T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

C6 GLİOMA HÜCRE HATTINDA CİSPLATİN VE GİNKGOLİD A YÜKLÜ NANOPARTİKÜLLERİN BİYOLOJİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Ümmügülsüm GÜZELSOY

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU

Eş Danışman

Doç. Dr. Melike ERSÖZ

Kasım, 2022

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

C6 GLİOMA HÜCRE HATTINDA CİSPLATİN VE GİNKGOLİD A YÜKLÜ NANOPARTİKÜLLERİN BİYOLOJİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Ümmügülsüm GÜZELSOY tarafından hazırlanan tez çalışması 19.10.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU Yıldız Teknik Üniversitesi Danışman	Doç. Dr. Melike ERSÖZ Demiroğlu Bilim Üniversitesi Eş-Danışman

Jüri Üyeleri

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

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

Dr. Öğr. Üyesi Sezen CANIM ATEŞ, Üye
İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi _____

Danışmanım Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU ve eş danışmanım Doç. Dr. Melike ERSÖZ sorumluluğunda tarafımca hazırlanan C6 Glioma Hücre Hattında Cisplatin ve Ginkgolid A Yüklü Nanopartiküllerin Biyolojik Etkilerinin İncelenmesi başlıklı çalışmada diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metinde 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.

Ümmügülsüm GÜZELSOY

İmza

Aileme

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim sürecim boyunca desteğini esirgemeyen, hep yanımda olan sevgili tez danışman hocamlarımdan Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU'na,

Sabır ve hoşgörüsüyle değerli bilgilerini aktaran, hep yol gösteren ve bana olan güveniyle beni destekleyen eş danışman hocam Doç. Dr. Melike ERSÖZ'e,

Her zaman bilgi birikimiyle bana yol gösteren değerli hocalarım Doç. Dr. Günnur Demircan ve Doç. Dr. Ayşegül ERDEMİR ÜSTÜNDAĞ'a,

Eğitim sürecimde bana yeni bakış açıları kazandırarak kendimi geliştirmemi sağlayan değerli hocam Dr. Pınar HÜNER OMAY'a,

Tez çalışmalarım süresince desteklerini ve teşviklerini eksik etmeyen kıymetli iş arkadaşlarım Selin AKPINAR, Mine AVCU, Menekşe COŞKUN ve Aykut SİDAL'a,

Her türlü zorluğumda yanımda olan değerli arkadaşlarım Derin GÜNEŞ, Demet GÜNEŞ, Gökhan GÜNEŞ ve hepimize şans getiren Han GÜNEŞ'e,

Akademik yolda her türlü imkanı sunarak, kendimi geliştirmemi sağlayan, hiçbir zaman yardımını esirgemeyen sayın Mert ŞAHİN'e,

Üniversite eğitim hayatımda bana en güzel dostluğu kazandırmış olan ve her zaman destekleriyle yanımda olan, beni her zaman daha iyisine inandıran canım dostlarım Müyeseer KUŞÇU, Damla ALTINCI, Sena ÜNVER, İrem ARSLAN, Cansu TATAR, Cansel KAYA ve Berin Sena ARSLAN-GATZ'a, teşekkürlerimi sunarım.

Thank you to my boyfriend, Melchior FLUGGE, who always motivates and supports me.

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ ix
KISALTMA LİSTESİ x
ŞEKİL LİSTESİ xi
TABLO LİSTESİ xiv
ÖZET xv
ABSTRACT xviii
1 GİRİŞ 1
1.1 Literatür Özeti 1
1.2 Tezin Amacı 2
1.3 Hipotez 3
2 GENEL BİLGİLER 4
2.1 Kanser 4
2.1.1 Beyin Kanseri 6
2.1.2 Glioblastoma Multiforme 7
2.1.3 Glioblastoma Tedavi Stratejileri 9
2.2 Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres 10
2.2.1 Malondialdehit (MDA) Aktivitesi 11
2.3 Antioksidanlar 12
2.3.1 Endojen Kaynaklı Antioksidanlar 14
2.3.2 Eksojen Kaynaklı Antioksidanlar 15
2.4 Apoptoz 18
2.5 Cisplatin 20
2.5.1 Cisplatin'in Moleküler Yapısı 21
2.5.2 Cisplatin'in Hücre İçine Alınışı 21
2.5.3 Cisplatin'in Etki Mekanizması ve Toksisitesi 22
2.6 Ginkgo biloba 23
2.6.1 *Ginkgo biloba* Bileşenleri 25
2.6.2 Ginkgolid A 26
2.7 Polimerik Nanopartiküller (NP) 27
3 MATERYAL- METOD 30
3.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar 30

3.2 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasallar 30
3.3 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kitler 31
3.4 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler 31
3.4.1 NP Hazırlamada Kullanılan Çözeltiler 31
3.5 Deneysel Metodlar 32
3.5.1 Cisplatin Yüklü NP Sentezi 32
3.5.2 Ginkgolid A Yüklü NP Sentezi 33
3.5.3 Cisplatin ve Ginkgolid A Yüklü NP'nin Karakterizasyonu 33
3.5.4 Hücre Kültürü Çalışmaları 35
3.5.5 Stok Solüsyonların Hazırlanması 36
3.5.6 MTT Yöntemi 37
3.5.7 Oksidatif Stres ve Antioksidan Analizleri 37
3.5.9 Yara İyileşmesi Testi 41
3.5.10 İstatistiksel Analizler 41
4 SONUÇ VE ÖNERİLER 42
4.1 Cisplatin'in Kalibrasyon Eğrisi Analizi 42
4.2 Ginkgolid A'nın Kalibrasyon Eğrisi Analizi 42
4.3 Cisplatin yüklü PLGA ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP Sentezi 43
4.4 Cisplatin Yüklü PLGA NP ve Ginkgolid A Yüklü PLGA NP'nin Karakterizasyon Analizi Sonuçları 45
4.4.1 Reaksiyon Verimi (RV) 45
4.4.2 Enkapsülasyon Etkinliği (EE) 45
4.4.3 İlaç Yükleme Kapasitesi (DL) 46
4.4.4 Boyut Analizi ve Çoklu Dağılım İndeksleri (PDI) 46
4.4.5 Zeta Potansiyel Analizi 48
4.4.6 FT-IR Analizi Sonuçları 49
4.4.7 *İn Vitro* Salım Analizi 50
4.5 C6 Glioma Hücre Kültürü 52
4.6 Farklı Konsantrasyonlardaki Cisplatin ve Cisplatin Yüklü PLGA NP'nin C6 Glioma Hücreleri Üzerindeki Etkisi 53
4.7 Farklı Konsantrasyonlardaki Ginkgolid A ve Ginkgolid A Yüklü PLGA NP'nin C6 Glioma Hücreleri Üzerindeki Etkisi 56
4.8 Total Oksidan Seviye (TOS) Ölçüm Sonuçları 59
4.8.1 Cisplatin ve Cisplatin Yüklü PLGA NP ile Muamele Edilen C6 Glioma Hücrelerinde TOS Ölçümü 59

4.8.2 Ginkgolid A ve Ginkgolid A Yüklü PLGA NP ile Muamele Edilen C6 Glioma Hücrelerinde TOS Ölçümü 60
4.9 Total Antioksidan Seviye (TAS) Ölçüm Sonuçları 62
4.9.1 Cisplatin ve Cisplatin Yüklü PLGA NP ile Muamele Edilen C6 Glioma Hücrelerinde TAS Ölçümü 62
4.9.2 Ginkgolid A ve Ginkgolid A Yüklü PLGA NP ile Muamele Edilen C6 Glioma Hücrelerinde TAS Ölçümü 63
4.10 Protein Miktar Tayini 65
4.10.1 Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP için Protein Tayini 65
4.10.2 Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP için Protein Tayini 65
4.11 MDA Aktivite Tayini 65
4.11.1 Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP ile Muamele Edilen C6 Glioma Hücrelerinde MDA Düzeyi 65
4.11.2 Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP ile Muamele Edilen C6 Glioma Hücrelerinde MDA Düzeyi 66
4.12 SOD Aktivite Tayini 68
4.12.1 Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP ile Muamele Edilen C6 Glioma Hücrelerinde SOD Düzeyi 68
4.12.2 Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP ile Muamele Edilen C6 Glioma Hücrelerinde SOD Düzeyi 69
4.13 GSH Aktivite Tayini 70
4.13.1 Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP ile Muamele Edilen C6 Glioma Hücrelerinde GSH Düzeyi 70
4.13.2 Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP ile Muamele Edilen C6 Glioma Hücrelerinde GSH Düzeyi 71
4.14 TUNEL Yöntemi ile Apoptoz Tayini 72
4.14.1 Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP'nin C6 Glioma Hücrelerinde Apoptoz Etkisi 72
4.14.2 Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP'nin C6 Glioma Hücrelerinde Apoptoz Etkisi 76
4.15 Yara İyileşmesi Analizi 80
4.15.1 Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP'nin C6 Glioma Hücrelerinde Hücre Göçüne Etkisi 80
4.15.2 Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP'nin C6 Glioma Hücrelerinde Hücre Göçüne Etkisi 81
KAYNAKÇA **89**
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR **109**

SİMGE LİSTESİ

rpm	Dakikada dönme hızı
g	Gram
L	Litre
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
mg	Miligram
ml	Milimetre
nm	Nanometre
°C	Santigrat
cm^2	Santimetrekare
%	Yüzde

KISALTMA LİSTESİ

ATCC	American Type Culture Collection
BCA	Bikinkoninik asit
CTR1	Copper Transporter 1
DCM	Diklorometan
DL	İlaç Yükleme Kapasitesi
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EE	Enkapsülasyon Etkinliği
FT-IR	Fouirer Transform Infrared Spektrofotometre
GSH	Redükte Glutat
GSH-Px	Glutatyon Redüktaz GSH Redükte Glutatyon
IC_{50}	Yarı maksimum inhibitör konsantrasyon
MDA	Malondialdehit
MTT	3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür
PGA	Poliglikolik asit
PLA	Polilaktik asit
PLGA	Polilaktik-ko-glikolik asit
PVA	Polivinil alkol
SOD	Süperoksit Dismutaz
TAS	Total Antioksidan Seviye
TBARS	Thiobarbitürik Asit Reaktifleri
TOS	Total Oksidan Seviye
TUNEL	Terminal Deoksinükleotidil Transferaz (Tdt) Aracılı dUTP Biotin Nick Uç-Etiketleme

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Kanserin 14 temel özelliği.....5
Şekil 2.2 Primer ve Sekonder glioblastomalar arasındaki farklılıklar 8
Şekil 2.3 MDA'nın Mezomerik Yapıları 11
Şekil 2.4 Apoptozisin mitokondri yolunda yer alan Bcl-2 aile üyeleri 19
Şekil 2.5 Hücrelerin apoptoz aşamasındaki morfolojileri.....20
Şekil 2.6 Cisplatin.....21
Şekil 2.7 *Ginkgo biloba*'nın biyoaktif bileşikleri 25
Şekil 2.8 *Ginkgo biloba*'dan sentezlenen flavanoidin yapısı 26
Şekil 2.9 PLGA ve PLA'nın kimyasal yapısı.....29
Şekil 3.1 Protein miktar analizi standart eğrisi 39
Şekil 4.1 Cisplatin molekülüne ait kalibrasyon eğrisi.....42
Şekil 4.2 Ginkgolid A molekülüne ait kalibrasyon eğrisi 43
Şekil 4.3 Boyut dağılım analizi. A) Cisplatin yüklü PLGA NP, B) Ginkgolid A yüklü PLGA NP, C) Boş PLGA NP.....47
Şekil 4.4 Zeta potansiyel analizi, Cisplatin yüklü PLGA NP (A), Ginkgolid yüklü PLGA NP (B), Boş PLGA NP(C).....48
Şekil 4.5 Boş PLGA NP.....49
Şekil 4.6 Cisplatin yüklü PLGA NP.....50
Şekil 4.7 Ginkgolid A yüklü PLGA NP 50
Şekil 4.8 Cisplatin yüklü PLGA NP salım analizi 51
Şekil 4.9 Ginkgolid A yüklü PLGA NP salım analizi 51
Şekil 4.10 Inverted mikroskobu altında C6 Glioma hücrelerinin morfolojik görüntüsü (24 saat, x10) 52
Şekil 4.11 Inverted mikroskobu altında C6 Glioma hücrelerinin morfolojik görüntüsü (24 saat, x40) 52
Şekil 4.12 Kontrol, Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP ile 24 saat muamele edilen C6 Glioma hücrelerinin morfolojik görüntüleri (x20).....53
Şekil 4.13 Kontrol, Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP ile 48 saat muamele edilen C6 Glioma hücrelerinin morfolojik görüntüleri (x20).....54
Şekil 4.14 Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP ile muamele edilen C6 Glioma hücrelerinin 24 saatlik canlılık (%) grafiği.....55
Şekil 4.15 Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP ile muamele edilen C6 Glioma hücrelerinin 48 saatlik canlılık (%) grafiği.....55

Şekil 4.16 Kontrol, Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP ile 24 saat muamele edilen C6 Glioma hücrelerinin morfolojik görüntüleri (x20) 56

Şekil 4.17 Kontrol, Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA ile 48 saat muamele edilen C6 Glioma hücrelerinin morfolojik görüntüleri (x20).....57

Şekil 4.18 Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP ile muamele edilen C6 Glioma hücrelerinin 24 saatlik canlılık (%) grafiği 58

Şekil 4.19 Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP ile muamele edilen C6 Glioma hücrelerinin 48 saatlik canlılık (%) grafiği 58

Şekil 4.20 Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP ile muamele edilen C6 Glioma hücrelerindeki TOS değerleri (24 saat).....59

Şekil 4.21 Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP ile muamele edilen C6 Glioma hücrelerindeki TOS değerleri (48 saat).....60

Şekil 4.22 Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP uygulanan C6 Glioma hücrelerindeki TOS değerleri (24 saat).....61

Şekil 4.23 Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP ile muamele edilen C6 Glioma hücrelerindeki TOS değerleri (48 saat) 61

Şekil 4.24 Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP ile muamele edilen C6 Glioma hücrelerindeki TAS değerleri (24 saat) 62

Şekil 4.25 Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP ile muamele edilen C6 Glioma hücrelerindeki TAS değerleri (48 saat) 63

Şekil 4.26 Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP uygulanan C6 Glioma hücrelerindeki TAS değerleri (24 saat) 64

Şekil 4.27 Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP uygulanan C6 Glioma hücrelerindeki TAS değerleri (48 saat) 64

Şekil 4.28 Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP ile muamele edilen C6 Glioma hücrelerindeki MDA seviyeleri (A) 24 saat (B) 48 saat 66

Şekil 4.29 Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP ile muamele edilen C6 Glioma hücrelerindeki MDA seviyeleri (A) 24 saat (B) 48 saat.....67

Şekil 4.30 Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP ile muamele edilen C6 Glioma hücrelerindeki SOD seviyeleri (A) 24 saat (B) 48 saat 68

Şekil 4.31 Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP uygulanan C6 Glioma hücrelerindeki SOD seviyeleri (A) 24 saat (B) 48 saat 69

Şekil 4.32 Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP ile muamele edilen C6 Glioma hücrelerindeki GSH seviyeleri (A) 24 saat (B) 48 saat 70

Şekil 4.33 Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP uygulanan C6 Glioma hücrelerindeki GSH seviyeleri (A) 24 saat (B) 48 saat 72

Şekil 4.34 Kontrol, Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP ile 24 saat muamele edilen C6 Glioma hücrelerinin TUNEL pozitif işaretlenmesinin ışık mikroskobu görüntüsü (100x) 73

Şekil 4.35 Kontrol, Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP ile 48 saat muamele edilen C6 Glioma hücrelerinin TUNEL pozitif işaretlenmesinin ışık mikroskobu görüntüsü (100x) 74

Şekil 4.36 Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP ile muamele edilen C6 Glioma hücrelerinde apoptotik hücre sayısı (24 saat) 75

Şekil 4.37 Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP ile muamele edilen C6 Glioma hücrelerinde apoptotik hücre sayısı (48 saat) 76

Şekil 4.38 Kontrol, Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP ile 24 saat muamele edilen C6 Glioma hücrelerinin TUNEL pozitif işaretlenmesinin ışık mikroskobu görüntüsü (100x) 77

Şekil 4.39 Kontrol, Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP ile 48 saat muamele edilen C6 Glioma hücrelerinin TUNEL pozitif işaretlenmesinin ışık mikroskobu görüntüsü (100x) 78

Şekil 4.40 Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP uygulanan C6 Glioma hücrelerinde apoptotik hücre sayısı (24 saat) 79

Şekil 4.41 Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP uygulanan C6 Glioma hücrelerinde hücrelerinde apoptotik hücre sayısı (48 saat) 79

Şekil 4.42 Cisplatin, Cisplatin yüklü PLGA NP'nin C6 Glioma hücre göçünde etkisi.....80

Şekil 4.43 Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP'nin C6 Glioma hücre göçünde etkisi 82

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 Biyolojik sistemlerde antioksidan savunma sistemi 13

Tablo 3.1 C6 Glioma Hücre Hattı 35

Tablo 4.1 Cisplatin ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP'nin Karakterizasyonu.....44

Tablo 4.2 Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP ile muamele edilen C6 Glioma hücrelerindeki yarıkların mesafe değerleri.....81

Tablo 4.3 Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP ile muamele edilen C6 Glioma hücrelerindeki yarıkların mesafe değerleri 82

ÖZET

C6 GLİOMA HÜCRE HATTINDA CİSPLATİN VE GİNKGOLİD A YÜKLÜ NANOPARTİKÜLLERİN BİYOLOJİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Ümmügülsüm GÜZELSOY

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU

Eş Danışman: Doç. Dr. Melike ERSÖZ

Glioblastoma, primer beyin tümörleri arasında en sık görülen agresif malign kanser türüdür. Tedavi yöntemlerinde kemoterapi ve radyoterapi yer almasına rağmen kısıtlı etkinlik göstermesi ve hastalığın çok hızlı yayılması sonucunda glioblastoma hastalarında hayatta kalma süresi 15 ayı geçmemektedir. Bu nedenle, glioblostoma tedavisinde yeni yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır. Cisplatin, kanser tedavilerinde yaygın kullanılan bir kemoterapi ilacıdır. Cisplatin DNA'da hasar oluşturarak hücre döngüsünün G1/S fazında kalmasını sağlar ve apoptoza neden olur. Fakat bu durum aynı zamanda mitokondriyal disfonksiyon oluşturur. *Ginkgo biloba* ekstraktı içerisinde bulunan terpenoidler (Ginkgolid A, Ginkgolid B), anti-kanser ve nöroprotektif etkiler dahil olmak üzere birçok önemli biyolojik aktiviteye sahip antioksidanlardır. Ginkgolide A, *Ginkgo biloba*'nın yapraklarından izole edilen oldukça aktif bir moleküldür. Ginkgolide A'nın çeşitli

hastalıklara karşı koruyucu etkisinin iyi bir antioksidan olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Günümüzde nanopartiküler (NP) sistemler, bir çok tedavide mevcut ilaçların etkinliğini arttırmak ve kontrollü salınım sağlamak amacıyla ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada, Cisplatin, Cisplatin yüklü PLGA NP, Ginkgolid A, Ginkgolid A yüklü PLGA NP'nin C6 Glioma hücrelerinde biyolojik etkileri araştırıldı.

