T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

# HESPERETİN VE JUGLON YÜKLÜ NANOPARTİKÜLLERİN U87MG HÜCRE HATTI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Nefiye GÜLER

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman
Doç. Dr. Banu Mansuroğlu

Temmuz, 2022

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

# HESPERETİN VE JUGLON YÜKLÜ NANOPARTİKÜLLERİN U87MG HÜCRE HATTI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Nefiye GÜLER tarafından hazırlanan tez çalışması 01.07.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

**Jüri Üyeleri**

Prof. Dr. BANU MANSUROĞLU _____
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. SEMİHA ERİŞEN _____
Yıldız Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi SEZEN CANIM ATEŞ _____
İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi

Danışmanım Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU sorumluluğunda tarafımca hazırlanan Hesperetin ve Juglon Yüklü Nanopartiküllerin U87mg Hücre Hattı Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi 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.

Nefiye GÜLER

İmza

*Her zaman bana destek olan biricik aileme…*

# TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca beni yönlendiren ve yol gösteren, ihtiyacım olan olanakları bana sağlayan, takıldığım konularda bana ilham olan değerli danışman hocam Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Bu zorlu süreçte hem psikolojik olarak desteklediği hem de her zor anımda yanımda olduğu için, yoğun bir tempo ile çalışırken bile her sorunuma çözüm bulan, sabah akşam demeden birlikte gece yarılarına kadar deneyler yaptığım ve deneylerin daha eğlenceli bir hale büründüğü Gülşah AKBAŞ'a teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman ulaşılabilir olmasıyla beni etkileyen ve her şeyin cevabına sahip olan enerjisine hayran kaldığım, tez çalışmam sürecinde yardımlarını benden esirgemeyen F. Şayan POYRAZ'a, teşekkürlerimi sunarım.

Hücre Kültürü Laboratuvarı, Moleküler Hücre Biyolojisi Laboratuvarı, Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda birlikte çalıştığım ve vakit geçirdiğim tüm arkadaşlarıma paylaştığımız güzel anlar için teşekkürlerimi sunarım.

Aynı evi paylaştığım dostluğumuzun yüksek lisans öncesine dayandığı, aynı problemlerle karşılaştığımız için birbirimizin derdini daha iyi anladığımız ve birbirimizi desteklediğimiz biricik ev arkadaşlarım Elif YÜKSEL ve Nursena GÜRSOY'a teşekkülerimi sunarım.

En önemlisi benim bugüne kadar gelmemde en büyük katkısı olan, stresimi azaltan, desteklerini hep arkamda hissettiğim çok sevgili aileme teşekkürlerimi sunarım.

Nefiye GÜLER

# İÇİNDEKİLER

**SİMGE LİSTESİ** ix

**KISALTMA LİSTESİ** x

**ŞEKİL LİSTESİ** xi

**TABLO LİSTESİ** xiii

**ÖZET** xiv

**ABSTRACT** xvi

**1 GİRİŞ** 1

1.1 Literatür Özeti ... 1

1.2 Tezin Amacı ... 2

1.3 Hipotez ... 2

**2 GENEL BİLGİLER** 3

2.1 Kanser ... 3

2.2 Beyin Kanseri ... 5

2.2.1 Risk Faktörleri ve Epidemiyolojisi ... 6

2.2.2 Türleri ... 7

2.2.3 Tedavi Yöntemleri ... 9

2.2.4 Kan Beyin Bariyeri ... 10

2.3 Nanoteknoloji ve Nano İlaç Taşıma Sistemleri ... 11

2.3.1 Polimerik Nanopartiküller ... 13

2.3.2 Nanopartikül Sentezi ve Karakterizasyonu ... 14

2.4 Flavonoidler ... 15

2.4.1 Hesperetin ... 16

2.5 Juglon ... 18

2.5.1 Etkilediği Yolaklar ... 19

2.6 Antioksidan ve Oksidatif Stres ... 20

**3 MATERYAL VE METOD** 22

3.1 Kullanılan Materyaller ... 22

3.1.1 Kullanılan Cihazlar ... 22

3.1.2 Kullanılan Sarf Malzemeler ..... 22
3.1.3 Kullanılan Kimyasallar ve Kitler ..... 23
3.2 Hücre Kültürü Deneyleri ..... 23
3.2.1 Tamamlanmış Besiyeri Hazırlama ..... 23
3.2.2 Hücre Sayımı ..... 24
3.2.3 Hücre Pasajı ..... 24
3.2.4 Hücre Dondurma ..... 24
3.2.5 Hesperetin Konsantrasyonunun Ayarlanması ..... 25
3.2.6 Juglon Konsantrasyonunun Ayarlanması ..... 25
3.2.7 In Vitro Salımın Ölçülmesi ..... 25
3.2.8 MTT Analizi ..... 25
3.2.9 Yara İyileşmesi ..... 26
3.2.10 Kolonizasyon ..... 26
3.2.11 U87MG Hücre Lizatlarının Hazırlanması ..... 27
3.3 Oksidatif Stres ve Antioksidan Deneyleri ..... 27
3.3.1 Protein Miktar Tayin, (BCA Yöntemi) ..... 27
3.3.2 MDA Düzeylerinin Belirlenmesi ..... 28
3.3.3 GSH Düzeylerinin Belirlenmesi ..... 28
3.3.4 SOD Düzeylerinin Belirlenmesi ..... 29
3.4 İstatiksel Analizler ..... 29
**4 SONUÇ VE ÖNERİLER 30**
4.1 Sonuçlar ..... 30
4.1.1 Hesperetin ve Juglonun Serbest Formlarının CCD Hücrelerine Etkisi 30
4.1.2 Hesperetin ve Juglonun Serbest Formlarının U87MG Hücrelerine Etkisi ..... 34
4.1.3 Hesperetin ve Juglon Nanoparitküllerinin Salım Grafiklerinin İncelenmesi ..... 42
4.1.4 Hesperetin ve Juglon Nanopartiküllerinin U87MG Hücrelerine Etkisi .....43
4.1.5 Hesperetin ve Juglonun U87MG Hücrelerinde Kombinasyon İndeksinin Hesaplanması ..... 46
4.1.6 Yara İyileşmesi ..... 46

4.1.7 Kolonizasyon ..... 47
4.1.8 Protein Miktar Tayini ..... 48
4.1.9 İlaç Tedavisi Uygulanan U87MG Hüclerinde MDA Tayini..... 49
4.1.10 İlaç Tedavisi Uygulanan U87MG Hücrelerinde GSH Tayini ..... 50
4.1.11 İlaç Tedavisi Uygulanan U87MG Hücrelerinde SOD Tayini ..... 51
4.2 Öneriler..... 52
**KAYNAKÇA** **55**

# SİMGE LİSTESİ

| | |
|---|---|
| rpm | Dakikadaki Devir Sayısı |
| $IC_{50}$ | Letal doz |
| µg | Mikrogram |
| µl | Mikrolitre |
| µM | Mikromolar |
| mg | Miligram |
| ml | Mililitre |
| mM | Milimolar |
| nM | Nanometre |
| sn | Saniye |
| °C | Santigrat Derece |
| % | Yüzde |

# KISALTMA LİSTESİ

| | |
|---|---|
| AFM | Atomik Kuvvet Mikroskobu |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| DMF | Dimetilformamid |
| DMSO | Dimetilsülfoksit |
| DNA | Deoksiribo Nükleik Asit |
| DTNB | 5,5 Ditiyobis-2-Nitrobenzoik Asit |
| DSÖ | Dünya Sağlık Örgütü |
| EDTA | Etilendiamin Tetraasetik Asit |
| EGFR | Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörleri |
| ELISA | Enzime Bağlı İmmünosorbent Deneyi |
| FADD | FAS ile ilişkili ölüm alanı proteini |
| FBS | Fetal Bovine Serum |
| FT-IR | Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi |
| GBM | Glioblastoma Multiforme |
| GSH | Glutatyon |
| Hsp | Hesperetin |
| HspNP | Hesperetin Nanopartikül |
| IDH | İzositrat Dehidrojenaz |
| IUPAC | Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği |
| J | Juglon |
| JNP | Juglon Nanopartikül |
| IC50 | Yarı maksimum inhibitör konsantrasyon |
| KBB | Kan-Beyin Bariyeri |
| MDA | Monaldialdehit |
| MSS | Merkezi Sinir Sistemi |
| MTT | 3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid |
| NaCl | Sodyüm Klorür |
| NaOH | Sodyüm Hidroksit |
| NP | Nanopartikül |
| PCV | Prokarbazin, Karmustin, Vinkristin |
| PGA | Poliglikolik asit |
| PLA | Polilaktik asit |
| PLGA | Polilaktik-ko-glikolik asit |
| PTEN | Fosfataz ve Tensin Homologu |
| PTN | Pleitropin (heparin bağlayıcı büyüme ile ilişkili büyüme molekülü) |
| ROS | Reaktif Oksijen Türleri |
| RTK | Reseptör Tirozin Kinazlar |
| SEM | Taramalı Elektron Mikroskobu |
| SOD | Süperoksit Dismutaz |
| STM | Taramalı Tünelleme Mikroskobu |
| TERT | Telomeraz Ters Transkript |
| TMZ | Temozolomid |
| UV | Ultra Violet |

# ŞEKİL LİSTESİ

**Şekil 2.1** Kanserin karakteristik özellikleri ..... 4
**Şekil 2.2** Hücre döngüsü kontrol noktaları ..... 5
**Şekil 2.3** Çocuklarda ve erişkinlerde beyin kanseri görülme oranı ..... 6
**Şekil 2.4** Beyin kanseri öldürücülük oranı ..... 7
**Şekil 2.5** GBM'nin kadın ve erkekte sağ kalım oranı ..... 8
**Şekil 2.6** Nanokapsül ve nanoküre yapısı [26] ..... 12
**Şekil 2.7** Sentetik nanopartiküller ..... 13
**Şekil 2.8** PLGA'nın Bozunması ..... 14
**Şekil 2.9** PLGA'dan madde salımı ..... 14
**Şekil 2.10** Flavonoid yapısı ..... 15
**Şekil 2.11** Hesperetin moleküler yapısı ..... 16
**Şekil 2.12** Hespiridin yapısı ..... 17
**Şekil 2.13** Hesperetinin etki mekanizması ..... 18
**Şekil 2.14** Juglon moleküler yapısı ..... 18
**Şekil 2.15** Juglonun etkilediği yolaklar ..... 19
**Sekil 2.16** Moleküler oksiienden ROS olusumu ..... 21
**Şekil 4.1** Kontrol Grubu 24 Saat Görüntüsü (5x) ..... 30
**Şekil 4.2** 40 $\mu$M Juglon 24 Saat Görüntüsü (5x) ..... 30
**Şekil 4.3** Kontrol Grubu 48 Saat Görüntüsü (5x) ..... 31
**Şekil 4.4** 40 $\mu$M Juglon 48 Saat Görüntüsü (5x) ..... 31
**Şekil 4.5** Juglonun CCD Hücrelerinde Canlılığa Etkisi ..... 32
**Şekil 4.6** Kontrol Grubu 24 Saat Görüntüsü (5x) ..... 32
**Şekil 4.7** 500 $\mu$M Hesperetin 24 Saat Görüntüsü (5x) ..... 33
**Şekil 4.8** Kontrol 48 Saat Görüntüsü (5x) ..... 33
**Şekil 4.9** 500 $\mu$M Hesperetin 48 Saat Görüntüsü (5x) ..... 34
**Şekil 4.10** Hesperetinin CCD Hücrelerinde Canlılığa Etkisi ..... 34
**Şekil 4.11** Kontrol 24 Saat Görüntüsü (5x) ..... 35
**Şekil 4.12** 30 $\mu$M Juglon 24 Saat Görüntüsü (5x) ..... 35
**Şekil 4.13** Kontrol 48 Saat Görüntüsü (5x) ..... 36
**Şekil 4.14** 30$\mu$M Juglon 48Saat Görüntüsü (5x) ..... 36
**Şekil 4.15** Juglonun U87MG Hücrelerinde Canlılığa Etkisi ..... 37
**Şekil 4.16** Kontrol 24 Saat Görüntüsü (5x) ..... 37
**Şekil 4.17** 400 $\mu$M Hesperetin 24 Saat Görüntüsü (5x) ..... 38
**Şekil 4.18** Kontrol 48 Saat Görüntüsü (5x) ..... 38
**Şekil 4.19** 400 $\mu$M Hesperetin 48 Saat Görüntüsü (5x) ..... 39
**Şekil 4.20** Hesperetinin U87MG Hücrelerinde Canlılığa Etkisi ..... 39
**Şekil 4.21** Kontrol Grubu 24 Saat Görüntüsü (5x) ..... 40
**Şekil 4.22** 20 $\mu$M Hsp-J 24 Saat Görüntüsü (5x) ..... 40
**Şekil 4.23** Kontrol Grubu 48 Saat Görüntüsü (5x) ..... 41
**Şekil 4.24** 20 $\mu$M Hsp-J 48 Saat Görüntüsü (5x) ..... 41
**Şekil 4.25** Juglon ve Hesperetin Kombinasyonunun U87MG Hücrelerinde Canlılığa Etkisi ..... 42
**Şekil 4.26** Juglonun DCM'de Salım Grafiği ..... 43
**Şekil 4.27** Hesperetinin DCM'de Salım Grafiği ..... 43

**Şekil 4.28** JNP'nin U87MG Hücrelerinde Canlılığa Etkisi.....44
**Şekil 4.29** HNP'nin U87MG Hücrelerinde Canlılığa Etkisi.....45
**Şekil 4.30** HspNP-JNP Kombinasyonunun U87MG Hücrelerinde Canlılığa Etkisi.....45
**Şekil 4.31** Hesperetin ve Juglonun Kombinasyon İndeksi Eğrisi.....46
**Şekil 4.32** İlaç Uygulamalarının Yara İyileşmesindeki Etkisi .....47
**Şekil 4.33** Hücrelere Serbest Formlarda İlaç Uygulamasının 24 ve 48 Saatte Koloni Oluşturma Eğilimi.....48
**Şekil 4.34** Hücrelere Nanopartikül Formlarda Ilaç Uygulamasının 24 ve 48 Saatte Koloni Oluşturma Eğilimi.....48
**Şekil 4.35** BSA Standart Eğrisi.....49
**Şekil 4.36** Kontrol Grubu ile Etken Maddelerdeki MDA Düzeyinin Karşılaştırılması .....50
**Şekil 4.37** Kontrol Grubu ile Etken Maddelerdeki GSH Düzeyinin Karşılaştırılması .....51
**Şekil 4.38** Kontrol Grubu ile Etken Maddelerdeki SOD Düzeyinin Karşılaştırılması .....52

# TABLO LİSTESİ

**Tablo 2.1** Flavonoid çeşitleri ..... 15
**Tablo 4.1** Protein Miktarları ..... 49
**Tablo 4.2** Protein Lizatlarından Elde Edilen MDA Düzeyleri ..... 49
**Tablo 4.3** Protein Lizatlarından Elde Edilen GSH Düzeyleri ..... 50
**Tablo 4.4** Protein Lizatlarından Elde Edilen MDA Düzeyleri ..... 51

# ÖZET

## Hesperetin ve Juglon Yüklü Nanopartiküllerin U87MG Hücre Hatti Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi

Nefiye GÜLER

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU

Kanser, dünyada ölüm sebeplerinin başında gelmektedir. Beyin kanseri türleri arasında en ölümcül ve agresif olan glioblastoma multiform tedavisi en zor olan tümör çeşididir. İlaç tedavisinde karşımıza çıkan en büyük zorluk beyinde bulunan kan beyin bariyeridir. Yüksek seçiciliği nedeniyle uygulanan ilaçların farmösatik etkisi ve biyouyumluluğu büyük oranda düşmektedir. Bu durum etkili tedavi geliştirmekte büyük bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Son dönemlerde kanser tedavilerinde bitki ekstraktlarından elde edilen moleküllerin destekleyici etkileri keşfedilmiş ve bu alanda araştırmalar artmaya başlamıştır. Antikanser ve antioksidan özellikli etken maddelerin vücuda verildiğinde toksik etki yaratmaması biyoayarlanımının yapılabilmesi ve kan beyin bariyerini aşabilmesi son derece önem arz etmektedir. Nanopartiküler sistemlerden ilaç taşınımı ve salımında yararlanabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmada, literatür taramasında karşılaşılan antiproliferatif ve antioksidan etkiye sahip, apoptozu indükleyen önemli antikanser molekülleri olan hesperetin ve moleküllerinin serbest ve nanopartikül formlarının sağlıklı ve kanser hücrelerinde oluşturduğu sitotoksisite MTT ile analiz edilmiştir. İki molekülün serbest ve nanopartikül formunun U87MG

hücre hattı üzerindeki kombine etkisi belirlenmiştir. Bu kombinasyon çalışması sonucunda ise iki maddenin birbirine sinerjistik etki gösterdiği bulunmuştur. Nanopartikül kombinasyon formunda 6.82 $\mu$M dozunda uygulaması ile ilaç etkinliğinin arttırılması sağlanmıştır. Bu maddelerin antioksidan etkileri GSH ve SOD tayinleriyle, oksidatif stres düzeyi MDA ile belirlenmiştir. Kolonizayon ve yara iyileşmesi deneyleri ile juglon ve hesperetinin farklı formülasyonlarının hücre proliferasyonuna etkisi gözlemlenmiştir. Tüm bulguların değerlendirilmesi sonucunda, hesperetin ve juglonun, glioblastoma hücrelerine antiproliferatif ve antioksidan etki ettiği gösterilmiştir. Biyouyumlu bir akıllı ilaç olarak kullanılabilmesi için bu çalışmaların in vivo ve klinik olarak desteklenmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Juglon, Hesperetin, Nanopartikül, Glioblastoma.

# ABSTRACT

## Investigation of Effects of Hesperetin and Juglone Charged Nanoparticles on U87MG Cell Line

Nefiye GÜLER

Department of Molecular Biology and Genetics

Master Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU

Cancer is one of the leading causes of death in the world. Glioblastoma multiforme, the most deadly and aggressive type of brain cancer, is the most difficult tumor to treat. The biggest challenge in drug treatment is the blood-brain barrier in the brain. Due to its high selectivity, the pharmaceutical effect and biocompatibility of the administered drugs are greatly reduced. This is a major challenge in developing effective treatment. Recently, supportive effects of molecules obtained from plant extracts in cancer treatments have been discovered and researches in this field have started to increase. It is extremely important that these anticancer and antioxidant active substances do not cause toxic effects when administered to the body, can be bioadjusted and pass the blood-brain barrier. It is thought that nanoparticulate systems can be used for drug delivery and drug release. In this study, the cytotoxicity of the free and nanoparticle forms of hesperetin and its molecules, which are important anticancer molecules that have antiproliferative and antioxidant effects and induce apoptosis, encountered in the literature review, were analyzed by MTT in healthy and cancer cells. The effects of the combination forms on the U87MG cell line were investigated by MTT analysis. It has been found that these two substances have a synergistic effect on each other. The drug efficacy has been increased by the application of the

nanoparticle combination at a dose of 6.82 $\mu$M. The antioxidant effects of these substances were determined by GSH and SOD determinations, and the oxidative stress level was determined by MDA. The effects of different formulations of juglone and hesperetin on cell proliferation were observed with colonization and wound healing experiments. As a result of the evaluation of all findings, it has been shown that hesperetin and juglone have antiproliferative and antioxidant effects on glioblastoma cells. In order to be used as a biocompatible smart drug, these studies need to be supported in vivo and clinically.

**Keywords:** Juglone, Hesperetin, Nanoparticle, Glioblastoma.

# 1
# GİRİŞ

## 1.1 Literatür Özeti

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre yılda milyonlarca insan kanser nedeniyle hayatını kaybetmektedir. Kanser çeşitlerinden tedavisi en zor olan beyin tümörünün en sık karşılaşılan türü glioblastoma multiformdur (GBM). Karakteristik olarak agresif proliferasyona sahip ve metastaz yaparak çevredeki dokulara baskı yaratmaktadır. Vücudun işlevselliğinde önemli bir organ olan beyinin cerrahi müdahale ile tedavisi oldukça zor olmaktadır. Radyasyon tedavisi ve kemoterapi ilaçlarının kullanımı tedavide sıklıkla kullanılan yöntemlerdir. Kemateröpik ilaçların kullanımında karşılaşılan en büyük zorluk kan beyin bariyerinin (KBB) aşılmasıdır. KBB, sadece küçük moleküllerin kandan alımını sağlayarak beyinde bulunan hücrelerin ortamının iyon stabilitesini korumaktadır. Ayrıca KBB geçirgenliği yüksek, sitotoksik olan kemoterapi Temozolomid (TMZ) ilacına GBM'nin büyük direnç gösterdiği gözlenmiştir. Tedavi sonrasında birincil tümör büyük olasılıkla tekrardan ortaya çıktığı görülmüştür. Geçirgenliği daha düşük olan ancak oldukça toksik olması nedeniyle daha etkili kombinasyon ilaç olan Prokarbazin-Karmustin-Vinkristin (PCV) kullanımı da tercih edilen tedavi yöntemlerinden olmakla beraber yüksek oranda DNA hasarına sebep olmaktadır.

Son dönemlerde kanser tedavilerinde flavanoidler kullanılarak alternatif tedavi yöntemleri geliştirilmektedir. Farmösatik etkileri ve antikanser etkilerinin kullanılarak ilaç tedavisi geliştirilmeye çalışılmaktadır. Birçok kanser türü üzerinde etkili olduğu bulunan hesperidin flavonoidinin kombinasyon formlarının da etkileri araştırılmaktadır. Bitkiler üzerinde toksik etkiye sahip olan juglon organik molekülünün antikanser etkileri araştırılmış ve bazı kanser türlerinde olumlu sonuçlar elde edilebilmiştir.

Nanopartiküller proteaz inhibitörleri dahil çeşitli terapötik ajanların MSS'e teslimatı için taşıyıcılar olarak büyük ilgi çekmektedir. Bunun nedeni, nanopartiküllerin, biyolojik sıvılarda ve lipozomlar veya miseller gibi diğer

kolloidal sistemlerle karşılaştırıldığında kapsüllenmiş ilaca daha fazla stabilite kazandırmaktadır [20]. Nanopartiküller, polimerler veya lipitlerden oluşan katı kolloidal matriks benzeri parçacıklar biyobozunur, hedeflenebilir ve dolaşımda uzun süre kalabilmesi için yeterli gerilim kuvvetine sahip olmaları gerekmektedir [21]. Nanopartiküllerin avantajları, formülasyonları için az madde kullanımı ve basit hazırlama prosedürlerine sahip, yüksek fiziksel stabilite ve hastalıkların tedavilerinde sürekli ilaç gönderim olasılığıdır. PLGA nanopartikül üretimi için en sık tercih edilen biyopolimer olup, nano-boyutlarda üretimi çeşitli bariyer ve kılcal damarlardan geçme, ayrıca hedef dokularına ulaşana kadar vücudun farklı sistemlerinde dolaşma yeteneği vererek etkin ilaç dağıtımına olanak sağlar. Nanopartiküller, beyne ilaç iletimi için invazif olmayan bir tedavi yöntemi sunar. Bununla birlikte, boyut, salım kinetiği, kimyasal özellikler açısından optimize edilmeleri, KBB'yi geçme yeteneklerinin yanı sıra ilacı biyolojik ortamdan korumak ve ilaç çözünürlüğünü arttırmasından dolayı tercih edilmektedir [22].

## 1.2 Tezin Amacı

Tez çalışmasının amacı, antioksidan özelliklere sahip olan hesperetin ve juglon maddelerinin serbest ve kombinasyon formlarının U87MG hücre hattı üzerinde etkilerinin araştırılarak sitotoksik ve oksidatif etkilerinin incelenerek antikanser ajanı olarak kullanabilirliğini belirlemektir. Hesperetin ve juglonun nanopartikül formları kullanılarak kan besin bariyerinin aşılmasındaki güçlüğün önüne geçilmesi ve ilaç salınımının daha etkili olması hedeflenmektedir.

