T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AKCİĞER KANSER HÜCRELERİNE YÖNELİK BİYOTİN İLE HEDEFLENDİRİLMİŞ DUAL İLAÇ YÜKLÜ NANOPARTİKÜLER SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ

Fatma Şayan POYRAZ

DOKTORA TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU

Eylül, 2025

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AKCİĞER KANSER HÜCRELERİNE YÖNELİK BİYOTİN İLE HEDEFLENDİRİLMİŞ DUAL İLAÇ YÜKLÜ NANOPARTİKÜLER SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ

Fatma Şayan POYRAZ tarafından hazırlanan tez çalışması 04.09.2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Barbaros NALBANTOĞLU, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Doç. Dr. Ayşegül ERDEMİR, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Veli Cengiz ÖZALP, Üye
Atılım Üniversitesi _____

Dr. Öğr. Üyesi Levent ELMAS, Üye
İzmir Bakırçay Üniversitesi _____

Danışmanım Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU sorumluluğunda tarafımca hazırlanan "Akciğer Kanser Hücrelerine Yönelik Biyotin ile Hedeflendirilmiş Dual İlaç Yüklü Nanopartiküler Sistemlerin Geliştirilmesi" başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Fatma Şayan POYRAZ

Bu tez çalışması, “Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)” tarafından “2214-A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı” kapsamında “1059B142100560” başvuru numaralı proje ile desteklenmiştir.



Fındığıma

TEŞEKKÜR

Her şeyden önce akademik hayata başlamış olduğum lisans eğitimimden itibaren ilgimi ve merakımı her daim destekleyen, bana sadece yol göstermekle kalmayıp yeni yollar açan, kariyerim boyunca attığım her adımda arkamda durarak bugünkü ben olmamı sağlayan sevgili danışmanım Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU'na,

Sadece akademik hayatta değil günlük yaşantımda da vakit geçirmekten çokça keyif aldığım, bu hayata ve bu mesleğe dair bilgi ve deneyiminlerini samimiyetle paylaşan, çekinmeden kapısını çalabildiğim sevgili hocam Doç. Dr. Ayşegül ERDEMİR'e,

Daha lisans öğrencisi iken ilk deneylerimi birlikte yaptığım ve o günden beri birlikte pek çok çalışmaya imza attığımız, ne zaman bir sorum ya da sorunum olsa rahatça arayabildiğim, yoğun takvimine rağmen bana vakit ayıran değerli hocam Prof. Dr. Serap ACAR'a

Hayatın sadece iyi anlarında değil, özellikle içinden çıkamayacağımı düşündüğüm kötü zamanlarında varlığıyla bana ışık olan ve değerli hissettiren en kıymetlilerim Arş. Gör. Dr. Serap YALÇINYİĞİT ve İrem METEOĞLU'na,

Tüm lisans hayatımı birlikte geçirdiğim, artık her birimiz farklı yerlerde olsak da gönül bağımızın hiç kopmadığı, hep yanımda ve kalbimde hissettiğim minnoşlarım Ceren KIRMIZITAŞ, Edibe Ece ABACI, Elif DİK ve Yağmur HASBİOĞLU'na

Bu hayatta aldığım en güzel kararlardan biri olan 2214-A serüvenimde beni sadece gaza getirmekle kalmayıp bir de kefilim olarak İrlanda'ya gitmeme vesile olan, akademik anlamda her konuda yol gösteren ve öğreten arkadaşım Dr. Bilal ÖZTÜRK'e, her ne kadar bu yola bilerek, isteyerek ve severek çıkmış olsam da zorlu ve yıpratıcı olan doktora sürecimi katlanır kıldığı için başta oda arkadaşım Arş. Gör. Senanur DOKUZ olmak üzere değerli arkadaşlarım Emrah BERTAN, Şener ÇİNTESUN, Büşra AKGÜL, Semra TAŞDURMAZLI, Hasan Hüseyin GÜLERCAN ve Esra BEDİR'e

Hepsi bambaşka karakterler ve farklı hikâyeler taşısa da ortak noktada bana güç, neşe ve huzur veren, hayatın farklı yollarından gelip kalbimde aynı yeri paylaşan canım arkadaşlarım Seher AKKUŞ, Cansel KAYA, Pınar ÖZTEKİN,Çağla VELİOĞLU ve Alihan KOCABAŞ'a

İnsanın lise arkadaşıyla meslektaş olması ve bambaşka bir diyarda yıllar sonra yan yana çalışabilmesi olabilecek tesadüflerin en güzeliydi. Hayatımın her anında yanımda olması bir yana, İrlanda serüvenimde kendimi hep evimde gibi hissettirdiği için Yağmur BOZKURT'a, bir yıl boyunca birlikte güldüğüm, ağladığım, dertleştiğim, iyi ki vardınız ve iyi ki yollarımız kesişti dediğim Büşra GÜNAY ve İbrahim ERBAY'a,

2214-A Yurtdışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı kapsamında doktora eğitimime katkıda bulunan TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Life brings you together with some people in the most unexpected ways. From being three strangers sharing a house to teaching me what sisterhood truly means, my beautiful girls, Sam and Ariadni, Carramore House was something entirely different with you. If soulmates exist, you are mine. My Gs, forever grateful for our bond.

Not only in the cell culture room, where we chatted like crazy while experimenting side by side, but also during all the good times I had at CURAM and even in Galway, you were always there. TC-8 would never be the same without Rahul and Ankita.

Başta dünyalar güzeli Fındık'ım olmak üzere yolumun kesiştiği her canlıya, bu mesleğe heyecanla devam etmemi sağlayan öğrencilerime, hep elimden tutanlara, düşerken kaldıranlara, dallanıp budaklandıkça çiçek bahçelerine açılan o yollara, bugünkü ben olmak için kendime verdiğim sözü tutarken en değerli hatıralarım Yeşim'e, Ahmet'e, Babam'a ve anısı daima kalpte kalacak tüm kaybettiklerime, tüm zorluklara tek başına göğüs geren biricik anneme, mucizelerle gelen Rıfkı'ya,

Kendini aradığımı bile bilmeden kendini bulduğu bu yolda hayal ettiklerinden çok daha fazlasına sahip olan o küçük kıza; inandığım ve başardığım için en çok kendime teşekkür ederim.

Fatma Şayan POYRAZ

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ ix
KISALTMA LİSTESİ x
ŞEKİL LİSTESİ xii
TABLO LİSTESİ xiv
ÖZET xv
ABSTRACT xvii
1 GİRİŞ 1
1.1 Literatür Özeti ... 1
1.2 Tezin Amacı ... 4
1.3 Hipotez ... 4
2 GENEL BİLGİLER 6
2.1 Kanser ... 6
2.2 Akciğer Kanseri ve Tedavi Yöntemleri ... 8
2.3 A549 Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanser Hücre Hattı ... 13
2.4 Taşıyıcı Sistemler ve Kanser ... 14
2.4.1 Polimerik Nanopartiküller 15
2.4.2 PLGA 17
2.4.3 Biyotin ile Hedeflendirilmiş İlaç Taşıma Sistemleri 19
2.5 5-Fluorourasil ... 21
2.6 Gentisik Asit ... 23
3 MATERYAL VE METOD 25
3.1 Materyal ... 25
3.1.1 Kullanılan Sarf Malzemeler 25

3.1.2 Kullanılan Cihazlar 25

3.1.3 Kullanılan Kimyasal, Enzim ve Kitler 26

3.1.4 Kullanılan Stok Solüsyon ve Tampon Çözeltilerin Hazırlanması 29

3.2 Metod 32

3.2.1 İkili Emülsiyon Çözücü Uçurma Yöntemi (w/o/w) ile 5-Fluorourasil ve Gentisik Asit Yüklü PLGA Nanopartiküllerinin Sentezi 32

3.2.2 5-Fluorourasil ve Gentisik Asit Yüklü PLGA Nanopartiküllerin Karakterizasyonu 34

3.2.3 5-Fluorourasil ve Gentisik Asit Yüklü PLGA Nanopartiküllerin Biyotin ile Yüzeyinin Kaplanması ve Karakterizasyonu 36

3.2.4 Nanopartiküllerin Stabilitesi 38

3.2.5 Hücre Kültürü Çalışmaları 38

3.3 İstatistiksel Analizler 56

4 BULGULAR VE TARTIŞMA 57

4.1 Kalibrasyon Eğrileri 57

4.2 Farklı Parametrelerde Sentezlenen Nanopartiküller ve Karakterizasyonu 59

4.3 Nanopartiküllerin Biyotin ile Yüzeyinin Kaplanması ve Karakterizasyonu 65

4.4 Nanopartiküllerde Stabilizasyon Çalışması 69

4.5 Hücre Kültürü Çalışmaları 70

5 SONUÇ 93

KAYNAKÇA 95

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR 111

SİMGE LİSTESİ

rpm	Dakikada Dönme Hızı
λ	Dalgaboyu
°C	Derece Santigrat
g	Gram
w/v	Hacimde Ağırlıkça Yüzde
kV	Kilovolt
L	Litre
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mV	Milivolt
n	Mol
M	Molar
nm	Nanometre
h	Saat
W	Watt

KISALTMA LİSTESİ

5-FU	5-Fluorouracil
A549	İnsan Akciğer Kanser Hücre Hattı
ATCC	American Type Culture Collection
ATR	Attenuated Total Reflectance
BNP	Biyotin Kaplı Nanopartikül
Casp-	Kaspaz (Caspase)
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DCM	Diklorometan
DL	İlaç Yükleme Kapasitesi (Drug Loading)
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DMEM	Dulbecco's Medified Eagle Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksid
EDC	1-Etil-3-(3-Dimetilamino) Propil Karbodiimid
EDTA	Etilendiamintetraasetik Asit
EE	Enkapsiülasyon Etkinliği (Encapsulation Efficiency)
EMA	European Medicine Agency
FBS	Fetal Bovine Serum
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Floresan İzotiyosiyanat
FT-IR	Fourier Transform Infrared
FUGA	5- Fluorouracil ve Gentisik Asit
FUGANP	5- Fluorouracil ve Gentisik Asit Yüklü Nanopartikül
GA	Gentisik Asit
HDF	İnsan Dermal Fibroblast
HCl	Hidroklorik Asit
IC_{50}	Yarı Maksimum İnhibitör Konsantrasyon
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide

NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
NHS	N-Hidroksisukkinimid
OD	Optical Density
PBS	Fosfat Tamponu
PDI	Çoklu Dağılım İndeksi
PEST	Penisilin-Streptomisin
PLGA	Polilaktik-ko-glikolik Asit
qRT-PCR	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik Asit
PVA	Polivinil Alkol
RY	Reaksiyon Verimi (Reaction Yield)
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TAS	Total Antioksidan Seviye
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskobu
TOS	Total Oksidan Seviye
WHO	World Health Organization
UV	Ultra Violet
XRD	X-Işını Kristalografisi

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2. 1 Kanserin temel özellikleri. **8**
Şekil 2. 2 Farklı kemoterapötik ilaçların etki mekanizmaları. **12**
Şekil 2. 3 Plga'nın kimyasal yapısı **18**
Şekil 2. 4 Biyotin molekülünün kimyasal yapısı **20**
Şekil 2. 5 5-Fluorourasil'in kimyasal yapısı **21**
Şekil 2. 6 5-Fluorourasil'in kanser hücrelerine etki mekanizması **22**
Şekil 2. 7 Gentisik asit molekülünün kimyasal yapısı 23
Şekil 3. 1 5-Fu ve ga yüklü plga nanopartiküllerin şematik gösterimi **33**
Şekil 3. 2 Karbodiimid yöntemi ile biyotin kaplanan nanopartiküllerin gösterimi. **37**
Şekil 3. 3 Bsa standart eğrisi **53**
Şekil 3. 4 Sds-page ve sds jelin pvdf membrana aktarımının şematik olarak gösterilmesi 55
Şekil 4. 1 5-Fu'nun suya karşı 266 nm'de hazırlanmış kalibrasyon eğrisi. **58**
Şekil 4. 2 Ga'nin suya karşı 320 nm'de hazırlanmış kalibrasyon eğrisi. **58**
Şekil 4. 3 Biyotinin su ve etanole karşı 210 nm'de hazırlanmı kalibrasyon eğrisi. **58**
Şekil 4. 4 5-Fu ve ga içeren fuganp'lere ait boyut dağılım grafiği **61**
Şekil 4. 5 5-Fu ve ga içeren fuganp'lere ait zeta grafiği **61**
Şekil 4. 6 Fuganp'lere ait sem görüntüsü. **62**
Şekil 4. 7 Fuganp'lere ait tem görüntüsü. **62**
Şekil 4. 8 5-Fluorourasil, gentisik asit, plga ve fuganp'lere ait ft-ır grafiği **63**
Şekil 4. 9 5-Fluorourasil, gentisik asit ve fuganp'lere ait xrd grafiği **64**
Şekil 4. 10 Ph 7.4 ve ph 5.5 pbs tampon içerisinde fuganp'lerin ilaç salımı **65**
Şekil 4. 11 Biyotin ile kaplanmış bnp'lere ait boyut dağılım grafiği **66**
Şekil 4. 12 Biyotin ile kaplanmiş bnp'lere ait zeta grafiği **66**
Şekil 4. 13 Bnp'lere ait sem görüntüsü. **67**
Şekil 4. 14 Biyotin, fuganp ve bnp'lere ait ft-ir grafiği **68**
Şekil 4. 15 Fuganp ve bnp'lere ait xrd grafiği **68**
Şekil 4. 16 Ph 7.4 ve ph 5.5 pbs tampon içerisinde bnp'lerin ilaç salımı **69**
Şekil 4. 17 (A) Fuganp ve **(b)** bnp'lerin distile su, pbs ve dmem ortamında günlere bağlı stabilite çalışması **70**
Şekil 4. 18 Fitc-fuganp boyut dağılım grafiği **71**
Şekil 4. 19 Fitc-fuganp zeta grafiği **71**
Şekil 4. 20 Fitc-fuganp'lerin a549 hücreleri tarafından hücre içerisine alınımı **72**

Şekil 4. 21 (A) A549 hücrelerinde 48 saat hücre canlılığının temsili görüntüleri **(b)** a549 hücreleri üzerinde farklı konsantrasyonlarda (0,1-5 mm) fuga, fuganp ve bnp'lerin 48 saat hücre canlılığı **73**
Şekil 4. 22 (A) Hdf hücrelerinde 48 saat hücre canlılığının temsili görüntüleri **(b)** hdf hücreleri üzerinde farklı konsantrasyonlarda (0,1 - 100 mm) fuga, fuganp ve bnp'lerin 48 saat hücre canlılığı **73**
Şekil 4. 23 (A) A549 hücre hatlarında koloni oluşumu **(b)** kolonilerin kantitatif analizi **(c)** %30 asetik asit ile çözülen kolonilerin normalizasyonu. **76**
Şekil 4. 24 Fuga, fuganp ve bnp uygulanan a549 hücrelerinde hücre göçü ve yara kapanması. **78**
Şekil 4. 25 A549 hücrelerinde hücre göçü oranlarinin kantitatif analizi. **78**
Şekil 4. 26 (A) Fuga, fuganp ve bnp uygulanan a549 hücrelerinde anti-proliferatif etkinin immünositokimyasal olarak gösterimi **(b)** fuga, fuganp ve bnp uygulanan a549 hücrelerinde anti-proliferasyon grafiği **80**
Şekil 4. 27 Floresan mikroskobunda otofajik hücrelerin görüntülenmesi **82**
Şekil 4. 28 Fuga, fuganp ve bnp uygulanan a549 hücrelerinde otofajik vezikül oluşumu ile kırmızı-avo içeren hücrelerin yüzdesi **82**
Şekil 4. 29 Floresan mikroskobunda mitofajik hücrelerin görüntülenmesi **84**
Şekil 4. 30 Fuga, fuganp ve bnp uygulanan a549 hücrelerinde monomer ve agregat oranının kantitatif analizi. **84**
Şekil 4. 31 Konfokal mikroskobunda apoptotik hücrelerin görüntülenmesi **86**
Şekil 4. 32 Fuga, fuganp ve bnp uygulanan a549 hücrelerinde apoptotik hücrelerin kantitatif analizi **86**
Şekil 4. 33 Fuga, fuganp ve bnp'ler tarafından oksidatif stres parametreleri **(a)** tas, **(b)** tos ve **(c)** osi **88**
Şekil 4. 34 (A) Fuga, fuganp ve bnp uygulanan a549 hücrelerinde apoptotik genlerin mrna düzeylerinin kantitatif gerçek zamanlı pcr analizi **(b)** fuga için genişletilmiş ölçekte bcl-2 gen ifadesi **(c)** fuganp için genişletilmiş ölçekte bcl-2 gen ifadesi **90**
Şekil 4. 35 Fuga, fuganp ve bnp uygulanan a549 hücrelerinde protein ifade düzeylerinin western blotting ile analizi. **91**
Şekil 4. 36 İmmunoblot bantlarinin kantitatif densitometrik analizi **92**

TABLO LİSTESİ

Tablo 2. 1 Kemoterapinin dönemsel yan etkileri 12
Tablo 3. 1 Farklı parametrelerle sentezlenen nanopartiküller **34**
Tablo 3. 2 Farklıparametrelerde sentezlenen biyotin kaplı nanopartiküller **37**
Tablo 3. 3 A549 ve hdf hücre hatlarının genel özellikleri. **39**
Tablo 3. 4 Cdna sentezinde kullanılan bileşenler ve miktarları **50**
Tablo 3. 5 Cdna sentezi reaksiyon koşulları **50**
Tablo 3. 6 Ekspresyonu belirlenecek genlere ait primer dizileri **51**
Tablo 3. 7 Qrt-pcr analizinde kullanılan bileşenler **51**
Tablo 3. 8 Qrt-pcr reaksiyon koşulları **52**
Tablo 3. 9 Ayırma ve yükleme jeli hazirlanması 53
Tablo 4. 1 Farklı parametrelerle sentezlenen nanopartiküllere ait sonuçlar **59**
Tablo 4. 2 Deneysel çalışmalarda kullanılan nanopartiküllere ait sonuçlar **59**
Tablo 4. 3 Farklı parametreler kullanılarak sentezlenen bnp'ler **65**

ÖZET

Akciğer Kanser Hücrelerine Yönelik Biyotin ile Hedeflendirilmiş Dual İlaç Yüklü Nanopartiküler Sistemlerin Geliştirilmesi

Fatma Şayan POYRAZ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU

Güncel verilere göre akciğer kanseri her yıl yaklaşık 1,6 milyon ölüme neden olan tedavisi zor, ölümcül bir hastalık olup tedavi zorlukları çoğunlukla tümörün agresifliği ve kemoterapi toksisitesinden kaynaklanmaktadır. A549 hücreleri, yüzeylerinde biyotin pozitif reseptörlere sahip küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücreleridir. Bu çalışma, A549 küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerini hedeflemek için 5-Fluorourasil (5-FU) ve Gentisik Asit (GA) ile yüklenmiş, Biyotin (B) kaplı poli-(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) nanopartikülleri (BNP) kullanılarak yeni bir terapötik yaklaşımı araştırmaktadır. Bu amaçla, Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FT-IR) Spektroskopisi, X-Işını Kırınımı (XRD) Analizi, Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) kullanılarak BNP'ler parçacık boyutu, zeta potansiyeli ve morfoloji dahil olmak üzere fizikokimyasal özellikleri açısından karakterize edilerek optimize edilmiştir. Karakterizasyon sonrası yapılan *In vitro* analizler, BNP'lerin A549 küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerinde 48

saatte 0,35 mM'lik bir IC_{50} değeri ile biyotinlenmemiş nanopartiküllere ve serbest ilaç kombinasyonlarına kıyasla üstün sitotoksisite sergilediğini ortaya koymuştur. BNP'ler ayrıca hücre canlılığını, çoğalmasını, göçünü ve koloni oluşumunu etkili bir şekilde engellemiş; hücrelerde apoptozu, otofajiyi ve oksidatif stresi artırmış ve akciğer kanseri hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyelini bozmuştur. Ayrıca yapılan moleküler analizler sonucunda BNP'lerin içsel apoptotik yolu aktive ederek A549 küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerinde apoptotik genleri ve proteinleri indüklediği doğrulanmıştır. Bu bulgular, biyotinle işlevselleştirilmiş çift ilaçlı nanopartiküllerin akciğer kanseri tedavisi için hedefli ve etkili bir terapötik strateji olarak potansiyelini vurgulamaktadır.

Anahtar Kelimeler: 5-fluorourasil, gentisik asit, biyotin, nanopartikül, hedefli nanopartikül, akciğer kanseri.

ABSTRACT

Development of Dual Drug-Loaded Nanoparticle Systems Targeted With Biotin for Lung Cancer Cells

Fatma Şayan POYRAZ

Department of Molecular Biology and Genetics
Doctor of Philosophy Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU

Lung cancer causes approximately 1.6 million deaths annually, and treatment challenges stem from tumor aggressiveness and chemotherapy toxicity. A549 cells are non-small cell lung cancer cells that have biotin-positive receptors on their surface. This study explores a novel therapeutic approach using biotin-coated poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles (BNPs) loaded with 5-Fluorouracil (5-FU) and Gentisic Acid (GA) to target A549 non-small cell lung cancer cells. For this purpose, using Fourier-Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopy, X-Ray Diffraction (XRD) Analysis, Scanning Electron Microscopy (SEM) and Transmission Electron Microscopy (TEM), BNPs were characterised for their physicochemical properties, including particle size, zeta potential, and morphology. In vitro analyses revealed that BNPs exhibited superior cytotoxicity compared to non-biotinylated nanoparticles and free drug combinations, with an IC50 of 0.35 mM at 48 hours on A549 non-small cell lung cancer cells. BNPs also effectively inhibited cell viability, proliferation, migration, and colony formation. Additionally, BNPs treatment increased apoptosis, autophagy and oxidative stress, and disrupted mitochondrial membrane potential on cancer cells. Molecular

analyses confirmed the activation of the intrinsic apoptotic pathway. These findings highlight the potential of biotin-functionalized dual-drug nanoparticles as a targeted and efficient therapeutic strategy for lung cancer treatment.

Keywords: 5-fluorouracil, gentisic acid, biotin, nanoparticle, targeted nanoparticle, lung cancer.

1
GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Kanser, dünya çapında ikinci önde gelen ölüm nedeni olup, her altı ölümden yaklaşık birini oluşturmaktadır ve akciğer kanseri, küresel çapta en ölümcül kanser türüdür. Çeşitli histolojik alt tipleri olan karmaşık ve çok faktörlü bir hastalık olması ve geç teşhis edilen hastaların neredeyse üçte ikisinin kapsamlı bir cerrahi müdahaleye tabi tutulamaması nedeniyle akciğer kanserinde teşhis genellikle çok geç konulabilmektedir[1, 2]. Günümüzde akciğer kanserinin geleneksel tedavisi, tümörün cerrahi olarak çıkarılması ve ardından kemoterapi ve radyoterapidir. Yan etkilerin yüksek sıklığına ve akciğerlere sınırlı ilaç taşınmasına rağmen, kemoterapi ilaçlarının sistemik uygulanması akciğer kanseri için temel tedavi olmaya devam etmektedir[3].

Bir antimetabolit ilaç olan 5-Fluorourasil (5-FU), kolorektal ve akciğer kanseri de dahil olmak üzere çeşitli tümörlerin tedavisinde 1957'den beri yaygın olarak kullanılan bir kemoterapötik ajandır. 5-FU, timidilat sentazı (TS) bloke ederek veya metabolitlerini RNA ve DNA'ya yanlış bir şekilde entegre ederek önemli biyosentetik süreçleri kesintiye uğratır ve bu da kanser hücrelerinde sitotoksisiteye neden olur[4]. Ancak kemoterapi sonrası gelişen ilaç direnci, kanser tedavisindeki sayısız avantajına rağmen 5-FU'nun terapötik etkinliğini kısıtlamaktadır. Çeşitli çalışma raporlarına göre, 5-FU bazlı birinci basamak kemoterapinin ileri evre kanser hastalarında %10-15 oranında başarılı tedavi yanıt oranı bulunmaktayken tedaviye diğer kanser ilaçlarının eklenmesi veya 5-FU bazlı kompleks tedaviler (FOLFOX, XELOX ve SOX) yanıt oranını %40-50'ye yükseltmektedir[5]. Ayrıca, baş ağrısı, mide bulantısı, iştahsızlık, ishal, deri döküntüsü, saç dökülmesi, uyuşukluk, baş dönmesi, görme bozuklukları ve uykusuzluk gibi kaçınılmaz yan etkiler nedeniyle bu ilacın terapötik kullanımı sınırlıdır[6]. Başarılı kanser tedavisi, kemoterapi duyarlılığını artırmak ve yan etkileri azaltmak için yeni teknikler geliştirmeye dayanır. Bu nedenle, ilaç

direnciyle mücadele etmek ve terapötik yanıt oranlarını iyileştirmek için acilen yeni tedavi yaklaşımlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Akciğer kanseri tedavisindeki sınırlamalar göz önüne alındığında, nanoteknolojiye dayalı ilaç verme sistemlerinin geliştirilmesinin bu zorluklara etkili bir çözüm olabileceği düşünülmektedir[1].

Güncel araştırmalara göre, hücre sinyallemesini etkileyen çeşitli bitkiler ve bitki kaynaklı diyet bileşenleri de kanser tedavisinde kemopreventif ajanlar olarak kullanılmaktadır[7]. Gentisik asit (GA; 2,5-dihidroksibenzoik asit [2,5-DHBA]), *Gentiana* cinsi bitkilerin köklerinden elde edilen doğal bir madde olup aynı zamanda bir aspirin metaboliti ve benzoik asitten türetilen bir difenolik bileşiktir[8]. Çok sayıda çalışma, GA'nın anti-inflamatuar, antimutajenik, hepatoprotektif, nöroprotektif, antibakteriyel ve özellikle antioksidan özellikleri de dahil olmak üzere çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğunu göstermektedir. Bu bulgular, GA'nın çeşitli hastalıkların tedavisinde potansiyel kullanımını düşündürmektedir[8-10].

Nanopartiküler sistemler, terapötik ilaçları hassas hedef bölgelere iletmek için uzun zamandır etkili kontrollü salım yapabilen formülasyonlar olarak kabul edilmektedir. Standart kanser tedavilerine göre daha etkili ve hedefli tedavi sağlayarak kanser için önemli terapötik vaatler sunmaktadırlar[11]. Küçük boyutları sayesinde nanopartiküller, gelişmiş geçirgenlik ve tutulma (EPR) etkisi sayesinde tümör bölgelerinde birikerek geleneksel kemoterapötiklere kıyasla daha az yan etkiye neden olurlar. Polimerik nanopartiküller, geniş bir yelpazedeki aktif maddelerin biyoyararlanımını, yarı ömrünü ve suda çözünürlüğünü artırırken sistemik toksisiteyi azaltan taşıyıcı sistemlerdir. Ayrıca merkezi sinir sistemine çok sayıda ilaç ajanı sağlamak için de kullanılabilmektedirler. Poli(laktik-ko-glikolik) asit (PLGA), biyolojik olarak parçalanabilirlik, EPR etkisi, sürekli ve kontrollü ilaç salınımı, tümör damar sisteminde gelişmiş ilaç birikimi, biyouyumluluk, düşük maliyet ve EMA ve FDA tarafından altın standart olarak onaylanması gibi çok sayıda avantaj sunan, iyi karakterize edilmiş bir polimerdir ve polimerik nanopartiküllerin üretiminde en yaygın kullanılan polimerdir. Tüm bu avantajlarına ek olarak son yıllarda taşıyıcı sistemler ve dolayısı ile polimerik nanopartiküller işlevsellendirilerek tümörlerin veya mikro ortamlarının pasif ya da aktif olarak hedeflenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Pasif hedefleme,

boyutları, şekilleri ve yüzey yükleri nedeniyle çoğunlukla EPR etkisi yoluyla kanser hücrelerinin mikro ortamında yoğunlaşabilen polimerik nanopartiküllerin doğrudan uygulanmasıdır. Aktif hedefleme ise kanser hücrelerinde aşırı ekspresyon gösteren belirli reseptörleri/biyobelirteçleri hedefleyerek nanopartiküllere hedefleme/biyo-tanınabilir ligandların takılması ve normal hücreleri etkilemeden kanserli hücrelerin hedeflenmesidir. Hedefleme ile nanoilaçların emilimi ve tutulması; dolayısıyla terapötik etkinliği artırılabilmektedir. Hedefleme ligandları, kanser hücrelerinde aşırı ekspresyon gösteren reseptörlere karşı son derece seçicidir ve bu da normal hücrelere zarar vermeden nanopartiküllerin hücresel emilimini artırabilir. En yaygın hedefleme ajanları peptitler, aptamerler, küçük moleküller ve antikorlardır. Antikorlar, ilaç farmakokinetiğini değiştirebildikleri, pahalı ve büyük olmaları, bağlanma zorluğu ve konjugasyon sırasında reseptör afinitelerini azaltma eğiliminde oldukları için hedefleme için tercih edilmemektedir. Bu nedenle, vitaminler gibi küçük moleküller son yıllarda hedefleme ajanları olarak yaygınlaşmıştır[1, 11-15].

Suda çözünen bir vitamin olan Biyotin (B), insanlarda yağ asitleri, glikoz ve amino asit metabolizmasındaki temel adımları katalize eden beş karboksilaz için koenzim görevi görür; H2A, H3 ve H4 histonlarındaki lizin kalıntılarının biyotinlenmesi ve çeşitli transkripsiyon faktörleri aracılığıyla gen ekspresyonunu düzenler[16]. Memeli hücreleri biyotin üretemez, bu nedenle biyotin dışarıdan takviye edilir[17]. A549 da dahil olmak üzere birçok kanser hücre hattının sağlıklı hücrelere göre daha yüksek seviyelerde biyotin reseptörlerine sahip olduğu ve kanser hücrelerinde biyotin alımının çok daha yüksek olduğu bilinmektedir[18].

Son araştırmalar, kanserde ayrı hücresel yolları hedef alan iki veya daha fazla terapötik ilacın birlikte enkapsüle edildiği ve hedeflendirildiği nanopartiküler sistemlerin kontrollü ilaç dağılım mekanizması ile birlikte anti-kanser etkinliği arttırabileceğini göstermektedir[1, 19]. Yapılan literatür taramasında bugüne kadar, A549 hücrelerinde gelişmiş antitümör etkiler elde etmek için 5-FU ve GA'nın PLGA nanopartiküllerine birlikte kapsüllenmesiyle ilgili hiçbir çalışma bildirilmemiştir.

1.2 Tezin Amacı

Bu çalışmanın amacı, 5-FU ve GA'yı kapsülleyen çift ilaç yüklü PLGA nanopartikül sistemlerini (FUGANP) tasarlamak, üretmek, karakterize etmek ve yüzeylerini biyotin ile işlevsellendirdikten sonra (BNP) biyotin pozitif reseptörlere sahip A549 küçük hücreli olmayan akciğer kanser hücreleri üzerindeki antitümör aktivitelerini değerlendirmektir.

Bu amaçla, FUGANP'ler çift emülsiyon (w/o/w) çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılarak sentezlendi ve ardından BNP'leri üretmek için biyotin ile yüzey modifikasyonu yapıldı. Her iki formülasyon da partikül boyutu, zeta potansiyeli, ilaç salınımı, Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FT-IR) Spektroskopisi ve X-Işını Kırınımı (XRD) Analizi gibi fizikokimyasal özellikler ile karakterize edildi ve morfolojik analiz için Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) kullanıldı.

FUGANP ve BNP'lerin *In vitro* antitümör aktivitesi, A549 hücreleri üzerinde sitotoksik, anti-proliferatif, anti-migrasyon, antioksidan ve antiapoptotik etkilerinin serbest ilaç kombinasyonu (FUGA) ve tedavi edilmemiş kontrol grubu hücreleri ile karşılaştırmalı olarak incelenmesiyle değerlendirildi.

1.3 Hipotez

Bu çalışmada; kemoterapötik bir antimetabolit ilaç olan 5-FU'nun direkt uygulanması ile meydana gelen yan etkilerini azaltmak ve tedavi yanıtını artırmak amacı ile kombine ilaç tedavisi olarak önemli biyolojik aktivitelere sahip olduğu bilinen GA molekülü ile PLGA içerisine enkapsüle edilmesi ve Biyotin ile hedeflendirilerek A549 hücrelerinde etkin bir tedavi rolü üstlenmesi amaçlanmaktadır.

Böylece elde edilen; biyotin ile hedeflendirilmiş, ikili ilaç yüklü nanopartiküler sistem, sağlıklı hücrelere zarar vermeden yüzeyinde biyotin resptörleri bulunduran A549 hücrelerine hedeflenecek ve kontrollü salınım mekanizması sayesinde dolaşım sistemi içerisinde uzun süre bozunmadan kalarak tümörlü hücreye/dokuya etki eden nanoteknolojik tabanlı bir ilaç iletim sistemi olacaktır.

Bu çalışmanın ayrıca literatürde daha evvel birlikte çalışılmamış olan 5-FU ve GA ajanlarının terapötik uygulamalarını önemli ölçüde genişletebileceği ve kombine

ilaç yüklü hedefli nanopartiküler sistemlerin kanser tedavisi üzerine etkisi bakımından önemli bir referans olabileceği düşünülmektedir.

2
GENEL BİLGİLER

2.1 Kanser

İlk kez MÖ 16-17. Yüzyıllarda yazılmış olan dünyanın en eski cerrahi dökümanı Edwin Smith Papirüs'ünde bahsi geçen kanser, vücudun normal hücresel düzenini bozan, kontrolsüz hücre çoğalması ve yayılması ile karakterize edilen kompleks bir hastalık grubudur. Etimolojik olarak ise M.Ö. 400 yılında, hastalıkların çevre dokulara yayılmasını yengecin kollarıyla çevresine sarılmasına benzeten Hipokrat tarafından Eski Yunanca'da "yengeç" anlamına gelen "karkinos" sözcüğünden türetilmiştir[20].

Biyolojik olarak kanser, genetik materyalde meydana gelen mutasyonlar sonucu oluşan bir hastalık olup bu mutasyonlar genellikle hücre bölünmesini teşvik eden onkogenlerin aktivasyonu, hücre büyümesini baskılayan tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu ve/veya DNA onarım mekanizmalarının bozulması gibi olaylarla ilişkilidir[21].

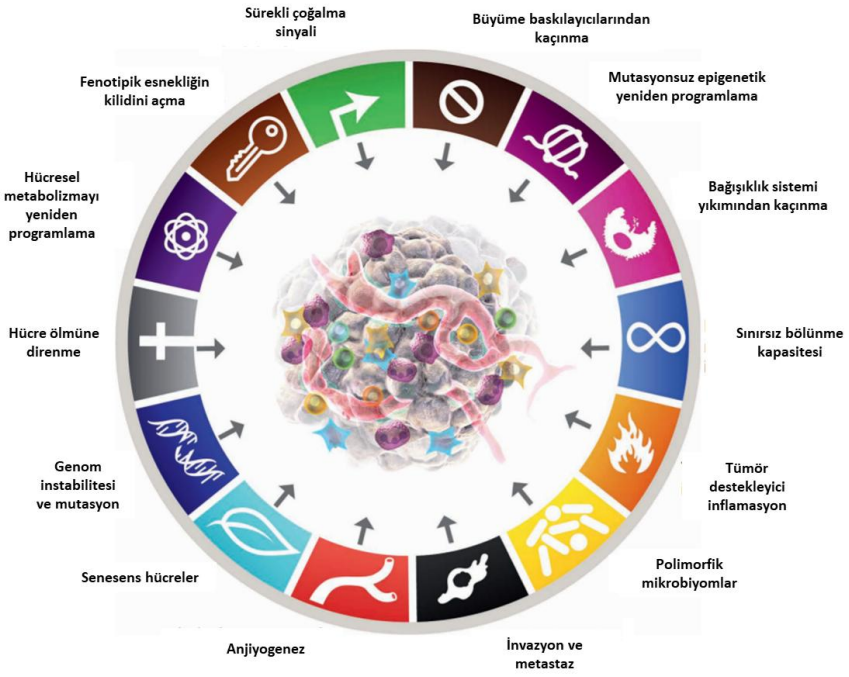
Sinir hücreleri ve kas hücreleri gibi bölünemeyen hücreler dışında vücutta bulunan tüm sağlıklı hücreler düzenli ve sürekli olarak bölünebilme yeteneğine sahiptir. Bölünebilen bu hücreler, erken ya da erişkin dönemde olmasına göre hızlı ya da yavaş bölünebilmekte ve hatta yetişkin hücreler bölünme özelliklerini kaybederek zamanla apoptoza gitmektedirler. Kontrollü hücre ölümü olarak da bilinen apoptoz sağlıklı ve bölünebilme yeteneğini kaybetmiş yaşlı hücrelerde nükleer parçalanma ve hücresel yıkım ile hücrenin yok edilmesi durumudur[22].

Normal hücrelerde hücre döngüsü sıkı bir şekilde kontrol edilirken kanser hücreleri, bu düzeni bozarak sınırsız çoğalma yeteneği kazanırlar. Organizmada bulunan milyonlarca hücreden herhangi birinde kontrolsüz bölünme ve çoğalma ile başlayabilen kanser oluşumunda; apoptoza uğraması gereken eski veya hasarlı hücrelerin ölmesi gerekirken bu hücreler sağ kalarak hasarlı yeni hücreleri

oluşturur. Oluşan bu yeni sağlıksız hücreler sürekli olarak bölünerek tümör denilen anormal dokuları oluştururlar [23].

Kanser, temel sebebi tam olarak bilinemese de genetik ve epigenetik değişimlerin sonucu meydana gelen bir hastalık olup proto-onkogenlerin çeşitli mutasyonlar ile aktifleşmesi sonucu onkogenlere dönüşmesi tümör oluşumunun ana nedenlerinden biri olarak kabul edilmektedir. Ayrıca, tümör baskılayıcı genlerin her iki alelinde de mutasyon meydana gelirse hücresel kontrol kaybolmakta ve kanser oluşmaktadır[24, 25]. Son yıllarda sigara/alkol kullanımı, çeşitli radyoaktif ajanlara ve UV ışınlarına uzun süre maruz kalma, virüsler, beslenme alışkanlıkları ve hava kirliliği gibi epigenetik mekanizmaların da kanser oluşumuna neden olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiş olup; DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve mikroRNA'lar gibi faktörlerin, gen ekspresyonunu değiştirerek tümör gelişimini desteklediği bildirilmiştir[26-29].

Hanahan ve Weinberg tarafından ilk kez 2000 yılında raporlanan “Hallmarks of Cancer” başlıklı çalışmada kanserin altı temel özelliği ; sürekli çoğalma sinyali sağlama, büyümeyi baskılayan sinyallere direnç, hücre ölümünden kaçınma, sınırsız bölünme kapasitesi, anjiyogenez oluşturma ve metastaz yeteneği şeklinde sıralanmıştır. Bu özelliklere 2011 yılında hücresel metabolizmayı yeniden programlama, bağışıklık sistemi yıkımından kaçınma, tümör destekleyici inflamasyon ve genom instabilitesi ve mutasyon özellikleri eklenerek on temel özellik şeklinde sunulmuştur. 2022 yılında Hanahan tarafından yayınlanan son versiyonda ise kanserin temel özellikleri on dört olarak raporlanmıştır (Şekil 2.1)[23, 30, 31].



Şekil 2. 1 Kanserin temel özellikleri[23].

Tüm bu özellikler göz önüne alındığında kanser; farklı doku ve organlarda gelişebilen ve birbirinden farklı biyolojik davranışlar sergileyen kontrolsüz hücre bölünmesi durumudur. Oluştuğu doku veya organa göre tiroid, akciğer, lenfoma, sarcoma gibi özel isimlerle adlandırılmaktadır. Görülme sıklığı ve mortalite bakımından; yaş, cinsiyet, etnik köken, coğrafya vb. pek çok özelliğe göre istatistikler farklılık göstermektedir[32].

2.2 Akciğer Kanseri ve Tedavi Yöntemleri

Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization, WHO) ve Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (International Agency for Research on Cancer, IARC) verilerine göre dünya genelinde en sık rastlanan ve mortalitesi en yüksek olan kanser türlerinden biri akciğer kanseri olup 2022 yılında dünya genelinde yaklaşık 2,48 milyon yeni akciğer kanseri vakası bildirilmiş ve bu hastalıktan kaynaklanan ölümler 1,8 milyona ulaşmıştır. Bu veriler, tüm kanser ölümlerinin yaklaşık beşte birinin akciğer kanseri nedeniyle gerçekleştiğini ve akciğer kanserinin küresel sağlık sistemlerinin en önemli mücadele alanlarından biri olduğunu göstermektedir. WHO verilerine göre; akciğer kanseri oluşumunda başlıca neden

olarak %85-90 oranında tütün ürünü kullanımı gelmektedir. Ayrıca pasif içicilik de kanser oluşum riskini öenmli ölçüde arttırmaktadır[33, 34].

Bununla birlikte özellikle adenokarsinom kaynaklı akciğer kanserlerinin sigara içmeyen bireyler arasında yaygın hale geldiği; hava kirliliği, iç ortam kirleticileri, pişirme dumanı ve endüstriyel kimyasallara maruziyet gibi çevresel faktörlerin bu durumun başlıca nedenleri arasında yer aldığı bilinmektedir. Hindistan gibi gelişmekte olan ülkelerde yapılan çalışmalar, sigara içmeyen akciğer kanseri vakalarının oranının %25 ile %50 arasında değiştiğini göstermektedir[35, 36].

Histopatolojik ve moleküler farklılıklarına göre akciğer kanserleri küçük hücreli akciğer kanseri (SCLC, small cell lung cancer) ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC, non-small cell lung cancer) olarak ikiye ayrılır. Bu iki ana sınıflama, hem klinik seyir hem de tedavi yaklaşımları açısından önemli farklılıklar gösterir[37]. Ayrıca direct akciğer kaynaklı olmasa da nadir tümör türlerinden olan; tüm akciğer kanseri vaklarının %5'ten azını oluşturan ve uzun süreli asbest maruziyeti ile ilişkili akciğer zarı kanseri mezotelyoma[38] ve çeşitli göğüs duvarı tümörleri[39] akciğer kanseri türlerinden sayılmaktadır.

Küçük Hücreli Akciğer Kanseri (SCLC)

Akciğer kanserlerinin yaklaşık %15'ini oluşturur ve en agresif ilerleyişe sahip alt tiptir. Genellikle tütün kullanımına güçlü bir şekilde bağlıdır ve tanı konulduğunda sıklıkla metastaz yapmış durumdadır. Mikroskobik incelemede hücreler küçük boyutlu, oval ve az sitoplazmalıdır. Nöroendokrin özellikler taşır ve sıklıkla TP53, RB1 gibi tümör baskılayıcı genlerde mutasyon görülür. Tedaviye başlangıçta iyi yanıt verse de çoğu zaman hızlı nüks gösterir[40].

Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri (NSCLC)

Akciğer kanserlerinin yaklaşık %85'ini oluşturur ve kendi içerisinde adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinom olmak üzere üç ana alt tipe ayrılır[41].

Adenokarsinom, NSCLC'nin en yaygın alt tipidir ve genellikle sigara içmeyen bireylerde daha sık görülür. Periferik akciğer bölgelerinde gelişir ve yavaş büyüme eğilimi gösterir. EGFR, ALK, KRAS, ROS1 gibi genetik mutasyonlar bu tümörde önemli rol oynar[42].