Cisplatin yüklü PLGA NP ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP tekli emülsiyon (w/o) yöntemiyle sentezlendi. Cisplatin yüklü PLGA NP ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP'nin boyut dağılımları, çoklu dağılım indeksleri, zeta potansiyelleri, enkapsülasyon verimleri ve ilaç yükleme kapasitesileri belirlendi. Cisplatin yüklü PLGA NP'nin boyutu 196.5 ± 1.773 nm, Ginkgolid A yüklü PLGA NP'nin boyutu ise 224.5 ± 10.86 nm olarak ölçüldü. Cisplatin, Cisplatin yüklü PLGA NP, Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP'nin sitotoksik aktivitesi C6 Glioma hücrelerinde MTT yöntemiyle analiz edildi. Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP ile muamele edilen C6 Glioma hücrelerinin IC_{50} değerleri 24. saatte sırasıyla; 53 μM ve 24 μM, 48. saatte ise sırasıyla; 12.7 μM ve 4.3 μM olarak belirlendi. Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP ile muamele edilen C6 Glioma hücrelerinin IC_{50} değerleri 24. saatte sırasıyla; 175 μM ve 116 μM, 48. saatte ise sırasıyla; 136 μM ve 64 μM olarak tespit edildi. Cisplatin, Cisplatin yüklü PLGA NP, Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP ile muamele edilen C6 Glioma hücrelerindeki apoptotik etki TUNEL yöntemi ile gösterildi. 24 ve 48 saat Cisplatin, Cisplatin yüklü PLGA NP, Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP uygulanan C6 Glioma hücrelerindeki apoptotik hücre sayısı kontrol hücrelerine göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdi ($p<0.05$). Total oksidan seviye (TOS) tayini kit ile, oksidatif stres belirteci olan MDA seviyesi spektrofotometrik olarak belirlendi. Total antioksidan seviye (TAS) tayini kit ile, GSH ve SOD antioksidan düzeyleri spektrofotometrik olarak saptandı. 48 saat Cisplatin yüklü PLGA NP ile muamele edilen C6 Glioma hücrelerinin TOS değerleri kontrol hücrelerine göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdi ($p<0.05$). 48 saat Ginkgolid A yüklü PLGA NP ile muamele edilen C6 Glioma hücrelerinin TAS değerlerinde kontrol hücrelerine göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış kaydedildi ($p<0.05$).

Elde edilen sonuçlarla; Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP'nin C6 Glioma hücrelerinde oksidatif stresi arttırarak apoptozu indüklediği, Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP'nin ise C6 Glioma hücrelerinde antioksidan aktivitesi ile serbest radikallerin ortadan kaldırılmasında etkili olduğu gösterildi. Buna göre; Cisplatin, Cisplatin yüklü PLGA NP, Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP glioblastoma tedavisine yönetlik olarak geliştirilen etkin tedavi yaklaşımlarında düşünülebilir. Çalışma sonuçları bu alandaki gelecekteki araştırmalara önemli bir katkı sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: Cisplatin, Ginkgolid A, Nanopartikül, Oksidatif stres, Antioksidan, Apoptoz, Glioblastoma

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE BIOLOGICAL EFFECTS OF CISPLATIN AND GINKGOLIDE A LOADED NANOPARTICLES IN C6 GLIOMA CELL LINE

Ümmügülsüm GÜZELSOY

Department of Molecular Biology and Genetics

Master of Science Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Banu MANSUROGLU

Co-supervisor: Assoc. Prof. Dr. Melike ERSOZ

Glioblastoma is the most common type of aggressive malignant cancer among primary brain tumors. Although chemotherapy and radiotherapy are included in the treatment methods, the survival time in glioblastoma patients does not exceed 15 months as a result of limited effectiveness and the rapid spread of the disease. Therefore, new approaches are needed in the treatment of glioblastoma. Cisplatin is a chemotherapy drug widely used in cancer treatments. Cisplatin causes DNA damage and keeps the cell cycle in G1/S phase and causes apoptosis. But this also creates mitochondrial dysfunction. Terpenoids (Ginkgolide A, Ginkgolide B) contained in *Ginkgo biloba* extract are antioxidants with many important biological activities, including anti-cancer and neuroprotective effects. Ginkgolide A is a highly active molecule isolated from the leaves of *Ginkgo biloba*. It is thought that the protective effect of Ginkgolide A against various diseases is due to its being a good antioxidant. Nanoparticular (NP) systems are used as drug delivery systems in many treatments to increase the effectiveness of existing drugs and to provide controlled release. In this study, the biological effects of Cisplatin,

Cisplatin loaded PLGA NP, Ginkgolide A, Ginkgolide A loaded PLGA NP were investigated in C6 Glioma cells.

Cisplatin loaded PLGA NP and Ginkgolid A loaded PLGA NP were synthesized by single emulsion (w/o) method. The size distributions, multiple distribution indices, zeta potentials, encapsulation efficiencies and drug loading capacities of Cisplatin loaded PLGA NP and Ginkgolide A loaded PLGA NP were determined. The size of Cisplatin loaded PLGA NP was measured as 196.5 ± 1.773 nm, and the size of Ginkgolide A loaded PLGA NP was measured as 224.5 ± 10.86 nm. The cytotoxic activity of Cisplatin, Cisplatin loaded PLGA NP, Ginkgolide A and Ginkgolide A loaded PLGA NP were analyzed by MTT method in C6 Glioma cells. IC50 values of C6 Glioma cells treated with Cisplatin and Cisplatin-loaded PLGA NP at 24 hours; 53 μM and 24 μM, respectively, at the 48th hour; It was determined as 12.7 μM and 4.3 μM. IC_{50} values of C6 Glioma cells treated with Ginkgolide A and Ginkgolide A loaded PLGA NP at 24 hours, respectively; 175 μM and 116 μM, respectively, at the 48th hour; It was detected as 136 μM and 64 μM. The apoptotic effect in C6 Glioma cells treated with Cisplatin, Cisplatin loaded PLGA NP, Ginkgolide A and Ginkgolide loaded PLGA NP A was demonstrated by TUNEL method. The number of apoptotic cells in C6 Glioma cells treated with Cisplatin, Cisplatin loaded PLGA NP, Ginkgolide A and Ginkgolide A loaded PLGA NP for 24 and 48 hours showed a statistically significant increase compared to control cells ($p<0.05$). Total oxidant level (TOS) was determined with the kit, and MDA level, which is an oxidative stress marker, was determined spectrophotometrically. Total antioxidant level (TAS) was determined with the kit, and GSH and SOD antioxidant levels were determined spectrophotometrically. TOS values of C6 Glioma cells treated with Cisplatin loaded PLGA NP for 48 hours showed a statistically significant increase compared to control cells ($p<0.05$). A statistically significant increase was observed in TAS values of C6 Glioma cells treated with Ginkgolide A loaded PLGA NP for 48 hours compared to control cells ($p<0.05$).

With the results obtained; It has been shown that Cisplatin and Cisplatin loaded PLGA NP increase oxidative stress in C6 Glioma cells and induce apoptosis, while Ginkgolide A and Ginkgolide A loaded PLGA NP are effective in eliminating free

radicals with their antioxidant activity in C6 Glioma cells. According to this; Cisplatin, Cisplatin loaded PLGA NP, Ginkgolide A and Ginkgolide A loaded PLGA NP can be considered in effective treatment approaches developed for the treatment of glioblastoma. The results of the study will make an important contribution to future research in this area.

Keywords: Cisplatin, Ginkgolide A, Nanoparticle, Oxidative stress, Antioxidant, Apoptosis. Glioblastoma

1
GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Hücre döngüsünden çıkarak kontrolsüz çoğalan hücreler kanser olarak adlandırılır ve bu hücreler organizmanın işleyişinde olumsuzluklara neden olmaktadır [1]. Her kanser türünün kendine özgü özelliği olmasına rağmen bu hücrelerin kanser gelişimi açısından yaygın olan ortak moleküler özellikleri vardır [2].

Glioblastoma multiforme (GBM), derece IV gliomlar olarak sınıflandırılan bir astrositomdur. GBM merkezi sinir sisteminde en sık görülen malign beyin tümörüdür [3]. Hastalarda yaşam süresi ilk tanıdan sonra eş zamanlı uygulanan radyoterapi ve kemoterapi tedavisine bağlı olarak ortalama 15 aydır. Astrosit hücrelerinden gelişerek etrafındaki beyin dokusuna nüfuz eden GBM beyin tümörleri arasında tedavisi en zor olan kanser türüdür [4].

Kanserin, kansere yol açan çok sayıda enflamatuar sürecin ve bazı otoimmün hastalıkların, serbest radikal kaynaklı oksidatif stresin doğrudan veya dolaylı etkisi sonucu meydana geldiği belirlenmiştir [5]. Kanser tedavisinde uygulanan kemoterapi ve radyoterapi uygulamaları oksidatif stresi arttırabilmektedir [6], [7].

Antioksidan maddeler, reaktif oksijen türlerini (ROS) stabilize etme ve yakalama yeteneğine sahip olan moleküllerdir. Antioksidanların bu sebeple insan sağlığı üzerinde önemli etkileri vardır. Antioksidanlar, ROS'un oluşturduğu hasarları engeller ve aynı zamanda bu hasarın onarımında da görevlidir. Böylece immün sistem savunmasını arttırarak kanser gibi önemli hastalıkların tedavisinde rol oynamaktadır. *Ginkgo biloba* ekstraktı içerisinde bulunan terpenoidler (Ginkgolid A, Ginkgolid B), anti-inflamatuar, anti-kanser, nöroprotektif ve hepatoprotektif etkiler dahil olmak üzere birçok önemli biyolojik aktiviteye sahip antioksidanlardır [8], [9].

Apoptoz bütün çok hücreli organizmalardaki homoestazda ve gelişimde önemli bir role sahiptir [10]. Bu mekanizma organizmada zararlı, yaşlanan ya da istenmeyen hücrelerin yok edilmesini sağlar. Sağlıklı hücrelerde DNA'da herhangi bir hasar görüldüğünde hücreler apoptoz yolağına girerek yok olur. Ancak kanser hücreleri apoptoz sinyallerinden kaçabilmektedir [11].

Yapılan çalışmalarda Cisplatin kemoterapi ilacının kanser hücrelerinde DNA yapısına bağlandığı belirlenmiştir. Bu bağlanma sonucunda DNA'nın sentezini ve DNA'nın replikasyonunu direkt olarak durdurduğu ortaya koyulmuştur. Cisplatin'in etkisiyle oluşan ROS, apoptoz mekanizmasının uyarılması için kaspaz aktivasyonunu indüklemektedir [12], [13].

Ginkgolidler, *Ginkgo biloba* bitkisinde bulunan terpenoidlerdendir ve nöroproteksiyondan sorumludur. Ginkgolidler, nöronları oksidatif stres hasarından korumak için Akt/Nrf2 sinyal yolağındaki antioksidan proteinlerin seviyelerini yükseltmektedir [14].

Terapötik ajanların hedef bölgeye ulaştırılması birçok hastalığın tedavisinde temel konulardan biri olarak kabul edilmektedir. İlaçların zayıf etkinlik göstermesi uygulama yöntemleriyle doğrudan ilişkilidir. Birçok uygulama alanına sahip olan nanopartiküller (NP) biyouyumlu malzemeler olarak çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmak amacıyla sentezlenir [15].

Zayıf çözünür ve toksik ilaçların NP sistemler ile kapsüllenmesi, terapötik ve farmakodinamik performanslarını arttırdığı gibi ilaçların yan etkilerini de azaltmaktadır [16]. ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafında, ilaç dağıtımı için polimerik PLGA NP'nin insanlarda kullanımı onaylanmıştır [17]. Tez çalışmamızda anti-kanser ve biyolojik aktivitesini arttırmak için Cisplatin ve Ginkgolid A, PLGA NP'ye yüklenerek C6 Glioma hücrelerinde biyolojik etkileri incelenmiştir.

1.2 Tezin Amacı

Yapılan tez çalışmasınında Cisplatin yüklü PLGA NP ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP'nin C6 Glioma hücreleri üzerindeki biyolojik etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda Cisplatin yüklü PLGA ve Ginkgolid yüklü PLGA

NP'nin C6 Glioma hücreleri üzerindeki toksisitesi, oksidatif stres ve antioksidan seviyesi, apoptotoz ve hücre göçüne etkisi araştırılacaktır.

1.3 Hipotez

Bu çalışmada Cisplatin ve Ginkgolid A moleküllerinin NP sisteme yüklenmesi ile serbest formlarına göre kontrollü salınım oluşturarak daha yüksek aktivite göstermesi hedeflenmektedir. Sadece beyin tümörleri için değil, diğer kanser türleri içinde NP sistemlerinin oluşturulmasına ve yeni tedavi yöntemlerine katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

2
GENEL BİLGİLER

2.1 Kanser

Organ ya da dokuları oluşturan hücrelerin belirli bir düzen içerisinde ilerleyen hücre döngüsünden çıkarak kontrolsüz bölünmesi ve çoğalması kanser olarak adlandırılır. Kontrolsüz çoğalan bu hücreler organizmanın işleyişinde olumsuzluklara neden olmaktadır [1].

Kanser hücreleri, organizmada hasar oluşturduğu dokulara ve geliştirilen tedavilere karşı verdiği yanıta göre birçok türe sahiptir. Kanser türlerinin hepsinin kendine özgü özellikleri bulunmaktadır. Her kanser türünün kendine özgü özelliği olmasına rağmen bu hücrelerin kanser gelişimi açısından yaygın olan ortak moleküler özellikleri vardır. Weinberg ve Hanahan (2000) bu ortak özellikleri "kanser hücrelerinin hayatta kalmasına, çoğalmasına ve yayılmasına izin veren edinilmiş fonksiyonel yetenekler" olarak tanımlamıştır. Weinberg ve Hanahan'ın 2000 ve 2011 yılında yaptıkları araştırma sonucu ortaya koyduğu on ortak özellik "The Hallmarks of Cancer" olarak belirlenmiş ve aşağıdaki şekilde açıklanmıştır [2],[18]:

Çoğalma sinyallerinin sürdürülmesi

1. Büyüme baskılayıcılardan kaçma
2. Hücresel ölümsüzlüğün etkinleştirilmesi
3. İnvazyon ve metastaz aktivasyonu
4. Yeni damar oluşumunun tetiklenmesi
5. Hücresel ölüme direnç
6. Enerji metabolizmasını değiştirme
7. Bağışıklık sisteminden kaçma
8. Kanserleşmeyi destekleyen inflamasyon

9. Genetik kararsızlık ve mutasyonlar

Hanahan ortaya koydukları özelliklere ek olarak kanser araştırmalarındaki ilerlemeleri inceleyerek, 2022 yılında dört yeni özellik daha eklenebileceğini gösteren yeni bir çalışma yayınlamıştır (Şekil 2.1). Sonradan eklenmiş olan dört özellik ise aşağıda yer almaktadır [19]:

10. Fenotipik plastisite ve bozulmuş farklılaşma
11. Mutasyonel olmayan epigenetik yeniden programlama
12. Polimorfik mikrobiyomlar
13. Yaşlanmış hücreler



Şekil 2.1 Kanserin 14 temel özelliği [19]

Kanser oluşumunun temel mekanizmasında değiştirilebilir ve değiştirilemeyen iki grup risk faktörü yer almaktadır. Yaş, aile ve cinsiyet değiştirilmeyen faktörler olarak bulunmaktadır. Alkol ve sigara kullanımı, ultraviyole ışınlara ve radyasyona maruz kalma, beslenme alışkanlıkları, çeşitli kimyasallar ve hava kirliliği de değişebilir faktörlerden sayılmaktadır [20].

Kanser türlerinin adlandırılması aslında oluşum gösterdikleri doku ya da organa göre belirlenmektedir. Lenfoma, sarkom, glioblastoma, melanom, serviks doku ya da organa göre isimlendirilen kanser türleridir [21].

Kanser türleri genel olarak üç ana başlıkta incelenmektedir.

1. **Karsinomalar**: Kanser tiplendirmelerinin %90'ını oluşturan karsinomalar, epitelyal orijinli malign tümörlerdir.
2. **Sarkomlar:** Kanser tiplendirmelerinin %3'ünü oluşturan sarkomlar, mezenkimal orijinli malign tümörlerdir.
3. **Lenfoid maligniteler:** Kanser tiplendirmelerinin %7'sini oluşturan lenfoid maligniteler, lenfatik sistem ve periferik kanda yayılan tümörlerdir [22].

Kanser tedavisi için cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi yöntemlerinin tek olarak ya da beraber kullanılması kanser türlerine ve ilerleyiş aşamalarına bağlı olarak tercih edilmektedir [23]. Ayrıca mevcut bu yöntemlerin yanı sıra kanser hastaları tedavi boyunca alternatif tedavileri de denemektedirler. Bu alternatif tedavi yöntemlerinden ülkemizde yaygın tercih edilen yöntem bitkisel tedaviler olarak bilinmektedir [24], [25], [26].

2.1.1 Beyin Kanseri

Kanser türlerinden biri olan beyin kanseri ölümcül kanser olarak bilinmektedir. Tanı koyulan mevcut beyin kanseri vakalarından yarısından fazlasının hayatını kaybettiği ortaya koyulmuştur [27], [28].

Beyin kanserinin bening tümör ve malign tümör olarak iki çeşidi bulunmaktadır [29]. Bening tümörler iyi huylu tümörler olarak bilinmektedir ve doku yıkımı malign tümörlere oranla minimal düzeydedir. Bening tümörler parankim dokuyu etkileyerek beyin periferal sinir sisteminin hasarında etkilidir. Malign tümörler kötü huylu tümörler olarak bilinmektedirler. Kontrolsüz bir şekilde büyüyen malign tümörler kan dolaşımı veya lenfatik sistem yoluyla uzak bölgelere yayılırlar. Bu yayılmaya metastaz denir. Beyinde en sık görülen malign tümörler glial tümörler olarak bilinir [30].

Beyin tümörleri aynı zamanda primer ve sekonder olarak da sınıflandırılabilmektedir [29]. En yaygın primer beyin tümörleri gliom olarak bilinmektedir. Gliomlar, malign (kötü huylu) beyin tümörlerdir [28], [29]. Malign gliomlar glial hücrelerden oluşmaktadır. Glial hücreler, beyinde destekleyici dokuyu oluşturan hücrelerdir. Glial hücrelerdeki hasar sonucu oluşan bu gliom tümörler glioblastoma olarak da adlandırılmaktadır [31]. Merkezi santral sinir

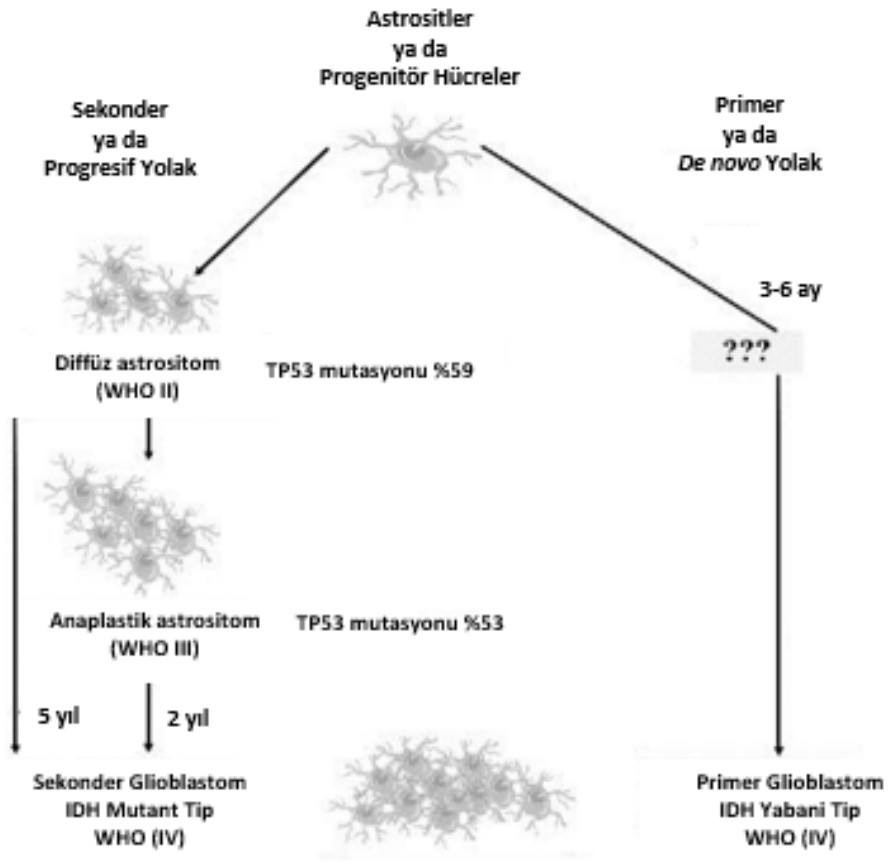
sistemi içerisinde en sık görülen tümör glioblastomadır. Glioblastoma oldukça agresif, invazif ve tedavisi zor tümörlerdir. Ayrıca glioblastoma nekroz ve mikrovasküler proliferasyona sebep olabilmektedir [32]. Glioblastoma primer beyin tümörleri içerisinde yer alırken, sekonder beyin tümörleri ise metastaz sonucu meydana gelmektedir [1].

