

**HİPERİSİN YÜKLÜ KİTOSAN NANOPARTİKÜLLERİN
A549 AKCİĞER KANSER HÜCRELERİNDE
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**INVESTIGATION OF EFFECTS OF HYPERICIN
LOADED CHITOSAN NANOPARTICLES IN A549 LUNG
CANCER CELLS**

BELİZ TAŞKONAK

DOÇ. DR. AYSUN KILIÇ SÜLOĞLU

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

Canım aileme...

ÖZET

HİPERİSİN YÜKLÜ KİTOSAN NANOPARTİKÜLLERİN A549 AKCİĞER KANSER HÜCRELERİNDE ETKİLERİ'NİN ARAŞTIRILMASI

Beliz TAŞKONAK

Yüksek Lisans, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Aysun KILIÇ SÜLOĞLU

Haziran 2021, 84 sayfa

Akciğer kanseri halen günümüzde en sık karşılaşılan ve en yüksek ölüme sebep olan kanser türlerinden biri olarak görülmektedir. Hiperisin (HY), *Hypericum perforatum* bitkisinden elde edilen hidrofobik, doğal bir anti-kanser bileşendir. HY gibi ışıkla duyarlı maddelerin kullanımına dayanan fotodinamik terapi (FDT), sıklıkla tercih edilen alternatif tedavi yaklaşımlardan biri olmaktadır. HY, fotoreaksiyon ile oksijen bağımlı reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşmasıyla hücre ölümüne sebep olmaktadır. HY nispeten büyük moleküler bir yapıya sahiptir ve tek başına kümeleşme göstermektedir, bunun yanı sıra alımının sınırlı olması ve fizyolojik ortamda degradesyona uğraması oluşturacağı cevabı etkilemektedir. Bu sebeplerden dolayı hidrofobik ilaç taşıyıcı sistemlerinin önemli bir parçası olan nanopartiküller (NP) kullanılarak HY'nin suda çözünebilir hale getirilmesi açısından oldukça önem taşımaktadır.

HY ile görülmesi beklenen anti-kanser etkinin, NP'ler sayesinde daha özgül ve daha uzun süreli bir tedavi yaklaşımı sağlaması hedeflenmiştir.

Nanopartikülün polimerik yapısını oluşturan Kitosan, kitinden elde edilen doğal bir bileşen olmakla birlikte biyouyumluluğu, sınırlı sitotoksisiteye sahip olması ve kolayca çözünebilir olması nedenleriyle öne çıkmaktadır. Kanser ilaçları ile tümör dokularının hedeflendirilmesiyle potansiyel bir anti-kanser aracı olarak görülmektedir. Tez kapsamında, A549 akciğer kanseri hücre hattında HY ile ve/veya HY içeren kitosan yüklü nanopartiküller (HY-NP) kullanılarak FDT uygulanmıştır ve anti-kanser özelliği değerlendirilmiştir. Kitosan NP'ler iyonik jelyasyon yöntemi ile sentezlenmiş ve taramalı elektron mikroskopunda (SEM) yapısı incelenmiştir. Belirlenen değerlerdeki HY dozları (200 nM, 400 nM, 600 nM) NP'lerin sentezi sırasında eklenmiş ve hücrelere uygulanmıştır. 24 saat sonrasında 6 lux/J cm² dozunda 30 dk ışığa yapılmıştır. Işıma süresinin bitiminden 24 saat ve 48 saat sonra ise hücre analizler gerçekleştirilmiştir. 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolyum bromit (MTT) canlılık analizi, DCFDA (2',7'-dikloroflorosein diasetat) ile hücrede oluşan reaktif oksijen türlerinin miktarı ölçülürken, AO/PI floresan boyaması ile hücre ölüm tipi değerlendirilmiştir. FITC (Fluorescein isothiocyanate) ile NP'lerin hücre alımı ve TumorTac kiti ile apoptoz oluşumu incelenmiştir. Tüm deney grupları arasında NP içeren gruplarında hücre ölümünün daha çok artmasıyla, HY'nin hücre alımının arttığı sonucuna varılmıştır. MTT analizinin sonucunda 48 saatte HY-NP 600 nM grubunda hücre canlılığında %56'ya kadar düşüş görülürken, nanopartikül grupları içerisinde HY konsantrasyonunun artması ile doza bağlı canlılıktaki azalmanın da arttığı tespit edilmiştir. Hücre ölüm tipi AO/PI floresan boyaları ile değerlendirildiğinde ise hücrelerin büyük kısmında nekroz oluşumu görülmüştür. Oluşturulan NP'lerin karakterizasyon çalışmaları SEM analizleri ile gerçekleştirilmiştir. Kitosan NP'lerin geliştirilerek kanser hücrelerinde etken maddenin alımının artırılacağı ve ilaçların yerine bitkisel bileşenlerin kullanılarak yan etkilerin azaltılabileceği öngörülmektedir. Kitosan NP kullanılarak gerçekleştirilen HY aracılı FDT'nin akciğer kanserinin tedavisinde umut vaad ettiği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Akciğer kanseri, Hiperisin, Kitosan, Nanopartikül, Fotodinamik terapi

ABSTRACT

INVESTIGATION EFFECTS OF HYPERICIN LOADED CHITOSAN NANOPARTICLES IN A549 LUNG CANCER CELLS

Beliz TAŞKONAK

Master of Zoology, Department of BIOLOGY

Supervisor: Ass. Prof. Aysun KILIÇ SÜLOĞLU

January 2021, 84 pages

Lung cancer is still continues to be one of the most common types of cancer today and is the leading cause of cancer death. Hypericin (HY) is a hydrophobic, natural anti-cancer component derived from the plant *Hypericum Perforatum*. HY is one of the preferred molecules in photodynamic therapy based on activation by light. HY causes cell death by the formation of oxygen-dependent reactive oxygen species (ROS) by photoreaction. HY has a relatively large molecular structure and shows clustering alone, as well as limited uptake and degradation in the physiological environment, which affects the response it will create. For these reasons, it is crucial to make HY water-soluble by using nanoparticles (NP), which are an important part of hydrophobic drug carrier systems. It is aimed that the anti-cancer effect expected to be seen with HY will provide a more specific and longer-term treatment approach by the virtue of NPs.

Chitosan, which forms the polymeric structure of the nanoparticle, is a natural component obtained from chitin, but it stands out because of its biocompatibility, limited cytotoxicity, and easy solubility. It is seen as a potential anti-cancer tool by targeting tumor tissues with cancer drugs. Within the scope of the thesis, the anti-cancer property of A549, lung cancer epithelial cell, was evaluated, by direct HY and loaded with chitosan nanoparticles. The ionic gelation method was preferred for the synthesis of chitosan nanoparticles; its structure has been studied in scanning electron microscopy (SEM). HY concentrations of the determined values (200 nM, 400 nM, 600 nM) were added during synthesis and applied to cells. After 24 hours incubation, cells were exposed to light for 30 minutes at a dose of 6 lux/J cm². Analysis was carried out after 24 hours at the end of the PDT period. Cell viability analysis was measured with MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) agent and the amount of reactive oxygen species formed was evaluated with DCFDA (2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate) while cell death type was specified with AO/PI fluorescent staining. Cellular uptakes of NPs were imaged with FITC (Fluorescein isothiocyanate) fluorescent dye and apoptosis formations with Tumortac kit have been studied. Among all experimental groups, NP groups were seen to increase the uptake of HY as targeted, with more increasing cell death. As a result of MTT analysis, up to 56% decrease in cell viability was observed in the HY-NP 600 nM group within 48 hours, while increasing the HY concentration in nanoparticle groups also increased the decrease in dose-related viability. When cell death type AO/PI was evaluated with fluorescent dyes, necrosis was observed in most cells. Characterization studies of the generated NPs were carried out by SEM analysis. By developing chitosan NPs, it has been suggested that the uptake of the active ingredient in cancer cells can be increased and side effects can be reduced by using herbal ingredients instead of drugs. It is promising for tumor tissues formed in lung cancer.

Keywords: Lung cancer, Hypericin, Chitosan, Nanoparticle, Photodynamic Therapy

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans sürecindeki çalışmam boyunca, vaktini ve özverisini esirgmeden her konuda her zaman desteğini gördüğüm, incelikle çalışmalarımı detaylandıran ve şekillendiren ve öğrencisi olmaktan gurur duyduğum danışman hocam sayın Doç. Dr. Aysun KILIÇ SÜLOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamıza FYL-2019-18365 nolu proje kapsamında destek sağlayan Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine teşekkür ederim.

Araş. Gör. Dr. Elif KARACAOĞLU'na tüm çalışmalarımda gösterdiği ilgi ve sabır için, çekinmeden danışabildiğim hocama en içten teşekkürlerimi sunmak isterim.

Tecrübesiyle çalışmama yol veren ve geliştirilmesinde önemli payı bulunan, değerli vaktini paylaşan değerli hocam Doç. Dr. Eylem GÜVEN ÖZTÜRK'e teşekkürlerimi sunarım. Çalışmamın temeli olan nanopartikül çalışmalarında bilgisi ve tecrübesini sunan değerli hocam Doç. Dr. Müge ANDAÇ ÖZDİL'e ve çalışmama hem teorik hem de pratik desteği sağlayan değerli hocam Araş. Gör. Gülgün AYLAZ'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımın önemli bir kısmını gerçekleştirdiğim Biyokimya Laboratuvarını bana açan değerli hocam Doç. Dr. Işık PERÇİN DEMİRÇELİK'e ve laboratuvardaki çalışmalarım sırasında bana arkadaşlık eden Uzm. Gülsen BAYRAK'a teşekkürü bir borç bilirim.

Değerli hocam Dr. Hayriye Akel BİLGİÇ'e kapısını çaldığımda içtenlikle sorularımı cevapladığı ve zaman ayırdığı için teşekkür ederim. İhtiyacım olduğu anda hiçbir zaman geri çevirmeyen Araş. Gör. Başak Ezgi SARAÇ'a teşekkürlerimi sunarım.

İlgisi ve desteği için değerli hocam Prof. Dr. Zafer AYAŞ'a çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans hayatım boyunca arkadaşlıklarını hissettiğim, desteklerini gördüğüm, her konuda yardımlarını alabildiğim, çalışmalarımın daha keyifli geçmesini sağlayan tüm arkadaşlarıma; Deniz TULUMCUOĞLU, Eda Nur İNKAYA, Merve DEMİR, Mevlahan ÖZKAN, Nilüfer COŞKUN ve Selen SANİN'e en içten teşekkürlerimi sunarım. Sevgilerini ve desteklerini her daim hissettiğim, çalışmam boyunca beni hep motive eden canım annem Ayşe TAŞKONAK ve babam Ali Ferhat TAŞKONAK en içten sevgilerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Kanser.....	2
2.2. Kanserin Nedenleri.....	3
2.3. Akciğer Kanseri	4
2.3.1. Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri	5
2.3.2. A549 Hücre Hattı.....	5
2.4. Kanserin Tedavi Yöntemleri.....	6
2.4.1. Kemoterapi	6
2.4.2. İlaç Tedavisi	7
2.4.3. Radyasyon Tedavisi	7
2.4.4. Hedefli Terapi.....	7
2.4.5. İmmünoterapi	8
2.5. Fotodinamik Terapi (FDT)	8
2.5.1. Işığa Duyarlı Maddeler ve Hiperisin	9
2.5.2. HY'nin Hücreye Etki Mekanizması	13
2.5.3. HY'nin Hücre İçindeki Dağılımı	13
2.5.4. HY ve Reaktif Oksijen Türlerinin Oluşumu	14
2.5.5. HY ile FDT'nin Hücresel Etkileri	14
2.5.6. Kanser Teşhisinde Kullanımı	15
2.5.7. Karanlıkta Hiperisin.....	15

2.6. Kanserde Proteozom İnhibitörleri	16
2.7. Kanser ve Apoptoz	16
2.7.1. Apoptoz ve Kanser Tedavisi	17
2.7.2. FDT İndüklü Apoptoz.....	17
2.8. Kanser Tedavisinde Nanoteknolojik Yaklaşımlar	18
2.8.1. Kanser Tedavisinde Kullanılan İlaç Taşıyıcı Sistemler	19
2.8.2. Polimer Bazlı Nanopartiküller.....	22
2.8.3. Nanopartikül'lerin Hücre ile Etkileşimleri.....	25
2.9. Nanoteknoloji ve Fotodinamik Terapi	26
2.9.1. Nanopartikül Bazlı FDT Sistemleri	26
2.9.2. Nanopartiküller ile Hiperisin kullanımı	27
2.9.3. Fotodinamik Terapi ile Hücre Ölüm Mekanizması	27
2.10. Hücre Canlılık Testleri	28
2.10.1. MTT Analizi.....	28
2.10.2. Tumor Tac ile Apoptoz Tayini	28
2.10.3. AO/PI Boyası ile Hücre Ölüm Tipinin Belirlenmesi.....	28
2.10.4. Oksidatif Stres Tayini	29
2.10.5. LDH Sitotoksisite Testi.....	29
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	30
3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Malzemeler	30
3.2. Işıma Cihazı	30
3.3. Hücre Kültürü	30
3.4. Hücre Hattının Üretilmesi ve Pasajlanması.....	31
3.5. Üreme Eğrisi ve İklenme Zamanının Hesaplanması.....	31
3.6. Mikoplazma Testi.....	31
3.7. Hiperisin'in Çözdürülmesi ve Stoklarının Hazırlanması.....	32
3.8. Nanopartiküllerin Sentezi	33
3.8.1 Hiperisin Yüklü Nanopartiküllerin Sentezi.....	33
3.8.2. Nanopartiküllerin Hücre ile İnkübasyonu	33
3.9. Nanopartikül'lerin Karakterizasyonu	34
3.10. Kitosan Nanopartiküller'in Hücresel Alımı.....	34
3.11. MTT Analizi	34

3.12. TumorTac ile Apoptoz Tayini.....	35
3.13. AO/PI Boyası ile Hücre Ölüm Tipinin Belirlenmesi	35
3.14. Oksidatif Stres Tayini (ROS Ölçümü)	35
3.15. LDH Sitotoksisite Testi	36
3.16. İstatiksel Analiz.....	36
4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA.....	37
4.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Hücre Hattının Pasajlanması	37
4.2 Mikoplazma Tayini	38
4.3. HY Standart Grafiğinin Oluşturulması.....	38
4.4. Nanopartiküllerin SEM ile Morfolojik Analizi.....	39
4.5. Kitosan Nanopartiküller'in Hücresel Alımının Gösterilmesi	40
4.6. MTT Analizi Sonuçları.....	42
4.7. TumorTac Kiti ile Apoptoz Sonuçları.....	46
4.8. AO/PI ile Hücre Ölüm Tipinin Belirlenmesi	51
4.9. Oksidatif Stres Tayini.....	55
4.10. LDH Sitotoksisite Testi	56
5.YORUM	59
6. KAYNAKLAR	62
EK 1 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu	
ÖZGEÇMİŞ.....	Error! Bookmark not defined.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>Hypericum perforatum</i> (Sarı kantaron) bitkisi.....	10
Şekil 2.2. HY'nin kimyasal yapısı.....	11
Şekil 2.3. Apoptoz oluşumuna giden yolda FDT aktivasyonu sonucu görülen biyomarkerler [38]	17
Şekil 2.4. Kitin'in deasetilasyon aşaması sonucu kitosan'a dönüşümü ile değişen moleküler yapının açık formülünün gösterilmesi.....	22
Şekil 2.5. İlaç bağlı polimer bazlı NP'lerin şematik gösterimi [59].....	24
Şekil 2.6. Nanopartiküllerin hücreye giriş mekanizmaları ile hücre içerisinde izlediği yolların gösterilmesi [22].....	25
Şekil 3.1. Deney planının gösterimi.....	31
Şekil 4.1. A549 hücrelerine ait inverted mikroskop görüntüsü.....	36
Şekil 4.2. A549 hücrelerinde DAPI boyamasının inverted mikroskop görüntüsü.....	37
Şekil 4.3. HY'nin 10 µM, 25 µM, 50 µM, 75 µM ve 100 µM konsantrasyonlarında hazırlanan HY'nin standart grafiği.....	38
Şekil 4.4. SEM görüntüleri. A: Boş NP, B: HY- NP.....	38
Şekil 4.5. FITC-Kİ-NP'lere ait floresan ataşmanlı inverted mikroskop görüntüleri. A: Kontrol, B: HY-NP 200 nM, C: HY-NP 400 nM, D: HY-NP 600 nM grupları.....	40
Şekil. 4.6. A549 hücrelerinin inverted mikroskop görüntüsü. A: HY 200 nM, B: HY-NP 200 nM, C: HY 400 nM, D: HY-NP 400 nM, E: HY 600 nM, F: HY-NP 600 nM.....	42
Şekil 4.7. A549 hücrelerinde MTT testinin hücre canlılık analizi sonuçları. a: Kontrole göre, b: HY-200 nM'ye göre, c: HY-NP 200 nM'ye, d: HY-NP 600 nM'ye göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($P \leq 0,05$).	43
Şekil 4.8. A549 hücresi kontrol grubu, ışık mikroskop görüntüsü. Büyütme: X10. Sağlıklı hücrelerin çekirdekleri metil green sayesinde yeşil görünmektedir.....	46

Şekil 4.9. A549 hücrelerinin pozitif kontrol grubu, ışık mikroskop görüntüsü. Büyütme: X10, Kitin içeriğinde bulunan nükleaz enzimi ile bütün hücrelerde apoptozun gösterilmesi.....	46
Şekil 4.10. HY 200nM grubu, ışık mikroskop görüntüsü. Büyütme:X10. Apoptotik hücreler (kırmızı ok) görülmektedir.....	47
Şekil 4.11. HY 400 nM grubu, ışık mikroskop görüntüsü. Büyütme: X10. Apoptotik hücreler (kırmızı ok) görülmektedir.....	47
Şekil 4.12. HY 600 nM grubu, ışık mikroskop görüntüsü. Büyütme:X10. Apoptotik hücreler (kırmızı ok) görülmektedir.....	48
Şekil 4.13. HY-NP 200 nM grubu, ışık mikroskop görüntüsü. Büyütme:X10. Apoptotik hücreler (kırmızı ok) görülmektedir.....	48
Şekil 4.14. HY-NP 400 nM grubu, ışık mikroskop görüntüsü. Büyütme:X10. Apoptotik hücreler (kırmızı ok) ile görülmektedir.....	49
Şekil 4.15. HY-NP 600 nM grubu, ışık mikroskop görüntüsü. Büyütme:X10. Apoptotik hücreler (kırmızı ok) ile görülmektedir.....	49
Şekil 4.16. AO/PI boyamasına göre oluşan hücre ölüm şekillerinin yüzde oranları.....	51
Şekil 4.17. AO/PI boyaması yapılan hücrelerin inverted mikroskop görüntüleri. A: Kontrol grubu, B: H ₂ O ₂ (pozitif kontrol grubu), C: HY 200 nM grubu, D: HY 400 nM grubu, E: HY 600 nM grubu, F: Boş NP grubu, G: HY-NP 200 nM grubu, H: HY-NP 400 nM grubu, I: HY-NP 600 nM grubu. Nekrotik (kırmızı ok) ve apoptotik (beyaz ok) hücreler görülmektedir.....	53
Şekil 4.18. ROS analiz sonuçları. a: Kontrole göre istatistiksel farklıdır ($p \leq 0,0002$), b: HY-NP 600 nM'e göre anlamlı farklılık, c: HY-200'den anlamlı farklılık, e: HY-400'den anlamlı farklılık, f: HY-NP 200'den anlamlı farklılık.....	55
Şekil 4.19. A549 hücrelerinin 24 ve 48 saatlik LDH sitotoksosite sonuçları. a: Kontrole grubuna göre anlamlı farklılık ($p \leq 0,05$).....	56

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizege 2.1. A549 Akciğer kanseri hücre hattının temel özellikleri.....	5
Çizelge 3 1. Deney Gruplarının Gösterilmesi.....	33
Çizelge 4. 1. Deney gruplarının nekroz, sekonder nekroz ve apoptoz oranları.....	52

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

Rpm	Dakikadaki devir sayısı
nm	Nanometre
nM	Nanomolar
cm ²	Santimetre kare
°C	Derece santrigat
µM	Mikromolar

Kısaltmalar

A549	İnsan alveoler karsinoma epitel hücre hattı
AO/PI	Akridin oranj/Propidium iyodür
DCFH-DA	2',7'-dikloroflorosein diasetat
DNA	Deoksiribonükleik asit
DMSO	Dimetil Sülfoksit
FBS	Fötal Bovin Serum
FDT	Fotodinamik terapi
FITC	Fluorescein isothiocyante
IDM	Işığa duyarlı madde
LDH	Laktat Dehidrogenaz Enzimi
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolyum bromit
PBS	Fosfat tampon çözeltisi
ROS	Reaktif oksijen türleri
RPMI	Roswell's Park Memorial Institute
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TPP	Sodyum tripolifosfat

1. GİRİŞ

Kanser günümüzde halen en sık rastlanan hastalıklardan biridir. Kullanılan tedavi yöntemlerinin dışında alternatif tedaviler araştırılmaktadır. Günümüzün alternatif kanser tedavi yöntemlerinden biri olan fotodinamik terapi (FDT), doğal bileşenlerin ışık ile aktifleşmesi sonucu radikaller oluşturması ve bu radikallerin hücre içi toksisite nedeniyle ölüme sebep olması yoluyla etki göstermektedir. Bu terapide ışığa duyarlı maddeler kullanılır ve bu maddelerden biri *Hypericum perforatum* bitkisinden elde edilen Hiperisin'dir (HY). HY aracılı uygulanan FDT ile kanser hücrelerinde sitotoksikite, antiproliferatif ve antitümör etkilerin olduğu bilinmektedir. HY'nin sulu ortam içerisinde kümelenmesi, suda çözünübilirliğinin ve seçiciliğinin zayıf olması sebepleriyle nanopartikül gibi taşıyıcı sistemlerle birlikte kullanılması son yıllarda tercih edilmektedir.

Nanoteknoloji maddenin atomik ve moleküler düzeyde kontrolünü sağlayan bir bilim dalıdır. Nanoteknoloji ve nanomateryallerin gelişimi biyolojik sistemlerde taşıyıcı olarak kullanımlarının önünü açmıştır. Biyolojik nano boyutlu yapıların önemli bir parçası olan nanopartiküller (NP) ise ilaç salım sistemlerinde en çok tercih edilen materyallerden biridir. Çok fonksiyonlu nano salım sistemlerinin ilerlemesiyle, eş zamanlı görüntüleme ve terapi yöntemleri geliştirilerek kanser erken aşamada teşhis edilebilmekte ve tedavi sürecine katkı sağlanabilmektedir.

Tez çalışmasında HY ile yüklenen NP'ler hazırlanarak A549 akciğer kanseri hücre hattında HY'nin hücre alımının sitotoksik etkisindeki değişiklik araştırılmıştır. Hücreler HY içeren NP'ler ile muamele edilmiş ve FDT uygulanmıştır. NP'lerin karakterizasyon işlemlerinin yapılmasından sonra hücre analizleri gerçekleştirilmiştir. MTT analizi ile hücre canlılığı değerlendirilerek uygun HY konsantrasyonları belirlenmiştir. Hücredeki HY'ye bağlı oluşan reaktif oksijen türlerinin miktarları ölçülmüş ve apoptoz tayini yapılmıştır. Hücre alım Fluorescein-5-isothiocyanate (FITC) ile işaretlenen NP'lerin floresan ışınması sayesinde inverted mikroskopta görüntülenmiştir. HY'nin NP'ler ile birlikte hücrelere uygulandığında HY'nin alımının artırılarak direnç mekanizmasının aşılabileceği, düşük dozlarda dahi anti-kanser etkinin görülebildiği, doğal bileşenler içeren potansiyel tedavi aracı sunulmuştur.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, hücrelerdeki büyümeyi düzenleyen genlerde benzersiz mutasyonlara sahip olan ve bu sebepten dolayı kontrolsüz çoğalarak metastaz yapan hücrelerin neden olduğu, genetik bir hastalıktır. Hücrenin kansere dönüşmesine sebep olan genetik mutasyonların başında tümör baskılayıcı ve proto-onkogenlerdeki mutasyonlar bulunmaktadır. Tümör baskılayıcı genler hücre bölünmesinin gerektiği yerde durdurulmasını sağlarken, proto-onkogenlerin onkogen haline gelmesiyle hücrede sürekli bölünme sinyali oluşmaktadır. Kanseri hücreleri, bölünme ve büyüme kapasiteleri sayesinde normal hücrelerle oksijen, glukoz ve amino asitler için başarılı bir şekilde yarışır ve normal hücrelere kıyasla daha fazla enerji tüketirler. Besin maddelerini daha fazla alabilmek için yeni damarlar oluştururlar [1].

Kanser hücreleri ile yapılan çalışmalar günümüzdeki en fazla önem arz eden ve en sık çalışılan alanların başında gelmektedir. Bunun sebebi oluşan vaka sayısının yüksek olmasıdır. 2018 yılında 9,6 milyon ile kanser, dünya çapında en fazla ölüme sebebiyet veren ikinci hastalıktır. 2025 yılına kadar ise 19,3 milyon yeni vakanın oluşacağı tahmin edilmektedir [1].

Kanser hematolojik kanser (kan hücreleri) ve katı tümör kanseri (organlar ve dokular) olmak üzere 2 ana grupta sınıflandırılmaktadır. Hücre türüne göre ise karsinom, sarkom, miyelom, lösemi, lenfoma ve karışık tipler olacak şekilde 6 ara başlıkta bulunurlar. Kanseri tiplerinin %85'i epitelial hücrelerden oluşur ve karsinoma olarak gruplandırılır. Mezoderm hücrelerinden oluşan kanserler sarkoma, bez dokusundan gelişenlere ise adenokarsinoma denmektedir. Farklı kökenlerden gelişen kanserler farklı özelliklere sahiptirler [2]. Bunun yanı sıra kanserin oluşumunu gösteren belirtiler 6 madde ile sıralanabilmektedir;

1. Anjiyogenez
2. İnvazyon ve metastaz
3. Sınırsız replikasyon potansiyeli
4. Apoptozdan kaçma
5. Büyüme inhibitör sinyallerinden kaçma

6. Büyüme sinyali otonomisi

Günümüzdeki kanser tedavileri için ameliyat, radyoterapi, kemoterapi, hormon terapisi ve immünoterapi gibi seçenekler bulunmaktadır. En sık yararlanılan tedavi yöntemi olan kemoterapide, kullanılan ilaçların kanser hücrelerini özgül olarak hedefleyememesi nedeniyle tedavinin büyük kısmı sağlanamamaktadır. Tedavi yöntemleri geliştirilirken yeni bir ilaç geliştirmek yerine, var olan ilaçlarda maksimum hedeflemeyi sağlamaya çalışılmaktadır. Bunun için hücreye hedeflendirilen ilaçlar çalışmaların merkezinde bulunmaktadır. Hücreye alınan ilaç, organellere kadar yönlendirilebilmektedir [2].

2.2. Kanserin Nedenleri

Başlıca kanser nedenleri arasında, sigara ve alkol kullanımı, uzun süre güneş altında kalma, kanserojen kimyasal maddeler, radyasyon, kötü beslenme ve genetik faktörler (mutasyonlar) bulunmaktadır. Gen mutasyonlarının yanı sıra, gen ifadelerindeki değişimler de kanser gibi hastalıklara sebebiyet verebilmektedir. Çevresel faktörlere karşın gelişen histon modifikasyonu ve DNA metilasyonu gibi değişimler hücrelerin kansere dönüşmesine neden olmaktadır.

