bant, CH_3 gerilimini (referans: $1100\text{-}900\text{ cm}^{-1}$); 1395.9 cm^{-1} ’de görülen bant ise, üçüncül karbonun simetrik bükülme ile birlikte CH_3 ’ü ifadesi etmektedir (referans: $1383.68\text{ cm}^{-1} - 1354.22\text{ cm}^{-1}$). Yine, IR spektrumunda görülen 2331.9 cm^{-1} ’deki bant, C-O yapısına işaret etmektedir (referans: 2359 cm^{-1}). 2849.1 cm^{-1} ve 2922.4 cm^{-1} ’de görülen sivri piklerin varlığındaki bantlar, C-H gerilmesinin varlığını ifade etmektedir (referans: $2850\text{-}2975\text{ cm}^{-1}$).

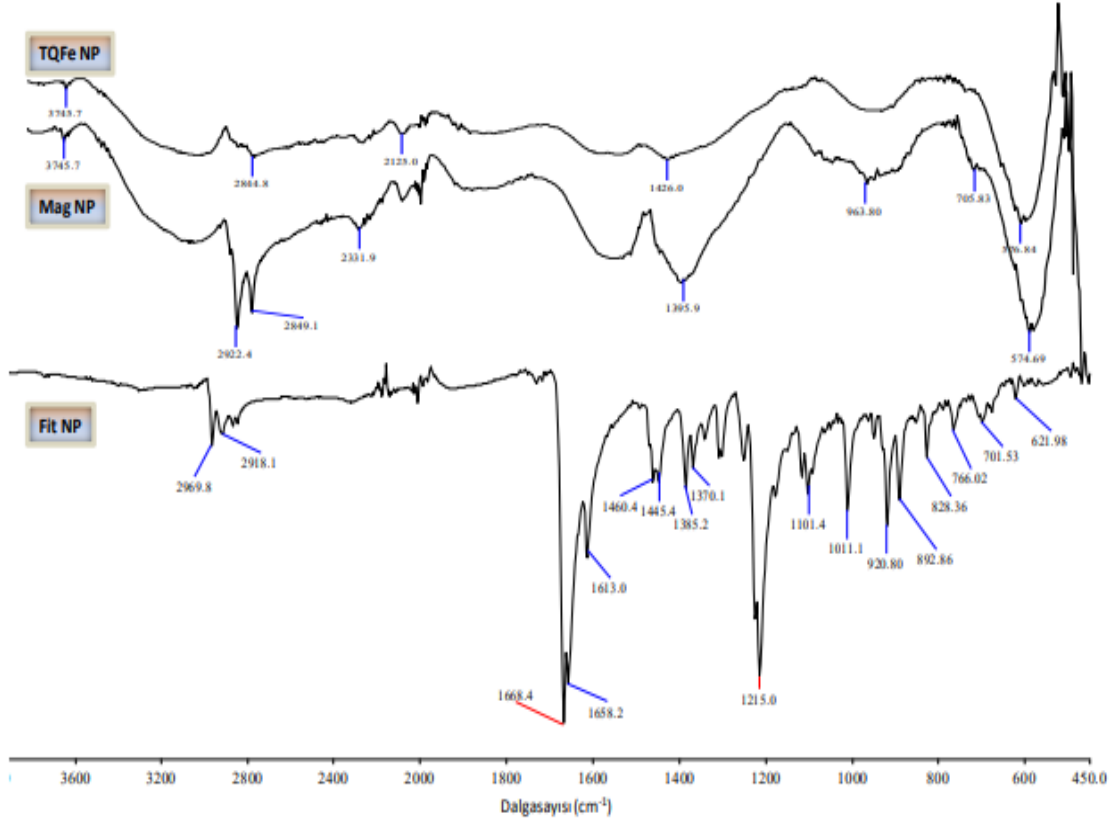
Mag NP'lerin FTIR spektrumundaki, 963.80 cm^{-1} ve 1395.9 cm^{-1} bantlarının varlığı, TQ'un moleküler yapısında görülen metil grubu ile uyumlu olarak TQ varlığını ifade etmektedir. Ayrıca, 2849.1 cm^{-1} ve 2922.4 cm^{-1} bantlarının ikisi de, hem TQ hem de fosfolipit referanslarında görülmesi nedeniyle TQ ve fosfolipit varlığını ifade etmektedir (TQ referans: 2851 cm^{-1} ve 2924 cm^{-1}), (fosfolipit referans: 2849 cm^{-1} ve 2923 cm^{-1}). Ayrıca, Mag NP'lerinde görülen 2849.1 cm^{-1} bantı, TQFe NP'üne göre çok daha sivri ve büyük pik olarak görülmektedir. Bu bant, C-H gerilmesinin varlığını ve TQ varlığını ifade etmektedir (TQ referans: 2851 cm^{-1}). Yine, bu pik bakımından her iki grubun benzerlik göstermesi, içerik yönünden benzerliği de bir ifadesi olarak görülebilir.



Şekil 4.5. Fit NP'lerinin FTIR spektrumu.

Fit NP'lerinin FTIR spektrumunda (Şekil 4.5), 920.80 cm^{-1} 'de keskin ve derin pik varlığı ile görülen bant, CH_3 gerilimini ifade etmektedir (referans: $1100\text{-}900\text{ cm}^{-1}$). 1370.1 cm^{-1} ve 1385.2 cm^{-1} 'deki görülen sivri piklerin varlığındaki bantlar ise, üçüncül karbonun simetrik bükülmesi ile CH_3 deformasyonunun bir ifadesini göstermektedir (referans: 1383.68 cm^{-1} ve $1354.22\text{-}1658.2\text{ cm}^{-1}$). 1445.4 cm^{-1} ve 1460.4 cm^{-1} 'lerde birbirine yakın piklerin varlığında görülen bantlar, CH_3 'ün antisimetrik bükülme ve deformasyonu ifade etmektedir (referans: $1457\text{-}1459,31\text{ cm}^{-1}$). Bu bantların anlamlılıkları karşılaştırıldığında, 920.80 cm^{-1} , 1370.1 cm^{-1} , 1385.2 cm^{-1} , 1445.4 cm^{-1}

ve 1460.4 cm^{-1} bantların varlığı, TQ'un moleküler yapısında görülen metil grubu ile uyumlu olarak TQ varlığını ifade etmektedir. Bunun dışında, 2918.1 ve 2969.8 cm^{-1} 'lerde görülen bantlar, C-H gerilmesinin ifade etmekte (referans: 2965 cm^{-1} , 2921 cm^{-1} , 2924 cm^{-1}). Ayrıca, Fit NP'lerinin FTIR spektrumunda, 1101.4 ve 1011.1 cm^{-1} 'lerde görülen yine sivri pikleri, C-O bant varlığını ifade etmektedir (referans: $1050-1150\text{ cm}^{-1}$). Yine, 1215 cm^{-1} 'deki derin pik varlığındaki bant, C-OH ve O-H gerilimlerine işaret etmektedir. (referans: $1100-1200\text{ cm}^{-1}$). Fit NP'lerinde, özellikle 1600 cm^{-1} civarında, oldukça sivri ve derin piklerin varlığında görülen 1668.4 , 1658.2 ve 1613.023 cm^{-1} bantları, TQ için en karakteristik bantlarını ifade etmekte olup, aromatik C=C gerilimlerinin absorpsiyon yaptığını ifade etmektedir (referanslar: 1615 cm^{-1} ve 1643 cm^{-1}).



Şekil 4.6. Sırasıyla, TQ-Fe NP, Mag NP ve Fit NP'lerinin FTIR spektrumları.

Bu pikler ve anlamlılıkları karşılaştırıldığında, Fit NP grubunda görülen 1668.4 cm^{-1} , 1658.2 ve 1613.023 cm^{-1} aralığındaki pikleri ile 2918.1 ve 2969.8 cm^{-1} 'lerinin varlığı, hem TQ referansında bu civarlarda (1615 cm^{-1} ve 1643 cm^{-1} , ayrıca 2665 cm^{-1}) olması, hem de fosfolipit referansında da bu civarlarda piklerin (1654 cm^{-1} , ayrıca 2849 cm^{-1} ve

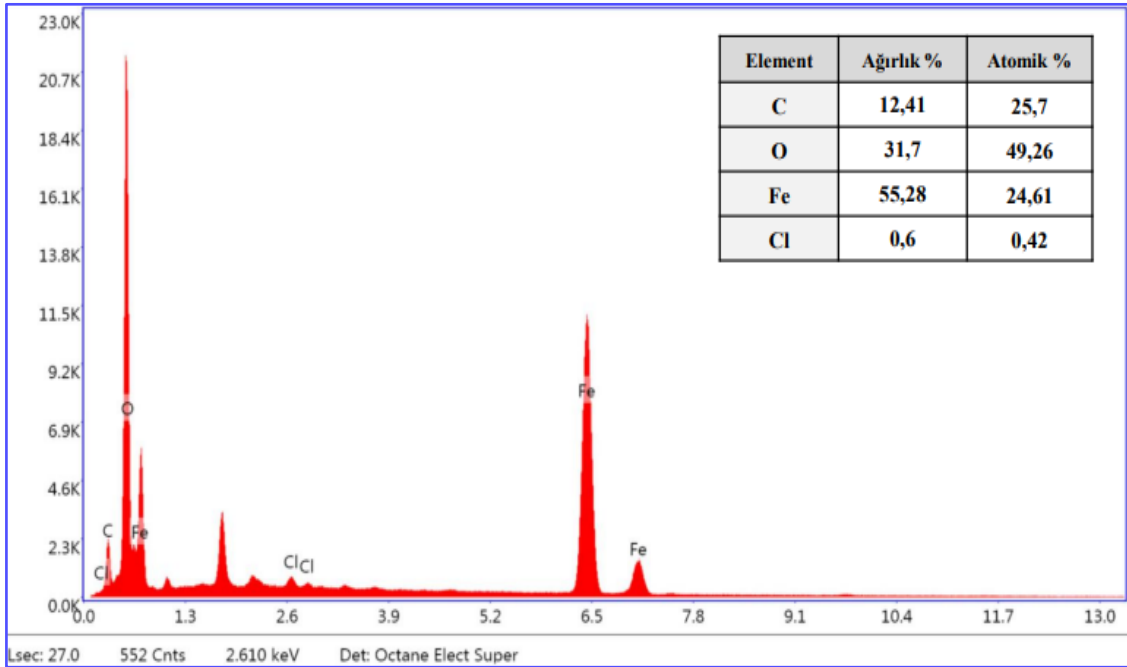
2923 cm^{-1}) bulunması, TQ ve fosfolipitlerin birlikte varlığını göstermektedir. Mag NP'lerin de ise hem demir referansında (1627 cm^{-1}) hem de yine yukarıda bildirildiği gibi TQ ve fosfolipit varlığında görülen bu aralıktaki piklerin, toplu olarak görülmemesi, Mag NP'ünde bu aralıkta değişme olduğunun göstergesi olarak, TQ-Fe NP'lerinin bu bölgeden fosfolipitlere bağlanmak suratiyle Mag oluşturdukları ifade etmektedir. Hem TQFe NP'lerinde hem de Mag NP'lerinde, referansa göre 1711.23 cm^{-1} civarında olması beklenen bantın görülmemesi, C=O gerilimin olmadığı bir ifadesi olarak kabul edilerek, TQ'un hidroksi yapısına dönüşmesi ya da demir ile şelatlama bağının oluştuğu bölge olarak düşünülmesine neden olmaktadır. Ancak, Mag NP'lerinde görülen 2331.9 cm^{-1} 'de pik, C-O varlığına işaret etmesi nedeniyle, TQ'daki C=O çift bağının, tek bağ olarak, kimyasal aktivitesinin bir göstergesini ifade etmektedir. Bu durum ise, Mag NP'lerinde TQ'un semikinon özelliğini göstermektedir. Dolayısıyla, Mag NP'lerinde TQ-Fe NP'lerinin bağlanmasının, TQ'un semikinon yapısıyla daha çok ilişkili olabileceğini göstermekte, bu da TQ-Fe ve Mag NP'lerinin hem oksidan özelliğinin hem de şelatör-metal kompleks özelliğinin bir göstergesi niteliğinde olduğu düşünülebilir.

TQ için karakteristik olduğu bildirilen (aromatik yapıyı ifade eden C=C) referans 1615-1643 cm^{-1} aralığındaki bantların, fosfolipitler için de 1654 cm^{-1} 'deki bantın referans olarak verilmesi ve Fit NP'lerinin FTIR spektrumunda 1668.4, 1658.2 ve 1613.023 cm^{-1} değerleri olarak bantların görülmesi, Fit NP'lerinde hem TQ hem de fosfolipitin varlığını gösterirken; 1668.4, 1658.2 ve 1613.023 cm^{-1} bantların, lipozomal yapılar olmasına rağmen Mag NP'lerinin FTIR spektrumlarında bu bantların kaybolması, Mag NP'ünde bu aralıkta değişme olduğunu ifade etmekte ve TQ-Fe NP'lerinin bu bölgeden bağlanmış olabileceğini ifade etmektedir.

Sonuç olarak, literatür ile uyumlu bir şekilde, FTIR spektrumu ile TQ, demir ve fosfolipit varlığı gösterilmiş ve FTIR analiz sonuçlarının karşılaştırılması, NP'lerin sentezlerinden sorumlu olduğu düşünülen bantlarda ve piklerde önemli sapmaların görülmesi, referanslarda bu piklerin ait olduğu moleküller arasında olası etkileşimlerin olabileceğini desteklemektedir. Bu durum, TQ biyoaktif bileşeninin hem demire hem de fosfolipite bağlanmak suretiyle NP sentezine katıldığını düşündürmektedir

4.1.3. Nanopartiküllerin EDX Analizi

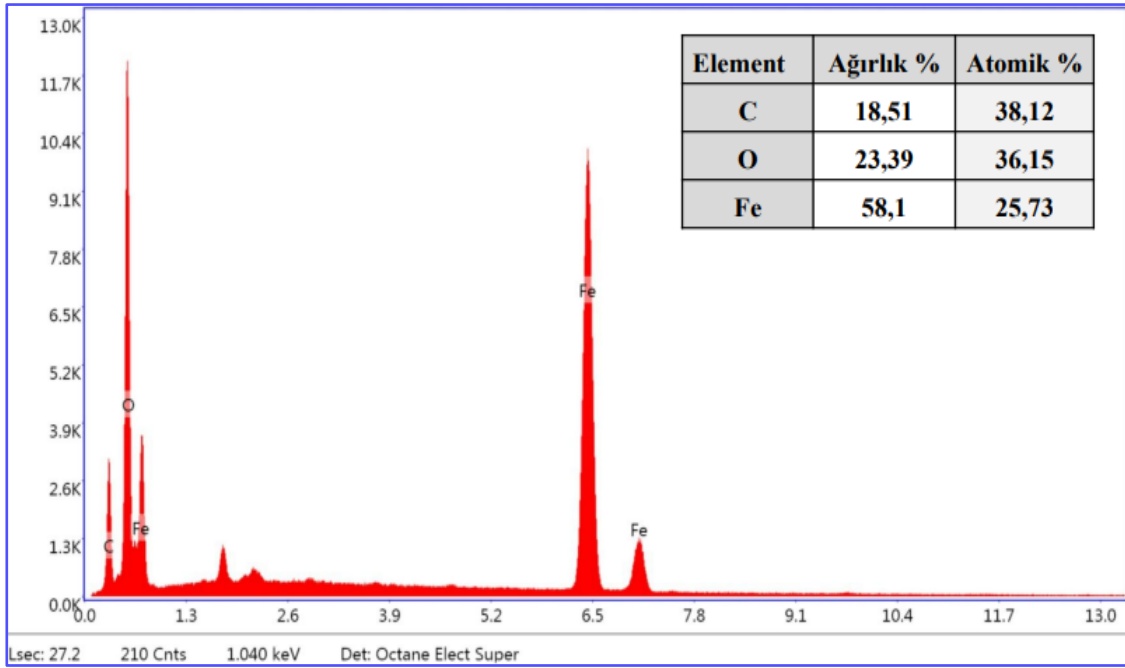
EDX (Enerji Dağılımı X-Ray Spektroskopisi) mikroanalizi, numunelerde bulunan elementlerin varlığını ortaya çıkaran karakteristik X ışınlarının üretilmesine dayanan, elektron mikroskobuyla ilişkili yüksek duyarlılığa sahip bir element analizi tekniğidir. Bu X-ışınları, kaynaklandıkları element için karakteristik özelliğindedir ve örnekte mevcut olan elementler hakkında bilgi içermektedir. EDX tekniği, özellikle NP'leri tespit etmek için son zamanlarda gittikçe daha yararlı hale gelmektedir. Ayrıca NP'lerdeki endojen element tayininde olduğu kadar, NP'lerin yapılarındaki ekzojen elementlerin tayininin (NP kirliliği) teşhisi bakımından da önemli bir yöntemdir. EDX mikroanalizi, özellikle ağır metal tespitinde büyük bir avantaj sağlamaktadır. EDX, elementlerin atom numarası 10'dan büyük olan elementleri tespit etmek mümkündür ve ağır elementleri içeren biyolojik numunelerin daha fazla tespit edilmelerini sağlamaktadır. Bu nedenle ilgili elementlerin ağır olduğu biliniyorsa anlamlıdır (Scimeca ve ark,2018). Biz de çalışmamızda, TQ-Fe, Mag ve Fit NP'lerinin elementel yapıları ve saflıkları Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9'de sunulduğu gibi, EDX yöntemi ile analiz edilerek bilgi edinilmiştir.



Şekil 4.7. TQFe NP'lerinin EDX görüntüsü ve içerik oranları.

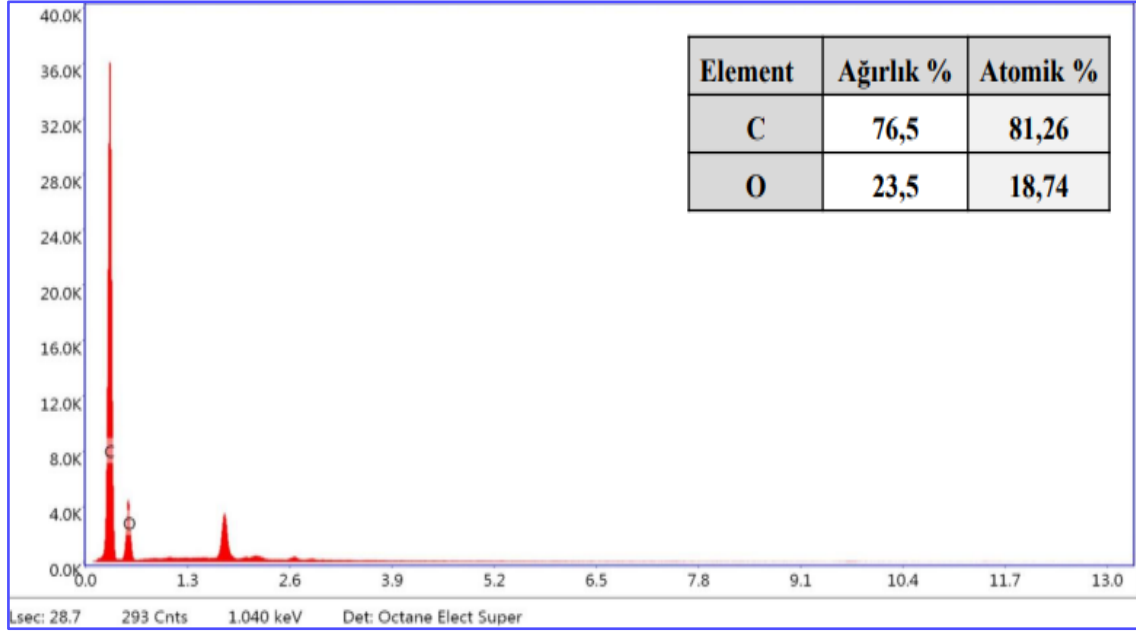
Şekil 4.7'da görülen EDX analizinde, yüksek oksijen miktarının demir oksitlerinin varlığı tespit edilmiştir. NP'lerin elemental analizi, numunede Fe oranını % 55,28 ve O

oranını % 31,7 oranlarında olduğunu göstermektedir. Oksijenin güçlü sinyalleri ve demir bölgesindeki güçlü sinyallerin birlikteliği, FeO şeklinde bağlanma oluşumunu doğrulamaktadır. Analizde görülen % 0,6 oranında bulunan Cl (Şekil 4.7), ihmal edilecek düzeyde olup, NP sentez aşamasındayken kullanılan FeCl₃ ve FeCl₂ içeriklerinden gelen ve reaksiyona girmemiş kalıntılar olarak görülmüştür. Ayrıca C oranını % 12,41 ve O oranının % 31,7 olarak ortamda bulunması ise, TQ'un varlığını göstermekte olup TQ-Fe NP'lerinin varlığını doğrulamakta ve içeriğin yüksek saflıkta olduğunu göstermektedir (Şekil 4.7).



Şekil 4.8. Mag NP'lerinin EDX görüntüsü ve içerik oranları.

Şekil 4.8'de görülen EDX analiz grafiğinde , Mag NP'lerinin yapısındaki Fe, O ve C elementlerinin verdiği pikler görülmektedir. EDX spektrumu demir bölgede yaklaşık 11 keV'de, ayrıca oksijende görülen çok güçlü bir sinyal ve yüksek C varlığı da görülmekte olup, her element yüzdesinin Fe (% 58,1), O (% 23,39) ve C (% 18,51) olduğunu göstermiş ve % ağırlıkça oranı en yüksek olarak demir bulunmuş (Şekil 4.8). Bu ise, hem Fe, hem de TQ varlığını göstermekte olup, Mag NP'lerin oluşumunu teyit etmekte ve ana bileşenlerin herhangi bir kirlenmeye uğramadığını göstermektedir (Şekil 4.7).



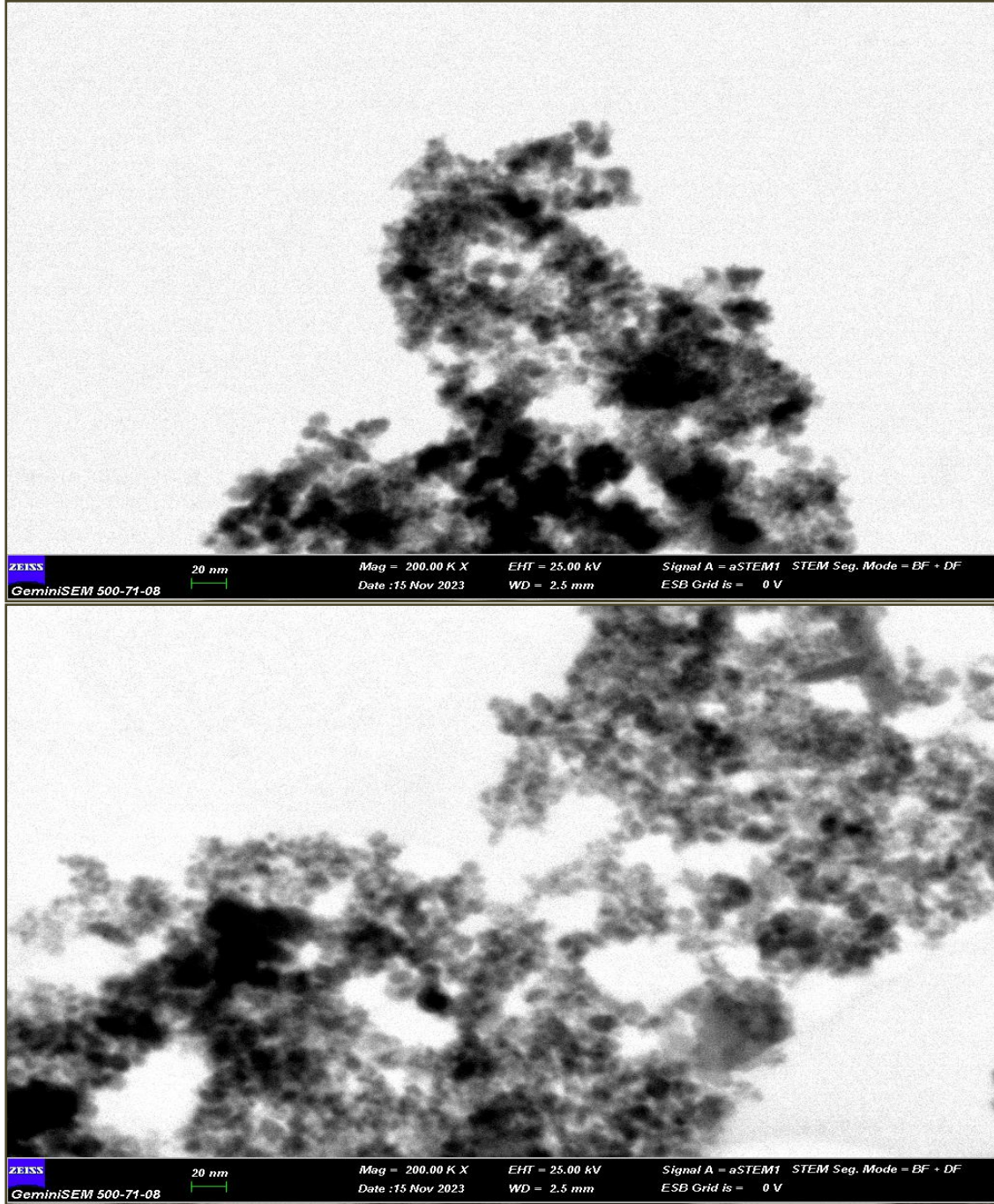
Şekil 4.9. Fit NP'lerinin EDX görüntüsü ve elementel analiz sonuçları.

Aynı şekilde Şekil 4.9'de görülen EDX analiz sonucuna göre, C (% 75,5) ve O (% 23,5) elementlerin ağırlıkça yüzdesi gösterilmektedir. Ayrıca C bölgesinde görülen çok güçlü bir sinyal ile hem C, hem de O varlığını göstermekte olup, başka bir elementel yapının görülmemesi ile oldukça temiz Fit NP'lerin oluşumunu teyit etmektedir (Şekil 4.9) (SEM- EDX analiz rapor sonuçları; Ek 1, Ek 2, Ek 3).

4.1.4. Nanopartiküllerin Morfolojik Analizi

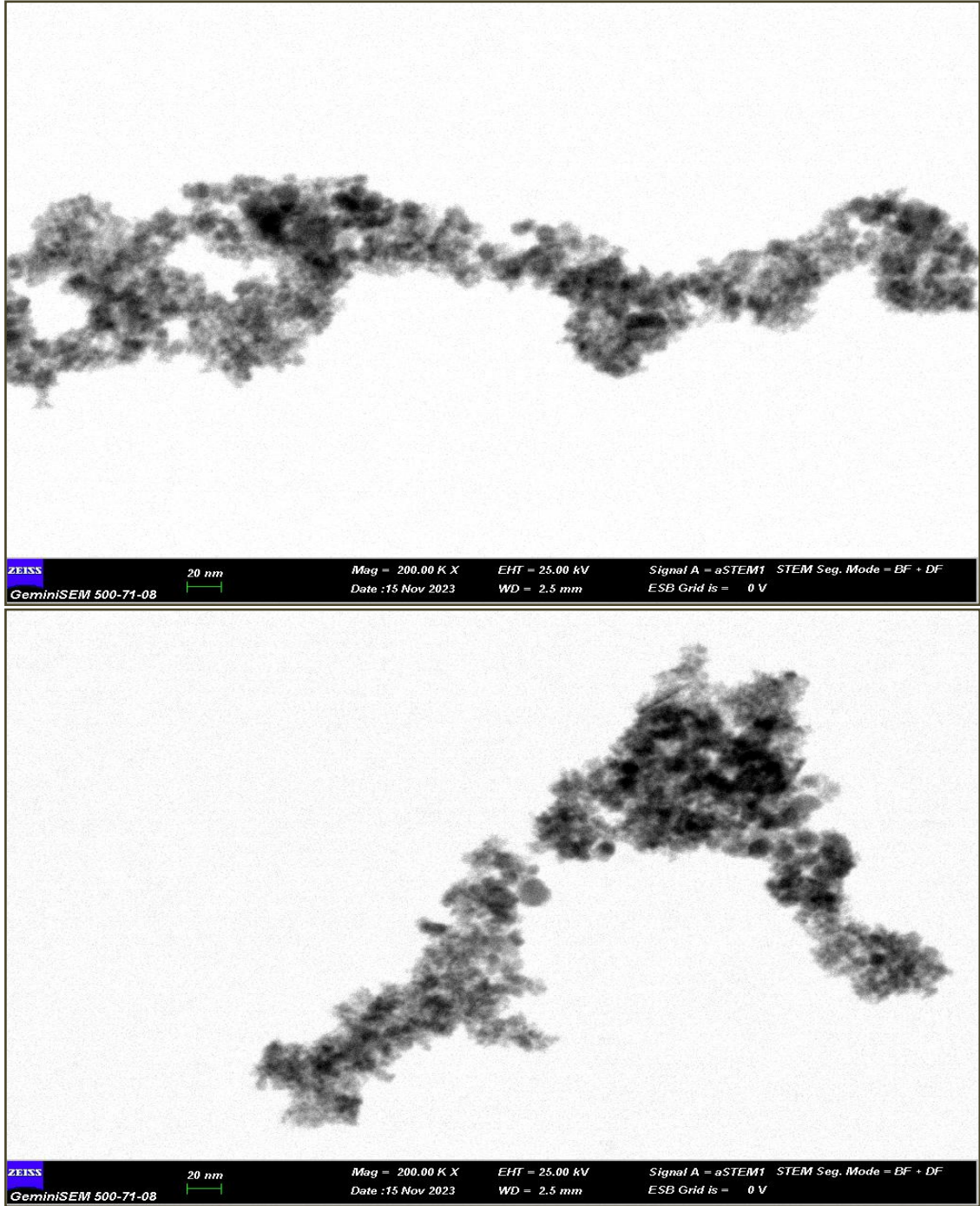
Taramalı Geçirimli Elektron Mikroskobu (STEM), hem TEM hem de SEM'in özelliklerine sahiptir. Atomik elementlerin yayılım ve varlığının saptanmasında ve elektron demetlerinin ince örnekleri delerek taranmasında STEM tercih edilmektedir. Yüksek enerjili elektronların örnek ile etkileşmesi ile oluşan elektron ve foton sinyalleri sonucunda, partiküllerin morfolojik yönden analizini sağlayan en güvenli yöntemlerden biridir (Sousa ve Leapman, 2012). Biz de sentezlediğimiz NP'lerimizin morfolojik yönden analizlerini yapabilmek için STEM (ZEISS – Gemini 500) verilerini kullandık. NP'ler süspansiyondan 10-15 µl kadar alınıp karbon bant üzerine damlatılarak, kaplama yapıldıktan sonra, nano oluşumların yüzey morfolojisi, tanecik boyutu ve şekli açısından STEM analizleri yapılmıştır. Nanopartiküllerin STEM görüntüleri, 100.00 ve 200.00 KX gibi çeşitli büyütme oranlarıyla incelenmiş ve STEM görüntüleri arasından

en net görüntüler alınarak değerlendirilmiştir. TQ-Fe, Mag ve Fit NP'lere ait STEM görüntüleri Şekil 4.10, Şekil 4.11 ve Şekil 4.12 ile sunulmuştur.



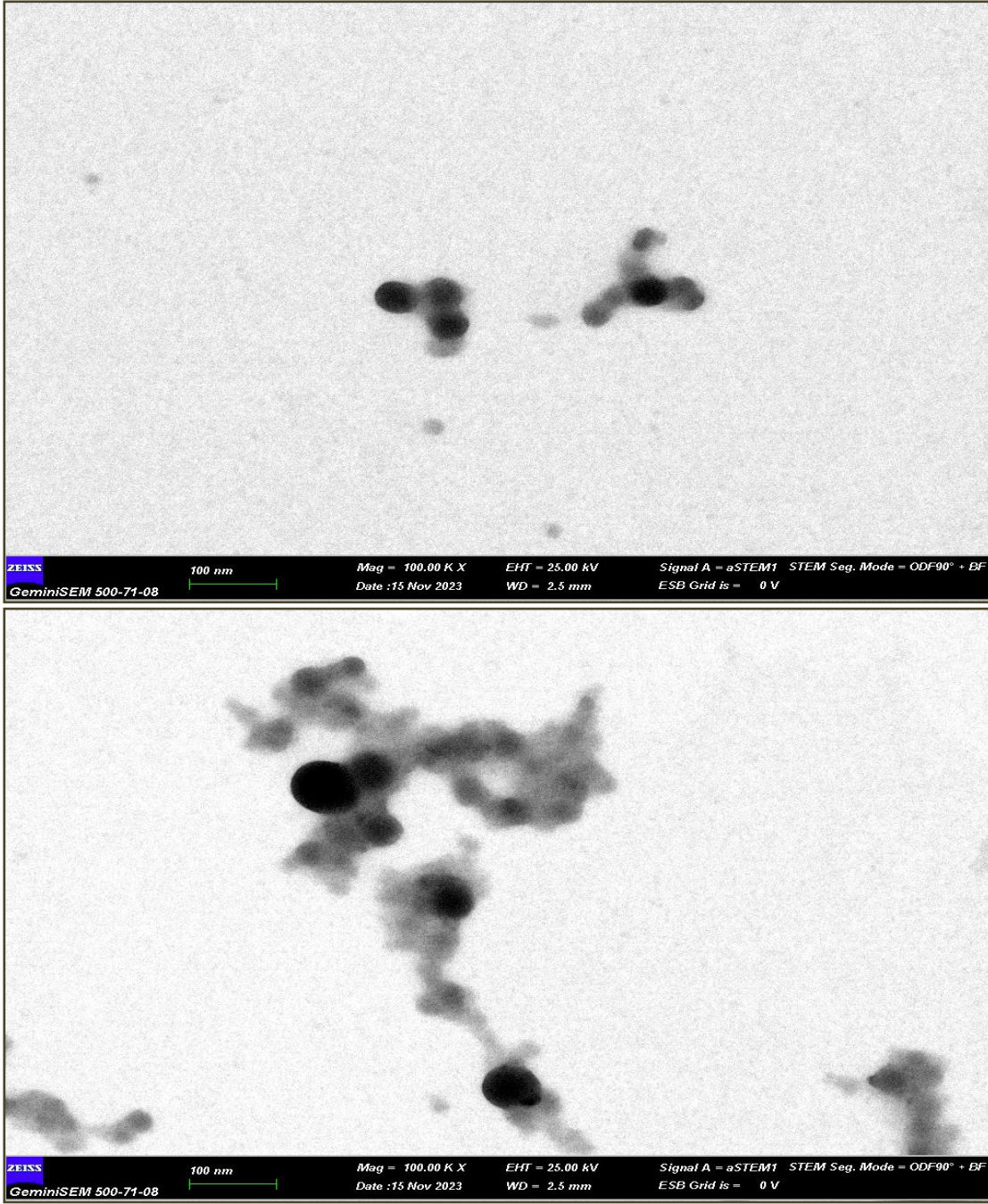
Şekil 4.10. TQFe NP'lerinin STEM görüntüleri (Büyütme:200.00 KX; Ölçek:20 nm)

TQ-Fe NP'lerinin STEM analizi incelendiğinde, nano boyutta küresel yapılar şeklinde morfoloji sergilediği görülmektedir (Şekil 4.10).



Şekil 4.11. Mag NP'lerinin STEM görüntüleri (Büyütme:200.00 KX; Ölçek:20 nm).

Mag NP grubunun STEM analizleri incelendiğinde, partiküllerin nanoboyutta küresel yapılar şeklinde morfoloji sergilediği görülmektedir (Şekil 4.11).



Şekil 4.12. Fe NP'lerinin STEM görüntüleri (Büyütme:100.00 KX; Ölçek:100 nm).

Fe NP'lerinin STEM görüntüleri incelendiğinde, nano boyutta küresel yapılar şeklinde morfoloji sergilediği görülmektedir (Şekil 4.12).

Genel olarak içerik bakımından benzer olan TQ-Fe ve Mag NP'lerinin STEM görüntülerinde dağılımlarına bakılacak olunursa (Şekil 4.10 ve Şekil 4.11), Mag NP'leri daha homojen dağılım gösterirken, TQ-Fe NP'lerinin yer yer agregasyona yatkın olduğu bilgisini veren kümelenmeler ve yer yer topaklanmalar görülmektedir. Bu durumun,

Mag NP'lerin TQ-Fe NP'lerinden farklı olarak, lipozomal yapılara yüklenmesinin, kümelenmeyi önleme açısından avantaj sağladığı söylenebilir. TQ-Fe NP'lerinin bu kümelenmeye eğilimleri, metalik yapıları nedeniyle ağır olmalarına ve yüzey kaplaması olmaması nedeniyle diğer partiküllerle daha çabuk etkileşebilmelerine bağlanabilir. Bundan dolayı partikül çapları her yerde eşit gözükmemekte ve yer yer kümelenmeler olduğundan daha büyük partikül boyutları göze çarpmaktadır. Mag NP'lerinde ise, yine demir içeriği olmasına rağmen, lipozomal yapılarla kaplı olması, daha homojen dağılımlı ve kümelenmelerin olmadığı, daha az koyu bölgeler şeklinde görünmesine neden olduğunu düşünmekteyiz. Sonuç olarak, tüm NP'lerin nano boyutlarda ve küresel nano yapılar olduğu, STEM analizleri sonucu görülmektedir (Şekil 4.10, Şekil 4.11 ve Şekil 4.12).

4.1.5. Nanopartiküllerin Boyutu, Dağılımı ve Zeta Potansiyel Değerleri

Sentezlenen TQ-Fe, Mag ve Fit NP formülasyonlarının boyut analizleri, çoklu dağılım indeksleri (polydispersity index) (Pdi) ve zeta potansiyelleri Malvern Zeta Sizer cihazında (Malvern Nano – ZS90), 25 °C'de, üç tekrarlı olarak belirlenmiştir.

20 µl'lik nanopartikül süspansiyon hacmi, 2 ml dW içinde seyreltilmiş ve Malvern Zeta Sizer cihazında, dinamik ışık saçılımı (DLS) ve zeta potansiyel olarak ölçülmüştür. Değerler, parçacık boyutu ve zeta potansiyel için, sırasıyla, medyan çap (D %50) ve milivolt (mV) olarak ifade edilmiştir. Birlikte Pdi için de veri sağlanmıştır. Sonuçlar Tablo 4.3 ile TQ-Fe, Mag ve Fit NP'lerine ait DLS-size, pdi, zeta potansiyel değerleri şeklinde toplu olarak gösterilmiş olup, boyut dağılım ve zeta potansiyel analiz grafikleri Şekil 4.13, Şekil 4.14 ve Şekil 4.15'de sunulmuştur.

DLS, zamana göre saçılan ışık yoğunluğundaki dalgalanmaların ölçümüdür. DLS'de bir çözelti tek renkli ışık huzmesinin yoluna yerleştirilmekte ve çözelti içerisindeki parçacıkların Brownian hareketiyle saçılan ışığın zamana bağlı olarak dalgalanma durumu ölçülmektedir. Bu nedenle, çözeltilerdeki saçılma yoğunluğu durumundaki dalgalanmaların davranışı, parçacıkların yayılması ile orantılı olduğu için, büyük parçacıkların küçük parçacıklara oranla daha yavaş yayılma özelliği baz alınarak, parçacıkların davranış istatistiği, parçacık boyutu ile ilişkilendirilmektedir, böylece, boyut ve agregasyonları hakkında bilgi vermesi nedeniyle parçacıkların hidrodinamik davranışları kullanılmaktadır. DLS, hızlı, tekrarlanabilirlik, yüksek stabilite ve yüksek

kantitatif analiz hassasiyeti gibi avantajlara sahiptir (Stetefeld ve ark., 2016). Çalışmamızda DLS sonuçlarına Tablo 4.3’de bakacak olursak, TQ-Fe NP’leri, $88,20 \pm 59,57$ boyutu ile, Mag NP’lerinden ($76,31 \pm 46,19$) daha büyük, Fit NP’leri ($87,49 \pm 45,80$) boyutlarında olduğu görülmektedir.

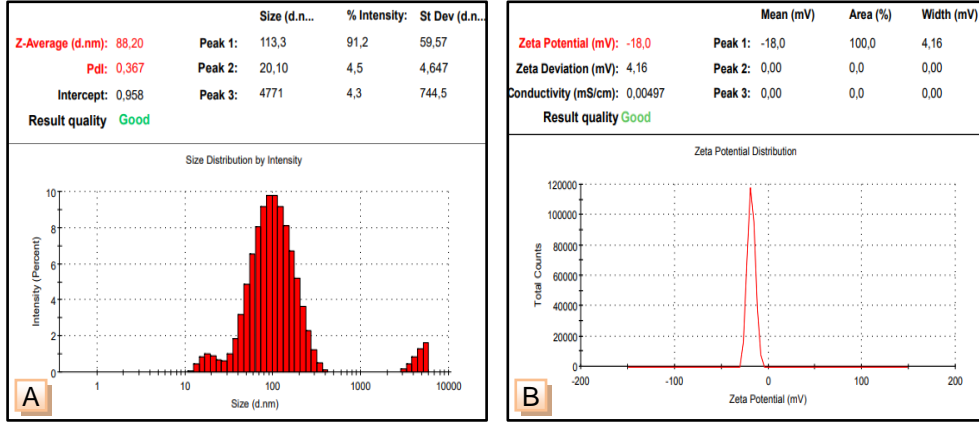
Çizelge 4.3. Nanopartikül gruplarının DLS-size, pdi, zeta potansiyel değerleri.

Grup		Nanopartiküller	DLS Size (nm)	Pdi	Zeta (mV)
Sayı	Kodu				
1	TQFeNp	Timokinon-Demir	$88,20 \pm 59,57$	0,367	$-18,0 \pm 4,16$
2	MagNp	Magnetolipozom	$76,31 \pm 46,19$	0,263	$-26,1 \pm 3,17$
3	FitNp	Fitozom	$87,49 \pm 45,80$	0,223	$33,2 \pm 5,41$

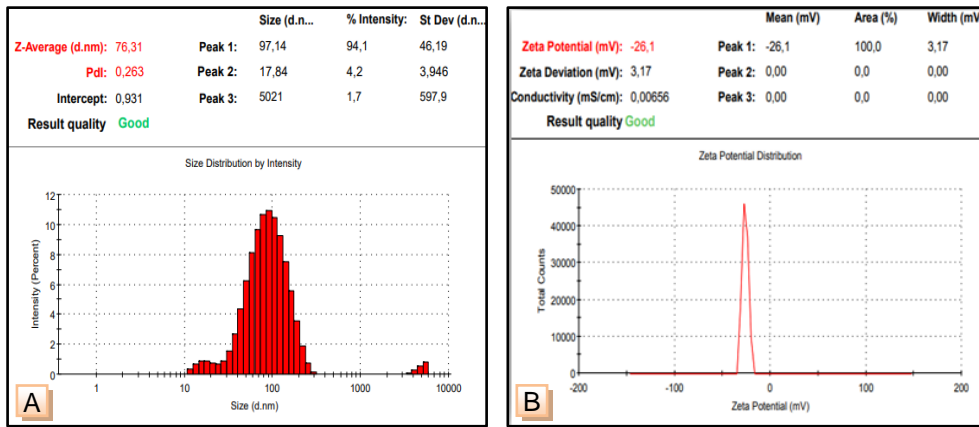
Kolloidal süspansiyonlar, ince katı partiküllerin sıvı bir ortama dağılmasıdır. Bir kolloidal sistemin kararlılığını, itici kuvvetler ile parçacıkların birbirine yaklaştıkça maruz kaldıkları Van Der Walls çekici kuvvetler belirlemektedir. İtici kuvvetler nedeniyle ortaya çıkan enerji bariyeri, iki parçacığın birbirine yaklaşmasını ve bir araya toplanmasını engellemektedir. Şayet kolloidal partiküller, bu enerji bariyerini aşacak kadar yeterli enerjiye sahip olursa, çekici kuvvetler, parçacıkların birbirini çekmesini sağlayarak temas ettirebilmektedir. O zaman, dispersiyondaki parçacıklar birbirine yapışarak ve yerçekimi nedeniyle çökerek gittikçe artan kümeler oluşturabilmektedir. Bu durum, kolloidal kararsızlık olarak adlandırılmaktadır (Titus ve ark., 2019). Çözelti gibi sulu ortamlarda NP’lerin homojen olarak dağılım özelliklerini göstermesi bakımından Pdi değerlerinden bilgi edinilmektedir. Bu bakımdan sonuçlarımıza bakılacak olunursa (Tablo 4.3), Fit NP’leri (0,223) ve Mag NP’leri ile benzer dağılıma (0,263) sahip ve oldukça homojen dağılımlı (monodispers) oldukları görülmektedir. TQ-Fe NP’leri ise, daha az homojen dağılım gösterdikleri (0,367) anlaşılmakta olup, Fit ve Mag NP’leri kadar dağılım yönünden iyi olmadıkları söylenebilir. Bu durumun STEM sonuçları ile de uyumlu olduğu görülmektedir. Daha önce açıklandığı gibi, TQ-Fe NP’lerin STEM görüntülerinden (Şekil 4.10) agregasyona benzer alanların olduğu belirtilmişti. Bu sonuçlara göre, Fit NP’leri, TQ-Fe ve Mag NP’lerine göre daha az homojen dağılımlı olduğu söylenebilir.

Sulu ortamdaki kolloidal sistemler bir elektrik yükü taşımaktadır. Yüzey yükünün miktarı, yüzey gruplarının asidik ya da bazik gücüne ve solüsyonun pH'ına bağlıdır. Bir partikül yüzeyinde net yükün artması, çevredeki temas bölgesindeki iyonların dağılımını etkiler ve böylece yüzeye yakın olan ve partiküle zıt yükte olan iyonların konsantrasyonunun artmasıyla, zıt yüklü iyonların yüzeye yakın olduğu bir alan oluşmaktadır. Bu durum, her partikülün çevresinde elektriksel bir çift katman oluşmasına neden olmaktadır. Bu katmanlar; iyonların kuvvetli bir şekilde bağlandığı bir iç katman (stern) ve iyonların daha gevşek olduğu bir dış (difüze) katmandır. Bu difüze bölge içinde, her partikülün tek bir varlık gibi davrandığı ve kayma yüzeyi olarak adlandırılan, kavramsal bir sınır bulunmaktadır. Bu sınırdaki potansiyel, zeta potansiyel olarak adlandırılmaktadır. Zeta potansiyelinin büyüklüğü, kolloidal sistemin potansiyel kararlılığı hakkında bir fikir vermektedir. Şayet süspansiyon içerisindeki tüm partiküller büyük negatif ya da büyük pozitif zeta potansiyeline sahipse, parçacıklar birbirini itme eğilimi içerisinde olup, partiküllerin bir araya gelmesini sağlayan bir eğilim bulunmadığı için dağılıma kararlılığı göstermektedir. (Titus ve ark., 2019). Bizim çalışmamızda, sentezlediğimiz NP gruplarındaki zeta potansiyel değerleri Tablo 4.3 şeklinde sunulmuştur. Grafik bilgileri Şekil 4.4, 4.7 ve 4.8'de görülmektedir. Demir içerikli gruplar olan TQ-Fe ve Mag NP'lerini zeta potansiyel değerleri, sırasıyla, $-18,0 \pm 4,16$ ve $-26,1 \pm 3,17$ olarak ölçülmüştür. Buradaki zeta potansiyel değerlerini, Mag NP'lerinde oldukça yüksek negatif değerde olmasına karşılık TQ-Fe NP'lerinde daha düşük zeta potansiyel değerini yansıtmaktadır. Bu durum, Mag NP'lerinin daha kararlı olduğunu göstermektedir.