Glioblastomanın en önemli karakteristik özelliği tümör içi heterojeniteye sahip olmasıdır. Glioblastoma hücre döngüsündeki hasar sonucu ortaya çıkan kontrolsüz hücre çoğalmasıyla meydana gelir [33]. Tümör süpresör genlerini inhibe eden mutasyonlar, sağlıklı hücrelerdeki döngünün bozulmasına, *in vivo* ve *in vitro* olarak hücrelerin kontrolsüz çoğalmasına sebep olmaktadır. Bu yüzden tümör süpresör genlerde ekspresyonun artırılması için geliştirilecek yöntemler tümör hücrelerinde uygulanabilir bir tedavi yöntemi olmaya aday olabilir [33], [34].

2.1.2 Glioblastoma Multiforme

Glioblastoma multiforme (GBM), derece IV gliomlar olarak sınıflandırılan bir astrositomdur. GBM merkezi sinir sisteminde en sık görülen malign beyin tümörüdür. Ulusal Kanser Enstitüsü'nün 2020 yılında açıkladığı verilerde ortalama olarak 23.890 yetişkin hastaya beyin kanseri teşhisi konulmuştur. Bu hastalardan yaklaşık 18.020'sinin durumunun ölümle sonuçlandığı düşünülmektedir. GBM yılda 100.000 yetişkinden 2-3'ünde görülmektedir. Bu hastaların yaş ortalamaları 45-70 arasındadır [3]. Hastalarda yaşam süresi ilk tanıdan sonra eş zamanlı uygulanan radyoterapi ve kemoterapi tedavisine bağlı olarak ortalama 15 aydır. Astrosit hücrelerinde gelişerek etrafındaki beyin dokusuna nüfuz eden GBM beyin tümörleri arasında tedavisi en zor olan kanser türüdür [4].

GBM meydana gelen mutasyonlar ve genlerdeki farklılıklara bağlı olarak primer ve sekonder glioblastomlar olarak gruplandırılır. İzositrat dehidrojenaz-1 (IDH1) mutasyonları sekonder GBM'lerin %75'ini oluştururken, primer GBM'lerde bu mutasyon daha az bulunmaktadır. Bu yüzden sınıflandırmada sekonder GBM'ler IDH mutant tip GBM, primer GBM'ler ise IDH yabani tip GBM olarak da kullanılmaktadır (Şekil 2.2), [35], [36], [37].



Şekil 2.2 Primer ve Sekonder glioblastomalar arasındaki farklılıklar [34]

Malign beyin tümörü mutasyonlarında çoğunlukla p53 sinyal yolağı inaktiftir. Telomeraz enziminin ters transkriptaz (TERT) aktivasyonu GBM orijinlerinin aydınlatılmasında önemli bir role sahiptir [38]. Hücreler her bölündüğünde telomer kısalmaya başlar. Belirli bir bölünmeden sonra hücre çoğalması durmaktadır. Bu durumun dengelenmesi, hücrelerdeki telomerin kısalmasıyla birlikte "senesens" olayını ortaya çıkarır. Senesens hücrelerin bölünmesinin durmasıyla hücresel yaşlanmaya geçiş olarak ifade edilir [39]. Hücresel yaşlanma, TP53 (tümör proteini p53) kontrolündedir. Kromozomda 17p13.1 bölgesinde bulunan TP53, p53 proteinini kodlar. MDM2 (murin double minute 2) ve MDM4 (murin double minute 4) ubikitinasyon yoluyla p53 proteininin hücresel aktivitesini kontrol etmektedir. MDM2 bir proto onkogen ve MDM4 ise p53 regülatörüdür [40]. Hücresel stres arttığı zaman $p14^{ARF}$ (siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2A, CDKN2) geninin kodlanmış olduğu ARF proteini aktive olur. Strese

bağlı olarak ARF proteinin artması durumunda MDM2 ve MDM4 baskılanır ve ARF-MDM2-p53 sinyal yolağı inaktifleşir [41], [42].

2.1.3 Glioblastoma Tedavi Stratejileri

Kanser tedavisi lokalize ve sistemik tedaviler olarak belirlenmiştir. Cerrahi ve radyasyon tedavileri lokalize tedaviler iken biyolojik tedaviler, sistemik radyoterapi ve radyoizotoplarla uygulanan tedaviler ise sistemik tedaviler olarak uygulanmaktadır. Bunun yanı sıra hem kanserin hem de tedavinin yan etkilerini azaltmak için gerçekleştirilen destek tedaviler de kanser tedavisinin bir parçası olarak değerlendirilebilmektedir [43], [44].

GBM tedavisi beyin cerrahisinde en zorlu görülen tedavi yöntemidir. Günümüzde henüz tamamen etkili bir tedavi yöntemi yoktur. İlk olarak cerrahi rezeksiyonun gerçekleştirilmesinin ardından kemoterapi ve radyoterapi ile desteklenmesi GBM tedavisinin temelini oluşturmaktadır [45]. GBM'nin hızlı yayılması, etrafında bulunan sağlıklı beyin dokularında hasar oluşturmadan tümörün ortamdan çıkarılamaması ve kemoterapi ilaçlarının kan beyin bariyerini (KBB) tamamen geçememesine bağlı olarak beyin tümörlerine ilaç etkileşiminin tam verimlilikte olmaması GBM tedavisini daha da zorlaştıran durumlardır [46]. Temozolomid (TMZ) ve prokarbazin GBM için kullanılan temel kemoterapi ajanlarıdır ve metil gruplarını DNA nükleotitlerine bağlayarak etki eder. Diğer kemoterapik ajanlardan lomustin ve karmustin daha toksiktir ve metilasyon oluşturmasının yanında DNA sarmalları arasında çapraz bağlar oluştururlar. Lomustin ve karmustin GBM için etkili kemoterapi ajanları olsada yan etki olarak kemik iliğinde baskılama yaptığı için kısıtlı kullanılmaktadır [38].

TMZ ilk olarak 1970 yılında keşfedilmiştir. Fakat Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından beyin tümörlerinde kullanımı için onay 2005 yılında verilmiştir [45]. Yüksek sağkalım sağlayan TMZ'nin, GBM tedavisinde kullanımı standartlaştırılmıştır [47]. GBM tedavisinde bugüne kadar klinik çalışmalar ile etkinliği kabul görmüş başka bir kemoterapötik ajan olmamıştır [38]. GBM için kemoterapik ilaç tasarlanmasında geçirgenlik, hedef seçilmesi ve ilaç farmakokinetiği aşamaları KBB açısından dikkat edilmesi gereken önemli noktalardır [45].

2.2 Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

Atomlar çekirdek ve bu çekirdeğin çevresinde hareket eden elektronlardan oluşmuşlardır. Genellikle bu elektronlar çift halinde yer almaktadır. Atomların dış katmanlarındaki elektronlar tekli halde buluyorsa bu yapılara radikal ismi verilmektedir [48]. Atomların dış katmanlarındaki elektonları sayesinde kimyasal tepkimeler gerçekleşir. Atomların dış katmanlarında bulunan eşleşmemiş elektronlar kimyasal tepkimelerin reaktivitesini yüksek oranda arttırmaktadır [18]. Birçok radikal kararsızdır ve oldukça reaktiftir. Diğer moleküllere bir elektron verebilir veya bir elektron alabilir, bu nedenle de oksidanlar veya indirgeyici olarak davranırlar [49].

Serbest radikaller; atom çekirdeği, DNA, proteinler, karbonhidratlar ve lipitler gibi biyolojik moleküllere zarar veren, hücrelerin zarlarında yüksek derecede bulunabilen reaktif türleridir [49], [50]. Serbest radikaller ve reaktif oksijen türleri (ROS), insan vücudundaki normal temel metabolik süreçlerden veya X-ışınlarına, ozona, sigara dumanına, hava kirleticilere ve endüstriyel kimyasallara maruz kalma gibi dış kaynaklardan türetilir [51]. Serbest radikaller, oksijenin organik bileşiklerle enzimatik olmayan reaksiyonları ve iyonize edici reaksiyonlarıyla da oluşturulabilir [52].

İki ana ölüm nedeninden biri olan kanser bilinen “serbest radikal” hastalığıdır [53]. Oksidatif stres, hücreler ve dokulardaki aşırı ROS üretimini ifade eder ve antioksidan sistem aşırı üretilen ROS moleküllerini nötralize edemez [54]. Bu koruyucu mekanizmadaki dengesizlik DNA, proteinler ve lipitler gibi hücresel moleküllerin zarar görmesine yol açabilir ve bu durum sonucunda da kanser oluşabilir [54], [55].

Kanserin, kansere yol açan çok sayıda enflamatuar sürecin ve bazı otoimmün hastalıkların, serbest radikal kaynaklı oksidatif stresin doğrudan veya dolaylı etkisi sonucu meydana geldiği belirlenmiştir [5]. Kanser tedavisinde uygulanan kemoterapi ve radyoterapi uygulamaları oksidatif stresi arttırabilmektedir [6], [7].

ROS’un tümörijenik etkisi, DNA hasarını indükleyerek hücrelerin kontrolsüz çoğalmasını ve hücresel göçü destekler. Aynı zamanda ROS hücresel yaşlanmayı

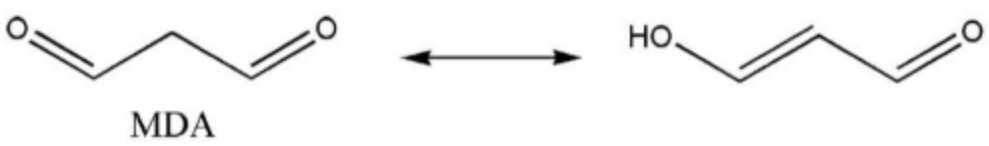
ve hücre ölümünü de indükleyebilir. ROS'un tümörjenik ya da antitümörojenik ajan olarak ilerlemesi üretildiği yere, konsantrasyonuna ve hücrelerin konumuna bağlıdır [56], [57].

ROS üretiminin potansiyel kaynaklarından biri olan indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz enzim ailesi, tümör hücresinin hayatta kalmasını ve büyümesini desteklemektedir. ROS, fosfatidilinositol 3-kinaza (PI3K) bağlı Akt aktivasyonunu engelleyen fosfataz ve tensin homoloğunu (PTEN) inhibe ederek Akt'yi aktive eder. Akt, apoptozu önleyerek oksidatif metabolizmayı artırır ve onkojenik sinyal oluşturur [58].

2.2.1 Malondialdehit (MDA) Aktivitesi

Yağ oksidasyonunun mutajenik etkisi üzerine yapılan çalışmalarda en çok tercih edilen metabolit olan MDA'nın kapalı formülü $C_3H_4O_2$ (Şekil 2.3) ve molekül ağırlığı 72'dir [59]. Lipid peroksidasyonu hücre zarında gerçekleşir ve serbest radikallerden dolayı ortaya çıkar. Lipid peroksidasyonu sürecinde yağ asitlerinin oksidasyonu sonucu olarak lipid hidroperoksitleri (ROOH) ve konjuge dienler oluşur. Daha sonra bu moleküller hidrokarbonlar ve MDA gibi çeşitli aldehit formlarına dönüştürülmektedir [60].

MDA, hücre membranından rahatça geçebilmektedir. 1960 yılından itibaren MDA molekülü *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda oksidatif stres ölçümünde biyobelirteç olarak kullanılmaya başlanmıştır [61]. MDA, proteinlerin amino grupları ve nükleik asit bazları, fosfolipidlerin N bazları ve sülfidril bileşiklerinin SH grupları dahil olmak üzere çeşitli hücresel bileşiklerin fonksiyonel grupları ile etkileşime girebildiğinden, tümör oluşumunda rol oynamaktadır [62]. Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan MDA, oksidatif hasarın başlıca nedenlerinden biri olarak kabul edilir ve kanser araştırmalarında hücrelerdeki seviyesinin artışına bağlı olarak oksidatif stres analizinde belirteç olarak kullanılmaktadır [63].



Şekil 2.3 MDA'nın Mezomerik Yapıları [61]

2.3 Antioksidanlar

Serbest radikal oluşumu gerçekleşirken, aynı zamanda antioksidan savunma sistemi de hızlıca gelişerek oluşan serbest radikalleri temizler ve hücrede bir denge oluşturur. Antioksidan maddeler serbest radikalleri stabilize etme ve yakalama yeteneğine sahip olan moleküllerdir. Antioksidanların bu sebeple insan sağlığı üzerinde önemli etkileri vardır. Antioksidanlar, ROS'un oluşturduğu hasarları engeller ve aynı zamanda bu hasarın onarımında da görevlidir. Böylece immün sistem savunmasını arttırarak kanser gibi önemli hastalıkların tedavisinde rol oynamaktadır. Organik olarak sınıflandırabileceğimiz doğal gıdalar aracılığı ile alınan antioksidanlar serbest radikallerin ortaya çıkardığı oksidasyonu önleyebilmektedir. Antioksidanların sınıflandırılması hücresel lokalizasyonu (membran, hücre içi ve hücre dışı) ve fonksiyonlarına (elektron verici, enzim inhibitörü, radikal süpürücü, hidrojen verici, sinerjist ve metal şelatlayıcı ajanlar) göre yapılmaktadır [64].

Antioksidan maddeler sentetik ve doğal olarak iki gruba ayrılır [65]. Bitki ve hayvan dokularında yer alan, ekstrakte edilebilen antioksidanlar doğal antioksidan sınıfında yer alırlar. Meyveler, sebzeler ve aromatik bitkiler doğal antioksidan kaynağı olarak dikkat çekmektedirler [66]. Doğal antioksidanlar da kendi içerisinde endojen ve ekzojen yapılı olarak ayrılmaktadırlar ve hücrelerde farklı lokalizasyonlarda bulunabilirler [67], [68]. Organizmaların doğal antioksidan sentezi yaş ilerlemesiyle azalır. Zamanla oluşacak bu azalmanın tamamlanabilmesi için bitkisel antioksidanların iyi bir alternatif olduğu düşünülmektedir [69]. En önemli kaynağı meyve sebzeler olan bitkisel antioksidanlar kontrolsüz hücre çoğalmalarını engelleyen ve oksidasyondan dolayı zarar gören hücreleri koruyan bir görev üstlenirler [70].

Biyolojik sistemlerde yer alan ve endojen kaynaklı en önemli antioksidanlar Tablo 2.1'de gösterildiği şekilde; Süperoksit Dismutaz (SOD), Katalaz (CAT), Glutatyon peroksidaz (GSH-Px), Glutatyon (GSH) olarak bilinmektedir [71]. Eksojen kaynaklı en önemli antioksidanlar (Tablo 2.1) ise karotenoidler, polifenoller, E

vitamini (alfa tokoferol), C vitamini (askorbik asit) ve terpenoidler olarak sınıflandırılmaktadır [72].

Tablo 2.1 Biyolojik sistemlerde antioksidan savunma sistemi

ANTİOKSİDANLAR	
Endojen Kaynaklı	**Eksojen Kaynaklı**
Süperoksit Dismutaz (SOD)	Vitamin E
Katalaz (CAT)	Polifenoller
Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px)	Vitamin C
Glutatyon (GSH)	Karotenoidler
	Terpenoidler

Antioksidan bileşenlerin etkileşimleri, bir arada veya birbirinden bağımsız mekanizma ile gösterilebilmektedir. Antioksidanlar, oksijen molekülüyle reaksiyona girer veya oksijen molekülü yerine geçerek lokal oksijen konsantrasyonunu azaltabilir. Bu bileşenler peroksitleri, nonradikal ürünlere çevirebilme yeteneğine sahiptirler. GSH-Px antioksidan molekülü, peroksitleri nonradikal yapıya çevirerek temizlemektedir. Aromatik aminler, E vitamini, fenoller ise serbest radikaller ile reaksiyona girerek, yağ asidi zincirlerinin ürettiği hidrojen iyonu salınımını önleyen en önemli antioksidanlardır [73].

Antioksidanlar kanser sürecinde de bir çok mekanizmada yer alabilirler [74]. Bazı antioksidanlar prokarsinojenlerin metabolik aktivasyonunu inhibe ederken, diğer bir kısmı karsinojenlerin detoksifikasyonuna yardım eder ve ortamdaki ROS birikimini dengeleyip hücrelerin anjiyogenezden uzaklaşarak hücre siklusu, invazyon ve apoptoza doğru yönlenmesini sağlayarak kanser mekanizmasını baskılar [75].

2.3.1 Endojen Kaynaklı Antioksidanlar

Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit radikali, aerobik hücrelerde moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi ile oluşur. Enzimatik antioksidanlardan olan SOD, süperoksit radikalini ($O_2^{\cdot}$) öncelikle hidrojen peroksite (H_2O_2), daha sonra da moleküler oksijene (O_2) katalizlemektedir. Böylece SOD'un reaktif süperoksit anyonunu hedeflemesiyle hücreyi oksidatif hasardan korur. Oluşan hidrojen peroksit daha sonra CAT ve GSH-Px enzimleri ile ortamdan uzaklaştırılmaktadır [76].

İnsanlarda SOD molekülünün üç formu görülür. Bakır/çinko SOD (Cu/Zn SOD) sitozolde, manganez SOD (Mn SOD) mitokondride ve ekstrasellüler SOD (EC SOD) hücre dışı sıvılarda bulunur [76], [77]. Süperoksit anyonu Cu^{+2} ve bir arginin rezidüsünün guanido grubuna bağlanır ve süperoksitteki bir elektron Cu^{+2} molekülüne transfer olur. SOD oluşan Cu^{+1}'den bir elektron ve bağlandığı yapıdan iki proton alarak H_2O_2 oluşturur. Bu şekilde SOD, Cu^{+2} yapısına tekrar döner [77].

Katalaz (CAT)

CAT 4 alt birimi olan bir hemoproteindir ve her alt birimde, bir NADPH molekülü ve bir hem grubu bulunmaktadır [76]. CAT, büyük ölçüde peroksizomlarda ve belirli oranlarda sitozolde yer almaktadır [77]. Peroksizomların içinde bulunan proteinlerin %40'ını, H_2O_2'yi yıkan CAT enzimi oluşturmaktadır. H_2O_2 katalizasyonunda CAT, su (H_2O) ve oksijene (O_2) dönüşmeyi sağlar [78].

CAT enziminin indirgeyici etkinliği küçük moleküllere karşı (etil hidroperoksitleri ve H_2O_2) gerçekleşmektedir. Lipid hidroperoksit gibi büyük moleküllere etki etmemektedir [79]. CAT bütün dokularda bulunabilir fakat bulunduğu yere göre en yüksek aktivitesini karaciğer ve eritrositlerde göstermektedir [76].

Glutatyon Peroksidaz (GSH-PX)

GSH-PX, elektron kaynağı olarak glutatyonu (GSH) kullanarak H_2O_2'yi ve organik hidroperoksitleri katalizleyen bir enzimdir ve hücrelerde sitozolda yer almaktadır [79]. İlk defa memeli eritrositlerinde Mills tarafından 1957 yılında yapılan çalışmada saptanmıştır [80]. Enzimatik bir antioksidan olan GSH-PX, H_2O_2'den oluşan oksidatif strese karşı hücreleri koruyarak hidroksil radikalinin oluşumunu

engeller. Karaciğer ve eritrositler enzim aktivitesinin en yüksek olduğu dokulardır [73].

GSH-PX enziminin iki ana tipi bulunmaktadır. Bu tiplerden birisi selenyuma bağımlı GSH-PX (Se-GPx)'dır. Se-GPx, H_2O_2 ve organik peroksitlere karşı etki göstermektedir. Selenyuma bağımlı olmayan GSH-PX ise daha çok organik peroksitlerin katalizlenmesinde görev alır [73].

GSH enzimi, katalizleme işleminde hidrojen verici olarak H_2O_2 molekülüne indirgenir ve GSH oksidasyonuyla glutatyon disülfit oluşur (GSSG). Glutatyon redüktaz (GR) enzimi sayesinde, GSSG redükte glutatyon haline geri indirgenir ve bu reaksiyonda GR elektron vericisi olarak NADPH kullanır. Ayrıca GSH-PX'in hücredeki dağılımı GR enzimine bağlıdır. Bu her iki enzim de en yüksek yoğunlukta sitozolde yer almaktadır [73].