Kanser hücrelerinin özellikleri:

- Sınırsız çoğalabilirler; sahip oldukları mutasyonlar ile replikatif yaşlanmadan kaçınırlar, telomeraz aktiviteleri azalmak yerine arttırırlar.
- Büyüme sinyallerine gereksinim duymazlar; kontakt inhibisyona sahip değildirler.
- Büyümeyi engelleyici sinyallere ve apoptoza direnç gösterirler; denetim mekanizmalarının bozuk olmasından ötürü hücre hasara rağmen ölüm yoluna gitmezler.
- Mikroçevrelerini kendileri düzenleyebilirler; yeni damar oluşturarak ekstra beslenmelerini sağlarlarken, matriks proteinlerinin bağlantılarını değiştirirler.
- Genetik açıdan kararsızdırlar; bölünmelerinin hızlı olmasından ötürü mutasyonlar onarılmadan sürekli artmaya devam ederler.
- Metabolik özellikleri farklılaşmıştır; hem aerobik hem de anaerobik koşulda glikoliz yaparlar. Glikoliz sonucu daha az oluşan enerji için çevreden de glukoz alırlar. Ayrıca normal hücrelere göre daha fazla laktat üretirler.

•Kanser hücreleri yüksek miktarda şaperon üretirler; şaperonlar sayesinde ile protein kinazların ve hücre büyümesinde rol alan transkripsiyon faktörlerinin kararlı hale getirebilir ve p53 aracılığıyla hücre döngüsünün kontrolünün sağlayabilirler [3].

2.3. Akciğer Kanseri

20.yy'ın başlarında akciğer kanseri bilinmeyen kanserlerden biriyken, son zamanlarda hızlı oranlarda artış göstererek dünyadaki en yaygın kanser türüne dönüşmüştür. 2000 yılında, dünya çapında 1 milyondan fazla insan akciğer kanseri nedeniyle hayatını kaybetmiştir. 5 yıllık sağ kalım süresinin oranı sadece % 5'te kalmaktadır [4]. Avrupa'da 2015'te görülen ölüm sayısı erkekler için 164,743'ü bulurken, kadınlarda 72,145'i bulmuştur. 2021'e kadar beklenen ölüm sayısı ise erkeklerde 164,600, kadınlarda ise 83,500 olarak tahmin edilmektedir [5]. Ülkemizde ise, 100.000'de 15.78'lik bir oranla görülme sıklığı ile kanser türlerinin başında gelir [6].

Akciğer kanserinde belli risk faktörleri bulunmaktadır. Tütün kullanımı başta gelirken, asbest, hava kirliliği, akciğer hastalıkları, kalıtım ve gen mutasyonlarının da etkileri vardır. Yüzde olarak tütün kullanımına bağlı gelişen kanser ölümleri %22'yi bulurken, virüs gibi enfeksiyonlara bağlı ölümler %25'i bulmaktadır. Bunun yanı sıra selenyum eksikliği, antioksidan etkisinden dolayı kansere yol açmada büyük role sahiptir [5].

Akciğer kanserinin gelişimi, bazı mutasyonların art arda oluşması ile ortaya çıksa da genetik mekanizmaların çoğu halen bilinmemektedir. Bu anormallikler anjiyogenik faktörlerin ifadesinde, proteozom regülasyonundaki apoptozda ve tirozin kinaz reseptörlerinde görülebilmektedir [7]. Dört evresi bulunan akciğer kanserinin yayılma evreleri aşağıdaki gibi sıralanabilmektedir;

1.Evre: tümörün tek bir akciğerde bulunduğu, lenf bezlerinde görülmediği evredir.

2.Evre: tümörün bulunduğu lenf bezlerinde de yayılmanın başladığı evredir.

3.Evre: 2 farklı tipi bulunan 3. Evre, IIIa ve IIIb olarak ayrılmaktadır. IIIa'da kanser, tümörün bulunduğu akciğerle aynı taraftaki lenf bezlerine yayılmıştır. IIIb'de ise kanser her iki taraftaki lenf bezlerine de yayılmıştır.

4.Evre: kanserin metastaz yaparak vücudun diğer kısımlarına yayıldığı evredir.

Akciğer kanserinde iki farklı hücre tipi görülürken, bu kanserli hücrelerin dörtte üçü küçük olmayan hücre kökenlidir. Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ise kendi içinde 4'e ayrılmaktadırlar;

- Adenokanser:** hücrede başlayarak alveole uzanan ve mukus benzeri madde yapan kanser formudur. Sigara içenlerin arasında en sık görünen tipidir.
- Skuamöz hücreli kanser:** ince ve düz yapıda olan akciğerin içinde bulunan kanser formudur.
- Büyük hücreli kanser;** hızlı büyümesi ve yayılmasından ötürü tedavi edilmesi zor olan kanser türüdür.
- Karma tip kanser;** diğer farklı tipteki kanser türlerinin bulunduğu gruptur.

2.3.1. Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri

Görülen vakaların %85'i bu gruptan oluşmaktadır. Genellikle, iki güçlü anti-kanser ilacının birlikte verilmesi ile tedavi uygulanmaktadır. Cerrahi tedaviden kaçınılmaya çalışılmaktadır çünkü birçok hastada tespit edilememiş hastalıklar görülebilmektedir. Bu sebeple kişiselleştirilmiş veya hedeflendirilmiş tedaviler daha büyük önem arz etmektedir.

Küçük Hücreli Akciğer Kanseri ise görünür birincil tümör oluşumu olmadan metastaz yapabilen, hızlı büyüyen tümör tipidir. Tümör yumuşak, beyaz bir görünüm oluştururken çok sayıda nekroz sergilemektedir [7].

2.3.2. A549 Hücre Hattı

A549 hücre hattı hipotriploid alveolar bazal hücre hattıdır. İlk olarak DJ Guard ve ark. tarafından 1972'de, Kafkas 58 yaşındaki bir erkeğe ait tümörün pulmoner karsinom dokusunun ayrıştırılması ile kültüre edilmiştir. Lesitini sentezleyebilen hücre hattı aynı zamanda yüksek miktarda doymamış yağ asitleri içerir. Hücre ikilenme zamanı 22 saattir. Adenovirüs üretimi, hastalık modellemesi, ilaç geliştirme, enzimatik çalışmalarda tercih edilmektedir. A549 hücresinin temel bilgileri aşağıdaki tabloda gösterilmiştir;

Çizelge 2.1. A549 Akciğer kanseri hücre hattının temel özellikleri.

Elde edildiği organizma	İnsan
Alınan doku	Akciğer
Cinsiyet/yaş/ırk	Erkek/58/Kafkas
Hücre tipi	Epitel
Hastalık	Karsinoma
Hücre özelliği	Adherent

2.4. Kanserin Tedavi Yöntemleri

Son yıllarda kullanılmakta olan birçok tedavi yöntemi bulunmaktadır. Buna rağmen mümkün olduğu durumlarda tedavi için cerrahi işlem halen en tutarlı ve başarılı yöntem olarak kalmayı sürdürmektedir [8]. Birinci ve ikinci evreye sahip hastalarda ameliyat tercih edilse de üçüncü ve dördüncü seviyede ameliyat tercih edilmemektedir. Kemoterapi ise özellikle akciğer kanserinde sıklıkla tercih edilen ikinci seçenek olarak dikkat çekmektedir.

2.4.1. Kemoterapi

Hastaların yaklaşık olarak %70'i kanserin ileri seviyesinde ve metastaz aşamasında olduğu için kemoterapi ilk başvurulmuş yöntemdir. Geleneksel kemoterapötik ajanların kullanımında doruk noktasına ulaşıldığı için potansiyel terapötik arayışlara başlanmıştır. Kanser biyolojisinin anlaşılmasına başlanması ile EGFR (Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü), sinyal iletimi ve anjiyogenez gibi farklı mekanizmalar hedef haline gelmektedir [8].

Akciğer kanseri, geç teşhis edilebilme ve yüksek yayılma riskine rağmen kemoterapiye karşı oldukça duyarlıdır [4]. Kemoterapi metastatik hastalıklar için faydalıyken, akciğer kanserinin üçüncü evresinde radyasyon ile eşzamanlı yönlendirilmektedir. Fakat normal doku toksisitesi, kemoterapi ile radyasyon birlikte verildiği zaman önemli seviyeye gelmektedir.

Üç farklı tip kemoterapi uygulaması bulunmaktadır. İlki olan adjuvan kemoterapisi, nüks riskini düşürmek için kullanılmaktadır. Neoadjuvan tedavide lokal ileri hastalıkta kullanılmaktadır. Palyatif kemoterapi ise ileri evreye sahip hastaların yaşam süresini uzatmak ve yaşam kalitesini arttırmak için kullanılmaktadır [9].

Kemoterapide kullanılan ilaçlara karşı gelişen direnç en büyük engeli oluşturmaktadır. İlaç direnci ile ilişkili olan ve dikkat çeken tedavilerden biride Platinum bazlı tedavidir. Platinum bazlı ilaç tedavisi, iki sitotoksik etkiye sahip ilacın birlikte kullanılarak etkili sonuç vermesinden dolayı küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde standart tedavi olarak uygulanmaktadır. Platinum bazlı kemoterapiye direnç oluşturan diğer bir mekanizmada DNA onarımıdır. DNA onarımı daha az olan tümör hücrelerinin tedaviye daha olumlu sonuç verdiği düşünülmektedir [8].

2.4.2. İlaç Tedavisi

Yıllardır geliştirilen ve terapötik etkisi kanıtlanmış birçok kanser ilacı bulunmaktadır. Bazı durumlarda, diğer hastalıkların tedavisinde kullanılan ilaçlar kanser tedavisinde iyi sonuçlar verebilmektedir. Bunun örneği olarak insülin direnci için kullanılan Metformin ilacı, tip-2 diyabet hastaları için geliştirilmiş olsa da kanser için de etkili olduğu anlaşılmıştır [10].

Sıklıkla karşılaşılan ilaç direnci, kemoterapinin başarısız olmasına sebebiyet vermektedir. Farmakogenetik çalışmalar çeşitli ilaç metabolizmalarından sorumlu olan çoklu gen varyasyonlarını esas almaya başlamıştır [8].

2.4.3. Radyasyon Tedavisi

Radyasyon tedavisinde, görüntüleme yöntemlerinin gelişmesiyle oldukça ilerleme kaydedilmiştir. Bu ilerlemeler ile tümör hedeflemesinin doğruluğunu iyileştirmesi ve tedaviye bağlı yan etkileri en aza indirilmesi beklenmektedir. Cerrahiden sonra uygulanan radyoterapi, tamamen alınamayan veya lenf bezlerinde rastlanan kanser için kullanılır. Günümüz kanser tedavilerinde farklı radyasyon terapileri kullanılmaktadır. İyonlaştırıcı radyasyon, ileriki aşamada olan kanser için bilinen tedavilerden biri iken, iyonlaşabilen atomların enerjisinin kullanıldığı elektromanyetik bir radyasyon türüdür ve DNA kırıklarına sebep olmaktadır [9].

Erken evre kanser tedavisinde, avantajlarından dolayı Stereotaktik vücut radyoterapisi (SBRT) olarak adlandırılan özel bir radyoterapi tedavisi de tercih edilmektedir. Yeri tam belirlenemeyen küçük tümörler için kullanılabilir [9].

2.4.4. Hedefli Terapi

Tümör hücrelerinin genetik ve moleküler özelliklerinin öğrenilerek kişiye özgü tedavi sunulması hedefli terapi olarak adlandırılmaktadır. Tümörün DNA'sından yapılan analizler ile kanserli hücredeki mutasyonlar teşhis edilebilir. Bu mutasyonlardan bazıları epidermal büyüme faktör reseptörü mutasyonu, ALK (Anaplastik Lenfoma Kinaz) yolu mutasyonu, ROS1 gen mutasyonu şeklindedir. Henüz yeni bir tedavi yöntemi olan bu alana her gün yeni ajanlar eklenmektedir. ALK, akciğer kanser hücresinin yüzey reseptörlerinden biri olup, genin bir kısmının başka gen ile birleşerek oluşması ile ortaya çıkan mutasyondur.

Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hastalarının çoğunda epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) aşırı ifade edilmektedir ve bu durum teşhisi zorlaştırmaktadır. Bu

sebepten dolayı EGFR inhibitörleri geliştirilmektedir. Bunun yanı sıra vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörleri de hedeflendirilerek kemoterapi ile birlikte uygulanmaya çalışılmaktadır [11].

Moleküler profillemeye küçük olmayan kanser hücresi için tedaviyi yönlendirebilmektedir. Mikrodizilim teknolojileri aynı anda çok sayıdaki gen ekspresyonunu profilleyerek kanserin heterojenliğini küresel çapta gösterebilmektedir [11].

2.4.5. İmmünoterapi

İmmünoterapi, vücudun kendi bağışıklık sisteminin uyarılması veya baskılanması yoluyla yönetilen bir tedavi türüdür. Birçok tümör immün sistemden kaçabilmektedir. Bunlardan bazıları, kanser hücrelerinde immün baskılayıcı sitokinlerin seviyesinin artması, T-hücresi aktivasyonu için gerekli uyarıcı moleküllerin eksikliği ve tümör antijenlerinin miktarının aşırı artması olarak sıralanabilmektedir. Hastalardan alınan örneklerden görüldüğü üzere tümör hücrelerine karşı antikor ve hücre bazlı immün cevap oluşabilmektedir. Fakat bazı hastalarda ise zayıf bağışıklık sistemi bulunmaktadır [12].

İmmün sistemin daha fazla anlaşılabilir hale gelmesiyle immün terapi kanser hücrelerine karşı kullanılmaya başlanmıştır. Monoklonal antikorlar, immün kontrol noktası immünoterapiler ve kanser aşılı immünoterapi çeşitlerini oluşturmaktadır. Monoklonal antikorlar daha önce tanınamayan kanser hücrelerinin bulunmasını sağlarken, immün kontrol noktası immünoterapiler dendritik hücreleri ile T hücrelerinin aktifleştirilmesini sağlayarak görev alırlar [12].

2.5. Fotodinamik Terapi (FDT)

Fotodinamik Terapi'nin (FDT) ortaya çıkması 1901 yılına kadar uzanmaktadır. Oscar Raab isimli araştırmacının, Akridin isimli boya ile Paramecium hücrelerini incelemek için boyadığında, belli bir süre sonunda ışık alan hücreler ölürken, diğerlerinin canlılığının korunduğunun fark edilmesi üzerine FDT ile ilgili olarak ilk fikir ortaya çıkmıştır. Işık alan hücrelerde kullanılan maddenin, ışık sayesinde toksisite yarattığı görülmüştür. 1970'lerde, FDT'nin kanser tedavisinde de kullanılabileceği öne sürülmüş ve 1995 yılında FDA (Food and Drug Administration) tarafından bazı boyaların tedavide kullanılabileceğine izin verilmiştir [13].

FDT, kemoterapi ve radyoterapinin yaptığı yan etkileri, lokalize terapi sağlayan karşı etkili bir yöntem olarak ön plana çıkarmaktadır. Hedef bölgeye, Işığa Duyarlı Madde'leri (IDM)

kullanarak belli dalga boyundaki termal ışığın verilmesi, tümörde seçici hasara neden olmakta ve radyoterapinin sadece DNA'da hasar oluşturmasının aksine, bu maddeler hücrenin diğer kısımlarını da etkileyebilmektedir. İlave olarak, ilaç ve radyasyon, dirençli tümörü de öldürebilmektedir [14]. Bu terapi yönteminin kullanılması normal hücrelerde hasara yol açmadan etkisini gösterdiği için yan etkileri engelleyerek hedefleyici bir yöntem sunmaktadır. Bu sebeple *in vitro* ve *in vivo* kullanımı arttırılmak istenmektedir.

FDT iki adımlı bir süreçtir. Fotonların absorbe edilmesinden sonra IDM, en düşük enerji seviyesinden üçüncü enerji seviyesine çıkmaktadır. Üçüncü seviye 3 farklı yol ile reaksiyon gösterebilir; birinci yolda (Tip I reaksiyonu) oksijen ile elektron ve hidrojen atom transfer reaksiyonları gerçekleşir; ikinci yolda (Tip II reaksiyonu) enerjisini oksijenin en düşük enerjisine aktarmaktadır; üçüncü yolda ise oksijen rol oynamazken, IDM'nin substrat ile etkileşimde olduğu bir reaksiyon oluşmaktadır [15].

FDT'nin klinik uygulamasında IDM hastanın tümör bölgesine enjekte edildikten sonra, IDM'nin vücuttan atılıp, tümör bölgesinde birikmesi için belli bir süre beklenir. Avantajlarından biri de, tedavinin immün sistemini harekete geçirmesidir. Işık uygulamasının da tropik olarak uygulanmasıyla hücre içerisinde reaksiyonlar indüklenmiş olur. FDT tarafından tümör dokusunda hasar oluşmasıyla, debris temizlenir ve homeostazis sağlanır. Lipid membranındaki hasar ise bağışıklık sitokinlerinin (IL6, IL-1 β , TNF α) ekspresyonunu arttırır ve hücreden tümöre karşı işlemler başlar [16].

FDT'nin hastalara uygulama şekli IDM'nin enjekte edilmesi ve dolaşıma karışması şeklindedir. Sadece kanser bulunan bölgeye ışık uygulaması yapılmaktadır. Klinik olarak kullanıldığında tedavi edilen bölgeye kan akışı damar hasarına sebebiyet verir. FDT'nin IDM maddeleri dışında hastalara boya enjekte edilerek kullanıldığı da bilinmektedir. Boyalar ışığın enerjisini oksijene aktararak yükseltgeyebilirler. Bu uygulamada dikkat edilmesi gereken noktalardan birisi de, ışık rengi ile boyanın renginin birbirine uyumlu olmasıdır [13].

2.5.1. Işığa Duyarlı Maddeler ve Hiperisin

Işığa duyarlı maddeler (IDM) özellikle tümörler tarafından alınabilen floresan bileşenlerdir. Bu sebeple, kanser teşhisinde floresan tekniklerin kullanımıyla biyomarker görevi oluşturulabilmektedirler. Optik teşhisler, literatürde fotodinamik teşhisler şeklinde söz edilmektedir. Kanserde fotodinamik teşhisin kullanımı klinikte de yaygındır [17].

IDM'lerin seçici olarak tümör hücreleri tarafından alınma nedenleri bulunmaktadır. Bu nedenler; tümörlü bölgede dokular arası sıvı hacminin daha fazla olması, daha fazla miktarda makrofaj içermesi, hücre dışı pH'ın daha düşük olması, lipoproteinler için daha fazla sayıda reseptör içermesi, mikro damar ağının daha geniş olması ve daha fazla matriks proteinleri içermesi olarak sıralanabilmektedir [18].

Işığa duyarlı maddeler, FDT'de kullanılmak üzere moleküler kontrast ajanı olarak kullanılma potansiyeline sahiptirler. Optik görüntüleme sayesinde kanserde teşhis yapılabilir [17]. Aktivasyon için görünebilir ışığın kullanımı ikinci bir malignansinin oluşma riskini de engellemekle beraber, UV ışığının kullanıldığı başka FDT'lere de sıklıkla karşılaşılmaktadır [1].

Birçok IDM, lifofilik olduğundan, parenteral uygulamalarda zorluklarla karşılaşılmakta ve sistemik uygulamaları sonucunda ışığa hassasiyet gösterebilmektedir. Kısıtlamaların önüne geçebilmek için IDM'ler, suda çözünebilir polimerlere veya nanopartiküllere kapsülendirilebilirler. Hidrofobik özelliklerinden kaynaklanan sorunlar bu şekilde çözülebilmektedir.

FDT'de birçok IDM kullanılmaktadır. Bunlardan biri olan Hiperisin, *Hypericum Perfaratum L.* (St. John's wort) cinsine ait bitki türlerinde bulunan 400 maddeden biridir (Şekil 2.1.). Uzun bir ömre sahip olan ve ülkemizde de yaygın olarak kullanılan bitki, sarı kantaron adıyla bilinmektedir. 2000 yılı aşkın süredir tıpta kullanıldığından dolayı bitkisel ilaç olarak geçmektedir. Medikal özelliklerinden dolayı antik yunan zamanından beri kullanılmaktadır. Hiperisin, (HY) bitkinin çiçek ve yapraklarında kuru ağırlığının % 0.03'ü ile % 0.3'ü arasındaki oranlarda bulunmaktadır [20]. HY konsantrasyonu, bitkiye, bitkinin büyüdüğü yere ve ekstrakte edildiği yere göre değişmekle birlikte tüm bitkide bulunduğu oran %0.46'a kadar ulaşabilmektedir. HY ticari olarak alınabilirken, kimyasal olarak da sentezlenebilir [19].

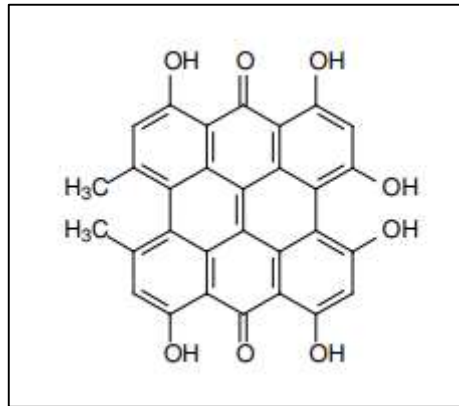


Şekil 2.1. Hypericum perforatum (Sarı kantaron) bitkisi

Hiperisin'in kimyasal özellikleri aşağıda maddeler halinde sıralanmıştır;

- **Renk:** Koyu mor
- **Erime Noktası:** >320 °C (methanol)
- **Çözünürlük:** Metanol, aseton, piridin ve dimetil sülfoksit'te çözdürebilmektedir.
- **CAS ismi:** 1,3,4,6,8,13-Hexahydroxy-10,11-dimethyl-phenanthro-[1,10,9,8-opqra]-perylene-7,14-dione
- **Molar Kütle:** 504,44 g/mol
- **Kapalı Formülü:** C₃₀H₁₆O₈
- **Maximum Absorbans:** DMSO'daki HY, maksimum spektrumunu 545 nm'de verirken kırmızı-turuncu floresan emisyon spektrumu maksimum 594 ve 640 nm'de vermektedir [21].

HY'nin moleküler formülü Şekil 2.2'deki gibidir;



Şekil 2.2. HY'nin kimyasal yapısı.

Hiperisin'in özellikleri aşağıdaki gibi sıralanabilir;

- **Anti-kanser;** kanser hücrelerinde fototoksisite oluşturmanın yanısıra serbest radikaller üretebilmekte ve tümör dokusunda birikim yapabilmesi sayesinde antikanser özellik kazanmaktadır.
- **Anti-depresan;** bu etkisini seratonin, nöroepinefrin, dopamin, GABA ve L-glutamat gibi uyarıcıların alınımını engelleyerek gösterdiği düşünülmektedir (pherma).
- **Anti-viral;** HY, DNA ve RNA virüslerinin aktivasyonlarının yok edilmesi için de kullanılabilir. Bu virüsler arasında HIV(insan immün yetmezliği virüsü), Hepatit C ve herpes simpleks virüsü de bulunmaktadır.
- HY'nin fotoaktivasyonu virüs ve bakterilerde foto-oksidasyona sebep olarak ölümüne sebep olmaktadır [22].
- **Anti-bakteriyel;** farklı suşlar ile yapılan çalışmalarda etkili olduğu görülmektedir.
- **Antineoplastik;** kanser hücrelerinde apoptoz, nekroz ve otofaji indüklemektedir
- **Yara iyileştirici;** yara iyileşmesinde ve T hücre aracılı hastalıkların tedavisinde bir potansiyele sahip olduğu bilinmektedir. Fibroblast göçünü hızlandırdığı, kollajen depolanmasını arttırdığı, daha iyi epitelizasyona neden olduğu kanıtlanmaktadır [20].

Eski zamanlardan beri kullanılmakta olan HY'nin birçok özelliği bulunurken, sıklıkla ışık ile ortaya çıkan özelliklerinden dolayı da kullanılmaktadır. Işık ile aktive olabilen HY, fototoksiktir ve oksidan hızlandırıcı ajan olarak davranabilmektedir. HY'nin fototoksisitesi oksijen bağımlıdır, hipoksik koşullar altında bu etkiler görülememektedir. Işık uygulandığı zaman, ilk olarak hücrede mitokondriyel hasar oluşur ve mitokondrinin iç zar geçirgenliği artmaktadır [19]. Hücrede iritasyon olmadan toksisiteyi indüklemektedir ve 2 mg kadar günlük olarak alınabilmektedir [23]. Yüksek dozlarda ise kan basıncının izlenmesi gerektiği bildirilmiştir [19].

HY tümör hücrelerine de birçok şekilde hasar verir. Kanser hücrelerinde hücre ölümünü indükleyen anti-anjiyogenik özelliği bulunmaktadır. HY, tümör hücrelerince alındıktan sonra hidrofobik bileşen olmasından ötürü organellerin zarlarında birikebilmektedir. Dokuda birikmesi ise kanser hücrelerinin diğer hücrelerden ayrılmasını sağlayarak tedaviyi kolaylaştırmaktadır. Anti-proliferatif etkisiyle anti-tümör etkisine katkı olmaktadır [24].

HY ile yapılan ilk *in vivo* çalışmaları, 1990'da Nevada Üniversitesi'nde Thomas ve arkadaşları tarafından farelerden alınan meme kanseri hücreleri ile gerçekleştirilmiştir. Lazer ışınlarıyla tümör bölgesinde hasar oluşturmayı başarmışlardır [25]. HY, lipofilik molekül olmasından dolayı, kanda dolaşırken lipoproteinlere bağlanmaktadır. Vücut içerisinde taşıyıcı olarak kullandığı molekül ise serum albümindir.

2.5.2. HY'nin Hücreye Etki Mekanizması

Protein kinaz C'yi, telomerazı ve ters transkriptazı inhibe eder. Ayrıca zar lipidlerinin peroksidasyonu, matris metalloproteinaz-1'in işlevinde azalmaya neden olmaktadır. Katalaz, Glutasyon Peroksidaz ve Superoksit dismutaz enzimlerinde artışa, Glutatyonda ise azalmaya sebep olmaktadır [19].

HY'nin en önemli hücre hedeflerinden biri HSP 90 şaperonu'dur. HY'nin HSP 90 şaperonuna bağlanarak onu okside edebildiği bilinmektedir. Okside olan HSP 90, inaktif olarak hızlı bir degradasyona uğramaktadır. HSP 90 bir düzineden fazla bilinen kofaktörüyle protein kompleks ağının merkezindedir. HSP 90 ile birlikte ilişkili olan proteinler de işlevlerini kaybetmektedir. HY, protein stabilizasyonu ve transferini sağlarken kanser hücrelerinin yayılmasına sebep olan HSP 90'ı tedavi için hedef moleküllerden biri yapmaktadır.

HY'nin çevresinde yarattığı ışık bağımlı asidifikasyonu, proton transferi aracılığıyla hücre içi pH'm azalmasına neden olur. Bu durum pH bağımlı olan yapısal proteinler de de değişikliğe sebep olmaktadır [26].

HY, 600 nm dalga boyunda aktive edildiği zaman DNA veya proteinlere zarar vermeden daha küçük birimlere ulaşabilmektedir [26].

2.5.3. HY'nin Hücre İçindeki Dağılımı

HY'nin hücreye giriş mekanizması tam aydınlatılmamış olsa da sıcaklığa bağlı difüzyon yolu ile girdiğini belirten çalışmaları bulunmaktadır [24]. *In vivo* ve *in vitro* verilere göre HY'nin su kanalları yoluyla hücreye girebildiği ve bu sonucun HY ile birlikte kullanılan suda çözünebilen türevleri ile gerçekleştiği tespit edilmiştir. Hücreye alınımında e-kaderin'in de önemli rol oynadığı bildirilmiştir [17].

HY'nin endoplazmik retikulum ve golgi'de birikim yapabildiği gösterilmiştir. HY'nin zarlarda birikim yapabilmesi, tümör hücrelerindeki apoptoz açısından önemli bir roldür.