## 1.3 Hipotez

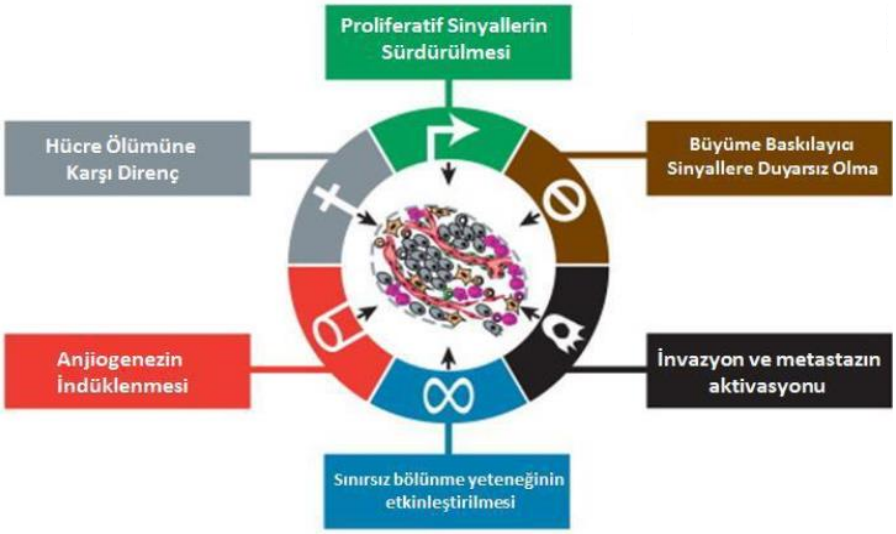
Bu çalışmada kullanılan juglon ve hesperetin moleküllerinin nanopartikül formlarının serbest formlarına göre daha etkin olması beklenmektedir. Ayrıca nanopartikül formlarının biyouyumluluğu nedeniyle kan besin bariyerinden geçebileceği ve etkin salım yaparak kanser hücrelerine hedeflenmesinin sağlanarak sağlıklı hücrelere zarar vermemesi düşünülmektedir. Sağlıklı hücre hattı olarak CCD fibroblast hücreleri ve kanser hücre hattı olarak U87MG glioblastoma hücreleri kullanılmıştır. Bu ikisi arasında kanserli hücreler için MTT ile etkin doz aralığı bulunarak tedavi geliştirilmesi için literatüre katkı sağlanması hedeflenmektedir.

# 2
# GENEL BİLGİLER

## 2.1 Kanser

20. yy öncesinde yabancı hücreler olduğu varsayılan kanser hücrelerinin, histolojinin gelişmesi ve mikroskop kullanımının yaygınlaşmasıyla beraber, vücudumuzdaki hücrelerden köken aldığı kanıtlanmıştır. Bir doku veya organda bulunan hücrelerin kontrolsüz şekilde çoğalmasıyla kanser meydana gelir. Kanser terimi ilk defa tıbbın babası olarak bilinen Hippocrates (MÖ 460-370) kullanılmıştır [1].

Bazı hücreler haricinde (kas ve sinir hücreleri) tüm sağlıklı hücreler bölünme yeteneğine sahiptir. Gelişim döneminin başlarında bu bölünmeler daha hızlı gerçekleşirken ilerleyen dönemlerde bu bölünme yeteneği azalmaya başlar. Hücrenin yaklaşık 50-150 bölünme sonrasında bölünme yeteneğini kaybetme sürecine Hayflick limiti denir. Embriyonik hücrelerde ve kanser hücrelerinde bu bölünme sınırsız olarak devam etmektedir. Hücrenin bölünme fonksiyonlarını çekirdeğinde bulunan DNA yönetir. Hücre DNA'sında meydana gelen hasar öncelikle DNA tamir mekanizmaları ile onarılmaya çalışılır. DNA onarılamazsa apoptoz ile hücre ölümü gerçekleşir. DNA yapısını bozan başlıca çevresel faktörler; kimyasallar, virüsler, sigara, UV ışınıdır. Eğer hücre DNA'sını tamir edemez veya hücre ölümü gerçekleşmezse mutasyona uğrayan hücre devamlı bölünme yeteneği kazanır [2]. Morfoloji kaybıyla oluşan primer tümörler köken aldıkları doku ile benzer özellikler gösterir. Bu tümörler bulundukları yerde kalabilir (benign tümör) veya başka doku ve organlara metastaz yapabilirler (malign tümör). Kanser hücrelerinin karakterizasyonu için çalışmaları bulunan Hanahan ve Weinberg en önemli 6 ayırt edici özelliği sıralamayı başarmışlardır. Şekil 2.1'de bu 6 özellik gösterilmiştir. [3]

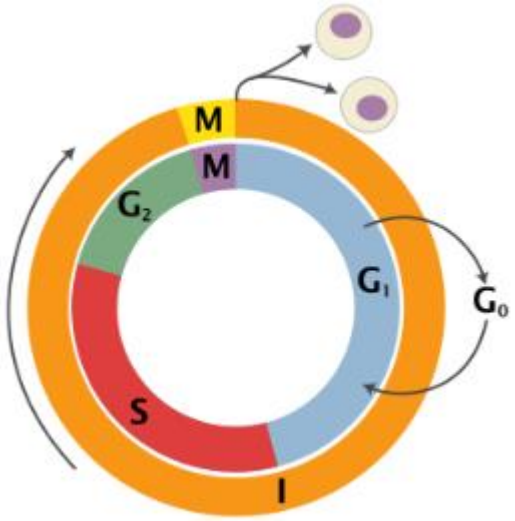



**Şekil 2.1** Kanserin karakteristik özellikleri

Kanser hücrelerinin hücre döngüsü kontrol noktalarında ve DNA tamir mekanizmalarında mutasyon sonucu veya kalıtsal olarak kusur bulunmaktadır [4].

Hücre bölünmesi DNA'nın replike olarak iki katına çıkması ve iki özdeş hücreye ayrılması sürecini kapsamaktadır. Bu süreci yöneten başlıca 4 faz bulunmaktadır. DNA replikasyonu öncesinde G1 fazı, hazırlık aşamasını yöneterek hücrenin büyümesine sebep olur. Ardından S fazında DNA replikasyonu gerçekleşir ve DNA miktarı iki katına çıkar. Artan DNAnın mitoza hazırlık aşamasında G2 fazı göre alır. Bunları takiben M fazına geçen hücrede mitoz gerçekleşir. Hücre bölünmesi için herhangi bir sinyal oluşmadığı takdirde hücre G0 denilen bir ara fazda dinlenme durumunda bekler. Vücudumuzdaki farklılaşmasını tamamlayan ve artık bölünme yeteneğini kaybeden birçok hücre G0 fazında kalmaktadır. Epitel hücreler gibi devamlı bölünen hücreler ise G0 dinlenme fazına geçmeyerek devamlı bölünürler [5,6]. Bu döngünün düzenli bir şekilde ilerlemesini sağlayan her faz arasında kontrol noktaları bulunmaktadır. G1-S kontrol noktası hücrenin büyümesinin yeterli olup oladığını ve DNAnın replikasyona hazır olup olmadığını kontrol eder. S-G2 fazı replike olan DNAnın raplikasyonunun doğru bir şekilde gerçekleşmesinden ve DNA'da bir hasar oluştuysa bunun tespit edilmesinden sorumludur. G2-M kontrol noktasında hücrenin mitoza hazır olması halinde bir sonraki bölünme aşamasına geçebilir. Mitoz sonlarına doğru M kontrol noktası

kromozomların iğ ipliklerine tutunmasını ve doğru şekilde eşleşmenin yapılmasını denetler. Doğru şekilde kromozomların hücrelere dağılımı sağlanarak sitokinez gerçekleşir ve iki özdeş hücre oluşumu ile döngü tamamlanır. Eğer bu noktalarda bir kusur tespit edilirse bölünme geçici bir süre durdurularak hasarın onarılması veya gerekli işlemlerin tamamlanması için süre tanınır. Hasar onarılamazsa bir sonraki aşamaya geçiş engellenir. Şekil 2.2'de hücre döngüsü kontrol noktaları gösterilmiştir [7,8].




**Şekil 2.2** Hücre döngüsü kontrol noktaları

Bu kontrol noktalarında siklinler, siklin bağımlı kinazlar (Cdk) ve düzenleyici proteinler göre almaktadır. Cdklar farklı siklin grupları ile kompleks oluşturabilirler. Siklinler belirli proteinlerin fosforile edilmesinde seçicilik sağlarlar. Cdk miktarı hücrede sabit kalırken siklin oranının değişimi hücre döngüsün kontrolünde rol oynamaktadır.

## 2.2 Beyin Kanseri

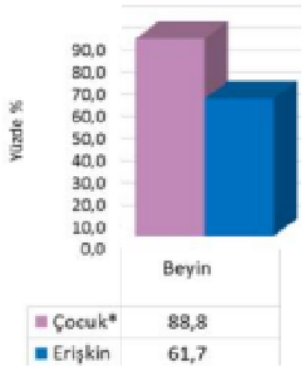
Beyinde oluşum gösteren tümör, primer beyin tümörü; başka organlarda oluşarak beyine metastaz yapan tümörler, sekonder beyin tümörü olarak adlandırılır. Primer tümörler büyüme hızına göre; düşük dereceli ve yüksek dereceli olarak ikiye ayrılmaktadır. Beyinde glial hücrelerin neden olduğu primer tümörler gliomalar olarak adlandırılır. Beyin tümörlerinin büyük kısmını oluştururlar.

### 2.2.1 Risk Faktörleri ve Epidemiyolojisi

Beyin tümörünün nedeni tam olarak aydınlatılamamıştır Ancak şüphelenilen risk faktörleri şunlardır; [3]

- Yaş
- Cinsiyet
- Stres faktörleri
- Kalıtımsal faktörler
- Enfeksiyon, virüs ve alerjen maruziyeti
- Elektromanyetik alan maruziyeti
- Irk ve Etnik köken
- İyonlaştırıcı radyasyon
- Kafa travması ve nöbetler
- N-nitrozo bileşikleri

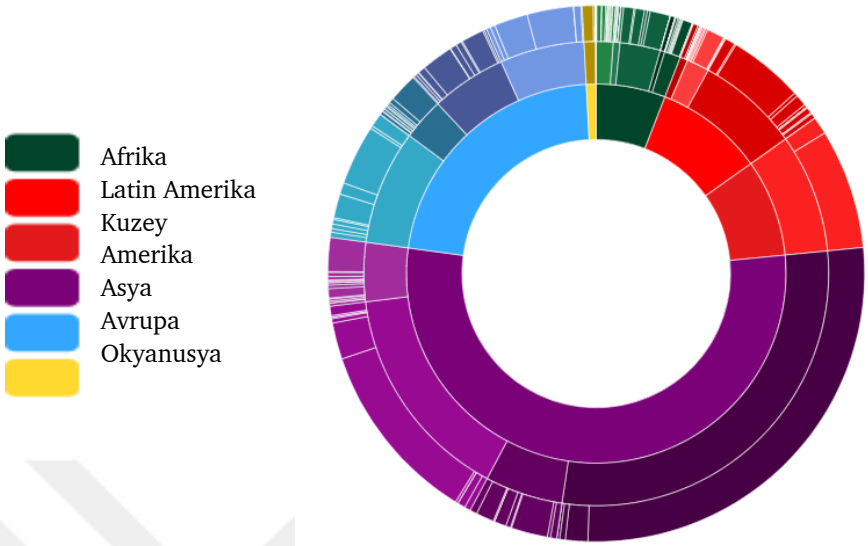
Dünya genelinde beyin kanseri en çok asyada, ikinci sırada Avrupa'da görülmektedir. Yaşlara bağlı değerlendirildiğinde yetişkinlerde beyin kanserinin görülme oranı daha yüksek bulunmuştur. 0-19 yaş grubu çocuk olarak değerlendirilirken, 20+ yetişkin olarak değerlendirilmiştir. Bu oran Şekil 2.3'te gösterilmiştir [9].




**Şekil 2.3** Çocuklarda ve erişkinlerde beyin kanseri görülme oranı

Cinsiyetlere göre değerlendirildiğinde malign beyin tümörlerinin görülme sıklığı erkeklerde %74, kadınlarda %54 olarak bulunmuştur. Buna karşın bening beyin tümörlerinin kadınlarda görülme sıklığı erkeklerden fazladır. Beyin kanserinde beş yıllık sağ kalım oranı %46, on yıllık sağ kalım oranı %35'tir. DSÖ verilerine

göre tüm cinsiyet ve yaş grupları için beyin kanserinin öldürücülük oranı Şekil 2.4'te gösterilmiştir [10].




**Şekil 2.4** Beyin kanseri öldürücülük oranı

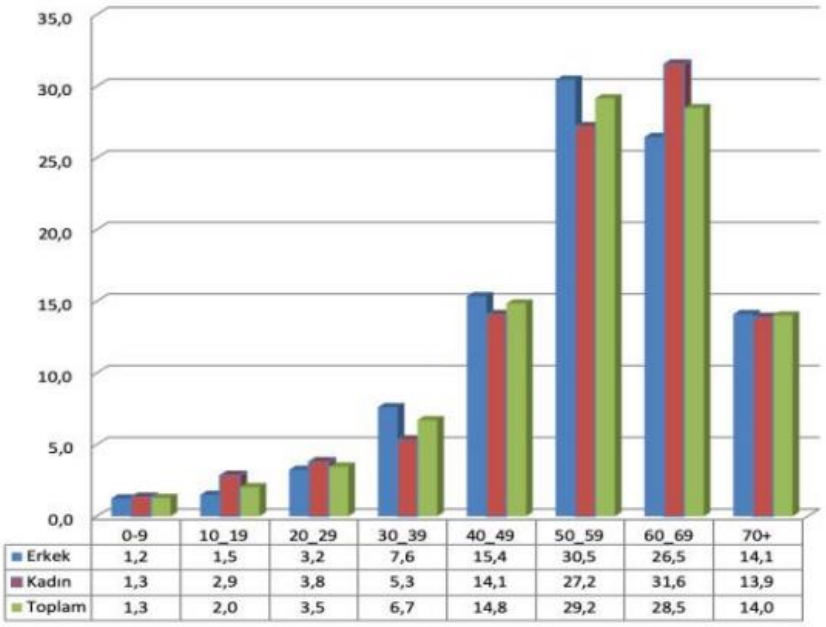
### 2.2.2 Türleri

Beyin kanser türleri arasında en sık karşılaşılan gliomalar, beyinde glial hücrelerin neden olduğu primer tümörlerdir. Glioma türleri;

- Astrositomlar: En sık görülen türü astrositomlardır. Beyincik hücrelerinin ve beyincikte bulunan astrosit adı verilen glial benzeri hücrelerin oluşturduğu tümörlerdir. Astrositomlar derecelerine göre 4'e ayrılmaktadır. İyi huylu olan ve çevre dokulara yayılmayan pilositik astrositomlar I. derece tümörlerdir. Diffüz astrositomlar çevre dokulara yayılabilen yavaş büyüyen II. Derece malign tümörlerdir. Anaplastik astrositomlar çevre dokulara yayılabilen ve hızlı büyüyen III. Derece tümörlerdir. Glioblastoma astrositomlar arasındaki en agresif IV. Derece tümörlerdir.
- Oligodendroglioma: Oligodendrogliomalar, oligodendrosit adı verilen glial hücrelere benzeyen bir tümördür. Düşük dereceli ve yüksek dereceli olabilirler.
- Ependimom: Genellikle beyin omurilik sıvısının üretildiği ve depolandığı geçitlerde başlayan ve omurgaya yerleşen tümörlerdir.

- Beyin sapı gliomu: Beyin sapı ucunda bulunan glial hücrelerin oluşturduğu tümörlerdir [3].

Bir astrositom türü olan gliobastoma multiform (GBM), beyin kanserleri arasında sağ kalım oranı en az olan türüdür. Bu oran erkeklerde 11,6 ay iken kadınlarda 13,3'tür. Şekil 2.5'te sağ kalım oranı cinsiyetlere ve yaşlara göre gösterilmiştir [9].




| | 0-9 | 10_19 | 20_29 | 30_39 | 40_49 | 50_59 | 60_69 | 70+ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Erkek | 1,2 | 1,5 | 3,2 | 7,6 | 15,4 | 30,5 | 26,5 | 14,1 |
| Kadın | 1,3 | 2,9 | 3,8 | 5,3 | 14,1 | 27,2 | 31,6 | 13,9 |
| Toplam | 1,3 | 2,0 | 3,5 | 6,7 | 14,8 | 29,2 | 28,5 | 14,0 |

**Şekil 2.5** GBM'nin kadın ve erkekte sağ kalım oranı

GBM, genetik kökeni ve tedaviye yanıt farklılıklarına göre DSÖ tarafından 2016'da 3 gruba ayrılmıştır.

- IDH-Vahşi Tip: Birincil tip GBM vakaların yaklaşık %90ında görülmektedir. 55 yaş üzeri kişilerde daha yaygın karşımıza çıkan ve kliniği tanımlanmış GBM türüdür. PTN (MMC I) mutasyonu, CDKN2A (p16) silinmesi ve az sıklıkla MDM2 amplifikasyonu ile karşılaşılmaktadır [11]. Reseptör tirozin kinazlar (RTK) GBM'nin malign tümöre dönüşümünde önemli rol oynamaktadır. Hücre yüzeyinde bulunan RTKlar büyüme faktörlerinin bağlanması sonucu aktive olurlar. Epidermal büyüme faktörü reseptörleri (EGFR) sinyalizasyonu MSS'deki hücrelerin proliferasyonunu, farklılaşmasını ve yaşamını sürdürmesi için gerekli fonksiyonları sağlaması açısından oldukça önemlidir. RTKde meydana gelen mutasyon EGFR'nin

aşırı ekspresyonuna ve MSS hücrelerinin devamlı aktif proliferasyonuna neden olabilir [12]. Ayrıca EGFR'de meydana gelen mutasyon heterozigotluk kaybı sonucunda protein tirozin fosfotaz ve tensin homologu olan PTEN geninin silinmesi ile karakterize olmaktadır [13]. Bunların yanı sıra yapılan bir çalışmada telomeraz ters transkript (TERT) mutasyonunun yalnızca birincil GBM'de meydana geldiği gösterilmiştir [14].

- IDH-Mutant Tip: İkincil GBM vakaları daha çok erken yaşlarda görülmektedir ve teşhis edilebilmektedir. GBM vakalarının yaklaşık %10unu oluşturmaktadır. Hastalar arasında yaygın olarak glioma öyküsü bulunmaktadır. Sıklıkla izositrat dehidrojenaz (IDH) mutasyonları ile karşılaşılmaktadır [11]. MGMT gen bölgesi promotorunun metilasyonu birincil GBM'ye kıyasla ikincil GBM'de daha çok karşılaşılan bir olaydır [15].
- GBM NOS: Üçüncü olarak karşımıza çıkan GBM türünde IDH değerlendirmesi yapılamamaktadır. Bu sebeple ayrı bir grup olarak değerlendirilmektedir.

### 2.2.3 Tedavi Yöntemleri

Tedavi seçenekleri ve öneriler birkaç faktöre bağlıdır:

- Tümörün boyutu, tipi ve derecesi
- Tümörün beynin hayati kısımlarına baskı yapıp yapmadığı
- Tümör merkezi sinir sisteminin veya vücudun diğer bölgelerine yayılmışsa
- Olası yan etkiler
- Hastanın tercihleri ve genel sağlık

Beyin tümörünün bazı semptomları şiddetli olabilir ve günlük yaşantıda hastaya veya hastayla ilgilenen kişilere birçok problem çıkartabilir. Buna karşın çoğu semptom ilaç kullanımı ile yönetilerek karşılaşılan problemlerin önüne geçilebilir. Beyin tümörü olan kişiler için destekleyici ilaçlardan biri olan kortikosteroidler beyinde oluşan şişliği azaltarak şişlikten kaynaklanan ağrıyı da hafifletir bu sayede

nörolojik semptomların da görülme oranı düşer. Ayrıca nöbet önleyici çeşitli ilaçlar da reçete edilebilir.

Beyin tümörü tiplerine göre farklı tedaviler uygulanmaktadır. IDH mutasyonu ile 1p/19q delesyonuna bağlı olarak gelişen II. Ve III. Derece beyin tümörü olan kişiler için kemoterapi ve radyasyon tedavisi uygulanmaktadır. Gerekli görüldüğü zamanlarda iki tedavinin birleşimi olan kemoradyasyon tedavisi de uygulanabilmektedir. 1p/19q delesyonuna sahip olmayan IDH mutasyonuna bağlı gelişen II. Ve III. Derece tümörlerde radyasyon tedavisi sonrasında temozolomid (TMZ) uygulanır. Kemoterapötik bir ilaç olan TMZ radyasyon tedavisi ile birlikte de verilebilmektedir. IDH mutasyonu veya 1p/19q delesyonuna bağlı olmayan tümörlerin II. Ve III. Derece ile IV. Derece tümör tedavilerinde PCV kemoterapisi radyasyon tedavisi ile birlikte önerilmektedir. PCV, Prokarbazin, Karmustin, Vinkristin maddelerinden oluşan temazolomidden çok daha etkili bir ilaç karışımıdır. Yan etkilerinin TMZ'den daha fazla olması nedeniyle ilk aşamalarda pek tercih edilmemektedir. GBM gibi IV. Derece tümörlerinde radyasyon ve kemoterapi tedavisinden sonra 6 ay TMZ kullanımı ve sonrasında alternatif elektrik alan tedavisi önerilmektedir [16].

TMZ, MSS'ye etki eden kematerapötik bir ajandır. Yüksek KBB geçirgenliğine sahiptir [17]. PCV içeriğinde bulunan maddelerin KBB geçirgenliği oldukça düşüktür ancak bu maddelerden özellikle vinkristin oldukça toksiktir ve düşük bir miktarının KBB'yi aşması tedavi için olumlu yanıt oluşmasına yeterlidir [18].

### 2.2.4 Kan Beyin Bariyeri

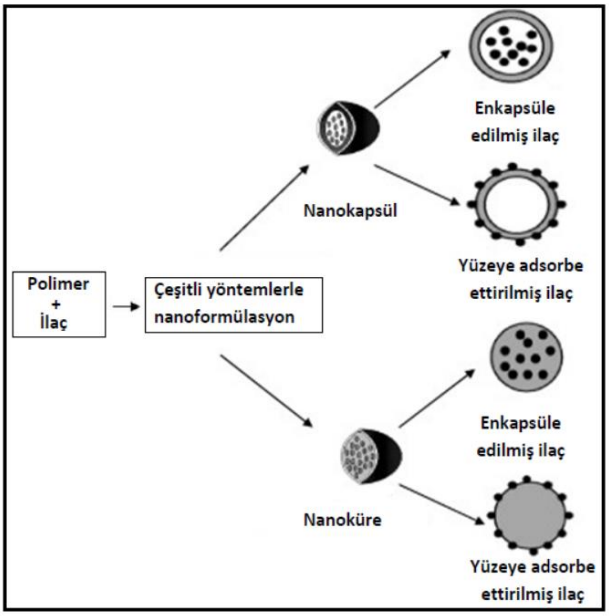
Merkezi sinir sistemi (MSS), insan vücudundaki en önemli ve hassas sistemdir. Uygun nöronal fonksiyon hücre içi ve hücreler arası sıvıda $Na^{+}$, $K^{+}$ ve $Ca^{2+}$ gibi iyon konsantrasyonlarının belli bir sınırları içinde tutulması ile sürdürülmektedir. KBB endotelyal hücreler, perisitler, bağışıklık hücreleri, astrositler ve bazal membrandan oluşan kompleks yapıdır ve merkezi sinir sistemi MSS'ni sistemik dolaşımdaki çeşitli toksinlerden ve patojenlerden korumaktadır. Bu mekanizmalar sistemik dolaşımdan beyine iyonların ve besin maddelerinin girişini düzenlemektedir. KBB'nin kısıtlayıcı eşsiz doğası aynı zamanda çok sayıda terapötik maddelerin, MSS ilaçlarının %98'inden

fazlasının beyine erişimini kısıtlamaktadır. KBB'yi geçerek beyin dokusuna erişmek, bilim adamları için son birkaç yüzyıldan günümüze en büyük zorluklardan biridir. KBB'nin aşılması için non-invaziv yöntemler geliştirilmiştir. Kimyasal olarak ilaçlar influks veya efluks inhibitörlerle birlikte verilmesi; biyolojik olarak peptid aracılı ilaç taşıyıcılar, kolloidal ilaç taşıyıcılar, ezsozomlar, nanopartiküller, polierik nanopartiküller, polimerik miseller, lipozomlar, dendrimerler kullanılmaktadır. Ayrıca KBB'nin aşılması non-invaziv olmayan yöntemlerle de sağlanabilir. Bu yöntem KBB bütünlüğünü bozmaya yönelik uygulamaya sahiptir [19].