Glutatyon (GSH)

GSH (L-γ- glutamil-L-sisteinil-glisin) tripeptid yapısında bir antioksidandır. Oksidatif stres ve radyasyona karşı hücrelerin korunmasında büyük önemi bulunmaktadır. GSH, reaktif oksijen türlerine karşı savunma yapabilmekte ve aynı zamanda sitozolik GSH redoks döngüsünde substrat olarak rol almaktadır [75]. GSH, hücrelerde çok az bulunmaktadır ve primer yapıda redükte formda (GSH) saklanmaktadır. Fakat okside yapıdayken GSSG olarak da bulunabilmektedir [81].

2.3.2 Eksojen Kaynaklı Antioksidanlar

C Vitamini (Askorbik Asit)

Diğer adı askorbik asit olan vitamin C, suda çözünebilen, L-askorbik asit ve L-dehidroaskorbik asit gibi iki aktif forma sahip iyi bir redüktan maddedir [82]. Vitamin C süperoksit, hidroperoksil, singlet oksijen, ozon, peroksinitrit gibi reaktif oksijen türevleri moleküllerini kolaylıkla temizler ve bu nedenle oksidatif strese karşı etkili koruma sağlamaktadır. Vitamin C lipitlerde çözünme özelliği olan tokoferolü tokoferoksi radikalini kullanarak yeniden oluşturabilir [79]. C vitamininin antioksidan etkisinin asıl özelliği lipit hidroperoksitlerin oluşumunu engellemesi olarak bilinmektedir [83].

Vitamin E (α-tokoferol)

E Vitamini ilk olarak Evans ve Sure tarafından 1938 yılında tanımlanmış ve izole edilmiştir. Vitamin E, yüksek antioksidan potansiyeli olan, yağda çözünen bir asimetrik bileşiktir [77]. Vitamin E'nin asıl görevi, membran koruyucu özelliği ve lipitte çözünür olan zincir kıran bir antioksidan olmasıdır [79]. Vitamin E serbest radikalleri sabit hale getirerek peroksidasyon zincirini kırmaktadır. Bu durum O_2'nin çoğunlukla OH·'ye veya $O_2^{\cdot-}$'ye dönüşümüyle meydana gelmektedir [82].

Karotenoidler

Karotenoid bileşenler, metil grupları eklenmiş konjuge çift bağları bulunan doymamış alifatik zincir yapısındadır. Bu bileşenler meyve ve sebzelerde yaygın olarak bulunur ve genellikle su yerine bitkisel yağlarda erirler. Karetenoidler kırmızı, sarı ve turuncu pigment maddeleri olarak doğada en çok bulunan pigmentlerdir. İlk olarak 3 milyar yıl önce bakterilerde ortaya çıkmıştır. İlk kez havuçtan izole edilmiştir. Doğada karotenoid bileşen sayısı yaklaşık 600'dür. Bu karotenoidlerden sadece belirli bir kısmı gıdalarda yer almaktadır [76], [83]. Karotenoidler, insan ve hayvanlar aracılığıyla sentezlenmemektedirler. Karotenoidler bitkiler ve mikroorganizmalar tarafından sentezlenirler [84]. Antioksidan etkisi yüksek olduğu düşünülen karotenoidler arasında likopen, ß-karoten ve lutein yer almaktadır [72]. Karotenoidler ve kanser arasındaki ilişki daha çok akciğer kanseri ile ilgilidir ancak β-karoten′in kandaki oranı yüksek olduğunda rahim, göğüs, cilt ve mide kanseri riskini düşürdüğü saptanmıştır [85], [86].

Fenolik Bileşikler (Polifenoller)

Antioksidan etkiye sahip diğer önemli bir alt grup da fenolik bileşiklerdir. En güçlü doğal antioksidanlar olarak bilinen fenoliklerin antioksidan etkileri; serbest radikalleri bağlama, metallerle şelatları oluşturma ve lipoksijenaz enzimini inhibe etme olarak bildirilmiştir [87]. Bu etkileri ile kanser, kalp hastalıkları ve diyabet gibi çeşitli hastalıklara karşı koruma sağlarlar [88]. Fenolik bileşikler yapılarında benzen halkası taşırlar. Fenollerin en basit bileşikleri bir OH grubu içerir [89]. Polinefenoller olarak da yer alan fenolik maddelerin yapısında doymamış çift bağ grupları bulunmaktadır. Bu durum polifenol içeren meyve veya sebzelerin uzun

süre saklanmasında büyük önem taşır. Antioksidan özellik gösteren fenolik bileşikler ortamda oksijen bulunduğu zaman yağların yükseltgenmesini engellemektedirler [90]. Ayrıca bazı polifenollerin renkli olmaları, meyve ve sebzelerdeki renk pigmenti oluşumunda etki sağlarlar. Polifenoller, enzimatik olarak renkte esmerleşmeyi fenol oksidaz enzimiyle gerçekleştirirler. Bu bileşenlerin antioksidan aktivite göstermesi serbest radikalleri bağlama yeteneğine dayanmaktadır [72].

Fenolik bileşiklerin ayrıca tat, koku ve renk oluşumu, antimikrobiyal ve antioksidatif etkileri, enzim inhibisyonu ve aynı zamanda bazı enzimlere karşı inhibitör etkileri vardır. Alfa difenol oksidaz ve beta galaktosidaz enzim inhibisyonu gösteren fenoliklerdir ve bitkisel kaynaklı gıdalarda bulunur. Bitkisel kaynaklı gıdalarda bulunan fenolik fitokimyasallar, güçlü antioksidan özelliklerinin yanı sıra oksidatif zararlara karşı vücut savunmasına da katkıda bulunmaktadır. Diyetle alınan 1 g fenolik bileşenin tüketimi, birçok maddenin tüketimine oranla oksidatif strese karşı 10 kat daha etkilidir. Bu nedenle polifenol bileşikler faydası yüksek güçlü antioksidanlar olarak da bilinmektedir. Fenolik asitler ve flavonoidler, antioksidan fenolik bileşenlerin en önemli alt gruplarıdır. Aynı zamanda flavonoidler antioksidan özelliği sayesinde diyette yer alan değerli antikarsinojenlerden sayılmaktadır [91].

Terpenoidler

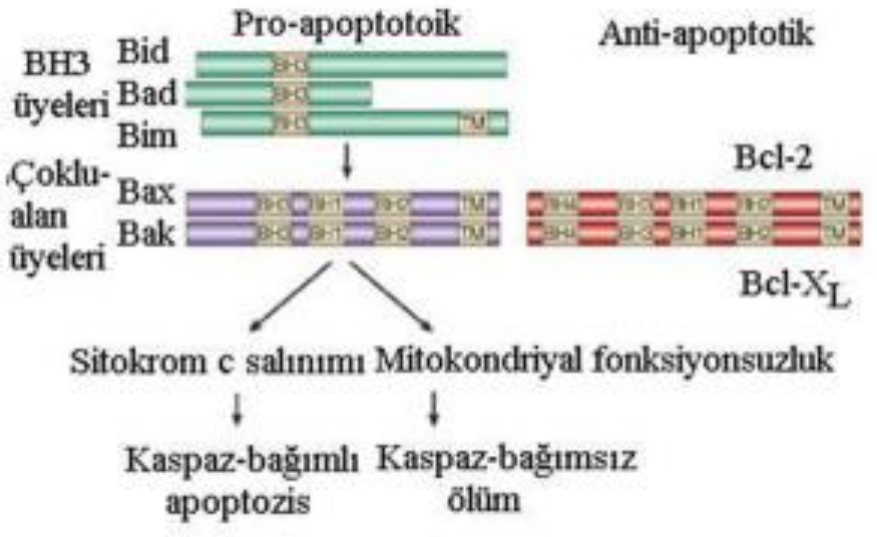
Terpenoidler, organizma üzerinde pek çok önemli biyolojik işlevlere sahip olduğu bilinen ikincil metabolitlerdendir. Gerçekleştirilmiş olan pek çok bilimsel çalışma sonucunda elde edilen veriler, bitkisel aromatik hidrokarbon bileşik grubu olan terpenoidlerin ve bileşenlerinin genellikle mutajenik etki göstermediğini kanıtlamaktadır [92], [93]. Beric ve arkadaşlarının (2008) gerçekleştirdikleri çalışmada *Ocimum basilicum* L. yağının temel bileşeni olan linalool terpenoidinin *Escherichia coli* WP2 suşları üzerinde mutasyona neden olmadıklarını belirtmişlerdir [94]. Terpenoidlerin Alzheimer hastalığının oluşumunu baskılamada ve anti-tümör ajanı olarak kullanabileceği belirtilmektedir [95]. Bitkisel aromatik bileşiklerin genler üzerinde mutajenik etkiye sahip olmamaları onların kullanımına olan umut verici yaklaşımı ve güvenilirliği

kuvvetlendirmektedir [96]. *Ginkgo biloba* ekstraktı içerisinde bulunan terpenoidler (Ginkgolid A, Ginkgolid B), anti-inflamatuar, anti-kanser, nöroprotektif ve hepatoprotektif etkiler dahil olmak üzere birçok önemli biyolojik aktiviteye sahip antioksidanlardır [8], [9].

2.4 Apoptoz

Hücrelerde genlerin düzenlenmesi sonucu ortaya çıkan programlı hücre ölümü apoptoz olarak adlandırılır. Apoptoz bütün çok hücreli organizmalardaki homoestazda ve gelişimde önemli bir role sahiptir [10]. Bu mekanizma organizmada zararlı, yaşlanan ya da istenmeyen hücrelerin yok edilmesini sağlar [11].

Bcl-2 proteinleri, proapoptotik ve antiapoptotik üyeleri içeren onkoprotein grubudur. Bu proteinler apoptozun düzenlenmesinde en önemli role sahiptirler [97]. Bcl-2 ailesi, birbirlerine karşıt etkili iki gruptan meydana gelir. Şekil 2.4'te görüldüğü gibi anti-apoptotikler (Bcl-2 ve Bcl-XL gibi) birinci grup ve pro-apoptotikler (Bax, Bid gibi) ikinci gruptur. Apoptozu baskılayan grup anti-apoptotik, apoptozu indükleyen grup ise pro-apoptotik üyelerdir. Anti-apoptotik grup üyeleri sitokrom C'nin salınmasını engellerken, pro-apoptotik olanlar sitoplazmaya sitokrom C'nin salınımını indükler [98]. Anti-apoptotik ve pro-apoptotik Bcl-2 proteinlerinin dengesiyle hücrelerin apoptoza ilerleyişi gerçekleşir [99]. Anti-apoptotik Bcl-2 proteinleri yüksek oranda sentezlenirse hücreler apoptoza karşı baskılanır, pro-apoptotik üyeler fazla sentezenirse hücreler apoptoza doğru ilerler [98], [100].



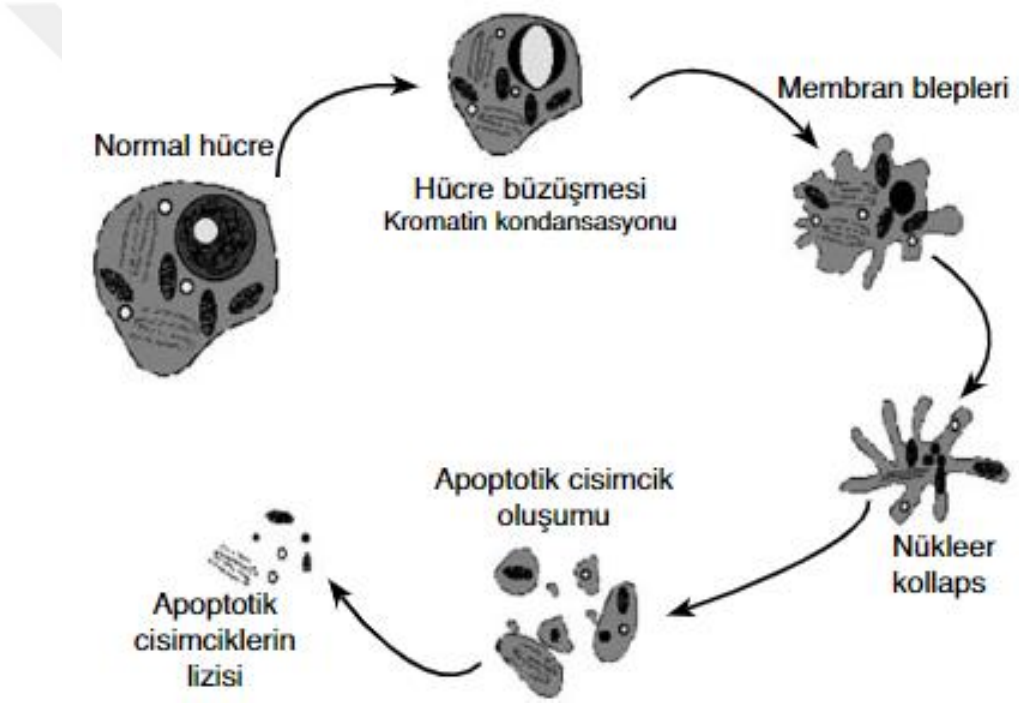
Şekil 2.4 Apoptozisin mitokondri yolunda yer alan Bcl-2 aile üyeleri [101]

Apoptotik süreçte yer alan bir diğer belirteç ise kaspazlardır ve insanlardaki 12 kaspaz çeşidinin 7'si apopoz yolağıyla doğrudan ilişkilidir. Bunlar; kaspaz-2, -3, -6, -7, -8, -9 ve -10 olarak gösterilir. Kaspazlar birincil yapılarında inaktif zimojenler olarak sentezlenirler. Fakat apoptoza karşı uyarıldıklarında aktif formlarına kavuşurlar [102]. Hücre sinyalleri apoptozu başlatır ve daha sonra kaspazların aktivasyonuyla süreç ilerler. Hücrelerden gelen iç sinyallerde kaspaz-9, dış sinyallerde kaspaz-8, hem iç hem de dış sinyallerde ise kaspaz-3 aktivasyonu gerçekleşir [103]. Aktifleşen kaspazlar hedef proteinlerin yıkımını sağlarlar. Bu yıkım sonucunda hücrede yapısal ve biyokimyasal değişiklikler gözlemlenir. Kaspazlar aracılığıyla oluşan bu yıkımda, pro-apoptotik proteinlerin (Bax ve Bak) ekspresyonu artarken, anti-apoptotik proteinlerin (Bcl-2, Bcl-xL) ekspresyonları azalmaktadır [104]. Pro-apoptotik genlerin baskılanması, apoptozu inhibe etmek için kullanılan en etkili yöntemdir [105]. Sağlıklı hücrelerde DNA'da herhangi bir hasar görüldüğünde hücreler apoptoz yolağına girerek yok olur. Ancak kanser hücreleri apoptoz sinyallerinden kaçabilmektedir [2].

Apoptoz, hücre membranın iç tarafındaki fosfotidilserinin hücre membranının dış yüzeyine geçmesine neden olur ve bu durumun sonucunda hücrede morfolojik farklılıklar gözlemlenir [106]. Hücrelerin kromatini apoptoz esnasında nukleus çeperinin etrafında toplanır. Sodyum ve potasyum kanallarının fonksiyonlarını kaybetmesi sonucu hücreler büzülür ve hücrelerinin hacmi azalır. Hücreler

büzüldüğünde morfolojik olarak membran kıvrımlı bir yapıda görünür. Hücrelerin yüzey farklılaşmaları yok olur ve çevredeki diğer hücreler ile bağlantısı kesilir (Şekil 2.5). Ortaya çıkan yapılar apoptotik cisimler olarak adlandırılır ve makrofajlar bu cisimleri yok ederek enflamasyon oluşmasını önlerler [107], [108].

Apoptoz sinyali ile karşılaşan hücreler DNaz ve kaspaz-3 aktivasyonu gösterir ve DNA'nın yaklaşık 200 baz çiftlik spesifik fragmanlara ayrılmasına neden olur. Bu durum sayesinde apoptoza giden hücre TUNEL (Terminal Deoksinükleotidil Transferaz (Tdt) Aracılı dUTP-Biotin Nick Uç- Etiketleme) metodu ile belirlenir [109].



Şekil 2.5 Hücrelerin apoptoz aşamasındaki morfolojileri [110]

2.5 Cisplatin

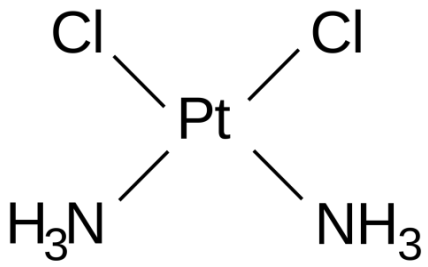
İlk kez Michele Peyronie (1845) tarafından sentezlenen cisplatin, Peyronie'nin klorürü olarak kaydedilmiştir [111]. Ancak kimyasal yapısı Alfred Werner tarafından 1893 yılında açıklanmıştır [112]. Cisplatin ile ilgili ilk çalışmalar *Escherchia coli* bakterisinde yapılmıştır. Çalışmaların amacı, *Escherchia coli* bakterisinin çoğalmasında cisplatinin rolü olarak hedeflenirken [12], Rosenberg ve arkadaşlarının (1965) gerçekleştirdiği çalışmada elektrottan sıvıya geçen platin

türlerinin antibakteriyel ve antineoplastik etki oluşturduğu da ortaya çıkmıştır [113].

Cisplatin'in antikanser aktivitesi üzerine çalışmalar devam etmektedir. Yapılan çalışmalarda cisplatinin kanser hücrelerinde DNA yapısına bağlandığı belirlenmiştir. Bu bağlanma sonucunda DNA'nın sentezini ve DNA'nın replikasyonunu direkt olarak durdurduğu ortaya koyulmuştur [13], [114].

2.5.1 Cisplatin'in Moleküler Yapısı

Cisplatin yumuşak doku kanserleri, sarkoma gibi bir çok kanser türünün tedavisinde kemoterapik ilaç olarak uygulanmaktadır [115]. Cisplatin'in açık formülü "Cis-diamminedichloroplatinum (II)" olarak bilinmektedir (Şekil 2.6). Cisplatin'in iki izomeri (cis ve trans) bulunmaktadır. Cis izomeri sitotoksik etkiye sahiptir. Cisplatin oda sıcaklığında koyu sarı veya beyaz kristal toz halindedir [116]. Su içerisinde çözünmesine rağmen dimetilprimanid içerisinde çözünürlüğü daha da yüksektir. Normal basınç ve sıcaklıkta Cisplatin stabildir fakat zaman içerisinde trans-izomere dönüşebilmektedir [117].



Şekil 2.6 Cisplatin

2.5.2 Cisplatin'in Hücre İçine Alınışı

Cisplatin'in, yapılan ilk çalışmalarda hücre içerisine pasif difüzyon ile alındığı düşünülmüştür. Daha sonra Copper Transporter 1 (CTR1) bakır transport proteininin Cisplatin'in hücre içerisine aktif geçişinde etkili olduğu gösterilmiştir [116]. Ancak çalışmaların ortaya çıkardığı başka bir sonuç ise Cisplatin'in CTR1'in hızlı bir şekilde bozulmasını tetiklediğidir. Bu durumda CTR1'in bozulmasıyla

Cisplatin'in hücreye akışının azaldığı ve ilaca direnç kazanıldığı belirtilmiştir [118], [119].

Genellikle Cisplatin vücut içerisine alındığında, dokulardan başlayarak hücre içi organellere kadar nüfuz etmektedir [120]. Kemoterapi uygulamasının ardından Cisplatin'in vücut içerisindeki dağılımına bakıldığında en yüksek miktarda böbrekte olduğu ve en düşük miktarda ise beyinde bulunduğu belirlenmiştir [121], [122]. Moleküler ağırlığı çok düşük olduğu için yapısal karakterizasyonu değiştirilemeyen Cisplatin'in, uygulamanın ardından 5 gün sonra %45'i idrar ile vücuttan atılmaktadır. İlacın kalan kısmının ise vücuttan atılımı ≤50 gün içerisinde gerçekleşmektedir [123].

2.5.3 Cisplatin'in Etki Mekanizması ve Toksisitesi

Metaller, hücre içi mekanizmalarda işleyiş açısından önemli bir rol üstlenmektedirler. Cisplatin bir metalik-platinyum katyonudur. Metalik-platinyum katyonu olarak en önemli görevi ise apoptozun indüklenmesini sağlamasıdır. Cisplatin'in DNA üzerinde yaratmış olduğu hasar, DNA'ya karşı en önemli etki mekanizması olarak bilinmektedir [124]. Zincir içi çapraz bağlar, DNA çift sarmalının gevşemesine ve aynı zamanda bükülmesine neden olarak DNA'nın yapısal bütünlüğünde bozulmaya yol açabilmektedir [125].