ER’de birikim yapan HY, FDT sonucunda Ca^{+2} ATPaz 2 proteininin kaybı ile kalsiyum dengesinin bozularak hücre ölümüne gitmesine sebep olmaktadır [19].

HY’nin hücre içi taşınımında diffüzyon ile birlikte endositozun da katkı yaptığı ileri sürülmüştür [17]. Işık ile uyarıldıktan sonra mitokondriyal solunum zinciri ile etkileşime girerek mitokondriyal hasar oluşturduğu ve reaktif oksijen türlerinin oluşumuna sebep olduğu bilinmektedir. Oluşan ROS’lar endojen piridin nükleotidleri okside ederek mitokondriyal membran porlarının açılmasına neden olmaktadır [27].

2.5.4. HY ve Reaktif Oksijen Türlerinin Oluşumu

HY ile yüklü hücrelerin ışığa bağlı yıkıma uğraması için oksijene ve belli aralıktaki dalga boyuna sahip ışığa gereksinimi vardır. HY, oksijeni yükseltgeyerek reaktif oksijen türlerin (ROS) oluşumuna neden olmaktadır. Serbest radikal anyonlarının oluşması tip I reaksiyonlarının meydana gelmesini sağlar ve hücrenin kendi DNA’sına hasar vermesine sebep olur. Hücrede büyük zarara neden olan ROS’lar; süperoksit radikali, Hidrojen peroksit (H_2O_2) ve Hidroksil radikali’nden oluşmaktadır ve kalsiyum homeostazisini bozmaktadır. Tekli oksijenlerin tercih ettikleri hedefler doymamış yağ asitleri, membran kolesterolü ve proteinlerdeki belirli amino asitlerdir [28].

2.5.5. HY ile FDT’nin Hücresel Etkileri

HY, çok güçlü ve doğal bir ışığa duyarlı madde (IDM) olması nedeniyle onkolojik hastalıkların Fotodinamik terapisi’nde (FDT) kullanılmaktadır. HY’nin biyolojik moleküller ile kompleks oluşturmasının yanı sıra, ışığa göstermesinden dolayı ultraviyole (UV) veya ışık yayan diyot (LED) ile ışık verilerek, FDT’de kansere karşı kullanılabilir. Işık verildiğinde fototoksik özelliği ortaya çıkan HY, sinyal iletim yolundaki büyüme faktörlerine de etki ederek apoptoz, nekroz, otofaji gibi hücre ölümlerinin görülmesine sebep olur. Moleküler mekanizmasını, glutasyonu ile metalloproteinaz-9 aktivitesini azaltarak ve kalsiyum homeostazisini bozarak göstermektedir [29].

HY-FDT’nin hücre içi Glutasyon ve Glutasyon-S-transferaz (GST) enzimlerini inhibe ettiği ve de, nükleotid eksizyon tamiri yolağında kritik role sahip iki enzimi (ERCC1 ve XPF) down regüle ettiği bilinmektedir [30].

HY aracılı FDT'nin en bilinen etkilerinden biri, hücre döngüsünü durdurmasıdır. Yapılan analizlerde genellikle G₂/M fazında durdurabildiği gözlemlenmiştir. Bazı hücrelerde mitokondriyal membran potansiyelinin kaybını indüklediği görülmüştür.

2.5.6. Kanser Teşhisinde Kullanımı

HY kanserli dokuda birikebilmektedir. Normal hücrelere göre kanser hücreleri tarafından HY'nin alımı daha fazlayken, doku seviyesinde seçici birikime katkı yapan başka faktörleri de olabileceği başka çalışmalar ile bulunmuştur. Birikim yapabilmesi ve fluoresan özelliği sayesinde Fotodinamik teşhiste çeşitli onkolojik hastalıkların keşfedilmesinde yardımcı olabilmektedir [17].

Hiperisin'in tekli oksijen oluşturması serbest oksijenin DNA hasarına sebep olarak nekroz ve apoptozu indüklenmesiyle son bulur.

HY'nin nekrotik dokulara karşı güçlü afinitetik etkiye sahip olduğu keşfedilmiştir. Neoplastik dokuda birikimi diğer dokulara göre daha fazladır. Bu sebepten dolayı, HY tümör nekrozunu hedeflemede potansiyel biyomarkerlar olarak kullanılabilir. [17].

2.5.7. Karanlıkta Hiperisin

HY'nin sıklıkla ışık ile çalışmalarına yönelmiş olursa da, karanlıkta sahip olduğu özelliği de önem arz etmektedir. *In vitro* çalışmalarda ışık ile aktif edilmemiş HY'nin sitotoksik olmayan etkileri gösterilmiştir. *In vivo*'da ise antimetastaz ve antiproliferatif aktiviteye rastlanmıştır. Kanser hücrelerinde fotositotoksik aktivasyonu için gereken konsantrasyonda toksik olmadığı düşünülürken, yeni yapılan çalışmalarda karanlıktaki toksisitenin konsantrasyona bağlı olduğu düşünülmektedir. Blank ve ark.'nın yaptığı çalışmada HY, fare göğüs adenokarsinoma hücresinde canlılığın azaltılmasını ve *in vivo*'da tümör büyüme inhibisyonunu sağlamıştır. Aynı çalışmada akciğere metastaz yapan kanserde, 72 saat sonrasında sonuç alınmıştır. Tek HY dozun hayatta kalabilmeye yeterli gelmediğinden, dozun devamlı verilmesiyle başarı sağlanmıştır. Bunun yanı sıra karanlıkta HY indüklü apoptoz oluştuğuna dair kanıt bulunmamaktadır [24].

Karanlıktaki redoks aktivitesi, düşük redoks potansiyeline katkı sağlamaktadır. Redoks aktivitesi HY'yi hem yükseltgeyen hem de indirgeyen ajan yapmaktadır. Redoks potansiyeli elektron zincir sistemlerinde alıcı olarak davranmasını sağlarken, elektronları yükseltgemeye ve ROS oluşturmaya izin vermektedir [31].

2.6. Kanserde Proteozom İnhibitörleri

Hücrel proteinlerin yıkımı karmaşık basamaklar içermektedir. Homeostazi sağlamada ve diğer hücrel fonksiyonların düzenlenmesinde büyük öneme sahiptirler. En bilinen proteozomlardan olan 26S proteozomu kısa ömürlü proteinlerin yıkımından sorumlu olan ATP-bağımlı bir proteazdır. Proteazların düzgün çalışmaması sonucu hasarlı proteinlerin geri dönüştürülememesi ile sinyal iletimi bozulur ve hücre ölüme gider. Sinyal iletiminin kesilmesi amaçlanan anti-kanser ilaçların bazılarında antitümör etkisi için 26S proteozomu hedef alınmıştır. Bu şekilde proteozom inhibitörleri geliştirilmektedir [32].

Proteozom inhibitörleri, proteozomları işlevsiz hale getirirken, proteinlerin ifade edilmesini ve çoklu sinyal iletimini engeller. Kanser hücrelerinin, normal hücrelere göre proteozom inhibisyonuna daha hassas olduğu bilinmektedir. Ubikitin proteozom yolağı hücre içi proteinlerin degradasyonundaki ana yollardan biridir. Bu yolak, hücre büyümesi ve ölümü arasında dengeyi sağlarken kanser hücrelerindeki ilaç direnci gelişimi gibi mekanizmalar içerisinde de rol oynadığı bilinmektedir [33].

Proteozom fonksiyonunun inhibe edilerek kanser tedavisinde sonuç alınabilmesi üzerine proteozom inhibitörlerinin terapötik ajan olabilecekleri göz önünde bulundurulmaya başlanmıştır. İlk yapılan araştırmalarda hücrelerde apoptozu, tümörde ise anjiyogenezi indükleyebildiği görülmüştür [32].

2.7. Kanser ve Apoptoz

Apoptoz'un asıl amaçlarından biride kanseri engellemektir. Kanserde apoptozu engelleyen birçok neden olsa da genel olarak iç yolağın işlevsizleşmesi apoptozu inhibe etmektedir. Apoptotik kontrolün kaybolması kanserde anjiyogenezi uyarması ve mutasyonların oluşması açısından zaman kazanılmasını sağlamaktadır [34].

Genellikle kanser hücrelerinin apoptoz hücre ölüm yolları arasından apoptozu tercih etmediği bilinse de aslında hücreler onkolojik olaylar ile ilişkili apoptotik yollardan kaçınmaktadırlar. Bunun yanı sıra normal hücreler apoptozu indükleyen sinyallere sahip değilken, kanser hücreleri normal hücrelere göre apoptozu daha fazla hassasiyet gösterirler. Bunu sebebi hücrelerin çevresinin hipoksik olması ve besin açısından fakir durumda bulunurken, kanser hücrelerinin normal hücrelerin aksine aktif kaspazlara sahip olmasındandır.

P53 proteini, hücrenin apoptoza ya da onarıma gideceğini belirleyen önemli bir moleküldür. Genom stabilitesini sürdürmede rol oynar. Tümör baskılayıcı gen olmakla birlikte pek çok kanserde farklı mutasyonlarına rastlanmıştır. Kanser vakalarında en çok mutasyona sahip genlerdir [35].

2.7.1. Apoptoz ve Kanser Tedavisi

Kanser tedavilerinin çoğunluğunda mitokondriyal apoptotik yolak kullanılmaktadır. Geleneksel anti-kanser ilaçlarının büyük çoğunluğu apoptotik proteinler olan BCL-2/BAX bağımlı mekanizmayı kullanmaktadır. Bu mekanizmanın çalışmaması ilaçların başarısızlığına sebep olmaktadır [34].

ARF ve p53'e bağlı apoptoz, hücre içi sinyal yollarını düzenleyerek hücreleri kanserleşmeye karşı korurlar.

Kanser ajanlarının *in vivo*'da apoptozu indükleyebildiğini göstermek zor olabilmektedir. Tümör hücreleri nekroz ile de ölebilirler. Apoptotik ölüm diğer ölüm tiplerine göre daha az immünojeniktir. *In vivo*'da daha hızlı ve kesin sonuç alınabilen hücre ölümü apoptozdur. [35].

TNF ailesinden olan Trail ligandı (TNF ilişkili apoptozu indükleyen ligand), seçici olarak kanser hücrelerinde apoptozu indüklediğinden dolayı kaspaz bağımsız tedavilerde hedef haline gelmektedir. Bu sebepten ötürü Trail reseptörü antagonistler anti-kanser çalışmalarda kullanılmaktadır [36].

2.7.2. FDT İndüklü Apoptoz

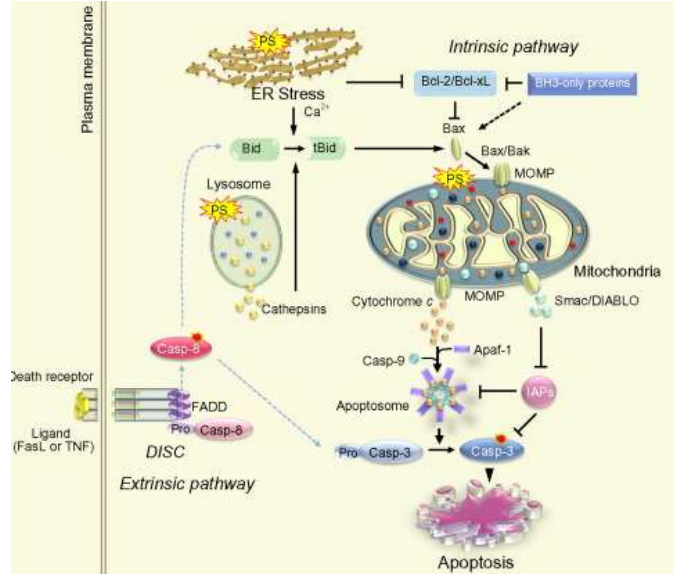
FDT apoptoz'un etkili bir indükleyicisi olmasından ötürü farklı hücre hatları ve IDM'ler ile birlikte çalışılmaktadır. FDT indüklü apoptoz hücre döngüsünde herhangi bir zamanda oluşabilir.

Birçok IDM temel olarak mitokondriyi hedef alırken, por kompleksinin geçirgenliğinde değişikliğe sebep olmaktadır. Mitokondriyal membran hasarı sonucunda ise kısa sürede sitoplazmada sitokrom-c salınımı görülmektedir. Bazı IDM'ler endoplazmik retikulumu (ER) da hedeflerken, kalsiyum pompalarına hasar vererek Ca²⁺'un sitozole ve mitokondriye salınmasını neden olurlar. Lizozom organelinde birikim yapan IDM'ler ise lizozomal membrana hasar vererek Bid gibi apoptotik moleküllerin aktivasyonuna neden

olurlar. Bunun sonucunda mitokondriyal apoptoz uyarılır. Salınan membran reseptörlerinin ligandların salınımından plazma membranı da etkilenebilmektedir [37].

Apoptozu indükleyen dozlardan daha yüksek dozlar kullanıldığında ise nekroz indüklenebilmektedir.

Şekil 2.3'te apoptozun FDT ile uyarılması sonucu iç ve dış yolak mekanizmalarında oluşan iki farklı yol gösterilmektedir.



Şekil 2.3. Apoptoz oluşumuna giden yolakta FDT aktivasyonu sonucu görülen biyomarkerlar [38].

2.8. Kanser Tedavisinde Nanoteknolojik Yaklaşımlar

Nanoteknoloji, yaklaşık olarak 1 ile 1000 nanometre boyutundaki materyal ve cihazların uygulamasına ve kontrolüne dayanan bir mühendislik alanıdır. İlk kez modern tanımı 1959'da Feynman tarafından yapılmıştır. 1980'lerde atom seviyesinde görüntü alınmasını sağlayan Taramalı Tünelleme Mikroskobu'nun (TTM) keşfedilmesi ile nanoteknolojiye karşı ilgi oluşmaya başlamıştır [39].

Nanoteknolojinin gelişmesiyle nanomateryallerin çeşitliliği artmaya başlamıştır ve sektördeki geniş kullanım alanları sayesinde çevrede daha fazla rastlanmaya başlanmıştır. Nanomateryaller birçok farklı bileşenlerde olabilirken, her bir bileşende farklı boyuta, şekle, kaplamaya ve işleve sahip olabilirler. Sıvı süspansiyonda, toz halde veya gaz olarak bulunabilirler. Doğada da bulunabilen nanomateryallere, insanlar farkında olmadan kıyafetlerin, yiyeceklerin ve kozmetik ürünlerin içerisinde maruz kalmaktadır [23].

Son 20 yıl içerisinde nanoteknoloji dünyasına diğer bilim alanlarının da dahil olmasıyla önemli gelişmeler yaşanmıştır. Bu alanlar ile farklı yan dalların oluşması ve çalışma alanlarının genişlemesiyle birlikte, nanoteknolojinin tıp bilimi ile birleşmesi sonucu nanotıp teknolojisi oluşmuştur. Nanotıp alanı ise nanoteknolojinin daha hızlı teşhislerde, gelişmiş görüntüleme ve çeşitli klinik vakaların oluşumunu engellemede kullanılmaktadır. Hastalıkların insidanslarının artmasıyla daha erken ve hızlı teşhislerin yapılabilmesi ve yeni ilaçların geliştirilebilmesi için yeni teknolojilere olan gereksinim artmaktadır. Nanotıp ürünleri olan biyoajanlar tıp dünyası içerisinde ümit vaat etmektedir [40]. Hazır halde ve kullanılmakta olan nano-ilaçlar ise seçicilikleri ve de düşük yan etkileri sayesinde özellikle kanser tedavilerinde tercih edilmektedir. Kemoterapide görülen sistemik toksisiteye karşın etkili bir alternatif olarak dikkat çekmektedirler.

Birçok nano-ilaç, enjeksiyon veya soluma yoluyla verilebilecek şekilde geliştirilmiştir. Bu yöntemlerle ilacın verilmesi, ilacın protein ve lipid kompleksleri ile muameleye uğraması sonucu hedefe kadar etkinliklerinin azalmasına sebep olmaktadır. Bu nedenle ilk olarak peptit, nükleik asit ve hormon gibi küçük yapılar ile nanomateryaller aracı olarak kullanılmaya başlanmıştır.

2.8.1. Kanser Tedavisinde Kullanılan İlaç Taşıyıcı Sistemler

Farmakolojik ajanların ve enzimlerin tesliminde kullanılan taşıyıcıların geliştirilmesinde son 10 yılda önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. İlaç taşıyıcı sistemler yeni ve geleneksel olarak ikiye ayrılmaktadırlar. Geleneksel sistemlerde oral, dilaltı ve intravenöz yolla ilaçlar verilirken, doz yönetimi yapmak gerekmektedir. Tedavide terapötik ajanların konsantrasyonunun sürekli değişmesi devamlı olarak takip gerektirmektedir. İlaç vücuda ilk alındığında kanda bulunan derişimi çok yüksek olurken, ilacın diğer dozunun alımına kadar geçen sürede seviyesi çok düşmektedir. İlaç taşıyıcılarının kullanım yararları bu sırada ortaya çıkmaktadır. Hedefli bölgeye ilacı taşıyarak kontrollü bir şekilde hızla salımını sağlarlar [39].

İlaç taşıyıcıların formu da ilacın kendisi kadar önem taşımaktadır. İlaç taşıyıcılar içerisinde lipozomlar, nanopartiküller (NP'ler), miseller, mikrokapsüller ve dendrimerler önemli paya sahiptirler. İlaçların aracı moleküller ile taşınmasında çözünürlüğün ve maruziyet süresinin artırılması, ilacın bırakılacağı bölgeye karşı seçici geçirgenlik ve gelişmiş terapötik indeks gibi avantajlardan yararlanılmaktadır [41].

Kanser hücrelerinde ilaç salımı çalışmalarında sentetik polimerler, proteinler ve lipozom gibi bileşenler kullanılırken yeni çalışmalar da çoğunlukla NP'lere yönelmeye başlamıştır. Son 20 yıl içerisinde NP'lerle ilaç salım vezikülleri farklı boyutlarda ve farklı yüzey kimyasına sahip olarak şekillendirilmiştir [42]. NP'ler boyutlarından dolayı *in vitro*'da kullanımı dikkat çekerken, kanser tedavisinde peptidler, antikolar ve de küçük molekülü ilaçlar NP'ler tarafından teslim edilmektedir [43]. İlacın yan etkilerin azaltılması ile daha güvenli bir tedavi sağlayabilmekte ve biyoyararlanımını arttırmaktadırlar. Ayrıca uygulanan alanın seçici olmasından dolayı *in vivo*'da da etkisi olmaktadır. Kan damarlarından geçerek sirkülasyona karışabilirler. Stabilitesinin ve raf ömrünün uzun olmasından ötürü saklanarak uzun süre çalışılabilmektedir [44].

2.8.1.1. Nanopartiküller

Birçok sayıdaki NP-bazlı ilaçların kanser gibi kronik hastalıklarda tedavi olarak kullanımlarına izin verilmiştir. Daha kompleks tasarımlar ile oluşturulan NP'ler kişiselleştirilmiş ve özel kanser tedavileri için geliştirilmeye devam etmektedir [40]. Farklı tipteki NP'ler istenilen işlevsel grupları ile birleştirilerek klinik uygulamalarda kullanılabilir. İdeal nano taşıyıcı bulabilmek için bilim insanları yapısal olarak karmaşık kopolimer moleküller kullanmaya başlamışlardır, fakat kopolimerlerin sentezi zordur ve immün sistemi reaksiyonlarına sebep olabilmektedir [45]. Bu nedenle biyoçözünabilir NP'ler tercih edilmeye başlamıştır.

Biyoçözünabilir NP'ler, hedeflendirmeyi arttırması ve kullanılan maddenin etkili taşınımından dolayı kanser terapisinde birçok avantaja sahiptir. Özellikle antikanser ilaçlarının salımında özgün yapısal ve fiziksel özelliklerinden dolayı dikkat çekmektedirler. NP'ler kemoterapötik ajanların veya terapötik genlerin sağlıklı hücrelerinden kaçınırken malignan hücrelerde etkili olması için tasarlanmaktadır. Yükleme kapasiteleri yüksek olmakla birlikte taşıdıkları maddeyi degradasyondan korurlar. Boyutlarının küçük olmasından dolayı hücrelere girmekte zorlanmazlar [46]. Antikolar ile işlevlendirilerek özgül olarak hücrelere bağlanabilirler. Vücutta ise 10 nm'den küçük NP'ler renal boşaltım ile hemen vücuttan atılabilirken, 100 nm'den büyük NP'ler makrofajlar tarafından bulunarak vücuttan atılmaktadırlar. 10 ile 100 nm arasındaki NP'ler ise tümörlerin oluşturduğu damarlara girebilmektedir. Tümör bölgelerinde birikim gösterebilmeleri gelişmiş geçirgenlik ve tutunma etkinliklerinden (GGTY) kaynaklanır.

Pasif hedeflemede farklı tipteki NP'ler vücuttaki farklı dokularda ve organlarda birikim yapabilmektedirler. Normal doku ile tümör dokunun çevresinde farklar bulunması sayesinde NP'ler pasif hedefleme ile kendiliğinden tümör çevresine yönelebilmektedir.

Tümör vasküler yapısının zayıf olması ve lenfötik boşluklardan dolayı NP'ler uzun süre orada kalabilirler. Lenfötik yapının zayıf olması çevreden merkeze doğru basınç oluşturur [47].

Endotel hücrelerde normal dokuların arasındaki boşluk bulunmazken, tümör dokularının arasında 100 ile 400 nm boyut aralığında boşluk bulunmaktadır. Hedeflendirilmeyen NP'ler GGTY etkilerinden dolayı tümör dokularının içerisine, hücrelere ise spesifik olmayan yüzey adsorbsiyonu ile girebilir [48].

NP'lerin farklı polimer bileşenleri ile oluşturulmasıyla kontrollü salınım yaparak istenilen miktarda doz yüklenebilmektedir. Bu sayede sağlıklı hücrelere verilen ilaç minimize edilerek, antikanser ajanların tümördeki sitotoksisiteyi artırması ve yan etkilerin çoğundan kaçınması sağlanır. Polimer yapısı, NP'lerin yüzey işlevselleştirilmesi ve partiküllere aktif hedefleme özelliği kazandırmasının yanı sıra birçok ilaca karşı gelişen direncin üstesinden gelmeye ve sitotoksik ilaçların terapötik etkilerini geliştirmeye katkı sağlamaktadır [46].

Nanopartiküller organik ve inorganik olmak üzere ikiye ayrılmaktadırlar. Organik NP'ler lipid, polisakkarit, protein ve polimer gibi bileşenlerden oluşurken düşük toksisiteye sahip olmanın avantajına ve birçok çeşitte ilacı taşıyabilme yeteneğine sahiptirler [14]. Nanoskopik boyutlarından ötürü tümörün etrafındaki zayıf damarlardan geçebilmektedirler. İnorganik NP'ler ise hidrofilik ve organik materyallere kıyasla çok daha stabil bileşenlerdir. Quantum noktaları, altın NP'ler, superparamagnetik demir oksit NP'ler inorganik NP'lerin örneklerindedir. Işığı emen cihazlarda yarı iletken olarak kullanılırken, biyotıp ve kataliz alanlarında giderek artan rollere sahiptirler [49].

2.8.1.2. Akciğer Kanseri İlaç Yüklü Nanopartiküllerin Kullanımı

NP'lerin boyutları, kimyasal yapıları, ilaç kapsülleme etkinlikleri akciğer kanserinde kullanımı için dikkat edilmesi gereken noktalardır. Lipozom ve lipid bazlı NP'ler oksidatif yıkıma daha hızlı uğrarken ilacın etkinliğini de düşürmektedirler. Ancak geliştirilen NP'lerin akciğerin tüm dokularına nüfuz edebilmesi için daha uzun bir zaman dilimine ihtiyaç duyulmaktadır, bu sebeple tasarlanan NP'lerin stabiliteilerinin korunması akciğer kanserinde kritik bir role sahiptir [50].

NP'ler normal hücreler arasından geçerek, malignan hücreleri hedefleyebilirler. Akciğer kanserinde genellikle akciğer epitelinde tümör oluşumu gözlemlendiği için, NP'ler alternatif tedavi yöntemleri arasında sayılmaktadır. Bu sebepten akciğer nanomateryallerin hedef organı olarak görülmektedir. 5 µm boyutunun altındaki mikromoleküller periferik akciğer alveoline ulaşabilirken, 1 µm'ın altındaki NP'lerin alveollere difüzyon ile geçebildiği bildirilmiştir [51].

2.8.2. Polimer Bazlı Nanopartiküller

Tümörü hedeflerken kan dolaşım sistemlerinde NP'lerin uzun süre bulunması istenirken, partikül boyutu ve yüzey modifikasyonları dağılımlarında kilit özellikler olarak değerlendirilmektedir [52]. Bunun yanı sıra seçilen polimerin kolay sentezlenebilir, ucuz, suda çözünebilir ve biyouyumlu olması büyük önem taşımaktadır. NP'lerin sentezinde kullanılan polimerler sentetik veya doğal olabilmektedirler. Kitosan, selüloz, aljinat ve jelatin doğal en sık tercih edilen polimerler arasındadır. Çalışmada polimer olarak *in vitro* ortamındaki biyouyumluluğu nedeniyle kitosan tercih edilmiştir.

2.8.2.1. Kitosan

Kitin 1811'de Henri Braconnot tarafından mantarların incelenmesi sırasında keşfedilmiştir. 1859'da kitinin alkali ile birleşimi sonucu asitlerde çözünebilir kitosan ise kitinin kısmi deasetilasyonu sonucu oluşturulan modifiyeli bir biyopolimerdir. Deasetilasyon ve moleküler ağırlığı kitosana çeşitlilik sağlarken, polimerin kalitesini de etkilemektedir [53]. Şekil 2.4'de kitin ile kitosanın arasındaki kimyasal fark görülmektedir.

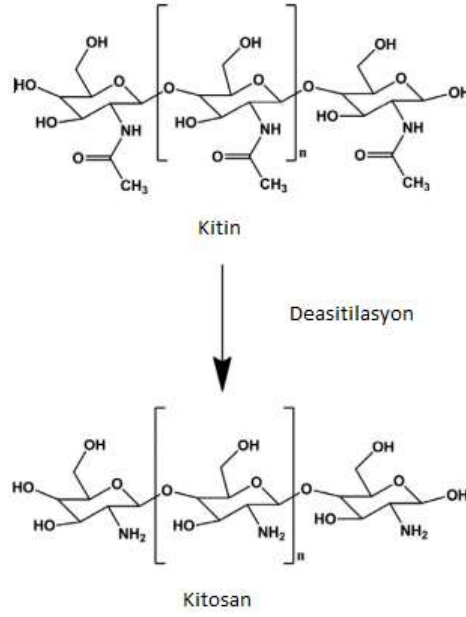
Kitosan çok az miktarda sadece belli mantarların hücre duvarlarında bulunmaktadır. N-asetil glukozamin ve glukozamin birimlerinden oluşmaktadır. Beyaz, sert, elastikiyeti olmayan bir polisakkarittir. Toksik olmaması, biyoçözünübilirliği ve antimikrobiyal özelliklerinden dolayı biyomedikal alanda, genetik mühendisliğinde ve çevresel kirlilik kontrollerinde kullanılmaktadır [54].

Çalışmalarda sıklıkla ilaçlar ile kullanılan kitosan, FDA tarafından doku mühendisliği ve ilaç tesliminde kullanılabileceği onaylanmıştır. Diğer polimerler arasından katyonik karaktere sadece kitosan sahiptir. Katyonik karakteri sayesinde, epiteldeki sıkı bağlantıları açarak penetrasyonu arttırabilirken nükleik asitlerinde iyi bir taşıyıcısı olmaktadır [55].