## 2.3 Nanoteknoloji ve Nano İlaç Taşıma Sistemleri

Yunanca kökenli nano cüce anlamına gelmektedir. Metrenin milyarda birini ifade eder. Nanoteknoloji, boyut olarak 1-100 nanometre düzeyinde olan nanoparçacıkların bilimi olarak bilinmektedir [23]. Fraday'ın altın nanopartikülleriyle olan çalışması nanoteknolojinin temellerini oluşturmuştur. 20. yy başlarında taramalı tünelleme mikroskobu (STM) ve atomik kuvvet mikroskobunun (AFM) geliştirilmesi ile nanoteknolojik gelişmeleri hızlandırmıştır. Gelişmeler sayesinde nano boyutlarda görüntüleme yapılarak nanomalzemelerin işlenebilmesinin önü açılmıştır [24]. Günümüzde elektronik, kimya, endüstri, moleküler biyoloji ve sağlık gibi birçok farklı alanda nanopartiküllerin kullanımı yaygınlaşmıştır. Özellikle sağlık alanında hastalıkların erken teşhisi ve tedavisinde umut vadeden sonuçlar elde edilmiştir. Nanoteknoloji ile nano ilaç salınım sistemleri geliştirilerek uygulanacak olan ilaç aktif maddesi yeterli yoğunlukta ve ayarlanabilir doz aralığında dokuya organa veya hücreye hedeflendirilebilmektedir. Bu şekilde ilacın yan etkilerin önüne geçilerek sağlıklı hücrelere verebileceği zarar minimalize edilmektedir [25]. Son dönemlerde kanser ve aşı geliştirme çalışmalarında nano ilaç sistemlerinden yararlanılarak umut verici sonuçlar elde edilmiştir. Normal ilaç kullanımında karşılaşılan kanser dokusuna ulaşma, kan beyin bariyerini geçmek gibi problemlerin önüne geçilmesinde büyük avantaj sağlanmıştır. Tedaviler başarı ile sonuçlanmıştır [24].

Nanopartiküller üretim yöntemlerine göre nanokapsül ve nanoküre olarak ikiye ayrılmaktadır (Şekil 2.6).




**Şekil 2.6** Nanokapsül ve nanoküre yapısı [26]

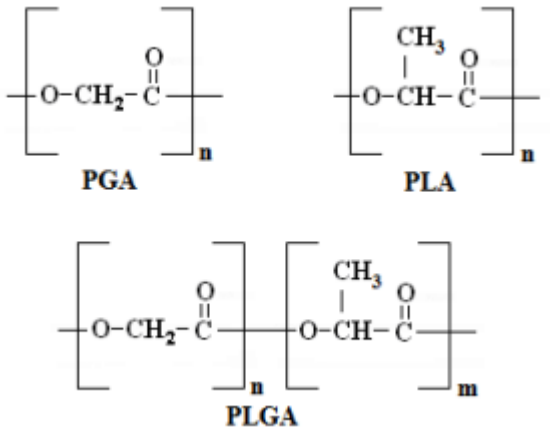
Nanoküreler ilacı içinde veya yüzeyinde taşıyan matris sistemlerdir. Etken madde, polimer moleküle enkapsüle edilerek veya kimyasal adsorbsiyon ile tutunarak oluşturulurlar. Stabilitesini uzun süre koruyabilen hedeflenmesi kolay yapılardır [27].

Nanokapsül ile ilacın genellikle polimer içinde hapsedildiği veziküler sistemlerdir. Etken madde, molekül yüzeyinde adsorbe olarak da bulunabilmektedir. Hazırlanma yöntemlerine göre lipofilik veya hidrofilik özellikte bulunabilirler [28].

Diğer ilaç taşıma sistemleri ile karşılaştırıldığında yüzey-hacim oranının daha fazla olması, membran gözeneklerinin daha küçük boyutlarda olması gibi özellikleri biyolojik bozunma süresi ve difüzyonunu sırasında nano ilaç taşıyıcı sistemleri öne çıkmaktadır. Ulaşması zor hücre içi ve dışı alanlara kolaylıkla ulaşabilmektedirler [29]. Birçok avantajı olan nanopartiküllerin dezavantajlarının da olabileceği üzerine çalışmalar yapılmıştır. Boyutları nedeniyle içerisine yüklenebilen madde miktarının bir sınırı vardır. Yine küçük boyutlarda olması ile hedef organa veya dokuya geçiş miktarının tam ayarlanamaması sonucu dokuda birikmeye başlaması dezavantajı olarak gösterilebilektedir [30].

### 2.3.1 Polimerik Nanopartiküller

Diğer kolloidal taşıyıcı sistemleriyle kıyaslandığında polimerik yapıdaki nanopartiküller biyolojik sıvılarda stabilitesini korumada daha iyidir. Katı matriks içerisinde bulunan etken madde daha iyi korunduğundan istenilen dokuya ulaşma şansı daha yüksektir ayrıca salınımın uzun süre sağlanabildiği kontrollü sistemlerdir. Biyomateryallerle üretilmeleri nedeniyle vücutta parçalanmaları sonucu oluşan atık ürünler toksik etkiye sebep olmamaktadır. Üretimi basit ve kolaydır [31]. Başlıca kullanılan sentetik polimerler PLA (Poli(laktik asit)), PGA (Poli(glikolik asit) ve PLGA Poli(laktid-ko-glikolid asit)'dır [26]. Şekil 2.7'de sentetik nanopartiküller gösterilmiştir.




**Şekil 2.7** Sentetik nanopartiküller

#### 2.3.1.1 PLA

Metil yan grubu polimere hidrofobik özellik kazandırmaktadır. Hidrolize daha dayanıklıdır. Yarı kristal yapıda bulunur. Kırılgan ve sıcaklık stabilitesi düşüktür.

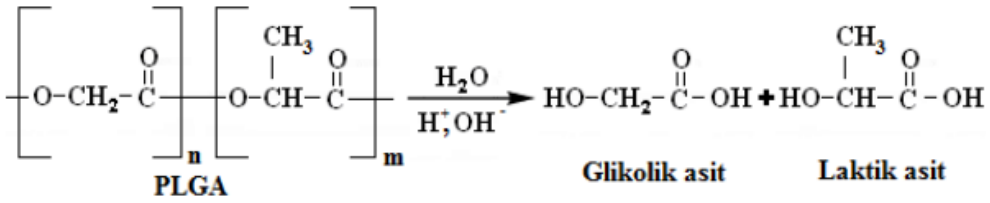
#### 2.3.1.2 PGA

Metil yan grubu içermez. PGA'nın kristal yapısı PLA'dan daha yüksektir ve bu nedenle birçok organik çözücüde çözünmez.

#### 2.3.1.3 PLGA

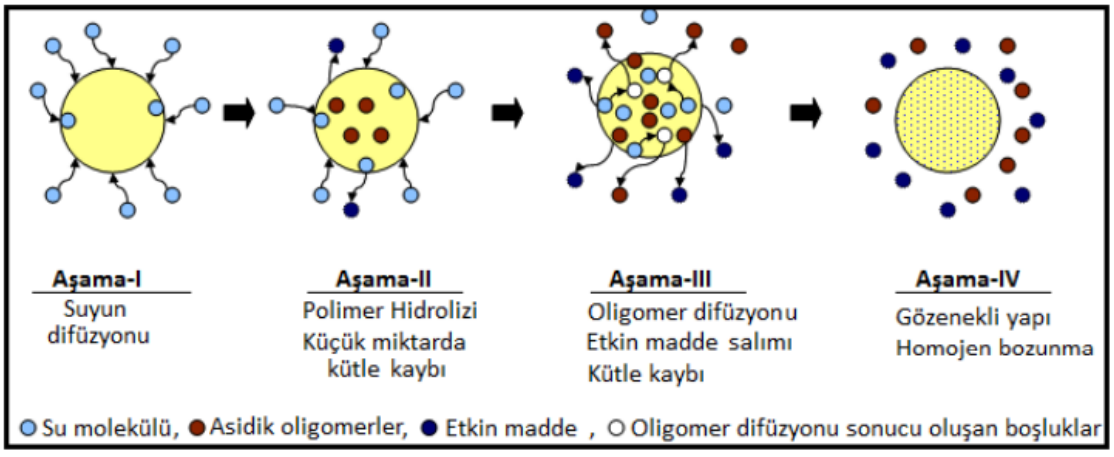
PLGA üretilirken PLA ve PGA kullanılmaktadır. Glikolik ve laktik asit oranları değiştirilerek kristalik derecesi kontrol edilmektedir [32,33]. Fizyolojik ortamda inert olan PLGA biyolojik ortamda toksik olmayan glikolik asit ve laktik asite

parçalanır (Şekil 2.8). Bu iki monomer sitrik asit döngüsüne katılarak CO2 ve H2O olarak vücuttan uzaklaştırılır. FDA tarafından onaylanmış bir biyopolimerdir [34].




**Şekil 2.8** PLGA'nın bozunması

PLGA bozunması su moleküllerinin hücre içerisine girmesi ve polimerik nanopartikül içerisindeki maddelerin bu esnada oluşan gözeneklerden dışarı çıkması ile devam etmektedir. Gözenekli yapı homojen bozunmaya uğrayarak içerisindeki maddenin bu süreçte yavaş bir şekilde salımının devam etmesini sağlamaktadır. Şekil 2.9'da salım aşamaları ifade edilmiştir [35].




**Şekil 2.9** PLGA'dan madde salımı

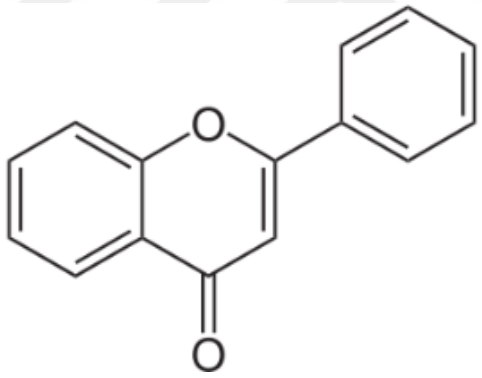
### 2.3.2 Nanopartikül Sentezi ve Karakterizasyonu

Nanopartikül üretiminde etken maddenin hidrofobik veya hidrofilik omasına göre farklı yöntemler kullanılabilmektedir. Sıklıkla kullanılan bazı yöntemler; emülsiyon polimerizasyonu. yüzeyler arası polimerizasyon, yüzeyler arası polikondenzasyon, emülsiyon oluşturma / çözücü difüzyon ve nebülizasyondur [36]. Hidrofobik özellikteki moleküllerin sentezi için bu yöntemlerden emülsiyon oluşturma / çözücü uçurma yöntemi tercih edilmektedir. Sonrasında reaksiyon verimi, enkapsülasyon verimi ve ilaç yükleme verimleri hesaplanır [37,38].

Nanopartikül sentezinden sonra karakterizasyonunu belirlemek ve standardize edebilmek oldukça önemlidir. İlacın nanopartiküle yüklenme oranı, partikül büyüklük ve dağılımı, salım yapma oranı belirlenmelidir. Boyut analizi için dinamik ışık saçılması yöntemi ile çalışan Zeta-Sizer kullanılır. Oluşan katı nanopartikülün morfolojik incelemesi genellikle altın ile kaplandıktan sonra taramalı elektron mikroskobu (SEM) cihazında incelenir. Nanopartikül yüzeyinde bulunan fonksiyonel gruplar FT-IR spektroskopisi ile belirlenerek UV-vis spektrometrisi ile moleküllerin pik verdiği dalga boylarından molekül miktarı hesaplanır.

## 2.4 Flavonoidler

Flavonoidlerin 4000'den fazla türü olduğu düşünülmektedir. Bitkisel gıdalarda bol miktarda bulunan bu bileşikler ortak fenilbenzopiron iskeleti bulundurur (Şekil 2.10). Merkezinde bulunan piran halkasının doygunluk oranı ve açılma oranına göre 7 alt gruba ayrılmaktadır (Tablo 2.1) [39,40].




**Şekil 2.10** Flavonoid yapısı

**Tablo 2.1** Flavonoid çeşitleri

| Flavanoller | Flavonoller | Flavanonlar | Flavonlar | Flavanoller | İzoflavonlar | Antosiyanidinler |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Catechin<br>Epicatechin | Quersetin<br>Rutin<br>Kaempferol<br>Rhamnetin | Naringenin<br>Eriodiktol<br>Hesperidin | Chryisin<br>Apigenin<br>Luteolin | Catechin<br>Epicatechin | Daidzein<br>Genistein<br>Glisitein | Siyanidin<br>Delfinidin<br>Peonidin<br>Malvidin |

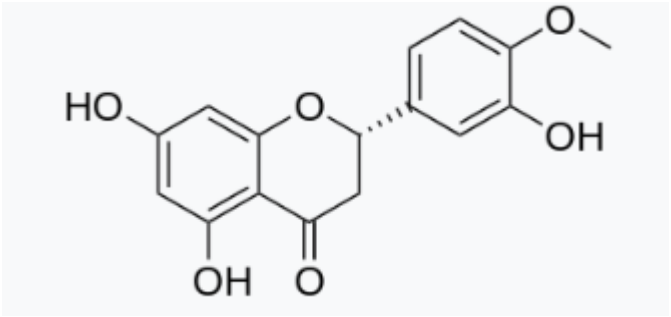
Flavonoidlerin araştırılması ile antioksidan, antiproliferatif, antimutajenik etkileri ortaya çıkmıştır. Özelliklerini şu şekilde sıralayabiliriz: [41]

- Antitümör etkisi
- Antiviral etkisi
- Antirombotik etki
- Antiinflamatuar etki
- Antiallerjik etki
- Aterosklerosis ve kroner kalp hastaliklanndan koruma etkisi
- Vasodilatasyon etkisi
- Hücresel immünitenin sitümülasyonu etkisi

Tümör hücre hatları üzerinde yapılan araştırmalar neticesinde apoptozu tetikleyerek hücre proliferasyonunu düzenlediği bulunmuştur [42,43]. Bunların yanı sıra flavonoidlerin yapısal özellikleri sayesinde yüksek seçiciliğe sahip KBB'yi aşabildiği çalışmalar literatürde mevcuttur. [44,45]

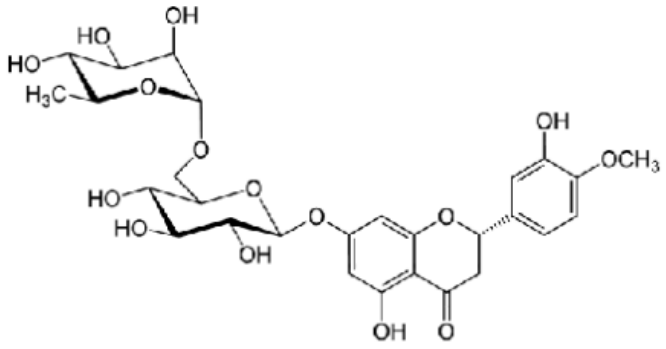
### 2.4.1 Hesperetin

Hesperetinin moleküler yapısının IUPAC isimlendirmesi (2 S )-3',5,7-Trihidroksi-4'-metoksiflavan-4-on şeklindedir. Şekil 2.11'de gösterilmiştir.




**Şekil 2.11** Hesperetin moleküler yapısı

Hesperetinin 7-O-glikoziti olan hesperidin (Şekil 2.12), limon ve tatlı portakallarda doğal olarak bulunan flavanon-glikozit biyoaktif özelliktedir. [46]

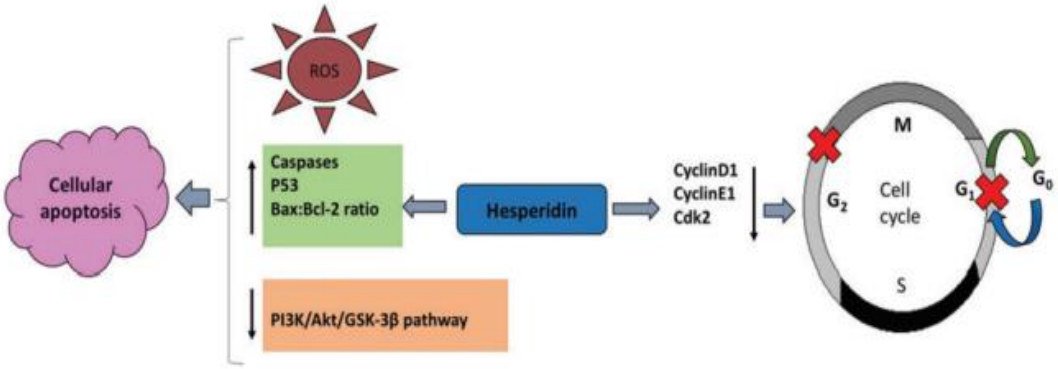



**Şekil 2.12** Hespiridin yapısı

Günlük olarak vücudun ihtiyaç duyduğu flavonoid miktarını önemli ölçüde karşıladığı bilinen hesperetin Çin'de ilaç olarak reçete edilmektedir [47]. Hesperetinin hücre döngüsü üzerindeki progresyonu araştırılmıştır. Benzer çalışmalar ile hesperetinin antikanser aktivitesi tespit edilmiştir. Meme, kolon, gastrointestinal, akciğer gibi kanserlere karşı etkili olduğu bulunmuştur [48,49,50,51]. Hesperetinin umut verici bu özelliğine rağmen hidrofobik karakteri nedeniyle klinikte kullanımı kısıtlıdır. Nanoformülasyonu geliştirilerek bu engelin aşılmasına olanak sağlanır [52].

### 2.4.1.1 Etkilediği Yolaklar

Hesperetinin yüksek glikoz uygulaması ile oksidatif stresin artırıldığı hücrelerde serbest oksijen radikallerini temizleyerek oksidatif stresi azalttığı bulunmuştur. Akt veya β-katenin blokajı ile glikoz seviyesinin düşürülmesini sağlamaktadır [53]. Epitelden mezenkimale geçişe olanak sağlayan büyüme faktörü TGF-β1'in aktive edildiği hücrelere hesperetin uygulandığında mTOR aktivasyonu ile TGF-β1'i inhibe ettiği tespit edilmiştir [54]. Akciğer kanseri hücrelerinde yapılan bir çalışmada hesperetinin apoptoz ajanı olan FADD geninin yukarı düzenlemesini ve kaspaz 8'i aktivasyonunu sağlayarak hücreyi apoptoza götürdüğü bulunmuştur [55]. Ayrıca hesperetin uygulanan kanser hücrelerinin G0 evresinde kalma eğilimi gösterdiği tespit edilmiştir [56]. Miyeloid lösemi hücrelerinde yapılan bir çalışmada Kaspaz 3 ve JAK/STAT yolağını aktive ederek hücrenin apoptoza gitmesine neden olmaktadır [57] Şekil 2.13'te hesperetinin etki mekanizması gösterilmiştir.

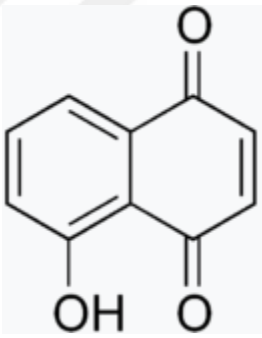



**Şekil 2.13** Hesperetinin etki mekanizması

Yapılan birçok çalışma ile hesperetinin antikanser etkisi kanıtlanmış olup moleküler mekanizması aydınlatılmaya çalışılmaktadır. Dolaylı veya doğrudan birçok moleküler mekanizmayı düzenleyen hesperetinin ilaç uygulaması için kombinasyon tedavileri ve nanoformülasyonları geliştirilmeye devam etmektedir.

## 2.5 Juglon

Juglonun IUPAC isimlendirmesi 5-Hidroksinaftalin-1,4-dion şeklindedir ve Şekil 2.14'te moleküler yapısı gösterilmiştir.



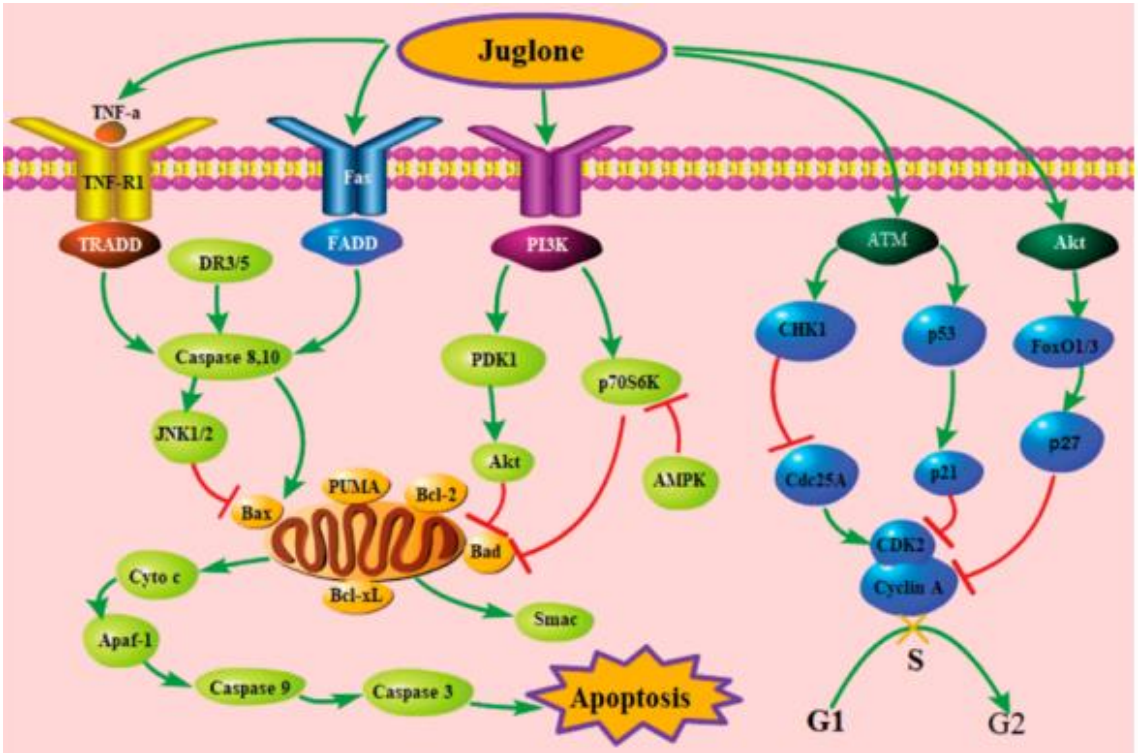

**Şekil 2.14** Juglon moleküler yapısı

Juglon, Juglandaceae familyasındaki bitkilerin yapraklarında, köklerinde, kabuklarında, meyvelerinde ve kabuğunda doğal olarak bulunur ve birçok bitki türü için toksiktir veya büyümeyi geciktirir [58].

İlk defa 1851 yılında ceviz ağacından A. Vogel Jr. ve C. Reischauer tarafından juglon bileşiği izole edildi. Önceki zamanda nusin olarak bilinen juglon sonradan 1887'de A. Bernthsen ve A. Semper tarafından sentezlenerek karakterize edildi [59].

Juglonun son zamanlarda güçlü antitümör aktivitesi birçok farklı kanser hücre hattı üzerinde gösterilmiştir [60,61,62,63]. Ayrıca antifungal ve antibakteriyel özellikleri de bulunmaktadır [64]. Sitotoksik özellikleri nedeniyle düşük dozlarda yüksek etkinlik gösteren güçlü bir organik moleküldür. Serbest ve nanopartikül formlarının değerlendirilmesi sonucunda nanopartikül formunun daha yüksek aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Juglonun nanopartikül formülasyonu ile yararlı etkileri daha da artırılabilir [65,66].

