T.C

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MİDE KANSERİNE KARŞI 5-FLUOROURASİL VE TİMOKİNON YÜKLÜ POLİKAPROLAKTON TABANLI NANOPARTİKÜLER TAŞIYICI SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ

Fadime ÇETİN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Biyomühendislik Programı

Danışman

Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR

Şubat, 2023

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MİDE KANSERİNE KARŞI 5-FLUOROURASİL VE TİMOKİNON YÜKLÜ POLİKAPROLAKTON TABANLI NANOPARTİKÜLER TAŞIYICI SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ

Fadime ÇETİN tarafından hazırlanan tez çalışması 03.02.2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı, Biyomühendislik Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Doç. Dr. Murat TOPUZOĞULLARI, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Doç. Dr. Melike ERSÖZ, Üye
Demiroğlu Bilim Üniversitesi _____

Danışmanım Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR sorumluluğunda tarafımca hazırlanan Mide Kanserine Karşı 5-Fluorourasil Ve Timokinon Yüklü Polikaprolakton Tabanlı Nanopartiküler Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Fadime ÇETİN

İmza

Bir işçi çocuğu olarak bilim hayalleri kuran herkese

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi birikimi ve tecrübesiyle bana destek olan, tez konumun belirlenmesinde ve çalışmalarım sırasında bana yol gösteren Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği laboratuvarının kurucuları değerli hocalarım Sn. Prof. Dr. Adil M. ALLAHVERDİYEV'e ve Sn. Doç. Dr. Melahat BAĞIROVA'ya, araştırmalarımda bilgi ve deneyimleriyle bana her zaman yol gösteren danışman hocam Sn. Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR'a,

Ayrıca bölümümüzün kurucusu Prof.Dr. Mustafa AKDESTE'ye, bölümümüzün kurucu üyeleri Prof.Dr. Huriye KUZU'ya ve Prof.Dr. Zeynep AKDESTE'ye

Tezimin değerlendirilmesinde katkılarını esirgemeyen jüri üyelerim Sn. Doç. Dr. Murat TOPUZOĞULLARI'na ve Sn. Doç.Dr. Melike ERSÖZ'e

Ayrıca tez çalışmam için gerekli ilacın teminini sağladıkları için Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik bölüm başkanı Prof. Dr. Fikrettin ŞAHİN'e ve araştırmacı Dr. Emre CEBECİ'ye,

Tez çalışmam sırasında sentezlenen nanopartiküllerin SEM görüntülerinin alınmasındaki katkılarından dolayı Boğaziçi Üniversitesi-Yaşam Bilimleri ve Teknolojileri Uygulama ve Araştırma Merkezi çalışanı Uzm. Demet SEZGİN MANSUROĞLU'na,

Tez deneylerimin yapılması sırasında bilgi ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen tüm Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği laboratuvarı öğrencilerine,

Beni her zaman ve her konuda destekleyen, karşılıksız emekleri ve sevgileri için annem Rukiye ÇETİN'e, babam Faruk ÇETİN'e ve kardeşim Mükmine ÇETİN'e, en içten duygularımla teşekkür ederim.

Fadime ÇETİN

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ vii

KISALTMA LİSTESİ viii

ŞEKİL LİSTESİ v

TABLO LİSTESİ vii

ÖZET viii

ABSTRACT xviii

1 GİRİŞ 1

1.1 Literatür Özeti 1

1.2 Tezin Amacı 4

1.3 Hipotez 5

2 GENEL BİLGİLER 7

2.1 Mide Kanseri ..... **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**

2.1.1 Mide Kanseri Epidemiyolojisi 7

2.1.2 Mide Kanseri Etyolojisi ve Risk Faktörleri 10

2.1.3 Mide Kanserinde Teşhis 13

2.1.4 Gastrik Kanserlerin Sınıflandırılması ve Evreleme 13

2.1.5 Mide Kanserinde Tedavi Yöntemleri 15

2.2 Nanopartiküller 21

2.2.1 Polimerik Nanopartiküller 25

3 MATERYAL VE METOT 32

3.1 Materyal 32

3.1.1 Ekipman ve Sarf Malzemeler 32

3.1.2 Kimyasallar 33

3.1.3 Deneylerde Kullanılan Tampon ve Kimyasalların Hazırlanışı 34

3.1.4 Deneylerde Kullanılan Hücreler 35

3.2 Metot 35

3.2.1 Hücre Kültürü Metodları 35

3.2.2 Farklı Formülasyonları İçeren Polikaprolakton Nanopartiküllerinin Sentezlenmesi 38

3.2.3 Farklı Formülasyonları İçeren Polikaprolakton Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu 41

3.2.4 5-Fluorourasil ve/veya Timokinon İçeren Polikaprolakton Nanopartiküllerinin Hücre Hatları Üzerinde MTT yöntemi ile Toksisitelerinin Tayini ve Toksik Olmayan Konsantrasyonların Belirlenmesi 43

4 DENEYSEL SONUÇLAR **47**

4.1 L929 Fare Fibroblast Hücrelerinin Kültürü 47

4.2 AGS Mide Kanseri Hücre Kültürü 47

4.3 Farklı Formülasyonları İçeren Polikaprolakton Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu 48

4.3.1 Polikaprolakton Nanopartiküllerinin Boyut Analizi 48

4.3.2 Polikaprolakton Nanopartiküllerinin Zeta Potansiyel Analizi 50

4.3.3 Polikaprolakton Nanopartiküllerinin Taramalı Elektron Mikroskobu ile Karakterizasyonu 52

4.3.4 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi Analizi 59

4.3.5 Polikaprolakton Nanopartiküllerinin Reaksiyon Verimi 65

4.3.6 Polikaprolakton Nanopartiküllerinin Enkapsülasyon Verimi 66

4.3.7 Farklı Formülasyonları İçeren Polikaprolakton Nanopartiküllerinin Salım Profilleri 66

4.4 Polikaprolakton Nanopartiküllerinin Hücre Hatları Üzerinde Etkinliğinin *in vitro* olarak İncelenmesi 70

4.4.1 Polikaprolakton Nanopartiküllerinin L929 Fare Fibroblast Hücre Hattı Üzerinde Sitotoksitelerinin Belirlenmesi 70

4.4.2 Polikaprolaktan Nanopartiküllerinin AGS Mide Kanseri Hücre Hattı Üzerinde Sitotoksitelerinin Belirlenmesi 72

4.4.3 Timokinon ve/veya 5-Florourasil'in AGS Mide Kanseri Hücre Hattı Üzerinde Sitotoksitelerinin Belirlenmesi 75

5 SONUÇ VE ÖNERİLER **78**

KAYNAKÇA **87**

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR **106**

SİMGE LİSTESİ

α	Alfa
β	Beta
ε	Epsilon
g	Gram
kDa	Kilo dalton
L	Litre
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mV	Milivolt
nm	Nanometre
°C	Santigrat derece
cm	Santimetre
~	Yaklaşık
%	Yüzde

KISALTMA LİSTESİ

5-Fu	5-Fluorourasil
CagA	Sitotoksin ilişkili gen A
CO_2	Karbondioksit
DMEM	Dulbecco modifiye Eagle medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribo nükleik asit
ECF	Epirubisin, sisplatin ve 5-fluorourasil
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
FBS	Fetal sığır serumu
FDA	Amerikan Gıda ve ilaç dairesi
FLOT	5-florourasil, lökovorin, oksaliplatin ve docetaxel
FOLFOX	Folinic Acid, Fluorouracil, Oxaliplatin
FT-IR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopi
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
H_2O_2	Hidrojen peroksit
H. pylori	Helicobacter pylori
IARC	Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı
MTT	Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide
N_2	Nitrojen
Na_2HPO_4	Disodyum hidrojen monofosfat
NaCl	Sodyum klorür
NH_3	Amonyak
NP	Nanopartikül
PCL	Polikaprolakton
PDI	Çoklu dağılım indeksi
PEG	Polietilen glikol
PET	Pozitron Emisyon Tomografi
PLA	Polilaktik asit
PLGA	Polilaktik-ko-glikolik asit
PPI	Proton pompa inhibitörleri
PVA	Polivinil alkol
RNA	Ribonükleik asit
ROS	Reaktif oksijen
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
TNP	Tek nükleotid polimorfizmleri
TS	Timidilat sentazın
TQ	Timokinon
UV	Ultraviyole
VacA	Vakuol oluşturucu sitotoksin A

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 2020 yılında dünyada (a) erkekler ve (b) kadınlar arasında en yaygın kanser insidansı türü [1] 7
Şekil 2.2 2020 yılında ülkelere göre (a) erkekler ve (b) kadınlar arasında en yaygın kanser ölümü türü [1] 8
Şekil 2.3 2020 Yılında Dünyada en yaygın 10 kanser türü ölümü oranları [1] 9
Şekil 2.4 2020 Yılında Dünyadaki tüm mide kanseri vakalarının kıtalara göre teşhis ve ölüm oranları [27] 9
Şekil 2.5 Mide kanseri oluşumunda çevresel ve genetik faktörler 10
Şekil 2.6 Correa kaskadı 12
Şekil 2.7 Urasil ve 5-Florourasil molekül yapısı 18
Şekil 2.8 Poli (ε-kaprolakton)'un kimyasal yapısı [148] 28
Şekil 2.9 Poli (ε-kaprolakton)'un zincirleşme yapısı [150] 28
Şekil 2.10 Timokinon molekül yapısı 29
Şekil 3.1 Thoma lamı görüntüsü 37
Şekil 4.1 L929 Fibroblast hücrelerinin görüntüsü (10X) 47
Şekil 4.2 AGS mide kanseri hücrelerinin görüntüsü (10X) 48
Şekil 4.3 Boş PCL nanopartiküllerinin Zeta-Sizer boyut dağılım grafiği 49
Şekil 4.4 5-Fu-PCL nanopartiküllerinin Zeta-Sizer boyut dağılım grafiği 49
Şekil 4.5 TQ-PCL nanopartiküllerinin Zeta-Sizer boyut dağılım grafiği 50
Şekil 4.6 5-Fu-TQ-PCL nanopartikülerinin Zeta-Sizer boyut dağılım grafiği 50
Şekil 4.7 Boş PCL nanopartiküllerinin Zeta-Sizer zeta potansiyel grafiği 51
Şekil 4.8 5-Florourasil enkapsüle PCL nanopartiküllerinin Zeta-Sizer zeta potansiyel grafiği 51
Şekil 4.9 Timokinon enkapsüle PCL nanopartiküllerinin Zeta-Sizer zeta potansiyel grafiği 52
Şekil 4.10 5-Florourasil ve Timokinon enkapsüle PCL nanopartiküllerinin Zeta-Sizer zeta potansiyel grafiği 52
Şekil 4.11 PCL nanopartiküllerinin SEM görüntüsü (20.000X) 53
Şekil 4.12 PCL nanopartiküllerinin SEM görüntüsü (40.000X) 54
Şekil 4.13 PCL nanopartiküllerinin SEM görüntüsü (80.000X) 54
Şekil 4.14 5-Fu-PCL nanopartiküllerinin SEM görüntüsü (20.000X) 55
Şekil 4.15 5-Fu-PCL nanopartiküllerinin SEM görüntüsü (40.000X) 55
Şekil 4.16 5-Fu-PCL nanopartiküllerinin SEM görüntüsü (80.000X) 56
Şekil 4.17 TQ-PCL nanopartiküllerinin SEM görüntüsü (20.000X) 56

Şekil 4.18 TQ-PCL nanopartiküllerinin SEM görüntüsü (40.000X) 57
Şekil 4.19 TQ-PCL nanopartiküllerinin SEM görüntüsü (80.000X) 57
Şekil 4.20 5-Fu-TQ-PCL nanopartiküllerinin SEM görüntüsü (20.000X)..... 58
Şekil 4.21 5-Fu-TQ-PCL nanopartiküllerinin SEM görüntüsü (40.000X)..... 58
Şekil 4.22 5-Fu-TQ-PCL nanopartiküllerinin SEM görüntüsü (80.000X)..... 59
Şekil 4.23 Serbest 5-Fu FT-IR spektrumu 60
Şekil 4.24 Serbest TQ FT-IR spektrumu..... 61
Şekil 4.25 Boş PCL nanopartikülü FT-IR spektrumu 62
Şekil 4.26 5-Fu-PCL FT-IR spektrumu..... 63
Şekil 4.27 TQ-PCL FT-IR spektrumu 64
Şekil 4.28 5-Fu-TQ-PCL FT-IR spektrumu 65
Şekil 4.29 5-Fu kalibrasyon eğrisi..... 67
Şekil 4.30 TQ kalibrasyon eğrisi 68
Şekil 4.31 5-Fu-PCL salım grafiği..... 69
Şekil 4.32 TQ-PCL salım grafiği 69
Şekil 4.33 5-Fu-TQ-PCL salım grafiği 70
Şekil 4.34 5-Fu-PCL nanopartiküllerinin L929 fare fibroblast hücre hattı üzerindeki sitotoksisite analizi..... 71
Şekil 4.35 TQ-PCL nanopartiküllerinin L929 fare fibroblast hücre hattı üzerindeki sitotoksisite analizi..... 71
Şekil 4.36 5-Fu-TQ-PCL nanopartiküllerinin L929 fare fibroblast hücre hattı üzerindeki sitotoksisite analizi..... 72
Şekil 4.37 5-Fu-PCL nanopartiküllerinin AGS mide kanseri hücre üzerindeki sitotoksisite analizi..... 74
Şekil 4.38 TQ-PCL nanopartiküllerinin AGS mide kanseri hücre üzerindeki sitotoksisite analizi..... 74
Şekil 4.39 5-Fu-TQ-PCL nanopartiküllerinin AGS mide kanseri hücre üzerindeki sitotoksisite analizi..... 75
Şekil 4.40 Serbest formdaki 5-Fu'nun AGS mide kanseri hücre hattı üzerindeki sitotoksisite analizi..... 76
Şekil 4.41 Serbest formdaki TQ'nun AGS mide kanseri hücre hattı üzerindeki sitotoksisite analizi..... 76
Şekil 4.42 Serbest formdaki 5-Fu+TQ'nun AGS mide kanseri hücre hattı üzerindeki sitotoksisite analizi..... 77

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 Mide kanserleri için TNM evreleme sistemi..... 14
Tablo 2.2 Polimer nanopartiküllerin bazı kanser türlerinde incelemeleri 27
Tablo 4.1 Polikaprolakton nanopartiküllerinin reaksiyon verimi 65
Tablo 4.2 Polikaprolakton nanopartiküllerinin enkapsülasyon verimi 66

ÖZET

Mide Kanserine Karşı 5-Fluorourasil ve Timokinon Yüklü Polikaprolakton Tabanlı Nanopartiküler Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi

Fadime ÇETİN

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR

Mide kanseri şu an dünyada en ölümcül hastalıklardan biridir. Coğrafi etmenlere göre mide kanseri insidansında farklılıklar görülsede teşhisin ileri evrelerde yapılması ve sınırlı tedavi etkinliğinden dolayı hala ölüm oranları yüksektir. Mevcut tedavi yöntemlerini cerrahi, kemoterapötik rejimler ve kombinasyonları oluşturur. Kemoterapötik rejimlerin, sistemik toksik yan etkileri, düşük biyoyararlanımları ve gelişen ilaç dirençleri tedavi başarısını olumsuz etkileyen en önemli faktörlerdendir. Bu durumda sağkalımı ve tedavi başarısını iyileştirecek multidisipliner yeni yaklaşımların geliştirilmesi büyük bir önem arz etmektedir.

Bu çalışmada, kemoterapötik ilaçların tüm sistem üzerindeki toksik etkilerini azaltmak ve hedefe yönelik uzun süre salım sağlayabilecek etkili bir ilaç iletimi sistemi için yeni bir nanoboyutlu ilaç taşıma sisteminin geliştirilmesi hedeflenmektedir. Bu çalışma kapsamında ileri evre mide kanseri birinci basamak kemoterapi rejimlerinde sıklıkla kullanılan 5-Fluorourasil (5-Fu) ve Nigella Sativa

bitkisinin esas bileşenlerinden anti-tümör, antibakteriyel özellikleri kanıtlanmış olan Timokinon (TQ) moleküllerinin biyobozunur, biyouyumlu, FDA onaylı Polikaprolakton (PCL) polimerlerine enkapsülasyonu ile yeni nesil nanoformülasyonlar hazırlanmıştır. Geliştirilen bu sistem anti-kanser ajanların nanopartiküllere kapsüllenerek biyolojik sisteme verilmesine, ilacın toksik etkisinin azaltılmasına, stabilitelerinin ve biyoyararlanımlarının arttırılabilmesine olanak sağlamaktadır. Ayrıca kemoterapötik ajanlar doğal bileşikler ile kombinasyon halinde nanopartikül içerisine enkapsüle edilebilmektedirler.

Bu çalışmada 5-Fu ve TQ bileşenleri tekli ve kombinasyon halinde çözücü buharlaştırma yöntemiyle PCL nanopariküllerine kapsüllenmiştir. Sentezlenen polimerik nanopartiküllerin karakterizasyonu SEM, FTIR, UV-VIS, DLS analizleri ile gerçekleştirilmiştir. Nanopartiküllerin antikanser etkinliği AGS Mide kanseri hücrelerinde, toksisite ve biyouyumluluk çalışmaları ise L929 Fibroblast hücrelerinde MTT yöntemi kullanılarak *in vitro* test edilmiştir.

AGS mide kanseri hücre hattı üzerinde tek başına 5-FU, TQ ve 5-FU+TQ kombinasyonlarını içeren PCL nanopartiküllerinin farklı konsantrasyonları incelenmiş ve 5-FU+TQ PCL nanopartiküllerinin AGS hücreleri üzerindeki inhibe edici etkinliğinin tekli formülasyonlara göre daha yüksek olduğu görülmüştür. L929 Fibroblast hücreleri üzerinde denenen aynı konsantrasyonların ise toksik etkisinin bulunmadığı gözlemlenmiştir.

Bu çalışma kapsamında elde edilen sonuçlar ilaç ve ekstrakt yüklü polimerik nanopartikülerin mide kanseri hücrelerine karşı kayda değer bir terapötik etkinlik gösterdiklerini ortaya koymuştur.

Bu sonuçlar aynı zamanda mide kanserinin tedavisinde ilaç ve ekstrakt yüklü polimerik nanopartiküllerin alternatif bir terapi olarak büyük bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

Gelecekte yapılacak *in-vivo* çalışmalarda da olumlu sonuçların alınması durumunda yeni nesil bir antikanser ilaç adayının geliştirilmesi mümkün olacaktır.

Anahtar Kelimeler: 5-Fluorourasil, Timokinon, mide kanseri, nanopartikül, ilaç iletimi

ABSTRACT

Development of 5-Fluorouracil and Thymoquinone Loaded Polycaprolactone-Based Nanoparticle Carrier Systems Against Gastric Cancer

Fadime ÇETİN

Department of Bioengineering

Master of Science Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Emrah Sefik ABAMOR

Gastric cancer is currently one of the deadliest diseases in the world. Although there are differences in the incidence of gastric cancer according to geographical factors, mortality rates are still high due to the advanced stages of diagnosis and limited treatment efficacy. Current treatment modalities include surgery, chemotherapeutic regimens and combinations. Systemic toxic side effects, low bioavailability and developing drug resistance of chemotherapeutic regimens are the most important factors that negatively affect the success of treatment. In this case, it is of great importance to develop new multidisciplinary approaches that will improve survival and treatment success.

In this study, it is aimed to develop a new nanoscale drug delivery system for an effective drug delivery system that can reduce the toxic effects of chemotherapeutic drugs on the whole system and provide targeted long-term

release. Within the scope of this study, 5-Fluorouracil (5-Fu), which is frequently used in advanced stage gastric cancer first-line chemotherapy regimens, and Thymoquinone (TQ) molecules, which are the main components of Nigella Sativa plant with proven anti-tumor, antibacterial properties, are biodegradable, biocompatible, FDA-approved Polycaprolactone (PCL). New generation nanoformülations have been prepared by encapsulation into polymers. This developed system allows anti-cancer agents to be encapsulated into nanoparticles and delivered to the biological system, to reduce the toxic effect of the drug, and to increase their stability and bioavailability. In addition, chemotherapeutic agents can be encapsulated into nanoparticles in combination with natural compounds.

In this study, 5-Fluorouracil and Thymoquinone components were encapsulated into PCL nanoparticles by solvent evaporation method, either individually or in combination. The characterization of the synthesized polymeric nanoparticles was carried out by SEM, FTIR, UV-VIS, DLS analyses. The anticancer activity of nanoparticles was tested in AGS gastric cancer cells, and toxicity and biocompatibility studies were tested in L929 Fibroblast cells using the MTT method *in vitro*.

Different concentrations of PCL nanoparticles containing 5-FU, TQ and 5-FU+TQ combinations alone on the AGS gastric cancer cell line were examined and it was observed that the anticancer activity of 5-FU+TQ PCL nanoparticles was higher than single formulations. It was observed that the same concentrations tested on L929 Fibroblast cells did not have any toxic effects.

The results obtained within the scope of this study revealed that polymeric nanoparticles loaded with drugs and extracts showed remarkable therapeutic activity against gastric cancer cells. These results also show that drug and extract-loaded polymeric nanoparticles have great potential as an alternative therapy in the treatment of gastric cancer. If positive results are obtained in future in-vivo studies, it will be possible to develop a new generation anticancer drug candidate.

Keywords: 5-Fluorouracil, Thymoquinone, gastric cancer, nanoparticle, drug delivery

1
GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Mide kanseri yılda 1 milyondan fazla yeni vaka ile dünyada en çok teşhisi konulan beşinci hastalıktır. Kliniğe başvuran hastalarda genellikle mide kanseri teşhisi hastalığın ilerlemiş evrelerinde konulmaktadır. Bu yüzden ölüm oranı da yüksektir. Dünya Sağlık Örgütünün 2020 raporuna göre, mide kanseri 784.000 ölümle kansere bağlı ölümlerin en yaygın dördüncü nedenidir [1]. Türkiye Sağlık Bakanlığı 2020 verilerine göre ise mide kanseri insidansının ülkemizdeki oranı dünyadakinden daha yüksektir [2]. Mide kanseri çevresel ve bazı genetik faktörlerin farklı kombinasyonları gibi çoklu risk faktörlerinden oluşsa da *Helicobacter pylori* en iyi tanımlanmış risk faktörüdür [3]. *H.pylori* karsinojenezi gastrit gelişimi ile ilgilidir; mide mukozasında iltihaplanmaya oksidatif hasar ve DNA nitrillenmesi neden olur. İlerleyen inflamasyon, atrofi, IM, displazi ve kansere yol açan Correa kaskadı olarak adlandırılan mekanizma ile gerçekleşir [4]. *H.pylori* yanında beslenmede nitrit oranı yüksek et, kahve, alkol, sigara ve fazla tuz tüketimi mide kanseri için önemli risk faktörleridir. Mide kanserlerinin yaklaşık %8'inin Epstein-Barr virüsü ile enfekte olduğu da bildirilmiştir [5]. Mide kanseri teşhisi öncesi hastalarda spesifik olmayan belirtiler görülmektedir, erken evrelerde fiziki muayenede de teşhis için yeterli olmamaktadır. Ancak hastalığın ileri evrelerinde bir dizi tarama, biyopsi ve endoskopi sonrası teşhis koyulmaktadır, hal böyle iken zaten ilerlemiş olan kanser, tedavi için etkili ve hızlı çözümler gerekmektedir. Teşhis sonrası tedavi rejimini belirlemek için evreleme önemli bir rehberlik sunar. En yaygın kullanılan evreleme türü ise tümör/düğüm/metastaz (T-N-M) evreleme sistemidir. Evreleme aşaması sonrası uygun tedavinin uygulanması ile sağkalım oranı artırılmaktadır. Geleneksel tedavi yöntemlerinden cerrahi tedavi, mide kanserinde erken evrelerde omurga tedavi yöntemidir. Erken evredeki bu hastalarda amaç tümörün mideden kesilip atılmasıdır. Tümör boyutu, konumu ve derinliğine göre ameliyat türü farklılık göstermektedir [6]. Fakat ileri evrelerde ya da yüksek metastazı olan hastalarda cerrahi tedavi uygulanamamaktadır. Mide

kanseri için cerrahi rezeksiyondan sonra nüks, erken evre hastalıkta negatif sınırlar olsa bile yaygındır. Bu yüzden kemoterapi cerrahi işlem öncesi, sonrası veya tek başına gerekli bir tedavi yöntemi haline gelmektedir. 2006'da yapılan geniş çaplı MAGIC çalışmasının (ECF rejimi ile perioperatif kemoterapi; epirubisin, sisplatin ve 5-fluorourasil) ve SWOG INT-0116 çalışmasının (MacDonald's rejimi: radyoduyarlılaştırıcı olarak 5-florourasil (5-Fu) kullanan postoperatif kemoradyoterapi) sonuçlarına göre, lokal olarak ilerlemiş mide kanserinde kemoterapi tek başına cerrahi tedaviye kıyasla genel sağkalımı iyileştirdiği görülmüştür [7].

2017'de bildirilen bir Faz-3 çalışmasında perioperatif ECF ile başka bir perioperatif FLOT (5-florourasil, lökovorin, oksaliplatin ve docetaxel) rejimleri karşılaştırılmış ve FLOT alan hastalarda genel sağkalımı iyileştirdiği görülmüştür [8]. Fakat FLOT rejimi aynı zamanda ciddi bir yan etki profili göstermektedir. Bu nedenle, uzmanlar performans durumu kötü olan hastalarda, FOLFOX (folinik asit, florourasil (5-Fu), oksaliplatin) veya başka rejimler önermektedir [9]. Metastatik tümörlerde ise birinci basamak tedavi platin bazlı genellikle oksaliplatin gibi bir ajan veya 5-FU gibi sitotoksik bir bileşik ile gerçekleştirilen FOLFOX rejimine HER2+ durumuna göre de Trastuzumab eşlik eder [10]. Kemoterapide uygulanan farklı rejimlerde en etkili ve en yaygın kullanılan ve bu rejimlerin ana bileşeni olan ajan 5-Fu'dur [11]. 5-Fu suda çözünen, urasil molekülünün C-5 pozisyonundaki hidrojen yerine flor atomu bulunduran, floropirimidin türevi antimetabolit bir ajandır[12]. Hücrelere urasilin taşınma mekanizması yoluyla kolayca girer. Hücre içinde RNA sentezini ve timidilat sentazın (TS) etkisini bozan aktif metabolitlere dönüştürülür[13]. Meydana gelen urasil bazındaki değişim ve nükleotid oranlarındaki dengesizlikler DNA sentezini ve onarımını bozduğu bunun sonucunda ise ölümcül DNA hasarına sebep olduğu düşünülmektedir [14]. Antikanser ajan olarak güçlü etkinliğe sahip bu molekül hızlı metabolizme, kısa yarılanma ömrü ve kanser hücresine seçici olmamasından dolayı sistemik toksisitesi de güçlüdür. Tüm iyileştirilmiş kemoterapi rejimlerine rağmen dünya çapında 5 yıllık sağkalım oranı %25'te kalmaktadır. Bu duruma hem teşhisin ileri evrelerde koyulması hem de yüksek ilaç direnci sebep olmaktadır [15]. Bu yüzden etkili ve tedavi başarısını artırmaya yönelik geliştirilmesi gereken yeni yöntemlere

ihtiyaç vardır. Optimal bir tedavi için multidisipliner bakış açılarından çözüm getirmek mide kanseri gibi heterojenik bir hastalık için zorunluluk olmaktadır. Bu doğrultuda son zamanlarda biyouyumlu, non-toksik gibi dikkat çekici özellikleri ile birçok araştırmacı tarafından çalışılan nanopartiküler sistemler hedefli tedaviler için umut verici olmaktadır. Nanopartiküller nano-boyutlarından dolayı sağlıklı dokulardan farklı olarak katı tümörlerin kıvrımlı ve farklılaşmış vaskülarizasyonundan faydalanarak içerisindeki enkapsüle edilmiş ilaçları uzun süre dolaşımda kalmasına olanak sağlar [16]. Katı tümörlerin işlevselliği bozulmuş olan lenfatik sistemleri nanopartikülleri sistemden uzaklaştıramaz böylece kemoterapötik ilaçlar uzun süre dolaşımda kalır ve gelişmiş geçirgenlik ve tutma etkisi olarak bilinen EPR (Enhanced Permeability and Retention) mekanizması tümör dokusunda ilaçların birikmesini sağlar [17]. Nanopartiküller aynı zamanda hidrofobik yapıdaki bileşiklerin kapsüllenerek sistemde uzun süre kalmasını ve oral yolla alınan sitotoksik ilaçların sistemik toksisitesini azaltırken biyoyararlanımını ve farmokakinetiğini artırırlar [18], [19]. Polimerik nanopartiküller, biyouyumlu ve biyobozunur özelliklerinin yanında aktif ve pasif hedefleme ile ilaç iletim sistemlerinde avantaj sağlar. Yapısının işlevselleştirilebilmesi ve yüksek kapsülleme kapasitesi sayesinde hedefli ve kombine tedavilerin geliştirilmesinde önemli bir rol oynar [20]. Kombine tedaviler, çoklu ilaç direncinin üstesinden gelmek ve ilaçların sinerjik etkisinin artırılmasını sağlamak için geliştirilen sistemlerdir. Doğal bileşikler günümüzde kombine tedavi stratejileri için araştırmacılar tarafından ilgi görmektedir [21]. Antikanser özelliklere sahip fitokimyasallar kemoterapötiklerin etkinliğini güçlendirerek sinerjik etkiye ve farklı yolaklardan hücre ölümüne gittikleri için çoklu ilaç direncine karşı etkiye sebep olurlar. *Nigella sativa* çörek otu olarak bilinen bir bitkidir. *Nigella sativa* yapısında esansiyel (uçucu) yağ ile beraber proteinler ve amino asitler, karbonhidratlar, alkaloidler, saponinler, ham lifler, vitaminler ve mineralleri içerir [22]. N. sativa tohumundaki başlıca yağ asitleri linoleik asit, palmitik asit ve esansiyel yağlardır. Şimdiye kadar bildirilen farklı aktif bileşenler arasında, uçucu yağın ana bileşeni timokinondur [23]. Timokinon ($C_{10}H_{12}O_2$, 2-izopropil-5-metil 1,4-benzokinon), antioksidan, hipoglisemik, antiinflamatuar, protektif aktivitelereinin yanında antikanser etkilere sahip bitkisel bileşiktir [24]–[27]. Antikanser etkinliği, reaktif oksijen türleri (ROS) oluşturması, çeşitli yolaklar

ile apoptozu indüklenmesi ve hücre döngüsü üzerindeki durdurucu etkisiyle umut verici kemoterapötik potansiyele sahiptir [28]. Timokinon (TQ) hidrofobik bir moleküldür, dolayısıyla biyoyararlanımı ve ilaç formülasyonunda etkinliği sınırlamalara neden olur [29]. Bu yüzden çeşitli optimizasyonlara ihtiyaç vardır.

2017'de yayınlanan bir çalışmada TQ'nun mide kanserinin *in vivo* ve *in vitro* modellerinde potansiyeli incelenmiştir. Bu çalışmada insan mide kanseri hücrelerinde 12, 24 ve 36 saat boyunca farklı konsantrasyonda TQ (0, 10, 25, 50, 75, 100, 125 μmol/L) uygulanması sonrası *in vitro* ve ksenogreft tümörlü fare modelinde benzer sonuçlar elde edilmiştir. Sonuçlar TQ'nun antikanser ajan olarak etkinliğini doğrulamış ve STAT3 sinyal yolağının down regülasyonu ile kanser proliferasyonu inhibe ettiği vurgulanmıştır [30].

1.2 Tezin Amacı

Bu tez çalışmasının amacını; antikanser ve antibakteriyel etkisi bilinen TQ'nun bitkisel ve birinci basamak kemoterapi rejimlerinin değişmeyen antimetabolit ajanı 5-Fu antikanser ilacının mide kanserine karşı tek başlarına ve birlikte kombinasyon halinde polikaprolakton polimerine enkapsüle edilmesiyle geliştirilen nano-formülasyonların sentezlenmesi, karakterizasyonunun yapılması ve AGS mide kanseri hücrelerinde hücre canlılığını inhibe edici etkinliğinin *in-vitro* karşılaştırmalı olarak incelenmesi oluşturmaktadır. Aynı zamanda bu tez çalışması kapsamında sentezlenen bitkisel ekstrakt ve antikanser ilaç enkapsüle edilmiş polikaprolakton nanopartiküllerinin fare fibroblast hücreleri üzerinde in-vitro toksisitesini incelenmesi de amaçlanmıştır. Bu tez çalışması ile mide kanseri tedavisinde sıklıkla kullanılan antikanser ajanının sebep olduğu sistemik toksisitenin azaltılması, tümör hücrelerinin ilaca karşı geliştirdiği direncin üstesinden gelmek için Timokinon kullanılması ve sinerjik etki ile antikanser etkinliğin artırılması için nanopartiküllere dayalı yeni kombine bir tedavi stratejisi önerilmiştir.

Bu amaca ulaşmak için aşağıdaki çalışmalar gerçekleştirilmiştir:

- 5-Fluorourasil içeren 5-Fu-PCL, Timokinon yüklü TQ-PCL, 5-Fluorourasil ve Timokinon enkapsüle 5-Fu-TQ-PCL ve boş PCL nanopartikülleri çözücü buharlaştırma yöntemiyle sentezlendi.
- UV-Visible spektrofotometre cihazı kullanılarak 5-Fluorousil ve Timokinon bileşenleri için kalibrasyon eğrisi çıkarıldı.
- 5-Fu-PCL, TQ-PCL, 5-Fu-TQ-PCL ve boş PCL nanopartiküllerinin Zeta sizer ile boyut ve zeta potansiyeli ölçümü, SEM ile boyut ve morfoloji görüntülemesi, FT-IR ile enkapsülasyon verimliliği, UV spektrofotometre ile salım analizleri gerçekleştirilerek nanoformülasyonlar karakterize edildi.
- 5-Fluorourasil, Timokinon, 5-Fu-PCL, TQ-PCL, 5-Fu-TQ-PCL formülasyonlarının AGS (CRL-1739) mide kanseri hücre hattı üzerinde antikanser etkisi morfolojik inceleme ve MTT yöntemi ile değerlendirilmesi
- 5-Fu-PCL, TQ-PCL, 5-Fu-TQ-PCL formülasyonlarının L929 fare fibroblast hücre hattı üzerinde sitotoksistesi MTT yöntemi ile incelendi

1.3 Hipotez

Mide kanseri birinci basamak kemoterapide hastalığın mevcut durumuna göre çeşitli tedavi rejimleri önerilse de 5-Fluorourasil neredeyse tüm rejimlerde bulunmaktadır. Bu iyileştrilmiş tedavi rehimlerine rağmen hastalığın sağkalım oranı hala çok düşüktür. Kanser hücrelerinin ilaca karşı geliştirdiği direnç, oral yolla alınan ilacın hedef bölgeye gidene kadar sistemden büyük bir kısmının atılması ve bu güçlü kemoterapötik ajanın sağlıklı hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi yeni tedavi stratejilerine ihtiyacı doğurmaktadır. Günümüzde bitkisel kaynakların tedavi edici özellikleri ise pek çok araştırmacı tarafından incelenmiştir. Timokinon etken maddesinin daha önceki çalışmalarda ise antikanser etkisi gösterilmiştir. Fakat TQ'un tek başına antikanser etkisi ise tedavi için yeterli olmamaktadır. Literatürde 5-Fluorourasil ve Timokinon etken maddesi için ayrı ayrı çalışmalar mevcuttur fakat beraber kombine bir etkisinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Kanser tedavisindeki mevcut problemlerin üstesinden gelinebilmek için nanoteknolojik yaklaşımlar ilgi çekicidir. Literatürde farklı biyomalzemeler ile ilaç ve bitki ekstraktlarının enkapsüle edildiği ve in-vitro etkinliklerinin incelendiği çalışmalar mevcuttur. FDA onaylı biyouyumlu,

biyobozunur polikaprolakton polimeri toksik olmaması, ulaşılabilir olması ile nanopartiküler sistemlerde sıklıkla tercih edilmektedir. Bu bilgiler ışığında bu tez çalışmasının hipotezini;

- Literatürde 5-Fluorourasil ve Timokinon etken maddesinin antikanser etkinliğinin incelendiği çalışmaların varlığı,
- İlaç ve bitkisel ajanların enkapsülasyonu için Polikaprolakton polimerinin kullanılması,
- FDA onaylı, biyouyumlu ve biyobozunur polikaprolakton'un non-toksik ve uzun süre salım sağlama özelliğinin daha önceki çalışmalarda gösterilmesi,
- 5-Fluorourasilin güçlü bir kemoterapötik ajan olduğu, tölere edemeyecek hastalarda kullanılamaması ve tümör hücrelerinde gelişen ilaç direncinin, ilacın kullanımında büyük bir sorun oluşturduğunun bilinmesi,
- Literatürde 5-Fluorourasil ve Timokinon etken maddesinin beraber antikanser etkinliğinin incelendiği bir çalışmaya rastlanılmaması,
- 5-Fluorourasil ve Timokinon etken maddesinin kombinasyonunun polikaprolakton nanopartikülleri içersine enkapsüle edilerek, mide kanseri hücrelerinde etkinliğinin değerlendirilmemiş olması oluşturmaktadır.

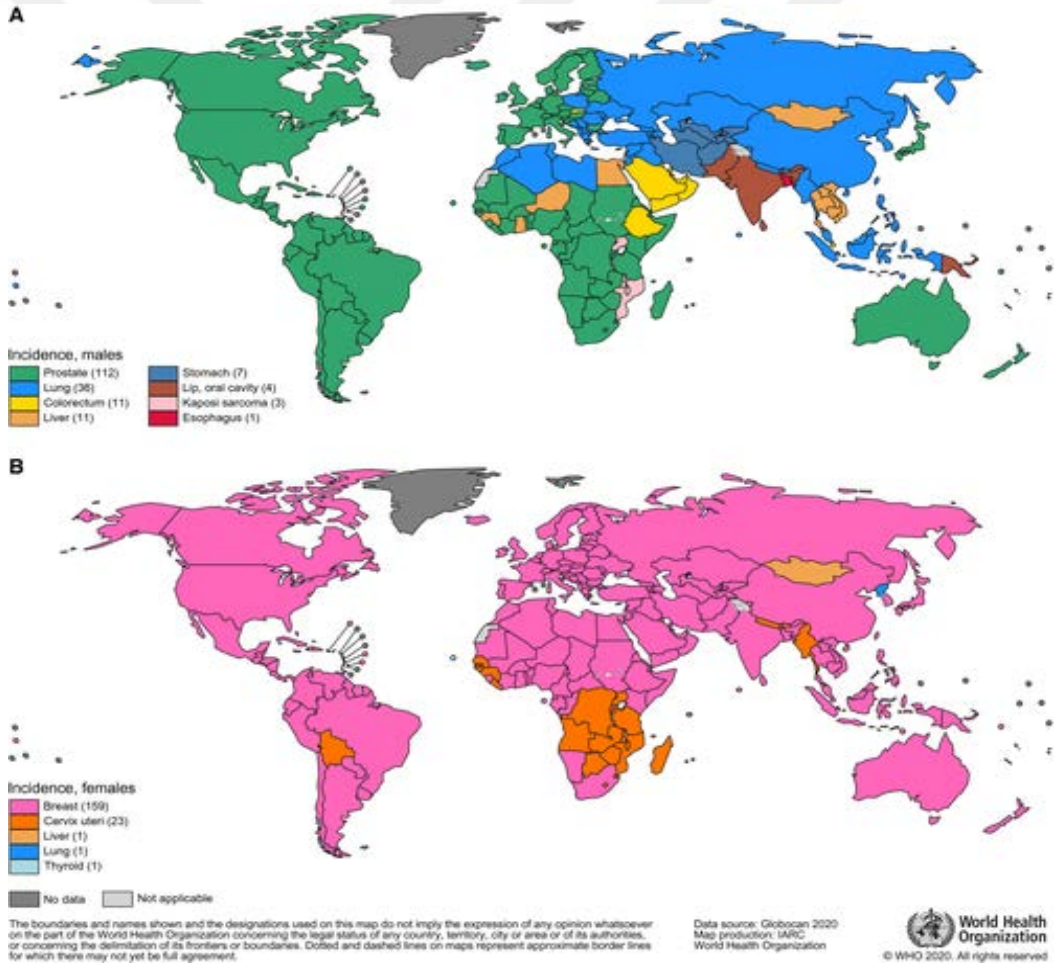
Tüm bu bilgiler doğrultusunda bu tez çalışmasında mide kanseri tedavisinde birinci basamak kemoterapötik olan 5-Fluorourasil ve antikanser etkinliği bilinen timokinon etken maddesinin tek başına ve beraber olarak polikaprolakton nanopartiküllerine enkapsülasyonunun gerçekleştirilerek sentezlenmesi, karakterize edilmesi ve AGS hücre hattında *in-vitro* etkinliğinin karşılaştırmalı olarak incelenmesi, L929 fare fibroblast hücre hattında toksisitesinin değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

2
GENEL BİLGİLER

2.1 Mide Kanseri

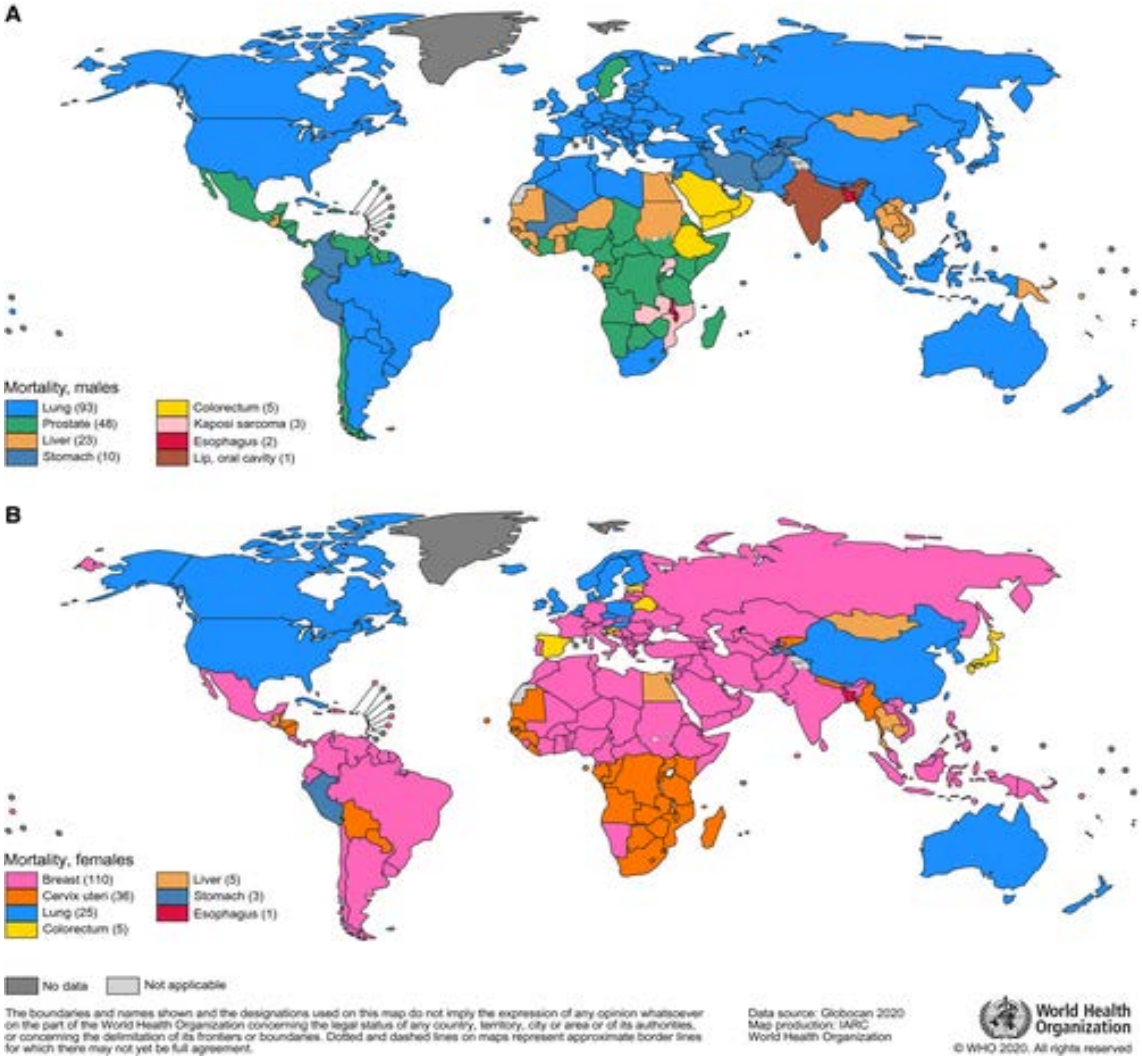
2.1.1 Mide Kanseri Epidemiyolojisi

2020 yılından alınan verilere göre dünya çapında 1 milyonu aşkın yeni mide kanseri vakası tespit edilmiş olup bu vakaların yaklaşık %76'sı ölümle sonuçlanmıştır [1]. Mide kanseri, kanser türleri arasında ülkemizde en yaygın görülen beşinci kanser türü olarak yer almaktadır [2].