Skuamöz hücreli karsinom, daha çok merkezi bronşlardan köken alır ve genellikle sigara içenlerde görülür. Histolojik olarak keratinizasyon ve hücre içi köprüleşme ile karakterizedir. TP53 mutasyonları bu alt tipte sıktır[43, 44].

Büyük hücreli karsinom, diğer iki NSCLC alt tipine benzemeyen, farklılaşmamış tümör hücreleri içerir. Nadir görülür ve genetik olarak heterojen bir yapıya sahiptir. Agresif seyir gösterdiği bilinmektedir[45].

Ne yazık ki, çeşitli histolojik alt tipleri olan karmaşık ve çok faktörlü bir hastalık olması ve geç teşhis edilen hastaların neredeyse üçte ikisinin kapsamlı bir cerrahi müdahaleye tabi tutulamaması nedeniyle akciğer kanserinde tanı genellikle çok geç konulmaktadır[2]. Hastalığın ortalama tanı yaşı 70 civarındadır ve beş yıllık sağkalım oranı %28,1'dir. Ancak erken evrede tanı konulabilirse sağkalım oranı %65'e kadar yükselmektedir. Hastalığın erken evrede saptanabildiği durumlarda akciğer kanserinin geleneksel tedavisi, tümörün cerrahi olarak çıkarılması ve ardından radyoterapi ve/veya kemoterapidir.

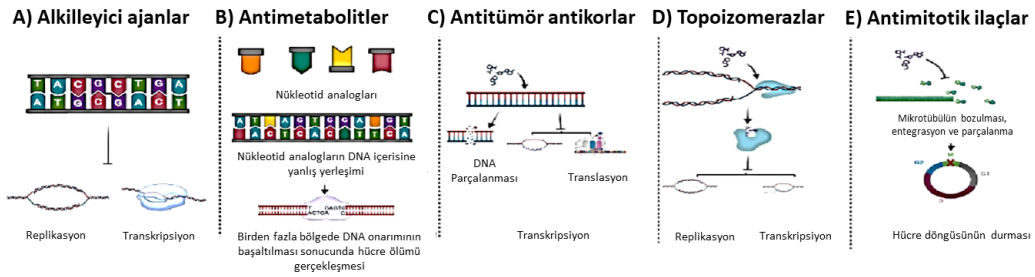
Tümörün cerrahi olarak çıkarılması lokalize tümörlerin teşhis ve tedavisi için temel, etkin bir yöntem olarak kullanılmaya devam etmektedir ancak başarısı tümörün boyutu, konumu ve metastaz gibi faktörlere bağlı olarak sınırlı kalabilmektedir[46]. Tümör hücrelerinin tamamen temizlenmesini sağlamak için genellikle eksizyon cerrahisi yapılmaktadır fakat görünüşte başarılı bir rezeksiyona ragmen çoğunlukla temizlenen bölgede minimal rezidüel hastalık (MRD) olarak belirtilen mikroskobik birikintiler ve mikrometastazlar kalabilmektedir. Yapılan çalışmalar cerrahi teknik yöntemi, kanserli dokunun çevresi ve kanser hücresi çoğalmasını teşvik eden koşulları besleyebilen travma kaynaklı ortam da dahil olmak üzere çeşitli faktörlere bağlı olarak MRD'nin agresif bir yapıda olduğunu ve bu özelliği dolayısıyla hızla yayılarak cerrahi işlem sonra hastalığın tekrarında önemli bir etkisi olduğunu göstermektedir[47, 48]. Ayrıca, cerrahi müdahale doğal riskler taşıdığından özellikle ileri evre hastalığı olan tüm hastalar için uygun olmayabilir[46].

Radyoterapi, kanser hücrelerinin DNA'sına zarar vererek kanserli hücreyi yok etmek için X-ışınları, gama ışınları ve protonlar gibi yüksek enerjili parçacıkların kullanıldığı oldukça etkili ve çeşitli kanser türlerinde genel sağ kalım oranlarının artmasına katkıda bulunan bir kanser tedavisidir[49]. İyonlaştırıcı radyasyona

maruz kalma, hidrolize ve radyoaktif oksidatif türlerin (ROS), özellikle hidroksil radikallerinin (.OH) oluşumuna neden olarak kanserli hücrede DNA hasarına yol açarak apoptoz, nekroz veya otofaji yoluyla DNA hasarı tepkisini ve hücre ölümünü tetikler[50, 51]. Ancak bu yöntemin dezavantajı yalnızca tümörlü dokunun değil çevresindeki sağlıklı hücrelerin de radyasyona maruz kalarak hasar görmesidir. Bu nedenle çeşitli radyoterapi protokolleri ile tedavi süreci boyunca tümörün küçülmesi veya meydana gelebilecek anatomik değişiklikler hesaba katılarak tümörde optimum hedefleme ve sağlıklı dokulara verilen zararı en aza indirgeme sağlanır[52]. Brakiterapi (dahili radyoterapi), radyasyon kaynağını doğrudan tümör bölgesine veya yakınına yerleştirerek çıkarılamayan tümörlere yüksek veya düşük dozda radyasyon vermek için bu amaçla kullanılan tekniklerden biridir. Tümörlerin içeriden veya daha yakından ışınlanması, çevre dokulara verilen hasarı en aza indirir[53]. Tüm bu başarılara rağmen, bazı kanser hücreleri radyoterapiye karşı duyarsız kalmakta ve yüksek oranda hastalık tekrarlanmaktadır[54].

Kemoterapi, kanser tedavisinde hücre ölümünü tetiklemek için temel hücre döngüsü evrelerini hedefleyen, en yaygın kullanılan geleneksel yaklaşımlardan biridir. Kemoterapötik ajanlar; alkilleyici ajanlar, antimetabolitler, antitümör antibiyotikler, topoizomeraz inhibitörleri ve antimitotik ilaçlar olmak üzere temelde beş sınıfa ayrılır (Şekil 2.2). Bu ilaçların her biri farklı etki mekanizmalarına sahiptir.

- Alkilleyici ajanlar, DNA'nın replikasyon ve transkripsiyon için açılmasını engelleyen zincir içi ve/veya zincirler arası ilaveler oluşturur.
- Antimetabolitler nükleotid analoglarını kullanır ve bu nükleotid analoglarının DNA içerisine yanlış bir şekilde dahil edilmesi, aynı anda yüzlerce bölgede DNA onarımını başlatarak DNA stresine ve nihai hücre ölümüne neden olur.
- Antitümör antibiyotikler DNA'yı parçalayarak transkripsiyon ve translasyonun bozulmasına neden olurlar.
- Topoizomeraz inhibitörleri DNA replikasyonunu, transkripsiyonunu, kromozomal ayrışmayı ve rekombinasyonu engeller.
- Antimitotik ilaçlar mikrotübül birleşme ve dağılmasını hedef alarak mitozu bozar ve hücre döngüsünün durmasına neden olurlar.



Şekil 2. 2 Farklı kemoterapötik ilaçların etki mekanizmaları[46].

Kemoterapötik ilaçların farklı etki mekanizmaları sayesinde, kemoterapi tedavisi yalnızca lokal tümörleri değil, vücuda yayılmış metastatik kanser hücrelerini de hedef alabilmekte, bazı vakalarda tümörü küçülterek cerrahiye olanak sağlarken bazılarında ise tam iyileştirici etki göstermektedir[31].

Ancak kemoterapötik ilaçlar, sadece kanserli hücreleri değil, aynı zamanda kemik iliği, gastrointestinal sistem, saç kökleri gibi hızlı bölünen sağlıklı hücreleri de etkiler. Bu durum, tedavi süresince veya sonrasında bir dizi akut ve kronik yan etkiye yol açabilir[55, 56]. Tablo 2.1'de kemoterapinin farklı dönemlerde neden olabileceği yaygın yan etkileri dönemsel olarak sınıflandırılmıştır.

Tablo 2. 1 Kemoterapinin dönemsel yan etkileri

Dönem	Yaygın Yan Etkiler
Akut (Tedavi süresince)	Bulantı, kusma, yorgunluk, saç dökülmesi, mukozit, ishal/kabızlık, iştahsızlık, tat değişiklikleri, kan sayım düşüklüğü[55, 57, 58].
Kronik / Geç Etkiler	Periferik nöropati, hafıza ve konsantrasyon bozukluğu, kalp, akciğer ve böbrek hasarları, infertilite, işitme kaybı, ikincil kanser riski[59-61].
Ruhsal Etkiler	Depresyon, anksiyete, uyku bozuklukları, sosyal izolasyon, psikolojik tükenmişlik[62].

Kemoterapinin yan etkileri; hastanın cinsiyetine, yaşına ve genel sağlık durumuna, kullanılan ilacın türüne ve dozaj sıklığına göre değişebilir[60]. Tablo

2.1'de verilen fiziksel yan etkilerin dışında, kemotreapötik ajanların kullanımındaki diğer bir sorun kemoterapi direncidir.

Erken evre tümörler küçük ve daha az heterojen bir yapıya sahip olduklarından farklı tedavilerle yönetilebilirler. Ancak boyutlarının artması ve belirli bir kemoterapi ilacına uzun süre maruz kalmaları, kemoterapi direncini ortaya çıkarır ve uygulanan tedavinin yeniden değerlendirilmesini gerektirir. Kısacası tümör heterojenliği kemoterapi direncine yol açan temel faktördür. Kemoterapi direnci, tedavi sırasında ortaya çıkan edinilmiş bir direnç veya genetik değişiklikler, tümör heterojenliği ve yetersiz ilaç emilimi/metabolizması gibi diğer faktörler sonucunda tedaviden önce var olan içsel bir direnç olabilir. Dolayısı ile kemoterapi tedavisi, genetik mutasyonlar, sinyal yollarındaki değişiklikler veya tümör heterojenliğinden kaynaklanan direnç mekanizmaları tarafından sıklıkla engellenir ve bu dirençler, tedavilerin uzun vadeli etkinliğini azaltır[46].

Yan etkilerin yüksek sıklığına ve sınırlı ilaç taşınmasına rağmen, kemoterapi ilaçlarının sistemik uygulaması akciğer başta olmak üzere pek çok kanserde temel tedavi olmaya devam etmektedir[3]. Ancak özellikle akciğer kanserinde hastaların büyük bir bölümü ileri evrelerde başvurduğundan, geleneksel yöntemlere alternatif olarak çeşitli sistemik tedavilere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu kapsamda son yıllarda geleneksel olmayan yeni tedavi yöntemleri geliştirilmiştir. Gen terapisi, kök hücre tedavisi, immünoterapi, fotodinamik terapi, nanotaşıyıcı sistemler ve hedefe yönelik tedaviler akciğer kanseri başta olmak üzere çeşitli kanser türlerini teşhis ve tedavi etmek için günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır[63].

2.3 A549 Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanser Hücre Hattı

A549 hücre hattı, insan akciğer adenokarsinomu kökenli bir hücre dizisidir ve ilk kez 1972 yılında Giard et al. tarafından izole edilmiştir. Bu hücreler, özellikle küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) çalışmalarında en çok kullanılan *In vitro* modellerden biridir. Epitelyal morfolojiye sahip bu hücreler, 58 yaşında bir erkek hastanın sağ akciğerinden izole edilmiştir. A549 hücreleri, tip II alveoler pnömositlere benzer özellikler gösterdiğinden hem tümör biyolojisi hem de akciğerin biyokimyasal fonksiyonlarını anlamada kullanılan önemli bir hücre modelidir[64]. A549 hücrelerinin bilimsel çalışmalarda sıkça tercih edilmesinin

başlıca nedenlerinden biri, hücrelerin iyi karakterize edilmiş olması ve uzun süreli kültür koşullarına direnç göstermesidir. Bu hücre hattı, özellikle ilaç taşıma sistemlerinin değerlendirilmesi, toksikolojik testler ve gen ekspresyon analizleri için yaygın şekilde kullanılmaktadır[65]. Moleküler düzeyde incelendiğinde, A549 hücreleri genellikle KRAS mutasyonu taşır, ancak EGFR mutasyonu içermez. Bu genetik profil, özellikle hedefe yönelik terapilerin etkinliğinin araştırılmasında onları önemli bir model haline getirmektedir. Ayrıca, bu hücreler TP53 geni bakımından yabanıl tipte olduğundan bu durum onları tümör supresör yolaklarının araştırılmasında farklı bir boyuta taşır[66]. Immünoloji, genetik, metabolizma ve farmakoloji alanlarında da yaygın biçimde kullanılan A549 hücre hattı, nanopartikül tabanlı ilaç taşıma sistemlerinin test edilmesinde akciğer kanser modeli olarak sıklıkla tercih edilmektedir[67].

2.4 Taşıyıcı Sistemler ve Kanser

Kanserde sistemik toksisite, ilaç direnci ve düşük hedef seçicilik gibi sınırlamalar nedeniyle istenen tedavi başarısını sağlanamadığından son yıllarda ilaç taşıyıcı sistemlere dayalı yeni nesil tedavi stratejileri geliştirilmektedir. Taşıyıcı sistemler, tedavi edici ajanların biyoyararlanımını artırmayı, toksisitesini azaltmayı ve hedeflenen dokuya etkin şekilde ulaşmasını sağlamayı amaçlayan, genellikle nanoteknoloji tabanlı yapılardır. Özellikle nanoboyutlu taşıyıcı sistemler, hem fiziksel-kimyasal stabilite sağlamakta hem de kanser hücrelerine seçici dağılım yetenekleri ile öne çıkmaktadır[68]. Nanoteknolojiyle geliştirilen ilaç taşıyıcı sistemlerin temel avantajı, gelişmiş geçirgenlik ve tutma etkisi olarak bilinen EPR etkisi sayesinde tümör dokusunda pasif olarak birikme özelliğine sahip olmalarıdır. Tümör mikroçevresindeki düzensiz damar yapıları ve lenfatik drenajın zayıf olması, bu tür sistemlerin hedef dokuya daha uzun süre etki etmesini mümkün kılmakta ve böylece, ilacın terapötik konsantrasyonu artarken sistemik toksisitesi azalmaktadır[69].

Son yıllarda geliştirilen akıllı nanotaşıyıcı sistemler sayesinde sadece pasif hedefleme değil, tümör hücrelerinde aşırı eksprese edilen belirli biyomolekülleri tanıyarak aktif hedefleme de gerçekleştirebilmektedir. Aktife hedeflemede sıklıkla peptid, antikor, aptamer, vitamin türevleri gibi ligandlar kullanılarak fonksiyonelleştirme yapılmakta, böylece yalnızca kanserli hücrelere hedeflenerek seçici ilaç dağılımı yapılabilmektedir[70].

Nanoboyutlu taşıyıcılar arasında polimerik yapılar, biyobozunur ve biyouyumlu özellikleri nedeniyle öne çıkmaktadır. Polimerik nanotaşıyıcılar, sentetik veya doğal kaynaklı polimerlerden hazırlanabilmektedir ve en yaygın kullanılan polimerler arasında poli(laktik-ko-glikolik asit)(PLGA), polietilen glikol (PEG), chitosan ve polikaprolakton gibi bileşikler yer almaktadır. PLGA, FDA onaylı ve biyobozunur yapıda bir polimer olup, ilaçların uzun süreli ve kontrollü salımına olanak tanıyan bir polimerdir. PEG ise taşıyıcıların dolaşımda daha uzun süre kalmasını sağlar ve immün sistemden kaçmalarına yardımcı olur. Chitosan gibi doğal polimerler biyolojik olarak parçalanabilir ve hücre membranı ile etkileşime girerek mukozal geçirgenliği artırabilir. Yaygın olarak kullanılan bu polimerler, nanosfer ya da nanokapsül şeklinde yapılandırılabilir ve içeriklerine göre hem hidrofilik hem de hidrofobik ilaçları taşıyabilirler[71, 72].

Son yıllarda yapılan araştırmalar ile polimerik nanotaşıyıcıların sadece kemoterapötik ajanlarla sınırlı kalmayarak gen terapisi, immünoterapi ve fotodinamik terapi gibi alanlarda da kullanılabileceğini göstermiştir. Örneğin çeşitli kanser ilaçlarının polimerik taşıyıcılarda birlikte kapsüllenmesi ile çoklu ilaç direnci geliştiren hücre hatlarında etkili sonuçlar elde edilebildiği; siRNA veya DNA gibi genetik materyallerin taşınarak tümöre yönelik gen susturma veya onarım stratejileri geliştirilebildiği; pH-duyarlılığı gibi özel amaçlarla tasarlanarak tümör mikroçevresindeki spesifik koşullara yanıt veren, kontrollü ve yerinde ilaç salınımı yapılabildiği çeşitli araştırmalarda gösterilmiştir[73-75]. Dolayısı ile polimerik taşıyıcı sistemlerin klasik kemoterapi ilaçlarına alternative olarak daha kompleks ve hedeflenmiş tedavi planlarında etkin şekilde kullanılabileceği düşünülmektedir. Günümüzde bu sistemlerin klinik uygulamaları sınırlı olmakla birlikte, çeşitli faz I ve II klinik denemeleri yürütülmektedir. Ancak bu sistemlerin üretim maliyetleri, büyük ölçekli üretim zorlukları ve uzun dönemli biyogüvenlik gereksinimleri gibi bazı sorunlar mevcuttur[76, 77]. Bununla birlikte, ilaç salım sistemlerinin kişiselleştirilmiş tıpla bütünleştirilmesi ve tümör biyolojisinin daha iyi anlaşılmasıyla birlikte, nanoboyutlu ilaç taşıyıcı sistemlerin kanser tedavisindeki yerinin giderek güçleneceği düşünülmektedir.

2.4.1 Polimerik Nanopartiküller

Polimerik nanopartiküller; doğal veya sentetik polimerlerden elde edilen, boyutları genellikle 10–1000 nanometre arasında değişen, biyouyumlu ve

biyobozunur ilaç taşıyıcı sistemlerdir[78]. Bu sistemlerde, etkin farmasötik bileşen ya polimerik matrisin içine entegre edilir ya da dış yüzeyine bağlanarak hedeflenen bölgeye taşınır. Polimerik nanopartiküller son yıllarda özellikle biyomedikal uygulamalarda önemli bir rol oynamaya başlamıştır. Bu nanopartiküller, nanokapsüller ya da nanoküreler olarak farklı sentez yöntemleriyle üretilebilmektedir. Bu yöntemler arasında emülsifikasyon/çözücü buharlaştırma, tuzla çöktürme (salting-out), süperkritik sıvı teknolojisi, diyaliz ve nanopresipitasyon gibi yöntemler bulunmaktadır[79].

Günümüzde geniş uygulama alanlarına sahip olan polimerik nanopartiküllerin en önemli avantajlarından biri, ilaçların kontrollü ve hedefli bir şekilde vücuda salımını sağlamasıdır. Bu sistemler sayesinde terapötik ajanlar hedef bölgeye ulaşana kadar biyolojik ortamda korunabilir ve gerektiğinde uzun süreli ilaç salınımı sağlayabilir. Suda çözünmeyen ilaçların biyoyararlanımı artırılabilir, hidrofilik veya hidrofobik ilaçlar/moleküller enzimatik ya da oksidatif bozulmalardan korunarak taşınabilir, yüzeylerine ligand, antikor, aptamer gibi yapılar bağlanarak spesifik hücre veya dokulara hedefe yönelik tedaviler gerçekleştirilebilir. Bu hedefleme özellikle kanser tedavisinde, tümör mikroçevresine spesifik taşıyıcıların kullanılmasıyla yüksek terapötik indeks sağlanmasına olanak verir[80].

Tüm bu avantajlara karşın, polimerik nanopartiküllerin bazı önemli dezavantajları da bulunmaktadır; örneğin laboratuvar ortamında başarıyla geliştirilen nanopartiküllerin klinik uygulamaya geçişi oldukça zordur ve klinik kullanıma geçirilebilen onaylı sistem sayısı çok azdır. Yalnızca Abraxane gibi birkaç örnek bulunmaktadır[81]. Bu durumun en büyük nedenlerinden biri, süreç içerisinde çeşitli sistemik toksisiteler çıkması ve farklı canlı türleri arasındaki biyolojik farklılıklar nedeniyle hayvan modellerinde elde edilen başarılı sonuçların insana birebir yansıtılamamasıdır . Ayrıca, bu sistemlerin ölçeklenebilirliği ve üretim maliyetleri hâlâ önemli sorun teşkil etmekte ve GMP (Good Manufacturing Practice, İyi Üretim Uygulamaları) koşullarında üretim için yüksek teknik altyapı ve yatırım gerekmektedir[82].

Polimerik nanopartiküllerle ilgili bir diğer sınırlama ise toksik açıdan güvenilirliğinin sorgulanmasıdır. Özellikle sentetik polimerlerin bazı formları veya parçalanma ürünleri vücutta toksisiteye neden olabilmektedir. Aynı zamanda

nanopartikül yüzeyinde protein birikimi (protein corona) gibi olaylar, bağışıklık sistemiyle etkileşime neden olabilir ve immün yanıtı tetikleyebilir, nanopartikül-ilaç konjugatları vücutta fagositoza maruz kalabilir ve bu durum hem ilaç etkinliğinde azalma hem de istenmeyen yan etkilere neden olabilir. Nanopartikül bazlı ilaç taşıyıcı sistemlerin küçük boyutu ve geniş yüzey alanı, agregasyon gibi bazı fiziksel stabilite sorunlarına yol açabilir; boyutu, yüzey yükü, morfolojisi, dağılımı ve stabilitesi detaylı analiz gerektirmekte ve bu analizlerin tekrarlanabilirliği bazen sorun oluşturabilmektedir. Kısacası bu sistemlerin karakterizasyonu zordur [83].

Tüm bu dezavantajlara rağmen doğru polimer-ilaç seçimi ve deneysel tasarım ile polimerik nanopartiküller; kontrollü salım, hedefe yönlendirme, biyouyumlu yapı ve çevresel uyarılara duyarlılık gibi özellikleriyle özellikle kanser ve nörolojik hastalıklar gibi alanlarda çığır açabilecek potansiyele sahiptir.

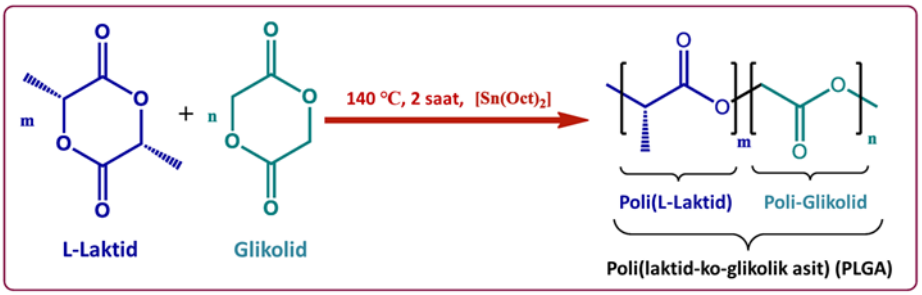
Polimerik nanopartiküllerin üretiminde doğal veya sentetik polimerler kullanılabilmekte ve en yaygın kullanılan sentetik polimerler arasında poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), poli(laktik asit) (PLA), poli(caprolactone) (PCL) gibi FDA onaylı polimerler yer almaktadır. Doğal polimer olarak ise kitosan, jelatin, hiyalüronik asit ve albumin gibi biyopolimerler tercih edilmektedir[84, 85]. Özellikle PLGA bazlı nanopartiküller, ilaç salım kinetiği bakımından oldukça avantajlıdır ve bu durum hem tedavi etkinliğini artırmakta hem de ilacın sistemik toksik etkilerini azaltmaktadır[80].

2.4.2 PLGA

Polimerler, çok sayıda monomerin kimyasal bağlarla birbirine bağlanarak tekrarlanması sonucu oluşan yüksek moleküler ağırlıklı makromoleküllerdir ve bu temel yapı, doğal veya sentetik olarak farklı formlarda bulunabilmektedir. Doğal polimerlere DNA, protein ve selüloz gibi biyolojik moleküller örnek gösterilirken, sentetik polimerler arasında polietilen, naylon ve polyester gibi günlük yaşamda sık karşılaşılan yapılar yer alır. Polimerlerin çeşitlilik, esneklik, biyouyumluluk ve kimyasal olarak değiştirilebilirlik gibi özellikleri, kontrollü ve hedefli ilaç iletim sistemlerinin geliştirilmesinde biyolojik olarak parçalanabilir olmaları, toksik ara ürün oluşturmamaları ve immünojenik yanıta neden olmamalaarı nedeniyle son

yıllarda özellikle biyomedikal ve taşıyıcı sistemlerde geniş bir uygulama alanları vardır[79, 86, 87].

Bu özellikler bakımından, biyobozunur sentetik poliesterler grubunda yer alan poli(laktik-ko-glikolik asit) yani PLGA, laktik asit (LA) ve glikolik asit (GA) monomerlerinin belirli oranlarda kopolimerizasyonu ile elde edilen (Şekil 2.3), biyobozunur ve biyouyumlu yapısı sayesinde insan vücudunda parçalanarak karbondioksit ve suya dönüşen, Avrupa İlaç Ajansı (European Medicine Agency (EMA)) ve Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu (Food and Drug Administration; FDA) tarafından onaylı altın standart bir polimer olup ilaç taşıma sistemlerinden doku mühendisliği uygulamalarına kadar geniş bir kullanım alanı bulunmaktadır. Molekül ağırlıklarına, doğal viskozitelerine ve monomerlerinin oranına bağlı olarak farklı ticari PLGA'lar mevcuttur. Monomer oranının (LA:GA) polimerin hidrofilikliği ve bozunma oranı üzerinde belirgin bir etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Bu da, kontrollü salım sistemleri gibi uygulamalarda PLGA'yı ideal bir aday haline getirmektedir[87-89].



Şekil 2. 3 PLGA'nın kimyasal yapısı[90]

Son beş yıl içinde yapılan çeşitli çalışmalar, PLGA'nın bu potansiyelini daha da derinleştirmiş; özellikle kontrollü ilaç salınımı ve hedefli tedavi sistemlerinde PLGA'nın çok sayıda farmasötik ajanla birlikte biyolojik sistemlere başarıyla entegre edildiği gösterilmiştir. Yang ve ark. 2024 yılında yayımladıkları bir çalışmada PLGA tabanlı nanopartiküllerin ilaçların biyoyararlanımını artırmak ve hedef dokuya doğrudan taşınmasını sağlamak amacıyla yoğun biçimde kullanıldığını belirtmiştir. Bu yaklaşımla hem ilacın terapötik etkisi artırılmakta hem de sistemik yan etkiler minimize edilmektedir[91]. Bir başka dikkat çeken gelişme, PLGA'nın lokal ve transdermal ilaç taşıma sistemlerinde kullanımıdır. PLGA temelli nanopartiküllerle yüklenmiş mikroiğne (microneedle) yamalarının deriye uygulandığında ilacın cilt altı tabakalara yavaş ve sürekli salınmasını

sağlayarak enjeksiyon ihtiyacını ortadan kaldırdığı ve tedavi sürecinde hasta konforunu arttırdığı belirtilmiştir. Böylece PLGA'nın sadece taşıyıcı olarak değil, aynı zamanda uygulama arayüzünü oluşturan yapısal malzeme olarak da kullanılabileceği gösterilmiştir[92]. Aynı zamanda hepatik hastalıkların tedavisi için de umut vadeden bir taşıyıcı olan PLGA'nın karaciğer hedefli salınım sistemlerinde yüksek biyoyararlanım sağladığı belirtilmiştir. Bu tür sistemler, karaciğerdeki hücrelere doğrudan ulaşarak istenilen tedavi etkisini daha etkin ve güvenli bir şekilde gerçekleştirebilmektedir. PLGA, burada yalnızca bir taşıyıcı değil, aynı zamanda toksik etkileri azaltan bir koruyucu ortam da sunmaktadır[93, 94]. Kemik doku mühendisliğinde de PLGA'nın kullanımı giderek yaygınlaşmaşta ve bu tür biyomalzemeler, özellikle kemik kırıkları ve dejeneratif hastalıkların tedavisinde rejeneratif çözümler sunmaktadır[95, 96]. PLGA'nın antimikrobiyal ajanlarla birlikte kullanımı ise enfeksiyonların önlenmesi ve tedavisi konusunda yeni kapılar aralamaktadır. Bu çalışmalar sayesinde PLGA, yalnızca kronik hastalıkların değil, aynı zamanda dirençli enfeksiyonların da önlenmesinde potansiyel bir araç olarak değerlendirilmektedir[97, 98].

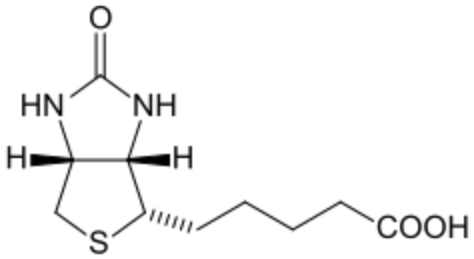
Sonuç olarak polimer bilimindeki ilerlemelerle birlikte PLGA gibi biyobozunur polimerlerin, kişiselleştirilmiş tıp ve hedefe yönelik tedavi stratejilerinde temel taşıyıcı sistemler olarak kullanılmaya devam edeceği öngörülmektedir.

2.4.3 Biyotin ile Hedeflendirilmiş İlaç Taşıma Sistemleri

Vitamin B_7 veya H vitamini olarak da bilinen Biyotin (Şekil 2.4), suda çözünebilen ve temel metabolik süreçlerde rol alan bir vitamindir. İnsan vücudunda karboksilaz enzimlerinin kofaktörü olarak işlev görür ve yağ asidi sentezi, glukoneogenez ve amino asit metabolizması gibi biyokimyasal reaksiyonlarda yer alır. H2A, H3 ve H4 histonlarındaki lizin kalıntılarının biyotinlenmesi ve çeşitli transkripsiyon faktörleri aracılığıyla gen ekspresyonunu da düzenleyen biyotin[16], memeli hücreleri tarafından üretilemediği için memelilerde dışarıdan takviye edilir[17].

Biyotin molekülünü ilaç taşıma sistemleri açısından değerli kılan asıl özellik, birçok kanser hücresinde ve hızlı bölünen dokuda yüksek düzeyde eksprese edilen sodyum-bağımlı multivitamin taşıyıcıları (SMVT) aracılığıyla etkin bir şekilde hücre içine alınabilmesidir. SMVT'nin yüksek ekspresyonu özellikle malign

dokularda belirgin olduğundan, biyotin bu tür hücrelerin seçici olarak hedeflenmesi için uygun bir ligand haline gelmiştir. A549 da dahil olmak üzere birçok kanser hücre hattının sağlıklı hücrelere göre daha yüksek seviyelerde biyotin reseptörlerine sahip olduğu ve dolayısı ile kanser hücrelerinde biyotin alımının çok daha yüksek olduğu bilinmektedir[18, 99].



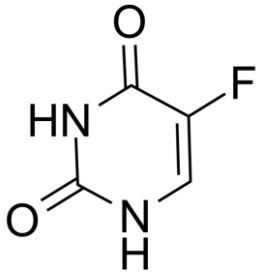
Şekil 2. 4 Biyotin molekülünün kimyasal yapısı

Kanserli hücreler tarafından hücresel alımının yüksek olmasının verdiği avantaj dolayısı ile son yıllarda biyotin konjugasyonuna dayalı hedeflendirme stratejileri, nanoteknolojik ilaç taşıma sistemlerinde giderek artmaktadır. Böylece, biyotin ile işlevsellendirilmiş taşıyıcı sistemlerin kanserli hücrelerde biyotin reseptörlerini tanıması sayesinde ilaçlar hedef hücrelere kolaylıkla yönlendirilebilmekte ve sistemik dolaşımda gereksiz ilaç dağılımı azaltılarak terapötik etkinlik artırılır ve yan etkiler minimuma indirilir[100-102].

Biyotinin PLGA nanopartiküllerle kombinasyonunda pasif ve aktif hedefleme mekanizmaları birlikte kullanılmaktadır. Böylece pasif hedefleme ile tümör dokusunda ilaç yüklü nanopartiküller kolayca birikirken aktif hedefleme sayesinde biyotin reseptörlerinin biyotin ile konjuge edilen nanopartikülleri tanıması ve endositoz yoluyla hücre içine alması gerçekleşir ve hedefe yönelik tedavi gerçekleşir. Bu iki mekanizmanın bir arada kullanılması, hem ilaçların hedef dokuda daha yüksek yoğunlukta bulunmasını hem de sağlıklı dokuların korunmasını sağlar[103-105]. Ancak, biyotin reseptörlerinin bazı sağlıklı dokularda da bulunması potansiyel bir sınırlılık oluşturabilir. Hedefleme çalışmalarında biyotin ve benzeri ligandların diğer ligandlarla kombine edilerek çift veya çoklu hedefleme stratejilerinin geliştirilmesi beklenmektedir. Bu bağlamda biyotin ile hedeflendirilmiş nanopartiküler sistemlerin, hedefe yönelik tedavilerde önümüzdeki yıllarda klinik onkoloji ve gen tedavisi alanlarında önemli bir yer edinebileceği düşünülmektedir.

2.5 5-Fluorourasil

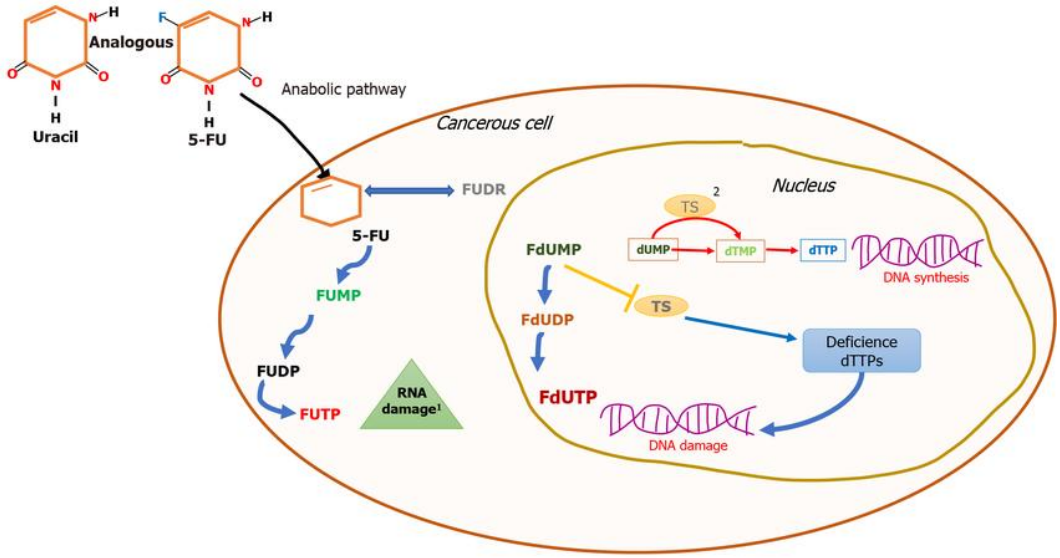
5-Fluorourasil (5-FU), urasil halkasının 5. pozisyonuna flor atomu eklenmesiyle elde edilen sentetik bir pirimidin analoğudur (Şekil 2.5) ve antimetabolit sınıfında yer alır. 1957 yılında Heidelberger ve çalışma arkadaşları tarafından yapay olarak sentezlenmiş ve tümör inhibitör etkisi gösterdiği ortaya konmuştur[106].



Şekil 2. 5 5-Fluorourasil'in kimyasal yapısı

Keşfedildiği tarihten itibaren özellikle kolorektal, meme, baş-boyun ve gastrointestinal sistem kanserlerinin tedavisinde kullanılan temel kemoterapötik ajanlardan biri haline gelen 5-FU, hem DNA hem de RNA biyosentezine müdahale edebilme yeteneği dolayısıyla oldukça güçlü bir antikanser ajandır[4]. 5-FU molekülünün olası üç etki mekanizması vardır (Şekil 2.6);

1. Florourasil metaboliti florodeoksiuridin monofosfat (FdUMP), timidilat sentetaz (TS) ve folat kofaktörü ile bağlanmak için urasil ile rekabet eder. Bu, timidin üretiminin azalmasına ve dolayısıyla DNA sentezinin ve onarımının azalmasına ve nihayetinde hücre proliferasyonunun azalmasına neden olur.
2. Florourasil metaboliti florodeoksiuridin trifosfat (FdUTP) DNA'ya dahil edilerek DNA replikasyonuna müdahale eder.
3. Florourasil metaboliti floroüridin-5-trifosfat (FUTP), üridin trifosfat (UTP) yerine RNA'ya dahil edilir, hileli bir RNA üretir ve RNA işleme ve protein sentezine müdahale eder[107].



Şekil 2. 6 5-Fluorourasil'in kanser hücrelerine etki mekanizması[108]

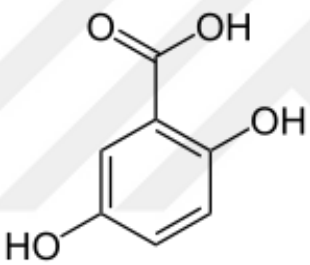
5-FU yalnızca kanser tedavisinde değil, kanser öncesi deri lezyonlarına, aktinik keratoza, viral siğillere ve bazal hücreli karsinoma karşı da etkili bir antimetabolittir. Özellikle deri kanserlerinde kullanılmak üzere oral ve topikal dozaj formları geliştirilmiş ancak karşılaşılan en büyük zorluk, ilacın biyoyararlanımını azaltan zayıf geçirgenliği olmuştur. Bu nedenle çeşitli taşıyıcılarla ve co-crystalleme ile kullanılmıştır[109]. Klinik uygulamalarda da 5-FU genellikle tek başına değil, sinerjik etkiler sağlayan kombinasyon rejimlerinin bir parçası olarak uygulanmaktadır. Örneğin folinik asit ile birlikte kullanımı, FdUMP'nin timidilat sentetaz ile daha kararlı bir kompleks oluşturmasını sağlayarak ilacın etkinliğini artırır. Oksaliplatin veya irinotekan ile kombinasyonları ise kolorektal kanser tedavisinde standart protokoller haline gelmiştir. Bununla birlikte, knaser hücrelerinde 5-FU tedavisine direnç gelişimi önemli bir klinik sorundur[110]. Bu nedenle, dirençli olguların yönetiminde gen ekspresyon profilleme ve yeni nesil hedefe yönelik ajanlarla kombinasyon stratejileri geliştirilmiştir. 5-FU'nun terapötik indeksini iyileştirmek amacıyla günümüzde nanoteknoloji tabanlı ilaç taşıma sistemleri oldukça yaygındır. Ayrıca 5-FU'nun oral biyoyararlanımını artırmak ve gastrointestinal toksisiteyi azaltmak için prodrug yaklaşımları üzerinde de yoğun çalışmalar sürmektedir[111].

Sonuç olarak 5-Fluorourasil, kemoterapi alanında uzun yıllara dayanan klinik kullanım geçmişi ve geniş etki spektrumuyla kanser tedavisinde temel taşlardan biri olmaya devam etmektedir. Etki mekanizmalarının çok yönlülüğü,

farmakogenetik uyarlama olanakları ve ilaç taşıyıcı nanoparitküler sistemlerle kombinasyonu bu ilacın gelecekte de önemli bir terapötik seçenek olarak varlığını sürdüreceğini göstermektedir.

2.6 Gentisik Asit

2,5-dihidroksibenzoik asit ([2,5-DHBA]), olarak da bilinen Gentisik Asit (GA), benzen halkasında bir karboksil (–COOH) ve iki hidroksil (–OH) grubuna sahip bir fenolik asittir (Şekil 2.7). *Gentiana* cinsi bitkilerin köklerinden elde edilen doğal bir madde olup aynı zamanda bir aspirin metaboliti ve benzoik asitten türetilen bir difenolik bileşiktir. Ayrıca birçok bitkide sekonder metabolit durumunda geniş bir yayılım göstermektedir. Yüksek hidrofilik ve fenolik yapısı dolayısı ile başta antioksidan aktivite olmak üzere anti-inflamatuar, antimutajenik, hepatoprotektif, nöroprotektif ve antibakteriyel aktivite gibi çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğu bilinmektedir[8].



Şekil 2. 7 Gentisik asit molekülünün kimyasal yapısı

Antioksidan etkinliği mekanizma olarak da incelenen gentisik asit molekülünün α-resorsilik asite kıyasla daha güçlü bir radikal giderici kapasiteye sahip olduğu ve molekülün yüksek polaritesi ve çözünürlüğü sayesinde zincir kırılmasında önemli rol oynadığı Ghahfarokhi ve ark. tarafından bildirilmiştir[112]. 2021 yılında yapılan bir çalışmada gentisik asidin antidiabetik potansiyeli hem in silico hem de in vitro yöntemlerle araştırılmış ve in vitro olarak α-amylaz ile α-glukozidaz enzim inhibisyonu sergilediği bildirilmiştir. Bu sonuçlar, gentisik asidin potansiyel olarak metabolik bozukluklarda da faydalı olabileceğine işaret etmektedir[10]. Cunha ve ark. tarafından yapılan bir başka çalışmada gentisik asidin dermatolojik uygulamalarda güçlü antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir[113].

Taşıyıcı sistemler ve polimerik nanopartiküller bağlamında gentisik aside doğrudan değinen özgün çalışma sayısı sınırlı olsa da, fenolik bileşiklerin

enkapsüle edildiği polimerik nanopartiküllerin taşıyıcı sistemler olarak kanser tedavisinde yaygın olarak kullanıldığı bilinmektedir[114-116]. Taşıyıcı sistemlerin genel avantajları göz önüne alındığında bu bileşiğin nanopartikül bazlı ilaç taşıma sistemlerinde araştırılmaya değer bir aday olduğu sonucuna ulaşılabilir. Molekülün fenolik yapısı, hedefleyici tedavi sistemlerinde stabiliteyi ve kontrollü salımı kolaylaştırabilir. Ayrıca antimikrobiyal ve antiinflamatuar etkileri, dermatolojik veya sistemik uygulanacak taşıyıcı sistemlerde sinerjik fayda sağlayabilir.

Literatürde spesifik bir gentisik asit-yüklenmiş polimerik/PLGA nanopartikül örneği bulunmamaktadır ve güncel araştırmalar, kanserde ayrı hücresel yolları hedef alan iki veya daha fazla terapötik ilacın birlikte enkapsüle edildiği ve hedeflendirildiği nanopartiküler sistemlerin kontrollü ilaç dağılım mekanizması ile birlikte anti-kanser etkinliği arttırabileceğini göstermektedir[1, 19]. Yapılan bu tez çalışmasında kemoterapötik bir antimetabolit ilaç olan 5-FU'nun direkt uygulanması ile meydana gelen yan etkilerini azaltmak ve tedavi yanıtını artırmak amacı ile kombine ilaç tedavisi olarak önemli biyolojik aktivitelere sahip olduğu bilinen GA molekülü ile PLGA içerisine enkapsüle edilmesi ve Biyotin ile hedeflendirilerek A549 hücrelerinde etkin bir tedavi rolü üstlenmesi amaçlanmaktadır.