### 2.5.1 Etkilediği Yolaklar

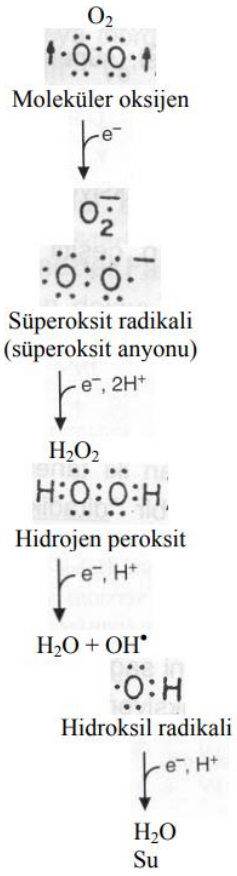



**Şekil 2.15** Juglonun etkilediği yolaklar

Juglonun sitotoksik etkisi oksidatif stresi indükleyerek hücre zarı hasarı oluşturmasına ve hücrenin apoptaza gitmesine neden olmaktadır [68]. Moleküler mekanizmaları incelendiğinde tümör hücrelerini doğrudan öldürdüğü, hücre döngüsünün S fazını inhibe ettiği, potasyum kanalını bloke ettiği bulunmuştur [67,69]. Mitokondri bağımlı apoptozu indükler. Mitokondriyal membran bozarak Bax/Bcl2 nin artmasına neden olur. Sitokrom-c salınmasını sağlayarak kaspazları aktive eder ve hücre apoptoza gider. Şekil 2.15'te juglonun etkilediği yolaklar gösterilmektedir.

## 2.6 Antioksidan ve Oksidatif Stres

Moleküler oksijen ($O_2$) serbest radikallerle kolaylıkla reaksiyona girmektedir. Redoks tepkimesi sonucu reaktif oksijen türleri (ROS) oluşur. Bu ROS türleri süperoksit radikali ($O_2 \cdot -$), hidrojen peroksit ($H_2O_2$) ve hidroksil radikali (OH•)dir. Reaksiyon sonucu oluşan süperoksit radikali direkt olarak hücreye zarar vermemesine rağmen hidrojen peroksit($H_2O_2$) kaynağını oluşturmaktadır. Bu reaksiyon süperoksit dismutaz enzimi tarafından katalizlenmektedir. $H_2O_2$ lipit çözücü özelliği nedeniyle hücre membranlarına hasar vermektedir. ROS türleri arasında en yıkıcı etkiyi hidroksil radikali oluşturmaktadır. Oluştuğu bölgedeki molekküllerden proton kopararak yeni radikal grupların oluşmasına neden olur [70,71]. Şekil 2.16'da moleküler oksijenden ROS türlerinin oluşmaları şematize edilmiştir. Elektron kaybı ile oluşan oksidasyon, biyolojik düzenlemede oldukça sık gerçekleşen bir durumdur. ROS birikimi kimyasal madde maruziyeti ve ilaç kullanımı gibi nedenlerden artar. Artan ROS, lipit, protein, karbonhidrat, DNA, enzim gibi yaşamı önemli derece etkileyen molekülleri olumsuz yönde etkiler. Lipit peroksidasyonuna neden olarak hücre geçirgenliğinin artmasına ve DNA'nın okside olmasına neden olur [72]. Lipit peroksidasyon ürünü olan monaldehit düzeyinde ROS miktarıyla doğru orantılı bir artış görülmektedir. Bu nedenle oksidatif stres markırı olarak MDA düzeyinin ölçülmesi sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir [73]. Hücre sitozolünde bulunan bir enzim olan glutatyon peroksidaz, oksidatif stresle birlikte artış gösteren okside olan glutatyonu redükte glutatyona çevirmekte görevlidir. Lipit peroksidasyonunu önleme açışısından glutatyon, oldukça önemli bir moleküldür [74].




**Şekil 2.16** Moleküler oksijenden ROS oluşumu

ROSların oluşturmuş olduğu oksidatif stresin etkilerini önlemek ve azaltmak için antioksidan savunma mekanizmaları bulunmaktadır. Antioksidanın dört etki mekanizması bulunmaktadır;

- Serbest radikalleri tutarak onları daha zayıf moleküllere çevirir.
- Serbest oksijen radikallerine hidrojen sağlayarak inaktive eder.
- Serbest oksijen radikallerinin zincirlerini kırarak fonksiyon kaybına neden olur.
- Serbest radikallerin oluşturdukları hasarı onarır.

# 3
# MATERYAL VE METOD

## 3.1 Kullanılan Materyaller

### 3.1.1 Kullanılan Cihazlar

Biyogüvenlik Kabini- Hedlab XPROII

Çalkalayıcı- Biosan Environmental Shaker ES20

CO2 İnkübatör- Biosan ES20

Distile Su Cihazı- Sartorius Arium Pro

Elisa Reader- BioTek PowerWave XS2

Hassas Terazi- Shimadzu

Manyetik Karıştırıcı- Variomag Mono

Mini Santrifüj Cihazı- Hermle Z 206 A

Otoklav- Hirayama

pH metre- Hanna

Pipet – Rainin ve ThermoLab

Sıvı Azot Tankı- International Cryogenics, Inc. 20R

Ultrasonik Su Banyosu – Bandelin Sonorex

Vorteks- Velp Scientifica

### 3.1.2 Kullanılan Sarf Malzemeler

fs6, 24 ve 96 Kuyucuklu Plate-NEST

Beher-ISOLAB

Filtre Kağıdı- BIO-RAD 1703965

Flask 25 ve 75 cc'lik-NEST

İnce Uçlu pense

Kriyotüp-ISOLAB

Lam-Lamel-ISOLAB

Parafilm-Bemis

Serolojik Pipetler-SPL Life Sciences

Steril Falkonlar-ISOLAB

Steril Şırınga - Set Medikal

Thoma Lamı-Isolab

### 3.1.3 Kullanılan Kimyasallar ve Kitler

Bakır Klorür ($CuCl_2$) – Sigma Aldrich 222011

Diklorometan (DCM) – Merk

Dimetil Sülfoksit (DMSO) – ChemCruz

Dulbecco's Medified Eagle Medium / F-12 Nutrient Mixture (Ham) (DMEM/F-12 / 1:1 / 1X) – Gibco 1906042

Etil Alkol – Merck

Fetal Sığır Serumu – Gibco 08G5259

Hidroklorik Asit (HCl) – Sigma Aldrich 30721

L-glutamine 200mM (100X) – Gibco1881732

Penisilin-Streptomisin (PEST) – Sigma P4333

Potasyum-sitrat – Fluka

SMART™ BCA Protein Assay Kit

Sodyum Hidroksit (NaOH) – Sigma Aldrich 71690

Sodyum Klorür (NaCl) – Sigma Aldrich 13423

Thiazoyl Blue Tetrazolium Bromide %98- Sigma Aldrich M5655

Tiyobarbitürik Asit ($C_4H_4N_2O_2S$) –T5500

Tripsin EDTA – Multicell

## 3.2 Hücre Kültürü Deneyleri

Deneyde CCD, sağlıklı kolon fibroblast hücre hattı ve U87MG, beyin kanseri olan glioblastoma hücre hattı olarak kullanılmıştır.

### 3.2.1 Tamamlanmış Besiyeri Hazırlama

Ticari olarak satın alınan DMEM/F12 besiyeri içerisine %1 Penisilin-Streptomisin ve %1 L-Glutamin eklenmiştir. Hazırlanan besiyerine %10 FBS eklenerek CCD ve

U87MG hücre hatları bu besiyerinde büyütülmüştür. Hazır haldeki besiyeri +4 °C'de saklanmıştır.

### 3.2.2 Hücre Sayımı

Sanrifüjde pellet içindeki hücreler çözündükten sonra 1:1 oranında tripan mavisi kullanılarak boyanmışlardır. (50 $\mu$l hücre süspansiyonu / 50 $\mu$l tripan mavisi). Pipetaj yapıldıktan sonra thoma lamına yüklenen karışım ışık mikroskobu altında incelenmiştir. Canlı hücreler renksiz ve parlak görünürken ölen hücreler boyayı aldıkları için mavi renkte görüntülenmiştir. Canlı olan hücreler matrikslerin en az 4 tanesinde sayılarak ve ortalama alınarak hesaplanmıştır. Hesaplama;

*Ortalama hücre sayısı x dilüsyon faktörü x sabit sayı($10^4$) x toplam hacim*

şeklinde yapılmıştır.

### 3.2.3 Hücre Pasajı

Hücre üzerinden besiyeri çekilerek PBS ile yıkama yapılmıştır. Ardından Tripsin eklenerek inkübatöre kaldırılmıştır. Yaklaşık 3 dk bekletilerek mikroskopta hücrelerin kalktığı gözlemlenmiştir. Sonrasında tripsin miktarının en az 2 katı kadar besiyeri eklenerek tripsin aktivitesi durdurulmuştur. Serolojik pipetle kalkan hücreler toplanarak 15lik falkona aktarılmıştır. 1000rpm/5dk santrifüjlenerek süpernatant atılır ve çöken hücreler besiyeri içerisinde çözülerek T25 ve T75 flasklarına aktarılır. 37 °C'de %5'lik $CO_2$ içeren inkübatöre kaldırılarak yaklaşık %70 doluluk oranına ulaştıkça pasaj işlemi tekrarlanır.

### 3.2.4 Hücre Dondurma

Hücrelerin bir kısmı deneylerde kullanılırken bir kısmı da sonra kullanılmak üzere dondurulmuştur. Dondurma işlemi için %90 FBS ve %10 DMSO içeren solüsyon hazırlanır. Dondurulacak hücre yüzeyindeki besiyeri atıldıktan sonra PBS ile yıkanır. Tripsin ile kaldırılan hücreler falkon içine alındıktan sonra 1000 rpm/5dk santrifüjlenir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hazırlanan dondurma solüsyonu içinde pellet çözünür. 1'er ml kriyotüplere aktarılmasının ardından öncelikle -20°C dondurucuya kaldırılır. Sonrasında kademeli olarak -80°C'ye ve azot tankına yerleştirilmiştir.

### 3.2.5 Hesperetin Konsantrasyonunun Ayarlanması

800 $\mu$M stok hazırlamak için 1,7 mg hesperetin tartılarak üzerine 8 $\mu$L DMSO ve 7992 $\mu$L tamamlanmış besiyeri eklenmiştir. 800 $\mu$M olarak hazırlanan stoktan 700, 600, 500, 450, 400, 300, 250, 200, 100 ve 50 $\mu$M seyreltilerek hazırlanmıştır. Hazırlanan konsantrasyonlar pipetle 96lı well plate kuyucuklarına eklenmiştir.

### 3.2.6 Juglon Konsantrasyonunun Ayarlanması

1 M ana stok hazırlamak için 1,4 mg juglon tartılarak üzerine 8 $\mu$L DMSO ve 7992 $\mu$L tamamlanmış besiyeri eklenmiştir. 1M olarak hazırlanan ana stoktan 200, 150, 100, 75, 50, 40, 30, 20, 10, 5 ve 1 $\mu$M seyreltilerek hazırlanmıştır. Hazırlanan konsantrasyonlar pipetle 96lı well plate kuyucuklarına eklenmiştir.

### 3.2.7 In Vitro Salımın Ölçülmesi

Daha önceden Yıldız Teknik Üniversitesi bünyesinde farklı nanopartikül çalışmaları için sentezlenmiş olan juglon ve hesperetin yüklü nanopartiküller karakterizasyonlarına göre seçilmiştir. 5 mg nanopartikül, 5 ml PBS içinde çözülmüştür. 37°C 200 rpm'de çalkalayıcıda bırakılmıştır. 9000 rpm 4°C'de 20 dk santrifüj edildikten sonra supernatant içerisinden 1 ml alınarak UV spektrofotometrede okuması yapılmıştır. Alınan 1 ml örnek yerine 1 ml PBS eklenmiştir. Bu işlem 30 günlük periyotta belli aralıklarla tekrarlanarak nanopartikül içerisindeki maddenin salımının oranı ölçülmüştür.

### 3.2.8 MTT Analizi

MTT ([3-(4,5-dimethylthiazol–2-yl)-2,5diphentyltetrazoliumbromide]) testi, metabolik aktiveteyi belirleyen ve en yaygın kullanılan yöntemdir [75]. Tetrazolyum tuzlarının formazana indirgenmesi ile renk değişikliği gözlenir. Bu süreç sadece canlı hücrelerin aktif mitokondrisi tarafından gerçekleştirilebilen dehidrogenaz aktivitesine bağlıdır. Bu nedenle cansız hücrelerde renk değişikliği görülmez. Canlı hücrelerde oluşan formozanın çözünebilir hale gelmesi için DMF ya da DMSO eklenerek ELISA Reader'da 570 nm'de optik okuması yapılır.

$$\%\ Canlılık\ Formülü = \frac{\text{Etken Yüklü Örneklere Ait } Abs_{570}}{\text{Kontrol Grubuna Ait } Abs_{570}} x100 \quad (3.1)$$

CCD ve U87MG hücre hatlarında aynı prosedür uygularak MTT okuması yapılmıştır. Thoma lamında hücre sayımı yapıldıktan sonra 96 kuyucuklu plakaların her bir kuyucuğuna $10^4$ hücre/ml'de olacak şekilde ekilen hücreler 24 saat %5 $CO_2$ ve 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından Hesperetin ve Juglonun serbest formları, nanopartikül formları ve kombinasyon formları 4 tekrarlı olacak şekilde hücreye juglonun 200, 150, 100, 75, 50, 40, 30, 20, 10, 5, 1 $\mu$M konsantrasyonları, hesperetinin 800, 700, 600, 500, 450, 400, 300, 250, 200, 100, 50 $\mu$M konsantrasyonları verilmiştir. Plakalar 24 saat ve 48 saat inkübe edilmiştir. Sonrasında PBS'te çözülen MTT boyasıdan 50 $\mu$L her kuyuya eklenerek 3 saat inkübe edilmiştir. Formazan kristallerinin çözünmesi için 100 $\mu$L DMSO eklenerek 570 nm'de ELISA Reader'da okuma yapılmıştır.

### 3.2.9 Yara İyileşmesi

Hücre göçünün incelenmesi için yapılan bu deney çizik testi olarak da bilinmektedir [76]. U87MG hücreleri 24'lü plakalara ekilerek %5 $CO_2$ ve 37°C'de inkübe edilmiştir. Konfluensi sağlanana kadar inkübatörde bekletilen hücrelere $IC_{50}$ değerlerini hesapladığımız juglon, hesperetin ve nanopartikül formları 3 tekrarlı olacak şekilde uygulanır. Tüm kuyucukların orta bölgesine pipet ile bir çizik atılır. İlk açıklığın görüntüsü, 24 ve 48 saat görüntüleri ışık mikroskobu ile alınır. Açılan boşluğun kapanma mesafesi görüntü üzerinde çizgilerle belirlenir. Bu çizgilerin boyutları kaydedilirek yaranın kapanma oranları belirlenir.

### 3.2.10 Kolonizasyon

Hücrelerin in vitro olarak hayatta kalma ve koloni oluşturma yeteneğini esas alan bir testtir. Kolojinesiteyi ölçmek için, hücreler tabakalara az miktarlarda ekilerek 1-3 hafta arası koloni oluşturmaları için beklenir. Bekleme süresinden sonra hücreler yüzeye sabitlenir ve görünür olmaları için kristal viyole boyası ile boyanır. Oluşan kolonilerin kontrol hücrelerine oranla hayatta kalma yüzdesi hesaplanmıştır [77].

Kurulan deneyde juglon ve hesperetinin $IC_{50}$ değerlerinin bir alt ve bir üst değerleri 6 kuyucuklu tabakalara 2şer tekrarlı olacak şekilde ekilmiştir. Her kuyucukta 200.000 hücre olacak şekilde thoma lamında sayım yapılır. Hücrelerin yüzeye

yapışması için 24 saat beklenir. Besiyeri çekilerek PBS ile yıkama yapılır. Tripsin ile hücreler kaldırıldıktan sonra besiyeri eklerenek tripsin aktivitesi durdurulmuştur. Toplanan hücreler falkona aktarılarak ve tekrardan thoma lamında sayım yapılarak 250 adet hücre kuyulara ekilmiştir. Hücrelerin yüzeye tutunması için 72 saat %5 $CO_2$ ve 37°C'de inkübe edilmiştir. 14 gün boyunca ışık mikroskobunda koloni oluşumu takibi yapılmıştır. Kolonilerin oluştuğu gözlemlendikten sonra her kuyuya hücrelerin sabitlenmesi için metanol uygulanmıştır. 2 damla kristal viyole damlatılarak 15 dk çalkalayıcıda bırakılır. Akar su ile yıkandıktan sonra kuruması için beklenmiştir. Sonra ışık mikroskobu altında kuyuların görüntüleri alınmıştır.

### 3.2.11 U87MG Hücre Lizatlarının Hazırlanması

U87MG hücrelerine 24 ve 48. Saat için belirlenmiş olan juglonun ve hesperetinin serbest ve nanopartikül formlarının $IC_{50}$ dozları ve kombinasyonları uygulanmıştır. Her biri ayrı flasklarda kültüre edilmiştir. Kontrol grubu için kültüre edilen flasktaki hücrelere herhangi bir madde uygulaması yapılmamıştır. 24 ve 48 saat inkübasyonun ardından hücrelerin besiyeri çekilir ve tripsin-EDTA eklerek yapışan hücreler kaldırılır. Kalkan hücreler 15ml'lik falkonlara alınarak üzerlerine 5ml PBS eklenir. 5 dk 1000 rpm'de santrifüj edilir. Süpernatantı atılarak pelletlere 1'er ml PBS eklenerek elde edilen lizatlar -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

## 3.3 Oksidatif Stres ve Antioksidan Deneyleri

### 3.3.1 Protein Miktar Tayin, (BCA Yöntemi)

BCA protein tahlili ile hücre lizatındaki toplam protein miktarı belirlenmiştir. Bu yöntemin prensibi proteinlerin içerisindeki sistein, sistin, tirozin ve triptofan aminoasitlerinin alkali ortamda bikinkoninik asit ile etkileşime girdiğinde $Cu^{+2}$'yi $Cu^{+1}$'e indirgeme yeteneğine dayanır. İndirgenme sonucu mor renk oluşumu gözlenir. 562 nm dalga boyunda absorbans değeri ölçülür [78,79]. Deneyde, SMART™ BCA Protein Assay Kiti (iNtRON Biotechnology, Cat. No. 21071) kullanılmıştır. Kit içerisinde bulunan BSA çözeltisi ile protein standart eğrisi oluşturulur. 96'lı plakanın kuyularına hücre lizatlarından 25 $\mu$L eklenir. Kitte bulunan A ve B solüsyonları prosedüre göre karıştırılarak çalışma solüsyonu hazırlanır. Kuyulara 200 $\mu$L çalışma solüsyonu eklenir. 30 sn çalkalayıcıda

bekletildikten sonra 37°C'de 30 dk inkübe edilir. İnkübasyon sonrasında oda sıcaklığında soğutulan tabakanın ELISA Reader'da 562 nm'de okuması yapılır. BSA çözeltisiyle hazırlanan standart eğriden yararlanılarak kuyularda bulunan protein miktarı mg/ml cinsinden hesaplanır.

### 3.3.2 MDA Düzeylerinin Belirlenmesi

Lipid peroksidasyonu, lipidlerin oksidatif bozunmasını ifade eder. Bu süreçte serbest radikaller, lipidlerden (genellikle hücre zarlarında) elektron alarak hücre hasarına neden olur. Oksidatif stresi değerlendirmek için lipid peroksidasyonunun nicelleştirilmesi esastır. Lipit peroksidasyonunun son ürünlerinden birinin monaldehit olduğu bilinmektedir. MDA, tiyobarbitürik asit ile tepkimeye girerek tepkime verir ve spektrofotometrik olarak ölçülebilir [80,81]. Deneyde TBA reaktifi 0,25 M HCl, %15 TCA, %3,75 TBA karıştırılarak hazırlanır. TBA reaktifinin çözünmesi için hafifçe ısıtılır. 100 $\mu$L örnek üzerine 200 $\mu$L TBA reaktifi eklenerek 100 °C'de 15dk kaynatılır, 3000 g'de 5 dk santifüjlenir. Süpernatantlardan 100'er $\mu$L alınarak ELISA Reader ile 535 nm'de absorbans değerleri ölçülür. MDA miktarları standart eğri grafiği kullanılarak MDA/mg protein bulunmuştur.

### 3.3.3 GSH Düzeylerinin Belirlenmesi

Glutatyon redüktaz, GSH-Px vasıtasıyla hidroperoksitlerin indirgenmesi sonucu oluşan okside glutatyonun (GSSG) tekrar indirgenmiş glutatyona (GSH) dönüşümünü katalize eder. 5,5-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit (DTNB) glutatyonla tepkimeye girerek oksitlenmiş glutatyon ve 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit (TNB) açığa çıkarmaktadır. Sarı renk oluşumuna neden olan TNB, 412 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür [82,83]. Deneyde 20 ml dH2O içerisinde 0,32 g metafosforik asit, 0,02 g EDTA disodyum tuzu, 5,8 g NaCl çözülerek proteinsizleştirme çözeltisi hazırlanmıştır. 1,067 g disodyum fosfat ($Na_2HPO_4$) 20 ml $dH_2O$'da çözülerek fosfat çözeltisi hazırlanır. 0,2 g potasyum sitrat 20 ml $dH_2O$'da çözüldükten sonra 7,92 mg DTNB eklenerek Ellman Reaktifi elde edilmiştir. 200 $\mu$L hücre lizatına 300 $\mu$L proteinsizleştirme çözeltisi eklenerek 5 dk oda sıcaklığında bekletilir. 2000 g'de 10 dk santrifüjlenir. Süpernatantlardan 50 $\mu$L alınarak kuyucuklara koyulur. Üzerlerine 200 $\mu$L fosfat çözeltisi ve 25 $\mu$L Ellman reaktifi eklenir. ELISA Reader ile 412 nm'de absorbans değerleri ölçülür.

Örneklerdeki redükte glutatyon miktarları standart eğri grafiği kullanılarak µg glutatyon cinsinden bulunmuştur.

### 3.3.4 SOD Düzeylerinin Belirlenmesi

Süperoksit dismutaz (SOD), süperoksit serbest radikalinin ($O^{2-}$) hidrojen peroksit ($H_2O_2$) ve moleküler oksijene ($O_2$) dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimdir. SOD'ın fizyolojik fonksiyonu oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikalinin ($O^{2-}$) lipid peroksidasyonu gibi zararlı etkilerine karşı korumaktır. SOD aktivitesi, süperoksit radikali ile nitroblue tetrazolyumun (NBT) tepkimesi ile oluşan formazanın 560 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile belirlenir [84,85]. Deneyde 1,836 mg ksantin tartılmıştır. 2 damla 1M NaOH damlatılarak üzeri $dH_2O$ ile 40 ml'e tamamlanır. 4,46 mg EDTA disodyum, 20 ml $dH_2O$'da çözülerek EDTA disodyum çözeltisi hazırlanır. 2,46 mg NBT, 20 ml $dH_2O$'da çözülür. 0,84 gram $Na_2CO_3$ tartılıp distile suda çözülerek hacim 20 ml'ye tamamlanır. 25 mg BSA, 25 ml $dH_2O$'da çözülür. 1,074 mg $CuCl_2$ 10 ml $dH_2O$'da çözülür. Hazırlanan çözeltiler karıştırılarak reaktif çözelti elde edilir. pH 10,2'ye ayarlanmıştır. Reaktif çözeltiye sonradan eklemek için 50 $\mu$L ksantin oksidaz 950 $\mu$L amonyum sülfat ($(NH_4)_2SO_4$) içinde çözülür. İnkübasyon sonrası durdurma solüsyonu olarak 1,074 mg CuCl2 10 ml'e tamamlanmıştır.

Tüplerdeki her bir 100 $\mu$L örneğe 245 $\mu$L reaktif çözelti ve ardından 10 $\mu$L ksantin oksidaz eklenir. Örnekler 25°C'de 20 dakika inkübe edilir. İnkübasyon sonrası her bir 100 $\mu$L CuCl2 eklenir. Örneklerin, kördeki distile suya karşı 560 nm'deki absorbans değerleri ölçülür. Örneklerdeki SOD aktivitesi standart eğri grafiği kullanılarak U/mg protein cinsinden bulunur.