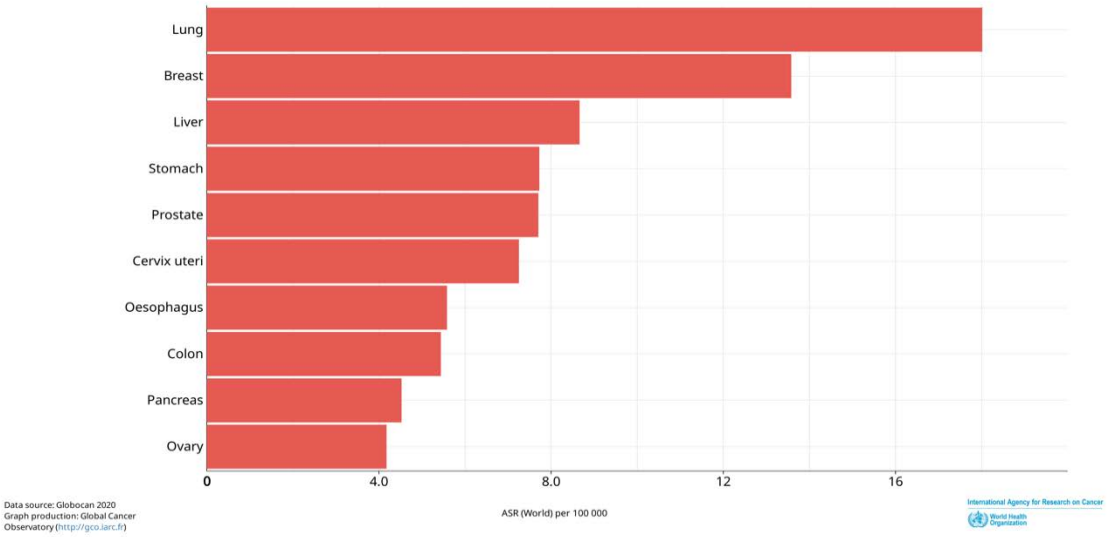


Şekil 2.1 2020 yılında dünyada (a) erkekler ve (b) kadınlar arasında en yaygın kanser insidansı türü [1]

Şekil 2.1 ve 2.2, dünyada cinsiyete göre sırasıyla en çok teşhisi koyulan kanser çeşidi ve kanser ölümleri gösterilmektedir. Erkeklerde prostat kanseri 112 ülkede en sık teşhis edilen kanser iken, bunu 36 ülkede akciğer kanseri ile 11 ülkede kolorektal kanseri ve karaciğer kanseri takip etmektedir (Şekil 2.1A). Ölüm oranı açısından (Şekil 2.2), erkeklerde en yüksek oranla (93) akciğer kanseri birinci sıradadır. Erkeklerden farklı olarak, kadınlarda en çok tanısı koyulan 159 ülke ile meme kanseridir (Şekil 2.1B). Kadınlarda ölüm oranı, teşhis oranına göre daha farklı dağılım (Şekil 2.2B) göstermesine rağmen yine ilk sırada, meme kanseridir.

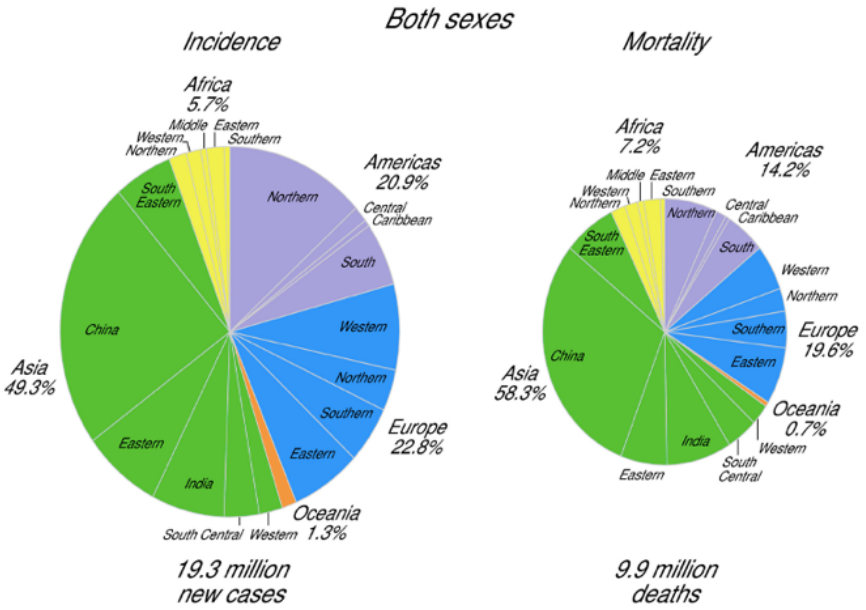


Şekil 2.2 2020 yılında ülkelere göre (a) erkekler ve (b) kadınlar arasında en yaygın kanser ölümü türü [1]



Şekil 2.3 2020 Yılında Dünyada en yaygın 10 kanser türü ölümü oranları [1]

Mide kanseri genellikle ileri evrelerde teşhis edilebildiğinden ölüm oranı yüksektir. Mide kanseri insidans ve mortalitesinde coğrafi, etnik ve sosyo-ekonomik etkenler önemli rol oynar. Mide kanseri Doğu Asya, Doğu Avrupa ve Amerika'da önemli ölüm oranına sahiptir.



Şekil 2.4 2020 Yılında Dünyadaki tüm mide kanseri vakalarının kıtalara göre teşhis ve ölüm oranları [1]

Ayrıca cinsiyete bağlı olarak da mide kanseri insidansı önemli ölçüde farklılık göstermektedir. Dünya genelinde erkeklere kadınlara oranla daha fazla mide kanseri tanısı koyulmaktadır (Şekil 2.1) [1]. Şekil 2.4'de de görüldüğü gibi vakaların büyük çoğunluğu Asya'da görülmekte ve bu sırayı Doğu Asya, Doğu Avrupa, Orta ve Güney Amerika bölgeleri takip etmektedir.

2.1.2 Mide Kanseri Etyolojisi ve Risk Faktörleri

Mide Kanseri etyolojisi çok faktörlü, çevresel ve genetik faktörlerden oluşan karmaşık bir süreci içermektedir. Çeşitli genetik farklılıklar mide kanseri oluşumun rol oynamaktadır[31]. Çok sık rastlanan kalıtsal farklılıklar, yaygın mide kanserinin altında yatan germ hattı mutasyonu E-cadherin kodlayan CDH1 geninin mutasyonlarıdır[32]. Diffüz tip mide kanseri hastalarının %50'sinde bu mutasyonlar görülmektedir[33]. Gastrik kanser oluşumunda büyük bir rol oynayan E-cadherin geni, önemli bir tümör süpressör genidir. Herediter diffüz mide kanseri E-cadherin genindeki germline mutasyona bağlı olarak gelişmektedir[34], [35]. Genellikle tek nükleotid polimorfizmleri (TNP'ler) olsa da mide kanseri risk faktörleri histon modifikasyonları, DNA metilasyonu gibi bir dizi başka genetik polimorfizmleri de içerir. PSCA, Mucin1, PLCE1, C2Oorf54, MCC, APC ve p53 tümör baskılayıcı genler mide kanserinin büyük bir kısmında tanımlandırılmıştır [36].



Şekil 2.5 Mide kanseri oluşumunda çevresel ve genetik faktörler

Daha kötü ekonomik durumlarda mide kanseri insidansının daha yüksek olduğu kanıtlanan çalışmalar ile sosyo-ekonomik durumun mide kanseri ile ilişkisi anlaşılmaktadır[37]. Yine aşırı alkol ve sigara tüketimi, yetersiz ve sağlıksız beslenme de mide kanseri insidansını artıran çevresel faktörlerin başında gelmektedir. Günlük beslenme rutinindeki fazla tuz ve baharat tüketimi, N-nitrozo bileşikleri gibi karsinojenleri içeren yiyeceklerin tüketimi çevresel faktörleri oluşturmaktadır [38].

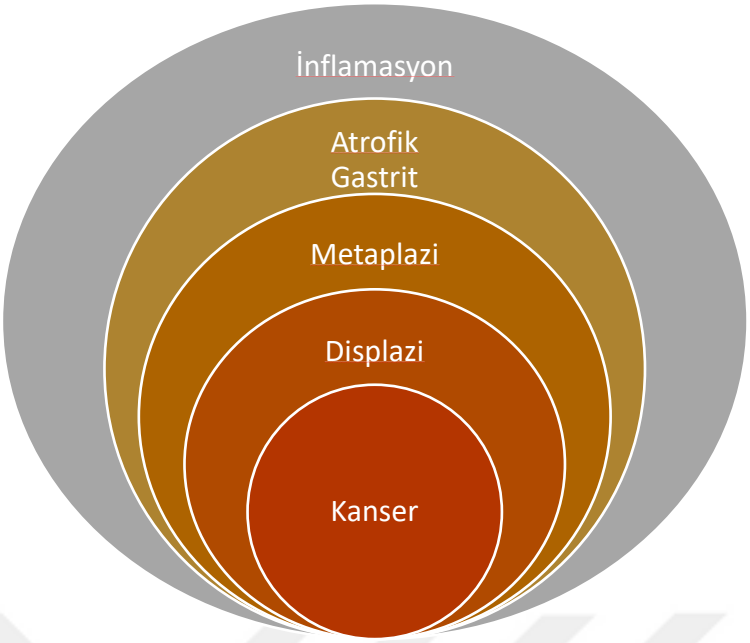
Helicobacter pylori

Helicobacter pylori, mide kanseri için en güçlü risk faktörü olarak kabul edilen ve Dünya Sağlık Örgütü, Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) tarafından tip I kanserojen olarak sınıflandırılmış, dünya nüfusunun neredeyse yarısını enfekte bir bakteridir [39]. Mide kanseri vakaların %74,7 ila %90'ı arasında bir tahminle, H.pylori ilişkili olduğu tahmin edilmektedir [40].

Serbest ortamda spiral formda bulunan *H.pylori*, gram negatif ve mikroaerofilik bir patojen olup flagellaları sayesinde hareketli yapıdadadır[41].

H. pylori'nin çoğalabilmesi için optimum koşul nötr pH'dır ancak bakteri kendine has bazı özellikleriyle asidik ortamlarda yaşayabilmektedir[42]. *H.pylori*, yapısında bulundurduğu üreaz enzimiyle, üreyi NH_3 ve CO_2'ye dönüştürerek mide asidinin pH'sını artırır böylece bakteri etrafında çoğalmak için uygun ortam oluşmuş olur. Ek olarak üreaz, mide epitel hücreleri üzerindeki CD74 reseptörü ile etkileşime girerek adezyonda rol alır [38].

Artan proliferasyon sonrası bakteri; salgıladığı toksinlerle doku hasarı, dokular etrafında oluşturduğu serbest reaktif oksijenler ile DNA hasarı oluşturarak ve tabii ki direkt hücre ile etkileşimi sonucu sağlıklı hücre döngülerini değiştirerek hücreleri apoptoza götürür [43].



Şekil 2.6 Correa kaskadı

H.pylori'nin onkogenez sürecine etkisi iki ana mekanizma ile tarif edilebilir: *H. pylori* enfeksiyonunun mide mukozasında oluşturduğu dolaylı bir inflamatuar reaksiyon ve H. pylori'nin mide epitel hücreleri üzerinde doğrudan epigenetik etkiler[44]. Mide mukozasında gelişen enfeksiyon Correa kaskadı olarak adlandırılan inflamasyon-atrofi-metaplazi-displazi-adenokarsinom süreci ile sonlanır. Mide mukozasının iltihaplanması, oksidatif hasara ve DNA'nın nitrozasyonuna neden olur. Kronik hal almaya başlayan inflamasyon ardından atrofik gastrite dönüşür ve bağırsak metaplazisinden kademeli ilerlemeyle displaziye yol açar. *H.pylori* enfekte olduğu hastalarda çoğunlukla asemptomatik kalır. *H.pylori* enfeksiyonu kaynaklı mide kanseri, bakteriyel virülans faktörleri, hastanın genetik mekanizmaları ve çevresel faktörler ile ilişkilidir[45].

Çoğu *H.pylori* suşu, hücresel sinyal proteinlerinin ekspresyonunu etkileyen bir onkoprotein olan 120-140 kDa CagA proteinini kodlayan sitotoksin ile ilişkili bir gen A (CagA) patojenite adasına sahiptir[46]. CagA ve sitotoksin A'yı vakuol eden diğer ana virülans faktörü (VacA)'yı içeren *H.pylori*, distal midede hem yoğun doku tepkileri hem de premalign ve malign lezyonlar geliştirme riskiyle ilişkilidir[47].

2.1.3 Mide Kanserinde Teşhis

Mide kanseri hastalarında erken evrelerde belirgin bir semptom görülmemekle beraber, hastalar yaygın semptomlar oluştuğunda kliniklere başvururlar. Yaygın semptomlar ise kiloda kayıplar, karın ağrısı, hazımsızlık (dispepsi), iştahsızlık veya erken doyma gibi müphem belirtilerdir. Erken evrelerde klinik belirti olmadığından dolayı erken teşhis de çoğu zaman mümkün olmamaktadır[48]. İleri evrelerde ise disfaji, bulantı ve kusma gibi şikayetler sık görülmektedir. Mikroskopik boyutta gastrointestinal kanama ise bir diğer belirtidir, ancak kanama olmasına rağmen hastalarda demir eksikliği anemisi görülmeyebilir. Bu da erken tanıyı zorlaştıran etkenlerdendir[49].

Mide kanseri için en net tanı tümörün lokalizasyonunun ve makroskopik tipinin belirlendiği ve histolojik doğrulama için biyopsilerin alındığı endoskopik muayene ile teşhis edilir. Lezyonların görülebilmesi için üst gastrointestinal sistemde endoskopisi yapılması hem primer tümörün doku tanısında hem de anatomik bölgesinin belirlemede altın standart bir yöntemdir[50]. Endoskopik ultrasonografi (EUS), özellikle erken (T1) lezyonlarda invazyon derinliğini ve mide ile ilişkili lenf düğümlerinin değerlendirmesinde oldukça faydalıdır. Radyolojik görüntülemeler (Bilgisayarlı tomografi (BT), Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRI) ve Pozitron Emisyon Tomografi (PET-BT)) ve baryumlu incelemeler de yaygın olmakla beraber ultrasonografik bulguları desteklemek, yakın ve uzak organ tutulumlarını görmede faydalı yöntemlerden biridir. Böylece gereksiz cerrahi işlemlerin önüne geçilmiş olur[51]. Radyolojik yöntemler daha çok teşhis sonrası evrelemede tercih edilmektedirler. Bu yöntemler mide duvarı kalınlığındaki artışı, mide içerisini dolduran lezyon lokolizasyonlarını ve peritonal ve intraperitonal metastazları görmede tercih edilen metodlardır. PET diğer kanser türlerinin tanısını koymada etkili olmasına rağmen mide kanserinde hücre farklılıklarını ayırt edemediği için mide kanserinde yeterli olmamaktadır [52].

2.1.4 Gastrik Kanserlerin Sınıflandırılması ve Evreleme

Mide kanserlerini evrelemek, mevcut tedavi stratejilerini belirlemek ve bu tedavilerin başarısını değerlendirmek ayrıca yapılan çalışmaları standardize edebilmek için önemlidir. Bunun için farklı evreleme sistemleri kullanılmaktadır.

Evreleme sistemlerinden biri olan Amerikan Kanser Ortak Komitesi (AJCC) geliştirilen Tümör-Nod-Metastaz (TNM) evreleme sistemidir[53]. Burada tümörün yayılımı (T), lenf nodülleri (N) ve metastaz (M) ile değerlendirme yapılır. Böylece kullanılan tedavi yöntemlerinin etkisi, tümörün mevcut durumu ve prognozu hakkında daha sistematik bilgi sağlanmış olur[54].

Tablo 2.1 Mide kanserleri için TNM evreleme sistemi

Tümör (T) evresi
Tx: Primer tümör değerlendirilemez
T0: Primer tümör için kanıt yok
T1s: Karsinoma in situ; İntraepitelial tümör(Lamina propriada invazyon yok)
T1: Tümör mukoza veya submukozayla sınırlıdır
T1a: Tümör lamina propria veya muskularis mukozayı tutmuştur
T1b: Tümör submukozayı tutmuştur
T2: Tümör muskularis propriyayı tutmuştur
T3: Tümör subserozal bağ dokusunu tutmuştur ancak visseral periton(seroza) ve çevre dokular sağlamdır
T4: Tümör visseral periton ve komsu dokulara yayılmıştır
T4a: Tümör visseral peritonu tutmuştur
T4b: Tümör komşu dokuları tutmuştur
Nodal (N) Evre
Nx: Bölgesel lenf nodları değerlendirilemez
N0: Bölgesel lenf nodları tutulumu yok
N1: 1-2 bölgesel lenf nodu tutulumu
N2: 3-6 bölgesel lenf nodu tutulumu
N3: > 7 bölgesel lenf nodu tutulumu
N3a: 7-15 bölgesel lenf nodu tutulumu
N3b: >16 bölgesel lenf nodu tutulumu
Uzak Metastaz (M)
Mx: Uzak metastaz değerlendirilemez
M0: Uzak metastaz yok
M1: Uzak metastaz var(ör. karaciğer metastazı, periton metastazı)
Evreleme
Evre 0: Tis N0 M0
Evre 1A: T1 N0 M0
Evre 1B: T1 N1 M0, T2a/b N0 M0
Evre 2A: T1 N2 M0, T2a/b N1 M0, T3 N0 M0
Evre 2B: T1 N3 M0, T2 N2 M0, T3 N1 M0, T4a N0 M0
Evre 3A: T4a N1 M0, T3 N2 M0, T2 N3 M0
Evre 3B: T3 N3 M0, T4a N2 M0, T4b N0 M0, T4b N1 M0
Evre 4: Herhangi bir T, Herhangi bir N M1

2.1.5 Mide Kanserinde Tedavi Yöntemleri

Mide kanseri tedavisi, çoğu hastada erken evrede teşhis edilememesinden dolayı hala yetersizdir. Mevcut tedavi yöntemleri hastalığın evresine ve kişinin genel sağlık durumuna göre farklılık göstermektedir. Tedavi stratejisi, fiziksel muayene, kan testleri, karın ve pelvis, endoskopik ultrasonu, PET ve CBT taramasını içeren tedavi öncesi araştırmaların sonuçlarına göre karar verilmelidir [55].

2.1.5.1 Cerrahi Tedavi

Cerrahi tedavi mide kanseri tedavisi için hala ana tedavi yöntemi olarak görülmektedir. Tedavinin içeriği tümörün evresi, çapı, yeri ve histolojik tipine göre belirlenir. Erken evre kanserlerde cerrahi işlem genellikle ilk tercih edilen ve potansiyel olarak verimliliği yüksek bir yöntemdir. 3 cm altındaki tümörlerde cerrahi girişimler uygun görülebilmektedir. Fakat ileri evrelerde tümör dokusunun lenf nodlarına ve diğer organlara metastazı cerrahi girişimi sınırlandırır [56]. Cerrahi işlem sırasında temizlenen lenf nodu sayısına ve çeşidine göre farklı isimlerde gastrektomi çeşitleri bulunmaktadır. Ancak mide kanseri ileri evrelerde teşhis edilebildiğinden metastatik kanserlerde çıkarılması gereken çok büyük bir bölge olduğundan cerrahi işlem uygulanamamaktadır ayrıca erken evre girişimlerde cerrahi işlem özenle seçilmesine rağmen çoğu zaman tekrar nüks etmekte ve işlem sırasında sıklıkla iç organ yaralanmaları görülebilmektedir. Bu yüzden multidisipliner yaklaşımları uygulamak gerekmektedir [57][58].

2.1.5.2 Radyoterapi

Radyoterapi, kanserli hücrelerin yaşamını veya yayılımını devam ettirmemesi için yüksek enerjili X-ışınları veya diğer radyasyon türü kullanılan bir tedavi yöntemidir. Cerrahi işlem uygulanamayan hastalarda, kemoterapinin yeterli olmadığı veya kemoterapiye uygun olmayan hastalarda tercih edilmektedir. Metastaza sahip hastalarda genel sağkalıma etkisi az olsa da bölgesel uygulamalarda tercih edilmektedir. Ancak radyoterapi, tek başına kullanımı hakkında yeterli veri olmamasından kaynaklı kombine tedavilerle beraber kullanılmaktadır. Karın üst bölgesindeki iç organların radyasyon ışınlarına olan hassasiyeti radyoterapiyi sınırlandıran en önemli faktördür [59], [60].

2.1.5.3 Kemoterapi

Kemoterapi, kanser çeşidine (herediter, diffüz vb.) ve kanserin evresine göre oral, enjeksiyon, intravenöz veya cilt üzerinden verilebilir. Tek başına veya cerrahi, radyasyon tedavisi veya immunoterapi gibi diğer tedavilerle birlikte verilebilir [61].

Kemoterapik ilaçlar ağızdan alındığında ya da enjekte olarak alındığında, ilaçlar kan dolaşımına girer ve vücuttaki kanser hücrelerine ulaşabilir. Ancak kemoterapik ilaçlar kan beyin bariyerini geçebilir, bir organa veya karın gibi bir vücut boşluğuna girdiğinde ilaçlar bu bölgelerdeki hücrelere toksik etki gösterirler [62].

Erken evredeki hastalarda ameliyat sonrası tümör sınırları temizlenmiş olsa bile sonrasında tekrar nüks yaygındır. Bundan dolayı neoadjuvan ve adjuvant tedaviler beraber uygulanmaktadır [63].

Ameliyat öncesi tümörün küçülmesi için yapılan ilaç tedavisi, neoadjuvan tedavidir. Adjuvan terapi ise ameliyat sonrası tümör gerilemesini desteklemek için yapılan ilaç tedavisidir. Her iki tedavi de erken evre kanserlerde tümör boyutunda gerileme gösterdiği çalışmalarla kanıtlanmıştır[64]–[66]. Neoadjuvan kemoterapi [67],[68] adjuvan kemoterapi [69],[70] ve adjuvan kemoradyoterapi mide kanseri için tedavi edici cerrahi işlem öncesinde veya sonrasında sağkalımı iyileştirir. Fakat bunların hiçbirinin uzak metastaz ve peritoneal nüks oranını önemli ölçüde azalttığı gösterilmemiştir [71]. Metastatik mide kanserinin altın standardı haline gelen birinci basamak kemoterapi rejimi bir floropirimidin ile bir platin kombinasyonundan oluşmaktadır[72]. Bununla beraber, dosetaksel içeren üçlü rejimler, yüksek tümör yükü olan sağlıklı hastalarda faydalı olabilir[73]. Tüm kanser türlerinde olduğu gibi metastaz yapmış mide kanserlerinde de kombine kemoterapilerin daha etkili yanıt oluşturabileceği düşünülerek kombine tedavi rejimlerine odaklanılmıştır.

Zhu ve ark. 2020'de yayınladığı çalışmaya göre ECF (epirubisin, sisplatin ve fluorourasil), FLOT (dosetaksel, oksaliplatin, fluorourasil) rejimlerinin değerlendirildiği ve bu çalışmalar sonucunda bu rejimlerin sağkalımda iyileştirmelere yardımcı olduğu görülse bile radikal etkinliğinin kanıtlanamadığını

söylemişlerdir [74]. E. Smyth ve ark. 2020 raporuna göre birinci basamak kemoterapi rejimleri en iyi sağkalım oranı göstermişlerdir buna rağmen en yüksek sağkalım dahi 18 aydan azdır[45]. Literatürde denenmiş randomize çalışmalarda belirgin bir üstünlük görülmemiştir[45],[75]–[77].

Bu durum yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinin ve tedavinin kişiselleştirilmesinin gerekliliğini göstermektedir.
Mide kanseri tedavisinde en fazla tercih edilen kemoterapötik ajanlar ve etki mekanizmaları [78]–[80];

1- Antrasiklin Türevi Antibiyotikler: Epirubicin ve Doxorubicin (adriamisin) bu gruptadır. Hücre membranında bozulmalara sebep olarak, DNA yapısında bozulmaya sebep olarak (interkalasyon), DNA protein etkileşimlerini engelleyerek etki ederler [81].

2- Alkilleyici Antibiyotikler: Mitomisin bu gruptadır. DNA sentezini engelleyerek ve DNA'yı alkilleyerek etki göstermektedir [82].

3- Fluoropirimidin Türevleri: Urasil Tegafur (UFT) ve 5-Fluorourasil bu gruptadır. Hücrelerde DNA ve RNA sentezini, Timidilat sentezini inhibe ederek bozar ve apoptozisi baslatarak hücre ölümüne neden olur [83].

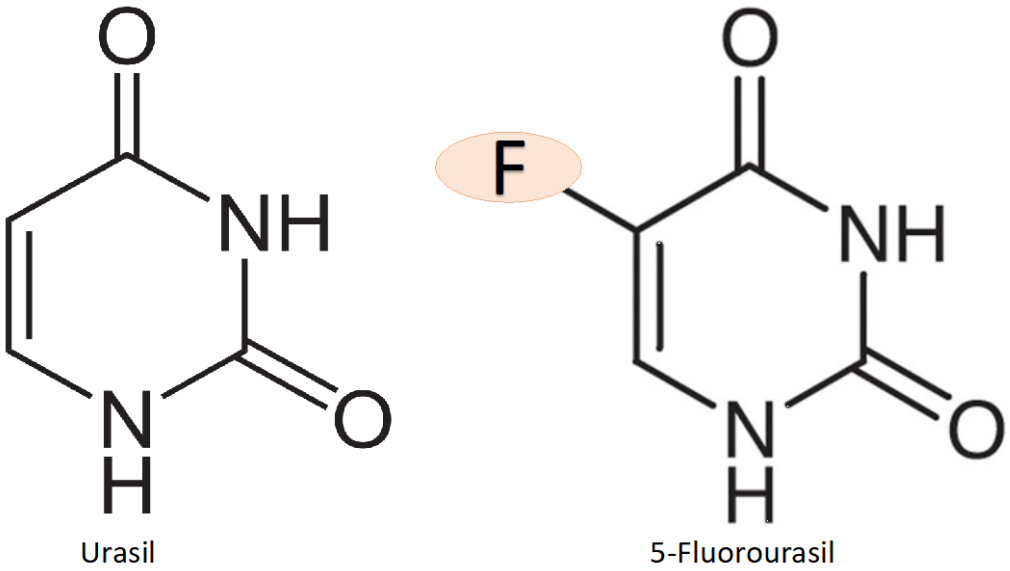
4- Platinum Türevleri: Cisplatin ve Oksaliplatini içeren gruptadır. DNA çift sarmalına kovalent bağlanır ve DNA, RNA ve protein sentezini inhibe ederek hücre replikasyonunu önler [84].

5- Taksoidler: Docetaxel (Taxotere) bu gruptadır. Mikrotübül fonksiyonunu bozarak, mikrotübüllerin ayrılmasını engeller. Hücre bölünmesi için gerekli olan mikrotübüllerin olmaması kanser hücrelerinin çoğalmasını engeller [73].

Kemoterapi tedavisi sona erdikten sonra, akciger toksisitesinin oluşması, gastrointestinal toksisite sebebiyle mide bulantısı, kusma, ishal ve kilo kaybı, kemik iliğinin baskılanmasından dolayı lökopeni, trombosit sayısında düşüklük ve anemi, kalp ve böbrek fonksiyon bozukluğu, karın-mesane bölgesinde çeşitli enflamasyonlar, periferik nöropati, saç dökülmesi ve kellik, cilt üzerinde renk düzensizlikleri, baş dönmesi ve sersemlik gibi yan etkiler görülebilir. Bu yüzden yeni, hedefli ve daha etkili yöntemlere ihtiyaç vardır.

5-Florourasil

5-Florourasil (5-Fu), mide, bağırsak, meme, baş ve boyun kanseri de olmak üzere çeşitli kanserlerde kemoterapötik ajan olarak kullanılmaktadır. Kemoterapi randomize çalışmalarında ve tekli halde sıkça kullanılan 5-Fu mide kanserinde önemli bir antikanser ilaç olarak yer tutmaktadır. İleri evre tedavilerde 5-Fu, tek başına muamele edildiğinde, tedavisinde %10-15 oranında etkili iken başka antikanser ilaçlar ile kombinasyonlarda %40-50 oranında etki göstermiştir [85],[86]. Ancak hala ilaç direnci, tedavi ilerlemesinde önemli bir sorun olmaktadır. Florlu pirimidin bazlı kemoterapötik ajanlar ise ilaç direnci mekanizmaları için umut verici potansiyeldedirler [87].



Şekil 2.7 Urasil ve 5-Florourasil molekül yapısı

Antikanser ilaç olarak Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onaylı 5-Fu, DNA ve RNA'nın pirimidin molekülleri gibi heterosiklik halkalı, aromatik organik bir bileşiktir. 5-Fu, C5 atomuna bağlanan hidrojen yerine F atomunun bulunduğu (Şekil 2.7), urasil tarafından hedeflenen, böylece hücre içine urasil ile aynı taşıma mekanizması ile girebilen bir floropirimidindir. Hücre içerisine girdiğinde timidilat sentaz (TS) inhibisyonuna sebep olur. TS, protein sentezi ve apoptotik süreçlerin

düzenlenmesinde rol oynayan bir enzimdir. TS inhibisyonu ile deoksitimidin mono-fosfat (dTMP) üretimi inhibe olur ve ardından diğer deoksinükleotitlerin (dATP, dGTP ve dCTP) seviyelerinde bozulmalara neden olan deoksitimidin trifosfatın (dTTP) inhibisyonuna sebep olur. Son olarak, deoksinükleotitlerin oranındaki bu değişikler (özellikle ATP/dTTP oranı) DNA sentezini ve DNA onarımını bozduğu ve ölümcül DNA hasarına yol açtığı düşünülmektedir[88],[89]. Yani antineoplastik ajan olarak 5-Fu, hücre döngüsünün G1/S-fazını inhibe ederek çalışır, böylece DNA sentezini bloke eder ve hücre ölümünü tetikler. Hücre apoptozunu ise kaspaz-6'yı aktive ederek tetikler [90],[91]. Kısaca 5-Fu'nun kanıtlanan iki ana anti-tümör mekanizması bulunur. İlki, timinsiz hücre ölümüne yol açan TS inhibitörü olması, ikincisi urasil veya timin yerine RNA ve DNA'ya yerleşen bir pirimidin analoğudur. 5-Fu'nun güçlü antikanser etkisiyle beraber bazı önemli yan etkileri de bulunmaktadır. Bunlar hastaya göre değişebilmektedir ancak yine de en yaygın yan etkileri ateş, yorgunluk, mukozit, stomatit, mide bulantısı, kusma ve ishali içerir [92]. 5-Fu'nun yarı ömrünün çok kısa olması, verilen orijinal dozun sadece %3'lük kısmının tümör hücrelerine ulaşması, büyük bir kısmının karaciğerde inaktif hale getirilmesi ve yaklaşık %20'sinin doğrudan idrarla atılması kullanımını sınırlayan bir dizi problemlerdir [93],[94]. Bununla birlikte, klinik uygulamada kullanımı ilaç inaktivasyonunun artması ve ilaç hedefinin mutasyonları, tümör mikro çevresi, değişen sinyal aktiviteleri gibi çeşitli nedenlerden kaynaklanabilecek ilaç direnci nedeniyle büyük ölçüde sınırlıdır[90],[95],[96].

2.1.5.4 Hedefli Tedavi

Kanser hücreleri, sağlıklı normal hücrelerden fizyolojik olarak farklı, genetik olarak mutant hücrelerdir. Değişmiş hücre fizyolojilerinin, çeşitli tümör mikroçevrelerinin ve kemoterapi ilaçlarına karşı değişmiş moleküler mekanizmalarından dolayı, geleneksel onkoterapileri uygun bir tedavi seçeneği olmaktan uzaklaştırır. Onkoloji bilimindeki ilerlemelere ve yoğun araştırmalara rağmen, çoklu ilaç direnci, düşük iyileşme oranları, yüksek ilaç toksisitesi ve uzun süreli tedavi rejimleri gibi sayısız konu, mevcut birçok klinik onkoterapinin başarısız olmasına yol açmıştır [97].

Biyoteknolojideki ilerlemeler, kanser türleri arasında genetik heterojenlik nedeniyle dirençle ilgili sorunlara birkaç yeni moleküler hedef ve yeni ilaçlar belirlemede etkili olmuştur. Bununla birlikte, kişiselleştirilmiş tıp kavramının, uygulanabilirlik yönünden eksiklikleri giderilememiştir. Kemoterapideki ilaç direnci, tümörün tekrar nüksü, tedavi başarısızlığı ve monoterapilerin karşılaştığı diğer sorunların azaltılması amacıyla, bir çok kombinasyon tedavi kurtarıcı olabilme umudu ile ortaya çıkmıştır [98],[99].

Moleküler düzeydeki hedefli tedavi, ileri evre mide kanserleri için önemli bir tedavi şeklidir. Büyüme faktörü reseptörlerinin hedefi, tirozin kinazların hedefi ve diğer biyobelirteçlerin hedefi ilerlemiş mide kanserinin genel sağkalımını uzatabilir. Mide kanserinde hedefe yönelik tedavi büyük ilerleme kaydetmiş olsa da, trastuzumab (anti-HER2 ilaçları) ve apatinib (antianjiyogenik yol ilaçları) gibi yalnızca birkaç hedefe yönelik ilaç klinik kullanım için onaylanmıştır [100]. Ve bunlar hasta prognozunda iyileşme göstermiş olsa da, ilaç direnci önemli bir sorun olmaya devam etmektedir [101].

Bununla birlikte, ilaçların karmaşık dozaj uygulaması, hastanın ilaçla uyum sorunları, verimsiz terapötik etkinlik ve istenmeyen toksisitenin artması nedeniyle kombinasyon terapilerin klinik uygulanabilirliğinde iyileştirmelere ihtiyaç duyulmaktadır [102]. Geleneksel kemoterapötik ilaçların toksisitesinin yüksek oluşu ve kanserli hücreleri tanımadaki yetersizlikleri nedeniyle normal hücrelerde istenmeyen ciddi hasarlara neden olur. İlacın birkaç dozundan sonra da ilaç direnci gelişebilir [103], [104]. Tümör hedefli ilaç dağıtım sistemlerinin temeli, nanopartiküllerin istenen doku veya hücrelerde pasif veya aktif olarak birikme yeteneğidir. Pasif hedeflemede nanopartiküller, sızdıran damarlar ve tümörlerin benzersiz organ içi basınçları yoluyla taşınmak üzere tasarlanmıştır. Aktif hedeflemede nanopartiküller, yüzeye bağlı ligandların moleküler tanınması yoluyla tümörlerdeki spesifik biyolojik yapılara yapışmak üzere tasarlanmıştır. Nanopartiküller ve yüklü ilaçlar böylece bağışıklık temizliğinden kaçar, spesifik olmayan hücre alımından kaçınır ve spesifik olarak hedeflenen tümör hücreleri ve dokularında birikir [105], [106].

2.2 Nanopartiküller

Nano-boyutlu malzemelerin 1959'daki keşfi ile beraber nanotıp önemli bir hale gelmiştir [107]. Nano malzemeler hastalıkların tanısından tedavisine kadarki süreçte bir çok farklı yöntemler ile kullanılmaktadır. Aynı şekilde biyoteknoloji içerisinde medikal malzemeler ve ilaç sektöründe de anahtar bir rol oynamaktadır. Çünkü nanomalzemeler boyutlarından dolayı kuantum etkisi göstermekte olup, yüksek yüzey/hacim oranını sayesinde iyi bir yükleme verimliliği sunması ve yüzey atomlarına farklı karakteristik özellikler yüklenebilmesi gibi özelliklerden dolayı diğer malzemelere göre yüksek verimliliktedir [108], [109].

Nanopartiküller literatürde 1-1000 nm boyutları arasında kabul görmektedir. 1 nm = 10^{-9} m olarak ifade edilir. Nanopartiküllerin bu boyutu hücreler arası boşluklarda dolaşabilmesini ve hücre içine kolayca girebilmesini sağlar. Nanopartiküller boyutlarına, şekillerine, malzeme türlerine ve üretim şekline göre çeşitli sınıflandırmalara ayrılabilirler [110]. Farklı fiziksel ve kimyasal özellikleri ile farklı amaçlarla biyoloji, biyomedikal, ilaç iletimi ve tedavilerde kullanılabilmektedirler. Bu amaçlara göre sentez şekilleri, sentezleme koşulları ve sentez yöntemleri farklılık göstermektedir. Nanopartikül tabanlı ilaç iletim sistemi, tedavi bölgesini hedefleyebilen ve beraberinde işlevselleştirilmiş nanopartikülleri kullanma avantajına sahiptir. Bu sistemler etken maddenin hedef bölgeye maksimum verimlilik ile ulaşması ve bu süreçte yan etkilerinin minimum düzeyde tutulmasını amaçlayan sistemlerdir. Burada kulllanılan nanopartiküllerin boyutları, şekli, yüzey yükleri, dayanıklığı ve bozunma süresi oldukça önemli birer tasarım parametreleridir [111], [112].

Partikül boyutu; dolaşım sistemindeki yarı ömrünü amaçlanan hedef bölgeye iletimini, kan damarları içerisinde taşınımını, vasküleriteden sızmayı, makrofajların tetiklenmesi ve partikülün ekstravazasyonunu belirlemektedir[113]. Eğer kan yolu ile bir taşınım hedefleniyorsa ilaç taşınımı sırasında kan damarlarında emboli oluşmaması için dolaşımdaki partiküllerin boyutu 5 μm'den daha da küçük olmalıdır. Ayrıca karaciğer, dalak ve akciğerlerde bulunan makrofajlar bu boyutlardaki nanopartikülleri tutabilmektedir[114]. Daha genel bir ifade ile 100 nm civarındaki nanopartiküller dolaşımda uzun süre kalabildiklerinden dolayı ideal olarak kabul edilebilmektedirler [115], [116].

Boyutla birlikte, nanoparçacıkların yüzeyi, nanoparçacık yarı ömrünü ve kan dolaşımındaki kaderini etkilemede eşit derecede önemli bir rol oynar [117],[118]. Hidrofobik yüzeyden oluşan nanotaşıyıcıların genellikle nanopartikül dağıtım sisteminin opsonizasyonuna yol açar ve retiküloendotelyal sistemdeki makrofajlar tarafından temizlenir. Yüzeyi modifiye edilmemiş nanotaşıyıcılar genellikle bu tür opsonizasyon olaylarına yol açar ve bu da ilaçların bölgeye hedefli iletiminde başarısızlığa sebep olur [119]. Sonuç olarak, kandaki nanotaşıyıcı dolaşımını uzatmak ve ilacın hedeflenen iletiminin başarısı için opsonizasyonun en aza indirilmesi önemli bir faktördür. Opsonizasyonun minimizasyonu, çeşitli polimerler nanotaşıyıcılarla da sağlanabilir.

Boyut ve yüzey özelliklerine ek olarak, nanopartiküllerin şekli, dolaşım süresinde, biyo-dağılımda, hücresel alımda ve ayrıca kanser ilacı iletimi hedeflemede kritik rol oynayan önemli bir faktördür. Nanotaşıyıcılarda antikanser ilaçlar için geliştirilenler küresel formda bulunurken, virüs ve bakteriler için geliştirilenler filamentler veya silindirler gibi çeşitli şekillerde bulunurlar [120]. Virüsler ve bakteriler, küresel olmayan formlarda evrimleşerek bağışıklık tepkisinden kaçma yeteneklerini geliştirmiştir. Kanser ilacı iletiminin etkisi, esas olarak ilaçların veya ilaç taşıyıcılarının biyo-dağılımı ile belirlenir. İlaç, terapötik etkinliği en üst düzeye çıkarmak için daha az sistemik dağılımla belirli hedeflere iletilmelidir. Etkili biyo-dağılıma sahip diğer küresel şekiller nanopartiküllerdir [121]–[124].

Bir diğer önemli parametre ise yüzey yüküdür. Nanopartikülün yüzey yükü, dolaşım ömrünü uzatmak ve amaçlanan bölgede birikmesini arttırmak açısından önemlidir. Serum proteinlerinin adsorpsiyonunu azaltan pozitif yüklü olmayan nanopartiküller daha uzun süre kan damarları içerisinde dolaşımını devam ettirebilmektedir [125].

Nanopartikülleri en temel şekilde organik ve inorganik olarak sınıflandırabiliriz. Organik nanopartiküller; fulleren, karbon nanotüpler ve quantum dotlar karbon içerirken inorganik nanopartiküller; metal nanopartiküller, altın ve gümüş nanopartiküller içermez [126],[127].

Dendrimerler, 1-10 nm boyutları arasında karakterizedir. Merkezi bir çekirdek etrafında simetrik birbirleriyle bağlı dallanmış bir dizi polimer zincirlerinden

oluşan 3 katmanlı tek dağılımlı homojen, nanoboyutlu simetrik moleküllerdir. Merkez çekirdek etrafındaki polimer zincirleri arasına çeşitli ilaçlar veya moleküller tutturularak tedavi bölgeleri hedeflenebilir. Farklı biyolojik özelliklere sahip dendrimerler bulunmaktadır ancak sentezlemedeki zorluklar ve ilaç iletim stabilitelerindeki eksikliklerden dolayı ilaç salımında zorlukları mevcuttur[128].

2016 yılında yapılan bir çalışmada Poliamidoamin (PAMAM)-polietilen glikol (PEG) kompleksi tek sarmallı bir AS1411 aptamer (APT^{AS1411}) ile konjuge edilmiş ve bu konjuge PAMAM-PEG-APT^{AS1411} kompleksinin, MKN45 mide kanseri hücreleri tarafından PAMAM-PEG-5-FU alımını önemli ölçüde artırdığı görülmüştür. Ayrıca kanserli tümörlerin çevresinde 5-Fu birikiminde artış olduğu gösterilmiştir [129].