3
MATERYAL VE METOD

3.1 Materyal

3.1.1 Kullanılan Sarf Malzemeler

- T25 ve T75 Hücre Kültür Flakonu - NEST
- Thoma Lamı / Lam - ISOLAB
- 13 mm yuvarlak lamel – Thermo Scientific Nunc™ Thermanox™
- 35 mm petri kabı – iBidi
- 8 kuyulu chamber slide – iBidi
- 10 µl , 200 µl , 1000 µl pipet uçları – NEST
- 6, 24 ve 96 kuyulu mikroplakalar- NEST
- 96 kuyulu PCR mikroplaka - NEST
- 96 kuyulu soğuk bloklu PCR-cooler-Eppendorf
- Hücre krio (dondurma) tüpleri - NEST
- Mr. Frosty Hücre Dondurma Kabı – Thermo Fisher
- 15 ml ve 50ml'lik steril falkon tüpler-ISOLAB
- Steril tek kullanımlık serolojik pipetler (1 ml, 2 ml, 5 ml,10 ml ve 25 ml'lik)-GREINER
- 0,2 µl hacimli PCR tüpü – Axygen
- Steril şırınga - Set Medikal
- Nitroselüloz Transfer Membran- Thermo Scientific 88018
- 0.2 µm Immün-Blot PVDF Membran (Bio-Rad Cat No:1620177)
- Filtre kağıdı -BIO-RAD 1703965
- Parafilm

3.1.2 Kullanılan Cihazlar

- Hassas terazi - Shimadzu

- Ultrasonik Su Banyosu - Bandelin Sonorex
- Sonikatör - Bandelin Sonoplus
- Manyetik Karıştırıcı -Variomag Mono
- Shaker - Biosan Environmental Shaker ES20
- Soğutmalı Santrifüj Cihazı - Beckman Coulter Allegra X-30 R
- Mini Santrifüj Cihazı - Hermle Z 206 A
- Mini Vorteks -Thermomac
- pH Metre - Mettler Toledo
- UV-Visible Spektrofotometre - Shimadzu UV-1800
- ZetaSizer - Malvern ZEN 3600 Nano ZS
- Liyafilizatör -Telstar Cryodos
- FT-IR - Thermo Scientific Nicolet iS10
- Karbondioksitli İnkübatör - Biosan ES20
- Otoklav - Hirayama
- Floresan Mikroskop - Zeiss AxioVert A01
- Sınıf II Biyogüvenlik Kabini - Hedlab XPRO-II
- ELISA Okuyucu - BioTek PowerWave XS2
- qRT-PCR Cihazı-Thermo Fisher Scientific OnePlus Real-Time PCR
- Nanodrop - Thermo Scientific NanoDrop One Microvolume UV-Visible Spectrophotometers
- Dikey Elektroforez Sistemi- BIO-RAD MiniPROTEAN® 3 CelI
- Western Blot Transfer Sistemi-Trans-Blot Turbo Transfer System
- Western Blot Görüntüleme Sistemi – Thermo Fisher Scientific iBright Imaging Systems
- Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) - Hitachi S-4700 SEM
- Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) - Hitachi H7500 TEM
- Konfokal Mikroskop – Zeiss LSM 900
- X-Işını Difraktometresi (XRD) - Malvern PANalytical X'Pert PRO

3.1.3 Kullanılan Kimyasal, Enzim ve Kitler

3.1.3.1 Nanopartikül Sentezi ve Karakterizasyonunda Kullanılan Kimyasallar

- 5-Fluorourasil (5-FU, Sigma-Aldrich,F6627)

- Gentisik Asit (GA, Sigma-Aldrich,149357)
- Biyotin (B, Sigma-Aldrich)
- Poli laktik-ko-glikolik asit (PLGA, Sigma-Aldrich 719870)
- 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimit (EDC, Sigma, E7750)
- N -Hidroksisüksinimid (NHS, Sigma-Aldrich 130672)
- Diklorometan (DCM, Merck 106050)
- Etanol (EtOH, Merck 64-17-5)
- Polivinil Alkol (PVA, Sigma-Aldrich 363138)
- Sodyum klorür (NaCl, Sigma-Aldrich 13423)
- Monosodyum fosfat (NaH_2PO_4, Sigma-Aldrich 04270)
- Disodyum fosfat dihidrat ($Na_2HPO_4.2H_2O$, Sigma-Aldirch 04272)
- Sodyum hidroksit (NaOH, Sigma-Aldrich 71690)
- Hidroklorik asit (HCl, Sigma-Aldrich 30721)

3.1.3.2 Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Malzemeler

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco™ 41966-029)
- Penisilin-Streptomisin (PEST) (Gibco™ 15140-122)
- Fetal Sığır Serumu (FBS) (Gibco™ 10270-106)
- Tripsin-EDTA (Gibco™ 25200-056)
- Tripan Mavisi (Sigma T8154)
- Tiazolil Mavi Tetrazolyum Bromür %98 (MTT) (BioBasic T0793)
- Dimetil Sülfoksit (DMSO) (Merck 102952/AppliChem A3672)
- 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Thermo Fisher Scientific D1306)
- Akridin Oranj (Sigma A6014)
- Fosfat Tamponlu Salin Solüsyonu (PBS) (Gibco™ 14190-144)
- Floresan İzotiyosiyanat (FITC) (Sigma-Aldrich F3651)
- Kristal Viyole (Sigma-Aldrich V5265)
- PCNA antikoru (Thermo Scientific, MS106P)
- Hematoksilen (Bio-optica,05-06002)
- Invitrogen Histostain Plus Kit (Cat. No: 85-9043)
- AEC Peroksidaz Kit (Vector Laboratories, SK4200)
- Kapatma medyumu (Large Volume Vision Mount, Thermo Scientific)
- Mitokondriyal Membran Potansiyel Kit (JC-1) (Elabscience E-CK-A301)

- Total Antioksidan Kapasite (TAS) Kit (Elabscience E-BC-K801-M)
- Total Oksidan Kapasite (TOS) Kit (Elabscience E-BC-K802-M)
- Direct-zol™ RNA MiniPrep Kit (Zymo Research, R2050)
- SensiFAST™ cDNA Sentez Kit (65054)
- GoTaq® qPCR ve RT-qPCR Kit (Promega, A6001)
- qRT-PCR İleri ve Geri Primerleri Sentebiolab A.Ş'den temin edildi.
- Proteaz-fosfataz inhibitör kokteyl 100X (Sigma PPC1010)
- Radioimmunoprecipitation Assay (RIPA) Buffer 10X (Abcam ab156034)
- BCA Protein Assay Kit (SMART^{TM} 21071)
- Tris-Baz (Sigma 1001765977)
- Hidroklorik Asit (Sigma-Aldrich 30721)
- Sodyum Dodesil Sülfat (Sigma 101536917)
- Amonyum Persülfat (Sigma 06429KH)
- Tetrametiletilendiamin (Sigma Life Science 102051196)
- Akrilamid/Bis Solüsyonu (Serva - 10688)
- PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher 26619)
- Metanol (Sigma-Aldrich STBG2513V)
- Glasiyel Asetik Asit (TEKKİM-251011531)
- Gliserol (Riedel de Haen 15524)
- β-merkaptoetanol (MERCK 8.05740.0250)
- Glisin (Sigma G8898-500G)
- Bromfenol mavisi (Sigma-Aldrich 114391)
- Coomassie brilliant blue (AppliChem A1092)
- Tween-20 (AppliChem A1389)
- Yağsız süt tozu (Bioshop SKI400.500)
- H_2O_2 (Sigma-Aldrich 18304)
- SuperSignal™ West Pico PLUS Kemilüminesans Substrat (Thermo Fisher 34579)
- Anti-Caspase-3 - (Abcam / ab13847)
- Caspase-7 – (Santa Cruz / sc-56063)
- Caspase-8 p18 – (Santa Cruz / sc-166320
- Cleaved-Caspase-9 – (Abcam / ab2324)

- Bax – (Santa Cruz / sc-7480)
- Bcl-2 – (Santa Cruz / sc-7382)
- Cytochrome-c – (Invitrogen / 338500)
- β -actin – (Cell Signaling Technology/ 4967S)

3.1.4 Kullanılan Stok Solüsyon ve Tampon Çözeltilerin Hazırlanması

3.1.4.1 Nanopartikül Sentezinde Kullanılan Çözeltiler

5-Fluorourasil (5-FU) molekülünün stok çözeltisini hazırlamak için 1 mg 5-Fluorourasil, 1 ml saf suda çözülerek 1 mg/ml konsantrasyonunda bir çözelti elde edildi ve bu çözelti seyreltilerek 0,0001-0,004 mg/ml konsantrasyonları arasında çözeltiler hazırlandı. Çözeltiye ait λ_{max} değeri UV-Vis spektroskopisinde 266 nm olarak belirlendi. Seri konsantrasyonlarda hazırlanan 5-Fluorourasil çözeltilerinin sırasıyla 266 nm dalga boyunda UV-Vis spektrofotometrede absorbans değerleri okunarak standart eğri grafiği çizildi.

Gentisik Asit (GA) molekülünün stok çözeltisini hazırlamak için 1 mg Gentisik Asit, 1 ml saf suda çözülerek 1 mg/ml konsantrasyonunda bir çözelti elde edildi ve bu çözelti seyreltilerek 0,0001-0,007 mg/ml konsantrasyonları arasında çözeltiler hazırlandı. Çözeltiye ait λ_{max} değeri UV-Vis spektroskopisinde 320 nm olarak belirlendi. Seri konsantrasyonlarda hazırlanan Gentisik Asit çözeltilerinin sırasıyla 320 nm dalga boyunda UV-Vis spektrofotometrede absorbans değerleri okunarak standart eğri grafiği çizildi.

%5'lik polivinilalkol (PVA) solüsyonu hazırlanırken; 5 g polivinilalkol tartıldı ve üzerine 100 ml saf su eklenerek ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda 75-78 ℃'de homojen çözelti elde edilene kadar karıştırıldı ve filtre kağıdı ile süzüldü.

%0,1'lik polivinilalkol çözeltisi elde etmek için; 0,1 g polivinilalkol tartıldı ve üzerine 100 ml saf su eklenerek manyetik karıştırıcıda 75-78 ℃'de homojen çözelti elde edilene kadar karıştırıldı ve filtre kağıdı ile süzüldü.

0.01 mol/L fosfat tamponu (PBS) hazırlamak için ; 1,1998 g NaH_2PO_4, 1,7799 g Na_2HPO_4 ve 5,85 g NaCl tartılarak üzerine 1 L saf su eklendi ve manyetik karıştırıcıda homojen bir çözelti elde edilene kadar karıştırıldı. Çözeltinin pH'ı 7,4'e ayarlandı. Salım çalışmaları için aynı şekilde hazırlanan PBS çözeltisinin bir kısmı pH 5,5'e ayarlandı.

Yüzey modifikasyonu amacıyla 400 mM stok EDC ve 100 mM stok NHS çözeltileri hazırlandı. 400 mM EDC stoğu için 62 mg EDC molekülü 1 mL 0.01 mol/L, pH 7.4 fosfat tampon içerisinde hazırlanarak alikotlandı. 100 mM NHS stoğu için 15,5 mg NHS molekülü 1 mL 0.01 mol/L, pH 7.4 fosfat tampon içerisinde hazırlanarak alikotlandı.

Biyotin (B) molekülünün stok çözeltisini hazırlamak için 1 mg Biyotin, 1 ml saf su:etanol (1:1) karışımında çözülerek 1 mg/ml konsantrasyonunda bir çözelti elde edildi ve bu çözelti seyreltilerek 0,005-0,5 mg/ml konsantrasyonları arasında çözeltiler hazırlandı. Çözeltiye ait λmax değeri UV-Vis spektroskopisinde 210 nm olarak belirlendi. Seri konsantrasyonlarda hazırlanan Biyotin çözeltilerinin sırasıyla 210 nm dalga boyunda UV-Vis spektrofotometrede absorbans değerleri okunarak standart eğri grafiği çizildi.

3.1.4.2 Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler

Hücre kültürü çalışmalarında A549 küçük hücreli olmayan akciğer kanser hücre hattı ve sağlıklı kontrol grubu olarak HDF insan dermal fibroblast hücre hattı kullanıldı. A549 ve HDF hücreleri %10 Fetal Sığır Srumu (FBS) içeren tamamlanmış besiyerinde büyütüldü. Bu amaçla ticari olarak satın alınan DMEM besiyeri içerisine 100 µg/mL penisilin-streptomisin (%1), 0,2 mM L-glutamin (%1) ve %10 oranında FBS eklenerek hazırlanan besiyeri +4°C'de saklandı.

Hücre dondurma solüsyonu stok olarak %90 tamamlanmış besiyeri ve %10 Dimetil Sülfoksit (DMSO) içerecek şekilde hazırlanarak -20°C'de saklandı.

Sitotoksisite analizlerinde kullanılan MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) çözeltisi 0,6 mg/ml konsantrasyonda hazırlandı. 6 mg MTT molekülü tartılarak 10 ml PBS (pH 7,4) içerisinde çözdürüldü ve filtreden geçirilerek kullanıldı. MTT solüsyonu ışığa duyarlı olması nedeniyle taze hazırlandı ve kullanılana kadar +4°C'de karanlıkta muhafaza edildi.

Hücresel alım çalışmalarında hücre çekirdeğini boyamak ve hücresel düzeyde apoptoz tayini amacı ile kullanılan DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) molekülü 50 µg/ml olacak şekilde 1X steril PBS tamponu içerisinde stok olarak hazırlandı ve alikotlanarak kullanılana kadar -20°C'de karanlıkta muhafaza edildi.

Koloni oluşum testinde kullanılan %30'luk (v/v) asetik asit çözeltisi için; 30 ml glacial asetik asit çözeltisi 70 ml saf su üzerine damla damla eklenerek seyreltik asit çözeltisi elde edildi.

Otofajik veziküller gözlemlemek amacı ile hazırlanan Akridin Oranj çözeltisi 1 µg/ml olacak şekilde 1X steril PBS tamponu içerisinde taze hazırlandı ve kullanılana kadar karanlıkta muhafaza edildi.

Protein lizatları hazırlanırken RIPA ve proteaz fosfotaz inhibitörü içeren lizis tampon kullanıldı. Bu amaçla ticari olarak satın alınan 5X RIPA çözeltisi PBS tampon ile 1X'e seyreltildi. Seyreltilen 1X RIPA içerisine %1 oranında (1 ml için 10 µl) proteaz fosfotaz inhibitör eklendi.

Protein miktar tayini için BCA Protein Assay Kiti kullanıldı ve kit protokolüne uygun olarak A ve B solüsyonları 50:1 oranında karıştırılarak BCA solüsyonu hazırlandı.

SDS-PAGE'de kullanılan çözeltiler

Tris-HCl (pH 8.8) çözeltisinin hazırlanmasında, 18,15 g Tris-Baz tartılarak 60 ml distile su içerisinde çözdürüldü. pH'ı 8.8'e ayarlandı ve çözelti saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

Tris-HCl (pH 6.8) çözeltisinin hazırlanmasında, 6 g Tris-Baz tartılarak 60 ml saf su içerisinde çözdürüldü. pH'ı 6.8'e ayarlandı ve çözelti saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

%10 SDS çözeltisinin hazırlanmasında, 1 g SDS tartılarak 10 ml saf su içerisinde çözdürüldü.

%10 APS çözeltisinin hazırlanmasında 0,1 g amonyum persülfat tartılarak 1 ml saf su içerisinde çözdürüldü. APS çözeltisi her deney öncesi taze olarak hazırlandı

Protein boyama çözeltisinin hazırlanmasında, 0,1 g coomassie brilliant blue tartılarak 40 ml metanol ve 10 ml glacial asetik asit karışımı içerisinde çözdürüldü ve çözeltinin hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

Boya uzaklaştırma çözeltisinin hazırlanmasında, öncelikle 5 ml metanol 95 ml saf su ile seyreltilerek %5'lik metanol çözeltisi hazırlandı. Aynı şekilde 7 ml glacial asetik asit 93 ml saf su üzerine damla damla eklenerek %7'lik asetik asit çözeltisi

hazıırlandı. Daha sonra 50 ml %5'lik metanol ve 70 ml %7'lik glacial asetik asit karışımı hazırlanarak çözeltinin hacmi saf suyla 1 L'ye tamamlandı.

2X SDS-PAGE örnek tamponunun hazırlanırken; 0,02 g bromfenol mavisi ve 0,4 g SDS tartılarak, 2,5 ml 0,5 M Tris-HCl (pH 6.8), 2 ml gliserol ve 0,4 ml β-merkaptoetanol içeren karışım içerisinde çözdürüldü. Çözeltinin toplam hacmi saf su ile 10 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan stok 1 ml'lik hacimlere alikotlanarak daha sonar kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

Örneklerin yürütüleceği 5X tank tamponunun hazırlanmasında, 15 g Tris-Baz, 72 g glisin ve 5 g SDS tartılarak 1 L saf su içerisinde çözdürüldü.

Western Blot analizinde kullanılan çözeltiler;

Towbin tamponunun hazırlanmasında, 7,2 g glisin ve 1,51 g Tris-Baz tartılarak 250 ml saf su ve 100 ml metanol içeren karışım içerisinde çözdürüldü ve çözelti saf su ile 500 ml'ye tamamlandı.

PBS-T çözeltisi için 1 L, pH 7,4 PBS çözeltisi içerisine 2 ml Tween-20 eklenerek yavaşça karıştırıldı ve PBS-Tween-20 karışımı (PBS-T) hazırlandı.

%5'lik bloklama çözeltisinin hazırlanmasında, 5 g yağsız süt tozu tartılarak 100 ml PBS-T çözeltisi içerisinde çözdürüldü.

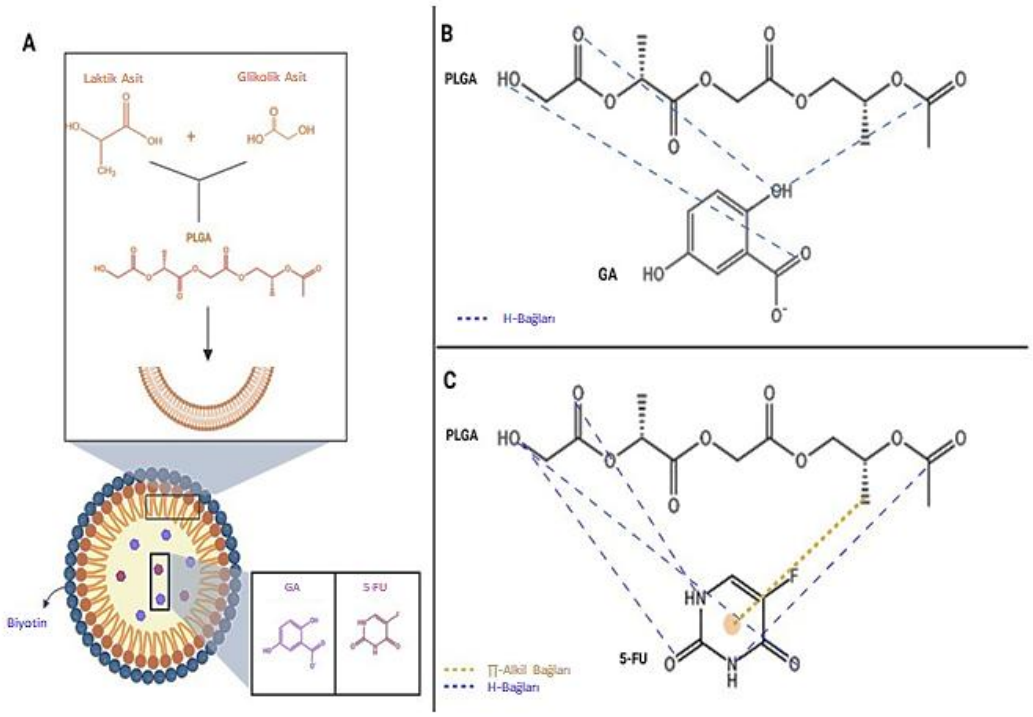
3.2 Metod

3.2.1 İkili Emülsiyon Çözücü Uçurma Yöntemi (w/o/w) ile 5-Fluorourasil ve Gentisik Asit Yüklü PLGA Nanopartiküllerinin Sentezi

Nanopartiküler sistemler hazırlanırken yöntemin belirlenmesinde en etkili parametrelerden biri moleküllerin hidrofobik ya da hidrofilik özellikte olmasıdır[117]. 5-Fluorourasil ve Gentisik Asit molekülleri hidrofilik özellik göstermesi sebebiyle nanopartiküller sentezlenirken çalışmada ikili emülsiyon (w/o/w) çözücü uçurma yöntemi kullanılmıştır [118-121].

In vitro çalışmalarda kullanılan 5-Fluorourasil (5-FU) ve Gentisik Asit (GA) yüklü PLGA nanopartikülleri (FUGANP) (Şekil 3.1) sentezlenirken 5 mg 5-Fluorourasil ve 5 mg Gentisik Asit 0,5 ml saf su içerisinde birlikte çözüldü. 100 mg PLGA, 1 ml DCM içerisinde çözüldü ve oluşan çözeltiler birbirine karıştırılarak vortekslendi. Organik fazı oluşturmak amacı ile 2 ml %5 polivinil alkol (PVA) çözeltisi üzerine %80 güçte, 90 saniye sonike edilerek eklendi.

Oluşan emülsiyon, dış fazı oluşturmak üzere 35 ml %0,1'lik PVA üzerine eklenerek manyetik karıştırıcıda 800 rpm'de 4 saat karıştırıldı. 4 saatin sonunda nanopartikülleri katı olarak elde edebilmek ve yüzeydeki PVA'yı uzaklaştırmak için önce çöktürme ardından yıkama işlemi yapıldı. Çöktürme işlemi 10000 rpm'de 40 dk +4 ℃'de santrifüj yapılarak gerçekleştirildi. Çöktürme işlemi sonrası yıkama için pellet üzerine 35 ml saf su eklenerek 10000 rpm'de 30 dk +4 ℃'de santrifüj yapıldı ve bu işlem 3 kez tekrar edildi. Yıkama sonrası elde edilen nanopartiküller 5-6 ml saf su içinde homojen çözelti haline getirildi ve liyafilizatörde kurutulmak üzere -20 ℃'de dondurulduğu.



Şekil 3. 1 5-FU ve GA yüklü PLGA nanopartiküllerin şematik gösterimi (Biorender ile oluşturuldu).

Farklı parametrelerde sentezlenen 5-Fluorourasil (5-FU) ve Gentisik Asit (GA) yüklü PLGA nanopartikülleri (FUGANP) Tablo 2.1'de verilmiştir.

Tablo 3. 1 Farklı parametrelerle sentezlenen nanopartiküller

Sentez No	GA Miktarı	5-FU Miktarı	Su Miktarı	PLGA Miktarı	PVA Yüzdesi ve Miktarı	DCM Miktarı
1	5,5 mg	5,5 mg	1 ml	50 mg	%3 PVA - 4 ml	1 ml
2	5,5 mg	5,5 mg	1 ml	100 mg	%3 PVA - 4 ml	1 ml
3	5,5 mg	5,5 mg	1 ml	100 mg	%1,5 PVA - 5 ml	1 ml
4	6 mg	6 mg	0,5 ml	100 mg	%1,5 PVA - 4 ml	1 ml
5	5 mg	5 mg	0,5 ml	100 mg	%5 PVA - 3 ml	1 ml
6	5 mg	5 mg	0,5 ml	100 mg	%5 PVA - 2 ml	1 ml
7	5 mg	5 mg	0,5 ml	100 mg	%5 PVA - 2 ml	1 ml
8	5 mg	5 mg	0,5 ml	100 mg	%5 PVA - 2 ml	1 ml
9	5 mg	5 mg	0,5 ml	100 mg	%5 PVA - 2 ml	1 ml
10	5 mg	5 mg	0,5 ml	100 mg	%5 PVA - 2 ml	1 ml

3.2.2 5-Fluorourasil ve Gentisik Asit Yüklü PLGA Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Hazırlanan nanopartiküllerin karakterizasyonu için nanopartiküllerin ilk santrifüj ve üç yıkama sonrasında elde edilen üst fazları kullanılarak reaksiyon verimi (RV), enkapsülasyon etkinliği (EE) ve ilaç yükleme kapasitesi (DL) UV spektroskopisi kullanılarak indirekt yöntem ile hesaplandı[122]. Zeta Sizer ile boyut, dağılım ve zeta potansiyel analizi, Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) ile morfolojik analizler, Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) ve X-Işını Difraktometresi (XRD) ile kimyasal bağ analizleri yapıldı, optimize edilen FUGA nanopartiküllerine ait *In vitro* salım çalışması 30 gün boyunca pH 7,4 ve pH 5,5'ta takip edildi.

3.2.2.1 Enkapsülasyon Etkinliği (EE) Hesaplanması

Nanopartikül içerisine yüklenen etken madde miktarını belirlemek için üst fazdan indirekt tayin metodu kullanıldı. Çöktürme ve yıkama işlemi sonrası elde edilen üst fazlar toplanarak UV spektroskopisinde ölçüm alındı. Ölçüm sonucunda üst fazda bulunan ve suya karşı 266 nm ve 320 nm'de absorbans pikleri verdiği bilinen 5-Fluorourasil ve Gentisik Asit miktarları hesaplanarak nanopartikül içerisine yüklenmemiş olan madde miktarları hesaplandı. Belirlenen miktarlar başlangıç miktarlarından çıkarıldı ve enkapsüle edilen toplam madde miktarı belirlendi.

Enkapsülasyon Etkinliği (%EE), aşağıdaki eşitlik (2.1) kullanılarak hesaplandı.

$$\text{EE (\%)} = \frac{\text{Nanopartikül içine yüklenen etken miktarı (mg)}}{\text{Kullanılan toplam etken madde miktarı (mg)}}\ x\ 100 \qquad (2.1)$$

3.2.2.2 Reaksiyon Verimi (RV) Hesaplanması

Elde edilen nanopartiküllerde reaksiyon verimi hesabı için elde edilen katı nanopartiküllerin başlangıç madde miktarlarına oranı hesaplanarak tüm nanopartiküller için % cinsinden RV eşitlik (2.2) kullanılarak hesaplandı:

$$\text{RV (\%)} = \frac{\text{Üretilen nanoapartikül miktarı (mg)}}{\text{Başlangıç polimer miktarı + Etken madde miktarı (mg)}}\ x\ 100 \qquad (2.2)$$

3.2.2.3 İlaç Yükleme Kapasitesi (DL) Hesaplanması

Üst fazların toplanması sonucunda UV-spektroskopisi ile indirekt olarak hesaplanan enkapsüle madde miktarının liyafilizatörden alınan katı nanopartikül miktarına oranlanması ile ilaç yükleme kapasitesi aşağıdaki eşitlik (2.3) kullanılarak hesaplandı.

$$\text{DL (\%)} = \frac{\text{Enkapsüle edilen etken madde miktarı(mg)}}{\text{Elde edilen katı nanopartikül miktarı (mg)}}\ x\ 100 \qquad (2.3)$$

3.2.2.4 Boyut ve Zeta Potansiyel Analizi

Nanopartiküllere ait ortalama parçacık boyutu (Z-Ave), zeta potansiyel ve polidispersite indeksi (PDI) değerleri Dinamik Işık Saçılması yöntemi ile belirlendi[116]. Ölçüm alınırken nanopartiküller ultra saf su ile 30 kat seyreltildi. Analizler 4,0 mV Helyum-Neon lazer lambalar (633 nm) ile donatılmış Zetasizer Nano ZS (Malvern Insruments, UK) cihazı kullanılarak 0.8872 cP viskozite ve 1.330 kırılma indeksi parametreleri ile ±0,1 °C hassasiyette 25 °C'de 3 tekrarda gerçekleştirildi.

3.2.2.5 Elektron Mikroskobu Analizleri

Optimize edilmiş nanopartiküllerin şekli ve yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskobu (SEM) (S-4700, Hitachi, Japonya) ve geçirimli elektron mikroskobu (TEM) (H-7500, Hitachi, Japonya) kullanılarak analiz edildi[116]. Yüksek vakum altında altın kaplama ile iletken hale getirilen nanopartiküllerin görüntüleri 5 kV, 30.000X büyütmede SEM ile analiz edildi. Benzer şekilde %2 (w/v) fosfotungstik asit solüsyonu ile negative boyama yapılan nanopartiküller oda sıcaklığında kurutularak 80-100 kV, 30.000X büyütmede TEM kullanılarak analiz edildi.

3.2.2.6 FT-IR ve XRD Analizleri

Serbest 5-Fluorourasil ve Gentisik Asit molekülü, PLGA polimeri ve etken madde yüklü polimerik nanopartiküllere (FUGANP) ait fonksiyonel grupların tayini yapılırken Thermo Scientific Nicolet iS10 cihazı kullanıldı, numuneler doğrudan ATR (Attenuated Total Reflectance) ataçmanı kullanılarak örnek başına 16 tarama ve 600 cm^{-1} ila 3600 cm^{-1} bölgesinde 4 cm^{-1} çözünürlükle, havaya karşı blank alınarak 3 tekrarlı olarak analiz edildi[123].

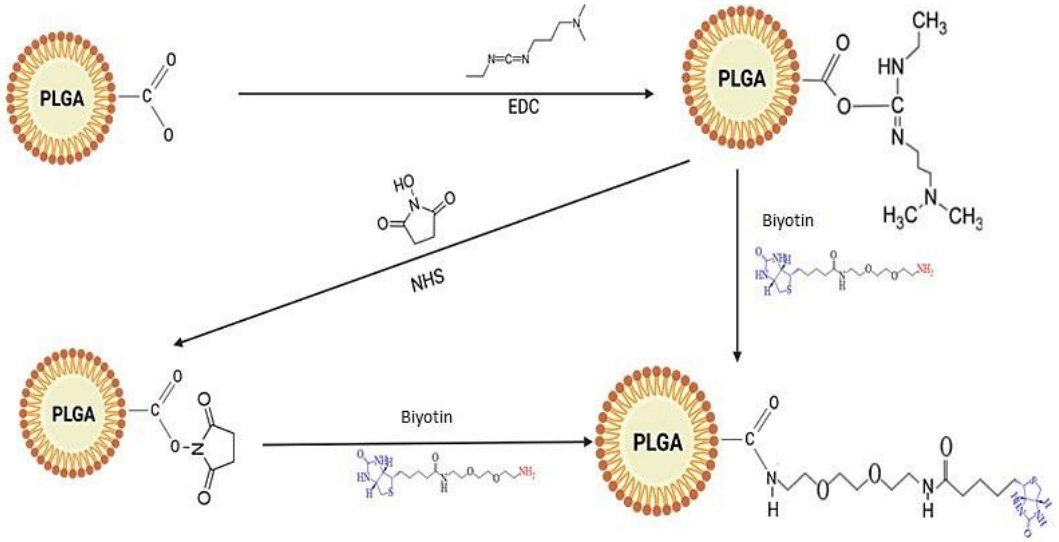
FUGANP'lerin kristalin ve/veya amorf yapısı X-Işın Toz Kırınımı (XRD) kullanılarak Malvern PANalytical X'Pert PRO cihazı ile belirlendi. Örneklerin toz XRD spektrumları, 3°-80° aralığında, 2θ açısı ile ortam sıcaklığında 3 tekrarlı olarak incelendi[116].

3.2.2.7 Nanopartiküllerin *In vitro* Salımı

Nanopartiküler sistemlerin etken madde salım davranışı, doğrudan ilaç stabilitesi ve terapötik sonuçların yanı sıra formülasyon geliştirme ile ilgili olan polimerik nanopartiküllerin uygulanma alanlarının belirlenmesi için önemli bir faktördür[124]. Sentezlenen nanopartiküllerin *In vitro* salınımını inceleyebilmek için 5 mg liyofilize FUGANP 10 ml pH 7,4 ve pH 5,5 (tümör mikroçevresi) PBS tamponunda süspanse edilerek 37 ℃' de, 200 rpm'de yatay olarak çalkalamaya bırakıldı. Örnekler belirli sürelerde 10000 rpm'de, 20 dk, +4℃'de santrifüj edilerek üst fazları toplandı ve absorbans değerlerinden mililitre başına 5-FU ve GA konsantrasyonu bir UV spektrofotometresi kullanılarak belirlendi. Bu işlem 30 gün boyunca belirli periyotlarla tekrarlandı ve salınan toplam madde miktarları hesaplandı.

3.2.3 5-Fluorourasil ve Gentisik Asit Yüklü PLGA Nanopartiküllerin Biyotin ile Yüzeyinin Kaplanması ve Karakterizasyonu

Kanser tedavisi için çeşitli avantajlar sunan PLGA içerikli polimerik nanopartiküller, kanser hücrelerine veya reseptörlerine bağlanabilen vitaminler, peptitler ve aptamerler gibi hedef ligandlarla yüzey konjuge edildiğinde belirli hedeflere ulaşabilir. Böylece ilacın etkinliği artırılabilirken tedavideki yan etkiler azaltılabilir[125]. Biyotin (B) molekülü, belirtilen partikül formülasyonlarına hedefleme ajanı olarak bağlanarak 5-Fluorourasil ve Gentisik Asit yüklü, Biyotin kaplı nanopartiküller (BNP) elde edildi (Şekil 3.2).



Şekil 3. 2 Karbodiimid yöntemi ile biyotin kaplanan nanopartiküllerin gösterimi (Biorender ile olşturuldu).

Konjugasyon işlemi sırasında[12, 126-130], liyofilize edilmiş FUGANP'ler 10 µg/µl olacak şekilde pH 7,4'te 10 mM fosfat tamponlu salinle (PBS) çözüldü ve 15000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Bu işlem 3 kere tekrar edilerek nanopartiküllerin yüzeyi yıkandı. Daha sonra supernatant atılarak nanopartiküllere 400 mM EDC ve 100 mM NHS eklendi. Oda sıcaklığında 100 rpm'de 15 dakika inkübe edildikten sonra, numuneye DMEM besiyerinde çözülmüş 25 mM biotin eklendi ve karışım oda sıcaklığında 30 rpm'de 1 saat karıştırıldı. Daha sonra, numune üç kez saf su ile yıkandı. Yıkama işleminin ardından örnekler liyafilizatörde kurutulmak üzere -20 ℃'de dondurulduu. Tablo 3.2'de farklı parametrelerde sentezlenen biyotin kaplı nanopartiküller (BNP) verilmiştir.

Tablo 3. 2 Farklı parametrelerde sentezlenen biyotin kaplı nanopartiküller

Sentez No	FUGANP Miktarı (0.75 mM)	EDC Miktarı (400 mM)	NHS Miktarı (100 mM)	Biyotin Miktarı	Çözücü Miktarı ve Türü
1	6.32 mg	1 ml	1 ml	25 mM	1 ml - PBS
2	3.16 mg	400 µl	400 µl	10 mM	2 ml - DMEM
3	3.16 mg	1 ml	1 ml	10 mM	2 ml - DMEM
4	1.58 mg	200 µl	200 µl	25 mM	0,5 ml PBS + 0,5 ml DMEM
5	1.58 mg	400 µl	400 µl	25 mM	0,5 ml PBS + 0,5 ml DMEM
6	1.58 mg	400 µl	400 µl	25 mM	1 ml DMEM

Tablo 3. 2 Farklı parametrelerde sentezlenen biyotin kaplı nanopartiküller(devamı)

7	3.16 mg	400 µl	400 µl	50 mM	1 ml DMEM
8	1.58 mg	200 µl	200 µl	50 mM	1 ml DMEM
9	1.58 mg	500 µl	500 µl	50 mM	1 ml DMEM
10	4.74 mg	600 µl	600 µl	75 mM	1 ml DMEM
11	1.58 mg	600 µl	600 µl	25 mM	1 ml DMEM
12	1.58 mg	400 µl	400 µl	25 mM	1 ml DMEM

Hazırlanan hedefli nanopartikülleri karakterize etmek için Zeta Sizer ile boyut, dağılım ve zeta potansiyel analizi, Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) ile morfolojik analizler, Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) ve X-Işını Difraktometresi (XRD) ile kimyasal bağ analizleri yapıldı, optimize edilen biyotin kaplı nanopartiküllere ait *In vitro* salım çalışması 30 gün boyunca pH 7,4 ve pH 5,5'ta takip edildi.

3.2.4 Nanopartiküllerin Stabilitesi

Nanopartikül kararlılığının değerlendirilmesi için, örnekler DMEM besiyeri, fosfat tamponu (PBS, pH 7.4) ve saf su içerisinde çözülerek 1,4,7,10 ve 15. günlerde dinamik ışık saçılımı (DLS) kullanılarak boyut ölçümü yapılmıştır.

3.2.5 Hücre Kültürü Çalışmaları

Nanopartiküllerin *In vitro* etkinliğini belirlemek amacı ile hücre kültürü çalışmalarında A549 küçük hücreli olmayan akciğer kanser hücre hattı (ATCC-CCL-185™) ve sağlıklı kontrol grubu olarak HDF insan dermal fibroblast hücre hattı (ATCC-PCS-201-012™) kullanıldı. A549 hücre hattı epitelyal morfolojide, adherent büyüme özelliğine sahip bir hücre hücre hattıdır. HDF hücre hattı ise fibroblastik morfolojide, adherent büyüme özelliğine sahip hücreler olup bu çalışmada sağlıklı kontrol olarak kullanıldı. A549 ve HDF hücreleri %10 Fetal Sığır Serumu (FBS), %1 PEST ve %1 L-glutamin içeren tamamlanmış besiyerinde, %5 CO_2 içeren 37℃'lik nemli bir inkübatörde büyütüldü. Inverted ışık mikroskobunda günlük mikroskobik incelemeler sonucunda %80-90 konfluansa ulaşan hücreler pasajlanarak kültür devamlılığı sağlandı. Kullanılan hücre hatlarına ait tüm özellikler Tablo 3.3'te yer almaktadır.

Tablo 3. 3 A549[131] ve HDF[132] hücre hatlarının genel özellikleri.

	A549 (ATCC-CCL-185™)	**HDF (ATCC-PCS-201-012™)**
Organizma	**Homo sapiens, İnsan**	**Homo sapiens, İnsan**
Doku	**Akciğer**	**Deri**
Hastalık	**Karsinom**	**Sağlıklı Doku**
Yaş	**58**	**Yetişkin, Lot-spesifik**
Cinsiyet	**Erkek**	**Lot-spesifik**
Morfoloji	**Epitelyal**	**İğ şeklinde, iki kutuplu ve kırılgan**
Büyüme Özelliği	**Adherent**	**Adherent**

3.2.5.1 Hücre Hatlarının Canlandırılması

A549 ve HDF hücrelerinin canlandırılmasında her iki hücre hattı için de aynı protokol izlendi. Sıvı azot tankında (-196°C) kriyotüplerde dondurulmuş halde bulunan hücreler 37°C'ye ısıtılan steril saf su içerisinde hızlıca çözdürüldü. Bu aşamanın hızlı gerçekleştirilmesinin sebebi hücrelerin DMSO'dan zarar görmemesini sağlamaktır. Daha sonra çözdürülen hücreler besiyeri içeren falkon tüplere alınarak 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi ve santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı. Dipte kalan pellet üzerine %10 FBS içeren tamamlanmış besiyeri eklenip nazikçe pipetaj yapılarak hücrelerin homojen bir şekilde dağılması sağlandı ve Thoma Lamı'nda sayılan hücreler yoğunluk durumuna bağlı olarak T25 ya da T75 flask olarak bilinen hücre kültür şişelerine aktarıldı. Flasklara ekilen hücreler, 37°C'de, %5 CO_2 içeren nemli inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Ekimden sonra hücrelerin flask yüzeyine tutunması inverted ışık mikroskobu ile günlük takip edilerek tutunan ve büyüyen hücrelerin besiyeri değiştirildi. %80-90 yoğunluğa ulaşan hücrelerin pasajlama işlemi gerçekleştirildi.

3.2.5.2 Hücre Hatlarının Pasajlanması

A549 ve HDF hücrelerinin pasajlanmasında her iki hücre hattı için de aynı protokol izlendi. Flasklara ekilen hücreler günlük olarak kontrol edilerek gerektiğinde besiyerleri değiştirildi. %80-90 oranında konfluent olan hücrelerin pasajlama işlemi yapıldı. Bu işlemde öncelikle hücrelerin yüzeyini kaplamış olan tamamlanmış besiyeri uzaklaştırıldı ve flask yüzeyine 1X steril PBS eklenerek tripsinizasyon öncesi hücre artıklarının ve besiyerinin uzaklaştırılması amacıyla yıkama yapıldı. Daha sonra flask yüzeyine yapışık halde bulunan hücrelere 1X Tripsin-EDTA eklenerek hücrelerin yüzeyden kaldırılması sağlandı. Bu aşamada enzimin optimum etkisini gösterebilmesi amacıyla hücreler 37°C'lik CO_2'li inkübatörde 2 dakika kadar bekletildi. Hücrelerin tripsinizasyon ile yüzeyden kalkıp kalkmadığını belirlemek için hücreler inverted mikroskopta incelendi. Yüzeyden ayrıldığı belirlenen hücrelerde tripsin etkisini inaktive edebilmek için hücrelere tamamlanmış besiyeri eklendi ve süspanse edilen hücreler 15 ml falkon tüplere aktarılarak 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası çöktürülen hücrelerden süpernatant uzaklaştırılırken elde edilen pellete FBS içeren tamamlanmış besiyeri eklendi ve nazikçe pipetaj yapılarak hücrelerin homojen bir şekilde tek tek ayrılması sağlandı. Homojen hale getirilip süspanse edilen hücreler sayılarak yeni flasklara aktarıldı ve 37°C'de %5'lik CO_2 içeren nemli inkübatöre kaldırıldı. Hücreler %80-%90 oranında konfluent oldukça prolifere olabilmeleri için pasajlama işlemi düzenli olarak tekrar edildi ve belirli aralıklarla ara pasajlardan stok amacı ile hücre dondurularak azot tankına kaldırıldı.

3.2.5.3 Hücrelerde Canlılık Kontrolü ve Hücre Sayımı

Hücrelerde canlılık oranının kontrolünde tripan mavisi kullanıldı. Bu amaçla pasajlama sonrası santrifüjde çöken hücre pelleti tamamlanmış besiyerinde süspanse edildikten sonra süspanse kültürden 20 µl örnek alınarak mikrosantrifüj tüpü içerisine aktarıldı ve üzerine 20 µl tripan mavisi eklenerek 1:1 oranında hücre-boya karışımı elde edildi. Elde edilen karışım Thoma Lamı'na aktarıldı ve farklı alanlardaki canlı hücreler ışık mikroskobu altında sayılarak canlı hücre ortalaması alındı. Bu aşamada mikroskopta canlı hücreler renksiz ve parlak olarak gözlemlenirken cansız hücreler mavi olarak gözlemlendi[133]. Canlı hücre sayısı belirlendikten sonra hücreler yeni flasklara aktarıldı. Tüm *In vitro* deneylerde gerekli hücre sayıları bu yöntemle belirlendi.

Thoma Lamı'nda hesaplama yapılırken 1 ml besiyeri içerisinde bulunan canlı hücre sayısını belirlemek için Eşitlik 2.4 kullanıldı.

$$Canlı\ Hücre\ Sayısı = A\ x\ DF\ x\ 10^4 \quad (2.4)$$

Bu eşitlikte; A, Thoma Lamı'nda farklı alanlarda sayılan canlı hücre sayısının ortalamasını, DF, Thoma Lamı'na koymadan önce tripan mavisi ile karıştırılan hücre süspansiyonunun "dilüsyon faktörünü" temsil etmektedir.