## 3.4 İstatiksel Analizler

İstatistiksel analiz, GraphPad Prism yazılımı sürüm 9 (GraphPad Yazılımı, La Jolla, CA) kullanılarak yapıldı. $IC_{50}$ değerleri GraphPad Prism ile logaritmik olarak hesaplanmıştır. Kontrol ve tedavi edilen gruplar arasında oksidatif stres ve hücresel antioksidan aktivite ölçümleri arasındaki istatistiksel farklar Two-Way ANOVA ve TUKEY testi ile analiz edilerek 0,05'ten küçük p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

# 4
# SONUÇ VE ÖNERİLER

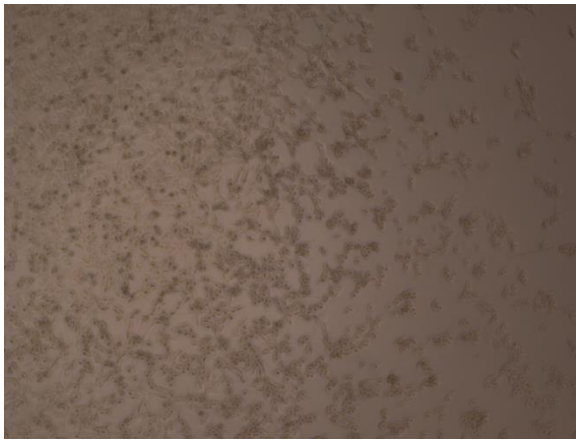
## 4.1 Sonuçlar

### 4.1.1 Hesperetin ve Juglonun Serbest Formlarının CCD Hücrelerine Etkisi

Juglonun serbest formunun 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150, 200 $\mu$M konsantrasyonları; hesperetinin serbest formunun 50, 100, 200, 250, 300, 400, 450, 500, 600, 700, 800 $\mu$M konsantrasyonları CCD fibroblast hücre hattına 4 tekrarlı olarak uygulanmasının ardından ışık mikroskobu ile 24 ve 48. saatlerde görüntüleri alınmıştır. Kontrol grubunun 24 saat görüntüsü (Şekil 4.1) ile 40 $\mu$M juglon uygulanan CCD hücre hattının 24 saatteki görüntüsü (Şekil 4.2) kıyaslanmıştır.



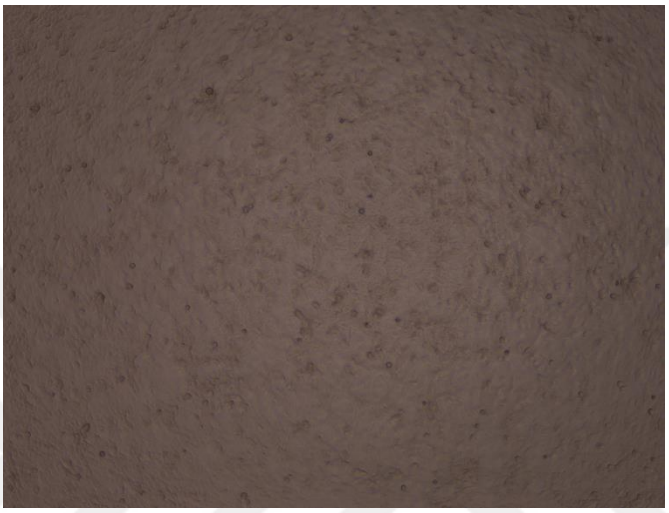
**Şekil 4.1** Kontrol grubu 24 saat görüntüsü (5x)



**Şekil 4.2** 40 $\mu$M Juglon 24 saat görüntüsü (5x)

MTT ile sitotoksik etkisi ölçülmüştür. 24. Saatte juglonun kontrol grubuna göre 200 $\mu$M'da %91 oranında hücreleri öldürdüğü görülmüştür. $IC_{50}$ değeri 43.40 $\mu$M olarak bulunmuştur.

Kontrol grubunun 48 saat (Şekil 4.3) ile 40 $\mu$M juglon uygulanan CCD hücre hattının (Şekil 4.4) kıyaslanması sonucu öldürücülük oranının daha yüksek olduğu bulunmuştur.

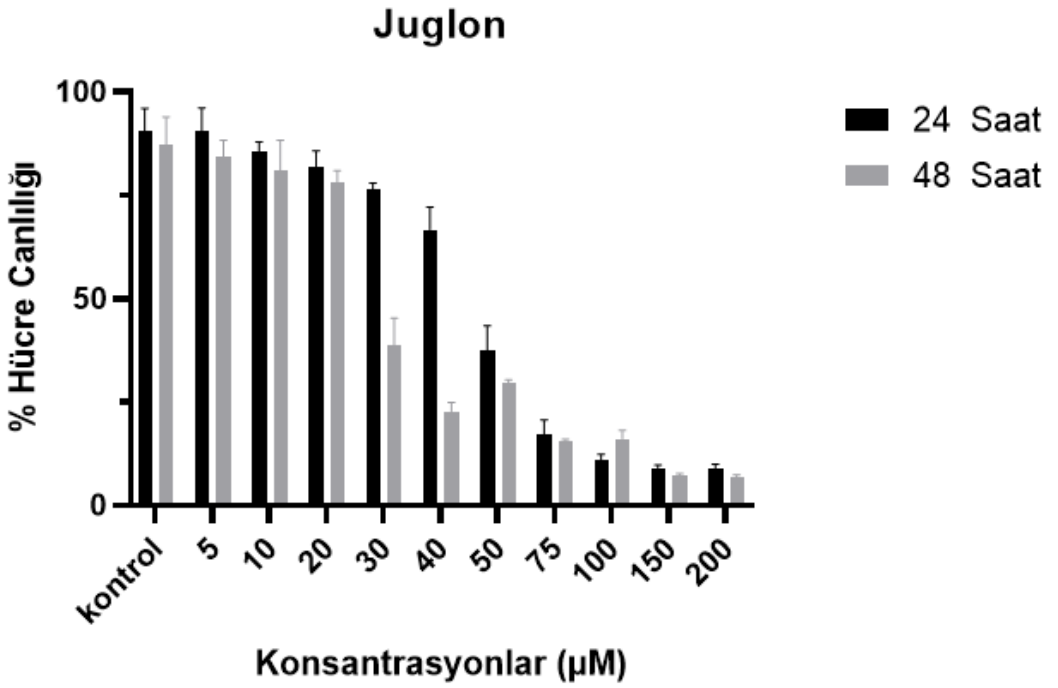


**Şekil 4.3** Kontrol grubu 48 saat görüntüsü (5x)



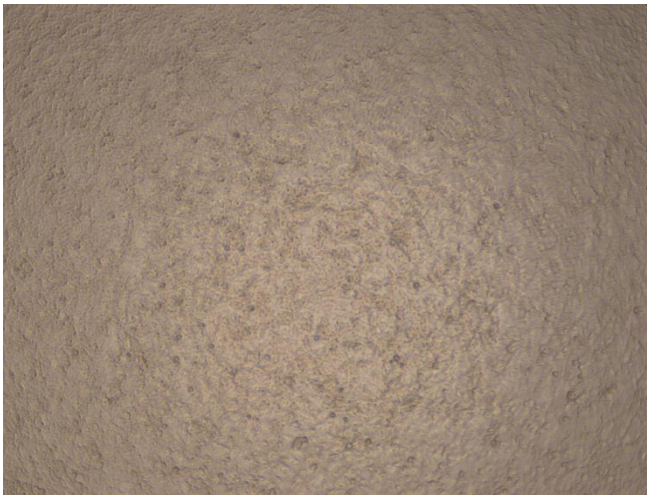
**Şekil 4.4** 40 $\mu$M Juglon 48 saat görüntüsü (5x)

48 saatte juglonun kontrol grubuna göre 200 $\mu$M'da %94 oranda hücreleri öldürdüğü görülmüştür. $IC_{50}$ değeri 23.11 $\mu$M olarak bulunmuştur. Şekil 4.5'te Juglonun 24 ve 48 saatlerde CCD hücrelerinde canlılığa etkisi gösterilmiştir.

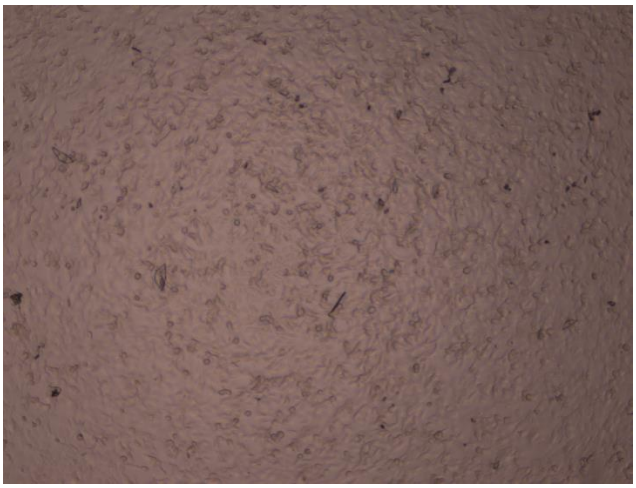



**Şekil 4.5** Juglonun CCD hücrelerinde canlılığa etkisi

Hesperetinin CCD hücre hattı üzerinde canlılığa etkisi MTT ile belirlenmiştir. 24 saatte ışık mikroskobu ile alınan görüntüler Şekil 4.6 ve Şekil 4.7'de belirtilmiştir. Hesperetinin 800 $\mu$M konsantrasyonunda canlılığının %17'ye kadar düştüğü hesaplanmıştır. GraphPad ile yapılan analiz ile 24. Saat $IC_{50}$ değeri 508.2 $\mu$M olarak bulunmuştur.

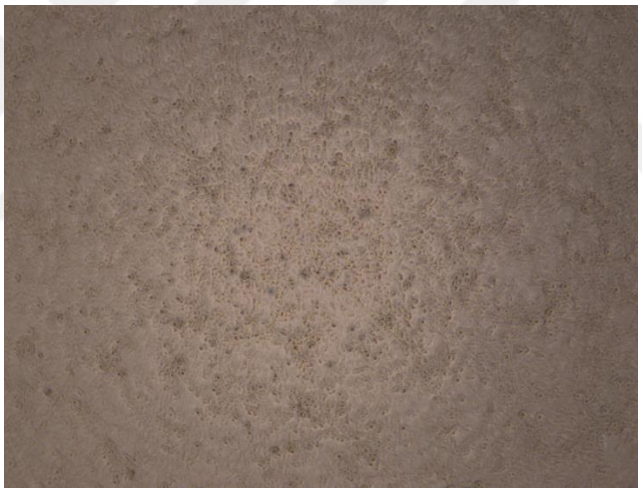


**Şekil 4.6** Kontrol grubu 24 saat görüntüsü (5x)

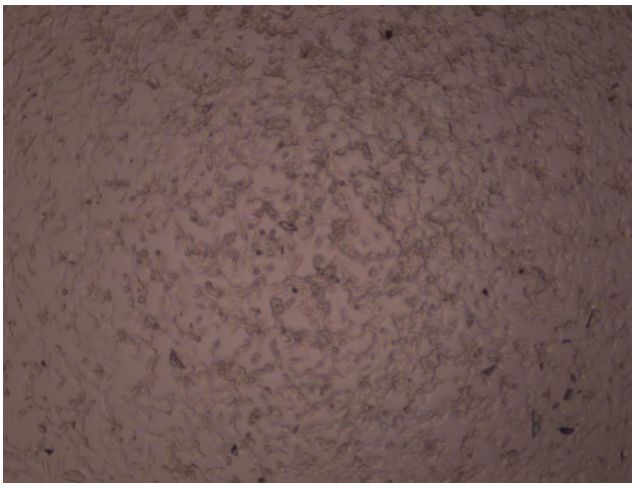


**Şekil 4.7** 500 $\mu$M Hesperetin 24 saat görüntüsü (5x)

Hesperetinin 48 saat görüntüleri Şekil 4.8 ve Şekil 4.9'da gösterilmiştir. MTT sonuçlarına göre 800 $\mu$M konsantrasyonlarında hesperetinin canlılık oranı %18'e düşmüştür. 48. Saat $IC_{50}$ değeri 466,9 $\mu$M olarak bulunmuştur.

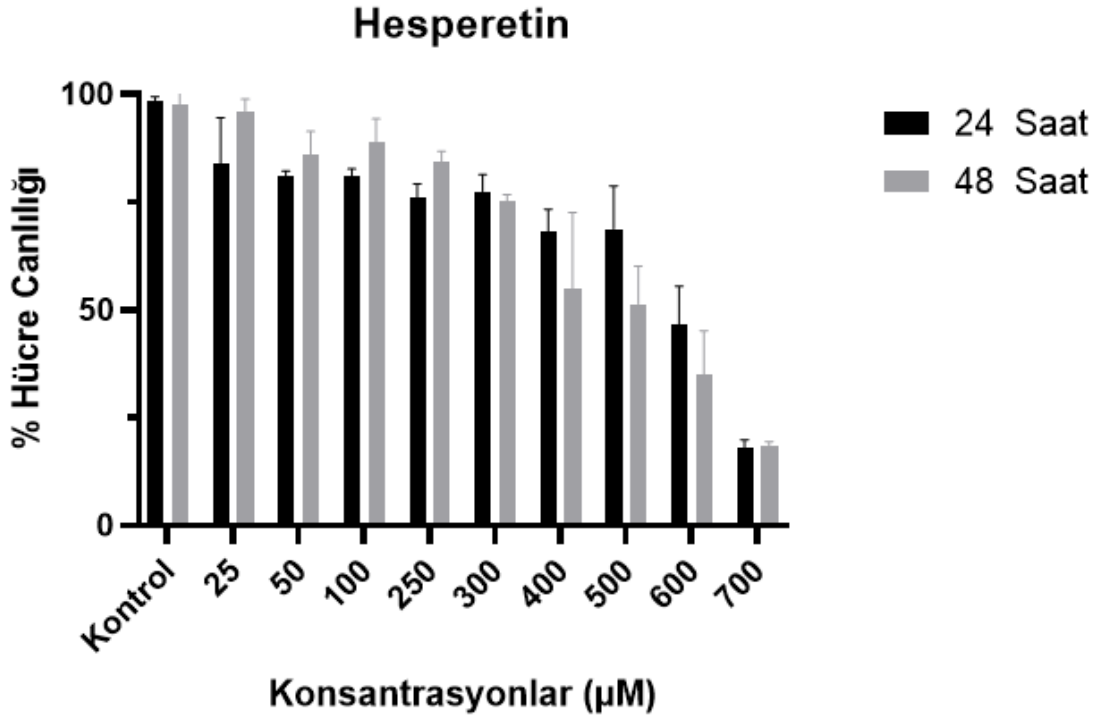


**Şekil 4.8** Kontrol 48 saat görüntüsü (5x)



**Şekil 4.9** 500 $\mu$M Hesperetin 48 saat görüntüsü (5x)

Hesperetinin 24 ve 48 saatteki CCD hücre canlılığına etkisi Şekil 4.10'daki grafik ile gösterilmiştir.

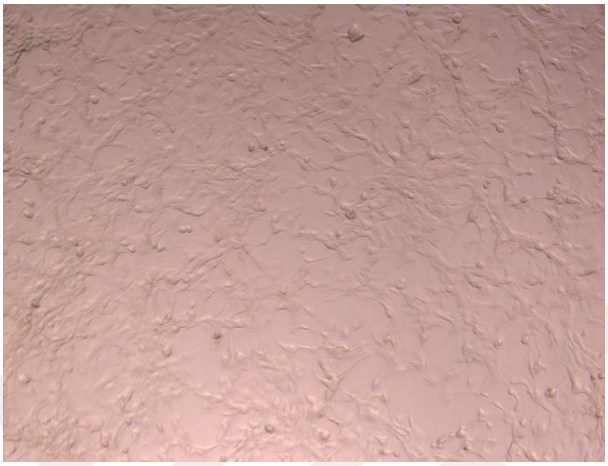



**Şekil 4.10** Hesperetinin CCD hücrelerinde canlılığa etkisi

### 4.1.2 Hesperetin ve Juglonun Serbest Formlarının U87MG Hücrelerine Etkisi

Juglonun serbest formunun 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150, 200 $\mu$M konsantrasyonları; hesperetinin serbest formunun 50, 100, 200, 250, 300, 400, 450, 500, 600, 700, 800 $\mu$M konsantrasyonları U87MG GBM hücre hattına 4 tekrarlı olarak uygulanmasının ardından ışık mikroskobu ile 24 ve 48. saatlerde

görüntüleri alınmıştır. 24. saatte kontrol grubundaki hücrelerle juglonun ilaç olarak farklı dozlarının verildiği hücrelerin mikroskop görüntüleri kıyaslandığında canlılıkta belirgin bir düşüşün olduğu gözlemlenmektedir. Juglonun U87MG hücre hattında 24 saat uygulanmasının görüntüleri kontrol ile kıyaslamalı olarak Şekil 4.11 ve 4.12'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.11** Kontrol 24 saat görüntüsü (5x)



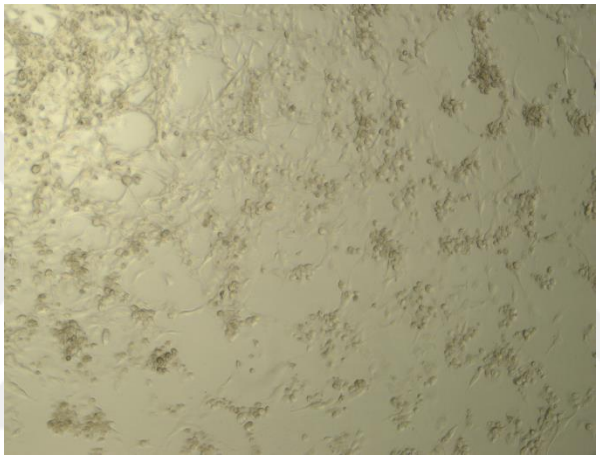
**Şekil 4.12** 30 $\mu$M Juglon 24 saat görüntüsü (5x)

Juglonun 200 $\mu$M konsantrasyonda uygulanması hücre calılığını 24 saatte %4'e kadar düşürmüştür. Juglonun 24. Saat $IC_{50}$ değeri 27,70 $\mu$M olarak belirlenmiştir.

48 saat sonunda juglonun hücreye etkisi Şekil 4.13 ve Şekil 4.14'te gösterilmiştir.



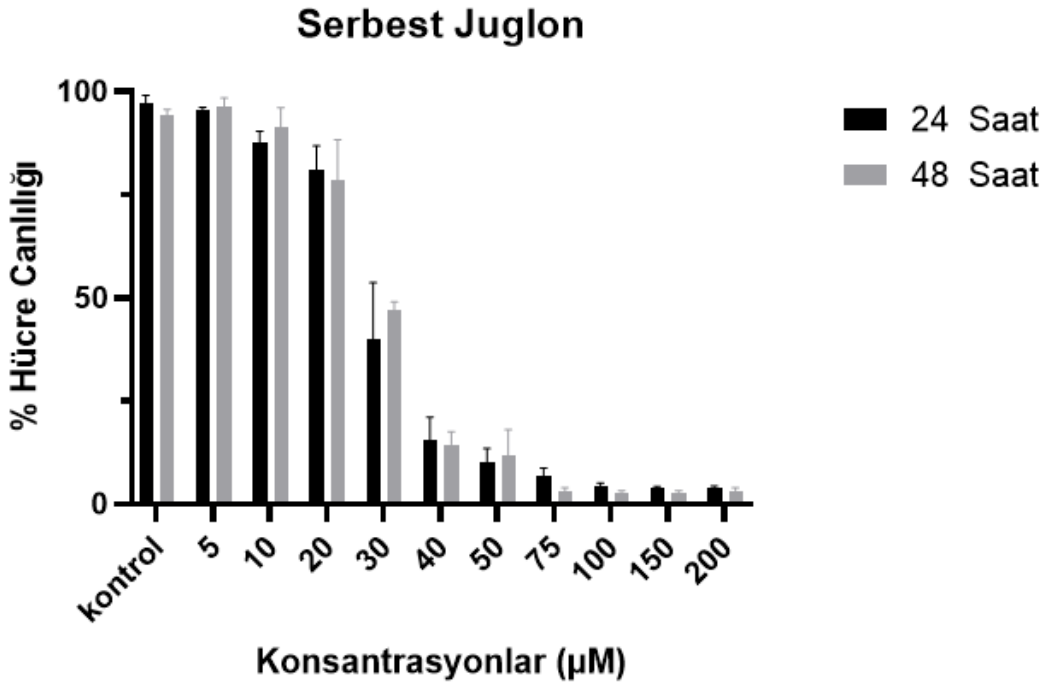
**Şekil 4.13** Kontrol 48 saat görüntüsü (5x)



**Şekil 4.14** 30$\mu$M Juglon 48 saat görüntüsü (5x)

48. saatte juglonun 200 $\mu$M konsantrasyon uygulaması ile hücre canlılığı %3'e kadar düşmüştür. 48. Saat $IC_{50}$ değeri 26,68 $\mu$M olarak bulunmuştur.

Juglonun 24 ve 48 saatteki hücre calılığına etkisi Şekil 4.15'te gösterilmiştir.




**Şekil 4.15** Juglonun U87MG hücrelerinde canlılığa etkisi

Hesperetinin ilaç olarak farklı dozlarının verildiği hücrelerin 24. Saat kontrol grubundaki hücrelerle mikroskop görüntüleri kıyaslandığında canlılıkta belirgin bir düşüşün olduğu gözlemlenmektedir. (Şekil 4.16 ve Şekil 4.17)



**Şekil 4.16** Kontrol 24 saat görüntüsü (5x)



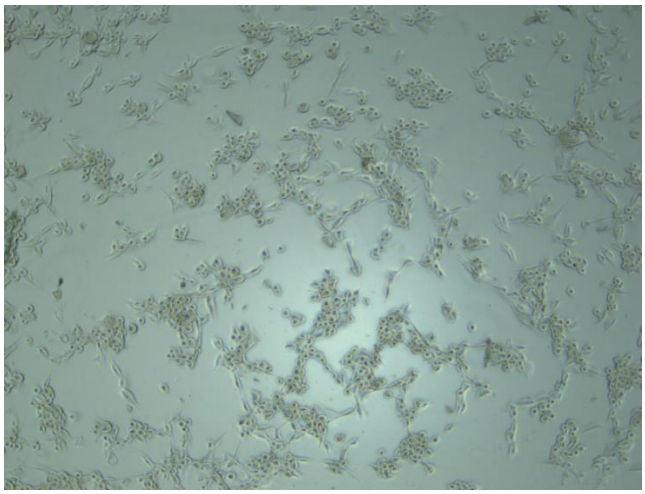
**Şekil 4.17** 400 $\mu$M Hesperetin 24 saat görüntüsü (5x)

24 saat sonuçlarına göre 800 $\mu$M hesperetin uygulaması hücre canlılığı %37 seviyesine düşürmüştür. Hesperetinin 24 saat $IC_{50}$ değeri 414,8 $\mu$M olarak bulunmuştur.

Hesperetinin 48 saat uygulanmasının hücreye etkisi Şekil 4.18 ve 4.19'da gösterilmiştir.