Lipozomlar, lipid çift katmandan oluşan içi boşluklu küresel yapılardır. İletimi yapılmak istenen ilaçlar bu boşluk içerisine tutturulur. Lipid yapısı sayesinde düşük suda çözünürlüğü vardır böylece sulu ortamlarda yüksek stabilite gösterebilirler. Hidrofobik ortamlarda lipid yapılar açılır ve merkezdeki molekülü serbest bırakırlar. Bu mekanizma sayesinde hedeflenen moleküller hücre zarından içeri girip sitoplazmada etki gösterebilirler. Biyouyumlu, düşük toksisiteli ve immunojenik olmayan, biyolojik parçalanabilirliği yüksek olan bu mekanizmalar kanser hedeflemesinde avantajlı olmaktadır. Lipozomal sistemler hem aktif hem de pasif hedeflemede günümüzde hala araştırmacılar tarafından geliştirilmeye devam eden yapılardır [130], [131].

Peng Z. ve arkadaşları mide kanseri üzerindeki anti-tümör etkilerini incelemek için ısıya duyarlı manyetik lipozomal dağıtım sistemi geliştirmişlerdir. Gen susturucu shRNA vektörü ve anti-tümör ilacının (DOX) mide kanserine birlikte verildiği çalışmada *in vitro* ve *in vivo* deneyler sonrası önerilen liposomal dağıtım sisteminin tekli dağıtıma kıyasla kanser hücrelerinin büyümesini engelleyebileceğini göstermiştir [132].

Nanokabuklar, ince bir altın tabakası ile çevrelenmiş bir dielektrik çekirdek yapısında çoğunlukla küresel nanoparçacıklardır[133]. Nanokabukların kullanımına bağlı olarak, kabuklar metallerden de oluşturulabilir. Optik ve

kimyasal özelliklerinden dolayı nanokabuklar biyomedikal görüntüleme ve kanser tedavisi olarak kullanılmaktadır [134].

Zang ve arkadaşlarının yürüttüğü bir çalışmada, mide kanseri hücrelerinde HER-2'yi ve immünolojik adjuvan CPG dizisini hedefleyen altın nanokabuk (Gold Nanoshell) ilaç taşıyıcısı geliştirilmiş ve bu siRNA-CpG-Altın-nanokabuk sistemi, hem *in vitro* hem de *in vivo* sonuçlarda, ilaç dağıtım sisteminin çoklu terapötik etkilerinin monoterapiden daha iyi antitümör etkinlik sergilediğini göstermiştir [135].

Kuantum noktaları, ayırt edici optik ve elektronik özelliklerinden dolayı hem *in vitro* hem de *in vivo* biyomedikal görüntüleme için keşfedilen bir prob olarak kullanılmaktadır [136]. Kuantum noktalarına dayalı problar, antikorlar, peptitler veya diğer küçük moleküller gibi biyoajanlarla konjuge edildiğinde hedef kanser moleküllerine karşı yüksek özgüllük ve hassasiyet gösterir. Bununla birlikte, insan hastalıklarında görüntüleme için kuantum noktalarının kullanımı, potansiyel ağır metal toksisiteleri ile sınırlıdır [137].

Wang ve arkadaşlarının yayınladığı çalışmada Sitrik asit ve PEI'den türetilen C-noktalarının (CD) konjuge edilmesiyle geliştirilen bir gen iletim sistemi, survivin siRNA'yı etkili bir şekilde yoğunlaştırdığı, gen iletimi etkinliğinin arttığı, insan mide kanseri hücrelerinin MGC-803 ölümüne ve büyümesinin inhibisyonuna neden olduğu ve bir görüntüleme ajanı olarak görev yaptığı gösterilmiştir[138].

Karbon nanotüpler, fulleren yapı ailesinin[139] altında yer alan benzen halkalarından oluşan tübüler yapılardır. Karbon nanotüpler nanometrik boyutlarına göre iki gruba ayrılmıştır, yani bir silindir grafen tabakasından oluşan tek duvarlı nanotüpler (SWNT) ve çok sayıda eşmerkezli grafen katmanından oluşan çok duvarlı nanotüpler (MWNT)'dir. Karbon nanotüpler, organize yapı, ultra hafif ağırlık, iyi elektriksel ve termal iletkenlik gibi özellikleri ve ayrıca daha fazla üst yüzey alanı nedeniyle ilaç dağıtımında uygun taşıyıcılar olarak kabul edilir [140]. Karbon nanotüpler, teşhis için biyosensörlerin üretiminde ve çeşitli terapötik ajanlar için ilaç iletim sistemlerinde kullanılmıştır. Potansiyel faydalarına rağmen, toksisite endişesi nedeniyle kanser tedavisinde araştırmaları devam etmektedir [141], [142].

Nanopartiküller çeşitli stratejiler ile doğrudan hedef bölgeye hedeflenebilirler. Ayrıca, nano boyutları nedeniyle tümör dokularına kolayca nüfuz edebilir ve bölgede yüksek miktarda birikebilir. Üstelik katı tümörler ayrıca fonksiyonel lenfatik sistemlerden yoksundur ve bu da ilacın tümör kütlesinde daha uzun süre kalmasını sağlar [143]. Nano boyutları sayesinde, intravenöz, intramüsküler ve deri altı uygulamalar için kolayca uygulanabilir hale getirir. Nanopartiküller aracılığıyla tümör hücrelerinin hedeflenmesi, aktif hedefleme, pasif hedefleme, polimerik nano taşıyıcılar yoluyla hedefleme gibi farklı stratejileri içerir [111].

Pasif hedefleme esas olarak nanoilaçların birikmesine yardımcı olan tümörün fizyolojik özelliklerine bağlıdır. Artmış vasküler geçirgenliğe ve kusurlu lenfatik drenaja sahip hızla büyüyen tümörler, sıklıkla nanosistemlerin kanserde artan geçirgenlik ve tutma (EPR) etkisine yol açar. Bu etki, daha küçük partiküllere (20 - 500 nm) ek olarak, tümör içinde daha yüksek moleküler ağırlıklı bileşiklerin birikmesine yardımcı olur. Pasif hedefleme, esas olarak nanoparçacık boyutuna bağlıdır, çünkü pasif difüzyon, difüzyon aracılı taşıma ile sağlanır [144]. 40 – 200 nm boyut aralığındaki nanopartiküller, daha uzun dolaşımda kalır, daha fazla tümör kütlesi içinde birikir ve nanopartikülün sistemden daha az elimine olmasını sağlar. EPR etkisi, tümör bölgesinde ilaçların seçici hedeflenmesi diğer geleneksel kemoterapi üzerindeki büyük ikilemin üstesinden gelir. Şu anda çok sayıda nanopartikül klinik kullanımdadır [145].

2.2.1 Polimerik Nanopartiküller

Polimerler, monomer adı verilen küçük moleküllerin polimerizasyon işlemi ile çok sayıda tekrar etmesi ile oluşan, doğrusal dallanmış ve çapraz bağlı gibi farklı yapısal özelliklere sahip makromoleküllerdir [146].

Polimerik nanopartiküller, ilacın polimerik matris (nanosferler) içinde tutulabileceği veya partiküllerin iç boşluğunda kapsüllenebileceği ve bir polimerik tabaka (nanokapsüller) ile çevrelenebileceği, küresel bir şekle sahip katı, nano boyutlu, biyobozunur kolloidal sistemlerdir. Bu aynı zamanda ilacın partiküllerin yüzeyine tutunmasını da mümkün kılar [147],[148]. Üretilen nanopartikül formülasyonlarında hedeflenilen tedavi stratejisine göre çeşitli polimerler kullanılabilir. Bu polimerler köken aldığı kaynaklarına göre, yapılarına ve

parçalanma özelliklerine göre sınıflandırılmaktadır. Elde edildiği kaynaklara göre doğal veya sentetik olarak sınıflandırılan polimerler, biyobozunur, biyouyumlu, toksik olmayan ve immun yanıt oluşturmayan özellikleri ile nanopartikül taşıyıcı sistemlerinde tercih sebebi olmaktadır. Polimerik nanopartiküller, biyobozunurlukları ve biyouyumlulukları ile birlikte düşük immünojenisite, daha iyi stabilite ve kolay yüzey işlevselleştirmeye ek olarak daha yüksek ilaç yükleme kapasitesi de dahil olmak üzere sundukları istisnai özellikler nedeniyle kanser tedavisi ve kontrollü ilaç salımı için en uygun ilaç taşıyıcıları olarak kabul edilebilirler [149]. Polimerik nanopartiküller, hedefleme ligandlarının yüzey modifikasyonları sayesinde örneğin kanser hücrelerinde aşırı eksprese edilen spesifik reseptörler veya ligand bağlama bölgeleri tarafından tanınması gibi, yüklü ilaçların kontrollü salımı için hedef bölgelerde tanınmasını sağlar. Örneğin polimerin yüzeyini polietilen glikol (PEG) ile kaplamak *in vivo* protein adsorpsiyonunu azaltmaya, nanopartiküllerin Retikülo-endoteliyal sistemden kaçınmasını kolaylaştırmasına ve kan dolaşımındaki dolaşım sürelerini uzatmaya böylece tümör dokusunda birikimlerini arttırmaya sebep olur olur [150],[151]. Tedavilerin başarılı olabilmesi için polimerik nanopartiküllere dayalı hedefli ilaç dağıtım sistemlerinin rasyonel tasarımı, bileşim, çözünürlük, kristallik, moleküler ağırlık, omurga stabilitesi, hidrofobiklik ve polidispersitenin dikkate alınmasını içerir[152]. Doğal polimerler; nişasta, heparin, dekstran, aljinat, kitosan, hyaluronik asit, kolajen, jelatin, albümin kitosan, toksik olmayan, ucuz ve doğada bol bulunan en yaygın polimerlerdir ancak hızlı ve kontrolsüz salım profilleri, saflık açısından farklı parametreleri ve çapraz bağlanmayı gerektirdiği durumlarda enkapsüle ilacın etkinliğini denatüre edebilecek özelliklerinden dolayı kullanımları dezavantaj oluşturur [153]. FDA tarafından halihazırda onaylanmış biyobozunur ve biyouyumlu sentetik polimerler ise, polilaktik asit (PLA), poli-L-lisin (PLL), poliglutamik asit (PGluA), poliglikolik asit (PGA), polietilen glikol (PEG), polikaprolakton (PCL), poliaspartat (PAA), poli(D-L-laktid-ko-glikolik) asit (PLGA), siklodekstrinler (CD) ve N-(2-hidroksipropil)-metakrilamid kopolimeri (HPMA) yaygın kullanılan polimerlerdir [154].

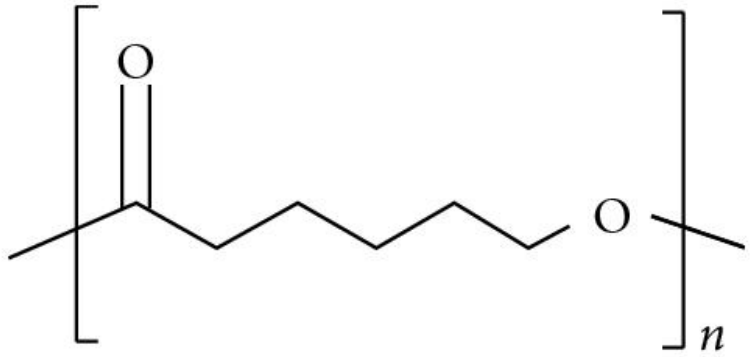
Tablo 2.2 Polimer nanopartiküllerin bazı kanser türlerinde incelemeleri

Polimer	**Aktif Farmasötik İçerik**	**Uygulama**	**Referans**
PLGA-PVP	Tamoksifen	MCF-7 hücreleri	[155]
PLGA	Folat	MCF-7 hücreleri	[156]
PLA-mPEG	Aptamer	*In vivo* / LNCaP hücreleri	[157]
PEG-PLGA	Folat	*In vivo* / MDA-MB-231 hücreleri	[158]
PEGylated PLGA	Doksorubisin	*In vivo*: Bioavailability assay	[159]
PCL–PEG	Kamptotesin	*In vivo* / 4T1 hücreleri	[160]
PLGA–PEG	Paklitaksel	*In vivo* / Gliosarkoma C6 hücreleri	[161]
PLA–PEG–maleimide	Paklitaksel	*In vivo* / MDA-MB-231 hücreleri	[162]
mPEG–PLGA–PGlu	Doksorubisin–Curcumin	*In vivo* / MCF-7/ADR hücreleri	[163]
PCLLA–PEG–PCLLA	Doksorubisin-Klorin e6-MnO2	*In vivo* / MCF-7 hücreleri	[164]
TPGS–PLGA	Doksorubisin-Metformin	MCF-7/DOX hücreleri	[165]
TPGS–PLGA	Doksataksel-Salinomisin	*In vivo* / MCF-7 hücreleri	[166]
Gal–pD–TPGS–PLA	Doksataksel	*In vivo* / HepG2 hücreleri	[167]
PCL–PEGPEG–PCL	Paklitaksel	*In vivo* / A549 hücreleri	[168]
PEI–PLA	Paklitaksel	*In vivo* / A549 hücreleri	[169]
PEG-PCL	Gambogic acid	*In vivo* / MKN-45 hücreleri	[170]

2.2.1.1 Polikaprolakton (PCL)

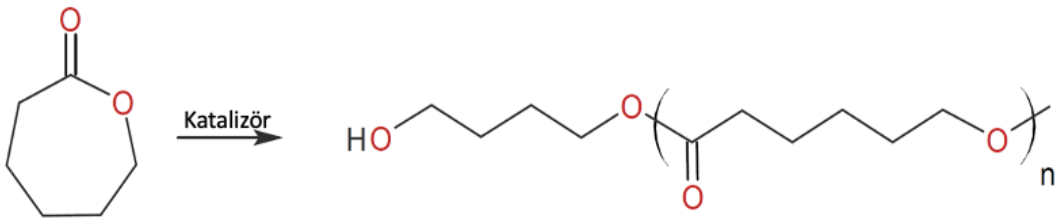
1930'lu yıllarda sentezlenen ilk polimerlerden biri olan Polikaprolakton (PCL), ilaç taşıma sistemlerinde ve yara örtüsü iskelelerinde sıklıkla tercih edilen, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onaylı, sentetik, düşük erime noktası (60°C) ve semi kristal yapıya sahip polimerdir [171]. Oda sıcaklığında diklorometan, kloroform, benzen, toluẗen, aseton ve asetonitrilde çözuẗnuẗr. Su, alkol, petrol eteri, dietil eter ise çözuẗnmez [172]. Çeşitli katalizörler ile ε-kaprolaktonun zincir halka açılması polimerizasyonu ile oluşan PCL insan vücudu benzeri fizyolojik koşullarda ester

bağlarındaki hidroliz sonucu bozunur [173]. Biyouyumlu ve biyobozunur olan bu polimer toksik olmaması, düşük sıcaklıklarda şekillendirilebilmesi ve çalışılabilmesi gibi sayısız avantajı ile ilaç taşıma sistemlerinde tercih edilmektedir. PCL hidrofobik yapıda bir polimer olması sebebiyle degradasyonu yavaştır ve bozunma yüzey erozyonu şeklinde gerçekleşir bu da ilaç taşıma sistemlerinde kapsüllenen molekülün yavaş ve kontrollü salımına olanak sağlaması açısından avantajlıdır [174].



Şekil 2.8 Poli (ε-kaprolakton)'un kimyasal yapısı [175]

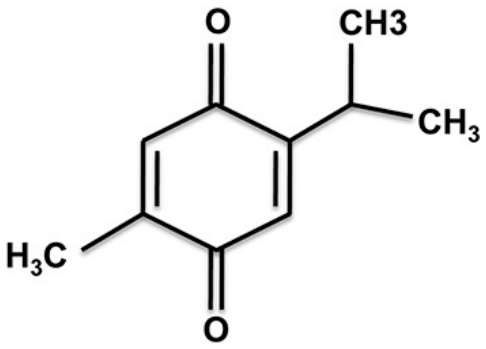
PCL temelli nanopartikül taşıma sistemleri ayrıca bakteri gibi çeşitli mikroorganizmaların lipazları ve esterazları sayesinde enzimatik olarak kolaylıkla parçalabilmesiyle mide kanserlerinde birincil risk faktörü olan Helicobacter pylori'nin koloni bölgesinin hedeflenmesinde ve tedavi başarısında avantaj sağlar[176].



Şekil 2.9 Poli (ε-kaprolakton)'un zincirleşme yapısı [177]

Timokinon

Timokinon (TQ), *Nigella sativa* bitkisinde bulunan çörek otu olarak da bilinen aktif bir fitokimyasaldır. TQ, Ranunculaceae familyasına ait tek yıllık otsu bir bitkidir ve blunduğu bölgelerde geleneksel olarak baharat şeklinde kullanmanın yanı sıra koruyucu ve tedavi edici şekilde kullanılmıştır. TQ, 2-izopropil 5-metil 1-4 benzo-kinon(Şekil 2.10) kimyasal yapıya sahiptir [178] ve yapısında uçucu yağ, protein, aminoasit, karbonhidrat, organik asit, saponin, lif, vitamin ve mineraller gibi çeşitli bileşikleri barındırır [179],[180]. Redüktazların semikinon veya timo-hidrokinon'a dönüştürebildiği bir kinondur. Timo-hidrokinon bir antioksidandır ve semikinon, pro-oksidanlar olan reaktif oksijen türlerini (ROS) üretir, bu nedenle TQ hem antioksidan hem de pro-oksidan molekül görevi görür böylelikle sağlıklı hücreler için antioksidan, kanser hücreleri için pro-oksidan olarak seçici toksisite sağlar[181]. TQ'un antidiyabetik, antikanser dahil olmak üzere kardiyoprotektif, nöroprotektif, ve antihipertansif farmakolojik etkinliği kanıtlanmıştır [182]–[184]. TQ'un antikanser çalışmaları on yıldan fazla süredir çeşitli hücre hatlarında ve hayvan modellerinde denenmektedir. Kanser hücrelerindeki etki mekanizması ise apoptoza yol açarak, hücre proliferasyonu ve anjiyogenezin engellenmesi, ROS'ların sebep olduğu DNA hasarı, farklı sinyal yolaklarını hedefleyerek ve hücre döngüsünün durdurulmasına müdahale ederek hücre ölümlerini gerçekleştirir [185].



Şekil 2.10 Timokinon molekül yapısı

TQ'un antioksidan aktivitesinin serbest radikalleri temizleyerek oksidatif DNA hasarını önlediği [186]–[188] ve kemopreventif aktivitelerinden sorumlu olduğu

kanıtlanmış olmakla beraber, diğer bazı çalışmalarda TQ'nun oksidatif hasarı uyararak kanser hücrelerinde DNA sentezini ve çoğalmasını engelleyebildiği kanıtlanmıştır [189]–[191]. TQ, Bax/Bak gibi pro-apoptotik genleri ve proteinleri up-regüle edebilir veya Bcl-2, Bcl-xL gibi antiapoptotik genleri ve proteinleri down-regüle edebilir, kaspaz yolaklarını uyarabilir ve böylece apoptozu indükleyerek kanser hücresi büyümesini kontrol edebilir [192],[193]. TQ'nun, p53, peroksizom proliferatörle aktive edilen reseptör (PPAR)-γ, fosfataz ve tensin homologu (PTEN), sinyal transdüseri ve transkripsiyon aktivatörü(STAT3) ve reaktif oksijen türlerinin üretilmesi gibi çeşitli moleküler hedeflerin aktivitesine ve ekspresyonuna etki ederek apoptozu indüklediği de kanıtlanmıştır [193],[194]. Bazı tümör baskılayıcı genlerin ve proteinlerin, TQ tarafından aşırı eksprese edildiği veya aktive edildiği bulunurken, bazı onkojenik sinyal molekülleri ve yollarının, TQ tarafından inhibe edildiği bulunmuştur [195]-[197]. TQ, kanser hücresi büyümesini engellemeye ek olarak, farklı moleküler yolları hedefleyerek kanser hücresi metastazını kontrol etme potansiyeline sahiptir. Ayrıca TQ, proanjiyojenik vasküler endotelyal büyüme faktörünün (VEGF) indüklediği ERK aktivasyonunun baskılanması ve tüp oluşumunun inhibisyonu gibi neovaskülarizasyonun temel adımlarına müdahale ederek anjiyogenezi inhibe edebilir. Polo benzeri kinaz1'in (Plk1) polo kutusu alanı (PBD), TQ'un önemli hedeflerinden biri olarak gösterilmiştir. Plk1, hücre döngüsünün önemli bir indükleyicisidir ve TQ, işlevini bozarak hücre döngüsünü durdurur [198]–[201].

TQ, bakteriler, virüsler, parazitler ve mantarlar dahil olmak üzere çeşitli patojenik mikrobiyal suşlara karşı test edilmiştir ve antimikrobiyal aktivite göstermiştir [202]–[205]. Hem gram pozitif hem de gram negatif bakterilere karşı etkilidir[206]. TQ'un düşük konsantrasyonlarda antifungal ajan gibi davrandığı, poli(metil metakrilat) (PMMA) protezlere eklendiğinde PMMA'nın eğilme ve yüzey özelliklerini etkilemeden enfeksiyonu önlemeye yardımcı olduğu gösterilmiştir[207].

Tüm bunların yanında TQ'un hidrofobik yapısından dolayı hızla elimine edildiği, dolayısıyla biyoyararlanımının çok düşük olduğu sınırlı da olsa farmakolojik çalışmalarda tespit edilmiştir [208]–[211]. Bu yüzden bu mükemmel teranostik

etkinliği kullanabilmek için nanoteknolojik yaklaşımlar büyük bir önem ifade etmektedir.

3
MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

3.1.1 Ekipman ve Sarf Malzemeler

- Hava akımlı kabinler (Thermo Scientific Hera safe, Faster BH-EN 2006)
- Ters mikroskop (Olympus CKX41)
- Santrifüj (Eppendorf, Thermo Micromax RF)
- CO_2 akışlı inkübatör (New Brunswick scientific CO-150)
- Manyetik karıştırma cihazı (Heidolph MR3000)
- Hassas terazi (Presica Gravimetrics)
- Pastör fırın (Memmert)
- Buz yapma makinası (Scotsman AF100)
- Vortexleme cihazı (LMS VTX-3000L)
- Çalkalamalı su banyosu (GFL mbH, Kerman)
- UV-spektrofotometre cihazı (Shimadzu UV-1800)
- -196°C sıvı azot tankı (DMC air liquid system)
- Otoklav
- Liyofilizatör
- ELISA çoklu mikroplaka okuyucusu (Thermo)
- Distile su ve ultra saf su sistemi (GFL2104)
- Mikropipetler (10,100,1000 µl'lik, Thermo)
- Pipet ucu (1-10, 20-200, 100-1000 µl'lik tek kullanımlık)
- Enjektörler (1, 5, 10, 50 cc'lik, Ayset)
- Buzdolabı (Beko(+4,-20°C), Arçelik(+4,-20°C) Beko(-40°C)
- Santrifüj falkonları 15 ve 50 mL (Ependorf, IsoLAB)
- ELISA 96 kuyucuklu plaka (TPP)

- Thoma Lamı (menzelsuperior)
- Kriyotüpler(TPP)
- Hücre külrtür flaskı (25, 75 cm^2, TPP)
- Pipet tabancası (Thermo)
- Serolojik pipet (1, 5, 10 ml, IsoLAB)
- Otoklavlanabilir cam şişeler (50-1000 ml'lik, IsoLAB)
- Enjektör filteleri (0,22-0,45 μm'lik, Millipore,TPP)
- Taramalı elektron mikroskobu (SEM)
- Dönüşümlü Kızılötesi Spektrofotometresi (SHIMADZU)
- Sonikasyon Cihazı (Bandelin Sonoplus GM2200)
- pH-metre (HANNA instruments)

3.1.2 Kimyasallar

- Metanol (Merck)
- Etil Alkol (%96) (Labkim)
- Tripan mavisi (Biologycal Industry)
- Etanol (Merck)
- EDTA (AppliChem)
- L-Glutamine (PAN Biotech)
- Dipotasyum fosfot, K_2HPO_4 (Sigma)
- Amonyum sülfat, $(NH_4)_2SO_4$ (Merck)
- Sodyum klorür, NaCl(Sigma)
- Sodyum bikarbonat, $NaHCO_3$ (Merck)
- FBS-fetal bovine serum (GIBCO-Invitrogen)
- Dimetilsülfoksit (DMSO, Sigma)
- DMEM-F12 (Sigma Aldrich)
- Penisillin-streptomisin (PAN Biotech)
- HEPES (Sigma Aldrich)

- Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (Sigma Aldrich)
- Polivinilalkol (PVA) (Sigma Aldrich)
- Polikaprolakton (PCL) (Sigma Aldrich)
- Diklorometan (Sigma Aldrich)
- 5-Florourasil (Sigma Aldirich, ABD)

3.1.3 Deneylerde Kullanılan Tampon ve Kimyasalların Hazırlanışı

3.1.3.1 Tamponlar

PBS Tamponu

KCl (Ma: 58.4 g/mol) 0,2 g , NaCl (Ma: 58.4 g/mol) 8 g, KH_2PO_4 (Ma: 136.086 g/mol) 0,24 g, ve Na_2HPO_4 (Ma: 141.96 g/mol) 1.44 mg toz kimyasallar hassas terazi ile tartıldı 900 ml distile suda homojen hale gelene kadar çözdürüldü. pH'ı 7,4'e göre ayarlandı ve son hacim 1 litre olacak şekilde distile su eklendi. 1 atm, 121°C otoklavda cam şişelerde 20 dakika steril edildi.

3.1.3.2 Kimyasallar

Tripsin Solüsyonu

%0,25 tripsin solüsyonu elde etmek için 2,5 g tripsin ve 0,2 g EDTA tartıldı, 1 ml'ye tamamlandı manyetik karıştırıcı üzerinde çözdürüldü.

MTT Solüsyonu

Son konsatrasyonu 10 mg/ml olacak şekilde Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide tuzu hassas terazide 100 mg tartıldı PBS ile 10 ml'ye tamamlandı. İyice vortekslendikten sonra soğuk sterilizasyon yöntemi ile sterilize edilmek için 0,22 µl'lik filtreden geçiildi. Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide tuzu ışığa duyarlı olduğu için işlemler karanlıkta tamamlandı ve karanlıkta muhafaza edildi.

Hücre Dondurma Solüsyonu

Kabin içerisinde 15 ml'lik falkonlarda %80 FBS ve %20 DMSO içerecek şekilde çözeltiler hazırlandı ve daha sonra kullanılması için -20°C'de muhafaza edildi.

PCL Çözeltisinin Hazırlanması

% 3 PCL çözeltisini elde etmek için 3 mg PCL (Ma:14000) tartıldı. 100 mL diklorometan içerisinde çözdürüldü.

PVA Çözeltisinin Hazırlanması

%1 PVA çözeltisi hazırlamak için 2 mg PVA tartılarak 200 mL distile su içerisinde 50 °C'de 1000 rpm manyetik karıştırıcıda karıştırılarak çözdürüldü.

3.1.3.3 Besiyerleri

DMEM- F12 Medyumu

500 ml DMEM/F12 stok besiyeri içerisine 5 ml penisilin streptomisin ve 5 ml L-glutamin ilave edildi. Ardından 50ml'lik falkonlara %10 FBS içeren DMEM-F12 besiyeri eklenerek alikotlandı. +4°C'de muhafaza edildi.

3.1.4 Deneylerde Kullanılan Hücreler

L929 (ECACC 85011425) fare fibroblast hücre hattı: 100 günlük erkek C3H/An faresinin normal deri altı yağ dokusundan türetilmiştir. Fare fibroblast hücresi olan bu hücre hattı hazırlanan formülasyonların toksisite testleri için kullanılmıştır.

AGS (CRL-1739(ATCC)) hücre hattı: 54 yaşında kadın mide kanseri hastasından izole edilmiştir. Daha önce tedavi almamış hastadan izole edilmiş, mide kanseri hücre hattıdır ve sentezlenen formülasyonların antikanser aktivitelerinin değerlendirilmesi için kullanılmıştır.

3.2 Metot

3.2.1 Hücre Kültürü Metodları

3.2.1.1 Hücre Hatlarının Kriyobanktan Çıkarılması

Deneylerde Yıldız Teknik Üniversitesi, Kimya Metalurji Fakültesi, Hücre kültürü ve Doku Mühendisliği laboratuvarında bulunan kriyobanktan çıkarılan AGS ve L929 hücre hattı bulunan kriyotüpler 37 °C'deki su banyosunda çözdürüldü. Çözdürülen hücre süspansiyonu 5ml %10 FBS içeren DMEM-F12 besiyeri üzerine aktarıldı ve

1200 rpm'de 5 dk santrifüjlendi. Ardından supernatant atıldı ve pellet nazik bir kaç pipetaj sonrası 5 ml besiyeri bulunduran T25'lik flaska alındı.

3.2.1.2 Hücre Hatlarının Kültürünün Yapılması

Hücrelerin devam eden kültürü için DMEM-F12(%10 FBS) besiyeri kullanıldı. T25 flasklarda 5ml besiyerinde hücre ekimi gerçekleşti. Kültürün durumu, hücrelerin morfolojisi ve proliferasyonu her gün düzenli olarak invert mikroskopta incelendi. Besiyeri, kültürün proliferasyonu ve ortamın pH'sına bağlı olarak değiştirildi. Hücreler %80 yoğunluğa ulaştıktan sonra pasajlama işlemi yapıldı.

3.2.1.3 Hücre Hatlarının Tripsinizasyonu ve Pasajı

Tripsinizasyon basamağında flasktaki besiyeri uzaklaştırılır ve hücreler 3 ml PBS ile 2 kez nazik bir şekilde yıkanır. 4 ml Tripsin-EDTA flasklara ilave edilir ve 37°C'de 5 dk inkübe edilir. Hücrelerin yüzeyden kalkıp ayrıştıklarını ters mikroskopta inceledikten sonra 8 ml %10 FBS'li DMEM-F12 flaska eklenir, ardından 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edilir. Süpernatant uzaklaştırılır ve hücre sayımı yapılır. Belirli sayıdaki hücreye göre her T75'lik flask içine homojen bir şekilde dağıtılır. Flasklar %5 CO_2 içeren 37°C'deki inkübatörde inkübe edilir.

3.2.1.4 Hücre Sayımı

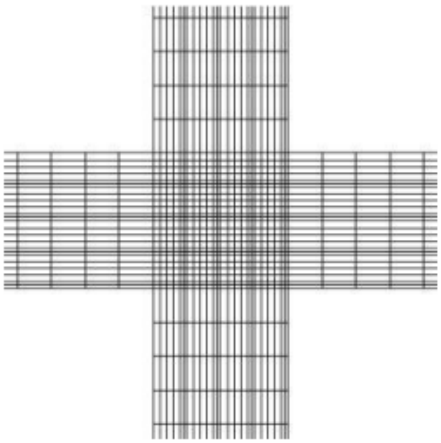
Hücrelerin sayımı, tripan mavisi ile thoma lamında yapılır. Santrifüj sonrası hücre süspansiyonunun pelleti, süpernatantı uzaklaştırıldıktan sonra 1 ml besiyeri ile resüspanse edilir. 50 µl tripan mavisi solüsyonu, 48 µl besiyeri ve 2 µl hücre süspansiyonu ile 1,5 ml'lik steril ependorfa eklenir. Thoma lamının alt ve üst kısımlarının her iki tarafına 10 µl hücre süspansiyonu eklenir. Ters mikroskopta hücre sayımı yapılır. Pasaj sırasında elde edilen pelletin geri kalanı kriyoprezervasyon işlemi için kullanılır.

Hücre sayısı (1 ml) = Sulandırma oranı x Sayılan hücre sayısı x Thoma Lamı Sabiti (10,000)

Sayılan ortalama hücre sayısı: Thoma lamında sayılan 16 karedeki canlı hücrelerin aritmetik ortalamasıdır

Sulandırma oranı: Ependorfta sulandırılmış pelletin sulandırma katsayısı

Thoma lamı sabiti: 10 000



Şekil 3.1 Thoma lamı görüntüsü

3.2.1.5 Hücre Hatlarının Kriyoprezervasyonu

Hücrelerin kriyoprezervasyon işlemi için pasaj sonrası hücre sayımı yapılır, 1 ml'lik kriyotüp içerisinde 10^6 hücre/ kriyoprotektan mL, olacak şekilde alınır. Ardından yavaş dondurma işlemi başlatılır. Hücreler +4°C-1 saat, -20°C-2 saat ve -40°C'de bir gece bekletildikten sonra -196°C'deki kriyobanka aktarılır.

AGS (CRL-1739) Hücre Hattının Kültürü

Sitotoksisite deneylerinde Deneylerde Yıldız Teknik Üniversitesi, Kimya Metalurji Fakültesi, Hücre kültürü ve Doku Mühendisliği laboratuvarında bulunan likit azot tankında bulunan AGS mide kanseri hücre hattı kullanıldı.

Kriyobanktan çıkarılan kriyotüpte bulunan hücreler 37°C'de su banyosunda çözdürüldü. %10 FBS'li DMEM F-12 besiyerine aktarıldı, 1200 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi ve süpernatantı atıldı. Hücre pelletinin üstüne 5 ml %10 FBS'li DMEM-F12 besiyeri eklendi ve T25'lik flasklara hücrelerin ekimi gerçekleştirildi. Hücreler invert mikroskopta 24 saatte bir incelendi.

AGS hücrelerinin pasajını gerçekleştirmek için besiyeri flasktan uzaklaştırıldı ve PBS ile yıkandı. Flaska 4 mL tripsin solüsyonu eklendi ve 5 dakika etüvde inkübe edildi. Ardından flaska 8 mL DMEM-F12 besiyerini ilave edildi ve pipetaj yapılarak hücreler flasktan falkona aktarıldı ve 1000 rpm hızında 5 dakika santrifüjlendi. Ardından Thoma lamında deneyler için hücre sayımı yapıldı.

AGS Hücrelerinin Sayımı

Sayım için flasktan kaldırılan AGS hücreleri 1200 rpm'da 5 dakika boyunca santrifüjlendi. Süpernantantı atıldı ve falkonda kalan pelletin üzerine 1 mL DMEM-F12 besiyeri eklenerek hücreler yeniden süspanse edildi. Eppendorf tüpüne 48 µl besiyeri, 50 µl tripan mavi boya ve 2 µl hücre ilave edilerek pipetaj yapıldı. Thoma lamının her iki tarafına hazırlanan süspansiyondan 10'ar µl konuldu ve mikroskopta sayım gerçekleştirildi. 1 mL içerisindeki toplam hücre sayısını hesaplamak için aşağıdaki denklem kullanıldı.

Hücre sayısı (1 ml) = Sulandırma oranı x Sayılan hücre sayısı x Thoma Lamı Sabiti (10,000)

Sayılan ortalama hücre sayısı: Thoma lamında sayılan 16 karedeki canlı hücrelerin aritmetik ortalamasıdır

Sulandırma oranı: Ependorfta sulandırılmış pelletin sulandırma katsayısı

Thoma lamı sabiti: 10 000

AGS Hücrelerin Kriyoprezervasyonu

AGS hücrelerin kriyoprezervasyonu için %20 DMSO içeren FBS ile dondurma solüsyonu hazırlandı. 1 mL'lik kriyotüplere 1.000.000 hücre içeren 500 µl besiyeri konuldu. Üzerine damla damla 500 µl kriyoprotektan eklenerek yavaş dondurma yöntemi ile donduruldu. Bu amaçla kriyotüpler öncelikle 1 saat +4 °C'de, 2 saat -20°C'de, bir gece boyunca -40°C'de bekletildi ve ardından -196°C'deki azot tankına yerleştirildi.

3.2.2 Farklı Formülasyonları İçeren Polikaprolakton Nanopartiküllerinin Sentezlenmesi

L929 fibroblast ve AGS hücre hatlarında sitotoksisiteleri incelenecek olan Timokinon ve/veya 5-Fluorourasil yüklü ve boş polikaprolakton (PCL) nanopartikülleri emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile sentezlendi.

3.2.2.1 Çözücü Buharlaştırma Yöntemi ile Polikaprolakton Nanopartiküllerinin Hazırlanması

Boş PCL nanopartikülleri tekli emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlandı. Önceden hazırlanmış olan %1 PVA çözeltisi manyetik karıştırıcı üzerinde 15ml beher içerisine alındı ve üzerine 5 mL %3 PCL çözeltisi damlatıldı. Damlatma işlemi sonrası sonikasyon yapıldı. Diklorometanı uzaklaştırmak için sonikasyon sonrası çeker ocakta 4 saat karıştırıldı. Diklorometan uçurulduktan sonra 14000 rpm'de 45 dakika +4°C'de santrifüjlendi. Yıkama işlemi 3 kez tekrar edildi. Süpernatantlar enkapsülasyon etkinliğinin belirlenmesinde kullanılmak üzere bir falkona toplandı. Son yıkama işleminin sonrası zeta-sizer ile boyut ve zeta potansiyel analizi yapıldı. Elde edilen nanopartiküller liyofilizatör ile 24 saat kurutuldu ve deneylerde kullanılmak üzere buzdolabında muhafaza edildi.

Çözücü Buharlaştırma Yöntemi ile 5-Fluorourasil Yüklü Polikaprolakton Nanopartiküllerin Hazırlanması

5-Fluorourasil yüklü PCL nanopartikülleri tekli emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlandı. Literatürde farklı hücre hatları üzerinde serbest formlarının çalışıldığı 5-Fluorourasil'in konsantrasyonunu bu çalışmalardan yola çıkarak 8 mg olarak seçtik [211,222-227]. 5-Fluorourasil daha önceden hazırlanmış %3'lük 5 mL PCL çözeltisinin içerisine eklendi ve manyetik karıştırıcıda 3dk karıştırılarak çözünmesi sağlandı. Ardından 5 dakika sonikasyon işlemi gerçekleştirildi. Daha önce hazırlanan %1 PVA çözeltisinden 15 mL behere aktarıldı ve manyetik karıştırıcı ile 1000 rpm hızında karıştırılırken üzerine sonike edilmiş 5 mL %3 PCL çözeltisi şırınga ile damlatıldı. Damlatma işlemi sonrası karışım 5 dakika daha sonike edildi. Diklorometan çeker ocakta uzaklaştırıldı. Diklorometan uçurulduktan sonra 14000 rpm'de 45 dakika +4°C'de santrifüjlendi. Yıkama işlemi 3 kez tekrar edildi. Süpernatantlar enkapsülasyon etkinliğinin belirlenmesinde kullanılmak üzere bir falkona toplandı. Son yıkama işleminin ardından zeta-sizer ile boyut ve zeta potansiyel analizi yapıldı. Elde edilen nanopartiküller liyofilizatör ile 24 saat kurutuldu ve deneylerde kullanılmak üzere buzdolabında muhafaza edildi.

Çözücü Buharlaştırma Yöntemi ile Timokinon Yüklü Polikaprolakton Nanopartiküllerin Hazırlanması

Timokinon yüklü PCL nanopartikülleri tekli emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlandı. 5-Fluorourasil için 8 mg seçtiğimiz için sentezlenne tüm nanopartiküllerde parametreleri sabitlemek için timokinon polikaprolakton üretimi için de 8 mg timokinon kullanıldı, hassas terazi ile tartıldı, daha önceden hazırlanmış %3'lük 5 mL PCL çözeltisinin içerisinde çözdürüldü. Ardından 5 dakika sonike edildi. Daha önce hazırlanan %1 PVA çözeltisinden 15 mL behere alındı ve manyetik karıştırıcı ile 1000 rpm hızında karıştırılırken üzerine şırınga ile sonike edilen 5 mL %3 PCL çözeltisi damlatıldı. Damlatma sonrası karışım 5 dakika daha sonike edildi. Diklorometan uçuruldu ve 3 kez 14000 rpm'de 45 dakika +4°C'de yıkandı. Süpernatantlar toplandı. Zeta boyut ve potansiyel analizi yapıldı. Elde edilen nanopartiküller liyofilizatörde kurutuldu ve daha sonra kullanılmak için buzdolabına kaldırıldı.

Çözücü Buharlaştırma Yöntemi ile 5-Fluorourasil ve Timokinon Yüklü Polikaprolakton Nanopartiküllerin Hazırlanması

5-Fluorourasil ve Timokinon yüklü PCL nanopartikülleri tekli emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlandı. 4 mg timokinon hassas terazi ile tartıldı ve 4 mg antikanser ilaç ile birlikte daha önceden hazırlanmış %3'lük 5 mL PCL çözeltisinin içerisine eklendi ve manyetik karıştırıcıda karıştırılarak çözünmesi sağlandı. Ardından 5 dakika sonikasyon işlemi gerçekleştirildi. Daha önce hazırlanan %1 PVA çözeltisinden 15 mL behere alındı ve manyetik karıştırıcı ile 1000 rpm hızında karıştırılırken üzerine sonike edilen 5 mL %3 PCL çözeltisi damlatıldı. Damlatma işleminin ardından karışım 5 dakika daha sonike edildi. Diklorometanı uzaklaştırmak için çeker ocağın altında 4 saat karıştırılmaya bırakıldı. Diklorometan uçurulduktan sonra 14000 rpm'de 45 dakika +4°C'de santrifüjlendi. Yıkama işlemi 3 kez tekrar edildi. Süpernatantlar enkapsülasyon etkinliğinin belirlenmesinde kullanılmak üzere bir falkona toplandı. Son yıkama işleminin ardından zeta-sizer ile boyut ve zeta potansiyel analizi yapıldı. Elde edilen nanopartiküller liyofilizatör ile 24 saat kurutuldu ve deneylerde kullanılmak üzere buzdolabında muhafaza edildi.

3.2.3 Farklı Formülasyonları İçeren Polikaprolakton Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu

5-Fluorourasil yüklü PCL nanopartikülleri (5Fu-PCL), Timokinon yüklü PCL nanopartikülleri (TQ-PCL), 5-Fluorourasil ve Timokinon yüklü PCL nanopartikülleri (5Fu-TQ-PCL) ve boş PCL nanopartikülleri farklı yöntemler ve cihazlar kullanılarak karakterize edildi. Zeta boyut ve zeta potansiyel ölçümleri Zeta-Sizer cihazı, görüntülemeleri ise taramalı elektron mikroskobu kullanılarak gerçekleştirildi. 5-Fluorourasil ve Timokinon'un PCL nanopartiküllerine enkapsülasyonu ise Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi kullanılarak nanopartiküllerin belirli dalga boyları aralığında spektrumları alınarak ve bağ titreşimleri karşılaştırılarak analiz edildi. Ayrıca sentezlenen PCL nanopartiküllerinin reaksiyon verimi ve enkapsülasyon etkinliği de belirlendi. Bütün bu yöntemlerle karakterize edilen nanopartiküllerin, UV-Vis Spektrofotometre kullanılarak salım profilleri de çıkarıldı.

3.2.3.1 Zeta Sızer ile Boyut ve Zeta-Potansiyel Analizi

Nanopartiküllerin, Yıldız Teknik Üniversitesi, Kimya-Metalurji Fakültesi, Biyomühendislik bölümü KMC-306 no'lu laboratuvarda bulunan Malvern Instruments ZetaSizer cihazı ile boyut ve zeta potansiyel ölçümleri tamamlandı. Her bir ölçümde ayrı ayrı 1 mL'lik eppendorflarda 995 µl distile su ve 5 µl nanopartikül içerecek şekilde örnekler hazırlandı. ZetaSizer ile boyut ve zeta potansiyelleri 3 tekrarlı olarak ölçüldü.

3.2.3.2 Nanopartiküllerin Liyofilizasyonu

Boyut analizi sonrası 15 mL'lik falkonlarda -40°C'de dondurulan nanopartiküller 24 saat boyunca liyafilizatörde -60 °C'de vakumlu alanda yüksek basınç altında kurutuldu.