3.2.5.4 Hücre Hatlarının Dondurulması

A549 ve HDF hücrelerinin dondurulmasında her iki hücre hattı için de aynı protokol izlendi. Dondurma protokolünde %90 tamamlanmış besiyeri ve %10 DMSO kullanıldı. 1X Tripsin-EDTA eklenerek flask yüzeyinden kaldırılan hücreler 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve santrifüj sonrası süpernatan atıldı. Pellet üzerine stok olarak hazırlanmış dondurma çözeltisinden kriyotüp başına 1 ml olacak şekilde eklendi ve hücreler pipetaj ile homojen hale getirilerek etiketlenmiş kriyotüplere koyuldu. Kriyotüpler kademeli dondurma işlemi amacıyla izopropil alkol içeren Mr. Frosty™ dondurma kabı içerisinde -80°C'ye kaldırıldı. Ertesi gün kriyotüpler -196°C sıvı azot içeren depolama tankına alınarak kademeli dondurma işlemi tamamlandı. Bu işlemin amacı;kriyoprotektan olarak kullanılan DMSO'nun oda sıcaklığında hücreler üzerinde sitotoksik etkisi olması dolayısı ile hücrelere zarar vermesini engellemektir[134].

3.2.5.5 Hücresel Alım Çalışmaları

Nanopartiküllerin hücresel alımı, yüksek morbidite oranlarına sahip hastalıkların tedavisi için etkili formülasyonların geliştirilmesinde kritik bir öneme sahiptir[135]. Bu nedenle, *In vitro* deneylerden önce, FUGANP'lerin A549 hücreleri tarafından hücre içerisine alınıp alınmayacağını belirlemek için hücresel alım testleri yapıldı. Bu amaçla 1 mg FITC floresan boyası, sentez bölümünde belirtilen çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılarak 5-FU ve GA ile birlikte nanopartiküler sistem içerisinde kapsüllendi (FITCNP). Boyut ve zeta potansiyel analizi ile karakterize edilen nanopartiküllerin hücreler tarafından alınıp alınmadığını değerlendirmek için öncelikle hücre çekirdekleri DAPI ile maviye boyandı. Ardından 1 mg/ml konsanstrasyon olacak şekilde tamamlanmış besiyerinde çözülen FITCNP'ler A549 hücrelerine verildi ve hücresel alım süreci 24 saat boyunca inverted floresan mikroskobu altında izlendi.

3.2.5.6 Nanopartiküler Sistemlerin *In vitro* Biyolojik Etkinliğinin Belirlenmesi

MTT Yöntemi ile Sitotoksisitenin Belirlenmesi

A549 ve HDF hücreleri üzerinde FUGANP ve BNP nanopatiküler sistemlerin serbest ilaç kombinasyonları ile karşılaştırmalı olarak sitotoksik etkisinin belirlenmesinde MTT yöntemi uygulandı. Bu yöntemde kullanılan sarı renkli MTT molekülü (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) canlı hücrelerin mitokondriyal membranında lokalize olan mitokondriyal süksinat dehidrogenaz enzimine bağlanarak mor renkli formazan kristalleri oluşturmaktadır. Yöntem, oluşan formazan kristallerinin çözdürülmesi ve 570 nm'de spektrofotometrik ölçüm ile alınan absorbans değerleriyle ölü ve canlı hücre sayısı arasında doğru orantı kurulmasına dayanmaktadır [136]. 96 kuyulu mikroplakalara 10.000 hücre/kuyu olacak şekilde ekilen A549 ve HDF hücreleri prolifere olması için 37°C'de %5 CO_2 içeren inkübatörde 24 saat inkübe edildi. Morfolojik olarak incelenen hücrelere sitotoksik analizlerini yapmak üzere A549 hücreleri için 0-5 mM doz aralığında, HDF hücreleri için 0-100 mM doz aralığında DMEM besiyeri içerisinde çözülmüş serbest FUGA, FUGANP ve BNP'ler uygulanarak 48 saatlik inkübasyona bırakıldı. 48 saatlik inkübasyon sonucunda tüm kuyulardan besiyeri çekilerek 50 µl MTT solüsyonu eklendi ve hücreler 3 saat inkübe edildi. 3 saatlik inkübasyon sonucunda MTT solüsyonları uzaklaştırılıp her bir kuyu üzerine 100 µl DMSO eklenerek hücreler üzerinde oluşan formazan kristalleri çözdürüldü. ELISA okuyucu ile 570 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak absorbans ölçümü yapıldı. Alınan ölçümlerin her biri için % olarak canlılık oranı Eşitlik 2.5 kullanılarak hesaplanarak hücrelerin %50'sini öldüren doz olarak bilinen IC_{50} değeri hesaplandı[137].

$$\%Canlılık = \left(\frac{\text{570 nm'de deney gruplarının verdiği absorbans değeri}}{\text{570 nm'de kontrol grubunun verdiği absorbans değeri}}\right) x\ 100 \qquad (2.5)$$

Sağlıklı kontrol grubu olan HDF hücrelerinde, A549 hücreleri için belirlenen aralıkta öldürücü doz ve anlamlı sitotoksik aktivite gözlenmediğinden, FUGA, FUGANP ve BNP'lerin diğer biyolojik etkileri sadece A549 hücreleri üzerinde çalışıldı.

Klonojenik Hayatta Kalma Tayini

Klonojenik hayatta kalma tayini için A549 hücreleri 6-kuyucuklu bir mikro plakada $1x10^4$ hücre/kuyu olacak şekilde ekildi ve mikro plakada büyütülen hücrelere BNP için IC_{50} değeri olarak belirlenen 0.35 mM konsantrasyona denk şekilde FUGA, FUGANP ve BNP'ler uygulanarak 48 saat inkübe edildi, kontrol grubuna herhangi bir uygulama yapılmadı. 48 saat inkübasyon sonrasında hücreler 6-kuyucuklu mikro plakalardan tripsinizasyon ile toplandı ve 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılarak pellet üzerine taze besiyeri eklendi ve hücreler Thoma Lamı'nda inverted mikroskop altında sayıldı. Her örnekten kuyucuk başına maksimum 100 hücre alınarak 6-kuyucuklu plakalara yeniden ekildi ve hücrelerin 37°C'de %5 CO_2 içeren bir inkübatörde 7-8 bölünme için büyümesine izin verildi. Her üç günde bir hücre ortamı taze besiyeri ile değiştirildi. Yaklaşık 10 günlük inkübasyondan sonra büyüyen kolonileri ortaya çıkarmak için hücreler üzerindeki besiyeri atılarak 1X PBS ile hücreler yıkandı. Yıkama sonrası hücrelere 10 dk boyunca buz gibi soğuk metanol ile muamele edildi ve hücreler fikse edildi. Fiksasyonun ardından hücreler %0,2 kristal viyole ile 15 dk boyandı. Boyamadan sonra, kültür kapları boya kalıntılarını gidermek için 2-3 kez saf suyla durulandı, boyanmış koloniler sayıldı ve hayatta kalma yüzde grafiği çizildi. Analizi doğrulamak için; fikse edilip %0,2 kristal viyole ile boyanan koloniler %30 asetik asit çözeltisinde çözüldü ve 590 nm'de spektrofotometrik olarak analiz edildi. Hayatta kalma yüzdesi, numunenin kontrole oranı olarak grafiksel olarak çizildi[138].

Çizik Yara İyileşme Testi

Tümör hücrelerinin istila karakterinin ve hücre göç oranlarının belirlenmesi için kullanılan çizik yara iyileştirme testinde[139], A549 hücreleri 24-kuyucuklu mikro plakalarda $1x10^5$ hücre/kuyu olacak şekilde ekildi ve mikro plaka yüzeyinde hücreler %90 oranında konfluansa ulaşana kadar 37°C'de %5 CO_2 içeren bir inkübatörde büyütüldü. Daha sonra, tek tabaka halinde büyüyen hücre merkezi boyunca steril bir pipet ucuyla fiziksel bir yara oluşturuldu ve hücrelere BNP için IC_{50} değeri olarak belirlenen 0.35 mM konsantrasyona denk şekilde FUGA, FUGANP ve BNP'ler uygulandı. Kontrol grubuna herhangi bir uygulama yapılmadı. FBS içermeyen ortamda göç etmesine izin verilen hücrelerde, süreç 48

saat boyunca mikroskobik olarak takip edildi ve yara kapatma boşlukları control grubuna göre karşılaştırmalı olarak hesaplandı.

Prolifere Hücre Çekirdek Antijeni (PCNA) ile Proliferasyonun Belirlenmesi

DNA replikasyonunu durdurmada ve hasarlı hücrelerde DNA onarımını kolaylaştırmada önemli bir rol oynayan bir protein olan PCNA, immünositokimya kullanılarak hücre proliferasyonunu belirlemek için kullanıldı[116, 137]. A549 hücreleri, 24-kuyucuklu bir mikroplakada önceden sterilize edilmiş ve steril pens ile kuyulara yerleştirilmiş olan yuvarlak lamel üzerine $1x10^4$ hücre/kuyu olacak şekilde 50 µl ekildi ve 37°C'de %5 CO_2 içeren bir inkübatörde 30 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası yuvarlak lamellere yapışmış olan hücrelere 450 µl tamamlanmış besiyeri eklenerek hücreler 24 saat inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonra hücrelere BNP için IC_{50} değeri olarak belirlenen 0.35 mM konsantrasyona denk şekilde FUGA, FUGANP ve BNP'ler 48 saat inkübasyon ile uygulandı. Kontrol grubuna herhangi bir uygulama yapılmadı. İnkübasyon süresinin sonunda 24 kuyucuklu mikroplakalar içerisindeki besiyeri uzaklaştırılarak her kuyu 1X PBS ile yıkandı. Yıkama sonrası hücrelere 5 dk boyunca buz gibi soğuk metanol ile muamele edildi ve hücreler fikse edildi. Fiksasyon sonrası kuyular tekrar 1X PBS ile yıkanarak methanol kalıntıları uzaklaştırıldı ve her bir kuyuya 250 µl blokaj solüsyonu (İnvitrogen Histostain Plus Kit – A solüsyonu) eklenerek 20 dakika oda sıcaklığında karıştırıldı. Süre sonunda blokaj solüsyonu uzaklaştırılarak her bir kuyuya 1:300 oranında 1X PBS ile seyreltilmiş PCNA primer antikoru eklendi ve 4°C'de bir gece inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kuyulardaki antikorlar toplanarak tüm kuyular 3x5 dakika olacak şekilde 1X PBS tampon ile yıkandı. Yıkama sonrası kuyulara 250 µl sekonder antikor (İnvitrogen Histostain Plus Kit-B solüsyonu) eklenerek 20 dakika oda sıcaklığında karıştırıldı. İnkibasyon sonrası sekonder antikorlar toplanarak tüm kuyular 3x5 dakika olacak şekilde 1X PBS tampon ile yıkandı. Yıkama sonrası kuyulara 250 µl Streptavidin-peroxidase (HRP) (İnvitrogen Histostain Plus Kit-C Solüsyonu) eklenerek 20 dakika oda sıcaklığında karıştırıldı. İnkibasyon sonrası kuyular son kez 3x5 dakika olacak şekilde 1X PBS tampon ile yıkandı. Daha sonra AEC Peroxidase Substrate Kiti protokolüne göre kromojen hazırlandı ve hazırlanan kromojen karışımından her bir kuyucuk üzerine 250 µl eklenerek 20 dakika karanlıkta

inkübe edildi. İnkübasyon süresi boyunca hücreler mikroskobik olarak takip edildi ve kromojen yardımı ile hücrelerin PCNA antikoru ile işaretlenip işaretlenmediği gözlendi. Kromojenin uzaklaştırılması için hücreler saf su ile yıkandı ve hemen ardından hematoksilen ile işaretlenmeyen hücrelerin zıt boyaması yapıldı. Hematoksilen ile 10-15 saniye kadar muamele edilen hücreler hızlıca çeşme suyu ile yıkanarak reaksiyon durduruldu ve tüm kuyular son kez saf su ile yıkandı. Kuyularda bulunan yuvarlak lameller steril bir pens yardımı ile ters olarak üzerine kapatma medyumu damlatılmış lamlara yerleştirildi ve kuruması için karanlık bir yere kaldırıldı. Hazırlanan preperatlar inverted mikroskopta immersiyon yağı ve objektifi kullanılarak 60x büyütmede incelendi. Rastgele seçilen 10 farklı alanda işaretlenen ve işaretlenmeyen hücreler sayılarak proliferasyon yüzdesi Eşitlik 2.6 kullanılarak hesaplandı[137].

$$\%\ \text{Proliferasyon} = \frac{PCNA\ Pozitif\ Hücre\ Sayısı}{Toplam\ Hücre\ Sayısı}\ x\ 100 \qquad (2.6)$$

Otofajik, Mitokondriyal ve Apoptotik Etkilerin Floresan Görüntüleme ile Hücresel Düzeyde Belirlenmesi

Doğal pH'ta (pH=7) hidrofobik yeşil floresan bir boya olan akridin turuncusu (AO), asidik vezikül organellerinde (AVO'lar) protonlanır ve parlak kırmızı floresan yayan kümeler oluşturarak herhangi bir kültür hücresinde asidik vezikül organellerinin oluşumunun ve otofajinin görüntülenmesini sağlar[140, 141].

JC-1 boyama, biyolojik hücrelerin içi ve dışı arasındaki kritik bir elektrik potansiyeli farkı olan mitokondriyal membran potansiyelinin ($\Delta\Psi m$) belirlenmesinde kullanılan bir yöntemdir[142, 143].

4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), hücre çekirdeğinde meydana gelen, programlanmış hücre ölümü olarak bilinen apoptozu değerlendirmek ve değişimi görselleştirmek için kullanılan bir floresan boyadır[144-146].

DAPI, AO ve JC-1 teknikleri için; A549 hücreleri, 24-kuyucuklu bir mikroplakada önceden sterilize edilmiş ve steril pens ile kuyulara yerleştirilmiş olan yuvarlak lamellar üzerine $1x10^4$ hücre/kuyu olacak şekilde 50 µl ekildi ve 37°C'de %5 CO_2 içeren bir inkübatörde 30 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası yuvarlak lamellere yapışmış olan hücrelere 450 µl tamamlanmış besiyeri eklenerek hücreler 24 saat inkübasyona bırakıldı. Daha sonra hücrelere BNP için

IC_{50} değeri olarak belirlenen 0.35 mM konsantrasyona denk şekilde FUGA, FUGANP ve BNP'ler 48 saat inkübasyon ile uygulandı. Kontrol grubu hücrelerine herhangi bir uygulama yapılmadı. İnkübasyon süresinin sonunda 24 kuyucuklu mikroplakalar içerisindeki besiyeri uzaklaştırılarak her kuyu 1X PBS ile yıkandı. Yıkama sonrası AO ve DAPI boyama için hücrelere 5 dk boyunca buz gibi soğuk metanol ile muamele edilerek hücreler fikse edildi. Fiksasyon sonrası kuyular tekrar 1X PBS ile yıkanarak methanol kalıntıları uzaklaştırıldı ve her boyama için kendi protokolü uygulandı.

AO boyama için; 48 saatlik inkübasyon sonrası fikse edilen hücrelere kuyu başına 1 µg/ml konsantrasyonda akridin turuncusu boyası eklendi. Hücreler daha sonra 37°C'de %5 CO_2 içeren nemli bir inkübatörde 15 dakika kadar karanlıkta inkübe edildi ve boyanın belirli substratlara bağlanması sağlandı. Daha sonra boyalı hücreleri içeren yuvarlak lameller steril bir pens yardımıyla alınarak lam üzerine kapatıldı ve 20X büyütmeli inverted floresan mikroskopla uygun filtrede görüntülendi. Rastgele seçilen 10 farklı alanda hücreler sayılarak her grup için otofajik hücre sayısı % olarak kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak hesaplandı.

JC-1 boyama için; 48 saatlik inkübasyon sonrası tüm kuyular 1X JC-1 Tamponu ile yıkandı ve her bir kuyuya 1 mL JC-1 Çalışma Solüsyonu eklenderek hücreler 37 °C'de 20 dakika karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücreler 1X JC-1 Tamponu ile yıkandı ve 20X büyütmeli inverted floresan mikroskopla uygun filtrede görüntülendi. Rastgele seçilen 10 farklı alandan hücrelerin monomer/agregat oranları sayılarak her grup için mitokondriyal membran potansiyeli Arbitary Unit (AU) cinsinden kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak hesaplandı.

DAPI boyama için; 48 saatlik inkübasyon sonrası fikse edilen hücrelere 1X PBS'de çözülmüş 1 µg/ml DAPI boyası eklendi. DAPI ile muamele edilen hücreler, ilgili substratlarına bağlanmaları için 37°C'de %5 CO_2 içeren nemli bir inkübatörde karanlıkta 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kuyular fazla boyayı gidermek için 1X PBS ile 3x5 dakika yıkandı. Daha sonra boyalı hücreleri içeren yuvarlak lameller steril bir pens yardımıyla alınarak lam üzerine kapatıldı. Örnekler, immersiyon yağı ve 60X büyütmede inverted konfokal lazer tarama mikroskobu (LSM900, Carl-Zeiss, Almanya) kullanılarak görüntülendi. Rastgele

seçilen 10 farklı alan taranarak apoptoza giden hücrelerin her grup için apotozis oranları kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak hesaplandı.

Antioksidan Aktivite Çalışmaları

Antioksidanlar, diğer moleküllerin oksidasyonunu engelleyebilen, artırabilen/azaltabilen veya geciktirebilen moleküllerdir ve kimyasal veya biyokimyasal sistemlerde çeşitli mekanizmalar yoluyla etkilerini gösterirler[147]. Antioksidan çalışmalarda Total Antioksidan Statü (TAS), Total Oksidan Statü (TOS) ve Oksidatif Stres Indeksi (OSI) değerleri çalışıldı. TAS ve TOS analizleri için A549 hücreleri ayrı ayrı flask başına $1x10^6$ hücre olacak şekilde T75 flasklara ekildi ve yeterli konfluansa ulaşmaları için 37°C'de %5 CO_2 içeren nemli bir inkübatörde büyütüldü. Daha sonra hücrelere BNP için IC_{50} değeri olarak belirlenen 0.35 mM konsantrasyona denk şekilde FUGA, FUGANP ve BNP'ler 48 saat inkübasyon ile uygulandı. Kontrol grubu hücrelerine herhangi bir uygulama yapılmadı. İnkübasyon sonrası hücreler tripsinizasyon ile yüzeyden kaldırıldı ve 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar atıldı ve TAS analizi için hücre lizatlarına 1 mL %60 etanol, TOS analizi için hücre lizatlarına 1 mL soğuk PBS eklendi. Daha sonra, lizatlar 4°C'de homojenize edildi ve 10000 g'de, 4°C'de, 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst fazlar TAS ve TOS analizleri için ayrı ayrı eppendorflarda toplandı.

In vitro Total Antioksidan Durumu (TAS) Ölçümü

Hazırlanan hücre lizatlarındaki TAS değerlerinin belirlenebilmesi için uygun bir oksidan varlığında oksitlenerek yeşile dönen ve ortamdaki antioksidanlarla tekrar renksiz hale gelebilen 2,2'-casino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)(ABTS) bazlı ticari bir kolorimetrik test kiti (E-BC-K801-M) protokolü uygulandı. Kit içerisinden çıkan stok standart çözelti %60 etanol ile seyreltilerek 0-2 mmol/L konsantrasyonları arasında bir standart eğri çizildi.

Ölçüm için her bir kuyuya 10 µl örnek ve 200 µl tampon solüsyonu eklenerek pipetaj yapıldı ve mikroplaka okuyucuda 660 nm'de absorbans değerleri ölçülerek A1 değeri olarak kaydedildi. Daha sonra kuyuların üzerine 20 µL kromojenik ajan eklenerek pipetaj yapıldı ve 37°C'de 5 dakika karanlıkta inkübe edildikten sonra mikroplaka okuyucuda 660 nm'de absorbans değerleri ölçüldü, A2 olarak kaydedildi. Aynı işlem standart eğri örnekleri için de yapıldı ve her bir örnek üç

tekrarlı çalışıldı. Her bir örnek için ölçülen absorbans değerlerinin ortalaması alındı A2-A1 farkından ΔA hesaplanarak ve Eşitlik 2.7 kullanılarak mmol Trolox eşdeğeri/L cinsinden TAS değeri bulundu[148].

$$\text{TAS (mmol Trolox Equiv. /L)} = (\Delta A_{Blank} - \Delta A_{Örnek} - b) \div a \times f \quad (2.7)$$

a; standart eğri eğimi, b; standart eğri kesim noktası ve f; dilusyon faktörünü temsil etmektedir.

In vitro Total Oksidan Durumu (TOS) Ölçümü

Hazırlanan hücre lizatlarındaki TOS değerlerinin belirlenebilmesi için asidik koşullar altında, okside materyalin Fe^{+2}'yi Fe^{+3}'e dönüştürerek ksilenol turuncusuyla yüksek oranda bağlanıp mavi/mor bir kompleks oluşturması esasına dayanan ticari bir kolorimetrik kit (E-BC-K802-M) protokolü uygulandı. Çalışma için, kit içerisinden çıkan hidrojen peroksit (H_2O_2) stok çözeltisi ultra saf su ile seyreltilerek 0-100 µmol/L konsantrasyonları arasında bir standart eğri çizildi.

Ölçüm için her bir kuyuya 20 µl örnek ve 200 µl kromojenik ajan eklenerek pipetaj yapıldı mikroplaka okuyucuda 590 nm'de absorbans değerleri ölçülerek A1 değeri olarak kaydedildi. Daha sonra kuyuların üzerine 50 µL substrat eklenerek pipetaj yapıldı ve 37°C'de 5 dakika karanlıkta inkübe edildikten sonra mikroplaka okuyucuda 590 nm'de absorbans değerleri ölçüldü, A2 olarak kaydedildi. Aynı işlem standart eğri örnekleri için de yapıldı ve her bir örnek üç tekrarlı çalışıldı. Her bir örnek için ölçülen absorbans değerlerinin ortalaması alındı A2-A1 farkından ΔA hesaplanarak ve Eşitlik 2.8 kullanılarak µmol H_2O_2 eşdeğeri/L cinsinden TOS değeri bulundu[148].

$$\text{TOS (µmol } H_2O_2 \text{ Equiv./L)} = (\Delta A_{590} - b) \div a \times f \quad (2.8)$$

a; standart eğri eğimi, b; standart eğri kesim noktası ve f; dilusyon faktörünü temsil etmektedir.

Oksidatif Stres İndeksi (OSI)

Total oksidan durumunun total antioksidan durumuna oranlanması ile belirlenen Oksidatif stres indeksi (OSI) Eşitlik 2.9 kullanılarak hesaplandı[148].

$$OSI\ (arbitary\ unit, AU) = \frac{\text{TOS,(µmol H2O2 equivalent/L)}}{\text{TAS,(mmol Trolox equivalent/L x 10)}} \quad (2.9)$$

Total RNA İzolasyonu, cDNA Sentezi ve Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizi

Total RNA izolasyonu için A549 hücreleri flask başına $1x10^6$ hücre olacak şekilde T75 flasklara ekildi ve ekilen hücreler üzerine yeterli konfluansa ulaşmaları için 37°C'de %5 CO_2 içeren nemli bir inkübatörde büyütüldü. Daha sonra hücrelere BNP için IC_{50} değeri olarak belirlenen 0.35 mM konsantrasyona denk şekilde FUGA, FUGANP ve BNP'ler 48 saat inkübasyon ile uygulandı. Kontrol grubu hücrelerine herhangi bir uygulama yapılmadı. İnkübasyon sonrası hücrelerden RNA izolasyonu Zymo Research Direct-zol RNA MiniPrep kit ile gerçekleştirildi. İlk olarak hücrelerin üzerinde bulunan besiyeri uzaklaştırılarak hücreler 1X buz gibi soğuk PBS tamponuyla yıkandı. Daha sonra üzerine 2,5 ml kadar Trizol çözeltisi eklenerek 2 dk bekletildi. Hücre kazıma aparatı ile flask tabanından kazınan hücreler 15 ml'lik falkonlara aktarıldı ve üzerine 950 µl kloroform eklendi. Kloroform-Trizol karışımı içerisindeki hücreler 2 ml'lik Eppendorf tüplere aktarılarak 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi ve 15000 rpm'de 4°C'de 15 dakika santrifüj edildi ve elde edilen süpernatantlar steril Eppendorf tüplere geçirilerek üzerlerine 1:1 oranında etanol eklendi ve pipetaj yapıldı. Etanolde çözülen örnekler kit içerisinde bulunan spin kolonlara aktarıldı ve 14000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi Santrifüj sonrası toplama tüplerine geçen sıvılar uzaklaştırıldı. Bu işlem örneklerin tamamı spin kolona aktarılıncaya kadar tekrar edildi. Daha sonra spin kolonlar üzerine 400 µl RNA Wash Buffer eklenerek tüpler 14000 rpm'de 1 dk boyunca santrifüj edildi ve toplama tüplerindeki sıvılar atıldı. Örnek başına 5 µl DNAz I ve 75 µl DNA Digestion Buffer içeren karışım spin kolonlar üzerine eklendi ve kolonlar 15 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucunda 400 µl Direct-zol RNA PreWash Solüsyonu spin kolonlara eklenerek tüpler 14000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi ve toplama tüpündeki atık uzaklaştırıldı. Bu işlem tekrar edildi. Ardından, 700 µl RNA Wash Buffer Solüsyonu spin kolonlar üzerine eklenerek 2 dk 14000 rpm'de santrifüj edildi ve toplama tüpündeki sıvı uzaklaştırıldı. Bu aşamada toplama tüpleri atılarak spin kolonlar yeni steril RNAz içermeyen tüplere geçirildi ve spin kolonun tam ortasına gelecek şekilde 22 µl DNaz-RNaz içermeyen su eklendi. Kolonlar 14000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonucunda RNA'lar RNAz içermeyen tüpler içerisinde kullanıma hazır hale getirildi.

RNA'sı izole edilmiş olan örneklerin RNA miktarını ve saflığını tayin etmek için Nanodrop UV-Visible Spektrofotomere (Thermo Scientific) kullanıldı. RNA örneklerinin 1 µl'si nanodrop cihazına koyularak ölçüm yapıldı ve ng/µl cinsinden RNA konsantrasyonu her örnek için belirlendi. 260 nm ve 280 nm dalga boylarında alınan absorbans değerlerinin oranının 1.7 ile 2.0 arasında olduğu RNA örnekleri saf olarak kabul edildi [149]. RNA miktarı hesaplanmasında Eşitlik 2.10 kullanıldı ve 260 nm'deki bir optik dansite (OD) değeri 40 µg/ml RNA miktarı tek iplikli RNA'ya eşdeğer olarak kabul edildi.

$$RNA\ Miktarı = OD\ değeri\ x\ Dilüsyon\ Faktörü\ x\ 40\ \mu g/ml \qquad (2.10)$$

Elde edilen total RNA'lardan cDNA sentezi elde etmek için SensiFAST cDNA sentez kiti kullanıldı. Kit protokolüne uygun olarak; cDNA sentezi sırasında Tablo 3.4'te hacmi verilen bileşenler 0.2 µl'lik steril PCR tüpleri içerisinde karıştırıldı ve Tablo 3.5'te belirtilen program parametreleri kullanılarak PCR sentezlendi. PCR reaksiyonu sonucunda elde edilen cDNA örnekleri, Real-Time PCR analizinde kullanılana kadar -20 °C'ye kaldırılarak saklandı.

Tablo 3. 4 cDNA sentezinde kullanılan bileşenler ve miktarları

Kullanılan Bileşen	**Hacim**
Total RNA (1 µg'a kadar)	n µl
5x TransAmp Buffer	4 µl
Reverse Transkriptaz	1 µl
DNaz-RNaz içermeyen su	20 µl' ye kadar
Toplam Hacim	**20** µl

Tablo 3. 5 cDNA sentezi reaksiyon koşulları

Aşamalar	**Sıcaklık**	**Zaman**
Primer Bağlanması	25°C	10 dakika
Ters Transkripsiyon	42°C	30 dakika
İnaktivasyon	85°C	5 dakika
Soğutma	4°C	-

A549 hücrelerine FUGA, FUGANP ve BNP'lerin uygulanması sonucu oluşan apoptotik ve anti-proliferatif etkilerin incelenmesi amacıyla içsel ve dışsal apoptotik yolaklarda yer alan genlerin ekspresyon analizi Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) cihazı kullanılarak yapıldı. Elde edilen cDNA'lar 1:4 oranında seyreltilerek qRT-PCR analizinde kullanıldı. Bu aşamada seyreltilen cDNA'lar ile birlikte ileri (Forward) ve geri (Reverse) primerler,

SYBR green boyası ve saf su kullanıldı. qRT-PCR analizinde kullanılan primerler Sentegen firmasından temin edildi (Tablo 3.6). Üretici firma talimatına göre uygun miktarda DNaz-RNaz içermeyen steril su ile çözülen ana stok primerlerden qRT-PCR analizinde kullanılmadan önce 10 µM olacak şekilde alikotlar oluşturuldu.

Her bir bileşen için stok ve reaksiyon konsantrasyondan kuyu başına kullanılan miktarlar (Tablo 3.7) ile master mix hazırlandı. 96 kuyulu PCR mikroplakası içerisine ekspresyonu test edilecek her bir gen için 18 µl master mix ve 2 µl cDNA eklenerek 40 döngü qRT-PCR analizi yapıldı. Analizde kullanılan reaksiyon koşulları Tablo 3.8'de verilmiştir.

Tablo 3. 6 Ekspresyonu belirlenecek genlere ait primer dizileri

Gen Adı	Primer Dizisi (5′- 3′)
Kaspaz-3 (NM_004346)	F:AGAGGGGATCGTTGTAGAAGTC R:ACAGTCCAGTTCTGTACCACG
Kaspaz-7 (ID840)	F:CGGAACAGACAAAGATGCCGAG R:AGGCGGCATTTGTATGGTCCTC
Kaspaz-8 (NM_033356)	F:GTTGTGTGGGGTAATGACAATCT R:TCAAAGGTCGTGGTCAAAGCC
Kaspaz-9 (NM_032996)	F:CTCAGACCAGAGATTCGCAAAC R:GCATTTCCCCTCAAACTCTCAA
Bax (NM_138763)	F:CCCGAGAGGTCTTTTTCCGAG R:CCAGCCCATGATGGTTCTGAT
Bcl-2 (NM_000657)	F:GGTGGGGTCATGTGTGTGG R:CGGTTCAGGTACTCAGTCATCC
Sitokrom-c (NM_018947)	F:CTTTGGGCGGAAGACAGGTC R:TTATTGGCGGCTGTGTAAGAG
β –actin (NM_001101)	F:CATGTACGTTGCTATCCAGGC R:CTCCTTAATGTCACGCACGAT

Tablo 3. 7 qRT-PCR analizinde kullanılan bileşenler

Kullanılan Bileşen	Stok Konsantrasyon	Reaksiyon Konsantrasyon	Hacim
SensiFAST SYBR Lo-Rox	2X	2X	10 µl
Forward Primer	200 nmol	10 µM	0,8 µl
Reverse Primer	200 nmol	10 µM	0,8 µl
cDNA	-	-	2 µl
Saf su	-	-	6,4 µl

Tablo 3. 8 qRT-PCR reaksiyon koşulları

Aşama	Sıcaklık	Zaman
Ön Denatürasyon	95°C	2 dakika
Denatürasyon	95°C	5 saniye
Bağlanma	63°C	10 saniye
Uzama	72°C	15 saniye
Döngü Sayısı	40 döngü	

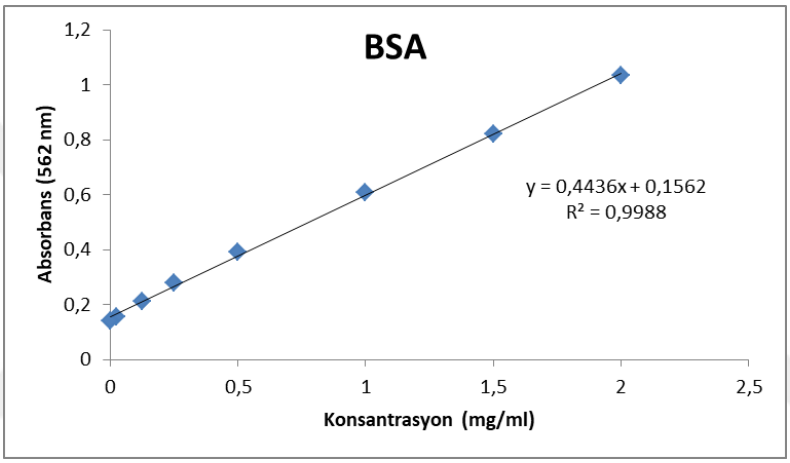
Hedef genlerin ekspresyonları, şartlara göre ekspresyonu değişmeyen referans gen grubunda yer alan β-actin gen ekspresyonu ile karşılaştırılarak $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu ile tayin edilmiştir[150].

Protein Lizatlarının Hazırlanması ve Protein Miktar Tayini

Protein izolasyonu için A549 hücreleri flask başına $1x10^6$ hücre olacak şekilde T75 flasklara ekildi ve ekilen hücreler üzerine yeterli konfluansa ulaşmaları için 37°C'de %5 CO_2 içeren nemli bir inkübatörde büyütüldü. Daha sonra hücrelere BNP için IC_{50} değeri olarak belirlenen 0.35 mM konsantrasyona denk şekilde FUGA, FUGANP ve BNP'ler 48 saat inkübasyon ile uygulandı. Kontrol grubu hücrelerine herhangi bir uygulama yapılmadı. İnkübasyon sonrası besiyeri uzaklaştırılarak hücreler 1X PBS tampon ile yıkandı. Daha sonra hücrelere 1,5 ml tripsin-EDTA eklendi ve flasklar 3 dk inkübatörde bekletildi. Tripsinizasyon sonrası hücrelere tamamlanmış besiyeri eklendi ve bölyece tripsin aktivitesi inhibe edilerek hücreler steril bir falkon tüpe aktarıldı. 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilen hücrelerin süpernatantı atılarak pellet üzerine 500 µl 1X soğuk PBS tampon eklendi ve hücrelere homojen olması için nazikçe pipetaj yapıldı. Mikrosantrifüj tüplerine transfer edilen örnekler 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi, süpernatant atıldı. Pellete %1 proteaz fosfotaz inhibitörü içeren RIPA çözeltisinden 500 µl eklendi. 5 dakikada bir vortekslenen örnekler toplamda 20 dakika buz üzerinde inkübe edildi ve 15000 rpm'de 4°C'de 20 dk santrifüjlendi. Santrifüj sonrası üst fazlar temiz mikrosantrifüj tüplerine geçirilerek elde edilen protein lizatları kullanılıncaya kadar -80°C'de muhafaza edildi.

Hücre lizatlarında protein miktar tayini BCA Protein Assay Kit (SMART™ 21071) protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. Öncelikle protein standart eğrisi çizebilmek amacıyla kit içerisinde stok olarak bulunan bovine serum albümin (BSA) kullanılarak farklı konsantrasyonlarda BSA içeren bir seri dilüsyon hazırlandı. Hazırlanan BSA standartlarından ve 1:10 oranında dilue edilen

örneklerden 3 tekrarlı 96 kuyulu mikroplakada belirlenen kuyulara 10'ar µl koyuldu ve kit protokolüne göre hazırlanan çalışma solüsyonundan her bir kuyu üzerine 200 µl eklendi. 37°C'de, 30 dakika karanlıkta inkübasyona bırakılan örneklerin ve BSA standartlarının 562 nm'deki absorbans değerleri mikro plaka okuyucuda ölçüldü. BSA standartlarının 562 nm'deki absorbans değerleri ile BSA'ya ait kalibrasyon eğrisi çizildi (Şekil 3.3). Kalibrasyon eğrisine göre tüm örneklerin protein konsantrasyonları belirlendi. Lizatlar üzerine, proteaz fosfotaz inhibitör içeren 1X RIPA ile 2X SDS-PAGE tampon eklenerek 2 mg/ml protein içeren stoklar hazırlandı ve SDS-PAGE'de yürütülmek üzere -20°C'de muhafaza edildi [1, 137].



Şekil 3. 3 BSA Standart Eğrisi

SDS-PAGE ve Western Blot Analizi

SDS-PAGE için BIO-RAD MiniPROTEAN® 3 CelI jel elektroforez sistemi kullanıldı. Tablo 3.9'da verilen değerlere göre %12 (v/v) ayırma jeli ve %4 (v/v) yükleme jeli hazırlandı.

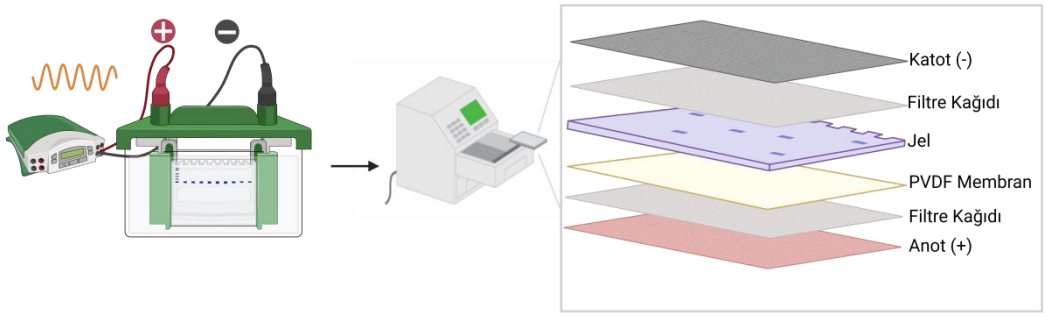
Tablo 3. 9 Ayırma ve yükleme jeli hazırlanması

Kullanılan Bileşenler	Ayırma Jeli (%12)	Kullanılan Bileşenler	Yükleme Jeli (%4)
Distile su	3,35 ml	Distile su	3,05 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8.8)	2,5 ml	0,5 M Tris-HCl (pH 6.8)	1,25 ml
%10 SDS	100 µl	%10 SDS	50 µl
%30 Akrilamid/Bis	4 ml	%30 Akrilamid/Bis	0,65 ml
%10 APS	75 µl	%10 APS	30 µl
TEMED	15 µl	TEMED	6 µl

Hazırlanan %12'lik ayırma jeli cam plakalarda belirlenen noktaya kadar döküldükten sonra üzeri saf su ile kaplanarak düzleştirildi ve polimerleşmesi beklendi. Daha sonra %4'lük yükleme jeli hazırlandı. %12'lik jel polimerleştikten sonra üzerine eklenen saf su uzaklaştırıldı ve hazırlanan %4'lük yükleme jeli dikkatli bir şekilde ayırma jeli üzerine döküldü. Hızlı bir şekilde jel üzerine uygun taraklar yerleştirilerek polimerleşmesi beklendi.

Polimerleşmesi tamamlanan jeller cam tabakalar ile birlikte yürütme tankı içerisine yerleştirildi. Jel üzerine yerleştirilen taraklar yavaşça çıkarıldıktan sonra yürütme tankı 1X tank tamponu ile dolduruldu. SDS-PAGE için -20℃'de stoklanmış örnekler 95℃'de 5 dakika ısıtıldı ve tarakların oluşturduğu kuyucuklara 20'şer µl olarak eklendi. Protein boyutunun belirlenebilmesi için marker olarak 3 µl PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Cat.No. 26619) kullanıldı. Örnekler 80 V'da 30 dk yürütüldükten sonra 100 V'da bir saat yürütüldü.

48 saat boyunca FUGA, FUGANP ve BNP'lerin uygulandığı A549 hücrelerinde herhangi bir uygulama yapılmayan control grubu ile karşılaştırmalı olarak sitokrom-c (12 kDa), Bax (21 kDA), Bcl-2 (28 kDa), kaspaz-3 (35 kDa), kaspaz-7 (35 kDa), cleaved kaspaz-9 (37 kDa), ve kaspaz-8 (57 kDa) proteinlerinin ekspresyonunu protein düzeyinde göstermek amacıyla Western Blot analizi yapıldı. Kontrol olarak β-aktin (42 kDa) proteini kullanıldı. SDS-PAGE sonrası jeldeki proteinlerin PVDF membrana transferi için Trans-Blot Turbo Transfer sistemi kullanıldı. Jel proteinlerinin PVDF membrana transferi Şekil 3.4'te şematize edilen şekilde gerçekleştirildi. Jel ve membran yerleştirildikten sonra sistemde hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi ve 25 V, 1.3 A, 7 dakika standart aktarım protokolü ile proteinlerin membrana aktarımı başarılı olarak gerçekleştirildi.



Şekil 3. 4 SDS-PAGE ve SDS jelin PVDF membrana aktarımının şematik olarak gösterilmesi (Biorender ile oluşturuldu).

Membrana aktarımın başarılı olup olmadığını anlamak amacıyla jel Coomasie boya çözeltisi ile boyanarak jelde protein varlığı olmadığı belirlendi. Boyama için jel dikkatlice çıkarılarak protein boyama çözeltisine koyuldu ve gece boyu oda sıcaklığında, çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün boya uzaklaştırma çözeltisine alınarak 2 saat boyanın uzaklaştırılması sağlandı.

Jel boyamaya alınırken eş zamanlı olarak membran %5'lik bloklama çözeltisinde oda sıcaklığında 1 saat çalkalayıcıda bloklandı. β-actin (1:1000), sitokrom-c (1:1000), Bax (1:1000), Bcl-2 (1:1000), kaspaz-3 (1:250), kaspaz-7 (1:500), cleaved kaspaz-9 (1:500), ve kaspaz-8 (1:500), primer antikorları %5'lik bloklama solüsyonu ile seyreltilerek kullanıma hazır hale getirildi. Hazırlanan primer antikorlar, membranları kaplayacak şekilde membranların üzerine eklenerek 4 °C'de çalkalayıcıda gece boyu inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından membranlar üzerindeki primer antikorlar toplandı ve membranlar, PBS-T çözeltisi ile 3x5 dakika yıkandı. Yıkamalar sonrası membranlar üzerine β-actin ve kaspaz-3 için anti-rabbit sekonder antikor (1:10000), diğer antikorlar için anti-mouse sekonder antikor (1:10000) eklendi ve 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Sekonder antikorlar ile inkübasyon sonrası membranlar PBS-T ile tekrar 3x5 dakika yıkandı. Deteksiyon aşamasına geçilmeden önce sırasıyla PBS ve saf su ile yıkanan membranlara protein bantlarını tespit etmek için SuperSignal™ West Pico PLUS Kemilüminesan Substrat eklenerek 5 dakika karanlıkta bekletildi ve görüntüleme gerçekleştirildi. İmmunoblot bantlarının kantitatif densitometrik analizi GraphPad Prism yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. Protein ekspresyon seviyeleri β-aktine göre normalize edildi ve tedavi edilmeyen kontrol grubuna göre kat değişimi olarak gösterildi[1, 137].