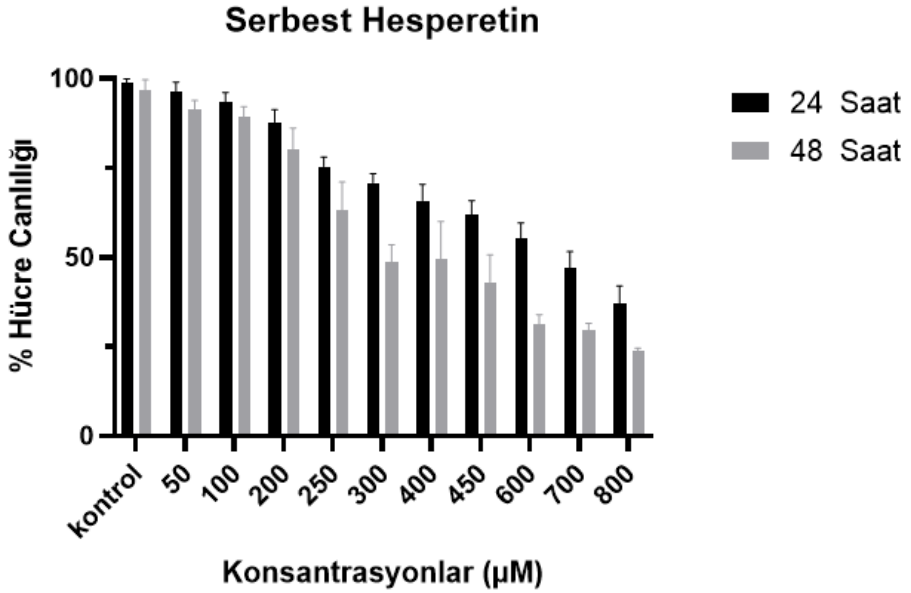
**Şekil 4.18** Kontrol 48 saat görüntüsü (5x)



**Şekil 4.19** 400 $\mu$M Hesperetin 48 saat görüntüsü (5x)

Hesperetin uygulanması sonucu hücre canlılığı 48 saatte %24'e kadar düşüş göstermiştir. Hesperetinin 48 saatteki dozları ile kontrol grubunun kıyaslanması sonucu $IC_{50}$ değeri 335 $\mu$M olarak bulunmuştur.

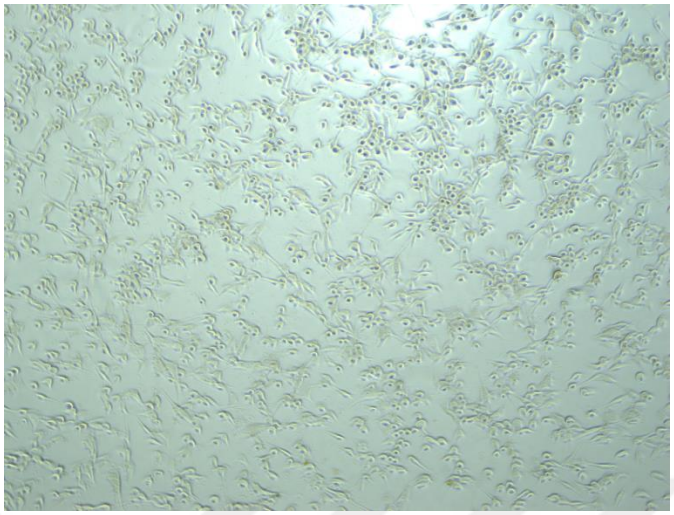
Hesperetinin 24 ve 48 saatlerdeki hücre çalılığına etkisi Şekil 4.20'deki grafikte gösterilmiştir.



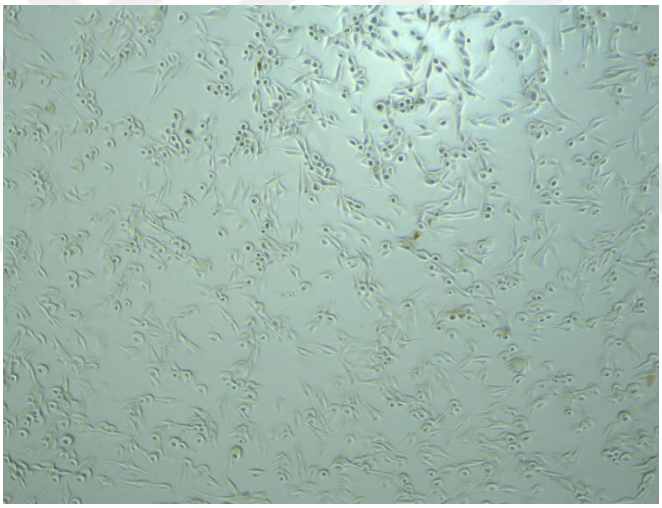

**Şekil 4.20** Hesperetinin U87MG hücrelerinde canlılığa etkisi

Hesperetin ve juglon molekülleri kombinasyon halinde hücreye verildiğinde hücre canlılığına serbest formlardakine kıyasla daha fazla etki ettği gözlemlenmiştir. MTT sonuçlarıyla desteklenmiştir. Serbest kombinasyon formlarının uygulaması

sonucunda elde edilen mikroskop görüntüleri Şekil 4.21 ve Şekil 4.22'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.21** Kontrol grubu 24 saat görüntüsü (5x)



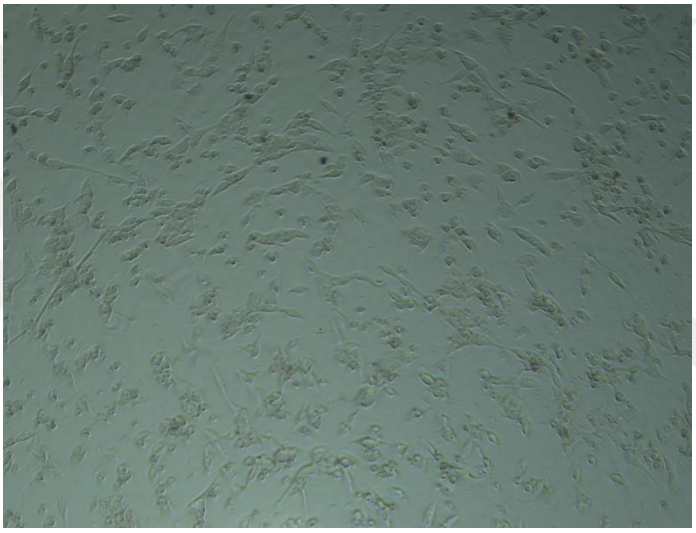
**Şekil 4.22** 20 $\mu$M Hsp-J 24 saat görüntüsü (5x)

200 $\mu$M Hsp-J uygulaması 24 saatte canlılığı %4'e, 48 saatte %2'ye düşürmüştür. Serbest kombinasyon uygulamasının 24. Saat $IC_{50}$ değeri 18.40 $\mu$M olarak bulunmuştur.

Serbest kombinasyon uygulamasının 48 saat görüntüleri Şekil 4.23 ve Şekil 4.24'te gösterilmiştir.

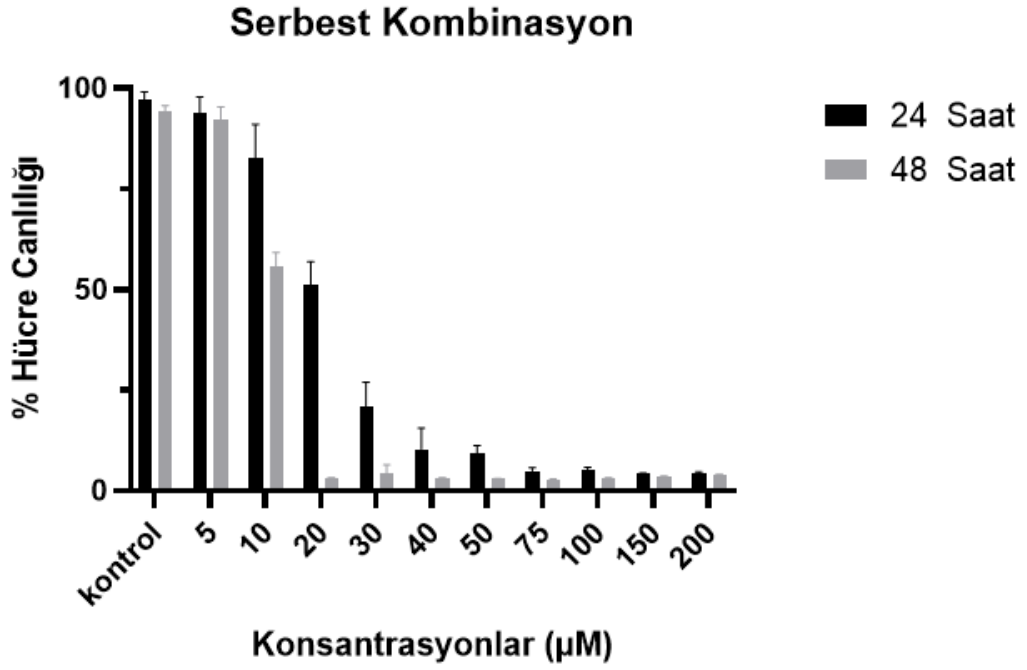


**Şekil 4.23** Kontrol grubu 48 saat görüntüsü (5x)



**Şekil 4.24** 20 $\mu$M Hsp-J 48 saat görüntüsü (5x)

Hsp-J uygulamasının 48. Saat $IC_{50}$ değeri 10.27 $\mu$M olarak hesaplanmıştır. Kombinasyon olarak ilaç uygulamasının hücre canlılığına 24 ve 48 saatteki etkisi Şekil 4.25'te gösterilmiştir.

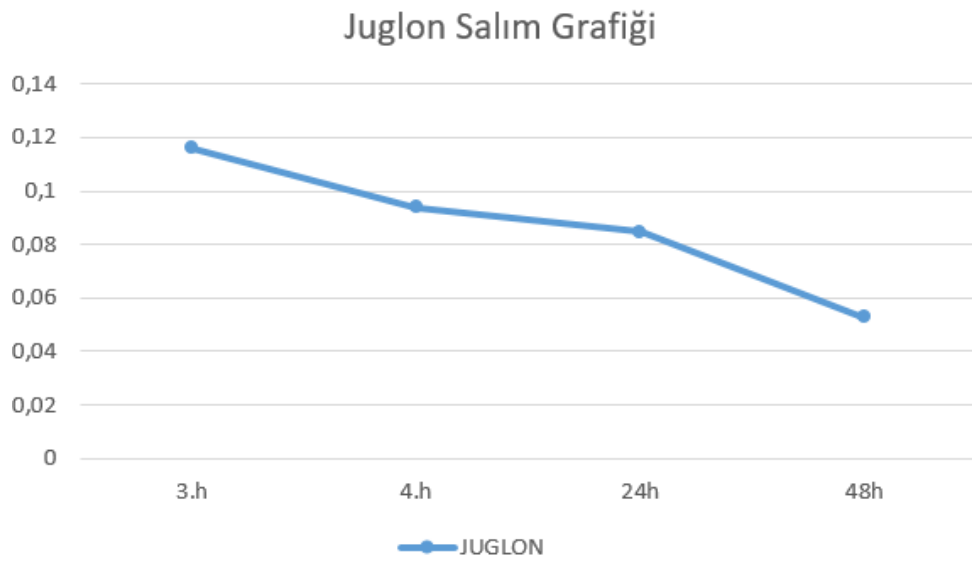



**Şekil 4.25** Juglon ve Hesperetin kombinasyonunun U87MG hücrelerinde canlılığa etkisi

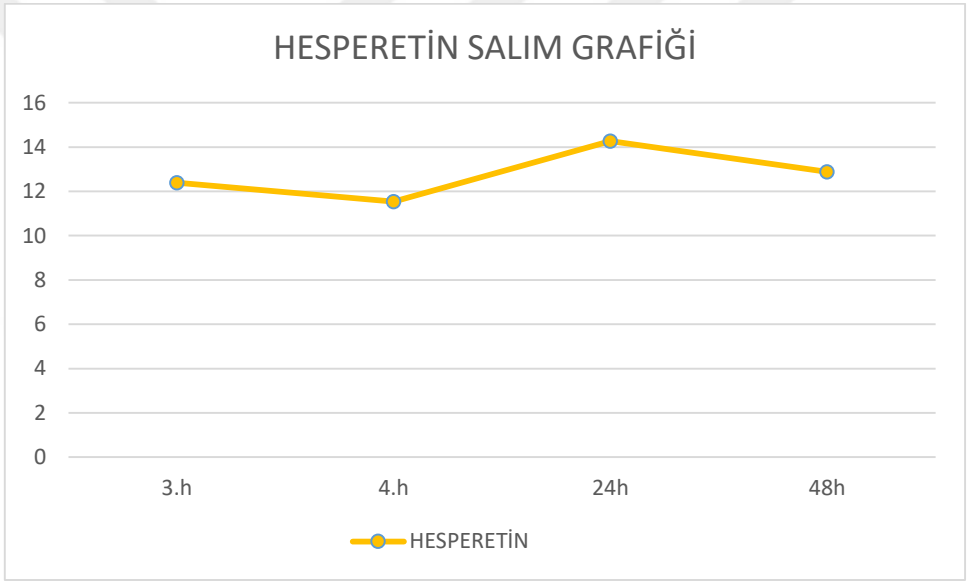
### 4.1.3 Hesperetin ve Juglon Nanoparitküllerinin Salım Grafiklerinin İncelenmesi

Nanopartiküle yüklü ilaç hücreye alındıktan sonra enzimatik degredasyona uğrar. Yüzeyinde veya içeriğinde kapsüle edilmiş olan ilaç kontrollü şekilde salınır. Degrede olan yüzey biyobozunur özellikte olması nedeniyle herhangi bir toksisite oluşturmamaktadır. Kapsüle edilen ilaç normalden daha uzun süre hücrede maruziyet oluşturur ve etken dozu ayarlandığında sadece istenilen hücreye etki eder [86].

Daha önceden hazırlanmış olan juglon ve hesperetin nanopartiküllerinin salım grafikleri incelendiğinde, HspNP'nin 3 saatte %12,39, 24 saatte %26,66, 48 saatte %51,09 salındığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.26). JNP 3 saatte %0,11, 24 saatte %0,20, 48 saatte %0,34 salındığı gözlenmiştir (Şekil 4.27).




**Şekil 4.26** Juglonun DCM'de salım grafiği




**Şekil 4.27** Hesperetinin DCM'de salım grafiği

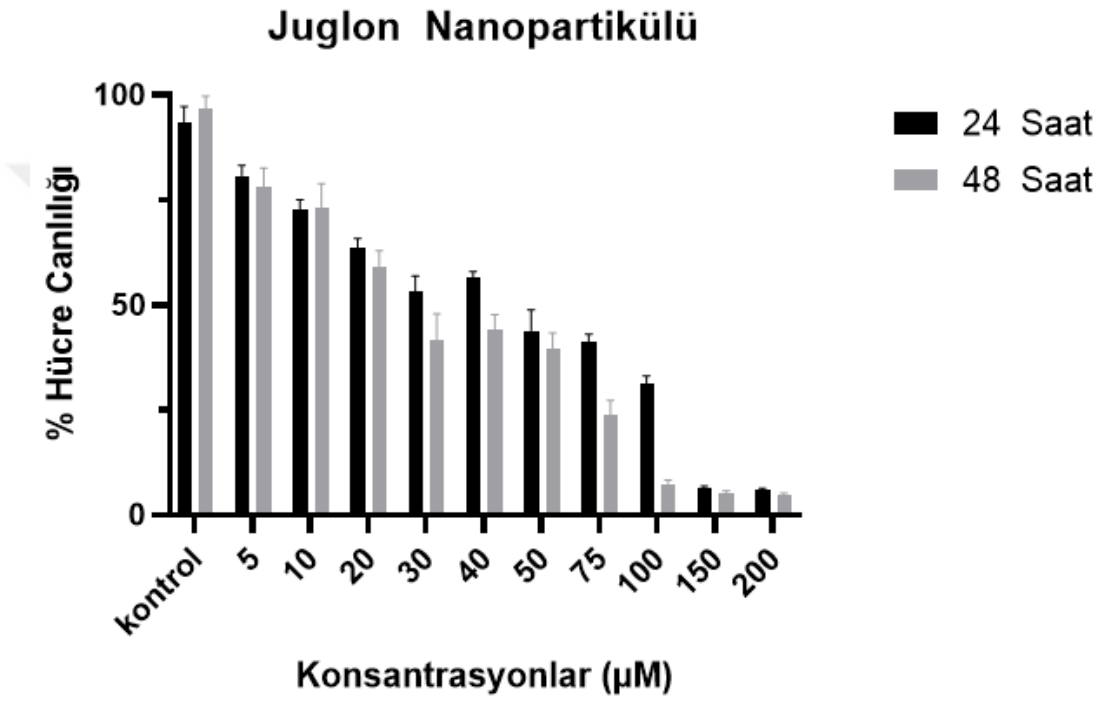
### 4.1.4 Hesperetin ve Juglon Nanopartiküllerinin U87MG Hücrelerine Etkisi

Juglonun nanopartikül formunun 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150, 200 $\mu$M konsantrasyonları; hesperetinin nanopartikül formunun 50, 100, 200, 250, 300, 400, 450, 500, 600, 700, 800 $\mu$M konsantrasyonları U87MG GBM hücre hattına 4 tekrarlı olarak uygulanmasının ardından ışık mikroskobu ile 24 ve 48. saatlerde görüntüleri alınmıştır.

JNP uygulanan hücre hattının 24. Saatinde düşük konsantrasyonlarda etkisinin az olduğu gözlenirken 30 $\mu$M ve sonrasında hücre proliferasyonunda önemli düşüş

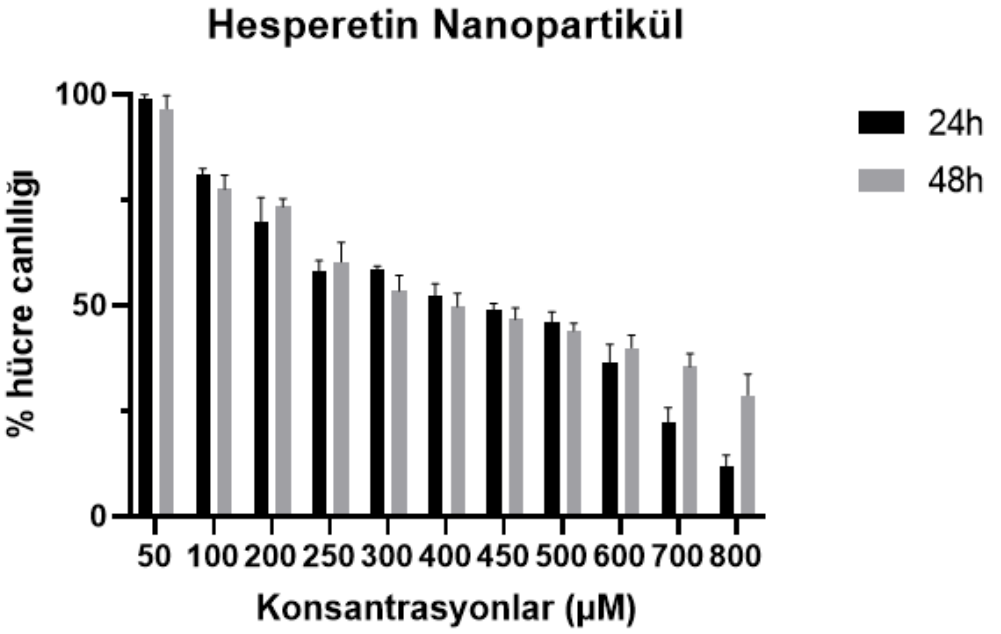
gözlenmiştir. 50 $\mu$M'da canlılık %44'e düşmüştür. Yüksek konsantrasyonlarda ise canlılık %6'ya kadar düşmüştür. JNP'nin 24. Saatteki $IC_{50}$ değeri 30,74 $\mu$M olarak bulunmuştur.

JNP uygulanan hücre hattının 48. Saatinde 30 $\mu$M konsantrasyonda canlılık %50'ye düşmektedir. Yüksek konsantrasyonlarda canlılık %4'e kadar düşmüştür. JNP'nin 48. Saatteki $IC_{50}$ değeri 22,3 olarak bulunmuştur. Hücre canlılığına etkisi Şekil 4.28'deki grafikte gösterilmiştir.



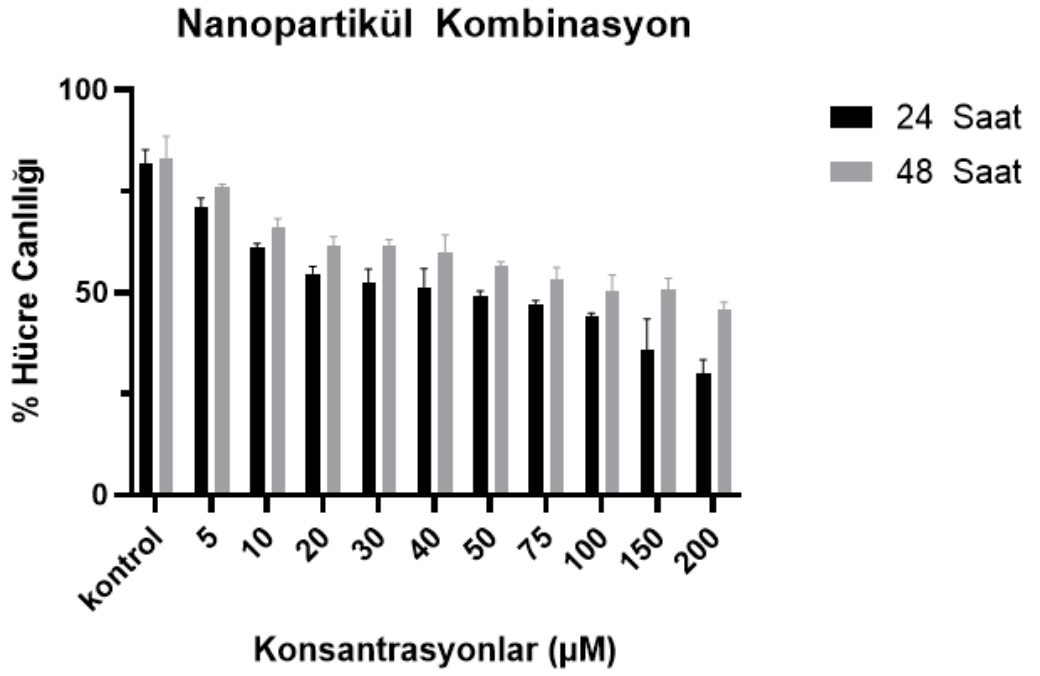

**Şekil 4.28** JNP'nin U87MG hücrelerinde canlılığa etkisi

HNP uygulanan hücre hattının 24. Saatteki sonuçlarına göre $IC_{50}$ değeri 218 $\mu$M olarak bulunmuştur. HNP'nin 48. Saat $IC_{50}$ değeri 112,8 $\mu$M olarak bulunmuştur. Yüksek dozlarda HNP uygulanan hücrede canlılık 24 saatte %11'e, 48 saatte %35'e düşmüştür. Bu düşüş Şekil 4.29'daki grafikte gösterilmiştir.




**Şekil 4.29** HNP'nin U87MG hücrelerinde canlılığa etkisi

Nanopartikül formdaki kombinasyon JNP-HspNP'nin yüksek doz uygulanması hücrelerde canlılığın 24 saatte %34'e, 48 saatte %49'a düşmesine neden olmuştur. 24 saat $IC_{50}$ değeri 9,129 $\mu$M; 48. Saat $IC_{50}$ değeri 6,818 $\mu$M olarak bulunmuştur. HspNP-JNP uygulamasının hücre canlılığına etkisi Şekil 4.30'da gösterilmiştir.

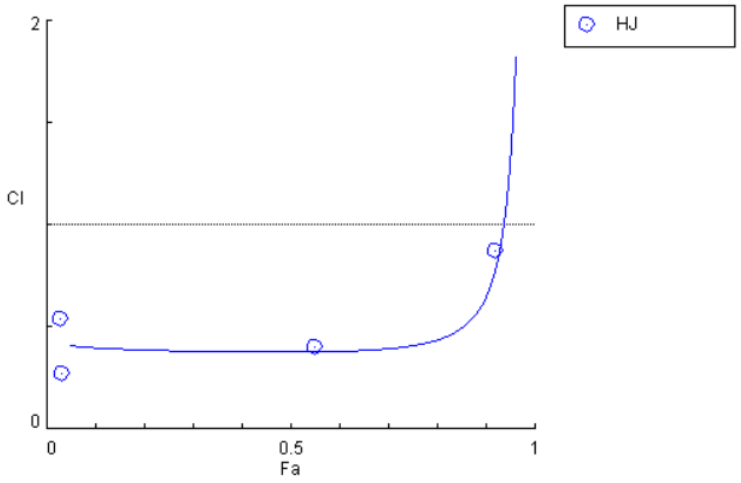



**Şekil 4.30** HspNP-JNP kombinasyonunun U87MG hücrelerinde canlılığa etkisi

### 4.1.5 Hesperetin ve Juglonun U87MG Hücrelerinde Kombinasyon İndeksinin Hesaplanması

Hesperetin ve juglonun ilaç sinerjileri, CalcuSyn yazılımı (Biosoft Version 2.1, Cambridge, UK) kullanılarak medyan etki prensibinden türetilen kombinasyon indeks metoduyla değerlendirilmiştir. Serbest formdaki juglon ve hesperetin kombinasyonlarının 24 ve 48. saat $IC_{50}$ değerleri baz alınmıştır. CalcuSyn yazılımı ile kombinasyon indeksi (CI) ve doz azaltma indeksi (DRI) değerleri $IC_{50}$ değerlerine göre tespit edilmiştir. CI değeri $< 1$ ise sinerjisitik etki; CI değeri $= 1$ ise birbirleri üzerinde etkisiz; CI değeri $> 1$ ise antagonistik etki göstermektedir [87].