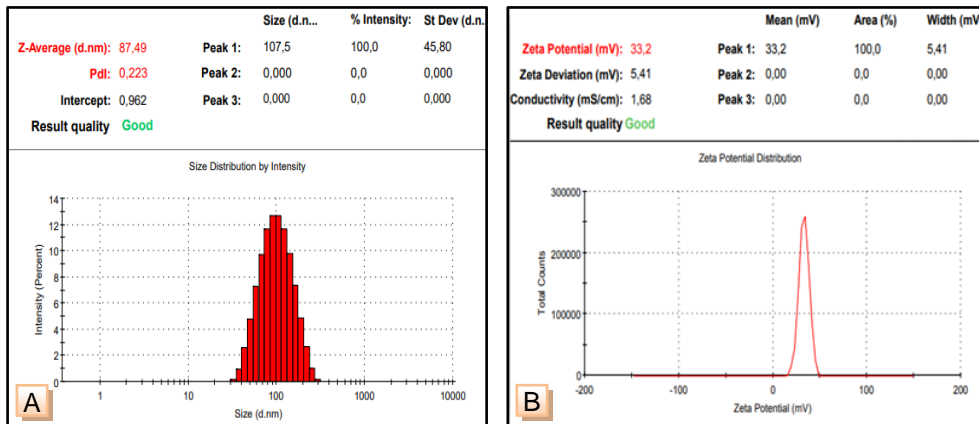
Bu sonuçlar, STEM analizleri ile de uyum göstermektedir. Bölüm 4.1.4'de belirttiğimiz gibi, TQ-Fe NP'lerinin STEM analizinde görülen kümeleşme eğilimi, zeta potansiyel değerinin daha düşük olmasına bağlı olarak, parçacıkların birleşerek çökme eğiliminde olması sonucudur (Şekil 4.10). Ayrıca, TQ-Fe NP'lerinin metalik ağırlıklarına bağlı olarak, zemin yüzeyine çökme eğilimleri de ilave bir etki yaratacağı düşünülmelidir. Bu durumda Mag NP'lerinin TQ-Fe NP'lerine göre daha kararlı ve stabil olması beklenmektedir. Fit NP'leri ise $+33,2 \pm 5,41$ zeta potansiyel değeri ile, pozitif yük ve yüksek zeta potansiyel değerlerinin, stabilite açısından ek avantajlar getireceğini düşünmekteyiz.



Şekil 4.13. TQ-Fe NP'lerine ait, A) size, pdi ve B) zeta analiz sonuçları.



Şekil 4.14. Mag NP'lerine ait, A) size, pdi ve B) zeta analiz sonuçları.



Şekil 4.15. Fit NP'lerine ait, A) size, pdi ve B) zeta analiz sonuçları.

Zeta potansiyeli, parçacıkların stabilitelelerinde (kararlılıkları) olduğu kadar, parçacıkların içinde bulunacakları sistemlerdeki davranışları hakkında da bilgi vermektedir. Ancak zeta potansiyeli, parçacığın yüzey yapısı kadar, parçacığın içinde

dağıldığı sıvının bileşimine de bağlıdır. Zeta potansiyelini etkileyen en önemli faktör pH'dır. Bu nedenle zeta potansiyeli, farklı pH değerlerinde, farklı yüzey potansiyellerini yansıtacaktır (Titus ve ark., 2019).

Bu nedenle, NP'lerin negatif ve pozitif özelliklerinin ek avantaj sağlayıp sağlamayacağı, içinde bulunduğu ortama da bağlıdır. Örneğin, kanser hücrelerinin bulunduğu asidik ortam nedeniyle Fit NP'leri daha da pozitif değer kazanarak, daha kararlı duruma gelmesi, Fit NP grubu için bir avantaj teşkil edecektir. Mag NP'lerinde ise, kanser hücrelerinin asidik çevresi, Mag NP'lerinin negatif değerliğini nötrleme etkisi yüzünden, düşürerek sifıra daha yaklaştıracak ve bu durum düşük zeta potansiyel değeri ile NP'leri kanser bölgesinde daha az kararlı hale getirerek agregasyon olmalarını sağlayacağı göz önünde bulundurulursa, bu agregasyonun kanser ortamında daha uzun süre kalma etkisine neden olması açısından değerlendirilebileceği düşünülebilir.

Ayrıca, yapılan çalışmalarda negatif yüklü veziküler sistemlerin, pozitif ve nötral veziküler sistemlere göre etken madde tutma kapasitesinin daha fazla olduğu bildirilmektedir. (Shete ve ark, 2013). Bu bakımdan sonuçlara bakıldığında, negatif yüklü olan TQ-Fe NP'lerinin (% 89) ve Mag (% 76) NP'lerinin, pozitif yüklü Fit NP'lerine (% 81) göre daha yüksek % EE değerleri, bu literature bilgisini desteklemektedir (Burada Mag NP'lerinin başlangıç etken madde yüzdesi % 89 olduğu için, bu değer, % 100 olarak kabul edilirse, Mag NP'lerinin gerçek % EE değeri, % 76 değil, % 85 olduğu anlaşılır) Bu bakımdan, NP yapım aşamasında, NP'lerin kullanım amaçları düşünülerek dizayn edilmesi önemli bir unsur olarak gözükmektedir

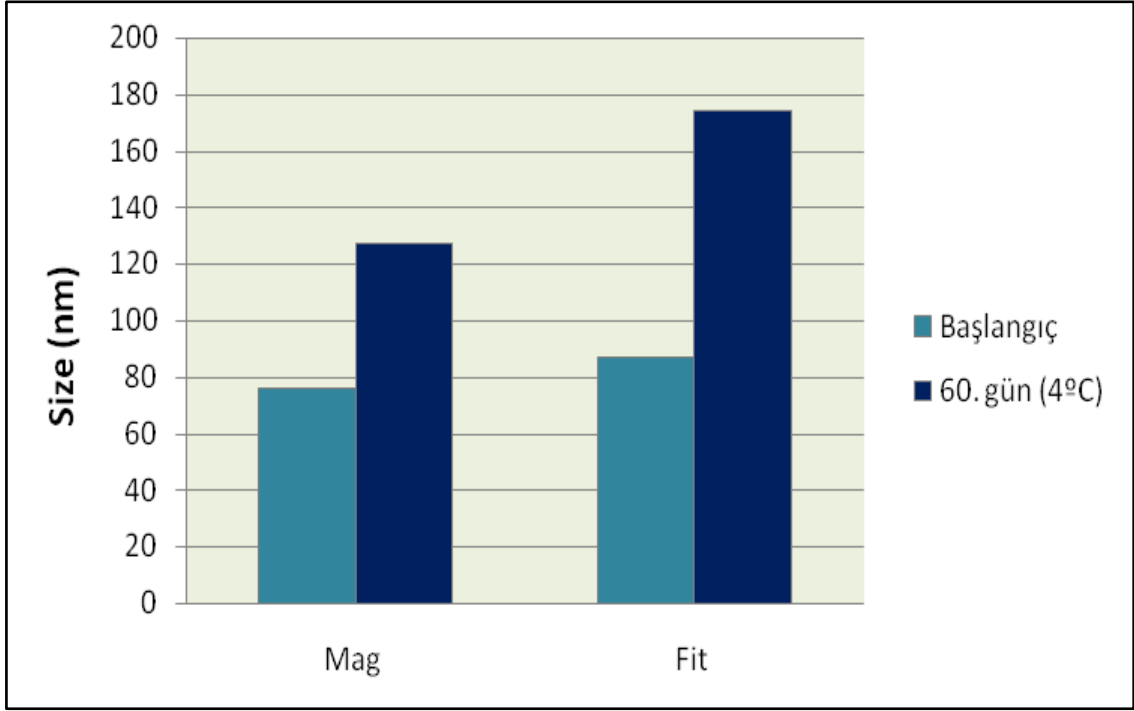
Ayrıca, NP yapım aşamasında kullanılan çözücü de pH değerleri üzerinde, dolayısıyla NP'lerin zeta potansiyelleri üzerinde etkisi olacaktır (Titus ve ark., 2019). Bu nedenle, biz çalışmamızda, Fit NP'lerini sentezlerken zayıf asidik özellik göstermesi nedeniyle DMSO içinde çözmeyiz, Fit NP'lerinin pozitif zeta potansiyel özellik kazanmasında rol oynadığı düşüncesindeyiz. Keza TQ-Fe NP'lerinin sentezinde, dolayısı ile Mag NP'lerinin sentezinde de ortamın yüksek bazik olma şartı, bu iki NP'lerin negatif değer almasında katkı sağlayan unsurların başında gelmektedir. Bu durum iyi bir yıkama ve kurutma işlemleri ile giderilebilmektedir. Bu nedenle TQ-Fe ve Mag NP'lerin negativiteliğinin çok yüksek olmaması, yapım aşamсындаki yüksek pH'nın etkisinin az olduğunu göstermektedir.

Partikül büyüklüğü bakımından zeta potansiyel değerleri ile karşılaştıracak olursak, DLS analiz sonuçlarına göre, Mag NP grubu en düşük boyutlara sahip grup olarak belirlenmiştir. Ayrıca TQ-Fe ve Mag NP'leri kendi arasında karşılaştırılacak olunursa, Mag NP'lerinin lipozomlanmaları nedeniyle, TQ-Fe NP'lerinden daha büyük boyutlu olması beklenirken, daha küçük boyutlu olduğu görülmektedir. TQFe NP'lerinin DLS size değeri ($88,20 \pm 59,57$ nm), Mag NP'lerinin DLS size değerlerine ($76,31 \pm 46,19$ nm) göre daha büyük değerde olduğu görülmekte olup, zeta potansiyeller ile uyumlu olduğunu şeklinde yorumlanabilir, ancak STEM sonuçlarına bakıldığında (Şekil 4.10), TQ-Fe NP'lerinin boyutları (~ 10 nm), Mag NP'lerinin boyutlarından ($\sim 15-20$ nm) daha küçük olduğu anlaşılmaktadır. DLS ölçümlerinin, çözelti içerisinde ölçülmesi nedeniyle, NP'ler, çözeltinin pH değeri, sıcaklıktan etkilenebilmekte, demir gibi ağır NP'lerde graviteye bağlı tabana çökme ile kümeleşmeler görülebilmektedir. Ayrıca TQ-Fe NP'lerinin STEM sonuçlarına bakıldığında (Şekil 4.10) görülen yer yer kümeleşmeler, sulu ortamlarda, özellikle metal NP'lerin (TQ-Fe NP'lerinde olduğu gibi) kaplanmadıkları durumlarda, partikül yüzeyinin su molekülleri ile etkileşmesi sonucu, partiküllerin olduğundan daha büyük boyutlarda ölçülmesi görülebilen bir durumdur. Bu nedenle, TQ-Fe NP'lerinin DLS ve STEM ölçümlerindeki boyut farklılığının (Şekil 4.10, Şekil 4.13) buna bağlı olduğunu ve Mag NP'lerindeki lipozomlanmanın karakterizasyon açısından ek avantajlar sağlayacağı söylenebilir.

Sonuç olarak, sentezlediğimiz özellikle Fit ve Mag NP'lerinin boyut, dağılım ve yüzey yükü bakımından, partiküllerin agregasyonunu önleme, oldukça homojen koloidal dağılım ve % 100 nm'in altında olması bakımından kanser hücrelerine uygulamada (özellikle KBB' açısından) yeterli boyutlarda olmaları yönüyle uygun nanopartiküler yapılar oldukları söylenebilir.

4.1.6. Nanopartiküllerin Fiziksel Stabilite Çalışmaları

Stabilite çalışmaları, Bölüm 3.2.4'te anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Çalışmamızda, sentezlediğimiz Mag ve Fit NP'lerinin dispersiyonları ve boyutsal değişimleri, $+4$ °C'de 60 gün boyunca aynı koşullarda bekletmek suretiyle izlenmiştir. Depolama süresi boyunca fiziksel parametrelerin değişmemesine dikkat edilmiştir. Şekil 4.16'da Mag ve Fit NP formülasyonlarının başlangıç ve 60 gün sonraki ortalama partikül boyutu sonuçlarının grafiği sunulmuştur.

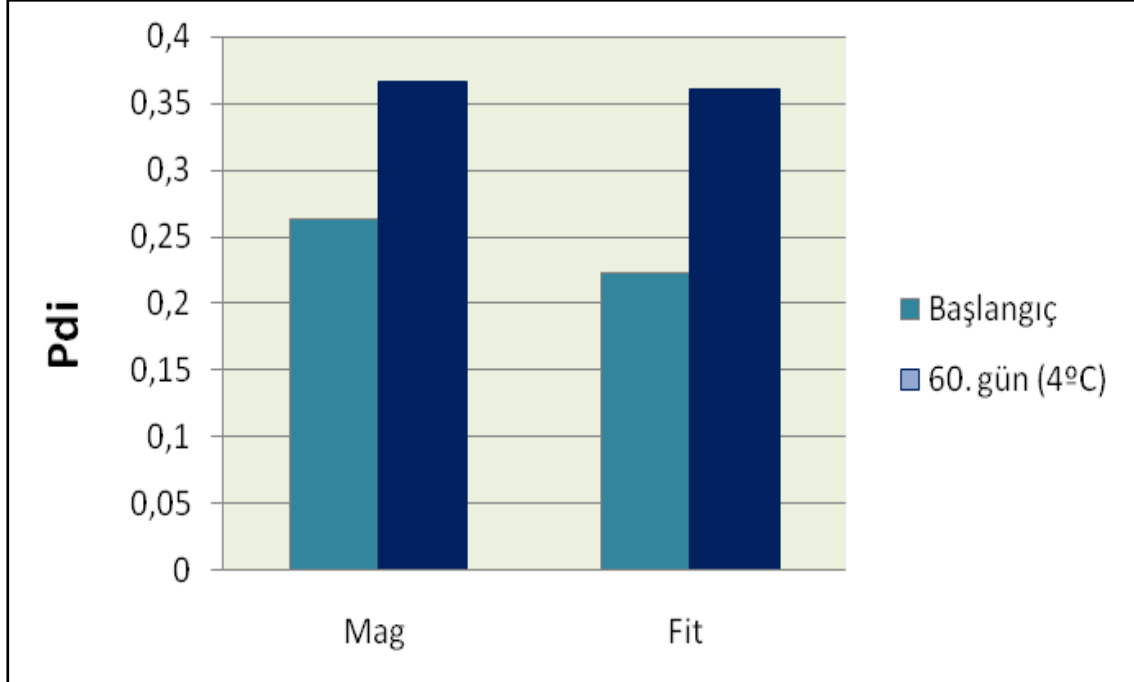


Şekil 4.16. 4°C’de bekletilen Mag ve Fit NP’lerinin başlangıç ve 60. günlerdeki boyut indekslerindeki değişim değerleri.

Lipozomların stabilitesindeki değişikliklerini gösteren ilk belirtiler, genellikle agregasyon, lipozom hacminin büyümesi ya da veziküllerden sızmaların olması gibi bozunmayı gösteren fiziksel değişikliklerdir ve makroskopik düzeyde görünmeye neden olmaktadır (Heurtault ve ark., 2003; Fulton ve Najahi-Missaoui, 2023). Yaptığımız stabilite deneyinde, 60. günde her iki koloidal NP dispersiyonları gözlemlendiğinde, herhangi bir bulanıklık ve tabaka ayrılması gözlenmemiştir. Mag NP formülasyonları çözelti içinde çökmekle birlikte, magnet etkisiyle toplanarak ve kolaylıkla yeniden dağılarak homojen hale getirilebilmiştir. Bu duruma, NP dispersiyonlarını +4 °C gibi faz geçiş sıcaklığından uzak bir sıcaklıkta saklamanın ve stabil vaziyette bekletmenin etkisi olduğu düşünülmektedir. (Heurtault ve ark., 2003).

Lipozomların stabilitesinin korunmasında öncelikle lipozomun yapısı, etken maddenin lipozomda tutulduğu faz, etken maddenin hidrofilik ya da hidrofobik olması, lipozomun büyüklüğü, lipozomun yükü, hazırlama koşulları ve depolama şartları önemli rol oynamaktadır. Ancak, lipozomların stabilitesini etkileyen en önemli faktör, bunların temel yapılarını oluşturan fosfolipidlerin kimyasal stabilitesidir (Heurtault ve ark., 2003; Lei ve ark., 2022; Attama ve ark, 2012). Lipozom membranı, dinamik bir

fosfolipit membranıdır. Fosfolipitler sürekli olarak transmembran hareketine maruz kalabilir, böylece lipozom partiküllerinin toplanmasına, çökmesine ve dengesiz fosfolipit membranlar oluşmasına neden olabilmektedir. Bu da, lipozomların fiziksel ve morfolojik yapısının dengesizliğine yol açabilmektedir. Ayrıca fosfolipitlerin oksidasyonu ve hidrolizi de lipozomların kimyasal kararsızlığına yol açan iki ana mekanizmadır (Grit ve Crommelin, 1993). Bu iki mekanizma özellikle doymamış yağ asitlerinden oluşan fosfolipitler için önemli bir sorun olmaktadır. Ancak, antioksidan özellikli bileşiklerin lipozomlara eklenmesi ile daha uzun süre stabilite sağlanabileceğini belirtilmektedir (Gibis ve ark., 2012). Panya ve arkadaşları (2010), yaptıkları bir çalışmada, lipozomların stabilitesini korumanın en etkili yöntemlerinden biri olarak, antioksidan eklenmesi olduğunu bildirmişlerdir. Lipozomal sistemlerin hazırlanması ve kullanılmasına kadar geçen sürede ortaya çıkabilecek en önemli değişikliklerden biri, yapısındaki temel bileşeni olan lipidlerin oksidasyona uğramalarıdır. Bu nedenle, ürün kalitesini korumak için bu oksidasyonun yavaşlatılarak çabuk bozunmadan korumak ve stabiliteyi arttırmak amacıyla antioksidan özellikteki madde ilavesinin oldukça önemli olduğu bildirilmiştir.



Şekil 4.17. 4°C’de bekletilen Mag ve Fit NP’lerinin başlangıç ve 60. günlerdeki pdi indekslerindeki değişim değerleri.

Biz de, Mag ve Fit lipozomal yapılarını oluşturmak için fosfatidilkolini kullandık. Doğal nanoyapılı ilaç taşıyıcı sistemlerin sentezi için, gerek daha hijyenik, ekonomik ve güvenli oluşu bakımından, gerekse stabilite açısından, tamamen doğal ve bitkisel kaynaklı olan soya fasülyesi fosfatidilkolini (lesitin) lipozomal NP'lerini sentezlemek üzere seçtik. Lipozomal yapıların en büyük dezavantajlarından birisi, lipit yapıların yağ asidi kuyruğunda bulunan çifte bağ nedeniyle, lipit oksidasyonunun hızlı gelişmesi sonucu görülen stabilite sorunudur. Bu nedenle, soya fasulyesi fosfatidilkolinin yağ asit zincirinde bir tek çift zincir bulunmasının (Panya ve ark., 2010), stabilite açısından bir avantaj sağlayacağını varsaydık. Ayrıca, stabilite yönünden önemli bir avantajın da TQ olduğunu düşünmemizin nedeni; lipozomal özellikteki Mag ve Fit NP'lerini, antioksidan özelliği (Mansour ve ark., 2001) ile lipit oksidasyonundan; antimikrobiyal etkisi (Shoieb ve ark., 2003) ile, mikroorganizma saldırısından koruyarak, hijyen ve stabilite sağlayacağını düşünmemizdir. Bu bakımdan, TQ'un lipozomal yapılar üzerindeki antioksidan ve antimikrobiyal etkilerinin partikül boyutuna nasıl etki ettiğini anlamak için stabilite deneyi ayrıca önem arz etmektedir.

Şekil 4.16 ve Şekil 4.17'de görülen stabilite deney sonuçlarına bakılacak olursa, +4°C sıcaklıkta bekletilen, sentezlediğimiz lesitin kaynaklı Mag ve Fit NP formülasyonlarının, 60. günde hem boyutlarında hem de pdi oranlarında artışların olduğu görülmektedir. NP'lerin 60. gündeki boyutları, başlangıçtaki boyutlarına göre karşılaştırılacak olursa, Mag NP formülasyonlarının boyutları, başlangıca göre 60. günde 1,67 kat arttığı; Fit NP'lerinin 60. gündeki boyutları ise, başlangıca göre 1,99 kat arttığı görülmektedir (Şekil 4.16). NP'lerin +4°C'de 60 gün bekletilmesi sonucunda aldığımız pdi verilerinin sonuçlarına baktığımızda, Mag NP'lerinin başlangıca göre 60. gündeki pdi oranı % 39,1; Fit NP'lerinin ise başlangıca göre 60. gündeki pdi oranının % 61,9 arttığı görülmektedir (Şekil 4.17). Bu verilere göre tüm NP'lerin zamanla boyutsal büyüme oranları sırasıyla, Fit NP > Mag NP şeklinde olduğu görülmektedir. Pdi indeksi, 0,350 değerlerine kadar partikül dağılımı homojen dağılımlı (monodispers) olarak kabul edilmektedir (Stetefeld ve ark, 2016). Sonuçlara bakıldığında, artış oranlarına göre, 60. günde pdi oranlarının 0,350'nin üstünde olması, homojen dağılım konusunda sıkıntıların olabileceğini göstermekle birlikte, 0,400'ün altındaki değerlerin, NP'lerin birbirine yapışarak agregasyona uğramadıklarını, dağılımın homojenliğinin hala etkinliğini koruyabildiğini göstermektedir (Javed ve Mashwani, 2020). Sonuç olarak, lipozomal yapılar için oldukça uzun sayılabilecek 60 günlük sürede görülen bu

değerler, her iki lipozomal yapıların, oldukça kararlı, orta derece stabil olduğu, ancak stabilitesini arttıracak ileri çalışmalarla daha iyi sonuçlar alınabileceği söylenilebilir.

Yine oksidasyonu tetikleyebilecek nedenlerden biri de ortamda geçiş metallerinin (demir gibi) varlığıdır. Bu metaller oksidasyon reaksiyonunu destekleyen özellikler göstermektedir (Gibis ve ark., 2012). Ancak lipozom membranları arasında özellikle büyük, polar veya iyonik maddeler, küçük molekül ağırlığına sahip lipofilik maddelerden daha etkili biçimde tutunmaya neden olmaktadır (Heurtault ve ark., 2003).

Bu durum, Mag NP'lerinin yapısında bulunan demirin, NP stabilitesi açısından hem avantaj hem de dezavantaj olabileceğini düşündürmektedir. Ancak sonuçlara baktığımızda, Mag NP'lerinin, boyut ve pdi bakımından, Fit NP'lerine oranla daha yavaş büyüdüğü ve daha fazla homojen dağılım gösterdiği anlaşılmaktadır. Dolayısıyla, yukarıda belirtilen literatür bilgilerine göre; demir iyonlarının TQ ile bağlı olması daha büyük iyonik madde oluşturmaları nedeniyle lipit yapılara daha etkili tutunmayı sağlayarak lipit bozulmasının yavaşlamasında etki gösterdikleri anlaşılmaktadır. Yine Fit NP'lerinde, küçük molekül ağırlığına sahip lipofilik TQ'un lipit yapılara bağlanması da lipit bozulmasının yavaşlamasında etkili olabileceğini düşündürmektedir.

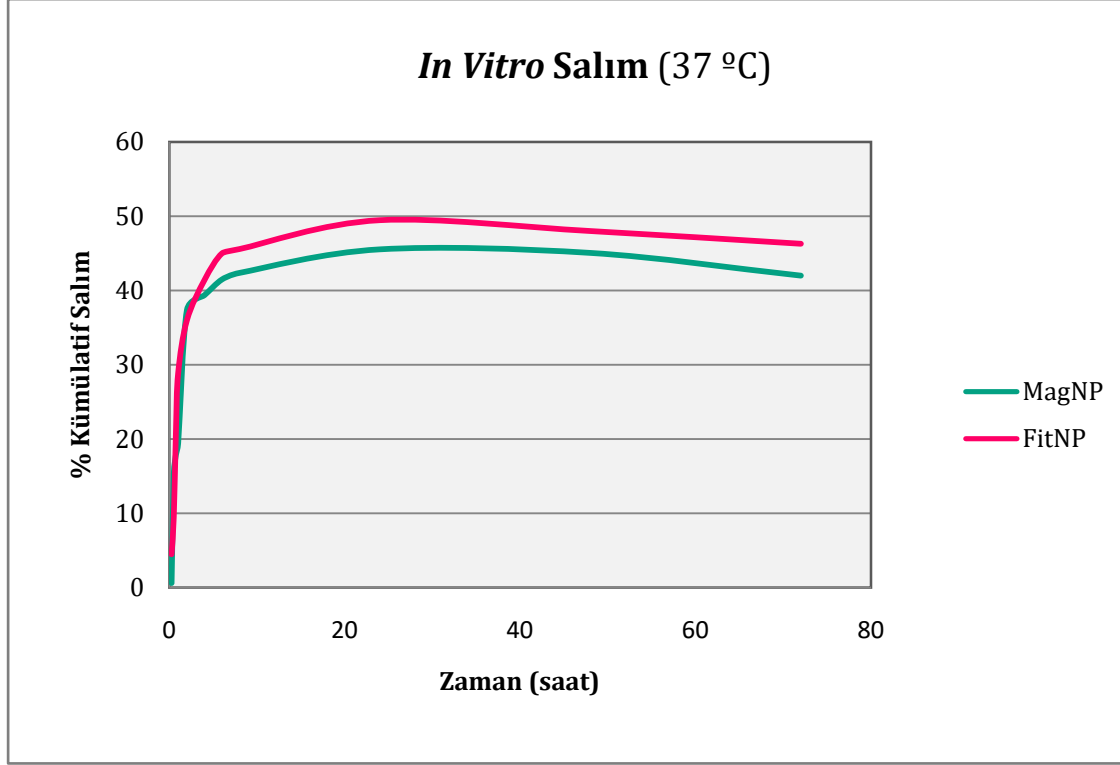
Bunların dışında, lipozomların yüzey yükü de ortamdaki yüklü diğer moleküllerle elektrostatik etkileşimleri nedeniyle stabiliteyi etkileyebileceği için koloidal sistemlerin kararlılığını değerlendirmede kullanılmaktadır. Böylece, NP'lerin stabilizasyonu, sistemin bulunduğu ortamın iyonları, yani pH konsantrasyonu ile değiştirilebilmektedir (Titus ve ark, 2019). Yapılan bir çalışmada, 3 / 4'ü soya fosfatidilkolin olan lipozomal yapıların, pH:3'te, zeta potansiyel değeri -21.8 iken, pH:11'e yükseltildiğinde yüzey yükünün -57.7 değerine çıktığı gösterilmiş ve farklı pH değerlerinde lipozomal NP'lerde, yüzey yükünün de etkilendiği bildirilmiştir (Gibis ve ark., 2012). Yüksek zeta potansiyeli olan NP'ler, partiküller arası yüksek elektrostatik itme kuvvetinin olmasından dolayı depolanma süresinde koagüle olmayacaklarını göstermektedir (Shete ve ark, 2013) (Ek 4, Mag ve Fit NP'lerinin 60. gün size ve pdi sonuçları ve analiz raporları).

4.1.7. Nanopartiküllerin *In Vitro* Salım Çalışmaları

In vitro salım çalışmaları, Bölüm 3.2.5'te anlatıldığı şekilde yapılmıştır. NP'lerin *in vitro* salım çalışmalarında diyaliz yöntemi kullanılmıştır (Hoiuchi ve ark., 2005). Mag ve Fit NP'lerin, 37 °C'de, 100 ml PBS (pH = 7.4) içinde süspansiyon edilmiş dializ membrandan TQ için yaptıkları *in vitro* salım deneyleri, yatay çalkalayıcı ile 72 saat süreyle takip edilerek gerçekleştirilmiş ve belirli zaman aralıklarında alınan örnekler, en az üç tekrarlı olarak UV-Vis spektrofotometrede ölçülen absorbans değerlerinden, konsantrasyonları ve yüzdeleri hesaplanarak, zamanın fonksiyonu olarak % kümülatif salım miktarının gösterildiği *in vitro* salım grafiği çizilmiş ve Şekil 4.18'de sunulmuştur.

Şekil 4.18'e baktığımızda, 37 °C'deki inkübasyonun ilk 8 saat içinde Mag NP'leri TQ için ortalama % 42, Fit NP'leri ise TQ için ortalama % 47 salım yaptığı görülmektedir. Yine salım grafiği incelendiğinde, 72 saat sonunda Mag NP'lerinin TQ için ortalama yine % 42 oranında; Fit NP'lerinin TQ için ortalama yine % 47 oranında salım yaptığı görülmektedir. Buradan, yaklaşık olarak ilk 8 saatten 72 saate kadar salım hızı ortalama monoton bir yapıya dönüştüğü anlaşılmaktadır. Bu da, patlama etkisinden sonra yavaş, kontrollü salım olduğunu göstermektedir.

Sonuçlarımıza göre, Mag ve Fit NP'lerinin, ilk 8 saat içerisinde salımın büyük çoğunluğunu yaptığı görülmektedir ve bu durum "burst effect" olarak ifade edilen, hızlı başlangıç salım anlamında bir etki mekanizması ile açıklanabilmektedir. Nanopartiküler ilaç dağılım sistemlerinde *in vitro* salım, NP'ün boyutu ile ters orantılı olmaktadır. Büyük boyutlu NP'lerin daha yavaş salım gösterdiği, küçük boyutlu NP'lerin ise daha hızlı salım yaptığı gözlenmiştir. Bu durum, NP'lerde boyut küçüldükçe yüzey alanının büyümesine bağlı olarak, daha büyük yüzey alanı olması nedeniyle daha fazla salım yapması anlamındadır ve bu nedenle, NP'lerin ani salım (burst effect) yapılmış gibi görünmesine neden olmaktadır. Bu etki, etken maddenin boyutuna bağlı olabileceği gibi, etken maddenin lipozoma zayıf şekilde bağlanmasından dolayı da olabilmektedir (Nounou ve ark., 2006; Lu ve ark., 2011).



Şekil 4.18. Mag ve Fit NP gruplarının zamana (saat) karşı *in vitro* salım (%) grafiği.

Vücutta aşınabilen lipozomlar gibi ilaç salım sistemlerinde, salım hızı difüzyon veya aşınma ile kontrol edilmektedir. Difüzyon hızı, konsantrasyon gradientine bağlıdır, yani, yüksek konsantrasyondan düşük konsantrasyona doğrudur ve enerji gerektirmemektedir (Fick Diffüzyon kanunu, 1.derece kinetiği) (Kamaly ve ark., 2008; Hasan ve ark., 2007). Bizim de çalıştığımız lipozomal NP'ler olan Mag ve Fit NP'leri, sulu fazda olması nedeniyle 1. derece kinetiğiyle salım göstermektedirler. Ayrıca, bizim Mag ve Fit NP'lerimizde olduğu gibi, % EE verimi yüksek olan NP'lerdeki salım da, iç kısımdaki konsantrasyonun dış kısımdan çok daha fazla olması nedeniyle, 1. derece kinetiğine bağlı olarak hızlı olacaktır.

Aşınma durumunda ise, etken maddenin salınım faz zamanı azalmaktadır. Lipozomal matris aşınmaya uğrarken ilaç salınmaktadır. Şayet, lipozomun aşınması, etken maddenin difüzyonuna oranla yavaş ise, salımın difüzyon kontrollü olduğu anlaşılır. Ancak etken madde lipozomal yapılarda immobilize edilmişse ve difüzyon aşınmaya göre yavaş ise, o zaman ilaç salım hızının aşınma kontrollü olduğu anlaşılır. Bu nedenle aşınma, yalnızca dışardan değil, içten de olabilmektedir. Etken maddenin her salınması,

aynı zamanda lipozom duvarının aşınması anlamına da gelmektedir (Nounou ve ark., 2006; Huang ve Brazel, 2001).

Bu durumda, bizim sentezlediğimiz Mag ve Fit NP'lerinde etken maddelerin lipit yapıya bağlanarak immobilize olmaları, her salım olduğunda kütle kaybı ile birlikte lipit yapının aşınması anlamına da geleceği için Mag ve Fit NP'leri aşınma kontrollü olacaktır. Ancak Mag ve Fit NP'lerinin yüksek % EE verimli olmaları, difüzyon kontrollü olduğu anlamına da geleceği için, Mag ve Fit NP'lerinin, hem aşınma hem de difüzyon kontrollü olduğu anlaşılmaktadır. Bunun dışında, Mag ve Fit NP'lerinin boyutlarının küçük olması, yüzey alanının büyük olmasına neden olduğundan, yine salım fazla olacaktır. Ayrıca TQ'un kendi boyutunun küçük olması da geçişin daha hızlı olmasında etkili olmaktadır. Tüm bu etkenler birleştiğinde, Mag ve Fit NP'lerinde gördüğümüz ilk 8 saatteki bu patlama etkili (burst effect) salımın nedenleri anlaşılmaktadır. Ancak literatürde, bizim verilerimizle uyumlu olarak, bu etkiden sonra genellikle kontrollü yavaş salımın gerçekleştiği bildirilmektedir (Babos ve ark., 2018). Ayrıca, Mag ve Fit NP'lerinin başlangıçtaki patlama etkili salımının, kanser hücrelerindeki düşük pH durumunda daha da çok etkili olacağı varsayılırsa, kanser hücre sitotoksitesinde avantaj sağlayacağı öngörülebilir.

Bu tez çalışmasındaki TQ bazlı Mag ve Fit NP'lerinin *in vitro* salım çalışmalarındaki bulgular, literatürdeki TQ bazlı NP'ler ile yapılan diğer *in vitro* salım çalışmaları ile de paralellik göstermektedir. Alhakamy ve arkadaşlarının (2020) TQ bazlı fitozomlar (~ 45 nm boyutlu) sentezleyerek yaptıkları bir çalışmada, NP'lerin *in vitro* salımlarının ilk iki saat içinde patlama tarzında (burst effect) olduğunu bildirmişlerdir. Yine, bir başka çalışmada, TQ bazlı demir NP'lerini (~ 30 - 50 nm boyutlu) sentezledikten sonra yaptıkları *in vitro* salım çalışmasında (37 °C, pH = 7.4), NP'lerin ilk 6-8 saatte patlama şeklinde, daha sonra 18 saate kadar yavaş şekilde salım yaptıklarını bildirmişlerdir. Bu sonuç, bizim *in vitro* salım sonuçlarımızın literatürle benzer bir şekilde uyumlu olduğunu göstermektedir (Kumar ve ark., 2020) (Ek 5, Mag ve Fit NP'lerinin belli zaman aralıklarındaki *in vitro* % salım konsantrasyonları).

4.1.8. Karakterizasyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Karakterizasyon çalışmalarının sonuçları değerlendirilecek olunursa;

- TQ-Fe NP'leri, % EE yönünden oldukça yüksek yükleme oranına sahip olduğu ve morfolojik olarak oldukça küçük, küresel boyutlarda olmasına rağmen, farklı boyut büyüklüğü, yüzey yükü ve homojen dağılım bakımından güven vermeyen, agregasyona meyilli görünümü nedeniyle, geliştirilmesi gerektiğine inanmaktayız. Bu nedenle, karakterizasyon çalışmalarının ardından yapılması planlanan hücre deneylerinde, terapötik amaçlı kullanımı uygun görülmemekle, sadece Mag NP'lerine konfirme amacıyla çalışılması uygun görülmüştür.
- Mag NP'leri ise, % EE'i, morfolojisi, boyutu, homojen dağılımı, yüzey yükü, elementer içeriği, salım özelliği ve stabilitesi yönünden NP özelliklerinin uygun olduğu ve demir NP'leri oldukları teyid edilerek, kullanım açısından güven verici olarak değerlendirilmiştir.
- Yine, Fit NP'leri de, % EE'i, morfolojisi, boyutu, homojen dağılımı, yüzey yükü, elementer içeriği, salım özelliği ve stabilitesi yönünden NP özelliklerinin uygun olduğu teyit edilerek, kullanım açısından güven verici olarak değerlendirilmiştir.

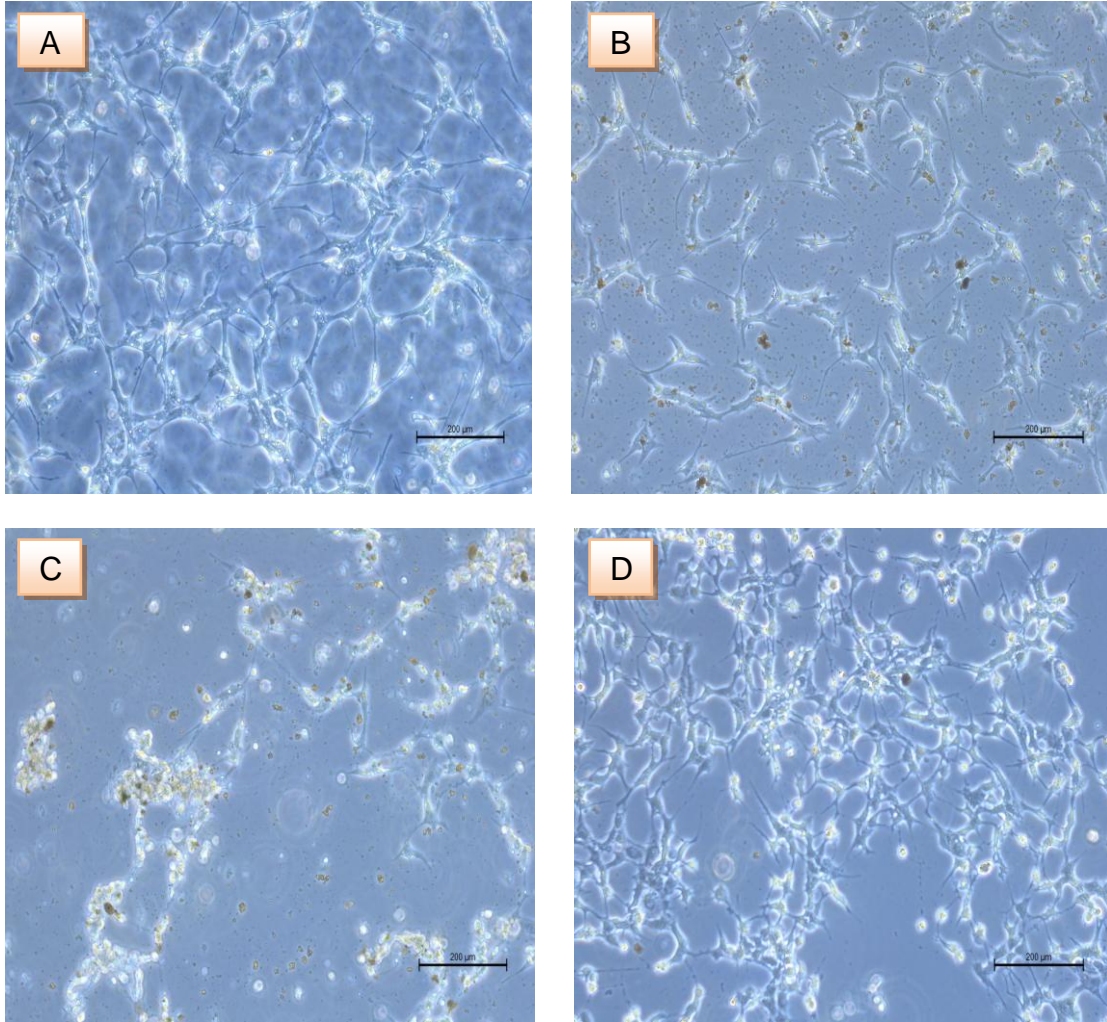
4.2. Nanopartiküllerin *In Vitro* Hücre Kültürü Çalışmaları

TQ-Fe, Mag ve Fit NP'lerinin sentezlenmesi ve karakterizasyon işlemlerinin ardından *in vitro* hücre çalışmalarına geçilmiştir. Hücre çalışmalarında, insan GB kanser hücrelerinden oluşan "U87-MG" hücre hattı, Erciyes Üniversitesi Genkök Araştırma Merkezi'nden temin edilmiştir.

TQ-Fe NP'leri, hücre deneylerine sadece Mag NP'lerini teyid amacıyla alınmıştır. Hücre çalışmaları kapsamında, önce canlılık/sitotoksikite çalışmaları ile IC₅₀ dozu belirlendikten sonra, sırasıyla, apoptoz etkinliğini, serbest radikal seviyesini, lipid peroksidasyon düzeyini ve şelatlama aktivitesini belirleme deneyleri, U87-MG hücreleri üzerinde NP'lerin muamelesi sonucu en az üç tekrarlı olarak yapılmış, istatistiksel olarak analiz edilmiş, yorumlanmış ve Mag ve Fit NP'leri karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

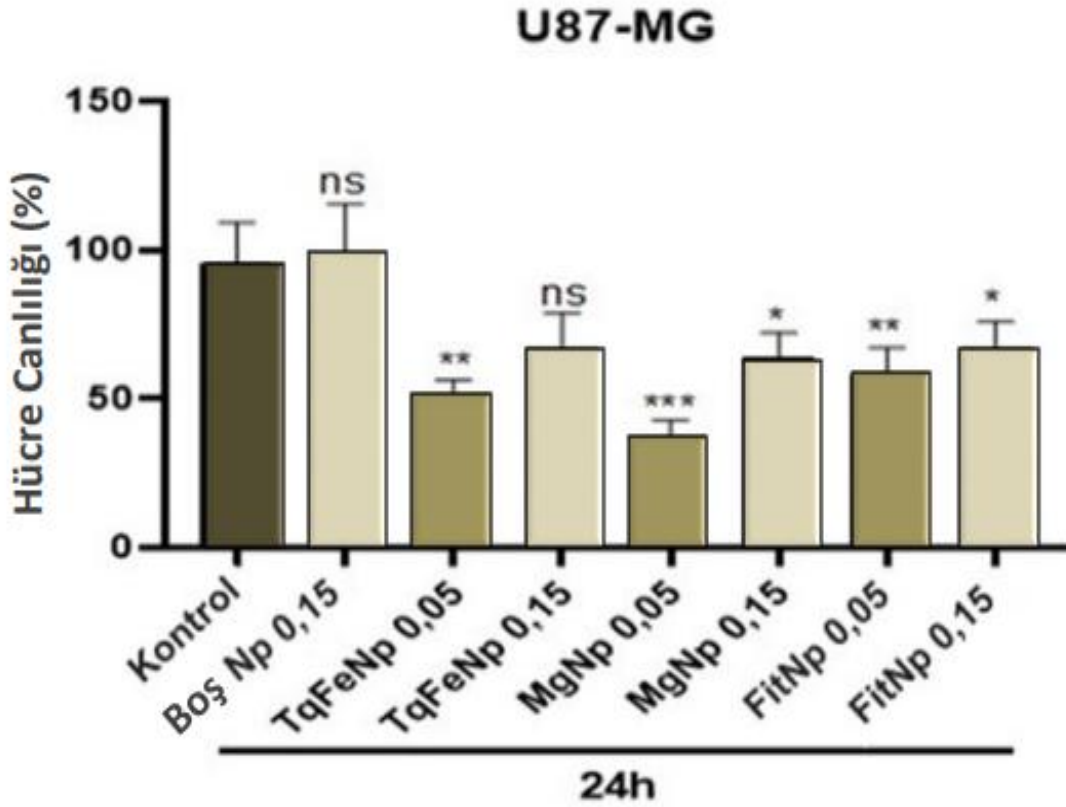
4.2.1. Nanopartiküllerin Hücre Canlılığına Etkileri ve Doz Belirleme Çalışmaları

NP'lerin sentezlenmesi ve karakterizasyon işlemlerinin ardından, Bölüm 3.2.7'de anlatıldığı gibi "MTS Kit" (Sigma) prosedürünü uygulamak amacıyla, U87-MG hücre hattı üzerinde, boş NP'leri ve yüklü olan TQ-Fe, Mag ve Fit NP'leri, 24 saat boyunca, çeşitli dozlarda muamele edilmek suretiyle, hücreler üzerindeki canlılık/sitotoksik etkileri *in vitro* olarak incelenmiştir. Deney, dört bağımsız tekrar halinde yapılmış olup, ortalama \pm standart sapma olarak ifade edilmiş, kontrole göre oranlanmış, farklılıklar istatistiksel olarak anlamlandırılarak değerlendirilmiş ve IC₅₀ oranları belirlenerek Şekil 4.20'de grafik halinde sunulmuştur.



Şekil 4.19. Kontrol (A), TQ-Fe (0,05 mg/ml) (B), Mag (0,05 mg/ml) (C) ve Fit (0,05 mg/ml) (D) NP'lerinin, U87-MG hücre hattına 24 saat muamelesi sonucu kanser hücrelerinin invert mikroskopik görüntüleri (200 μ m büyütme).

Şekil 4.19’da, kontrol, TQ-Fe , Mag ve Fit NP’lerinin (sırasıyla, A, B, C ve D), U87-MG hücreleri üzerine 0,05 mg/ml dozunda, 24 saat muamelesi sonucundaki invert mikroskopi görüntüleri görülmektedir. U87-MG hücreleri üzerinde en fazla sitotoksik etkiyi Mag NP’lerinin (Şekil 4.19; C) oluşturduğu, daha sonra, sırasıyla, TQ-Fe ve Fit NP’lerinin (Şekil 4.19; B ve D) (Mag NP > TQFe NP > Fit NP) sitotoksik etkili olduğu görülmektedir. TQ-Fe NP’leri ile Mag NP’lerinin benzer etki göstermeleri, sitotoksik etkilerini teyid eder tarzdadır (Şekil 4.19; B ve C).



Şekil 4.20. U87-MG hücreleri üzerine, 0,05 ve 0,15 mg /ml dozlarında, TQ-Fe, Mag, Fit ve boş NP’lerin 24 saat boyunca muamelesi sonucu kontrole göre hücrelerdeki canlılık oranları (%). Kontrol ile karşılaştırıldığında, *, ** ve *** sırasıyla, $p<0.05$, $p<0.01$ ve $p<0.001$ anlamlılık değerlerini göstermektedir (Ortalama \pm SD, n = 4).

Kanser tedavilerinde hem direnç gelişiminin önlenmesi hem de normal hücrelerin zarar görmemesi bakımından etken maddelerin toksik doz aralıkları önemlidir. Çalışmamızda, GB hücrelerindeki antikanser etkinliğini belirlemek üzere seçmiş olduğumuz TQ fitoajanının NP’ler çalışmaları, literatürde oldukça sınırlı sayıda olması nedeniyle, bu konuda kısıtlı bilgiye ulaşılmaktadır. Alhakamy ve arkadaşları (2020),

yaptıkları bir çalışmada TQ-fitozom NP'lerinin, A549 insan akciğer hücreleri üzerinde 24 saatlik muamelesi sonucunda IC_{50} dozunun $4,31 \mu M$ olduğunu bulmuşlardır. Yine, TQ yüklü lipit polimer hibrit NP'ler ile yapılan bir çalışmada, bu NP'lerin MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanserleri hücrelerinde, 24 saatlik muamelesi sonucundaki IC_{50} dozları, sırasıyla, $4,42 \mu M$ ve $41,5 \mu M$ olarak belirlenmiştir (Imam ve ark, 2022). Yapılan bir başka çalışmada, TQ yüklü miseller kullanılarak, SH-SY5H insan nöroblastoma hücreleri üzerinde, partiküllerin 24 saatlik uygulama sonrasında dozların 3 ve $6 \mu M$ olduğu bulunmuştur (Bergonzi ve ark, 2020). Diğer bir çalışmada, Fe_3O_4 NP'leri üzerine yüklenen TQ'un polivinilpirolidon (PVP)'lanmış Fe_3O_4 manyetik NP'leri (TQPVP- Fe_3O_4 NP'ler) oluşturularak, meme kanseri (MDA-MB-231) hücrelerine karşı etkinliğini araştırmak için IC_{50} değeri olarak 50 mg/ml dozu, NP'lerin 24 saatlik muamelesi sonucunda belirlenmiş ve hücrelerin ROS seviyelerinin etkili bir şekilde arttırılarak sitotoksisteye neden olduğu gösterilmiş (Kumar ve ark., 2020). Fathy ve arkadaşları (2020) ise, sentezledikleri TQ-IO NP'lerinin, MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri üzerinde 24 saatlik muamelesi sonucunda IC_{50} değeri olarak, $0,25$ mg/ml dozunu belirlemişlerdir.