Hemostatik (kan dondurucu), fungusidal, anti-tümöral ve immün sistemi destekleyici özelliklere sahiptir. Kitosan'ın kilo kaybı ilaçlarının yapımında da kullanımı çok tercih

edilmektedir. Sebebi ise kitosanın yağ asitleri ile kompleks yaparak yağ hidrolizinin inhibisyonunu kolaylaştırmasıyla vücuttan atılmasına bağlıdır. Özellikleri açısından en dikkat çeken, ilaç taşıyıcı olarak kullanılmasıdır.

Kitosana kimyasal modifikasyonlar ile farklı özellikler kazandırılabilir. Modifikasyonların polimerin ana zincirini içermemesiyle kendi özelliğini kaybetmesinden kaçınılabilmektedir. Yapılan hidrofobik modifikasyonlar ise farklı ilaçların kullanımı içinde umut vaat etmektedir [56].



Şekil 2.4. Kitin'in deasitilasyon aşaması sonucu kitosan'a dönüşümü ile değişen moleküler yapının açık formülünün gösterilmesi [57].

2.8.2.2. Kitosan Nanopartiküller

Doğal bir materyal olan kitosan, farklı fizikokimyasal özelliklerinden ötürü çevre dostu olmakla birlikte insanlar için de güvenlidir. Karakteristik özellikleri terapötik ilaç taşınım sistemlerinin geliştirilmesinin önünü açmıştır. Sonuç olarak, doku mühendisliğinde, kanser teşhisinde, ilaç tesliminde, enzim immobilizasyon desteğinde kullanılmaktadırlar [53].

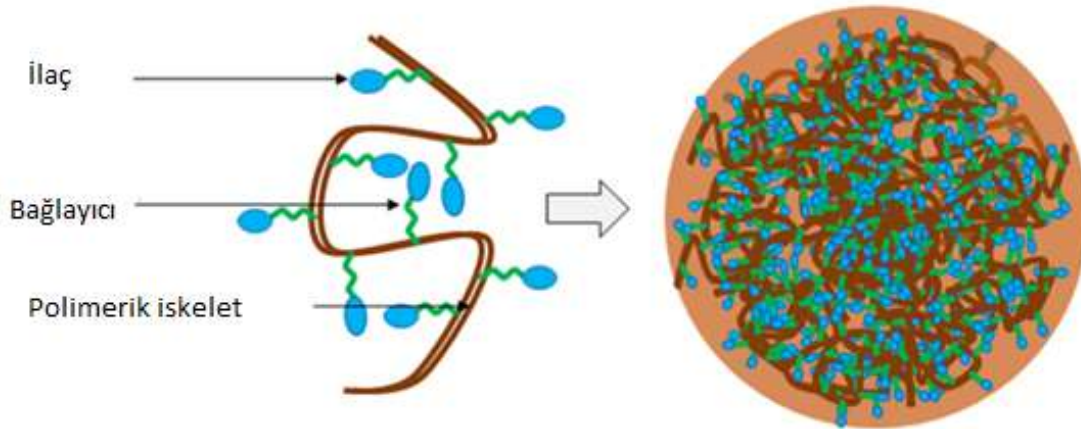
Kitosan nanopartiküllerin (KI-NP) sentezi için birçok farklı uygulama olmakla birlikte bunlar şu şekilde sıralanabilir; iyonotropik jelasyon, mikroemülsiyon metodu, ters miseller metodu, emulsifikasyon solvent difüzyon metodu ve polielektrolit kompleks. Tez çalışması için iyonotropik jelasyon yöntemi kullanılmıştır. Bu metot, kitosanın pozitif amin grupları ile tripolifosfatın (TPP) negatif yüklü polianyon grubunun arasındaki elektrostatik

etkileşime dayalıdır. Şekil 2.5'te de görüldüğü üzere KI-NP'ler sadece ilaç, bağlayıcı ve polimerik iskeletten oluşmaktadır.

İlaç salımı ve NP teslim sistemlerinde kullanımı ise iyonik etkileşimleri ile gerçekleştirmektedir. İyonik etkileşimler düşük pH'ta serbest amin grupları protonlayarak, polimer zincirleri arasında elektrostatik çekim kuvveti yaratır. Kitosan asetik asit içerisinde çözünebilirken, polianyonun eklenmesiyle oda sıcaklığında mekanik karıştırma ile kendiliğinden nanopartikülü oluşturabilmektedir. Boyut ve yüzey yükü ise kullanılan kitosan oranına göre değişmektedir. Kullanılan kitosan konsantrasyonu arttıkça boyutun da arttığı bilinmektedir [54].

Bu sayede jelimsi yapıda polimer solüsyonu oluşur. Serbest amin ve hidroksil grupları hidrojen bağı aracılığıyla farklı moleküllerin bağlanmasına olanak sağlamaktadır. Kitosan ile NP oluşumunu başlatan kimyasallar ise çapraz bağlayıcılar olarak adlandırılmaktadırlar. Kitosan'a çapraz bağlayıcı olarak birçok ajan kullanılabilir. Gluteraldehit, Genipin ve TPP ajan olarak kullanılanlar arasındadır. İyonik çapraz bağı NP'ler sık tercih edilmektedir. Bunun nedeni hazırlanma kolaylığı ve organik çözücüler olmadan oluşturulabilmeleridir [58].

Tez çalışmasında kullanılan kitosan ise IDM'lerin enjekte edilebilir hale getirilmesi için tercih edilmiştir. Kitosan'ın amino grupları hafif asidik koşullarda protonlanmaktadır, bu sayede kitosan pH hassasiyetli NP'lerde sık tercih edilmektedir [58].



Şekil 2.5. İlaç bağlı polimer bazlı NP'lerin şematik gösterimi [59].

2.8.2.3. Kitosan Nanopartiküller'den İlaç Salımı

Kitosan NP'lerden ilaç salımı birçok şekilde gerçekleştirilebilir. Bunlar arasında absorbe ilacın difüzyonu, polimetrik matriksden ilaç difüzyonu, polimerin degradasyonu örnek olarak

sıralanabilir. İlacın ilkin salımı ise, polimerin şişmesi veya polimerin yüzeyinden ilacın difüzyonu ile gerçekleşmektedir. Kitosan NP'ler, pH bağımlı ilaç salımı sergilemektedir. Kullanılan kitosan türevi ise ilacın salınma hızını etkileyerek salımın kontrolünü sağlarken, ilacın farmakokinetik profilini de etkilemektedir [60].

2.8.3. Nanopartikül'lerin Hücre ile Etkileşimleri

NP'ler hücreye endositoz ile girerken, endositoz yolları olan fagositoz ve pinositoz denilen 2 ana yolu kullanmaktadır. Fagositoz da 500 nm'den büyük partiküller alınırken, pinositoz ile daha küçük partiküller alınmaktadır. Pinositoz'da kltrin-bağımlı ve kltrin-bağımsız olmak üzere iki farklı yol ile hücreye alım gerçekleşmektedir. Fagositoz'da ise temel olarak nötrofil ve makrofajlardan yararlanılmaktadır. Bunun yanı sıra bazı çalışmalarda küçük NP ve moleküllerin plazma membranını pasif difüzyon yolağı ile geçebileceğı bildirilmiştir [61].

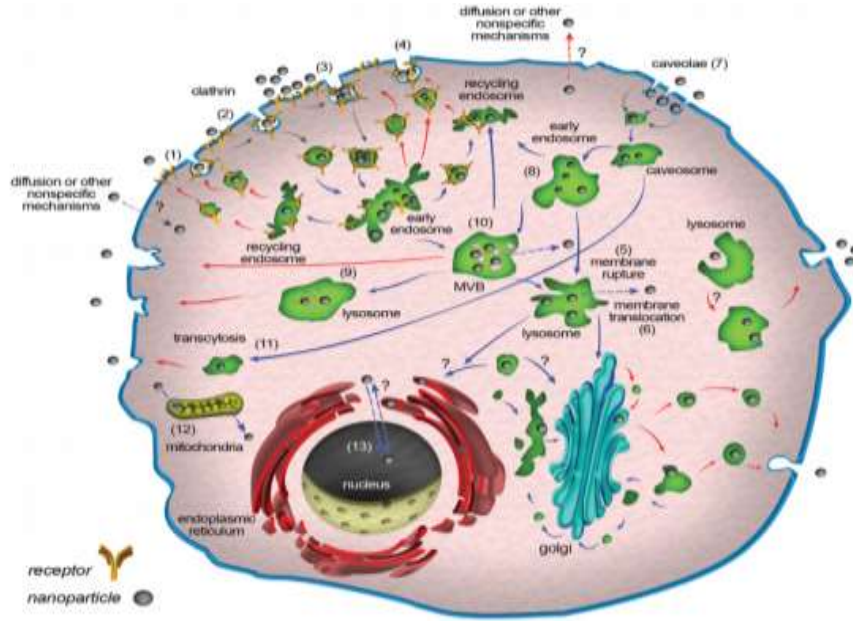
NP'lerin hücreye alınmasında şekil, boyut, yüzey kimyası gibi faktörlerin rol aldığına inanılsa da henüz tam olarak açıklanamamıştır. Bunun yanı sıra bazı yolakların kullanıldığı bilinmektedir.

NP'lerin hücreye giriş aşamalarının hücre hattına göre farklılık gösterdiği bilinmektedir. Bazı çalışmalarda A549 hücrelerinin kltrin-bağımlı yolu tercih ettiği görülürken, başka çalışmalarda ise klaveolin-bağımlı yolu tercih ettiği bildirilmektedir [62]. Kltrin bağımlı endositoz, hücrelerin besinlerin yanı sıra plazma zarının bileşenlerini de hücre içine aldığı ana yoldur. Kltrin proteini, hücre dışı veziküllerin belli bir şekli alabilmesinde rol oynamaktadır. Adaptör proteinler ise zarın sitoplazmaya bakan yüzünde bulunurken, farklı taşınan maddeleri tanır ve sinyalleri düzenlerler [63].

Epitel hücrelerde de fagositoz olsa da temel olarak fagosit hücrelerde görülmektedir. Fagositozda genellikle NP'lere bağlanmasına aracılık eden proteinlerle, spesifik ligand reseptör ilişkileri oluşturulur. Bağlantıyı sağlayan fagosit reseptörleri arasında Fc reseptörleri, tamamlayıcı reseptörler, fruktoz reseptörleri bulunmaktadır [64]

Misel veya katı lipit NP'ler, tümör hücrelerinde p-glikoprotein pompasından endositoz ile ilacın geçmesine aracılık etseler de, ilaç ekzositozdan kaçamamaktadır. İlacın endozomlardan kaçabilmesi için asidik endozomal pH'a cevap verebilen ve daha hızlı salım yapabilen NP'ler geliştirilmeye çalışılmaktadır. NP'lerin endozomal zara hasar vererek, ilacın sitozole salımının sağlanması istenmektedir [64].

NP'lerin hücreye alınmasındaki önemli özelliklerinden biride yüzey yükleridir. NP'lerin pozitif yüklü yüzeyleri ile negatif yüklü mukoz tabakanın arasında kuvvetli bir elektrostatik kuvvet oluşmaktadır [65].



Şekil 2.6. Nanopartiküllerin hücreye giriş mekanizmaları ile hücre içerisinde izlediği yolların gösterilmesi [22].

2.9. Nanoteknoloji ve Fotodinamik Terapi

FDT'nin kullanımının sınırlı olmasının bir takım nedenleri vardır. Optimum dalga boyunda bile ışık dokunun sadece birkaç mm'sinin altına erişebilmektedir. Başka bir faktör ise tümörlerin geliştiği hipoksik koşullarda FDT, inhibe olmaktadır. Ayrıca normal dokularda dahil olmak üzere FDT, hücresel oksijen seviyesini düşürerek kendi terapötik etkisini de olumsuz etkilemektedir. Bu sebeplerden ötürü istenilen bölgeye kontrollü mekanizmalarla tekli oksijenlerin uygulanması, sorunların üstesinden gelinmesini sağlayabilir [65].

Nanoboyuttaki taşıyıcılar yüksek yükleme kapasitesi, degradasyondan koruma, uzun dolaşım süresi gibi avantajlara sahiptir. FDT'nin etkisinin artırılması nanotaşıyıcılara yüzey modifikasyonlarının yapılmasıyla sağlanabilmektedir [14].

2.9.1. Nanopartikül Bazlı FDT Sistemleri

FDT sistemleri, umut verici sonuçlarına rağmen bir takım problemlere de sahiptir. En büyük sorun IDM'lerin seçici birikim gösterememeleridir. Bunun sonucunda hastaların güneşe maruz kalması ile deri hasarı oluşma riski oluşmaktadır. Taşıyıcı moleküllerin kullanılmasıyla bu soruna çözüm getirilebilmektedir.

Işık algılayıcı maddeler (IDM), NP'lere kapsüle edilmek dışında kovalent veya non-kovalent etkileşimlerle yüzeylerine de bağlandırılabilirler. IDM'ler ile NP'lerin kullanılması IDM'lerin hidrofobik özelliğinin ortadan kalkmasını sağlarken, hedefleme potansiyelleri sayesinde istenilen bölgede IDM konsantrasyonları artar ve normal dokulara karşı hasarı azaltır. Sabit miktarda IDM'leri serbest bırakması ile bölgedeki doz miktarı da aynı düzeyde kalabilmektedir [14].

NP'ler formüllerine göre FDT'ye karşı farklı cevaplar oluşturmaktadır. Altın ve gümüş NP'ler organik IDM'lere göre daha yüksek sönüm katsayısına sahiptirler [66].

2.9.2. Nanopartiküller ile Hiperisin Kullanımı

HY'nin hidrofobik özelliği tedavide kullanımını da kısıtlamaktadır. Çözünürlüğünün iyi olmaması yardımcı maddeler ile taşınımını gerektirmiştir. HY'yi kullanırken çözücü kimyasal maddelerden yardım alınsa da, *in vivo* ortamda kimyasallar kullanılmayacağı için taşıyıcı maddelerden yararlanılmaktadır. HY'nin taşınımında lipozomlar, katı lipid NP'ler, miseller, emülsiyonlar ve mikropartiküller tercih edilmektedir [67].

HY'nin NP'ler ile kullanımını serbest kullanımına göre birçok avantaja sahiptir. NP'ler, düşük konsantrasyon ile kullanıma izin vererek ışığa hassaslık oluşmasının önüne geçebilmektedir. Tek başına kullanılan HY'nin çoklu ilaç direnci oluşturabildiği bilinmektedir. NP'ler, hedefleme yetenekleri sayesinde çoklu ilaç direncinin üstesinden gelebilmektedirler. NP'ler, tümör bölgesindeki hipoksik ortama karşı HY'yi koruyarak hücreye giriş yapabilmemesini de sağlamaktadır.

HY'nin hidrofobik yapısını aşmak için birçok çözücü kullanılmıştır. Fakat son çalışmalarda kanserin fluoresan yöntemlerle teşhisini sağlamak üzere yeni formüller geliştirilmiştir. Bunların arasından PVP (polivinil prolidon) ve siklodekstrinler en sık kullanılanlarıdır [17].

Çalışmalarda tümör hedefli NP'lerin hidrofobik moleküllerle tasarlanması tavsiye edilmektedir. Hidrofobik moleküller, tek başına kullanıldığında suda agregatların oluşmasına sebep olur ve bu durum oksijen oluşumunun azalması gibi foto-fiziksel özelliklerini etkilediğinden dolayı kapsüllendirilerek verilmesi daha uygundur [26].

2.9.3. Fotodinamik Terapi ile Hücre Ölüm Mekanizması

Aktif dış kaspazlar ölen hücrelerde gözlemlenen ve karakteristik değişimlere yol açan maddeleri ayırırlar. Çekirdeğin laminası parçalanır ve kromatin yoğunlaşır. Bu sebepten

dolayı çekirdekte büzülme görülür. Kaspaz aktifli DNA inhibitöründe parçalandığı için DNA parçalanır [13]. Zardaki fosfolipitlerin peroksidasyonu FDT'nin ilkin amacını oluşturmaktadır.

2.10. Hücre Canlılık Testleri

2.10.1. MTT Analizi

MTT analizi, hücre canlılık testlerinin başında gelen kolorimetrik bir ölçüm testidir. MTT'nin endoistoz ile alınmasıyla, enzimatik indirgenmesi sonucu mitokondriyal süksinat dehidrogenaz tarafından katalize edilen MTT formazanları oluşur. Mor formazanları için çözme solüsyonu kullanılır ve bunun sonucunda renkli solüsyon oluşur. Renkli solüsyon belirli dalga boyunda (500 nm-600 nm) spektrofotometre tarafından ölçülebilmektedir. Analiz, mitokondriyal solunuma bağlı olduğundan ötürü hücrenin enerji kapasitesini değerlendirmede kullanılabilir. Hücre proliferasyonunun hassas ve sayısal teşhisini yapabilmektedir. Hücre aktivitesi ile absorbansı arasındaki doğrusal ilişki sayesinde büyüme hızını gösterebilmektedir [68].

2.10.2. Tumor Tac ile Apoptoz Tayini

TumorTACS™ Kit ile kanser hücrelerindeki apoptoz belirlenebilmektedir. Kitin Tunel bazlı sistemi apoptotik hücrelerdeki çift zincirli DNA'yı işaretlemektedir. Metil yeşil boyası ile ise apoptotik olmayan hücrelerin görüntülenmesi sağlanmaktadır. Apoptoza özgü parçalanmış nükleer kromatin içeren hücrelerde ise çekirdeği kahverengine sahip olmasından dolayı kahverengi görünen hücrelerin apoptotik olduğu anlaşılmaktadır.

2.10.3. AO/PI Boyası ile Hücre Ölüm Tipinin Belirlenmesi

Akridin Oranj (AO) ve Propidyum İyodit (PI) boyaarı çekirdeği boyayabilen floresan boyalardır. Hücre ölüm yolunun belirlenebilmesi için kullanılmaktadır. Akridin Oranj hücrelerin membranından geçerek yeşil görünüm vermesine sebep olurken, apoptotik ölümün görülebilmesini sağlamaktadır. Propidyum İyodit ise kırmızı renk oluşumuna sebep olurken, sağlıklı hücrelerin membranından geçemediği için sadece nekrotik hücreleri görünür kılarak ölü hücrelerin boyanmasını sağlamaktadır.

2.10.4. Oksidatif Stres Tayini

Hücredeki ROS miktarlarını ölçebilmek için çeşitli floresan ajanlar kullanılmaktadır. 2',7' – diklorofluorescein diasetat (DCFDA) probu sıklıkla tercih edilen ajanlardan biridir. Geçirgen floresan prob (DCFHDA), membranlardan geçerek hücreye girdikten sonra enzimler sonucunda floresan olmayan DCFH'ye dönüşmektedir. Hücrede ROS bulunması durumunda DCFH yükseltgenerek yüksek floresanlı DCF'ye çevrilmektedir. Hücredeki DHF oluşumu floresan spektroskopisi ile teşhis edilerek hücre oksidasyonu belirlenebilmektedir.

2.10.5. LDH Sitotoksisite Testi

Plazma membranı hasarını ölçebilen testlerden biri de LDH testidir. Hücrelerdeki laktat dehidrogenaz (LDH) sitoplazmik enziminin membrandan süpernatana geçmesine dayanmaktadır. Bu sayede nekrotik, apoptotik ve diğer hücrel hasarlar gösterilebilmektedir. Laktatın piruvata dönüşümü sırasında üretilen NADH'ın sayesinde ölçüm yapılabilmektedir. Sarı tetrazolyum tuzunun NADH tarafından kırmızı, suda çözünebilen formazana dönüşürken 492 nm'de absorbanı vermektedir [69].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Malzemeler

Çalışmada kullanılan Hypericin (56690, %95 saflıkta, Sigma) firmasından temin edilmiştir. Dimetil sülfoksit HY'nin çözdürülmesinde ve hücrelerin dondurulma aşamalarında kullanılmıştır. MTT (Sigma, 475989) ile hücre canlılık analizleri yapılmıştır. ROS ölçümü DCFHDA (Abcam, ab113851) ile ölçülürken, apoptoz ölçümü TumarTac kiti (Trevigen, 4815-30K) ile yapılmıştır. Hücre sayımı için Tripan Mavisi (Hyclone, Logan, UT) kullanılmıştır. Akridin oranj (Sigma, A6014-10G) /Propidyum iyodit (Appllichem, 01A2261,0025) floresan boyaarı hücre ölüm tipinin belirlenmesinde kullanılmıştır. FITC (Sigma, 124546) ile nanopartiküllerin hücre alımı değerlendirilmiştir.

3.2. Işıma Cihazı

Işıma cihazı içerisinde 12 adet L18W/30 floresan lambadan oluşmaktadır ve üzerindeki yarı şeffaf plak sayesinde direk ışığın etkisini engellerken gerekli ışık kuvvetinin geçişine izin vermektedir. Lambaların gösterdiği yayılım aralığı HY'nin maksimum absorbans değerinin de olduğu 590-600 nm arasındadır. Cihazın ısınmasının engellenmesi amacıyla 3 tarafında 8 adet fan bulunmaktadır. Kullanılan ışık şiddeti lüks/cm² birimidir.

Işıma uygulaması için deney grupları ile 24 saat inkübasyon sonrasında besiyeri değiştirilmektedir. Işıma cihazının 45 dk çalıştırılmasından sonra ışık kuvveti lüksmetre ile ölçülmektedir. İstenilen joule/cm² değeri için gereken süre hesaplandıktan sonra pleytler cihazın üstüne yerleştirilmektedir. Sürenin bitiminde ise hücreler %5 CO₂ ve 37 °C'de inkübasyona bırakılmaktadır.

3.3. Hücre Kültürü

Çalışmada insan kanser akciğer epitel hücresi kullanılmıştır. A549 (Katalog no. CCL-185) hücre hattı American Type Cultural Collection (ATCC) firmasından temin edilmiştir. Hücre hattı %10 fetal sığır serumu (FBS) ve %1 Penisilin/streptomisin içeren RPMI (Roswell Park Memorial Institute) besiyerinde (Cegrogen Biotech, Almanya) %5 CO₂ içeren etüvde 37 C°'de inkübe edilerek üretilmiştir.

3.4. Hücre Hattının Üretilmesi ve Pasajlanması

A549 hücreleri konfluent hale geldikten sonra, tripsinize edilerek yüzeyden ayrılmaları sağlanmıştır. 25 cm²'de flastaki hücreler Tripsin/EDTA eklenmesiyle etüve kaldırılarak birkaç dakika bekletilmiştir. Tripsin/EDTA'nın üzerine hacimsel olarak en az 3 katı olmak üzere besiyeri eklenerek pipetaj yapılmıştır. Üçte biri alınmak üzere yeni flaska aktarılan süspansiyon besiyeri ile pipetaj yapılarak karıştırılmıştır.

3.5 Üreme Eğrisi ve İkilenme Zamanının Hesaplanması

A549 hücrelerine ait üreme eğrisi oluşturularak ikilenme süresi hesaplanmış, bulunan süre çalışmalar için kullanılmıştır. Üreme eğrilerinin çıkartılması için aşağıdaki işlemler yapılmıştır:

1. A549 hücrelerinin başlangıç sayısı 5×10^4 hücre/ml olacak şekilde 40 ml hücre süspansiyonu hazırlanmıştır.
2. 10 gün boyunca 2 tekrar yapmak amacıyla 20 adet 3 cm²'lik hücre kültürü petrilere 2 ml/petri olacak şekilde hücre süspansiyonu paylaştırılmıştır. 37 °C ve % 5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakılmışlardır.
3. 2 saat sonrasında 2 petri için besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra 1 ml tripsin/EDTA (etilen diamin tetra asetik asit) (Hyclone Logan, UT, USA) eklenerek hücreler yüzeyden kaldırılmıştır. Hücre sayımı yapılarak 2 petrinin ortalaması alınmış ve bu sayı t₀ olarak kaydedilmiştir.
4. Her gün aynı saatte aynı işlemler yapılmış ve hücre sayıları kaydedilmiştir. Excel programı ile üreme eğrisi çizilmiş ve ikilenme süresi hesaplanmıştır.

3.6. Mikoplazma Testi

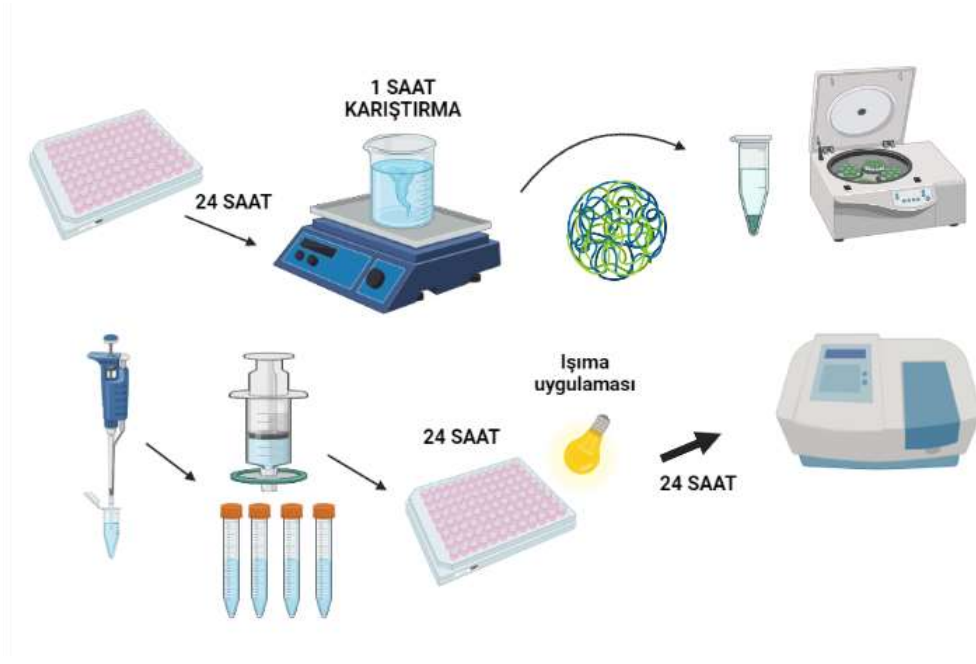
Hücrelerin analizlere başlamadan önce sterilitesinin kontrolünün yapılması için mikoplazma testi yapılmaktadır. Hücreler 3 kez antibiyotiksiz besiyeri ile pasajlandıktan sonra hücre sayısı 6×10^5 / ml olacak şekilde 6 gözlü plaklara ekilmiştir. 2 gün inkübasyonun sonunda besiyeri uzaklaştırılır ve asetik asit/metanol solüsyonu ile 10 dk muamele edilir. PBS ile yıkama yapıldıktan sonra 300 nM olarak hazırlanan DAPI boyası PBS ile hazırlanarak 15 dk hücreler ile karanlıkta bekletilmiştir.

DAPI boyasında uzaklaştırılması ile mounting medium her göze 1 damla damlatılarak görüntüler alınmaktadır.

3.7. Hiperisin'in Çözdürülmesi ve Stoklarının Hazırlanması

1 mg Hiperisin (HY) saflık >%95 HPLC (Sigma Aldrich Chemical co., Germany), 1 ml Dimetil Sülfoksit (DMSO) ile çözdürülmüştür. Hazırlanan ana stoktan serumsuz RPMI ile ara stoklar hazırlanmıştır. Ara dozlar hazırlandıktan sonra 0,22 µM filtreden geçirilerek steril hale getirilmiştir. Hazırlanan dozlar -80°C'ye kaldırılmıştır.