3.3 İstatistiksel Analizler

Tüm istatistiksel analizler için GraphPad Prism 6.0 (GraphPad, La Jolla, CA) istatistik yazılımı kullanıldı. ANOVA ile analiz edilen veriler, en az üç deneyden elde edilen üçlü tekrarlardan ortalama ± standart sapma (SD) alınarak sunuldu. $p<0,05$ olan farklar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4
BULGULAR VE TARTIŞMA

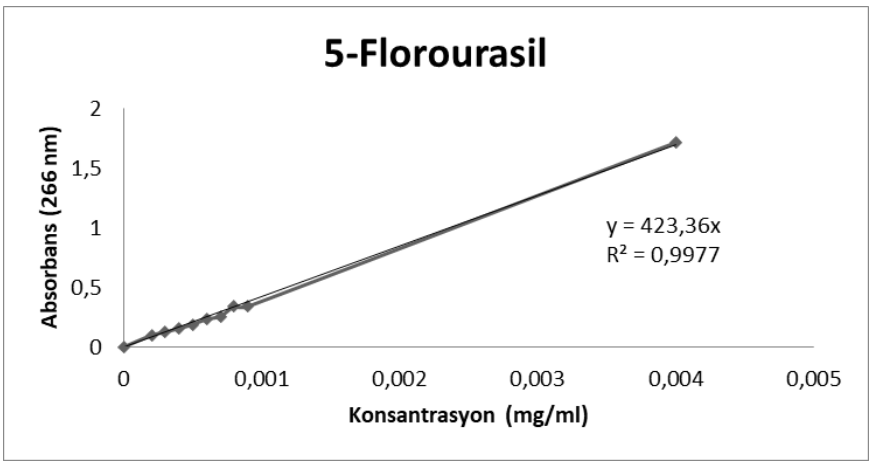
4.1 Kalibrasyon Eğrileri

5-Fluorourasil (5-FU) molekülünün stok çözeltisini hazırlamak için 1 mg 5-Fluorourasil, 1 ml saf suda çözülerek 1 mg/ml oranında çözelti elde edildi ve bu çözelti seyreltilerek 0,0001-0,004 mg/ml konsantrasyonları arasında çözeltiler hazırlandı. Çözeltiye ait λmax değeri UV-Vis spektroskopisinde 266 nm olarak belirlendi. Seri konsantrasyonlarda hazırlanan 5-Fluorourasil çözeltilerinin sırasıyla 266 nm dalga boyunda UV absorbans değerleri okunarak standart kalibrasyon eğrisi çizildi. Şekil 4.1'de 5-FU'nun suya karşı 266 nm'de alınan seri çözeltilerinden oluşturulmuş kalibrasyon eğrisi verilmiştir.

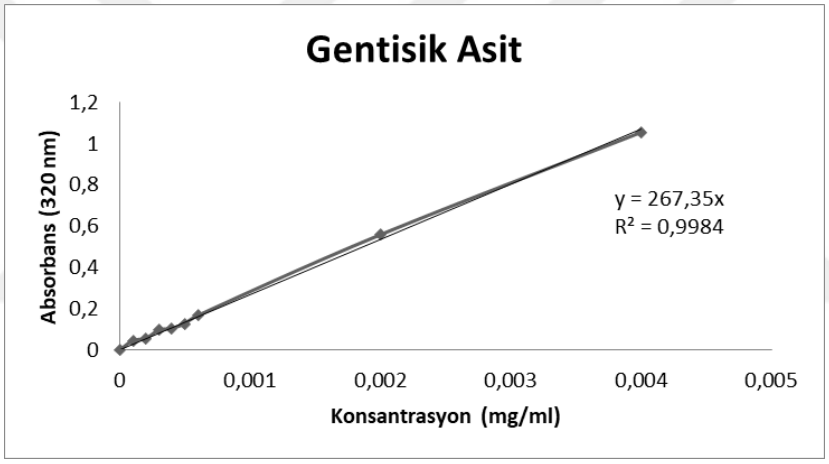
Gentisik Asit (GA) molekülünün stok çözeltisini hazırlamak için 1 mg Gentisik Asit, 1 ml saf suda çözülerek 1 mg/ml oranında çözelti elde edildi ve bu çözelti seyreltilerek 0,0001-0,007 mg/ml konsantrasyonları arasında çözeltiler hazırlandı. Çözeltiye ait λmax değeri UV-Vis spektroskopisinde 320 nm olarak belirlendi. Seri konsantrasyonlarda hazırlanan Gentisik Asit çözeltilerinin sırasıyla 320 nm dalga boyunda UV absorbans değerleri okunarak standart kalibrasyon eğrisi çizildi. Şekil 4.2'de GA'nın suya karşı 320 nm'de alınan seri çözeltilerinden oluşturulmuş kalibrasyon eğrisi verilmiştir.

Biyotin (B) molekülünün stok çözeltisini hazırlamak için 1 mg Biyotin, 1 ml saf su:etanol (1:1) karışımında çözülerek 1 mg/ml oranında çözelti elde edildi ve bu çözelti seyreltilerek 0,005-0,5 mg/ml konsantrasyonları arasında çözeltiler hazırlandı. Çözeltiye ait λmax değeri UV-Vis spektroskopisinde 210 nm olarak belirlendi. Seri konsantrasyonlarda hazırlanan Biyotin çözeltilerinin sırasıyla 210 nm dalga boyunda UV absorbans değerleri okunarak standart kalibrasyon eğrisi

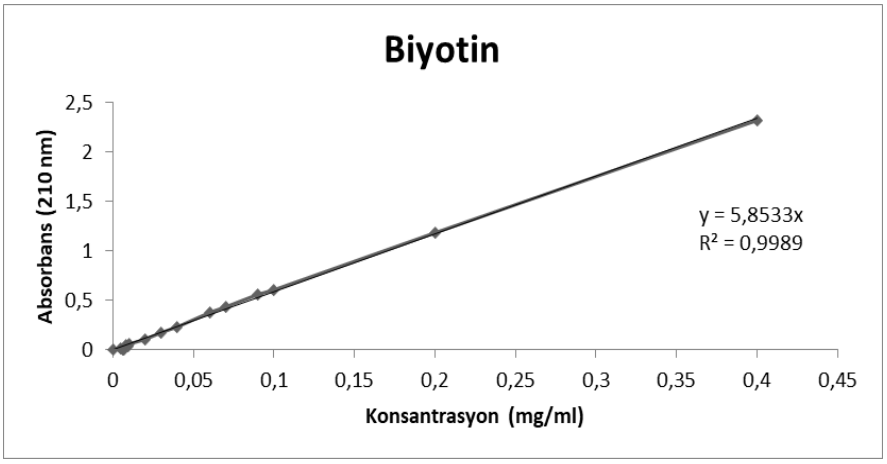
çizildi. Şekil 4.3'te Biyotinin suya karşı 210 nm'de alınan seri çözeltilerinden oluşturulmuş kalibrasyon eğrisi verilmiştir.



Şekil 4. 1 5-FU'nun suya karşı 266 nm'de hazırlanmış kalibrasyon eğrisi.



Şekil 4. 2 GA'nın suya karşı 320 nm'de hazırlanmış kalibrasyon eğrisi.



Şekil 4. 3 Biyotinin su ve etanole karşı 210 nm'de hazırlanmış kalibrasyon eğrisi.

4.2 Farklı Parametrelerde Sentezlenen Nanopartiküller ve Karakterizasyonu

Kalibrasyon eğrileri oluşturulduktan sonra Tablo 4.1'de verilen farklı parametrelerle 5-Fluorourasil ve Gentisik Asit yüklü nanopartiküller (FUGANP) ikili emülsiyon (w/o/w) çözücü uçurma yöntemi ile sentezlendi. Nanopartikül sentezinde farklı parametrelerin kullanılma amacı hedefleme ve hücre kültürü çalışmalarında kullanılabilecek; minimum boyutta, maksimum ilaç verimine ve enkapsülasyon etkinliğine sahip ideal partiküllere ulaşmak olmuştur. Kullanılan madde ve polimer miktarı, surfaktan oranı ve miktarı, çözücü hacmi gibi etkenler belirli oranlarda değiştirilerek ideal boyutta partiküller elde edilmiştir.

Tablo 4. 1 Farklı parametrelerle sentezlenen nanopartiküllere ait sonuçlar

Sentez No	EE(%)		DL(%)		RY (%)	Boyut(nm)	Zeta(mV)	PDI
	5-FU	GA	5-FU	GA				
1	81,64	85,82	7,86	9,13	84,75	352,3±8,57	(-)15,8±0,46	0,299±0,023
2	74,55	78,36	12,81	13,47	28,83	233±1,94	(-)18,7±0,32	0,187±0,030
3	88,73	92,0	9,38	9,73	46,85	444,9±7,18	(-)13,2±0,70	0,332±0,033
4	89,67	92,50	7,43	7,67	64,64	331,1±9,82	(-)23,9±0,90	0,364±0,048
5	89,40	91,80	6,95	7,14	58,45	193,4±2.175	(-)19,8±0,44	0,107±0,003
6	89,20	90,60	6,71	6,81	60,45	184,0±1,97	(-)25,5±1,17	0,104±0,005
7	89,40	89,20	6,57	6,56	61,82	196,4±1,72	(-)27,3±1,12	0,140±0,042
8	88,20	90,60	6,20	6,37	64,64	211,9±0,64	(-)24,1±0,99	0,092±0,012
9	88,20	90,20	6,87	7,03	58,36	210,1±1,81	(-)23,5±1,15	0,149±0,018
10	89,0	91,60	6,44	6,63	62,82	195,3±2,91	(-)24,4±0,17	0,091±0,014

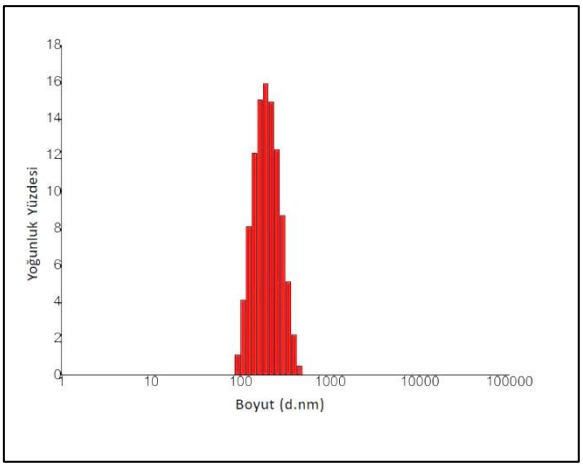
Aynı parametrelerle sentezlenerek enkapsülasyon etkinliği, ilaç yükleme kapasitesi ve boyut bakımından benzer özellikler gösteren 6, 7 ve 10 numaralı nanopartiküllerin homojen karışımı ile hedefleme ve hücre kültürü çalışmaları gerçekleştirildi. Homojenizaasyon için; toz haldeki nanopartiküller birleştirilerek havanda nazikçe dövüldü. Tablo 4.2'de bu partiküllere ait sonuçlar ve ortalama değerleri verilmiştir.

Tablo 4. 2 Deneysel çalışmalarda kullanılan nanopartiküllere ait sonuçlar

Sentez No	EE(%)		DL(%)		RY (%)	Boyut(nm)	Zeta(mV)	PDI
	5-FU	GA	5-FU	GA				
6	89,20	90,60	6,71	6,81	60,45	184,0±1,97	(-)25,5±1,17	0,104±0,005
7	89,40	89,20	6,57	6,56	61,82	196,4±1,72	(-)27,3±1,12	0,140±0,042
10	89,0	91,60	6,44	6,63	62,82	195,3±2,91	(-)24,4±0,17	0,091±0,014
Ort.	**89,20**	**90,45**	**6,57**	**6,67**	**61,70**	**191,9±2,20**	**(-)25,73±0,82**	**0,112±0,020**

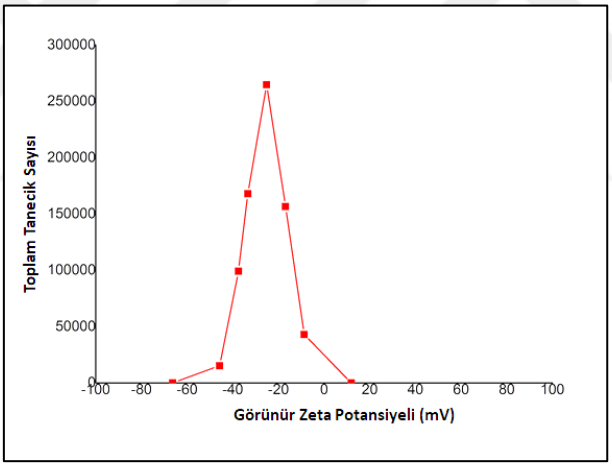
Hedefleme ve hücre kültürü çalışmalarında kullanılan FUGANP'lere ait ortalama reaksiyon verimi %61,70 olarak hesaplanmıştır. Enkapsülasyon etkinliği indirekt tayin yöntemi ile üst fazdan 266 nm ve 320 nm'de UV ölçüm yapılarak hesaplanmış ve sırasıyla 5-FU için %89,20, GA için %90,45 olarak bulunmuştur. İlaç yükleme kapasitesi hesaplandığında ortalama değer 5-FU için %6,57, GA için %6,67 olarak bulunmuştur.

Küçük boyutlu nanopartiküller tümör hücreleriyle güçlü bir temas kurmakla kalmaz, aynı zamanda karaciğer tarafından ilaç emilimini sınırlayarak toksisiteyi de düşürürler[151]. Nanopartiküllerin ilaç iletimi için uygunluğu, ortalama çap ve çoklu dağılım indeksleri (PDI) dahil olmak üzere çeşitli faktörler tarafından belirlenebilir. Bu nedenle, geniş homojenlik nanopartikül agregasyonuna neden olabileceğinden monodispers nanopartiküller üretmek kritik öneme sahiptir[152]. Ek olarak, küçük boyutlu nanopartiküllerin hücre membranı ile etkileşimde büyük nanopartiküllere göre daha etkili olduğu bilinmektedir[153]. 100 ila 200 nm aralığındaki nanopartiküller, gelişmiş geçirgenlik ve tutma etkisi olarak bilinen EPR etkisi nedeniyle tümör hedeflemesinde en uygun boyutlu taşıyıcı nanopartiküller olarak kabul edilmektedir. Bu boyut aralığı, sızdıran damar yapısından ve bozulmuş lenfatik drenajdan yararlanarak tümör dokularında verimli birikmeyi sağlar. Bu boyut aralığındaki nanopartiküllerin uygun vasküler geçirgenlik ve tutma özellikleri nedeniyle 50 nm'den daha küçük veya 300 nm'den daha büyük partiküllere kıyasla önemli ölçüde daha yüksek tümör alım verimliliği gösterdiği Kim ve ark. tarafından kanıtlanmıştır[154]. Bu çalışmada, ikili emülsiyon (w/o/w) çözücü uçurma yöntemi ile sentezlenen naopartiküllerin boyut analizi zeta sizer cihazı ile yapıldı ve boyut değerleri ortalama 191,9±2,20 nm olarak belirlendi (Şekil 4.4). Boyut dağılımını belirleyen PDI değerleri 0,112±0,020 olarak ölçüldü. Bu nedenle, sonuçlarımız, çift ilaç içeren FUGANP'lerin kanser tedavisi için uygun bir boyuta sahip olduğunu ve nanopartiküllerin homojen olduğunu gösteren minimal PDI değerlerine sahip olduğunu gösterdi.



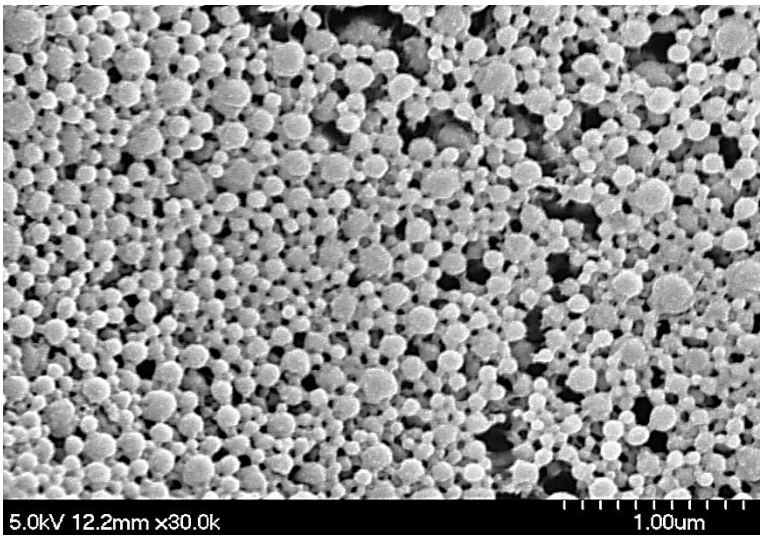
Şekil 4. 4 5-FU ve GA içeren FUGANP'lere ait boyut dağılım grafiği

Nanopartiküllere ait yüzey özelliklerini belirlemeye yarayan zeta potansiyel değerleri Zetasizer cihazı ile belirlendi ve FUGANP'lerin ortalama zeta potansiyeli yüzeylerindeki PLGA'nın karboksi uç grupları nedeniyle beklendiği şekilde negatif bir değerde -25,73±0,82 mV olarak ölçüldü (Şekil 4.5).



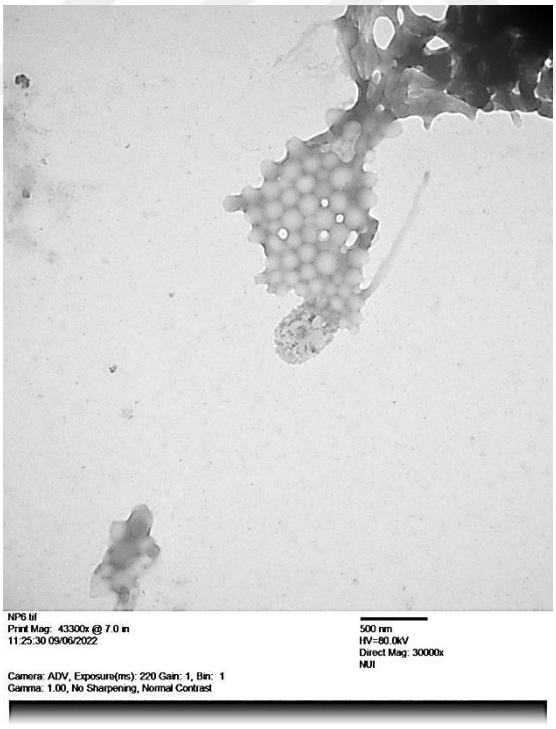
Şekil 4. 5 5-FU ve GA içeren FUGANP'lere ait zeta grafiği

FUGANP'lerin boyut analizi, şekil ve yüzey morfolojisi incelenirken Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) kullanıldı. SEM ile görüntü analizi öncesi iletkenliği bulunmayan nanopartiküllere altın ile kaplama işlemi yapılarak nanopartiküllerin iletkenliği sağlandı. Kaplamada altın kullanılmasının amacı altın elementinin yüksek iletkenliğinin olması ve oksitlenmemesidir. Altın kaplamanın ardından iletken hale getirilen FUGANP'lere ait görüntüler 5 kV altında ve 30.000X büyütme ile alındı(Şekil 4.6).



Şekil 4. 6 FUGANP'lere ait SEM görüntüsü.

Benzer şekilde TEM analizi için örnekler fosfotungstik asit solüsyonu (%2 w/v) ile negatif boyandı ve mikroskop içerisine konulmadan önce oda sıcaklığında havada kurutuldu. Daha sonra FUGANP'lere ait görüntüler 80 kV altında ve 30.000X büyütmede elde edildi (Şekil 4.7).

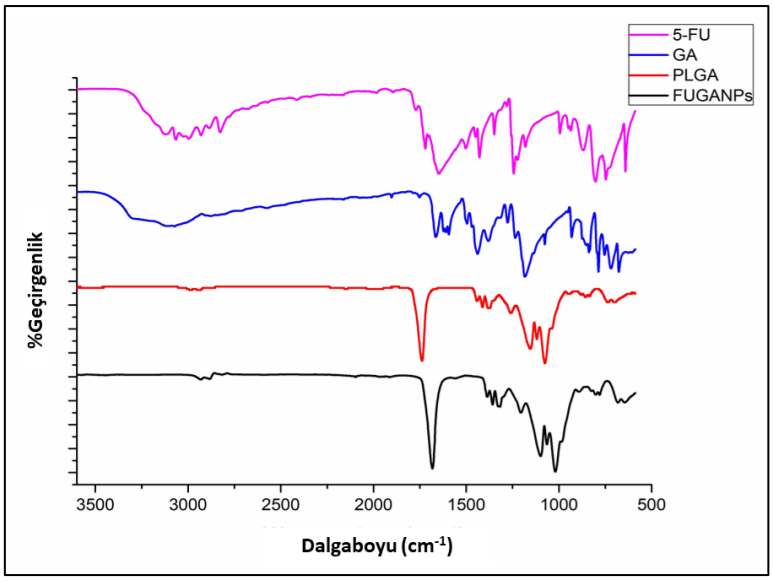


Şekil 4. 7 FUGANP'lere ait TEM görüntüsü.

SEM ve TEM görüntüleri incelendiğinde sentezlenen FUGANP'lerin küresel ve homojen bir yapıda olduğu; ortalama boyutların 100 nm ile 200 nm aralığında olduğu açıkça görülmektedir. Boyut dağılımı ve ortalama partikül boyutlarına

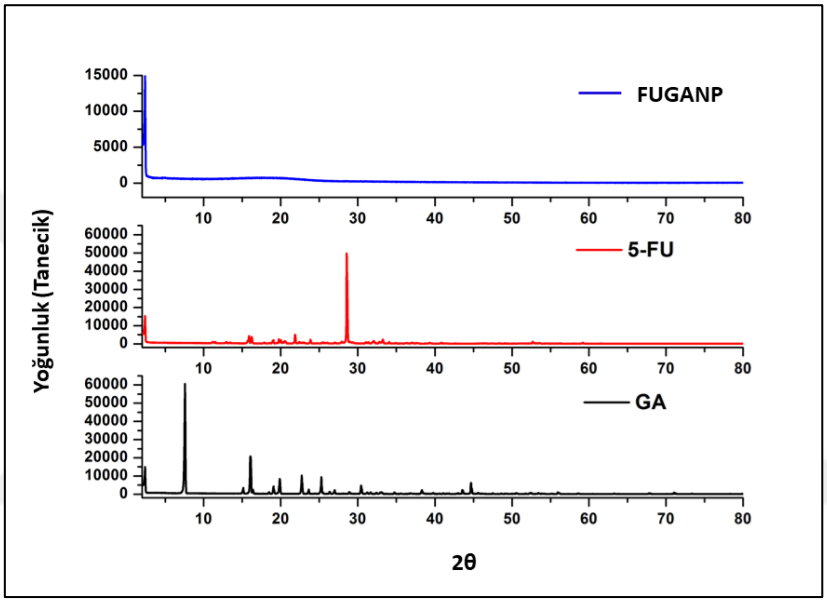
bakıldığında FUGANP'lere ait değerlerin dinamik ışık saçılımı yaklaşımı kullanılarak belirlenen boyut ve PDI değerleriyle birbirini desteklediği gözlendi. Bu nedenle sonuçlarımız, önceki çalışmalarımıza benzer şekilde[116, 137] FUGANP'lerin kanser tedavisi için uygun bir boyuta sahip olduğunu göstermektedir.

Sentezlenen FUGANP'lerin yüzeyinde/içinde bulunan aktif maddeyi tespit etmek ve aktif madde-polimer etkileşimlerini belirlemek için PLGA, 5-FU, GA ve FUGANP'lerin FT-IR analizi gerçekleştirildi. PLGA polimeri, 5-FU, GA ve FUGANP'lerin FT-IR spektrumları Şekil 4.8'de gösterilmektedir. PLGA polimerinin FT-IR spektrumunda sırasıyla 2993 cm^{-1}'de ve 2989 cm^{-1}'de C-H ve CH_2'ye ait C-H gerilme pikleri görülmektedir. Yaklaşık 1750 cm^{-1}'lik bölgede görülen keskin pik, ester bağından kaynaklanan C = O bağına ve 1160-1090 cm^{-1} bölgesindeki pik C-O bağına ait gerilim pikidir [155]. Benzer şekilde, FUGANP'lere ait pikler incelendiğinde 2993 cm^{-1} ve 2989 cm^{-1}'de iki tepe noktası olan alifatik bir C-H gerilmesi, 1250 cm^{-1} ve 1100 cm^{-1}'de C = O gerilmesiyle ilişkili iki tepe noktası ve aynı zamanda PLGA ile ilişkili birincil tepe noktaları olan C = O grubuna ait 1750 cm^{-1}'lik bir tepe noktası görülmekteyken 5-FU ve/veya GA için belirgin piklere rastlanmamıştır. Bu bulgular, 5-FU ve GA ile FUGANP'lerin yüzeyi arasında önemli bir kimyasal etkileşim olmadığını ve 5-FU ve GA moleküllerinin yüzeye adsorbe olmadan nanopartiküle etkili bir şekilde yüklendiğini göstermektedir.



Şekil 4. 8 5-Fluorourasil, Gentisik Asit, PLGA ve FUGANP'lere ait FT-IR grafiği

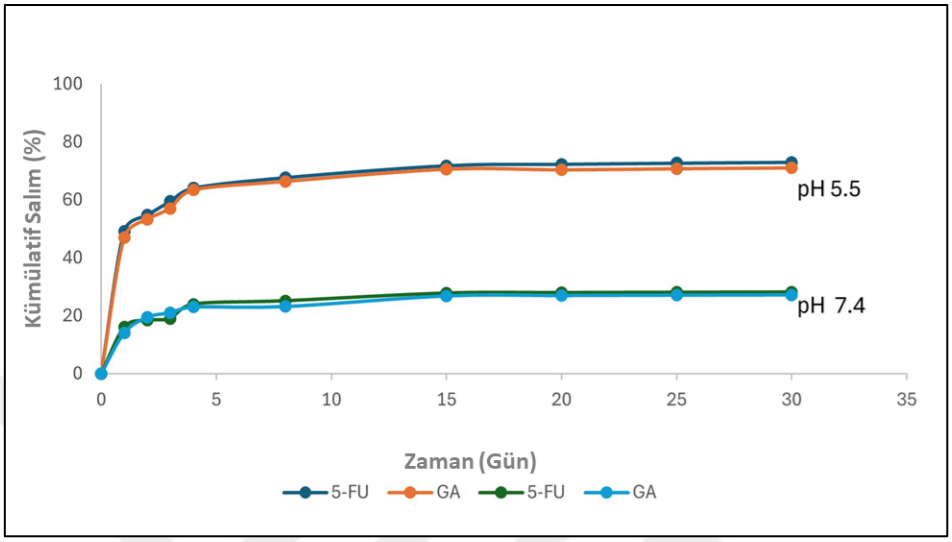
FUGANP'lerin fizikokimyasal karakterizayonunda kullanılan bir diğer yöntem X-Işını Toz Kırınımı (XRD) olup 5-FU, GA ve FUGANP'lerin toz XRD spektrumları, 3°-80° aralığında, 2θ açısı ile ortam sıcaklığında çekilmiş ve sonuçlar Şekil 4.9'da gösterilmiştir. 5-FU ve GA için karakteristik pikler belirgin bir şekilde gözlemlenirken FUGANP'lere ait XRD kırınımları 5-FU ve GA ile karşılaştırıldığında daha az yoğun olarak karakterize edildiği gözlenmiştir. Bu durum, FUGANP'lerin kristalliğindeki azalmayı göstermektedir ve FT-IR ile birbirini destekler niteliktedir.



Şekil 4. 9 5-Fluorourasil, Gentisik Asit ve FUGANP'lere ait XRD grafiği

FUGANP'lere ait *In vitro* salım değerleri incelenirken dolaşım (pH 7.4) ve tümör mikroçevresi (asidik, pH 5.5) taklit edildi. Nanopartiküller PBS tamponu (pH: 7,4 ve pH: 5,5) içerisinde süspanse edilerek 30 gün boyunca 37°C'de 200 rpm'de yatay olarak çalkalandı. Belirli sürelerde santrfiüj edilerek üst fazı toplanan çözeltilerin 266 nm ve 320 nm'de UV-spektrumları alınarak salınan toplam 5-FU ve GA miktarı indirekt olarak hesaplandı. Şekil 4.10'da görüldüğü gibi, pH 7.4'te 5-FU'nun yaklaşık %28'i ve GA'nın %26'sı 30 gün boyunca kümülatif olarak salındı. pH 5,5'te ise 5-FU'nun %73'ü ve GA'nın %70'i tamamen salındı. Her iki pH değerinde de salımın büyük bir kısmının 24 saat içerisinde gerçekleşmesi literatürde "burst effect-patlama etkisi" olarak tanımlanan etki mekanizmasıyla açıklanabilmektedir. Bu durum taşıyıcı sistem içerisine yüklenen ilacın bir kısmının nanopartikül yüzeyine yakın ve/veya gevşek bir şekilde bağlı

olmasından kaynaklanır ve salımın başlangıcı çok hızlı gerçekleşir. Bu etkiden sonra, daha yavaş ve daha kontrollü bir salınma meydana gelir[156, 157]. Çeşitli araştırmalar, tek ve çift ilaç yüklü PLGA nanopartiküllerinin benzer salım profillerine sahip olduğunu göstermektedir[19, 158, 159].



Şekil 4. 10 pH 7.4 ve pH 5.5 PBS tampon içerisinde FUGANP'lerin ilaç salımı

4.3 Nanopartiküllerin Biyotin ile Yüzeyinin Kaplanması ve Karakterizasyonu

Biyotin ve türevlerinin metalik, polimerik nanopartiküler sistemler, dendrimerler ve lipozomlara konjuge olduğu ve bu konjugatların klinik öncesi çalışmalarda tümörlere karşı yüksek bir afinite gösterdiği bilinmektedir[12]. A549 küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerinin biyotin-pozitif reseptörlere sahip olduğu yaygın olarak bilinmektedir[160, 161]. Bu amaçla, EDC/NHS kullanılarak karbodiimid yöntemi ile Biyotin (B), karakterize edilen ideal boyutlardaki partikül formülasyonlarına hedefleme ajanı olarak konjuge edildi ve BNP'ler sentezlendi. Tablo 4.3'te farklı parametreler kullanılarak sentezlenen BNP'lere ait değerler verilmektedir. 6 ve 12 numaralı sentez parametreleri kullanılarak hücre kültürü çalışmaları gerçekleştirildi

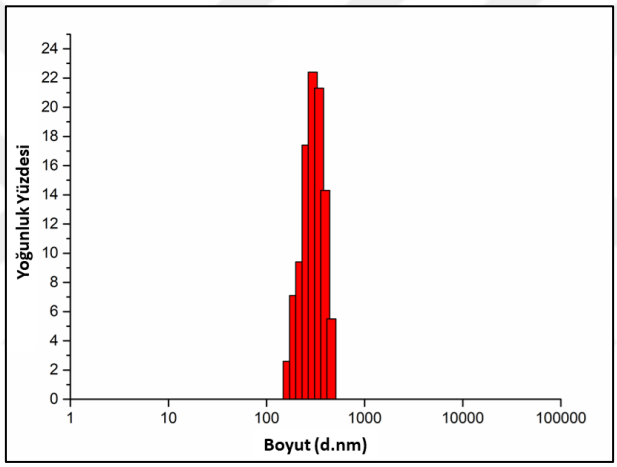
Tablo 4. 3 Farklı parametreler kullanılarak sentezlenen BNP'ler

Sentez No	Boyut(nm)	Zeta(mV)	PDI	Bağlanma Yüzdesi
1	422,1±3,76	(-)32,7±2,16	0,317±0,076	%23-toksik
2	307,2±1,78	(-)22,8±0,65	0,200±0,065	%41
3	237,5±27,62	(-)29,9±1,76	0,196±0,171	%17-toksik

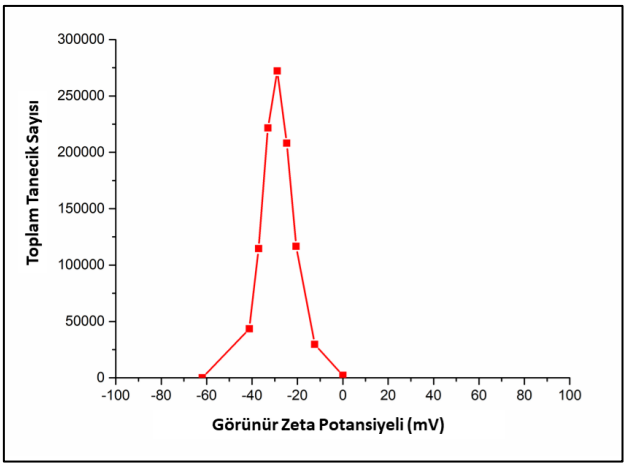
Tablo 4. 3 Farklı parametreler kullanılarak sentezlenen BNP'ler (devamı)

4	276,3±0,65	(-)26,2±0,25	0,221±0,065	%12
5	312,8±5,12	(-)26,7±0,95	0,210±0,042	%15
6	**295,7±2,97**	**(-)27,9±0,32**	**0,244±0,072**	**%62**
7	305,2±6,42	(-)28,3±1,75	0,492±0,275	%64-toksik
8	299,9±5,57	(-)27,7±3,18	0,185±0,027	%52-toksik
9	312,7±1,21	(-)30,6±4,68	0,202±0,521	%65-toksik
10	567,5±27,17	(-)37,1±8,16	0,798±0,326	%37
11	352,4±3,85	(-)33,2±3,27	0,207±0,312	%69-toksik
12	**296,5±3,13**	**(-)27,5±0,58**	**0,252±0,024**	**%60**

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılmak üzere sentezlenen BNP'lerin ortalama partikül boyutu 296,1±3,053 nm (Şekil 4.11), ortalama zeta potansiyeli -27,7±0,451 mV (Şekil 4.12) ve polidispersite indeksi 0,248±0,048 olarak ölçüldü.



Şekil 4. 11 Biyotin ile kaplanmış BNP'lere ait boyut dağılım grafiği

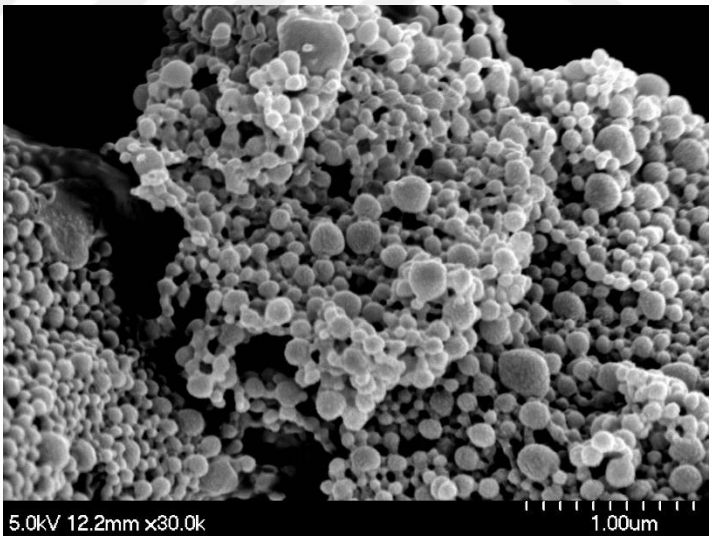


Şekil 4. 12 Biyotin ile kaplanmış BNP'lere ait zeta grafiği

6 ve 10 numaralı sentezlerin seçilmesinde boyut, bağlanma yüzdesi ve toksisite değerleri dikkate alındı. BNP'lerin A549 akciğer kanseri ve sağlıklı kontrol hücre

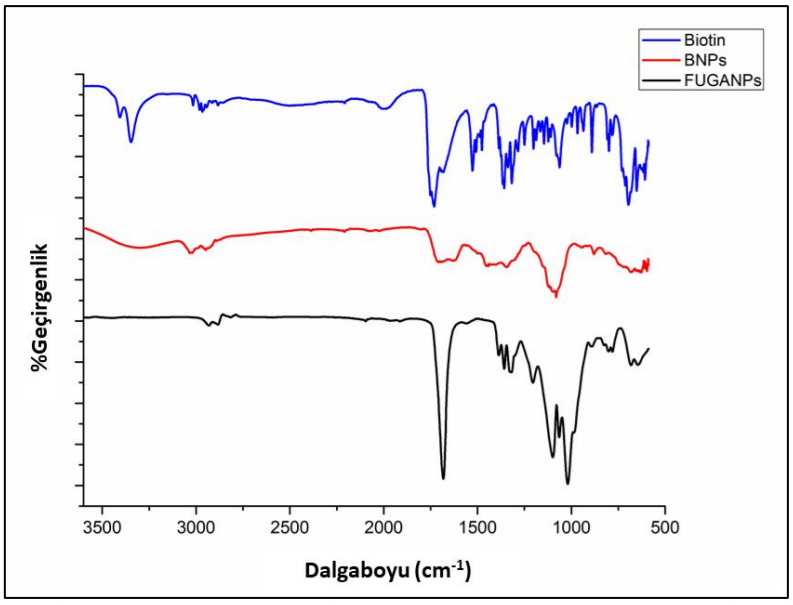
hattı olan HDF hücrelerinde ön deneme olarak sitotoksisitesi incelendiğinde yüksek miktarda EDC/NHS veya biyotin içeren sentezlerin hücrelerde ilk 24 saat içerisinde yüksek oranda toksisiteye sebep olduğu gözlendi. Buradaki toksisitenin hedefleme ve/veya ilaç salınımı kaynaklı değil, çapraz bağlayıcı ve/veya biyotinin toksik etkisi olduğu düşünülerek ve boyut, bağlanma yüzdesi ve toksisite değerleri dikkate alınarak 400 µl EDC/NHS ve 25 mM biyotin, BNP sentezinde kullanıldı. Optimize edilen BNP'lerin fizikimyasal analizleri SEM, FT-IR, XRD ve *In vitro* ilaç salınımı incelenerek gerçekleştirildi.

SEM ile görüntü analizi öncesi iletkenliği bulunmayan nanopartiküllere altın ile kaplama işlemi yapılarak nanopartiküllerin iletkenliği sağlandı. Altın kaplamanın ardından iletken hale getirilen BNP'lere ait görüntüler 5 kV altında ve 30.000X büyütme ile alındı (Şekil 4.13) SEM görüntüleri incelendiğinde sentezlenen BNP'lerin küresel ve homojen bir yapıda olduğu; ortalama boyutların 200 nm ile 500 nm aralığında olduğu görülmektedir. Boyut dağılımı ve ortalama partikül boyutlarına bakıldığında BNP'lere ait değerlerin dinamik ışık saçılımı yaklaşımı kullanılarak belirlenen boyut ve PDI değerleriyle birbirini desteklediği gözlendi.



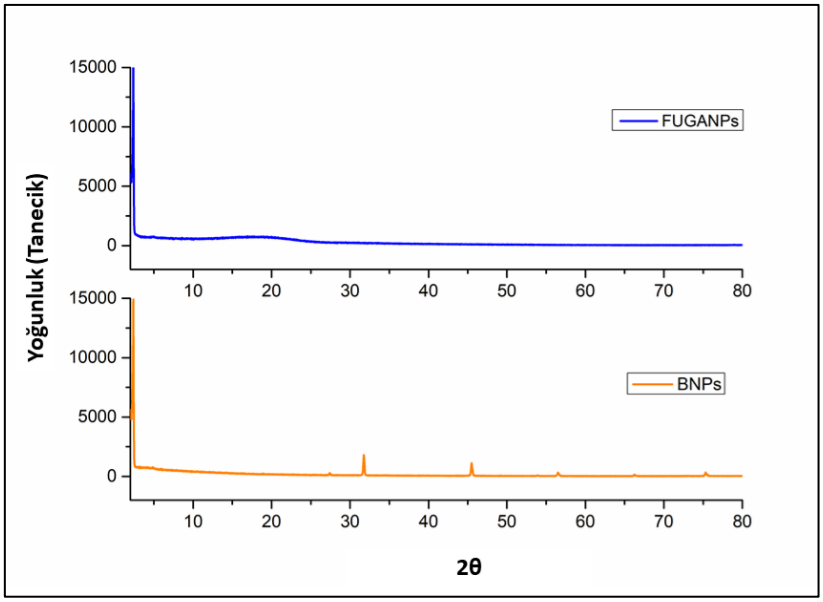
Şekil 4. 13 BNP'lere ait SEM görüntüsü.

PLGA'nın karakteristik piklerine sahip olduğu bilinen FUGANP'lerin yüzey modifikasyonundan sonra BNP'lerde gözlenen biyotin molekülüne ait ana FT-IR pikleri, yüzey modifikasyonunun başarılı olduğunu ve biyotinin yüzeye başarılı bir şekilde bağlandığını gösterdi (Şekil 4.14).



Şekil 4. 14 Biyotin, FUGANP ve BNP'lere ait FT-IR grafiği

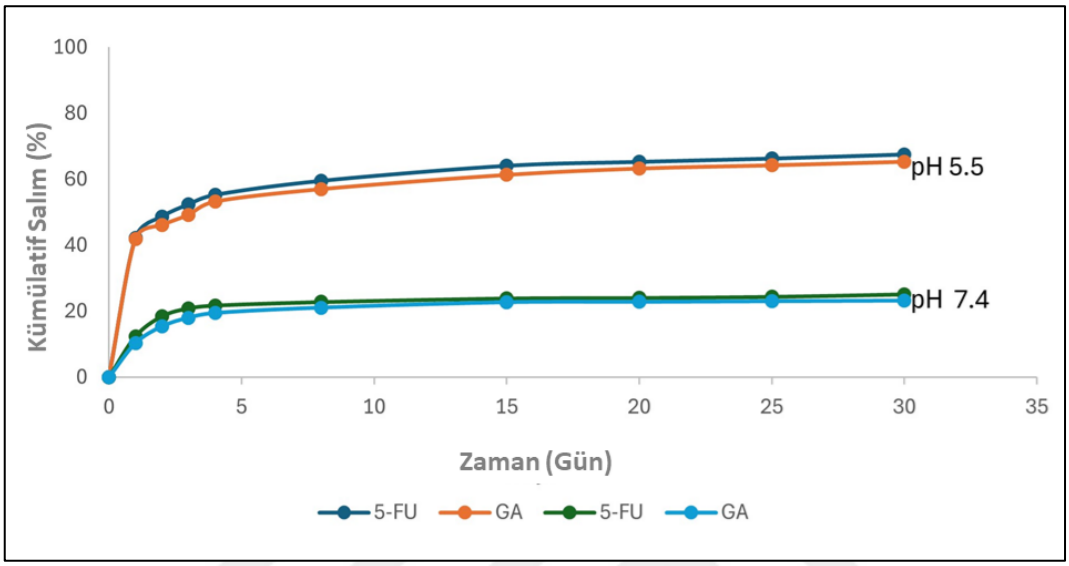
BNP'lere ait toz XRD spektrumları, 3°-80° aralığında, 2θ açısı ile ortam sıcaklığında çekilmiş ve sonuçlar Şekil 4.15'te gösterilmiştir. Biyotin için karakteristik pikler belirgin bir şekilde BNP'lerde gözlemlenmesi FUGANP'lerin yüzeyinde FT-IR ile birbirini destekler nitelikte biyotein konjugasyonunu doğrulamaktadır.