Ayrıca TQ'un GB beyin kanseri üzerine etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada, TQ'nun beyin kanseri hücreleri SW1088 ve A172 ile sağlıklı hücreler olarak kabul edilen kortikal nöronal hücreler-2 (HCN2) üzerindeki sitotoksik etkileri karşılaştırılmış ve TQ'nun HCN2'deki sitotoksitesinin diğer kanser hücrelerine göre çok daha az olduğu gösterilmiştir (Samar ve ark, 2019). Başka bir çalışmada, TQ uygulamasında Gli36, T98 G ve U87-MG insan glioblastoma hücrelerinin proliferasyonunu inhibe edici dozlarının normal astrosit (NHA) hücrelerine göre daha düşük olduğu bulunmuştur. Karşılaştırıldığında, $2 \mu M$ TQ, Gli36 hücre büyümesini önemli ölçüde inhibe etmek için yeterli olurken ve $4 \mu M$ dozda tespit edilebilir hücre görülememiş, T98 G hücrelerinin dirençli ($IC_{50} = 10,3 \mu M$), U87-MG hücrelerinin ise orta düzeyde duyarlı ($IC_{50} = 8,3 \mu M$) olduğu bulunmuştur. Ancak, ilginç olarak, dirençli hücrelerine sitotoksik etkili olan bu $8 \mu M$ ila $16 \mu M$ TQ konsantrasyonlarında bile, NHA hücrelerinin etkilenmeyerek çoğalmaya devam ettikleri bildirilmiştir (Racoma ve ark, 2013).

Bizim çalışmamızda, MTS testi ile elde edilen deney sonuçları, kontrol grubuna göre % hücre canlılığı olarak ifade edilmiştir. Boş NP'lerin hücre canlılığına herhangi bir katkısının olup olmadığını anlamak için, etken maddenin olmadığı, boş lipozomlar da,

diğer NP'ler ile birlikte deney grubu olarak alınmış ve çeşitli konsantrasyonlarda hücre canlılığına olan etkisine bakılmıştır. Şekil 4.20'ye bakacak olursak, boş NP'lerin, hücre canlılık oranının, neredeyse kontrol ile aynı olduğu (% 97,98) görülmekte olup, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Şekil 4.20'deki grafikte TQ-Fe NP grubuna bakıldığında, 0,05 mg/ml ve 0,15 mg/ml dozlarında, sırasıyla, kontrole göre hücre canlılıkları % 51,67 ve % 72,33 olarak bulunmuş olup, kontrol ile aralarında 0,05 mg/ml dozunda hücre canlılığında % 48,33 düşme görülerek, istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiş olup ($p < 0,01$), 0,15 mg/ml dozunda görülen % 27,67'lik bir azalma, istatistiksel olarak anlamlı görülmemiştir.

Şekil 4.20'de Mag NP grubunda ise, 0,05 mg/ml dozunda hücre canlılık oranı, kontrole göre % 64,44 oranında azalarak % 35,56'lara düştüğü görülmektedir. Bu oran, tüm gruplar içerisinde hücrelere en fazla sitotoksik etkinin Mag NP'lerinde olduğunu ifade etmektedir ve bu etki, kontrole göre istatistiksel olarak oldukça anlamlı olarak kabul edilmiştir ($p < 0,001$). Mag NP'lerinin 0,15 mg/ml dozundaki hücre canlılık oranı ise, kontrole göre % 37,14 düşerek, % 62,85 olduğu görülmüş ve istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir ($p < 0,05$).

Şekil 4.20'deki grafikte, Fit NP'lerinde 0,05 mg/ml ve 0,15 mg/ml dozlarına baktığımızda, sırasıyla, kontrole göre hücre canlılık oranları % 57,8 ve % 73,13 olarak bulunmuş olup, kontrole göre 0,05 mg/ml dozunda hücre canlılığında % 42,2 düşme görülerek, anlamlı bir istatistiksel fark olduğu saptanmıştır ($p < 0,01$). Yine, 0,15 mg/ml dozunda kontrole göre görülen % 26,87'lik bir azalmanın istatistiksel olarak anlamlılık ifade ettiği görülmüştür ($p < 0,05$).

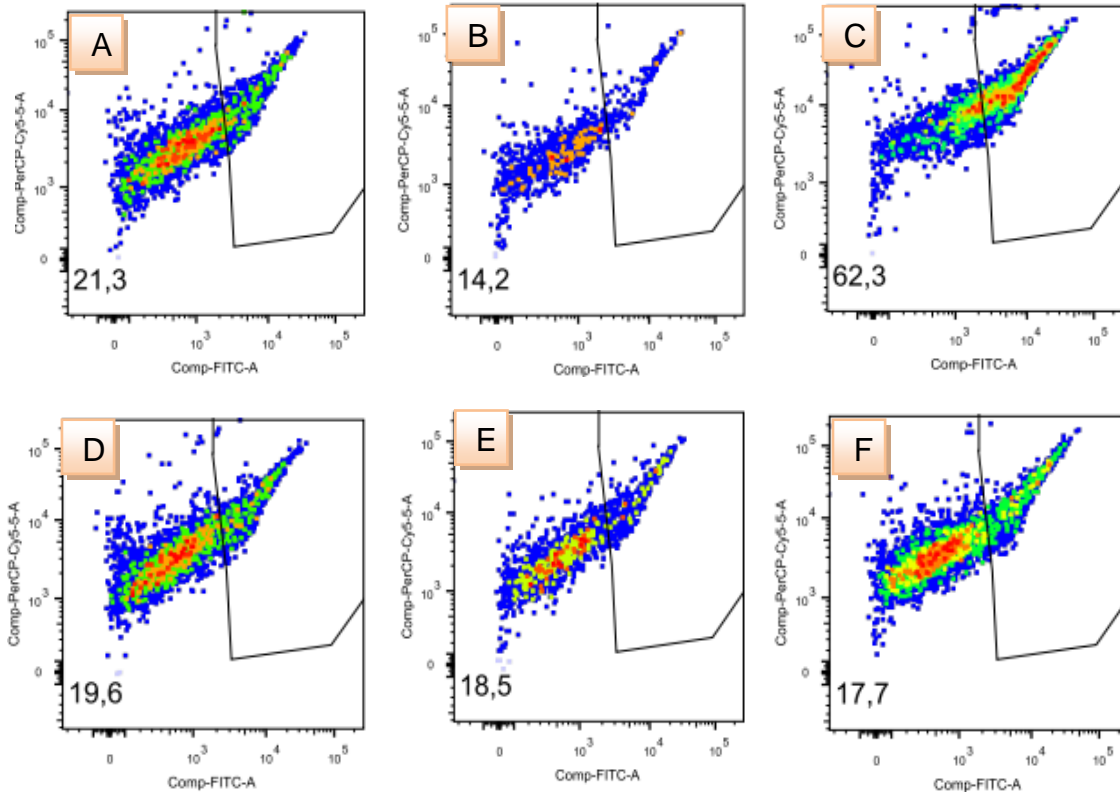
Yukarıdaki sonuçlara göre, 0,05 mg/ml dozunda en etkili NP grubunun Mag olarak tespit edilmiştir (Mag NP > TQFe NP > Fit NP). Bu durum, yukarıda Şekil 4.19'da, NP'lerin 0,05 mg/ml dozunda hücrelerin invert mikroskopi görüntüleri ile de uyumlu olduğu görülmektedir (Mag NP > TQFe NP > Fit NP). Sonuç olarak, yaptığımız MTS deneyinde, kontrole göre tüm NP gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bulduğumuz 0,05 mg/ml dozu, sonraki deneylerimizde uygulamak üzere seçtiğimiz IC₅₀ değeri olarak belirlenmiştir.

U87-MG hücrelerine 24 saat boyunca, 0,05 mg/ml dozunda, NP'lerin maruziyeti sonucu, tüm grupların, hücrelerin canlılığını istatistiksel olarak anlamlı düzeylerde azalttığı; 0,15 mg/ml dozunda ise, NP'lerin maruziyeti sonucunda, tüm grupların hücrelerin canlılığını arttırdığı ve bu artışın, TQFe NP'leri hariç, Mag ve Fit NP gruplarında istatistiksel olarak anlamlı düzeylerde olduğu görülmektedir (Şekil 4.20). Bu sonuçlar, NP gruplarının konsantrasyonu arttıkça hücre canlılığında artış olduğu anlamına gelmekte olup, doz artışında hücre canlılığında olması beklenen azalmanın burada olmayışı ilginç bir durum olarak karşımıza çıkmaktadır. Tüm gruplarda 0,15 mg/ml dozunda hücre canlılığında görülen bu artış, tüm grupları ilgilendiren bir nedenin varlığını akla getirmekte olup, TQ'un ortak olarak bulunması nedeniyle, bu etkinin TQ ile ilgili olabileceği sonucuna bizi götürmektedir.

Literatüre bakıldığında, arsenik ve H₂O₂ ile oluşturulmuş SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattı üzerinde ve yine başka bir çalışmada, H₂O₂ ile indüklenen oksidatif strese karşı nöral hücreler üzerinde, TQ'un muamele edilmesi sonucunda, hücre canlılığının arttığı görülmüştür. Bu durumun, TQ'un antioksidan etkisi nedeniyle olabileceği ve özellikle nöronal hücreler üzerinde hücre canlılığını arttırıcı etkinin belirgin olduğu sonucu görülmektedir (Firdaus ve ark., 2019; İsmail ve ark., 2016). Bu nedenle bizim çalışmamızda da, tüm NP gruplarının doz arttıkça hücre canlılığını artırma etkisinin TQ içeriklerine bağlı olarak, U87-MG hücrelerinin nöronal yapısı gereği, literatürle uyumlu olduğunu göstermektedir. Ancak bu veriler, TQ'un sitotoksik dozu ile sitoprotektif dozu arasında fark olduğu sonucuna götürmekle birlikte, TQ'un doza bağımlı bir şekilde farklı aktivitelerinin olabileceği sonucunu da göstermektedir. Bu durumun, daha detaylı ileri araştırmalarla ancak açıklığa kavuşturulabileceği kanaatindeyiz.

4.2.2. Nanopartiküllerin Apoptoz Etkileri

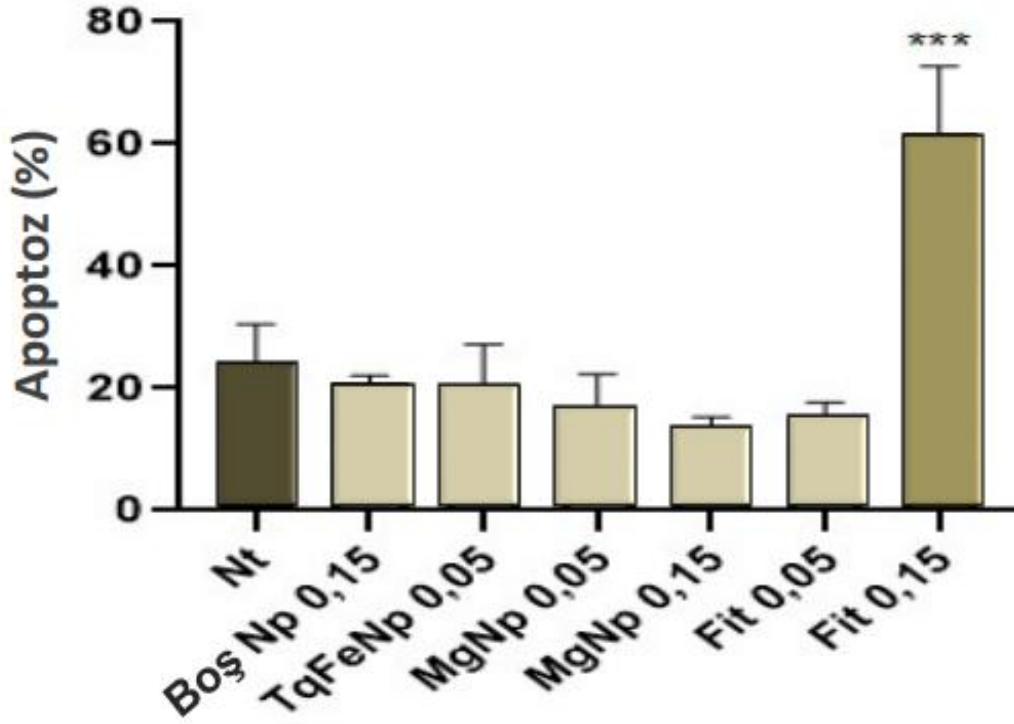
Çalışmamızda, GB hücrelerinde 24 saatlik TQ-Fe, Mag ve Fit NP'lerinin inkübasyonundan sonra apoptoz oranları, Flow sitometri ile ölçülmüştür. Şekil 4.21'de, U87-MG hücrelerine, 0,05 mg/ml ve 0.15 mg/ml dozlarında uygulanan NP'lerin "Annexin V-FITC / 7-AAD Kit" (BioLegend 640922) uygulanarak elde edilen apoptoz sonuçları görülmektedir. Annexin-V FITC boyası ile tespit edilen çizili alan içerisinde toplam apoptoz miktarları görülmektedir (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. U87-MG hücrelerine, Kontrol (A), 0,15 mg/ml dozunda uygulanan Mag (B) ve Fit (C) NP'leri ile; 0,05 mg/ml dozunda uygulanan TQ-Fe (D), Mag (E) ve Fit (F) NP'lerinin Annexin V-FITC / 7-AAD apoptoz sonuçları.

Bölüm 3.2.8.1'de anlatıldığı gibi, U87-MG hücrelerinde 24 saatlik TQ-Fe, Mag ve Fit NP'lerinin inkübasyonundan sonra apoptoz oranları Flow sitometri ile ölçülerek, sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.22). Annexin V deneyinde, sadece IC₅₀ dozu (0,05 mg/ml) değil, canlılık deney sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bulduğumuz tüm dozlar (Şekil 4.20), U87-MG hücrelerindeki apoptotik etkisine bakılmak üzere çalışılmıştır (Şekil 4.22). Deney, dört bağımsız tekrar halinde yapılmış olup, ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiş ve istatistiksel farklılıklar kontrole göre (%) oranlanmıştır.

U87-MG



Şekil 4.22. U87-MG hücrelerinde, TQ-Fe, Mag, Fit ve boş NP'lerinin (0,05 mg/ml ve 0,15 mg/ml, 24 saat) apoptotik etkinliğinin Flow sitometre ile AnnexinV-FITC/7-AAD deney sonuçları *, ** ve *** kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, sırasıyla, $p < 0,05$, $p < 0,01$ ve $p < 0,001$ anlamlı farkı göstermektedir (Ortalama \pm SD, n = 4).

Son zamanlarda antikanser etkinliğe sahip doğal bileşiklere ilgi, özellikle sağlıklı hücrelere olan yan etkilerinin azlığı nedeniyle artmaktadır. Bu tür fitobileşenlerden en çok üzerinde araştırma yapılanlardan biri de TQ'dur. Yapılan araştırmalar sonucunda TQ'un antikanser aktiviteler bakımından umut verici özelliklere sahip olduğu bildirilmektedir. TQ'un antikanser gücünü, kanser hücre proliferasyonunu, anjiogenezi ve metastazı inhibe etmek ve hücre döngüsünün durdurulması gibi çeşitli yönlerden gerçekleştirdiği bilirse de, kanser hücreleri üzerindeki antikanser özelliklerini en çok apoptozu teşvik etme yolu ile gerçekleştirdiği bildirilmektedir (Zhang ve ark, 1018; Al-Oqail ve ark, 2017; Shokoohinia ve ark, 2018; Tabeshpour ve ark, 2019).

Biz de yaptığımız çalışmada, TQ bazlı TQ-Fe, Mag ve Fit NP'lerini, U87-MG GB kanser hücrelerinde, 24 saat muamelesi sonucu apoptotik etkinliklerini 0,05 mg/ml ve 0,15 mg/ml dozlarında test ettik. Literatüre bakıldığında, TQ'un kanser hücrelerini

apoptoza götürdüğü doz aralıkları yönünden birçok çalışmalar yapılmış olduğu görülmektedir. TQ'un, 25, 50 ve 75 uM dozlarında HGC27 ve BGC823 mide karsinoma (Zhu ve ark., 2016), 5, 10 ve 30 µM dozlarında HL-60 akut miyeloid lösemi (Musalli ve ark, 2019), 2,5 uM, 25 uM ve 50 uM dozlarında CGTH-W1 ve CAL-62 tiroid karsinoma (Ozturk ve ark, 2017), 50 ve 750 nM dozlarında ATL, HTLV-1 T hücreli lösemi, (Fatfat ve ark, 2019), 72 µM, 20 µM, 50-70 µM dozlarında C6 glioma karsinoma (Guler ve ark., 2021) gibi birçok kanser hücreleri üzerinde yapılan araştırmalar, TQ'un, anlamlı apoptotik etkilerde bulunduğunu ve antiapoptotik yolları baskılamak, proapoptotik yolları ise çeşitli yollarla indüklenmek suretiyle apoptotik etkinlik gösterdiği bildirilmektedir.

Biz de yaptığımız Anneksin V deney sonuçlarının sunulduğu Şekil 4.22'deki grafikde, tüm NP grupların apoptoz indüklenme yüzdelerine bakılacak olunursa, kontrol grubunda görülen toplam apoptotik hücre oranı % 23,36 olarak bulunmuştur. Diğer grupları kontrole göre değerlendirecek olursak, TQ-Fe NP'lerinin 0,05 mg/ml dozları, U87-MG hücrelerinde, 24 saatte, kontrole göre % 11,81 oranında daha az apoptotik hücre görülmüş ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. TQ-Fe NP'lerinin hücre canlılık deneyi sonuçlarına göre 0,15 mg/ml dozu, 24 saat muamele sonucunda U87-MG hücrelerinin canlılığı üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmadığı için, Anneksin V deneyinde TQ-Fe NP'lerinin bu dozu deney grubuna dahil edilmemiştir.

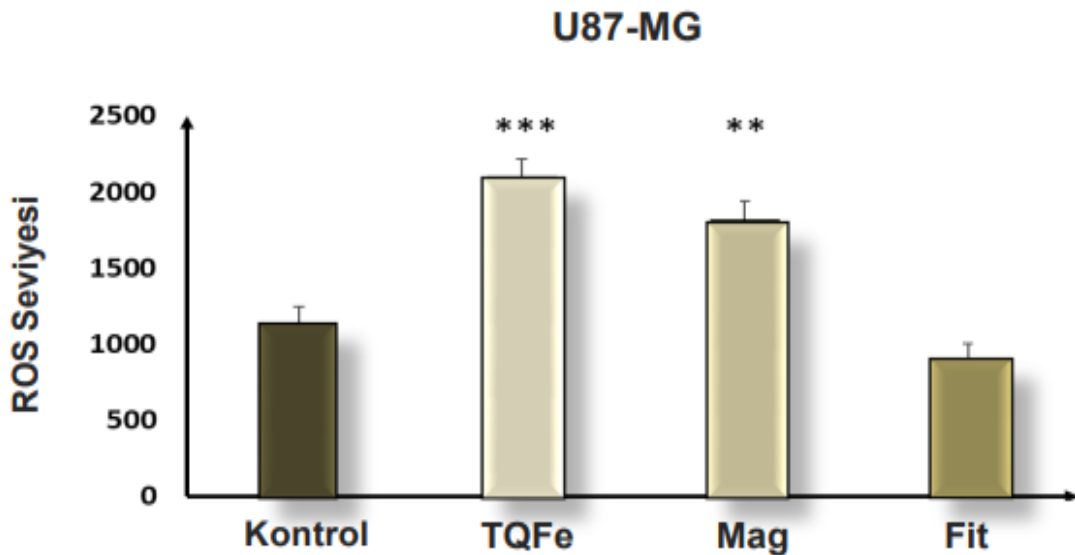
Yine Şekil 4.22'ye bakacak olursak, Mag NP grubumuzun 0,05 mg/ml dozunda, 24 saat U87-MG hücrelerine apoptotik etkilerinin oranı, kontrole göre % 26,54 daha düşük bulunmuş olup, istatistiksel olarak anlamlı görülmemiştir. Mag NP'lerinin 0,15 mg/ml dozunda U87-MG hücrelerine muamelesi sonucunda, kontrole göre % 13,2 daha az apoptotik hücre oranı görülmüş olup, istatistiksel olarak anlamlı görülmemiştir. Böylece, Mag NP'lerinin, GB hücreleri üzerinde görülen sitotoksik etkilerinin (Şekil 4.19), apoptozu indüklenme yoluyla olmadığı sonucuna varılmaktadır.

Şekil 4.22'deki apoptoz yüzde oranları Fit NP'leri için değerlendirilecek olunursa, 0,05 mg/ml dozunda, 24 saat muamele sonucunda U87-MG hücreleri üzerinde kontrole göre % 35,6'lık bir azalma görülmekte olup, bu doz oranında istatistiksel olarak anlamlı bir apoptoza neden olmadığı görülmektedir. Ancak, doz, 0,15 mg/ml konsantrasyona çıktığında Fit NP grubunun kontrole göre % 161,63 oranında daha fazla, hücreleri

apoptoza götürdüğü görülmekte (Şekil 4.22) ve istatistiksel olarak oldukça anlamlı olarak değerlendirilen ($p<0,001$) bu sonuç, literatürle de uyumluluk göstermektedir. TQ'un antikanser etkisi üzerine yapılan birçok araştırmada olduğu gibi glioma hücreleri üzerinde antikanser etkisinin apoptozu indüklemeye yoluyla olduğu ve gliomanın tedavi direncinin kırılmasında, kanser hücrelerinin apoptoz teşvikinin önemli olduğu bildirilmektedir.

Bu sonuçlara göre tüm NP gruplarının 0,05 mg/ml dozunda, 24 saat muamele sonucunda, U87-MG hücrelerini apoptoza götürmediği ya da apoptoz yoluyla hücrelerin ölümünü indüklemediği; yine 0,15 mg/ml dozunda, 24 saat muamele ile, Fit NP grubu hariç, diğer NP gruplarının anlamlı olarak apoptoz yoluyla GB hücrelerine sitotoksik etkili olmadığı anlaşılmaktadır. Tüm gruplar içerisinde sadece 0,15 mg/ml dozunda Fit NP'lerinin, 24 saat muamele sonucunda U87-MG hücrelerinde istatistiksel olarak oldukça anlamlı düzeylerde ($p<0,001$), apoptoz seviyelerini arttırdığı görülmektedir. Bu durum, apoptotik etkinin Fit NP grubu için doza bağlı olduğunu ifade etmekte ve TQ'un düşük dozlarda antioksidan, yüksek dozlarda ise sitotoksik etki sergilediğini bildiren literatür sonuçları ile uyumlu olduğunu göstermektedir.

4.2.3. Nanopartiküllerin Serbest Radikal Oluşumuna Etkileri



Şekil 4.23. TQ-Fe, Mag ve Fit NP'lerinin, U87-MG hücrelerindeki ROS seviyeleri (0,05 mg/ml, 24 saat). ** ve *** kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, sırasıyla, $p<0.01$ ve $p<0.001$ anlamlı farkı göstermektedir (Ortalama ± SD, n = 3).

Kanser hücrelerinin demir metabolizmasında serbest radikal oluşumu önemli olduğu için, biz de U87-MG hücrelerinde NP'lerimizin serbest radikal miktarlarına yaptıkları etkiyi anlamak amacıyla Bölüm 3.2.8.2'de anlatıldığı gibi, "ROS Detection Assay Kit" (Elabscience) prosedürüne göre, ROS seviyelerini tespit ederek, istatistiksel olarak değerlendirdik (Şekil 4.23).

Grafiğe baktığımızda (Şekil 4.23), TQ'un tek başına etken madde olarak bulunduğu Fit NP'lerinin, 0,05 mg/ml dozda, 24 saat U87-MG hücrelerine muamelesi sonucu, kontrole göre yaklaşık olarak % 21,1 daha az ROS seviyelerini yükseltmekte olup, istatistiksel olarak anlamlı görülmemiştir. Bu sonuç, TQ'un ROS seviyesini azalttığını göstermektedir. Oysa ki, TQ'un demir ile kombine olarak bulunduğu TQ-Fe ve Mag NP'lerinin, 0,05 mg/ml dozda, 24 saat U87-MG hücrelerine muamelesi sonucu, ROS seviyelerini kontrole göre, sırasıyla, % 86,5 ve % 61,5 oranlarında daha fazla yükselttiği görülmekte olup, istatistiksel olarak oldukça anlamlı yüksek değerleri ifade etmektedir (TQ-Fe NP'leri, $p < 0,001$; Mag NP'leri, $p < 0,01$) (Şekil 4.23). Yine, TQFe ve Mag NP'leri, sırasıyla, yaklaşık olarak % 136,3 ve % 104,7 oranlarında Fit NP'üne göre daha çok ROS artışına neden olduğu görülmektedir (Şekil 4.23). Sonuç olarak, bizim verilerimiz, TQ-Fe ve Mag NP'lerinin yüksek düzeylerde ROS seviyelerinin artışına; Fit NP'lerinin ise ROS seviyelerinin azalmasına neden olduğunu göstermektedir.

TQ'un antioksidan özelliği, ana özelliklerinden biri olarak kabul edilmekte olup yapılan birçok çalışmalar sonucunda, TQ'un oksidatif stresle mücadelede umut verici bir bileşen olduğu bildirilmektedir (Khithar ve ark., 2018; Sandhya ve Kannayiram, 2020; Mansour ve ark., 2002; Nagi ve ark., 2000). Yapılan çalışmalar, TQ'un antioksidan enzimleri indüklemek yoluyla oksidatif stresin neden olduğu hasara karşı hücreleri korumada etkili olduğunu bildirmektedir. Bir çalışmada, TQ'un, mRNA ekspresyonuna etki yoluyla antioksidan ve sitoprotektif enzimlerin aktivasyonunu arttırdığı ve böylece, kimyasal kaynaklı karsinogenезin önlenmesinde antioksidan özelliğinin rol oynadığı bildirilmektedir (Kassab ve ark., 2017). Bu ve benzeri birçok literatür bilgileri, çalışmamızın sonucunda gördüğümüz, Fit NP'lerinin ROS düzeylerindeki azaltıcı etkisinin, içeriğindeki TQ'un güçlü antioksidan özelliği nedeniyle olduğunu ve bu nedenle TQ'un dikkate değer bir antiradikal potansiyele sahip olabileceğini vurgulamaktadır. Bu sonuç, TQ'un ROS seviyelerini azaltan, antioksidan özellikli bir madde olabileceğini bildiren literatür sonuçları ile her ne kadar uyumlu gibi görünse de;

TQ'un bu yüksek potansiyelli antioksidan özelliği, oksidatif stresin neden olduğu hücrel patolojiye karşı koruyucu bir etki ile sonuçlanması bakımından, normal hücreler açısından avantaj olmasına rağmen, kanser hücreleri için tedavi açısından bir dezavantajı da ifade etmektedir. Dolayısıyla bu durum, TQ'un, kanser hücrelerine toksik etki yerine koruyucu etki gösterebileceği ihtimalini de akla getirmektedir. Yine, daha önce yaptığımız apoptoz deney sonucuna bakılacak olunursa (Şekil 4.22), yine Fit NP'lerinin, yine GB hücrelerine (0,15 mg/ml, 24 saat) oldukça yüksek apoptoz indüksiyonu, bu deney sonucunda (Şekil 4.22) görülen, Fit NP'lerinin ROS radikal ürünlerini azaltma etkisi, dolayısıyla antioksidan özelliği ile ters düşmektedir.

Literatürdeki, meme karsinomu (Aslan ve ark., 2021), prostat karsinomu (Kaseb ve ark., 2007), hepatoselüler karsinom (Ahmed ve ark., 2008), tiroid karsinomu (Ozturk ve ark., 2017) ve akut miyeloid lösemi (Musalli ve ark., 2019) dahil olmak üzere, çeşitli kanser hücre hatları üzerine yapılan birçok araştırmada, TQ'un kanser hücrelerinin büyümesini, apoptoz yoluyla inhibe ettiği sonuçları, bizim, Fit NP'lerinin apoptotik sonuçları ile uyumlu olduğunu göstermektedir. Bu durum, TQ'un hem antioksidan özelliğinin hem de apoptotik özelliğinin, aynı hücrelerde etkili olabileceğini vurgulamaktadır.

Açıklanamayan bu özellikleri nedeniyle, TQ'un çeşitli türevlerinin antikanser etkilerini araştırmak için, genellikle karbonil veya benzoid bölgesine yönelik hazırlanan 29 kadar türevini inceleyen bir çalışmada, hidroksil türevinin % 50 kadar daha güçlü sitotoksik etki sergilediği sonucuna varılmıştır. Hidroksil türevinin daha güçlü sitotoksik etkili olması, hidrojen bağı etkileşimlerinin daha fazla olması anlamına gelmekte olup, apoptozu da bu nedenle tetiklediği ileri sürülmüştür (Yusuf, ve ark., 2013).

Koka ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise, TQ'un 25-250 µM/L aralığındaki dozlarının, agresif ve agresif olmayan prostat kanserleri üzerinde 24-48 saat muamelesinin ardından, TQ'un antikanser etkisinin her iki hücre hattının büyümesini de inhibe ettiği gösterilmiştir. Ancak, ilginç bir şekilde, hücrelerin bir saat boyunca TQ'a maruz kalması sonucunda, ROS seviyelerinin üç kat artışının gerçekleşmesi üzerine, TQ'un kanser hücrelerindeki antiproliferatif ve antikanser etkilerinde ROS üretiminin önemli bir etken olabileceği sonucuna varılmıştır (Koka ve ark, 2010).

Bir çalışmada araştırmacılar, glioma kanser hücreleri üzerinde, TQ'un konsantrasyon artışlarının, ROS düzeylerinde de artışlara neden olduğunu ve bunun sonucu olarak apoptoz indüksiyonu yoluyla sitotoksik etkinin ortaya çıktığını, hücre içi kalsiyum seviyelerini ve mitokondriyal membran potansiyel düzeylerini ölçmek suretiyle göstermişlerdir. Ayrıca TQ'un konsantrasyona bağlı bir şekilde ROS miktarlarını arttırması ile hücrelerin daha çok oksidatif strese ve DNA hasarına maruz kalmasını, dolayısıyla, apoptotik yolların hızla aktivasyonu sonucu, hücrelerin apoptoza uğramasını, TQ'un sitotoksik aktiviteleri olarak bildirmişlerdir (Guler ve ark, 2021). Literatürde yapılan çalışmalar, TQ etkisinin yine ROS artışına neden olduğu sonucunu bildirmekte ve TQ'un ROS'u arttırmadaki etkinliğinin, sadece beyin kanseri hücrelerine sınırlı olmayıp, diğer kanser hücrelerinde de aynı davranışı sergilediğini göstermektedir (Park ve ark, 2019; Yang ve ark, 2015; Jafri ve ark, 2010).

Bizim bu sonucumuzda görülen uyumsuzluğun altında olabilecek olası nedenleri araştırmak amacıyla literatüre baktığımızda, bazı araştırma sonuçlarının, TQ'un ROS ürünlerine etkisinin, temizleyici enzim sistemleri (SOD/CAT) vasıyasıyla olabileceğini bildirdikleri görülmüştür (Martinovich ve ark, 2016; Woo ve ark,2013; Ghasemi ve diğerleri, 2022). Ancak, Ghelichkhani ve arkadaşlarının (2023) yaptıkları bir çalışmada, moleküler yerleştirme bulguları sonucuna göre, TQ'nun serbest radikal oluşumu üzerindeki etkisinin, SOD/CAT moleküllerinin yapısına kimyasal müdahale yoluyla olmadığını göstermiş olmaları, TQ'un, enzim sistemleri aracılığı ile ROS'a etki etmediğinin anlaşılmasını sağlamıştır. Ancak aynı araştırmanın sonucunda, düşük TQ konsantrasyon durumunda, hidrojen peroksite maruz kalma ile HepG2 kanser hücrelerinin hayatta kalma oranını arttırdığının görülmesi; tersine, TQ'un yüksek konsantrasyonunda, hidrojen peroksitin neden olduğu sitotoksiteyi güçlendirdiğinin rapor edilmesi, bizim araştırma sonucumuzda gördüğümüz Fit NP'lerinin ROS seviyelerini neden azalttığı ile ilgili sorumuzun aydınlanmasına neden olmuştur.

Başka araştırma sonuçları, TQ'un bu ikili etkilerini hem antioksidan hem de prooksidan olarak görev yapabilme özellikleriyle ilişkilendirmektedir (Darakhshan ve diğerleri, 2015; Martinovich ve diğerleri, 2016; Pal ve diğerleri, 2021). Bu nedenle, yapılan birçok araştırma, her ne kadar TQ'un antikanser özelliğini antioksidan potansiyeline bağlasa da, ortaya çıkan kanıtlar, TQ'un kanser hücrelerinde apoptozla sonuçlanan oksidatif hasara neden olduğu yönünde birleşmektedir (Woo ve ark, 2013).

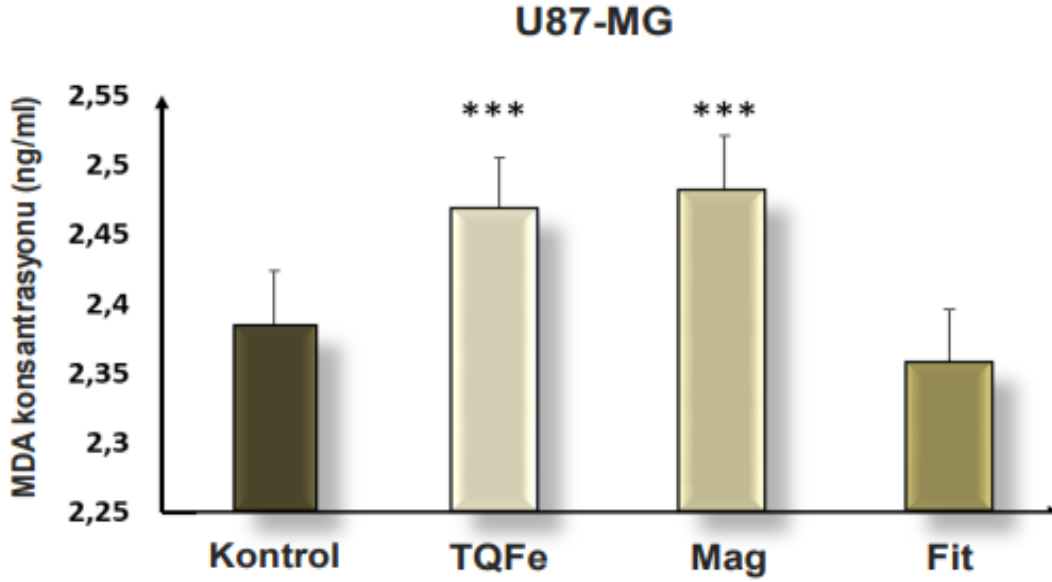
Zubair ve arkadaşları (2013), TQ'un kanser hücrelerinde prooksidan olarak görev yapma olasılığını bir mekanizma olarak bildirmişlerdir. Bu mekanizmaya göre, TQ, hücre içinde sitoprotektif özellikteki antioksidan yapı olan timohidrokinona dönüşebileceği gibi, zıt olarak, semikinon yapıya dönüşümü sayesinde prooksidan aktivite ile sitotoksik özelliğe de bürünebilmektedir. Yapılan diğer araştırma sonuçları, ROS oluşumunun, hücrelerin proliferasyonunu durduran çok önemli bir mekanizma olduğunu ve TQ'un, düşük konsantrasyonlarında bir antioksidan olarak görev görürken, daha yüksek konsantrasyonlarında prooksidan özelliğe dönüşerek hareket edebileceğini bildirmektedirler (Koka ve ark., 2010; Bolton ve ark., 2000). Sonuç olarak, TQ'un, bilinen güçlü bir antioksidan olması sebebiyle, mekanizmayı aydınlatmaya çalışan araştırmaların çoğunun antioksidan özelliğe odaklanmış olması, TQ'un daha yüksek konsantrasyonlarda prooksidan özelliğinin göz ardı edilmesine neden olmuştur.

Tüm bu literatür bilgileri, bizim çalışmamızda, Fit NP'lerinin U87-MG hücrelerinde ROS seviyelerini düşürerek antioksidan özellikli davranışını, düşük doz (0,05 mg/ml) uygulanması ile açıklamaktadır. Yine, daha yüksek doz olan 0,15 mg/ml'de TQ'un anlamlı düzeylerde apoptoz artışına neden olması, literatür bilgilerine uyum göstermektedir. Ancak yapılan bir araştırmada, hidrojen peroksit kaynaklı sitotoksosite üzerindeki ikili etkilerine bakılarak, TQ'un, hücrelerde farklı davranışlarda bulunduğu ve etkinliğinin bulunduğu ortama bağlı olarak değişebildiğinin bildirilmesi (Gali-Muhtasib ve ark., 2004) ve diğer araştırma sonuçları, TQ'nun antiproliferatif etkisinin kanser hücrelerine özgü bir özellik olduğunu, normal hücrelerin büyümesi yönünde negatif bir etkisinin olmadığını bildirmesi (Shahein ve ark., 2019), son çalışma raporlarının ortak bulgusu olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle, aynı kanser hücrelerinde, TQ'un antikanser özelliğinin yanında, antioksidan özelliğinin de bir arada görülmesi, oldukça ilginç bir durum olarak karşımıza çıkmaktadır (Czene ve ark., 1997; Gali ve ark., 1992). Bu nedenle, bu durumun ileride daha detaylı araştırmalarla aydınlatılması gerektiği düşünülmektedir.

Bunun dışında, diğer iki grubumuzu oluşturan TQ-Fe ve Mag NP'lerinin de TQ bazlı olmalarına rağmen, aynı düşük dozda (0,005 mg/ml) ROS seviyelerini istatistiksel olarak oldukça anlamlı düzeylerde arttırmış olmaları (TQ-Fe NP'lerinde $p < 0,001$; Mag NP'lerinde $p < 0,01$), yine, Fit NP'lerindeki azalmayla birlikte yorumlanacak olunursa, TQ-Fe ve Mag NP'lerindeki ROS artış nedeninin demire bağlı olduğu sonucuna

varılabilmesini sağlaması açısından Fit NP'lerindeki azalma, bu bilgiyi vermesi bakımından oldukça değerli bulunmaktadır.

4.2.4. Nanopartiküllerin Lipit Peroksidasyonuna Etkileri



Şekil 4.24. TQ-Fe, Mag ve Fit NP'lerinin, U87-MG hücrelerindeki MDA konsantrasyon (ng/ml) düzeyleri (0,05 mg/ml, 24 saat). *** kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0.001$ anlamlı farkı göstermektedir (Ortalama \pm SD, n = 3).

Demir yükleme bazlı kanser hedefleme ile yüklenen demir tarafından katalize edilen aşırı serbest radikallerin tetiklenmesi sonucu lipit peroksidasyonu oluşmakta ve lipit oksidasyonunun son ürünlerinden biri olan MDA (malondialdehit), membran hasarının göstergesi olarak kabul edilmektedir. Dolayısıyla, MDA miktarının ölçümü, lipit peroksidasyon düzeylerinin saptanmasında sıklıkla kullanılan en etkin yöntemlerden biri olarak görülmektedir (Yang ve ark., 2023). Biz de çalışmamızda, NP aracılı, GB hücre zarlarında lipit peroksidasyonu nedeniyle hücre ölümünün gelişmesini test etmek için “MDA Ölçüm Kit” (Elabscience) protokolunu, Bölüm 3.2.8.3’de anlatıldığı gibi uygulayarak MDA miktarlarını ölçtük ve sonuçları istatistiksel olarak değerlendirerek, Şekil 4.24’de grafik halinde sunduk.

Şekil 4.24’de görüldüğü gibi, TQ-Fe NP’lerinin 0,05 mg/ml dozunda, U87-MG hücrelerine 24 saat muamelesi sonucunda, MDA miktarı 2,46 ng/ml değerinde ölçülerek, TQ-Fe NP’lerinin MDA seviyelerini kontrole göre istatistiksel olarak oldukça

anlamli bir sekilde, % 3,39 daha fazla yukselttiği bulunmuştur ($p < 0,001$). Mag NP'lerinin 0,05 mg/ml dozunda, U87-MG hücrelerine 24 saat muamelesi sonucunda, MDA miktarı 2,48 ng/ml değerinde ölçülerek, kontrole göre % 4,07 daha fazla yukselttiği ve yine istatistiksel olarak oldukça anlamlı düzeylere ulaştırdığı sonucuna varılmıştır ($p < 0,001$). Fit NP'leri ise, 0,05 mg/ml dozunda, U87-MG hücrelerine 24 saat muamelesi sonucunda, MDA miktarının ölçümü 2,35 ng/ml değerinde olup, kontrole göre % 1,17 daha düşük ve istatistiksel olarak anlamlılık ifade etmediği sonucuna varılmıştır.

Fit NP'lerinin, U87-MG hücrelerinde MDA düzeyini düşürmesi, ayrıca Mag NP'lerinin, TQ-Fe NP teyidi ile lipit peroksidasyonunu arttırması, ROS deney sonucunda olduğu gibi, bu durumun demire bağlı olduğunu göstermektedir. Fit NP'lerinde görülen bu sonuç, demir bazlı NP olmadığı için, TQ'un tek başına lipit peroksidasyonu yoluyla hücre sitotoksitesini indükleme yeteneğine sahip olmadığını göstermesi bakımından değerli bulunmakta ve Fit NP'lerinin, 0,05 mg/ml konsantrasyonunda, lipit peroksidasyonunu azaltmasının, antioksidan etki nedeniyle olduğu düşünmekteyiz. Literatüre bakıldığında, TQ'un antioksidan güçlerinin araştırıldığı bir çalışmada, kolon tümörlerinde 1,2-dimetil-hidrazin kaynaklı oksidatif stresin, TQ tedavisi (5 mg/kg) ile tamamen onarıldığı ve lipit peroksidasyon tayin için yaptıkları MDA düzeyi ölçümünde anlamlı bir azalma olduğu görülerek, TQ'un lipit peroksidasyonuna karşı koruyucu etkili olabileceği bildirilmiştir (Jrah-Harzallah ve ark., 2013). Mansur ve arkadaşlarının (2002) yaptığı bir çalışmada ise, TQ'nun, mikro ve nanomolar aralıkta, davranışının farklılaşabileceği; hem güçlü bir serbest radikal hem de süperoksit radikal temizleyici gibi davranabileceği bildirilmiştir. Bu sonuç, TQ'nun doza bağlı bir şekilde, güçlü bir süperoksit anyon temizleyici ve lipid peroksidasyonunu inhibe edici şekillerde davranabileceğini bildiren Badary ve arkadaşlarının raporuyla aynı olduğu belirtilerek, TQ'nun oksidatif stresin önlenmesi ve tedavisinde, potansiyel bir radikal temizleyici role sahip olduğu rapor edilmiştir (Mansur ve ark, 2002; Badary ve ark,2003). Bu literatür sonuçları, bizim sonuçlarımızla uyumlu olarak, Fit NP'lerinin hem MDA hem de ROS seviyelerini azaltan etkisinin, doza bağlı bir şekilde TQ'un antioksidan etkisi nedeniyle olabileceğini göstermektedir. Yine apoptoz deneyinde gördüğümüz; Fit NP'lerinin, doza bağlı olarak oldukça yüksek seviyedeki apoptoz indüksiyonunun görülmesi de bu durumu destekler niteliktedir.

Yine MDA deney sonuçlarına bakıldığında veriler, TQ-Fe ve Mag NP'lerinin, 0,05 mg/ml konsantrasyonunda, U87-MG hücrelerine 24 saat maruziyeti sonucunda lipit peroksidasyonuna bağlı hücre ölümünü indüklediği yönündedir. Burada TQ-Fe NP'lerinin de MDA'yı, Mag NP'lerine çok yakın, benzer düzeylerde arttırması, Mag NP'lerinin lipit peroksidasyonunu teyid eder nitelikte olmakla birlikte, Fit NP'lerinde MDA düzeylerinin azalması, Mag NP'lerinin lipit peroksidasyonunu indüklemedeki etkisinin, demir kaynaklı NP olmasından ileri geldiğini göstermektedir. Bu nedenle, Mag NP'lerinde görülen MDA düzeylerindeki istatistiksel olarak oldukça anlamlı yüksek seviyenin, lipit peroksidasyon artışı ile karakterize olan ferroptotik hücre ölümünün indüklenmesinin bir işareti olduğu sonucuna varılmaktadır.

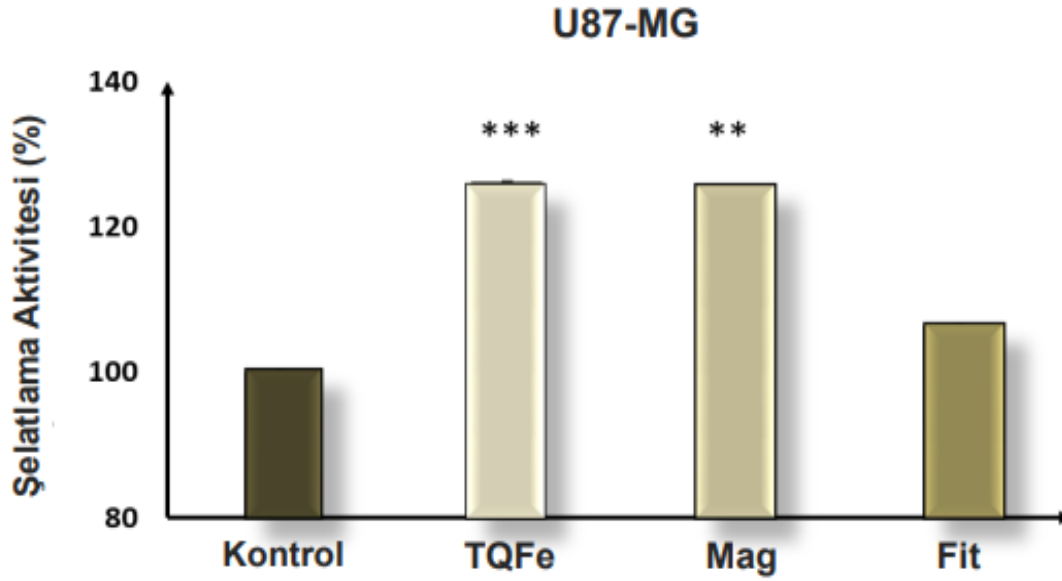
Ferroptoz indüksiyonunun, özellikle standart tedavilerden sonra gelişen ilaç direnci ve nüks durumlarında, yeni bir tedavi stratejisi olma potansiyeline sahip olduğunun düşünülmesi, hücre içi demir seviyelerini ve dolayısıyla lipit peroksidasyon seviyelerini artırarak ferroptozu indükleme stratejilerinin gündeme gelmesine neden olmuştur (Liang ve ark., 2019; Dixon ve Stockwell, 2019). Günümüzde, demir bazlı kanser stratejilerinden biri olan demir bazlı nanoteknoloji, hücrelerde ferroptozu indükleyen en önemli yöntemlerden biri olarak kabul edilmektedir. Literatürde demir bazlı nanoteknolojide, ferroptoz indüksiyonunun üç farklı şekilde hedeflendiği görülmektedir. Bunlar, demir yükleme bazlı lipit peroksidasyonu; demir oksidasyonu bazlı lipit peroksidasyonu ve LfeH bazlı lipit peroksidasyonudur (Huang ve ark., 2019; Hassannia ve ark., 2019; Liang ve ark., 2019; Xie ve ark., 2016; Zhang ve ark., 2019; Yao ve ark., 2019; Guan ve ark., 2020).