Deney planı Şekil 3.1.'de, çalışmadaki gruplar Çizelge 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3. 1. Deney planının gösterimi

Çizelge 3 1. Deney Gruplarının Gösterilmesi

Grup	HY/NP	HY konsantrasyonu	Işıma
Grup 1 (Kontrol)	-	-	+
Grup 2 (DMSO)	-	-	+
Grup 3	HY	200 nM	+
Grup 4	HY	400 nM	+
Grup 5	HY	600 nM	+
Grup 6 (Işıma Kontrol)	HY	600 nM	-
Grup 7	NP	-	+
Grup 8	NP	200 nM	+
Grup 9	NP	400 nM	+
Grup 10	NP	600 nM	+
Grup 11	NP	600 nM	-

3.8. Nanopartiküllerin Sentezi

3.8.1 Hiperisin Yüklü Nanopartiküllerin Sentezi

Kitosan (0.5 w/v) 20 ml %1 asetik asit içerisinde ve TPP (0.7 mg/ml) olacak şekilde çözülmüştür. İlk ölçülen kitosan çözeltisi pH 4.0 iken, pH NaOH ile 4.6'ya getirilmiştir. Belirlenen 3 HY konsantrasyonu (200 nM, 400 nM, 600 nM) eklendikten sonra TPP 1666 µl olacak şekilde damla damla eklenmiştir. TPP'nin eklenmesiyle Kitosan nanopartiküller iyonik jelasyon yöntemi ile sentezlenmiştir. TPP sonrası magnetik karıştırıcıda 600 rpm'de 60 dk boyunca inkübe edilmiştir. Santrifüj için 5 °C, 30 dk ve 9000 rcf ayarlanmıştır. Santrifüj ile elde edilen nanopartiküller üç kez saf su ile yıkanmıştır [70].

3.8.2. Nanopartiküllerin Hücre ile İnkübasyonu

- 1- Santrifüj edildikten sonra çöken peletin üstüne serumsuz besiyeri eklenerek toplam hacim 5 ml olacak şekilde pipetaj yapılmıştır.
- 2- Süspansiyon olan karışım 0,45 µM porlu şırınga filtresinden geçirilmiştir.
- 3- Her doz grubu 100 µl/göz olacak şekilde dağıtılmış ve %5 CO₂'li etüvde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

3.9. Nanopartikül'lerin Karakterizasyonu

Kitosan nanopartiküllerinin morfolojik özelliklerinin anlaşılabilmesi için odaklanmış İyon Demeti-taramalı elektron mikroskopu (FIB-SEM) (GAIA 3, Tescan) ile görüntüleri alınmıştır. NP'ler metal stap üzerine 10 µl eklenmiş ve kurutulmuştur. Altın kaplama yapıldıktan sonra görüntüler alınmıştır.

3.10. Kitosan Nanopartiküller'in Hücresel Alımı

Fluorescein-5-isothiocyanate (FITC) boyası ile kitosan inkübe edilerek NP'lerin hücre içine alınmaları gösterilmiştir.

- FITC konsantrasyonu 1 mg/ml olacak şekilde 10 mg hassas terazide ölçülerek PBS çözeltisi içerisinde karıştırılır.
- 10 ml kitosan çözeltisi 60 dk magnetik karıştırıcıda 600 rpm'de karıştırılmıştır.
- Kitosan:FITC oranı 10:1 (v/v)'a karşılık gelecek şekilde FITC solüsyonu kitosan solüsyonuna eklenir.
- FITC-kitosan solüsyonu pH değeri 9.50'a 10 N NaOH ile yükseltilir.
- 3 saat karanlıkta magnetik karıştırıcıda bekletilir.
- FITC bağlı kitosanın çökeltilmesi için 3000 g'de 10 dk santrifüj edilir.
- Süpernatant uzaklaştırılır ve yerine distile su eklenerek berrak renk oluşana kadar yıkama yapılır.
- Çökelti halinde gece boyunca karanlıkta +4 °C'de bırakılır.
- Süspansiyon %1 asetik asit ile 10 ml'ye tamamlanır ve vortekslenir.
- NP deney prosedürü aynı şekilde uygulanır.

3.11. MTT Analizi

MTT [3-(4,5-dimetiltiyazol-2il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür] testi sitotoksisite testlerinin arasında en sık tercih edilmesinin yanı sıra hücre proliferasyonu ile mitokondriyal hasarın araştırılması için kullanılmaktadır. İlaç yüklü NP'lerin IC₅₀ dozlarının belirlenmesi için uygulanmıştır. İlk olarak hücreler 96 kuyucuklu plaklara 6x10⁴/ml olacak şekilde ekilerek, 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ortamdaki besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra, belirlenen dozlarda HY ve HY-NP konsantrasyonları serumsuz besiyeri ile hazırlanarak hücreler ile 24 saat muamele edilmiştir. Işık uygulamasından sonraki inkübasyon süresinin sonunda her kuyucuğa 13 µl/kuyucuk olacak şekilde MTT çözeltisi eklenmiştir ve 3 saat karanlıkta bekletilmiştir. Formazan kristallerinin çözünmesi için 100 µl/kuyucuk olmak üzere DMSO/Amonyak kullanılmıştır. Absorbans değerleri mikropalak okuyucuda (BIO-TEK µQUANT) ölçülmüştür.

Veriler elde edildikten sonra hesaplama;

$$\frac{\text{Doz grubu OD ortalaması}}{\text{Kontrol grubunun OD ortalaması}} \times 100$$
 şeklinde yapılmıştır.

3.12. TumorTac ile Apoptoz Tayini

TumorTac kiti (Cat no:4815-30-K) ile hücrelerin çekirdeklerindeki kromozomal kırıklara bağlı apoptoz oluşumu gözlemlenebilmektedir. Bunun için hücreler 4 well chamber slide'lara 10×10^4 /ml olacak şekilde ekilmiştir. Işımadan sonraki 24. saatte hücrelerden besiyeri uzaklaştırılarak paraformaldehit ile fikse edilmiştir. Fiksasyonun ardından PBS ile yıkama yapılmış ve enzimi ve nükleotidleri içeren işaretleyici buffer ile inkübe edilmiştir. Reaksiyonu durdurmak için solüsyon eklendikten sonra Strep-HRP enzim kompleksi ile DAB enzimi bağlandırılır ve nükleotidlerin etiketlenerek görüntülenebilmesi sağlanır.

3.13. AO/PI Boyası ile Hücre Ölüm Tipinin Belirlenmesi

AO/PI boyaması hücrelerde görülen ölüm tiplerinin hangi oranlarda olduğunu belirlemek için kullanılmıştır. Canlı hücrelerde yeşil renk ve çekirdek bütünlüğü görülürken, apoptotik hücrelerde çekirdek parçalı görünmektedir. Apoptozda hücreler büzülmesinden dolayı küçülürken, nekrozda daha büyük hücreler görülür. Nekroz ve sekonder nekrozda hücreler kırmızı görülürken, sekonder nekrozun çekirdeğinde parçalıdır. A549 hücresi 24 gözlü plaklarda 5×10^4 /ml olacak şekilde ekilmiştir. HY-NP ve ışık uygulamasından 24 saat sonra hücreler 1:1 oranında hazırlanan AO/PI (AO 25 µg/ml: PI 25 µg/ml) ile 30 sn bekletildikten sonra inverted mikroskopta (Olympus IX71, Japonya) incelenmiştir.

3.14. Oksidatif Stres Tayini (ROS Ölçümü)

Hücre içindeki hasara bağlı oluşan reaktif oksijen türlerinin ölçümü floresan probalar ile yapılabilmektedir. Bu çalışma için 2',7'-dikhlorodihidrofluorescein diasetat probu tercih edilmiştir. Çalışma için DCFDA testi (ABCAM Cat No:113851) kullanılmıştır. Hücreler 96 kuyucuklu plaklara 10×10^4 hücre/ml olacak şekilde ekilmiştir. Uygulama gruplarının uzaklaştırılmasından sonra 1x PBS ile yıkama yapılmıştır. HY ve ışık uygulamasından sonraki 23. saatte 40 µM DCFDA solüsyonu eklenerek 37°C'de 45 dk bekletilmiştir. 1x PBS ile ortamdaki boya uzaklaştırılmıştır. Biotek Synergy h1 Hibrit

Reader'da fluorimetrik olarak eksitasyon 485 nm ve emisyon 535 nm'de okunmuştur. Sonuçlar ölçülen floresan yoğunluğu göre kat bazında hesaplanmıştır.

3.15. LDH Sitotoksosite Testi

LDH analizi için hücreler 6×10^4 /ml 96 gözlü plaklara 24 ve 48 saat için ekilmiştir. 1 gün inkübe edildikten sonra, uygulama için belirlenen konsantrasyonlar ile 24 saat muamele edilmiştir. Işık uygulamasından sonraki inkübasyon süresinin sonunda plaktaki her gözden 50 µl alınarak yeni bir plağa aktarılmıştır. Reaksiyon karışımından 50 µl/göz eklenerek oda sıcaklığında karanlıkta 30 dk bekletilmiştir. Durdurma solüsyonunun da 50 µl/göz eklenmesiyle 490 nm ve 680 nm'de spektrofotometrede okutulmuştur.

3.16. İstatiksel Analiz

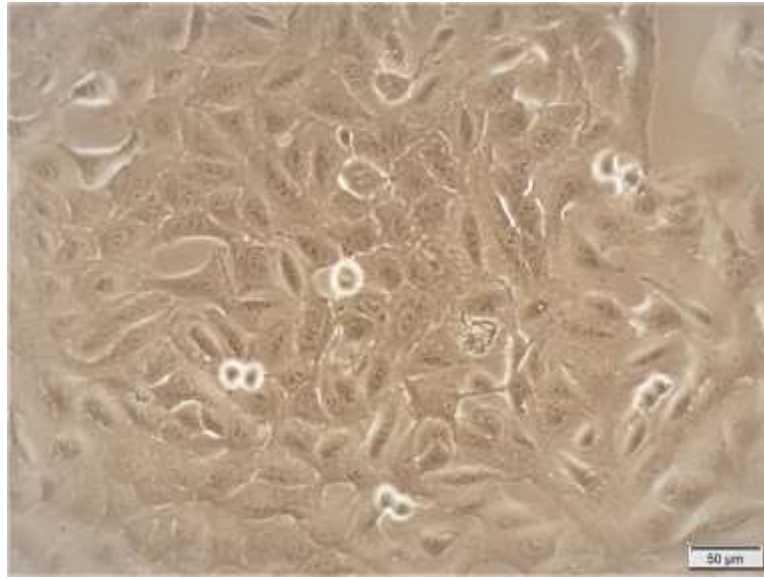
Tüm deneyler 3 kez tekrar edilmiş ve verilerin ortalamaları alınmıştır. İstatiksel analiz için Statistica (TIBCO Statistica 8) kullanılmıştır. Grup içerisindeki ikili karşılaştırmalar Tukey testi ile yapılmıştır. $P \leq 0.05$ anlamlılık derecesi olarak kabul edilmiştir.

4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Tez çalışması kapsamında A549 akciğer kanseri hücrelerine kitosan nanopartiküller aracılığıyla HY aracılı FDT uygulanarak HY'nin oluşturacağı anti-kanser cevap araştırılmıştır. Tezin amacı HY'nin nanopartikül içinde veya tek başına hücreye uygulanması sonrası hücresel cevapta oluşabilecek farklılıkları göstermektir. Bu doğrultuda oluşturulan nanopartiküller, hücre ile inkübe edilmiş ve FDT kapsamında HY aktivasyonu için ışına uygulanmıştır. Işıma süresi itibariyle 24 saat sonunda hücresel analizler uygulanmıştır. Tez kapsamında oluşturulan nanopartiküllerin karakterizasyon çalışmaları yapılmış ve sonrasında A549 akciğer kanser hücrelerinde hücre ölüm yolları araştırılmıştır.

4.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Hücre Hattının Pasajlanması

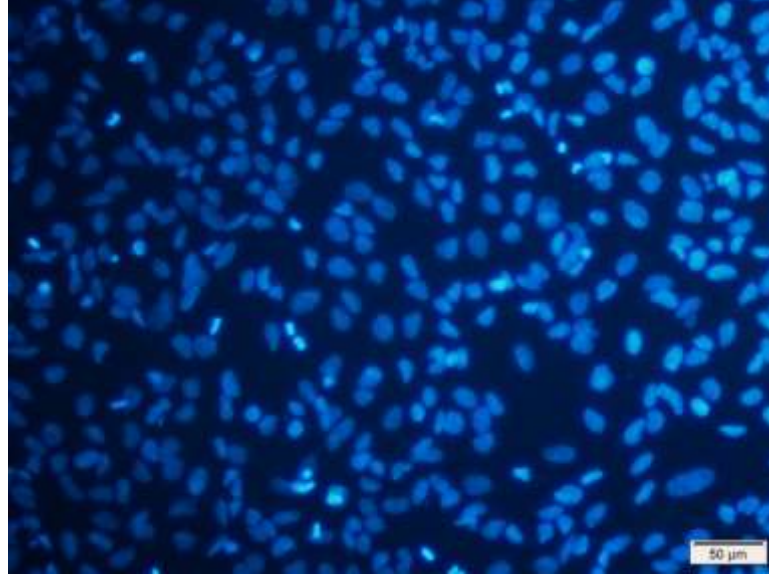
A549 hücreleri iki günde bir pasajlanarak hücre kültüründe sürekli olarak devam ettirilmiştir. Tüm deneylerde 18-25. pasajlar kullanılmıştır. Şekil 4.1'de görülen hücreler adherent özelliğe sahiptirler. Hızlı proliferasyonlarından dolayı deneylerde kullanılan hücre sayısı düşük aralıkta ($2-6 \times 10^4/\text{ml}$) tutulmuştur. Hücrelerin ikilenme zamanı 22 saat olarak bulunmuştur. A549 hücrelerinin 24. pasajına ait hücrenin resmi aşağıda verilmiştir (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. A549 hücrelerine ait inverted mikroskop görüntüsü.

4.2 Mikoplazma Tayini

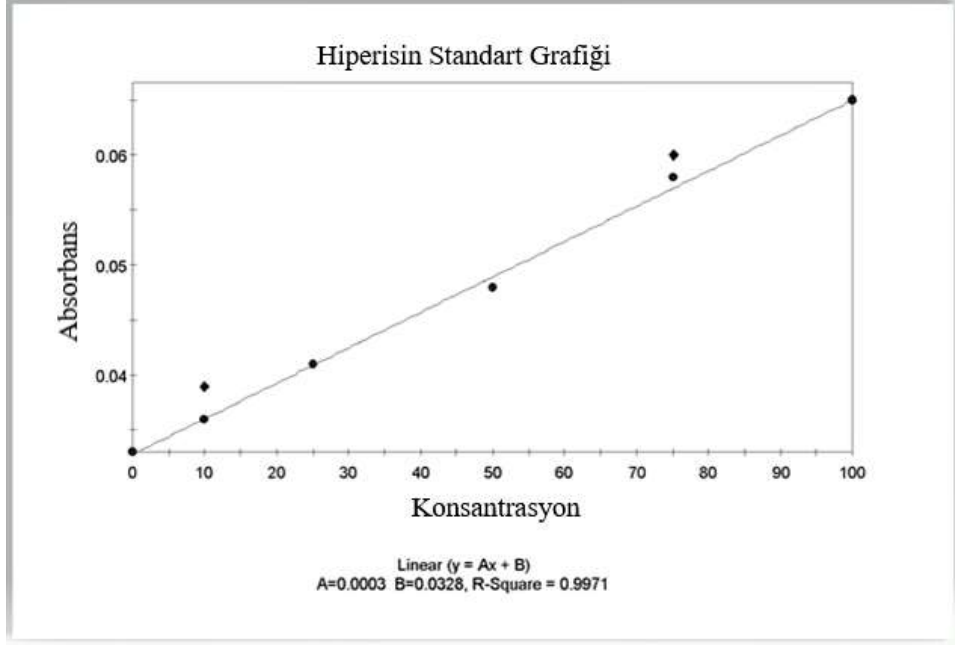
A549 hücresi için çalışmalara başlanmadan önce sterilite testi olarak mikoplazma tayini yapılmıştır. Aşağıdaki Şekil 4.2.'de DAPI ile çekirdekleri boyanan hücreler gösterilmiştir.



Şekil 4.2. A549 hücrelerinde DAPI boyamasının inverted mikroskop görüntüsü. Mikoplazma tayini yapılan hücrelerde floresan DAPI çekirdek boyamaları değerlendirildiğinde mikoplazmaya rastlanmamıştır.

4.3. HY Standart Grafiğinin Oluşturulması

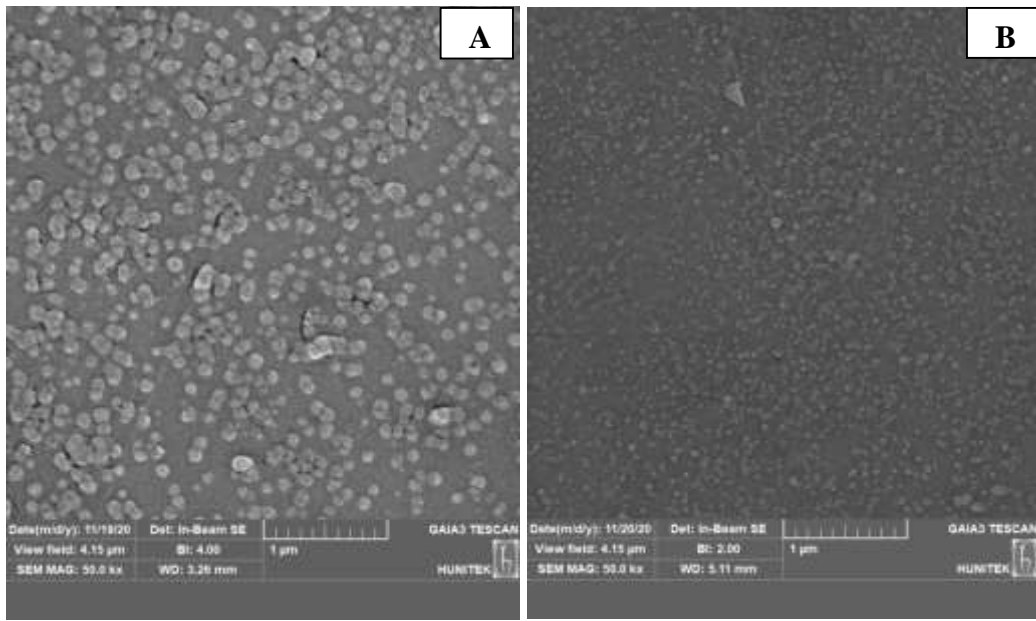
Hazırlanan konsantrasyonlarının OD değerlerinin alınması ile çalışmalara başlanmadan önce dozların konsantrasyonları doğrulanmıştır. Dozlar 100 µM'lık hazırlanan derişimden ultra saf su ile seyreltilerek hazırlanmıştır. HY'nin spektrofotometre'de 590 nm'de okutulması ile alınan sonuçlar Şekil 4.3.'de görüldüğü üzere R^2 'si 0,9971'ye ulaşmıştır. Doza bağlı olarak OD değerinde artış olmuştur.



Şekil 4 2. HY'nin 10 µM, 25 µM, 50 µM, 75 µM ve 100 µM konsantrasyonlarında hazırlanan HY'nin standart grafiği.

4.4. Nanopartiküllerin SEM ile Morfolojik Analizi

Hiperisin yüklü NP'ler ve boş NP'ler taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile analiz edilmiştir. Alınan SEM görüntüleri sonucunda boş NP, HY-NP 200 nM gruplarına ait mikrograflar Şekil 4.19'da verilmiştir. SEM analizi için, santrifüj sırasında ultra saf su ile yıkama yapıldıktan sonra örnekler süspansiyon edilmiş ve belli oranda seyreltilerek hazırlanmıştır.



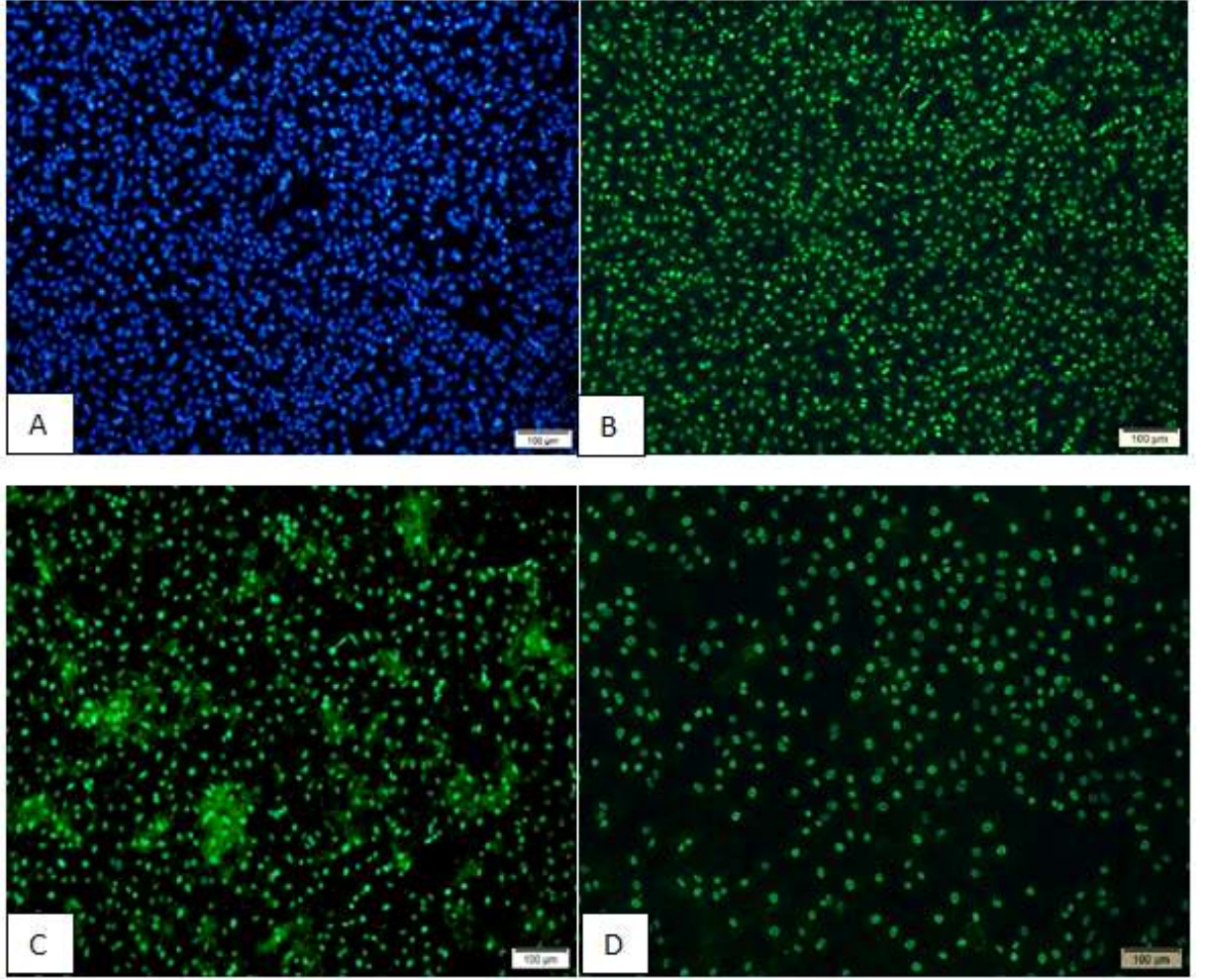
Şekil 4.3. SEM görüntüleri. A: Boş NP, B: HY- NP

Görüntüler incelendiğinde partiküllerin küresel ve nano boyutta olduğu anlaşılmaktadır. Her resim aynı büyütmede sunulurken, boyutları SEM görüntüleri üzerinden değerlendirilmiştir. Boş NP'nin boyutu 150-200 d.nm arasında ölçülürken, HY-NP'nin boyutu ise 250-300 d.nm arasında bulunmuştur.

Kitosan konsantrasyonunun partikülün hidrodinamik yarıçapına önemli etkisinin olduğu bilinmektedir. Daha yüksek deasetilasyon değerlerinde etkinin daha da güçlendiği bildirilmiştir [82]. Bu sebepten ötürü çalışmada %75-85 deasetilasyon derecesine sahip kitosan kullanılmıştır.

4.5. Kitosan Nanopartiküller'in Hücresel Alımının Gösterilmesi

FITC boyası kitosan NP'lere bağlandıktan sonra 24 saat boyunca hücreler ile inkübe edilmiş ve inverted mikroskopta görüntüler incelenmiştir. Kontrol grubundaki hücrelerde yeşil boyanma olmadığından görüntülerinin alınabilmesi için DAPI çekirdek boyaması yapılmıştır. Kontrol grubu, HY-NP 200 nM, HY-NP 400 nM ve HY-NP 600 nM gruplarına ait görüntüler Şekil 4.18.'de verilmiştir.



Şekil 4.4. FITC-Kİ-NP'lere ait floresan ataşmanlı inverted mikroskop görüntüleri. A: Kontrol, B: HY-NP 200 nM, C: HY-NP 400 nM, D: HY-NP 600 nM grupları

Yapılan ön çalışmalardan sonra, Kitosan:FITC oranı 10:1 ml olarak kullanılmasına ve inkübasyon süresinin 1 saatten 3 saate çıkarılmasına karar verilmiştir.

Floresans boyanın hücreye daha iyi alınabilmesi için hücreler Tween 20 içeren fiksatifle muamele edildikten sonra boyanmıştır. Kontrol grubu ile HY-NP grupları arasındaki fark Şekil 4.5'de görülmektedir. NP gruplarındaki hücrelerin çekirdeklerinin yeşile boyanması ile NP'lerin hücreye alınmasının yanı sıra Kİ-NP'lerin çekirdek zarından geçebildiği de gösterilmiştir. FITC'nin 6 saat hücre ile inkübasyonu sonucunda çekirdek zarından geçebildiği bilinmektedir.

Kİ-NP'lerin hücrede izlenebilmeleri için floresan işaretleme yapılmaktadır. İşaretleme yapılan moleküller arasında FITC gibi amin reaktif bileşenler bulunmaktadır. Yapılan modifikasyonun kitosanın fizikokimyasal yapısını etkilemediği de kontrol edilmektedir.

Tez çalışmasında da hücre alımını gösterilmesi için FITC ile kitosan önceden bağlanarak NP sentezlenmiştir. DAPI boyaması sonucunda kontrol hücreleri ile kıyaslandığında KI-NP'lerin hücreye alındığı görülmüştür.

FITC ile işaretlenen NP'ler hücrelerin işaretlenmesinde tercih edilmektedir. KI-NP'lerin hücre alımının FITC ile gösterildiği birçok çalışma bulunmaktadır. Huang ve ark.'ları [80], yaptıkları çalışmada FITC bağlı kitosan nanopartiküllerin A549 hücresi tarafından alımını incelemiştir. Hücre alımını sıcaklık ve konsantrasyon bağımlı olduğu ve kitosan nanopartiküllerinin alımını kitosana göre 1.8 kat fazla olduğu görülmüştür. Sonuç olarak KI-NP'ler istenilen maddenin taşınımında ve hücrelerin işaretlenmesinde etkili yollardan biri olarak kullanılmaktadır.