3.2.3.3 Taramalı Elektron Mikroskobu Analizi

Nanopartiküllerin yüzey özellikleri, şekil ve boyutları FEI QUANTA 450 FEG Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile incelendi. Yalıtkan numunelerin SEM görüntülemesi yapılabilmesi için altın-paladyum gibi iletken maddelerle

kaplanması gerçekleştirilir ve ardından vakumlu ortamda, yüksek voltaj argon gazının iyonize olması sağlanır, bu iyonlar altın-paladyum atomlarını koparır ve bu kopan atomlar numuneleri homojen bir şekilde kaplanmasını sağlamaktadır. Bu amaçla, karbon bant üzerine, liyofilize edilmiş nanopartiküller yerleştirildi, yüksek vakum altında altın ile kaplandı ve 5 ve 7 kV'da farklı büyütmelerde nanopartiküllerin görüntülemesi gerçekleştirildi.

3.2.3.4 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi Analizi

Etken maddelerin nanopartiküllere enkapsülasyonunun incelenmesi amacıyla 5-Fluorourasil, Timokinon, boş PCL ve etken madde yüklü PCL nanopartikülleri FT-IR spektrofotometre cihazında 4000-1200 cm-1 aralığında ölçümler alınarak belirlendi.

3.2.3.5 Reaksiyon Veriminin Belirlenmesi

Reaksiyon verimi aşağıdaki denklemi kullanarak, liyofilizasyon işlemini sonrası elde edilen nanopartikül miktarının reaksiyona giren toplam madde (polikaprolakton, 5-Fluorourasil ve Timokinon) miktarına oranıyla belirlendi.

$$\text{Reaksiyon Verimi (\%)} = \frac{\text{Elde edilen nanopartikül miktarı}}{\text{Başlangıçta kullanılan toplam madde miktarı}} \text{ x } 100 \qquad (3.1)$$

3.2.3.6 Enkapsülasyon Etkinliğinin Belirlenmesi

5-Fluorourasil ve/veya Timokinon enkapsüle PCL nanopartiküllerinin enkapsülasyon etkinliği aşağıdaki denklem kullanılarak belirlendi. Enkapsüle edilen etken madde miktarını belirlemek için öncelikle her bir etken madde için absorbans, madde miktarı ilişkisini gösteren kalibrasyon eğrileri oluşturuldu. Ardından nanopartiküllerin yıkama işlemleri sırasında toplanan süpernatantlardan 1 ml alınıp 20 dakika 1400 rpm hızında santrifüj edildi ve UV cihazında uygun dalga boylarında ölçümler alınarak enkapsüle edilen etken madde miktarları belirlendi.

$$\text{Enkapsülasyon Etkinliği Verimi (\%)} = \frac{\text{Enkapsüle edilen etken madde miktarı}}{\text{Başlangıçta kullanılan etken madde miktarı}} \text{ x } 100 \qquad (3.2)$$

3.2.3.7 Farklı Formülasyonları İçeren Polikaprolakton Nanopartiküllerinin *In Vitro* Salımı

Enkapsüle edilmiş 5-Fluorourasil ve Timokinon PCL nanopartiküllerinden salım profillerini incelemek amacıyla 10 mg nanopartikül tartıldı ve 3 mL PBS içerisinde 37 °C'de 130 rpm karıştırma hızında çalkalamalı inkübatörde 670 saat boyunca bırakıldı. Belirlenen zaman aralıklarında 1'er mL örnek alındı. 14000 rpm hızında 20 dakika santirifüj edildi ve süpernatant UV-Vis spektrofotometre ile uygun dalga boyunda absorbans değeri belirlendi. Her alınan 1 mL örnek için inkübatördeki örneğe 1 mL yeni PBS eklendi. 5-Fluorourasil ve Timokinon için çıkarılan kalibrasyon eğrileri kullanılarak salım profilleri oluşturuldu.

3.2.4 5-Fluorourasil ve/veya Timokinon İçeren Polikaprolakton Nanopartiküllerinin Hücre Hatları Üzerinde MTT yöntemi ile Toksisitelerinin Tayini ve Toksik Olmayan Konsantrasyonların Belirlenmesi

5-Fluorourasil ve Timokinon, 5Fu-PCL, TQ-PCL, 5Fu-TQ-PCL ve PCL nanopartiküllerinin, ISO-9001 kalite standartına göre toksisiteleri L929 normal sağlıklı fare fibroblast hücreleri üzerinde, antikanser etkinliği ise AGS mide kanseri hücre hatlarında incelendi. Sitotoksisite analizleri için vücuttaki sağlıklı hücrelerle nanopartiküllerin etkileşimi incelemek için fibroblast hücre hattı seçildi. Ayrıca, mide kanseri tedavisinde kullanılması amaçlanan nanopartiküllerin, sitotoksisite çalışmalarında mide kanseri hücre hattı kullanıldı.

3.2.4.1 5-Fluorourasil-Timokinon ve Farklı Formülasyonları İçeren Polikaprolakton Nanopartiküllerinin L929 Hücre Hattında Toksisitelerinin MTT Yöntemi ile İncelenmesi

L929 Hücre Hattının Kültürü ve Karakterizasyonu

Sitotoksisite deneylerinde Yıldız Teknik Üniversitesi, Kimya-Metalurji Fakültesi, Biyomühendislik bölümü, Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği laboratuvarındaki sıvı azot tankında bulunan L929 Fare Fibroblast Hücre Hattı kullanıldı.

L929 Hücre Hattının Kriyobanktan Çıkarılması ve Kültürü

Kriyobanktan çıkarılan hücreler kriyotüpler içerisinde 37°C'de su banyosunda çözdürüldü. %10 FBS içeren DMEM-F12 besiyerine aktarıldı, 1000 rpm hızında 5 dakika santrifüjlendi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Hücrelerin yer aldığı pelletin üzerine 5 mL %10 FBS içeren DMEM-F12 besiyeri eklendi ve T25'lik flasklara hücrelerin ekimi gerçekleştirildi. Hücreler invert mikroskopta 24 saatte bir incelendi.

L929 Fibroblast Hücrelerinin Sayımı

Sayım için öncelikle L929 Fibroblast hücreleri flasktan kaldırıldı ve 1000 rpm hızında 5 dakika santrifüjlendi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve pelletin üzerine 1 mL besiyeri eklenerek hücreler kaldırıldı. Eppendorf tüpüne 48 µl PBS, 50 µl tripan mavisi boyası ve 2 µl hücre alındı ve pipetaj yapıldı. Thoma lamının iki tarafına hazırlanan süspansiyondan 10'ar µl konuldu ve mikroskopta sayım gerçekleştirildi. 1 mL içerisindeki hücre sayısını hesaplamak için aşağıdaki denklem kullanıldı.

Hücre sayısı (1 ml) = Sulandırma oranı x Sayılan hücre sayısı x Thoma Lamı Sabiti (10,000)

Sayılan ortalama hücre sayısı: Thoma lamında sayılan 16 karedeki canlı hücrelerin aritmetik ortalamasıdır

Sulandırma oranı: Ependorfta sulandırılmış pelletin sulandırma katsayısı

Thoma lamı sabiti: 10 000

Boş PCL, 5Fu-PCL, TQ-PCL ve 5Fu-TQ-PCL nanopartiküllerinin (500 – 25 µg/mL) sitotoksisiteleri L929 hücreleri üzerinde incelendi. Öncelikle 96'lık well platede her bir kuyuda 100 µl besiyeri içerisinde 10^4 sayıda hücre olacak şekilde makrofajların ekimi gerçekleştirildi ve 1 gün 37°C'de %5 CO_2 içeren etüvde inkübe edildi. 24 saatin ardından kuyucuklardaki hücreler invert mikroskopta incelendi, belirtilen formülasyonlar hücrelere verildi ve 24, 48 ve 72 saat inkübe edildi. Daha sonra MTT solüsyonundan her bir kuyucuğa 10 µl eklendi ve 4 saat 37°C etüvde inkübe edildi. Mikroskopta formazan kristallerinin oluşumu incelendi. Her bir kuyucuğa 100 µl DMSO eklendi ve oluşan kristallerin çözünmesi için 30 dakika karanlık ortamda plate bekletildi. ELISA plaka okuyucu ile 570 nm'de ölçüm alındı.

3.2.4.2 5-Fluorourasil-Timokinon ve Farklı Formülasyonları İçeren Polikaprolakton Nanopartiküllerinin AGS Mide Kanseri Hücre Hattında Toksisitelerinin MTT Yöntemi ile İncelenmesi

Sitotoksisite deneylerinde Yıldız Teknik Üniversitesi, Kimya-Metalurji Fakültesi, Biyomühendislik bölümü, Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği laboratuvarındaki sıvı azot tankında bulunan AGS mide kanseri hücre hattı kullanıldı.

AGS Mide Kanseri Hücre Hattının Kriyobanktan Çıkarılması ve Kültürü

Kriyobanktan çıkarılan hücreler kriyotüpler içerisinde 37°C'de su banyosunda çözdürüldü. %10 FBS içeren DMEM F-12 besiyerine aktarıldı, 1000 rpm hızında 5 dakika santrifüjlendi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Hücrelerin yer aldığı pelletin üzerine 5 mL %10 FBS içeren DMEM F-12 besiyeri eklendi ve T25'lik flasklara hücrelerin ekimi gerçekleştirildi. Hücreler invert mikroskopta 24 saatte bir incelendi.

AGS hücrelerinin pasajı için besiyeri flasktan uzaklaştırıldı ve PBS ile yıkama yapıldı. Flaska 1 mL tripsin solüsyonu eklendi ve 5 dakika etüvde inkübe edildi. Mikroskopta hücrelerin flasktan ayrılması görüntülendi. Flaska 4 mL DMEM-F12 besiyerini ilave edildi ve pipetaj yapılarak hücreler flasktan alınarak falkona aktarıldı ve 1000 rpm hızında 5 dakika santrifüjlendi. Ardından Thoma lamında deneyler için hücre sayımı yapıldı.

AGS Mide Kanseri Hücrelerinin Sayımı

Sayım için flasktan kaldırılan AGS hücreleri 1000 rpm hızında 5 dakika santrifüjlendi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve falkonda kalan pelletin üzerine 1 mL DMEM-F12 besiyeri eklenerek hücreler yeniden süspanse edildi. Eppendorf tüpüne 48 µl besiyeri, 50 µl tripan mavi boya ve 2 µl hücre ilave edilerek pipetaj yapıldı. Thoma lamının her iki tarafına hazırlanan süspansiyondan 10'ar µl konuldu ve mikroskopta sayım gerçekleştirildi. 1 mL içerisindeki hücre sayısını hesaplamak için aşağıdaki denklem kullanıldı.

Hücre sayısı (1 ml) = Sulandırma oranı x Sayılan hücre sayısı x Thoma Lamı Sabiti (10,000)

Sayılan ortalama hücre sayısı: Thoma lamında sayılan 16 karedeki canlı hücrelerin aritmetik ortalamasıdır

Sulandırma oranı: Ependorfta sulandırılmış pelletin sulandırma katsayısı

Thoma lamı sabiti: 10 000

Serbest Timokinon, Serbest 5-Fluorourasil, boş PCL, 5Fu-PCL, TQ-PCL ve 5Fu-TQ-PCL nanopartiküllerinin (500 – 25 µg/mL) antikanser etkinliklerinin ve incelenmesi için MTT yöntemi uygulandı. Öncelikle her bir etken için 500 – 25 µg/mL arasında konsantrasyona sahip formülasyonlar hazırlandı. Formülasyonlar, DMEM-F12 besiyeri içerisinde çözdürülerek hazırlandı. 96 kuyucuklu plakaya her bir kuyuda 100 µl besiyeri içerisinde 10^4 sayıda hücre olacak şekilde hücrelerim ekimi gerçekleştirildi ve 1 gün 37°C'de %5 CO2 içeren etüvde inkübe edildi. 24 saatin ardından kuyucuklardaki hücreler invert mikroskopta incelendi, belirtilen formülasyonlar hücrelere verildi ve 24, 48 ve 72 saat inkübe edildi. Daha sonra MTT solüsyonundan her bir kuyucuğa 10 µl eklendi ve 4 saat 37°C etüvde inkübe edildi. Mikroskopta formazan kristallerinin oluşumu incelendi. Her bir kuyucuğa 100 µl DMSO eklendi ve oluşan kristallerin çözünmesi için plaka, 30 dakika karanlık ortamda bekletildi. ELISA plaka okuyucu ile 570 nm'de ölçüm alındı.

4
DENEYSEL SONUÇLAR

4.1 L929 Fare Fibroblast Hücrelerinin Kültürü

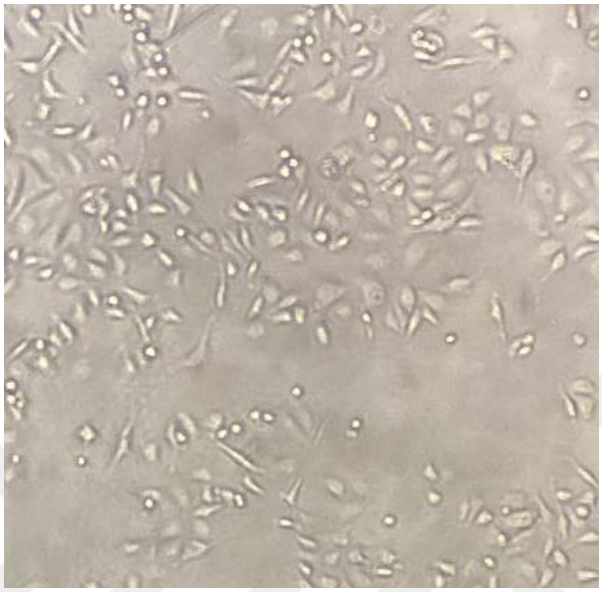
Yıldız Teknik Üniversitesi, Kimya-Metalurji Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Hücre kültürü ve Doku Mühendisliği Labooratuvarında bulunan kriyobanktan çıkarılan L929 hücreleri 37 ^{o}C'de su banyosunda çözdürüldü ve 1200 rpm'de 5 dk santrifüjlendi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve hücre pellet filtreli T25'lik flaska 5 ml %10 FBS içeren DMEM-F12 besiyeri ile ekildi. Hücrelerin proliferasyonu ve morfolojisi düzenli olarak ters mikroskop ile incelendi. Kültürün 7. gününde Şekil 4.1'de olduğu gibi hücrelerin normal şekilde prolifere olduğu, homojen yayılma gösterdiği, parlak ve canlı olduğu belirlendi.

Şekil 4.1 L929 Fibroblast hücrelerinin görüntüsü (10X)

4.2 AGS Mide Kanseri Hücre Kültürü

Yıldız Teknik Üniversitesi, Kimya-Metalurji Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Hücre kültürü ve Doku Mühendisliği Labooratuvarında bulunan kriyobanktan çıkarılan AGS hücrelerinin kültürü %10 FBS içeren DMEM F12 besiyerinde gerçekleştirildi. Her 24 saatte bir hücrelerin morfolojisi ve proliferasyonu invert

mikroskopta incelendi. Kültürün 4. gününde hücrelerin kültür flaskının tabanında homojen yayılma göstererek prolifere olduğu invert mikroskopta gözlemlendi. Şekil 4.2'de invert mikroskopta (10X büyütme) incelenen hücreler canlı ve parlak görünüme sahipti.

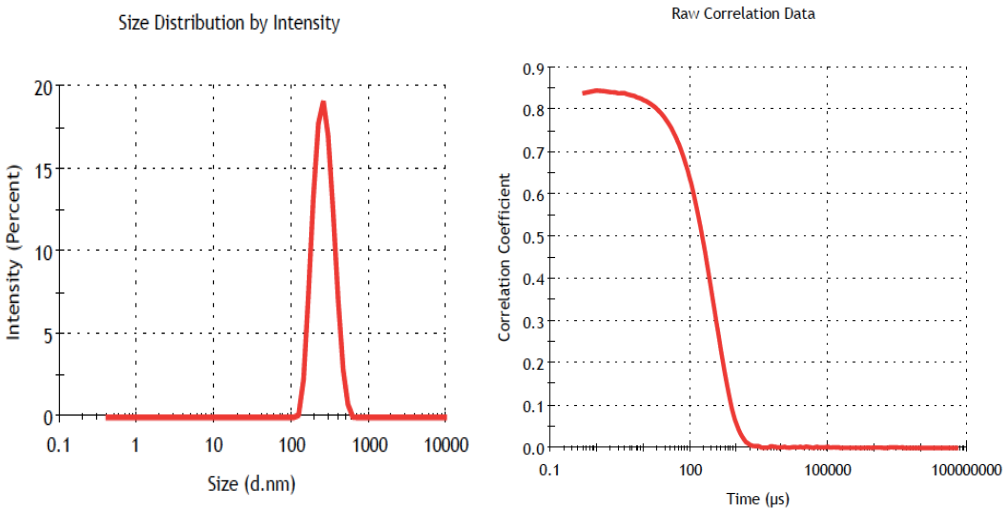


Şekil 4.2 AGS mide kanseri hücrelerinin görüntüsü (10X)

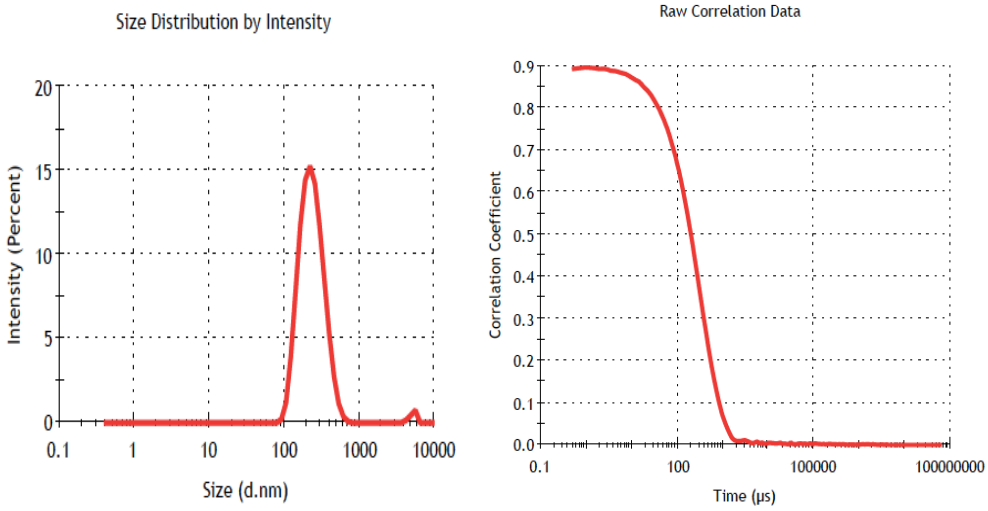
4.3 Farklı Formülasyonları İçeren Polikaprolakton Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu

4.3.1 Polikaprolakton Nanopartiküllerinin Boyut Analizi

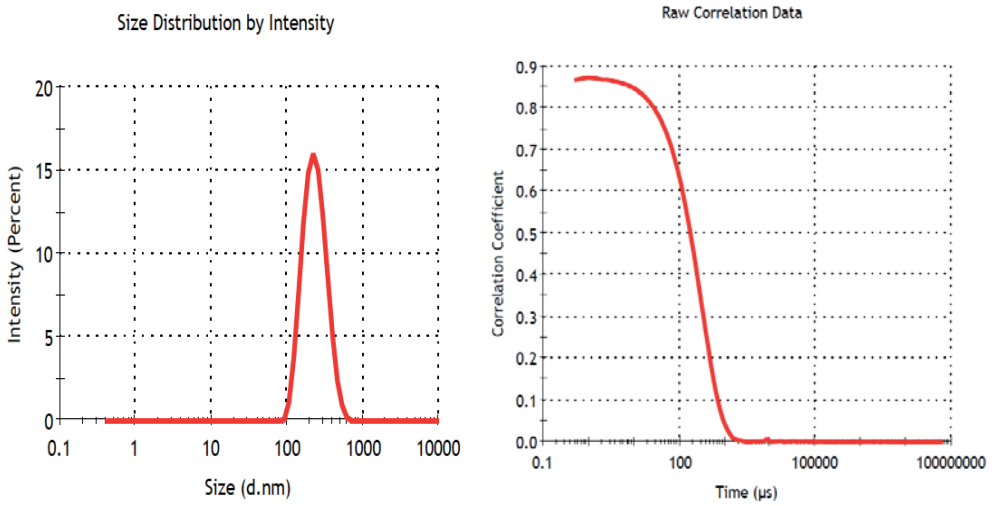
Boş PCL, Timokinon enkapsüle PCL, 5-Florourasil enkapsüle PCL ve Timokinon ve 5-Florourasil enkapsüle PCL nanopartikülerinin dinamik ışık saçılması yöntemi ile ölçülen boyut dağılım grafikleri Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'da verildi. Sentezlenen nanopartiküllerin boyutlarının ortalamaları boş PCL nanopartikülleri için 246,6 nm; Timokinon enkapsüle PCL nanopartikülleri için 215,4 nm; 5-Florourasil enkapsüle PCL nanopartikülleri için 226,0 nm ve 5-Florourasil ve Timokinon enkapsüle PCL nanopartikülleri için 221,1 nm olarak ölçüldü. Boş PCL, 5-Florourasil enkapsüle PCL, Timokinon enkapsüle PCL ve 5-Florourasil ve Timokinon enkapsüle PCL nanopartikülerinin çoklu dağılım indisi değerleri ise sırasıyla ortalama 0,067; 0,182; 0,102 ve 0,129 olarak ölçülmüştür.



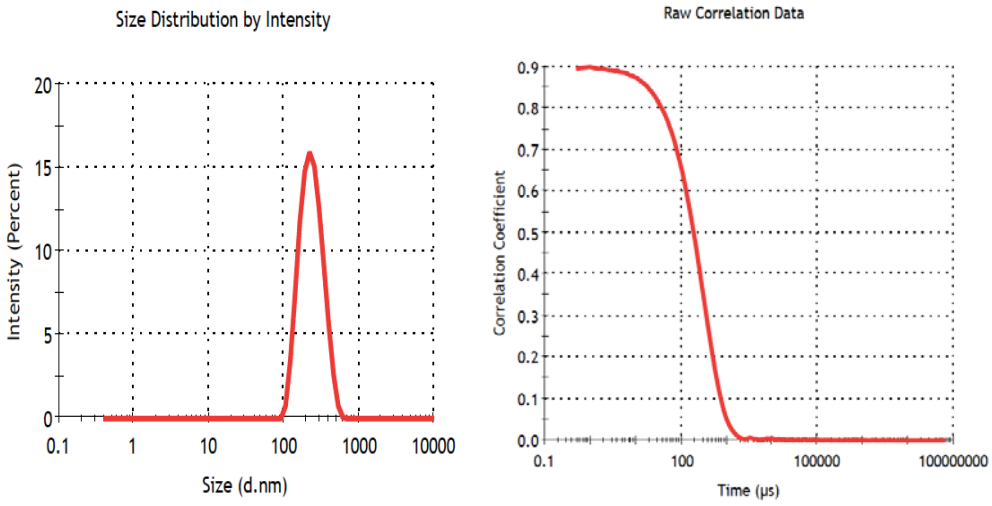
Şekil 4.3 Boş PCL nanopartiküllerinin Zeta-Sizer boyut dağılım grafiği



Şekil 4.4 5-Fu-PCL nanopartiküllerinin Zeta-Sizer boyut dağılım grafiği



Şekil 4.5 TQ-PCL nanopartiküllerinin Zeta-Sizer boyut dağılım grafiği



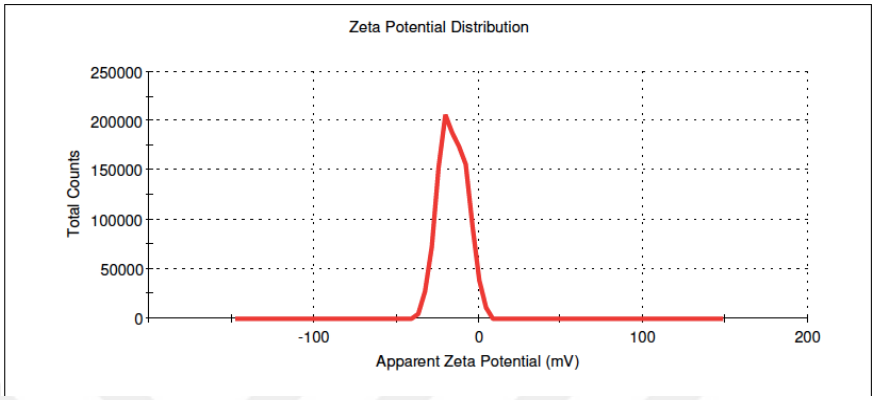
Şekil 4.6 5-Fu-TQ-PCL nanopartikülerinin Zeta-Sizer boyut dağılım grafiği

4.3.2 Polikaprolakton Nanopartiküllerinin Zeta Potansiyel Analizi

Sentezlenen nanopartiküllerin zeta potansiyel değerleri elektroforetik ışık saçılması yöntemi ile ölçüldü ve Şekil 4.7, Şekil 4.8 Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da verildi. Sentezlenen nanopartiküllerin ortalama zeta potansiyelleri boş PCL nanopartikülleri için -15,6 mV; 5-Florourasil enkapsüle PCL nanopartikülleri için -

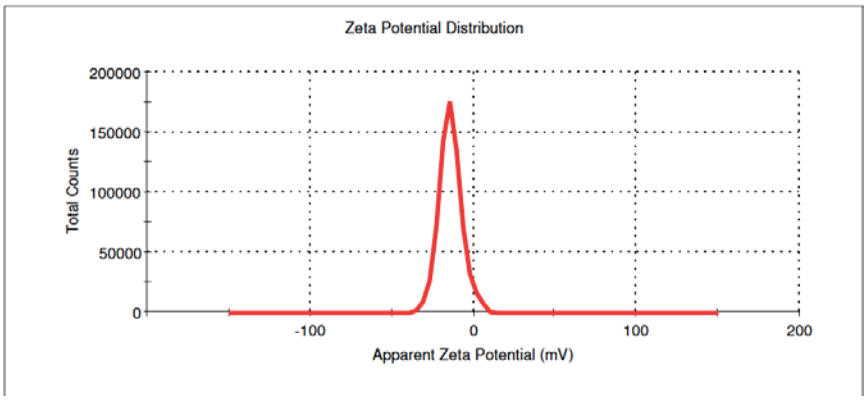
14,0 mV, Timokinon enkapsüle PCL nanopartikülleri için -15,3 mV ve 5-Florourasil ve Timokinon enkapsüle PCL nanopartikülleri için -13,4 mV olarak ölçüldü.

			Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV):	-15,6	Peak 1:	-15,6	100,0	8,27
Zeta Deviation (mV):	8,27	Peak 2:	0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm):	0,0115	Peak 3:	0,00	0,0	0,00
Result quality	Good				



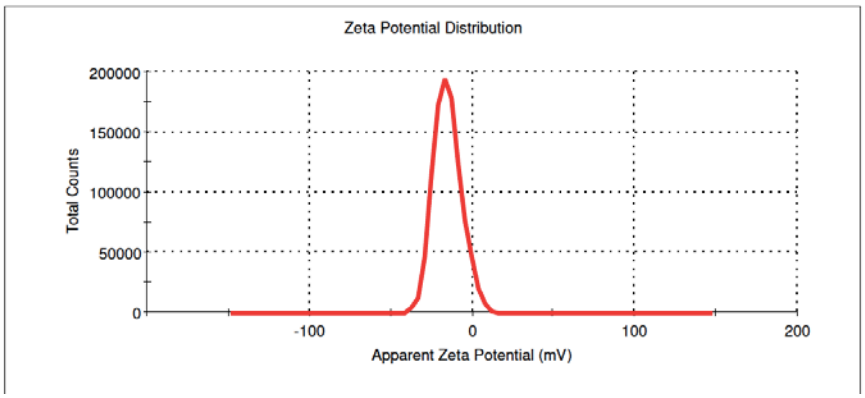
Şekil 4.7 Boş PCL nanopartiküllerinin Zeta-Sizer zeta potansiyel grafiği

			Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV):	-14,1	Peak 1:	-14,0	100,0	7,08
Zeta Deviation (mV):	6,81	Peak 2:	0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm):	0,0142	Peak 3:	0,00	0,0	0,00
Result quality	Good				



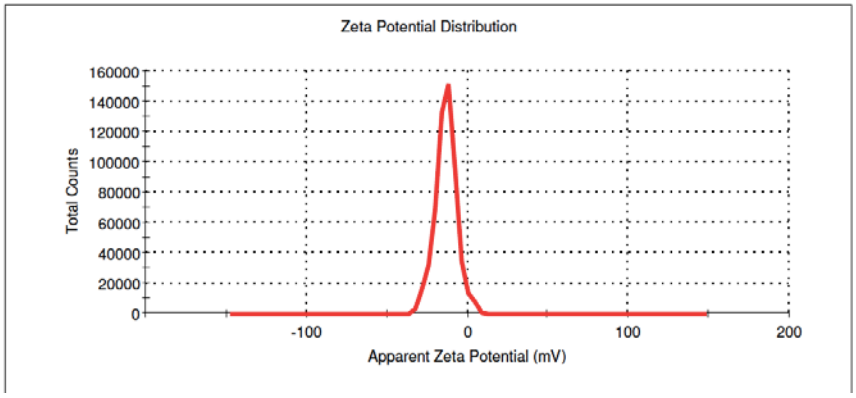
Şekil 4.8 5-Fu enkapsüle PCL nanopartiküllerinin Zeta-Sizer zeta potansiyel grafiği

		Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -15,3	Peak 1:	-15,3	100,0	8,42
Zeta Deviation (mV): 8,42	Peak 2:	0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,0119	Peak 3:	0,00	0,0	0,00
Result quality Good				



Şekil 4.9 TQ enkapsüle PCL nanopartiküllerinin Zeta-Sizer zeta potansiyel grafiği

		Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -13,4	Peak 1:	-13,4	100,0	6,69
Zeta Deviation (mV): 6,69	Peak 2:	0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,0138	Peak 3:	0,00	0,0	0,00
Result quality Good				

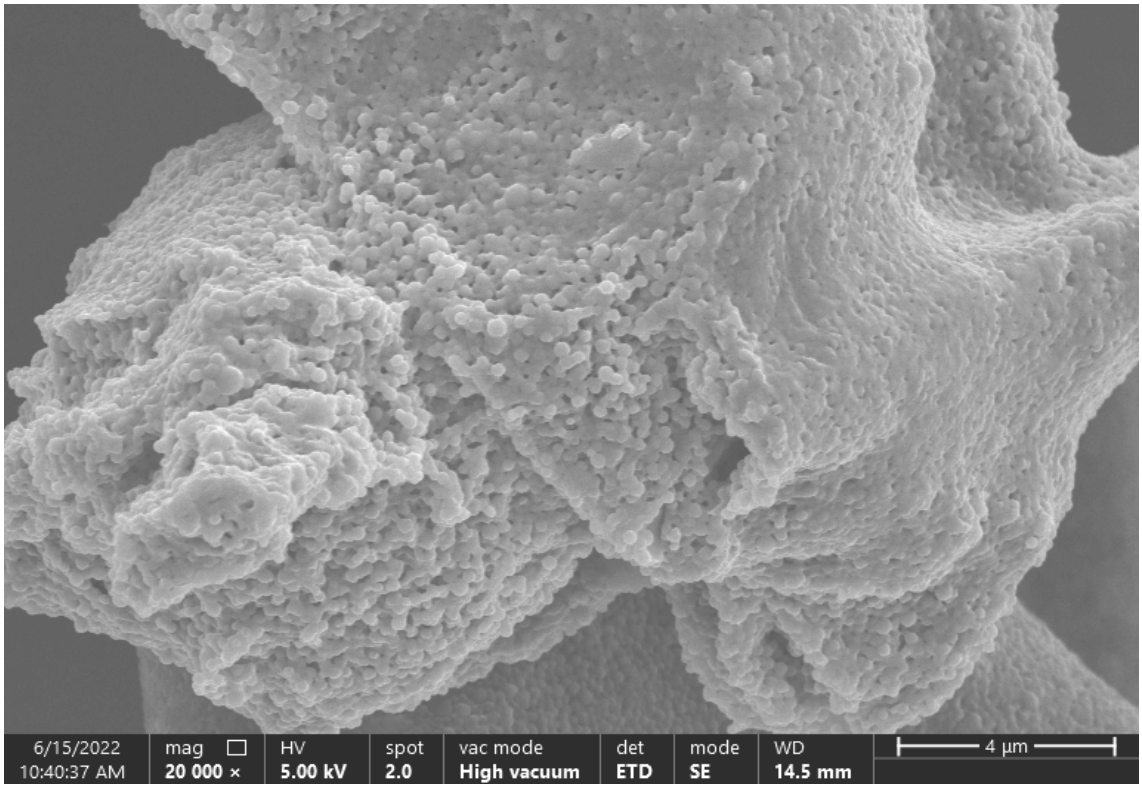


Şekil 4.10 5-Fu ve TQ enkapsüle PCL nanopartiküllerinin Zeta-Sizer zeta potansiyel grafiği

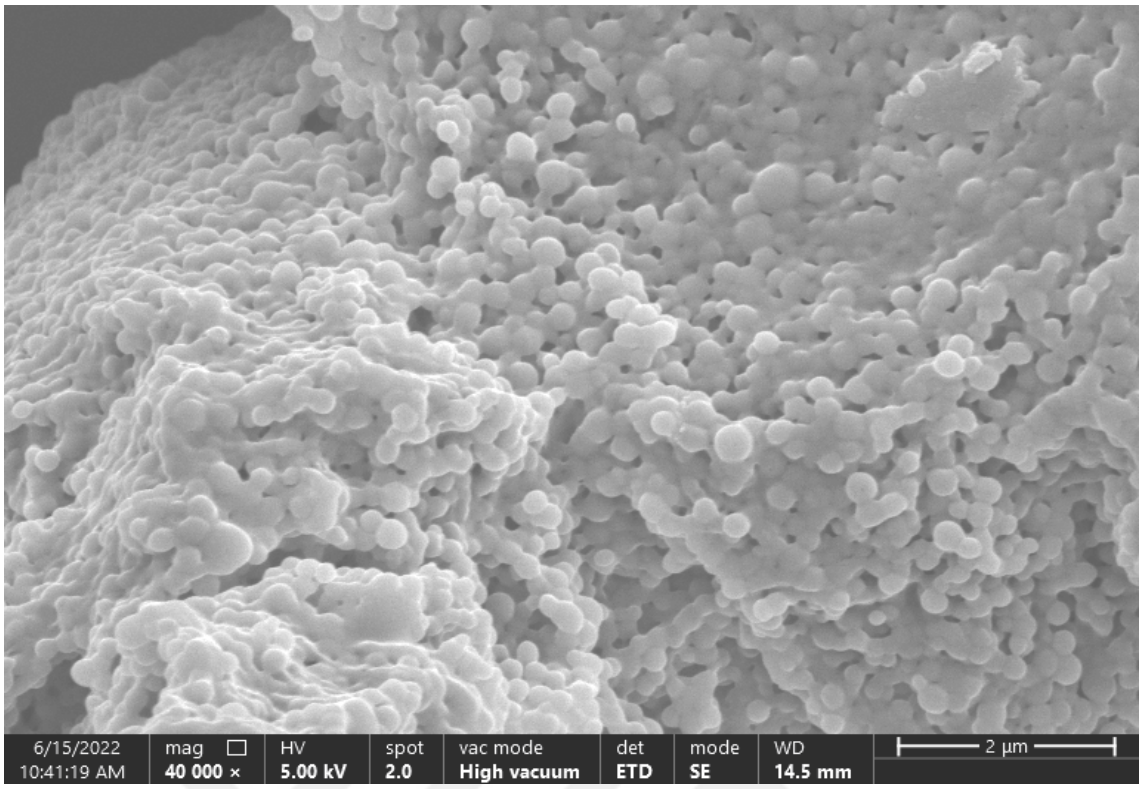
4.3.3 Polikaprolakton Nanopartiküllerinin Taramalı Elektron Mikroskobu ile Karakterizasyonu

Sentezlenen PCL nanopartiküllerinin taramalı elektron mikroskobu ile farklı büyütme oranlarındaki görüntüleri Şekil 4.11 - 4.22'de verilmiştir.

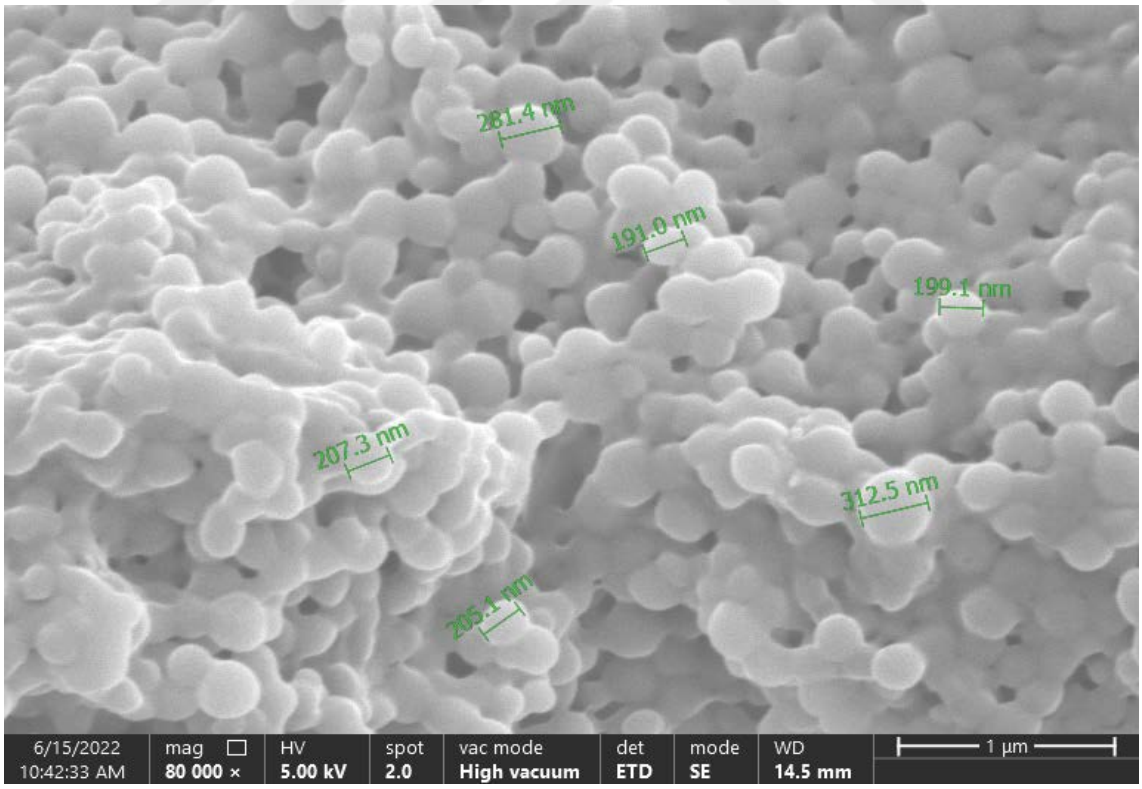
Nanopartiküllerin SEM görüntüleri incelendiğinde morfolojilerinin düzgün, pürüzsüz, küresel ve homojen boyut dağılımına sahip olduğu görüntülenmiştir. Ayrıca nanopartiküllerin yüzeylerinde herhangi bir etken madde görülmedi. Görüntüler Zetasizer boyut ölçümleriyle birbirini desteklemektedir.