Hücrede sitoplazma klorür iyonlarının konsantrasyonu çok düşüktür. Bu yüzden Cisplatin hidroliz olur ve klor atomlarını kaybedip su molekülünü bağlar. Cisplatin'in bu akuatik formu DNA, RNA ve proteinlerle etkileşmesine olanak sağlar. Bunun sonucunda, DNA sentezini ve transkripsiyonu inhibe etmekten sorumlu olan platin-DNA kompleksleri tümör hücrelerinde apoptozu indükler [126].

Cisplatin toksisitesi için oksidatif stres mekanizması çok önemlidir. Cisplatin tarafından ortaya çıkan oksidatif stresin ilk hedeflendiği organel mitokondridir [127]. Cisplatin'in mitokondriyal DNA (mtDNA) da yaptığı sitotoksik etki, hücre DNA'sına yaptığı toksik etki ile karşılaştırıldığında, mitokondriyal DNA'da 4-5 kat daha yüksek bir toksik etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir [128]. Cisplatin mtDNA'da mitokondriyal gen transkripsiyonunu ve mtDNA replikasyonunu inhibe etmektedir [117]. Toksisiteye maruz kalan mtDNA, elektron taşıma zinciri (ETS)

içinde fonksiyonel olmayan ya da anormal proteinlerin sentezini tetikleyerek mitokondriyal fonksiyonel bozukluklara neden olmaktadır. Cisplatin'in mitokondriyal fonksiyonel hasarı indüklemesiyle oluşan ROS, ortamda normalin üzerinde üretilir. Bu durum hücre içerisinde oksidatif stresin artmasına yol açmaktadır. ROS'un hücrelerde yüksek oranda üretilmesi Cisplatin ile gerçekleştirilen tedavinin uzunluğuna ve dozuna bağlıdır [129].

Cisplatin'in etkisiyle oluşan ROS, apoptoz mekanizmasının uyarılması için kaspaz aktivasyonunu indüklemektedir. Kaspaz-3 apoptotik efektörü nükleer ölüme, hücre iskelet yapısında bozulmaya ve diğer hücre değişikliklerine yol açan önemli bir kaspaz faktörüdür [130]. Cisplatin'in ROS oluşumunu yüksek oranda tetiklediğinin anlaşılmasının yanı sıra, yapılan çalışmalarda ROS moleküllerinin ortamda yüksek oranda bulunmasıyla tümör baskılayıcı p53'ü etkilediği gösterilmiştir. p53 proteinin ortamda baskılanması sonucunda ölüm reseptör-tümör nekroz faktörü etkileşimiyle apoptozun indüklediği ve mitokondriyal disfonksiyonun oluştuğu belirtilmiştir [125], [131]. Cisplatin sadece mitokondride değil, endoplazmik retikulum (ER) üzerinde de oksidatif stres oluşmasına neden olur. ER kaynaklı bu stresin ortaya çıkması hücrelerdeki kalsiyum sinyal mekanizmasını önemli ölçüde etkiler [124]. Hepatotoksisite, miyelosupresyon, nörotoksisite, nefrotoksisite, gastrointestinal toksisite Cisplatin'in iyi bilinen toksik etkileridir [132], [133].

2.6 Ginkgo biloba

Dünya üzerinde en yaşlı ağaç olarak var olan *Gingko biloba* bitkisi Ginkgoopsida'daki *Ginkgoaceae* familyasına ait tıbbi bir bitkidir. *Gingko biloba* bitkisinin ana vatanı Çin olsa da Avrupa, Amerika, Hindistan ve Yeni Zelanda'nın birçok bölgesinde diğer türleri de bulunmaktadır [134].

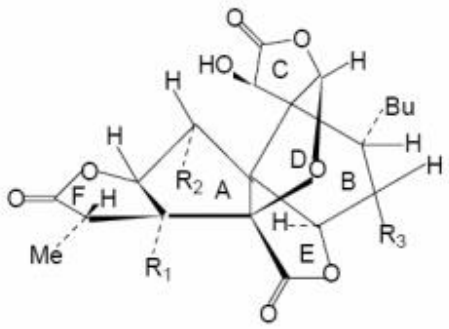
Gingko biloba yüzyıllardır tıbbi amaçlar için kullanılmıştır. Geleneksel tıpta öncelikle solunum ve kardiyovasküler rahatsızlıklar için kullanılmaya başlanmış [135], daha sonra periferik damar hastalıkları ve demansa karşı olumlu etkilerinin olduğu gösterilmiştir [136], [137]. Çeşitli hastalıklara karşı koruyucu etkisinin iyi bir antioksidan olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir [138]. Aybastier'in (2020) yapmış olduğu çalışmada *Ginkgo biloba'nın* ilaç, gıda takviyesi ve yaprak

olmak üzere üç farklı formunda antioksidan kapasitesi ve toplam fenolik madde içeriği incelenmiş, ilaç formundaki ürünün diğer formlardan daha iyi antioksidan özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir [139].

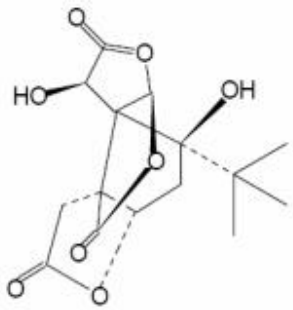
Gingko biloba ekstraktı bitkinin yaprak, kök, kabuk veya tohum gibi kısımlardan çeşitli ekstraksiyon metodları kullanılarak elde edilir. Renksiz ya da açık sarı renkte ve suda çözünebilen yapıdadır [140]. Klinik çalışmalarda (kronik beyin hastalıkları, kısa süreli hafıza kayıpları, beyin travması, demans) *Gingko biloba* ekstraktı kullanımı yaygındır [141].

Ginkgo biloba'nın birincil klinik uygulaması, beyin yetmezliği gibi periferik damar hastalığının tedavisinde olmuştur [142]. *Ginkgo biloba* yaprağının ekstresi hafızanın iyileştirilmesinde ve multipl sklerozun tedavisinde etkilidir [143]. Ayrıca Alzheimer hastalığının ve diğer demans tiplerinin önlenmesi ve tedavisinde etkili olabilir [141].

Gingko biloba'nın terapötik potansiyeli esas olarak, terpenoidler, flavonoidler, polifenoller ve organik asitlerin biyoaktif bileşikleriyle açıklanmaktadır [144]. Birincil terpenoidler olarak ginkgolidler yer alır. *Gingko biloba* standart özütünde yaklaşık olarak %3,2 bilobalid, %3,4 ginkgolid (A, B ve C) ve %24 flavon glikozit bileşenleri (kersetin, isorhamnetin ve kaempferol) bulunmaktadır (Şekil 2.7), [145].



Ginkgolid



(6)Bilobalid

		R_1	R_2	R_3
1	Ginkgolid A (G-A)	OH	H	H
2	Ginkgolid B (G-B)	OH	OH	H
3	Ginkgolid C (G-C)	OH	OH	OH
4	Ginkgolid J (G-J)	OH	H	OH
5	Ginkgolid M (G-M)	H	OH	OH

Şekil 2.7 *Ginkgo biloba*'nın biyoaktif bileşikleri [135]

Ginkgolid metabolizmada trombosit aktive edici faktörü inhibe ederken, yapısındaki antioksidan bileşikler ortamda bulunan hidroksil, süperoksit, peroksil radikalleri gibi serbest radikalleri süpürerek hücreleri protein ve lipid oksidasyonuna karşı korur. Bu nedenle, *Ginkgo biloba* yaprak özleri pek çok ülkede reçeteli bitkisel ilaçlar olarak kullanılmaktadır [146], [147].

2.6.1 *Ginkgo biloba* Bileşenleri

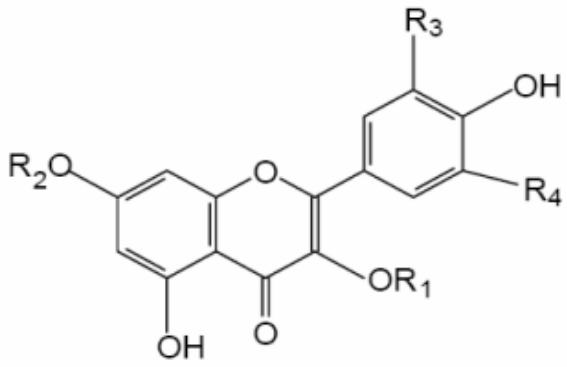
Ginkgo biloba'da en yüksek orandaki bileşen olan flavonoid (Şekil 2.8), yaprak ekstraktlarında bol miktarda bulunmaktadır. Günümüzde *Ginkgo biloba*'dan toplamda 39 adet flavanoid izole edilmiştir [135].

Ginkgolidler, *Ginkgo biloba*'yı karakterize eden bileşikler olarak 1932 yılında Funikawa tarafından izole edilmiştir [148]. Günümüzde 5 çeşit ginkgolid bulunmakta ve araştırmalarda kullanılmaktadır. Ginkgolidler, *Ginkgo biloba*'nın yaprağında çok düşük oranda (%0.1) bulunmaktadır [140]. Fakat Ginkgolid A ve

Ginkgolid B, düşük konsantrasyon oranına rağmen yapraktan izole edilerek kataloglarda yerini almıştır. Ginkgolidlerin sentetik olarak üretimi denenmiş fakat başarılı olunamamıştır. Bu yüzden ginkgolidlerin izole edilebileceği tek kaynak *Ginkgo Biloba* bitkisinin kendisi olmaktadır [135].

Ginkgolidlerin terapötik rolü, nörodejeneratif bozukluklar [149] ve kanser dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarda kanıtlanmıştır ve bir anti-inflamatuar ajan olarak yaygın olarak kullanılmaktadır [150], [151]. Ginkgolidler nöroproteksiyondan sorumludur. Yapılan bir çalışmada ginkgolidlerin akut serebral enfarktüslü sıçanın beyin dokusunda apoptozu azalttığı ve böylece beyin hücrelerini koruduğu gösterilmiştir [152]. Ayrıca ginkgolidlerin, nöronları oksidatif stres hasarından korumak için Akt/Nrf2 sinyal yolağındaki antioksidan proteinlerin seviyelerini yükselttiği kaydedilmiştir [14].

Gingko biloba'nın bir diğer bileşeni olan Bilobalidin izolasyonu 1967 yılında gerçekleştirmiştir. Bilobalid'in formülü $C_{15}H_{18}O_8$ olup Şekil 2.7'de gösterilmiştir [135].



Şekil 2.8 *Ginkgo Biloba*'dan sentezlenen flavanoidin yapısı [135]

2.6.2 Ginkgolid A

Ginkgolid A, C_1 ve C_{10} içeren iki adet ikincil hidroksil grubuna sahip bir diterpendir [153]. Moleküler formülü $C_{20}H_{24}O_9$'dur. Ginkgolid A, *Ginkgo biloba* ağacının yapraklarından izole edilen oldukça aktif bir trombosit aktive edici faktör (PAF) antagonisti molekülüdür. PAF, çok çeşitli inflamatuar ve immünolojik bozukluklar, nörotoksisite ve kardiyovasküler hastalıklarda var olan bir

fosfolipiddir. Aynı şekilde Ginkgolid A'da çok çeşitli inflamatuar ve immünolojik bozukluklarda tedavi edici etki gösterir. Ginkgolid A ayrıca Alzheimer tedavisinde ve serebral iskemi için yaygın olarak kullanılmaktadır [154].

Ginkolid A ile gerçekleştirilmiş bir araştırmada sıçan kaynaklı C6 glioma hücrelerinde ve insan BT325 glioma hücrelerinde serbest radikal olarak nitrik oksitin üretimini inhibe ettiği gösterilmiştir [155]. Nitrik oksit radikali AIDS, demans ve multipl skleroz dahil olmak üzere çeşitli sinir sistemi bozukluklarında önemli bir nörotoksisite aracısı olarak ortaya çıkmaktadır [156]. Ginkgolid A bu süreçte nörotoksik sinyalleşmeden önce, sinapsta nöroprotektif bir davranış sergiler [154].

Zhou ve arkadaşları (2006), domuz koroner arterlerinde homosistein kaynaklı endotelyal disfonksiyonu Ginkgolid A ile bloke ettiklerini bildirdiler [157]. Chen ve arkadaşları (2012), Ginkgolid A'nın nöroprotektif davranışı üzerine gerçekleştirdikleri çalışmada N2a hücrelerinde Tau fosforilasyonunu incelemişlerdir. Ginkgolid A'nın hücre lizatlarında Tau proteininin fosforilasyon seviyesini baskılayabildiğini bulmuşlardır [158]. Gerçekleştirilen çalışmalara rağmen, Ginkgolid A ile ilgili araştırmalar sınırlı sayıdadır.

2.7 Polimerik Nanopartiküller (NP)

Terapötik ajanların hedef bölgeye ulaştırılması birçok hastalığın tedavisinde temel konulardan biri olarak kabul edilmektedir. İlaçların zayıf etkinlik göstermesi uygulama yöntemleriyle doğrudan ilişkilidir. Birçok uygulama alanına sahip olan NP biyouyumlu malzemeler olarak çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmak amacıyla sentezlenir [15]. Nanoteknolojik yöntemler ile elde edilen birçok viral NP'ler, lipozomlar, polimerik NP'ler ve karbon nanotüpleri gibi nano-yapılı sistemler bulunmaktadır [159].

Polimerler, çok yönlü karakteristik özellikler vermek üzere tasarlanabildiklerinden dolayı biyomedikal alanda kullanılan nanomalzemenin en yaygın nano yapılı sistemlerinden biridir [160]. Kontrollü salınım için potansiyel kullanımları, biyolojik aktiviteye sahip moleküllerin çevresel faktörlere karşı korunması, biyoyararlanımı arttırması ve terapötik indeksleri iyileştirme yetenekleri polimerik NP'lerin ilaç taşıyıcı olarak kullanımında avantaj sağlar. Polimerik NP, 1-1000 nm

boyutlarındadır ve polimerik çekirdeğin içinde tutulan veya yüzey tarafından adsorbe edilen aktif bileşiklerle yüklenebilir [161].

Rezervuar sistemi (nanokapsül) ve matris sistemi (nanoküre) olarak iki tip polimerik NP tanımlanmaktadır. Nanoküreler, etken maddenin polimerik matriks yapı içinde çözündüğü bir sistem olarak bilinir. Nanokapsül ise etken maddenin polimerik bir membran tarafından çevrelenmiş bir çekirdek içinde bulunduğu rezervuar sistem olarak tanımlanır [162], [163].

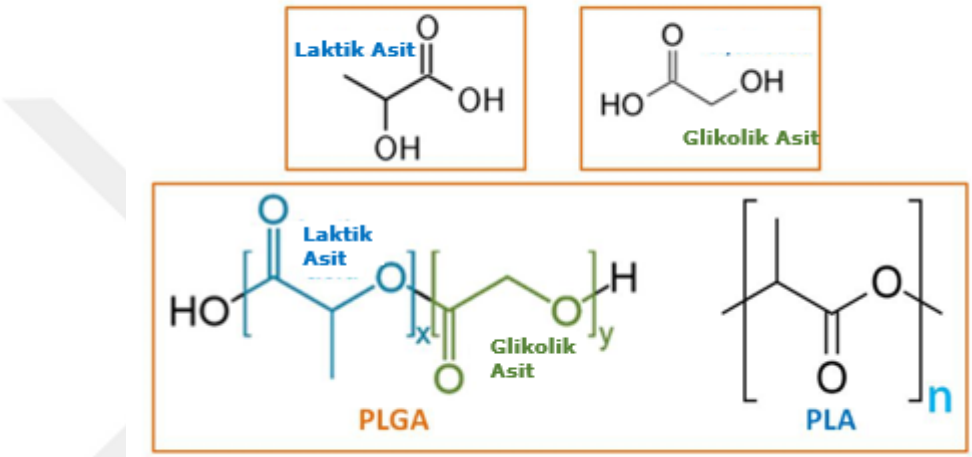
Polimerik NP'lere yüklenecek ilacın tipine ve belirli bir uygulama yolu için gereksinimlerine bağlı olarak, partiküllerin üretimi için farklı yöntemler kullanılabilir [164]. Polimerik NP'ler oluşturulurken sentetik veya doğal polimerler kullanılmaktadır. Polimer seçimi, oluşturulmak istenilen NP yapısı için en önemli basamaktır. En yaygın sentetik polimerler; poliglikolik asit (PGA), polilaktik asit (PLA), poliakrilatlar ve poli (laktik-ko-glikolik asit) kopolimerleri (PLGA)'dir [165].

PLGA, biyouyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilme özelliğinden dolayı biyomedikal uygulamalarda tercih edilen bir polimerdir. Ester bağlarının hidrolizi ile vücutta parçalananan PLGA'dan üretilen laktik asit ve glikolik asit monomerleri, organizmada Krebs döngüsü ile metabolize edilebildikleri için minimum sistemik toksisiteye sahiptirler. Bu sayede organizmadan karbondioksit ve su olarak atılırlar. Ayrıca, glikolik asit böbrekte değişmeden atılabilir [166]. FDA, ilaç taşıcı olarak insanlarda PLGA kullanımını onaylamıştır [17]. PLGA polimerleri sadece ticari olarak mevcut değildir. Aynı zamanda monomerlerinden sentezlenebilir. Molekül ağırlıkları ve monomer oranları, bileşime bağlı olarak farklı olabilir [167]. PLGA NP hücreler tarafından endositoz ve pinositoz yoluyla içeri alınabilir. Bu NP'ler, endo-lizozomlardan kaçar ve kısa bir inkübasyon süresi içinde sitoplazmaya girer. Bu yüzden PLGA ilaç taşıma sistemi olarak klinik çalışmalarda en çok kullanılan NP yapıdır ve kimyasal açılımı Şekil 2.9'da gösterilmiştir [168]. Üretilen polimerik NP'lerin karakterizasyon tayini için boyut, zeta potansiyeli ve FT-IR gibi birçok analiz yapılmaktadır [169].

Jayasuriya ve Darr (2013) gerçekleştirdikleri çalışmada, kanser tedavisi için kontrollü salım gösteren bir ilaç tedavisi oluşturmayı amaçlayarak Cisplatin yüklü

PLGA NP sentezlemiş ve Cisplatin'in serbest formuna göre Cisplatin yüklü PLGA NP'nin rahim kanseri hücrelerinde apoptozu daha fazla arttırdığını kaydetmişlerdir [170].

Zhang ve Gao (2007), yaptıkları çalışmada C6 Glioma hücrelerinde temozolomid yüklü PLGA NP'nin sitotoksisitesini değerlendirdiklerinde, aynı dozlardaki temozolomid yüklü PLGA NP'nin serbest formuna oranla daha yüksek apoptotik aktivite gösterdiğini raporlamıştır [171].



Şekil 2.9 PLGA ve PLA'nın kimyasal şemaları [166]

Hsu ve arkadaşları (2004), *Gingko biloba* eksraktı (EGb 761) yüklü PLGA NP'nin Schwann hücrelerinde etkisini araştırmış ve EGb 761 yüklü PLGA NP'nin, Schwann hücrelerinde sinir rejenerasyonundaki toplam miyelinli akson sayısını arttırdığını ve periferik sinir fonksiyonlarının iyileşmesinde serbest EGb 761'e göre etkisinin yüksek olduğunu raporlamışlardır [172].