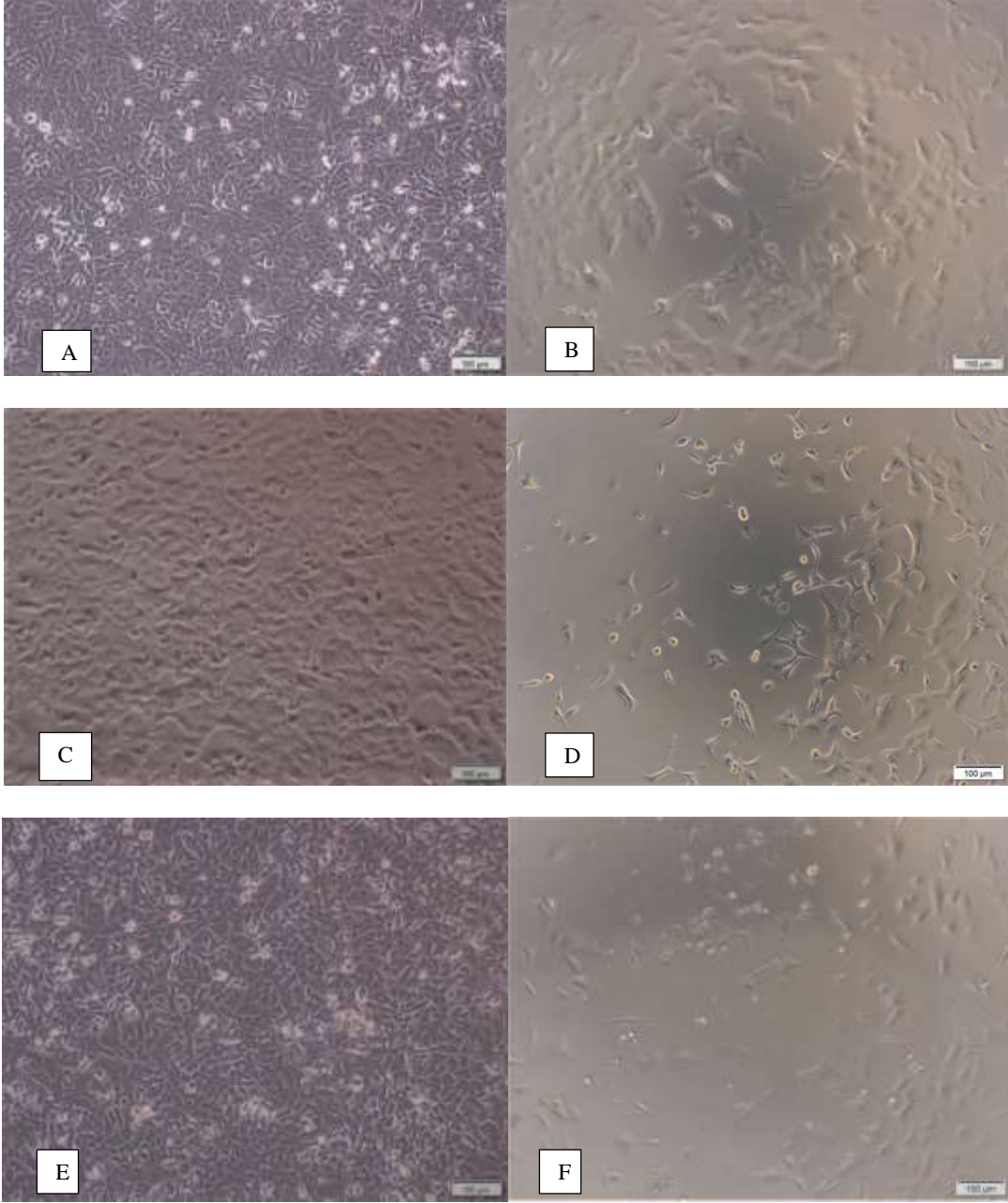
4.6. MTT Analizi Sonuçları

A549 hücrelerinde 6 j/cm^2 ışımaya ile HY aktivasyonundan 24 ve 48 saat sonra inverted mikroskop görüntüleri Şekil 4.6'de verilmiştir.

Şekil 4.7.'de HY ve HY-NP uygulama grupları ile 24 ve 48 saat sonundaki hücre canlılığında azalma görülmüştür. Artan dozlar ile orantılı olarak azalma olduğu görülmektedir. Yapılan SPSS probit analizi sonucunda IC_{50} değeri 24 saat için 640 nM olarak hesaplanmıştır.

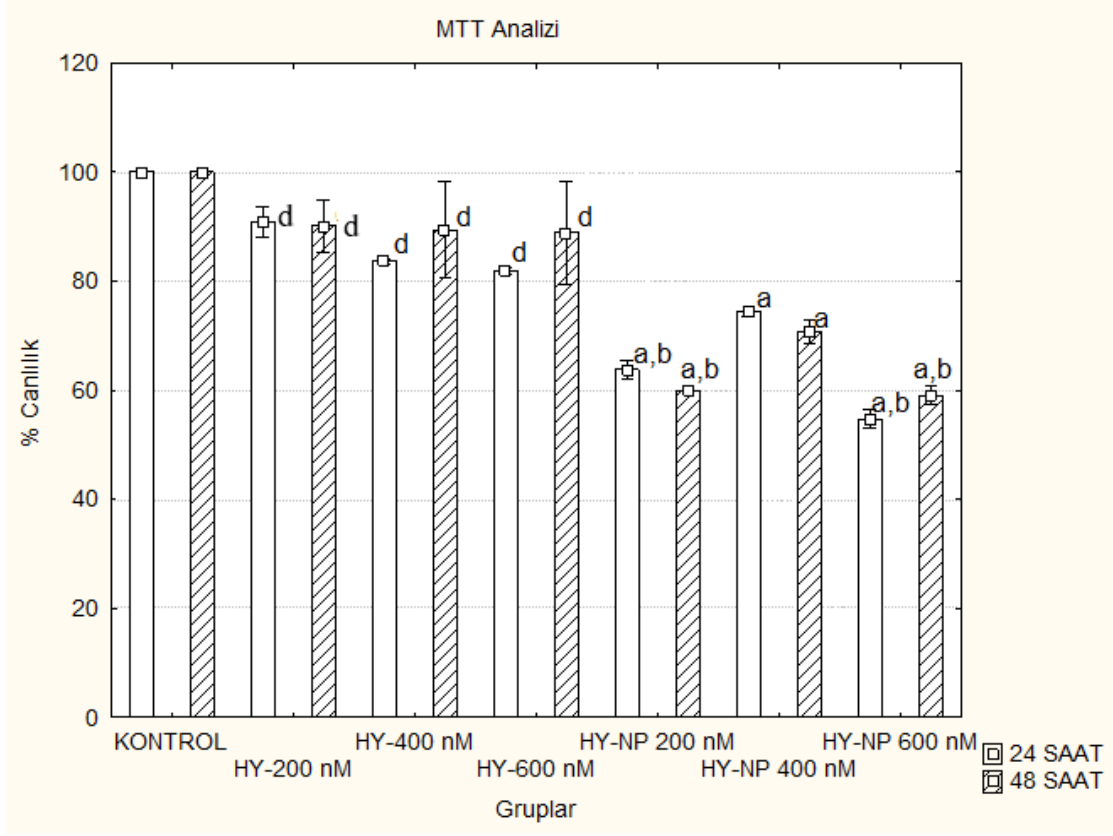
Tüm HY ve HY-NP dozları ile ışımaya aktive edilmeyen karanlık kontrol grupları oluşturulmuş ve MTT analizi yapılmıştır. Karanlık kontrol grupları ile HY uygulanmayan kontrol grubu arasında hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. Işıma ile aktivasyonu yapılan gruplar arasında ise kontrol ve HY grupları arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Ayrıca boş NP ve HY içeren NP grupları istatistiksel olarak karşılaştırılmış olup, gruplar arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir.

Tüm gruplar değerlendirildiğinde NP gruplarındaki hücre canlılığının azalmasının HY gruplarına göre daha fazla olduğu görülmektedir. Bu sonucun nanopartiküller ile HY'nin hücre içine daha çok alınması sayesinde olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.5. A549 hücrelerinin inverted mikroskop görüntüsü. A: HY 200 nM, B: HY-NP 200 nM, C: HY 400 nM, D: HY-NP 400 nM, E: HY 600 nM, F: HY-NP 600 nM

Şekil 4. 7’de de görüldüğü gibi 24 saat sonunda % canlılık HY-NP 200 nM’de %76 iken, 48 saatin sonunda %59’a kadar düşmüştür. HY-NP 600 nM’de ise 24 saatte %59 ve 48 saatte %56 sonuçları görülürken yakın değerlere sahip olduğu dikkat çekmektedir.



Şekil 4. 6. A549 hücrelerinde MTT testinin hücre canlılık analizi sonuçları. a: Kontrole göre, b: HY-200 nM'ye göre, c: HY-NP 200 nM'ye, d: HY-NP 600 nM'ye göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($P \leq 0,05$).

Şekil 4. 7'deki grafikte 24 ve 48 saatlik HY ve HY-NP gruplarının uygulanması ile elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. HY-NP'nin tüm grupları kontrole göre anlamlı iken, HY grupları kontrole göre anlamlı bulunmamıştır. HY-NP 200 nM grubunda HY 200 nM'ye göre de fark bulunmuştur ($p \leq 0,05$). HY-NP 600 nM grubunda ise diğer NP grupları haricindeki tüm gruplar 24 ve 48 saat için anlamlı bulunmuştur. Akciğer kanserleri ile yapılan kitosan NP içeren çalışmalar az olsa da, A549 hücre hattı ile yapılmış HY aracılı FDT çalışmaları bulunmaktadır. Penjweini ve ark. yaptıkları çalışmada [71], HY ile Poli (vinilpirolidon) ile bağlayarak A549 ve HLF (insan akciğer fibroblast hücresi) hücreleriyle farklı sürelerdeki ışına uygulaması sonucu hücresel ölüm oranlarını karşılaştırmıştır. Işık kuvveti ve uygulama süresi arttırıldığında, ölen hücrelerin yüzdesi A549 hücrelerinde %6'dan %39'a yükselirken aynı koşullarda HLF hücresi %1-13 arasında kalmıştır. HY'nin floresan ışınmasının ölçülmesiyle, A549 hücresinde HY'nin daha yoğun bulunduğu görülmektedir.

Hücrenin hangi ölüm yolunu tercih edeceğini IDM'nin birikim yaptığı yer belirleyebilmektedir. HY hücre içerisinde mitokondri ve lizozom organellerinin zarında birikim yapabilmektedir. Penjweini ve ark.'nın yaptığı çalışmada [71], PVP-HY'nin A549 hücrelerindeki birikim yaptığı bölgeler araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda, sitoplazmada en yoğun bulunurken, zardaki lipidlerin polar kısımlarında daha yoğun bulunduğu görülmüştür. Spesifik olarak mitokondriyi boyayabilen floresan bir boya olan MitoTracker Green sayesinde A549 hücresinin mitokondrisinde de HY'nin yoğun olarak bulunduğu kanıtlanmıştır.

HY doz gruplarında hücre ölümünün NP içeren gruplara oranla daha az görülmesinin nedeninin HY'nin hücreye girememesi olduğu düşünülmektedir. HY'nin hücre alımı ve hücrede birikiminin lipofilitesi tarafından veya serum lipoproteinleri tarafından etkilenebileceği bildirilmiştir [24]. Bu sebeplerle HY, nanopartiküller ile çalışılmaktadır. Mühleisen ve ark. yaptığı çalışmada [72], HY demir oksit NP'lere yüklenerek HT-29 kolon karsinoma hücresinde serbest HY'ye göre daha kısa sürede hücreye alındığını ve ROS'un arttığını belirtmişlerdir. Zeisser-Labouebe ve ark. [26], HY'nin FDT etkilerinin polilaktik asit ile kapsüllendirerek *in vitro* etkilerine baktıklarında, HY-NP gruplarının serbest HY'ye göre tümör hücrelerinde daha etkili olduğunu gözlemlemişlerdir.

Kitosanın düşük toksisitesini gösteren birçok çalışma bulunmaktadır. Çalışma süresince yapılan MTT testlerinin sonucunda boş NP gruplarının OD değerlerinin kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu sonucun kitosanın hücrede liziz olması sonucu hücrede protein kaynağı olarak kullanılmasına bağlanmıştır. Bazı çalışmalarda ise kitosan nanopartiküllerin toksisitesinin düşürülmesi ve yavaş ilaç salımı oluşturabilmek için kullanılmaktadır. Guo ve ark. [73], kitosan kaplı altın nanopartikülleri A549 hücresinde ve *in vivo* koşulda çalışmıştır. NP'lerin pH bağımlı davranış sergilediğini, pH 5.5 değerinde 2 saat içerisinde %70'i salınırken, pH 7.4'te 24 saatte %75'inin salınması sonucu kanıtlayabilmişlerdir.

Kitosanın suda çözünebilen bir polimer olması nedeniyle hidrofobik ilaçlar ile çalışmalar halen sürmektedir. Duse ve ark., yaptıkları çalışmada [74], kitosan nanopartiküllere hidrofobik yapısı bilinen zerdeçal yükleyerek ışık ile aktivasyonu sonucu A549 hücresinde etkinliğini araştırmışlardır. İlacın kitosana yüklenmesini çapraz bağlayıcının solüsyonuna ekleyerek arttırabilmişlerdir. NP'lerin hücrenin çekirdeğinin yakınında lokalize olduğunu ve inkübasyon süresi uzatılsa bile boş NP'nin

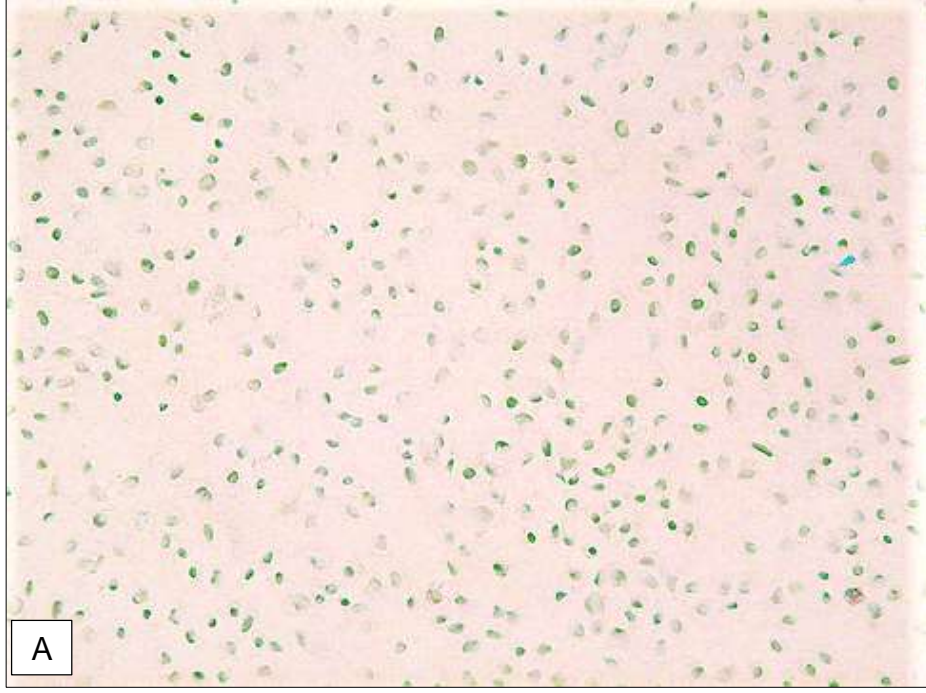
hücrede ROS artışına sebep olmadığı görülmüştür. Çalışmanın sonunda zerdeçalın sahip olduğu yüksek anti-kanser etkinin kontrol edilebilir şekilde uygulanabilir hale getirildiği sunulmuştur.

HY'nin hücreye alım çalışmaları ile ilişkili olarak zar proteinleri de araştırılmaktadır. Akciğer kanserine sahip birçok hasta platinum ilaç olarak adlandırılan, hemen hemen tüm katı tümörlerde etkili olan ilaçlar ile tedavi görmektedir. İlaçların kuvvetli etkisine rağmen hücrelerde direnç gelişimi görülebilmektedir. Bunun sebebi olarak hücre zarında bulunan proteinler (ABC taşıyıcıları) görülmektedir. ABC proteinleri birçok çalışmada direnç mekanizmaları ile ilişkilendirilmektedir. Vargova ve ark. [75], yaptıkları çalışmada HY ve A549 hücresinin etkileşimini araştırmış ve ABC transport proteinlerinden olan BCRP'nin (göğüs kanseri direnç proteini) ifadesi ile HY'nin ilişkili olabileceğini öne sürmüşlerdir. HY'nin BCRP ekspresyonunu arttırabilirken, BCRP inhibitörlerini hücreye uyguladıklarında HY'nin birikiminde arttığını bildirmişlerdir. Bu etkinin yüksek dozlarda daha etkili görülebileceği ve A549 hücresi için çok sayıda çalışma yapılmasına ihtiyaç olduğu vurgulanmıştır.

4.7. TumorTac Kiti ile Apoptoz Sonuçları

Kullanılan TumorTac apoptoz kiti ile DNA hasarına bağlı oluşan apoptoz gösterilmek istenmiştir. Terminal deoksinükleotidil transferaz dUTP uç etiketleme (TUNEL) metodu olarak adlandırılan deneyde apoptoz sonucu oluşan DNA fragmentlerinin Deoksinükleotidil transferaz enzimi (TdT) ile bağlanmasıyla, enzim DNA'nın kırık bölgelerine nükleotidleri eklemektedir. Biotinli nükleotidler streptavidin-fragmentlerin görünmesini sağlar. Çekirdek boyası olan Metil green ile DNA hasarı olmayan hücrelerin boyanması sayesinde karşılaştırma yapılabilmektedir.

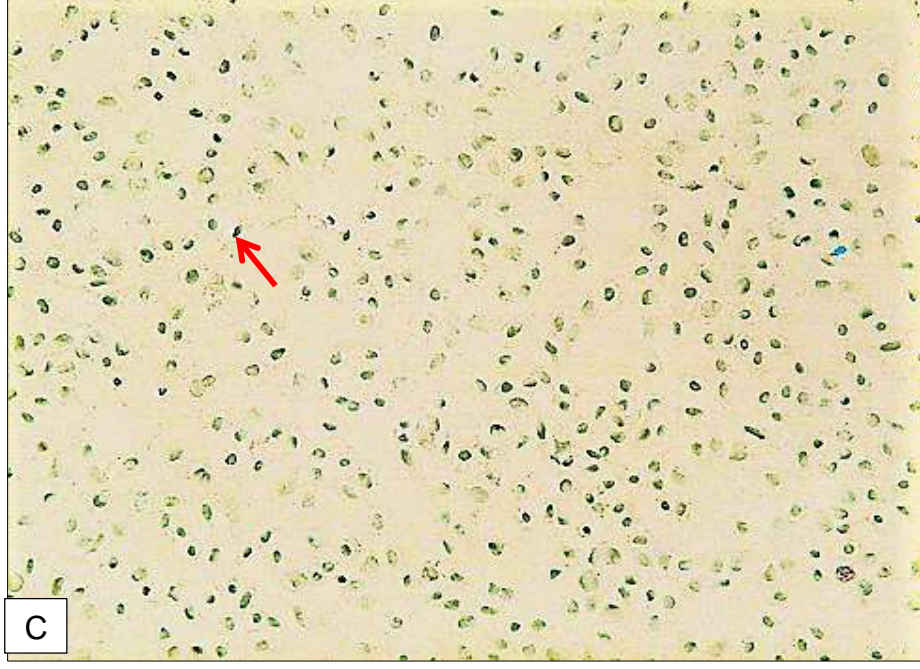
DNA hasarı olan hücreler kahverengiye boyanırken, sitoplazmanın da kahverengi görünmesi geç apoptoz veya nekroz ile açıklanmaktadır. Şekil 4.8.-4.15'te gruplara ait resimler gösterilmektedir.



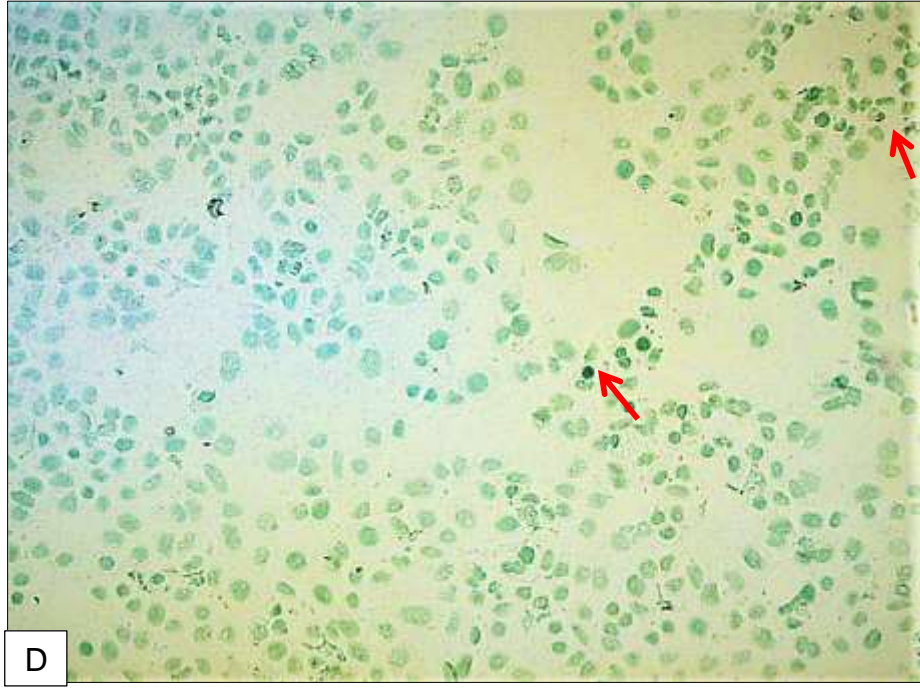
Şekil 4.7. A549 hücresi kontrol grubu, ışık mikroskop görüntüsü. Büyütme: X10. Sağlıklı hücrelerin çekirdekleri metil green sayesinde yeşil görünmektedir.



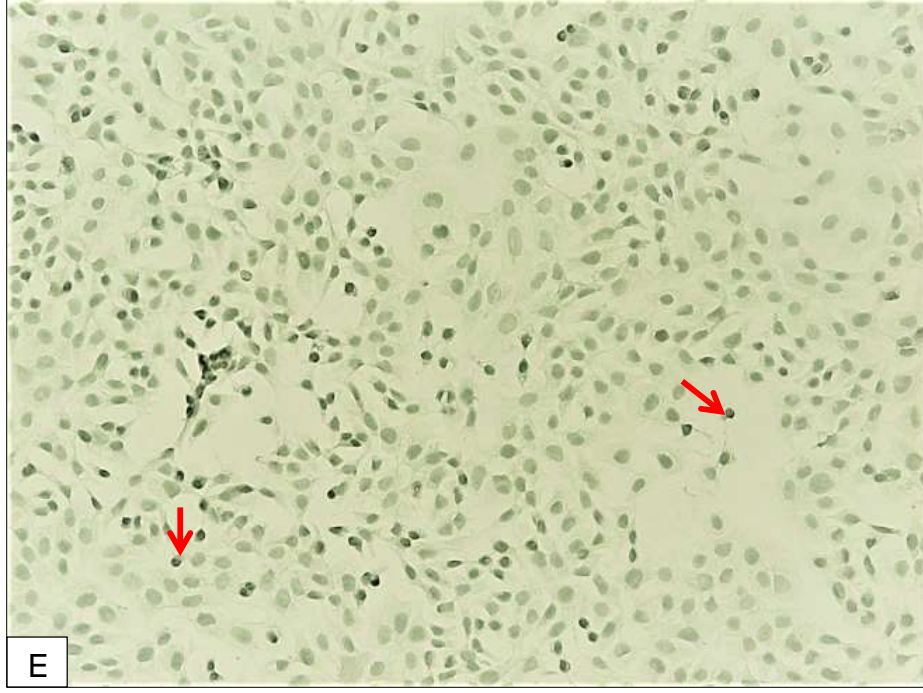
Şekil 4.8. A549 hücresinin pozitif kontrol grubu, ışık mikroskop görüntüsü. Büyütme: X10, Kitin içeriğinde bulunan nükleaz enzimi ile bütün hücrelerde apoptozun gösterilmesi.



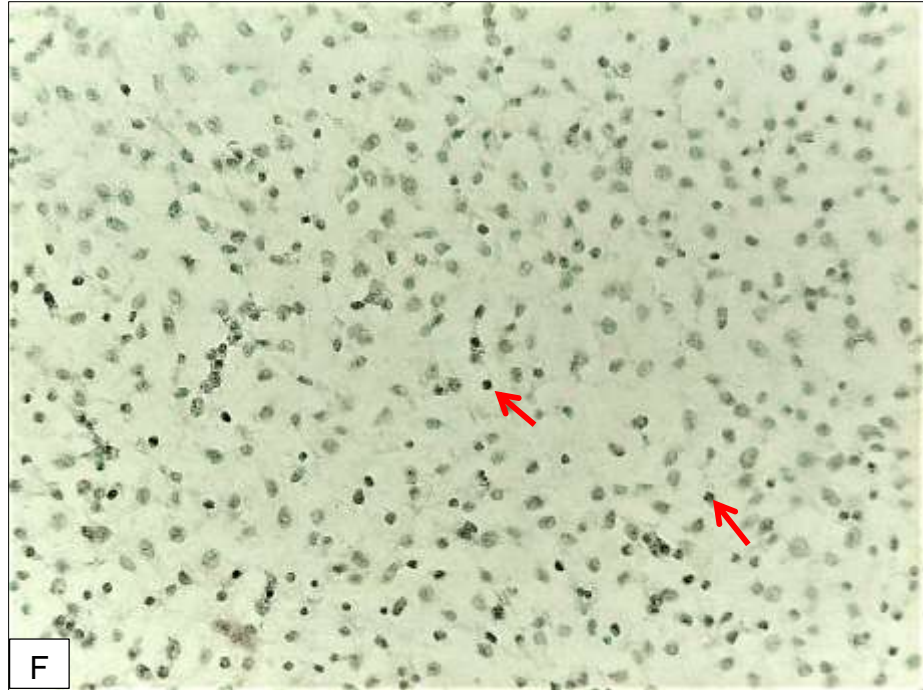
Şekil 4.10. HY 200nM grubu, ışık mikroskop görüntüsü. Büyütme:X10. Apoptotik hücreler (kırmızı ok) görülmektedir.



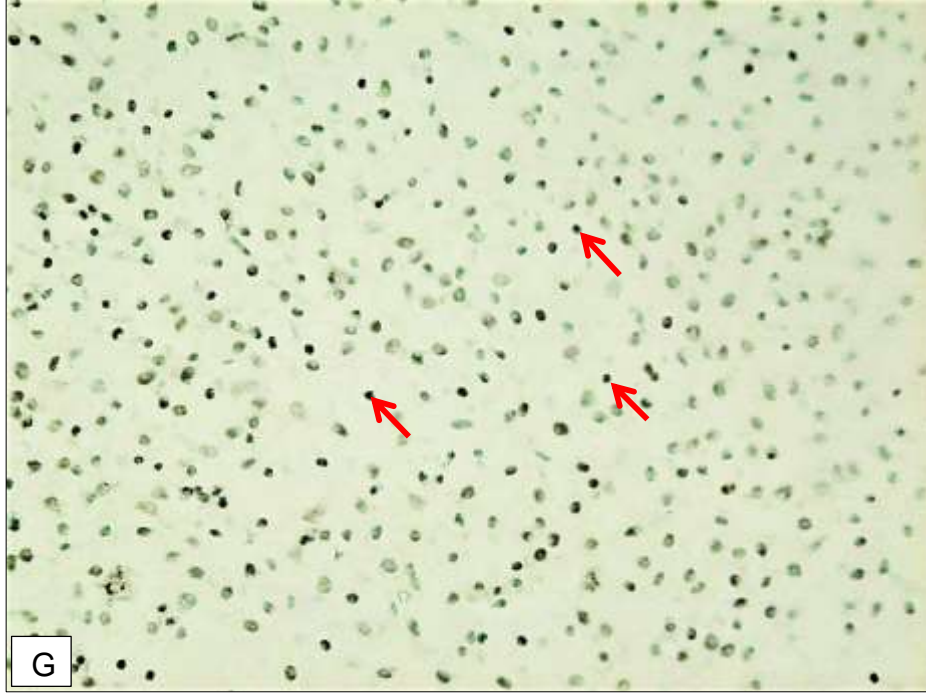
Şekil 4.9. HY 400 nM grubu, ışık mikroskop görüntüsü. Büyütme: X10. Apoptotik hücreler (kırmızı ok) görülmektedir.