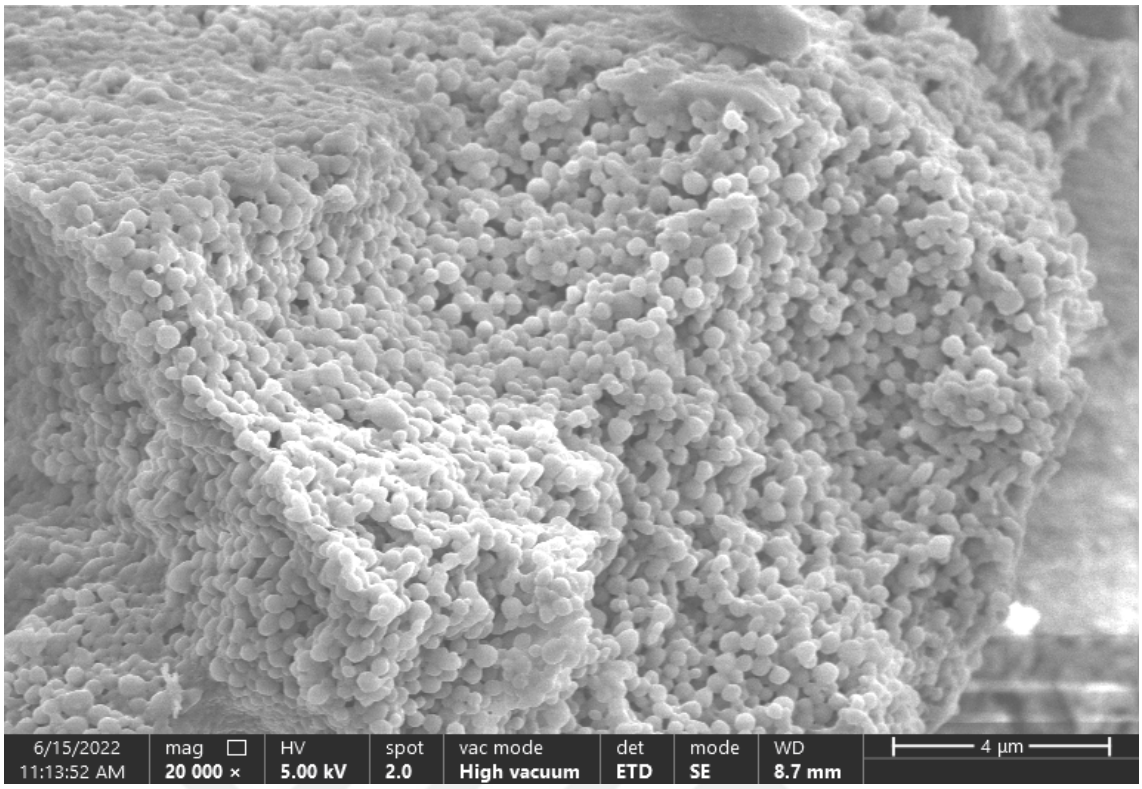
Şekil 4.11 PCL nanopartiküllerinin SEM görüntüsü (20.000X)



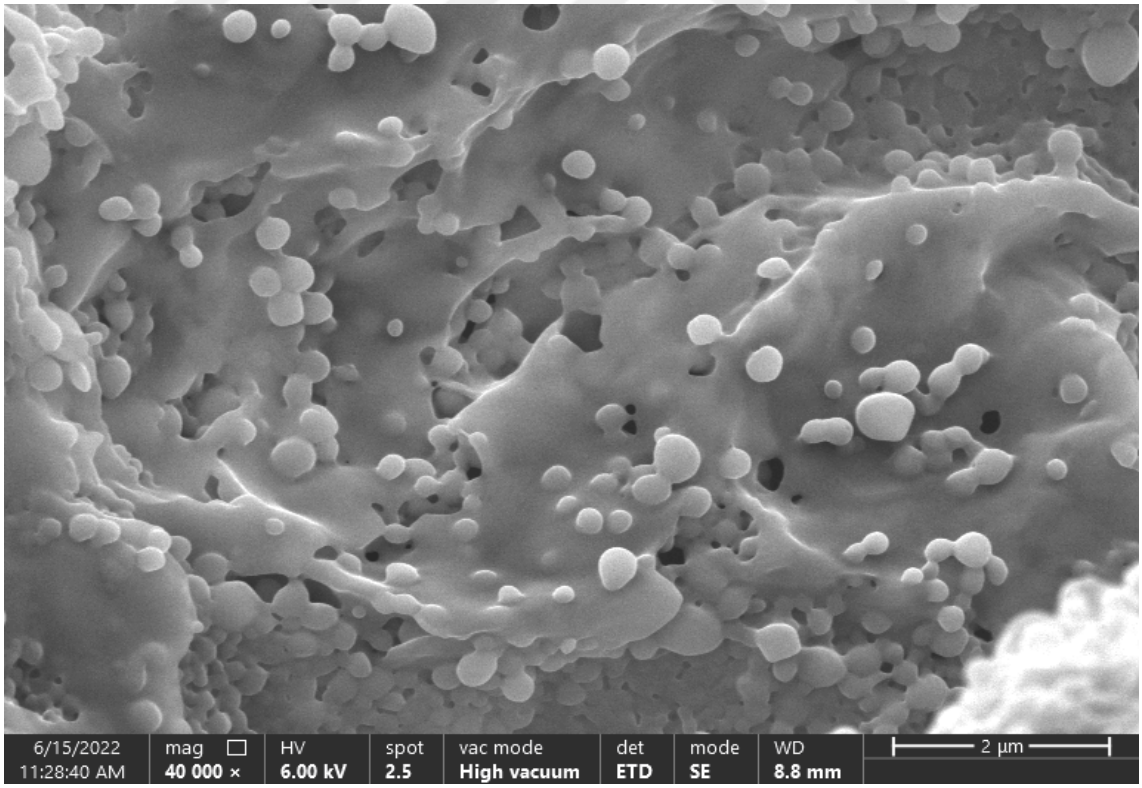
Şekil 4.12 PCL nanopartiküllerinin SEM görüntüsü (40.000X)



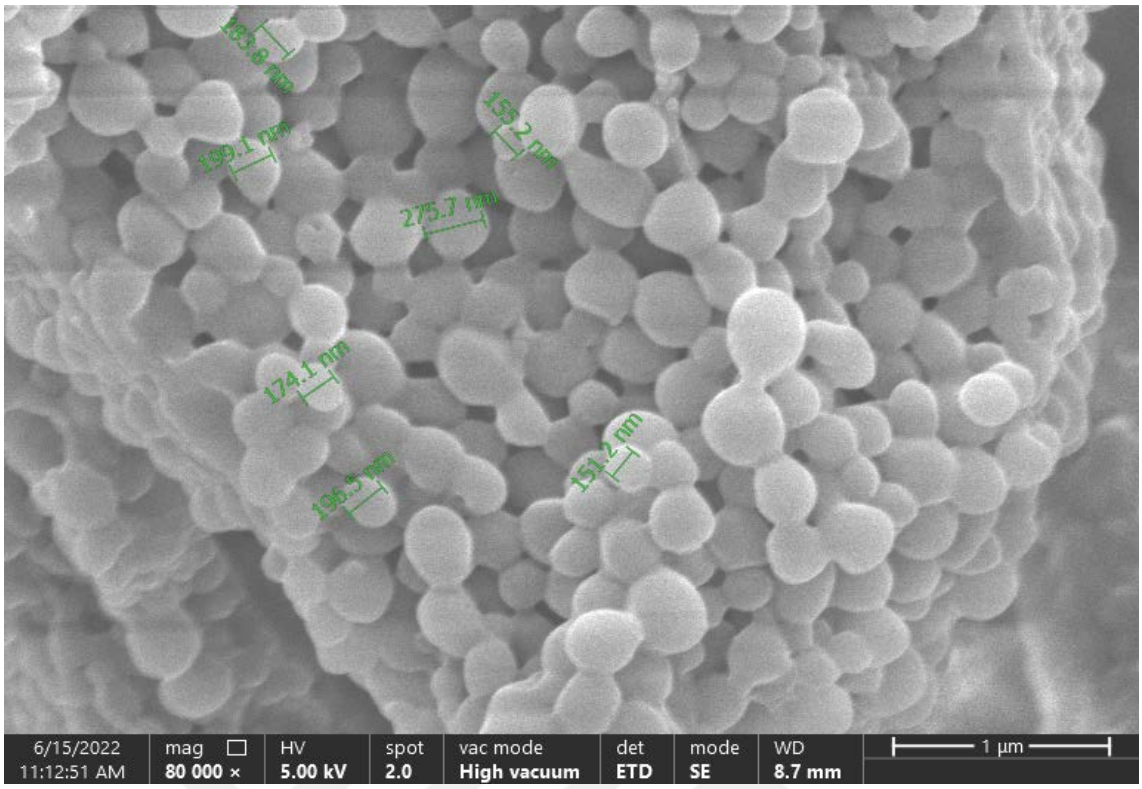
Şekil 4.13 PCL nanopartiküllerinin SEM görüntüsü (80.000X)



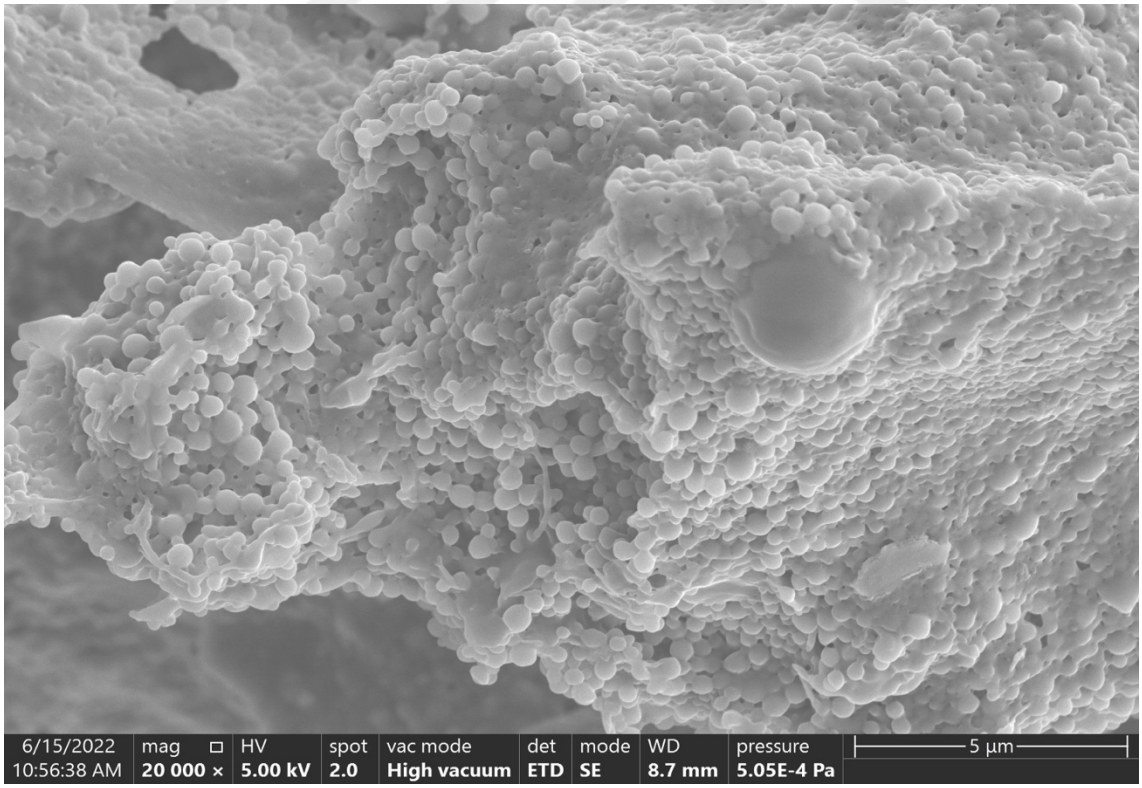
Şekil 4.14 5-Fu-PCL nanopartiküllerinin SEM görüntüsü (20.000X)



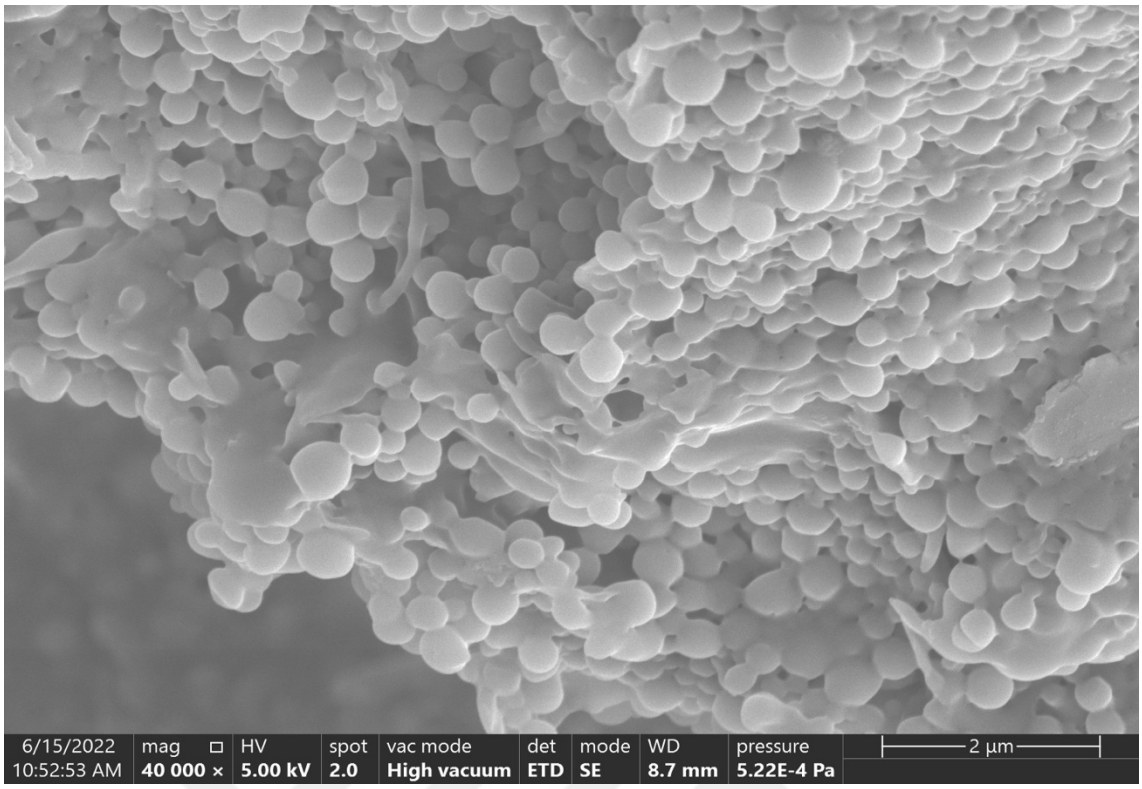
Şekil 4.15 5-Fu-PCL nanopartiküllerinin SEM görüntüsü (40.000X)



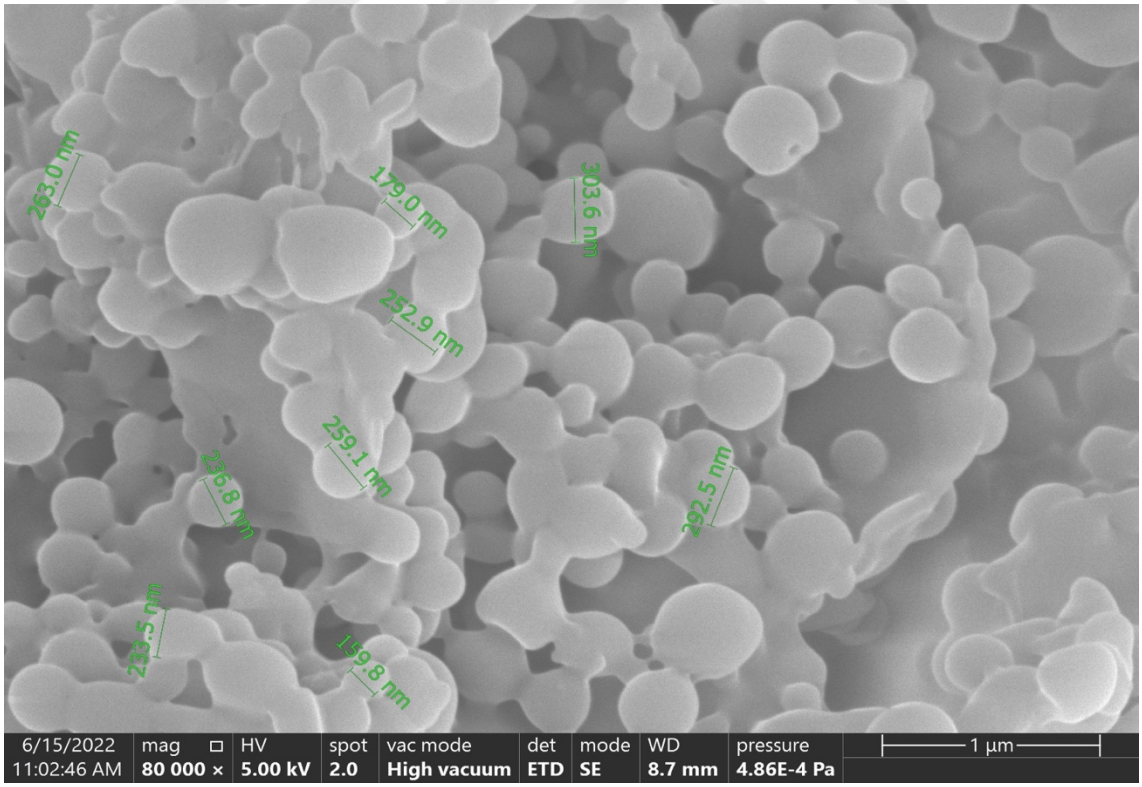
Şekil 4.16 5-Fu-PCL nanopartiküllerinin SEM görüntüsü (80.000X)



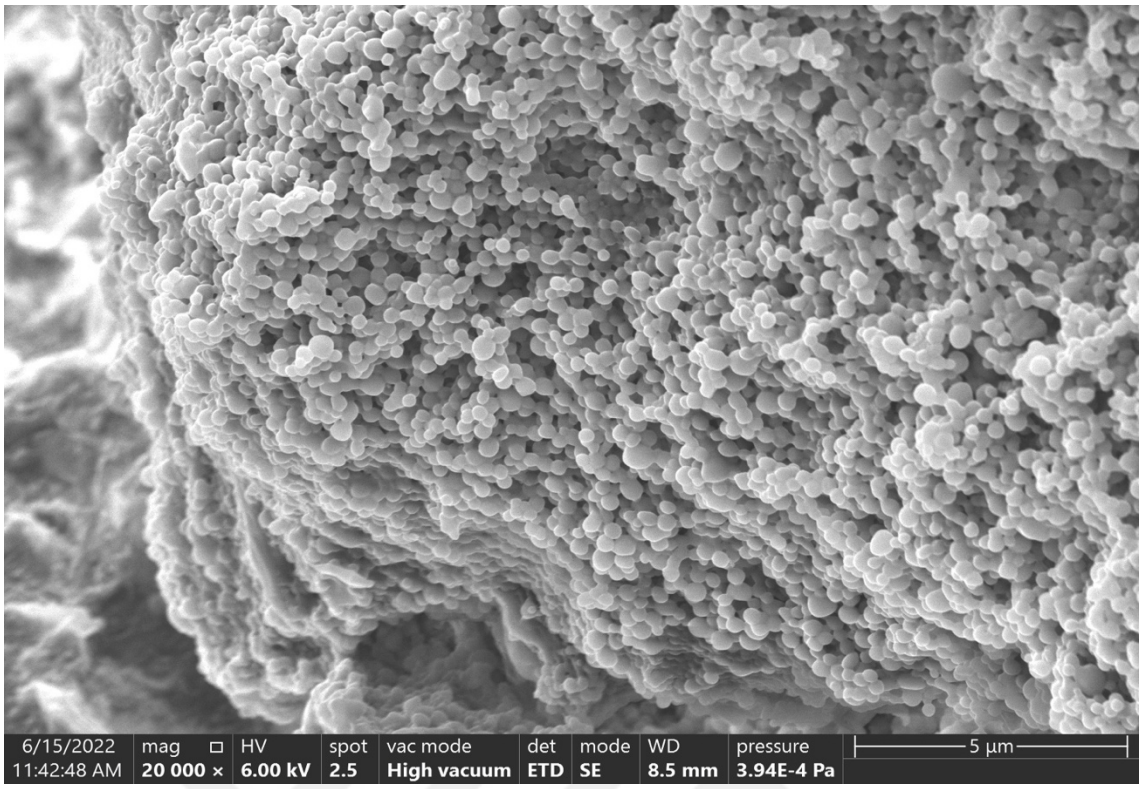
Şekil 4.17 TQ-PCL nanopartiküllerinin SEM görüntüsü (20.000X)



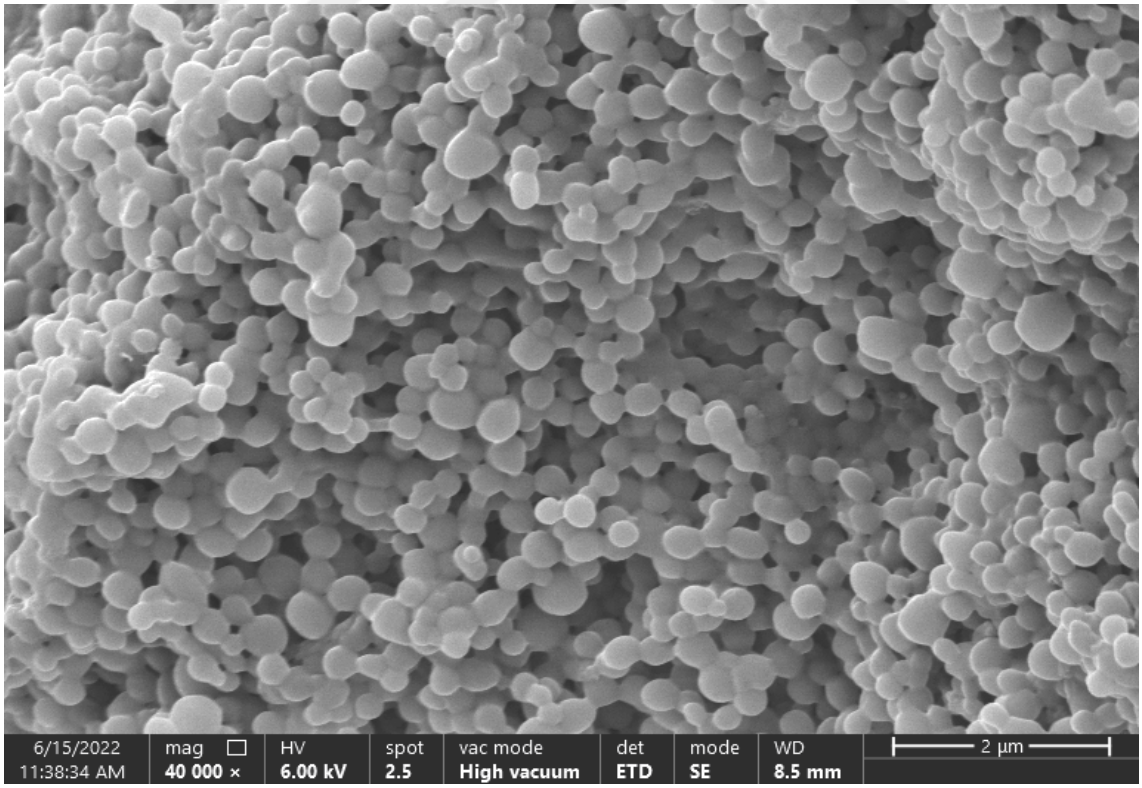
Şekil 4.18 TQ-PCL nanopartiküllerinin SEM görüntüsü (40.000X)



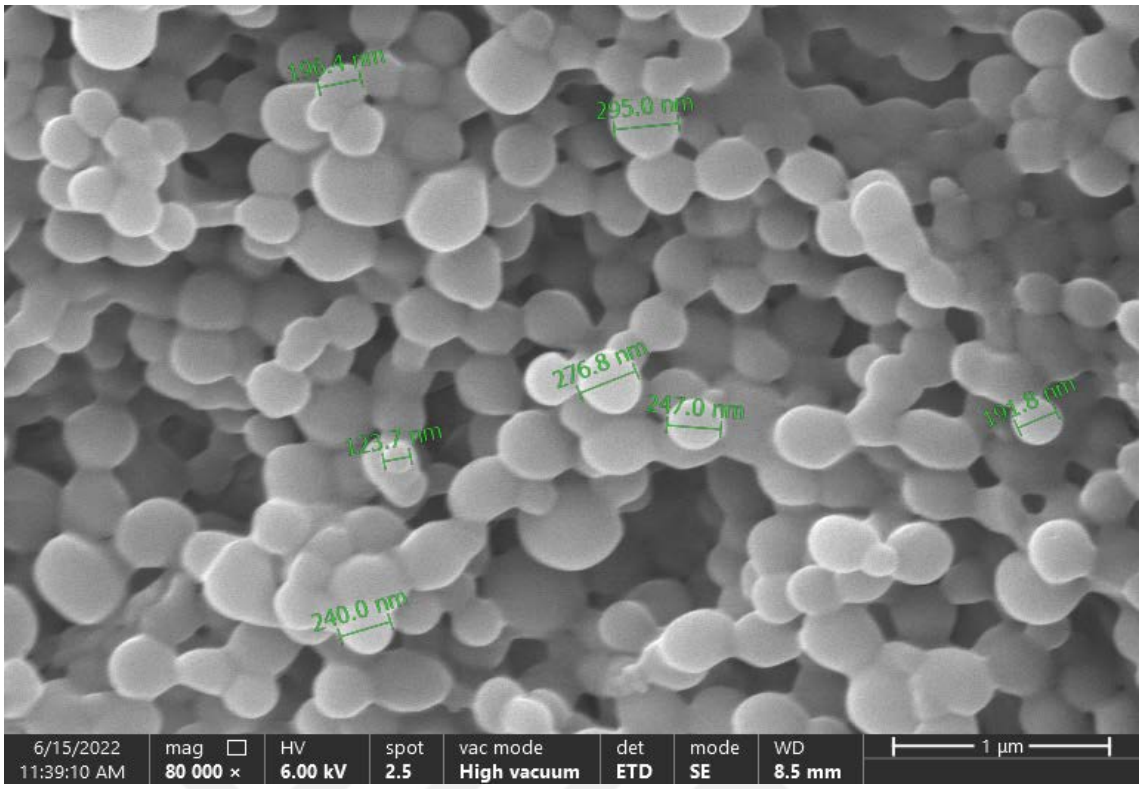
Şekil 4.19 TQ-PCL nanopartiküllerinin SEM görüntüsü (80.000X)



Şekil 4.20 5-Fu-TQ-PCL nanopartiküllerinin SEM görüntüsü (20.000X)



Şekil 4.21 5-Fu-TQ-PCL nanopartiküllerinin SEM görüntüsü (40.000X)



Şekil 4.22 5-Fu-TQ-PCL nanopartiküllerinin SEM görüntüsü (80.000X)

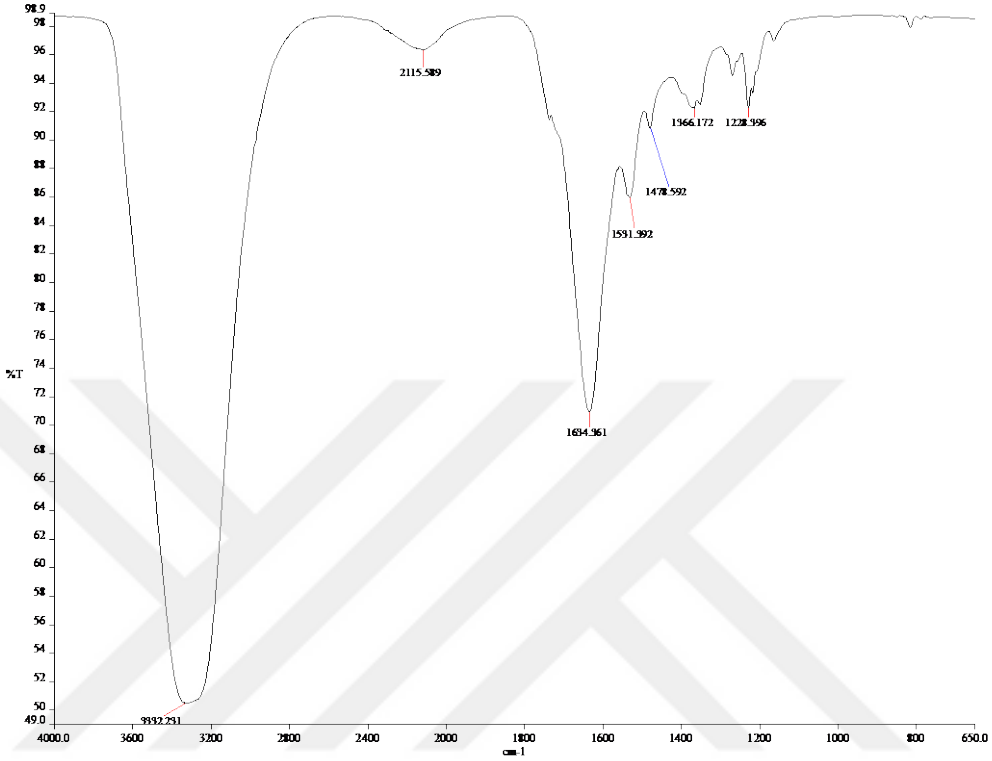
4.3.4 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi Analizi

5-Florourasil ve Timokinon'un PCL nanopartiküllerine enkapsülasyonunun incelenmesi amacıyla Timokinon, 5-Florourasil, boş PCL ve etken madde yüklü 5-Fu-PCL, TQ-PCL, 5-Fu-TQ-PCL nanopartiküllerinin Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrofotometre cihazında 4000-650 cm^{-1} aralığında spektrum ölçümleri gerçekleştirildi.

4.3.4.1 5-Florourasil FT-IR Spektrumu

5-Florourasil FT-IR spektrumu Şekil 4.23'de görülmektedir. Saf 5-FU'nun karakteristik bantları, imid gerilmesinin (amid II ve amid III) ve aromatik halkanın titreşiminden kaynaklanan 1722, 1430, 1246, 811 ve 551 cm^{-1}'de tespit edilir [134]. 1348 cm^{-1}'de pirimidin halkasının titreşimiyle ilişkili bir bant, 1181 cm^{-1}'da ise C=O titreşimlerinden kaynaklı bir bant 246 cm^{-1}'de ise C-N titreşimlerinden kaynaklı pikler görülür. Bizim ölçümüzdeki 3600-3000 cm^{-1} arasındaki geniş spektrumlu bant N-H gerilme titreşimlerinden, 1634.361, 1531.392, 1478.592, 811

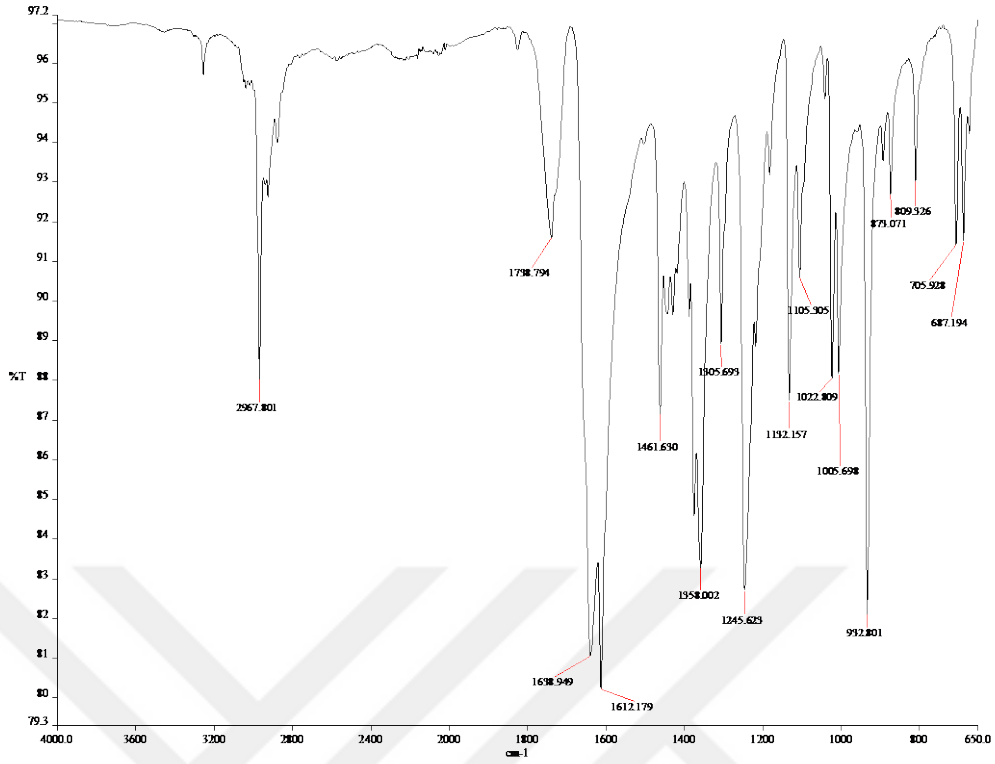
cm^{-1} imid gerilmesinin (amid II ve amid III) ve aromatik halkanın titreşiminden kaynaklanan bantlar, 1366.172 cm^{-1} pirimidin halka titreşiminden kaynaklanan bant, 1228,396 cm^{-1}'de görülen pik C=O titreşiminden kaynaklanır.



Şekil 4.23 Serbest 5-Fu FT-IR spektrumu

4.3.4.2 Timokinon FT-IR Spektrumu

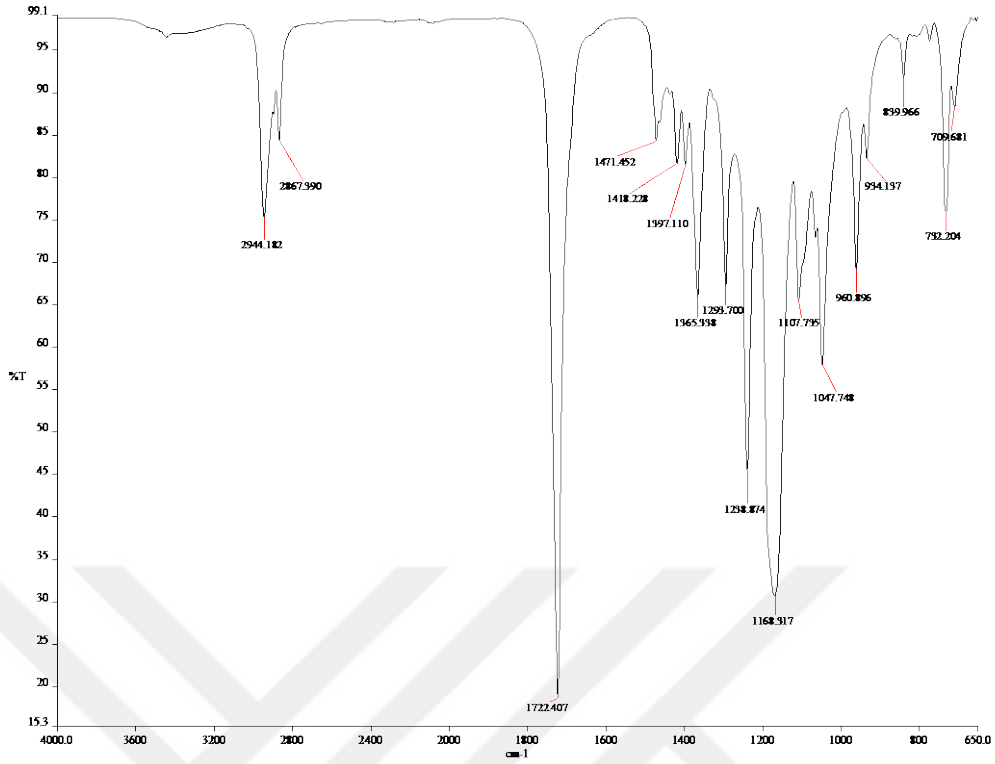
Timokinon için yapılan FTIR analizi sonucu Şekil 4.24'de görülmektedir. 2967.801 cm^{-1} 'de mevcut olan yoğun bant, alifatik grupların C-H gerilmesine karşılık gelir. Daha yüksek dalga boyunda (~3090 cm^{-1}) gözlemlenen zayıf piki ise, C=C-H gruplarındaki vinilik C-H'de gözlenen gerilmeden dolayıdır. 1650 cm^{-1} dalga boyunda sikloheksadienin karbonil bağına ve dolayısıyla timokinona has karakteristik güçlü esneme bandı 1638,949 cm^{-1} dalga boyunda gözlemlenmiştir. 1620-1640'lardaki bantların 1,4 sikloheksadiene uygun gelen orta derece kuvvetli bantın varlığı tespit edilmiştir [135].



Şekil 4.24 Serbest TQ FT-IR spektrumu

4.3.4.2 Boş PCL Nanopartiküllerinin FT-IR Spektrumu

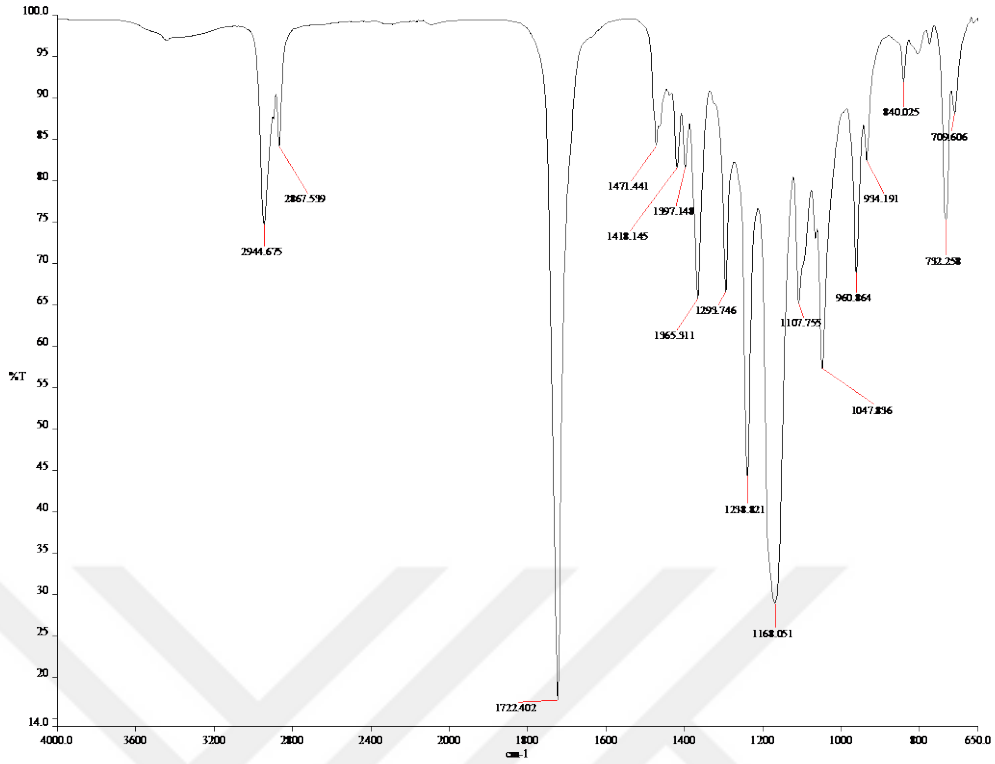
Boş PCL nanopartiküllerinin FT-IR spektrumu sonucu Şekil 4.25'de görülmektedir. 2870-2950 cm^{-1} arasında görülen karakteristik bantlar asimetrik CH_2 gerilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. 1722 cm^{-1} dalgaboyunda görülen bant karbonil gerilme titreşimlerini temsil etmektedir. 1490-1290 cm^{-1} arasındaki bantlar C-O ve C-C gerilme titreşimlerine aittir.



Şekil 4.25 Boş PCL nanopartikülü FT-IR spektrumu

4.3.4.3 5-Fu-PCL Nanopartiküllerinin FT-IR Spektrumu

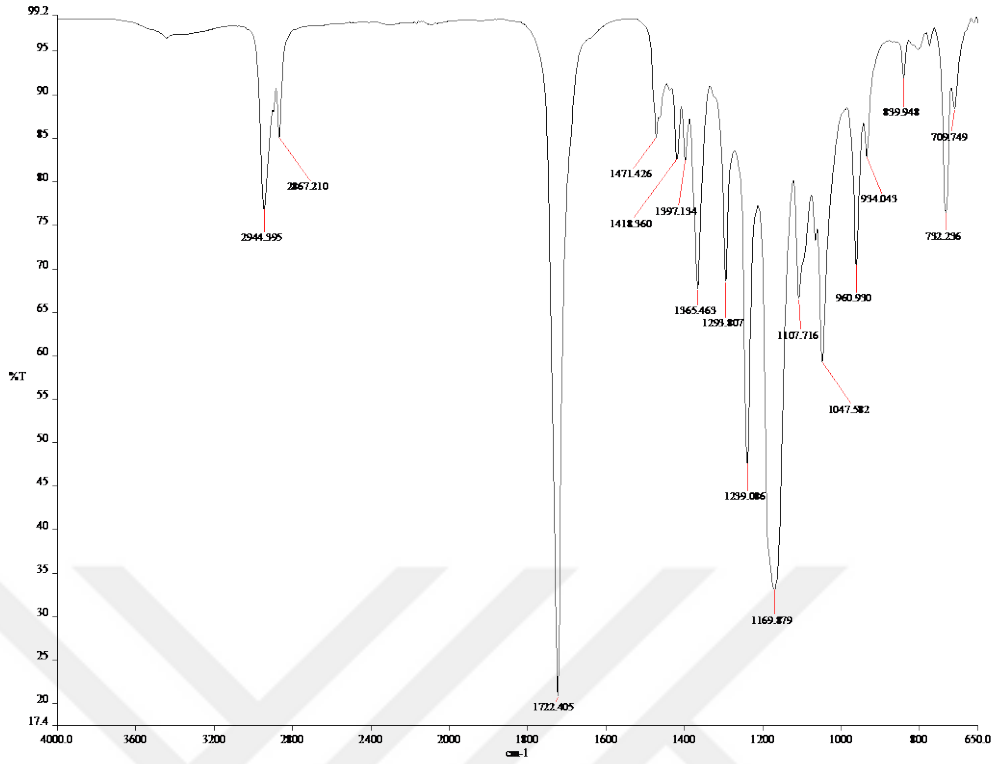
5-Florourasil yüklü PCL nanopartiküllerine ait FTIR spektrumu Şekil 4.26'da görülmektedir. 5-Florourasil FT-IR spektrumunda 3332 cm^{-1}'de gördüğümüz ilaca spesifik pik ve 2115 cm^{-1} ve 1634 cm^{-1}'deki pikler 5-Fu-PCL nanopartiküllerinin FT-IR spektrumunda görülmemiştir. Bu da 5-Florourasil'in PCL nanopartiküllerinin içerisine başarılı bir şekilde enkapsüle edildiğini göstermektedir. Aynı zamanda PCL nanopartiküllerine spesifik 2870-2950 cm^{-1} ve 1722 cm^{-1} 'de bantların varlığı enkapsülasyon başarısını doğrulamaktadır.



Şekil 4.26 5-Fu-PCL FT-IR spektrumu

4.3.4.4 TQ-PCL Nanopartiküllerinin FT-IR Spektrumu

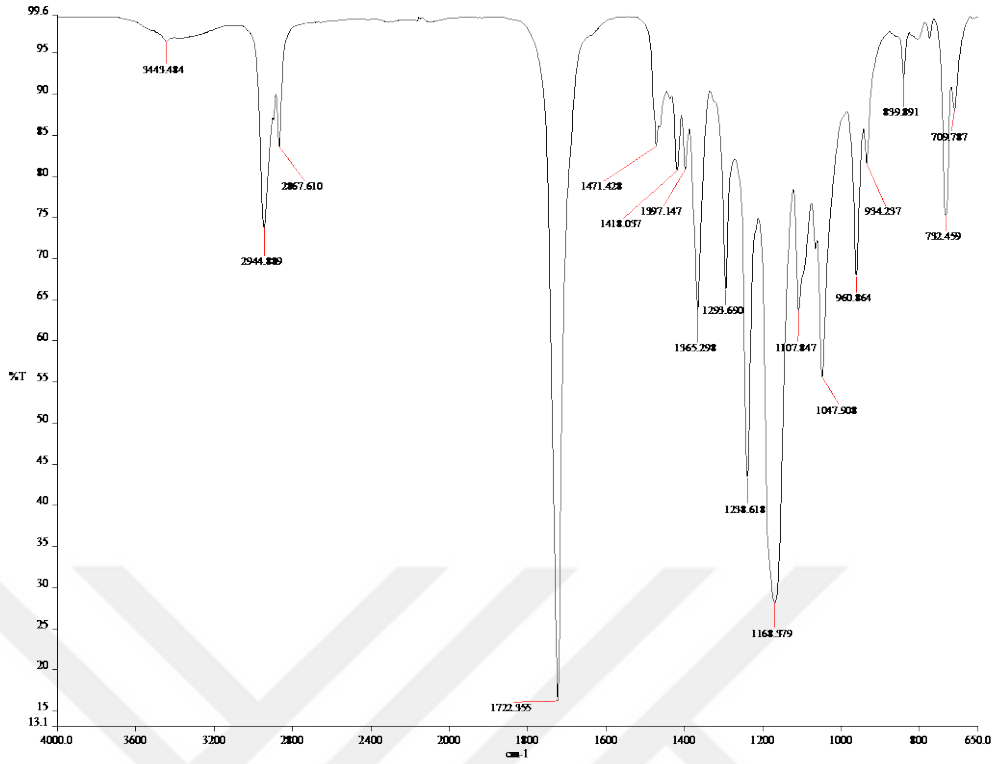
Timokinon yüklü PCL nanopartiküllerine ait FT-IR spektrumu Şekil 4.27'de görülmektedir. FT-IR analizi sonucunda TQ'nun 2967.801 cm^{-1} ve 1738.794 cm^{-1} spesifik bantları yerine PCL'ye ait 2870-2950 cm^{-1} ve 1722 cm^{-1} 'de gözlemlenen bantlar Timokinon'un da nanopartikül içerisine başarılı bir şekilde enkapsüle olduğunu göstermektedir. şekil 4.27'de TQ'nun 2967.801 cm^{-1} ve 1738.794 cm^{-1} spesifik bantları görülmemektedir.



Şekil 4.27 TQ-PCL FT-IR spektrumu

4.3.4.5 5-Fu-TQ-PCL Nanopartiküllerinin FT-IR Spektrumu

Timokinon ve 5-Florourasil enkapsüle edilmiş PCL nanopartiküllerine ait FT-IR spektrumu Şekil 4.28'de görülmektedir. Timokinon FTIR spektrumunda ekstrakta özgü 2967,801 cm^{-1} ve 5-Florourasil'e ait 3332,231 cm^{-1} ve 1634,361 cm^{-1} bantların 5-Fu-TQ-PCL nanopartiküllerinin FT-IR spektrumunda görülmemesi hem bitki ekstraktının hem de antikanser ilacın nanopartiküllerin içerisine başarılı bir şekilde enkapsüle edildiğini göstermektedir. Aynı zamanda PCL nanopartiküllerine ait 2870-2950 cm^{-1} ve 1722 cm^{-1} 'de gözlemlenen bantlar da bu kapsülasyonun verimli bir şekilde gerçekleştiğini doğrulamaktadır.



Şekil 4.28 5-Fu-TQ-PCL FT-IR spektrumu

4.3.5 Polikaprolakton Nanopartiküllerinin Reaksiyon Verimi

5-Florourasil ve/veya Timokinon enkapsüle edilmiş çözücü buharlaştırma yöntemi ile elde edilen PCL nanopartiküllerinin reaksiyon verimi, enkapsülasyon etkinliği ve yükleme kapasiteleri materyal ve metot bölümünde verilen formüllere göre hesaplandı. Reaksiyon verimleri tablo 4.1'de verildi.