Şekil 4. 15 FUGANP ve BNP'lere ait XRD grafiği

BNP'lere ait *In vitro* salım değerleri incelenirken dolaşım (pH 7.4) ve tümör mikroçevresi (asidik, pH 5.5) taklit edildi. Nanopartiküller PBS tamponu (pH: 7,4 ve pH: 5,5) içerisinde süspanse edilerek 30 gün boyunca 37°C'de 200 rpm'de

yatay olarak çalkalandı. Belirli sürelerde santrfiüj edilerek üst fazı toplanan çözeltilerin 266 nm ve 320 nm'de UV-spektrumları alınarak salınan toplam 5-FU ve GA miktarı indirekt olarak hesaplandı. Şekil 4.16'da görüldüğü gibi, pH 7.4'te 5-FU'nun yaklaşık %25'i ve GA'nın %23'sı 30 gün boyunca kümülatif olarak salındı. pH 5,5'te ise 5-FU'nun %68'i ve GA'nın %65'i tamamen salındı.

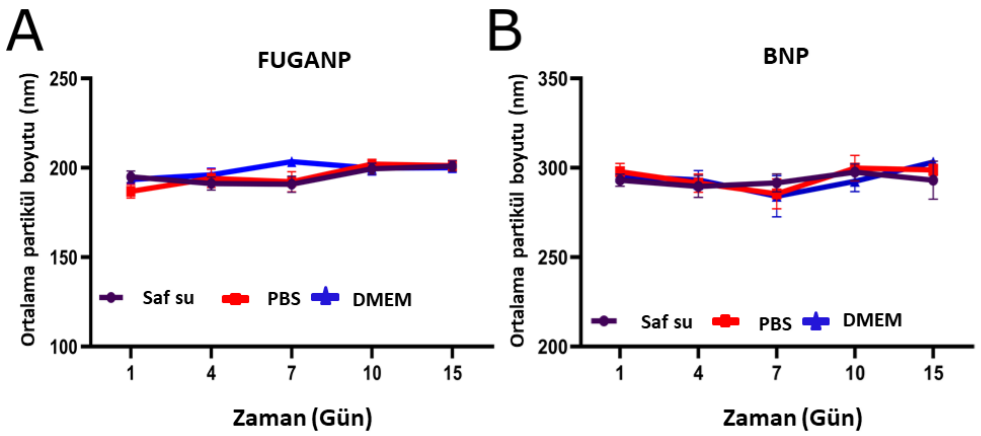


Şekil 4. 16 pH 7.4 ve pH 5.5 PBS tampon içerisinde BNP'lerin ilaç salımı

Çeşitli biyotinlenmiş nanotaşıyıcı sistemlerin A549 ve diğer kanser hücrelerinde antikanser aktivitesine sahip olduğu çeşitli araştırmalarda gösterilmiştir [103, 127, 162-165]. Bu bilgiler doğrultusunda, sonuçlarımız biyotinlenmiş-FUGANP'lerin (BNP'ler) A549 küçük olmayan akciğer kanseri hücre hattı tedavisi için uygun fizikokimyasal özelliklere sahip olduğunu göstermektedir.

4.4 Nanopartiküllerde Stabilizasyon Çalışması

FUGANP ve BNP'lere ait stabilite çalışmaları gerçekleştirilirken belirli günlerde DMEM besiyeri, PBS tampon (pH 7.4) ve saf su içerisinde çözülen nanopartiküllerin boyut ölçümü gerçekleştirildi. Dinamik ışık saçılması (DLS) kullanılarak 1,4,7,10 ve 15. günlerde gerçekleştirilen boyut ölçümleri Şekil 4.17'de verilmiştir. Nanopartiküler sistemlerin kendisini çevreleyen ortamlar ile arasındaki etkileşimler nedeniyle, partikül boyutunda hafif değişiklikler gözlemlendi. Ancak, üç ortamın hiçbirinde önemli bir boyut artışı tespit edilmedi. Partikül boyutundaki zamana bağlı değişimler kolloidal kararlılıkta potansiyel bir azalmayı düşündürse de, genel olarak minimal dalgalanmalar test edilen koşullar altında kararlı nanopartikül dispersiyonlarının göstergesi olarak kabul edildi.



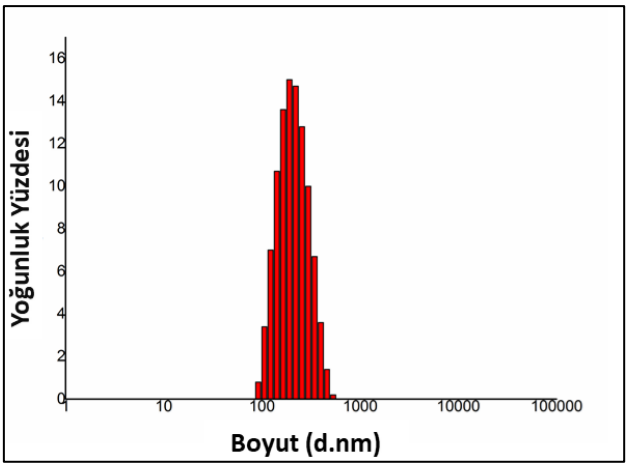
Şekil 4. 17 (A) FUGANP ve **(B)** BNP'lerin distile su, PBS ve DMEM ortamında günlere bağlı stabilite çalışması.

4.5 Hücre Kültürü Çalışmaları

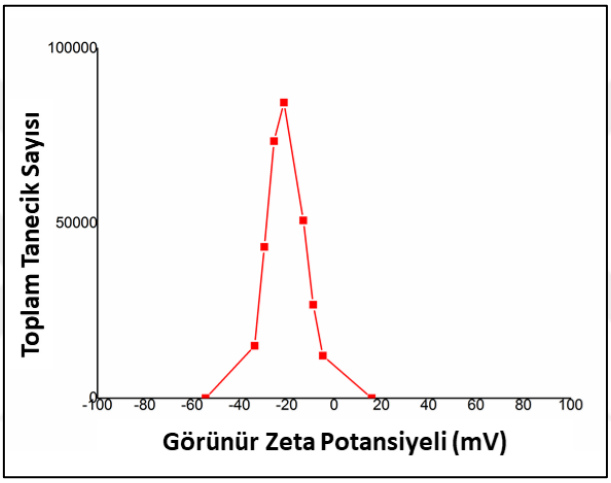
Hücresel Alım Çalışmaları

Taşıyıcı sistemlerin ve dolayısı ile nanopartiküllerin boyutu partikülün dolaşımdan kolayca geçmesine ve tümör dokusuna ulaşmasına izin vermesi bakımından önem arz etmektedir [166]. Literatüre göre, küçük partikül boyutlarına sahip nanopartiküler sistemler tümör hücreleriyle etkileşime girebilir ve gelişmiş geçirgenlik ve tutma yoluyla pasif tümör hedeflemesinde önemli bir rol oynayabilir [125, 167-169]. Çeşitli çalışmalarda, ilaç yüklü nanotaşıyıcı sistemlerin floresan boyalarla etiketlenerek kanser hücrelerine alımları izlenmiş ve 350 nm'ye kadar olan nanopartiküllerin hücreye kolayca alındığı gözlemlenmiştir [170-173].

Hücresel alım çalışmaları için floresan bir boya olan 1 mg FITC, FUGANP sentezi sırasında 5-FU ve GA ile birlikte PLGA içerisine enkapsüle edilerek bu nanopatiküllerin A549 hücrelerine alımı mikroskobik olarak gözlemlendi. FITC ve çift ilaç yüklü nanopartiküllerin karakterizasyonunda boyut ve zeta analizi yapıldı. FITC-FUGANP'lerin boyutu 233±1,943 nm(Şekil 4.18), zeta potansiyeli -18,7±0,321 mV(Şekil 4.19) ve PDI 0,187±0,030 olarak bulundu.

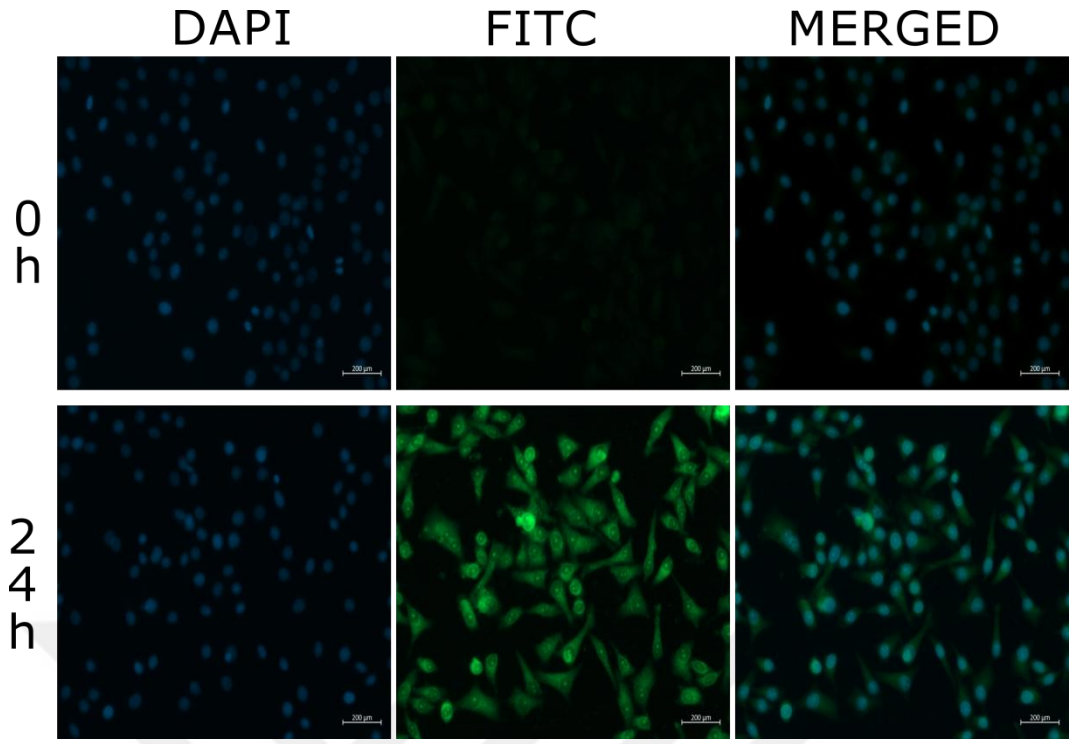


Şekil 4. 18 FITC-FUGANP boyut dağılım grafiği



Şekil 4. 19 FITC-FUGANP zeta grafiği

Nanopartiküler sistemin hücre içine alınıp alınmadığını belirlemek için hücre çekirdekleri DAPI ile boyandı ve ardından FITC-FUGANP'ler A549 hücrelerine uygulanarak 24 saat boyunca mikroskobik olarak takip edildi. 24 saatlik deney sonucunda, zamana bağlı olarak hücresel tutulumun artmasıyla birlikte sitoplazmanın çekirdekten farklı olarak artan konsantrasyonlarda yeşil renge boyandığı ve parçacıkların hücre içine başarıyla alındığı gözlendi (Şekil 4.20)

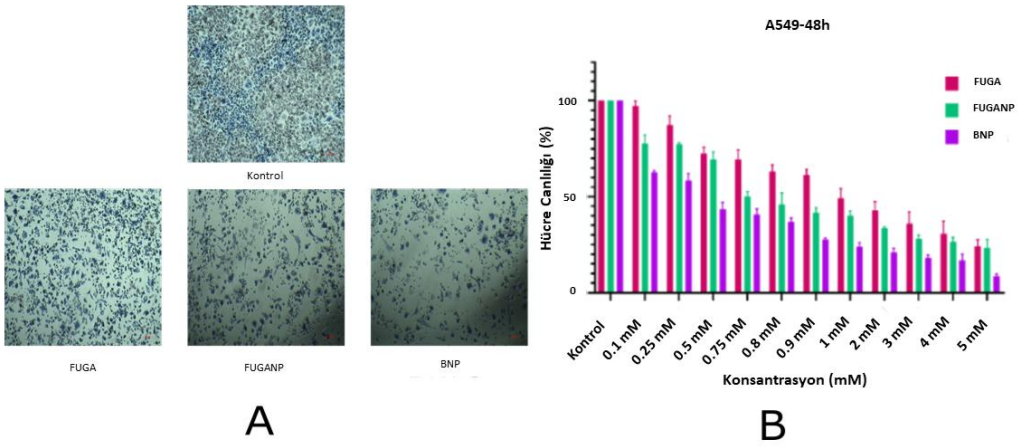


Şekil 4. 20 FITC-FUGANP'lerin A549 hücreleri tarafından hücre içerisine alınımı

MTT Yöntemi ile Sitotoksisitenin Belirlenmesi

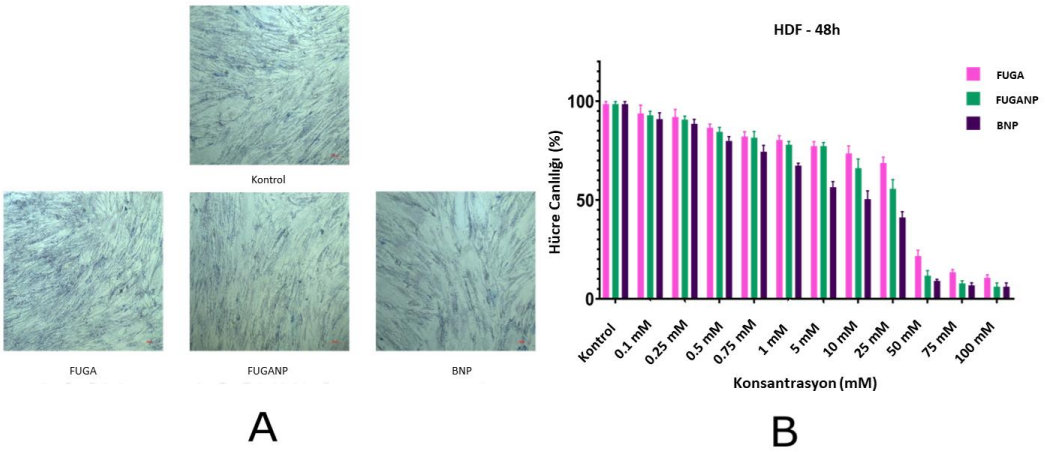
FUGA, FUGANP ve BNP'lerin farklı konsantrasyonlardaki dozlarının A549 küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ve HDF insan kaynaklı fibroblast hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisi canlı hücre mitokondrisinde bulunan oksidatif enzimlerin tetrazolyum halkasını parçalaması sonucu sarı renkli MTT boyasının mor fomazan kristallerine dönüştüğü MTT testi ile belirlendi (Şekil 4.21 ve Şekil 4.22).

MTT deneyi için salım grafiklerine göre nanopartiküler sistemin 48. saat değerlerine denk gelen salım miktarları baz alınarak 5-FU ve GA kombinasyonunun serbest formu (FUGA), FUGANP ve BNP'ler 0-5 mM konsantrasyon aralığında A549 hücrelerine uygulandı. Farklı konsantrasyonlarda FUGA, FUGANP ve BNP'lerin uygulanması sonucunda A549 hücrelerinde 48 saatte hücre canlılığı incelendiğinde, IC_{50} değeri FUGA için 1 mM, FUGANP'ler için 0,75 mM ve BNP'ler için 0,35 mM olarak belirlendi (Şekil 4.21).



Şekil 4. 21 (A) A549 hücrelerinde 48 saat hücre canlılığının temsili görüntüleri **(B)** A549 hücreleri üzerinde farklı konsantrasyonlarda (0,1-5 mM) FUGA, FUGANP ve BNP'lerin 48 saat hücre canlılığı.

FUGA, FUGANP ve BNP'ler 0-100 mM konsantrasyon aralığında HDF hücrelerine uygulandı. Farklı konsantrasyonlarda FUGA, FUGANP ve BNP'lerin uygulanması sonucunda HDF hücrelerinde 48 saatte hücre canlılığı incelendiğinde hücrelerin sadece 25 mM ve üzeri dozlarda öldüğü belirlendi. A549 hücreleriyle karşılaştırıldığında, HDF hücrelerinin sadece %15'i FUGA ve FUGANP'lerle bu hücrelere verilen en yüksek 5 mM dozunda canlılığını kaybetti. Aynı dozda BNP'lerde hücrelerin yaklaşık %65'i canlılığını korudu. Bu nedenle, A549 hücrelerinde kullanılan doz aralığının HDF hücreleri için toksik olmadığı belirlendi (Şekil 4.22).



Şekil 4. 22 (A) HDF hücrelerinde 48 saat hücre canlılığının temsili görüntüleri **(B)** HDF hücreleri üzerinde farklı konsantrasyonlarda (0,1 - 100 mM) FUGA, FUGANP ve BNP'lerin 48 saat hücre canlılığı.

Tedaviden sonra A549 hücre canlılığındaki önemli azalma, PLGA nanopartikülleri tarafından 5-FU ve GA'nın etkili kapsüllenmesine, hedeflenmesine ve iletilmesine bağlanabilir. Çok sayıda çalışma, çift ilaçlarla yüklenen hedefli polimerik nanopartiküllerin birçok kanser hücre tipinde gelişmiş içselleştirme ve güçlü sitotoksisite gösterdiğini göstermiştir. Polimerik nanopartiküllerin endositoz yoluyla etkili ve yüksek hücresel emilimi, hücre içi bölgelerde ilaç salınımını mümkün kılar. Sonuç olarak, hücre proliferasyonunun inhibe edilmesi veya apoptoz indüksiyonu gerçekleştirilebilir.

Benzer şekilde yapılan bir çalışmada; biyotinlenmiş paklitaksel ve tariquidar yüklü PLGA nanopartiküllerinin, ilaç dirençli tümör hücrelerine karşı sadece paklitaksel yüklü nanopartiküllerden önemli ölçüde daha yüksek *In vitro* sitotoksisite gösterdiği bulunmuştur[174]. Dai ve arkadaşları tarafından sentezlenen DOX-PLGA-lesitin-PEG-biyotin nanopartikülleri ile HepG2 hücreleri üzerinde yapılan sitotoksisite testlerinde ve tümör taşıyan farelerde yapılan *In vivo* antikanser aktivite çalışmalarında; hedefli nanopartiküllerin tümör proliferasyonu üzerinde hedeflendirilmemiş nanopartikül ve serbest DOX ile kıyaslandığında en büyük inhibitör etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Biyodağılım testlerinde, DOX-PLPB-NP'lerin tümör bölgelerinde serbest DOX ve DOX-PLGA-lesitin-PEG nanopartiküllerinden (DOX-PLP-NP'ler) daha yüksek bir DOX konsantrasyonu ile yer aldığı ve özellikle 24 saat sonra normal organlarda en düşük DOX seviyesine sahip olduğu gözlemlenmiştir[175].

Sonuçlarımız, literatüre benzer şekilde, 5-FU ve GA'nın PLGA nanopartiküllerine ko-kapsüllenmesinin moleküllerin çözünürlüğünü ve stabilitesini artırdığını göstermiş; BNP'lerin, hedeflenmemiş nanopartikül formülasyonu ve serbest ilaç kombinasyonuna kıyasla yüzey modifikasyonu yoluyla biyotin pozitif A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik aktiviteyi geliştirdiğini göstermiştir. Sağlıklı kontrol grubu olan HDF hücrelerinde verilen aralıkta öldürücü doz ve anlamlı sitotoksik aktivite gözlenmediğinden, FUGA, FUGANP ve BNP'lerin diğer biyolojik etkileri sadece A549 hücreleri üzerinde çalışılmıştır.

Klonojenik Hayatta Kalma Tayini

Klonojenik hayatta kalma tayini ile A549 hücreleri üzerinde FUGA, FUGANP ve BNP'lerin çoğalma ve koloni oluşumu üzerindeki rolü araştırıldı[138]. FUGA,

FUGANP ve BNP'ler A549 hücrelerine 0.35 mM konsantrasyonda eklenerek biyotin ile hedeflendirilen nanopartiküler sistemin hedeflendirilmemiş nanopartiküler sistem ve serbest madde kombinasyonuna göre etkisi kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak incelendi. Şekil 4.23A'da FUGA, FUGANP ve BNP'lerin A549 hücrelerinde koloni oluşumunu önemli ölçüde azalttığı nitel olarak görülmektedir. Buna karşın herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol grubundaki hızlı ve yüksek koloni oluşum oranı tümörün saldırganlığından kaynaklanmaktadır.

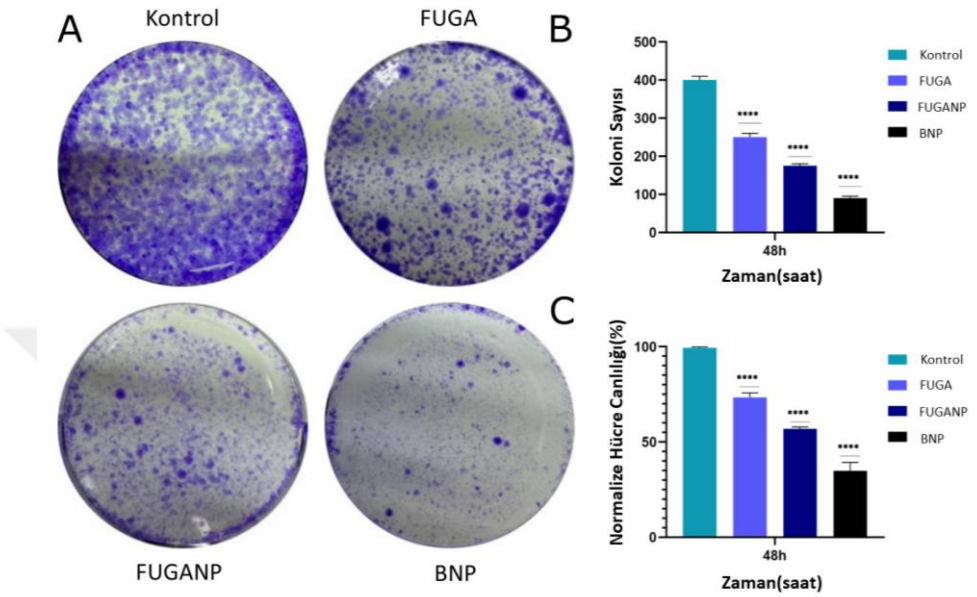
Şekil 4.23B'deki grafikler, FUGA, FUGANP ve BNP'lerin kontrol grubu kolonilerine kıyasla 48 saatlik etkilerini istatistiksel olarak göstermektedir. Koloni oluşumu FUGA için %63, FUGANP'ler için %42,50 ve BNP'ler için %22,50 olarak hesaplandı ve kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde koloni oluşumunun azaldığı gözlendi.

Koloni oluşumunu doğrulamak için yapılan absorbans analizinde, koloniler %30 asetik asitte çözülerek 590 nm'de absorbans değerleri okundu ve kontrol grubuna göre normalize edilen hücre canlılığı yüzdesi FUGA için %73,58, FUGANP'ler için %56,84 ve BNP'ler için %34,33 olarak belirlendi (Şekil 4.23C)

Çalışmamıza benzer şekilde Paudel ve arkadaşları tarafından yürütülen çalışmada, Rutin yüklü nanopartiküllerin A549 küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücreleri üzerinde antiproliferatif etkiler gösterdiği ve koloni oluşumunu önlediği belirtilmiştir[114]. Lokalize akciğer kanserinde sürekli ilaç dağıtımı için biyomimetik Infasurf® akciğer yüzey aktif maddesi (LS) kaplı solunabilir poli laktik-ko-glikolik asit polimer bazlı nanopartikül (PLGA-NP'ler) formülasyonunun geliştirilmesine yönelik *In vitro* bir çalışmada, gemsitabin ve paklitaksel yüklü nanopartiküllerin, tek ilaç yüklü nanopartiküllere ve serbest ilaçlara kıyasla A549 tümör hücrelerine karşı daha yüksek sitotoksisite ve anti-proliferatif etki gösterdiği, kanser hücresi sağkalımını ve koloni oluşumunu önemli ölçüde azalttığı gözlemlenmiş ve aynı çalışmanın *In vivo* değerlendirmesinde LS-PLGA-NP'lerinin PLGA-NP'lerine kıyasla daha uzun pulmoner tutulum gösterdiği gözlenmiştir[176].

Literatürle benzer şekilde, bulgularımız 5-FU ve GA'nın PLGA nanopartiküllerine ko-kapsüllenmesinin A549 hücrelerinde koloni oluşumunu azalttığını

göstermektedir. Her ne kadar tüm gruplar koloni oluşumunu önemli ölçüde engellese de, biyotin-konjuge nanopartiküllerin (BNP'ler), hedeflenmemiş nanopartikül formülasyonu (FUGANP) ve serbest ilaç kombinasyonuna (FUGA) kıyasla sitotoksisite sonuçlarına benzer şekilde daha etkili olduğu gözlendi.



Şekil 4. 23 (A) A549 hücre hatlarında koloni oluşumu **(B)** Kolonilerin kantitatif analizi **(C)** %30 asetik asit ile çözülen kolonilerin normalizasyonu (n=3, ****p <0.0001).

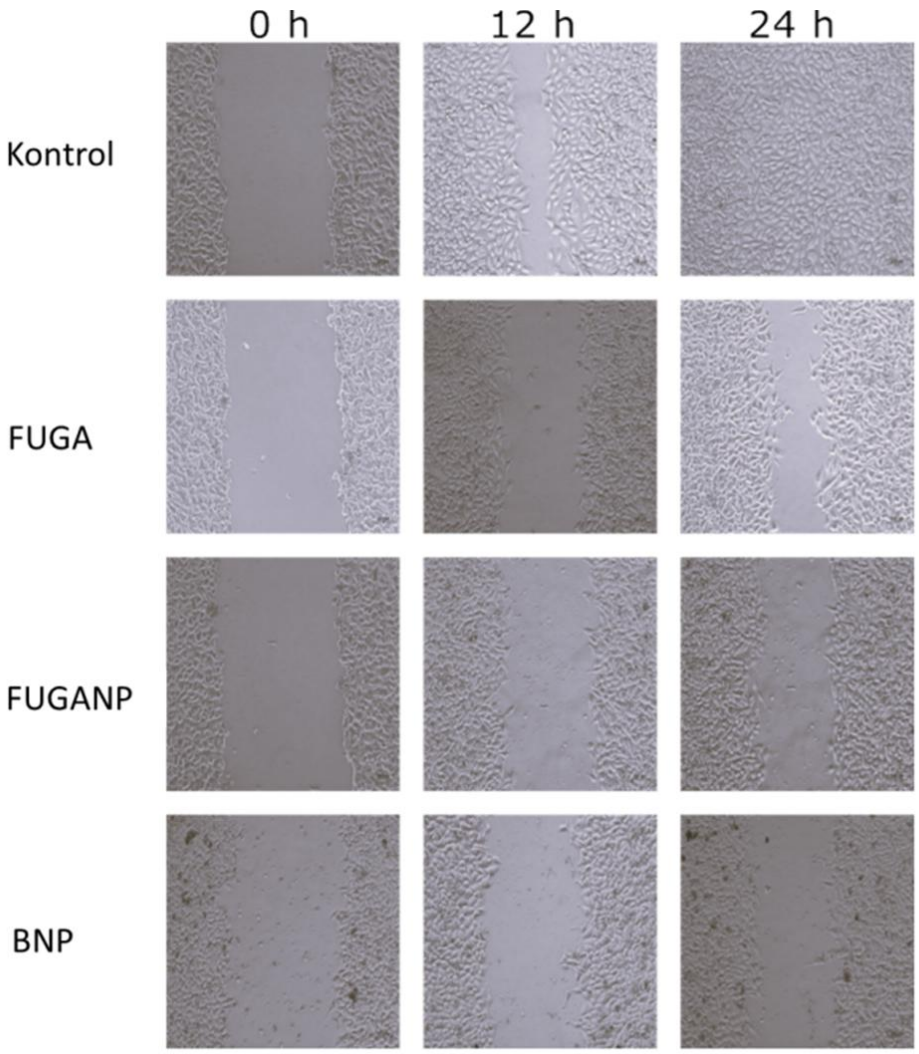
Çizik Yara İyileşme Testi

Yara iyileşmesi testinde hücreler üzerinde fiziksel bir yara oluşturulduktan sonra FUGA, FUGANP ve BNP'ler A549 hücrelerine 0.35 mM konsantrasyonunda eklenerek biyotin ile hedeflendirilen nanopartiküler sistemin hedeflendirilmemiş nanopartiküler sistem ve serbest madde kombinasyonuna göre yara iyileşmesi üzerine etkisi kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak incelendi. Bu amaçla, her grup için açılan çizikler 0. saatten itibaren belirli zaman aralıklarında mikroskobik olarak ölçüldü ve kontrol grubu kapanana kadar yara kapanma yüzdeleri hesaplandı. Şekil 4.24'te gösterildiği gibi; çizik, kontrol grubunda 24 saat sonra tamamen kapandı. FUGA, FUGANP ve BNP'lerin tedavisi ise yara üzerinde hücre göçünü zamana bağlı bir şekilde engelledi. Yara kapanma oranları, kontrol grubuna kıyasla 24 saatlik tedaviden sonra FUGA için %53,62, FUGANP'ler için %43,34 ve BNP'ler için %26,49 olarak belirlendi. İstatistiksel olarak anlamlı yara

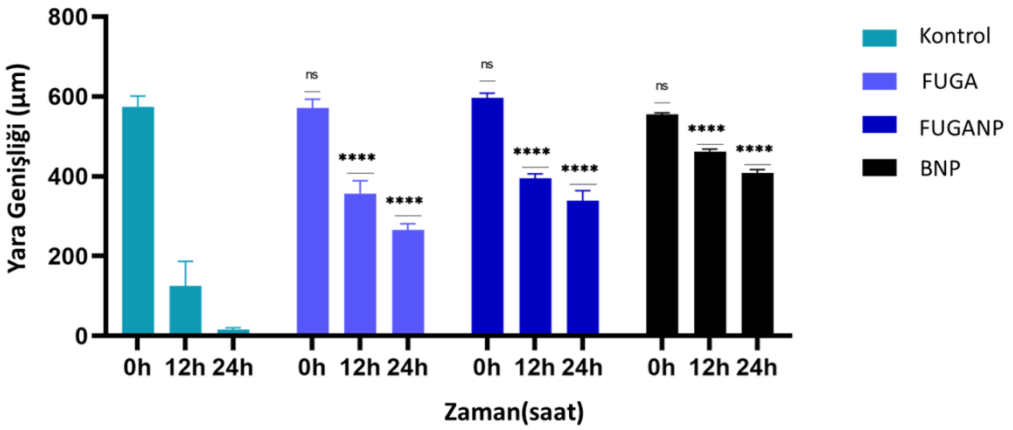
kapanması kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tüm gruplarda gözlendi ancak BNP'ler, FUGA ve FUGANP'lerden daha etkiliydi (Şekil 4.25).

Baghirova ve ark. tarafından HaCaT hücreleri üzerinde A vitamin-palmitat yüklü PLGA/kitosan kaplı nanopartikül formülasyonlarının sitotoksisite ve yara iyileşme profillerinin belirlendiği bir çalışmada en küçük boyuta sahip formülasyonun yara iyileşmesini önemli ölçüde artırdığını gösterilmiştir[177]. Paudel ve ark. tarafından 18-β-Glisirizinik asit yüklenmiş PLGA nanopartiküllerinin A549 akciğer kanseri hücrelerinde hücre çoğalmasını ve hücre göçünü azalttığı bildirilmiştir[178]. Laktobiyonik asitle kaplanmış silymarinin içeren PLGA nanopartiküller (LA-PLGA-Sil) ile yalnızca silymarinin enkapsüle edildiği PLGA nanopartiküllerin (PLGA-Sil) karşılaştırıldığı bir çalışmada HepG2 hücrelerinde hücre göç aktivitesinin hedeflenen nanoformülasyonlar tarafından bozulduğu ve böylece HCC'nin terapötik tedavisine kapsamlı bir yol sağlandığı gösterilmiştir[115].

Çalışmamızda, literatüre benzer şekilde biyotinle hedeflenen BNP'lerin A549 hücreleri üzerinde hücre göçünü engellemede serbest FUGA ve FUGANP'lerden daha etkili olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4. 24 FUGA, FUGANP ve BNP uygulanan A549 hücrelerinde hücre göçü ve yara kapanması.



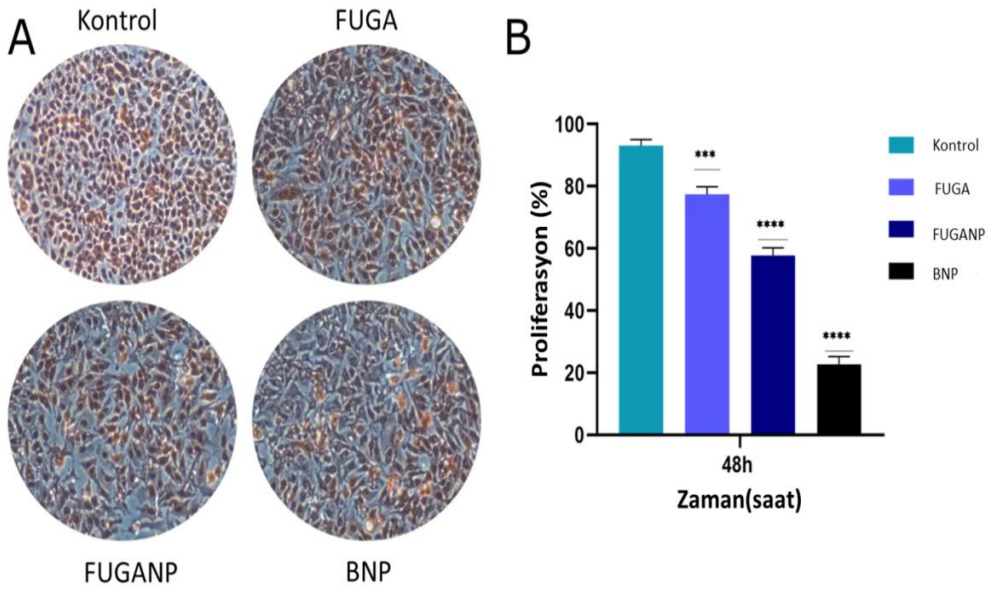
Şekil 4. 25 A549 hücrelerinde hücre göçü oranlarının kantitatif analizi (n=3, ****p <0.0001).

Prolifere Hücre Çekirdek Antijeni (PCNA) ile Proliferasyonun Belirlenmesi

FUGA, FUGANP ve BNP'lerin A549 kanser hücrelerinin proliferasyonuna etkisi immunositokimyasal PCNA işaretleme yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. FUGA, FUGANP ve BNP'ler A549 hücrelerine 0.35 mM konsantrasyonunda eklenerek biyotin ile hedeflendirilen nanopartiküler sistemin hedeflendirilmemiş nanopartiküler sistem ve serbest madde kombinasyonuna göre antiproliferatif etkisi kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak incelendi. Hücrelerin proliferasyon yüzdesi, PCNA ile işaretlenmiş ve işaretlenmemiş A549 hücrelerinin sayılarak birbirine oranlanması ile belirlendi. PCNA ile immünositokimyasal işaretleme sonucunda, FUGA, FUGANP ve özellikle BNP'ler ile 48 saat tedavi edilen A549 hücrelerinde, kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında hücre proliferasyonunda anlamlı bir azalma tespit edildi (Şekil 4.26). Hücre proliferasyonu, kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında FUGA için %77,33, FUGANP'ler için %57,67 ve BNP'ler için %22,67 olarak hesaplandı. FUGA, FUGANP ve BNP'ler ile tedavi edilen A549 hücrelerindeki hücre çoğalması, ANOVA testi ile değerlendirildiğinde proliferasyon yüzdesinin özellikle BNP verilen hücrelerde önemli ölçüde azaldığı gözlendi (Şekil 4.26).

Sarkar ve ark. tarafından Temozolamid ve 3,3'-diindoilmetanın PLGA'ya birlikte yüklendiği bir çalışmada, ikili ilaç yüklü tedavinin glioblastoma hücrelerinde *In vitro* ve *In vivo*'da sitotoksik etkiyi önemli ölçüde artırdığı; dahası, ikili ilaç yüklü nanoformülasyonun DNA hasarı, çoğalma ve apoptozis üzerinde tek ilaç yüklü nanopartiküllerden daha etkili olduğu belirtilmiştir[179]. Benzer şekilde Miao ve ark. tarafından yapılan çalışmada ikili ilaç yüklü PLGA nanopartiküllerin ilaç yükleme, hücresel alım, *In vitro* salınım ve *In vivo* tümör birikimi açısından incelendiğinde mesane kanseri üzerinde belirgin antitümör aktivitesi gösterdiği gözlemlenmiştir[180].

Literatüre benzer şekilde, çalışmamızda; biyotinle hedeflenen BNP'lerin A549 hücreleri üzerinde proliferasyonu engellemede serbest FUGA ve FUGANP'lerden daha etkili olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4. 26 (A) FUGA, FUGANP ve BNP uygulanan A549 hücrelerinde anti-proliferatif etkinin immünositokimyasal olarak gösterimi **(B)** FUGA, FUGANP ve BNP uygulanan A549 hücrelerinde anti-proliferasyon grafiği (n=3, ***p<0.0005, ****p <0.0001).

Otofajik, Mitokondriyal ve Apoptotik Etkilerin Floresan Görüntüleme ile Hücresel Düzeyde Belirlenmesi

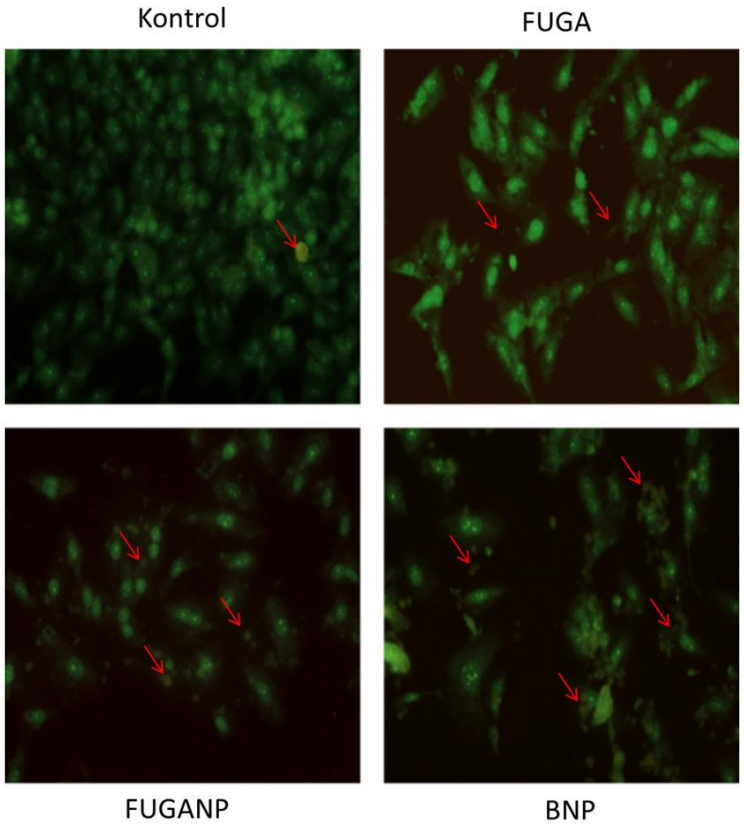
A549 hücrelerinde nanopartiküler sistemlerin otofajik etkisi, otofaji çalışmalarında yaygın olarak tercih edilen Akridin turuncusu (AO) kullanılarak belirlendi. Doğal pH'ta (pH=7) hidrofobik yeşil floresan molekülü olan AO boyası, asidik vezikül organellerinde (AVO'lar) protonlanır ve parlak kırmızı floresan yayan kümeler oluşturur [140, 141]. Şekil 4.27'de görüldüğü üzere kontrol hücreleri çoğunlukla yeşil floresan ışıma gösterirken, çok az sayıda hücre kırmızı floresan ışıma gösterdi. Bu durum, kontrol grubunda az miktarda AVO olduğunu göstermektedir. Kontrol grubu ile kıyaslandığında FUGA, FUGANP ve BNP'lerle tedavi edilen A549 hücrelerinde kırmızı floresan yayan kümelerin miktarında artış olduğu açıkça görülmektedir (Şekil 4.27). Bu sonuç, FUGA, FUGANP ve BNP tedavisinin A549 hücrelerinde otofajiyi indükleyebildiğini ortaya koymaktadır Kırmızı-AVO pozitif hücre oranı incelendiğinde, FUGA için %7,35, FUGANP için %23,53 ve BNP için %45,68 oranında otofajik hücrelerin sayısının önemli ölçüde arttığı belirlenirken, kontrol grubunda bu oran %2 idi.

Sonuçlar istatistiksel olarak anlamlıydı ve BNP'lerin otofajide oldukça etkili olduğu görüldü (Şekil 4.28).

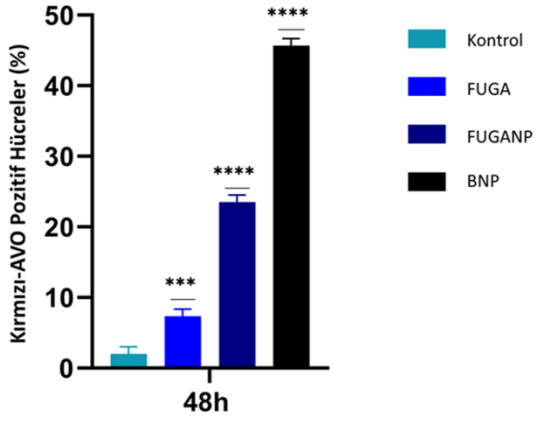
Epirubisin (EPI) ve Paklitaksel (PTX) yüklü polietilenimin (PEI) kaplı PLGA nanopartiküllerinin A549 akciğer karsinomu hücre hattı üzerindeki etkisi incelendiğinde, EPI ve PTX'in sinerjik etkisinin, tek ilaç sistemleri ve serbest maddeye kıyasla artmış apoptotik ve nekrotik hücre ölümüyle sonuçlandığı gösterilmiş, combine tedavinin hücre göçü ve kanser hücrelerinin invazyonunun inhibisyonuna karşı da oldukça etkili olduğu belirtilmiştir[73].

Zhao ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada Puerarin (PRN) ve 5-Fluorourasil (5FU) antitümör ilaçlarının polietilen glikol (PEG) ve PLGA nanopartiküller (NMs) ile birlikte kapsüllenmesi sonucunda elde edilen dual ilaç yüklü 5FU-PRN NMs'nin HEL-299 ve A549 gibi akciğer karsinomu hücre hatlarında *In vitro* apoptozu indüklediği gösterilmiş ve dual ilaç verme stratejisinin akciğer kanseri hücrelerinde 5FU-PRN NMs'nin etkinliğini iyileştirmede önemli bir potansiyele sahip olabileceği öne sürülmüştür[15].