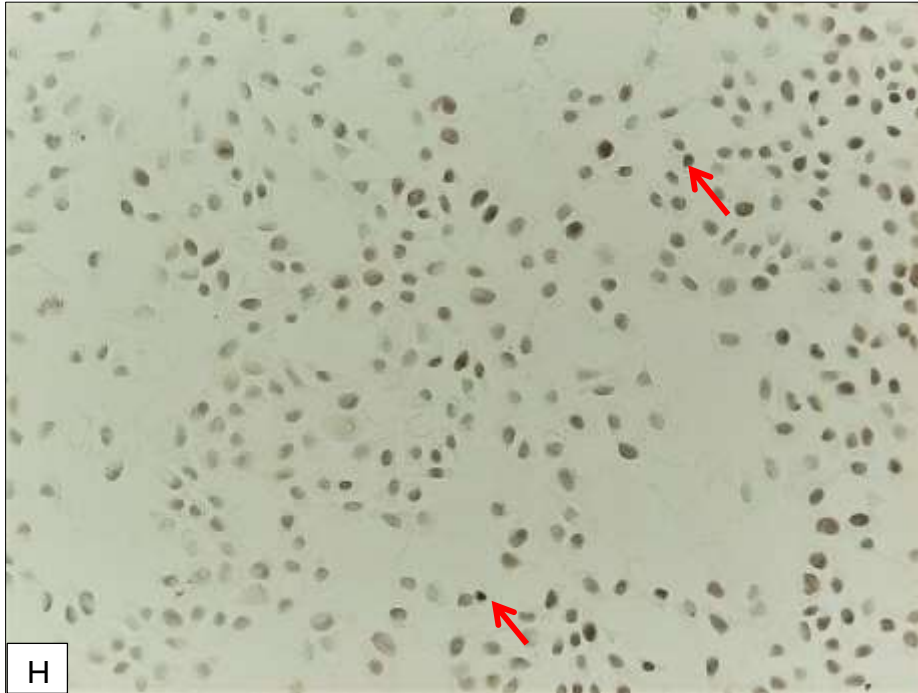
Şekil 4.10. HY 600 nM grubu, ışık mikroskop görüntüsü. Büyütme:X10. Apoptotik hücreler (kırmızı ok) görülmektedir.



Şekil 4.13. HY-NP 200 nM grubu, ışık mikroskop görüntüsü. Büyütme:X10. Apoptotik hücreler (kırmızı ok) görülmektedir.



Şekil 4.11. HY-NP 400 nM grubu, ışık mikroskop görüntüsü. Büyütme:X10. Apoptotik hücreler (kırmızı ok) ile görülmektedir.



Şekil 4.12. HY-NP 600 nM grubu, ışık mikroskop görüntüsü. Büyütme:X10. Apoptotik hücreler (kırmızı ok) ile görülmektedir.

HY-NP gruplarında kahverengiye boyanan hücrelerin (apoptotik hücreler) daha fazla olduğu görülmektedir. HY gruplarında ise hücrelerin çoğunlukla metil green ile boyandığı görülmektedir.

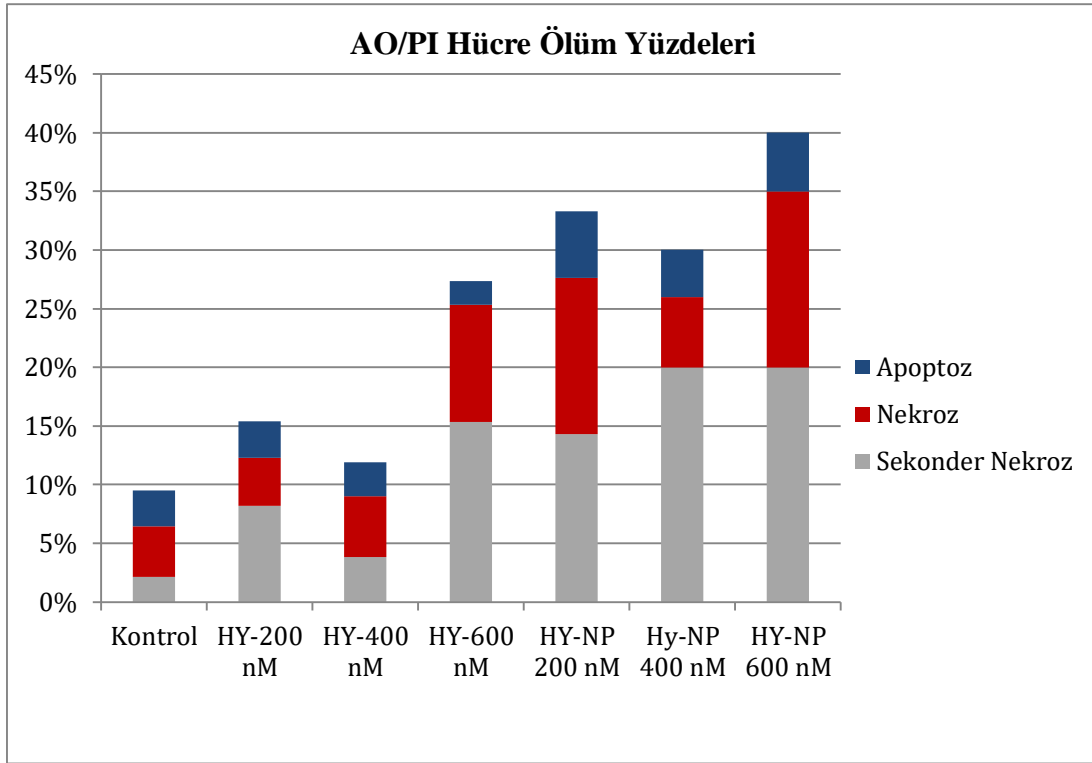
Apoptotik hücrelerde oluşan DNA fragmentler, etken maddenin hücrede oluşturduğu hasar sonucu oluşabilirken KI-NP'lerin hücre çekirdeğine girmesi sonucunda da gerçekleşebilir. KI-NP'ler çekirdek zarından girebildiği için gen taşımında da kullanılmaktadır. Mao ve ark.'ları yaptıkları çalışmada [76], kitosan-DNA nanopartiküllerin karakterizasyonu ile transfeksiyon etkinliğini değerlendirmişlerdir. Etidyum bromür (EtBr) DNA'nın bağlanma bölgelerini işgal ettiğinde floresan olarak görüntülenmesini sağlamaktadır, bu özelliğini kullanarak EtBr boyası ve KI-NP'nin DNA ile muamele edilmesi sonucu floresan ışması karşılaştırılmıştır. Kitosan DNA'ya bağlandığında floresan ışmanın azalması ile EtBr'ün yerini aldığı anlaşılmıştır. Tumortac analizinde apoptotik hücrelerin HY gruplarına göre daha fazla sayıda görülmesinin KI-NP'lerin hücre çekirdeğine alınması ile HY'nin DNA üzerinde apoptotik etki oluşturmuş olabileceği düşünülmektedir.

4.8. AO/PI ile Hücre Ölüm Tipinin Belirlenmesi

Uygulama gruplarının hücrelerde hangi ölüm yolağını oluşturduğunu ve hangi oranlarda olduğunu belirleyebilmek için AO/PI floresan boyası ile hücreler görüntülenmiştir. Gruplara göre oluşan hücre tipinin yüzdeleri Şekil 4.16'de verilmiştir.

Hücrede oluşan sekonder nekroz ile nekrozun apoptoza oranla daha yüksek olduğu görülebilmektedir. Özellikle sekonder nekrozun öne çıktığı görülürken, dozlara göre gruplar arasında artış olduğu görülmektedir. Çizelge 4.1'de deney gruplarında görülen ölüm tiplerinin yüzdeleri belirtilmiştir.

Şekil 4.14'deki sonuçlar ile uyumlu olarak tüm gruplarda en fazla sekonder nekroz görülürken, en az apoptoz görülmektedir. HY-NP ile muamele edilen hücrelerin AO/PI floresan boyama ile alınan görüntüleri Şekil 4.15'te verilmiştir. Şekil 4.15'te görülen resimlerde HY gruplarında daha fazla sağlıklı hücre görülürken, HY-NP gruplarında nekrotik ve apoptotik hücre sayısı artmıştır. Hücre sayısındaki azalmada HY-NP grupları arasında dikkat çekmektedir. HY-NP 600 nM grubuna ait olan görüntüde nekrozu gösteren sarı-turuncu ve kırmızı renkteki hücreler diğer gruplara göre daha yoğun oluşmuştur.

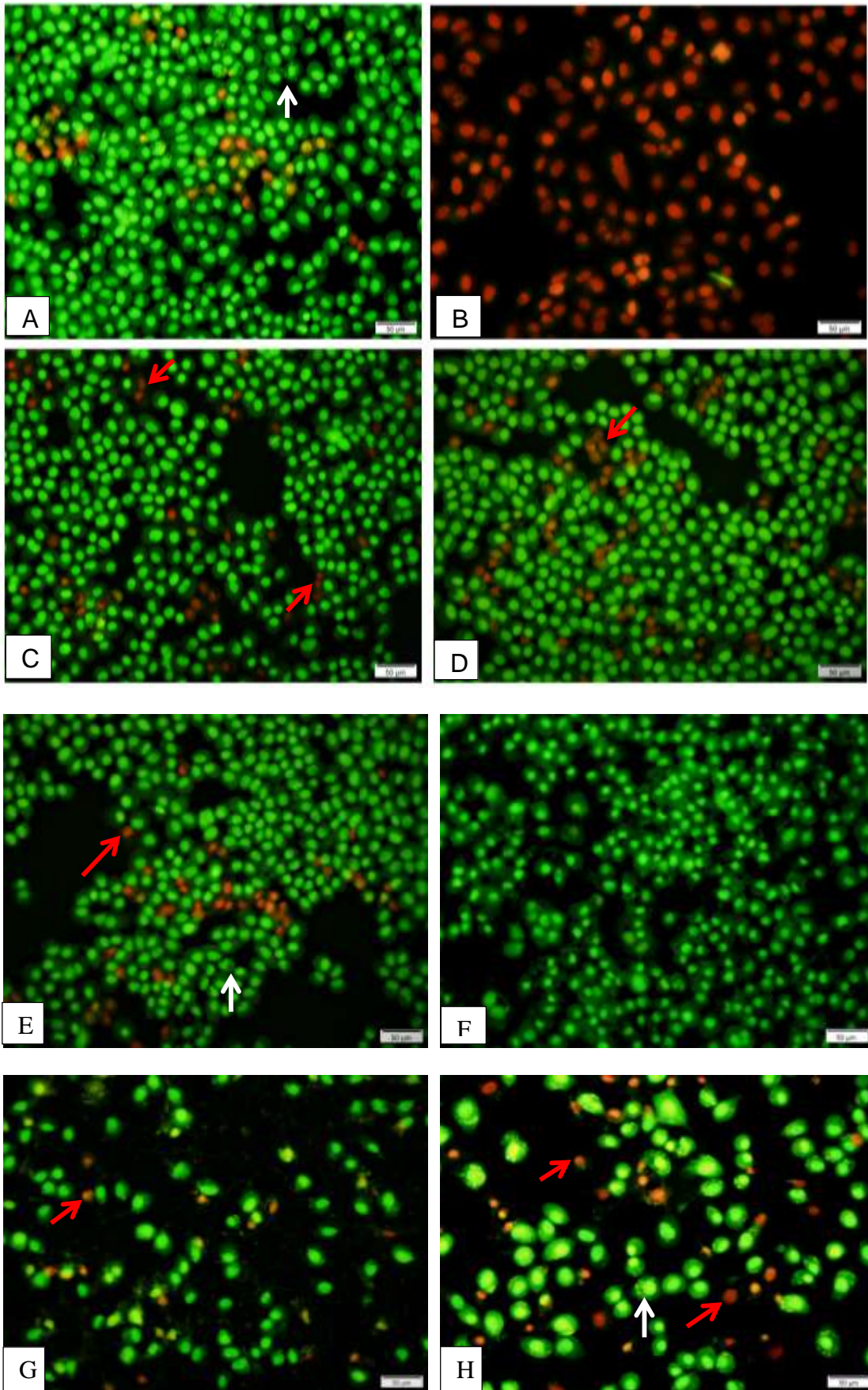


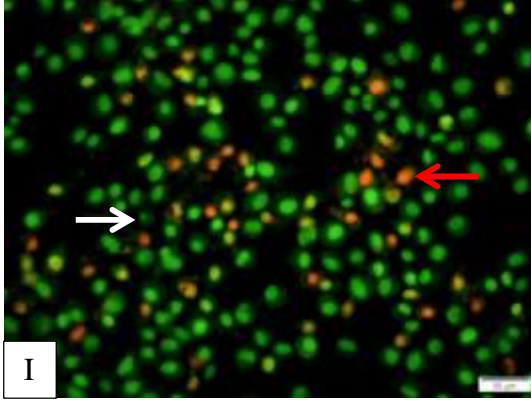
Şekil 4.13. AO/PI boyamasına göre oluşan hücre ölüm şekillerinin yüzde oranları.

Çizelge 4.1. Deney gruplarının nekroz, sekonder nekroz ve apoptoz oranları.

Hücre Ölüm Tipi/Gruplar	Sekonder Nekroz	Nekroz	Apoptoz
Kontrol	% 2,14	% 4,28	% 3,10
HY-200 nM	% 8,20	% 4,10	% 3,07
HY-400 nM	% 3,80	% 5,23	% 2,85
HY-600 nM	% 15,33	% 10	% 2
HY-NP 200 nM	% 14,28	% 13,33	% 5,71
Hy-NP 400 nM	% 12	% 6	% 4
HY-NP 600 nM	% 20	% 15	% 5

HY grupları ile HY-NP gruplar karşılaştırıldığında ise, toplam hücre ölüm yüzdeleri artmış olsa da, görülen ölüm tipinin oranları benzer görülmektedir.





Şekil 4. 14. AO/PI boyaması yapılan hücrelerin inverted mikroskop görüntüleri. A: Kontrol grubu, B: H₂O₂ (pozitif kontrol grubu), C: HY 200 nM grubu, D: HY 400 nM grubu, E: HY 600 nM grubu, F: Boş NP grubu, G: HY-NP 200 nM grubu, H: HY-NP 400 nM grubu, I: HY-NP 600 grubu.

Literatür taramalarında 1 ile 16 j/cm² arasında ışık dozlarının tercih edildiği görülmüştür. Bu nedenle çalışmamızda yaptığımız ön çalışmalar sonucunda tüm grupları için FDT uygulamasında 6.0 j/cm² ışık dozu kullanılmaya karar verilmiştir.

HY'nin yüksek dozlarında hücrelerin apoptozdan nekroza geçiş olabileceği literatürde belirtilmektedir. Çalışmamızın sonunda A549 hücresinde nekrozun apoptozdan daha çok oluştuğu görülmüştür. Ali ve Olivo'nun yaptığı çalışmada [77], nazofarinks kanserinde HY'nin hücre alım kinetiğini ve hücre ölüm tipini araştırmışlardır. Uygulanan ışık dozunun artırılmasıyla apoptozdan nekroza yönelim olduğunu belirtmişlerdir. Bu bilgiye dayanarak nekroz oluşumunun uygulanan ışık dozu ile doğru orantılı olduğu düşünülmektedir.

Bazı hücre hatlarında (HT-29 gibi) hücre ölümü olarak nekroz birincil ölüm şekli olarak görülebilmektedir. Bu durum farklı FDT dozları ve anti-apoptotik genlerin varlığında oluşabilmektedir. Bunun yanı sıra ışık sonrası c-Jun NH₂- terminal kinase ailesi (JNK) ve mitojenle aktive protein kinaz (MAPK) yollarının da aktif hale gelerek HY aracılı apoptoza direnci arttırabileceği bildirilmektedir [78].

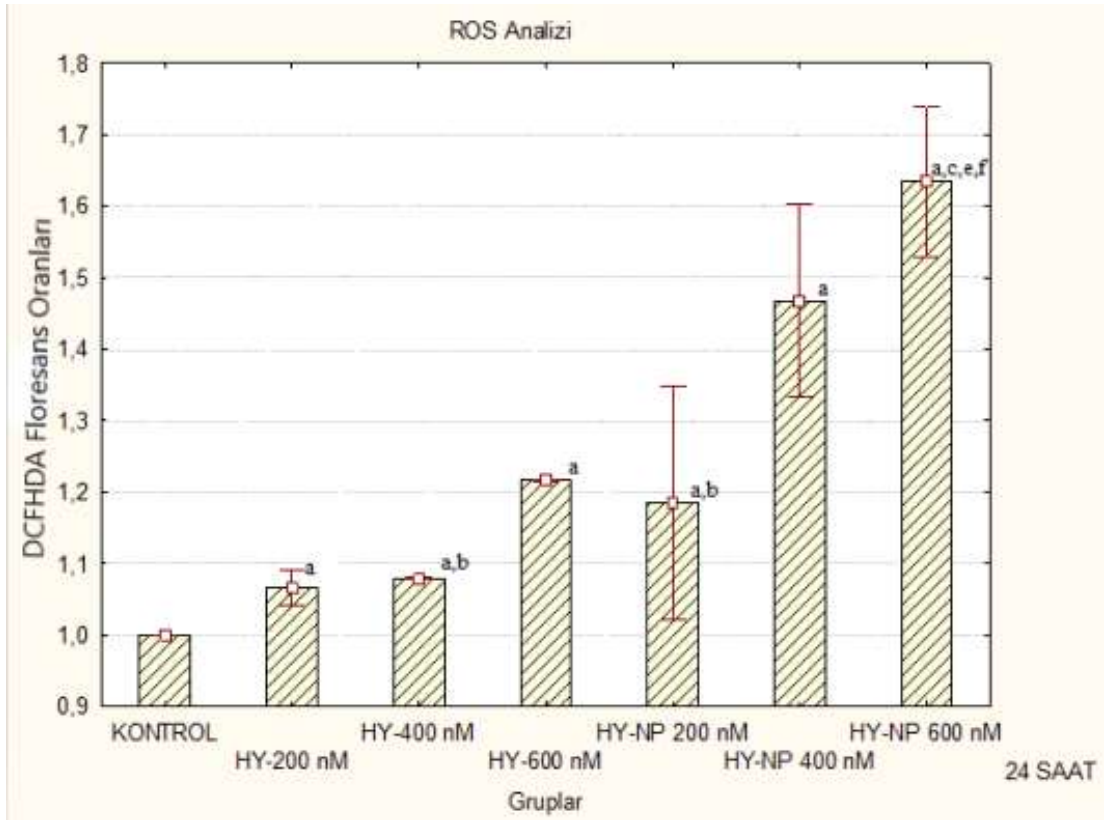
Nekroz veya apoptoz oluşumu hücreye göre farklılık göstermesinden ötürü hücrenin kullandığı yolların anlaşılabilmesi için moleküler seviyede çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Çizelge 4.1’de sekonder nekroz ve nekroz oranlarının gruplar içerisinde daha yüksek olduğu görülürken, HY-400 nM ve HY-NP 400 nM gruplarında daha düşük yüzdeler görülmektedir. Bu sonucun HY’nin bitkisel bir madde olmasından ötürü kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bitkisel içerikli maddelerin belli derişimlerde daha az etki gösterdiği görülebilmektedir.

4.9. Oksidatif Stres Tayini

Hücrelerde apoptozda görülen serbest radikal üretimi gruplar arasında DCFDA metoduyla değerlendirilmiştir. Şekil 4.18.’de HY ve HY-NP gruplarının hücreye uygulanması sonucu oluşan ROS oranları gösterilmiştir. Hücrede oluşan ROS’un uzun inkübasyon sürelerinin sonunda azaldığı tespit edilmiştir.

Sonuçların değerlendirilmesinde kontrol grubuna göre oluşan floresan ışımaya, uygulama gruplarındaki ışımaya göre kat artışı/azalması şeklinde yansıtılmıştır. HY-NP gruplarındaki artışın, HY gruplarındakilere kıyasla daha fazla olduğu görülmektedir. NP gruplarında HY konsantrasyonunun artmasıyla ROS oluşumunda istatistiksel olarak önemli bir artış olduğu görülmektedir. HY-NP 600 nM grubundaki ROS miktarı kontrole göre 1.6 kat daha fazla oluşmuştur.



Şekil 4.15. ROS analiz sonuçları. a: Kontrole göre istatistiksel farklıdır ($p \leq 0,0002$), b: HY-NP 600 nM'e göre anlamlı farklılık, c: HY-200'den anlamlı farklılık, e: HY-400'den anlamlı farklılık, f: HY-NP 200'den anlamlı farklılık.

İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde tüm gruplarda, kontrole göre anlamlı fark bulunmuştur. HY-NP 600 nM grubu ise HY-600 ve HY-NP 400 nM grubu haricindeki tüm gruplara göre anlamlı bulunmuştur.

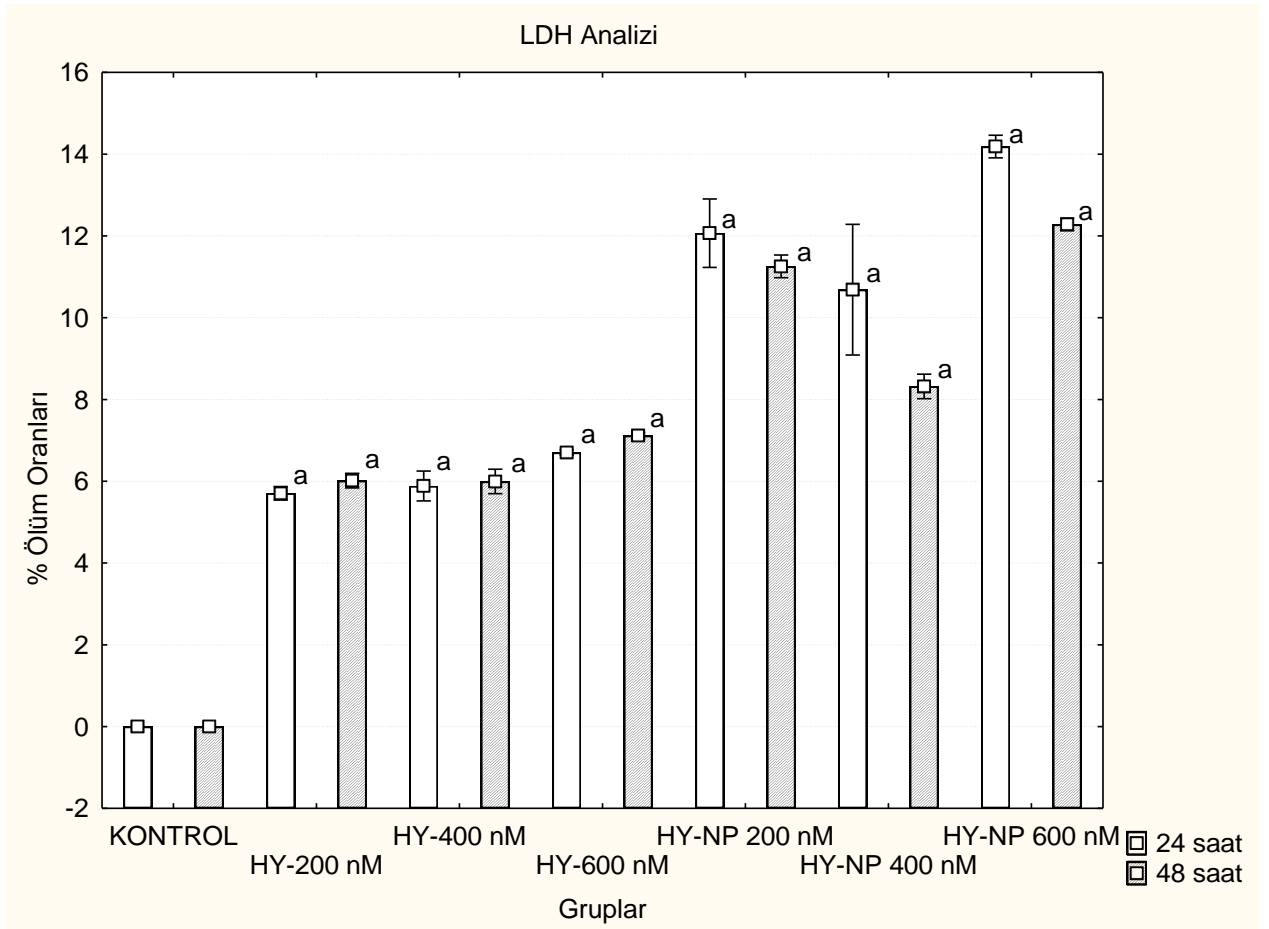
HY'nin kanser hücrelerinde apoptozu indükleyebildiği bilinmektedir. Ali ve ark yaptıkları çalışmada [77], HY'nin indüklediği apoptoz mekanizmasını incelemiştir. Kolon kanserinde sitokrom-c salımı, kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9 aktivasyonu ve DNA fragmentasyonu olduğu görülmüştür.

FDT'de apoptoz, ışık dozu ve kullanılan maddeye göre değişse de en sık görülen etkilerden biridir. ROS oluşumunun görülmesiyle hücrenin apoptoza gidebildiği bilinmektedir. Penjweini ve ark. [71], A549 hücresi ile yaptıkları çalışmada hücreleri 50 μ M PVP-HY ile muamele ederek farklı ışık dozları uygulamışlardır. Annexin-V-FLUOS analizi ile apoptotik ölüm yüzdeleri karşılaştırıldığında, $I=6.34 \text{ mW/cm}^2$ oranındaki ışığa sonucunda hücrelerin %80'inde apoptoz, %2,5'inde nekroz görülmüştür. Çalışmanın sonucunda ışığa muamele edilme süresinin ve kuvvetinin oluşacak ölüm tipini belirlediğini bildirmişlerdir.

4.10. LDH Sitotoksisite Testi

HY ve HY-NP grupları için, LDH sitotoksisite kiti kullanılarak hücre zarı hasarı tespit edilmiş ve sitotoksisite yüzdeleri hesaplanmıştır. Şekil 4.19.'da sonuçlar verilmiştir. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde tüm gruplarda kontrole göre fark bulunmuştur. 24 saatin HY-NP 600 nM grubunda ise HY-NP 200 nM haricindeki tüm gruplara göre anlamlı bulunmuştur.

Şekil 4.19.'da 24 ve 48 saat sonunda uygulanan LDH analizi ile grupların arasındaki hücre membran hasarına dayalı hücre ölüm oranları karşılaştırılmıştır. HY-NP grupları arasında sitotoksisite, HY gruplarına göre daha yüksek görülürken, HY grupları arasındaki farkın daha az olduğu da tespit edilmiştir. 24 ile 48 saat arasındaki fark ise belirgin şekilde görülürken, 24 saatteki toksisitenin 48 saatte azalması dikkat çekmektedir. HY-NP 400 nM grubunda LDH analizine göre sitotoksisitedeki azalma diğer analizlerle uyumlu bulunmuştur.



Şekil 4. 16. A549 hücrelerinin 24 ve 48 saatlik LDH sitotoksosite sonuçları. a: Kontrole grubuna göre anlamlı farklılık ($p \leq 0,05$).

LDH testi ile plazma zarındaki hasar sonucu sitoplazmaya salınan laktat dehidrogenaz enzimi ölçülebilmektedir. Plazma zarındaki hasarın nekroz ile ilişkili olmasından ötürü sadece nekrotik hücreler açısından fark gruplar açısından gösterilmiştir. HY'nin nekrotik ölüm oluşturduğu başka kanser hücreleri de çalışılmaktadır. Huntsova ve ark. [79], glioblastoma (U87) hücre hattını 500 nM HY ile HY-LDL (düşük yoğunluklu lipoprotein) ile 1, 3, 6, 24 saat inkübe etmiştir. 4 j/cm² ile aktive edilen hücreler 24 saat sonrasında akış sitometride değerlendirilmiştir. 1 saat sonunda %20 nekrotik ölüm görülürken, uzun inkübasyon sürelerinde yüzdeler artmıştır. LDL-HY gruplarında ise 1 saat sonunda %27 nekrotik hücre ölümü gerçekleşmiştir.