Hesperetin-Juglon serbest formlarının U87MG hücre hattında kombinasyon indeksi (CI) hesaplaması sonucu iki ilacın sinerjik etki gösterdiği tespit edilmiş ve CI değeri 0,37744 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.31).



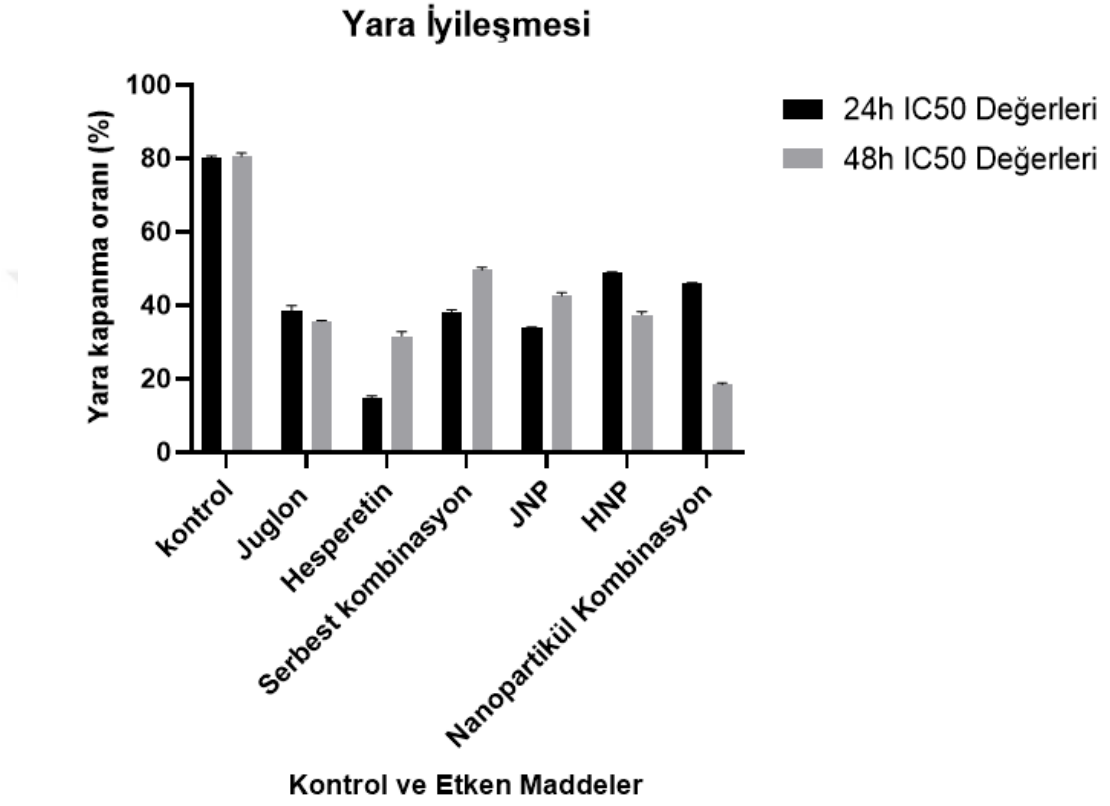

**Şekil 4.31** Hesperetin ve Juglonun kombinasyon indeksi eğrisi

### 4.1.6 Yara İyileşmesi

Juglon serbest formu(J), hesperetin serbest formu (H), serbest formdaki Juglon ve Hesperetinin kombinasyon formu, Juglon NP formu, Hesperetin NP ve nanopartiküllerin kombinasyon formunun U87MG hücreleri üzerinde 24 ve 48 saatlerde yara iyileşmesi etkisi incelenmiştir. Pipet ucu kullanılarak her

kuyucuktaki hücreye çizik atılmıştır. Yara oluşturulduktan sonra ilk ölçülen yara mesafesi 24 ve 48 saatlerdeki ölçülen mesafe ile karşılaştırılmıştır.

Şekil 4.32'deki grafikte kontrol grubuna göre ilaç uygulanan hücrelerdeki yaranın kapanma mesafesi ölçülerek hesaplaması yapılmıştır.

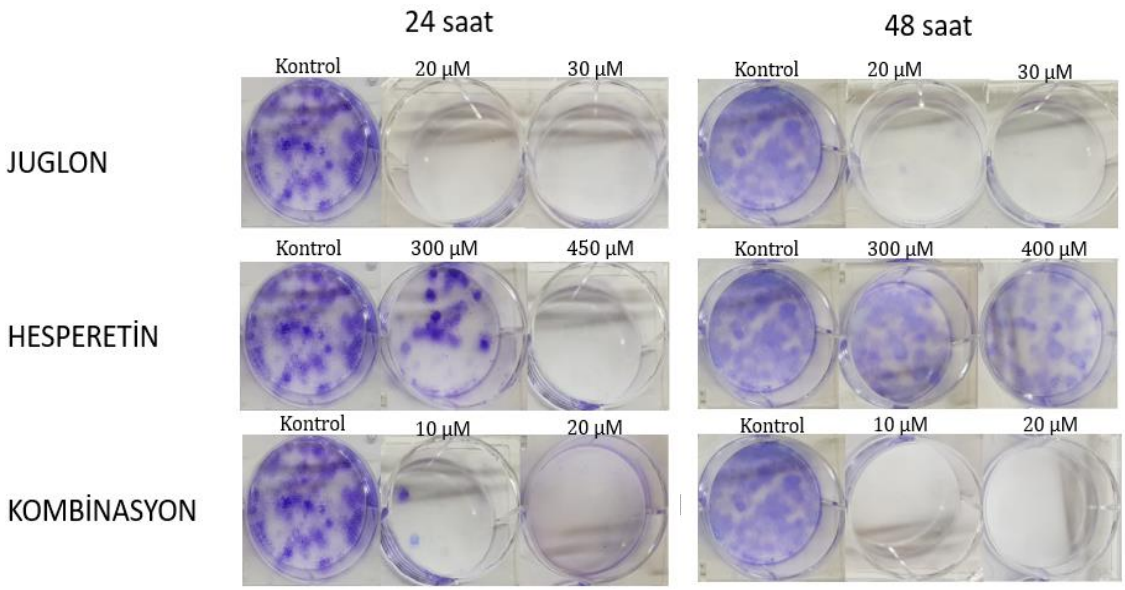



**Şekil 4.32** İlaç uygulamalarının yara iyileşmesindeki etkisi

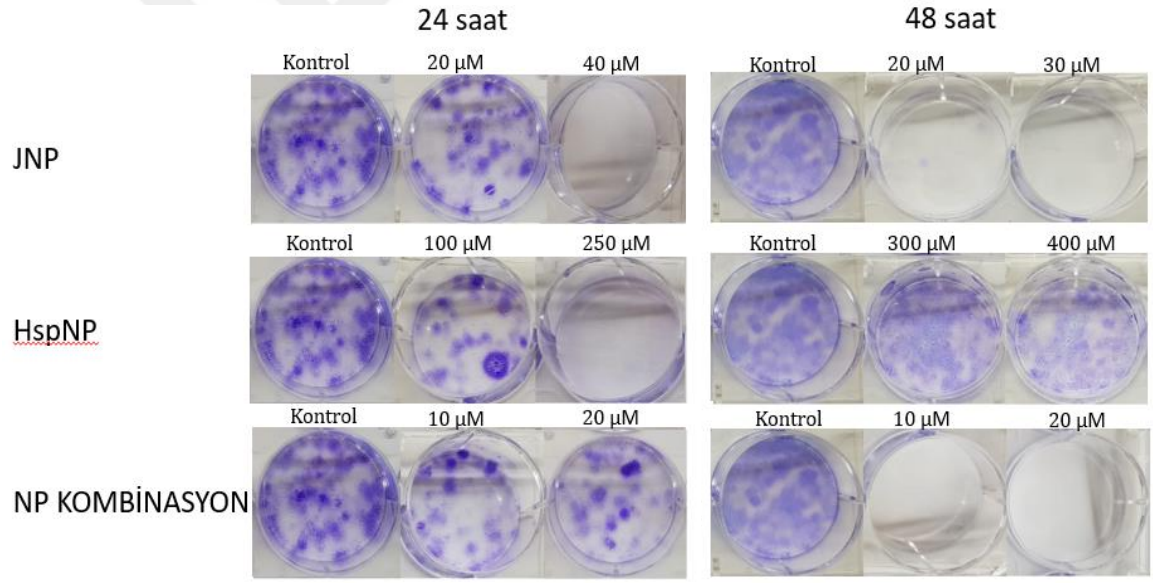
### 4.1.7 Kolonizasyon

H, J, H-J, HNP, JNP, HNP-JNP formlarının 24 ve 48 $IC_{50}$ doz aralıklarının bir alt ve bir üst değeri seçilerek U87MG hücre hattına uygulanmıştır. Doz uygulamaları sonrasında 14 gün inkübatörde bekletilerek hücrelerin koloni oluşturma ve hayatta kalma yeteneği gözlemlenmiştir. 14. Gün sonunda hücreler boyanarak görünür hale getirilmiştir.

Kontrol grubuna göre uygulanan dozların hücrenin proliferasyonuna etkisi gözlemlenmiştir (Şekil 4.33 ve Şekil 4.34).



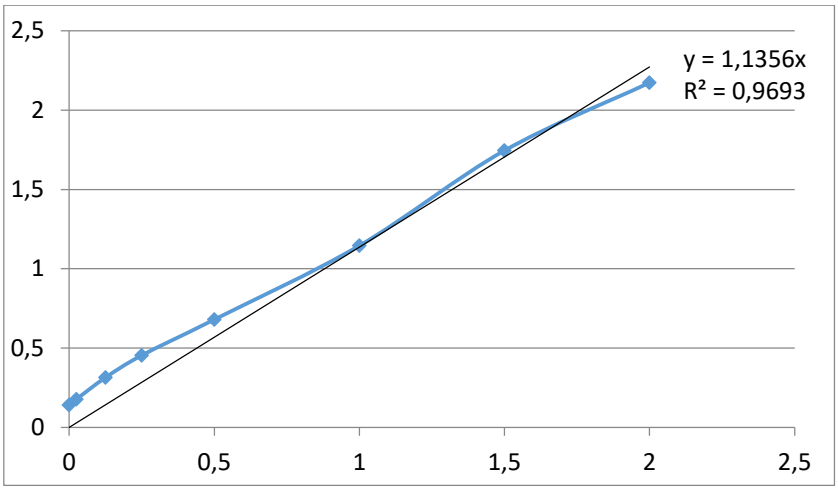

**Şekil 4.33** Hücrelere serbest formlarda ilaç uygulamasının 24 ve 48 saatte Koloni oluşturma eğilimi




**Şekil 4.34** Hücrelere nanopartikül formlarda ilaç uygulamasının 24 ve 48 saatte koloni oluşturma eğilimi

### 4.1.8 Protein Miktar Tayini

562 nm'de okunan absorbans değerleri baz alınarak BSA standart eğrisi oluşturulmuştur (Şekil 4.35). Bu değerler kullanılarak protein miktarı belirlenmiştir.




**Şekil 4.35** BSA standart eğrisi

U87MG kontrol hücrelerinde 24 saatte 1,285 mg protein, 48 saatte 2.03 mg protein ölçülmüştür. Uygulanan ilaçların 24 ve 48 saat uygulamalarından elde edilen protein miktarı Tablo 4.1'de belirtilmiştir.

**Tablo 4.1** Protein miktarları

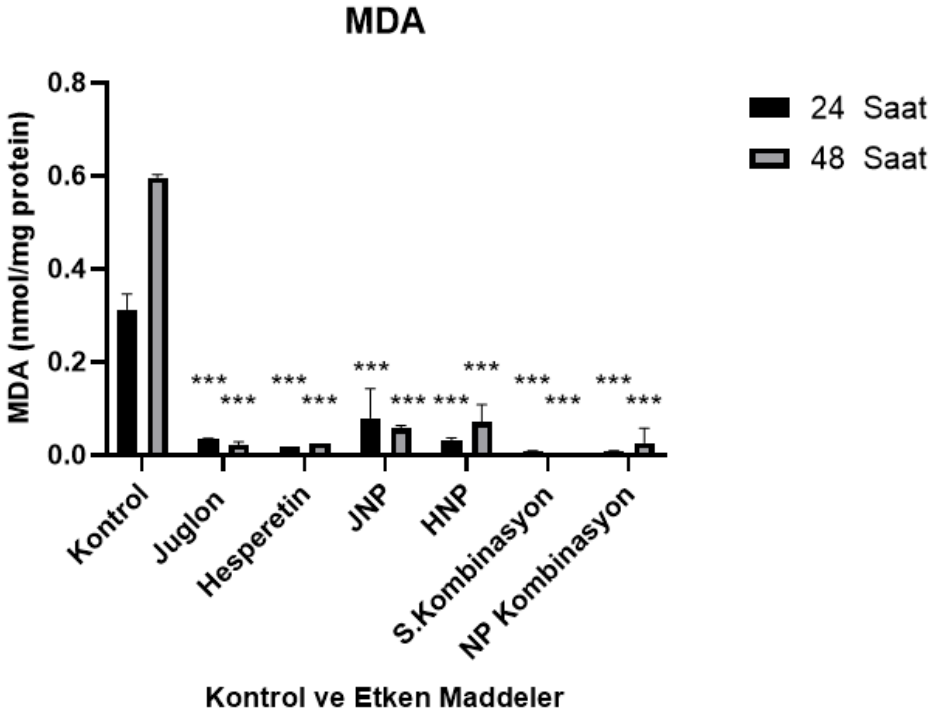
| | 24. saat | 48. saat |
|---|---|---|
| Juglon | 1.47mg | 2.37mg |
| Hesperetin | 0.83mg | 1.7mg |
| Serbest Kombinasyon | 1.49mg | 0.108mg |
| JNP | 1.86mg | 1.63mg |
| HNP | 1.16mg | 1.36mg |
| Nanopartikül Kombinasyon | 1.96mg | 2.23mg |

### 4.1.9 İlaç Tedavisi Uygulanan U87MG Hüclerinde MDA Tayini

U87MG hücre hattında oksidatif stres düzeyini belirlemek için monaldehit düzeyleri ölçülmüştür. Hücre lizatlarına 24h kontrol hücreerinde MDA düzeyi 0,345 mg, 48h kontrol hücrelerinde MDA düzeyi 0,165 mg olarak bulunmuştur. Juglon, Hesperetin, JNP, HNP ve kombinasyonların MDA miktarı Tablo 4.2'de ve Şekil 4.36'da belirtilmiştir.

**Tablo 4.2** Protein lizatlarından elde edilen MDA düzeyleri

| | 24 saat lizatları | 48 saat lizatları |
|---|---|---|
| Juglon | 0,017 mg | 0,005 mg |
| Hesperetin | 0,015 mg | 0,01 mg |
| JNP | 0,047 mg | 0,029 mg |
| HNP | 0,034 mg | 0,045 mg |
| H-J | 0,039 mg | 0,029 mg |
| Hsp-JNP | 0,044 mg | 0,099 mg |



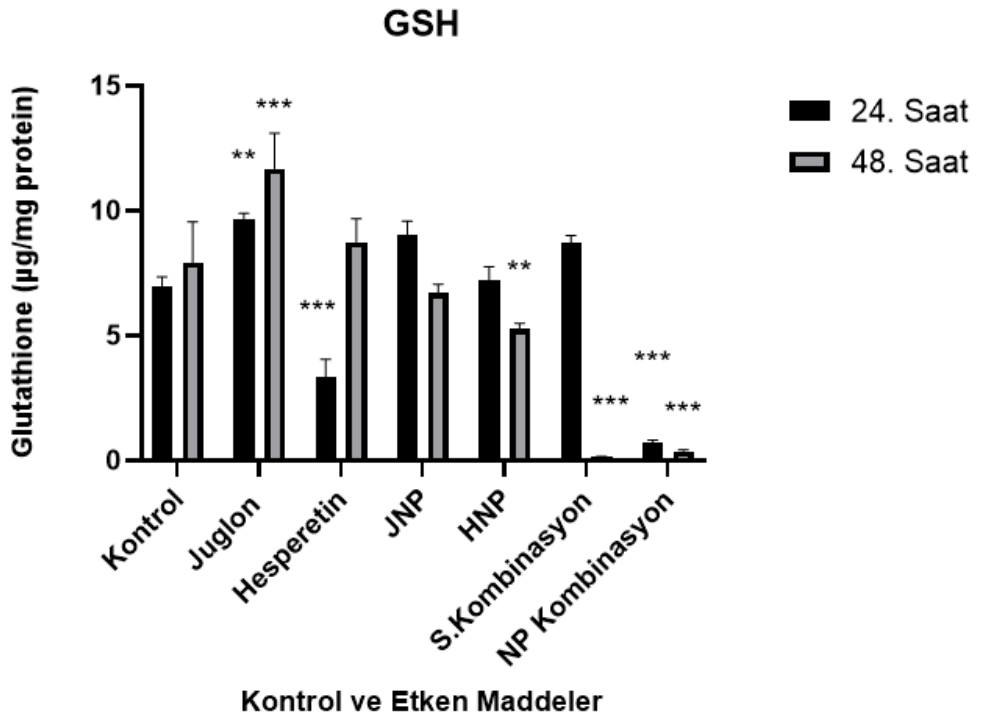

**Şekil 4.36** Kontrol grubu ile etken maddelerdeki MDA düzeyinin karşılaştırılması

### 4.1.10 İlaç Tedavisi Uygulanan U87MG Hücrelerinde GSH Tayini

U87MG hücre hattında redükte glutatyon düzeyleri ölçülmüştür. 24h kontrol grubunda GSH miktarı 6,98 $\mu$g, 48h kontrol grubunda GSH miktarı 7,92 $\mu$g olarak bulunmuştur. Juglon, hesperetin, JNP, HNP ve kombinasyon formlarının GSH miktarları Tablo 4.3'te ve Şekil 4.37'de belirtilmiştir.

**Tablo 4.3** Protein lizatlarından elde edilen GSH düzeyleri

| | 24 saat lizatları | 48 saat lizatları |
|---|---|---|
| Juglon | 9,68 $\mu$g | 11,68 $\mu$g |
| Hesperetin | 3,36 $\mu$g | 8,74 $\mu$g |
| JNP | 9,01 $\mu$g | 6,69 $\mu$g |
| HNP | 7,2 $\mu$g | 5,28 $\mu$g |
| H-J | 8,72 $\mu$g | 0,05 $\mu$g |
| Hsp-JNP | 0,69 $\mu$g | 0,37 $\mu$g |



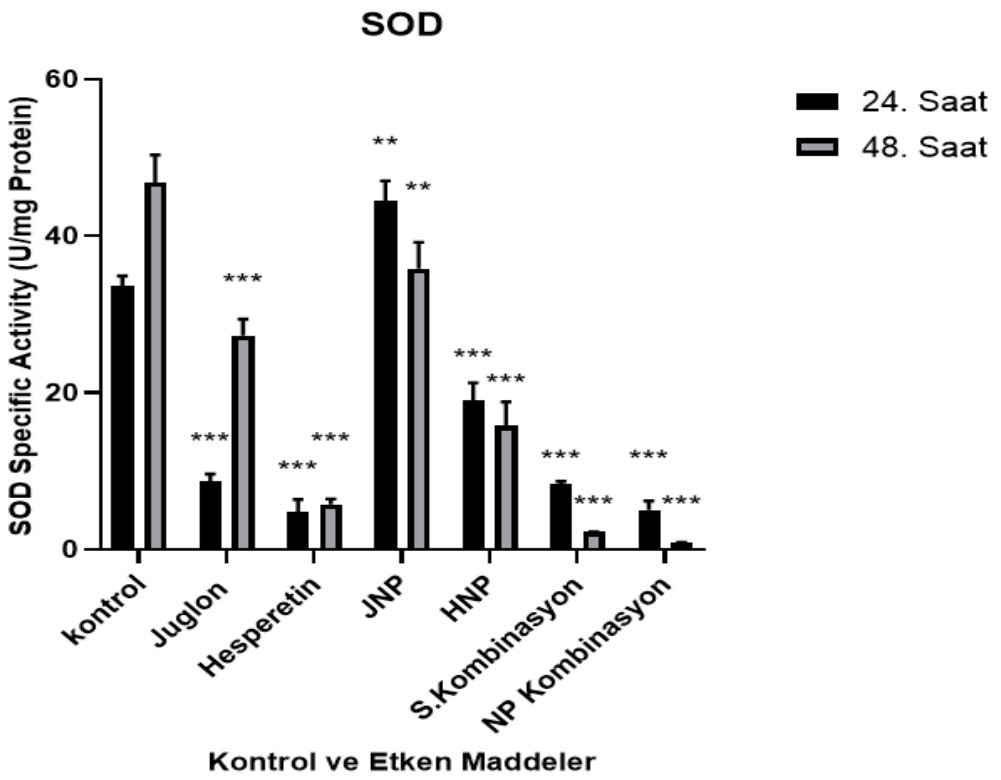

**Şekil 4.37** Kontrol grubu ile etken maddelerdeki GSH düzeyinin karşılaştırılması

### 4.1.11 İlaç Tedavisi Uygulanan U87MG Hücrelerinde SOD Tayini

U87MG hücrelerinin protein lizatlarında süperoksit dismutaz düzeyleri ölçülmüştür. 24h kontrol grubunda 19,99, 48h kontrol grubunda 17,59 protein elde eilmiştir. $IC_{50}$ değerlerine göre Juglon, Hesperetin, JNP, HNP ve kombinasyon formları uygulamalarının protein lizatlarından elde edilen SOD düzeyleri U/mg cinsinden Tablo 4.4'te ve Şekil 4.38'de belirtilmiştir.

**Tablo 4.4** Protein lizatlarından elde edilen MDA düzeyleri

| | 24 saat lizatları | 48 saat lizatları |
|---|---|---|
| Juglon | 5,81 | 12,84 |
| Hesperetin | 4,94 | 2,73 |
| JNP | 23,55 | 29,21 |
| HNP | 15,68 | 10,47 |
| H-J | 5,81 | 11,59 |
| Hsp-JNP | 25,8 | 14,19 |




**Şekil 4.38** Kontrol grubu ile etken maddelerdeki SOD düzeyinin karşılaştırılması

## 4.2 Öneriler

Yapılan çalışmada CCD sağlıklı fibroblast hücre hattı üzerinde juglon ve hesperetinin sitotoksik etkileri gösterilmiştir. Ardından aynı maddeler U87MG GBM kanser hücre hattı üzerinde denenmiştir. Referans olarak ilk aşamada CCD alınarak U87MG ile kıyaslaması yapılmıştır. 24 saat ve 48 saat uygulama sonrası MTT ile $IC_{50}$ değerleri hesaplanmıştır. İlk 24 saatte CCD hücrelerine yüksek dozlarda etki eden juglon ve hesperetin U87MG hücre hattında daha düşük doz aralıklarında etki göstermektedir. Bu fark sayesinde maddelerin ilaç olarak kullanımında doz ayarlaması yapılarak kanser hücrelerini etkileyen bir aralıkta, sağlıklı hücrelere zararın minimumda tutulabileceği bir sistem geliştirilebilir.