3
MATERYAL- METOD

3.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar

- Santrifüj – Beckman Coulter Allegra X-30 R
- Hassas Terazi – Shimadzu
- Saf Su Cihazı – Sartorius
- Manyetik Karıştırıcı – Variomag Mono
- Sonikatör – Bandelin Sonoplus
- Vorteks – Velp Scientifica
- Biyogüvenlik Kabini – Hedlab XPROII
- Ultrasonik Su Banyosu – Bandelin Sonorex
- Peristaltik Pompa – Masterflex Core Palmer
- CO_2 İnkübatör – Biosan, ES20
- UV-Vis Spektrofotometre – Shimadzu UV-1800
- FT-IR – Thermo Scientific Nicolet iS10
- Liyofilizatör – Telstar Cryodos
- Inverted Mikroskop – Olympus
- Mini Santrifüj Cihazı – Hermle Z 206 A
- Zeta Sizer – Malvern ZEN 3600 Nano ZS
- Elisa Okuyucu – BioTek PowerWave XS2

3.2 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasallar

- Dulbecco's Modified Eagle Medium / F-12 Nutrient Mixture (Ham) (DMEM/F-12 / 1:1 / 1X) – Gibco 1906042
- Polivinil Alkol –Sigma Aldrich 363138
- Diklorometan (DCM) – Merck 106050
- L-glutamine 200mM (100X) – Gibco1881732
- Etil Alkol – Merck 100986
- Poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) – Sigma 719870

- Tripsin EDTA – Multicell 325043156
- PEST (Penisilin-Streptomisin)– Sigma P4333
- MTT (Thiazoyl Blue Tetrazolium Bromide) – Sigma M5655
- Fetal Sığır Serumu – Gibco 08G5259K
- DMSO (Dimetil Sülfoksit) – ChemCruz sc358801
- NaH_2PO_4 (Monosodyum Fosfat) – Sigma Aldrich 04270
- NaCl (Sodyum Klorür)– Sigma Aldrich 13423
- $Na_2HPO_4.2H_2O$ (Disodyum Fosfat Dihidrat) – Sigma Aldrich 04272
- Tripan Mavisi – Sigma T8154
- Ginkgolid A- Sigma G4028
- Cisplatin- Merck 23120

3.3 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kitler

- Total Antioxidant Status Assay Kit- Rel Assay Diagnostics
- Total Oxidant Status Assay Kit-Rel Assay Diagnostics
- TUNEL Kit- ApopTag Plus Peroxidase In Situ
- Smart BCA Protein Assay

3.4 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler

3.4.1 NP Hazırlamada Kullanılan Çözeltiler

Polivinilalkol (PVA) Çözeltisinin Hazırlanması

PVA 3 g tartılarak üzerine 100 ml saf su eklendi. Karışım manyetik karıştırıcıya koyularak 65-75°C'de homojen bir çözelti oluşuncaya kadar karıştırıldı. %3'lük PVA çözeltisi elde edildi.

Fosfat Tamponunun (PBS) (0,01 mol/L) Hazırlanması (pH=7.4)

$Na_2HPO_4.2H_2O$ 1.7799 g, NaH_2PO_4 1.1998 g ve NaCl 5.85 g tartıldı. 1 litre distile su eklenerek manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. PBS'nin pH değeri 7.4'e ayarlandı.

3.4.2 Hücre Kültürü Çözeltileri

DMEM/F12 ile Tamamlanmış Besiyeri

2 Mm L-Glutamin, %5 FBS (Fetal Sığır Serumu) ve total hacmin %1'i oranında Penisilin Streptomisin DMEM/F12 besiyerine eklendi. C6 Glioma hücrelerinin kültürü için hazırlanan bu besiyeri kullanıldı.

Hücre Dondurma Solüsyonu

%10 Dimetil Sülfoksit (DMSO) ve %90 DEMEM/F12 tamamlanmış besiyeri kullanılarak hücre dondurma solüsyonu hazırlandı ve alikotlanarak -20°C'de saklandı.

MTT (Thiazoyl Blue Tetrazolium Bromide) Solüsyonu

6 mg MTT tartıldı ve 10 ml PBS'te çözüldü. Hazırlanan solüsyon filtreden geçirilerek MTT konsantrasyonu 0.6 mg/ml MTT olarak ayarlandı. +4°C'de kullanılacak zamana kadar karanlık ortamda bekletildi.

3.5 Deneysel Metodlar

3.5.1 Cisplatin Yüklü NP Sentezi

1 mL serum fizyolojik içerisinde çözünen 1 mg Cisplatin molekülü, 1.5 mL diklorometan (DCM) içerisinde çözünen 100 mg PLGA'ya eklenerek öncelikle su/yağ emülsiyonu oluşturuldu. Hazırlanan bu sulu çözelti %3'lük PVA çözeltisi içine ultrasonikasyona tabi tutularak eklendi ve su/yağ/su emülsiyonu elde edildi. Elde edilen bu emülsiyon %0.1'lik PVA çözeltisi içine eklendi. Oluşturulan NP'nin boyutunu minimuma indirmek ve NP çözeltisindeki organik çözücüyü buharlaştırmak için hazırlanan karışım 4 saat manyetik karıştırıcı üzerinde bırakıldı. Sonrasında 40 dk 10000 rpm +4°C'de santrifüj edildi. Santrifüj bitiminde süpernatant kısım toplandı ve pellet üzerine 35 ml ultra saf su eklendi. Bu yıkama işlemi 3 kez tekrar edildi. İşlem sonrası toplanan süpernatant enkapsülasyon veriminin indirekt tayini için kullanılırken, çöktürülen katı formdaki NP liyofilizatörde (-70°C, 0.01 mbar basınçta) kurutularak toz halde kullanılana kadar –20°C'de saklandı.

3.5.2 Ginkgolid A Yüklü NP Sentezi

1 mL su içerisinde çözünen 1 mg Ginkgolid A, 1.5 mL DCM içerisinde çözünen 100 mg PLGA'ya eklenerek öncelikle su/yağ emülsiyonu oluşturuldu. Hazırlanan bu sulu çözelti %3'lük PVA çözeltisi içine ultrasonikasyona tabi tutularak eklendi ve su/yağ/su emülsiyonu elde edildi. Elde edilen bu emülsiyon %0,1'lik PVA çözeltisi içine eklendi. Oluşturulan NP'nin boyutunu minimuma indirmek ve NP çözeltisindeki organik çözücüyü buharlaştırmak için hazırlanan karışım 4 saat manyetik karıştırıcı üzerinde bırakıldı. Sonrasında 40 dk 10000 rpm +4°C'de santrifüj edildi. Santrifüj bitiminde süpernatant kısım toplandı ve pellet üzerine 35 ml ultra saf su eklendi. Bu şekilde yıkama işlemi 3 kez tekrar edildi. İşlem sonrası toplanan süpernatant enkapsülasyon verimi tayini için kullanılırken, çöktürülen katı formdaki NP liyofilizatörde (-70°C, 0.01 mbar basınçta) kurutularak toz halde kullanılana kadar –20°C'de saklandı.

3.5.3 Cisplatin ve Ginkgolid A Yüklü NP'nin Karakterizasyonu

Enkapsülasyon Etkinliği (EE) Hesaplanması

Enkapsülasyon veriminin hesaplanması için farklı konsantrasyonlarda Ginkgolid A ve Cisplatin için ayrı ayrı seri çözeltiler hazırlandı. UV spektrofotometresi ile absorbans piki verilen dalga boyları tespit edildi. Kalibrasyon eğrisi çizmek amacı ile hazırlanan çözeltilerin tek dalga boyunda UV absorbans değerleri belirlendi.

NP sentezi sırasında toplanan süpernatant kullanılarak etken madde yükleme ve enkapsülasyon verimi hesaplandı. Süpernatant kısmından elde edilen UV absorbans değerleri ile kalibrasyon eğrisi çizildi. Aşağıdaki eşitlik (3.1) yardımıyla EE (%) hesaplandı.

$$\text{EE}\ (\%) = \frac{\text{Nanopartikül içerisine yüklenen etken madde miktarı (mg)}}{\text{Kullanılan etken madde miktarı (mg)}} \text{ x } 100 \quad (3.1)$$

Reaksiyon Verimi (RV) Hesaplanması

Sentezlenen katı NP miktarı, sentezde kullanılan toplam PLGA ve etken madde miktarına oranlanarak aşağıdaki eşitlik ile (3.2) RV (%) hesaplandı.

$$\text{RV}(\%) = \frac{\text{Üretilen nanopartikül miktarı (mg)}}{\text{Başlangıç PLGA miktarı (mg)} + \text{etken madde miktarı (mg)}} \text{ x } 100 \quad (3.2)$$

İlaç Yükleme Kapasitesi (DL) Hesaplanması

Hesaplanan enkapsüle madde miktarı, sentez sonucu elde edilen katı NP miktarına oranlandı ve DL (%) hesaplandı (3.3).

$$\mathrm{DL}(\%) = \frac{\text{Nanopartikül içerisine yüklenen etken madde miktarı (mg)}}{\text{Elde edilen katı nanopartikül miktarı (mg)}} x\ 100 \quad (3.3)$$

Zeta Sizer Analizi

Dinamik ışık saçılması yöntemi ile sentezlenen NP'lerin parçacık boyutu (Z-Ave), polidispersite indeksi (PDI) ve zeta potansiyeli belirlendi [17]. Bu yöntem Zetasizer Nano ZS cihazında (4.0 mV He-Ne lazer lamba) 1.330 kırılma indeksi ve 0.8872 cP viskozite değerlerinde 25 °C'de 3 tekrarlı gerçekleştirildi.

FT-IR (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi) Analizi

Thermo Scientific Nicolet iS10 cihazı kullanılarak Cisplatin yüklü PLGA NP ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP'nin fonksiyonel grup tayinleri gerçekleştirildi. NP'lerin analizi 3 tekrarlı olacak şekilde doğrudan ATR (Attenuated Total Reflection) kullanılarak gerçekleştirildi.

Cisplatin yüklü PLGA NP ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP'nin *İn Vitro* Salımı

Cisplatin yüklü PLGA NP ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP'nin *in vitro* salımı için, hazırlanan nanopartükül formülasyonlarının her biri PBS ile karıştırıldı. 37°C de çalkalama cihazına (200 rpm) bırakıldı ve günlük salımı gerçekleştirildi. +4 °C 10000 rpm'de 20dk santrifüj edildi ve süpernatant toplandı. 202 nm'de çizilen Cisplatin standart eğrisi ile Cisplatin miktarı hesaplandı. Salım analizi 40 gün boyunca takip edildi.

Ginkgolid A yüklü PLGA NP için de aynı yöntem gerçekleştirildi. 270 nm'de çizilen Ginkgolid A standart eğrisi ile Ginkgolid A miktarı hesaplandı. Salım analizi 40 gün boyunca takip edildi.

3.5.4 Hücre Kültürü Çalışmaları

C6 Glioma Hücre Kültürü

C6 Glioma hücreleri, Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu merkezinden (ATCC-CCL-107) satın alındı ve kryobank oluşturuldu (Tablo 3.1).

Tablo 2.2 C6 Glioma Hücre Hattı

ATCC Kodu: CCL-107™
Hücre: C6 Glioma
Organizma: *Rattus norvegicus*
Organ: Beyin
Hücre Tipi: Glial Hücre
Büyüme Özelliği: Adherent (Yapışan)
Hastalık: Glioma

Sıvı azot tankında stoklanan hücreler çıkarılarak su banyosu içerisinde çözdürüldü. Hücreler tamamlanmış DMEM/F12 besiyeri eklenen 15 ml'lik falkon tüp içerisine aktarıldı ve 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süpernatant atıldı. Pellete, tamamlanmış DMEM/F12 besiyeri eklendi. Hücreler 25 cm^{2}'lik ve 75 cm^{2}'lik flasklara aktarılarak 37°C %5 CO_2 içeren inkübatör ortamında çoğalmaya bırakıldı.

C6 Glioma Hücrelerinin Pasajlanması

Hücreler, konfluent hale geldiğinde pasajı yapıldı. Hücreler pasajlanırken içerisindeki besiyeri uzaklaştırıldı. Ardından flask içerisine PBS eklenerek hücre yüzeyinde kalan besiyerinin de ortamdan uzaklaşması için yıkama işlemi gerçekleştirildi. Flask yüzeyinde yapışmış hücrelere 2 ml Tripsin-EDTA eklenerek 5 dk kadar inkübatörde bekletildi. Tripsin EDTA ile yüzeyden kalkan hücreler, tamamlanmış besiyeri eklenerek falkon tüpe aktarıldı ve 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Pellet tekrar tamamlanmış besiyerinde çözdürüldü. Thoma lamında hücre sayımı yapıldı. Mikroskopta hücrelerin morfolojileri incelendi. Hücreler sayılarak yeni flasklara aktarıldı ve 37°C %5 CO_2 içeren inkübatörde kültüre devam edildi.

C6 Glioma Hücre Hattının Kriyoprezervasyonu

%90 FBS ve %10 DMSO kullanılarak dondurma solüsyonu hazırlandı. Solüsyonda $10x10^5$ hücre/ml olacak şekilde hücreler eklenerek kriyotüplere aktarıldı. Kriyotüpler, -20 °C'de 2 saat ve sonra -80 °C'de bir gece bekletilip sıvı azot tankına aktarıldı.

3.5.5 Stok Solüsyonların Hazırlanması

Cisplatin Stoğunun Hazırlanması

0.3 mg/ml Cisplatin, tamamlanmış besiyeri içinde çözülerek stok hazırlandı. Solüsyon, hücre kültürü kabininde 0.22 µm'lik steril filtrelerden geçirildi. Stok Cisplatin solüsyonu 1 µM, 5 µM, 10 µM, 25 μM, 50 μM, 75 μM, 100 μM, 125 μM, 150 μM konsantrasyonlarında olacak şekilde C6 Glioma hücrelerine 24 ve 48 saat uygulandı.

Cisplatin yüklü PLGA NP Stoğunun Hazırlanması

1.56 mg/ml Cisplatin yüklü PLGA NP, tamamlanmış besiyeri içinde çözülerek stok hazırlandı. Solüsyon hücre kültürü kabininde 0.22 µm'lik steril filtrelerden geçirildi. Stok Cisplatin yüklü PLGA NP solüsyonu 1 µM, 5 µM, 10 µM, 25 μM, 50 μM, 75 μM, 100 μM, 125 μM, 150 μM konsantrasyonlarında olacak şekilde C6 Glioma hücrelerine 24 ve 48 saat uygulandı.

Ginkgolid A Stoğunun Hazırlanması

0.4 mg/ml Ginkgolid A tamamlanmış besiyeri içinde çözülerek stok hazırlandı. Solüsyon hücre kültürü kabininde 0.22 µm'lik steril filtrelerden geçirildi. Stok Ginkgolid A 5 µM, 10 µM, 25 μM, 50 μM, 100 μM, 150 μM, 250 μM, 500 μM, 1000 μM konsantrasyonlarında olacak şekilde C6 Glioma hücrelerine 24 ve 48 saat uygulandı.

Ginkgolid A yüklü PLGA NP Stoğunun Hazırlanması

4.16 mg/ml Ginkgolid A yüklü PLGA NP, tamamlanmış besiyeri içinde çözülerek stok hazırlandı. Solüsyon hücre kültürü kabininde 0.22 µm'lik steril filtrelerden geçirildi. Stok Ginkgolid A yüklü PLGA NP solüsyonu 5 µM, 10 µM, 25 μM, 50 μM,

100 μM, 150 μM, 250 μM, 500 μM, 1000 μM konsantrasyonlarında olacak şekilde C6 Glioma hücrelerine 24 ve 48 saat uygulandı.

3.5.6 MTT Yöntemi

Hücreler 3 tekrarlı olacak şekilde 100 μl besiyeri bulunan 96 kuyucuklu mikroplaka içerisine her kuyucukta $10x10^3$ hücre olacak şekilde ekildi ve inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası her kuyucuğa farklı konstantrasyonlarda (5 µM, 10 µM, 25 μM, 50 μM, 100 μM, 150 μM, 250 μM, 500 μM, 1000 μM olacak şekilde) Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP ile farklı konstantrasyonlarda (1 µM, 5 µM, 10 µM, 25 μM, 50 μM, 75 μM, 100 μM, 125 μM, 150 μM olacak şekilde) Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP eklenerek hücreler 24 ve 48 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda üst sıvı atıldı. Kuyucuklara 150 μl MTT solüsyonu eklendi ve 4 saat 37°C'de %5 CO_2 içeren inkübatörde inkübasyona bırakıldı. 4 saat inkübasyonun sonunda MTT solüsyonu kuyucuklardan uzaklaştırıldı ve kuyucukların üzerine MTT ile oluşan formazon kristallerini çözmek için 100 μl DMSO eklendi. Kuyucuklar 570 nm dalga boyunda ELISA okuyucuda okutuldu. Kaydedilen absorbans değerleri ile canlılık (%) aşağıdaki eşitlik ile (3.4) hesaplanarak grafik çizildi. Grafikten %50 inhibisyon sağlayan konsantrasyon (IC_{50}) değeri hesaplandı.

$$Canlılık\ (\%) = \frac{Absorbans\ (örnek)}{\text{Absorbans (kontrol)}} x\ 100 \qquad (3.5)$$

3.5.7 Oksidatif Stres ve Antioksidan Analizleri

C6 Glioma Hücre Lizatlarının Hazırlanması

Hücreler 25 cm^2'lik flasklara ekildi ve %5 CO_2 içeren 37°C inkübatörde büyütüldü. C6 Glioma hücreleri IC_{50} değerine göre belirlenen konsantrasyonlarda (75 μM, 125 μM, 175 μM) Ginkgolid A, (75 μM, 125 μM, 175 μM) Ginkgolid A yüklü PLGA NP, (10 μM, 25 μM, 50 μM) Cisplatin ve (10 μM, 25 μM, 50 μM) Cisplatin yüklü PLGA NP ile 24 ve 48 saat muamele edildi. İnkübasyon sonunda flasklardan besiyerleri uzaklaştırıldı. 1x PBS ile yıkanan hücreler, tripsin ile kaldırılarak tüplere aktarıldı.

Oluşturulan lizatlar antioksidan ve oksidatif stres parametreleri analizine kadar -20°C'de muhafaza edildi.

Toplam Oksidan Seviye (TOS) Ölçümü

Hazırlanan C6 Glioma hücre lizatlarında Ginkgolid A, Ginkgolid A yüklü PLGA NP, Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP'nin TOS değerleri için kit prosedürü uygulandı. 15'er μl olacak şekilde standart solüsyon, level 1 ve level 2 solüsyonu, H_2O ve lizatlar mikroplate kuyucuklarına aktarıldı. Her kuyucuk üzerine 100 μl reagent 1 eklendi. 30 saniye inkübasyon sonrası ELISA okuyucu ile 530 nm dalga boyunda absorbans değeri ölçüldü. Kaydedilen reagent 1 değerinin ardından kuyucuklara reagent 2 eklenip 10 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda ELISA okuyucuda 530 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldü ve kit prosedürüne göre hesaplandı. Analiz 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

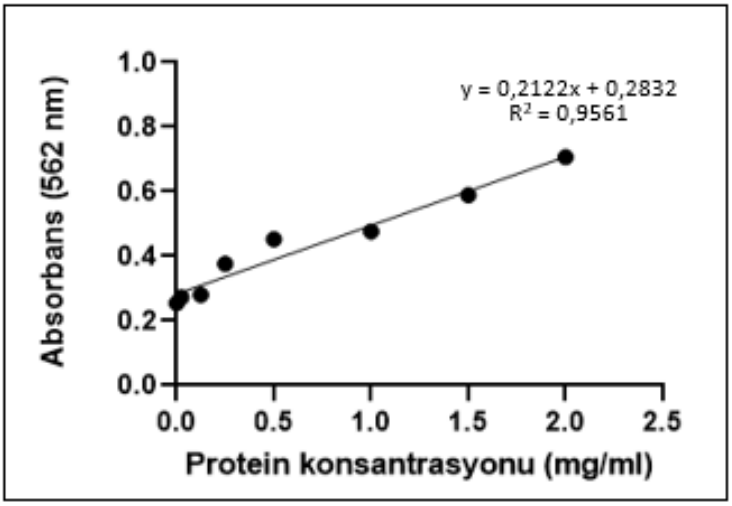
Toplam Antioksidan Seviye (TAS) Ölçümü

Hazırlanan C6 Glioma hücre lizatlarında Ginkgolid A, Ginkgolid A yüklü PLGA NP, Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP'nin TAS değerleri için kit prosedürü uygulandı. 15'er μl olacak şekilde standart solüsyon, level 1 ve level 2 solüsyonu, H_2O ve lizatlar mikroplate kuyucuklarına aktarıldı. Her kuyucuk üzerine 166 μl reagent 1 eklendi. 30 saniye sonra ELISA okuyucuda 660 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldü. Kaydedilen reagent 1 değerlerinin ardından kuyucuklara 25 μl reagent 2 eklenip 10 dk oda sıcaklığında inkübasyon sonrasında ELISA okuyucu ile 660 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldü ve kit prosedürüne göre hesaplandı.