Nekroz oluşumunun daha çok görülmesi inkübasyon süresi ile ilişkilendirilebilmektedir. Nekrotik hücreler geç apoptoz sonucunda görülebilmektedirler. 24 saat inkübasyon süreleri geç apoptoza sebebiyet vermiş olabilir. Bunun yanı sıra HY'nin bazı hücre hatlarında nekroz oluşturduğuda bilinmektedir.

Du ve ark.'ları [82], nazofarenks kanser hücresinde Hiperisin ile fotodinamik terapi uygulaması sonucunda nekrotik hücre oluşumları gözlemlemişlerdir. Hücre-membran geçirgenliğinin bozulması sonucunda sitoplazmik vakuoller olduğu elektron mikroskobu ile görüntülenmiştir. Lipid peroksidasyon sonucu tümör nekrozunu HY ile indüklenbildiği gösterilmiştir.

5.YORUM

Tez çalışması kapsamında akciğer kanseri hücresi ile bitkisel bir ekstrakt olan Hiperisin'in yüklendiği kitosan nanopartiküllerle anti-kanser cevabın araştırılması hedeflenmiştir. Tez çalışmasının hipotezi doğrultusunda Hiperisin'in nanopartiküllerle hücreye alınımının artırılması ve mitokondri zarında oluşturduğu hasar yoluyla apoptotik ve nekrotik ölümleri indüklemiştir. HY'nin NP'lerle kullanılmasının birçok sebebi bulunmaktadır; *in vivo* ortama HY direk verildiğinde biyodegradasyona uğrayabilmektedir; yüksek dozlarda kullanıldığında fototoksik deri reaksiyonuna sebep olabilmektedir ve de ışığa maruziyetinin azaltılmasıyla etkisi hedef bölgeye ulaşana kadar korunabilmektedir. Bu sebeplerle biyoyumluluğu sayesinde tercih edilen kitosan nanopartiküllere, HY yüklenerek oluşan cevap hücrel olarak incelenmiştir. İlk aşamada boş NP oluşturarak karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir ve alınan SEM görüntülerinin sonucunda NP formülasyonuna karar verilmiştir. Prosedürün belirlenmesinden sonra MTT analizi ile seçilen HY dozları NP solüsyonuna eklenerek, dozlar karşılaştırılmıştır. Tüm analizler için HY ve HY-NP grupları ayrı olarak uygulanmıştır. Yorumlar aşağıda özetlenmektedir;

- HY'nin mitokondri zarında oluşturduğu hasar sonucu hücreye sitokrom-c salımı ile kaspazların aktive olduğuna ve apoptozun oluşabildiği bilinmektedir. Bu bilgidan ötürü MTT analizi gerçekleştirilmiştir. MTT testi sonucunda HY'nin A549 hücresinin proliferasyonunu HY-NP gruplarında durdurabildiği, mitokondriyal hasar oluşturabildiği ve canlılığı en yüksek HY konsantrasyonu içeren NP grubunda 24 saatte %59, 48 saatin sonucunda %56'ya kadar düşürebildiği görülmüştür.
- TumorTac apoptoz kiti ile alınan sonuçlarda HY gruplarında apoptotik hücre çok az görülürken, HY-NP gruplarında belirgin şekilde artmıştır.
- AO/PI floresan çekirdek boyaları ile HY'nin indüklediği hücre ölüm yollarının oranları karşılaştırılmıştır. Deneyin sonucunda nekrotik ölüm yolunun apoptotik ölüm yoluna göre daha çok indüklendiği ortaya konmuştur.
- LDH sitotoksisite testi ile HY'nin plazma zarında yarattığı hasar incelenmiş ve NP gruplarında artış gösterilmiştir.
- FITC ile işaretlenen NP'lerin hücrel alımlarını göstermek için floresan mikroskoptan alınan görüntüler incelenmiş ve alınan görüntüler sayesinde HY içeren NP gruplarının etkili bir şekilde hücreye alındığı gösterilmiştir.

- Alınan SEM görüntüleri ile nano boyutta oluşan boş ve HY-NP'ler görüntülenmiş ve boyutları doğrulanmıştır.
- Çalışmanın sonucunda literatürde A549 hücreleri için kullanılan HY derişimleri daha yüksek olurken, NP'ler sayesinde 1 μM 'ın altındaki dozlarda bile etkili azalmanın oluşturulabileceği gösterilmiştir.
- Nanoteknoloji ile oluşturulan ilaç salım sistemi örneklerine FDT'nin de dahil olduğu bir *in vitro* model test edilmiştir.
- Nanoteknoloji büyük adımlarla genişleyen bir bilim dalı olsa da akciğer teşhis ve tedavisinde eksiklikler olduğu düşünülmektedir. Nanotoksosite probleminin aşılması için akciğer kanseri ile çalışmalar devam etmektedir, bu çalışma ile bu alana katkı sağlanması beklenmektedir. Çalışma sayesinde kitosanın toksisite profili kanser hücresi üzerinde gösterilmiştir.
- Tez çalışmasının literatürden farklı kılan yönü, literatürde Hiperisin yüklenmiş kitosan nanopartiküller aracılığıyla A549 akciğer kanser hücrelerinde yapılan FDT içeren bir çalışma olmasıdır. Sadece HY içeren gruplara oranla, HY-NP içeren gruplarda toksistenin artması, A549 hücresi gibi tedaviye yüksek direnç gösteren bir hücre hattında gösterilmesi büyük önem taşımaktadır. Sonuçların literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.
- Bu çalışma ile hedefli terapiye yönelik olarak geliştirilen NP'ler, IDM'lerin hücreye ve hedef bölgeye iletilmesini sağlayarak örnek sunmuştur. HY'nin direk verilmesi ile karşılaştırılarak fark ortaya konmuştur.
- Çalışmanın geliştirilmesi için kitosan nanopartiküllere modifikasyon yapılabilmektedir, bu sayede ilacın daha etkili enkapsüle edilmesi sağlanabilir. Kitosan, alkil gruplar eklenerek hidrofobik karakteri geliştirilebilmektedir. Bu sayede hidrofobik ilaçların kapsüllendirilmesi arttırılabilmektedir.
- Tez önerisinde bulunan Carfilzomib ilacı ile çalışma yapılmış olmakla birlikte, MTT analizi sonucunda hücre canlılığında beklenen azalma görülmemiştir. Bunun sonucunda Carfilzomib ile ilgili gruplar çıkarılmıştır.
- Hücrelerde görülen etkinin yanısıra *in vivo* etkinin gösterilmesi de önem taşımaktadır. Bunun için NP'lerin kanser hücrelerine *in vivo* ortamda seçicilik göstermeleri adına NP'lere glukozidik bağlar eklenebilmektedir.

- Yapılan yeni bir çalışmada HY, A549 hücreleri üzerinde uygulandığında paraptotik hücre ölümü oluştuğu belirtilmiştir. Endoplazmik retikulumda ışığa bağlı oluşan hasar paraptozu başlatabileceği bildirilmiştir. Bununla ilişkili olarak ER hasarına dayanan paraptotik ölüm yolu araştırılabilir.

6. KAYNAKLAR

- [1] Anonim, National Cancer Institute, www.cancer.gov.tr (Erişim Tarihi: 05 Haziran 2021)
- [2] M.M. Mortenson, M.G. Schlieman, S. Virudachalam, R.J. Bold, Effects of the Proteasome Inhibitor Bortezomib Alone and in Combination with Chemotherapy in the A549 Non-Small-Cell Lung Cancer Cell Line, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 54 (2004) 343–353.
- [3] C.G.T.E.Y. A. Gül, M. N. İnan, D. Kaya, K. Küçük, Isı Şoku Proteinleri ve Kanser, Sempozyum. (n.d.)
- [4] S.S. Cooper S, Small Cell Lung Cancer: Treatment Review, *Respirology.* 11 (2006) 241–248.
- [5] E.N. G. Carioli, M. Malvezzi, P. Bertuccio, P. Boffetta, F. Levi, C. La Vecchia, European Cancer Mortality Predictions For The Year 2021 With Focus On Pancreatic And Female Lung Cancer, *Eur. Soc. Med. Oncol.* 32 (2021) 478–487.
- [6] G. Demir, Akciğer Kanseriinde Kemoterapi, *Türkiyede Sık Karşılaşılan Hastalıklar 2*, Sempozyum Dizisi No58. (2007) 175–178.
- [7] R.J.M. R. Komaki, A. S. Tsao, Non-small Cell Lung Cancer, 60 Years Surviv. Outcomes Univ. Texas 45 MD Anderson Cancer Center, Springer. (2013).
- [8] S.E.S. and A.S.A. J.R. Molina, P. Yang, S. Cassivi, Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Treatment, and Survivorship, *Mayo Clin. Proc.* 83 (2008) 584–594.
- [9] L. Pecorino, *Molecular Biology of Cancer, Mechanisms, Targets And Therapeutics*, 2015.
- [10] R. Ackermann, S. Mrowka, *Cancer-An Ongoing Fight Searching For Reasons And Therapies*, *Acta Physiol.* 226 (2019).
- [11] P. Jaggi, A Review Article On Lung Cancer Diagnosis And Treatment, *Research And Reviews, J. Med. Heal. Sci.* 6 (2017).
- [12] J. Gabriel, *The Biology Of Cancer*, wiley, 2007.
- [13] G.K. and M.R.H. P. Mroz, A. Yaroslavsky, Cancer Death Pathways in Photodynamic Therapy of Cancer, *Cancers (Basel).* 3 (2011) 2516–2539.
- [14] S.P. and H.-C.T. T. A. Debele, Drug Carrier for Photodynamic Cancer Therapy, *International Journal of Molecular Sciences*, 16 (2015) 22094–22136.
- [15] R.L.N.A.-L. Oleinick, N. L. Morris, Photodynamic therapy-induced apoptosis, Chapter 27, *Cancer Drug Discovery And Development Apoptosis, Senescence, And Ancer*, Humana Press Inc. (n.d.) 557–578.
- [16] R.F.M. and S.O. Gollnick, Photodynamic Therapy and Immunity: An Update, *Photochem. Photobiol.* 96 (2020) 550–559.
- [17] W.K.O.L. M. Olivo, C. Y. Fu, V. Raghavan, New Frontier in Hypericin-Mediated Diagnosis of Cancer with Current Optical Technologies, *Ann. Biomed. Eng.* 40 (2012) 460–473.

- [18] A. Kılıç Süloğlu, G. Selmanoğlu, Ş. Yılmaz, H. Canpınar, Comparison of Phototoxic Effects of Hypericin-Mediated Photodynamic Therapy in HT-29 And Caco-2 Colon Cancer Cells, *Turkish J. Biol.* 40 (2016) 1202–1218. <https://doi.org/10.3906/biy-1510-43>.
- [19] F. Kahyaoglu, B. Demirci, Hypericum's 90th Anniversary in the Laboratory, *Eur. J. Ther.* 24 (2018) 192–197.
- [20] C.A. Altan, İ. Damlar, M. Hamdi Aras, Sarı Kantaronun (Hypericum Perforatum) Yara İyileşmesi Üzerine Etkisi, *Arşiv Kaynak Tarama Derg.* 24 (2015) 578–591.
- [21] J.S. and R.S. C. S. Head, Q. Luu, 'Photodynamic Therapy and Tumor İmaging of Hypericin-Treated Squamous Cell Carcinoma, *World J. Surg. Oncol.* 4 (2006) 87.
- [22] P. Solár, I. Čavarga, J. Hofmanová, M. Čekanová-Figurová, P. Miškovsky, P. Brezáni, G. Hrková, A. Kozubík, P. Fedoročko, Effect of Acetazolamide on Hypericin Photocytotoxicity, *Planta Med.* 68 (2002) 658–660.
- [23] S.A. Mirmalek, M.A. Azizi, E. Jangholi, S. Yadollah-Damavandi, M.A. Javidi, Y. Parsa, T. Parsa, S.A. Salimi-Tabatabaee, H. Ghasemzadeh kolagar, R. Alizadeh-Navaei, Cytotoxic and Apoptogenic Effect of Hypericin, The Bioactive Component of Hypericum Perforatum on The MCF-7 Human Breast Cancer Cell Line, *Cancer Cell Int.* 16 (2015) 3.
- [24] P.F. Z. Jendželovská, Rastislav Jendželovský, Barbora Kuchárová, Hypericin in The Light and in The Dark: Two Sides of The Same Coin, *Front. Plant Sci.* 7 (2016) 56.
- [25] E. Chacon, D. Acosta, J. J. Lemasters, Primary Cultures of Cardiac Myocytes As in Vitro Models For Pharmacological And Toxicology Assessments,
- [26] A. Barras, L. Boussekey, E. Courtade, R. Boukherroub, Hypericin-Loaded Lipid Nanocapsules For Photodynamic Cancer Therapy in Vitro, *Nanoscale.* 5 (2013) 10562–10572.
- [27] L.K. C. Han, C. Zhang, T. Ma, C.Zhang, j. Luo, X. Xu, H. Zhao, Y. Chen, Hypericin-Functionalized Graphene Oxide For Enhanced Mitochondria-Targeting And Synergistic Anticancer Effect, *Acta Biomater.* 77 (2018) 268–281.
- [28] M.K. H. Koren, G.M. Schenk, R.H. Lindra, G. Alth, R. Ebermann, A. Kubin, G. Koderhold, Hypericin in Phototherapy, *J. Biochem. Photobiol. Biol.* 36 (1996) 113–119.
- [29] A. Kılıç Süloğlu, G. Selmanoğlu, M.T. Akay, Alterations in Dysadherin Expression And F-Actin Reorganization: A Possible Mechanism of Hypericin-Mediated Photodynamic Therapy in Colon Adenocarcinoma Cells, *Cytotechnology.* 67 (2015) 311–330.
- [30] C.M. Lin, L. Huang, Y. Zhao, L. Miao, Y. Xiong, Co-Delivery of Polymeric Metformin And Cisplatin by Self-Assembled Core-Membrane Nanoparticles To Treat Non-Small Cell Lung Cancer, *J. Control. Release.* 244 (2016) 63–73.
- [31] P.W.S.H. C. L. L. Saw, M.Olivo, K.C. Soo, Delivery of Hypericin For Photodynamic Applications, *Cancer Lett.* 241 (2006) 23–30.

- [32] L J. Crawford, B. Walker and A. E. Irvine, Proteasome Inhibitors In Cancer Therapy, *J. Cell Commun. Signal.* 5 (2011) 101–110.
- [33] D.M. S. Engür, Kanser Tedavisininde Proteozom İnhibitörlerinin Önemi, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilim. Enstitüsü Derg.* 31 (n.d.) 182–187.
- [34] C. M. Pfeffer and Amareshwar T. K. Singh, Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy, *Int. J. Mol. Sci.* 19 (2018) 448.
- [35] A. Letai, Apoptosis and Cancer, *Annu. Rev. Cancer Biol.* 1 (2017) 275–294.
- [36] S.G. Dai, X., Zhang, J., Arfuso, F., Chinnathambi, A., Zayed, M. E., Alharbi, S. A., Kumar, A. P., Ahn, K. S., Targeting TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) Receptor By Natural Products As A Potential Therapeutic Approach For Cancer Therapy, *Exp. Biol. Med. (Maywood).* 240 (2015) 760–773.
- [37] R.L.N.A.-L. Oleinick, N. L. Morris, Photodynamic Therapy-Induced Apoptosis, Chapter 27, *Cancer Drug Discovery And Development Apoptosis, Senescence, And Ancer*, Humana Press Inc. (n.d.) 557–578.
- [38] J.-O. Yoo, K.-S.Ha, New Insights into the Mechanisms for Photodynamic Therapy-Induced Cancer Cell Death, *International Review of Cell and Molecular biology*, vol 295, Chapter 4, 2012.
- [39] Z.G. Zhang X, Yang X, Ji J, Liu A, Tumor Targeting Strategies For Chitosan-Based Nanoparticles, *Colloids Surf B Biointerfaces.* 1 (2016) 460–473.
- [40] R. Ranganathan, S. Madanmohan, A. Kesavan, G. Baskar, Y. R. Krishnamoorthy, R. Santosham, D Ponraju, S. K. Rayala, G. Venkatraman, Nanomedicine: Towards Development of Patient-Friendly Drug-Delivery Systems For Oncological Applications, *International Journal of Nanomedicine*, 7, 2012, 1043–1060.
- [41] Zamboni W.C., La-Beck N.M. Carrier-Mediated and Targeted Cancer Drug Delivery. In: Spitz D., Dornfeld K., Krishnan K., Gius D. (eds) *Oxidative Stress in Cancer Biology and Therapy. Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice.* Humana Press, Totowa, NJ, 2012.
- [42] S. Senapati, A. K. Mahanta, S. Kumar, P. Maiti, Controlled Drug Delivery Vehicles For Cancer Treatment And Their Performance, *Signal Transduction And Targeted Therapy*, 2018, 16;3:7.
- [43] K. Kopeckovaa, T. Eckschlagerb, J. Sircc, R. Hobzovac, J. Plchb, J. Hrabetab, J. Michalek, Nanodrugs Used in Cancer Therapy, *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.*, 163(2), 2019, 122-131.
- [44] M. Y .Koroleva, T.Y. Nagovitsina, D.A.Bidanov, O.S.Gorbachevski, E.V.Yurtov, Nano And Microcapsules As Drug Delivery Systems, *Resourse Efficient Technologies*, Volume 2, Issue 4, 2016, 233-239.

- [45] T. Kaur and R. Slavcev, Solid Lipid Nanoparticles, Novel Gene Therapy Approaches, Chapter3
- [46] Zhang X, Yang X, Ji J, Liu A, Zhai G. Tumor Targeting Strategies For Chitosan-Based Nanoparticles, Colloids Surf B Biointerfaces, 1;148, **2016**, 460-473.
- [47] Nanotechnology in The Diagnosis And Treatment Of Lung Cancer, Pharmacology And Therapeutics, Volume 198, **2019**, 189-205.
- [48] C. Altavilla, E. Ciliberto, Inorganic Nanoparticles Synthesis, Applications, And Perspectives, 2010, ISBN 9781439817612.
- [49] M. Amararathna, K. Goralski, D. W. Hoskin, H. P. V. Rupasinghe, Pulmonary Nano-Drug Delivery Systems for Lung Cancer: Current Knowledge and Prospects, Journal of Lung Health and Diseases, 3 (2019) 11-28.
- [50] D. S. Ettinger, Non-Small Cell Lung Cancer, Journal of the National Comprehensive Cancer Network 8.7 (2010) 740-801
- [51] S. Puisney, C. Baeza-Squiban, A. Boland, 'Mechanisms of Uptake and Translocation of Nanomaterials in The Lung, Cell. Mol. Toxicol. Nanoparticles. 1048 (2018) 21–36.
- [52] JP. Jee, J. H. Na, S. Lee, S. H. Kim, K. Choi, Y.Yeo, I. C.Kwon, Cancer Targeting Strategies in Nanomedicine: Design and Application of Chitosan Nanoparticles, Current opinion in solid state and materials science, volume 16, issue 6 (2012) 333-342.
- [53] S. M. Asiri, F. A. Khan & A. Bozkurt, Synthesis of Chitosan Nanoparticles, Chitosanbulk, Chitosan Nanoparticles Conjugated with Glutaraldehyde with Strong Anti-Cancer Proliferative Capabilities, Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology, 46:sup3 (2018) S1152-S1161.
- [54] K. Divya, M.S. Jisha, Chitosan Nanoparticles Preparation And Applications, Environ. Chem. Lett. 16 (2018) 101-112.
- [55] K.M.W. and E.K.W. Munawar A. Mohammed, Jaweria T. M. Syeda, Overview of Chitosan Nanoparticles and Its Application in Non-Parenteral Drug Delivery, Pharmaceutics. 9 (2017) 53.
- [56] O. E. Philippova and E.V. Korchagina, Chitosan and Its Hydrophobic Derivatives: Preparation And Aggregation In Dilute Aqueous Solutions, Polym. Sci. Ser. A 54 (2020) 552–572.
- [57] S. Gomathysankar, A. S. Halim, N. S. Yaacop, Proliferation of Keratinocytes Induced by Adipose-Derived Stem Cells on a Chitosan Scaffold and Its Role in Wound Healing, a Review, Archives of Plastic Surgery, 41 (2014) 452-457.
- [58] Y.-H. Jin, H.-Y. Hu, M.-X. Qiao, J. Zhu, J.-W. Qi, C.-J. Hu, Q. Zhang, D.-W. Chen, pH-Sensitive Chitosan-Derived Nanoparticles As Doxorubicin Carriers For Effective Anti-Tumor Activity: Preparation And In Vitro Evaluation, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, Vol. 94 (2012) 184-191.

- [59] M. Amararathna, K. Goralski, D. W. Hoskin, H. P. Vasantha Rupasinghe, Pulmonary Nano-Drug Delivery Systems for Lung Cancer: Current Knowledge and Prospects, *Journal of Lung Health and Diseases*, 2019.
- [60] Munawar A. Mohammed, Jaweria T. M. Syeda, Kishor M. Wasan and Ellen K. Wasan, Overview of Chitosan Nanoparticles and Its Application in Non-Parenteral Drug Delivery, *Pharmaceutics* , 9, 2017, 53.
- [61] E. Sykes, J. Chen, G. Zheng, W. C.W. Chan, Investigating The Impact of Nanoparticle Size on Active and Passive Tumor Targeting Efficiency, *American Chemical Society*, (2014) 5696-5706
- [62] Zhao, J. And Stenzel, M. H. Entry of Nanoparticles into Cells: The Importance of Nanoparticle Properties, *Polymer Chemistry* 9 (2018) , 259-272.
- [63] S. Behzadi, V. Serpooshan, W. Tao, M. A. Hamaly, M. Y. Alkawareek, E. C. Dreaden, D. Brown, M. A. Alkilany, O. C. Farokhzad, M. Mahmoudi, Cellular Uptake of Nanoparticles: Journey Inside The Cell, *Royal Society Of Chemistry* (2017) 46(14), 4218-4244.
- [64] S. Honary and F. Zahir, Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 1), *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* (2013) 12 (2): 255-264.
- [65] K. S, 'Remote-Controlled Release of Singlet Oxygen by the Plasmonic Heating of Endoperoxide-Modified Gold Nanorods: Towards a Paradigm Change in Photodynamic Therapy, *Angewandte Chemie* 128. 11 (2016): 3670-3674.
- [66] S.-M.K. B. Teong, C.-Y. Lin, S.-J. Chang, G. C.-C. Niu, C.-H. Yao, I-Fen Chen, Enhanced anti-cancer activity by curcumin-loaded hydrogel nanoparticle derived aggregates on A549 lung adenocarcinoma cells, *J Mater Sci Mater Med.* 26 (2015) 49.
- [67] X. Han, Olena Taratula, Oleh Taratula, Ke Xu, Anna St Lorenz, Abraham Moses, Younes Jahangiri, Guibo Yu, and Khashayar Farsad, Biodegradable Hypericin-Containing Nanoparticles for Necrosis Targeting and Fluorescence Imaging, *Molecular Pharmaceutics*, 2020, 17, 1538-1545.
- [68] L. Śliwka, K. Wiktorska, P. Suchocki, M. Milczarek, S. Mielczarek, K. Lubelska, T. Cierpiał, P. Łyzwa, P. Kielbasiński, A. Jaromin, A. Flis, Z. Chilmonczyk, The Comparison of MTT and CVS Assays For The Assessment of Anticancer Agent Interactions, *PLoS One.* 11 (2016) 1–17.
- [69] G. Fotakis, J.A. Timbrell, In Vitro Cytotoxicity Assays: Comparison of LDH, Neutral Red, MTT And Protein Assay in Hepatoma Cell Lines Following Exposure to Cadmium Chloride, *Toxicol. Lett.* 160 (2006) 171–177.
- [70] E. Öztürk, *Kanser Tedavisinde Kullanılmak Üzere Biyokimyasal Olarak Modifiye Edilmiş Polimerik Taşıyıcıların Hazırlanması ve Karakterizasyonu*, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2007.

- [71] R. Penjweini, H. G. Loew, P. Breit, K. W. Kratky, Optimizing the antitumor selectivity of PVP-Hypericin re A549 cancer cells and HLF normal cells through pulsed blue light ,Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 10 (2013) 591-599.
- [72] L. Mühleisen, M. Alev, H. Unterweger, D. Subatzus, M. Pöttler, R. P. Friedrich, C. Alexiou and C. Janko, Analyses of Hypericin-Mediated Effects and Implications for Targeted Photodynamic Therapy, International Journal of Molecular Sciences, 18 (2017) 1388.
- [73] J. Nie, W. Cheng, Y. Peng, G. Liu, Y. Chen, X. Wang, C. Liang, W. Tao, Y. Wei, X. Zeng, L. Mei, Co-Delivery of Docetaxel And Bortezomib Based on A Targeting Nanoplatform For Enhancing Cancer Chemotherapy Effects, Drug Deliv. 24 (2017) 1124–1138.
- [74] L. Duse, E. Baghdan, S. R. Pinnapireddy, K. H. Engelhardt, J. Jedelska, J. Schaefer, P. Quendt, U. Bakowsky, Preparation and Characterization of Curcumin Loaded Chitosan Nanoparticles for Photodynamic Therapy, Engineering of Functional Interfaces, 215 (2018) 15.
- [75] J. Vargova, J. Mikes, R. Jendzelovsky, L. Mikesova, B. Kucharova, E. Culka, R. Fedr, J. Remsik, K. Soucek, A. Kozubik, Hypericin Affects Cancer Side Populations Via Competitive Inhibition of BCRP, Biomedicine And Pharmacotherapy, (2018)
- [76] H-Q. Mao, K. Roy, V.L. Troung-Le, K. Janes, K. Lin, Y. Wang, J. T. August, K. Leong, Chitosan-DNA Nanoparticles As Gene Carriers: Synthesis, Characterization And Transfection Efficiency, Journal of controlled release, 70 (2001) 399-421.
- [77] S. M. Ali, M. Olivo, Bio-Distribution And Subcellular Localization of Hypericin And its Role in PDT Induced Apoptosis in Cancer Cells, International journal of oncology, 21 (2002) 531-540.
- [78] A. R. Billia, A. Karioti, Hypericins as Potential Leads for New Therapeutics, Int. J. Mol. Sci. 11 (2010).
- [79] V. Huntosova, Z. Nadova, L. Dzurova, V. Jakusova, F. Sureau, P. Miskovsky, Cell Death Response of U87 Glioma Cells On Hypericin Photoactivation is Mediated by Dynamics of Hypericin Subcellular Distribution And Its Aggregation in Cellular Organelles, Photochemical and Photobiological Sciences, 11 (2012) 1428-1436.
- [80] M. Huang, Z. Ma, E. Khor, L-Y. Lim, Uptake Of FITC-Chitosan anoparticles by A549 Cells, Pharmaceutical Research, 19 (2002) 1488-1494.
- [81] J. H. Kim, Y. S. Kim, K. Park, S. Lee, H. Y. Nam, K. H. Min, H. G. Jo, J. H. Park, K. Choi, S. Y. Jeong, R. W. Park, I. S. Kim, K. Kim, I.C. Kwon, Antitumor Efficacy of Cisplatin-Loaded Glycol Chitosan Nanoparticles in Tumor-Bearing Mice, Journal of Controlled Release, vol 127 (2008) pg 41-49.

- [82] H. Du, M. Olivo, B. K-H. Tan, B-H. Bay, Hypericin-Mediated Photodynamic Therapy Induces Lipid Peroxidation and Necrosis in Nasopharyngeal Cancer, vol 23, issue 5, **2003**, 1401-1405.