Hesperetin ve juglonun farklı kanser türleri üzerinde etkileri araştırılmıştır. Antikanser aktivitesi birçok çalışma ile desteklenen bu iki molekülün deneyde birlikte kullanımının nasıl etkilere sebep olacağı araştırılmıştır. Juglonun glioblastomada ROS-p38-MAPK yolağını kullarak kök benzeri hücrelerin (TSC) apoptozunu indüklediği bulunmuştur [88]. Hesperetinin GBM üzerinde etkisinin araştırıldığı bir çalışmada siklin B1, CDK1 ve p21 yolaklarını kullanarak G2/M

fazında hücre döngüsünü durdurduğu ayrıca p38-MAPK aktivasyonu ile GBM apoptozunu indüklediği bulunmuştur [89]. GBM'ye etkisi literatür çalışmaları ile desteklenen bu iki molekülün kombinasyon halinde hücreye verilmesi CompuSyn programı ile hesaplandığında sinerjistik etki gösterdiği bulunmuştur.

Biyolojik sistemlerde ilaç tedavilerine verilen yanıt her zaman yeterince yüksek olmayabilir. Yabancı madde olarak vücuda giren ilacın hedef dokuya ulaşması sürecinde bazı engellerle karşılaşması söz konusudur. GBM için en zorlu aşama KBB'nin aşılmasıdır. Bu aşamada daha önceden denenmiş olan ilaç sistemlerinin çok az miktarının hedefe ulaşabildiği ve yeterli etki gösteremediği bilinmektedir. KBBnin aşılması için nanopartiküler ilaç taşıma sistemlerinin kullanımının daha faydalı olabileceği deneylerle gösterilmektedir. Daha önceden sentezlenmiş olan hesperetin ve juglon nanopartiküllerinin etkisi U87MG hücre hattı üzerinde denenmiştir. MTT analizleri değerlendirildiğinde serbest formlara kıyasla $IC_{50}$ değerlerinin daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Duranoğlu ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada hesperetin yüklü nanoparçacıklar L929 fare sağlıklı fibroblast hücre hattında denenmiştir. Çalışmamızda elde edilen $IC_{50}$ değeri bu çalışma ile kıyaslandığında toksik değeri sağlıklı hücrelerin toksik refererans aralığına girmemektedir [90]. Erişen ve arkadaşlarının yapmış olduğu juglon nanopartiküllerinin L929 hücre hattında yapmış olduğu çalışmada bulunan $IC_{50}$ değeri U87MG hücre hattında yapmış olduğumuz deneyde bulunan toksik aralığa girmemektedir [91]. Bu sonuçlar nanopartikül formlarda sağlıklı hücreleri etkilemeyerek kanser hücrelerine hedeflenebilen doz aralığı uygulamasını mümkün kılmaktadır. Sonrasında hem serbest hem nanopartikül formlarının oksidatif stresi MDA ile, antioksidan düzeyleri GSH ve SOD analizleri ile ölçülmüştür. MDA düzeyleri tüm deney gruplarında önemli derecede düşmüştür ($p<0,01^{***}$). Antioksidanların serbest radikalleri ortamda azalttığı bilinmektedir [92]. GSH miktarının, JNP ve HNP'de artış gösterdiği diğer serbest formlarda ve kombinasyon uygulamalarında serbest radikallere karşı elektron kaybı yaşanması nedeniyle düşüş gösterdiği bulunmuştur. Juglon, JNP ve serbest kombinasyon uygulamasında SOD miktarında bir artış görülmektedir. Diğer uygulamalarda SOD miktarı azalmıştır.

Juglon ve hesperetinin U87MG hücre proliferasyonuna etkisi hücre göçü ile analiz edilmiştir. 24 saat ve 48 saat $IC_{50}$ değerlerine göre ilaç uygulaması yapılan hücre hattında çizik atılarak bir yara oluşturulmuştur. Kapanma mesafesi ölçülerek hücre proliferasyonunun etkinliği ölçülmüştür. Kontrol grupları ile kıyaslandığında ilaç uygulamasının proliferasyonu düşürdüğü gözlemlenmiştir. Hatta nanopartikül kombinasyonunda açılan yara mesafesinde bir artış gözlemlenmiştir. Bunun yanı sıra hücrelerin koloni oluşturma eğilimi de kolonizasyon deneyi ile ölçülmüştür. Her kuyuya 250 hücre ekimi yapılarak bu hücrelerin hayatta kalma potansiyeli ve sitotoksik ilaçların etkinliğinin değerlendirilmesi sağlanmıştır. Gözleme dayalı oluşturulan bu deneyde kontrol grubuna göre ilaç uygulamalarının koloni oluşumu önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir.

Tez çalışması kapsamında, antioksidan ve antşkanser özellikteki juglon ve hesperetinin serbest formdaki etkinliğine göre nanopartikül formlarının etkinliğinin, ayrı olarak gösterdiği etkinliğe göre de kombinasyon etkinliğinin daha verimli olduğu sonucuna varılmıştır. İlerleyen yıllarda yeni bir ilaç tedavisi geliştirilmesi açısından in vitro çalışmaların GBM üzerine etkisi in vivo hayvan deneyleri ve klinik çalışmalar ile desteklenmesi önerilmektedir.

# KAYNAKÇA


[1] T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Kanser Dairesi Başkanlığı-Kanser Sebepleri. (30.03.2022) https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/kanser-nedir-belirtileri

[2] Weinberg, R.A. (2014). *Biology of Cancer Second Edition*. Garland Science, Taylor & Francis Group.

[3] Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2000). *The Hallmarks Of Cancer*. 100(1):57-70.

[4] Kastan, M.B. and J. Bartek (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. Nature, 432(7015): p. 316-323.

[5] Blow, J.J. and Dutta A. (2005). Preventing re-replication of chromosomal DNA. Nature reviews Molecular cell biology. 6(6): p. 476-486.

[6] Nurse, P. (1994). Ordering S phase and M phase in the cell cycle. 79(4): p. 547-550.

[7] Raleigh, E.A. (2013). *Brenner's Encyclopedia of Genetics* (2. bs), Pages 456-464.

[8] Barnum, K.J. & M.J. O'Connell, (2014). Cell cycle regulation by checkpoints, in Cell Cycle Control., Springer. p. 29-40.

[9] Özgiray, E. vd. (2019). Ege Üniversitesi Hastanesi merkezi sinir sistemi tümörlerinin epidemiyolojik ve genel sağ kalım özellikleri. *Ege Tıp Dergisi*; 58: Ek Sayı, 10-18.

[10] International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. (30.03.2022) https://gco.iarc.fr/today

[11] Kleihues P, Ohgaki H. (1999). Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. Neuro Oncol. Jan;1(1):44-51. doi: 10.1093/neuonc/1.1.44.

[12] Xie, Q., Mittal S. & M.E. Berens, (2014).Targeting adaptive glioblastoma: an overview of proliferation and invasion. Neuro-oncology, 16(12): p. 1575-1584.

[13] Watanabe, K., Tachibana, O., Sato, K., Yonekawa, Y., Kleihues, P. & Ohgaki, H. (1996). Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain pathology*, vol. 6, pp. 217- 223.

[14] Reuss, D.E., Kratz, A., Sahm, F., Capper, D., Schrimpf, D., Koelsche, C., et al. (2015). Adult IDH wild type astrocytomas biologically and clinically resolve into other tumor entities. *Acta Neuropathologica*. Sep;130(3):407-417. DOI: 10.1007/s00401-015-1454-8.

[15] Nakamura, M., Watanabe, T., Yonekawa, Y., Kleihues, P., Ohgaki, H. (2001). Promoter methylation of the DNA repair gene MGMT in astrocytomas is frequently associated with G:C --> A:T mutations of the TP53 tumor suppressor gene. *Carcinogenesis.* Oct;22(10):1715-9. doi: 10.1093/carcin/22.10.1715.

[16] Nimish, A.M. et al. (2022). Therapy for Diffuse Astrocytic and Oligodendroglial Tumors in Adults: ASCO-SNO Guideline. *Journal of Clinical Oncology* 40, no. 4 403-426. DOI: 10.1200/JCO.21.02036

[17] Strobel, H. et al. (2019). Temozolomide and other alkylating agents in glioblastoma therapy. Biomedicines, 7(3): p. 69.

[18] Marriott, N. (2017). Antiparasitic drug could be new treatment for brain tumours. Drug Target Review. (12.04.2022) https://www.drugtargetreview.com/news/22827

[19] Zhunushova, A. (2020). Kan Beyin Bariyeri ve İlaç Geçiş Modulasyonu. *Manas Journal of Agriculture Veterinary and Life Sciences.* Volume 10 (Issue 2) (2020) Pages 115-121.

[20] Lu, J., Low, K.B., Lei, Y., Libera, J.A., Nicholls, A., Stair, P.C., Elam, J.W. (2014). Toward atomically-precise synthesis of supported bimetallic nanoparticles using atomic layer deposition. Nat Commun; 5:3264. doi: 10.1038/ncomms4264.

[21] Kasinathan, N., H. V. Jagani, A. T. Alex, S. M. Volety, and J. V. Rao. (2015). Strategies for drug delivery to the central nervous system by systemic route. *Drug Deliv*, 22: 243-57.

[22] Mahmoud, B.S., AlAmri, A.H. & McConville, C. (2020). Polymeric nanoparticles for the treatment of malignant gliomas. Cancers. 12(1): p. 175.

[23] Lamprecht, A. (2016). Nanotherapeutics: Drug Delivery Concepts in Nanoscience. Singapore: Pan Stanford.

[24] Tüylek, Z. (2018). Nanoteknolojinin Çevre ve İnsan Sağlığı Üzerindeki Riskleri.

[25] Marangoz, Ö. ve Yavuz, O. (2020). Nano-ilaç taşıma sistemleri ve toksikolojik değerlendirmeleri. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 77 (4), 509-526.

[26] Derman, S. (2012). Canine Parvovirus'e Ait Antijenik Özellikli Sentetik Peptidlerin Sentezi Ve Biyokonjugatlarının Geliştirilmesi, Doktora Tezi, Yıldz Teknik Üniversitesi.

[27] Letchford, K. & Burt, H. (2007). A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, vol. 65, pp. 259-269,

[28] Mora-Huertas, C., Fessi, H. & Elaissari A. (2010). Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International journal of pharmaceutics*, vol. 385, pp. 113-142.

[29] Leyva-Gómez, G., Piñón-Segundo, E., Mendoza-Muñoz, N., Zambrano-Zaragoza, M., Mendoza-Elvira, S. & Quintanar-Guerrero, D. (2018). Approaches in Polymeric Nanoparticles for Vaginal Drug Delivery: A Review of the State of the Art. *International journal of molecular sciences*, vol. 19, p. 1549.

[30] Berk, S. A. (2012). Nanopartikül: Geleceğin Korkulu Rüyası. *Tuberk Toraks*, vol. 60(2) pp. 180-184.

[31] Şengel-Türk, C.T., Hasçelik, C., & Gönül, N., (2007). Nanoparticulate Drug Delivery Systems For Targeting The Drugs To The Brain. *Journal of Neurological Sciences*, 24, 254-263.

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

[33] Vroman, I., Tighzert, L. (2009). Biodegradable polymers. *Materials*, 2: 307-344.

[34] Derman S. , Kızılbey K. , Akdeste Z. M. (2013). Polymeric nanoparticles. *Sigma Journal of Engineering and Natural Sciences*, 31(1): 107-120.

[35] Engineer, C., Parikh, J. & Raval, A. (2011). "Review on Hydrolytic Degradation Behavior of Biodegradable Polymers from Controlled Drug Delivery System. Trends in Biomaterials & Artificial Organs, vol. 25.

[36] Pinto Reis, C., Neufeld, R.J., Ribeiro, A.J., Veiga, F. (2006). Nanoencapsulation I. methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. Nanomedicine, 2: 8-21.

[37] Yelkenci, G. (2015). Juglon yüklü nanopartiküllerin üretimi ve karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi.

[38] Ersoz, M., Erdemir, A., Duranoglu, D., Uzunoglu, D., Arasoglu, T., Derman S. & Mansuroglu B. (2019). Comparative evaluation of hesperetin loaded nanoparticles for anticancer activity against C6 glioma cancer cells, Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology, 47:1, 319-329.

[39] Panche, A., Diwan, A. & Chandra, S. (2016). Flavonoids: an overview. Journal of nutritional science, 5.

[40] Woż niak, D., Lamer- Zarawska, E. & Matkowski, A. (2004). Antimutagenic and antiradical properties of flavones from the roots of Scutellaria baicalensis Georgi. Food/Nahrung, 48(1): p. 9-12.

[41] Kahraman, A., Serteser, M., Koken, T. (2002). Flavonoidler. Kocatepe TIp Dergisi (2002), 3, 01-08.

[42] Chahar, M.K., et al., (2011). Flavonoids: A versatile source of anticancer drugs. Pharmacognosy reviews, 5(9): p. 1.

[43] Abotaleb, M. et al. (2019). Flavonoids in cancer and apoptosis. Cancers, 11(1): p. 28.

[44] Yang, Y., et al. (2014). Transport of active flavonoids, based on cytotoxicity and lipophilicity: an evaluation using the blood–brain barrier cell and Caco-2 cell models. Toxicology in Vitro, 28(3): p. 388-396.

[45] Youdim, K.A., et al. (2004). Flavonoid permeability across an in situ model of the blood–brain barrier. Free Radical Biology and Medicine, 36(5): p. 592-604.

[46] National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 72281, Hesperetin.

[47] Brand, W., van der Wel, P., Rein M.J., Barron, D., Williamson, G., Van Bladeren, P.J., Rietjens, I. (2008). Metabolism and transport of the citrus flavonoid hesperetin in Caco-2 cell Monolayers. Drug Metabolism and Disposition, 36: 1794–1802.

[48] Zarebczan, B., Pinchot, S.N., Kunnimalaiyaan, M., Chen, H. (2011). Hesperetin, a potential therapy for carcinoid cancer. The American Journal of Surgery, 201: 329–333.

[49] Nalini, N., Aranganathan, S., Kabalimurthy, J. (2012). Chemopreventive efficacy of hesperetin (citrus flavonone) against 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. Toxicology Mechanisms and Methods, 22(5): 397-408.

[50] Choi, E.J. (2007). Hesperetin induced G1-phase cell cycle arrest in human breast cancer MCF-7 cells: involvement of CDK4 and p21. Nutrition and Cancer, 59: (1) 115-119.

[51] Yang, Y., Wolfram, J., Boom, K., Fang, X., Shen, H., Ferrari, M. (2013). Hesperetin impairs glucose uptake and inhibits proliferation of breast cancer cells. Cell Biochem. 31 (5), 374–9.

[52] Gurushankar, K., Gohulkumar, M., Prasad, N. R. & Krishnakumar, N. (2013). Synthesis, characterization and in vitro anti-cancer evaluation of hesperetin-loaded nanoparticles in human oral carcinoma (KB) cells Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology, 5 015006.

[53] Kim, S.Y., Lee, J.Y., Park, Y.D., Kang, K.L., Lee, J.C., Heo, J.S. (2013). Hesperetin alleviates the inhibitory effects of high glucose on the osteoblastic differentiation of periodontal ligament stem cells. PLoS One. 28;8(6):e67504. doi: 10.1371/journal.pone.0067504.

[54] Choi, D., Kim, C.L., Kim, J.E., Mo, J.S., Jeong, H.S. (2020). Hesperetin inhibit EMT in TGF-β treated podocyte by regulation of mTOR pathway. Biochem Biophys Res Commun, 528(1):154-159. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.05.087.

[55] Elango, R., Athinarayanan, J., Subbarayan, V.P., Lei, D.K.Y., Alshatwi, A.A. (2018). Hesperetin induces an apoptosis-triggered extrinsic pathway and a p53- independent pathway in human lung cancer H522 cells. J Asian Nat Prod Res. (6):559-569. doi: 10.1080/10286020.2017.1327949.

[56] Montopoli, M., Ragazzi, E., Froldi, G., & Caparrotta L. (2009). Cell Prolif. 42, 195–206.

[57] Adan, A., Baran, Y. (2015). Fistein and hesperetin induced apoptosis and cell cycle in chronic myeloid leukemia cells accompanied by modulation of cellular signaling. Tumour Biol, 37:5781–95

[58] Juglone toxicity Archived 2022-05-12 at the Wayback Machine.

[59] Soderquist, C.J. (1973). Juglone and allelopathy. Chem. Educ., 50, 11, 782.

[60] Zhang, W., Liu, A., Li, Y., Zhao, X., Lv, S., Zhu, W., Jin, Y. (2012). Anticancer activity and mechanism of juglone on human cervical carcinoma HeLa cells. Can J Physiol Pharmacol. 90(11):1553-8. doi: 10.1139/y2012-134.

[61] Kamisawa, T., Isawa, T., Koike, M., Tsuruta, K., Okamoto, A., (1995). Hematogenous metastases of pancreatic ductal carcinoma. Pancreas, 11, 345–9.

[62] Wagner, M., Redaelli, C., Lietz, M., Seiler, C.A., Friess, H., Büchler, M.W., (2004). Curative resection is the single most important factor determining outcome in patients with pancreatic adenocarcinoma. Br J Surg, 91, 586-94.

[63] Sugie, S., Okamoto, K., Rahman, K.M., Tanaka, T., Kawai, K., Yamahara, J., Mori, H., (1998). Inhibitory effects of plumbagin and juglone on azoxymethane-induced intestinal carcinogenesis in rats. Cancer Lett, 127, 177–83.

[64] Ahmad, T. & Suzuki, Y. J. (2019). Juglone in Oxidative Stress and Cell Signaling. Antioxidants (Basel, Switzerland), 8(4), 91. https://doi.org/10.3390/antiox8040091.

[65] Arasoğlu, T., Mansuroğlu, B., Derman, S., Gümüş, B., Koçyiğit, B., Acar, T., Kocaçalıskan, I. (2016). Bir poli kullanılarak juglonun (5-hidroksi-1,4-naftokinon) antifungal aktivitesinin arttırılması ( d,l-laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) nanoparçacık sistemi. J. Agric. Gıda Kimyası, 64 :7087–7094. doi: 10.1021/acs.jafc.6b03309.

[66] Arasoğlu, T., Derman, S., Mansuroğlu, B., Yelkenci, G., Koçyiğit, B., Gümüş, B., Acar, T., Kocaçalıskan, I. (2017). Juglon kapsüllenmiş PLGA nanopartiküllerinin sentezi, karakterizasyonu ve antibakteriyel aktivitesi. J. Uygulama Mikrobiyol. 123:1407–1419. doi: 10.1111/jam.13601.

[67] Zhang, Y.Y., Zhang, F., Zhang, Y.S., Thakur, K., Zhang, J.G., Liu, Y., Kan, H., Wei, Z.J. ( 2019). Mechanism of Juglone-Induced Cell Cycle Arrest and

Apoptosis in Ishikawa Human Endometrial Cancer Cells. J Agric Food Chem. 3;67(26):7378-7389. doi: 10.1021/acs.jafc.9b02759.

[68] d'Arcy Doherty, M., Rodgers, A., Cohen, G.M. (1987). Mechanisms of toxicity of 2- and 5-hydroxy-1,4-naphthoquinone; absence of a role for redox cycling in the toxicity of 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone to isolated hepatocytes. J Appl Toxicol, 7(2):123-9. doi: 10.1002/jat.2550070209.

[69] Wang, P. et al. (2018). Juglone induces apoptosis and autophagy via modulation of mitogen-activated protein kinase pathways in human hepatocellular carcinoma cells. Food Chem Toxicol, 116(Pt B):40-50. doi: 10.1016/j.fct.2018.04.004.

[70] Dawn, B.M., Allan, D.M., Colleen, M.S. (1996). Basic Medical Biochemistry a Clinical Approach.Lippincott Williams & Wilkins. Baltimore, Maryland.

[71] Akkuş İ. (1995). Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Yayınları. Konya.

[72] Kohen, R. and Nyska, A. (2002). Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. Toxicologic Pathology, Vol. 30, No. 6, pp. 620-650.

http://dx.doi.org/10.1080/01926230290166724

[73] Gaweł, S., Wardas, M., Niedworok, E., Wardas, P. (2004). Dialdehyd malonowy (MDA) jako wskaź nik procesów peroksydacji lipidów w organizmie [Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker]. Wiad Lek, 57(9-10):453-5.

[74] Akyol, Ö. (2004). Şizofrenide oksidatif stres. Kocatepe Tıp Dergisi, 5, 15-25.

[75] Stockert, J.C., Horobin, R.W., Colombo, L.L., Blázquez-Castro, A. (2018). Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives (PDF). Acta Histochemica. 120 (3): 159–167. doi:10.1016/j.acthis.2018.02.005

[76] Rodriguez, L.G., Wu, X., Guan, J.L. (2005). Wound healing experiment. Methods in Molecular Biology. 294 : 23–9.

[77] Munshi, A., Hobbs, M., & Meyn, R. E. (2005). Clonogenic cell survival assay. Methods in molecular medicine, 110, 21–28. https://doi.org/10.1385/1-59259-869-2:021

[78] Smith, P. K. et al. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal. Biochem., vol. 150, no. 1, pp 76-85.

[79] Olson, B. J. S. C. & Markwell, J. (2007). Assays for Determination of Protein Concentration. Curr. Protoc. Protein Sci., vol. 48, no. 1.

[80] Ayala, A., Muñoz, M. F. & Argüelles, S. (2014). Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy2-Nonenal. Oxid. Med. Cell Longev., pp. 1-31.

[81] Janero, D. R. (1990). Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. Free Radic. Biol. Med., vol. 9, no. 6, pp. 515-540.

[82] Dawn, B.M., Allan, D.M., Colleen, M.S. (1996). Basic Medical Biochemistry a Clinical Approach.Lippincott Williams & Wilkins. Baltimore, Maryland.

[83] Anderson, M.E. (1985). Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. Methods Enzymol. 113:548-55. doi: 10.1016/s0076-6879(85)13073-9.

[84] Johnson F. & Giulivi, C. (2005). Superoxide dismutases and their impact upon human health. Mol. Aspects Med., vol. 26, no. 4-5, pp. 340-352.

[85] Goldstein, S., Michel, C., Bors, W., Saran, M. & Czapski, G. (1988). A critical reevaluation of some assay methods for superoxide dismutase activity. Free Radic. Biol. Med., vol. 4, no. 5, pp. 295-303.

[86] Çırpanlı, Y. (2009). Kamptotesin Içeren Polimerik ve Oligosakkarit Bazlı Nanopartiküler Formülasyonların Geliştirilmesi ve In Vitro-In Vivo Değerlendirilmesi. Farmasötik Teknoloji, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.

[87] Chou, T.C., (2010). Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. Cancer research, 70(2): p. 440-446.

[88] Wu, J. et al. (2017). Juglone induces apoptosis of tumor stem-like cells through ROS-p38 pathway in glioblastoma. BMC Neurology volume 17, Article number: 70

[89] Li, Q., Miao, Z., Wang, R., Yang, J., Zhang, D. (2020). Hesperetin Induces Apoptosis in Human Glioblastoma Cells via p38 MAPK Activation. Nutr Cancer, 72(3):538-545.

[90] Duranoğlu, D., Uzunoglu, D., Mansuroglu, B., Arasoglu, T., Derman, S. (2018). Synthesis of hesperetin-loaded PLGA nanoparticles by two different experimental design methods and biological evaluation of optimized nanoparticles. Nanotechnology, 28;29(39):395603. doi: 10.1088/1361-6528/aad111.

[91] Erisen, S., Arasoglu, T., Mansuroglu, B., Kocacaliskan, I., Derman, S., (2019). Cytotoxic and mutagenic potential of juglone: a comparison of free and nano-encapsulated form. Arh Hig Rada Toksikol 2020; 71:69-77.

[92] Murota, K. & Terao, J. (2003). Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. Arch. Biochem. Biophys., vol. 417, no. 1, pp. 12-17.

# TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

**Konferans Bildirileri**

N. Güler, “Hesperetin Ve Juglon Yüklü Nanopartiküllerin U87mg Hücre Hattı Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi”, 6. Uluslararası Akademik Öğrenci Çalışmaları Kongresi, Özet Bildirisi, sayfa 446, 23-24 Nisan 2022.