Protein Miktarı Analizi

Smart BCA Protein Assay kiti ile protokole uygun olarak protein miktarı tayini gerçekleştirildi. 0 mg/ml, 0.025 mg/ml, 0.125 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1 mg/ml, 1.5 mg/ml, 2 mg/ml bovine serum albümin (BSA) içeren seri dilüsyonlar standart eğri çizimi için hazırlandı. BSA standart eğrisi Şekil 3.1'de gösterilmiştir. Hazırlanan seri dilüsyonlardan ve hücre lizatlarından 10'ar μl, 96 kuyucuklu mikroplakaya 3 tekrarlı olacak şekilde koyuldu. Kit içerisindeki A ve B solüsyonları protokole uygun olarak karıştırıldı ve her bir kuyucuğa 200 μl eklendi. Mikroplaka

30 dk 37°C'de inkübasyona bırakıldı. ELISA okuyucu yardımıyla 562 nm'de absorbans ölçümü alındı.



Şekil 3.1 Protein miktar analizi standart eğrisi

MDA Düzeyinin Belirlenmesi

MDA tayini için, %3.75'lik Tiyobarbütirik Asit ve %15'lik TCA/TBA reaktifi Trikloroasetik Asit kullanılarak hazırlandı. 0.2 ml TCA/TBA reaktifi 0.1 ml hücre lizatı üzerine eklenerek 100°C'de 15 dk kaynatıldı. Örnekler 5 dk 3000 g'de santrifüj edildi ve 532 nm'de absorbans değerleri ölçüldü. TBARS içeriği hesaplanması için belirli miktarlardaki MDA (0.82; 1.23; 1.64; 2.46; 3.28 µg) içeren çözeltilerin deney sonundaki absorbans değerlerine göre çizilen standart grafik kullanıldı [61].

SOD Enzim Aktivitesinin Tayini

1988 yılında Sun ve arkadaşları, SOD enzim aktivitesinin tayini için bir teknik açıkladı [173]. 0.6 mM EDTA-disodyum, 0.3 mM Ksantin, 400 mM Na_2CO_3, 150 µg/mL NBT ve 1 mg/ml BSA kullanılarak reaktif çözeltisi hazırlandı. 50 µl ksantin oksidaz ve 2.45 ml reaktif çözeltisi 500 µl hücre lizatına eklendi. Tüpler 20 dk 25°C'de inkübe edildi ve 1 ml $CuCl_2$ eklenerek reaksiyon durduruldu. Distile suya karşı absorbans ölçümü 560 nm'de yapıldı. Örneklerin SOD miktarı (U/mg protein) hesaplanması için standart eğri grafiği çizildi.

GSH Düzeyinin Belirlenmesi

C6 Glioma hücrelerinin lizatlarında redükte GSH tayini için gerekli çözeltiler hazırlandı. Proteinsizleştirme çözeltisi için 2.7 mM EDTA-disodyum tuzu, 0.2 M metafosforik asit ve 5 M NaCl karıştırıldı. 0.3 M Na_2HPO_4 içeren fosfat tamponu hazırlandı. Ellman Reaktifi, DTNB'nin %1'lik Na-sitrat içerisinde çözdürülmesiyle oluşturuldu [174]. 0.3 ml proteinsizleştirme çözeltisi, 0.2 ml lizat üzerine eklendi ve oda sıcaklığında 5 dk bekletildi. 10 dk 2000 g'de santrifüj edildikten sonra 0.2 ml fosfat tamponu ve 25 µl Ellman Reaktifi süpernatanttan alınan 50 µl örnek üzerine eklendi. Örneklerin absorbans değeri 412 nm'de ölçüldü. Örneklerin GSH miktarı (μg glutatyon) hesaplanması için standart eğri grafiği çizildi.

3.5.8 Apoptoz Tayini

TUNEL, DNA hasar tespitinde en yaygın kullanılan bir yöntemdir [175]. Apoptoz sürecindeki hücre çekirdeği bu yöntem sayesinde spesifik olarak boyanır ve mikroskopta görüntüleme ile hücre ölümü tespit edilir [176]. Apoptoz evresinde hücrede DNA zinciri kopar ve 3-OH bölgesi serbest kalır. TUNEL yönteminde deoksiuridin trifosfat moleküllerinin 3-OH ucundaki DNA zincir kırıklarına terminal deoksinükleotidil transferaz enzimi (Tdt) eklenerek apoptozdaki hücreler işaretlenir. DAB kromojeni ile apoptotik hücreler incelendiğinde kahverengi gözlemlenir [177].

24'lük mikroplakalar içerisine yuvarlak lameller yerleştirildi. Lamellerin üzerine 10^4 hücre/ml olacak şekilde C6 Glioma hücreleri ekildi ve 500 µl tamamlanmış DMEM/F12 besiyerinde inkübatörde büyütüldü. C6 Glioma hücreleri; 75 μM, 125 μM, 175 μM konsantrasyonlarda olacak şekilde Ginkgolid A, Ginkgolid A yüklü PLGA NP ve 10 μM, 25 μM, 50 μM konsantrasyonlarında Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP ile muamele edildi. 24 ve 48 saat inkübasyon sonrası hücreler 5 dk 1x PBS ile yıkandı ve soğuk metanolle fikse edildi. Apoptag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kiti kullanılarak apoptoza giden hücreler belirlendi.

Fikse edilmiş örneklerin üzerine 50 µl Equilibration tamponu eklenerek 2 dk bekletildi. Örneklere 35 µl reaksiyon tamponu ve 15 µl TdT enzim eklendi ve 1 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası hücrelere durdurma solüsyonu (Stop/wash) eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 1 dk

boyunca PBS ile yıkama işlemi 3 tekrarlı gerçekleştirildi. Yıkama sonrası hücreler 50 µl antidigoxenin peroksidaz ile 30 dk oda sıcaklığında muamele edildi. PBS ile yıkama işlemi 3 kez tekrarlanarak reaksiyon durduruldu. 98 µl DAB dilusyon solüsyonu üzerine 2 µl DAB substrat eklendi ve örneklere uygulandı. 5 dk boyunca oda sıcaklığında bekletildi ve renk değişimi mikroskopta incelendi. Musluk suyu ile 1 dk yıkama yapıldı ve 3 kez tekrarlandı. Apoptoza girmemiş hücreleri belirlemek için hematoksilen ile 2 dakika zıt boyama yapıldı. Kapatma medyumu ile kapatıldı ve hücreler mikroskopta incelendi. İşaretlenmiş ve işaretlenmemiş hücreler 100x büyütmede rastgele seçilen 10 farklı alanda sayıldı. Apoptoz yüzdesi aşağıdaki eşitlik (3.5) ile hesaplandı.

$$\text{Apoptoz Yüzdesi (\%)} = \frac{\text{İşaretlenen Hücre Sayısı}}{\text{Toplam Hücre Sayısı}} \tag{3.5}$$

3.5.9 Yara İyileşmesi Testi

Hücreler 24'lü mikroplakalara her kuyu içerisinde ortalama $7x10^5$ hücre olacak şekilde ekildi ve 24 saat inkübatörde bekletildi. Hücre yoğunluğu %70 oranına ulaştığında ortamdaki besiyeri uzaklaştırıldı. 200 μl'lik bir mikropipet ucu ile her kuyu iki parçaya ayrılacak şekilde tam orta noktasından yukarıdan aşağıya dikey bir çizgi çizilerek hücrelerde yara oluşturuldu. Yara oluşumu gerçekleştirilen hücreler PBS ile yıkanarak ortamda yara sonucu kalkan hücreler uzaklaştırıldı. Hücreler mikroskopta kontrol edilerek Ginkgolid A, Ginkgolid A yüklü PLGA NP, Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP'nin 24 ve 48 saatlik IC_{50} değerlerine göre hesaplanan dozları yara oluşturulan hücreler üzerine uygulandı. Hücrelerin 0., 24. ve 48. saatlerde görüntüleri mikroskop aracılığıyla kaydedildi. Çizikle oluşturulan hücre yaralarının dozlara bağlı olarak mesafeleri "ImageJ" programı kullanılarak hücreler arasındaki mesafe ölçüldü [178].

3.5.10 İstatistiksel Analizler

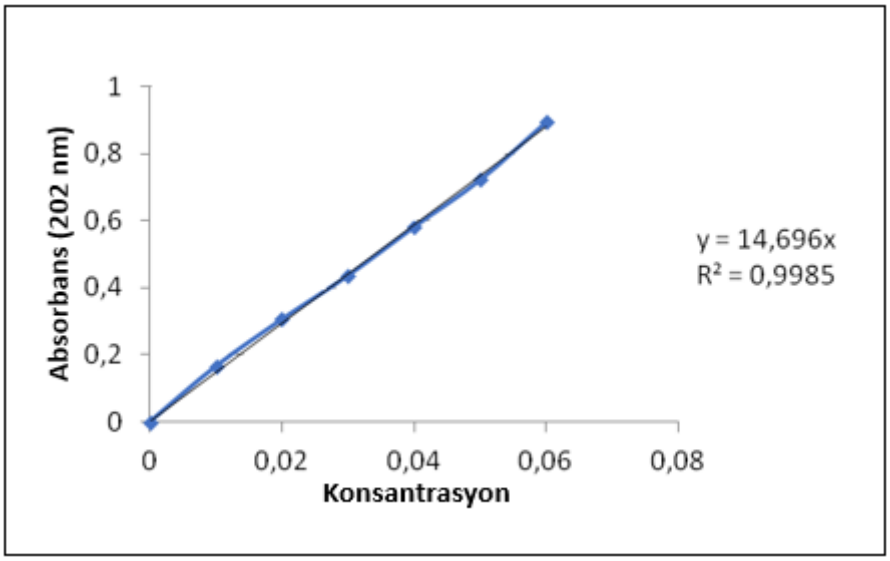
İstatistiksel analiz için GraphPad Prism yazılımı kullanıldı. GraphPad Prism yazılımında karşılaştırılmalarda Two-Way ANOVA testi tercih edildi ve 0.05'ten küçük p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4
SONUÇ VE ÖNERİLER

4.1 Cisplatin'in Kalibrasyon Eğrisi Analizi

1 mL serum fizyolojik ile çözünen 1 mg Cisplatin molekülü, 1.5 mL DCM içerisinde çözünen 100 mg PLGA'ya eklenerek öncelikle su/yağ emülsiyonu oluşturuldu.

0.001 mg/ml-0.06 mg/ml aralığında seri konsantrasyonlar hazırlandı. Cisplatin'in UV spektrofotometrede pik verdiği dalga boyunun 202 nm olduğu kaydedilerek Şekil 4.1'de kalibrasyon eğrisi gösterildi.

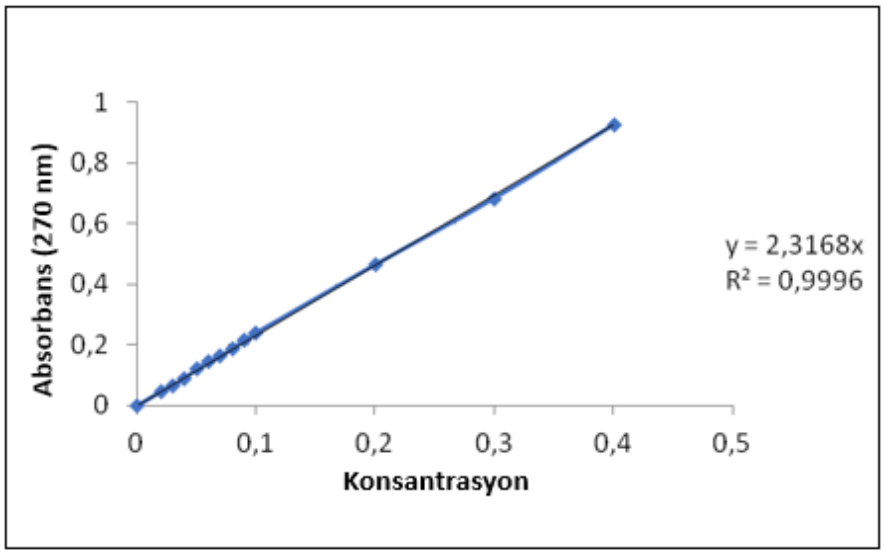


Şekil 4.1 Cisplatin molekülüne ait kalibrasyon eğrisi

4.2 Ginkgolid A'nın Kalibrasyon Eğrisi Analizi

1 mL su içerisinde çözülen 1 mg Ginkgolid A, 1.5 mL DCM içerisinde çözünen 100 mg PLGA'ya eklenerek öncelikle su/yağ emülsiyonu oluşturuldu.

0.001 mg/ml-0.4 mg/ml aralığında seri konsantrasyonları hazırlandı. Ginkgolid A'nın UV spektrofotometrede pik verdiği dalga boyunun 270 nm olduğu kaydedilerek Şekil 4.2'de kalibrasyon eğrisi gösterildi.



Şekil 4.2 Ginkgolid A molekülüne ait kalibrasyon eğrisi

4.3 Cisplatin yüklü PLGA ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP Sentezi

Cisplatin yüklü PLGA NP ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP hazırlanmasında tekli emülsiyon (w/o) çözücü uçurma yöntemi kullanıldı. Ayrıca etken madde içermeyen boş PLGA NP sentezlendi. Sentezlenen NP'lere ait sonuçlar (reaksiyon ve enkapsülasyon verimi, ilaç yükleme kapasitesi, boyut, zeta potansiyeli, çoklu dağılım indeksleri) Tablo 4.1'de gösterildi.

Tablo 4.1 Cisplatin ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP'nin karakterizasyonu

	Boyut Z-Ave (nm)	Zeta Potansiyel (mV)	Çoklu Dağılım İndeksi (PDI)	Reaksiyon Verimi RV (%)	Enkapsülasyon Etkinliği EE (%)	İlaç Yükleme Kapasitesi DL (%)
Boş PLGA	179.4 ± 4,544	-26.9 ± 1,10	0.089 ± 0.031	71.00	-	-
Ginkgolid A Yüklü PLGA NP	224.5 ± 10,86	-27.9 ± 0,551	0.084 ± 0.040	46.03	24	0.51
Cisplatin Yüklü PLGA NP	196.5 ± 1,773	-31.2 ±1,11	0.093 ± 0.032	70.29	64	0.90

4.4 Cisplatin Yüklü PLGA NP ve Ginkgolid A Yüklü PLGA NP'nin Karakterizasyon Analizi Sonuçları

4.4.1 Reaksiyon Verimi (RV)

Tablo 4.1 incelendiğinde; boyut ve zeta potansiyel analizleri sonucunda hücre kültürü çalışmaları için uygun değere sahip olan 1 mg Cisplatin ve 100 mg PLGA içeren NP'ye ait RV değeri % 70.29 kaydedilirken, 1 mg Ginkgolid A ve 100 mg PLGA içeren NP'ye ait RV değeri ise %46.03 bulundu.

Sentezlediğimiz Cisplatin yüklü PLGA NP'nin RV sonucu, Parhizkar ve arkadaşlarının (2016) Cisplatin yüklü PLGA NP için yapmış olduğu RV sonuçları ile benzerlik göstermektedir [179].

Caldas Dos Santos ve arkadaşları (2017), C-glikozit flavonoidi yüklü PLGA NP hazırlığında PVA ve poloxamer (PLU) ile emülsiyon gerçekleştirerek farklarını karşılaştırmışlardır [180]. PLU ile hazırlanan NP'nin RV değeri %67 ± 2 gözlenirken, PVA ile emülsiyonu gerçekleştirilen NP'de RV değerini %26 ± 1 kaydetmişlerdir. Hidrofilik ilaçların PLGA NP'lere yüklenirken oluşturduğu bu dez avantaj ilacın iç sulu fazdan dış sulu faza doğru akmasında kaynaklanmaktadır [181].

4.4.2 Enkapsülasyon Etkinliği (EE)

1 mg Cisplatin kullanılarak üretilen Cisplatin yüklü PLGA NP'de 0.640 mg cisplatin enkapsüle edilerek EE değeri %64 olarak hesaplandı. 1 mg Ginkgolid A kullanılarak üretilen Ginkgolid A yüklü PLGA NP'de 0.240 mg Ginkgolid A enkapsüle edildi. Ginkgolid A yüklü PLGA NP'nin EE değeri %24 olarak hesaplandı.

NP içerisine yüklenen ilacın yüzde oranı EE değerini vermektedir. NP sistemler gibi ilaç taşıyıcı sistemlere enkapsüle edilen etken maddelerin tedavi yöntemlerinde etkinliğinin arttırabileceği düşünülmektedir [172].

Umar ve arkadaşları (2021), hazırladıkları Cisplatin yüklü PLGA NP formülasyonlarında EE değerini %65-%67 olarak belirtmişlerdir [182].

Çalışmamız sonucunda Cisplatin yüklü PLGA NP'nin EE değeri %64 olarak hesaplanmış ve literatür ile eş değer sonuç elde edilmiştir.

Han ve arkadaşları (2012), ginkgo terpenleri (Ginkgolid A, Ginkgolid B, Ginkgolid C ve Bilobalid) yüklü mPEG–PLGA–mPEG (PELGE) NP sentezlemiş ve EE değerini ortalama 78.84± 2.06% olarak kaydetmişlerdir. PLGA nanopartikülünün PELGE formda hazırlanması EE değerinin arttırılmasında rol oynamaktadır. Bu nedenle, PELGE NP kapsüllenmiş ilaçların sürekli salınımını sağlamak için uygun NP taşıyıcılardır [183].

4.4.3 İlaç Yükleme Kapasitesi (DL)

Cisplatin yüklü PLGA NP ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP'ye ait DL değerleri Tablo 4.1'de gösterildi. 1 mg Cisplatin kullanılarak elde edilen Cisplatin yüklü PLGA NP'nin DL değeri %0.90 olarak, 1 mg Ginkgolid A kullanılarak elde edilen Ginkgolid A yüklü PLGA NP'nin DL değeri ise %0.51 olarak hesaplandı. Literatürde Cheng ve arkadaşları (2011) sentezlediği Cisplatin yüklü PLGA-mPEG NP'nin DL verimini %3.9 ± 0.3 olarak kaydetmişlerdir [184].

Mattheolabakis ve arkadaşları (2009), sentezlediği Cisplatin yüklü PLGA-mPEG NP'nin DL verimini %1.94 bulmuşlardır. PLGA NP formülasyonunun mPEG ile birlikte sentezlenmesi EE'yi arttırdığı için DL verimininde artmasını sağlamaktadır [185].

Caldas Dos Santos ve arkadaşları (2017), C-glikozit flavonoidi yüklü PLGA NP'lerde DL verimi PVA emülsiyonu ile hazırlanan formda %0.7 bulmuşlardır [180]. Moleküler ağırlığın DL veriminde etkisi olduğu düşünülmektedir [186]. Diğer bir sınırlayıcı faktör, bitkisel özlerin farklı kimyasal etkileşimlere yol açabilecek ve dolayısıyla yükleme kapasitesini azaltabilecek karmaşık fitokimyasallar olmasıdır [187].