Tablo 4.1 Polikaprolakton nanopartiküllerinin reaksiyon verimi

Nanopartikül	Reaksiyon Verimi %
5-Fu-PCL	56,329
TQ-PCL	46,202
5-Fu-TQ-PCL	56,329
PCL	45,635

4.3.6 Polikaprolakton Nanopartiküllerinin Enkapsülasyon Verimi

5-Florourasil ve/veya Timokinon enkapsüle edilmiş çözücü buharlaştırma yöntemi ile elde edilen PCL nanopartiküllerinin enkapsülasyon etkinliği material metot bölümünde verilen denkleme göre hesaplandı. Enkapsülasyon verimlilikleri tablo 4.2'de verildi.

Tablo 4.2 Polikaprolakton nanopartiküllerinin enkapsülasyon verimi

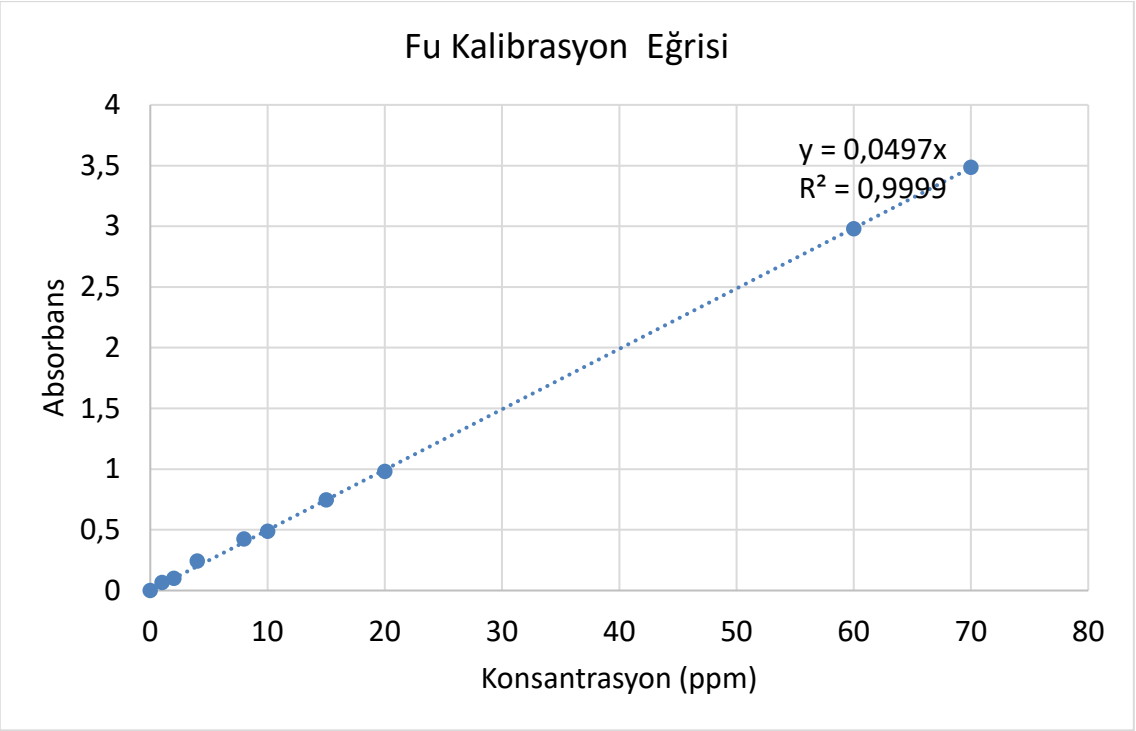
Nanopartikül	Enkapsülasyon Verimi %
5-Fu-PCL	72,952
TQ-PCL	76,074
5-Fu-TQ-PCL	5-Fu: 66,396 TQ: 72,928

4.3.7 Farklı Formülasyonları İçeren Polikaprolakton Nanopartiküllerinin Salım Profilleri

5-Fu-PCL, TQ-PCL, 5-Fu-TQ-PCL nanopartiküllerinin ilaç ve bitki ekstraktının salımını incelemek amacıyla 5-Florourasil ve Timokinon'un konsantrasyon / absorbans verilerini içeren grafikleri çizilerek kalibrasyon eğrileri oluşturuldu. Eğri denklemlerinden yararlanılarak da 670 saat boyunca farklı zamanlarda alınan örneklerin absorbans değerlerine karşılık salınan etken madde miktarları belirlendi.

4.3.7.1 5-Florourasil'in Farklı Konsantrasyonlarının Kalibrasyon Eğrisi

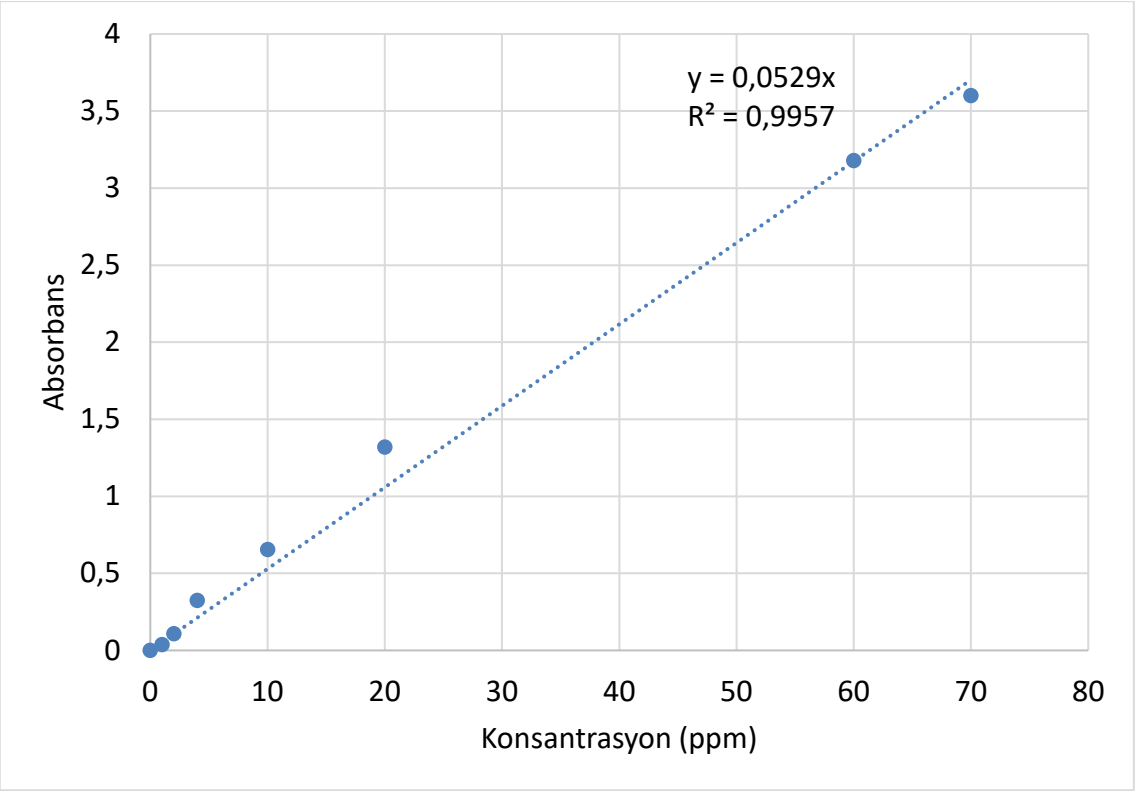
Polikaprolakton nanopartiküllerine kapsüllenen 5-Florourasil miktarını belirlemek ve nanopartiküllerin salım profillerini oluşturabilmek amacıyla farklı konsantrasyonlarda PBS ile hazırlanan 5-Florourasil 265 nm'de UV spektrofotometrede absorbans değerleri okundu. Bu değerlere bağlı olarak kalibrasyon eğrisi oluşturuldu ve eğri denklemi elde edildi (Şekil 4.29).



Şekil 4.29 5-Fu kalibrasyon eğrisi

4.3.7.2 Timokinon Farklı Konsantrasyonlarının Kalibrasyon Eğrisi

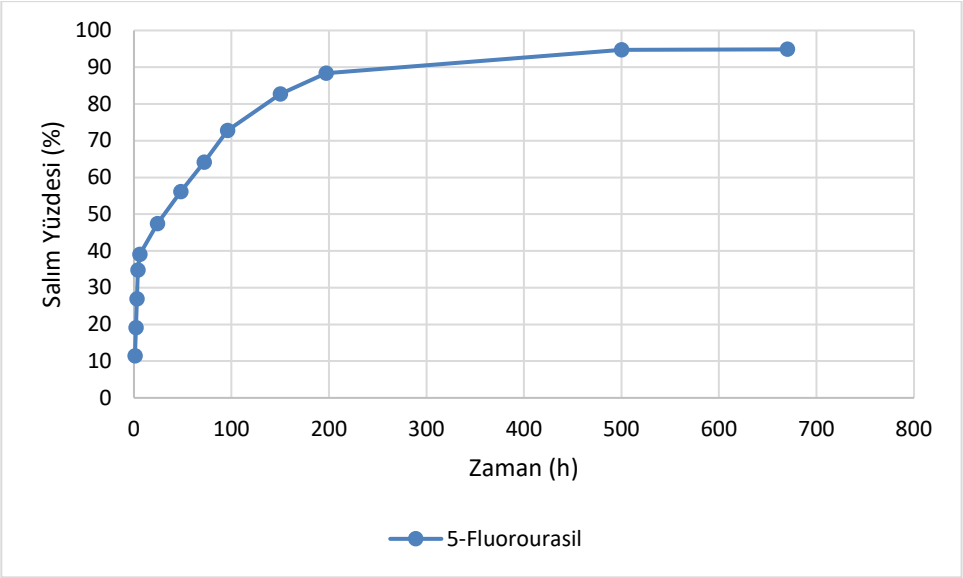
Polikaprolakton nanopartiküllerine kapsüllenen Timokinon miktarını belirlemek ve nanopartiküllerin salım profillerini oluşturabilmek amacıyla farklı konsantrasyonlarda PBS ile hazırlanan Timokinon 254 nm'de UV spektrofotometrede absorbans değerleri okundu. Bu değerlere bağlı olarak kalibrasyon eğrisi oluşturuldu ve eğri denklemi elde edildi (Şekil 4.30).



Şekil 4.30 TQ kalibrasyon eğrisi

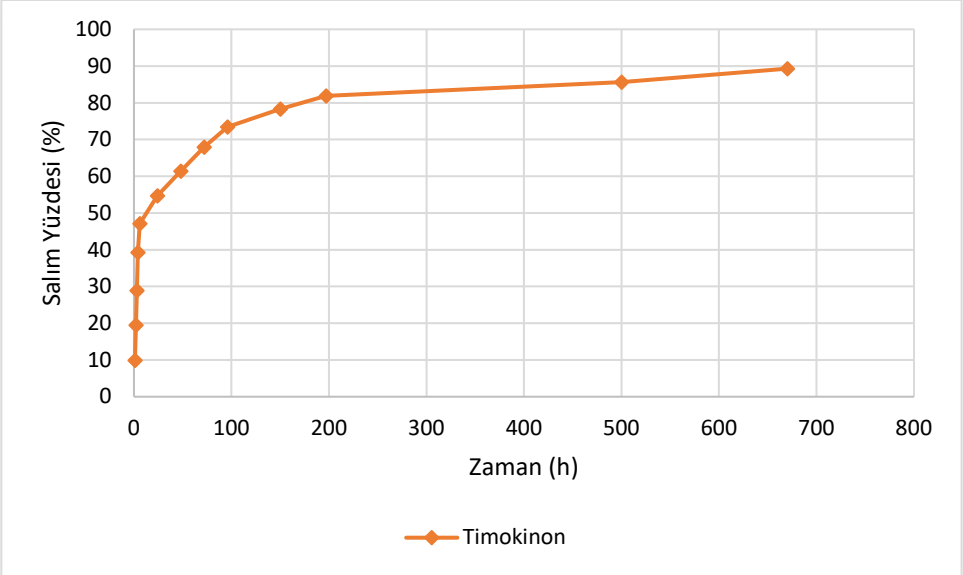
Sentezlenen PCL nanopartiküllerinin *in vitro* salım çalışmaları PBS tamponu içerisinde pH 7.4'te çalkalamalı inkübatörde (120 rpm) 37 C'de gerçekleştirildi. 5-Fu-PCL, TQ-PCL ve 5-Fu-TQ-PCL nanopartiküllerinden 10 mg tartılarak 3 mL PBS içerisinde salıma bırakıldı. Partiküllerin salımı 670 saat boyunca belirli zaman aralıklarında örnek alınarak sürdürüldü. Belirli aralıklarla 1 mL örnek alınarak 14000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi, süpernatantlar biriktirildi ve UV-Vis spektrofotometre ile ölçüm alınarak partiküllerden salınan 5-Fluorourasil ve Timokinon'un kümülatif yüzdeleri kalibrasyon eğri denklemleri ile belirlendi.

5-Fluorourasil kapsüle PCL nanopartiküllerinden salınan 5-Fluorourasil miktarı incelendiğinde 24 saat sonunda ilacın %47,42'sinin salımının gerçekleştiği gözlemlendi. 28. gün sonunda ise toplam kapsüle edilen 5-Fluorourasil'in %94,86'sının salımının gerçekleştiği belirlendi (Şekil 4.31).



Şekil 4.31 5-Fu-PCL salım grafiği

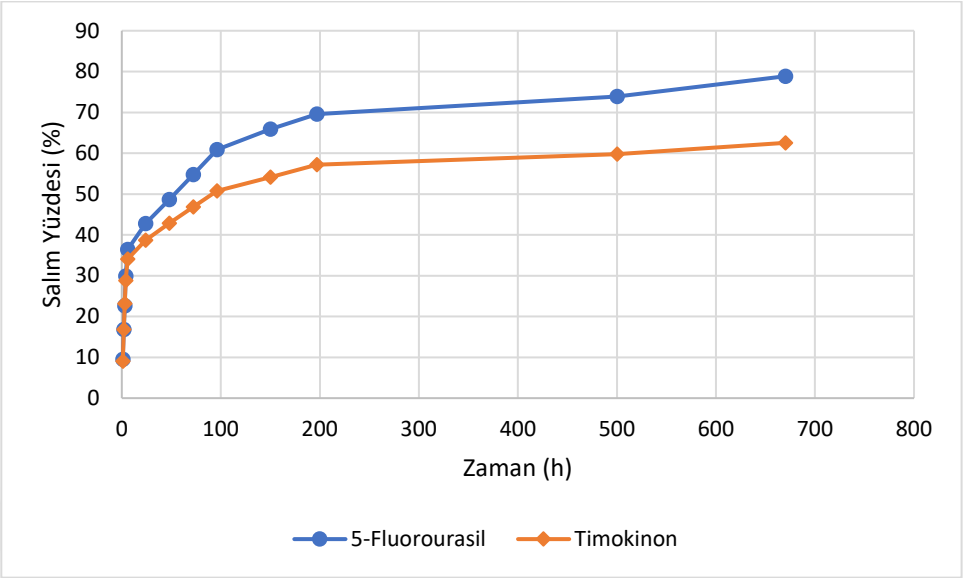
Timokinon yüklü PCL nanopartiküllerinden timokinon salımı incelendiğinde ise 24 saat sonucunda bitkisel içeriğin %54,70'inin salımının gerçekleştiği belirlendi. 670 saatin sonunda ise yapılan ölçümde toplam kapsüle edilen Timokinon'un %89,29'unun salımı gerçekleştiği gözlemlendi (Şekil 4.32).



Şekil 4.32 TQ-PCL salım grafiği

5-Fluorourasil ve Timokinon yüklü polikaprolakton nanopartiküllerinin *in-vitro* salımı incelendiğinde 24 saat sonunda 5-Fluorourasil'in %42,75'inin; Timokinon'un ise %38,70'inin salımının gerçekleştiği gözlemlendi. 28. Günün

sonunda yapılan ölçümde ise toplam kapsüle edilmiş 5-Fluorourasil'in %78,86; Timokinon'un ise %62,53'ünün salımının gerçekleştiği belirlendi (Şekil 4.33).

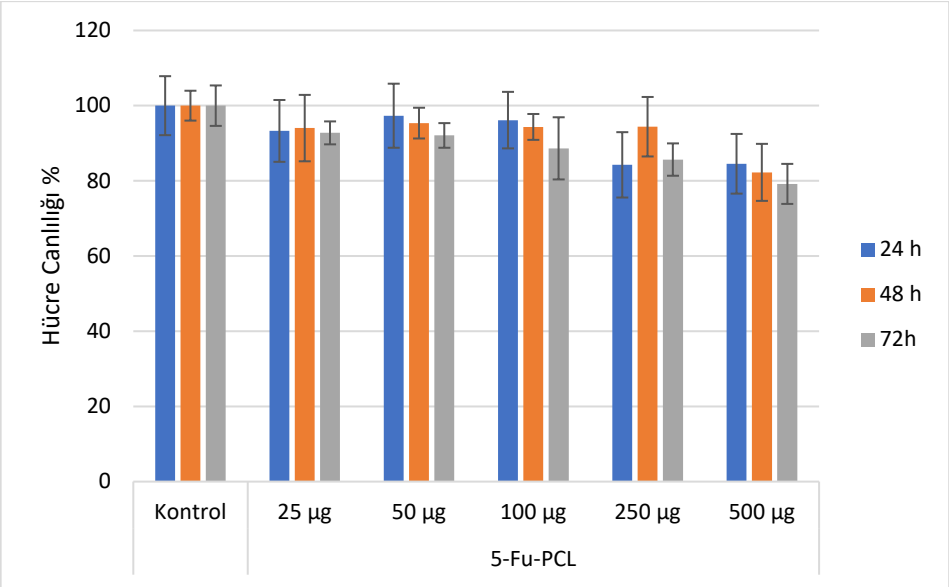


Şekil 4.33 5-Fu-TQ-PCL salım grafiği

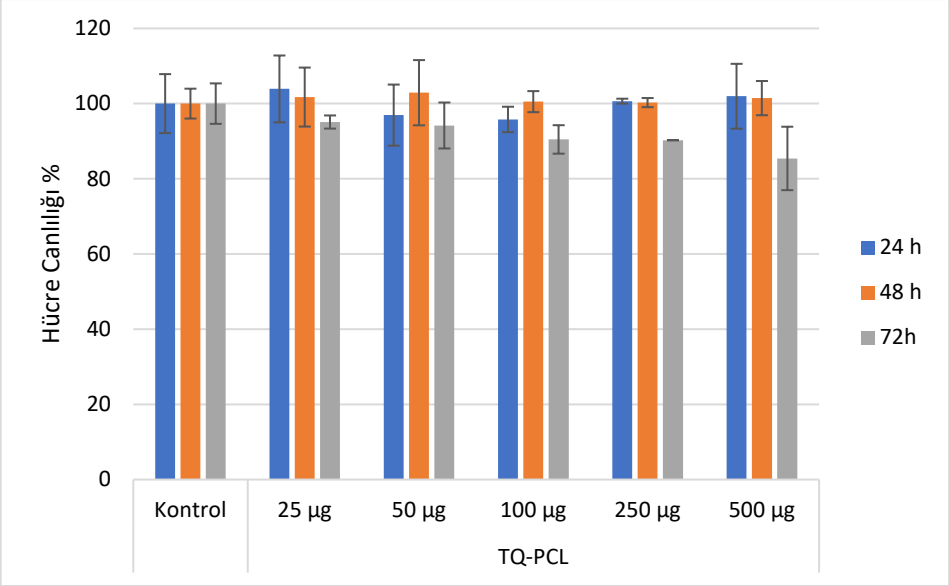
4.4 Polikaprolakton Nanopartiküllerinin Hücre Hatları Üzerinde Etkinliğinin *in vitro* olarak İncelenmesi

4.4.1 Polikaprolakton Nanopartiküllerinin L929 Fare Fibroblast Hücre Hattı Üzerinde Sitotoksitelerinin Belirlenmesi

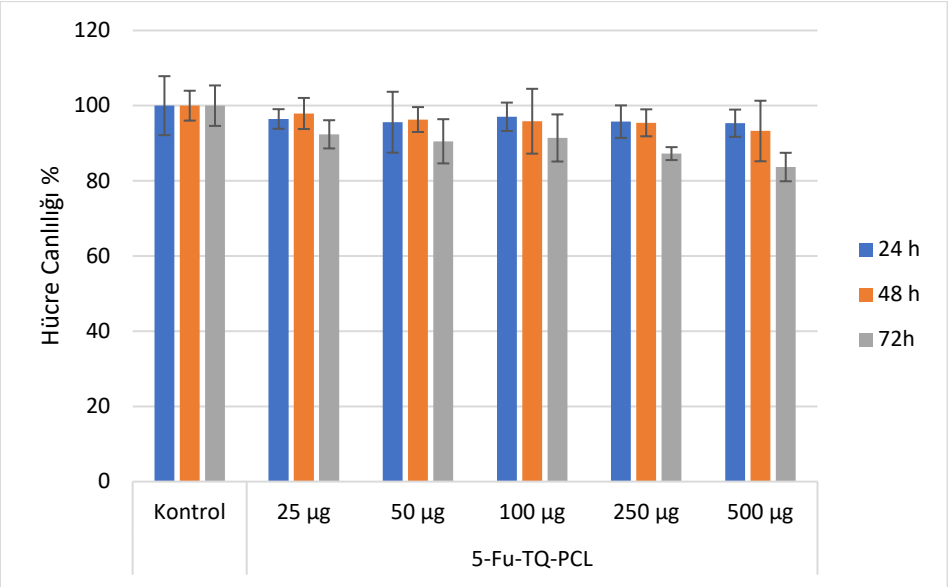
Karakterizasyonları tamamlanmış 5-Florourasil ve Timokinon yüklü TQ-PCL, 5-Fu-PCL, 5-Fu-TQ-PCL nanopartiküllerinin 25 µg/mL - 500 µg/mL arasında L929 fare fibroblast hücre hattında 24, 48 ve 72 saat inkübasyon süresi sonrası sitotoksik etkileri incelenmiştir. Şekil 4.34-4.36'da incelenen formülasyonların farklı konsantrasyonlarının sitotoksik etkileri karşılaştırmalı olarak verilmiştir. İncelenen tüm gruplarda artan konsantrasyona göre sitotoksik etki artmış olup 72 saatin sonunda en düşük hücre canlılığı kontrole kıyasla 5-Fu-PCL grubunda %79,18 ± 5,32 olmuştur.



Şekil 4.34 5-Fu-PCL nanopartiküllerinin L929 fare fibroblast hücre hattı üzerindeki sitotoksisite analizi



Şekil 4.35 TQ-PCL nanopartiküllerinin L929 fare fibroblast hücre hattı üzerindeki sitotoksisite analizi



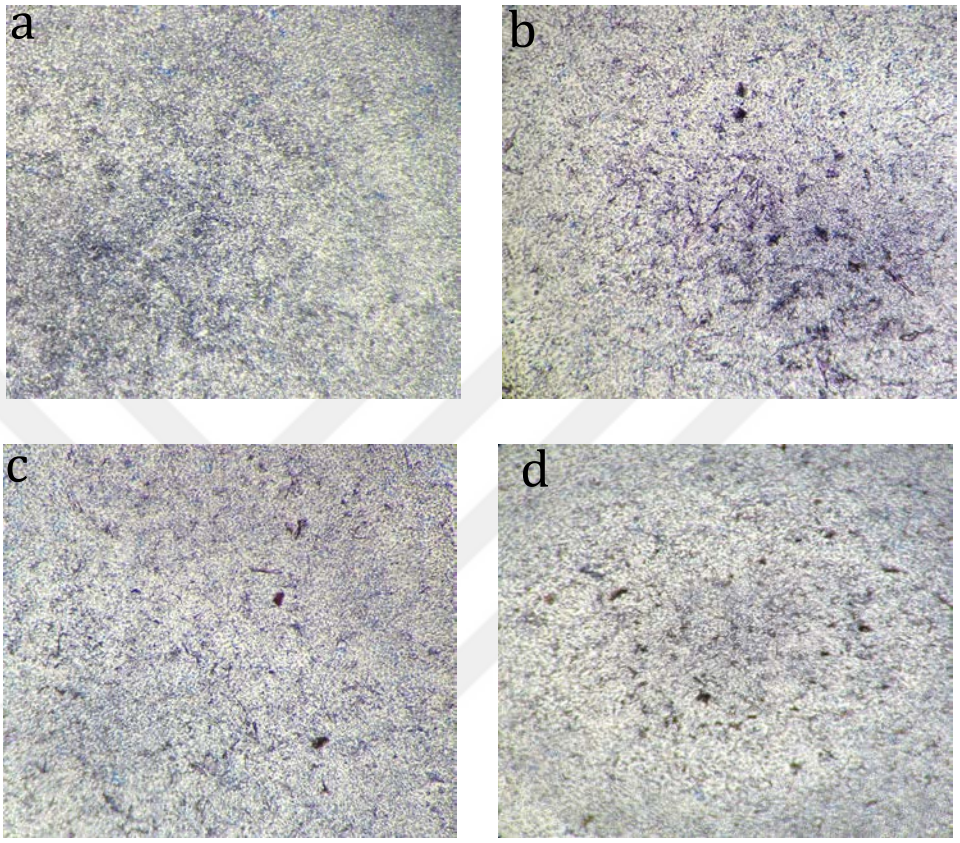
Şekil 4.36 5-Fu-TQ-PCL nanopartiküllerinin L929 fare fibroblast hücre hattı üzerindeki sitotoksisite analizi

4.4.2 Polikaprolaktan Nanopartiküllerinin AGS Mide Kanseri Hücre Hattı Üzerinde Sitotoksitelerinin Belirlenmesi

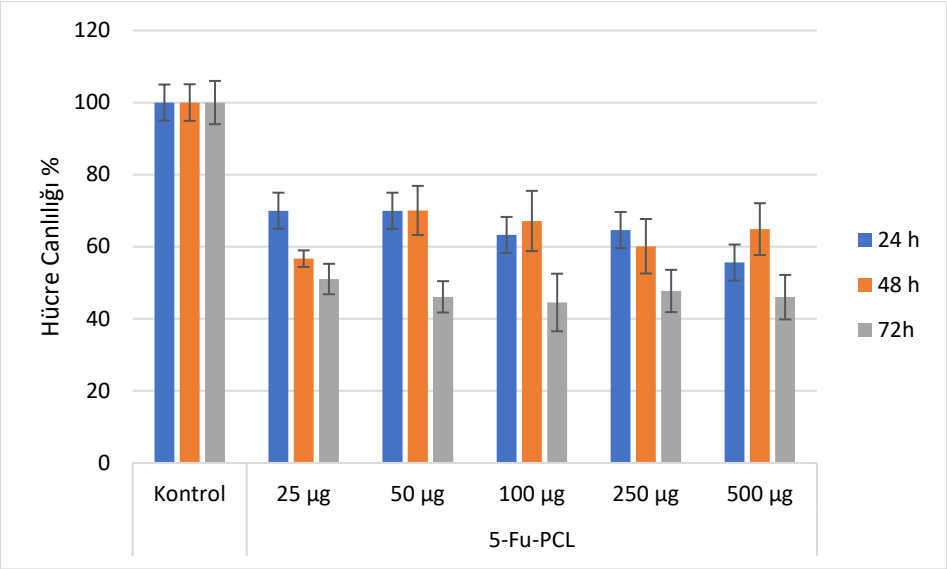
5-Florourasil ve Timokinon yüklü 5-Fu-PCL, TQ-PCL, 5-Fu-TQ-PCL nanopartiküllerinin 25 µg/mL - 500 µg/mL arasında AGS mide kanseri hücre hattında 24, 48 ve 72 saat inkübasyon süresi sonrası hücre canlılığı MTT yöntemi ile ölçülmüştür. Şekil 4.36 ise 72 saat sonunda 500 µg/mL konsantrasyonunda formazan kristallerinin görüntüsü görülmektedir.

Şekil 4.37-4.39'da incelenen formülasyonların farklı konsantrasyonlarının mide kanser hücrelerinin canlılığına etkileri kontrole göre kıyasla yüzde olarak ifade edilmiştir. Buna göre; 5-Fu-PCL nanopartiküllerinin 72 saat sonunda 100 µg/mL' konsantrasyonunda hücre canlılığı %44,51±7,99 olarak ölçülmüştür. TQ-PCL nanopartiküllerinin 50 µg/mL' konsantrasyonunda 72 saat sonundaki ölçümünde hücre canlılığı kontrole kıyasla %69,98±2,52 ve 5-Fu-TQ-PCL nanopartiküllerinin canlılığı %42,65±2,54 olarak ölçülmüştür. Sonuçlardan anlaşılacağı üzere 72 saatlik inkübasyonun ardından AGS hücreleri üzerinde en güçlü inhibisyon gösteren formülasyon 5-Fu-TQ-PCL olmuştur. Yine 72 saat sonuçlarına göre 5-Fu-TQ-PCL formülasyonu tek başına timokinon içeren PCL nanopartikülleri ile kıyaslandığında yaklaşık 2 kat daha yüksek düzeyde kanser hücreleri üzerinde

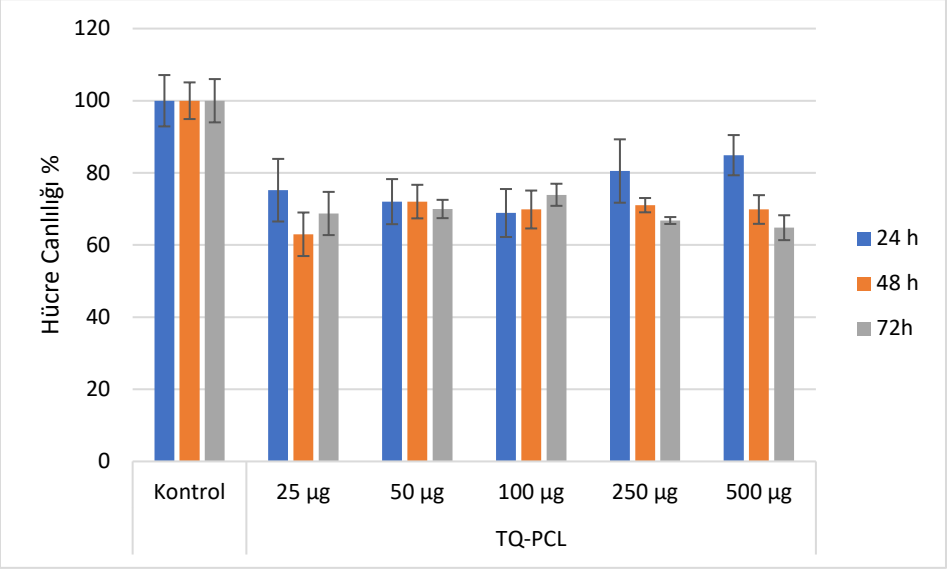
inhibe edici etkinlik göstermiştir. Aynı zamanda 5-Fu-TQ-PCL nanopartiküllerinin mide kanseri hücreleri üzerindeki antikanser etkinliklerinin 5-Fu-PCL nanopartiküllerine benzer etkinlik gösterdiği tespit edilmiştir.



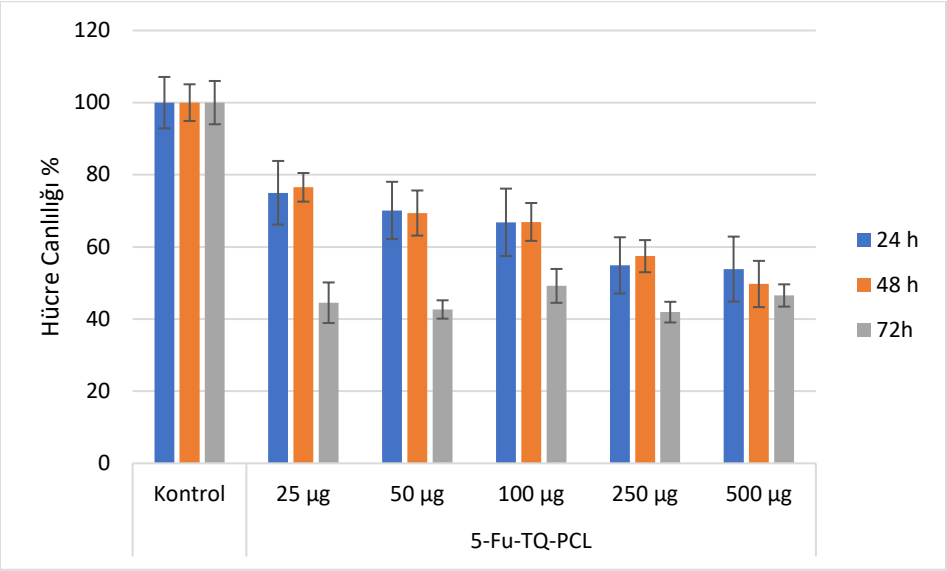
Şekil 4.36 a)kontrol, b)5-Fu-TQ-PCL, c)5-Fu-PCL, d)TQ-PCL nanopartiküllerinin(500 µg) AGS mide kanseri hücre hattı üzerindeki formazan kristalleri görüntüsü



Şekil 4.37 5-Fu-PCL nanopartiküllerinin AGS mide kanseri hücre üzerindeki sitotoksisite analizi



Şekil 4.38 TQ-PCL nanopartiküllerinin AGS mide kanseri hücre üzerindeki sitotoksisite analizi



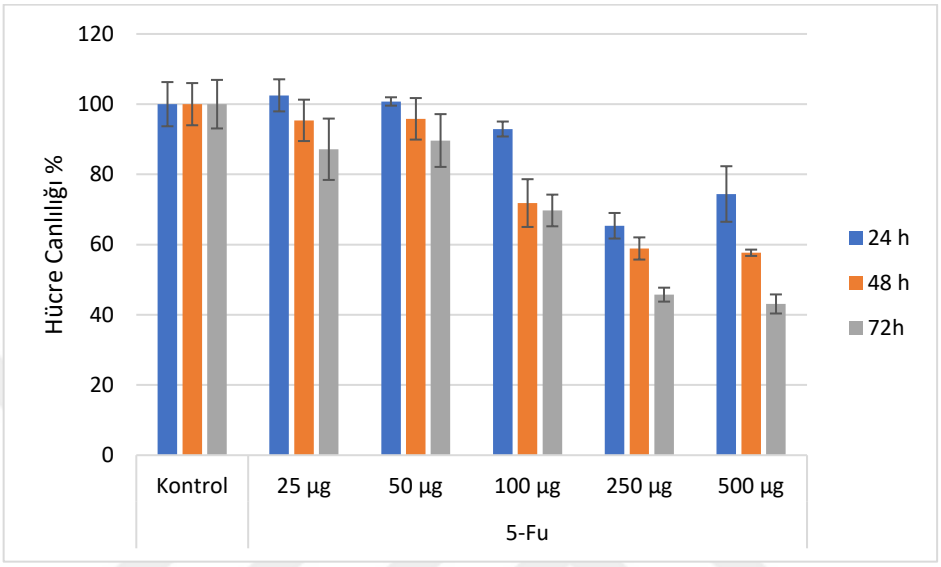
Şekil 4.39 5-Fu-TQ-PCL nanopartiküllerinin AGS mide kanseri hücre üzerindeki sitotoksisite analizi

4.4.3 Timokinon ve/veya 5-Florourasil'in AGS Mide Kanseri Hücre Hattı Üzerinde Sitotoksitelerinin Belirlenmesi

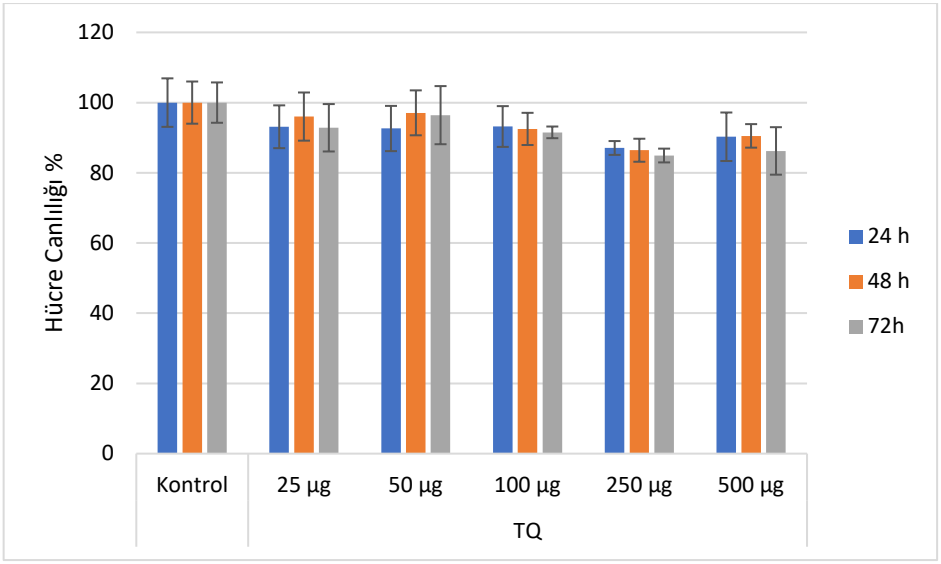
5-Florourasil antikanser ilacının, Timokinon ve 5-Florourasil+Timokinon'nun 25 µg/mL - 500 µg/mL arasındaki konsantrasyonlarda AGS mide kanseri hücre hattında 24, 48 ve 72 saat inkübasyon süresi sonrası hücre canlılığı MTT yöntemi ile ölçülmüştür.

Şekil 4.40-4.42'da incelenen formülasyonların farklı konsantrasyonlarının mide kanser hücrelerinin canlılığına etkileri kontrole göre kıyasla yüzde olarak ifade edilmiştir. Buna göre; 5-Fu formülasyonunun 250 µg/mL konsantrasyonunda 72 saatteki hücre canlılığı %45,73±1,98 olarak ölçülmüş, Aynı saat ve konsantrasyondaki TQ için hücre canlılığı %84,92±1,96 ve 5-Fu-TQ formülasyonda ise hücre canlılığı %52,62±1,6 olarak ölçülmüştür. Serbest halde kullanılan ilaç moleküllerinin AGS hücrelerindaki canlılığı ile nanoformülasyonların hücre canlılığı ile kıyaslanması sonucunda nanoformülasyonların daha düşük hücre canlılığı gösterdiği tespit edilmiştir. Yapılan incelemelerde serbest haldeki 5-Fu (Şekil 4.40) uygulamasına kıyasla 5-Fu-PCL uygulamasının (Şekil 4.37) mide kanseri hücreleri üzerindeki inhibe edici etkinliğinin daha yüksek olduğu, 5-Fu-

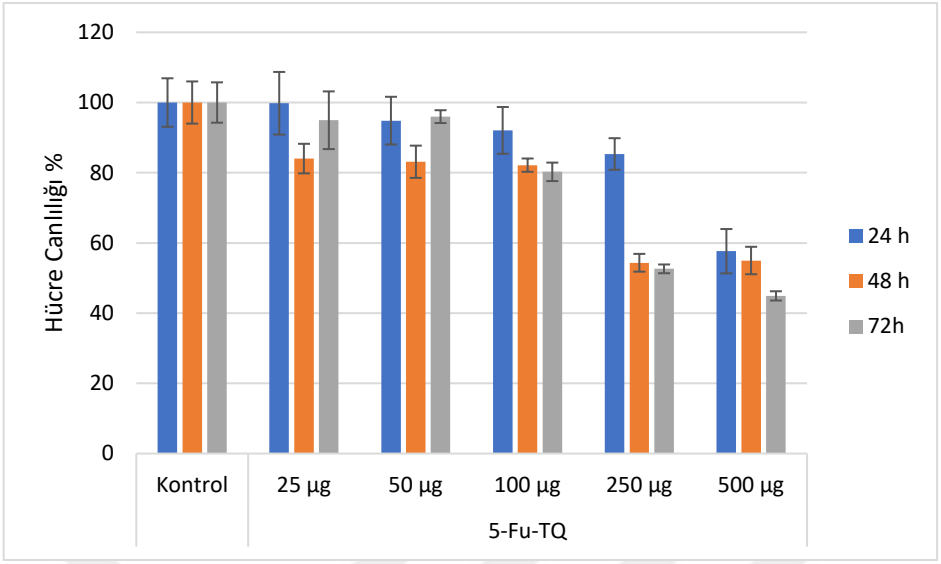
TQ-PCL nanoformülasyonlarının ise hem serbest 5-Fluorourasil'den hem de 5-Fu-PCL'den daha yüksek kanser hücresi inhibisyonu gerçekleştirdiği tespit edilmiştir. Aynı zamanda yapılan analizlerde ikili nanoformülasyonlarda ajanların sinerjik bir etki göstererek tek başına uygulamalarına kıyasla daha yüksek bir antikanser etkinlik gösterdikleri belirlenmiştir.



Şekil 4.40 Serbest formdaki 5-Fu'nun AGS mide kanseri hücre hattı üzerindeki sitotoksisite analizi



Şekil 4.41 Serbest formdaki TQ'nun AGS mide kanseri hücre hattı üzerindeki sitotoksisite analizi



Şekil 4.42 Serbest formdaki 5-Fu+TQ'nun AGS mide kanseri hücre hattı üzerindeki sitotoksisite analizi

5
SONUÇ VE ÖNERİLER

Dünyada her yıl 1 milyonu aşkın yeni mide kanseri vakası tespit edilmektedir bu vakaların yaklaşık dörtte üçü ölümle sonuçlanmaktadır [1]. Ülkemizde ise mide kanseri, kanser türleri arasında en yaygın görülen beşinci kanser türü olarak yer almaktadır [2]. Mide kanseri çeşitli çevresel ve genetik faktörler sebebiyle karmaşık bir insidans profili göstermekle birlikte yaşam koşulları, beslenme rutini ve Helicobacter pylori gibi bakteri ve virüs kaynaklı prevelansa sahiptir. Direkt olarak H. pylori'nin kendisi DNA hasar onarımı (DDR) ile ilgili genleri doğrudan değiştirme yeteneğine sahip olduğu gibi[186] diğer patajon kaynaklı oksidatif stres ve serbest oksijen radikallerinin oluşumu, DNA hasarı, CD4+ T hücre yanıtı artışına ve daha yüksek sayıda miyeloid hücreye yol açarak proinflamatuar sitokin üretimini artırır, apoptozu azaltır ve DDR bozar. Mide kanseri erken dönemde teşhis edilememesinden dolayı genellikle tanısı koyulan hastaların üçte biri metastaz görülmektedir. İleri evrelerde teşhis edilmesinden dolayı tedavi stratejisinin etkili ve hızlı olması gerekmektedir. Günümüzde tedavi yöntemleri ise cerrahi tedavi, radyoterapi ve kemoterapiden oluşmaktadır. Kemoterapi diğer tedavi yöntemlerinden daha başarılı bir performans göstermektedir. Kemoterapötik ilaçlardan birinci basamak tedavilerde en çok kullanılan platin-fluoropirimidin bazlı kemoterapi olmakla beraber Pembrolizumab, Trastuzumab da HER2+ hastalarda sağkalım süresini uzattığı görülmüştür [45]. Bunlardan oksaliplatin, sisplatin ve 5-FU gibi modern kombinasyonlar, önceki tedavi rejimlerine göre daha iyi performans göstermektedir [187]–[189].

Ancak yüksek toksisiteli kemoterapötik ilaçlar hastalarda tölere edilememektedir. Bu yüzden hedefli ve kombine tedaviler gereklilik oluşturmakta ve klinisyenler tarafından tercih edilmektedir.