Bu amaçla literatüre baktıldığında, kanıtlanmış demir salofen kompleksleri olan Klorido [N, N' - disalisiliden - 1, 2 - fenilendiamin] demir(III) komplekslerinin, ROS üretebildiği ve lipit peroksidasyon bazlı ferroptozu indükleyebildiği gösterilmiştir (Toyokuni., 2009). Benzer şekilde, Paklitaksel yüklü demir oksit NP'leri (IONP@PTX) ile U251 ve HMC3 hücrelerinde demir iyonlarının artırılmasının, Fenton reaksiyonunu tetikleyerek H₂O₂ ile yüksek düzeyde hücre içi süperoksit ve ROS üretiminin, lipit peroksidasyonunu arttırması sonucu ferroptozun tetiklenmesine yol açtığı bildirilmiştir (Chen ve ark., 2022; Ko ve ark., 2024). Ayrıca, glikoz oksidaz (GOD) ve ultra küçük Fe₃O₄ NP'lerin birlikte olduğu GODFe₃O₄@DMSN nanokatalizörlerini sentezleyerek tümörler üzerindeki rolünü ve mekanizmasını araştırmak için, artan hücre içi ROS

seviyelerinin eşlik ettiği, *in vitro* 4T1 ve GB hücre hattı U87 hücrelerinde ölümün indüklediği ve *in vivo* olarak tümör büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2021; Zhang ve ark., 2016; Zang ve ark., 2023). Bu nedenle, GB gibi dirençli tümörlerin çoğalmasını ve istilasını önlemenin çekici bir yolu olarak ferroptozun daha fazla araştırılması gerektiğini bildiren Zhang ve arkadaşları, yaptıkları çalışmalarda, safra cevizinden ekstrakte edilen ve doğal bir bileşik olan gallik asidi (GA), GA/Fe⁺² (GFNP'ler) NP'lerini hazırlamak üzere, Fe⁺² ile kompleks oluşturarak sentezledikten sonra, GB hücreleri üzerinde Fenton reaksiyonunu teşvik ederek hücre ferroptozuna yol açabildiğini, ek olarak, GA'in, Fe⁺³'ü etkili bir şekilde Fe⁺²'ye indirgeyebildiğini ve bunun da, Fenton reaksiyonunu daha da fazla tetiklediğini göstermişlerdir. Bu sonuçlara göre, ferroptozun GB'da terapötik bir etkisi olduğunu ve kemoterapötik ajanlarla kombine edildiğinde sinerjistik etkilere sahip olduğunu öne sürmüşlerdir. Aynı amaçla başka bir çalışmada, GFNP'lerin oldukça stabil Fenton katalitik aktivitesine dayanarak, DOX@GFNP'ler olarak bilinen biyouyumlu bir nanodrug, potansiyel bir antikanser stratejisi için tasarlanmış ve geniş spektrumlu bir kemoterapötik ilaç olan doksorubisin (DOX) ile kombine edilmiştir. GFNP'ler, tümör hücrelerinde Fe⁺² seviyelerini yükseltmek ve Fenton reaksiyonunu tetiklemek dışında, hücre içi ROS düzeylerinde önemli artışa neden olarak lipit peroksidasyonunu oluşturduğu ve ferroptozu indüklediği gösterilmiştir. Böylece, DOX@GFNP'ler gibi ferroptozu indükleyebilen nanoformülasyon çalışmalarında, kemorezistansın tersine çevrilebileceği görülerek, GB için yeni tedavilere yön verebilecek yeni terapötik bileşikler ve nanoyapıların arayış çalışmalarına ışık tutmuştur. (Zhang ve ark., 2023; Zhang ve ark., 2022; Ko ve ark., 2024). Bu nedenle, demir tedariki ve metabolizmasını hedeflemek suretiyle gelişen demir bazlı Fenton reaksiyonu, ferroptoz indüksiyonunda umut verici bir strateji olarak kabul edilmiştir (Huang ve ark., 2019; Guan ve ark., 2020).

Daha önceki tüm deneyler birlikte değerlendirilecek olunursa, Mag NP'lerinin neden olduğu U87-MG hücrelerindeki ölüm şeklinin, apoptoza bağlı bir hücre ölümü olmadığı; ROS ve MDA seviyelerini oldukça anlamlı düzeylerde arttırması nedeniyle, demire bağlı serbest radikal artışı ile lipit peroksidasyonu sonucu gelişen ferroptotik hücre ölümüne kuvvetle ihtimal bağlı olduğu sonucuna varılmaktadır. Ayrıca, Mag NP'lerin lipit peroksidasyonu seviyesini oldukça anlamlı bir şekilde arttırması, sadece demir içeriğinden değil, TQ-Fe içeriğinden kaynaklanıyor olabileceğine de işaret etmektedir.

4.2.5. Nanopartiküllerin Şelatlama Etkileri



Şekil 4.25. TQ-Fe, Mag ve Fit NP'lerinin, U87-MG hücrelerindeki % şelatlama aktiviteleri (0,05 mg/ml, 24 saat). ** ve *** kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, sırasıyla $p < 0.01$ ve $p < 0.001$ anlamlı farkı göstermektedir (Ortalama \pm SD, n = 3).

Kanser şelatör tedavileri için iki geniş strateji araştırılmaktadır. Bunlardan ilki, kanser hücrelerindeki demiri tüketmek/azaltmak için demir şelatörlerinin kullanılmasıdır. İkincisi, kanser hücrelerinde demir artışını sağlamaktır (Hatcher ve ark., 2009; Whitnall ve ark., 2006). Biz de çalışmamızda, bu iki stratejiyi temel alarak; Fit NP'lerini demir ve/veya demir aktivitesini azaltma stratejisi için, Mag NP'lerini ise demir ve/veya demir aktivitesini artırma stratejisi için sentezledik.

Bu iki kanser şelatör tedavi stratejisinin ilki, günümüzde, organizmada aşırı metal yüklenmesi ile ilişkili birçok hastalıkların tedavisi için kullanılan şelatör ajanlarıdır (Kontoghiorghes ve ark, 2015; Kontoghiorghes ve ark, 2020; Timoshnikov ve ark, 2020; Timoshnikov ve ark, 2021; Kontoghiorghes ve ark, 1986; Timoshnikov ve ark, 2015). Kanser tedavisi için, aşırı demir yüklenmesini azaltmayı hedeflemek amacıyla klinikte ilk kullanılan şelatör deferoxamin (Desferal) (560 g/mol) olup (Callens ve ark., 2010; Myers ve ark., 2011), meme kanseri hücreleri üzerinde yapılan çalışmalarda, hücrelerin kemoterapötik ajanlara duyarlılığını arttırdığı (Pogribny ve ark., 2013) ve akut miyeloid lösemide umut verici etkileri olduğu gösterilmiştir (Callens ve ark., 2010; Kim ve ark.,

2011). Nükseden, dirençli akut miyeloid lösemisi olan 73 yaşındaki bir erkek hastada, ek kemoterapi olmaksızın deferoksamin ile yapılan 12 aylık demir şelasyonundan sonra tam sitogenetik remisyonu indüklediği görülmüştür (Fukushima ve ark., 2011), Ayrıca, 69 yaşında, nükseden akut miyeloid lösemisi olan bir erkek hasta deferoksamin ve vitamin D ile tedavi edilmiş, periferik patlama sayılarında azalma, transfüzyon desteği gereksiniminde azalma ve monositik farklılaşmada artış görülmüştür (Callens ve ark., 2010), Yine, akut miyeloid lösemiye ek olarak, indüksiyon kemoterapisinde başarısız olan akut lenfoblastik lösemili altı haftalık bir bebek, deferoksamin ve sitarabin tedavisinden sonra periferik patlama sayıları sıfıra düştüğü ve monositik farklılaşma görüldüğü bildirilmiştir (Estrov ve ark., 1987). Ancak, daha sonraki raporlarda, deferoksamin gibi şelatlayıcı ajanların, hepatoselüler karsinomda etkili olurken, tekrarlayan nöroblastomada etkisiz olması gibi, sadece belirli kanserler üzerinde etkili olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca, ishal, kusma, hipotansiyon, anaflaksi, allerjik reaksiyonlar, işitme ve göz problemleri gibi önemli yan etkilerinin görülmesinin dışında, plazma yarı ömrünün kısalığı, doz aralığının dar olması ve toksik etkilerin fazla görülmesi gibi kısıtlayıcı nedenlerinin bulunduğu da rapor edilmiştir (Katsura ve ark,2019; Liu ve Hider, 2002; Chaston ve ark, 2003).

Yine bir demir şelatörü olan ve plazmadaki transferine bağlı olmayan demirin mobilizasyonu ve atılımı şeklinde antikanser etkinlik gösterdiği bildirilen deferipronun (0,1 mM), özel tarama yöntemlerini içeren çalışmalar, prostat ve meme kanseri modellerinde güçlü antikanser aktivite sergilemesinin yanı sıra, KKH çoğalmasını da inhibe ettiğini bildirmiştir. Daha sonra, deferipron, KKH'lerini hedeflemede FDA onayı almıştır (Simoes ve 2017; Sohn ve ark., 2011; Fiorillo ve ark, 2020; Orfanou ve ark, 2021). Deferipronun antikanser aktivitesi üzerine yapılan çalışmalar sonucunda, Fe⁺³'ü Fe⁺²'ye indirgeme yeteneğine sahip metalloedüktaz olarak işlev gören bir proteinin inhibisyonu yoluyla demir metabolizması ile ilgili olduğu ortaya çıkarılmıştır (Timoshnikov ve ark, 2019; de Souza ve ark, 2022). Ancak deferipronun da, ciddi ölümcül enfeksiyonlar ve allerjik reaksiyonlar gibi önemli yan etkileri, kullanımını kısıtlamaktadır (Kolnagou ve ark, 2010; Kolnagou ve ark, 2017; Kolnagou ve ark, 2011; Kolnagou ve ark, 2018; Kolnagou ve ark, 2008).

Bir başka şelatör olan Dp44mT'nin üzerine yapılan çeşitli *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar, birçok kanser tipini inhibe ettiğini ve deferoksaminden çok daha etkili olduğunu

göstermiştir. Sadece demiri azaltan deferoksaminin aksine, Dp44mT hem hücrel demiri tükettip, hem de kanser hücrelerinde ROS seviyesini artırması, Dp44mT-demir kompleksi oluşturmasına bağlanarak, bu ikili mekanizma etkisinin antikanser etkileri bakımından önemli olduğu belirtilmiştir (Whitnall ve ark., 2006).

Böylece, şelasyon tedavisi, esas olarak aşırı demir yükünü azaltmak amacıyla uygulanırken, kanser hücrelerinde demirin redoks aktivitesinin modülasyonu için de uygulanabileceğinin anlaşılması üzerine, daha yeni bir strateji olan demirin arttırılması ve/veya demir aktivitesinin arttırılması ile ROS oluşumu için redoks döngüsünü kolaylaştıran şelatörlerin kullanılması, ikinci grup şelatör terapötiklerini oluşturmuş ve kanser tedavilerinde şelatörlerle hedeflemeleri önemli bir konuma getirmiştir (Gao ve ark, 2022; Ke ve ark, 2022; Lei ve ark, 2022). Birinci grup şelatörler sadece elektron alıcısı olarak görev yaparken, ikinci grup şelatörlerin, hem elektron alıcı hem de verici özelliklerine sahip, redoks reaksiyonlarına katılabilme yeteneği ile kompleks oluşturdukları metal iyonlarını daha reaktif duruma dönüştürebildikleri, yapılan çalışmalar sonucunda gösterilmiştir (Cao ve ark, 2020; Kontoghiorghes ve ark, 2014; Jeremy ve ark, 1988). Bu özellikteki şelatörler arasında en önemli gruplardan biri kinonlardır. Ancak, sadece demir bağlama ile demir fazlalığını azaltma yönünde etkili olan serbest kinon grupları ile demirle kompleks oluşturmak suretiyle redoks aktivitesine katılarak antikanser etkili olan metal-şelatör kinon grupları arasında farklılık olduğu bildirilmiştir (Kontoghiorghes, 2020; Gaur ve ark, 2018; Sacco ve ark, 2021; Kontoghiorghes ve ark, 2019). Bu farklılığın, metal iyonlarının varlığında semikinon radikalleri ve ROS veriminde tespit edilen artışın sadece metallerle şelatör kompleksi oluşturabilen kinonlarda gözlemlenip, serbest kinonlarda gözlemlenmemesi, çalışmaların bu tür şelatör kinonların araştırılmasına yönelik yoğunlaşmaya neden olmuştur. Ancak, günümüzde, kinon-metal kompleks oluşturma özellikli çok az fitokimyasal ajanın olduğu bilinmektedir (Chekhun ve ark, 2014; Kontoghiorghes, 1986).

Literatüre bakacak olursak, en büyük antitümör sınıflarından birini oluşturan, kinon özellikli antrakininonların, genelde topoizomeras II'nin inhibisyonuna yol açarak DNA sentezini bozmak ve p53 sinyalini modüle etmek suretiyle antitümör aktivitelerini gösterdikleri rapor edilmiştir (Gutierrez, 2000). Ancak, antrakininonların ROS üretimiyle birlikte redoks siklik reaksiyonlara girebilme yeteneğinden dolayı, şelatör olarak

antikanser özelliğinin olabileceğine ilişkin yayınlar son zamanlarda gündeme gelmiş, yine, yüksek antitümör aktiviteye sahip, kinon yapılı olan doksorubisin ve daunorubisin gibi yaygın olarak kullanılan bazı kanser ilaçlarının demiri şelatladığı ve bunların antikanser aktivitelerinin demir modülasyonu yoluyla olduğu, *in vitro* ve *in vivo* deneylerde ROS seviyelerinde artış olduğunun tespit edilmesiyle anlaşılmıştır (Kontoghiorghes ve ark, 2008; Timoshnikov ve ark, 2022; Jablonska-Trypuc ve ark, 2017; Feng ve ark, 2000). Ayrıca, doksorubisinin redoks reaksiyonlarına katılma yeteneği olan şelatör özelliği, tedavi edilen kanser hastalarında oksidatif stresin biyolojik belirteçlerinin yüksekliğinin gösterilmesi ile desteklenmiştir. Ancak antrakinonların, kanser hücreleri için düşük seçicilik göstermesi, kemik iliği aktivitesinde azalma, ağır lökosit ve trombosit kaybının olması, en önemlisi de kardiyotoksikite gibi ciddi toksik yan etkilerin görünmesi kullanım kısıtlılığına neden olmuştur (Kontoghiorghes ve ark, 2008; Timoshnikov ve ark, 2022; Barnabe ve ark, 2002).

TQ fitobileşeni de kinon sınıfının bir parçasıdır ve bu tür bitkisel antioksidanların çoğunluğunun, çeşitli kanser hücrelerinde ROS'un indüksiyonu yoluyla hücre ölümünü tetikleyebileceği, yapılan çalışmalar sonucunda gösterilmiştir (Bhat ve ark., 2007; Simpson ve ark., 1992; Gali ve ark., 1992). Literatüre bakıldığında, TQ'un şelatlama aktivitesinin olabileceği ile ilgili çok az yayına rastlanmaktadır. Bu çalışmalardan birinde, TQ'un, Cu (II)'yi Cu (I)'e indirgediğine ve TQ-Cu(II)-DNA üçlü kompleksinin olası oluşumuna yönelik veriler bildirilmiştir. Bu araştırmadan elde edilen sonuçlara göre, TQ'un endojen bakır iyonlarının mobilizasyonu ile DNA kırılmasına neden olabileceği; bakırın redoks döngüsünün çeşitli ROS'ların, özellikle de hidroksil radikallerinin üretilmesine yol açarak, TQ'un doza bağlı bir şekilde prostat kanser hücrelerinin çoğalmasımı azaltabileceği ve kanser hücrelerinde bu kompleksin, hücre proliferasyonunu inhibe ederek apoptozu tetikleyebileceği bildirilmiştir. Böylece, TQ'un, bakır gibi redoks aktif metaller ile ROS oluşumuna yol açabilen şelatörler gibi de davranabileceği bildirilmiştir. (Zubair ve ark., 2013). Yine yakın zamanda yapılan bir başka çalışmada, Fe⁺³ ve TQ arasında çok net ve hızlı bir reaksiyon ile kompleks oluşumu olduğu ortaya konulmuştur. TQ'un Fe⁺³ giderimini yüksek bir verimlilikle oluşturduğu ve oluşan kompleksin oldukça stabil olarak gerçekleştiği bildirilmiş ve TQ'un, Fe⁺²'yi Fe⁺³'e, zıt olarak Fe⁺³'ü Fe⁺²'ye dönüştürebilme yeteneği ile Fenton reaksiyonuna benzer bir reaksiyona katılabileceği sonuçları (Kishwar ve ark, 2012),

TQ'un metallere kompleks oluşturma potansiyeline sahip bir şelatör olabileceğine işaret etmektedir.

Bu nedenle biz de çalışmamızda, hem şelatlama özelliğinin anlaşılmasına; hem GB gibi oldukça agresif ve tedavilere dirençli kanserlere karşı demir bazlı tedavi stratejilerine; hem de şelatör özellikli olabilecek yeni bir NP geliştirilmesine katkı sağlamak için TQ'u baz alarak Mag ve Fit NP'lerini sentezledik ve GB hücrelerinde bu NP'lerin demiri şelatlama etkinliklerini test ettik. Bölüm 2.3.8.4'de açıklandığı şekilde "Ferrozin" (Sigma) test prosedürünü uygulayarak, NP'lerin U87-MG hücrelerinde demir şelatlama aktivilerini ölçtükten sonra, sonuçları istatistiksel olarak anlamlandırdık ve grafiğe geçirerek Şekil 4.27'de sunduk. Grafiğe bakacak olursak, Fit NP'lerinin, U87-MG hücrelerinde 24 saat muamelesi sonucu, kontrole göre sadece % 6,3 oranında, ancak istatistiksel olarak anlamlı görülmeyen şelatlama aktivitesine sahip olduğu görülmektedir. TQ-Fe NP'lerin ise, U87-MG hücrelerinde 24 saat muamelesi sonucu, kontrole göre, % 26,1 oranında, istatistiksel olarak oldukça anlamlı bir şekilde ($p < 0,001$) yüksek bir şelatlama gücüne sahip olduğu görülmektedir (Şekil 4.27). Yine benzer şekilde Mag NP'lerinin de, U87-MG hücrelerinde 24 saat muamelesi sonucu, kontrole göre, % 25,2 oranında, istatistiksel olarak oldukça anlamlı ($p < 0,01$) yüksek bir şelatlama gücüne sahip olduğu Şekil 4.27'de grafikten görülmektedir.

Bu sonuçlara göre, TQ-Fe NP'lerinin de oldukça benzer şelatlama aktivitesinin görülmesi, Mag NP'lerinin şelatlama özelliğinin teyidi açısından önemlidir. Grupların şelatlama aktivitelerine bakılacak olunursa (TQ-Fe NP ~ Mag NP > Fit NP), Mag NP'lerinin oldukça yüksek şelatlama gücüne sahip olduğu görülmektedir. Çalışmamızda, Mag NP'lerinin, etkili bir şekilde şelatlama özelliğinin olduğunun görülmesi, etken madde özelliğinde sentezlenen TQ-Fe NP'lerinin, yeşil sentez sırasında şelatör-metal kompleks özellikli bir reaksiyonla bağlanmış olabileceğini akla getirmektedir. Literatüre baktığımızda, demir iyonlarına duyarlı ROS oluşturma yeteneği gösteren kinon-şelatörlerin önemli bir özelliği olarak, bir -OH grubunun ya da O atomlarının şelatlama bölgesinde varlığının görülmesi ve demir şelatlama bölgesinden bağlanma ile ROS oluşumunu, dolayısıyla hücre ölümünü önemli ölçüde arttırabileceği bildirilmektedir (Jablonska-Trypuc ve ark., 2017). Bu literatür bilgilerine göre, yaptığımız FTIR spektrum analizinde, TQ'un şelatör özellik gösterecek (semikinon benzeri yapıda, hem bir -OH hem de O varlığı) bant bölgelerinden

bağlanma olasılığı bunu desteklemektedir. Ayrıca diğer bir literatür bilgisinde, -OH ikameli kinonlara göre O atomlu kinon-şelatörlerin aktivitesinin 100 kattan daha fazla olduğu bildirilmiş ve bu durum, meme kanser hücrelerinde (MCF-7) gösterilmiştir (Markova ve ark., 2017). Ancak, TQ'un şelat merkezinde, hem kinon merkezinin hem de redoks aktif metal iyonunun varlığının gösterilmesi gibi ileri çalışmalarla bu durumun aydınlatılması gerekmektedir.

Önceki çalışmalar, kinonların sitotoksik etkilerini açıklamak için, Michael katılımı ile arilasyon sonucu DNA, protein hasarı ve özellikle hücre iskeleti işlevsizleşmesi yoluyla hücre ölümünün gerçekleştiği bir mekanizmayı önermekteydi. Racoma ve arkadaşları tarafından (2013) yapılan, bunu destekleyen bir çalışmada, U87-MG hücreleri üzerinde TQ'un etkisinin Michael reaksiyonuna katılma yoluyla ROS'dan bağımsız olarak hücre ölümünün indüklendiği ifade edilmiştir. Buna dayanak olarak da; hidrojen peroksit aracılı hücre ölümüne karşı koruma sağladığı bilinen Tiron'un, TQ aracılı ölümden hücreleri koruyamadığını göstererek, GB hücrelerinde TQ sitotoksitesinin ROS kaynaklı olmadığını, arilasyon sonucu olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Son yapılan araştırmaların sonuçlarına göre, kinonların kanser hücresinde etki gösterdiği iki mekanizma öne sürülmüştür: Birincisi DNA dublekslerine interkalasyon olup, ikincisi ise lipit peroksidasyonun uyarılmasıyla hücrel membranları parçalayan ROS üretilmesidir (Kankeu ve ark., 2017; Bhattacharya ve ark., 2015; Hrelia ve ark., 2002). Bu ikinci mekanizma, kinon ajanların, hücre içine nüfus etmedikleri ve dolayısı ile DNA'ya ulaşamadıkları durumlarda bile antikanser aktivite gösterebildiğinin anlaşılması üzerine öne sürülmüştür. Yine bu mekanizmanın öne sürülmesindeki diğer bir dayanak, yapılan bir çalışmada, kinon-metal kompleksinin lipit çift katmanlarına nüfuz edebildiğinin, böylece lipit hareketliliğine ve membran proteinlerine etki edebileceğinin gösterilmesi olmuştur (Selyutina ve ark., 2022). Kinonların sitotoksitesinin ana mekanizması olarak arilasyon ve nükleik asit etkileşimi ile DNA hasarı gösterilse bile (Racoma ve ark., 2013), yapılan çalışmalarda, kinonların, lipofilik özellikleri nedeniyle, DNA'ya ulaşım için çeşitli lipit zarlarını pasif difüzyonla geçmesi, kinon lipofilitesi ile lipit çift katmana nüfuz etme yetenekleri arasında korelasyon olduğu sonucuna götürmektedir. Kinonların neden olduğu ROS üretim mekanizmasının ilk aşamasında; kinonun doğal redüktazlar (yani nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NAD(P)H), askorbik asit veya indirgenmiş glutatyon) tarafından indirgenmesinin,

semikinon radikal oluşumuna neden olduğu ve aerobik koşullar altında, bu semikinon radikal anyonlarının, ROS üretiminden sorumlu olan metal iyonlarını (özellikle demiri) şelatlama (şelat-metal kompleks oluşturma) yeteneğinin, lipitlere nüfuz etme yeteneğine bağlı olduğu bildirilmektedir (Selyutina ve ark., 2022). Bu durum, kinonların metal komplekslerinin, miseller gibi model sistemlerde lipit peroksidasyonunu arttırabildiğinin gösterilmesi ile desteklenmiştir (Giemza-Stoklosa ve ark, 2019; Li ve ark, 2022). Bu nedenle kinon ajanların hücre zarı ile etkileşimi ve hücre zarı çift lipit tabakasında birikmesinin, antikanser aktivitesinde önemli rol oynadığı ve kinonların, hücre zarındaki olası aktivite mekanizmalarından birinin, hücre zarı içinde ROS üretimi ile lipit peroksidasyonu ve ardından hücre zarının hasar görmesi olabileceği öne sürülmektedir. (Li ve ark, 2022; Lalueza ve ark, 2020; Selyutina ve ark., 2022).

Önceki çalışmalarda, antrakınonların kardiyotoksik etkisinden radikal aktivitesinin sorumlu olduğu belirtilmişti (Timoshnikov ve ark, 2022; Polyakov ve ark, 2018). Yapılan çalışmalarda, antrakınonların kardiyotoksitesisi ile ilgili bir başka olası mekanizma olarak, kinon gruplarının lipit peroksidasyon reaksiyonlarındaki rolleriyle ilişkili olabileceği ileri sürülmüş ve özellikle yapılan *in vivo* çalışmalar, deney hayvanlarının kalp dokularında lipid peroksidasyonunun belirteçlerinden biri olan malondialdehid veriminin doksorubisinin varlığında önemli ölçüde arttığını göstermiştir (Christidi ve Brunham, 2021). Ayrıca, yapılan diper çalışmalar, kinonun, *in vitro* olarak kardiyomiyosit hücrelerinde lipit peroksidasyonunun bir sonucu olarak görülen konjuge dienlerin oluşumunu indüklediği ve buna daha sonra membran bütünlüğünün bozulmasının eşlik ettiğini bildirmektedir (Hrelia ve ark., 2002; Christidi ve Brunham, 2021).

Sonuç olarak, kinon şelatörler ile ilgili antikanser aktivitelerinin ana mekanizması olarak, etki şeklinin DNA bağlanması yoluyla oluşan hasardan mı yoksa ROS yoluyla gelişen hasardan mı olduğu (Lalueza ve ark, 2020; Seyhan ve ark, 2014) sorusu çözüm beklerken, model çalışmalardan elde edilen veriler, lipit yapılar içerisindeki şelatörlerin etki mekanizmasının lipit peroksidasyon yoluyla olacağı ve bu nedenle, lipofilik şelatörler ve bunların demir komplekslerinin, etkili tedavilerin bulunmadığı metastaz, ilaca direnç veya tekrarlayan tümörlerde ferroptozun indüklenmesi için önerilebileceği ifade edilmektedir (Giemza-Stoklosa ve ark, 2019; Li ve ark, 2022).

Biz de çalışmamızda, U87-MG hücreleri üzerinde Mag ve Fit NP'lerinin lipit peroksidasyon etkilerini görmek için daha önce belirttiğimiz gibi, MDA testinde, Mag NP'lerinin MDA seviyelerini oldukça anlamlı düzeylerde arttırdığını ve TQ-Fe NP'leri ile çok yakın benzerliğin görülmesi nedeniyle, TQ-Fe NP'lerinin Mag NP'lerindeki bu etkiyi teyit ettiğini bildirmiştik. Ayrıca, Fit NP'lerinde MDA düzeyinin azalması nedeniyle, bu etkinin Mag NP'lerin yapısında bulunan demir etkisiyle olabileceği sonucuna varmıştık. Ancak, MDA deneyinde TQ-Fe NP'lerinin, Mag NP'lerine oldukça yakın, yüksek düzeylerde görülen sonuçları, Mag NP'lerini teyit niteliğinde olmakla birlikte, literatür bilgileri göz önünde bulundurulduğunda, MDA deney sonucu ile şelatlama aktivite deneyi sonuçlarını birleştirecek olursak, Mag NP'lerinin lipit peroksidasyonunu artırma etkisinin, yapısındaki TQ-Fe NP'lerinin kinon-metal kompleks bağlanması nedeniyle olabileceği şeklindeki yorumumuza, yukarıda verilen literatür sonuçları açıklık getirebilir. Ayrıca, TQ-Fe NP sonuçlarının, yaptığımız hemen tüm deneylerde Mag NP'lerine oldukça yakın görülmesi, Mag NP sonuçlarının doğruluğunu teyit etmesinin yanı sıra, sonuçlarda TQ-Fe NP'lerinin etkisinin büyük olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, TQ-Fe NP'leri hazırlanırken, yeşil metod ile sentezi sırasında, kinon-metal kompleksini oluşturan şelatlama bölgesinden bağlanma reaksiyonu gerçekleşmiş olabilir. Bundan dolayı, Mag NP'lerinin ROS seviyesini arttırma etkisi de yapısında bulunan TQ-Fe NP'lerinin şelat kompleksi nedeniyle olmuş olabilir. Son olarak, bu üç deney (şelatlama aktivitesi, ROS tespit ve MDA seviyesi) sonuçlarını birleştirecek olursak, kinon-demir komplekslerinin kanser hücrelerindeki etki mekanizmasının lipit peroksidasyonu yoluyla olabileceğini ileri süren literatür bilgileri, bizim çalışmamız ile de uyumlu olarak görünmektedir. Sonuç olarak, yukarıdaki literatür bilgilerinin ışığında, TQ-Fe içerikli Mag NP'lerinin U87-MG hücrelerindeki sitotoksik etkinin olası nedeni olarak; TQ-Fe şelasyonuna bağlı oluşan kinon-metal kompleksinin artan ROS etkisi ve kompleksin lipit membran zarlara nüfuz etme yeteneği sonucu başlattığı lipit peroksidasyonu yoluyla gelişen zar harabiyeti ve hücre ölümü şeklinde olabileceği önerisi mantıklı olacaktır. Ayrıca, genel bilgiler kısmında açıkladığımız gibi, hidroksil radikallerinin kısa ömürlü olması sebebiyle, ancak birkaç nanometre aralığındaki yakın çevresinde hasar oluşturabilmesi (Ayala ve ark., 2014) de, kinon-metal kompleksin, lipit peroksidasyon etkisinin lipit zarlara nüfuz ederek göstermiş olma ihtimalini desteklemektedir. GB hücrelerindeki bu sitotoksik etkinin, ferroptik ölüm yoluna yüksek benzerliği, Mag NP'lerinin ferroptoz yönlü hücre ölümüne götürme yeteneğinin olabileceğine işaret etmektedir. Ayrıca yapmış

olduğumuz hücre canlılık deneyinde Mag NP'lerinin sitotoksik etkisinin görülmesi ile birlikte, apoptotik indüksiyonun tespit edilemeyişi de bu önerimizi destekler niteliktedir.

Yine son zamanlarda yapılan çalışmalar, GB hücrelerinde ferroptoz artışının, tümör büyümesindeki azalma ile doğrudan ilişkili olduğunu ve daha iyi sonuçlar sağladığını göstermektedir (Mitre ve ark., 2022). Demir bazlı ferroptoz indüksiyonunu hedeflemek amacıyla yapılan bir çalışmada, *Cortex pseudolaricis*'in kök ve gövde kabuğundan izole edilen bir diterpenik asit olan psödolarik asit-B (PAB) kullanılması sonucu, aşırı H₂O₂ üretimi ve demirle aktive olan lipit peroksit oluşumu, hem *in vitro* hem de *in vivo* glioma hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir (Wang ve ark., 2018). Ayrıca, U251, U87, U118 ve A172 gibi hücre hatlarında brusin ile yapılan çalışmalar da, aşırı demir yüklenmesi ve endoplazmik retikulum (ER) stresinin aktive edilerek H₂O₂ düzeyleri ve lipit peroksidasyon artışı ile ferroptozun indüklendiği gösterilmiş ve FDA onayı alarak, GB tedavisinde umut verici terapötik bileşik olarak önerilmiştir (Lu ve ark., 2021; Lu ve ark., 2020). Bu nedenle, artan demir aktivitesi ve lipit peroksidasyon artışının ferroptoz indüksiyonu yoluyla GB hücrelerinde tümör proliferasyonunun azalmasına neden olduğu ve bu sonuçların, GB'da etkili olmayan mevcut tedavileri iyileştirmek için potansiyel bir terapötik hedef olabileceğine işaret ettiği belirtilmektedir (Buccarelli ve ark., 2018; Yuan ve ark., 2022).

Günümüzde, ferroptoz indüksiyonu için demir bazlı NP'ler gündemde olup, dirençli kanser hücrelerini ortadan kaldırmak için umut verici bir terapötik yaklaşım olarak görülmektedir (Zhang ve ark., 2022; Ma ve ark., 2017). Literatüre bakıldığında, Guo ve arkadaşları (2017), daha küçük Fe₃O₄ nanopartiküllerinin hücreler tarafından daha kolay içselleştirildiğini, daha büyük Fe₃O₄ nanopartiküllerinin ise tümörde birikmesinin daha kolay olduğunu görülmesi üzerine, yapılan çalışmalarda, demir bazlı Ultra küçük Fe₃O₄ NP'lerin, hücre içi ROS seviyesini arttırmak için demir salınımının yanı sıra, redoks metabolizmasına da katılabilabileceği ve bu ultra küçük Fe₃O₄ NP'lerin, tümörün hafif asidik (yaklaşık pH:6) mikro ortamında bir Fenton reaksiyon katalizörü olarak hücreler arası redoks metabolizmasına da katılabileceği gösterilmiş ve bunun, demir bazlı NP'lerin, tümör bölgesinde normal dokuya göre daha belirgin şekilde demir (Fe⁺²) veya demir (Fe⁺³) iyonları saldırdığı anlamına geleceği, böylece, serbest bırakılan demirin Fenton reaksiyonuna katılarak tümör hücresinde ferroptozu tetikleyebileceği belirtilmiştir (Huo ve arkadaşları 2017). Sıfır değerlikli demir NP'leri üzerine yapılan

diğer bir çalışmada, mitokondriyal lipid peroksidasyonu ve organellerde GPX4 azalması yoluyla ferroptozu indükleyebileceği bildirilmektedir. Böylece, demir şelasyonunun, ayrıca Fenton reaksiyonunu da katalize etme yeteneğine sahip olduğu bildirilmiştir (Sagasser ve ark., 2019). Biz de çalışmamızda sentezlediğimiz TQ bazlı Mag demir NP'ümüzün, GB hücrelerindeki hücre ölüm şeklinin, literatüre dayanarak yüksek ihtimal ferroptoz yoluyla olduğunu önermekteyiz. Ancak, Mag NP'leri-ferrotoz ilişkisinin, ayrıca ferroptoz-hücre ilişkisinin daha ileri mekanizmatik ve *in vivo* alışmalarla, ihtiyaı olan netliğe kavuşturulması gerektiği kanaatindeyiz.

Çalışmamızda, şekil 4.27'deki grafik sonucunda Fit NP'lerinin, kontrole göre sadece % 6,3 oranında, istatistiksel olarak anlamlı olmayan, çok az (yaklaşık olarak kontrol kadar) bir şelatlama aktivitesine sahip olduğu görülmektedir. şelatlama bakımından, Fit NP'lerinin, Mag NP'lerinden % 15,1 oranında daha az aktif olduğu anlaşılmaktadır. Buradan TQ'un demirle kompleks oluşturmadığı durumlarda şelatlama etkisinin az olduğu anlaşılmaktadır. Bu sonuç, Fit NP'lerinin, hem ROS hem de MDA sonuçlarında görülen, ROS seviyelerini ve lipid peroksidasyonunu azaltma sonuçları ile uyumluluk göstermekte olup, TQ'un antioksidan özelliğinin ifadesi olarak yorumlanabilir. şelatlama aktivitesi bakımından TQ'un tüm NP'lerde benzer etki göstermesi beklenen bir durum olsa da, yapılan bazı çalışmaların sonucu, serbest kinonlar ile metallere bağlı kinonlar arasında davranış farklılığının olabileceğinin bildirilmesi (Kontoghiorghes, 2020; Gaur ve ark, 2018; Sacco ve ark, 2021; Kontoghiorghes ve ark, 2019), TQ'un serbest ve metale bağlı yapı farklılığının daha ileri çalışmalarla aydınlatılmasının, TQ'un potansiyel terapötik etkilerinden daha çok yararlanılmasını sağlayacaktır.

5. YORUM

Günümüzde, demir aktivitesinin kanser patolojisinin büyük çoğunluğunda rol oynadığının gösterilmesi ve kanser hücre fenotipinin yüksek demir ihtiyacı, demir bağımlı mekanizmaların hedeflenmesinin önemini vurgulaması bakımından, kanser tedavi stratejileri ile ilgili yeni bakış açılarının gelişmesine neden olmuştur. Kanser hücrelerinde demirin kullanılabilirliğinin sınırlanması ve/veya aşırı demirin ROS indüksiyonu yoluyla, normal hücreler zarar görmeden, kanser hücrelerine seçici olarak hedeflenebilmesi için şelatörlerden faydalanmanın, GB'daki direnç senaryosunu tersine çevirebileceği ve antikanser aktiviteyi arttırabileceği düşüncesiyle, bu çalışmada, demir modülasyonu için sentezlenen ve şelatlama aktivitesi olabileceği düşünülen NP'lerin, GB hücrelerinin demir fonksiyonuna olan etkileri üzerine odaklanılmıştır.

Fitokimyasal şelatörlerin, pasif metal bağlama etkilerinin dışında, metal kompleks oluşturarak aktif olarak antikanser etkili olabileceğinin anlaşılması, çok yönlü çeşitli kanser hedefleme fırsatlarını gündeme getirmiştir. Kinon yapısından dolayı, TQ'un bu özellikli bir fitobileşen olabileceği, yakın zamanda bildirilmesi nedeniyle, bu tezde, TQ-Fe bazlı Mag NP'lerinin, TQ'un demir ile metal kompleks oluşturma özelliği yönünden; TQ bazlı Fit NP'lerinin ise, serbest TQ'un pasif demir bağlama özelliği yönünden GB hücrelerinin demir fonksiyonu üzerindeki etkileri incelenerek, demir bazlı kanser hedefleme stratejisi için bir ön çalışma yapılmıştır.

Yapılan çalışmanın sonuçları özetlenecek olunursa;

- GB hücrelerinin demir fonksiyonu üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla, TQ-Fe NP'lerin hazırlanması için uygulanan yeşil metod ile TQ ve demirin başarıyla biyosentezlenmesi yapılmıştır. Böylece doğal yoldan sentezlenebilen, kolay, ucuz ve etkili bir fitosentezin TQ ve demir yönlü örneği, literatürle uyumlu olarak, başarıyla gerçekleştirilmiştir. Metalik NP'lerin kontrollü sentezi, indirgeme, çekirdeklenme ve NP büyümesi aşamalarının sınırlı bir şekilde gerçekleştiği özel ortamları gerektirmektedir. Bu açıdan, yeşil sentez ile elde edilen bitkisel bazlı metal NP sentezinin, özel ortam gerektirmemesi yönüyle de avantajlı olduğu görülmüştür.
- Ancak, biyosentezlenen bu NP'lerin, bağladıkları bu metal katyonlarını biyolojik membranları boyunca taşıma mekanizmalarından yoksun olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, bu metalik partiküllerin, hücre membranından geçiş belirsizliğini aşmak için

lipozomal yapılar halinde taşınmalarının, kontrollü geçiş kararlılığını sağlamak açısından önemli olduğu düşünülerek, ilk defa bu çalışmada görülen ve “Magnetolipozom” adı verilen, TQ bazlı, tamamen doğal, demir NP’lerinin sentezleri yapılmıştır. Bu amaçla, yeşil metotla sentezlenen TQ-Fe NP’lerini, etken madde görevi görmesi için doğal fosfolipitler olan soya fasülyesi kaynaklı fosfatidilkolinlere (lesitin) (SPC) bağlamak suretiyle Mag NP’leri başarıyla elde edilmiştir. Böylece, TQ-Fe bazlı Mag NP’lerinin yapımının kolay, etkili ve ucuz bir yöntem olduğu görülmüştür.

- Ayrıca, demir bazlı olmayan, tamamen doğal Fit NP’leri de, literatüre göre fitozom teknolojisi kullanılarak, TQ’un SPC’lere bağlanmasıyla başarılı bir şekilde sentezi yapılmıştır. Böylece, çalışmamızda, diğer bir doğal NP grubunu oluşturan TQ bazlı Fit NP’lerinin yapımı da kolay, etkili ve ucuz bir yöntem olarak değerlendirilmiştir.
- Karakterizasyon çalışmalarında, TQ-Fe, Mag ve Fit NP’lerin STEM analizi ile yüzey uygunlukları, yuvarlak, küresel morfolojileri ve < 50 nm boyutlarında NP’ler oldukları teyid edilmiş; FTIR spektrometre ile NP’lerin TQ, Fe ve fosfolipit içeriklerinin işlevsel bantları ve bağlanma özellikleri görülmüş; SEM-EDX analizi ile NP’lerin elementel yapıları ve saf oldukları anlaşılmış ve NP’lerin size, pdi ve zeta potansiyel analizleri (sırasıyla, TQ-Fe NP’leri için $88,20 \pm 59,57$, $0,367$, $-18,0 \pm 4,16$; Mag NP’leri için $76,31 \pm 46,19$, $0,263$, $-26,1 \pm 3,17$; Fit NP’leri için $87,49 \pm 45,80$, $0,223$, $33,2 \pm 5,41$) ile <100 nm boyutlu; homojen dağılımlı; kararlı yapılar oldukları görülmüştür. NP’lerin % EE’nin oranlarını, TQFe, Mag ve Fit NP’leri için sırasıyla, %89, %76 ve %81 olarak bulunmuştur. Ayrıca, Mag ve Fit NP’lerin 60 günlük, +4°C’deki raf ömrünün, Mag NP’lerinde daha az boyut artışı ile daha stabil olmakla birlikte (> Fit-size > Mag-size), nispeten stabil ve homojen dağılımlı (~350 pdi) (<400 pdi) oldukları görülmüştür. Mag ve Fit NP’lerinin 37 °C’de salım özelliklerinin, ilk 8 saat içinde burst (patlama) tarzında önce salım yaptıkları, daha sonra uzun sürede (72 saate kadar) sabit, kontrollü salım yapma şeklinde ikili salım özelliği gösterdiği anlaşılmıştır. Bu karakterizasyon çalışmaları sonucunda NP’lerin özellikleri tespit edilerek, Fit partiküllerinin uygun nano yapılar olduğu; ayrıca, TQ’un demiri bağlayarak oluşturduğu TQ-Fe bağlı komplekslerden nanopartiküller özellikli yapıların elde edilebildiği ve ilk kez bu çalışmada sentezlenen Mag NP’lerinin, nano yapıda demir nanopartikülleri oldukları gösterilmiştir.

- Karakterizasyon çalışmalarının ardından, Mag NP'leri demir ve/veya demir işlevini artırma yönünden, Fit NP'leri ise demir ve/veya demir işlevini azaltma yönünden, U87-MG GB hücrelerinde demir fonksiyonu üzerindeki etkilerinin araştırılması için, hücre canlılığı, apoptozu indükleme, serbest radikal oluşturma ve lipit peroksidasyonunu başlatma etkileri ve GB hücrelerinde demir şelatlama aktiviteleri *in vitro* olarak incelenmiş, istatistiksel olarak değerlendirilerek yorumlanmıştır. Mag ve Fit NP'leri karşılaştırmalı olarak değerlendirilirken, TQ-Fe NP'leri sadece Mag NP'lerini konfirme amacıyla değerlendirmeye alınmıştır.
- Toplu olarak tüm sonuçlara bakılacak olunursa, hücre canlılık deneyinde tüm NP'lerin U87-MG hücrelerindeki IC₅₀ değeri, 0,05 mg/ml (24 saat) olarak belirlenmiştir. Boş NP'lerinin hücre canlılığına etkisi görülmezken, Mag ve Fit NP'leri, programlı hücre ölümü yönünden önemli olabilecek sitotoksik etkiler göstermiştir.
- U87-MG hücrelerinde, Fit NP'lerinin yüksek doza bağlı olarak (0,15 mg/ml, 24 saat) oldukça anlamlı düzeyde apoptotik etkili olduğu görülmüştür. IC₅₀ dozunda, ROS ve lipit peroksidasyon düzeylerini azaltıcı etkiler gösterdiği tespit edilmiş, GB hücrelerindeki şelatlama aktivitesinin de düşük olduğu sonucu elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre, Fit NP'lerinin GB hücrelerindeki demir fonksiyonuna yönelik etkilerinin düşük olduğu, şelatlama etkilerinin ancak, demir kullanımını sınırlandıran pasif şelatlama aktivitesine benzer, serbest kinon şelatlama özelliğinde olabileceği, ROS ve lipit peroksidasyon seviyelerini azaltıcı etkileri nedeniyle öngörülmüştür. Ancak, bu sonucun ileri araştırmalarla teyid edilmesi ve mekanizmatik olarak açıklanması gerektiği sonucuna varılmıştır.
- Mag NP'lerinin IC₅₀ değerinde U87-MG hücrelerinde, sitotoksik etkili olduğu görülüp, bu etkinin, apoptozu indükleme yoluyla olmadığı tespit edilmiştir. Ancak, ROS ve lipit peroksidasyon seviyelerinde görülen anlamlı düzeylerdeki artışların, ferroptozun karakteristik bulguları olması nedeniyle, Mag NP'lerinin GB hücrelerindeki sitotoksik etkilerinin ferroptotik hücre ölümü yoluyla olabileceğine işaret ettiği sonucuna varılmış olmakla birlikte, Mag NP'lerinin ferroptoz ilişkisinin daha detaylı ileri araştırmalarla aydınlatılmaya ihtiyacı olduğu kanaatine varılmıştır. Yine, Mag NP'lerinin GB hücrelerindeki şelatlama aktivitesi yönünden de oldukça anlamlı derecede yüksek etkiye sahip oldukları tespit edilmiştir. Bu nedenle, Mag NP'lerinin GB hücrelerinin demir fonksiyonu bakımından etkilerinin, şelatör-metal kompleks özelliğinde ve demir aktivitesini arttırıcı yönde bir etkiyi temsil ettiği

sonucuna varılmış olmakla birlikte, daha ileri çalışmalarla bu bulguların doğrulanması gerektiği düşünülmüştür.

- Mag NP'lerinin demir aktivitesine yönelik bütün sonuçlarının, TQ-Fe NP'leri ile oldukça benzerlik göstermesi, konfirme etme açısından değerli olmakla birlikte, bu etkilerin, TQ-Fe NP'leri sebebiyle olduğunu göstermesi ve Mag NP'lerinde etken maddeler olarak demir fonksiyonu yönünden oldukça etkili olduklarının anlaşılması, asıl önemli nokta olarak değerlendirilmiştir. Bu nedenle, yeşil metodun, metal NP'lerin biyosentezinin yapılmasında gösterdiği etkinin yanı sıra, fitobileşenlerin metallerle kompleks oluşturmasını kolaylaştırıcı reaksiyonlara zemin hazırlama yönünden de etkili bir role sahip olabileceği kanaatine varılmıştır. Ancak, bu mekanizmalar tam olarak anlaşılabilmiş değildir ve ileri analizler bu duruma ışık tutabilecektir. Bu nedenle, daha detaylı araştırmalarla bu durumun açıklığa kavuşturulmasının önemli olduğu sonucuna varılmıştır.
- Sonuç olarak, bu çalışmada, TQ-Fe, Mag ve Fit NP'lerinin sentezleme ve karakterizasyon hedefleri başarıyla tamamlanmış, önerilen Mag NP'leri ile GB hücreleri üzerinde demir aktivitesini tetikleme yoluyla sitotoksik etki gösterme hedeflerine ulaşılmıştır.
- Ayrıca, TQ-Fe kompleksli nanopartiküler yapılar baz alınarak, tamamen doğal Magnetolipozom NP'leri başarıyla elde edilerek ilk defa bu tez çalışmasında literatüre sunulmuştur.
- Eldeki veriler, Mag NP'lerinin, taşıyıcı sistem olarak özgülüğünün, güvenliğinin, hedeflemesinin ve stabilitesinin daha da geliştirilerek desteklenmesi durumunda demir bazlı stratejiler için kanser hedefleme potansiyeli yönünden umut vaadeden terapötik bir aday olabileceğini ortaya koymuştur.
- Dolayısıyla, bu çalışmada önerilen yöntem, demir modülasyonu yoluyla demir aktivitesini harekete geçirerek arttırma yeteneğine sahip olduğu düşünülen demir şelatör karakterli Mag NP'leri ile kanser hücre sitotoksitesisi için demir bazlı bir kanser hedefleme stratejidir.
- Bu nedenle bu çalışmanın demir bazlı nanopartiküler tedavi stratejisine katkı sağlayacağına inanılmaktadır. Ancak demir bazlı bu tedavi stratejisinin, normal hücrelere toksisitesinin, açıklayıcı etki mekanizmalarının ve *in vivo* etkilerinin

öngörülebileceği daha ileri araştırma sonuçlarına ihtiyaç duyulduğu kanaatine varılmıştır.