Literatüre benzer şekilde, çalışmamızda; biyotinle hedeflenen BNP'lerin A549 hücreleri üzerinde otofajiyi indüklemede serbest FUGA ve FUGANP'lerden daha etkili olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4. 27 Floresan mikroskobunda otofajik hücrelerin görüntülenmesi (20X)



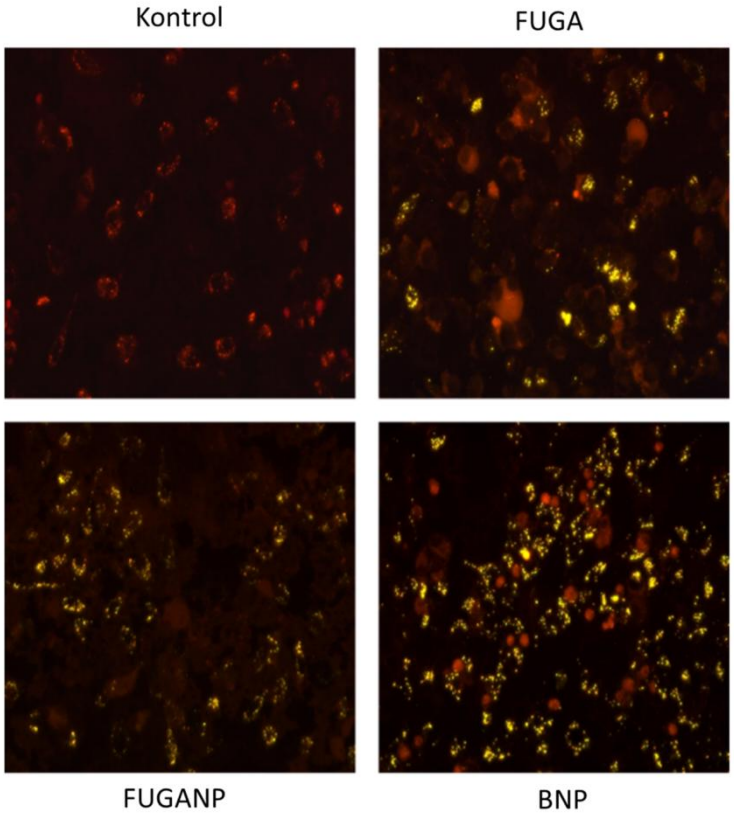
Şekil 4. 28 FUGA, FUGANP ve BNP uygulanan A549 hücrelerinde otofajik vezikül oluşumu ile Kırmızı-AVO içeren hücrelerin yüzdesi (n=3, ***p<0.0005, ****p <0.0001)

Katyonik JC-1 boyası, mitokondrilerde potansiyele bağlı birikim sergiler ve bu durum, mitokondri depolarizasyonu nedeniyle hasar gören membran dolayısı ile mitokondri zarının potansiyelini kaybetmesine neden olur. Membran potansiyelini kaybeden hücrelerde kırmızıdan yeşile doğru bir floresan emisyon kayması oluşur[142, 143]. FUGA, FUGANP ve BNP'lerle tedavi edilen A549 hücrelerinde

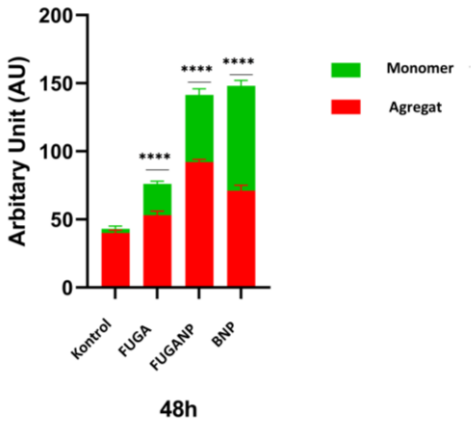
tedavi edilmemiş kontrol hücrelerine kıyasla yeşil monomer oranının kırmızı agregat oranına göre artmış olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.29). Bu sonuç, formülasyonumuzun mitokondri zarı hasarını indüklediğini ve dolayısıyla zar potansiyelini azalttığını göstermiştir. Yeşil ve kırmızı renk kantifikasyon verileri de Şekil 4.30'da sunulmuştur. A549 hücrelerinin mitokondri zarı potansiyeli, FUGA için 7,66 kat, FUGANP'ler için 16,33 kat ve BNP'ler için 48 saatlik tedaviden sonra 25,6 kat artmıştır ve sonuçlar istatistiksel olarak anlamlıdır. Bu sonuç, FUGA, FUGANP ve BNP'ler ile tedavinin A549 hücrelerinde mitofajiyi indüklediğini ortaya koydu.

Sen ve ark., yaptıkları çalışmada oral yoldan uygulanan mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit (DMSA)-konjuge Apigenin yüklü NP'lerin (DMSA-APG-NP'ler) düz NP'lere kıyasla B16F10 ve A549 hücre hatlarında daha yüksek hücresel internalizasyon, artan sitotoksisite, mitokondriyal transmembran potansiyelinin önemli depolarizasyonu ve artmış bir kaspaz aktivitesi seviyesi sergilediğini belirtmiştir[181]. Yine başka bir çalışmada; Dosetaksel-PLGA nanopartiküllerinin (PLGA-Dtx), serbest dosetaksel (Dtx) ve Dtx konjuge nanopartiküllerin (PLGA-Dtx) A549 hücreleri üzerindeki etkileri incelendiğinde, PLGA-Dtx'e maruz kalan A549 hücrelerinin apoptoz ve nekroptozu indüklediği ve mitokondriyal membran potansiyelinde önemli değişiklikler gösterdiği belirlenmiştir[182].

Literatür ile kıyaslandığında literature benzer şekilde; biyotinle hedeflenen BNP'lerin A549 hücreleri üzerinde mitokonriyal membran potansiyelini azaltmada serbest FUGA ve FUGANP'lerden daha etkili olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4. 29 Floresan mikroskobunda mitofajik hücrelerin görüntülenmesi (20X)



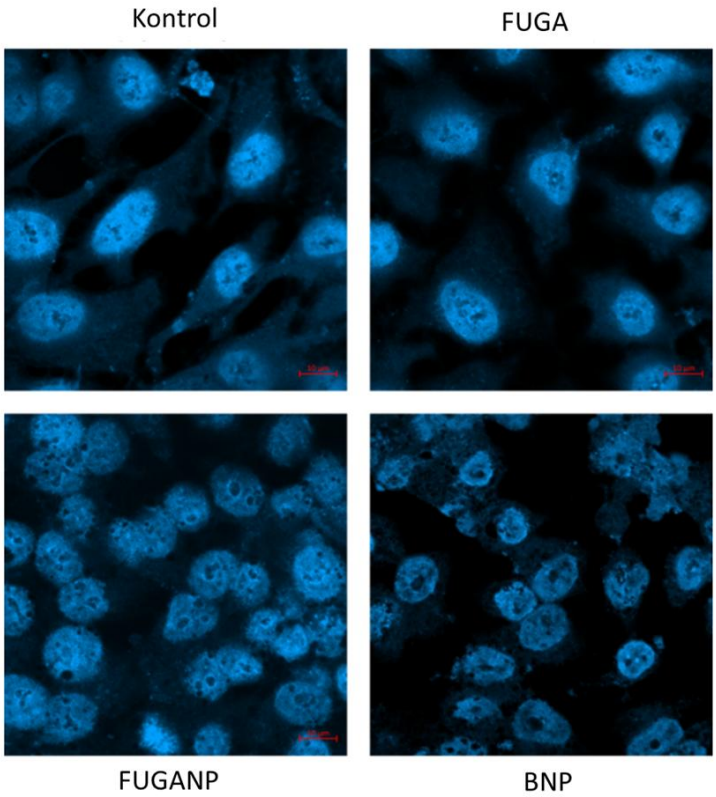
Şekil 4. 30 FUGA, FUGANP ve BNP uygulanan A549 hücrelerinde monomer ve agregat oranının kantitatif analizi (n=3, ****p <0.0001).

A549 hücrelerinde çekirdek morfolojisine bağlı olarak incelenen apoptotik hücre sayısı DAPI boyama kullanılarak belirlenmiştir. FUGA, FUGANP ve BNP'ler ile tedavi edilen hücrelerde tüm gruplar için 48 saatlik inkübasyondan sonra nükleer boyanmada artış gözlemlenmiştir (Şekil 4.31). Kontrol grubunda; apoptoz geçiren hücrelerle karşılaştırıldığında, serbest FUGA kombinasyonu 48 saatte apoptotik hücre sayısını 3,4 kat arttırırken FUGANP'ler 4,8 kat ve BNP'ler 13,2 kat artırdı.

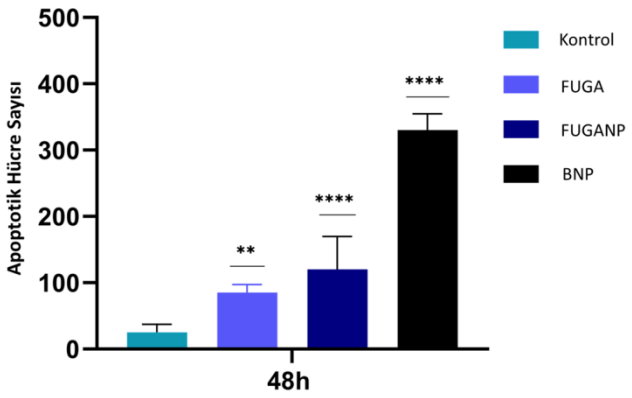
Sonuçlar tüm gruplar için anlamlıydı (Şekil 4.32). Bu sonuç, FUGA, FUGANP ve BNP'ler ile tedavinin A549 hücrelerinde apoptozu artırdığını ortaya koydu.

Metformin (Met) ve Silibinin'in (Sil) poli(D,L-laktid-ko-glikolid)-polietilen glikol (PLGA-PEG) içeren polimerik nanopartiküllere dual ilaç olarak yüklendiği bir çalışmada, bu bileşiklerin A549 insan akciğer kanseri hücrelerine karşı sinerjistik inhibitör etkisi araştırılmış ve DAPI boyama ile kanser hücrelerinde apoptozu indükleyebilecekleri gösterilmiştir[183]. Monoklonal bir antikor olan Setuksimab (Cet) ile konjuge edilmiş, Dosetaksel (DTX) ile yüklenen poli(laktid-ko-glikolid) (PLGA) nanopartiküllerinin, serbest ilaç ve konjuge olmayan nanopartiküllere kıyasla A549 hücrelerinde apoptozu indüklediği Kumari ve ark. tarafından belirlenmiştir[184]. Benzer şekilde Fang ve ark. tarafından yürütülen bir çalışmada, Fukoidan ve Trabektedin moleküllerinin dual olarak PLGA içerisine yüklendiği nanopartiküler sistemin A549 küçük hücreli olmayan akciğer kanserinin tedavisinde apoptozu indükleyerek A549 hücrelerini etkili bir şekilde baskıladığı ve öldürdüğü belirtilmiştir[185].

Literatür ile kıyaslandığında literatüre benzer şekilde; biyotinle hedeflenen BNP’lerin A549 hücreleri üzerinde apoptozu arttırdığı ve apoptotik hücrelerde BNP’lerin serbest FUGA ve FUGANP’lerden daha etkili olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4. 31 Konfokal mikroskobunda apoptotik hücrelerin görüntülenmesi (60X)



Şekil 4. 32 FUGA, FUGANP ve BNP uygulanan A549 hücrelerinde apoptotik hücrelerin kantitatif analizi (n=3, **p<0.003, ***p<0.0005, ****p <0.0001).

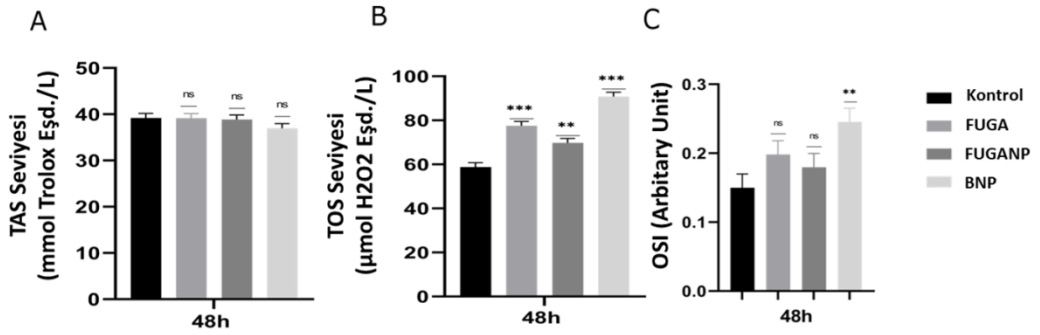
Tüm bu bilgiler doğrultusunda, A549 hücreleri üzerinde biyotin ile hedeflendirilen nanopartiküllerin (BNP) hedefleme yapılmayan FUGANP'ler ve serbest kombine FUGA ilaç tedavisiyle karşılaştırıldığında hücresel düzeyde otofajiyi indüklediği, mitokondriyal membran potansiyelini azalttığı ve apoptozu arttırdığı diğer sonuçlarımız ve literatürle paralel olarak gözlemlenmiştir.

Antioksidan Aktivite Çalışmaları

TAS (mmol Trolox Eşd./L), TOS (μmol H_2O_2 Eşd./L) ve OSI (TOS/TAS*10) değerleri Elabscience kolorimetrik test kitleri ile belirlenmiş ve değerler Şekil 4.33'te sunulmuştur. Örneklerin TAS değerleri sırasıyla FUGA için 39,15 mmol/L, FUGANP'ler için 38,84 mmol/L ve BNP'ler için 36,99 mmol/L oolarak belirlenmiştir (Şekil 4.33A). Aynı örnekler için TOS değerleri sırasıyla 77,52, 69,79 ve 90,81 μmol/L olarak (Şekil 4.33B), OSI değerleri ise sırasıyla FUGA için 0,198, FUGANP'ler için 0,179 ve BNP'ler için 0,245 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.33C).

Sezer ve ark. tarafından Gentisik Asit de dahil olmak üzere bir grup polifenolik bileşiğin HCT-116 hücreleri üzerindeki oksidatif stres etkilerinin incelendiği çalışmaya ait sonuçlar TAS ve TOS seviyeleri için yaptığımız çalışmadaki sonuçlara benzerdi. TAS seviyeleri önemli bir fark göstermezken, TOS seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla tüm tedavi edilen gruplarda önemli ölçüde değiştiği gözlendi. Antioksidan ve oksidan durum arasındaki dengeyi temsil eden OSI seviyeleri de kontrol grubuna kıyasla tüm tedavi edilen gruplarda önemli ölçüde farklıydı[186]. Daidzein nanosüspansiyonunun (DZ-NS) 5-Fluorourasil (5-FU) ile birlikte insan kolorektal adenokarsinom hücrelerinde (Caco-2) indüklenen apoptozis ve inflamasyon üzerindeki etkilerini araştıran bir çalışmada, 5-FU ile tedavi edilen hücrelerde kontrol gruplarına kıyasla TOS ve OSI seviyelerinde artış ve TAS seviyelerinde önemli bir azalma gözlemlenmiştir. Buna karşılık, DZ veya DZ-NS ile tedavi edilen Caco-2 hücreleri, kontrol gruplarına kıyasla TAS'ta önemli bir artış ve TOS ve OSI'de azalma göstediği Kızılkaya ve ark. tarafından yapılan çalışmada belirtilmiştir[187]. *Canarium commune* (Elemi) esansiyel yağı enkapsüle edilerek sentezlenen nanopartiküllerin insan akciğer adenokarsinomu (A549) ve normal fibroblast hücreleri (CCD-19Lu) üzerindeki antiproliferatif etkisi incelenmiş, TAS ve TOS değerlerinin kanser hücrelerinde normal hücrelere göre daha yüksek olduğu ve kanser hücrelerinin strese sürüklenerek apoptoza sürüklendiği bulunmuştur[188].

Çalışmamızda TAS etkisi istatistiksel olarak anlamsız olsa da; literatüre benzer şekilde biyotin ile hedeflendirilmiş BNP'lerin A549 hücrelerinde TOS ve OSI etkisi belirgin bir şekilde FUGA ve FUGANP'lerden daha yüksek olarak gözlenmiştir.



Şekil 4. 33 FUGA, FUGANP ve BNP'ler tarafından oksidatif stres parametreleri **(A)** TAS, **(B)** TOS ve **(C)** OSI (n=3, **p<0.003, ***p<0.0005).

Total RNA İzolasyonu, cDNA Sentezi ve Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizi

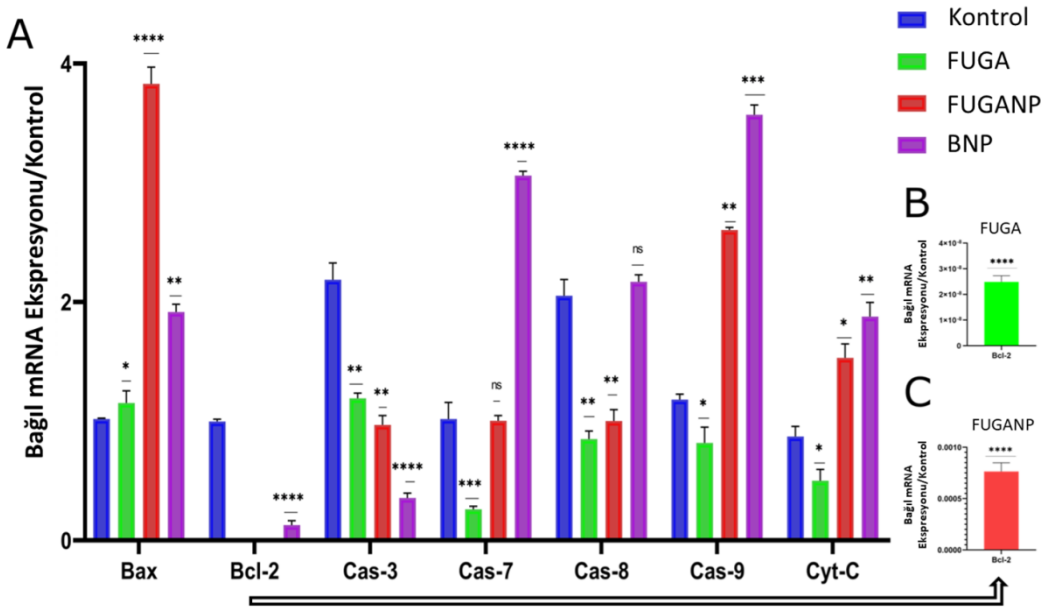
Kanser için bir ayırt edici özellik olarak kabul edilen apoptozdan kaçış, kanser hücrelerinin daha uzun süre hayatta kalmasını sağlayarak invazivliğini artırır, anjiyogenezi uyarır, hücre çoğalmasını düzensizleştirir ve tümör ilerlemesi sırasında farklılaşmayı engelleyebilecek farklı mutasyonların birikmesine neden olur[1]. Hedefli taşıyıcı ilaç sistemlerinin, önemli bir strateji olarak apoptozun indüklenmesinde içsel ve dışsal yolları etkilediği düşünülmektedir. Bu nedenle, FUGA, FUGANP ve BNP'ler aracılı apoptoz, apoptozda rol oynayan anahtar genlerin mRNA seviyelerinin qRT-PCR ile kontrol edilmesiyle belirlendi (Şekil 4.34) ve protein ekspresyonları western blotting ile doğrulandı (Şekil 4.35, Şekil 4.36).

Şekil 4.34A, A549 hücrelerinde 48 saatlik FUGA, FUGANP ve BNP ile tedaviden sonra Bax, Bcl-2, Kaspaz-3, Kaspaz-7, Kaspaz-8, Kaspaz-9 ve sitokrom-c genlerinin göreceli mRNA ekspresyon seviyelerini göstermektedir. Şekil 4.34A'da gösterildiği gibi, BNP tedavisi kaspaz-8 (1,06 kat), kaspaz-9 (3,02 kat) ve sitokrom-c (2,15 kat) seviyelerini kontrol, FUGA ve FUGANP'lere kıyasla arttırmıştır. Benzer şekilde pro-apoptotik Bax geninde kontrol grubuna kıyasla FUGA için 1,13 kat, FUGANP için 3,76 kat ve BNP için 1,88 kat artışla bir yukarı regülasyon gözlenmiştir. Buna karşılık, anti-apoptotik Bcl-2 geni, kontrol grubuna kıyasla A549 hücrelerinde FUGA, FUGANP ve BNP için yüksek derecede aşağı regülasyon göstermiştir. Ek olarak, BNP tedavisi A549 hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla kaspaz-3 (6,13 kat) seviyelerini büyük

ölçüde azaltırken bu seviyeler FUGANP'ler için 2,26 kat azalma ve FUGA tedavisi için 1,83 kat azalma olarak belirlenmiştir. FUGANP tedavisi kaspaz-7'yi önemli ölçüde etkilemezken, BNP tedavisi gen ifadesini kaspaz-7'de 3 kat azaltmıştır. Sonuç olarak A549 hücrelerinde, Bax, sitokrom-c, kaspaz-9 ve kaspaz-8 ifadeleri FUGANP ve BNP'ler için artarken, Bcl-2, kaspaz-3 ve kaspaz-7 seviyeleri FUGANP ve BNP tedavisi sonucunda azalmıştır. Bu durum, nanopartikül tedavisinin apoptozisin içsel yolunu aktive ettiğini ve BNP tedavisinin hedeflenmeyen FUGANP'lerden daha fazla apoptozu etkilediğini göstermektedir.

In vitro ve *In vivo* çalışmalar, 5-FU molekülünün apoptozu indüklediğini, tümör oluşumunu baskıladığını ve tek başına veya farklı maddelerle antikanser ajan olarak kombine tedavi şeklinde uygulandığında özellikle akciğer kanseri olmak üzere çeşitli kanser hücrelerinde ve dokularında tümör boyutunu küçülttüğünü göstermiştir[189-192]. Benzer şekilde, 5-FU ve/veya kombinasyonlarını içeren polimerik nanopartiküler sistemlerin kanser hücrelerinde serbest maddelere kıyasla antitümör aktivitesini ve apoptozu önemli ölçüde artırdığı önceki çalışmalardan bilinmektedir[4, 193-197]. Gentisik asitten türetilen lipofilik katyonların 5-Fluorourasil ile metastatik kolorektal kanser hücreleri üzerindeki sinerjik etkisini inceleyen bir çalışmada, kanser hücrelerinde apoptozisin arttığı ve kolorektal kanserin yaygın biyobelirteçleri olan VEGF ve MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonunun azaldığı ve anti-göç etkisine sahip olduğu belirlenmiştir[198]. Ancak literatürde Gentisik asidin bir nanotaşıyıcı sistem olarak PLGA içinde 5-Fluorourasil ile kapsüllendiği bir çalışma henüz bulunmamaktadır. Bulgularımız, FUGANP ve BNP'ler ile tedavi edilen A549 küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerinde içsel apoptozis yollarının ekspresyonunun arttığını göstermiştirr. Bu yukarı düzenleme 5-Fluorourasil tetiklemeli apoptoza atfedilebilir. Serbest 5-FU ve GA kombinasyonu (FUGA), FUGANP ve BNP'ler ile tedavi sonrası A549 küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerinde muhtemelen farklı yolların hedeflenmesiyle apoptoz içsel yolaklarda artmıştır. Sonuçlarımız, sadece FUGANP eşliğinde apoptotik hücre ölümünü doğrulamakla kalmayıp aynı zamanda BNP'ler tarafından apoptozis indüksiyonunun arttığını da göstermiştir. 5-FU ve GA'nın PLGA nanopartiküllerine kapsüllenmesi ve Biyotin ile modifiye edilmesi, aktif ajanların çözünürlüğünün artmasına ve yüksek

içselleştirilmesine, dolayısıyla kanser hücrelerinde apoptozis indüksiyonunun artmasına neden olmaktadır.



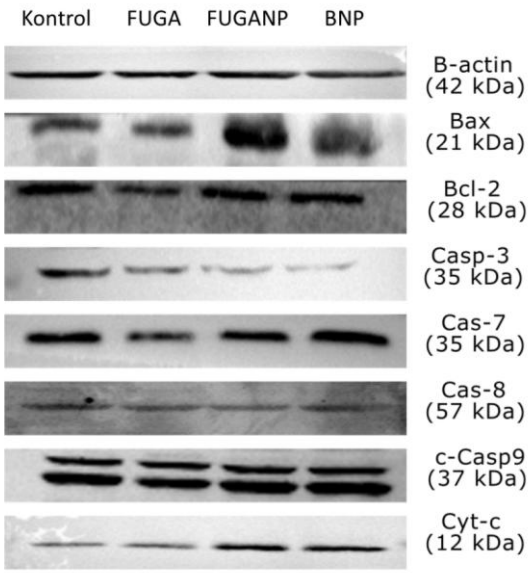
Şekil 4. 34 (A)FUGA, FUGANP ve BNP uygulanan A549 hücrelerinde apoptotik genlerin mRNA düzeylerinin kantitatif gerçek zamanlı PCR analizi **(B)** FUGA için genişletilmiş ölçekte Bcl-2 gen ifadesi **(C)** FUGANP için genişletilmiş ölçekte Bcl-2 gen ifadesi (n=3, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p<0.0005, ****p <0.0001).

SDS-PAGE ve Western Blot Analizi

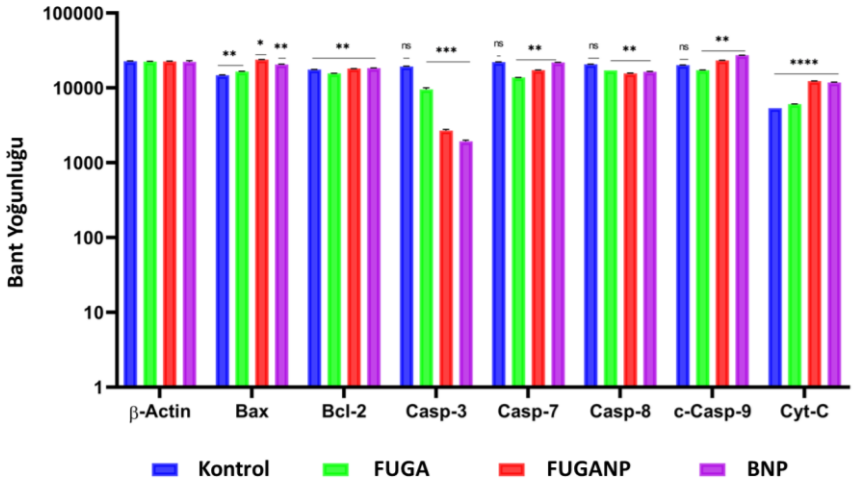
Literatürde, 5-FU ve benzeri kanser ilaçlarıyla ikili ilaç kombinasyonu olarak PLGA'da kapsüllenmiş flavonoid ve/veya fenolik asit türevlerinin akciğer kanseri ve diğer kanser türleri üzerinde antikanser ve antitümör etkileri olduğu önceki çalışmalarda belirtilmiştir[199-202]. Benzer şekilde, önceki çalışmalar, yüzey modifiye edilmiş nanopartiküler sistemlerin hedefli tedavilerde serbest maddelerden ve hedeflenmemiş partikül sistemlerinden daha etkili olduğunu göstermiştir[203-205]. Biyotin, hücresel fonksiyon için gerekli bir vitamindir ve reseptörleri bazı malignitelerde aşırı ifade edilir[206]. Biyotin kaplı nanosistemlerde kapsüllenmiş ilacın hedeflenen bölgede daha aktif etki ettiği ve bunun antitümör aktivitesine yol açtığı bilinmektedir[207-210].

A549 küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerinin hücre yüzeylerinde aşırı ifade edilmiş biyotin reseptörleri olduğu bilinmektedir ve protein aktivasyonunda ve intrinsik apoptozda önemli bir olay sitokrom-c'nin sitozole salınmasıdır. Bu

bilgiler doğrultusunda apoptotik hücre ölümünü belirlemede, FUGA, FUGANP ve BNP'lerin protein düzeyindeki ifadesi, Western blotting ile Bax, Bcl-2, kaspaz-3, kaspaz-7, kaspaz-8, kaspaz-9 ve sitokrom-c ile birlikte belirlenmiş; beta-aktin geni ise kontrol geni olarak kullanılmıştır (Şekil 4.35). İmmunoblotların kantitatif dansitometrik analizi (Şekil 4.36), FUGANP ve BNP'lerle tedavi edilen hücrelerde, tedavi edilmeyen kontrol grubu ve FUGA ile tedavi edilen gruplara kıyasla Bax, parçalanmış kaspaz-9 ve sitokrom-c proteinlerinin belirgin bir şekilde yukarı regülasyon gösterdiğini ortaya koymuştur. Özellikle, FUGANP ve BNP'lerle tedavi edilen gruplarda parçalanmış kaspaz-3 ve kaspaz-9 formlarının varlığı, intrinsik apoptotik yolun aktivasyonunu doğrulamıştır. Protein düzeyindeki bu sonuçlar gen düzeyinde apoptozun incelendiği qPCR bulgularıyla tutarlı olup, özellikle hedefli BNP formülasyonu ile mitokondri aracılı apoptozisin indüklendiğini desteklemektedir.



Şekil 4. 35 FUGA, FUGANP ve BNP uygulanan A549 hücrelerinde protein ifade düzeylerinin western blotting ile analizi.



Şekil 4. 36 İmmunoblot bantlarının kantitatif densitometrik analizi (n=3, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p<0.0005, ****p <0.0001).

.

5
SONUÇ

Tek bir ilaç dağıtım sistemi kullanılarak çok sayıda ilacın kombinasyonel olarak uygulanması, kanser de dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarda ilaçların terapötik etkinliğini artırmak için kullanılabilir.

Bu tez çalışmasında, 5-Fluorourasil ve gentisik asit bir PLGA nanopartikül sistemine dual olarak enkapsüle edilerek (FUGANP) yüzeyi biyotin molekülü ile kaplanmış (BNP) ve böylece biyouyumluluğunun artırılması ve daha düşük dozlarda daha etkili formülasyonların geliştirilmesi amaçlanmıştır. Nanopartiküler sistemlerin hazırlanması ikili emülsiyon (w/o/w) çözücü uçurma yöntemi ile gerçekleştirilmiş olup biyotin ile yüzey modifikasyonunda karbıdiimid yöntemi kullanılmıştır. FUGANP ve BNP'lerin fizikokimyasal karakterizasyonunda reaksiyon verimi (RY), enkapsülasyon etkinliği (EE), etken yüklenme verimi (DL), boyut (Z-Ave), çoklu dağılım indeksi (PDI), zeta potansiyel (mV), FT-IR, XRD, SEM ve TEM analizleri yapılmış, *In vitro* ilaç salım profilleri incelenmiştir.

Daha sonra yüzey reseptörlerinde biyotin aşırı ekpresyonu bilinen A549 küçük hücreli olmayan akciğer kanser hücrelerinde iyileştirilmiş anti-kanser aktivite amacıyla *In vitro* biyolojik aktivite çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Nanopartiküler sistemlerin (FUGANP ve BNP), tedavi edilmemiş kontrol hücreleri ve serbest FUGA kombinasyonlarıyla karşılaştırıldığında A549 hücre canlılığını, çoğalmasını, göçünü ve koloni oluşumunu güçlü bir şekilde engellediği; dahası, apoptotik ve otofajik hücreler, toplam oksidan durumu ve oksidatif stres indeksi artarken mitokondriyal membran potansiyellerini azalttığı gözlenmiştir.

Tüm sonuçlar göz önüne alındığında 5-Fluorourasil ve gentisik asit enkapsüle edilmiş ve yüzeyi biyotin ile modifiye edilmiş olan BNP'lerin, biyotin içermeyen FUGANP'lerden ve serbest ilaç kombinasyonu FUGA'dan daha etkili olduğu

gözlenmiştir. Ek olarak, qRT-PCR ile apoptotik genlerin mRNA seviyelerinde yukarı regülasyon gözlenirken bu sonuçlara paralel olarak immünoblot analizlerde, apoptozun BNP'lerle tedavi edilen A549 hücrelerinde artan bax, kaspaz-8, bölünmüş-kaspaz-9 ve sitokrom-c ifadeleriyle aktive edildiğini doğrulamıştır.

Tüm bu sonuçlar birlikte ele alındığında, biyotin ile hedeflendirilmiş BNP'lerin A549 hücrelerine karşı gelişmiş anti-tümör ve anti-apoptotik aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar, akciğer kanseri ve diğer kanser türlerinin tedavisinde etkili ajanlar ve hedefe yönelik tedavilere dayanan ikili ilaç taşıma sistemleri için yeni terapötik stratejilere ışık tutabilecek değerli bilgiler sunmaktadır.

KAYNAKÇA

[1] I. Meteoglu, A. Erdemir, Genistein and temozolomide-loaded polymeric nanoparticles: a synergistic approach for improved anti-tumor efficacy against glioblastoma, Process Biochemistry 110 (2021) 9-18.

[2] Y. Shen, J. TanTai, Co-delivery anticancer drug nanoparticles for synergistic therapy against lung cancer cells, Drug Design, Development and Therapy (2020) 4503-4510.

[3] Q. Guo, L. Liu, Z. Chen, Y. Fan, Y. Zhou, Z. Yuan, W. Zhang, Current treatments for non-small cell lung cancer, Frontiers in oncology 12 (2022) 945102.

[4] C. Sethy, C.N. Kundu, 5-Fluorouracil (5-FU) resistance and the new strategy to enhance the sensitivity against cancer: Implication of DNA repair inhibition, Biomedicine & Pharmacotherapy 137 (2021) 111285.

[5] J. Gu, Z. Li, J. Zhou, Z. Sun, C. Bai, Response prediction to oxaliplatin plus 5-fluorouracil chemotherapy in patients with colorectal cancer using a four-protein immunohistochemical model, Oncology Letters 18(2) (2019) 2091-2101.

[6] S.J. Kwon, Management of side effects of 5-FU based chemotherapy, Korean Journal of Clinical Oncology 1(1) (2005) 51-58.

[7] H. Kikuchi, B. Yuan, X. Hu, M. Okazaki, Chemopreventive and anticancer activity of flavonoids and its possibility for clinical use by combining with conventional chemotherapeutic agents, American journal of cancer research 9(8) (2019) 1517.

[8] F. Abedi, B.M. Razavi, H. Hosseinzadeh, A review on gentisic acid as a plant derived phenolic acid and metabolite of aspirin: Comprehensive pharmacology, toxicology, and some pharmaceutical aspects, Phytotherapy Research 34(4) (2020) 729-741.

[9] X. Dong, Q. Zhang, F. Zeng, M. Cai, D. Ding, The protective effect of gentisic acid on rheumatoid arthritis via the RAF/ERK signaling pathway, Journal of Orthopaedic Surgery and Research 17(1) (2022) 109.

[10] H. Mechchate, I. Es-Safi, O. Mohamed Al Kamaly, D. Bousta, Insight into gentisic acid antidiabetic potential using in vitro and in silico approaches, Molecules 26(7) (2021) 1932.

[11] H.I. Chiu, N.A. Samad, L. Fang, V. Lim, Cytotoxicity of targeted PLGA nanoparticles: A systematic review, RSC advances 11(16) (2021) 9433-9449.

[12] M. Darguzyte, N. Drude, T. Lammers, F. Kiessling, Riboflavin-targeted drug delivery, Cancers 12(2) (2020) 295.

[13] Y. Li, B. Yan, S. He, Advances and challenges in the treatment of lung cancer, Biomedicine & Pharmacotherapy 169 (2023) 115891.

[14] A. Sharma, D. Shambhwani, S. Pandey, J. Singh, H. Lalhlenmawia, M. Kumarasamy, S.K. Singh, D.K. Chellappan, G. Gupta, P. Prasher, Advances in lung cancer treatment using nanomedicines, ACS omega 8(1) (2022) 10-41.

[15] Y. Zhao, K. Liu, J. Li, J. Liao, L. Ma, Engineering of hybrid anticancer drug-loaded polymeric nanoparticles delivery system for the treatment and care of lung cancer therapy, Drug Delivery 28(1) (2021) 1539-1547.

[16] J. Zempleni, S.S. Wijeratne, T. Kuroishi, Biotin, Present knowledge in nutrition (2012) 359-374.

[17] K.T. Fam, M. Collot, A.S. Klymchenko, Probing biotin receptors in cancer cells with rationally designed fluorogenic squaraine dimers, Chemical Science 11(31) (2020) 8240-8248.

[18] W.S. Shin, J. Han, R. Kumar, G.G. Lee, J.L. Sessler, J.-H. Kim, J.S. Kim, Programmed activation of cancer cell apoptosis: A tumor-targeted phototherapeutic topoisomerase I inhibitor, Scientific reports 6(1) (2016) 29018.

[19] R.D. Colpan, A. Erdemir, Co-delivery of quercetin and caffeic-acid phenethyl ester by polymeric nanoparticles for improved antitumor efficacy in colon cancer cells, Journal of Microencapsulation 38(6) (2021) 381-393.

[20] A. Di Lonardo, S. Nasi, S. Pulciani, Cancer: we should not forget the past, Journal of cancer 6(1) (2015) 29.

[21] R.A. Weinberg, The molecular basis of oncogenes and tumor suppressor genes, Annals of the New York Academy of Sciences 758(1) (1995) 331-338.

[22] L. Gerschenson, R. Rotello, Apoptosis: a different type of cell death, The FASEB Journal 6(7) (1992) 2450-2455.

[23] D. Hanahan, Hallmarks of cancer: new dimensions, Cancer discovery 12(1) (2022) 31-46.

[24] A.G. Knudson, Hereditary cancer: two hits revisited, Journal of cancer research and clinical oncology 122(3) (1996) 135-140.

[25] K. Grønbaek, C. Hother, P.A. Jones, Epigenetic changes in cancer, Apmis 115(10) (2007) 1039-1059.

[26] Y.J. Park, R. Claus, D. Weichenhan, C. Plass, Genome-wide epigenetic modifications in cancer, Epigenetics and Disease: Pharmaceutical Opportunities (2010) 25-49.

[27] Y. Sun, O.B. Keat, S. Rajabi, The role of physical activity and epigenetic changes in colorectal cancer prevention, Cancer Cell International 25(1) (2025) 227.

[28] G. Kwao-Zigah, A. Bediako-Bowan, P.A. Boateng, G.K. Aryee, S.M. Abbang, G. Atampugbire, O. Quaye, E.A. Tagoe, Microbiome dysbiosis, dietary intake and lifestyle-associated factors involve in epigenetic modulations in

colorectal cancer: a narrative review, Cancer Control 31 (2024) 10732748241263650.

[29] P. Marino, M. Mininni, G. Deiana, G. Marino, R. Divella, I. Bochicchio, A. Giuliano, S. Lapadula, A.R. Lettini, F. Sanseverino, Healthy lifestyle and cancer risk: modifiable risk factors to prevent cancer, Nutrients 16(6) (2024) 800.

[30] D. Hanahan, R.A. Weinberg, The hallmarks of cancer, cell 100(1) (2000) 57-70.

[31] D. Hanahan, R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation, cell 144(5) (2011) 646-674.

[32] Dünya Sağlık Örgütü (WHO), Kanser. https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1. (Accessed 06.08 2025).

[33] Dünya Sağlık Örgütü, Akciğer Kanseri. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/lung-cancer. (Accessed 06.08 2025).

[34] A.K. Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC), 06.08, 2025. https://www.iarc.who.int/cancer-type/lung-cancer/.

[35] L.E. Hendriks, J. Remon, C. Faivre-Finn, M.C. Garassino, J.V. Heymach, K.M. Kerr, D.S. Tan, G. Veronesi, M. Reck, Non-small-cell lung cancer, Nature Reviews Disease Primers 10(1) (2024) 71.

[36] D. Singh, A. Taneja, Assessment of risk factors of lung cancer in non-smokers in india, 2022 7th International Conference on Intelligent Informatics and Biomedical Science (ICIIBMS), IEEE, 2022, pp. 7-12.

[37] H. Kitamura, T. Yazawa, K. Okudela, H. Shimoyamada, H. Sato, Molecular and genetic pathogenesis of lung cancer: differences between small-cell and non-small-cell carcinomas, Open Pathol J 2 (2008) 106-114.

[38] B.W. Robinson, A.W. Musk, R.A. Lake, Malignant mesothelioma, The Lancet 366(9483) (2005) 397-408.

[39] J. Kabbara, T. Mobayed, M. Moussally, M. Moussally, Beyond the Chest Wall: A Case of Fungating Lung Tumor and Review of Literature, Cureus 17(7) (2025).

[40] J. George, J.S. Lim, S.J. Jang, Y. Cun, L. Ozretić, G. Kong, F. Leenders, X. Lu, L. Fernández-Cuesta, G. Bosco, Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer, Nature 524(7563) (2015) 47-53.

[41] Z. Xi, R. Dai, Y. Ze, X. Jiang, M. Liu, H. Xu, Traditional Chinese medicine in lung cancer treatment, Molecular Cancer 24(1) (2025) 57.

[42] R.S. Herbst, D. Morgensztern, C. Boshoff, The biology and management of non-small cell lung cancer, Nature 553(7689) (2018) 446-454.

[43] M.S.-K.C.C.S.N.D.L.Y.S.N.B.L.L.A.E.V.A.S.C.L.M. 18 19, U.o.S.C.J.H.C.L.D.L.W.D.J.M.D.T.P.F.V.D.B.D.J. Triche, U.o.T.M.A.C.C.A.R.Z.N.B.B.M.C.T.U.A.W.C.C.C.R. Baggerly Keith A. 34 Weinstein John N. 34 36, Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers, Nature 489(7417) (2012) 519-525.

[44] B.R. Sabbula, D.P. Gasalberti, S.K.R. Mukkamalla, F. Anjum, Squamous cell lung cancer, StatPearls [Internet], StatPearls Publishing2024.

[45] R.J. Battafarano, F.G. Fernandez, J. Ritter, B.F. Meyers, T.J. Guthrie, J.D. Cooper, G.A. Patterson, Large cell neuroendocrine carcinoma: an aggressive form of non-small cell lung cancer, The Journal of thoracic and cardiovascular surgery 130(1) (2005) 166-172.

[46] A. Zafar, S. Khatoon, M.J. Khan, J. Abu, A. Naeem, Advancements and limitations in traditional anti-cancer therapies: a comprehensive review of surgery, chemotherapy, radiation therapy, and hormonal therapy, Discover oncology 16(1) (2025) 607.

[47] A.A. Jacome, B. Johnson, Minimal residual disease in colorectal cancer: are we finding the needle in a haystack?, Cells 12(7) (2023) 1068.

[48] A.I. Riggio, K.E. Varley, A.L. Welm, The lingering mysteries of metastatic recurrence in breast cancer, British journal of cancer 124(1) (2021) 13-26.

[49] H. Do Huh, S. Kim, History of radiation therapy technology, Progress in Medical Physics 31(3) (2020) 124-134.

[50] R.B. Richardson, M.-E. Harper, Mitochondrial stress controls the radiosensitivity of the oxygen effect: Implications for radiotherapy, Oncotarget 7(16) (2016) 21469.

[51] J.G. Kiang, B.R. Garrison, N.V. Gorbunov, Radiation combined injury: DNA damage, apoptosis, and autophagy, Adaptive Medicine 2(1) (2010) 1.

[52] S.L. Mulder, J. Heukelom, B.A. McDonald, L. Van Dijk, K.A. Wahid, K. Sanders, T.C. Salzillo, M. Hemmati, A. Schaefer, C.D. Fuller, MR-guided adaptive radiotherapy for OAR sparing in head and neck cancers, Cancers 14(8) (2022) 1909.

[53] C. Chargari, E. Deutsch, P. Blanchard, S. Gouy, H. Martelli, F. Guérin, I. Dumas, A. Bossi, P. Morice, A.N. Viswanathan, Brachytherapy: An overview for clinicians, CA: a cancer journal for clinicians 69(5) (2019) 386-401.