Son yıllarda hedefli tedavi stratejilerinde nanoteknolojinin kullanımı ise ümit verici olmakta ve geliştirilmesine önem verilmektedir. Nanoteknolojik yaklaşımların en temelinde nanopartiküller bulunmaktadır. Çünkü nanopartiküller

boyutları sayesinde boşaltım sistemi tarafından atılmadan hücrelere ulaşabilmektedir. Polimerik nanopartiküller boyutlarından dolayı yüksek ilaç yükleme kapasiteleri, hem biyouyumlulukları hem de biyobozunurlukları sayesinde nanoterapide önemli bir yer tutmaktadır [122].

Polikaprolakton ise hidrofobik, FDA onaylı bir polimerdir [127]. Hidrofobik yapısı sayesinde suda çözünmesi ve kapsüllenen ilacın degradasyonu daha yavaş gerçekleşir[147]. PCL temelli nanopartiküller mide kanserinde sıklıkla görülen H.pylori'nin hedeflenmesinde de avantaj sağlar[149]. Nanopartiküller sadece antikanser ilaçları değil bitkisel ekstrakt, bitki metabolitleri gibi bileşenleri de kapsülleyebilmektedir.

Sun ve ark. Kitosan ve 5-FU'yu (5-FU-CN) kapsülleyen lipid nanopartiküllerinin SGC-7901 mide kanseri hücrelerinde ve *in-vivo* çalışmaları sonrası, 5-FU'nun salım süresinin uzadığını, raf ömrününün önemli ölçüde artırdığını gösterdiler. Buna göre, 5-FU yüklü NP'lerin klinik uygulamada umut verici bir potansiyele sahip olduğunu açıkça ortaya koydu[190]. Timokinon, Kuersetin, Kurkumin gibi bitkisel bileşenlerin hem mide kanserine karşı etkinliği artırmada hem de sağlıklı hücrelere karşı toksik etkiyi azaltmaya yardımcı oldukları literatürde çok çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. *Nigella Sativa* bitkisi etken maddesi olan timokinon (TQ) bitkisel bileşeninin antioksidan, anti-enflamatuar, anti-diyabetik, immünomodülatör ve antikanser etkileri gibi terapötik faydaları araştırılmıştır [191]. Mide kanserine karşı antitümor etkisi Zhu Wq- Wang J ve ark. yaptığı çalışmada STAT3 sinyal yolağının aşağı regülasyonu ile apoptozu indüklediğini göstermişlerdir[30].

Timokinon (TQ) mide kanseri hücre hattı olan AGS hücrelerine karşı literatürde çalışılmış ve antiproliferatif etkisi bir çok çalışmada gösterilmiştir ancak kısa yarı ömrü, yetersiz biyolojik stabilitesi, zayıf suda çözünürlüğü ve düşük biyoyararlanımından dolayı timokinonun farmakolojik önemi ve terapötik uygulanabilirliği yetersizdir. Bu yüzden nanopartikül içerisinde kapsüllenmesi araştırma konusu olmuştur. Ancak yapılan literatür taramasında AGS mide kanseri hücre hattında Timokinon polikaprolakton nanopartiküllerinin antikanser aktivitesinin incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Dahası 5-Fluorourasil-Timokinon polikaprolakton nanopartiküllerinin kombine önerisinin de hücreler

üzerindeki antitümor etkisinin incelendiği bir çalışma bulunamamıştır. Tüm bunlar göz önüne alınarak bu tez çalışmasının amacını; Mide kanseri tedavisinde birinci basamak kemoterapötik ilaçlardan biri olan 5-Fluorourasil'in sistemik toksisitesini azaltmak, ilacın tümör bölgesindeki salım süresini ve antikanser etkinliğini arttırmak için daha önce bir çok çalışmada etkinliği kanıtlanmış Timokinon ile 5-Fluorourasil'in tek başına ve kombinasyon halinde polikaprolakton nanopartiküllerine enkapsülasyonu gerçekleştirilerek karakterize edilmesi, antitümör etkinliklerinin AGS mide kanser hücre hattında ve sitotoksik etkinliklerinin ise L929 fare fibroblast hücre hatlarında *in vitro* olarak incelenmesi oluşturmaktadır.

Tezin amaç ve hedefine ulaşmak için çalışmalarımız aşağıdaki aşamalarda gerçekleştirildi:

I. 5-Fluorourasil ve Timokinon enkapsülasyonu yapılmış polikaprolakton nanopartiküllerinin sentezlenmesi ve karakterizasyonu,

II. Polimerik nanopartiküllerin boyut, zeta potansiyel, Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi ve taramalı elektron mikroskobu analizlerinin gerçekleştirilerek karakterize edilmesi,

III. Ticari satin alınmış 5-Fluorourasil ve Timokinon'un ayrı ayrı ve kombinasyon halinde farklı konsantrasyonlarının AGS mide kanser hücre hatlarında MTT yöntemi ile hücra canlılığı değerlerinin belirlenmesi,

IV. Karakterize edilmiş yüklü polikaprolakton nanopartiküllerin L929 fare fibroblast ve AGS mide kanser hücre hatlarında MTT yöntemi ile sitotoksisite değerlerinin belirlenmesi.

Bu tez çalışmasının ilk aşamasında ticari olarak satın alınmış Timokinon ve 5-Fluorourasil ilacının polikaprolakton nanopartiküllerine çözücü buharlaştırma yöntemi kapsüllenmesi gerçekleştirilmiş. Enkapsülasyonu yapılmış nanopartiküllerin UV-Vis spektrofotometre, Zeta-sizer ile boyut ve potansiyel analizi, FT-IR ve SEM analizi ile karakterizasyonları yapılmıştır.

Nanopartikül boyutu, hedefli ilaç iletiminde önemli bir parametredir. Çünkü hedef organa giderken kılcalardan geçişi yine hedef hücrelerin hücre zarından geçişlerinde boyutları önemli bir yer tutumaktadır. Mukoza, oral yoldan gönderilen

nanopartiküllerin taşınmasında bir bariyer görevi gören yarı geçirgen bir zardır. Oral yoldan alınan nanopartiküllerin mide mukoza bariyerinden geçip mide hücrelerine ulaşabilmeleri gerekmektedir. Mukozada kalan nanopartiküller mukus döngüsü ile sistemden atılırlar, bu durumda nanopartikül etkinliği sağlananamış olur. Etkili bir membran geçirgenliği için nanopartiküllerin 500 nm'den küçük olması gerekmektedir. Aynı zamanda ~200 nm boyutlarındaki nanopartiküllerin mukozal membrandan daha etkili geçtikleri bildirilmiştir[192]. Sentezlediğimiz PCL nanopartiküllerin boyutları boş PCL nanopartikülleri için 246,6 nm; Timokinon enkapsüle PCL nanopartikülleri için 215,4 nm; 5-Florourasil enkapsüle PCL nanopartikülleri için 226,0 nm ve 5-Florourasil ve Timokinon enkapsüle PCL nanopartikülleri için 221,1 nm olarak ölçülmüştür. PCL nanopartiküllerinin enkapsülasyon sonrası boyutlarındaki küçülme ise PCL'nin esnek yapısından ve hidrofobik etkileşimler kaynaklı daha kompakt hale gelmesinden dolayı olduğu düşünülmektedir. Aynı zamanda zeta-boyut ve potansiyel analizlerinin de literatür ile uyumlu olduğu görülmüştür [128-130]. Boş PCL, 5-Florourasil enkapsüle PCL, Timokinon enkapsüle PCL ve 5-Florourasil ve Timokinon enkapsüle PCL nanopartikülerinin çoklu dağılım indisi değerleri ise sırasıyla ortalama 0,067; 0,182; 0,102 ve 0,129 olarak ölçülmüştür. Ayrıca elde edilen SEM görüntüleri ile nanopartiküllerin boyutlarını ve monodispersite indekslerini doğrular niteliktedir. Nanopartiküllerde herhangi bir aglomerasyon olmaması, homojen dağılımı ve boyutlarına göre PCL nanopartiküllerin mide mukoza bariyerinden geçişlerinin başarılı bir şekilde yapılabileceği düşünülmektedir [231].

Zeta potansiyel ölçümü sonuçlarına göre nanopartiküllerin ortalama zeta potansiyelleri boş PCL nanopartikülleri için -15,6 mV; 5-Florourasil enkapsüle PCL nanopartikülleri için -14,0 mV, Timokinon enkapsüle PCL nanopartikülleri için -15,3 mV ve 5-Florourasil ve Timokinon enkapsüle PCL nanopartikülleri için -13,4 mV olarak ölçüldü. PCL'nin yüzeyindeki serbest karboksilik asit grubunun varlığı, nanopartiküllerde negatif yüzey yükünün oluşmasına sebep olur. Literatürde PCL nanopartikülleri için -15 ila -30 mV aralığındaki zeta potansiyel değerlerinin stabilize nanopartiküller için ideal olduğu bildirilmiştir [143,226].

5-Fluorourasil ve Timokinon ve 5-Fu-PCL, TQ-PCL, 5-Fu-TQ-PCL, PCL nanopartiküllerin FT-IR analizi 4000-650 cm^{-1} dalgaboyu aralığında

gerçekleştirilmiştir. Alınan spektrum verileri sonucu 5-Fluorourasil ve Timokinon'un PCL içerisine enkapsüle olduğu yüzeyde herhangi bir adsorpsiyona rastlanmadığı görülmüştür.

5-Florourasil FT-IR spektrumunda 3332 cm^{-1}'de gördüğümüz ilaca spesifik N-H gerilme piki ve 2115 cm^{-1} ve 1634 cm^{-1}'deki imid gerilmesi ve aromatik halkadan kaynaklanan pikler 5-Fu-PCL nanopartiküllerinin FT-IR spektrumunda görülmemiştir. Bu da 5-Florourasil'in PCL nanopartiküllerinin içerisine başarılı bir şekilde enkapsüle edildiğini göstermektedir. Aynı zamanda PCL nanopartiküllerine spesifik 2870-2950 cm^{-1} ve 1722 cm^{-1} 'de bantların varlığı enkapsülasyon başarısını doğrulamaktadır.

TQ-PCL için yapılan FTIR analizinde TQ'nun alifatik gruplarının C-H gerilmesinden kaynaklanan 2967.801 cm^{-1} piki ve 1738.794 cm^{-1} spesifik bantları yerine PCL'ye ait asimetrik CH_2 gerilme titreşimlerinden kaynaklanan 2870-2950 cm^{-1} ve karbonil gerilme titreşimlerini gösteren 1722 cm^{-1} 'de gözlemlenen bantlar Timokinon'un da nanopartikül içerisine başarılı bir şekilde enkapsüle olduğunu göstermektedir.

Timokinon ve 5-Florourasil enkapsüle edilmiş PCL nanopartiküllerine ait FT-IR spektrumunda ise Timokinon FTIR spektrumunda ekstrakta özgü 2967,801 cm^{-1} ve 5-Florourasil'e ait 3332,231 cm^{-1} ve 1634,361 cm^{-1} bantların 5-Fu-TQ-PCL nanopartiküllerinin FT-IR spektrumunda görülmemesi hem bitki ekstraktının hem de antikanser ilacın nanopartiküllerin içerisine başarılı bir şekilde enkapsüle edildiğini göstermektedir. Aynı zamanda PCL nanopartiküllerine ait 2870-2950 cm^{-1} ve 1722 cm^{-1} 'de gözlemlenen bantlar da bu kapsülasyonun verimli bir şekilde gerçekleştiğini doğrulamaktadır.

İn-vitro salım çalışmaları için sentezlenen nanopartiküller PBS tamponu içerisinde 37°C, pH 7.4'te 120 rpm hızında çalkalamalı inkübatörde gerçekleştirildi. PCL nanopartiküllerinin salımı 28 gün boyunca belirli zaman dilimlerinde ölçümü alınarak gerçekleştirilmiştir. PCL nanopartiküllerinden salınan Timokinon ve 5-Florourasil kümülatif yüzdeleri, oluşturulan kalibrasyon eğrisinin denklemleri ile belirlendi. 5-Fu-PCL nanopartiküllerinden salınan 5-Fluorourasil miktarı incelendiğinde 24 saat sonunda ilacın %47,42'sinin, TQ-PCL nanopartiküllerinden bitkisel etken maddenin %54,70'inin, 5-Fu-TQ-PCL ise 5-Fluorourasil'in

%42,75'inin; Timokinon'un ise %38,70'inin salımının gerçekleştiği gözlemlendi. 28. gün yapılan ölçümde ise 5-Fu-PCL'den 5-Fluorourasil'in %94,86'sının salımının gerçekleştiği, TQ-PCL'den Timokinon'un %89,29'unun salımının gerçekleştiği, 5-Fu-TQ-PCL'den 5-Fluorourasil'in %78,86; Timokinon'un ise %62,53'ünün salımının gerçekleştiği belirlendi.

5-Fluorourasil, Timokinon ve karakterizasyonu tamamlanan 5-Fu-PCL, TQ-PCL ve 5-Fu-TQ-PCL nanopartiküllerinin MTT yöntemi ile kanser hücreleri üzerindeki inhibe edici etkinliğinin ve sitotoksik etkilerinin incelenmesi için L929 fare fibroblast ve AGS mide kanseri hücre hattı kullanılmıştır. Çalışmada tüm formülasyonların 25-500 µg/mL konsantrasyon aralığı değerlendirilmiştir.

5-Florourasil antikanser ilacının, Timokinon ve 5-Florourasil+Timokinon'nun 25-500 µg/mL arasındaki konsantrasyonlarda AGS mide kanseri hücre hattında 24, 48 ve 72 saat inkübasyon süresi sonrası hücre canlılığı MTT yöntemi ile ölçülmüştür.

AGS mide kanseri hücre hattı üzerinde 5-Fluorourasil, Timokinon ve kombinasyon gruplarının MTT testi sonuçlarına göre tüm konsantrasyon gruplarında zamana göre kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığında düşüş yaşanmıştır. Timokinon grubunda en düşük hücre canlılığı %86,23 ± 6,76 ile 72 saatin sonunda 500 µg/mL konsantrasyonunda görülmüştür. 5-Fluorurasil grubunda hücre canlılığı 100 µg/mL konsantrasyonunda %69,72 ± 4,51 iken, 250 µg/mL konsantrasyonunda %45,73 ± 1,98, 500 µg/mL konsantrasyonunda ise %43,08 ± 2,71 olarak ölçülmüştür. 5-Fluorourasil+Timokinon grubunda ise %70 toksisite sınırını geçmiş olup, 500 µg/mL konsantrasyonunda %44,91 ± 2,7 hücre canlılığı görülmüştür.

72 saat sonundaki 5-Fu, TQ, ve 5-Fu-TQ formülasyonlarındaki ölçümlerde en düşük hücre canlılığı 5-Florourasil antikanser ilacında görülmüştür fakat 5-Fu-TQ formülasyonunda da aynı konsantrasyonlarda yakın bir toksisite gözlemlenmiştir.

Yine AGS mide kanseri hücre hattında 24, 48 ve 72 saat inkübasyon süresi sonrası MTT yöntemi ile canlılıkları ölçülen 25-500 µg/mL farklı konsantrasyonlardaki 5-Fu-PCL, TQ-PCL ve 5-Fu-TQ-PCL nanopartiküllerinin 72 saat sonunda 500 µg/mL konsantrasyonundaki canlılıkları sırasıyla; 5-Fu-PCL için %46,00 ± 6,16, TQ-PCL için %64,79 ± 3,45, 5-Fu-TQ-PCL için %41,91 ± 2,86 olarak ölçülmüştür.

Polikaprolakton nanopartiküllerinin AGS mide kanseri hücre hattında serbest formdaki formülasyonlardan daha yüksek toksisite gösterdiği, kombinasyon grubunun tüm konsantrasyonlarında hücre canlılığının toksik sınırın altında kaldığı gözlemlenmiştir.

Çalışmamızda 5-Fu-PCL ve 5-Fu-TQ-PCL nanopartiküllerinin sadece 5-Fluorourasil ve 5-Fluorourasil-Timokinon kombinasyonuna göre 72 saat sonunda hücre canlılığı daha düşüktü bunun sebebi polikaprolaktonun sürekli salım yaparak hücreleri uyarması ve sürekli bir sitotoksisiteye maruz bırakmasıdır. 5-Fu-TQ-PCL nanopartiküllerinin 5-Fu-PCL nanopartiküllerinden daha düşük hücre canlılığına sahip olması TQ'nun 5-Fu'nun kanser hücreleri üzerindeki etkinliğini artırdığını düşündürtmüştür. Aynı zamanda en düşük hücre canlılığının 5-Fu-TQ-PCL nanopartiküllerine ait olması ise daha etkili bir antikanser adayı olma hipotezimizi doğrulamıştır. Ayrıca serbest formda TQ'nun hücre içine alınamaması polikaprolakton içerisinde hücreye girebilmesi ise toksisiteyi artırmıştır. Tek başına Timokinon'un 72 saat sonunda AGS hücreleri üzerinde toksisitesi ise 86,23 ± 6,76'dir. Ancak TQ-PCL 64,8±3,45 olarak gözlemlenmiştir. Mona ve ark. yaptığı çalışmada TQ yüklü PCL nanopartiküllerinin fare kolorektal tümör hücrelerinde *in vivo* testi sonucu serbest timokinona kıyasla PCL kaplı timokinonların tümör boyutlarında önemli ölçüde küçülme olduğunu tespit etmişlerdir [144]. Bizim çalışmamızda da literatüre uygun olarak TQ-PCL daha yüksek bir antitümör etki göstermiştir. Bu da timokinonun düşük suda çözünürlüğünden dolayı hücrelere alınanaması biyoyararlanımının düşük olduğunu ancak PCL ile kaplanması sonucu hücre içerisine girebildiği ve daha etkili sonuç gösterdiğini düşündürmektedir.

L929 fare fibroblast hücre hattında 24, 48 ve 72 saat inkübasyon süresi sonrası 5-Florourasil ve Timokinon yüklü TQ-PCL, 5-Fu-PCL, 5-Fu-TQ-PCL nanopartiküllerinin 25 µg/mL - 500 µg/mL arasında sitotoksik etkileri MTT yöntemi ile incelenmiştir. İncelenen tüm gruplarda artan konsantrasyona göre sitotoksik etki artmış olup 72 saatin sonunda en düşük hücre canlılığı kontrole kıyasla %79,18 ± 5,32 5-Fu-PCL grubunda olmuştur. Böylece sentezlenen nanopartiküllerin sağlıklı hücre hattında toksik etkiye sebep olmadığı görülmüştür.

Çalışmamızda sentezlenen ve kombinasyonunu önerdiğimiz 5-Fluorourasil ve Timokinon bitkisel bileşiğiinin Polikaprolakton içerisine kapsüllenmesiyle 5-Fluorourasil antikanser ilacının sağlıklı hücreler üzerinde toksik etkisini azaltabileceği, Timokinon'un biyoyararlanımının artırılabileceği gibi aynı zamanda antikanser etkiyi de artırabileceği sonucuna varılmaktadır.

Bu tez kapsamında ilk kez elde edilen sonuçlar aşağıdakilerden oluşmaktadır;

1. İlk kez Timokinon kullanılarak sentezlenen polikaprolakton nanopartiküllerinin AGS mide kanseri hücreleri üzerinde inhibe edici etkinliği incelenmiştir.
2. İlk kez 5-Fluorourasil ve Timokinon'un birlikte kullanımının AGS mide kanseri hücre hattı üzerinde etkinliiği incelenmiştir.
3. Ayrıca, ilk kez 5-Fluorourasil ve Timokinon'un PCL ile kapsüllenmesi ve antikanser ilaç iletim sistemi olarak AGS hücrelerinde değerlendirilmesi yapılmıştır.
4. 5-Fu-PCL, TQ-PCL ve 5-Fu-TQ-PCL nanopartiküllerinin sitotoksik etkisinin olmadığı, fakat AGS mide kanseri hücreleri üzerinde ise 5-Fu-TQ-PCL grubunun inhibe edici etkinliği güçlendirdiği görülmüştür.
5. 5-Fu-PCL, TQ-PCL ve 5-Fu-TQ-PCL nanopartiküllerinin ilaç salımının uzun süre devam ettiği böylece tümör hücrelerinde oluşan ilaç direncine önemli bir alternatif yaklaşım olmaktadır.

Öneriler

1. 5-Fu-PCL, TQ-PCL ve 5-Fu-TQ-PCL nanopartiküllerinin in-vivo antitümör etkinliğinin incelenmesi
2. Sentezlenen nanopartiküllerin AGS mide kanserinde antitümör etkinliği incelendi, dirençli mide kanseri hücre hatlarında da etkinliklerinin incelenmesi
3. Timokinon'un antibakteriyel özelliği olduğu bilinmektedir, sentezlenen TQ-PCL ve 5-Fu-TQ-PCL nanopartiküllerin Helicobacter pylori ilişkili mide kanserinde etkinliğinin incelenmesi

4. PCL nanopartiküllerin mide duvarındaki hedef tümör dokularına ulaşabilmesi ve mide mukoza bariyerini geçebilmesi için yüzey modifikasyonlarının yapılarak antitümör etkinliğinin incelenmesi

KAYNAKÇA

[1] H. Sung *et al.*, "Global cancer statistics 2020: Globocan estimates of ıncidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries," *CA Cancer J Clin*, vol. 71, no. 3, pp. 209–249, May 2021, doi: 10.3322/CAAC.21660.

[2] T.C. Sağlık Bakanlığı Kanser İstatistikleri. (2021). T.C. Sağlık Bakanlığı Kanser İstatistikleri: https://www.saglik.gov.tr/TR,89801/saglik-istatistikleri-yilligi-2020-yayinlanmistir.html adresinden erişim sağlandı.

[3] M. Plummer, S. Franceschi, J. Er^ Ome Vignat, D. Forman, and C. de Martel, "Global burden of gastric cancer attributable to Helicobacter pylori Helicobacter pylori in gastric cancer," *Int. J. Cancer*, vol. 136, pp. 487–490, 2015, doi: 10.1002/ijc.28999.

[4] L. H. Eusebi, A. Telese, G. Marasco, F. Bazzoli, and R. M. Zagari, "Gastric cancer prevention strategies: A global perspective," *J Gastroenterol Hepatol*, vol. 35, no. 9, pp. 1495–1502, Sep. 2020, doi: 10.1111/JGH.15037.

[5] M. C. Camargo *et al.*, "Determinants of Epstein-Barr virus-positive gastric cancer: an international pooled analysis," *Br J Cancer*, vol. 105, pp. 38–43, 2011, doi: 10.1038/bjc.2011.215.

[6] F. M. Johnston and M. Beckman, "Updates on Management of Gastric Cancer," *Current Oncology Reports*, vol. 21, no. 8. Current Medicine Group LLC 1, Aug. 01, 2019. doi: 10.1007/s11912-019-0820-4.

[7] M. Jayanathan *et al.*, "MAGIC versus MacDonald treatment regimens for gastric cancer: Trends and predictors of multimodal therapy for gastric cancer using the National Cancer Database," *Am J Surg*, vol. 219, no. 1, pp. 129–135, Jan. 2020, doi: 10.1016/j.amjsurg.2019.06.005.

[8] S.-E. Al-Batran *et al.*, "Perioperative chemotherapy with docetaxel, oxaliplatin, and fluorouracil/leucovorin (FLOT) versus epirubicin, cisplatin, and fluorouracil or capecitabine (ECF/ECX) for resectable gastric or gastroesophageal junction (GEJ) adenocarcinoma (FLOT4-AIO): A multicenter, randomized phase 3 trial.," *https://doi.org/10.1200/JCO.2017.35.15_suppl.4004*, vol. 35, no. 15_suppl, pp. 4004–4004, May 2017, doi: 10.1200/JCO.2017.35.15_SUPPL.4004.

[9] T. MASUISHI *et al.*, "FOLFOX as First-line Therapy for Gastric Cancer with Severe Peritoneal Metastasis," *Anticancer Res*, vol. 37, no. 12, 2017.

[10] Y. J. Bang *et al.*, "Adjuvant capecitabine and oxaliplatin for gastric cancer after D2 gastrectomy (CLASSIC): A phase 3 open-label, randomised controlled trial," *The Lancet*, vol. 379, no. 9813, pp. 315–321, Jan. 2012, doi: 10.1016/S0140-6736(11)61873-4.

[11] D. Sargent *et al.*, "Evidence for Cure by Adjuvant Therapy in Colon Cancer: Observations Based on Individual Patient Data From 20,898 Patients on 18 Randomized Trials," *J Clin Oncol*, vol. 27, pp. 872–877, 2009, doi: 10.1200/JCO.2008.19.5362.

[12] D. B. Longley, D. P. Harkin, and P. G. Johnston, "5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies," *Nature Reviews Cancer 2003 3:5*, vol. 3, no. 5, pp. 330–338, May 2003, doi: 10.1038/nrc1074.

[13] W. B. Parker and Y. C. Cheng, "Metabolism and mechanism of action of 5-fluorouracil," *Pharmacol Ther*, vol. 48, no. 3, pp. 381–395, Jan. 1990, doi: 10.1016/0163-7258(90)90056-8.

[14] Ratio of 2'-deoxyadenosine-5'-triphosphate/thymidine-5'-triphosphate influences the commitment of human colon carcinoma cells to thymineless death - PubMed.

[15] R. E. Sexton, M. N. al Hallak, M. Diab, and A. S. Azmi, "Gastric cancer: a comprehensive review of current and future treatment strategies," *Cancer and Metastasis Reviews 2020 39:4*, vol. 39, no. 4, pp. 1179–1203, Sep. 2020, doi: 10.1007/S10555-020-09925-3.

[16] K. Greish, "Enhanced permeability and retention of macromolecular drugs in solid tumors: A royal gate for targeted anticancer nanomedicines", vol. 15, no. 7–8, pp. 457–464, Aug. 2008, doi: 10.1080/10611860701539584.

[17] S. K. Golombek *et al.*, "Tumor targeting via EPR: Strategies to enhance patient responses," *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 130, pp. 17–38, May 2018, doi: 10.1016/J.ADDR.2018.07.007.

[18] I. M. Adjei, M. N. Temples, S. B. Brown, and B. Sharma, "Targeted Nanomedicine to Treat Bone Metastasis," *Pharmaceutics*, vol. 10, no. 4, Dec. 2018, doi: 10.3390/PHARMACEUTICS10040205.

[19] J. K. Patra *et al.*, "Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects," *Journal of Nanobiotechnology 2018 16:1*, vol. 16, no. 1, pp. 1–33, Sep. 2018, doi: 10.1186/S12951-018-0392-8.

[20] V. Taghipour-Sabzevar, T. Sharifi, and M. M. Moghaddam, "Polymeric nanoparticles as carrier for targeted and controlled delivery of anticancer agents," *https://doi.org/10.4155/tde-2019-0044*, vol. 10, no. 8, pp. 527–550, Sep. 2019, doi: 10.4155/TDE-2019-0044.

[21] F. Majolo, L. K. de Oliveira Becker Delwing, D. J. Marmitt, I. C. Bustamante-Filho, and M. I. Goettert, "Medicinal plants and bioactive natural compounds for cancer treatment: Important advances for drug discovery," *Phytochem Lett*, vol. 31, pp. 196–207, Jun. 2019, doi: 10.1016/j.phytol.2019.04.003.

[22] H. Gali-Muhtasib, N. El-Najjar, and R. Schneider-Stock, "The medicinal potential of black seed (Nigella sativa) and its components," *Advances in Phytomedicine*, vol. 2, no. C, pp. 133–153, Jan. 2006, doi: 10.1016/S1572-557X(05)02008-8.

[23] E. M. Yimer, K. B. Tuem, A. Karim, N. Ur-Rehman, and F. Anwar, "Review Article Nigella sativa L. (Black Cumin): A Promising Natural Remedy for Wide Range of Illnesses," 2019, doi: 10.1155/2019/1528635.

[24] S. Ahmad and Z. H. Beg, "Hypolipidemic and antioxidant activities of thymoquinone and limonene in atherogenic suspension fed rats," *Food*

Chem, vol. 138, no. 2–3, pp. 1116–1124, Jun. 2013, doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2012.11.109.

[25] K. M. Fararh, Y. Atoji, Y. Shimizu, T. Shiina, H. Nikami, and T. Takewaki, "Mechanisms of the hypoglycaemic and immunopotentiating effects of Nigella sativa L. oil in streptozotocin-induced diabetic hamsters," *Res Vet Sci*, vol. 77, no. 2, pp. 123–129, Oct. 2004, doi: 10.1016/J.RVSC.2004.03.002.

[26] M. K. Cobourne-Duval, E. Taka, P. Mendonca, K. F. A. Soliman, and K. F. A. Soliman, "Thymoquinone increases the expression of neuroprotective proteins while decreasing the expression of pro-inflammatory cytokines and the gene expression NFκB pathway signaling targets in LPS/IFNγ-activated BV-2 microglia cells HHS Public Access," *J Neuroimmunol*, vol. 320, pp. 87–97, 2018, doi: 10.1016/j.jneuroim.2018.04.018.

[27] N. M. Elsherbiny and M. El-Sherbiny, "Thymoquinone attenuates Doxorubicin-induced nephrotoxicity in rats: Role of Nrf2 and NOX4," *Chem Biol Interact*, vol. 223, pp. 102–108, Nov. 2014, doi: 10.1016/J.CBI.2014.09.015.

[28] C. C. Woo, A. P. Kumar, G. Sethi, and K. H. B. Tan, "Thymoquinone: Potential cure for inflammatory disorders and cancer," *Biochem Pharmacol*, vol. 83, no. 4, pp. 443–451, Feb. 2012, doi: 10.1016/J.BCP.2011.09.029.

[29] S. Darakhshan, A. Bidmeshki Pour, A. Hosseinzadeh Colagar, and S. Sisakhtnezhad, "Thymoquinone and its therapeutic potentials," *Pharmacol Res*, vol. 95–96, pp. 138–158, May 2015, doi: 10.1016/J.PHRS.2015.03.011.

[30] W.-Q. Zhu, J. Wang, X.-F. Guo, Z. Liu, and W.-G. Dong, "Thymoquinone inhibits proliferation in gastric cancer via the STAT3 pathway *in vivo* and *in vitro*," *World J Gastroenterol*, vol. 22, no. 16, pp. 4149–4159, 2016, doi: 10.3748/wjg.v22.i16.4149.

[31] F. Graziano, B. Humar, and P. Guilford, "The role of the E-cadherin gene (CDH1) in diffuse gastric cancer susceptibility: From the laboratory to clinical practice," *Annals of Oncology*, vol. 14, no. 12, pp. 1705–1713, Dec. 2003, doi: 10.1093/ANNONC/MDG486.

[32] W. Luo, F. Fedda, P. Lynch, and D. Tan, "CDH1 Gene and Hereditary Diffuse Gastric Cancer Syndrome: Molecular and Histological Alterations and Implications for Diagnosis And Treatment," *Front. Pharmacol*, vol. 9, p. 1421, 2018, doi: 10.3389/fphar.2018.01421.

[33] G. Keller *et al.*, "Diffuse Type Gastric and Lobular Breast Carcinoma in a Familial Gastric Cancer Patient with an E-Cadherin Germline Mutation," *Am J Pathol*, vol. 155, no. 2, pp. 337–342, Aug. 1999, doi: 10.1016/S0002-9440(10)65129-2.

[34] K. F. Becker, M. J. Atkinson, U. Reich, I. Becker, H. Nekarda, and J. R. Siewert, "E-Cadherin Gene Mutations Provide Clues to Diffuse Type Gastric Carcinomas," *Cancer Res*, vol. 54, no. 14, pp. 3845–3852, Jul. 1994.

[35] G. Tamura *et al.*, "Inactivation of the E-Cadherin Gene in Primary Gastric Carcinomas and Gastric Carcinoma Cell Lines," *Japanese Journal of Cancer Research*, vol. 87, no. 11, pp. 1153–1159, Nov. 1996, doi: 10.1111/J.1349-7006.1996.TB03125.X.

[36] M. Rhyu, W. Park, Y. Jung, S. Choi, and S. J. Meltzer, "Allelic Deletions of MCC/APC and ~53 Are Frequent Late Events in Human Gastric Carcinogenesis".

[37] A. R. Yusefi, K. B. Lankarani, P. Bastani, M. Radinmanesh, and Z. Kavosi, "Risk Factors for Gastric Cancer: A Systematic Review," *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, vol. 19, no. 3, pp. 591–603, Mar. 2018, doi: 10.22034/APJCP.2018.19.3.591.

[38] H. Gu, "Role of Flagella in the Pathogenesis of Helicobacter pylori," *Curr Microbiol*, vol. 74, no. 7, pp. 863–869, Jul. 2017, doi: 10.1007/S00284-017-1256-4/TABLES/1.

[39] P. Malfertheiner *et al.*, "Management of Helicobacter pylori infection—the Maastricht V/Florence Consensus Report," *Gut*, vol. 66, no. 1, pp. 6–30, Jan. 2017, doi: 10.1136/GUTJNL-2016-312288.

[40] C. de Martel *et al.*, "Global burden of cancers attributable to infections in 2008: A review and synthetic analysis," *Lancet Oncol*, vol. 13, no. 6, pp. 607–615, Jun. 2012, doi: 10.1016/S1470-2045(12)70137-7.

[41] M. Bagirova, A. M. Allahverdiyev, E. S. Abamor, H. Aliyeva, G. Unal, and T. D. Tanalp, "An overview of challenges to eradication of H. pylori infection and future prospects."

[42] J. G. Kusters, A. H. M. van Vliet, and E. J. Kuipers, "Pathogenesis of Helicobacter pylori Infection," *Clin Microbiol Rev*, vol. 19, no. 3, p. 449, Jul. 2006, doi: 10.1128/CMR.00054-05.

[43] H. Ashktorab *et al.*, "H. pylori-induced apoptosis in human gastric cancer cells mediated via the release of AIF from mitochondria", doi: 10.1111/j.1523-5378.2008.00646.x.

[44] J. Khatoon, R. P. Rai, and K. N. Prasad, "Role of Helicobacter pylori in gastric cancer: Updates," *World J Gastrointest Oncol*, vol. 8, no. 2, p. 147, Feb. 2016, doi: 10.4251/WJGO.V8.I2.147.

[45] E. C. Smyth, M. Nilsson, H. I. Grabsch, N. C. van Grieken, and F. Lordick, "Gastric cancer," *The Lancet*, vol. 396, no. 10251, pp. 635–648, Aug. 2020, doi: 10.1016/S0140-6736(20)31288-5.

[46] S. Y. Chen, R. G. Zhang, and G. C. Duan, "Pathogenic mechanisms of the oncoprotein CagA in H. pylori-induced gastric cancer (Review)," *Oncol Rep*, vol. 36, no. 6, pp. 3087–3094, Dec. 2016, doi: 10.3892/OR.2016.5145.

[47] B. M. Roesler, E. M. A. Rabelo-Gonçalves, and J. M. R. Zeitune, "Virulence Factors of Helicobacter pylori: A Review," *Clin Med Insights Gastroenterol*, vol. 7, no. 7, p. 9, 2014, doi: 10.4137/CGAST.S13760.

[48] "Gastric Cancer: Diagnosis and Treatment Options - American Family Physician," 2004, Accessed: Dec. 21, 2022.

[49] G. Maconi, G. Manes, and G. B. Porro, “Role of symptoms in diagnosis and outcome of gastric cancer,” *World Journal of Gastroenterology : WJG*, vol. 14, no. 8, p. 1149, Feb. 2008, doi: 10.3748/WJG.14.1149.

[50] T. Takahashi, Y. Saikawa, and Y. Kitagawa, “Gastric Cancer: Current Status of Diagnosis and Treatment,” *Cancers (Basel)*, vol. 5, pp. 48–63, 2013, doi: 10.3390/cancers5010048.

[51] K. Kinkel, Y. Lu, M. Both, R. S. Warren, and R. F. Thoeni, “Detection of Hepatic Metastases from Cancers of the Gastrointestinal Tract by Using Noninvasive Imaging Methods (US, CT, MR Imaging, PET): A Meta-Analysis1,” *https://doi.org/10.1148/radiol.2243011362*, vol. 224, no. 3, pp. 748–756, Sep. 2002, doi: 10.1148/RADIOL.2243011362.

[52] H. Jadvar, R. Tatlidil, A. A. Garcia, and P. S. Conti, “Evaluation of recurrent gastric malignancy with [F-18]-FDG positron emission tomography,” *Clin Radiol*, vol. 58, no. 3, pp. 215–221, Mar. 2003, doi: 10.1016/S0009-9260(02)00477-4.

[53] M. B. Amin *et al.*, “The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more ‘personalized’ approach to cancer staging,” *CA Cancer J Clin*, vol. 67, no. 2, pp. 93–99, Mar. 2017, doi: 10.3322/caac.21388.

[54] J. Brierley *et al.*, “Global Consultation on Cancer Staging: promoting consistent understanding and use,” *Nat Rev Clin Oncol*, doi: 10.1038/s41571-019-0253-x.

[55] C. Altini *et al.*, “F-FDG PET/CT Role in Staging of Gastric Carcinomas: Comparison with Conventional Contrast Enhancement Computed Tomography”, doi: 10.1097/MD.0000000000000864.

[56] E. van Cutsem, X. Sagaert, B. Topal, K. Haustermans, and H. Prenen, “Gastric cancer,” *The Lancet*, vol. 388, no. 10060, pp. 2654–2664, Nov. 2016, doi: 10.1016/S0140-6736(16)30354-3.

[57] C. Fiorillo *et al.*, “From biology to surgery: One step beyond histology for tailored surgical treatments of gastric cancer,” *Surgical Oncology*, vol. 34. Elsevier Ltd, pp. 86–95, Sep. 01, 2020. doi: 10.1016/j.suronc.2020.04.004.

[58] K. Rawicz-Pruszyński, J. W. van Sandick, J. Mielko, B. Ciseł, and W. P. Polkowski, “Current challenges in gastric cancer surgery: European perspective,” *Surg Oncol*, vol. 27, no. 4, pp. 650–656, Dec. 2018, doi: 10.1016/J.SURONC.2018.08.004.

[59] T. A. Wilson, M. A. Karajannis, and D. H. Harter, “Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics,” *Surg Neurol Int*, vol. 5, no. Supplement, 2014, doi: 10.4103/2152-7806.132138.

[60] C. Manoel *et al.*, “A Randomized Trial Comparing Radiation Therapy Versus Concomitant Radiation Therapy and Chemotherapy in Carcinoma of the Thoracic Esophagus”, doi: 10.1002/1097-0142(19910501)67:9<2258::AID-CNCR2820670908>3.0.CO;2-G.

[61] H. J. Meyer and H. Wilke, “Treatment Strategies in Gastric Cancer,” *Dtsch Arztebl Int*, vol. 108, no. 41, p. 698, Oct. 2011, doi: 10.3238/ARZTEBL.2011.0698.

[62] D. C. Lazar, S. Taban, M. Cornianu, A. Faur, and A. Goldis, “New advances in targeted gastric cancer treatment,” *World J Gastroenterol*, vol. 22, no. 30, p. 6776, Aug. 2016, doi: 10.3748/WJG.V22.I30.6776.

[63] M. Orditura *et al.*, “Treatment of gastric cancer,” *World Journal of Gastroenterology : WJG*, vol. 20, no. 7, p. 1635, Feb. 2014, doi: 10.3748/WJG.V20.I7.1635.

[64] U. Ronellenfitsch *et al.*, “Perioperative chemo(radio)therapy versus primary surgery for resectable adenocarcinoma of the stomach, gastroesophageal junction, and lower esophagus,” *Cochrane Database of Systematic Reviews*, vol. 2013, no. 5, May 2013.

[65] R. Diaz-Nieto, R. Orti-Rodríguez, and M. Winslet, “Post-surgical chemotherapy versus surgery alone for resectable gastric cancer,” *Cochrane Database of Systematic Reviews*, vol. 2013, no. 9, Sep. 2013.

[66] K. Oba *et al.*, “Disease-Free survival as a surrogate for Overall survival in Adjuvant Trials of Gastric Cancer: A Meta-Analysis,” vol. 105, 2013, doi: 10.1093/jnci/djt270.

[67] D. Cunningham *et al.*, “Perioperative Chemotherapy versus Surgery Alone for Resectable Gastroesophageal Cancer,” vol. 355, no. 1, pp. 11–20, Jul. 2006, doi: 10.1056/NEJMOA055531.

[68] M. Ychou *et al.*, “Perioperative chemotherapy compared with surgery alone for resectable gastroesophageal adenocarcinoma: An FNCLCC and FFCD multicenter phase III trial,” *Journal of Clinical Oncology*, vol. 29, no. 13, pp. 1715–1721, May 2011, doi: 10.1200/JCO.2010.33.0597.

[69] Y. J. Bang *et al.*, “Adjuvant capecitabine and oxaliplatin for gastric cancer after D2 gastrectomy (CLASSIC): A phase 3 open-label, randomised controlled trial,” *The Lancet*, vol. 379, no. 9813, pp. 315–321, Jan. 2012, doi: 10.1016/S0140-6736(11)61873-4.

[70] S. Sakuramoto *et al.*, “Adjuvant Chemotherapy for Gastric Cancer with S-1, an Oral Fluoropyrimidine”, Accessed: Dec. 22, 2022.

[71] “Sci-Hub | RETRACTED: Clinical effectiveness of neoadjuvant chemotherapy in advanced gastric cancer: An updated meta-analysis of randomized controlled trials. European Journal of Surgical Oncology (EJSO), 40(10), 1321–1330 | 10.1016/j.ejso.2014.01.006.”

[72] R. Obermannová and F. Lordick, “Management of Metastatic Gastric Cancer,” *Hematol Oncol Clin North Am*, vol. 31, no. 3, pp. 469–483, Jun. 2017, doi: 10.1016/J.HOC.2017.01.006.

[73] E. van Cutsem *et al.*, “Phase III study of docetaxel and cisplatin plus fluorouracil compared with cisplatin and fluorouracil as first-line therapy for advanced gastric cancer: A report of the V325 study group,” Nov. 2006, Accessed: Feb. 11, 2023. Available: https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/128011

[74] Z. Zhu, Y. B. Gong, and H. M. Xu, “Neoadjuvant therapy strategies for advanced gastric cancer: Current innovations and future challenges,” *Chronic Diseases and Translational Medicine*, vol. 6, no. 3. KeAi Communications Co., pp. 147–157, Sep. 01, 2020. doi: 10.1016/j.cdtm.2020.03.004.

[75] E. van Cutsem, X. Sagaert, B. Topal, K. Haustermans, and H. Prenen, “Gastric cancer,” *The Lancet*, vol. 388, no. 10060. Lancet Publishing Group, pp. 2654–2664, Nov. 26, 2016. doi: 10.1016/S0140-6736(16)30354-3.

[76] H. H. Hartgrink, E. P. Jansen, N. C. van Grieken, and C. J. van de Velde, “Gastric cancer,” *The Lancet*, vol. 374, no. 9688, pp. 477–490, Aug. 2009, doi: 10.1016/S0140-6736(09)60617-6.

[77] V. Catalano, R. Labianca, G. D. Beretta, G. Gatta, F. de Braud, and E. van Cutsem, “Gastric cancer,” *Crit Rev Oncol Hematol*, vol. 71, no. 2, pp. 127–164, Aug. 2009, doi: 10.1016/J.CRITREVONC.2009.01.004.

[78] V. Catalano, R. Labianca, G. D. Beretta, G. Gatta, F. de Braud, and E. van Cutsem, “Gastric cancer,” *Crit Rev Oncol Hematol*, vol. 71, no. 2, pp. 127–164, Aug. 2009, doi: 10.1016/J.CRITREVONC.2009.01.004.

[79] A. Cervantes, D. Roda, N. Tarazona, S. Roselló, and J. A. Pérez-Fidalgo, “Current questions for the treatment of advanced gastric cancer,” *Cancer Treat Rev*, vol. 39, no. 1, pp. 60–67, Feb. 2013, doi: 10.1016/j.ctrv.2012.09.007.