Son yıllarda tıp alanında önemli gelişmeler olmaktadır. Modern tıpta gelinen noktada, moleküler alanlardan nonoya doğru inilmesi ile hızla bütüncül bir yaklaşım vizyonuna adaptasyonun sağlanmasıdır. Artık, tıbbın bütünü içine alması gerekmektedir. Bu bakış açısıyla, teşhis ve tedavi ayrılığını bütünleştirerek, tek ve ortak bir platformda birleştirme zamanı gelmiştir. Bu nedenle, çalışmamızda ilk kez literatüre sunulan Mag NP'lerinin, gelecekte hem kanser tedavisi hem kanser teşhisi için aynı anda kullanılabilir potansiyelli bir teranostik materyal olarak değerlendirilmesi ya da bu yönde daha ileri çalışmalara ışık tutması bakımından, bilime katkı sağlayacak bir ön çalışma olması umudu ile bu tez çalışması yapılmıştır.

KAYNAKLAR

- Abbott, N.J., Dynamics of CNS barriers: evolution, differentiation, and modulation, *Cell Mol Neurobiol*, 25 (1), (2005), 5–23.
- Abbott, N.J., Patabendige, A.A., Dolman, D.E., Yusof, S.R., Begley, D.J., Structure and function of the blood–brain barrier, *Neurobiol Dis.*, 37 (1), (2010), 13–25.
- Abboud, S., Haile, D.J., A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism, *J Biol Chem.*, 275, (2000), 19906-19912.
- Abe, C., Miyazawa, T., Miyazawa, T., Current Use of Fenton Reaction in Drugs and Food, *Molecules.*, 27, (2022).
- Abdualmjid, R.J, Sergi, C.M., Mitochondrial Dysfunction and Induction of Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma and Cholangiocarcinoma Cell Lines by Thymoquinone, *Int J Mol Sci.*, 23, (2022), 14669.
- Ahmad, A., et al., A review on therapeutic potential of *Nigella sativa*: A miracle herb, *A P J Trop Biomedicine*, 3(5), (2013), 337-352.
- Ahmad, A., Mishra, R.K., Vyawahare, A., et al., Thymoquinone (2-Isopropyl-5-methyl-1, 4-benzoquinone) as a chemopreventive/anticancer agent: Chemistry and biological effects, *Saudi Pharm J.*, 27, (2019), 1113-26.
- Ahmed, W.A., Hassan, S.A., Galeb, F.M., El-Tawee, I M.A., Abu-Bedair, F.A., The in vitro promising therapeutic activity of thymoquinone on hepatocellular carcinoma (HepG2) cell line, *Global Veterinaria*, 5, (2008), 233-241.
- Ahmed, M., Pickova, J., Ahmad, T., Liaquat M, Farid A and Jahangir M. Oxidation of lipids in foods, *Sarhad Journal of Agriculture*, 32 (3), (2016), 230-238.
- Akyol, S., Akyol, O., The interaction of glutathione and thymoquinone and their antioxidant properties, *Electronic Journal of General Medicine*, 15(4), (2018).
- Al-Oqail, M.M., Al-Sheddi, E.S., Al-Massarani, M., Siddiqui, A., Ahmad, J., Musarrat, J., Al-Khedhairi, A., Farshori, N., *Nigella sativa* seed oil suppresses cell proliferation and induces ROS dependent mitochondrial apoptosis through p53 pathway in hepatocellular carcinoma cells, *S Afr J Bot*, 112, (2017), 70-78.

- Alam, S., Khan, I., Mustafa, G., Kumar, M., Islam, F., Bhatnagar, A., Development and evaluation of thymo-quinone-encapsulated chitosan nanoparticles for nose-to-brain targeting: A pharmacoscintigraphic study, *Int J Nanomed*, 7, (2012), 5705.
- Albanese, A., Tang, P.S., Chan, C., The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems, *Annu Rev Biomed Eng.*, 14, (2012), 1-16.
- Alhakamy, N.A., Badr-Eldin, S.M., Fahmy, U.A., Alruwaili, N.K., Awan, A., Caruso, G., Alfaleh, A., Alaofi, L., Arif, O., Ahmed, A., Alghaith, F., Thymoquinone-Loaded Soy-Phospholipid-Based Phytosomes Exhibit Anticancer Potential against Human Lung Cancer Cells, *Pharmaceutics*, 12, (2020), 761-78.
- Alhakamy, N.A., Fahmy, U.A., Badr Eldin, S.M., Ahmed, O.A.A., Aldawsari, H.M., Okbazghi, S.Z., Alfaleh, M.A., Abdulaal, W.H., Alamoudi, A.J., Mady, F.M., Scorpion venom-functionalized quercetin phytosomes for breast cancer management: in vitro response surface optimization and anticancer activity against MCF-7 cells, *Polymer*, 14 (1), (2022), 1–21.
- Alharbi, W.S., Almughem, F.A., Almeahady, M., Jarallah, J., Alsharif, K., Alzahrani, M., Phytosomes as an emerging nanotechnology platform for the topical delivery of bioactive phytochemicals, *Pharmaceutics*, 13 (9), (2021), 1–20,
- Alhmied, F., Alammar, A., Alsultan, B., Alshehri, M., Pottou, F.H., Molecular mechanisms of thymoquinone as anticancer agent, *Comb Chem High Throughput Screen*, 24, (2021), 1644-53.
- Aliferis, C. and Trafalis, D.T., Glioblastoma multiforme: pathogenesis and treatment, *Pharmacology & Therapeutics*, 152, (2015), 63-82.
- Allemailem, K.S., Alnuqaydan, A.M., Almatroudi, A., Alrumaihi, F., Aljaghwan, A., Khalilullah, H., Younus, H., Khan, A., Khan, M.A., Safety and Therapeutic Efficacy of Thymoquinone-Loaded Liposomes against Drug-Sensitive and Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii*, *Pharmaceutics*, 13 (5), (2021), 677.
- Ali, B.H. and Blunden, G., Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa*, *Phytotherapy research: PTR*, 17(4), (2003), 299-305.
- Ali, A., Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles, *Nanotechnology Sci Applications*, 9, (2016), 49.

- Allout, F., Habli, Z., Rahal, O.N., Fatfat, M., Gali-Muhtasib, H., Thymoquinone-based nanotechnology for cancer therapy: Promises and challenges, *Drug Discovery Today*, 23(5), (2018), 1089-98.
- Almajali, B., Al-Jamal, H.A.N., Taib, W.R.W., et al., Thymoquinone, as a novel therapeutic candidate of cancers, *Pharm.*, 14, (2021), 369.
- Almatroodi, S.A., Almatroudi, A., Alsahli, M.A., Khan, A.A., Rahmani, A.H., Thymoquinone, an active compound of *Nigella sativa*: role in prevention and treatment of cancer, *Curr Pharm Biotechnol*, 21, (2020), 1028-41
- Alobaedi, O.H., Talib, W.H., Bashedi, I.A., Antitumor effect of thymoquinone combined with resveratrol on mice transplanted with breast cancer, *Asian Pac J Trop Med*, 10 (4), (2017), 400-408.
- Alugoju, P., Jestadi, D.B., Periyasamy, L., Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30(1), (2014), 11-26
- Alvarez, S.W., NFS1 undergoes positive selection in lung tumours and protects cells from ferroptosis, *Nature*, 551, (2017), 639–643.
- Amini, Y., Jamehdar, A.S., Sadri, K, Zare, S., Musavi, D. ve Tafaghodi, M., Different methods to determine the encapsulation efficiency of protein in PLGA nanoparticles. *Biomed Materials Engineering*, 28, (2017), 613-620.
- Anderson, J.M., Van Itallie, C.M., Physiology and function of the tight junction, *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1, (2009), a002584.
- Andrews, N.C., Iron homeostasis: insights from genetics and animal models, *Nat Rev Genet*, (2000), 208–217.
- Anjum, K., Shagufa BI, Abbas SQ, et al. Current status and future therapeutic perspectives of glioblastoma multiforme (GBM) therapy: A review, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 92,(2017), 681-689.
- Anjum, S., et al., Recent Advances in Zinc Oxide Nanoparticles (ZnO NPs) for Cancer Diagnosis, Target Drug Delivery, and Treatment. *Cancers*, 13, (2021), 18
- Anwar, H., Hussain, G. and Mustafa, I., Antioxidants from natural sources. *Antioxidants Foods Applications*, (2018), 3-28.

- Aoki, K., Nakamura, H., Suzuki, H., Matsuo, K., Kataoka, K., Shimamura, T., Motomura, K., Ohka, F., Shiina, S., Yamamoto, T., Nagata, Y., Yoshizato, T., Mizoguchi, M., Abe, T., Momii, Y., Muragaki, Y., Watanabe, R., Ito, I., Sanada, M., Yajima, H., Morita, N., Takeuchi, I., Prognostic relevance of genetic alterations in diffuse lower-grade gliomas, *Neuro Oncol*, 20, (2018), 66–77.
- Apel, K., Hirt, H., Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction, *Annu Rev Plant Biol*, 55, (2004), 373-399.
- Ashour, A.E., Ahmed, A.F., Kumar, A., et al., Tymoquinone inhibits growth of human medulloblastoma cells by inducing oxidative stress and caspase-dependent apoptosis while suppressing NF- κ B signaling and IL-8 expression, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 416 (1-2), (2016), 141-155.
- Aslan, M., Afşar, E., Kırımlıoğlu, E., Çeker, T., Yılmaz, Ç., Antiproliferative effects of thymoquinone in MCF-7 breast and HepG2 liver cancer cells: possible role of ceramide and ER stress, *Nutr Cancer*, 73, (2021), 460-72.
- Attama, A.A., Momoh, M.A., Builders, P.F., Lipid nanoparticulate drug delivery systems: a revolution in dosage form design and development, *Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems*, 5, (2012), 107-170.
- Ayala, A., Munoz, M.F., Arguelles, S., Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal, *Oxid Med Cell Longev*, 2014, (2014), 360438.
- Azam, S, Malik, A, Hadi, SM., Prooxidant property of green tea polyphenols epicatechin and epicatechin-3-gallate: implications for anticancer properties, *Toxicol In Vitro*, 18, (2004) 555–561.
- Azeez, N.A., V.S., Deepa, V., Sivapriya, Phytosomes: emergent promising nano vesicular drug delivery system for targeted tumor therapy, *Adv Nat Sci Nanosci. Nanotechnol*, 9 (3), (2018), 1–6.
- Baan, R., Grosse, Y., Lauby-Secretan, B., El Ghissassi, F., Bouvard, V., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Islami, F., Galichet, L., Straif, K., Carcinogenicity of radio frequency electromagnetic fields, *Lancet Oncol*, 12, (2011), 624–626.

- Babay, S., Mhiri, T., & Toumi, M., Synthesis, structural and spectroscopic characterizations of maghemite γ -Fe₂O₃ prepared by one-step coprecipitation route, *Journal of Molecular Structure*, 1085, (2015), 286–293.
- Babos, G., Biro, E., Meiczinger, M., Feczko, T., Dual drug delivery of sorafenib and doxorubicin from PLGA and PEG-PLGA polymeric nanoparticles, *Polymers*, 10, (2018), 895.
- Badary, O.A., Taha, R.A., Gamal El-Din M., Thymoquinone is a potent superoxide anion scavenger, *Drug and Chemical Toxicology*, 26 (2), (2003), 87-98.
- Badary, O.A., Abd-Ellah, M.F., El-Mahdy, M.A., Salama, S.A., Hamada, F.M., Anticlastogenic activity of thymoquinone against benzo(a)pyrene in mice, *Food and Chemical Toxicology*, 45, (2007) 88-92.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., et al., Biological effects of essential oils-a review, *Food Chem Toxicol*, 46, (2008), 446-475
- Ballabh, P., Braun, A., Nedergaard, M., The blood–brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications, *Neurobiol Dis*, 16, (2004), 1-13.
- Ballout, F., Habli, Z., Rahal, O.N., Fatfat, M. and Gali-Muhtasib, H., Thymoquinone-based nanotechnology for cancer therapy: Promises and challenges, *Drug Discovery Today*, 23 (5), (2018), 1089-1098.
- Balyan, P., Shinde, S., Ali, A., Potential activities of nanoparticles synthesized from *Nigella sativa* L. and its phytoconstituents: An overview, *J Phytonanotechnology Pharmaceut Sci*, (2021), <https://doi.org/10.21276/jpps.2021.1.2.1>.
- Banerjee, S., Kaseb, A.O., Wang, W., Kong, J., Mohammad, M., Padhye, S., Sarkar, H., Mohammad, M., Antitumor activity of gemcitabine and oxaliplatin is augmented by thymoquinone in pancreatic cancer, *Cancer Res*, 69(13), (2009), 5575–5583.
- Bao, S., Wu, Q., McLendon, R.E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A.B., Dewhirst, W., Bigner, D., Rich, N., Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response, *Nature*, 444 (7120), (2006a), 756-760.
- Bao, S., Wu, Q., Sathornsumetee, S., Hao, Y., Li, Z., Hjelmeland, B., Shi, Q., McLendon, E., Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor, *Cancer Res*, 66, (2006b), 7843-48.

- Bao, W., Liu, X., Lv, Y., Lu, G.H., Li, F., Zhang, F., Liu, B., Li, D., Wei, W., Li, Y., Nanolongan with multiple on-demand conversions for ferroptosis-apoptosis combined anticancer therapy, *ACS Nano*, 13, (2019), 260-273.
- Barani, M., Sangiovanni, E., Angarano, M., Rajizadeh, M.A., Mehrabani, M., Piazza, S., Gangadharappa, H.V., Pardakhty, A., Mehrbani, M., Phytosomes as Innovative Delivery Systems for Phytochemicals: A Comprehensive Review of Literature, *International J Nanomedicine*, 16 ,(2021), 6983-7022.
- Barnabe, N., Zastre, J.A., Venkataram, S., Deferiprone protects against doxorubicin-induced myocyte cytotoxicity, *Free Radic Biol Med*, 33, (2002), 266-75.
- Bashmail, H.A., Alamoudi, A.A., Noorwali, A., Hegazy, G.A., Ajabnoor, G.M., Al-Abd, A.M., Thymoquinone enhances paclitaxel anti-breast cancer activity via inhibiting tumor-associated stem cells despite apparent mathematical antagonism, *Molecules*, 25(2), (2020), 426.
- Basuli, D., Iron addiction: a novel therapeutic target in ovarian cancer, *Oncogene*, 36, (2017), 4089–4099.
- Batash, R., Asna, N., Schaffer, P., Francis, N., Glioblastoma Multiforme, Diagnosis and Treatment; Recent Literature Review, *Curr Med Chem*, 24, (2017), 3002-9.
- Battaglia, A.M., Chirillo, R., Aversa, I., Sacco, A., Costanzo, F., Ferroptosis and Cancer: Mitochondria Meet the Iron Maiden Cell Death, *Cells*, 9, (2020), 1505.
- Battle, E., Clevers, H., Cancer stem cells revisited, *Nat Med*, 23 (10), (2017), 1124.
- Bautista, M., Bomati-Miguel, O., Zhao, X., Morales, M., Gonzalez-Carreno, T., de Alejo, R.P., et al., Comparative study of ferroluids based on dextran-coated iron oxide and metal nanoparticles for contrast agents in magnetic resonance imaging, *Nanotechnology*, 15 (4), (2004), S154-S159.
- Begleiter, A. and Blair, G.W., Quinone-induced DNA damage and its relationship to antitumor activity in L5178Y lymphoblasts, *Cancer Res*, 44(1), (1984), 78-82.
- Begleiter, A., Studies on the mechanism of action of quinone antitumor agents, *Biochem Pharmacol*, 34(15), (1985), 2629-36.

- Beier, D., Hau, P., Proescholdt, M., CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles, *Cancer Res*, 67, (2007), 4010–4015.
- Bergonzi, M.C., Vasarri, M., Marroncini, G., Barletta, E., Degl’Innocenti, D., Thymoquinone-Loaded Soluplus®-Solutol® HS15 Mixed Micelles: Preparation, In Vitro Characterization, and Effect on the SH-SY5Y Cell Migration. *Molecules*, 25, (2020), 4707.
- Berthomieu, C., Hienerwadel, R., Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy, *Photosynthesis Research*, 102, (2009), 157-170.
- Bexell, D., Gunnarsson, S., Siesjo, P., Bengzon, J., Darabi, A., CD133+ and Nestin+ Tumor-Initiating Cells Dominate in N29 and N32 Experimental Gliomas, *Int J Cancer*, 125, (2009), 15–22.
- Bezerra, D.P., Alves, A.P., de Alencar, N.M., Mesquita, R.O., Lima, M.W., Pessoa C et al. Antitumor activity of two derivatives from 2-acylamine-1,4-naphthoquinone in mice bearing S180 tumor, *J Exp Ther Oncol*, 7, (2008), 113–121.
- Bhat, R., Hadi, M., DNA breakage by tannic acid and Cu (II): sequence specificity of the reaction and involvement of active oxygen species, *Mutat Res*, 313,(1994), 39-48.
- Bhat, S.H., Azmi, S., Hadi, M., Prooxidant DNA breakage induced by caffeic acid in human peripheral lymphocytes: involvement of endogenous copper and a putative mechanism for anticancer properties, *Tox App Pharm*, 3,(2007),249-55.
- Bhattacharjee, M., Upadhyay, P., Sarker, S., Basu, A., Das, S., Ghosh, A., Ghosh, S., Combinatorial Therapy of Thymoquinone and Emodin Synergistically Enhances Apoptosis, Attenuates Cell Migration and Reduces Stemness Efficiently in Breast Cancer, *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 1864, (2020), 129695
- Bhattacharya, S., Ahir, M., Patra, P., Mukherjee, S., Ghosh, S., Mazumdar, M., PEGylated-thymoquinone-nanoparticle mediated retardation of breast cancer cell migration by deregulation of cytoskeletal actin polymerization through miR34a, *Biomaterials*, 51, (2015), 91-107
- Bhowmik, A., Khan, R., Ghosh, M.K., Blood brain barrier: a challenge for effectual therapy of brain tumors, *Biomed Res Int*, 2015, (2015), 320941-60.

- Bilgiç, S., Özgöçmen, M., Ozer, MK., Thymoquinone ameliorates amikacin induced oxidative damage in rat braintissue, *Biotech Histochem*, 98, (2023), 38-45.
- Bitá, A., et al., An alternative treatment for *Candida* infections with *Nigella sativa* extracts, *Europ J Hos Pharm Sci Practice*, 19(2), (2012), 162-162.
- Bochkov, V.N., Oskolkova, O.V., Birukov, K.G., Levonen, A.L., Binder, C.J., Stockl, J., Generation and biological activities of oxidized phospholipids, *Antioxid Redox Signal*, 12, (2010), 1009-1059.
- Bolton, J.L., Acay, N.M. and Vukomanovic, V., Evidence that 4-allyl-o-quinones spontaneously rearrange to their more electrophilic quinone methides: potential bioactivation mechanism for the hepatocarcinogen safrole, *Chem Res Toxicol*, 7, (1994), 443-450.
- Bolton, J.L., Trush, M.A., Penning, T.M., Dryhurst, G. and Monks, T.J., Role of quinones in toxicology, *Chem Res Toxicol*, 13, (2000), 135-160
- Bolton, J.L. and Dunlap, T., Formation and Biological Targets of Quinones: Cytotoxic versus Cytoprotective Effects, *Chem Res Toxicol*, 30, (2017), 13-37.
- Bourgou, S., Pichette, A., Marzouk, B., Legault, J., Bioactivities of black cummin essential oil and its main terpenes from Tunisia, *South African J Botany*, 76, (2010), 210-216.
- Bouvard, V., Loomis, D., Guyton, K.Z., Grosse, Y., Ghissassi, F.E., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Mattock, H., Straif, K., International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group, Carcinogenicity of consumption of red and processed meat, *Lancet Oncol*, 16, (2015),1599-1600.
- Bowers, D.C., Nathan, P.C., Constine, L., Woodman, C., Bhatia, S., Keller, K., Bashore, L., Subsequent neoplasms of the CNS among survivors of childhood cancer: A systematic review, *Lancet Oncol*, 14, (2013), e321–e328.
- Brat, D.J., Pseudopalisades in glioblastoma are hypoxic, express extracellular matrix proteases, and are formed by an actively migrating cell population, *Cancer Res*, 64(3), (2004), 920-7.
- Brat, D.J. and Van Meir, E.G., Vaso-occlusive and prothrombotic mechanisms associated with tumor hypoxia, necrosis, and accelerated growth in glioblastoma, *Lab Invest*, 84(4), (2004), 397-405.

- Brat, D.J., *Glioblastoma: Biology, Genetics, and Behavior*. American Society of Clinical Oncology Education Book, (2012).
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries (vol 68, pg 394, 2018), *CA* 70, (2020), 313-13.
- Breuer, W., Shvartsman, M., Cabantchik, Z.I., Intracellular labile iron, *Int J Biochem Cell Biol*, 40, (2008), 350-354.
- Brock, J.H., Liceaga, J., Arthur, H.M.L., Kontoghiorghes, G.J., Effect of novel 1-alkyl-3-hydroxy-2-methylpyrid-4-one chelators on uptake and release of iron from macrophages, *Am J Hematol*, 34, (1990), 21-25.
- Brittenham, G.M, Griffith, P.M., Nienhuis, A.W., McLaren, C.E., Young, N.S., Tucker, E.E., Efficacy of deferoxamine in preventing complications of iron overload in patients with thalassemia major, *N Engl J Med*, 331(9), (1994), 567-73.
- Brunmark, A. and Cadenas, E., Redox and addition chemistry of quinoid compounds and its biological implications, *Free Radical Biol Med*, 7, (1989), 435-477.
- Buccarelli, M., Marconi, M., Pacioni, S., Pascalis, I.D., Inhibition of autophagy increases susceptibility of glioblastoma stem cells to temozolomide by igniting ferroptosis, *Cell Death & Disease*, 9(8), (2018), 841.
- Busolo, A., Lagaron, M., Oxygen scavenging polyolefin nanocomposite films containing an iron modified kaolinite of interest in active food packaging applications, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 16,(2012), 211-17.
- Bystrom, L.M., Guzman, M.L., Rivella, S., Iron and reactive oxygen species friends or foes of cancer cells, *Antiox Redox Signal*, 20, (2014), 1917-1924.
- Bystrom, L.M., Rivella, S., Cancer cells with irons in the fire, *Free Radic Biol Med*, 79, (2015), 337-342.
- Cai, J., Zhang, C., Zhang, W., Wang, G., Yao, K., Wang, Z., Li, G., Qian, Z., Li, Y., Jiang, T., ATRX, IDH1-R132H and Ki-67 immunohistochemistry as a classification scheme for astrocytic tumors, *Oncoscience*, 3, (2016) 258–265.

- Callens, C., Coulon, S., Naudin, J., Radford-Weiss, I., Boissel, N., Raffoux, E., Wang, P.H., Agarwal, S., Tamouza, H., Paubelle, E., Asnafi, V., Ribeil, A., Dessen, P., Canioni, D., Chandesris, O., Rubio, T., Beaumont, C., Targeting iron homeostasis induces cellular differentiation and synergizes with differentiating agents in acute myeloid leukemia, *J Exp Med*, 207, (2010), 731-50.
- Campbell, L.L., Polyak, K., Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution? *Cell Cycle*, 6, (2007), 2332–8.
- Cao, Y., Lathia, J.D., Eyler, C.E., Wu, Q., Li, Z., Wang, H., McLendon, E., Hjelmeland, A.B., Rich, J.N., Erythropoietin Receptor Signaling Through STAT3 Is Required For Glioma Stem Cell Maintenance, *Genes Cancer*, 1, (2010), 50–61.
- Cao, J.Y. and Dixon, S.J., Mechanisms of ferroptosis, *Cell Mol Life Sci*, 73 (11-12), (2016), 2195-2209.
- Cao, W., Chen, H.D., Yu, Y.W., Li, N., Chen, W.Q., Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: A secondary analysis of the global cancer statistics 2020, *Chin Med J*, 134, (2021), 783-791.
- Cappellini, M.D., Taher, A., Deferasirox (Exjade) for the treatment of iron overload, *Acta Haematol*, 122, (2009), 165-73.
- Capper, D., Gaiser, T., Hartmann, C., et al., Stem-cell-like glioma cells are resistant to TRAIL/Apo2L and exhibit down-regulation of caspase-8 by promoter methylation, *Acta Neuropathologica*, 117(4), (2009), 445-456.
- Cardis, E., Deltour, I., Vrijheid, M., Combalot, E., Moissonnier, M., Tardy, H., Armstrong, B., Giles, G., Brown, J., Siemiatycki, J., Brain tumour risk in relation to mobile telephone use: Results of the INTERPHONE international case-control study, *Int J Epidemiol*, 39, (2010), 675–694.
- Celebioğlu, H.G.N., Becit-Kizilkaya, M., Çağlayan, A., Dilsiz, S.A., Effects of thymoquinone and etoposide combination on cell viability and genotoxicity in human cervical cancer hela cells, *İstanbul J Pharm*, 3, (2022), 258-64.
- Chaieb, K., Kouidhi, B., Jrah, H., Mahdouani, K. and Bakhrouf, A., Antibacterial activity of thymoquinone, an active principle of *Nigella sativa* and its potency to prevent bacterial biofilm formation, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 11 (1), (2011), 29, 1-6.

- Chakravarti, A., Temozolomide-mediated radiation enhancement in glioblastoma: a report on underlying mechanisms, *Clin Cancer Res*, 12(15), (2006), 4738-46.
- Chaleshtori, J.S., Mortazavi, S.H., Sureshjani, E.H., Samani, K.G., In Silico Study of the Effect of Thymoquinone on Three Pre-apoptotic Factors of Bad, Bak, and Bim, *Avicenna J Pharm Rev*, 1, (2020), 5-9.
- Chalmers, A.J., Radioresistant glioma stem cells – therapeutic obstacle or promising target? *DNA Repair*, 6, (2007), 1391–1394
- Chang, L.C., Chiang, S.K., Chen, S.E., Yu, L., Chou, H., Chang, C., Heme oxygenase-1 mediates BAY 11-7085 induced ferroptosis, *Cancer Lett*, 416, (2018), 124-137.
- Chaston, T.B., Lovejoy, B., Watts, N., Richardson, R., Examination of the anti-proliferative activity of iron chelators: multiple cellular targets and the different mechanism of action of Triapine compared with desferrioxamine and the potent pyridoxal isonicotinoyl hydrazone analogue , *Clin Cancer Res*, 9,(2003), 402-14
- Chaurasia, A., Park, S.H., Seo, J.W., Park, C.K., Immunohistochemical analysis of ATRX, IDH1 and p53 in glioblastoma and their correlations with patient survival, *J Korean Med Sci*, 31, (2016), 1208–1214.
- Chehl, N., Chipitsyna, G., Gong, Q., Yeo, C.J., Arafat, H.A., Anti-inflammatory effects of the *Nigella sativa* seed extract, thymoquinone, in pancreatic cancer cells, *HPB (Oxford)*, 11, (2009), 373-381.
- Chekhun, S.V., Lukyanova, N.Y., Shvets, Y.V., Burlaka, A.P., Buchinska, L.G., Significance of ferritin expression in formation of malignant phenotype of human breast cancer cells, *Exp Oncol*, 36, (2014),179-183.
- Chen, Z.H., Yoshida, Y., Saito, Y., Noguchi, N., Niki, E., Adaptive response induced by lipid peroxidation products in cell cultures, *FEBS Let*, 580(2), (2006), 479-83.
- Chen, Y., Liu, L., Modern methods for delivery of drugs across the blood–brain barrier, *Adv Drug Del Rev*, 64, (2012a), 640-65.
- Chen, J., Li, Y., Yu, S., McKay, M., Burns, K., Kernie, G., A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy, *Nature*, 488, (2012b), 522.

- Chen, J., Luo, Z.D., Zhao, Z.N., Xie, L.N., Zheng, W.J., Chen, T.F., Cellular localization of iron(II) polypyridyl complexes determines their anticancer action mechanisms, *Biomaterials*, 71, (2015), 168-77.
- Chen, Y., Mi, Y., Zhang, X., Ma, Q., Song, Y., Zhang, L., Wang, D., Xing, J., Hou, B., Li, H., et al., Dihydroartemisinin-induced unfolded protein response feedback attenuates ferroptosis via PERK/ATF4/HSPA5 pathway in glioma cells, *J Exp Clin. Cancer Res*, 38, (2019), 402.
- Chen, Y., Li, N., Wang, H., Wang, N., Peng, H., Wang, J., Li, Y., Liu, M., Li, H., Zhang, Y., Amentoflavone suppresses cell proliferation and induces cell death through triggering autophagy-dependent ferroptosis in human glioma, *Life Sci*, 247, (2020), 117425.
- Chen, T.C., Chuang, J.Y., Ko, C.Y., Kao, T.J., Yang, P.Y., Yu, C.H., Liu, M.S., Hu, S.L., Tsai, Y.T., Chan, H.; et al., AR ubiquitination induced by the curcumin analog suppresses growth of temozolomide-resistant glioblastoma through disrupting GPX4-Mediated redox homeostasis, *Redox Biol*, 30, (2020), 101413.
- Chen, H., Wen, J., Iron oxide nanoparticles loaded with paclitaxel inhibits glioblastoma by enhancing autophagy-dependent ferroptosis pathway, *Eur J Pharmacol*, 921, (2022), 174860.
- Chen, J., Wei, Z., Fu, K., Duan, Y., Zhang, M., Li, K., Guo, T., Yin, R., Non-apoptotic cell death in ovarian cancer: Treatment, resistance and prognosis, *Biomed Pharmacother*, 150, (2022), 112929.
- Chiang, S.K., Chen, S.E., Chang, L.C., A Dual Role of Heme Oxygenase-1 in Cancer Cells, *Int J Mol Sci*, 20, (2018), 39.
- Chifman, J., Arat, S., Deng, Z., Lemler, E., Pino, J.C., Harris, L.A., Activated Oncogenic Pathway Modifies Iron Network in Breast Epithelial Cells: A Dynamic Modeling Perspective, *PLoS Comput Biol*, 13, (2017), e1005352.
- Chitambar, C.R., The therapeutic potential of iron-targeting gallium compounds in human disease: From basic research to clinical application, *Pharmacol Res*, 115, (2017), 56-64.

- Chithrani, D.B., Dunne, M., Stewart, J., Allen, C., Jaffray, D.A., Cellular uptake and transport of gold nanoparticles incorporated in a liposomal carrier, *Nanomed Nanotechnol Biol Med*, 6, (2010), 161–169.
- Choi, H.S., Liu, W., Misra, P., Tanaka, E., Zimmer, P., Itty Ipe, B., Bawendi, G., Renal clearance of quantum dots, *Nat Biotechnol*, 25, (2007) 1165-70.
- Christidi, E. and Brunham, L., Regulated cell death pathways in doxorubicin-induced cardiotoxicity, *Cell Death & Disease*, 12(4), (2021), 339.
- Christofi, T., Baritaki, S., Falzone, L., Libra, M., Zaravinos, A., Current perspectives in cancer immunotherapy, *Cancers*, 11, (2019), 1472.
- Clement, V., Sanchez, P., De Tribolenc, N., Hedgehog-gli1 signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell self-renewal, and tumorigenicity, *Curr Biol*, 17, (2007), 165-72
- Conrad, M., Kagan, V.E., Bayir, H., Pagnussat, G.C., Head, B., Traber, M.G., Stockwell, B.R., Regulation of lipid peroxidation and ferroptosis in diverse species, *Genes Dev*, 32, (2018), 602-619.
- Cuccurullo, F., Antiproliferative effect of desferrioxamine on vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo, *Arterioscler Thromb*, 14, (1994), 299-304.
- Cutando, A, Lopez-Valverde, A, Arias-Santiago, S, De Vicente, J, De Diego, RG., Role of melatonin in cancer treatment, *Anticancer Res*, 32, (2012), 2747–2753.
- Czene, S., Tiback, M., Harms-Ringdahl, M., pH-dependent DNA cleavage in permeabilized human fibroblasts, *Biochem J*, 323, (1997), 337–341.
- Daneman, R., Prat, A., The blood–brain barrier, *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7, (2015), a020412.
- Darakhshan, S., Pour, A.B., Colagar, A.H. and Sisakhtnezhad, S., Thymoquinone and its therapeutic potentials, *Pharmacological Research*, 95, (2015), 138-158.
- Dastjerdi, M.N., Mehdiabady, E.M., Iranpour, F.G., Bahramian, H., Effect of thymoquinone on P53 gene expression and consequence apoptosis in breast cancer cell line, *Int J Prev Med*, 7, (2016), 66.
- Dawood, S., Austin, L., Cristofanilli, M., Cancer Stem Cells: Implications for Cancer Therapy, *Oncology Journal*, 28(12), (2014), 1101-7.

- de Angelis, L.M., Brain tumors, *N Engl J Med*, 344(2), (2001), 114-23.
- de Sousa, D.R., *Bioactive Essential Oils and Cancer*. ISBN 978-3-319-19143-0 ISBN 978-3-319-19144-7 (eBook) DOI 10.1007/978-3-319-19144-7 Library of Congress Control Number: 2015942822 Springer Cham Heidelberg New York Dordrecht London © Springer International Publishing Switzerland, (2015).
- de Souza, I., Ramalho, M.C.C., Guedes, C.B., Osawa, I.Y.A., Monteiro, L.K.S., Gomes, L.R., Rocha, C.R.R., Ferroptosis Modulation: Potential Therapeutic Target for Glioblastoma Treatment, *Int J Mol Sci*, 23, (2022), 6879.
- de Vries, N.A., Beijnen, J.H., Boogerd, W., van Tellingen, O., Blood–brain barrier and chemotherapeutic treatment of brain tumors, *Expert Rev Neurother*, 6, (2006), 1199-209.
- Deeley, R.G., Westlake, C., Cole, S.P.C., Transmembrane transport of Endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins, *Physiol Rev*, 86, (2006), 849–99.
- Delgado-Lopez, P.D., Corrales-Garcia, E.M., Survival in Glioblastoma: A Review on the Impact of Treatment Modalities, *Clin Transl Oncol*, 18, (2016), 1062–1071.
- Demir, E., Taysi, S., Ulusal, H., Kaplan, DS, Cinar, K., Tarakcioglu, M., Nigella sativa oil and thymoquinone reduce oxidative stress in the brain tissue of rats exposed to total head irradiation, *Int J Radiat Biol*, 96, (2020), 228-235.
- Dengxin, L., Guolong, G., Fanling, M., Chong, J., Preparation of nano-iron oxide red pigment powders by use of cyanided tailings, *Journal of Hazardous Materials*, 155(1), (2008), 369-377.
- Denz, H, Huber, P, Landmann, R, Orth, B, Wachter, H, Fuchs, D., Association between the activation of macrophages, changes of iron metabolism and the degree of anaemia in patients with malignant disorders, *Eur J Haematol*, 48, (1992), 244.
- Dera, A.A., Rajagopalan, P., Al Fayi, M., Ahmed, I., Chandramoorthy, H.C., Indirubin-3-monoxime and thymoquinone exhibit synergistic efficacy as therapeutic combination in in-vitro and in-vivo models of Lung cancer, *Arch Pharm Res*, 43, (2020), 655-665.
- Deshpande, P.P., Biswas, S., Torchilin, V.P., Current trends in the use of liposomes for tumor targeting, *Nanomedicine*, 8, (2013), 1509–1528

- Dev, S. and Babitt, J.L., Overview of iron metabolism in health and disease, *Hemodial Int*, 21 (1), (2017), S6-S20.
- Dinali, R., et al., Iron oxide nanoparticles in modern microbiology and biotechnology, *Critical Rev Microbiology*, 43(4), (2017), 493-507.
- Dixon, S.J., Lemberg, K.M., Lamprecht, M.R., Skouta, R., Zaitsev, E.M., Gleason, C.E., Patel, D.N., Bauer, A.J., Cantley, A.M., Yang, W.S., Morrison, B., Stockwell, B.R., Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death, *Cell*, 149(5), (2012), 1060-72.
- Dixon, S.J., Stockwell, B.R., The role of iron and reactive oxygen species in cell death, *Nat Chem Biol*, 10, (2014), 9–17.
- Dixon, S.J., Stockwell, B.R., The Hallmarks of Ferroptosis, *Annual Rev Cancer Biology*, 3, (2019), 35-54
- Djuzenova, C.S., Fiedler, V., Memmel, S., Katzer, A., Hartmann, S., Krohne, G., Zimmermann, H., Scholz, C.J., Polat, B., Flentje, M., Actin cytoskeleton organization, cell surface modification and invasion rate of 5 glioblastoma cell lines differing in PTEN and p53 status, *Exp Cell Res*, 330, (2015), 346–357.
- Dobson, J., Gene therapy progress and prospects: Magnetic nanoparticle-based gene delivery, *Gene Therapy*, 13 (4), (2006), 283-287.
- Doganlar, O., Doganlar, Z.B., Kurtdere, A.K., Chasan, T., Ok, E.S., Chronic exposure of human glioblastoma tumors to low concentrations of a pesticide mixture induced multidrug resistance against chemotherapy agents, *Ecotoxicol Environ Saf*, 202, (2020), 110940.
- Dolecek, T.A., CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009, *Neuro Oncol*, 14, (2012), 1-49.
- Dominguez, R., Pateiro, M., Gagaoua, M., Barba, F.J., Zhang, W. and Lorenzo, J.M., A comprehensive review on lipid oxidation in meat and meat products, *Antioxidants*, 8 (10), (2019), 429-31.

- Donfrancesco, A., Deb, G., Domicini, C., Angioni, A., Caniglia, M., De, Sio, L., Fidani, P., Amici, A., Helson, L., Deferoxamine, cyclophosphamide, etoposide, carboplatin and thotepa (DCECaT): A new cytoreductive chelation-chemotherapy regimen in patients with advanced neuroblastoma, *Am J Clin Oncol*, 15, (1992), 319-322.
- Donovan, A., Brownlie, A., Zhou, Y., Shepard, J., Pratt, S.J., Moynihan, J., Paw, B.H., Drejer, A., Barut, B., Zapata, A., Law, T.C., Brugnara, C., Lux, S.E., Pinkus, G.S., Pinkus, J.L., Kingsley, P.D., Palis, J., Fleming, MD., Andrews, N.C., Zon, L.I., Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter, *Nature*, 403, (2000), 776-781.
- Dontu, G., Jackson, K., McNicholas, E., Kawamura, M., Abdallah, W., Wicha, M., Role of Notch signaling in cell-fate determination of human mammary stem/progenitor cells, *Breast Cancer Res*, 6, (2004), R605–R615.
- Dumitru, C.A., Sandalcioglu, I.E., Karsak, M., Cannabinoids in glioblastoma therapy: new applications for old drugs, *Front Mol Neurosci*, 11, (2018), 159.
- Ebrahimi, N., Rasoul-Amini, S., Niazi, A., Erfani, N., Moghadam, A., Cytotoxic and apoptotic effects of three types of silver-iron oxide binary hybrid nanoparticles. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 17(12), (2016a), 1049-57.
- Ebrahimi, N., Rasoul-Amini, S., Ebrahiminezhad, A., Ghasemi, Y., Gholami, A., Seradj, H., Comparative study on characteristics and cytotoxicity of bifunctional magnetic silver nanostructures: Synthesized using three different reducing agents, *Acta Metallurgica Sinica (English Letters)*, 29 (4), (2016b), 326-334.
- Ebrahiminezhad, A., Davaran, S., Rasoul-Amini, S., Barar, J., Moghadam, M., Synthesis, characterization and anti-*Listeria monocytogenes* effect of amino acid coated magnetite nanoparticles, *Current Nanoscience*, 8 (6), (2012), 868-74.
- Ebrahiminezhad, A., Rasoul-Amini, S., Davaran, S., Barar, J., & Ghasemi, Y., Impacts of iron oxide nanoparticles on the invasion power of *Listeria monocytogenes*. *Current Nanoscience*, 10(3), (2014a), 382–388.
- Ebrahiminezhad, A., Najaipour, S., Kouhpayeh, A., Berenjian, A., Rasoul-Amini, S., & Ghasemi, Y., Facile fabrication of uniform hollow silica microspheres using a novel biological template. *Colloids and Surfaces B*, 118, (2014b), 249–253.

- Ebrahiminezhad, A., Rasoul-Amini, S., Kouhpayeh, A., Davaran, S., Barar, J., & Ghasemi, Y., Impacts of amine functionalized iron oxide nanoparticles on HepG2 cell line. *Current Nanoscience*, 11(1), (2015a), 113–119.
- Ebrahiminezhad, A., Varma, V., Yang, S., Ghasemi, Y., Berenjjan, A., Synthesis and application of amine functionalized iron oxide nanoparticles on menaquinone-7 fermentation: A step towards process intensification, *Nanomaterials*, 6 (1), (2015b), 1-9.
- Ebrahiminezhad, A., Varma, V., Yang, S., Berenjjan, A., Magnetic immobilization of *Bacillus subtilis natto* cells for menaquinone-7 fermentation, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100 (1), (2016a), 173-180.
- Ebrahiminezhad, A., Barzegar, Y., Ghasemi, Y., Berenjjan, A., Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Alcea rosea* lower extract as a new generation of antimicrobials, *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, (2016b), 2.
- Ebrahiminezhad, A., Berenjjan, A., Ghasemi, Y., Template free synthesis of natural carbohydrates functionalised fluorescent silver nanoclusters, *IET Nanobiotechnology*, (2016c), 1-4.
- Ebrahiminezhad, A., Bagheri, M., Taghizadeh, S., Berenjjan, A., & Ghasemi, Y., Biomimetic synthesis of silver nanoparticles using microalgal secretory carbohydrates as a novel anticancer and antimicrobial. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 7, (2016d), 015018.
- Eckel-Passow, J.E., Lachance, D.H., Molinaro, A.M., Walsh, K.M., Decker, P.A., Sicotte, H., Pekmezci, M., Rice, T., Kosel, M.L., Smirnov, I.V., Glioma Groups Based on 1p/19q, IDH, and TERT Promoter Mutations in Tumors, *N Engl J Med*, 372, (2015), 2499–2508.
- Edris, A.E., Anti-cancer properties of *Nigella* spp essential oils and their major constituents, thymoquinone and β -elemene, *Curr Clin Pharmacol*, 4,(2009),43-6.
- El-Far, A.H., Tantawy, M.A., Al Jaouni, S.K., Mousa, S.A., Thymoquinone-chemotherapeutic combinations: new regimen to combat cancer and cancer stem cells, *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*
<https://doi.org/10.1007/s00210-020-01898-y>

- El Hout, M., Dos Santos, L., Hamai, A., Mehrpour, M., A promising new approach to cancer therapy: Targeting iron metabolism in cancer stem cells, *Semin Cancer Biol*, 53, (2018), 125–138.
- El-Najjar, N., Chatila, M., Moukadem, H., Vuorela, H., Ocker, M., Gandesiri, M., et al., Reactive oxygen species mediate thymoquinone-induced apoptosis and activate ERK and JNK signaling, *Apoptosis*, 15, (2010), 183–195.
- Ellis, J., Neufeld oral chelators deferasirox and deferiprone for transfusional iron overload in thalassemia major: new data, new questions, *Blood*, 107, (2006), 3436-41.
- England, B., Huang, T., Karsy, M., Current understanding of the role and targeting of tumor suppressor p53 in glioblastoma multiforme, *Tumor Biol*, 34, (2013), 2063
- Emerit, J., Beaumont, C., Trivin, F., Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury, *Biomed Pharmacother*, 55, (2001), 333-9.
- Estrov, Z., Tawa, A., Wang, X.H., Dube, I.D., Sulh, H., Cohen, A., Gelfand, E.W., Freedman, M.H., In vitro and in vivo effects of deferoxamine in neonatal acute leukemia, *Blood*, 69, (1987), 757–761.
- Faa, G., Crisponi, G., Iron chelating agents in clinical practice, *Coordination Chemistry Reviews*, 184, (1999), 291-310.
- Fahmy, H.M., Fathy, M.M., Abd-Elbadia, R.A., Elshemey, W.M., Targeting of Thymoquinone-loaded mesoporous silica nanoparticles to different brain areas: in vivo study, *Life Sci*, 222, (2019), 94–102 .
- Falzone, L., Salomone, S., Libra, L., Evolution of cancer pharmacological treatments at the turn of the third millennium. *Front, Pharmacol*, 9, (2018), 1300.
- Fang, D., Nguyen, T.K., Leishear, K., Finko, R., Kulp, N., A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas, *Cancer Res*, 65,(2005), 9328-37.
- Fang, J., Nakamura, H., Maeda, H., The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect, *Adv Drug Deliv Rev*, 63, (2011), 136–151.

- Farokhi, M., Mottaghitalab, F., Saeb, M.R., Thomas, S., Functionalized theranostic nanocarriers with bio-inspired polydopamine for tumor imaging and chemophotothermal therapy, *J Control Release*, 309, (2019), 203-219.
- Fatfat, M., Fakhoury, I., Habli, Z., Mismar, R., Gali-Muhtasib, H., Thymoquinone enhances the anticancer activity of doxorubicin against adult T-cell leukemia in vitro and in vivo through ROS-dependent mechanisms, *Life Sci*, 232, (2019), 116628.
- Fathy, M.M., Multifunctional Thymoquinone-Capped Iron Oxide Nanoparticles for Combined Chemo-Photothermal Therapy of Cancer, *Journal of Superconductivity and Novel Magnetism*, (2020), <https://doi.org/10.1007/s10948-020-05469-3>.
- Feng, M., Does, L.V., Bantjees, A., Iron(III) chelating resins. VI. Stability constants of iron(III)-ligand complexes on insoluble polymeric matrices, *Journal of Applied Polymer Science*, 56, (1994), 1231-7.
- Feng, M., Yang, Y., He, P., Fang, Y., Spectroscopic Studies of Copper(II) and Iron(II) Complexes of Adriamycin, *Spectrochim Acta-Part A Mol Biomol Spectrosc*, 56, (2000), 581-587.
- Feng, M., Wang, X.F., Huang, Q.X., Thymoquinone induces cytotoxicity and reprogramming of EMT in gastric cancer cells by targeting PI3K/Akt/mTOR pathway, *Journal of Biosciences*, 42(4), (2017), 547-54.
- Fenton, H.J.H., Oxidation of Tartaric Acid in Presence of Iron, *J Chem Soc*, 65, (1894), 899-910.
- Ferruzzi, P., Mennillo, F., De Rosa, A., Giordano, C., Rossi, M., Benedetti, G., Magrini, R., Mohr, G.L.P., Miragliotta, V., Magnoni, L., In Vitro and in Vivo Characterization of a Novel Hedgehog Signaling Antagonist in Human Glioblastoma Cell Lines, *Int J Cancer*, 13, (2012), E33–E44.
- Finch, A., Solomou, G., Wykes, V., Pohl, U., Bardella, C., Watts, C., Advances in research of adult gliomas, *Int J Mol Sci*, 22, (2021), 924–936.
- Fiorillo, M., Toth, F., Brindisi, M., Sotgia, F., Lisanti, M.P., Deferiprone (DFP) Targets Cancer Stem cell (CSC) Propagation by Inhibiting Mitochondrial Metabolism and Inducing ROS Production, *Cells*, 9, (2020), 1529.