[54] T. Jaber, S.G. Waguespack, M.E. Cabanillas, M. Elbanan, T. Vu, R. Dadu, S.I. Sherman, M. Amit, E.B. Santos, M. Zafereo, Targeted therapy in advanced thyroid cancer to resensitize tumors to radioactive iodine, The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 103(10) (2018) 3698-3705.

[55] Amerikan Kanser Derneği (ACS), Kemoterapinin Yan Etkileri. https://www.cancer.org/cancer/managing-cancer/treatment-types/chemotherapy/chemotherapy-side-effects.html. (Accessed 06.08 2025).

[56] H. Starobova, I. Vetter, Pathophysiology of chemotherapy-induced peripheral neuropathy, Frontiers in molecular neuroscience 10 (2017) 174.

[57] A. Pearce, M. Haas, R. Viney, S.-A. Pearson, P. Haywood, C. Brown, R. Ward, Incidence and severity of self-reported chemotherapy side effects in routine care: A prospective cohort study, PloS one 12(10) (2017) e0184360.

[58] C. Scully, S. Sonis, P. Diz, Oral mucositis, Oral diseases 12(3) (2006) 229-241.

[59] W.M. van den Boogaard, D.S. Komninos, W.P. Vermeij, Chemotherapy side-effects: not all DNA damage is equal, Cancers 14(3) (2022) 627.

[60] T.A. Ahles, J.C. Root, E.L. Ryan, Cancer-and cancer treatment–associated cognitive change: an update on the state of the science, Journal of Clinical Oncology 30(30) (2012) 3675-3686.

[61] T. Vega-Stromberg, Chemotherapy-induced secondary malignancies, Journal of Infusion Nursing 26(6) (2003) 353-361.

[62] M. Pandey, G.P. Sarita, N. Devi, B.C. Thomas, B.M. Hussain, R. Krishnan, Distress, anxiety, and depression in cancer patients undergoing chemotherapy, World Journal of Surgical Oncology 4(1) (2006) 68.

[63] R. Kaur, A. Bhardwaj, S. Gupta, Cancer treatment therapies: traditional to modern approaches to combat cancers, Molecular biology reports 50(11) (2023) 9663-9676.

[64] D.J. Giard, S.A. Aaronson, G.J. Todaro, P. Arnstein, J.H. Kersey, H. Dosik, W.P. Parks, In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors, Journal of the National Cancer Institute 51(5) (1973) 1417-1423.

[65] L.G. Dobbs, R. Gonzalez, M.C. Williams, An improved method for isolating type II cells in high yield and purity, American Review of Respiratory Disease 134(1) (1986) 141-145.

[66] A.F. Gazdar, F.R. Hirsch, J.D. Minna, From mice to men and back: an assessment of preclinical model systems for the study of lung cancers, Journal of Thoracic Oncology 11(3) (2016) 287-299.

[67] A. Kroll, M.H. Pillukat, D. Hahn, J. Schnekenburger, Interference of engineered nanoparticles with in vitro toxicity assays, Archives of toxicology 86(7) (2012) 1123-1136.

[68] X. Xiao, F. Teng, C. Shi, J. Chen, S. Wu, B. Wang, X. Meng, A. Essiet Imeh, W. Li, Polymeric nanoparticles—Promising carriers for cancer therapy, Frontiers in Bioengineering and Biotechnology 10 (2022) 1024143.

[69] S. Surya Teja, N. Damodharan, T. Tamilanban, V. Subramaniyan, V. Chitra, S.V. Chinni, L.S. Wong, N.K. Fuloria, M. Sekar, S. Fuloria, Impact of nanocarrier aggregation on EPR-mediated tumor targeting, Frontiers in Bioengineering and Biotechnology 11 (2023) 1222693.

[70] J.S. Ferreira, J.P. Vareda, A. Oliveira, J.S. Barbosa, F. Bastos, P.V. Mendonça, A. Fonseca, Polymeric nanocarriers for cancer treatment: the promise of sensitive poly (2-(diisopropylamino) ethyl methacrylate), Journal of Materials Chemistry B (2025).

[71] K. Bal, S. Küçükertuğrul Çelik, S. Şentürk, Ö. Kaplan, E.B. Eker, M.K. Gök, Recent progress in chitosan-based nanoparticles for drug delivery: a review on modifications and therapeutic potential, Journal of Drug Targeting (2025) 1-28.

[72] P. Kumari, B. Ghosh, S. Biswas, Nanocarriers for cancer-targeted drug delivery, Journal of drug targeting 24(3) (2016) 179-191.

[73] N. Sharma, R.M. Kumari, N. Gupta, A. Syed, A.H. Bahkali, S. Nimesh, Poly-(lactic-co-glycolic) acid nanoparticles for synergistic delivery of epirubicin and paclitaxel to human lung cancer cells, Molecules 25(18) (2020) 4243.

[74] C. Toruntay, F.S. Poyraz, S. Susgun, E. Yucesan, B. Mansuroglu, Anticancer Effects of MAPK6 siRNA-Loaded PLGA Nanoparticles in the Treatment of Breast Cancer, Journal of Cellular and Molecular Medicine 29(2) (2025) e70309.

[75] N. Zhang, W. Liu, Z. Dong, Y. Yin, J. Luo, T. Lu, W. Tang, Y. Wang, Y. Han, An integrated tumor microenvironment responsive polymeric micelle for smart drug delivery and effective drug release, Bioconjugate Chemistry 32(9) (2021) 2083-2094.

[76] T. Kanp, A. Dhuri, B. M, K. Rode, M. Aalhate, P. Paul, R. Nair, P.K. Singh, Exploring the Potential of Nanocarriers for Cancer Immunotherapy: Insights into Mechanism, Nanocarriers, and Regulatory Perspectives, ACS Applied Bio Materials 8(1) (2025) 108-138.

[77] A. Imantay, N. Mashurov, B.A. Zhaisanbayeva, E.A. Mun, Doxorubicin-conjugated nanoparticles for potential use as drug delivery systems, Nanomaterials 15(2) (2025) 133.

[78] B. Nagavarma, H.K. Yadav, A. Ayaz, L. Vasudha, H. Shivakumar, Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles-a review, Asian J. Pharm. Clin. Res 5(3) (2012) 16-23.

[79] J.P. Rao, K.E. Geckeler, Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters, Progress in polymer science 36(7) (2011) 887-913.

[80] M.A. Beach, U. Nayanathara, Y. Gao, C. Zhang, Y. Xiong, Y. Wang, G.K. Such, Polymeric nanoparticles for drug delivery, Chemical Reviews 124(9) (2024) 5505-5616.

[81] E. Miele, G.P. Spinelli, E. Miele, F. Tomao, S. Tomao, Albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane® ABI-007) in the treatment of breast cancer, International journal of nanomedicine (2009) 99-105.

[82] D. Sun, W. Gao, H. Hu, S. Zhou, Why 90% of clinical drug development fails and how to improve it?, Acta Pharmaceutica Sinica B 12(7) (2022) 3049-3062.

[83] H.E. Gültekin, Z. Değim, Biodegradable polymeric nanoparticles are effective systems for controlled drug delivery, Fabad J Pharm Sci 38(2) (2013) 107-118.

[84] B. Begines, T. Ortiz, M. Pérez-Aranda, G. Martínez, M. Merinero, F. Argüelles-Arias, A. Alcudia, Polymeric nanoparticles for drug delivery: Recent developments and future prospects, Nanomaterials 10(7) (2020) 1403.

[85] M. Elmowafy, K. Shalaby, M.H. Elkomy, O.A. Alsaidan, H.A. Gomaa, M.A. Abdelgawad, E.M. Mostafa, Polymeric nanoparticles for delivery of natural bioactive agents: recent advances and challenges, Polymers 15(5) (2023) 1123.

[86] S. Rezvantalab, N.I. Drude, M.K. Moraveji, N. Güvener, E.K. Koons, Y. Shi, T. Lammers, F. Kiessling, PLGA-based nanoparticles in cancer treatment, Frontiers in pharmacology 9 (2018) 1260.

[87] D.N. Kapoor, A. Bhatia, R. Kaur, R. Sharma, G. Kaur, S. Dhawan, PLGA: a unique polymer for drug delivery, Therapeutic delivery 6(1) (2015) 41-58.

[88] M. Biondi, F. Ungaro, F. Quaglia, P.A. Netti, Controlled drug delivery in tissue engineering, Advanced drug delivery reviews 60(2) (2008) 229-242.

[89] H.K. Makadia, S.J. Siegel, Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier, Polymers 3(3) (2011) 1377-1397.

[90] A. Butreddy, R.P. Gaddam, N. Kommineni, N. Dudhipala, C. Voshavar, PLGA/PLA-based long-acting injectable depot microspheres in clinical use: production and characterization overview for protein/peptide delivery, International journal of molecular sciences 22(16) (2021) 8884.

[91] J. Yang, H. Zeng, Y. Luo, Y. Chen, M. Wang, C. Wu, P. Hu, Recent applications of PLGA in drug delivery systems, Polymers 16(18) (2024) 2606.

[92] A. Malek-Khatabi, M.S. Razavi, A. Abdollahi, M. Rahimzadeghan, F. Moammeri, M. Sheikhi, M. Tavakoli, M. Rad-Malekshahi, Z.F. Rad, Recent progress in PLGA-based microneedle-mediated transdermal drug and vaccine delivery, Biomaterials Science 11(16) (2023) 5390-5409.

[93] F. Gao, X. Feng, X. Li, Recent advances in polymeric nanoparticles for the treatment of hepatic diseases, Frontiers in Pharmacology 16 (2025) 1528752.

[94] F. Luo, Y. Yu, M. Li, Y. Chen, P. Zhang, C. Xiao, G. Lv, Polymeric nanomedicines for the treatment of hepatic diseases, Journal of Nanobiotechnology 20(1) (2022) 488.

[95] Y. Zhou, J. Hu, B. Li, J. Xia, T. Zhang, Z. Xiong, Towards the clinical translation of 3D PLGA/β-TCP/Mg composite scaffold for cranial bone regeneration, Materials 17(2) (2024) 352.

[96] A.P. RG, G. Bajaj, A.E. John, S. Chandran, V.V. Kumar, S. Ramakrishna, A review on the recent applications of synthetic biopolymers in 3D printing for biomedical applications, Journal of Materials Science: Materials in Medicine 34(12) (2023) 1-22.

[97] A. Guevara, K. Armknecht, C. Kudary, P. Nallathamby, PLGA Nanoparticles Formulations Loaded With Antibiotics Induce Sustained and Controlled Antibiotics Release for Prolonged Antibacterial Action Against MRSA, and Pseudomonas aeruginosa FRD1, Military Medicine 189(Supplement_3) (2024) 230-238.

[98] H.-Y. Kim, K. Han, L. Zhang, L. Yuting, B. Srinivas, M.-H. Wang, A. Sathiyaseelan, Biotinylated PLGA-PEG nanoparticles for the delivery of antibiotic Polymyxin B sulfate to inhibit Helicobacter pylori, Journal of Molecular Liquids (2025) 128171.

[99] H.M. Said, Cellular uptake of biotin: mechanisms and regulation, The Journal of nutrition 129(2) (1999) 490S-493S.

[100] R. Tripathi, A. Guglani, R. Ghorpade, B. Wang, Biotin conjugates in targeted drug delivery: is it mediated by a biotin transporter, a yet to be identified receptor, or (an) other unknown mechanism (s)?, Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry 38(1) (2023) 2276663.

[101] M. Jurczyk, K. Jelonek, M. Musiał-Kulik, A. Beberok, D. Wrześniok, J. Kasperczyk, Single-versus dual-targeted nanoparticles with folic acid and biotin for anticancer drug delivery, Pharmaceutics 13(3) (2021) 326.

[102] X. Song, R. Wang, J. Gao, X. Han, J. Jin, C. Lv, F. Yu, Construction of a biotin-targeting drug delivery system and its near-infrared theranostic fluorescent

probe for real-time image-guided therapy of lung cancer, Chinese Chemical Letters 33(3) (2022) 1567-1571.

[103] P.S. Giram, R. Nimma, A. Bulbule, A.S. Yadav, M. Gorain, N.N. Venkata Radharani, G.C. Kundu, B. Garnaik, Poly (d, l-lactide-co-glycolide) Surface-Anchored Biotin-Loaded Irinotecan Nanoparticles for Active Targeting of Colon Cancer, ACS omega 9(3) (2024) 3807-3826.

[104] M.H. Ghahremani, M. Amini, M. Gharghabi, S.N. Ostad, F. Atyabi, A. Baharian, R. Dinarvand, Biotin decorated PLGA nanoparticles containing SN-38 designed for cancer therapy.

[105] Z. He, K. Bao, J. Jian, Y. Zhao, Z. Jian, C. Hu, X. Gao, Biotin-targeted multifunctional nanoparticles encapsulating 10-hydroxycamptothecin and apoptin plasmid for synergistic hepatocellular carcinoma treatment, ACS Applied Polymer Materials 4(1) (2021) 497-508.

[106] C. Heidelberger, N. Chaudhuri, P. Danneberg, D. Mooren, L. Griesbach, R. Duschinsky, R. Schnitzer, E. Pleven, J. Scheiner, Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds, Nature 179(4561) (1957) 663-666.

[107] K. Miura, M. Kinouchi, K. Ishida, W. Fujibuchi, T. Naitoh, H. Ogawa, T. Ando, N. Yazaki, K. Watanabe, S. Haneda, 5-fu metabolism in cancer and orally-administrable 5-fu drugs, Cancers 2(3) (2010) 1717-1730.

[108] J.E. Olguin, M.G. Mendoza-Rodriguez, C.A. Sanchez-Barrera, L.I. Terrazas, Is the combination of immunotherapy with conventional chemotherapy the key to increase the efficacy of colorectal cancer treatment?, World Journal of Gastrointestinal Oncology 15(2) (2023) 251.

[109] M. Hursthouse, A controlled trial on the use of topical 5-fluorouracil on viral warts, British Journal of Dermatology 92(1) (1975) 93-96.

[110] D.B. Longley, D.P. Harkin, P.G. Johnston, 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies, Nature reviews cancer 3(5) (2003) 330-338.

[111] S. Vodenkova, T. Buchler, K. Cervena, V. Veskrnova, P. Vodicka, V. Vymetalkova, 5-fluorouracil and other fluoropyrimidines in colorectal cancer: Past, present and future, Pharmacology & therapeutics 206 (2020) 107447.

[112] A. Mardani-Ghahfarokhi, R. Farhoosh, Antioxidant activity and mechanism of inhibitory action of gentisic and α-resorcylic acids, Scientific Reports 10(1) (2020) 19487.

[113] L.B. Cunha, E.D. Lepore, C.C.B. Medeiros, R. Sorrechia, R.C. Pietro, M.A. Corrêa, Can Gentisic Acid Serve as a High-Performance Antioxidant with Lower Toxicity for a Promising New Topical Application?, Life 14(8) (2024) 1022.

[114] K.R. Paudel, R. Wadhwa, X.N. Tew, N.J.X. Lau, T. Madheswaran, J. Panneerselvam, F. Zeeshan, P. Kumar, G. Gupta, K. Anand, Rutin loaded liquid crystalline nanoparticles inhibit non-small cell lung cancer proliferation and migration in vitro, Life sciences 276 (2021) 119436.

[115] P. Upadhyay, M. Bhattacharjee, S. Bhattacharya, M. Ahir, A. Adhikary, P. Patra, Silymarin-loaded, lactobionic acid-conjugated porous PLGA nanoparticles induce apoptosis in liver cancer cells, ACS Applied Bio Materials 3(10) (2020) 7178-7192.

[116] F.S.a. Poyraz, G.l.a. Akbaş, D. Duranoğlu, S. Acar, B. Mansuroğlu, M. Ersöz, Sinapic-Acid-Loaded Nanoparticles Optimized via Experimental Design Methods: Cytotoxic, Antiapoptotoic, Antiproliferative, and Antioxidant Activity, ACS omega 9(39) (2024) 40329-40345.

[117] C.E. Astete, C.M. Sabliov, Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles, Journal of biomaterials science, polymer edition 17(3) (2006) 247-289.

[118] Y. Lee, D. Lee, E. Park, S.-y. Jang, S.Y. Cheon, S. Han, H. Koo, Rhamnolipid-coated W/O/W double emulsion nanoparticles for efficient delivery of doxorubicin/erlotinib and combination chemotherapy, Journal of Nanobiotechnology 19 (2021) 1-13.

[119] D. Panigrahi, P.K. Sahu, S. Swain, R.K. Verma, Quality by design prospects of pharmaceuticals application of double emulsion method for PLGA loaded nanoparticles, SN applied sciences 3 (2021) 1-21.

[120] J. Vandervoort, A. Ludwig, Biocompatible stabilizers in the preparation of PLGA nanoparticles: a factorial design study, International journal of pharmaceutics 238(1-2) (2002) 77-92.

[121] D. Zhang, L. Liu, J. Wang, H. Zhang, Z. Zhang, G. Xing, X. Wang, M. Liu, Drug-loaded PEG-PLGA nanoparticles for cancer treatment, Frontiers in Pharmacology 13 (2022) 990505.

[122] F.Ş. Poyraz, E. Abacı, C. Ertürk, T. Acar, S. Derman, S. Erişen, B. Mansuroğlu, 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid loaded polymeric nanoparticle synthesis and its effect on biomass in medicago sativa cell suspension cultures, International Journal of Life Sciences and Biotechnology 4(1) (2021) 46-60.

[123] H. Tiernan, B. Byrne, S.G. Kazarian, ATR-FTIR spectroscopy and spectroscopic imaging for the analysis of biopharmaceuticals, Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 241 (2020) 118636.

[124] Y. Herdiana, N. Wathoni, S. Shamsuddin, M. Muchtaridi, Drug release study of the chitosan-based nanoparticles, Heliyon 8(1) (2022).

[125] T. Yang, J. Zhai, D. Hu, R. Yang, G. Wang, Y. Li, G. Liang, "Targeting design" of nanoparticles in tumor therapy, Pharmaceutics 14(9) (2022) 1919.

[126] A. Dursun, S. Ucak, E. Yilmaz, F. Poyraz, B. Mansuroglu, V. Ozalp, Enhancement of Paclitaxel Therapeutic Effect by Aptamer Targeted Delivery in PLGA Nanoparticles, Eurasian Journal of Medical Investigation 5(4) (2021) 422.

[127] H. Chen, L.Q. Xie, J. Qin, Y. Jia, X. Cai, W. Nan, W. Yang, F. Lv, Q.Q. Zhang, Surface modification of PLGA nanoparticles with biotinylated chitosan for the sustained in vitro release and the enhanced cytotoxicity of epirubicin, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 138 (2016) 1-9.

[128] S. Derman, B. Mansuroglu, Y. Bozkurt, A. Tayfun, F.S. POYRAZ, Drug comprising plga nanoparticles loaded with cape targeted with angiopep-2 peptide, Google Patents, 2023.

[129] M. Mehdizadeh, H. Rouhani, N. Sepehri, R. Varshochian, M.H. Ghahremani, M. Amini, M. Gharghabi, S.N. Ostad, F. Atyabi, A. Baharian, Biotin decorated PLGA nanoparticles containing SN-38 designed for cancer therapy, Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology 45(3) (2017) 495-504.

[130] S.M. Rahimnia, M. Saeedi, J. Akbari, K. Morteza-Semnani, A. Hedayatizadeh-Omran, R. Yazdian-Robati, Development, Optimization, and in vitro Evaluation of Silybin-loaded PLGA Nanoparticles and Decoration with 5TR1 Aptamer for Targeted Delivery to Colorectal Cancer Cells, AAPS PharmSciTech 25(6) (2024) 141.

[131] ATCC, A549 Hücre Hattı. https://www.atcc.org/products/ccl-185. (Accessed 01.08 2025).

[132] ATCC, HDF Hücre Hattı. https://www.atcc.org/products/pcs-201-012. (Accessed 01.08 2025).

[133] J.R. Tennant, Evaluation of the trypan blue technique for determination of cell viability, Transplantation 2(6) (1964) 685-694.

[134] J. Farrant, Mechanism of cell damage during freezing and thawing and its prevention, Nature 205(4978) (1965) 1284-1287.

[135] P. Sabourian, G. Yazdani, S.S. Ashraf, M. Frounchi, S. Mashayekhan, S. Kiani, A. Kakkar, Effect of physico-chemical properties of nanoparticles on their intracellular uptake, International Journal of Molecular Sciences 21(21) (2020) 8019.

[136] P. Kumar, A. Nagarajan, P.D. Uchil, Analysis of cell viability by the MTT assay, Cold spring harbor protocols 2018(6) (2018) pdb. prot095505.

[137] F.S. Poyraz, R.D. Colpan, S. Derman, B. Mansuroglu, A. Erdemir, Investigation of cellular and molecular mechanisms of caffeic acid phenethyl ester loaded nanoparticle systems in breast cancer cell lines, Process Biochemistry 134 (2023) 32-43.

[138] Z. Xiao, A. Osipyan, S. Song, D. Chen, R.A. Schut, R. van Merkerk, P.E. van der Wouden, R.H. Cool, W.J. Quax, B.N. Melgert, Thieno [2, 3-d] pyrimidine-2, 4 (1 H, 3 H)-dione derivative inhibits d-dopachrome tautomerase activity and suppresses the proliferation of non-small cell lung cancer cells, Journal of Medicinal Chemistry 65(3) (2022) 2059-2077.

[139] S. Martinotti, E. Ranzato, Scratch wound healing assay, Epidermal cells: methods and protocols (2020) 225-229.

[140] S. Murugan, R.K. Amaravadi, Methods for studying autophagy within the tumor microenvironment, Tumor Microenvironment: Study Protocols (2016) 145-166.

[141] A. Tektemur, S. Ozaydin, E. Etem Onalan, N. Kaya, T. Kuloglu, İ.H. Ozercan, S. Tekin, H.M. Elyas, TRPM2 mediates distruption of autophagy machinery and correlates with the grade level in prostate cancer, Journal of cancer research and clinical oncology 145 (2019) 1297-1311.

[142] D. Laha, K. Pal, A.R. Chowdhuri, P.K. Parida, S.K. Sahu, K. Jana, P. Karmakar, Fabrication of curcumin-loaded folic acid-tagged metal organic framework for triple negative breast cancer therapy in in vitro and in vivo systems, New Journal of Chemistry 43(1) (2019) 217-229.

[143] C. Liao, D. Xu, X. Liu, Y. Fang, J. Yi, X. Li, B. Guo, Iridium (III) complex-loaded liposomes as a drug delivery system for lung cancer through mitochondrial dysfunction, International journal of nanomedicine (2018) 4417-4431.

[144] B. Chazotte, Labeling nuclear DNA using DAPI, Cold Spring Harbor Protocols 2011(1) (2011) pdb. prot5556.

[145] C. Hacioglu, F. Kar, S. Kacar, V. Sahinturk, G. Kanbak, High concentrations of boric acid trigger concentration-dependent oxidative stress, apoptotic pathways and morphological alterations in DU-145 human prostate cancer cell line, Biological Trace Element Research 193 (2020) 400-409.

[146] B.I. Tarnowski, F.G. Spinale, J.H. Nicholson, DAPI as a useful stain for nuclear quantitation, Biotechnic & histochemistry 66(6) (1991) 296-302.

[147] H.S. Arruda, G.M. Pastore, Araticum (Annona crassiflora Mart.) as a source of nutrients and bioactive compounds for food and non-food purposes: A comprehensive review, Food Research International 123 (2019) 450-480.

[148] A. Aycicek, O. Erel, Total oxidant/antioxidant status in jaundiced newborns before and after phototherapy, Jornal de pediatria 83 (2007) 319-322.

[149] A. Jain, R. Jain, S. Jain, Quantitative Estimation of DNA and RNA, Basic Techniques in Biochemistry, Microbiology and Molecular Biology: Principles and Techniques, Springer2020, pp. 79-79.

[150] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2− ΔΔCT method, methods 25(4) (2001) 402-408.

[151] J. Li, J. Zhao, T. Tan, M. Liu, Z. Zeng, Y. Zeng, L. Zhang, C. Fu, D. Chen, T. Xie, Nanoparticle drug delivery system for glioma and its efficacy improvement strategies: a comprehensive review, International Journal of Nanomedicine (2020) 2563-2582.

[152] M. Danaei, M. Dehghankhold, S. Ataei, F. Hasanzadeh Davarani, R. Javanmard, A. Dokhani, S. Khorasani, M. Mozafari, Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems, Pharmaceutics 10(2) (2018) 57.

[153] M. Govindarasu, P. Abirami, S.S. Alharthi, M. Thiruvengadam, G. Rajakumar, M. Vaiyapuri, Synthesis, physicochemical characterization, and in vitro evaluation of biodegradable PLGA nanoparticles entrapped to folic acid for targeted delivery of kaempferitrin, Biotechnology and Applied Biochemistry 69(6) (2022) 2387-2398.

[154] J. Kim, H. Cho, D.-K. Lim, M.K. Joo, K. Kim, Perspectives for improving the tumor targeting of nanomedicine via the EPR effect in clinical tumors, International journal of molecular sciences 24(12) (2023) 10082.

[155] J.T. Duskey, C. Baraldi, M.C. Gamberini, I. Ottonelli, F. Da Ros, G. Tosi, F. Forni, M.A. Vandelli, B. Ruozi, Investigating novel syntheses of a series of unique hybrid PLGA-chitosan polymers for potential therapeutic delivery applications, Polymers 12(4) (2020) 823.

[156] P.A. McCarron, A.D. Woolfson, S.M. Keating, Sustained release of 5-fluorouracil from polymeric nanoparticles, Journal of pharmacy and pharmacology 52(12) (2000) 1451-1459.

[157] S. Wang, R. Liu, Y. Fu, W.J. Kao, Release mechanisms and applications of drug delivery systems for extended-release, Expert Opinion on Drug Delivery 17(9) (2020) 1289-1304.

[158] L.P. Jahromi, M. Ghazali, H. Ashrafi, A. Azadi, A comparison of models for the analysis of the kinetics of drug release from PLGA-based nanoparticles, Heliyon 6(2) (2020).

[159] A. Panda, J. Meena, R. Katara, D.K. Majumdar, Formulation and characterization of clozapine and risperidone co-entrapped spray-dried PLGA nanoparticles, Pharmaceutical development and technology 21(1) (2016) 43-53.

[160] W. Dong, K. Li, S. Wang, L. Qiu, Q. Liu, M. Xie, J. Lin, Targeted photodynamic therapy (PDT) of lung cancer with biotinylated silicon (IV) phthalocyanine, Current Pharmaceutical Biotechnology 22(3) (2021) 414-422.

[161] D. Perumal, M. Golla, K.S. Pillai, G. Raj, A.K. PK, R. Varghese, Biotin-decorated NIR-absorbing nanosheets for targeted photodynamic cancer therapy, Organic & biomolecular chemistry 19(12) (2021) 2804-2810.

[162] D. Panjwani, S. Patel, D. Mishra, V. Patel, M. Yadav, A. Dharamsi, A. Patel, Avidin-Biotin functionalized self-assembled protein nanoparticles as EGFR targeted therapeutics for the treatment of lung cancer: characterization and cell viability, Journal of Dispersion Science and Technology 44(13) (2023) 2483-2496.

[163] B. Tang, Y. Peng, Q. Yue, Y. Pu, R. Li, Y. Zhao, L. Hai, L. Guo, Y. Wu, Design, preparation and evaluation of different branched biotin modified liposomes for targeting breast cancer, European journal of medicinal chemistry 193 (2020) 112204.

[164] H. Chen, W. Nan, X. Wei, Y. Wang, F. Lv, H. Tang, Y. Li, C. Zhou, J. Lin, W. Zhu, Toxicity, pharmacokinetics, and in vivo efficacy of biotinylated chitosan surface-modified PLGA nanoparticles for tumor therapy, Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology 45(6) (2017) 1115-1122.

[165] K. Li, X. Zang, X. Meng, Y. Li, Y. Xie, X. Chen, Targeted delivery of quercetin by biotinylated mixed micelles for non-small cell lung cancer treatment, Drug Delivery 29(1) (2022) 970-985.

[166] A.A. Yetisgin, S. Cetinel, M. Zuvin, A. Kosar, O. Kutlu, Therapeutic nanoparticles and their targeted delivery applications, Molecules 25(9) (2020) 2193.

[167] A.-G. Niculescu, A.M. Grumezescu, Novel tumor-targeting nanoparticles for cancer treatment—A review, International Journal of Molecular Sciences 23(9) (2022) 5253.

[168] L. Sun, H. Liu, Y. Ye, Y. Lei, R. Islam, S. Tan, R. Tong, Y.-B. Miao, L. Cai, Smart nanoparticles for cancer therapy, Signal transduction and targeted therapy 8(1) (2023) 418.

[169] Y. Yao, Y. Zhou, L. Liu, Y. Xu, Q. Chen, Y. Wang, S. Wu, Y. Deng, J. Zhang, A. Shao, Nanoparticle-based drug delivery in cancer therapy and its role in overcoming drug resistance, Frontiers in molecular biosciences 7 (2020) 193.

[170] R. Augustine, A. Hasan, R. Primavera, R.J. Wilson, A.S. Thakor, B.D. Kevadiya, Cellular uptake and retention of nanoparticles: Insights on particle properties and interaction with cellular components, Materials Today Communications 25 (2020) 101692.

[171] J. Li, J. Tian, H. Yin, Y. Peng, S. Liu, S. Yao, L. Zhang, Chemical conjugation of FITC to track silica nanoparticles in vivo and in vitro: An emerging method to assess the reproductive toxicity of industrial nanomaterials, Environment International 152 (2021) 106497.

[172] L. Yan, S. Gao, S. Shui, S. Liu, H. Qu, C. Liu, L. Zheng, Small interfering RNA-loaded chitosan hydrochloride/carboxymethyl chitosan nanoparticles for ultrasound-triggered release to hamper colorectal cancer growth in vitro, International Journal of Biological Macromolecules 162 (2020) 1303-1310.

[173] H. Yuan, J. Miao, Y.-Z. Du, J. You, F.-Q. Hu, S. Zeng, Cellular uptake of solid lipid nanoparticles and cytotoxicity of encapsulated paclitaxel in A549 cancer cells, International journal of pharmaceutics 348(1-2) (2008) 137-145.

[174] Y. Patil, T. Sadhukha, L. Ma, J. Panyam, Nanoparticle-mediated simultaneous and targeted delivery of paclitaxel and tariquidar overcomes tumor drug resistance, Journal of Controlled Release 136(1) (2009) 21-29.

[175] Y. Dai, H. Xing, F. Song, Y. Yang, Z. Qiu, X. Lu, Q. Liu, S. Ren, X. Chen, N. Li, Biotin-conjugated multilayer poly [D, L-lactide-co-glycolide]-lecithin-polyethylene glycol nanoparticles for targeted delivery of doxorubicin, Journal of Pharmaceutical Sciences 105(9) (2016) 2949-2958.

[176] A. Gonsalves, P. Sorkhdini, J. Bazinet, M. Ghumman, D. Dhamecha, Y. Zhou, J.U. Menon, Development and characterization of lung surfactant-coated polymer nanoparticles for pulmonary drug delivery, Biomaterials Advances 150 (2023) 213430.

[177] L. Baghirova, E. Kaya Tilki, A.A. Ozturk, Evaluation of cell proliferation and wound healing effects of vitamin A palmitate-loaded PLGA/chitosan-coated PLGA nanoparticles: Preparation, characterization, release, and release kinetics, ACS omega 8(2) (2023) 2658-2668.

[178] K.R. Paudel, M.S.B. Mohamad, G. De Rubis, R.-J. Reyes, N. Panth, H. Dureja, G. Gupta, S.K. Singh, T. Madheswaran, T. Collet, 18-β-Glycyrrhetinic acid encapsulated PLGA nanoparticles attenuate lung cancer proliferation and migration, Journal of Drug Delivery Science and Technology 95 (2024) 105523.

[179] S. Sarkar, S. Kumar, G. Saha, M. Basu, M.K. Ghosh, PLGA-based dual-loaded nanoformulation of DIM and TMZ-An advanced clinical strategy for brain cancer treatment in a combinatorial approach, bioRxiv (2023) 2023.05. 04.539373.

[180] L. Miao, S. Guo, J. Zhang, W.Y. Kim, L. Huang, Nanoparticles with precise ratiometric co-loading and co-delivery of gemcitabine monophosphate and cisplatin for treatment of bladder cancer, Advanced functional materials 24(42) (2014) 6601-6611.

[181] R. Sen, S. Ganguly, S. Ganguly, M.C. Debnath, S. Chakraborty, B. Mukherjee, D. Chattopadhyay, Apigenin-loaded PLGA-DMSA nanoparticles: a novel strategy to treat melanoma lung metastasis, Molecular Pharmaceutics 18(5) (2021) 1920-1938.

[182] P. Gupta, A. Singh, A.K. Verma, S. Kant, A.K. Pandey, P. Khare, V. Prakash, The anti-tumor and immunomodulatory effects of PLGA-based docetaxel nanoparticles in lung cancer: the potential involvement of necroptotic

cell death through reactive oxygen species and calcium build-up, Vaccines 10(11) (2022) 1801.

[183] F. Mogheri, E. Jokar, R. Afshin, A.A. Akbari, M. Dadashpour, A. Firouzi-amandi, H. Serati-Nouri, N. Zarghami, Co-delivery of metformin and silibinin in dual-drug loaded nanoparticles synergistically improves chemotherapy in human non-small cell lung cancer A549 cells, Journal of Drug Delivery Science and Technology 66 (2021) 102752.

[184] L. Kumari, I. Ehsan, A. Mondal, A. Al Hoque, B. Mukherjee, P. Choudhury, A. Sengupta, R. Sen, P. Ghosh, Cetuximab-conjugated PLGA nanoparticles as a prospective targeting therapeutics for non-small cell lung cancer, Journal of Drug Targeting 31(5) (2023) 521-536.

[185] Q. Fang, G. Mao, L. Wang, Y. Gu, R. Song, X. Gu, S. Lu, X. Li, Synergetic approaches of fucoidan and trabectedin complex coated PLGA nanoparticles effectively suppresses proliferation and induce apoptosis for the treatment on non-small cell lung cancer, Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition (2024) 1-20.

[186] E.D. Sezer, L.M. Oktay, E. Karadadaş, H. Memmedov, N. Selvi Gunel, E. Sözmen, Assessing anticancer potential of blueberry flavonoids, quercetin, kaempferol, and gentisic acid, through oxidative stress and apoptosis parameters on HCT-116 cells, Journal of medicinal food 22(11) (2019) 1118-1126.

[187] M. Becit-Kizilkaya, S. Oncu, S. Sen, A.B.U. Kaplan, S. Celik, M. Cetin, S. Aydin Dilsiz, Daidzein Nanosuspension with 5-Fluorouracil Induces Apoptosis and Alleviate Inflammation in Caco-2 Colorectal Adenocarcinoma Cells, Available at SSRN 4797567.

[188] B. Kurban, T. Tuncel, Ş. Görgülü, F. Kar, A. Öztürk, T. Özek, Elemi essential oil nanocapsulated drug ameliorates lung cancer via oxidative stress, apoptosis and inflammation pathway, Journal of Cellular and Molecular Medicine 27(13) (2023) 1887-1899.

[189] C.-F. Wu, C.-Y. Wu, R.Y.-Y. Chiou, W.-C. Yang, C.-F. Lin, C.-M. Wang, P.-H. Hou, T.-C. Lin, C.-Y. Kuo, G.-R. Chang, The anti-cancer effects of a zotarolimus and 5-fluorouracil combination treatment on A549 cell-derived tumors in Balb/c nude mice, International Journal of Molecular Sciences 22(9) (2021) 4562.

[190] Y. Zhou, M. Zhang, Z. Zhang, Y. Jia, C. Zhang, L. Peng, Hydrazinocurcumin and 5-fluorouracil enhance apoptosis and restrain tumorigenicity of HepG2 cells via disrupting the PTEN-mediated PI3K/Akt signaling pathway, Biomedicine & Pharmacotherapy 129 (2020) 109851.

[191] M.E. Elbanan, M.E. Amer, M.A. El-Missiry, A.I. Othman, S.M. Shabana, Melatonin protects mice from 5-FU hepatotoxicity and improves 5-FU antitumor effects by an apoptotic pathway dependent on cell cycle arrest in A549 human lung cancer cells, RPS Pharmacy and Pharmacology Reports 2(4) (2023) rqad034.

[192] E. Ribeiro, N. Vale, Novel Drug Combinations in Lung Cancer: New Potential Synergies Between 5-FU and Repurposed Drugs, Applied Sciences 14(21) (2024) 9658.

[193] S.T. Alsharif, A.M. Gardouh, M.F. Mandour, Z.M. Alaqais, L.K. Alharbi, M.J. Almarwani, H.I. Mokhtar, F.A. Hisham, M.M. Abdellah, G.M. Mohamed, Antitumor activity and targeting p53-PUMA mRNA expression by 5-flurouracil PLGA-lipid polymeric nanoparticles in mouse mammary carcinomas: comparison to free 5-flurouracil, Toxicology Mechanisms and Methods 34(4) (2024) 385-397.

[194] S. Bhattacharya, Development of 5-FU loaded poly lactic-co-glycolic acid nanoparticles for treatment of lung cancer, Iraqi Journal of Pharmaceutical Sciences (P-ISSN 1683-3597 E-ISSN 2521-3512) 31(1) (2022) 130-143.

[195] P. Wu, Q. Zhou, H. Zhu, Y. Zhuang, J. Bao, Enhanced antitumor efficacy in colon cancer using EGF functionalized PLGA nanoparticles loaded with 5-Fluorouracil and perfluorocarbon, BMC cancer 20 (2020) 1-10.

[196] S. Khaledi, S. Jafari, S. Hamidi, O. Molavi, S. Davaran, Preparation and characterization of PLGA-PEG-PLGA polymeric nanoparticles for co-delivery of 5-Fluorouracil and Chrysin, Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition 31(9) (2020) 1107-1126.

[197] R.M. Gahtani, A. Alqahtani, T. Alqahtani, S.A. Asiri, J.M.M. Mohamed, S. Venkatesa Prabhu, E.Y. Muluneh, [Retracted] 5-Fluorouracil-Loaded PLGA Nanoparticles: Formulation, Physicochemical Characterisation, and In VitroAnti-Cancer Activity, Bioinorganic chemistry and applications 2023(1) (2023) 2334675.

[198] C. Suárez-Rozas, J.A. Jara, G. Cortés, D. Rojas, G. Araya-Valdés, A. Molina-Berrios, F. González-Herrera, S. Fuentes-Retamal, P. Aránguiz-Urroz, P.R. Campodónico, Antimigratory Effect of Lipophilic Cations Derived from Gallic and Gentisic Acid and Synergistic Effect with 5-Fluorouracil on Metastatic Colorectal Cancer Cells: A New Synthesis Route, Cancers 16(17) (2024) 2980.

[199] J. Zhou, S. Wan, Y. Wu, H. Hu, Y. Liu, Z. Liao, M. Xu, J. Wu, Q. Fan, Cancer cell membrane-camouflaged paclitaxel/PLGA nanoparticles for targeted therapy against lung cancer, Biomedicine & Pharmacotherapy 177 (2024) 117102.

[200] S. Bao, H. Zheng, J. Ye, H. Huang, B. Zhou, Q. Yao, G. Lin, H. Zhang, L. Kou, R. Chen, Dual targeting EGFR and STAT3 with Erlotinib and Alantolactone co-loaded PLGA nanoparticles for pancreatic cancer treatment, Frontiers in pharmacology 12 (2021) 625084.

[201] F.B. Arslan, K. Öztürk, E. Tavukçuoğlu, S.C. Öztürk, G. Esendağlı, S. Çalış, A novel combination for the treatment of small cell lung cancer: Active targeted irinotecan and stattic co-loaded PLGA nanoparticles, International Journal of Pharmaceutics 632 (2023) 122573.

[202] D. Xiao, X. Hu, J. Zhang, Tumour targeted polymer nanoparticles co-loaded with docetaxel and siCCAT2 for combination therapy of lung cancer, Journal of Drug Targeting 30(5) (2022) 534-543.

[203] T.T.K. Nguyen, S.M. Woo, S.U. Seo, A. Banstola, H. Kim, R. Duwa, A.T.T. Vu, I.-S. Hong, T.K. Kwon, S. Yook, Enhanced anticancer efficacy of TRAIL-conjugated and odanacatib-loaded PLGA nanoparticles in TRAIL resistant cancer, Biomaterials 312 (2025) 122733.

[204] I. Ehsan, L. Kumari, R. Sen, A. Al Hoque, B. Mukherjee, A. Mukherjee, P. Ghosh, S. Bhattacharya, J591 functionalized paclitaxel-loaded PLGA

nanoparticles successfully inhibited PSMA overexpressing LNCaP cells, Journal of Drug Delivery Science and Technology 75 (2022) 103689.

[205] M.D.A. Paskeh, M. Entezari, C. Clark, A. Zabolian, E. Ranjbar, M.V. Farahani, H. Saleki, S.O. Sharifzadeh, F.B. Far, M. Ashrafizadeh, Targeted regulation of autophagy using nanoparticles: New insight into cancer therapy, Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease 1868(3) (2022) 166326.

[206] S.V.K. Rompicharla, P. Kumari, H. Bhatt, B. Ghosh, S. Biswas, Biotin functionalized PEGylated poly (amidoamine) dendrimer conjugate for active targeting of paclitaxel in cancer, International journal of pharmaceutics 557 (2019) 329-341.

[207] S.Y. Kim, S.H. Cho, Y.M. Lee, L.-Y. Chu, Biotin-conjugated block copolymeric nanoparticles as tumor-targeted drug delivery systems, Macromolecular Research 15 (2007) 646-655.

[208] W. YoungáKim, J. SeungáKim, Biotin-guided anticancer drug delivery with acidity-triggered drug release, Chemical Communications 51(45) (2015) 9343-9345.

[209] N.U. Deshpande, M. Jayakannan, Biotin-tagged polysaccharide vesicular nanocarriers for receptor-mediated anticancer drug delivery in cancer cells, Biomacromolecules 19(8) (2018) 3572-3585.

[210] W.X. Ren, J. Han, S. Uhm, Y.J. Jang, C. Kang, J.-H. Kim, J.S. Kim, Recent development of biotin conjugation in biological imaging, sensing, and target delivery, Chemical communications 51(52) (2015) 10403-10418.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. Poyraz, F.Ş., Mansuroğlu, B., Autophagic, Mitocondrial and Apoptotic Effects of Drug-Loaded Nanoparticles on Lung Cancer Cell, Frühjahrssymposium 2024, Ulm, Almanya, 13 - 16 Mart 2024, ss.141 (Poster Sunumu).

2. Poyraz, F.Ş., Mansuroğlu, B., Biotin-Functionalized Nanoparticle Systems for Targeted Lung Cancer Therapy, International Conference on Engineering, Natural Sciences, and Technological Developments (ICENSTED 2024), Balıkesir, Türkiye, 16 - 21 Temmuz 2024, ss.543 (Sözlü Sunum).

Makaleler

1. Poyraz F.Ş., Mansuroğlu B., A new strategy for lung cancer treatment: Biotin-coated drug delivery system loaded with 5-fluorouracil and gentisic acid, Process Biochemistry, vol.157, pp.216-231, 2025.

Projeler

1. Design of an Artificial Natural Killer Cell Mimicking System, TÜBİTAK 2214-A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı 1059B142100560 Kodlu Projesi.