[80] K. Yamashita, K. Hosoda, M. Niihara, and N. Hiki, “History and emerging trends in chemotherapy for gastric cancer,” *Ann Gastroenterol Surg*, vol. 5, no. 4, pp. 446–456, Jul. 2021, doi: 10.1002/AGS3.12439.

[81] S. Wadler, M. Green, and F. Muggia, “The role of anthracyclines in the treatment of gastric cancer,” *Cancer Treat Rev*, vol. 12, no. 2, pp. 105–132, Jun. 1985, doi: 10.1016/0305-7372(85)90003-9.

[82] J. S. MacDonald *et al.*, “5-Fluorouracil, doxorubicin, and mitomycin (FAM) combination chemotherapy for advanced gastric cancer,” *Ann Intern Med*, vol. 93, no. 4, pp. 533–536, 1980, doi: 10.7326/0003-4819-93-4-533.

[83] R. J. Fraile, L. H. Baker, T. R. Buroker, J. Horwitz, and V. K. Vaitkevicius, “Pharmacokinetics of 5-Fluorouracil Administered Orally, by Rapid Intravenous and by Slow Infusion1,” 1980, Accessed: Feb. 12, 2023.

[84] L. Kelland, “The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy,” *Nature Reviews Cancer 2007 7:8*, vol. 7, no. 8, pp. 573–584, Jul. 2007, doi: 10.1038/nrc2167.

[85] S. Giacchetti *et al.*, “Phase III multicenter randomized trial of oxaliplatin added to chronomodulated fluorouracil-leucovorin as first-line treatment of metastatic colorectal cancer,” *Journal of Clinical Oncology*, vol. 18, no. 1, pp. 136–147, 2000, doi: 10.1200/JCO.2000.18.1.136.

[86] “Sci-Hub | Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. The Lancet, 355(9209), 1041–1047 | 10.1016/s0140-6736(00)02034-1.”

[87] R. M. Mader, M. Müller, and G. G. Steger, “Resistance to 5-Fluorouracil,” *General Pharmacology: The Vascular System*, vol. 31, no. 5, pp. 661–666, Nov. 1998, doi: 10.1016/S0306-3623(98)00191-8.

[88] P. v. Danenberg, “Thymidylate synthetase - a target enzyme in cancer chemotherapy,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, vol. 473, no. 2, pp. 73–92, Dec. 1977, doi: 10.1016/0304-419X(77)90001-4.

[89] A. Jarmuła, A. Dowierciał, and W. Rode, “A molecular modeling study of the interaction of 2′-fluoro-substituted analogues of dUMP/FdUMP with thymidylate synthase,” *Bioorg Med Chem Lett*, vol. 18, no. 8, pp. 2701–2708, Apr. 2008, doi: 10.1016/J.BMCL.2008.03.016.

[90] N. Zhang, Y. Yin, S. J. Xu, and W. S. Chen, “5-Fluorouracil: Mechanisms of resistance and reversal strategies,” *Molecules*, vol. 13, no. 8, pp. 1551–1569, Aug. 2008, doi: 10.3390/MOLECULES13081551.

[91] M. H. Li *et al.*, “Effect of 5-fluorouracil on G1 phase cell cycle regulation in oral cancer cell lines,” *Oral Oncol*, vol. 40, no. 1, pp. 63–70, Jan. 2004, doi: 10.1016/S1368-8375(03)00136-2.

[92] J. Latchman, A. M. Guastella, and C. Tofthagen, “5-Fluorouracil Toxicity and Dihydropyrimidine Dehydrogenase Enzyme: Implications for Practice Case Study HHS Public Access,” *Clin J Oncol Nurs*, vol. 18, no. 5, pp. 581–585, 2014, doi: 10.1188/14.CJON.581-585.

[93] M. W. Saif, K. N. Syrigos, and N. A. Katirtzoglou, “Expert Opinion on Investigational Drugs S-1: a promising new oral fluoropyrimidine derivative Drug Evaluation S-1: a promising new oral fl uoropyrimidine derivative,” *Expert Opin. Investig. Drugs*, vol. 18, no. 3, pp. 335–348, 2009, doi: 10.1517/13543780902729412.

[94] S. Vodenkova, T. Buchler, K. Cervena, V. Veskrnova, P. Vodicka, and V. Vymetalkova, “5-fluorouracil and other fluoropyrimidines in colorectal cancer: Past, present and future,” *Pharmacol Ther*, vol. 206, p. 107447, Feb. 2020, doi: 10.1016/J.PHARMTHERA.2019.107447.

[95] R. A. Gatenby, R. J. Gillies, and J. S. Brown, “The evolutionary dynamics of cancer prevention,” 2010, doi: 10.1038/nrc2892.

[96] “Sci-Hub | Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. Nature, 501(7467), 346–354 | 10.1038/nature12626.”

[97] K. Oba *et al.*, “Role of chemotherapy for advanced/recurrent gastric cancer: an individual-patient-data meta-analysis,” *Eur J Cancer*, vol. 49, no. 7, pp. 1565–1577, May 2013, doi: 10.1016/J.EJCA.2012.12.016.

[98] D. D. Yuan, Z. X. Zhu, X. Zhang, and J. Liu, “Targeted therapy for gastric cancer: Current status and future directions (Review),” *Oncol Rep*, vol. 35, no. 3, pp. 1245–1254, Mar. 2016, doi: 10.3892/OR.2015.4528/HTML.

[99] E. C. Smyth, B. Msc, D. Cunningham, and F. Fmedsci, “Targeted Therapy for Gastric Cancer,” *Curr Treat Options Oncol*, vol. 13, pp. 377–389, 2012, doi: 10.1007/s11864-012-0192-6.

[100]F. H. Wang *et al.*, "The Chinese Society of Clinical Oncology (CSCO): Clinical guidelines for the diagnosis and treatment of gastric cancer, 2021," *Cancer Commun*, vol. 41, no. 8, pp. 747–795, Aug. 2021, doi: 10.1002/CAC2.12193.

[101] X. Zhu, T. Su, S. Wang, H. Zhou, and W. Shi, "New Advances in Nano-Drug Delivery Systems: Helicobacter pylori and Gastric Cancer," *Frontiers in Oncology*, vol. 12. Frontiers Media S.A., May 10, 2022. doi: 10.3389/fonc.2022.834934.

[102] R. X. Zhang, H. L. Wong, H. Y. Xue, J. Y. Eoh, and X. Y. Wu, "Nanomedicine of synergistic drug combinations for cancer therapy – Strategies and perspectives," *Journal of Controlled Release*, vol. 240, pp. 489–503, Oct. 2016, doi: 10.1016/J.JCONREL.2016.06.012.

[103]N. C. Turner and J. S. Reis-Filho, "Genetic heterogeneity and cancer drug resistance," *Lancet Oncol*, vol. 13, no. 4, pp. e178–e185, Apr. 2012, doi: 10.1016/S1470-2045(11)70335-7.

[104]Y.-H. Miao *et al.*, "Zinc oxide nanoparticles reduce the chemoresistance of gastric cancer by inhibiting autophagy Conflict-of-interest statement: The authors declare no conflict of interest," *World J Gastroenterol*, vol. 27, no. 25, pp. 3851–3862, 2021, doi: 10.3748/wjg.v27.i25.3851.

[105]J. D. Byrne, T. Betancourt, and L. Brannon-Peppas, "Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics," *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 60, no. 15, pp. 1615–1626, Dec. 2008, doi: 10.1016/J.ADDR.2008.08.005.

[106]D. Kalyane, N. Raval, R. Maheshwari, V. Tambe, K. Kalia, and R. K. Tekade, "Employment of enhanced permeability and retention effect (EPR): Nanoparticle-based precision tools for targeting of therapeutic and diagnostic agent in cancer," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 98, pp. 1252–1276, May 2019, doi: 10.1016/J.MSEC.2019.01.066.

[107]I. Khan, K. Saeed, and I. Khan, "Nanoparticles: Properties, applications and toxicities," *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 12, no. 7, pp. 908–931, Nov. 2019, doi: 10.1016/J.ARABJC.2017.05.011.

[108]R. Awasthi, A. Roseblade, P. M. Hansbro, M. J. Rathbone, K. Dua, and M. Bebawy, "Nanoparticles in Cancer Treatment: Opportunities and Obstacles," *Curr Drug Targets*, vol. 19, no. 14, pp. 1696–1709, May 2018, doi: 10.2174/1389450119666180326122831.

[109]N. Sanvicens and M. P. Marco, "Multifunctional nanoparticles – properties and prospects for their use in human medicine," *Trends Biotechnol*, vol. 26, no. 8, pp. 425–433, Aug. 2008, doi: 10.1016/J.TIBTECH.2008.04.005.

[110]S. Bhatia, "Nanoparticles Types, Classification, Characterization, Fabrication Methods and Drug Delivery Applications," *Natural Polymer Drug Delivery Systems*, pp. 33–93, 2016, doi: 10.1007/978-3-319-41129-3_2.

[111]M. Wang and M. Thanou, "Targeting nanoparticles to cancer," *Pharmacol Res*, vol. 62, no. 2, pp. 90–99, Aug. 2010, doi: 10.1016/J.PHRS.2010.03.005.

[112]A. Aghebati-Maleki *et al.*, "Nanoparticles and cancer therapy: Perspectives for application of nanoparticles in the treatment of cancers," *J Cell Physiol*, vol. 235, no. 3, pp. 1962–1972, Mar. 2020, doi: 10.1002/JCP.29126.

[113]E. Blanco, H. Shen, and M. Ferrari, "Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery," *Nature Biotechnology*, vol. 33, no. 9. Nature Publishing Group, pp. 941–951, Sep. 08, 2015. doi: 10.1038/nbt.3330.

[114]L. T. Chen and L. Weiss, "The Role of the Sinus Wall in the Passage of Erythrocytes Through the Spleen," *Blood*, vol. 41, no. 4, pp. 529–537, Apr. 1973, doi: 10.1182/BLOOD.V41.4.529.529.

[115]W. Zauner, N. A. Farrow, and A. M. R. Haines, "*In vitro* uptake of polystyrene microspheres: effect of particle size, cell line and cell density," *Journal of Controlled Release*, vol. 71, no. 1, pp. 39–51, Mar. 2001, doi: 10.1016/S0168-3659(00)00358-8.

[116]A. Prokop and J. M. Davidson, "Nanovehicular Intracellular Delivery Systems," *J Pharm Sci*, vol. 97, no. 9, p. 3518, 2008, doi: 10.1002/JPS.21270.

[117]B. D. Chithrani, A. A. Ghazani, and W. C. W. Chan, "Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells," *Nano Lett*, vol. 6, no. 4, pp. 662–668, Apr. 2006, doi: 10.1021/nl052396o.

[118]F. Tang, L. Li, and D. Chen, "Mesoporous Silica Nanoparticles: Synthesis, Biocompatibility and Drug Delivery," *Advanced Materials*, vol. 24, no. 12, pp. 1504–1534, Mar. 2012, doi: 10.1002/ADMA.201104763.

[119]L. Grislain, P. Couvreur, V. Lenaerts, M. Roland, D. Deprez-Decampeneere, and P. Speiser, "Pharmacokinetics and distribution of a biodegradable drug-carrier," *Int J Pharm*, vol. 15, no. 3, pp. 335–345, Jul. 1983, doi: 10.1016/0378-5173(83)90166-7.

[120]J. A. Champion, Y. K. Katare, and S. Mitragotri, "Particle Shape: A New Design Parameter for Micro-and Nanoscale Drug Delivery Carriers," 2007, doi: 10.1016/j.jconrel.2007.03.022.

[121]J. R. Infante *et al.*, "Phase I and pharmacokinetic study of IHL-305 (PEGylated liposomal irinotecan) in patients with advanced solid tumors", doi: 10.1007/s00280-012-1960-5.

[122]R. R. Patil, R. v. Gaikwad, A. Samad, and P. v. Devarajan, "Role of lipids in enhancing splenic uptake of polymer-lipid (LIPOMER) nanoparticles," *J Biomed Nanotechnol*, vol. 4, no. 3, pp. 359–366, Sep. 2008, doi: 10.1166/JBN.2008.320.

[123]N. S. Oltra, J. Swift, A. Mahmud, K. Rajagopal, S. M. Loverde, and D. E. Discher, "Filomicelles in nanomedicine-from flexible, fragmentable, and ligand-targetable drug carrier designs to combination therapy for brain tumors," *J Mater Chem B*, vol. 1, no. 39, pp. 5177–5185, Oct. 2013, doi: 10.1039/c3tb20431f.

[124]T. Chen *et al.*, "A Strategy in The Design of Micellar Shape for Cancer Therapy," *Adv Healthc Mater*, vol. 1, no. 2, pp. 214–224, Mar. 2012, doi: 10.1002/ADHM.201100040.

[125]F. Alexis, E. Pridgen, L. K. Molnar, and O. C. Farokhzad, "Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles", doi: 10.1021/mp800051m.

[126]M. J. Mitchell, M. M. Billingsley, R. M. Haley, M. E. Wechsler, N. A. Peppas, and R. Langer, "Engineering precision nanoparticles for drug delivery," *Nature Reviews Drug Discovery 2020 20:2*, vol. 20, no. 2, pp. 101–124, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41573-020-0090-8.

[127]N. M. Alsawaftah, N. S. Awad, W. G. Pitt, and G. A. Husseini, "pH-Responsive Nanocarriers in Cancer Therapy," *Polymers*, vol. 14, no. 5. MDPI, Mar. 01, 2022. doi: 10.3390/polym14050936.

[128]E. Abbasi *et al.*, "Dendrimers: synthesis, applications, and properties," 2014, doi: 10.1186/1556-276X-9-247.

[129]A. Barzegar Behrooz *et al.*, "Smart bomb AS1411 aptamer-functionalized/PAMAM dendrimer nanocarriers for targeted drug delivery in the treatment of gastric cancer," *Clinical and Experimental Pharmacology wileyonlinelibrary.com/journal/cep and Physiology*, vol. 44, pp. 41–51, 2017, doi: 10.1111/1440-1681.12670.

[130]M. Rahman, V. Kumar, S. Beg, G. Sharma, O. Prakash Katare, and F. Anwar, "Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology Emergence of liposome as targeted magic bullet for inflammatory disorders: current state of the art," 2016, doi: 10.3109/21691401.2015.1129617.

[131]J. Ahmad *et al.*, "Solid Matrix Based Lipidic Nanoparticles in Oral Cancer Chemotherapy: Applications and Pharmacokinetics," *Curr Drug Metab*, vol. 16, no. 8, pp. 633–644, Nov. 2015, doi: 10.2174/1389200216666150812122128.

[132]Z. Peng *et al.*, "Co-Delivery of Doxorubicin and SATB1 shRNA by Thermosensitive Magnetic Cationic Liposomes for Gastric Cancer Therapy," 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0092924.

[133]"Sci-Hub | Immunotargeted Nanoshells for Integrated Cancer Imaging and Therapy. Nano Letters, 5(4), 709–711 | 10.1021/nl050127s."

[134]"Sci-Hub | A Whole Blood Immunoassay Using Gold Nanoshells. Analytical Chemistry, 75(10), 2377–2381 | 10.1021/ac0262210."

[135]J. Zhang, T. Zhao, F. Han, Y. Hu, and Y. Li, "Photothermal and gene therapy combined with immunotherapy to gastric cancer by the gold nanoshell-based system," *J Nanobiotechnology*, vol. 17, no. 1, Jul. 2019, doi: 10.1186/s12951-019-0515-x.

[136]R. Hardman, "A toxicologic review of quantum dots: Toxicity depends on physicochemical and environmental factors," *Environmental Health Perspectives*, vol. 114, no. 2. pp. 165–172, Feb. 2006. doi: 10.1289/ehp.8284.

[137]T. Jamieson, R. Bakhshi, D. Petrova, R. Pocock, M. Imani, and A. M. Seifalian, "Biological applications of quantum dots," *Biomaterials*, vol. 28, no. 31, pp. 4717–4732, Nov. 2007, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2007.07.014.

[138]Q. Wang, C. Zhang, G. Shen, H. Liu, H. Fu, and D. Cui, "Fluorescent carbon dots as an efficient siRNA nanocarrier for its interference therapy in gastric cancer cells," *J Nanobiotechnology*, vol. 12, no. 1, pp. 1–12, Dec. 2014, doi: 10.1186/S12951-014-0058-0/FIGURES/8.

[139]L. Lacerda, A. Bianco, M. Prato, and K. Kostarelos, "Carbon nanotubes as nanomedicines: From toxicology to pharmacology," *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 58, no. 14, pp. 1460–1470, Dec. 2006, doi: 10.1016/J.ADDR.2006.09.015.

[140]A. Astefanei, O. Núñez, and M. T. Galceran, "Characterisation and determination of fullerenes: A critical review," *Anal Chim Acta*, vol. 882, pp. 1–21, Jul. 2015, doi: 10.1016/J.ACA.2015.03.025.

[141]G. Barbany *et al.*, "Cell-free tumour DNA testing for early detection of cancer – a potential future tool," *J Intern Med*, vol. 286, no. 2, pp. 118–136, Aug. 2019, doi: 10.1111/JOIM.12897.

[142]E. Quijano, S. H. Pun, T. Schluep, and S. Wen, "Impact of tumor-specific targeting on the biodistribution and efficacy of siRNA nanoparticles measured by multimodality *in vivo* imaging," *Mol Ther*, vol. 7, no. S290, 2003.

[143]X. Pan and R. J. Lee, "Tumour-selective drug delivery via folate receptor-targeted liposomes," *Expert Opinion on Drug Delivery*, vol. 1, no. 1. pp. 7–17, Nov. 2004. doi: 10.1517/17425247.1.1.7.

[144]Y. Gazit, J. W. Baish, N. Safabakhsh, M. Leunig, L. T. Baxter, and R. K. Jain, "Fractal Characteristics of Tumor Vascular Architecture During Tumor Growth and Regression," *Microcirculation*, vol. 4, no. 4, pp. 395–402, Dec. 1997, doi: 10.3109/10739689709146803.

[145]S. Raj *et al.*, "Specific targeting cancer cells with nanoparticles and drug delivery in cancer therapy," *Semin Cancer Biol*, vol. 69, pp. 166–177, Feb. 2021, doi: 10.1016/J.SEMCANCER.2019.11.002.

[146]T. F. A. de Greef and E. W. Meijer, "Supramolecular polymers How do they differ from conventional polymers?", Accessed: Dec. 22, 2022.

[147]S. K. Sahoo and V. Labhasetwar, "Nanotech approaches to drug delivery and imaging," *Drug Discov Today*, vol. 8, no. 24, pp. 1112–1120, Dec. 2003, doi: 10.1016/S1359-6446(03)02903-9.

[148]K. Letchford and H. Burt, "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, no. 3, pp. 259–269, Mar. 2007, doi: 10.1016/J.EJPB.2006.11.009.

[149]C. M. J. Hu, S. Aryal, and L. Zhang, "Nanoparticle-assisted combination therapies for effective cancer treatment,"

http://dx.doi.org/10.4155/tde.10.13, vol. 1, no. 2, pp. 323–334, Aug. 2010, doi: 10.4155/TDE.10.13.

[150]S. Guo and L. Huang, "Nanoparticles Escaping RES and Endosome: Challenges for siRNA Delivery for Cancer Therapy," *J Nanomater*, vol. 2011, p. 12, 2011, doi: 10.1155/2011/742895.

[151]D. E. Owens and N. A. Peppas, "Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles," *Int J Pharm*, vol. 307, no. 1, pp. 93–102, Jan. 2006, doi: 10.1016/J.IJPHARM.2005.10.010.

[152]S. P. Egusquiaguirre, J. L. Pedraz, R. M. Hernández, and M. Igartua, "Nanotherapeutic Platforms for Cancer Treatment: From Preclinical Development to Clinical Application," *Nanoarchitectonics for Smart Delivery and Drug Targeting*, pp. 813–869, Jul. 2016, doi: 10.1016/B978-0-323-47347-7.00029-X.

[153]Z. Liu, Y. Jiao, Y. Wang, C. Zhou, and Z. Zhang, "Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems," *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 60, no. 15, pp. 1650–1662, Dec. 2008, doi: 10.1016/J.ADDR.2008.09.001.

[154]M. L. Hans and A. M. Lowman, "Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting," *Curr Opin Solid State Mater Sci*, vol. 6, no. 4, pp. 319–327, Aug. 2002, doi: 10.1016/S1359-0286(02)00117-1.

[155]R. Vivek *et al.*, "Multifunctional HER2-Antibody conjugated polymeric nanocarrier-based drug delivery system for multi-drug-resistant breast cancer therapy," *ACS Appl Mater Interfaces*, vol. 6, no. 9, pp. 6469–6480, May 2014, doi: 10.1021/AM406012G/SUPPL_FILE/AM406012G_SI_001.PDF.

[156]C. Zheng *et al.*, "Indocyanine green-loaded biodegradable tumor targeting nanoprobes for *in vitro* and *in vivo* imaging," *Biomaterials*, vol. 33, no. 22, pp. 5603–5609, Aug. 2012, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2012.04.044.

[157]R. Tong, V. J. Coyle, L. Tang, A. M. Barger, T. M. Fan, and J. Cheng, "Polylactide nanoparticles containing stably incorporated cyanine dyes for *in vitro* and *in vivo* imaging applications," *Microsc Res Tech*, vol. 73, no. 9, pp. 901–909, Sep. 2010, doi: 10.1002/JEMT.20824.

[158]Y. Ma, M. Sadoqi, and J. Shao, "Biodistribution of indocyanine green-loaded nanoparticles with surface modifications of PEG and folic acid," *Int J Pharm*, vol. 436, no. 1–2, pp. 25–31, Oct. 2012, doi: 10.1016/J.IJPHARM.2012.06.007.

[159]N. Ahmad, R. Ahmad, A. Alam, and F. J. Ahmad, "Enhancement of oral bioavailability of doxorubicin through surface modified biodegradable polymeric nanoparticles," *Chem Cent J*, vol. 12, p. 65, 2018, doi: 10.1186/s13065-018-0434-1.

[160]Y. Çirpanli *et al.*, "Antitumoral activity of camptothecin-loaded nanoparticles in 9L rat glioma model," *Int J Pharm*, vol. 403, no. 1–2, pp. 201–206, Jan. 2011, doi: 10.1016/J.IJPHARM.2010.10.015.

[161]J. Guo *et al.*, "Aptamer-functionalized PEG–PLGA nanoparticles for enhanced anti-glioma drug delivery," *Biomaterials*, vol. 32, no. 31, pp. 8010–8020, Nov. 2011, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2011.07.004.

[162]V. Khanna, S. Kalscheuer, A. Kirtane, W. Zhang, and J. Panyam, "Perlecan-targeted nanoparticles for drug delivery to triple-negative breast cancer," *https://doi.org/10.4155/fdd-2019-0005*, vol. 1, no. 1, Jul. 2019, doi: 10.4155/FDD-2019-0005.

[163]J.-D. Yuan *et al.*, "Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology pH-sensitive polymeric nanoparticles of mPEG-PLGA-PGlu with hybrid core for simultaneous encapsulation of curcumin and doxorubicin to kill the heterogeneous tumour cells in breast cancer", doi: 10.1080/21691401.2017.1423495.

[164]D. Hu *et al.*, "Oxygen-generating Hybrid Polymeric Nanoparticles with Encapsulated Doxorubicin and Chlorin e6 for Trimodal Imaging-Guided Combined Chemo-Photodynamic Therapy," *Theranostics*, vol. 8, no. 6, 2018, doi: 10.7150/thno.22989.

[165]V. Shafiei-Irannejad *et al.*, "Reversion of Multidrug Resistance by Co-Encapsulation of Doxorubicin and Metformin in Poly(lactide-co-glycolide)-d-α-tocopherylpolyethyleneglycol1000succinate nanoparticles", doi: 10.1007/s11095-018-2404-7.

[166]J. Gao, J. Liu, F. Xie, Y. Lu, C. Yin, and X. Shen, "Co-Delivery of Docetaxel and Salinomycin to Target Both Breast Cancer Cells and Stem Cells by PLGA/TPGS Nanoparticles," *Int J Nanomedicine*, vol. 14, p. 9199, 2019, doi: 10.2147/IJN.S230376.

[167]D. Zhu *et al.*, "Docetaxel (DTX)-loaded polydopamine-modified TPGS-PLA nanoparticles as a targeted drug delivery system for the treatment of liver cancer," *Acta Biomater*, vol. 30, pp. 144–154, Jan. 2016, doi: 10.1016/J.ACTBIO.2015.11.031.

[168]J. Hu *et al.*, "Paclitaxel-loaded polymeric nanoparticles combined with chronomodulated chemotherapy on lung cancer: *In vitro* and *in vivo* evaluation," *Int J Pharm*, vol. 516, no. 1–2, pp. 313–322, Jan. 2017, doi: 10.1016/J.IJPHARM.2016.11.047.

[169]M. Jin, G. Jin, L. Kang, L. Chen, Z. Gao, and W. Huang, "Smart polymeric nanoparticles with pH-responsive and PEG-detachable properties for co-delivering paclitaxel and survivin siRNA to enhance antitumor outcomes," *Int J Nanomedicine*, vol. 13, p. 2405, Apr. 2018, doi: 10.2147/IJN.S161426.

[170]D. Zhang *et al.*, "Gambogic acid-loaded PEG–PCL nanoparticles act as an effective antitumor agent against gastric cancer," vol. 23, no. 1, pp. 33–40, Jan. 2017, doi: 10.1080/10837450.2017.1295068.

[171]"Sci-Hub | Studies of Polymerization and Ring Formation. XXIII.1ε-Caprolactone and its Polymers. Journal of the American Chemical Society, 56(2), 455–457 | 10.1021/ja01317a053."

[172]V. R. Sinha, K. Bansal, R. Kaushik, R. Kumria, and A. Trehan, "Poly-ϵ-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview," *Int J Pharm*, vol. 278, no. 1, pp. 1–23, Jun. 2004, doi: 10.1016/J.IJPHARM.2004.01.044.

[173]N. R. Nair, V. C. Sekhar, K. M. Nampoothiri, and A. Pandey, “Biodegradation of Biopolymers,” *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Production, Isolation and Purification of Industrial Products*, pp. 739–755, Jan. 2017, doi: 10.1016/B978-0-444-63662-1.00032-4.

[174]M. A. Woodruff and D. W. Hutmacher, “The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century,” *Prog Polym Sci*, vol. 35, no. 10, pp. 1217–1256, Oct. 2010, doi: 10.1016/J.PROGPOLYMSCI.2010.04.002.

[175]“Sci-Hub | MonoMax Suture: A New Long-Term Absorbable Monofilament Suture Made from Poly-4-Hydroxybutyrate. International Journal of Polymer Science, 2012, 1–12 | 10.1155/2012/216137.”

[176]“Permeability Properties of Plastics and Elastomers - Laurence W. McKeen - Google Books.(accessed Dec. 22, 2022).

[177]“PCL.” https://polymerdatabase.com/Polymer%20Brands/PCL.html (accessed Dec. 22, 2022).

[178]S. Pagola, A. Benavente, A. Raschi, E. Romano, M. A. A. Molina, and P. W. Stephens, “Crystal structure determination of thymoquinone by high-resolution x-ray powder diffraction,” *AAPS PharmSciTech*, vol. 5, no. 2, 2004, doi: 10.1208/PT050228.

[179]H. Gali-Muhtasib, N. El-Najjar, and R. Schneider-Stock, “The medicinal potential of black seed (Nigella sativa) and its components,” *Advances in Phytomedicine*, vol. 2, no. C, pp. 133–153, Jan. 2006, doi: 10.1016/S1572-557X(05)02008-8.

[180]S. Darakhshan, A. Bidmeshki Pour, A. Hosseinzadeh Colagar, and S. Sisakhtnezhad, “Thymoquinone and its therapeutic potentials,” *Pharmacol Res*, vol. 95–96, pp. 138–158, May 2015, doi: 10.1016/J.PHRS.2015.03.011.

[181]N. El-Najjar *et al.*, “Reactive oxygen species mediate thymoquinone-induced apoptosis and activate ERK and JNK signaling”, doi: 10.1007/s10495-009-0421-z.

[182]P. Khalil, S. Masood, A. U. Rehman, F. Khalil, and J. Nawaf, “Preventive Role of Thymoquinone against Certain Chronic Health Issues: A Review,” *International Journal of Nutrition Sciences*, vol. 5, no. 4, pp. 151–158, Dec. 2020, doi: 10.30476/IJNS.2020.87110.1077.

[183]X. Qian, J. Li, J. Ding, Z. Wang, L. Duan, and G. Hu, “Glibenclamide exerts an antitumor activity through reactive oxygen species–c-jun NH(2)-terminal kinase pathway in human gastric cancer cell line MGC-803,” *Biochem Pharmacol*, vol. 76, no. 12, pp. 1705–1715, Dec. 2008, doi: 10.1016/J.BCP.2008.09.009.

[184]H. Gali-Muhtasib, A. Roessner, and R. Schneider-Stock, “Thymoquinone: A promising anti-cancer drug from natural sources,” *Int J Biochem Cell Biol*, vol. 38, no. 8, pp. 1249–1253, Jan. 2006, doi: 10.1016/J.BIOCEL.2005.10.009.

[185]A. R. Hussain *et al.*, “Thymoquinone suppresses growth and induces apoptosis via generation of reactive oxygen species in primary effusion lymphoma,” *Free Radic Biol Med*, vol. 50, no. 8, pp. 978–987, Apr. 2011, doi: 10.1016/J.FREERADBIOMED.2010.12.034.

[186]E. M. Dergarabetian *et al.*, “Thymoquinone induces apoptosis in malignant T-cells via generation of ROS,” *Frontiers in Bioscience - Elite*, vol. 5 E, no. 2, pp. 706–719, Jan. 2013, doi: 10.2741/E651/PDF.

[187]M. A. Khan, M. Tania, S. Fu, and J. Fu, “Thymoquinone, as an anticancer molecule: from basic research to clinical investigation,” *Oncotarget*, vol. 8, no. 31, p. 51907, Aug. 2017, doi: 10.18632/ONCOTARGET.17206.

[188]R. L. Gurung *et al.*, “Thymoquinone Induces Telomere Shortening, DNA Damage and Apoptosis in Human Glioblastoma Cells,” *PLoS One*, vol. 5, no. 8, p. e12124, 2010, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0012124.

[189]H. Zubair *et al.*, “Redox cycling of endogenous copper by thymoquinone leads to ROS-mediated DNA breakage and consequent cell death: putative anticancer mechanism of antioxidants,” *Cell Death & Disease 2013 4:6*, vol. 4, no. 6, pp. e660–e660, Jun. 2013, doi: 10.1038/cddis.2013.172.

[190]A. A. Salem, I. A. el Haty, I. M. Abdou, and Y. Mu, “Interaction of human telomeric G-quadruplex DNA with thymoquinone: A possible mechanism for thymoquinone anticancer effect,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, vol. 1850, no. 2, pp. 329–342, Feb. 2015, doi: 10.1016/J.BBAGEN.2014.10.018.

[191]M. A. Khan, M. Tania, and J. Fu, “Epigenetic role of thymoquinone: impact on cellular mechanism and cancer therapeutics,” *Drug Discov Today*, vol. 24, no. 12, pp. 2315–2322, Dec. 2019, doi: 10.1016/J.DRUDIS.2019.09.007.

[192]H. Gali-Muhtasib, W. A. Kheir, … L. K.-A., and undefined 2004, “Molecular pathway for thymoquinone-induced cell-cycle arrest and apoptosis in neoplastic keratinocytes,” *journals.lww.com*, Accessed: Jan. 07, 2023.

[193]T. Efferth *et al.*, “Thymoquinone as a Potential Adjuvant Therapy for Cancer Treatment: Evidence from Preclinical Studies,” *Frontiers in Pharmacology | www.frontiersin.org*, vol. 1, 2017, doi: 10.3389/fphar.2017.00295.

[194]H. Gali-Muhtasib, M. Ocker, D. K.-J. of cellular, and undefined 2008, “Thymoquinone reduces mouse colon tumor cell invasion and inhibits tumor growth in murine colon cancer models,” *Wiley Online Library*, vol. 12, no. 1, pp. 330–342, Jan. 2008, doi: 10.1111/j.1582-4934.2007.00095.x.

[195]A. Dirican, H. Atmaca, E. Bozkurt, C. Erten, B. Karaca, and R. Uslu, “Novel combination of docetaxel and thymoquinone induces synergistic cytotoxicity and apoptosis in DU-145 human prostate cancer cells by modulating PI3K–AKT pathway,” *Clinical and Translational Oncology*, vol. 17, no. 2, pp. 145–151, Feb. 2015, doi: 10.1007/S12094-014-1206-6/FIGURES/6.

[196]Ç. Şakalar *et al.*, "The combination of thymoquinone and paclitaxel shows anti-tumor activity through the interplay with apoptosis network in triple-negative breast cancer," *Tumor Biology*, vol. 37, no. 4, pp. 4467–4477, Apr. 2016, doi: 10.1007/S13277-015-4307-0/FIGURES/7.

[197]S. Banerjee *et al.*, "Review on Molecular and Therapeutic Potential of Thymoquinone in Cancer," *Nutr Cancer*, vol. 62, no. 7, pp. 938–946, 2010, doi: 10.1080/01635581.2010.509832.

[198]N. Chehl, G. Chipitsyna, Q. Gong, C. J. Yeo, and H. A. Arafat, "Anti-inflammatory effects of the Nigella sativa seed extract, thymoquinone, in pancreatic cancer cells," *HPB*, vol. 11, no. 5, pp. 373–381, Aug. 2009, doi: 10.1111/J.1477-2574.2009.00059.X.

[199]W. Reindl, J. Yuan, A. Krämer, K. Strebhardt, and T. Berg, "Inhibition of Polo-like Kinase 1 by Blocking Polo-Box Domain-Dependent Protein-Protein Interactions," *Chem Biol*, vol. 15, no. 5, pp. 459–466, May 2008, doi: 10.1016/J.CHEMBIOL.2008.03.013.

[200]Z. Yin, Y. Song, and P. H. Rehse, "Thymoquinone Blocks pSer/pThr Recognition by Plk1 Polo-Box Domain As a Phosphate Mimic," *ACS Chem. Biol*, vol. 8, p. 41, 2013, doi: 10.1021/cb3004379.

[201]M. T. Islam *et al.*, "Thymoquinone is Knocking at the Door of Clinical Trial," *Int Arch Med*, vol. 9, no. 122, Aug. 2016, doi: 10.3823/1993.

[202]R. Ullah *et al.*, "Anthelmintic Potential of Thymoquinone and Curcumin on Fasciola gigantica," 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0171267.

[203]F. Forouzanfar, B. S. Fazly Bazzaz, and H. Hosseinzadeh, "Black cumin (Nigella sativa) and its constituent (thymoquinone): a review on antimicrobial effects".

[204]Hosseinzadeh et al Antibacterial Activity of Total Extracts and Essential oil of Nigella Sativa L. Seeds in Mice," 2007, Accessed: Jan. 07, 2023. https://www.researchgate.net/publication/266890908

[205]S. Malik, A. Singh, P. Negi, and V. K. Kapoor, "Thymoquinone: A small molecule from nature with high therapeutic potential," *Drug Discov Today*, vol. 26, no. 11, pp. 2716–2725, Nov. 2021, doi: 10.1016/J.DRUDIS.2021.07.013.

[206]M. M. Gad, A. M. Al-Thobity, S. M. Fouda, A. Raustia, and C. Mohammed Moustafa Ahmed Gad, "Flexural and Surface Properties of PMMA Denture Base Material Modified with Thymoquinone as an Antifungal Agent", doi: 10.1111/jopr.12967.

[207]M. Elmowafy *et al.*, "Enhancement of Bioavailability and Pharmacodynamic Effects of Thymoquinone Via Nanostructured Lipid Carrier (NLC) Formulation," *AAPS PharmSciTech*, doi: 10.1208/s12249-015-0391-0.

[208]G. M. Ganea, S. O. Fakayode, J. N. Losso, C. F. van Nostrum, C. M. Sabliov, and I. M. Warner, "Delivery of phytochemical thymoquinone using molecular micelle modified poly(D, L lactide-co-glycolide) (PLGA)

nanoparticles," *Nanotechnology*, vol. 21, no. 28, p. 285104, Jun. 2010, doi: 10.1088/0957-4484/21/28/285104.

[209]Y. K. Mahmoud and H. M. A. Abdelrazek, "Cancer: Thymoquinone antioxidant/pro-oxidant effect as potential anticancer remedy," *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 115, p. 108783, Jul. 2019, doi: 10.1016/J.BIOPHA.2019.108783.

[210]K. Effenberger, S. Breyer, and R. Schobert, "Terpene Conjugates of the Nigella sativa Seed-Oil Constituent Thymoquinone with Enhanced Efficacy in Cancer Cells", doi: 10.1002/cbdv.200900328.

[211]M. Samy, H. M. Abdallah, H. M. Awad, and M. M. H. Ayoub, "*In vitro* release and cytotoxicity activity of 5-fluorouracil entrapped polycaprolactone nanoparticles," *Polymer Bulletin*, vol. 79, no. 8, pp. 6645–6671, Aug. 2022, doi: 10.1007/s00289-021-03804-9.

[212]S. Pagola, A. Benavente, A. Raschi, E. Romano, M. A. A. Molina, and P. W. Stephens, "Crystal Structure Determination of Thymoquinone by High-Resolution X-Ray Powder Diffraction," *AAPS PharmSciTech*, vol. 5, no. 2, p. 28, 2003, Accessed: Dec. 22, 2022.

[213]M. Koeppel, F. Garcia-Alcalde, F. Glowinski, P. Schlaermann, and T. F. Meyer, "Helicobacter pylori Infection Causes Characteristic DNA Damage Patterns in Human Cells," *Cell Rep*, vol. 11, no. 11, pp. 1703–1713, Jun. 2015, doi: 10.1016/J.CELREP.2015.05.030.

[214]A. D. Wagner *et al.*, "Chemotherapy for advanced gastric cancer," *Cochrane Database of Systematic Reviews*, vol. 2017, no. 8, Aug. 2017, doi: 10.1002/14651858.CD004064.PUB4/FULL.

[215]S. E. Al-Batran and J. A. Ajani, "Impact of chemotherapy on quality of life in patients with metastatic esophagogastric cancer," *Cancer*, vol. 116, no. 11, pp. 2511–2518, Jun. 2010, doi: 10.1002/CNCR.25064.

[216]F. Lordick, S. Lorenzen, Y. Yamada, and D. Ilson, "Optimal chemotherapy for advanced gastric cancer: is there a global consensus?", doi: 10.1007/s10120-013-0297-z.

[217]L. Sun *et al.*, "Preparation of 5-fluorouracil-loaded chitosan nanoparticles and study of the sustained release *in vitro* and *in vivo*," *Asian J Pharm Sci*, vol. 12, no. 5, pp. 418–423, Sep. 2017, doi: 10.1016/J.AJPS.2017.04.002.

[218]C. C. Woo, A. P. Kumar, G. Sethi, and K. H. B. Tan, "Thymoquinone: Potential cure for inflammatory disorders and cancer," *Biochem Pharmacol*, vol. 83, no. 4, pp. 443–451, Feb. 2012, doi: 10.1016/J.BCP.2011.09.029.

[219]S. K. Lai, Y.-Y. Wang, and J. Hanes, "Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal tissues", doi: 10.1016/j.addr.2008.11.002.

[220]A. Treasa Alex, A. Joseph, G. Shavi, J. Venkata Rao, and N. Udupa, "Drug Delivery Development and evaluation of carboplatin-loaded PCL nanoparticles for intranasal delivery Development and evaluation of carboplatin-loaded PCL nanoparticles for intranasal delivery," *Drug Deliv*,

vol. 23, no. 7, pp. 2144–2153, 2016, doi: 10.3109/10717544.2014.948643.

[221]M.M.A. Abdel-Mottaleb, "Biodegradable Thymoquinone Nanoparticles for Higher Therapeutic Efficiency in Murine Colorectal Cancer," 2016.

[222] A. E. Ashour, M. Badran, A. Kumar, T. Hussain, A. Ibrahim, and A. A. E. B. Yassin, "Physical pegylation enhances the cytotoxicity of 5-fluorouracil-loaded PLGA and PCL nanoparticles," *Int J Nanomedicine*, vol. 14, pp. 9259–9273, 2019, doi: 10.2147/IJN.S223368.

[223] R. Ortiz *et al.*, "Poly(butylcyanoacrylate) and Poly(ε-caprolactone) Nanoparticles Loaded with 5-Fluorouracil Increase the Cytotoxic Effect of the Drug in Experimental Colon Cancer," *AAPS Journal*, vol. 17, no. 4, pp. 918–929, Jul. 2015, doi: 10.1208/s12248-015-9761-5.

[224] N. Hu *et al.*, "Strengthening Gastric Cancer Therapy by Trastuzumab-Conjugated Nanoparticles with Simultaneous Encapsulation of Anti-MiR-21 and 5-Fluorouridine," *Cellular Physiology and Biochemistry*, vol. 44, no. 6, pp. 2158–2173, Jan. 2018, doi: 10.1159/000485955.

[225] X. Lei *et al.*, "Thymoquinone inhibits growth and augments 5-fluorouracil-induced apoptosis in gastric cancer cells both in vitro and in vivo," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 417, no. 2, pp. 864–868, Jan. 2012, doi: 10.1016/j.bbrc.2011.12.063.

[226] S. Azimee, M. Rahmati, H. Fahimi, and M. A. Moosavi, "TiO2 nanoparticles enhance the chemotherapeutic effects of 5-fluorouracil in human AGS gastric cancer cells via autophagy blockade," *Life Sci*, vol. 248, May 2020, doi: 10.1016/j.lfs.2020.117466.

[227] K. Öztürk, A. R. Mashal, B. A. Yegin, and S. Çalış, "Preparation and in vitro evaluation of 5-fluorouracil-loaded PCL nanoparticles for colon cancer treatment'', vol. 22, no. 5, pp. 635–641, Jul. 2015, doi: 10.3109/10837450.2015.1116565.

[228] R. C. Mundargi *et al.*, "Development and evaluation of novel biodegradable microspheres based on poly(d,l-lactide-co-glycolide) and poly(ε-caprolactone) for controlled delivery of doxycycline in the treatment of human periodontal pocket: In vitro and in vivo studies," *Journal of Controlled Release*, vol. 119, no. 1, pp. 59–68, May 2007, doi: 10.1016/J.JCONREL.2007.01.008.

[229] M. Badran, M. Mady, M. G.-I. journal of, and undefined 2017, "Preparation and characterization of polymeric nanoparticles surface modified with chitosan for target treatment of colorectal cancer," *Elsevier*.

[230] A. E. Ashour, M. Badran, A. Kumar, T. Hussain, A. Ibrahim, and A. A. E. B. Yassin, "Physical pegylation enhances the cytotoxicity of 5-fluorouracil-loaded PLGA and PCL nanoparticles," *Int J Nanomedicine*, vol. 14, pp. 9259–9273, 2019, doi: 10.2147/IJN.S223368.

[231] R. Ortiz et al., " 5-fluorouracil-loaded poly(ε-caprolactone) nanoparticles combined with phage E gene therapy as a new strategy against colon cancer," Int J Nanomedicine, vol. 7, pp. 95–107, 2012, doi: 10.2147/IJN.S26401.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

[1] Cetin F., Abamor E.,S., "Investigation Of The *In Vitro* Anti-cancer Effects Of 5-Fu And Thymoquı̈none-loaded PCL Nanoparticles on AGS Stomach Cancer Cell'' International Marmara Sciences Congress (IMASCON 2022), Abstract Book, p. 106/670, 2022.