- Firdaus, F., Zafeer, M.F., Anis, E., Ahmad, F., Hossain, M.M., Ali, A., Evaluation of phytomedicinal efficacy of thymoquinone against Arsenic induced mitochondrial dysfunction and cytotoxicity in SH-SY5Y cells, *Phytomedicine*, 54, (2019), 224–30.
- Folkins, C., Man, S., Xu, P., Shaked, Y., Hicklin, J., Kerbel, S., Anticancer therapies combining antiangiogenic and tumor cell cytotoxic effects reduce the tumor stem like cell fraction in glioma xenograft tumors, *Cancer Res*, 67, (2007), 3560.
- Forcina, G.C, Dixon, S.J., GPX4 at the Crossroads of Lipid Homeostasis and Ferroptosis, *Proteomics*, 19, (2019), e1800311
- Forouzanfar, F., Bazzaz, B.S.F. and Hosseinzadeh, H., Black cumin (*Nigella sativa*) and its constituent (thymoquinone): a review on antimicrobial effects, *Iranian J Basic Medical Sciences*, 17(12), (2014), 929.
- Frazer, DM, Anderson, GJ., The regulation of iron transport, *Biofactors*, 40,(2014), 206.
- Friedmann Angeli, J.P, Schneider, M., Proneth, B., Tyurina, Y., Tyurin, A., Hammond, J., Herbach, N., Aichler, M., Walch, A., Eggenhofer, E., Basavarajappa, D., Radmark, O., Kobayashi, S., Seibt, T., Beck, H., Neff, F., Esposito, I., Wanke, R., Yefremova, O., Heinrichmeyer, M., Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice, *Nat Cell Biol*, 16, (2014), 1180-91.
- Frohlich, T., Ndreshkjana, B., Muenzner, J.K., Synthesis of Novel Hybrids of Tymoquinone and Artemisinin with High Activity and Selectivity Against Colon Cancer, *ChemMedChem*, 12(3), (2017), 226-234.
- Fukushima, T., Kawabata, H., Nakamura, T., Iwao, H., Nakajima, A., Miki, M., Sakai, T., Sawaki, T., Fujita, Y., Tanaka, M., Masaki, Y., Iron chelation therapy with deferasirox induced complete remission in a patient with chemotherapy-resistant acute monocytic leukemia, *Anticancer Res*, 31, (2011), 1741–1744.
- Fulton, M.D., and Najahi-Missaoui, W., Liposomes in Cancer Therapy: How Did We Start and Where Are We Now, *Int J Mol Sci*, 24, (2023), 6615.
- Gali, H.U., Perchellet, E.M., Klish, S., Johnson, M., Perchellet, P., Hydrolyzable tannins: potent inhibitors of hydroperoxide production and tumor promotion in mouse skin treated with 12-O-tetradecanoyl phorbol-13- acetate *in vivo*, *Int J Cancer*, 51, (1992), 425-32.

- Gali-Muhtasib H, Diab-Assaf M, Boltze C, AlHmaira J, Hartig R, Roessner A, Schneider-Stock R. Thymoquinone extracted from black seed triggers apoptotic cell death in human colorectal cancer cells via a p53-dependent mechanism. *Int J Oncol.* 2004a; 25(4): 857-66.
- Gali-Muhtasib H, Abou Kheir WG, Kheir LA, Darwiche N, Crooks PA. Molecular pathway for thymoquinone-induced cell-cycle arrest and apoptosis in neoplastic keratinocytes. *Anticancer Drugs.* 2004b; 15: 389-99.
- Gali-Muhtasib H, El-Najjar N, Schneider-Stock R. The medicinal potential of black seed (*Nigella sativa*) and its components. *Adv Phytomed.* 2006; 2: 133–153.
- Gali-Muhtasib H, Kuester D, Mawrin C, et al. Thymoquinone triggers inactivation of the stress response pathway sensor CHEK1 and contributes to apoptosis in colorectal cancer cells. *Cancer Research.* 2008; 68: 5609-5618.
- Galli, R., Binda, E., Orfanelli, U., Cipelletti, B., Gritti, A., DeVitis, S., Fiocco, R., Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma, *Cancer research*, 64(19), (2004a), 7011-21.
- Galli, R., Binda, E., Orfanelli, U., Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma, *Cancer Res*, 64, (2004b), 7011.
- Ganeshaguru, K., Lally, J.M., Piga, A., Hoffbrand, A.V., Kontoghiorghes, G.J., Cytotoxic Mechanisms of Iron Chelators, *Drugs Today*, 28, (1992), 29-34.
- Gao, M., Monian, P., Jiang, X., Metabolism and iron signaling in ferroptotic cell death, *Oncotarget*, 6(34), (2015a), 35145-6.
- Gao, X., Guo, N., Xu, H., Pan, T., Lei, H., Yan, A., Mi, Y., Xu, L., Ibuprofen induces ferroptosis of glioblastoma cells via downregulation of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 signaling pathway, *Anti-Cancer Drugs*, 31, (2020), 34.
- Gao, W., Wang, X., Zhou, Y., Autophagy,ferroptosis,pyroptosis and necroptosis in tumor immunotherapy, *Signal Transduct Target Ther*, 7, (2022), 1-26.
- Geng, Y., Dalhaimer, P., Cai, S., Tsai, R, Tewari, M., Minko, T., Discher, D.E., Shape effects of filaments versus spherical particles in flow and drug delivery, *Nat Nanotechnol*, 2, (2007), 249-255.

- Garcia-Ribeiro, R.S., Gysemans, C., Cunha, M., Manshian, B., Jirak, D., Kriz, J., Gallo, J., Struys, T., Cuyper, M., Mathieu, C., Soenen, J., Gsell, W., Himmelreich, U., Magnetoliposomes as contrast agents for longitudinal in vivo assessment of transplanted pancreatic islets in a diabetic rat model, *Sci Rep*, 8, (2018), 11487.
- Garnier, B., Tan, S., Miraux, S., Bled, E., Brisson, A.R., Optimized synthesis of 100 nm diameter magnetoliposomes with high content of maghemite particles and high MRI effect, *Contrast Media Mol Imaging*, 7(2), (2012), 231–9.
- Garrett, M., Sperry, J., Braas, D., Yan, W., Le, M., Mottahedeh, J., Ludwig, K., Eskin, A., Metabolic characterization of isocitrate dehydrogenase (IDH) mutant and IDH wildtype gliomaspheres uncovers cell type-specific vulnerabilities, *Cancer Metab*, 6, (2018), 4.
- Gaschler, M.M. and Stockwell, B.R., Lipid peroxidation in cell death, *Biochem Biophys Res Commun*, 482, (2017), 419-425.
- Gaschler, M.M., Andia, A.A., Liu, H., Csuka, M., Hurlocker, B., Vaiana, A., Heindel, W., Zuckerman, S., Bos, H., Reznik, E., FINO2 initiates ferroptosis through GPX4 inactivation and iron oxidation. *Nat Chem Biol*, 14, (2018), 507-15.
- Gaur, K., Vazquez-Salgado, A.M., Duran-Camacho, G., Dominguez-Martinez, I., Benjamín-Rivera, J.A., Fernandez-Vega, L., Carmona Sarabia, L., Iron and Copper Intracellular Chelation as an Anticancer Drug Strategy, *Inorganics*, 6, (2018), 126.
- Germing, U., Schroeder, T., Kaivers, J., Kündgen, A., Kobbe, G., Gattermann, N., Novel therapies in low- and high-risk myelodysplastic syndrome, *Expert Rev Hematol*, 12, (2019), 893-908.
- Ghanavi, Z., et al., Extraction and Purification of Anticancer Thymoquinone from Seeds of *Nigella sativa* by Preparative Highperformance Liquid Chromatography, *J Medicinal Plants Product*, 9, (2020), 73-79.
- Ghasemi, F., Ghaffari, F., Omidifar, N., Taheri-Azandaryani, M., NiliAhmadabadi, A., Hepatic response to the interaction between thymoquinone and iron-dextran: an in vitro and in vivo study, *Biol Trace Elem Res*, (2022), 1-10.

- Ghelichkhani, S., Saffari-Chaleshtori, J., Ghaffari, F., Nili-Ahmadabadi, A., The Cytotoxic Effect of Thymoquinone Enhance on HepG2 Cell Line due to Induction of Fenton Reaction by Hydrogen Peroxide: An In Vitro and In Silico Study, *Asian Pac J Cancer Prev*, 24 (5), (2023), 1809-1815.
- Ghods, A.J., Irvin, D, Liu, G., Spheres isolated from 9L gliosarcoma rat cell line possess chemoresistant and aggressive cancer stem-like cells, *Stem Cells*, 2, (2007).
- Giemza-Stokłosa, J., Islam, M.A., Kotyla, P.J., Hyperferritinaemia: An Iron Sword of Autoimmunity, *Curr Pharm Des*, 25, (2019), 2909-2918.
- Gibis, M., Vogt, E., Weiss, J., Encapsulation of polyphenolic grape seed extract in polymer-coated liposomes. *Food & Function* , 3(3), (2012), 246-254.
- Gilani, A.H., Jabeen, Q and Khan, U., A review of medicinal uses and pharmacological activities of *Nigella sativa*, *Pak J Biol Sci*, 7(4), (2004), 441-51.
- Gluer, C.C., Medina, T.P., Medina, O.P., Magnetoliposomes: formation and structural characterization, *Liposomal Deliv Syst Adv Challenges*, 1, (2015), 62–73.
- Goel, S., Mishra, P., Thymoquinone inhibits biofilm formation and has selective antibacterial activity due to ros generation, *Applied Microbiol Biotechnology*, 102 (4), (2018), 1955-1967.
- Goel, S., Mishra, P., Thymoquinone loaded mesoporous silica nanoparticles retard cell invasion and enhance in vitro cytotoxicity due to ROS mediated apoptosis in HeLa and MCF-7 cell lines, *Mater Sci Eng C*, 104, (2019), 109881.
- Gorji, S.G., Smyth, H.E., Sharma, M. and Fitzgerald, M., Lipid oxidation in mayonnaise and the role of natural antioxidants: A review, *Trends Food Science & Technology*, 56, (2016), 88-102.
- Gout, P.W., Buckley, A.R., Simms, C.R., Sulfasalazine, a potent suppressor of lymphoma growth by inhibition of the x(c)- cystine transporter: a new action for an old drug, *Leukemia*, 15(10), (2001), 1633-1640.
- Grady, R.W., Galanello, R., Randolph, E., Toward optimizing the use of deferasirox: potential benefits of combined use with deferoxamine, *Haematologica*, 98(1), (2013).

- Grassian, A.R., Parker, S.J., Davidson, S.M., Divakaruni, A.S., Green, C.R., Zhang, X., Slocum, K.L., Pu, M., Lin, F., Vickers, C., IDH1 mutations alter citric acid cycle metabolism and increase dependence on oxidative mitochondrial metabolism, *Cancer Res*, 74, (2014), 3317–3331.
- Grit, M., Crommelin, D.J., Chemical Stability of Liposomes: Implications for Their Physical Stability. *Chem Phys Lipids*, 64, (1993), 3-18.
- Guan, R., Zhang, X., Guo, M., Glioblastoma Stem Cells and Wnt Signaling Pathway: Molecular Mechanisms and Therapeutic Targets, *Chin Neurosurg J*, 6, (2020a), S41016–S41020.
- Guler, E.M., Sisman, B.H., Kocyigit, A., Hatiboglu, A., Investigation of cellular effects of thymoquinone on glioma cell, *Toxicology Reports*, 8, (2021), 162-170.
- Guo, J., Wang, R., Tjiu, W. W., Pan, J., & Liu, T., Synthesis of Fe nanoparticles@ graphene composites for environmental applications. *Journal of Hazardous Materials*, 225, (2012), 63–73.
- Gupta, S., Singh, R.P., Lokwani, P., Yadav, S., Gupta, K., Vesicular system as targeted drug delivery system: an overview, *Int J Pharm Tech*, 3, (2011), 987-1021.
- Gurung, R.L., Lim, S.N., Khaw, A.K., Soon, J.F., Shenoy, K., Mohamed-Ali S., et al., Thymoquinone induces telomere shortening, DNA damage and apoptosis in human glioblastoma cells, *PLoS ONE*, 5, (2010), e12124.
- Gürsoy, A.Z., *Lipozomlar. Kontrollü salım sistemleri, Kontrollü Salım Sistemleri Yayını, İstanbul*, (2002), 103-117.
- Gutierrez, P.L., The metabolism of quinone-containing alkylating agents: free radical production and measurement, *Front Biosci*, 5, (2000), 629-638.
- Hagerstrand D., He X., Bradic-Lindh M., Hoefs S., Hesselager G., Ostman A., Nister M., Identification of a SOX2-Dependent Subset of Tumor- and Sphere-Forming Glioblastoma Cells with a Distinct Tyrosine Kinase Inhibitor Sensitivity Profile, *NeuroOncology*, 13, (2011), 1178–1191.
- Haglund, E., Seale-Goldsmith, M., Leary, F., Design of Multifunctional Nanomedical Systems, *Annals of Biomedical Engineering*, 37, (2009), 2048-2063.

- Haley, B., Frenkel, E., Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment, *Urol Oncol*, 26, (2008), 57–64.
- Hanafy, M.S. and Hatem, M.E., 1991. Studies on the antimicrobial activity of *Nigella sativa* seed (black cumin), *J Ethnopharmacol*, 34, (1994), 275- 278.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A., Hallmarks of cancer: the next generatio, *Cell*, 144 (5), (2011), 646-674.
- Hannan, A., Rahman, A., Sohag, A.A.M., Uddin, J., Dash, R., Sikder, M.H., Rahman, S., Timalisina, B., Munni, Y.A., et.al., Black Cumin (*Nigella sativa* L.): A Comprehensive Review on Phytochemistry, Health Benefits, Molecular Pharmacology, and Safety, *Nutrients*, 13, (2021), 1784-1844.
- Hasan, A.S., et al., Effect of the microencapsulation of nanoparticles on the reduction of burst release. *International journal of pharmaceutics*, 344(1- 2), (2007), 53-61.
- Hassan, S.A., Ahmed, W.A., Galeb, F.M., El-Taweeld, M.A., Abu-Bedair, F.A., In vitro challenge using TQ on hepatocellular carcinoma (HepG2) cell line, *Iranian J Pharmaceutical Research*, 7(4), (2008), 283-290.
- Hassannia, B., Wiernicki, B., Ingold, I., Qu, F., Van-Herck., S, Tyurina, Y., Bayir, H., Abhari, B.A., Angeli, P.F., Choi, S.M., Meul, E., Heyninck K., Nano-targeted induction of dual ferroptotic mechanisms eradicates high-risk neuroblastoma, *J Clin Invest*, 128, (2018), 3341- 3355.
- Hassannia, B., Vandenabeele, P., Vanden Berghe, T., Targeting Ferroptosis to Iron Out Cancer, *Cancer Cell*, 35, (2019), 830–849.
- Hatcher, H.C., Singh, RN., Torti, FM., Torti, SV., Synthetic and natural iron chelators: therapeutic potential and clinical use, *Future Med Chem*, 1, (2009), 1643-1670.
- Hawkins, B.T., Davis, T.P., The blood–brain barrier/neurovascular unit in health and disease, *Pharmacol Rev*, 57, (2005), 173-85.
- Heimberger, A.B., Suki, D., Yang, D., Shi, W., Aldape, K., The natural history of EGFR and EGFRvIII in glioblastoma patients, *J Transl Med*, 3, (2005), 38.
- Hentze, M.W., Muckenthaler, U., Galy, B., Camaschella, C., Two to tango: Regulation of mammalian iron metabolism, *Cell*, 142, (2010), 24-38.

- Herlekar, M., Barve, S., & Kumar, R., Plant-mediated green synthesis of iron nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*, 2014, (2014), 1–9.
- Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B., Benoit, J.P., Proust, J.E., Interfacial stability of lipid nanocapsules, *Colloids and Surface Biointerfaces*, 30(3), (2003), 225-235.
- Higdon, A., Diers, A.R., Oh, J.Y., Landar, A., Darley-USmar, V.M., Cell signalling by reactive lipid species: New concepts and molecular mechanisms, *Biochem J*, 442, (2012), 453–464.
- Hilger, I., Hiergeist, R., Hergt, R., Winnefeld, K., Schubert, H., & Kaiser, W. A., Thermal ablation of tumors using magnetic nanoparticles: An in vivo feasibility study. *Investigative Radiology*, 37(10), (2002), 580-586.
- Hirschhorn, T., Stockwell, B.R., The development of the concept of ferroptosis, *Free Radic Biol Med*, 133, (2019), 130-43
- Hoepfner, S., Maoz, R., Cohen, R., Chi, L., Fuchs, H., Sagiv, J., Metal nanoparticles, nanowires, and contact electrodes self-assembled on patterned monolayer templates A bottom-up chemical approach, *Advanced Materials*, 14(15), (2002), 1036-41.
- Hoiuchi, A., Satou, T., Akao, N., Koike, K., Fujita, K. ve Nikaido, T., The Effect of Free and Polyethylene Glycol-Liposome-Entrapped Albendazole on Larval Mobility and Number in Toxocara Canis Infected Mice, *Veterinary Parasitology*, 129, (2005), 83-87.
- Homayoonfal, M., Asemi, Z., Yousefi, B., Potential anticancer properties and mechanisms of thymoquinone in osteosarcoma and bone metastasis, *Cell Mol Biol Lett*, 27, (2022), 21
- Hopkins, B.D., Hodakoski, C., Barrows, D., Mense, M., Parsons, E., PTEN function: The long and the short of it, *Trends Biochem Sci*, 39, (2014), 183–190.
- Hrelia, S., Fiorentini, D., Maraldi, T., Angeloni, C., Bordoni, A., Biagi, P.L., Hakim, G., Doxorubicin induces early lipid peroxidation associated with changes in glucose transport in cultured cardiomyocytes. *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr*, 1567, (2002), 150–156.
- Hu, J & Kesari, S, The molecular basis for novel therapies, *Cancer J*, 18(1),(2012),32-9.

- Hu, X., Ma, J., Vikash, V., Li, J., Wu, D., Liu, Y., Zhang, J., Dong, W., Thymoquinone Increases Cisplatin Induced Apoptosis in Esophageal Carcinoma by Reduced JAK2/STAT3 Activation, *Patika Dig Dis Sci*, 63, (2018), 126-134.
- Huang, X. and Brazel, C.S., On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems, *Journal of controlled release*, 73(2-3), (2001), 121-136.
- Huang, Q, et al., Anti-cancer properties of anthraquinones from rhubarb, *Med Res Rev*, 27(5), (2007), 609-630.
- Huang, K.J., Wei, Y.H., Chiu, Y.C., Wu, S.R., Shieh, D.B., Assessment of zero-valent iron-based nanotherapeutics for ferroptosis induction and resensitization strategy in cancer cells, *Biomater Sci*, 7, (2019), 1311-1322.
- Huber, D.L., Synthesis, properties, and applications of iron nanoparticles. *Small* (Weinheim an der Bergstrasse, Germany), 1(5), (2005), 482–501.
- Hunter, M., *Essential oils: art, agriculture, science, industry and entrepreneurship (a focus on the Asia-Pacific region)*. Agriculture issues and policies series, Nova Science Publishers, (2009), Inc, New York.
- Huo, M., Wang, L., Wang, Y., Chen, Y., Shi, J., Nanocatalytic tumor therapy by single-atom catalysts, *ACS Nano*, 13, (2019), 2643-2653.
- Huo, S., Chen, S., Gong, N., Liu, J., Zhao, Y., Ultrasmall gold nanoparticles behavior in vivo modulated by surface polyethylene glycol (PEG) grafting, *Bioconjugate Chemistry*, 28(1), (2017), 239-43.
- Huse, J.T. and Holland, E.C., Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma, *Nature Reviews Cancer*, 10 (5), (2010), 319-331.
- Hwang, S.R., Kim, K., Nano-enabled delivery systems across the blood–brain barrier, *Arch Pharm Res*, 37(1), (2014), 24-30.
- Iacob, G. and Dinca, E.B., Current data and strategy in glioblastoma multiforme, *J Med Life*, 2(4), (2009), 386-93.

- Ibiyeye, K.M., Zuki, A.Z., Cockle Shell-Derived Aragonite CaCO₃ Nanoparticles for Co-delivery of doxorubicin and thymoquinone eliminates cancer stem cells, *Int J Mol Sci*, 21(5), (2020), 1900.
- Iman, M., Khansefid, Z., Davood, A., Modeling and Proposed Molecular Mechanism of Hydroxyurea Through Docking and Molecular Dynamic Simulation to Curtail the Action of Ribonucleotide Reductase, *Recent Patents Anti-Cancer Drug Discov*, 11, (2016), 461-468.
- Imam, S.S., Gilani, S.J., Bin-Jumah, M.N., Rizwanullah, M., Zafar, A., Ahmed, M.M. and Alshehri, S., Harnessing Lipid Polymer Hybrid Nanoparticles for Enhanced Oral Bioavailability of Thymoquinone: In Vitro and In Vivo Assessments, *Polymers*, 14, (2022), 3705-3728.
- Inamoto, Y. and Lee, S.J., Late effects of blood and marrow transplantation. *Haematologica*. 102, (2017), 614-625.
- Ince, I., Yıldırım, Y., Güler, G., Medine, I., Ballica, G., Kusdemir, C., Göker, E., Synthesis and characterization of folic acid-chitosan nanoparticles loaded with thymoquinone to target ovarian cancer cells, *J Radioanal Nucl Chem*, 324, (2020), 1-15.
- Inoue, S., Li, W.Y., Tseng, A., Beerman, I., Elia, A.J., Bendall, S.C., Lemonnier, F., Kron, K.J., Cescon, D.W., Hao, Z., Mutant IDH1 downregulates ATM and alters DNA repair and sensitivity to DNA damage independent of TET2, *Cancer Cell*, 30, (2016), 337–348.
- Iqbal, M.S., Ahmad, A. and Pandey, B., Solvent Based Optimization for Extraction and Stability of Thymoquinone from *Nigella sativa* Linn. and Its Quantification Using RP-HPLC, *Int J Functional Plant Biology*, 24(6), (2018), 1209-1219.
- Iravani, S., Green synthesis of metal nanoparticles using plants, *Green Chemistry*, 13, (2011), 2638-265.
- Ismail, M., Al-Naqeep, G., Wei-Chan, K., *Nigella sativa* thymoquinone-rich fraction greatly improves plasma antioxidant capacity and expression of antioxidant genes in hypercholesterolemic rats, *Free Radical Biology & Medicine*, 48, (2010), 664-672.

- Ismail, N., Ismail, M., Azmi, N.H., Abu Bakar, M.F., Basri, H., Abdullah, M.A., Modulation of Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress in Human Neuronal Cells by Thymoquinone-Rich Fraction and Thymoquinone via Transcriptomic Regulation of Antioxidant and Apoptotic Signaling Genes, *Oxid Med Cell Longev*, 21, (2016), 1–15.
- Ismail, N., Ismail, M., Azmi, N.H., Bakar, M.F.A., Yida, Z., Stanslas, J., Sani, D., Basri, H., Abdullah, M.A., Beneficial effects of TQRF and TQ nano- and conventional emulsions on memory deficit, lipid peroxidation, total antioxidant status, antioxidants genes expression and soluble A β levels in high fat-cholesterol diet-induced rats, *Chem Biol Interact*, 275, (2017), 61-73.
- Ismail, N., Abdel-Mottaleb, Y., Ahmed, A.A.E., El-Maraghy, N.N., Novel combination of thymoquinone and resveratrol enhances anticancer effect on hepatocellular carcinoma cell line, *Future J Pharm Sci*, 4, (2018), 41-46.
- Ito, A., Fujioka, M., Yoshida, T., Wakamatsu, K., Ito, S., Yamashita, T., Jimbow, K., Honda, H., Scysteaminylphenol-loaded magnetite cationic liposomes for combination therapy of hyperthermia with chemotherapy against malignant melanoma, *Cancer Sci*, 98(3), (2007), 424–30.
- Jabłonska-Trypuc, A., Swiderski, G., Kretowski, R., Lewandowski, W., Newly Synthesized Doxorubicin Complexes with Selected Metals-Synthesis, Structure and Anti-Breast Cancer Activity, *Molecules*, 22, (2017), 1106.
- Jadhav, S.M., Morey, P., Karpe, M.M. and Kadam, V., Novel vesicular system: an overview, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2 (1), (2012), 193-202.
- Jafri, S.H., Glass, J., Shi, R., Zhang, S., Prince, M., Kleiner-Hancock, H., Thymoquinone and cisplatin as a therapeutic combination in lung cancer: in vitro and in vivo, *J Exp Clin Cancer Res*, 29 (87), (2010), <https://doi.org/10.1186/1756-9966-29-87>.
- Jain, R.K., Stylianopoulos, T., Delivering nanomedicine to solid tumors, *Nat Rev Clin Oncol*, 7, (2010), 653-664.
- Jassal, V., Shanker, U., & Gahlot, S., Green synthesis of some iron oxide nanoparticles and their interaction with 2-amino, 3-amino and 4-aminopyridines. *Materials Today*, 3(6), (2016), 1874–1882

- Javed, B.. and Mashwani, Z.R., Phytosynthesis of colloidal nanosilver from *Mentha longifolia* and *Mentha arvensis*: Comparative morphological and optical characterization. *Microscopy Research and Technique*, 83(11), (2020), 1299-1307.
- Jeremy, J.Y., Kontoghiorghes, G.J., Hoffbrand, A.V., Dandona, P., The iron chelators desferrioxamine and 1-alkyl-2-methyl-3- hydroxypyrid-4-ones inhibit vascular prostacyclin synthesis in vitro, *Biochem J*, 254, (1988), 239-244.
- Jin, J., Grigore, F., Chen, C., Li, M, Selfrenewal Signaling Pathways and Differentiation Therapies of Glioblastoma Stem Cells, *Int J Oncol*, 59, (2021), 45.
- Johannessen, T.C. & Bjerkvig, R., Molecular mechanisms of temozolomide resistance in glioblastoma multiforme, *Expert Rev Anticancer Ther*, 12(5), (2012), 635-42.
- Johnstone, T.C., Suntharalingam, K., Lippard, S.J., The next generation of platinum drugs: Targeted Pt(II) agents, nanoparticle delivery, and Pt(IV) Prodrugs, *Chem Rev*, 116, (2016), 3436-3486.
- Joniec, A., Sek, S., Krysinski, P., Magnetoliposomes as potential carriers of doxorubicin to tumours, *Chem-A Eur J*, 22(49), (2016), 17715–24.
- Joshi, K., Banasavadi-Siddegowda, Y., Mo, X., Kim, S.H., Mao, P., Kig, C., Nardini, D., Sobol, R.W., Chow, L.M.L., Kornblum, H.I., et al., MELK-dependent FOXM1 phosphorylation is essential for proliferation of glioma stem cells, *Stem Cells Dayt Ohio*, 31, (2013), 1051–1063.
- Jrah-Harzallah, H., Ben-Hadj-Khalifa, S., Almawi, W.Y., Maaloul, A., Houas, Z., Mahjoub, H., Effect of thymoquinone on 1,2-dimethyl-hydrazine-induced oxidative stress during initiation and promotion of colon carcinogenesis, *Eur. J. Cancer*, 49, (2013), 1127–1135.
- Kadry, H., Noorani, B. and Cucullo, L., A blood–brain barrier overview on structure, function, impairment, and biomarkers of integrity, *Fluids Barriers CNS*, 17, (2020), 69.
- Kalinowski, D.S., Richardson, D.R., The evolution of iron chelators for the treatment of iron overload disease and cancer, *Pharmacol Rev*, 57, (2005), 547–583.

- Kalinowski, D.S., Richardson, D.R., Future of toxicology--iron chelators and differing modes of action and toxicity: the changing face of iron chelation therapy, *Chem Res Toxicol*, 20, (2007), 715–720.
- Kamal, A., Ramu, R., Tekumalla, V., Khanna, G.B., Barkume, M.S., Juvekar, A.S., et al., Synthesis, DNA binding, and cytotoxicity studies of pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepine-anthraquinone conjugates, *Bioorg Med Chem*, 15, (2007), 6868-75.
- Kamaly, N., Kalber, T. ve Ahmad, A., et al., Bimodal Paramagnetic and Fluorescent Liposomes for Cellular and Tumor Magnetic Resonance Imaging. *Bioconjugate Chemistry*, 19, (2008), 118–129.
- Kanarek, N., Boryana, P., Sabatini, D.M., Dietary modifications for enhanced cancer therapy, *Nature*, 579, (2020), 507–517.
- Kang, M.K., Kang, S.K., Tumorigenesis of chemotherapeutic drug-resistant cancer stem-like cells in brain glioma, *Stem Cells Dev*, 16, (2007), 837–847.
- Kankeu, C., Clarke, K., Passante, E., Huber, H.J., Doxorubicin-induced chronic dilated cardiomyopathy—The apoptosis hypothesis revisited, *J Mol Med*, 95, (2017), 239–248.
- Kanter, M., Thymoquinone attenuates lung injury induced by chronic toluene exposure in rats, *Toxicol Ind Heal*, 27, (2010), 387-395.
- Kanzawa, T., Bedwell, J., Kondo, Y., Kondo, S., Germano, I.M., Inhibition of DNA repair for sensitizing resistant glioma cells to temozolomide, *J Neurosurg*, 99, (2003), 1047–1052.
- Kaplan, J., Ward, D.M., The essential nature of iron usage and regulation, *Curr Biol*, 5; 23(15), (2013), 642-646.
- Karpuz, M., Gunay, M.S. Ozer, A.Y., Liposomes and phytosomes for phytoconstituents, in: *Advances and Avenues in the Development of Novel Carriers for Bioactives and Biological Agents*, (2020), 525–553.
- Karthivashan, G., Masarudin, J., Kura, U., Abas, F., Fakurazi, S., Optimization, formulation, and characterization of multiflavonoids-loaded flavanosome by bulk or sequential technique, *International J Nanomedicine*, 11, (2016), 3417-34.

- Kaseb, A.O., Chinnakannu, K., Chen, D., Sivanandam, A., Tejwani, S., Menon, M., Dou, Q.P., Reddy, G.P., Androgen receptor and E2F-1 targeted thymoquinone therapy for hormone-refractory prostate cancer, *Cancer Res*, 67, (2007), 7782-8.
- Katsura, Y., Ohara, T., Noma, K., Ninomiya, T., Kashima, H., Kato, T., et al., A Novel Combination Cancer Therapy with Iron Chelator Targeting Cancer Stem Cells via Suppressing Stemness, *Cancers*, 11, (2019).
- Kawak, P., Al-Sawaftah, N.M., Pitt, W.G. and Hussein G.A., Transferrin-Targeted Liposomes in Glioblastoma Therapy: A Review, *Int J Mol Sci*, 24, (2023), 13262-13281.
- Ke, K., Li, L., Lu, C., Zhu, Q., Wang, Y., Mou, Y., Wang, H., Jin, W., The crosstalk effect between ferrous and other ions metabolism in ferroptosis for therapy of cancer, *Front Oncol*, 12, (2022), 916082.
- Kensara, O.A., El-Shemi, A.G., Mohamed, A.M., Refaat, B., Idris, S., Ahmad, J., Thymoquinone subdues tumor growth and potentiates the chemopreventive effect of 5-fluorouracil on the early stages of colorectal carcinogenesis in rats, *Drug Des Dev Ther*, 10, (2016), 2239-2253.
- Khan, MA, Tania, M, Wei, C, et al., Thymoquinone inhibits cancer metastasis by downregulating TWIST1 expression to reduce epithelial to mesenchymal transition, *Oncotarget*, 6 (23), (2015), 19580-19591.
- Khan, Z.U.H., Khan, A., Chen, Y., Shah, N.S., Muhammad, N., Khan, A.U., Tahir, K., Khan, F.U., Murtaza, B., Hassan, S., Qaisrani, S. A., Wangi, P., Biomedical applications of green synthesized Nobel metal nanoparticles, *Journal of Photochemistry & Photobiology*, 173, (2017a), 150–164.
- Khan, M.A., Tania, M., Fu, S. and Fu, J., Thymoquinone, as an anticancer molecule: from basic research to clinical investigation, *Oncotarget*, 1-8(31), (2017b), 51907-19.
- Khan, M.A., Aldebasi, Y.H., Alsuhaibani, S.A., Alsaqli, M.A., Alzohairy, M.A., Khan, A., Younus, H., Therapeutic potential of thymoquinone liposomes against the systemic infection of *Candida albicans* in diabetic mice, *PLoS ONE*, 13, (2018), e0208951.

- Khan, M.A., Younus, H., Thymoquinone Shows the Diverse Therapeutic Actions by Modulating Multiple Cell Signaling Pathways: Single Drug for Multiple Targets, *Curr Pharm Biotechnol*, 19, (2018), 934-945.
- Khan, F., Shariq, M., Asif, M., Siddiqui, M.A., Malan, P., Ahmad, F., Green Nanotechnology: Plant-Mediated Nanoparticle Synthesis and Application, *Nanomaterials*, 12(4), (2022), 673
- Khansefid, Z., Davood, A., Iman, M., Fasihi, M., Synthesis, In Silico and In Vitro Cytostatic Activity of New Lipophilic Derivatives of Hydroxyurea, *Recent Patents Anti-Cancer Drug Discov*, 13, (2018), 378-385.
- Killela, P.J., Reitman, Z.J., Jiao, Y., Bettegowda, C., Agrawal, N., Diaz, L., Friedman, A.H., Friedman, H., Gallia, G.L., Giovannella, B.C., TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal, *Proc Natl Acad Sci USA*, 110, (2013), 6021–6026.
- Kim, M., Morshead, C.M., Distinct populations of forebrain neural stem and progenitor cells can be isolated using side-population analysis, *J Neurosci*, 23, (2003), 10703– 10709.
- Kim, J.L., Kang, H.N., Kang, M.H., Yoo, Y.A., Kim, J.S., Choi, C.W., The oral iron chelator deferasirox induces apoptosis in myeloid leukemia cells by targeting caspase, *Acta Haematol*, 126, (2011), 241–245.
- Kim, E., Kim, M., Woo, D.H., Shin, Y., Shin, J., Chang, N., Oh, Y.T., Kim, H., Rhee, J., Nakano, I., et al., Phosphorylation of EZH2 Activates STAT3 Signaling via STAT3 Methylation and Promotes Tumorigenicity of Glioblastoma Stem-like Cells, *Cancer Cell*, 23, (2013), 839–852.
- Kirtil, E., ve Öztop, M.H., Enkapsülasyon Maddesi Olarak Lipozom ve Gıdalarda Kullanımı: Yapısı, Karakterizasyonu, Üretimi ve Satılabilirliği, *Akademik Gıda*, 12(4), (2014),41-57.
- Kishwar, F., Ulhaq, K. and Anwar, H., Use of active ingredient of *Nigella sativa* to reduce toxicity of some trace elements (Fe(III), Cr(III), V(V) and Co(II)). *Fuuast J Biol.*, 2(2), (2012), 95-101.
- Knobbe, C.B., Merlo, A., Reifenberger, G., PTEN signalling in gliomas, *Neuro-Oncology*, 4, (2002), 196–210.

- Ko, M.J., Min, S., Hong, H., Yoo, W., Joo, J., Zhang, Y.S., Kang, H., Kim, G.,
Magnetic nanoparticles for ferroptosis cancer therapy with diagnostic imaging,
Bioact Mater, 32, (2024), 66-97.
- Koka, P.S., Mondal, D., Schultz, M., Abdel-Mageed, A.B., Agrawal, K.C., Studies on
molecular mechanisms of growth inhibitory effects of thymoquinone against
prostate cancer cells: role of reactive oxygen species, *Exp Biol Med*, 235,
(2010), 751–760.
- Kolli-Bouhafs, K., Boukhari, A., Abusnina, A., Velot, E., Gies, J.P., Lugnier, C., et al.,
Thymoquinone reduces migration and invasion of human glioblastoma cells
associated with FAK, MMP-2 and MMP-9 down-regulation, *Investigational
New Drugs*, 30(6), (2012), 2121-31.
- Kolnagou, A., Michaelides, Y., Kontos, C., Kyriacou, K., Kontoghiorghes, G.J.,
Myocyte Damage and Loss of Myofibers is the Potential Mechanism of Iron
Overload Toxicity in Congestive Cardiac Failure in Thalassemia. Complete
Reversal of the Cardiomyopathy and Normalization of Iron Load by
Deferiprone, *Hemoglobin*, 32, (2008), 17-28.
- Kolnagou, A., Kleanthous, M., Kontoghiorghes, G.J., Reduction of body iron stores to
normal range levels in thalassaemia by using a deferiprone/deferoxamine
combination and their maintenance thereafter by deferiprone monotherapy, *Eur J
Haematol*, 85, (2010), 430-438.
- Kolnagou, A., Kleanthous, M., Kontoghiorghes, G.J., Efficacy, Compliance And
Toxicity Factors Are Affecting The Rate of Normalization of Body Iron Stores
In Thalassemia Patients Using The Deferiprone And Deferoxamine
Combination Therapy, *Hemoglobin*, 35, (2011), 186-198.
- Kolnagou, A., Kontoghiorghes, C.N., Kontoghiorghes, G.J., Prevention of Iron Overload
and Long Term Maintenance of Normal Iron Stores in Thalassaemia Major
Patients using Deferiprone or Deferiprone Deferoxamine Combination, *Drug
Res*, 67, (2017), 404-411.
- Kolnagou, A. and Kontoghiorghes, G.J., Chelation protocols for the elimination and
prevention of iron overload in thalassaemia, *Front Biosci*, 23, (2018), 1082-98.

- Komori, T., Grading of Adult Diffuse Gliomas According to the 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System, *Lab Investig*, 102, (2021), 126–133.
- Kontoghiorghes, G.J., Jackson, M.J., Lunec, J., *In Vitro* Screening of Iron Chelators Using Models of Free Radical Damage, *Free Radic Res Commun*, 2, (1986a), 115-124.
- Kontoghiorghes, G.J., Iron mobilization from ferritin using α -oxohydroxy heteroaromatic chelators, *Biochem J*, 233, (1986b), 299-302.
- Kontoghiorghes, G.J., Chambers, S., Hoffbrand, A.V., Comparative study of iron mobilization from haemosiderin, ferritin and iron(III) precipitates by chelators, *Biochem J*, 241, (1987a), 87-92.
- Kontoghiorghes, G.J., Iron Chelation in Biochemistry and Medicine. In *Free Radicals, Oxidant Stress and Drug Action*; Rice-Evans, C., Ed.; Recheleu Press: London, UK, (1987b), 277-303.
- Kontoghiorghes, G.J., May, A., Uptake and intracellular distribution of iron from transferrin and chelators in erythroid cells, *BioMetals*, 3, (1990), 183-187.
- Kontoghiorghes, G.J., Eracleous, E., Economides, C., Kolnagou, A., Advances in Iron Overload Therapies, Prospects for Effective Use of Deferiprone (L1), Deferoxamine, the New Experimental Chelators ICL670, GT56-252, L1NAll and their Combinations, *Curr Med Chem*, 12, (2005a), 2663-2681.
- Kontoghiorghes, G.J. and Kolnagou, A., Molecular factors and mechanisms affecting iron and other metal excretion or absorption in health and disease: The role of natural and synthetic chelators, *Curr Med Chem*, 12, (2005b), 2695-2709.
- Kontoghiorghes, G.J., Efstathiou, A., Ioannou-Loucaides, S., Kolnagou, A., Chelators Controlling Metal Metabolism and Toxicity Pathways: Applications in Cancer Prevention, Diagnosis and Treatment, *Hemoglobin*, 32, (2008), 217-227.
- Kontoghiorghes, G.J., Spyrou, A., Kolnagou, A., Iron Chelation Therapy in Hereditary Hemochromatosis and Thalassemia Intermedia: Regulatory and Non Regulatory Mechanisms of Increased Iron Absorption, *Hemoglobin*, 34, (2010), 251-264.

- Kontoghiorghes, C.N., Andreou, N., Constantinou, K., Kontoghiorghes, G.J., World health dilemmas: Orphan and rare diseases, orphan drugs and orphan patients, *World J Methodol*, 4, (2014), 163-188.
- Kontoghiorghes, C.N., Kolnagou, A., Kontoghiorghes, G.J., Phytochelators Intended for Clinical Use in Iron Overload, Other Diseases of Iron Imbalance and Free Radical Pathology, *Molecules*, 20, (2015), 20841-20872.
- Kontoghiorghes, G.J., Kontoghiorghes, C.N., Prospects for the introduction of targeted antioxidant drugs for the prevention and treatment of diseases related to free radical pathology, *Expert Opin Investig Drugs*, 28, (2019), 593-603.
- Kontoghiorghes, G.J.. How to manage iron toxicity in post-allogeneic hematopoietic stem cell transplantation? *Expert Rev Hematol*. 13, (2020a), 299-302.
- Kontoghiorghes, G.J. and Kontoghiorghes, C.N., Iron and Chelation in Biochemistry and Medicine: New Approaches to Controlling Iron Metabolism and Treating Related Diseases, *Cells*, 9, (2020b), 1456.
- Kontoghiorghes, G.J., Kolnagou, A., Kontoghiorghes, C.N., Mourouzidis, L., Timoshnikov, V.A., Polyakov, N.E., Trying to Solve the Puzzle of the Interaction of Ascorbic Acid and Iron: Redox, Chelation and Therapeutic Implications, *Medicines*, 7, (2020c), 45.
- Kontoghiorghes, G., Kolnagou, A., Demetriou, T., Neocleous, M., Kontoghiorghes, C., New Era in the Treatment of Iron Deficiency Anaemia Using Trimaltol Iron and Other Lipophilic Iron Chelator Complexes: Historical Perspectives of Discovery and Future Applications, *Int J Mol Sci*, 2021; 22: 5546.
- Kotowski, U., Heiduschka, G., Kadletz, L., Fahim, T., Seemann, R., Schmid, R., Schneider, S., Mitterbauer, A., Thurnher, D., Effect of thymoquinone on head and neck squamous cell carcinoma cells in vitro: Synergism with radiation, *Oncol Lett*, 14, (2017), 1147-1151.
- Kou, B., Liu, W., Zhao, W., Duan, W.P., Yang, Y., Yi, Q., Guo, F., Li, J., Zhou, J., Kou, Q., Thymoquinone inhibits epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer cells by negatively regulating the TGF-beta/Smad2/3 signaling pathway, *Oncol Rep*, 38 (6), (2017), 3592-3598.
- Koul, D., PTEN signaling pathways in glioblastoma, *Cancer Biol Ther*, 7, (2008), 1321.

- Kozma, G., Rónavári, A., Kónya, Z., & Kukovecz, A., Environmentally benign synthesis methods of zero-valent iron nanoparticles. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 4(1), (2015), 291–297.
- Krakstad, C. and Chekenya, M., Survival signalling and apoptosis resistance in glioblastomas: opportunities for targeted therapeutics, *Mol Cancer*, 9, (2010), 135
- Krasnici, S., Werner, A., Eichhorn, M.E., Schmitt-Sody, M., Pahernik, S.A., Sauer, B., Schulze, B., Teifel, M., Michaelis, U., Naujoks, K., et al., Effect of the surface charge of liposomes on their uptake by angiogenic tumor vessels, *Int J Cancer*, 105, (2003), 561–567.
- Kraus, J.A., Glesmann, N., Beck, M., Krex, D., Klockgether, T., Schackert, G., Schlegel, U., Molecular analysis of the PTEN, TP53 and CDKN2A tumor suppressor genes in long-term survivors of glioblastoma multiforme, *J Neurooncol*, 48, (2000), 89-94.
- Kristoffersen, K., Villingshoj, M., Poulsen, H.S., Stockhausen, M.T., Level of Notch Activation Determines the Effect on Growth and Stem Cell-like Features in Glioblastoma Multiforme Neurosphere Cultures, *Cancer Biol Ther*, 14, (2013), 625–637.
- Kucia, M., Ratajczak, M.Z., Stem cell as a two edged sword from regeneration to tumorformation, *J Pysiol Pharmakol*, 57 (7), (2006), 5-16.
- Kuhn, H., Banthiya, S., van-Leyen, K., Mammalian lipoxygenases and their biological relevance, *Biochim Biophys Acta*, 1851, (2015), 308-330.
- Kumar, B., Smita, K., Cumbal, L., & Debut, A., Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil for one pot synthesis of silver nanocatalyst: An ecofriendly approach. *Industrial Crops and Products*, 58, (2014), 238–243.
- Kumar, S.R., Thangam, R., Vivek, R., Srinivasanb, S. and Ponpandian, N., Synergetic effects of thymoquinone-loaded porous PVPylated Fe₃O₄ nanostructures for efficient pHdependent drug release and anticancer potential against triple-negative cancer cells, *Nanoscale Adv.*, 2, (2020), 3209–3221.

- Kumar, S., A. Baldi, D.K. Sharma, Phytosomes: a modernistic approach for novel herbal drug delivery - enhancing bioavailability and revealing endless frontier of phytopharmaceuticals, *J. Dev. Drugs*, 9 (2) (2020) 1–8,
- Kumara, B.C., Parthiban, S., Senthil kumar, G.P., Tamiz Mani, T., Proliposome: A novel approach to carrier drug delivery system. *International Journal of Biopharmaceutics*, 6(2), (2015), 98- 106
- Kundu, J, Chun, KS, Aruoma, OI and Kundu, JK., Mechanistic perspectives on cancer chemoprevention/chemotherapeutic effects of thymoquinone, *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 768, (2014), 22-34.
- Kurisawa, M., Liang, K., Tan, S., Chung, J.E., Ying, J.Y., Anti-Cancer Agent Delivery Vehicles Capable of Improved Loading, *US Patent*, 9(687), (2017), 464.
- Kyani, A., Tamura, S., Yang, S., Shergalis, A., Samanta, S., Kuang, Y., Ljungman, M., Neamati, N., Discovery and Mechanistic Elucidation of a Class of Protein Disulfide Isomerase Inhibitors for the Treatment of Glioblastoma, *ChemMedChem*, 13, (2018), 177.
- Lalueza, A., Ayuso, B., Arrieta, E., Trujillo, H., Folgueira, D., Cueto, C., Serrano, A., Laureiro, J., Arevalo-Canas, C., Castillo, C., et al., Elevation of serum ferritin levels for predicting a poor outcome in hospitalized patients with influenza infection, *Clin Microbiol Infect*, 26, (2020), e9–1557.
- Laskar, A.A., Khan, M.A., Rahmani, A.H., Fatima, S., Younus, H., Thymoquinone, an active constituent of *Nigella sativa* seeds, binds with bilirubin and protects mice from hyperbilirubinemia and cyclophosphamide-induced hepatotoxicity, *Biochimie*, 127, (2016), 205-213.
- Lathia, J.D., Mack, S.C., Mulkearns-Hubert, E.E., Valentim, C.L., Rich, J.N., Cancer Stem Cells in Glioblastoma, *Genes Dev*, 29, (2015), 1203–1217.
- Laurent, S., Dutz, S., Hafeli, U. O., & Mahmoudi, M., Magnetic luid hyperthermia: Focus on super paramagnetic iron oxide nanoparticles. *Advances in Colloid and Interface Science*, 166(1), (2011), 8–23.
- Le, N.T, Richardson, D.R., The role of iron in cell cycle progression and the proliferation of neoplastic cells, *Acta Biochim Biophys*, 1603, (2002), 31-46.

- Le, T.T., Kuplicki, R., Yeh, H.W., Aupperle, R.L., Khalsa, S.S., Simmons, W.K., Paulus, M.P., Effect of Ibuprofen on BrainAGE: A Randomized, Placebo-Controlled, Dose-Response Exploratory Study, *Biol Psychiatry Cogn Neurosci Neuroimaging*, 3, (2018), 836–843
- Le, N.T.T., Cao, V.D., Nguyen, T.N.Q., Le, T.T.H., Tran, T.T., Thi, T.T.H., Soy Lecithin-Derived Liposomal Delivery Systems: Surface Modification and Current Application, *Int J Mol Sci.*, 20(19), (2019), 4706.
- Lee, B.M., Park, K.K., Beneficial and adverse effects of chemopreventive agents, *Mutat Res*, 523, (2003), 265–278.
- Lee, N., & Hyeon, T., Designed synthesis of uniformly sized iron oxide nanoparticles for efficient magnetic resonance imaging contrast agents. *Chemical Society Reviews*, 41(7), (2012), 2575–2589
- Lei, X., Liv, X., Liu, M., Yang, Z., Ji, M., Guo, X., Dong, W., Thymoquinone inhibits growth and augments 5-fluorouracil-induced apoptosis in gastric cancer cells both in vitro and in vivo, *Biochem Biophys Res Commun*, 417 (2), (2012), 864-868.
- Lee, Y., Lee, J.K., Ahn, S.H., Lee, J., Nam, D.H., WNT Signaling in Glioblastoma and Therapeutic Opportunities, *Lab Investig*, 96, (2016), 137–150.
- Lei, G., Zhuang, L., Gan, B., Targeting ferroptosis as a vulnerability in cancer, *Nat Cancer*, 22, (2022), 381-396.
- Li, Z., Bao, S., Wu, Q., Wang, H., Eyler, C., Sathornsumetee, S., Shi, Q., Cao, Y., Lathia, J., McLendon, R.E., et al., Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells, *Cancer Cell*, 15, (2009), 501–513.
- Lei, X., Liv, X., Liu, M., Yang, Z., Ji, M., Guo, X., Dong, W., Thymoquinone inhibits growth and augments 5-fluorouracil-induced apoptosis in gastric cancer cells both in vitro and in vivo, *Biochem Biophys Res Commun*, 417 (2), (2012), 864-868.
- Li, M., Deng, H., Peng, H., Wang, Q., Functional nanoparticles in targeting glioma diagnosis and therapies, *J Nanosci Nanotechnol*, 14 (1), (2014), 415-432.
- Li, J., Cao, F., Yin, H., Huang, Z., Lin, Z., Mao, N., Sun, B., Wang, G., Ferroptosis: past, present and future, *Cell Death and Disease*, 11, (2020), 88.

- Li, G., Liang, Y., Yang, H., Zhang, W., Xie, T., The Research Landscape of Ferroptosis in Cancer: A Bibliometric Analysis, *Front Cell Dev Biol*, 10, (2022), 841724.
- Liang, C., Zhang, X., Yang, M., Dong, X., Recent Progress in Ferroptosis Inducers for Cancer Therapy, *Adv Mater*, 31, (2019a), e1904197.
- Liang, R., Li, Y., Huo, M., Lin, H., Chen, Y., Triggering sequential catalytic fenton reaction on 2D MXenes for hyperthermia-augmented synergistic nanocatalytic cancer therapy, *ACS Appl Mater Interfaces*, 11, (2019b), 42917-42931.
- Liebner, S., Czupalla, C.J., Wolburg, H., Current concepts of blood–brain barrier development, *Int J Dev Biol*, 55(4–5), (2011), 467–76.
- Liou, Y.F., Chen, P.N., Chu, S.C., Kao, S.H., Chang, Y.Z., Hsieh, Y.S., Thymoquinone suppresses the proliferation of renal cell carcinoma cells via reactive oxygen species-induced apoptosis and reduces cell stemness, *Environ Toxicol*, 34(11), (2019), 1208-20.
- Lin, D., Najdabauer, J., Salvaterra, P.M., Novel method for visualizing and modeling the spatial distribution of neural stem cells within intracranial glioma, *Neuroimage*, 37, (2007), 18–26.
- Liu, ZD, Hider, RC., Design of clinically usefull iron (III)-selective chelators, *Med Res Rev*, 22, (2002), 26-64.
- Liu G., Yuan X., Zeng Z., Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma, *Mol Cancer*, 5, (2006a), 67.
- Liu, S., Dontu, G., Mantle, I.D., Patel, S., Ahn, N.S., Jackson K.W., Suri, P., Wicha, M.S., Hedgehog Signaling and Bmi-1 Regulate Self-Renewal of Normal and Malignant Human Mammary Stem Cells, *Cancer Res*, 66, (2006b), 6063-6071.
- Liu, X.Y., Gerges, N., Korshunov, A., Sabha, N., Khuong-Quang, D.A., Fontebasso, A.M., Fleming, A., Hadjadj, D., Schwartzenuber, J., Majewski, J., Frequent ATRX mutations and loss of expression in adult diffuse astrocytic tumors carrying IDH1/IDH2 and TP53 mutations, *Acta Neuropathol*, 124, (2012), 615–625.

- Liu, T., Liu, W., Zhang, M., Yu, W., Gao, F., Li, C., Wang, S.B., Feng, J., Zhang, X.Z., Ferrous-supply-regeneration nanoengineering for cancer-cell-specific ferroptosis in combination with imaging-guided photodynamic therapy, *ACS Nano*, 12, (2018), 12181-12192.
- Liu J., Zhang C., Wang J., Hu W., Feng Z., The Regulation of Ferroptosis by Tumor Suppressor p53 and its Pathway, *Int J Mol Sci*, 21, (2020), 8387.
- Liu, P., Chen, G., Zhang, J., A Review of Liposomes as a Drug Delivery System: Current Status of Approved Products, Regulatory Environments, and Future Perspectives, *Molecules*, 27(4), (2022), 1372-1395.
- Lochhead, R.Y., Chapter 3 - Basic Physical Sciences for the Formulation of Cosmetic Products. *Cosmetic Science and Technology*. Sakamoto, K., Lochhead, R.Y., Maibach H.I., and Yamashita, Y., Amsterdam, Elsevier, (2017), 39-76.
- Lopusiewicz, L., et al., Black Cumin (*Nigella sativa* L.) Seed Press Cake as a Novel Material for the Development of New Non-Dairy Beverage Fermented with Kefir Grains, *Microorganisms*, (2022), 300.
- Louis, D.N., Perry, A., Wesseling, P., Brat, D.J., Cree, I.A., Figarella-Branger, D., Hawkins, C., Nag, H.K., Pfister, S.M., Reifenberger, G., The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: A Summary, *Neuro-Oncology*, 23, (2021), 1231–1251.
- Lu, X.Y., Wu, D.C., Li, Z.J. ve Chen, G.Q., Polymer nanoparticles, ed. *Progress in molecular biology and translational science*, Elsevier, (2011), 299- 323.
- Lu, M., Q., Qiu, X., Luo, X., Liu, J., Sun, C., Wang, X., Lin, Y., Deng, Y., Song, Phyto-phospholipid complexes (phytosomes): a novel strategy to improve the bioavailability of active constituents, *Asian J Pharm*, 14 (3), (2019), 265–274.
- Lu, L., Huang, R., Wu, Y., Jin, J.M., Chen, H.Z., Zhang, L.J., Luan, X., Brucine: A Review of Phytochemistry, Pharmacology and Toxicology *Front Pharmacol*, 11, (2020), 377.
- Lu, S., Wang, X.Z., He, C., Wang, L., Liang, S.P., Wang, C.C., Li, C., Luo, T.F., Feng, C.S., Wang, Z.C., et al., ATF3 contributes to brucine-triggered glioma cell ferroptosis via promotion of hydrogen peroxide and iron, *Acta Pharmacol Sin*, 42, (2021), 1690–1702.

- Ludwig, H., et al., Iron metabolism and iron supplementation in cancer patients, *Wien Klin Wochenschr*, 127, (2015), 907-919.
- Ma, P., Xiao, H., Yu, C., Liu, J., Cheng, Z., Song, H., Zhang, X., Li, C., Lin, J., Enhanced cisplatin chemotherapy by iron oxide nanocarrier-mediated generation of highly toxic reactive oxygen species, *Nano Lett*, 17, (2017), 928-37.
- MacKenzie, E.L., Iwasaki, K., Tsuji, Y., Intracellular iron transport and storage: From molecular mechanisms to health implications, *Antioxid Redox Signal*, 10, (2008), 997-1030.
- Madaan, K., Kaushik, D., Verma, T., Hydroxyurea: A key player in cancer chemotherapy, *Expert Rev Anticancer Ther*, 2, (2012), 19-29.
- Mahakham, W., Theerakulpisut, P., Maensiri, S., Phumying, S., & Sarmah, A. K. Environmentally benign synthesis of phytochemicals-capped gold nanoparticles as nanopriming agent for promoting maize seed germination, *Science of the Total Environment*, 573, (2016), 1089–1102.
- Mahdavi, M., Namvar, F., Ahmad, M.B., Mohamad, R., Green Biosynthesis and Characterization of Magnetic Iron Oxide (Fe₃O₄) Nanoparticles Using Seaweed (*Sargassum muticum*) Aqueous Extract, *Molecules*, 18(5), (2013), 5954-5964.
- Mahmoud, Y.K., Abdelrazek, H.M.A., Cancer: Thymoquinone antioxidant/pro-oxidant effect as potential anticancer remedy, *Biomed Pharmacother*, 115, (2019), 108783.
- Mahmoudi, K., Bouras, A., Bozec, D., Ivkov R., Hadjipanayi, C., Magnetic hyperthermia therapy for the treatment of glioblastoma: a review of the therapy's history, efficacy and application in humans, *Int J Hyperth Off Eur Soc Hyperthermic Oncol N Am Hyperth Group*, 34 (8), (2018), 1316–1328.
- Mai, T.T., Hamai, A., Hienzsch, A., Caneque, T., Muller, S., Wicinski, J., et.al., Salinomycin kills cancer stem cells by sequestering iron in lysosomes, *Nat Chem*, 9, (2017), 1025-33.
- Majdalawieh, A.F., Fayyad, M.W. and Nasrallah, GK., Anticancer properties and mechanisms of action of thymoquinone, the major active ingredient of *Nigella sativa*, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57 (18), (2016),3911-28.

- Makarov, V., Love, A., Sinitsyna, O., Makarova, S., Yaminsky, I., Taliany, M., et al., “Green” nanotechnologies: Synthesis of metal nanoparticles using plants, *Acta Naturae*, 6(1(20)), (2014), 35–44.
- Makarov, V.V., Makarova, S.S., Love, A.J., Sinitsyna, O.V., Dudnik, O., Yaminsky, V., Biosynthesis of stable iron oxide nanoparticles in aqueous extracts of *Hordeum vulgare* and *Rumex acetosa* plants, *Langmuir*, 30(20), (2014), 5982–59
- Makino, K., Yamada, T., Kimura, M., Oka, T., Ohshima, H., Kondo, T., Temperature-induced and ionic strength-induced conformational changes in the lipid head group region of liposomes as suggested by zeta-potential data, *Biop Chemistry*, 41(2), (1991), 175-183.
- Makarov, V.V., Makarova, S.S., Love, A.J., Sinitsyna, O.V., Dudnik, O., Yaminsky, V., Biosynthesis of stable iron oxide nanoparticles in aqueous extracts of *Hordeum vulgare* and *Rumex acetosa* plants, *Langmuir*, 30 (20), (2014a), 5982-88.
- Makarov, V.V., Love, A.J., Sinitsyna, O.V., Makarova, S.S., Yaminsky, I.V., Taliany, M.E., Kalina, N.O., Green Nanotechnologies: Synthesis of Metal Nanoparticles Using Plants, *Acta Naturae*, 6 (20), (2014b), 35-44.
- Malesza, I.J., Bartkowiak-Wieczorek, J., Winkler-Galicki, J., Nowicka, A., Dzieciolowska, M., Błaszczyk, M., Gajniak, P., Słowinska, K., Niepolski, L., Walkowiak, J., et al., The Dark Side of Iron: The Relationship between Iron, Inflammation and Gut Microbiota in Selected Diseases Associated with Iron Deficiency Anaemia-A Narrative Review, *Nutrients*, 24, (2022), 3478.
- Mansour, M.A., Ginawi, O.T., El-Hadiyah, T., El-Khatib, A.S., Al-Shabanah, O.A., Al-Sawaf, H.A., Effects of volatile oil constituents of *Nigella sativa* on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice: Evidence for antioxidant effects of thymo-quinone, *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*, 110, (2001), 239-252.
- Mansur, M.A., Nagi, M.N., El-Khatib, A.S. and Al-Bekairi, A.M., Effects of thymoquinone on antioxidant enzyme activities, lipid peroxidation and DT-diaphorase in different tissues of mice;a possible mechanism of action, *Cell Biochemistry and Function*, 20 (2), (2002), 143-151.
- Manz, D.H., Blanchette, N.L., Paul, B.T., Torti, F.M., Torti, S.V., Iron and cancer: Recent insights, *Ann N Y Acad Sci*, 1368, (2016), 149-161.

- Markova, I.D., Polyakov, N.E., Selyutina, O.Y., Fedenok, L.G., Fedotov, Y., Slepneva, A., Leshina, V., Pokrovsky, G., Weiner, M., Light-Stimulated Generation of Free Radicals by Quinones-Chelators, *Z Fur Phys Chem*, 231, (2017), 369-89.
- Marsik, P., Kokoska, L., Landa, P., Nepovim, A., Soudek, P., Vanek, T., In vitro inhibitory effects of thymol and quinones of *Nigella sativa* seeds on cyclooxygenase-1- and -2-catalyzed prostaglandin E2, *Planta Med*, 71, (2005), 739-742.
- Martinovich, G., Martinovich, I., Vcherashniaya, A., Shadyro, O., Cherenkevich, S., Thymoquinone, a biologically active component of *Nigella sativa*, induces mitochondrial production of reactive oxygen species and programmed death of tumor cells, *Biophys*, 61, (2016), 963-70.
- Marusyk, A., Polyak, K., Tumor heterogeneity: causes and consequences, *Biochim Biophys Acta*, 1805, (2010), 105–17.
- Maruyama, K., Intracellular targeting delivery of liposomal drugs to solid tumors based on EPR effects, *Adv Drug Deliv Rev*, 63, (2011), 161–169.
- Masliantsev, K., Pinel, B., Balbous, A., Guichet, P.O., Tachon, G., Milin, S., Godet, J., Duchesne M., Berger A., Petropoulos C., Impact of STAT3 Phosphorylation in Glioblastoma Stem Cells Radiosensitization and Patient Outcome, *Oncotarget*, 9, (2018), 3968.
- Mazda, F., Özer, A.Y., Ercan, M.T., Hincal, A.A., Preparation and Characterization of Urea Niosomes In Vitro and In Vivo Studies, *STP Pharma Sciences*, 7, (1997), 205-214.
- McLean, E., Cogswell, M., Egli, I., Wojdyla, D., De Benoist, B., Worldwide prevalence of anaemia, WHO Vitamin and Mineral Nutrition Information System, 1993-2005, *Public Health Nutr*, 12, (2008), 444.
- McKinnon, C., Nandhabalan, M., Murray, S.A., Plaha, P., Glioblastoma: Clinical Presentation, Diagnosis, and Management, *BMJ*, 374, (2021), n1560.
- Melamed, J.R., Morgan, J.T., Ioele, S.A., Gleghorn, J.P., Sims-Mourtada, J., Day E.S., Investigating the Role of Hedgehog/GLI1 Signaling in Glioblastoma Cell Response to Temozolomide, *Oncotarget*, 9, (2018), 27000.

- Mendez, R., Banerjee, S., Sonication-Based Basic Protocol for Liposome Synthesis, *Methods Mol. Biol*, 1609, (2017), 255–260.
- Menna, G., Manini, I., Cesselli, D., Skrap, M., Olivi, A., Ius, T., Pepa, G.M.D., Immunoregulatory Effects of Glioma-Associated Stem Cells on the Glioblastoma Peritumoral Microenvironment: A Differential PD-L1 Expression from Core to Periphery? *Neurosurg Focus*, 52, (2022), E4.
- Merchant, A.A., Matsui, W., Targeting Hedgehog a cancer stem cell pathway, *Clin Cancer Res*, 16, (2010), 3130–40.
- Mirzaei, H., A. Shakeri, B. Rashidi, A. Jalili, Z. Banikazemi, A. Sahebkar, Phytosomal curcumin: a review of pharmacokinetic, experimental and clinical studies, *Biomed. Pharmacother*, 85 (2017) 102–112
- Mitre, A.O., Florion, A.I., Bruiana, A., Boer, A., Moldovali, I., Soritaus, O., Florian, S.I., Susman, S., Ferroptosis involvement in glioblastoma treatment, *Medicina*, 58(2), (2022), 319.
- Monks, T.J. and Jones, D.C., The metabolism and toxicity of quinones, quinonimines, quinone methides, and quinone-thioethers, *Curr Drug Metab*, 3(4), (2002), 425-438.
- Moore, C., Ormseth, M., Fuchs, H., Causes and Significance of Markedly Elevated Serum Ferritin Levels in an Academic Medical Center, *J Clin Rheumatol*, 19, (2013), 324-328.
- Mostofa, A., Hossain, M.K., Basak, D. and Bin-Sayeed, M.S., Tymoquinone as a Potential Adjuvant Therapy for Cancer Treatment: Evidence from Preclinical Studies, *Frontiers in Pharmacology*, (2017), 8.
- Mostafa, M., Alaaeldin, E., Aly, U.F., Sarhan, H.A., Optimization and Characterization of Thymoquinone-Loaded Liposomes with Enhanced Topical Anti-inflammatory Activity, *AAPS Pharmscitech*, 19, (2018), 3490-3500.
- Musalli, M.G., Hassan, M.A., Sheikh, R.A., Halwani, M.A., Zeyadi, M., Hosawi, S., Alhosin, M., Thymoquinone induced cell proliferation and apoptosis in acute myeloid leukemia cells: role of apoptosis-related WT1 and Bcl2 genes, *European j Cell Science*, 1(1), (2019), 2-9.

- Myers, J.M., Antholine, W.E., Zielonka, J., Myers, C.R., The iron-chelating drug triapine causes pronounced mitochondrial thiol redox stress, *Toxicol Lett*, 201, (2011), 130–136.
- Nadagouda, M.N., Varma, R.S., Green synthesis of silver and palladium nanoparticles at room temperature using coffee and tea extract, *Green Chemistry*, 10 (8), (2008), 859-862.
- Nagi, M.N., Mansour, M.A., Protective effect of thymoquinone against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats: a possible mechanism of protection, *Pharmacol Res*, 41, (2000), 283–289.
- Nangare, S. and Dugam, S., Smart in vivo synthesis, characterizations, pharmaceutical applications, and pharmacokinetic perspective: a review, *Nangare and Dugam Future J Pharmaceut Sci*, 6, (2020), 123-144.
- Ndreshkjana, B., Capci, A., Klein, V., Chanvorachote, P., Muenzner, J.K., Huebner, K., et al., Combination of 5-fluorouracil and thymoquinone targets stem cell gene signature in colorectal cancer cells, *Cell Death and Disease*, 10(6), (2019), 379.
- Nickavar, B, Mojab, F, Javidnia, K, Amoli, AMR., Chemical composition of the fixed and volatile oils of *N. sativa* L. from Iran. *Z, Naturforsch*, 58C, (2003), 629-631
- Nili-Ahmadabadi, A., Alibolandi, P., Ranjbar, A., et al., Thymoquinone attenuates hepatotoxicity and oxidative damage caused by diazinon: an in vivo study, *Res Pharm Sci*, 13, (2018), 500.
- Ninomiya, T., Ohara, T., Noma, K., Katsura, Y., Katsube, R., Kashima, H., Kato, T., Tomono, Y., Tazawa, H., Kagawa, S., Iron depletion is a novel therapeutic strategy to target cancer stem cells, *Oncotarget*, 8, (2017), 98405-98416.
- Niraimathe, V., Subha, V., Ravindran, R. E., & Renganathan, S., Green synthesis of iron oxide nanoparticles from *Mimosa pudica* root extract. *International Journal of Environment and Sustainable Development*, 15(3), (2016), 227–240.
- Niu, Y., Zhu, J., Li, Y., Shi, H., Gong, Y., Li, R., Huo, Q., Ma, T., Liu, Y., Size shrinkable drug delivery nanosystems and priming the tumor microenvironment for deep intratumoral penetration of nanoparticles, *J Control Release*, 277, (2018), 35-47.

- Nkhili, E., Loonis, M., Mihai, S., El Hajji, H., Dangles, O., Reactivity of food phenols with iron and copper ions: Binding, dioxygen activation and oxidation mechanisms, *Food Funct*, 5, (2014), 1186-1202.
- Norwood, A.A., Tan, M., May, M., Tucci, M., Benghuzzi, H., Comparison of potential chemotherapeutic agents, 5-fluoruracil, green tea, and thymoquinone on colon cancer cells, *Biomed Sci Instrum*, 42, (2006), 350-356.
- Notta, F., Mullighan, C.G., Wang, J.C.Y., Poepl, A., Doulatov, S., Phillips, L.A., Evolution of human BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia-initiating cells, *Nature*, 469, (2011), 362-7.
- Nounou, M.M., El-khordagui, L.K., Khalafallah, N.A. ve Khalil, S.A., In Vitro Release of Hydrophilic and Hydrophobic Drugs from Liposomal Dispersions and Gels, *Journal of Acta Pharmaceutica Scientia*, 56, (2006), 311–24.
- O'Brien, P.J., Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity, *Chem Biol Interact*, 80(1), (1991), 1-41.
- Odeh, F., Ismail, S.I., Abu-Dahab, R., Mahmoud, I.S., Al Bawab, A., Thymoquinone in liposomes: A study of loading efficiency and biological activity towards breast cancer, *Drug Deliv*, 19, (2012), 371-377.
- Ohgaki, H., Genetic pathways to glioblastomas, *Neuropathology*, 25(1), (2005), 1-7.
- Ohgami, R.S., Campagna, D.R., McDonald, A., Fleming, M.D., The Steap proteins are metalloreductases, *Blood*, 108, (2006), 1388-1394.
- Ohka, F., Natsume, A., Wakabayashi, T., Current Trends in Targeted Therapies for Glioblastoma Multiforme, *Neurol Res Int*, 2012, (2012), 878425.
- Olsson, A., Bouaoun, L., Auvinen, A., Feychting, M., Johansen, C., Mathiesen, T., Melin, B., Lahkola, A., Larjavaara, S., Villegier, A.S., Survival of glioma patients in relation to mobile phone use in Denmark, Finland and Sweden, *J Neurooncol*, 141, (2019), 139–149.
- Olympios, N., Gilard, V., Marguet, F., Clatot, F., Di Fiore, F., Fontanilles, M., TERT promoter alterations in glioblastoma: A systematic review, *Cancers*, 13, (2021), 1147.

- Omuro, A. and DeAngelis, L.M., Glioblastoma and Other Malignant Gliomas: A Clinical Review, *JAMA*, 310, (2013), 1842–1850.
- Onishi, H., Katano, M., Hedgehog Signaling Pathway as a Therapeutic Target in Various Types of Cancer, *Cancer Sci*, 102, (2011), 1756–1760.
- Ooko, E., Saeed, M.E., Kadioglu, O., Artemisinin derivatives induce iron-dependent cell death (ferroptosis) in tumor cells, *Phytomedicine*, 22(11), (2015), 1045-1054.
- Oreskovic, D., Kastelancic, A., Raguz, M., Dlaka, D., Predrijevac, N., Matec, D., Matec, M., Tomac, D., Jelec, V., Marinovic, T., The vicious interplay between disrupted sleep and malignant brain tumors: A narrative review, *Croat Med J*, 62, (2021), 376–386.
- Orfanou, I.M., Argyros, O., Papapetropoulos, A., Tseleni-Balafouta, S., Vougas, K., Tamvakopoulos, C., Discovery and Pharmacological Evaluation of STEAP4 as a Novel Target for HER2 Overexpressing Breast Cancer, *Front Oncol*, 11, (2021), 608201.
- Ostolska, I. and Wisniewska, M., Application of the zeta potential measurements to explanation of colloidal Cr₂O₃ stability mechanism in the presence of the ionic polyamino acids, *Colloid Polymer Science*, 292(10), (2014), 2453-2464.
- Ostrom, Q.T., Gittleman, H., Truitt, G., Boscia, A., Kruchko, C., Barnholtz-Sloan, J.S., CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2011–2015, *Neuro-Oncology*, 20, (2018), iv1–iv86.
- Ozbolat, G. and Alizade, A., In Vitro Effects Of Antioxidant And Proapoptotic Activities Of Thymoquinone Iron Complex, *J Basic Clin Health Sci*, 6, (2022), 415-419.
- Ozturk, S.A.**, Alp, E., Yar, A.S., Konar, E., Menevşe, E.S., The effects of thymoquinone and genistein treatment on telomerase, activity, apoptosis, angiogenesis and survival in thyroid cancer cell lines, *J Cancer Res and Ther*, 14 (2), (2017), 328-34.

- Pagola, S., Benavente, A., Raschi, A., Romano, E., Molina, M., Stephens, P., Crystal structure determination of thymoquinone by high-resolution X-ray powder diffraction, *AAPS PharmSciTech*, 5(2), (2004), 24-31.
- Pajouhesh, H., Lenz, G.R., Medicinal chemical properties of successful central nervous system drugs, *Neuro*, 2, (2005), 541-553.
- Pal, R.R., Rajpal, V., Singh, P. and Saraf, S.A., Recent Findings on Thymoquinone and Its Applications as a Nanocarrier for the Treatment of Cancer and Rheumatoid Arthritis, *Pharmaceutics*, 13, (2021), 775
- Pan, Y., Du, X., Zhao, F., & Xu, B., Magnetic nanoparticles for the manipulation of proteins and cells, *Chemical Society Reviews*, 41(7), (2012), 2912–2942
- Panigrahi, S., Kundu, S., Ghosh, S., Nath, S., & Pal, T., General method of synthesis for metal nanoparticles, *Journal of Nanoparticle Research*, 6(4), (2004), 411–414.
- Pantopoulos, K., Porwal, S.K., Tartakoff, A., Devireddy, L., Mechanisms of mammalian iron homeostasis, *Biochemistry*, 51, (2012), 5705-5724.
- Panya, A., Laguerre, M., Lecomte, J., Villeneuve, P., Weiss, J., McClements, D.J., Decker, E.A., Effects of chitosan and rosmarinate esters on the physical and oxidative stability of liposomes, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(9), (2010), 5679-5684.
- Pari, L., Sankaranarayanan, C., Beneficial effects of thymoquinone on hepatic key enzymes in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats, *Life Sciences*, 85, (2009), 830-834.
- Park, C.M., Park, M.J., Kwak, H.J., Moon, S.I., Yoo, D.H., Lee, H.C., Park, I.C., Rhee, C.H., Hong, S., Il Induction of p53-mediated apoptosis and recovery of chemosensitivity through p53 transduction in human glioblastoma cells by cisplatin, *Int J Oncol*, 28, (2006), 119–125.
- Parker, T.W., Neufeld, K.L., APC Controls Wnt-Induced β -Catenin Destruction Complex Recruitment in Human Colonocytes, *Sci Rep*, 10, (2020), 2957.
- Parmigiani, E., Taylor, V., Giachino, C., Oncogenic and Tumor-Suppressive Functions of NOTCH Signaling in Glioma, *Cells*, 9, (2020), 2304.

- Pasricha, S.R., Tye-Din, J., Muckenthaler, M.U., Swinkels, D.W., Iron deficiency, *Lancet*, 397, (2021), 233-248.
- Pearce, M.S., Salotti, J.A., Little, M.P., McHugh, K., Lee, C., Kim, K.P., Howe, N.L., Ronckers, C.M., Rajaraman, P., Craft, A.W., Radiation exposure from CT scans in childhood and subsequent risk of leukaemia and brain tumours: A retrospective cohort study, *Lancet*, 380, (2012), 499–505.
- Peng, H., Wright, V., Usas, A., Synergistic enhancement of bone formation and healing by stem cell-expressed VEGF and bone morphogenetic protein-4, *J Clin Invest*, 110, (2002), 751–759.
- Peng, L, Liu, A, Shen, Y, et al., Antitumor and anti-angiogenesis effects of thymoquinone on osteosarcoma through the NFkappaB pathway, *Oncology Reports*, 29, (2013), 571-578.
- Perillo, B., Di Donato, M., Pezone, A., Di Zazzo, E., Giovannelli, P., Galasso, G., Castoria, G., Migliaccio, A., ROS in cancer therapy: The bright side of the moon, *Exp Mol Med*, 52, (2020), 192–203.
- Perron, N.R., Brumaghim, J.L., A Review of the Antioxidant Mechanisms of Polyphenol Compounds Related to Iron Binding, *Cell Biochem Biophys*, 53, (2009), 75-100.
- Perry, J., Okamoto, M., Guiou, M., Shirai, K., Errett, A., Chakravarti, A., Novel therapies in glioblastoma, *J Neurol Res Int*, 2012 (2012), 428565.
- Peyssonnaud, C., Zinkernagel, A.S., Schuepbach, R.A., Rankin, E., Vaulont, S., Haase, V.H., Nizet, V., Johnson, R.S., Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs), *J Clin Invest*, 117, (2007), 1926–1932.
- Pfenninger, C.V., Roschupkina, T., Hertwing, F., CD133 is not present on neurogenic astrocytes in the adult subventricular zone, but on embryonic neural stem cells, ependymal cells, and glioblastoma cells, *Cancer Res*, 67, (2007), 5727–5736.
- Phua, C.Y.H., Teoh, Z.L., Goh, B.H., Yap, W.H., Tang, Y.Q., Triangulating the pharmacological properties of thymoquinone in regulating reactive oxygen species, inflammation, and cancer: Therapeutic applications and mechanistic pathways, *Life Sciences*, 287, (2021), 120120.

- Piccirillo, S.G.M., Colman, S., Potter, N.E., van Delft, F.W., Lillis, S., Carnicer, M.J., Kearney, L., Watts, C., Greaves, M., Genetic and functional diversity of propagating cells in glioblastoma, *Stem Cell Reports*, 4(1), (2015), 7-15.
- Pogribny, I.P., Tryndyak, V.P., Pogribna, M., Shpyleva, S., Surratt, G., Gamboa da Costa, G., Beland, F.A., Modulation of intracellular iron metabolism by iron chelation affects chromatin remodeling proteins and corresponding epigenetic modifications in breast cancer cells and increases their sensitivity to chemotherapeutic agents, *Int J Oncol*, 42, (2013), 1822–1832.
- Polyakov, N., Leshina, T., Fedenok, L., Slepneva, I., Kirilyuk, I., Furso, J., Olchawa, M., Sarna, T., Elas, M., Bilkis, I., Redox-Active Quinone Chelators: Properties, Mechanisms of Action, Cell Delivery, and Cell Toxicity, *Antioxid, Redox Signal*, 28, (2018), 1394–1403
- Porreca, E., Uchino, S., Di Febbo, C., Di Bartolomeo, N., Angelucci, D., Napolitano, A.M., Mezzetti A., Cuccurullo F.. Antiproliferative effect of desferrioxamine on vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo, *Arterioscler Thromb*, 14, (1994), 299-304.
- Puig, S., Ramos-Alonso, L., Romero, A.M., Martínez-Pastor, M.T., The elemental role of iron in DNA synthesis and repair, *Metallomics*, 9, (2017), 1483– 500.
- Quincozes-Santos, A., Bobermin, L.D., Latini, A., Wajner, M., Souza, D.O., Gonçalves, C.A., Gottfried, C., Resveratrol protects C6 astrocyte cell line against hydrogen peroxide-induced oxidative stress through heme oxygenase 1, *PLoS One*, 8, (2013), e64372.
- Racoma, I.O., Meisen, W.H., Wang, Q.E., Kaur, B., Wani, A.A., Thymoquinone inhibits autophagy and induces cathepsin-mediated, caspaseindependent cell death in glioblastoma cells, *PLoS One*, 8, (2013), e72882.
- Raggi, C., Gammella, E., Correnti, M., Buratti, P., Forti, E., Andersen, J.B., Alpini, G., Glaser, S., Alvaro, D., Invernizzi, P., et al., Dysregulation of Iron Metabolism in Cholangiocarcinoma Stem-like Cells, *Sci Rep*, 7, (2017), 17667.
- Rahman, A., Shahabuddin, A., Hadi, S.M., Parish, J.H., Complexes involving quercetin, DNA and Cu(II), *Carcinogenesis*, 11, (1990), 2001–2003.

- Rahmani, A.H., Alzohairy, M.A., Khan, M.A. and Aly, S.M., Therapeutic implications of black seed and its constituent thymoquinone, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, (2014), ID 724658.
- Paiva-Santos, A.C., A.L. Silva, C., Guerra, D., Peixoto, M., Pereira-Silva, M., Zeinali, F., Mascarenhas, Veiga, F., Ethosomes as nanocarriers for the development of skin delivery formulations, *Pharm. Res. (N. Y.)* 38 (6), (2021), 947-70
- Raj, L., Ide, T., Gurkar, A.U., Foley, M., Schenone, M., Li, X., Tolliday, N.J., Golub, T.R., Carr, S.A., Shamji, A.F., Stern, A.M., Mandinova, A., Schreiber, S.L., Lee, S.W., Selective killing of cancer cells by a small molecule targeting the stress response to ROS, *Nature*, 475, (2011), 231–234.
- Rajakulendran, N., Rowland, K.J., Selvadurai, H.J., Ahmadi, M., Park, N.I., Naumenko, S., Dolma, S., Ward, R.J., So, M., Lee, L., Wnt and Notch Signaling Govern Self-Renewal and Differentiation in a Subset of Human Glioblastoma Stem Cells, *Genes Dev*, 33, (2019), 498–510.
- Rajput, S., Kumar, B.N., Dey, K.K., Pal, I., Parekh, A., Mandal, M., Molecular targeting of Akt by thymoquinone promotes G(1) arrest through translation inhibition of cyclin D1 and induces apoptosis in breast cancer cells, *Life Sci*, 93 (21), (2013), 783-790.
- Rajput, S., Puvvada, N., Kumar, B.N., Sarkar, S., Konar, S., Bharti, R., Dey, G., Mazumdar, A., Pathak, A., Fisher, P.B., et al., Overcoming Akt Induced Therapeutic Resistance in Breast Cancer through siRNA and Thymoquinone Encapsulated Multilamellar Gold Niosomes, *Mol Pharm*, 12, (2015), 4214-4225.
- Ramirez, Y., Weatherbee, J., Wheelhouse, R., Ross, A., Glioblastoma Multiforme Therapy and Mechanisms of Resistance, *Pharmaceuticals*, 6(12), (2013), 1475–1506.
- Rani, R.. et al., Improvement of antihyperglycemic activity of nano-thymoquinone in rat model of type-2 diabetes, *Chemico-biological Interactions*, 295, (2018), 119-32.
- Rat, B.H., Fair, J.M., Jamal, M., Camphausen, K., Tofilon, P.J., Astrocytes Enhance the Invasion Potential of Glioblastoma Stem-Like Cells, *PLoS ONE*, 8,(2013), 54752.

- Ray, P.D., Huang, B.W., Tsuji, Y., Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling, *Cell Signal*, 24(5), (2012), 981-990.
- Recalcati, S., Gammella, E., Cairo, G., Dysregulation of iron metabolism in cancer stem cells, *Free Radic Biol Med*, 133, (2019), 216-20
- Reguyal, F., Sarmah, A. K., & Gao, W., Synthesis of magnetic biochar from pine sawdust via oxidative hydrolysis of FeCl₂ for the removal sulfamethoxazole from aqueous solution, *Journal of Hazardous Materials*, 321, (2017), 868–878.
- Ren, W., Yan, Y., Zeng, L., Shi, Z., Gong, A., Schaaf, P., Wang, D., Zhao, J., Zou, B., Yu, H., Chen, G., A near infrared light triggered hydrogenated black TiO₂ for cancer photothermal therapy, *Adv Healthc Mater*, 4, (2015), 1526-1536.
- Reuss, D.E., Updates on the WHO diagnosis of IDH-mutant glioma, *Journal of Neuro-Oncology*, 162, (2023), 461–469.
- Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., Weissman, I.L., Stem cells, cancer, and cancer stem cells, *Nature*, 414, (2001), 105-11.
- Reya, T., Clevers, H., Wnt signalling in stem cells and cancer, *Nature*, 434, (2005), 843–50.
- Richardson, D.R., Kalinowski, D.S., Lau, S., Jansson, P.J., Lovejoy, D.B., Cancer cell iron metabolism and the development of potent iron chelators as anti-tumour agents, *Biochim Biophys Acta*, 1790, (2009), 702–717.
- Ricci-Vitiani, L., Lombardi, D.G., Pilozzi, E., Identification and expansion of human colon-cancer –initiating cells, *Nature*, 445 (7123), (2007), 111-15.
- Rich, J.N., Hans, C., Jones, B., Iversen, E.S., McLendon, R.E., Rasheed, B.K.A., Dobra, A., Dressman, H.K., Bigner, D.D., Nevins, J.R., Gene expression profiling and genetic markers in glioblastoma survival, *Cancer Res*, 65, (2005), 4051–4058.
- Richardson, D.R., Iron chelators as therapeutic agents for the treatment of cancer, *Crit Rev Oncol Hematology*, 42, (2002), 267- 81.
- Rinaldi, M., Cafo, M., Minutoli, L., Marini, H., Abbritti, R.V., Squadrito, F., Trichilo, V., Valenti, A., Barresi, V., Altavilla, D., ROS and brain gliomas: an overview of potential and innovative therapeutic strategies, *Int J Mol Sci*, (2016).

- Rip, J., Schenk, G.J., de Boer, A.G., Differential receptor-mediated drug targeting to the diseased brain, *Expert Opin Drug Deliv*, 6, (2009), 227-37.
- Rodgers, G.M., Gilreath, A., The Role of Intravenous Iron in the Treatment of Anemia Associated with Cancer and Chemotherapy, *Acta Haematol*, 142(1), (2019), 13-20
- Roepke, M., Diestel, A., Bajbouj, K., Walluscheck, D., Schonfeld, P., Roessner, A., Schneider-Stock, R., Gali-Muhtasib, H., Lack of p53 augments thymoquinone induced apoptosis and caspase activation in human osteosarcoma cells, *Cancer Biol Ther*, 6 (2), (2007), 160-169.
- Rosen, J.M., Jordan, C.T., The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm, *Science*, 324 (5935), (2009), 1670-3.
- Ross, D., Beall, H., Traver, R.D., Siegel, D., Phillips, R.M. and Gibson, N.W., Bioactivation of quinones by DT-diaphorase, molecular, biochemical, and chemical studies, *Oncol Res*, 6, (1994), 493-500.
- Sacco, A., Battaglia, A.M., Botta, C., Aversa, I., Mancuso, S., Costanzo, F., Biamonte, F., Iron Metabolism in the Tumor Microenvironment—Implications for Anti-Cancer Immune Response, *Cells*, 10, (2021), 303.
- Sachin, K.S., Nesalin, J.A.J. Mani, T.T., Preparation and evaluation of curcumin phytosomes by rotary evaporation method, *Int J Pharm biomed Res*. 6 (1), (2019), 29–34,
- Sadeek, E.A., El-Razek, F.H., The Chemo-Protective Effect of Turmeric, Chili, Cloves and Cardamom on Correcting Iron Overload-Induced Liver Injury, Oxidative Stress and Serum Lipid Profile in Rat Models, *J American Science*, 6,(2010), 10.
- Sagasser, J., Ma, B.N., Baecker, D., Salcher, S., Hermann, M., Lamprecht, J., Angerer, S., Obexer, P., Kircher, B., Gust, R., A new approach in cancer treatment: discovery of chlorido [N,N'-disalicylidene-1,2-phenylenediamine] iron(III) complexes as ferroptosis inducers, *J Med Chem*, 62, (2019), 8053-8061.
- Sakalar, Ç., Izgi, K., Iskender, B., Sezen, S., Aksu, H., Çakır, M., Kurt, B., Turan, A., Canatan, H., The combination of thymoquinone and paclitaxel shows anti-tumor activity through the interplay with apoptosis network in triple-negative breast cancer, *Tumour Biol J Int Soc Oncodev Biol Med*, 37, (2016), 4467-4477.

- Salem, M.L., Immunomodulatory and immunotherapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seed, *International Immunopharmacology*, 5(13-14), (2005), 1749-1770.
- Samanic, C.M., Cote, D.J., Creed, J.H., Stampfer, M.J., Wang, M., Smith-Warner, S.A., Egan, K.M., Prospective study of sleep duration and glioma risk, *Cancer Causes Control*, 32, (2021), 1039–1042.
- Samarghandian, S., Azimi-Nezhad, M., Farkhondeh, T., Thymoquinone-induced antitumor and apoptosis in human lung adenocarcinoma cells, *J Cell Physiol*, 234, (2019), 10421-31.
- Sang, M., Luo, R., Bai, Y., Dou, J., Zhang, Z., Liu, F., Feng, F., Xu, J., Liu, W., Mitochondrial membrane anchored photosensitive nano-device for lipid hydroperoxides burst and inducing ferroptosis to surmount therapy-resistant cancer, *Theranostics*, 9, (2019), 6209-6223.
- Saraf, A.S., Applications of novel drug delivery system for herbal formulations., *Fitoterapia*, 81, (2010), 680-89.
- Schonberg, D.L, Lubelski, D., Miller, E., Rich, N., Brain Tumor Stem Cells: Molecular Characteristics and Their Impact on Therapy, *Mol Asp Med*, 39,(2014), 82–101.
- Schwartz, C.S., Snyder, R. and Kalf G.F., The inhibition of mitochondrial DNA replication in vitro by the metabolites of benzene, hydroquinone and p-benzoquinone, *Chem Biol Interact*, 53, (1985), 327-350.
- Scimeca, M., Bischetti, S., Lamsira, H.K., Energy Dispersive X-ray (EDX) microanalysis: A powerful tool in biomedical research and diagnosis, *European j Histochemistry*, 62(1), (2018), 2841.
- Sell, S., Stem cell origin of cancer and differentiation therapy, *Crit Rev Oncol/Hematol*, 51, (2004), 1–28.
- Selyutina, O.Y., Kononova, P.A., Koshman, V.E., Fedenok, L.G. and Polyakov, N.E., The Interplay of Ascorbic Acid with QuinonesChelators—Influence on Lipid Peroxidation: Insight into Anticancer Activity, *Antioxidants*, 11, (2022), 376.
- Selyutina, O.Y., Mastova A.V. and Nikolay E. Polyakov N.E., The Interaction of Anthracycline Based Quinone-Chelators with Model Lipid Membranes: 1H NMR and MD Study, *Membranes*, 13, (2023), 61.

- Sethi, G., Ahn, K.S. and Aggarwal, B., Targeting nuclear factor- κ B activation pathway by thymoquinone: role in suppression of antiapoptotic gene products and enhancement of apoptosis, *Molecular Cancer Research*, 6 (6), (2008), 1059-70.
- Seyhan, S., Pamuk, O.N., Pamuk, G.E., Cakir, N., The correlation between ferritin level and acute phase parameters in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus, *Eur J Rheumatol*, 1, (2014), 92-95.
- Sezgin, Bayindir, Z., & Yuksel, N., Provesicles as novel drug delivery systems, *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 16(4), (2015), 344-364
- Shah, R., Shchepinov, M.S., Pratt, D.A., Resolving the role of lipoxygenases in the initiation and execution of ferroptosis, *ACS Cent Sci*, 4, (2018), 387-396
- Shahein, S.A., Aboul-Enein, A.M., Higazy, I.M., Abou-Ellella, F., Lojkowski, W., Ahmed, E.R., Mousa, S.A., Targeted anticancer potential against glioma cells of thymoquinone delivered by mesoporous silica core-shell nanoformulations with pH-dependent release, *Int J Nanomedicine*, 14, (2019), 5503.
- Shaji, J., & Bhatia, V., Proliposomes: A brief overview of novel delivery system, *Int J Pharm Biosci*, 4, (2013), 150-160.
- Shamim, U., Hanif, S., Ullah, M.F., Azmi, A.S., Bhat, S.H., Hadi, S.M., Plant polyphenols mobilize nuclear copper in human peripheral lymphocytes leading to oxidatively generated DNA breakage: Implications for an anticancer mechanism, *Free Radic Res*, 42, (2008), 764-772.
- Shander, A. Sweeney, J.D., Overview Of Current Treatment Regimens in Iron Chelation Therapy, *US Hematology*, 2(1), (2009), 56-9.
- Shen, Y., Xu, H.Z., Yang, S.Z., Ying, X.Z., Antitumor and antiangiogenesis effects of thymoquinone on osteosarcoma through the NF κ B pathway, *Oncology Reports*, 29(2), (2013), 571-8.
- Shen, Z., Song, J., Yung, B.C., Emerging strategies of cancer therapy based on ferroptosis, *Adv Mater*, 30, (2018a), e1704007.
- Shen, Z., Liu, T., Li, Y., Lau, J., Yang, Z., Fan, W., Zhou, Z., Shi, C., Ke, C., Bregadze, V.I., Fenton-reaction-acceleratable magnetic nanoparticles for ferroptosis therapy of orthotopic brain tumors, *ACS Nano*, 12, (2018b), 11355-65.

- Shergalis, A., Bankhead, A., Luesakul, U., Muangsin, N., Neamati, N., Current challenges and opportunities in treating glioblastoma, *Pharmacol Rev*, 70, (2018), 412-445.
- Shi, Y., Guryanova, O.A., Zhou, W., Liu, C., Huang, Z., Fang, X., Wang, X., Chen, C., Wu, Q., Ibrutinib Inactivates BMX-STAT3 in Glioma Stem Cells to Impair Malignant Growth and Radioresistance, *Sci Transl Med*, 10, (2018), eaah6816.
- Shin, D.H., Bae, Y.C., Kim-Han, J.S., Lee, J.H., Choi, I.Y., Son, K.H., Kang, S.S., Kim, W.K., Han, B.H., Polyphenol amentoflavone affords neuroprotection against neonatal hypoxic-ischemic brain damage via multiple mechanisms, *J Neurochem*, 96, (2006), 561–572.
- Shintoku, R., Takigawa Y., Yamada, K., Kubota, C., Yoshimoto, Y, Takeuchi, T., Koshiishi, I., Lipoxygenase-mediated generation of lipid peroxides enhances ferroptosis induced by erastin and RSL3, *Cancer Sci*, 108, (2017), 2187-2194.
- Shirmardi Shaghasemi, B., Virk, M.M., Reimhult, E., Optimization of Magneto-thermally Controlled Release Kinetics by Tuning of Magnetoliposome Composition and Structure *Sci*, 7(1), (2017), 7474-7483.
- Shoieb, A.M., Elgayyar, M., Dudrick, P.S., Bell, J.L., Tithof, P.K., In vitro inhibition of growth and induction of apoptosis in cancer cell lines by thymoquinone, *Int J Oncol*, 22, (2003), 107-113.
- Shokri, H., A review on the inhibitory potential of *Nigella sativa* against pathogenic and toxigenic fungi, *Avicenna J Phytomedicine*, 6(1), (2016), 21.
- Souza, I.D., Ramalho, M.C.C., Guedes, C.B., Osawa, I.Y.A., Monteiro, L.K.S., Gomes, L.R. and Rocha, C.R.R., Ferroptosis Modulation: Potential Therapeutic Target for Glioblastoma Treatment, *Int J Mol Sci*, 23, (2022), 6879-6900.
- Shokoohinia, Y., Bahrami, G., Taherabadi, F., Jaffari, F., Hosseinzadeh, L., Apoptosis cell death effect of linoleic acid from *nigella sativa* on human ovary cancer cells through mitochondrial intrinsic pathway, *J Rep Pharm Sci*, 7, (2018), 20-26.
- Siegel, R.L., Miller, K.D., Jemal, A., Cancer statistics, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 70(1), (2020), 7-30.

- Silantyeve, A.S., Falzone, L., Libra, M., Gurina, O.I., Kardashova, K.S., Nikolouzakis, T.K., Nosyrev, E., Current and future trends on diagnosis and prognosis of glioblastoma: from molecular biology to proteomics, *Cells*, 8, (2019), 863.
- Simamura, E., Hirai, K., Shimada, H., Koyama, J., Niwa, Y., Shimizu, S., Furanonaphthoquinones cause apoptosis of cancer cells by inducing the production of reactive oxygen species by the mitochondrial voltage-dependent anion channel, *Cancer Biol Ther*, 5, (2006), 1523–1529.
- Simmons, M.L., Lamborn, K.R., Takahashi, M., Chen, P., Israel, M.A., Berger, M.S., Godfrey, T., Nigro, J., Prados, M., Chang, S., Analysis of complex relationships between age, p53, epidermal growth factor receptor, and survival in glioblastoma patients, *Cancer Res*, 61, (2001), 1122–1128.
- Simoës, RV, Veeraperumal, S, Serganova, IS, Kruchevsky, N, Varshavsky, J, Blasberg, RG, Ackerstaff, E, Koutcher, JA., Inhibition of prostate cancer proliferation by Deferiprone, *NMR Biomed*, 30, (2017), 3712.
- Simpson, J.A., Narita, S., Geiseg, S., Gebicki, S., Dean, R.T., Long-lived reactive species on freeradical-damaged proteins, *Biochem J*, 282, (1992), 621–624
- Singamaneni, S., Bliznyuk, V.N., Binek, C. and Tsymbal, E.Y., Magnetic nanoparticles: recent advances in synthesis, self-assembly and applications, *Chem Soc Rev*, 21, (2011), 16819-16845.
- Singh, S.K., Hawkins, C., Clarke, I.D., Squire, J.A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R.M., Cusimano, M.D., Dirks, P.B., Identification of human brain tumour initiating cells, *Nature*, 432(7015), (2004), 396-401.
- Singh, A., Ahmad, I., Akhter, S., Jain, G.K., Iqbal, Z., Talegaonkar, S., Ahmad, F.J., Nanocarrier based formulation of Thymoquinone improves oral delivery: Stability assessment, in vitro and in vivo studies, *Colloids Surf, B* (2013), 10.
- Singh, R.P., Parpani, S., Narke, R. Chavan, R., Phytosome: Recent Advance Research for Novel Drug Delivery System, *Asian J Pharm Res Development*, 2(3), (2014),15-29
- Singh, J., Dutta, T., Kim, K.H., Rawat, M., Samddar P. and Kumar, P., "'Green' synthesis of metals and their oxide nanoparticles: applications for environmental remediation," *Journal of Nanobiotechnology*, 16(1), (2018), 84.

- Skoda, A.M., Simovic, D., Karin, V., Kardum, V., Vranic, S., Serman L., The Role of the Hedgehog Signaling Pathway in Cancer: A Comprehensive Review, *Bosn J Basic Med Sci*, 18, (2018), 8.
- Smith, J.S., Tachibana, I., Passe, S.M., Huntley, B.K., Borell, T.J., Iturria, N., O'Fallon, J.R., Schaefer, P.L., Scheithauer, B.W., James, C.D., PTEN mutation, EGFR amplification, and outcome in patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme, *J Natl Cancer Inst*, 93, (2001), 1246–1256.
- Sohn, Y.S., Mitterstiller, A.M., Breuer, W., Weiss, G., Cabantchik, Z.I., Rescuing iron-overloaded macrophages by conservative relocation of the accumulated metal, *Br J Pharmacol*, 164, (2011), 406–418.
- Sousa, A.A., and Leapman, R.D., Development and Application of STEM for the Biological Sciences, *Ultramicroscopy*, 123, (2012), 38-49.
- Souza, I.D., Ramalho, M.C.C., Guedes, C.B., Osawa, I.Y.A., Monteiro, L.K.S., Gomes, L.R. and Rocha, C.R.R., Ferroptosis Modulation: Potential Therapeutic Target for Glioblastoma Treatment, *Int J Mol Sci*, 23, (2022), 6879.
- Steeg, P S., The blood–tumour barrier in cancer biology and therapy, *Nat Rev Clin Oncol*, 18, (2021), 696–714.
- Stetefeld, J., McKenna, S.A., & Patel, T.R., Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. In *Biophysical Reviews*, 8 (4) (2016), 409-27.
- Stockwell, B.R., Angeli, F.J.P., Bayir, H., Bush, A.I., Conrad, M., Dixon, S.J., Fulda, S., Gascon, S., Hatzios, S.K., Kagan, V.E., et al., Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology, and Disease, *Cell*, 171, (2017), 273-285.
- Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosi, C., Bogdahn, U., Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma, *N Engl J Med*, 352, (2005), 987-996.
- Stupp, R., Brada, M., van den Bent, M.J., Tonn, J.C., Pentheroudakis, G., High-grade glioma: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up, *Ann Oncol*, 25, (2014), 93-101.

- Sun, H., Zhang, C., Cao, S., Sheng, T., Dong, N., Xu, Y., Fenton reactions drive nucleotide and ATP syntheses in cancer, *J Mol Cell Biol*, 10, (2018), 448- 59.
- Sun, Y., et al., PAMAM-Functionalized Cellulose Nanocrystals with Needle-Like Morphology for Effective Cancer Treatment, *Nanomaterials*, 11(7), (2021), 1640.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F., Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA Cancer J Clin*, 71, (2021), 209-249.
- Sur, S, Panda, CK., Molecular aspects of cancer chemopreventive and therapeutic efficacies of tea and tea polyphenols, *Nutrition*, 43, (2017), 8-15..
- Surekha, R., Aishwarya, V., Sumathi, T., Thymoquinone loaded solid lipid nanoparticle: Formulation, characterization and in-vitro cell viability assay, *Int J Pharm Bio Sci*, 6, (2014), 449–464.
- Tabeshpour, J., Mehri, S., Abnous, K., Hosseinzadeh, H., Neuroprotective Effects of Thymoquinone in Acrylamide-Induced Peripheral Nervous System Toxicity Through MAPKinase and Apoptosis Pathways in Rat, *Neurochem Res*, 44, (2019), 1101-1112.
- Taborsky, J., Kunt, M., Kloucek, P., Lachman, J., Zeleny, V., Kokoska, L., Identification of potential sources of thymoquinone and related compounds in Asteraceae, Cupressaceae, Lamiaceae, and Ranunculaceae families, *Cent Eur J Chem*, 10, (2012), 1899–1906.
- Taka, E., Mendonca, P., Mazzio, E.A., Reed, S.D., Reams, R, Soliman, K.F., Molecular Targets Underlying the Anti-inflammatory Effects of Thymoquinone in LPS activated BV-2 Cells, *The FASEB Journal*, 32(1), (2018), 40-2.
- Tan, A., Jeyaraj, R., De Lacey, S., Nanotechnology in neurosurgical oncology. *Nanotechnol, Cancer*, (2017), 139–170.
- Tang-Le, N.T., Cao, V.D., Nguyen, T.N.Q., Le, T.T.H., Trang, T.T., Thi, T.T.H., Soya Lecithin-Derived Liposomal Delivery System: Surface Modification and Current Applications, *Int J Mol Sci*, 20, (2019), 4706-33.

- Tan, J., Li, P., Xue, H., Li, Q., Cyanidin-3-glucoside prevents hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced oxidative damage in HepG2 cells, *Biotechnol Lett*, 42, (2020), 2453-66.
- Tan, S., Hou, X., Mei, L., Dihydratanshinone I inhibits human glioma cell proliferation via the activation of ferroptosis, *Oncol Lett*, 20, (2020), 122.
- Tang, C., Chua, C.L.M., Ang, B.T., Insight into the cancer stem cell model of glioma tumorigenesis, *Annals Acad Med Singapore*, 36, (2007), 352–735.
- Tang, D.G., Understanding cancer stem cell heterogeneity and plasticity, *Cell Res*, 22, (2012), 457–72.
- Tang, H.M., Tang, H.L., Cell recovery by reversal of ferroptosis, *Biol Open*, 8, (2019a), bio043182.
- Tang-Le, N.T., Cao, V.D., Nguyen, T.N.Q., Le, T.T.H., Trang, T.T., Thi, T.T.H., Soya Lecithin-Derived Liposomal Delivery System: Surface Modification and Current Applications, *Int J Mol Sci*, 20, (2019b), 4706-33.
- Tehrani, M., Intravascular thrombosis in central nervous system malignancies: a potential role in astrocytoma progression to glioblastoma, *Brain Pathol*, 18(2), (2008), 164-71.
- Tchoghandjian, A., Baeza, N., Colin, C., Cayre, M., Metellus, P., Beclin, C., Ouafik, L., Figarella-Branger, D., A2B5 Cells from Human Glioblastoma Have Cancer Stem Cell Properties, *Brain Pathol*, 20, (2010), 211–221.
- Thevenod, F., Iron and its role in cancer defense: a double-edged sword, *Met Ions Life Sci*, 18, (2018), 139-152
- Toyokuni S.. Role of iron in carcinogenesis: cancer as a ferrotoxic disease. *Cancer Sci*. 100, (2009), 9-16.
- Thevenod, F., Iron and its role in cancer defense: a double-edged sword, *Met Ions Life Sci*, 18, (2018), 139-152.
- Thomas, T.M., Yu, J.S., Metabolic Regulation of Glioma Stem-like Cells in the Tumor Micro-Environment, *Cancer Lett*, 408, (2017), 174.

- Timoshnikov, V.A., Kobzeva, T.V., Polyakov, N.E., Kontoghiorghes, G.J., Inhibition of Fe²⁺- and Fe³⁺-Induced Hydroxyl Radical Production by the Iron-Chelating Drug Deferiprone, *Free Radic Biol Med*, 78, (2015), 118-122.
- Timoshnikov, V.A., Kobzeva, T., Selyutina, O.Y., Polyakov, N.E., Kontoghiorghes, G.J., Effective inhibition of copper-catalyzed production of hydroxyl radicals by deferiprone, *JBIC J Biol Inorg Chem*, 24, (2019), 331-341.
- Timoshnikov, V.A., Kobzeva, T.V., Polyakov, N.E., Kontoghiorghes, G.J., Redox Interactions of Vitamin C and Iron: Inhibition of the Pro-Oxidant Activity by Deferiprone, *Int J Mol Sci*, 21, (2020), 3967.
- Timoshnikov, V.A., Kichigina, L.A., Selyutina, O.Y., Polyakov, N.E., Kontoghiorghes, G.J., Antioxidant Activity of Deferasirox and Its Metal Complexes in Model Systems of Oxidative Damage: Comparison with Deferiprone, *Molecules*, 26, (2021), 5064.
- Timoshnikov, V.A., Selyutina, O.Y., Polyakov, N.E., Didichenko, V., Kontoghiorghes, G.J., Mechanistic Insights of Chelator Complexes with Essential Transition Metals: Antioxidant/Pro-Oxidant Activity and Applications in Medicine, *Int J Mol Sci*, 23, (2022), 1247.
- Titus, D., Samuel, J.J.E., Roopan, S.M., Nanoparticle characterization techniques. In *Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles*, Elsevier, (2019), 303-319.
- Tomitakaa, A., Takemurab, Y., Huangc, Z., Royd, U., Nair, M., Magnetoliposomes in Controlled-Release Drug Delivery Systems, *Crit Rev Biomed Eng.*, 47(6), (2019), 495–505
- Torchilin, V.P., Weissig, V.. *Liposomes*, 2, Boston: Oxford University Press; (2003).
- Torti, S.V. and Torti, F.M., Iron and cancer: More ore to be mined, *Nat Rev Cancer*, 13, (2013), 342-355.
- Torti, S.V., Manz, D.H., Paul, B.T., Blanchette-Farra, N., Torti, F.M., Iron and Cancer, *Annu Rev Nutr*, 38, (2018), 97-125
- Torti, S.V. and Torti, F.M., Winning the war with iron, *Nat Nanotechnol*, 14, (2019), 499-500

- Torti, S.V., Torti, F.M., Iron and Cancer: 2020 Vision, *Cancer Res*, 80,(2020), 5435-48.
- Toyokuni, S., Role of iron in carcinogenesis: cancer as a ferrotoxic disease, *Cancer Sci*, 100, (2009), 9-16.
- Toyokuni, S., Iron overload as a major targetable pathogenesis of asbestos-induced mesothelial carcinogenesis, *Redox Rep*, 19, (2013), 1-7.
- Toyokuni, S., The origin and future of oxidative stress pathology: From the recognition of carcinogenesis as an iron addiction with ferroptosis-resistance to non-thermal plasma therapy, *Pathol Int*, 66, (2016), 245-259.
- Toyokuni, S., Ito, F., Yamashit, K., Okazaki, Y., Akatsuka, S., Iron and thiol redox signaling in cancer: an exquisite balance to escape ferroptosis, *Free Radic Biol Med*, 108, (2017), 610-626.
- Tran, B., Rosenthal, M.A., Survival comparison between glioblastoma multiforme and other incurable cancers, *J Clin Neurosci*, 17, (2010), 417–421.
- Trawczynska, I., New method of determining kinetic parameters for decomposition of hydrogen peroxide by catalase, *Catal*, 10, (2020), 323.
- Tsouana, E., Kaya, B., Gadong, N., Hemmaway, C., Newell, H., Simmons, A., Whitmarsh, S., Telfer, P., Deferasirox for iron chelation in multitransfused children with sickle cell disease; long-term experience in the East London clinical haemoglobinopathy network, *Eur J Haematol*, 94(4), (2015), 336-42.
- Tubesha, Z., Bakar, Z.A., Ismail, M., Characterization and Stability Evaluation of Thymoquinone Nanoemulsions Prepared by HighPressure Homogenization, *J Nanomaterials*, (2013), 1-6. <https://doi.org/10.1155/2013/453290>.
- Turcu, A.L., Versini, A., Khene, N., Gaillet, C., Caneque, T., Muller, S., DMT1 Inhibitors Kill Cancer Stem Cells by Blocking Lysosomal Iron Translocation, *Chemistry*, (2020).
- Ulasov, I.V., Nandi, S., Dey, M., Sonabend, A.M., Lesniak, M.S., Inhibition of sonic hedgehog and notch pathways enhances sensitivity of CD133 glioma stem cells to temozolomide therapy, *Mol Med*, 17, (2011), 103-12.

- Ullah, M.F., Khan, H.Y., Zubair, H., Shamim, U., Hadi, S.M., The antioxidant ascorbic acid mobilizes nuclear copper leading to a prooxidant breakage of cellular DNA: implications for chemotherapeutic action against cancer, *Cancer Chem Pharm*, 67, (2011), 103–110.
- van Woensel, M., Wauthoz, N., Rosière, R., Amighi, K., Mathieu, V., Lefranc, F., van Gool, S.W., de Vleeschouwer, S., Formulations for Intranasal Delivery of Pharmacological Agents to Combat Brain Disease: A New Opportunity to Tackle GBM? *Cancers (Basel)*, 5(3), (2013), 1020-1048.
- Vanoaica, L., Darshan, D., Richman, L., Schumann, K., Kuhn, L.C., Intestinal ferritin H is required for an accurate control of iron absorption, *Cell Metab*, 12, (2010), 273-282.
- Veiga, G.C., Liposomes as Versatile Tools: Nanoreactors, Membrane Models and Drug Delivery Carriers, Universitat Rovira Virgili. Department of Chemical Engineering, (2014).
- Villeneuve, P.J., Momoli, F., Parent, M.É., Siemiatycki, J., Turner, M.C., Krewski, D., Cell phone use and the risk of glioma: Are case-control study findings consistent with Canadian time trends in cancer incidence? *Environ Res*, 200, (2021), 111283.
- Vu, H.T.H., S.M. Hook, S.D. Siqueira, A. Müllertz, T. Rades, A. McDowell, Are phytosomes a superior nanodelivery system for the antioxidant rutin, *Int J Pharm*. 548 (1) (2018) 82–91,
- Wallenborn, M., Xu, L.X., Kirsten, H., Rohani, L., Rudolf, D., Ahnert, P., Schmidt, C., Schulz, R.M., Richter, M., Krupp, W.; et al., Molecular Analyses of Glioblastoma Stem-like Cells and Glioblastoma Tissue, *PLoS ONE*, 15, (2020), e0234986.
- Wanek, T., Mairinger, S., Langer, O., Radioligands targeting P-glycoprotein and other drug efflux proteins at the blood–brain barrier, *J Labelled Comp Radiopharm*, 56(3-4), (2013), 68-77.

- Wang, T.J., Huang, M.S., Hong, C.Y., Tse, V., Silverberg, G.D., Hsiao, M., Comparisons of tumor suppressor p53, p21, and p16 gene therapy effects on glioblastoma tumorigenicity in Situ, *Biochem Biophys Res Commun*, 287, (2001), 173–180.
- Wang, J. and Pantopoulos, K., Regulation of cellular iron metabolism, *Biochem J*, 434, (2011), 365-381
- Wang, Z., Iron complex nanoparticles synthesized by eucalyptus leaves, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 1(12), (2013), 1551–1554.
- Wang, L., Hu, C., Shao, L., The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future, *International J Nanomedicine*, 12, (2017), 1227.
- Wang, Y., Yin, W., Ke, W., et al., Multifunctional polymeric micelles with amplified Fenton reaction for tumor ablation, *Biomacromolecules*, 19, (2018), 1990-8.
- Wang, Z., Ding, Y., Wang, X., Lu, S., Wang, C., He, C., Wang, L., Piao, M., Chi, G., Luo, Y., et al., Pseudolaric acid B triggers ferroptosis in glioma cells via activation of Nox4 and inhibition of xCT, *Cancer Lett*, 428, (2018), 33.
- Wang, W., Tabu, K., Aimaitijiang A. and Wang, T.T. et al., Therapy-resistant nature of cancer stem cells in view of iron metabolism, *Inflammation and Regeneration*, 42, (2022), 34.
- Weinberg, E.D., The role of iron in cancer. *Eur J Cancer Prev*. 5, (1996), 19–36.
- Whitnall, M., Howard, J., Ponka, P., Richardson, D.R., A class of iron chelators with a wide spectrum of potent antitumor activity that overcomes resistance to chemotherapeutics, *Proc Natl Acad Sci USA*, 103, (2006), 14901-14906.
- Wiestler, B., Capper, D., Holland-Letz, T., Korshunov, A., Von Deimling, A., Pfister, S.M., Platten, M., Weller, M., Wick, W., ATRX loss refines the classification of anaplastic gliomas and identifies a subgroup of IDH mutant astrocytic tumors with better prognosis, *Acta Neuropathol*, 126, (2013), 443–451.
- Winter, W.E., Bazydlo, L.A., Harris, N.S., *The Molecular Biology of Human Iron Metabolism*, *Laboratory Medicine*, 45(2), (2014), 92-102.
- Wolburg, H., Lippoldt, A., Tight junctions of the blood–brain barrier: development, composition and regulation, *Vascul Pharmacol*, 38, (2002), 323-37.

- Wong, K., Ma, J., Rothnie, A., Biggin, P.C., Kerr, I.D., Towards understanding promiscuity in multidrug efflux pumps, *Trends Biochem Sci*, 39(1), (2014), 8-16.
- Woo, C.C., Loo, S.Y., Gee, V., et al., Anticancer activity of thymoquinone in breast cancer cells: possible involvement of PPAR- γ pathway, *Biochem Pharmacol*, 82, (2011), 464-75.
- Woo, C.C., Kumar, A. and Tan, K.H., Thymoquinone: Potential cure for inflammatory disorders and cancer, *Biochem Pharmacology*, 83 (4), (2012), 443-451.
- Woo, C.C., Hsu, A., Kumar, A.P., Sethi, G., Tan, K.H.B., Thymoquinone inhibits tumor growth and induces apoptosis in a breast cancer xenograft mouse model: the role of p38 MAPK and ROS, *PLoS One*, 8, (2013), e75356.
- Wu, X.J., Hua, X., Targeting ROS: selective killing of cancer cells by a cruciferous vegetable derived pro-oxidant compound, *Cancer Biol Ther*, 6, (2007), 646.
- X-q, L., Elliott, D.W., Zhang, W.X., Zero-valent iron nanoparticles for abatement of environmental pollutants: Materials and engineering aspects, *Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences*, 31 (4), (2006), 111-122.
- Xie, Y., Hou, W., Song, X., Yu, Y., Huang, J., Sun, X., Kang, R., Tang, D., Ferroptosis: process and function, *Cell Death Differ*, 23, (2016), 369-379.
- Xiong, H., Wang, C., Wang, Z., Jiang, Z., Zhou, J., Intracellular cascade activated nanosystem for improving ER+ breast cancer therapy through attacking GSH-mediated metabolic vulnerability, *J Control Release*, 309, (2019), 145-157.
- Xiong, Q., Li, X., Xia, L., Yao, Z., Shi, X., Dong, Z., Dihydroartemisinin attenuates hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats by inhibiting oxidative stress, *Mol Brain*, 15, (2022), 1-10.
- Xu, D., Su, C., Song, X., Shi, Q., Fu, J., Hu, L., Xia, X., Song, E., Polychlorinated biphenyl quinone induces endoplasmic reticulum stress, unfolded protein response, and calcium release, *Chem Res Toxicol*, 28, (2015), 1326-1337.
- Yan, H., Parsons, D.W., Jin, G., McLendon, R., Rasheed, B.A., Yuan, W., Kos, I., Batinic-Haberle, I., Jones, S., Riggins, G.J., Friedman, H., Friedman, A., Reardon, D., Herndon, J., Kinzler, K.W., Velculescu, V.E., Vogelstein, B., IDH1 and IDH2 mutations in gliomas, *N Engl J Med*, 360, (2009), 765-773.

- Yang, H.H., Zhang, S.Q., Chen, X.L., Zhuang, Z.X., Xu, J.G., & Wang, X.R., Magnetite-containing spherical silica nanoparticles for biocatalysis and bioseparations, *Analytical Chemistry*, 76(5), (2004), 1316–1321.
- Yang, L., Cao, Z., Sajja, H.K., Mao, H., Wang, L., Geng, H., et al., Development of receptor targeted magnetic iron oxide nanoparticles for efficient drug delivery and tumor imaging, *J Biomedical Nanotechnology*, 4 (4), (2008), 439-44.
- Yang, W.S., SriRamaratnam, R., Welsch, M.E., Shimada, K., Skouta, R., Viswanathan, V.S., Cheah, J.H., Clemons, P.A., Shamji, A.F., Clish, C.B., Regulation of Ferroptotic Cancer Cell Death by GPX4, *Cell*, 156, (2014), 317–331.
- Yang, J., Kuang, X.R., Lv, P.T., Yan, X.X., Thymoquinone inhibits proliferation and invasion of human nonsmall-cell lung cancer cells via ERK pathway, *Tumor Biology*, 36(1), (2015), 259-69.
- Yang, K., Wang, X., Zhang, H., Wang, Z., Nan, G., Li, Y., Zhang, F., Mohammed, M.K., Haydon, R.C., Luu, H.H., The Evolving Roles of Canonical WNT Signaling in Stem Cells and Tumorigenesis: Implications in Targeted Cancer Therapies, *Lab Investig*, 96, (2016), 116–136.
- Yang, W.S, Stockwell, B.R., Ferroptosis: Death by Lipid Peroxidation, *Trends Cell Biol*, 26, (2016), 165-176.
- Yang, L., Cao, Z., Sajja, H. K., Mao, H., Wang, L., Geng, H., Development of receptor targeted magnetic iron oxide nanoparticles for efficient drug delivery and tumor imaging, *Journal of Biomedical Nanotechnology*, (2008).
- Yang, K., Wu, Z., Zhang, H., Zhang, N., Wu, W., Wang, Z., Dai, Z., Zhang, X., Zhang, L., Peng, Y., Glioma targeted therapy: insight into future of molecular approaches, *Mol Cancer*, (2022), 21-39.
- Yang, X., Xiao, J., Wan, P., Liu, J., Mo, H., The effect of lutein on the oxidation of egg yolk phospholipids in a liposome model, *Food Chemistry*, 20, (2023), 100945.
- Yao, X., Yang, P., Jin, Z., Jiang, Q., Guo, R., Xie, R., He, Q., Yang, W., Multifunctional nanoplatform for photoacoustic imaging-guided combined therapy enhanced by CO induced ferroptosis, *Biomaterials*, 197, (2019), 268-83.

- Yi, L., Zhou, X., Li, T., Liu, P., Hai, L., Tong, L., Ma, H., Tao, Z., Xie, Y., Zhang, C., Notch1 Signaling Pathway Promotes Invasion, Self-Renewal and Growth of Glioma Initiating Cells via Modulating Chemokine System CXCL12/CXCR4, *J Exp Clin Cancer Res*, 38, (2019), 339
- Yi, R., Wang, H., Deng, C., Wang, X., Yao, L., Niu, W., Fei, M., Zhaba, W., Dihydroartemisinin initiates ferroptosis in glioblastoma through GPX4 inhibition, *Biosci Rep*, 40, (2020), BSR20193314.
- Yin, H., Xu, L., Porter, N.A., Free Radical Lipid Peroxidation: Mechanisms and Analysis, *Chem Rev*, 111, (2011), 5944–5972.
- Yoshikawa, T.T., Antimicrobial resistance and aging: beginning of the end of the antibiotic era? *J American Geriatrics Society*, 50 (7), (2002), 226-9.
- Yu, H., Lee, H., Herrmann, A., Buettner, R., Revisiting STAT3 Signalling in Cancer: New and Unexpected Biological Functions, *Nat Rev Cancer*, 14, (2014), 736-46.
- Yuan, B., Wang, G., Tang, X., Tong, A., Zhou, L., Immunotherapy of glioblastoma: recent advances and future prospects, *Hum Vacc Immunotherapeutics*, 18(5), (2022), 2055417.
- Yue, L., Dai, Z., Chen, X., Liu, C., Hu, Z., Song, B., Zheng, X., Development of a novel FePt-based multifunctional ferroptosis agent for high-efficiency anticancer therapy, *Nanoscale*, 10, (2018), 17858-17864.
- Yusufi, M., Banerjee, S., Mohammad, M., Khatal, S., Swamy, K.V., Khan, E.M., Aboukameel, A., Sarkar, F.H., Padhye, S., Synthesis, characterization and anti-tumor activity of novel thymoquinone analogs against pancreatic cancer, *Bioorg Med Chem Lett*, 23, (2013), 3101-3104.
- Zadeh, A.B., M. Zenial, H. Hamishehkar, Nano-phytosome: a developing platform for herbal anti-cancer agents in cancer therapy, *Curr. Drug Targets* 19 (2) (2018) 170–180,
- Zang, Y., Kong, Y, Ma, Y, Ni, S., Wikerholman, T., Xi, K., Zhao, F., Zhao, Z., Wang, J., Huang, B., et al., Loss of COPZ1 induces NCOA4 mediated autophagy and ferroptosis in glioblastoma cell lines, *Oncogene*, 40, (2021), 1425-1439.

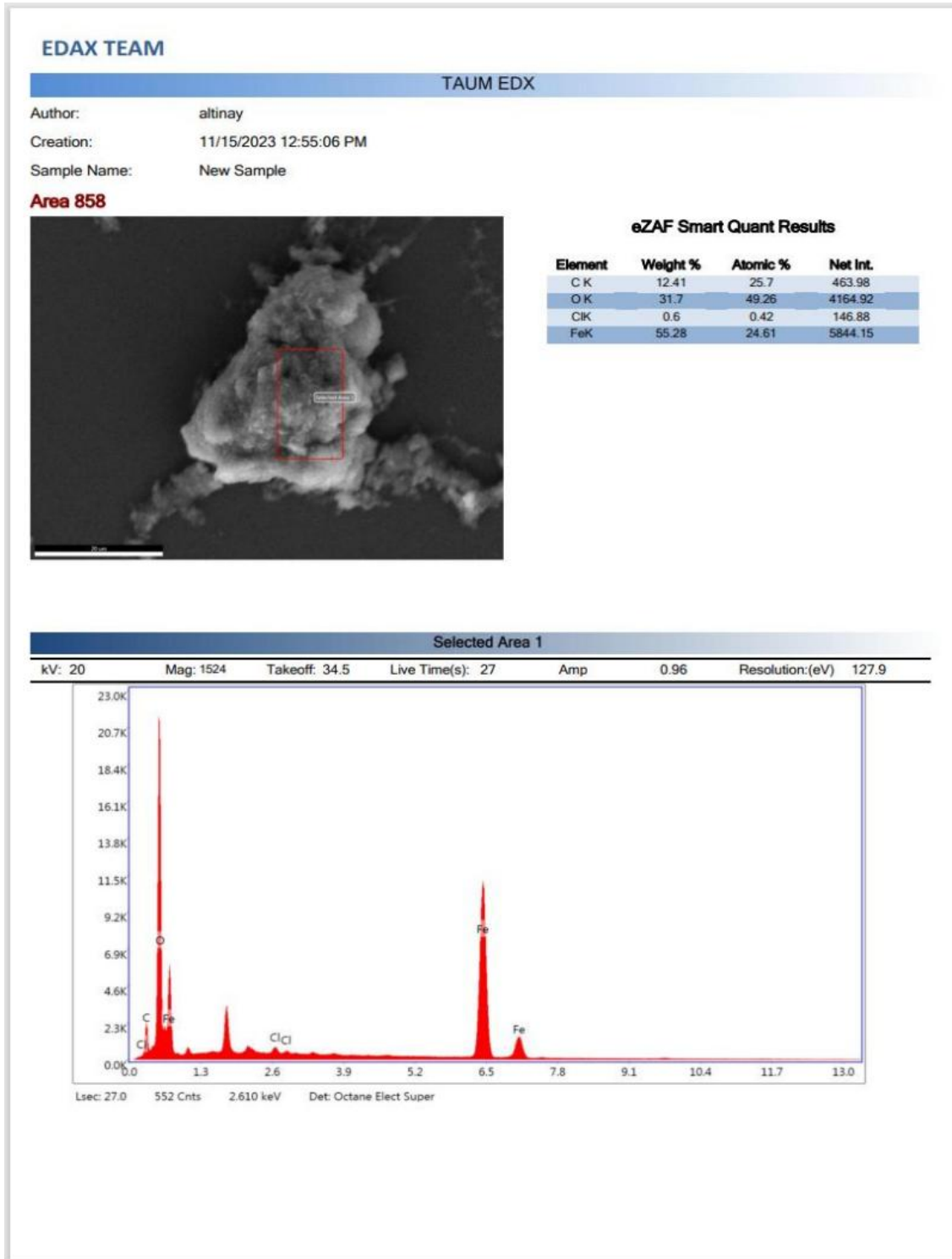
- Zeng, Y.A., Nusse, R., Wnt proteins are self-renewal factors for mammary stem cells and promote their long-term expansion in culture, *Cell Stem Cell*, 6, (2010), 568–77.
- Zgurskaya, H.I., López, C.A., Gnanakaran, S., Permeability Barrier of Gram-Negative Cell Envelopes and Approaches To Bypass It, *ACS Infectious Diseases*, 1(11), (2015), 512-522.
- Zhang, M., Song, T., Yang, L., Chen, R., Wu, L., Yang, Z., Fang, J., Nestin and CD133: Valuable Stem Cell-Specific Markers for Determining Clinical Outcome of Glioma Patients, *J Exp Clin Cancer Res*, 27, (2008) 85.
- Zhang, H., Kong, X., Kang, J., Su, J., Li, Y., Zhong, J., Sun, L., Oxidative stress induces parallel autophagy and mitochondria dysfunction in human glioma U251 cells, *Toxicol Sci*, 110, (2009), 376–88.
- Zhang, N., Wei, P., Gong, A., Chiu, T., Lee, T., Colman, H., Huang, H., Xue, J., Liu, M., FoxM1 promotes β -catenin nuclear localization and controls Wnt target-gene expression and glioma tumorigenesis, *Cancer Cell*, 20, (2011), 427-42.
- Zhang, C., Zhang, F., Iron homeostasis and tumorigenesis: Molecular mechanisms and therapeutic opportunities, *Protein Cell*, 6, (2015), 88–100.
- Zhang, L., Bai, Y., Yang, Y., Thymoquinone chemosensitizes colon cancer cells through inhibition of NF- κ B, *Oncol Lett*, 12 (4), (2016a), 2840-2845.
- Zhang, C., Bu, W., Ni, D., Zhang, S., Li, Q., Yao, Z., Zhang, J., Yao, H., Wang, Z., Shi, J., Synthesis of iron nanometallic glasses and their application in cancer therapy by a localized fenton reaction, *Angew Chem Int Ed Engl*, 55, (2016b), 2101-6.
- Zhang, H., Thin-Film Hydration Followed by Extrusion Method for Liposome Preparation, *Methods Mol Biol*, 1522, (2017), 17–22.
- Zhang, M., Du, H., Huang, Z., Zhang, P., Yue, Y., Wang, W., Liu, W., Zeng, J., Ma, J., Chen, G., Wang, X., Fan, J., Thymoquinone induces apoptosis in bladder cancer cell via endoplasmic reticulum stress-dependent mitochondrial pathway, *Chem Biol Interact*, 292, (2018), 65-75.

- Zhang, D., Cui, P., Dai, Z., Yang, B., Yao, X., Liu, Q., Hu, Z., Zheng, X., Tumor microenvironment responsive FePt/MoS₂ nanocomposites with chemotherapy and photothermal therapy for enhancing cancer immunotherapy, *Nanoscale*, 11, (2019a), 19912-19922.
- Zhang, P., Hou, Y., Zeng, J., Li, Y., Wang, Z., Zhu, R., Ma, T., Gao, M., Coordinatively unsaturated Fe(3+) based activatable probes for enhanced MRI and therapy of tumors, *Angew Chem Int Ed Engl*, 58, (2019b), 11088-11096.
- Zhang, F., Li, F., Lu, G.H., Nie, W., Zhang, L., Lv, Y., Bao, W., Gao, X., Wei, W., Pu, K., Xie, H.Y., Engineering magnetosomes for ferroptosis/immunomodulation synergism in cancer, *ACS Nano*, 13, (2019c), 5662-5673.
- Zhang, Y., Li, M., Gao, X., Chen, Y., Liu, T., Nanotechnology in cancer diagnosis: Progress, challenges and opportunities, *J Hematol Oncol*, 12,(2019d), 137–213.
- Zhang, Y., Xi, K., Fu, X., Sun, H., Wang, H., Yu, D., Li, Z., Ma, Y., Liu, X., Huang, B., et al., Versatile metal-phenolic network nanoparticles for multitargeted combination therapy and magnetic resonance tracing in glioblastoma, *Biomaterials*, 278, (2021), 121163.
- Zhang, B., Ting, W.J., Gao, J., et al., Erk phosphorylation reduces the thymoquinone toxicity in human hepatocarcinoma, *Environ Toxicol*, 36, (2021), 1990-8.
- Zhang, C., Liu, X., Jin, S., Chen, Y., Guo, R., Ferroptosis in cancer therapy: A novel approach to reversing drug resistance, *Mol Cancer*, 21, (2022), 1–12.
- Zhang, J., Yu, L., Yu, M., Yu, D., Chen, Y., Zhang, J., Engineering nanoprobe for magnetic resonance imaging of brain diseases, *Chemical Engineering*, 481, (2023), 148472.
- Zhao, B., Li, X., Wang, Y., Shang, P., Iron-dependent cell death as executioner of cancer stem cells, *J Exp Clin Cancer Res*, 37(1), (2018), 79.
- Zhao, Y., Zhao, W., Lim, Y.C., Liu, T., Salinomycin-loaded gold nanoparticles for treating cancer stem cells by ferroptosis-induced cell death, *Mol Pharm*, 16, (2019a), 2532-2539.
- Zhao, Z., Iron and oxidizing species in oxidative stress and Alzheimer's disease, *Aging Med (Milton)*, 2(2), (2019b), 82-87.

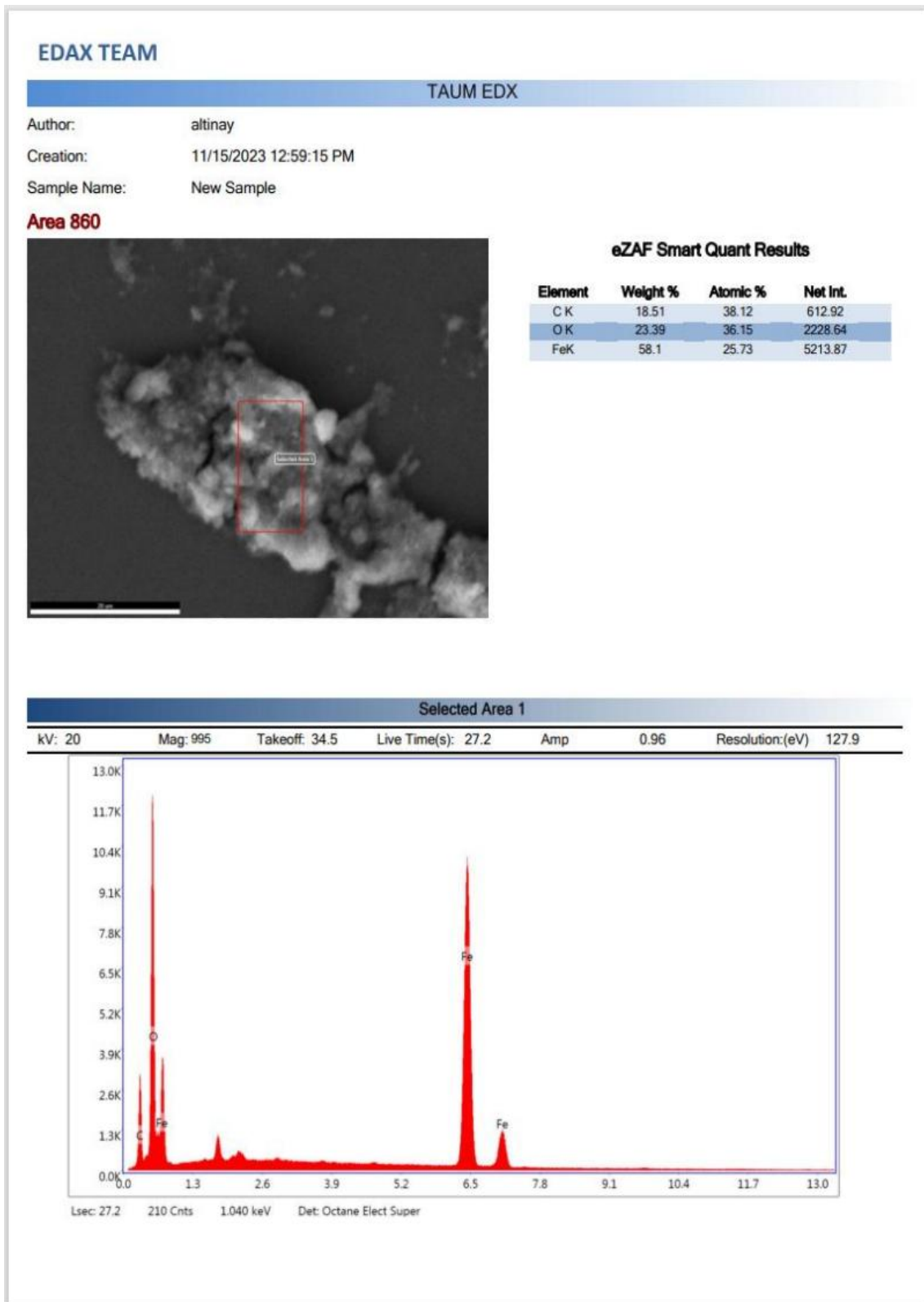
- Zhao, Y., Long, Z., Ding, Y., Jiang, T., Liu, J., Li, Y., Liu, Y., Peng, X., Wang, K., Dihydroartemisinin Ameliorates Learning and Memory in Alzheimer's Disease Through Promoting Autophagosome-Lysosome Fusion and Autolysosomal Degradation for A β Clearance, *Front Aging Neurosci*, 12, (2020), 47.
- Zeng, YA, Nusse, R., Wnt proteins are self-renewal factors for mammary stem cells and promote their long-term expansion in culture, *Cell Stem Cell*, 6, (2010), 568–77.
- Zhou, J., Patel, T.R., Sirianni, R.W., Strohbehn, G., Zheng, M.Q., Duong, N., Schafbauer, T., Huttner, A.J., Huang, Y., Carson, R.E., Zhang, Y., Highly penetrative, drug-loaded nanocarriers improve treatment of glioblastoma, *Proc Natl Acad Sci*, 110 (29), (2013), 11751-11756.
- Zhou, J., Lei, M., Peng, X.L., Wei, D.X., Yan, K., Fenton reaction induced by Fe-based nanoparticles for tumor therapy, *J Biomed Nanotechnol*, 17, (2021),1510-2.
- Zhu, Y. and Parada, L.F., The Molecular and Genetic Basis of Neurological Tumours. *Nature Reviews Cancer*, 2(8), (2002) 616–626.
- Zhu, W.Q., Wang, J., Guo, X.F., Liu, Z., Dong, W.G., Thymoquinone inhibits proliferation in gastric cancer via the STAT3 pathway *in vivo* and *in vitro*, *World J Gastroenterology*, 22(16), (2016), 4149.
- Zubair, H., Khan, H.Y., Sohail, A., Azim, S., Ullah, M.F., Ahmad, A., Sarkar F.H. and Hadi S.M., Redox cycling of endogenous copper by thymoquinone leads to ROS-mediated DNA breakage and consequent cell death: putative anticancer mechanism of antioxidants, *Cell Death and Disease*, 4, (2013), 172-180.

EKLER

EK 1 – TQFe NP'lerinin SEM-EDX analiz raporu



EK 2 – Mag NP’lerinin SEM-EDX Analiz Raporu



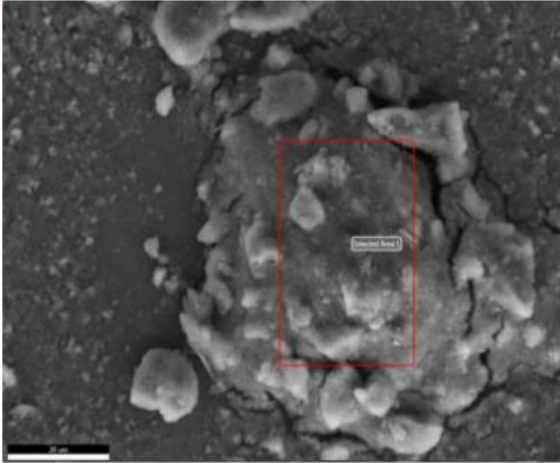
EK 3 – Fit NP'lerinin SEM-EDX Analiz Raporu

EDAX TEAM

TAUM EDX

Author: altinay
Creation: 11/15/2023 1:05:17 PM
Sample Name: New Sample

Area 863

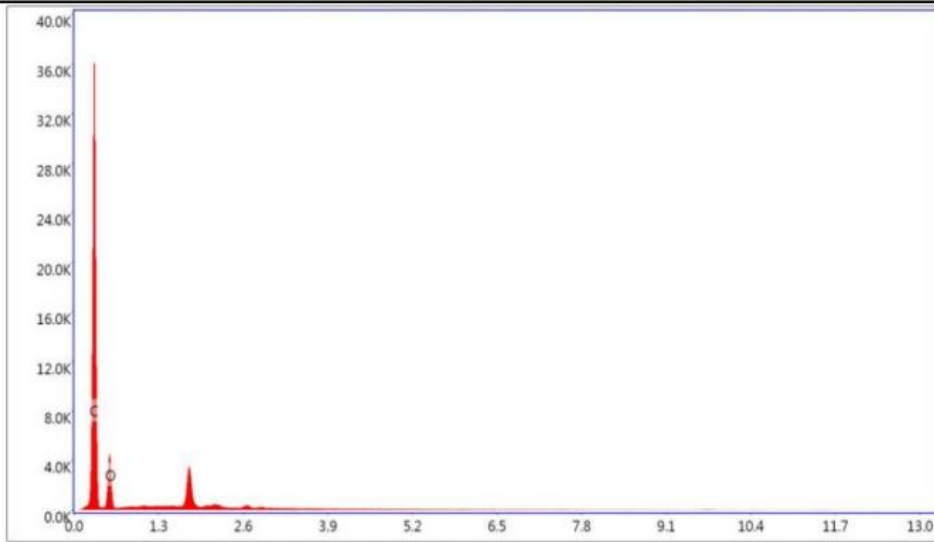


eZAF Smart Quant Results

Element	Weight %	Atomic %	Net Int.
C K	76.5	81.26	7701.79
O K	23.5	18.74	977.7

Selected Area 1

kV: 20 Mag: 1573 Takeoff: 34.5 Live Time(s): 28.7 Amp: 0.96 Resolution:(eV) 127.9



Lsec: 28.7 293 Cnts 1.040 keV Det: Octane Elect Super

EK 4 – Mag ve Fit NP’lerinin belli zaman aralıklarındaki *in vitro* salım konsantrasyonları (%)

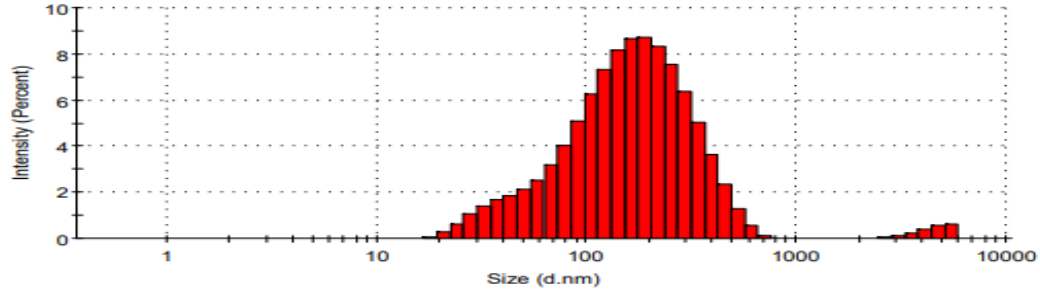
Zaman (saat)	Mag NP (% salım konsantrasyonu)	Fit NP (% salım konsantrasyonu)
0,25	0,6	4,5
0,5	15,31	9,5
0,75	17,9	21,13
1	19,42	28,88
2	37,35	35,99
4	39,35	41,39
6	41,47	44,98
8	42,35	45,56
24	45,52	49,44
48	45,04	47,98
72	41,98	46,27

EK 5 – Mag ve Fit NP’lerinin başlangıç ve 60. gün (+4 °C) DLS (size ve pdi) sonuç tablosu ve analiz raporları

GRUPLAR	Başlangıç		60 (+4 °C)	
	Size	Pdi	Size	Pdi
Mag NP	76,31 ± 46,19	0,263	127,7 ± 116,2	0,366
Fit NP	87,49 ± 45,80	0,223	176,6 ± 146,2	0,361

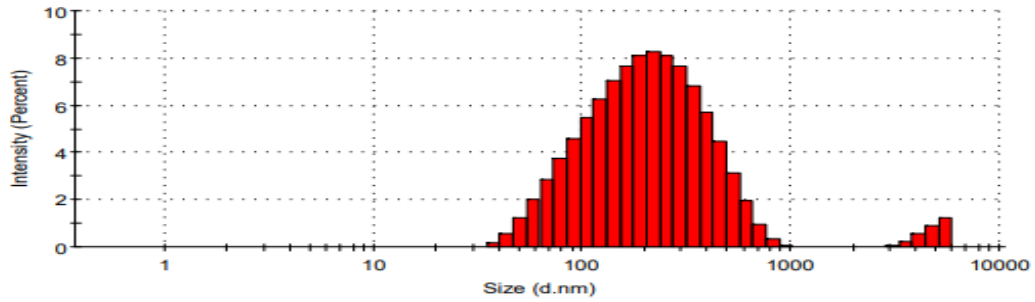
Z-Average (d.nm): 127,7 **Peak 1:** 185,9 **% Intensity:** 98,0 **St Dev (d.n..)** 116,2
Pdl: 0,366 **Peak 2:** 4617 **% Intensity:** 2,0 **St Dev (d.n..)** 821,1
Intercept: 0,959 **Peak 3:** 0,000 **% Intensity:** 0,0 **St Dev (d.n..)** 0,000
Result quality **Good**

Size Distribution by Intensity



Z-Average (d.nm): 174,6 **Peak 1:** 235,9 **% Intensity:** 97,0 **St Dev (d.n..)** 146,2
Pdl: 0,361 **Peak 2:** 4863 **% Intensity:** 3,0 **St Dev (d.n..)** 694,7
Intercept: 0,956 **Peak 3:** 0,000 **% Intensity:** 0,0 **St Dev (d.n..)** 0,000
Result quality **Good**

Size Distribution by Intensity



TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