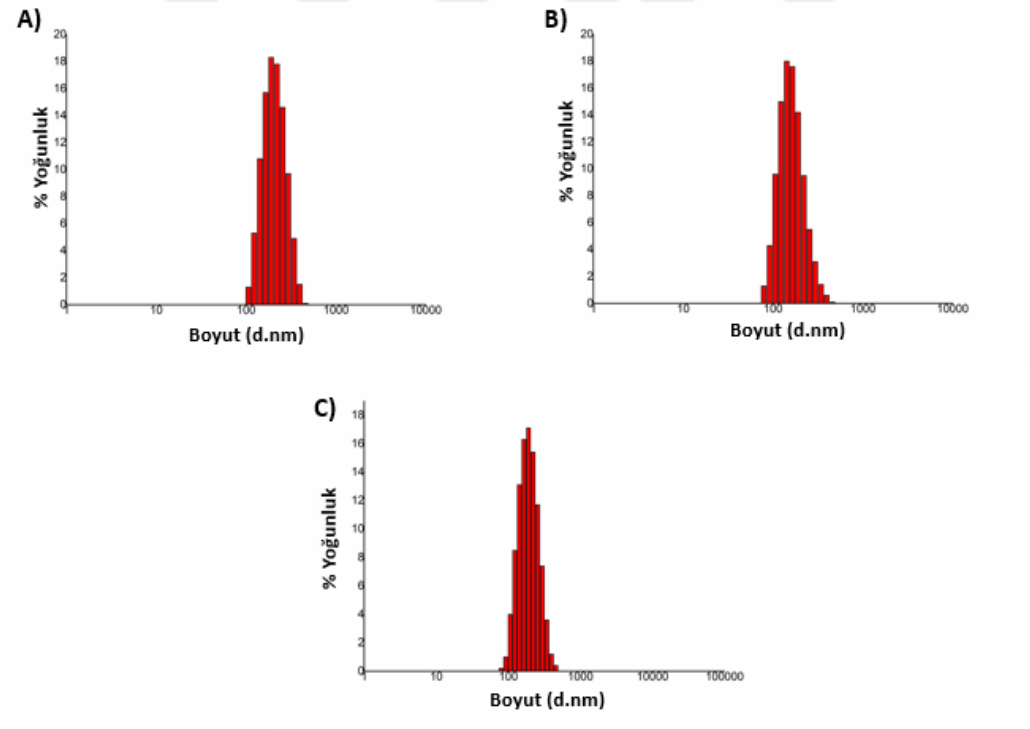
4.4.4 Boyut Analizi ve Çoklu Dağılım İndeksleri (PDI)

Zeta-sizer cihazı aracılığıyla oluşturulan NP boyut analizleri 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Boyut analizi ve PDI değeri Tablo 4.1'de ve Şekil 4.3'de gösterildi. Cisplatin yüklü PLGA NP'nin boyutu 196.5 ± 1.773 nm olarak, PDI değeri ise 0,093 ± 0,032 nm olarak belirlendi. Ginkgolid A yüklü PLGA NP'nin boyutu 224.5

± 10.86 nm, PDI değeri ise 0.084 ± 0.040 olarak ölçüldü. Boş PLGA NP'nin boyutu 179.4 ± 4.544 nm, PDI değeri ise 0.089 ± 0.031 nm olarak belirlendi.

Cheng ve arkadaşları (2011), Cisplatin yüklü PLGA-mPEG NP sentezinde PDI değerini 0.26, boyutu ise 192 ± 12 nm olarak kaydetmişlerdir [184]. Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz PDI değerinin küçük olması boyut dağılımının dar ve homojen olması açısından NP için önemlidir. Tong ve arkadaşları (2010), Ginkgolid A yüklü nano-lipozomlarda boyutu 207.13 nm olarak kaydetmişlerdir [188].

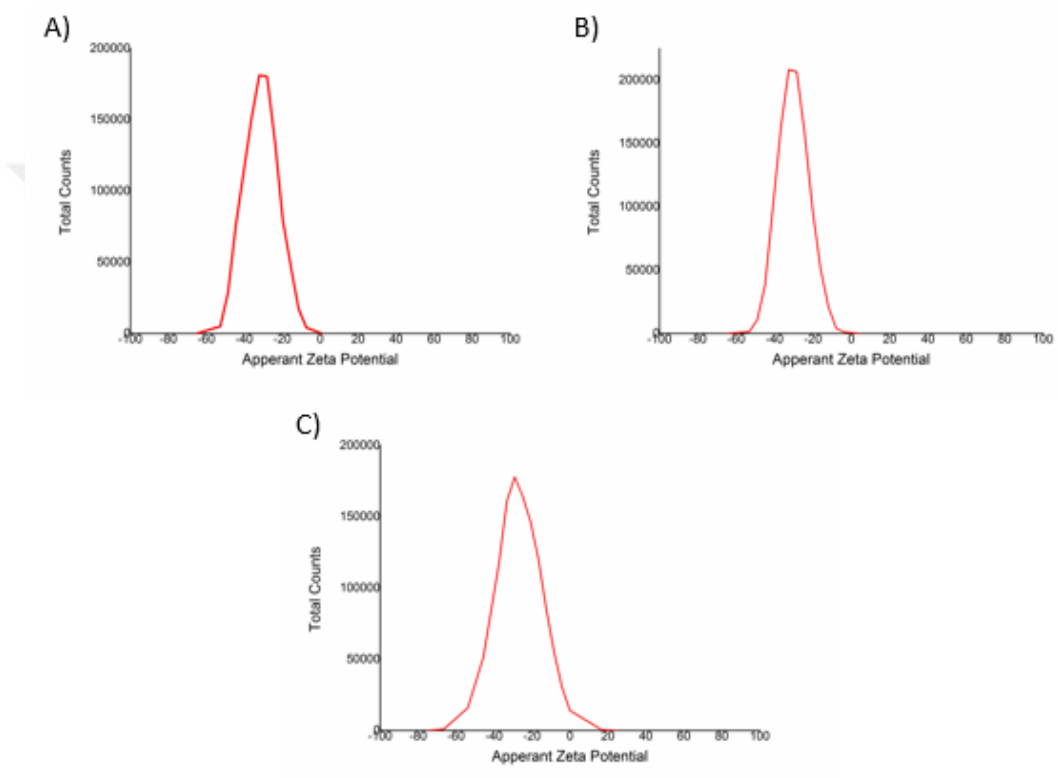
Pillai ve arkadaşları (2021), Kurkumin-piperin yüklü PLGA NP'lerde partikül boyutlarını ortalama 234 ± 6.39 nm, PDI değerlerini ise 0.11 ± 0.004 olarak bulmuşlardır. Etkin bir NP boyutu mononuklear fagositik sistem tarafından farkedilmeyecek kadar küçük, kan damarından sızmayacak kadar da büyük olmalıdır [189].



Şekil 4.3 Boyut dağılım analizi. A) Cisplatin yüklü PLGA NP B) Ginkgolid A yüklü PLGA NP C) Boş PLGA NP

4.4.5 Zeta Potansiyel Analizi

Zeta-sizer cihazı kullanılarak Cisplatin yüklü PLGA NP, Ginkgolid A yüklü PLGA NP ve boş PLGA NP'nin zeta potansiyel ölçümleri 3 kez tekrar edilerek gerçekleştirildi. Elde edilen analiz sonuçlarına göre Cisplatin yüklü PLGA NP'nin zeta potansiyel değeri -31.2±1.11 mV, Ginkgolid A yüklü PLGA NP'nin zeta potansiyel değeri -27.9±0.551 mV ve boş PLGA NP'nin zeta potansiyel değeri -26.9±1.10 mV olarak bulunarak Tablo 4.1 ve Şekil 4.4'de gösterildi.



Şekil 4.4 Zeta Potansiyel Analizi, Cisplatin yüklü PLGA NP (A), Ginkgolid yüklü PLGA NP (B), Boş PLGA NP (C)

Rossina ve arkadaşları (2019), Cisplatin yüklü PLGA NP'nin zeta potansiyel değerini -12.7 ± 1.68 mV olarak kaydetmişlerdir [190].

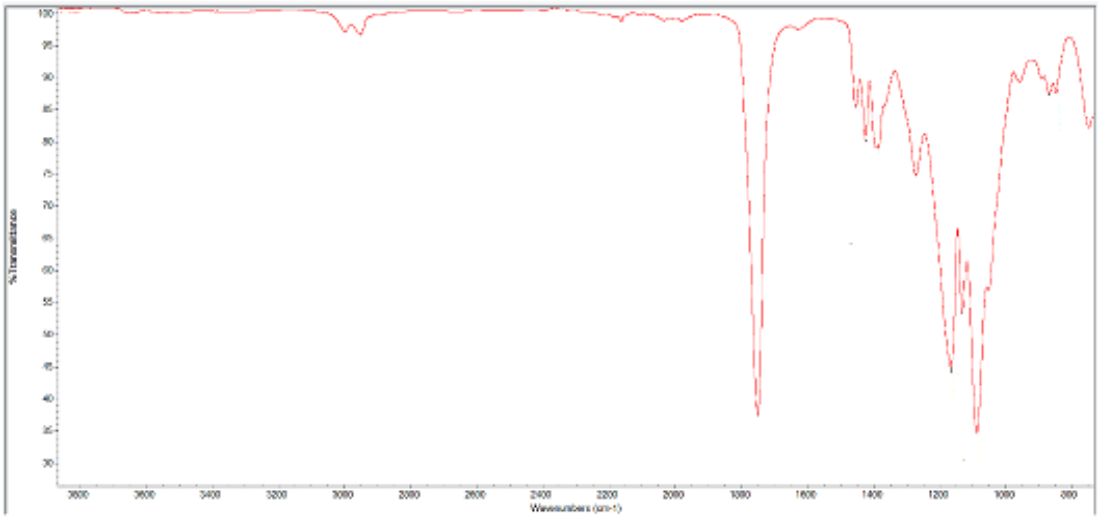
Literatürde yer alan Han ve arkadaşlarının (2012) *Ginkgo biloba* terpenleri yüklü PELGE NP sentezinde, zeta potansiyel değerlerini −30.86± 2.49 mV olarak bildirmişlerdir [183].

Zeta potansiyellerinin "-" yüklü olması PLGA ve yüklenen ilaçların karakteristiğine bağlıdır. PLGA yüzeyi "-" yüklü bir polimerdir [166]. Cisplatin yüklü PLGA NP ve

Ginkgolid A yüklü PLGA NP'lerin zeta potansiyellerinin boş PLGA NP'nin zeta potansiyelinden farklılık göstermesinin nedeni Cisplatin ve Ginkgolid A molekülünün yüzeylerinin "-" yüklü olmasından kaynaklanmaktadır.

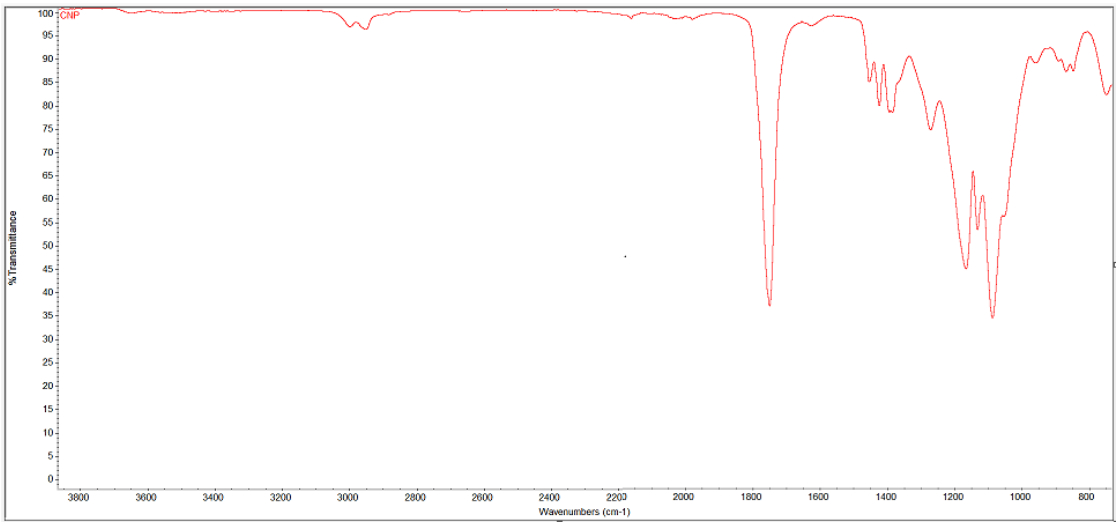
4.4.6 FT-IR Analizi Sonuçları

Liyofilize halde bulunan NP'lerin (Cisplatin yüklü PLGA NP, Ginkgolid A yüklü PLGA NP ve Boş PLGA NP), PLGA NP karakteristiğine uygunluğunun belirlenmesi için çekilen FT-IR spektrumları Şekil 4.5-4.7'de gösterilmiştir.

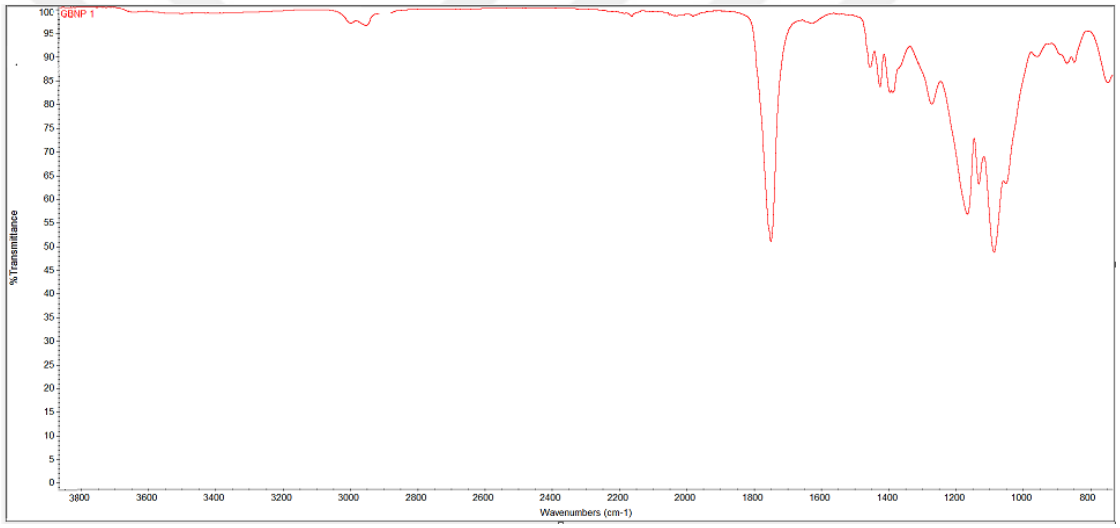


Şekil 4.5 Boş PLGA NP

Şekil 4.6 'da yer alan Cisplatin yüklü PLGA NP'nin analizinde PLGA karakteristiğinde pikler görülmektedir. Fakat Cisplatin'e ait bir pik gözlemlenmemiştir. Elde edilen FT-IR spektrumu sonucu Cisplatin yüklü PLGA NP'de yüzeyde Cisplatin molekülünün adsorbe olmadığını, PLGA NP içerisine yüklendiğini göstermektedir.



Şekil 4.6 Cisplatin yüklü PLGA NP

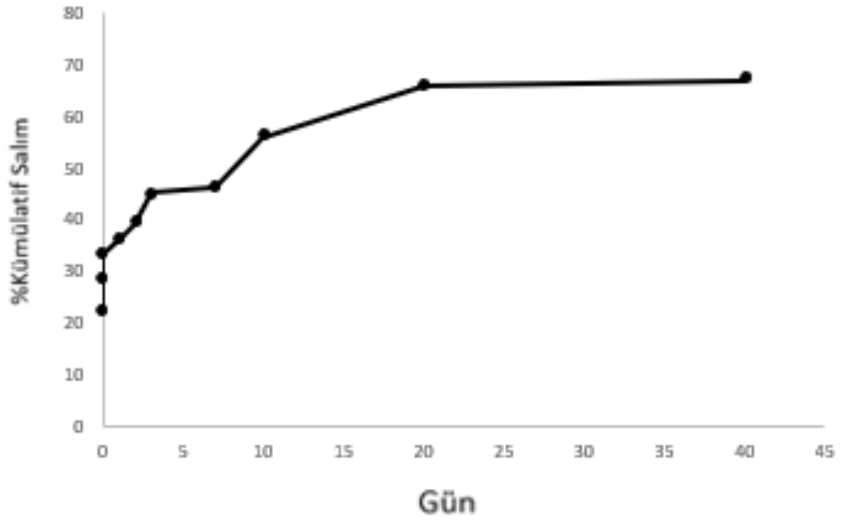


Şekil 4.7 Ginkgolid A yüklü PLGA NP

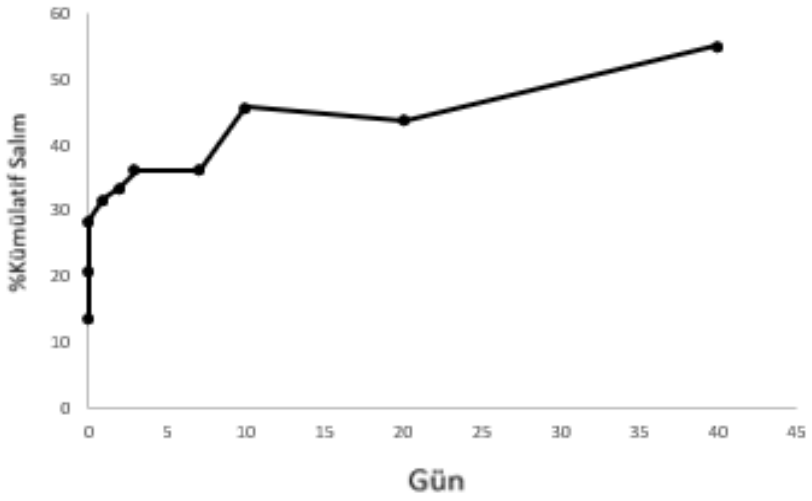
Şekil 4.7 FT-IR spektrumları incelendiğinde; Ginkgolid A yüklü PLGA NP'nin spektrumu, boş PLGA NP'ye ait spektrumla karşılaştırıldığında yüzeyde Ginkgolid A molekülünün adsorbe olmadığı belirlendi.

4.4.7 *İn Vitro* Salım Analizi

40 gün boyunca *in vitro* salım deneyleri takip edildi. Cisplatin yüklü PLGA NP ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP'nin salım grafikleri, UV-spektrofotometre ölçümlerine göre çizildi. Cisplatin ve Ginkgolid A için güne bağlı olarak % etken maddenin salım miktarları sırasıyla Şekil 4.8 ve Şekil 4.9'da gösterildi.



Şekil 4.8 Cisplatin yüklü PLGA NP salım analizi

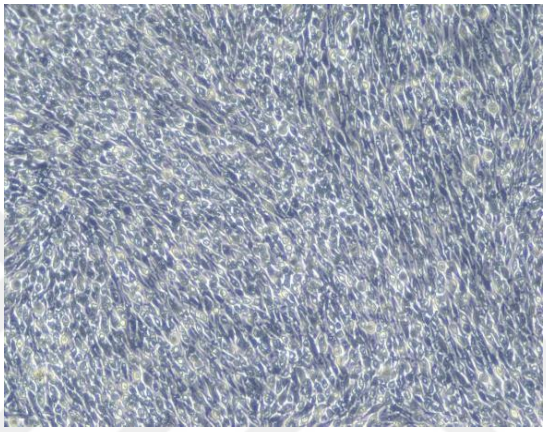


Şekil 4.9 Ginkgolid A yüklü PLGA NP salım analizi

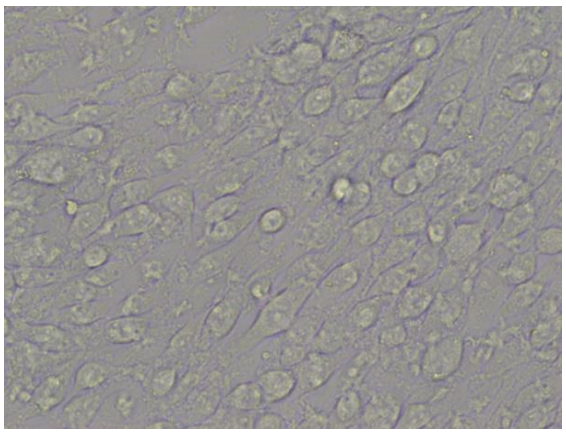
Salım grafiklerinde; 40 günlük süre sonunda Cisplatin yüklü PLGA NP'nin %67.2, Ginkgolid A yüklü PLGA NP'nin %55.8 salım yaptığı gözlemlendi. İki NP için de yavaş ve kontrollü bir salım kaydedilmiştir. Cisplatin yüklü PLGA NP %50 salımını 10 gün sonunda, Ginkgolid A yüklü PLGA NP ise salımı 20 gün sonunda gerçekleştirmiştir.

4.5 C6 Glioma Hücre Kültürü

Kültüre edilen C6 Glioma hücreleri flaska ekildikten sonra inverted mikroskop ile 24 ve 48 saat boyunca incelendiğinde, flask yüzeyini kaplamaya başladıkları ve hücrelerin sağlıklı olduğu gözlemlendi. Hücrelerin flask yüzeyindeki yerleşimi %80 oranına ulaştığında hücreler pasajlandı ve tripan mavisiyle boyanan hücreler thoma lamında sayıldı. Hücre canlılıklarının %100 olduğu gözlemlendi. $10x10^5$ hücre/ml olacak şekilde 20 kriyotüp dondurularak stok oluşturuldu. C6 Glioma hücrelerine ait morfolojik görüntüler Şekil 4.10 ve Şekil 4.11'de gösterildi.



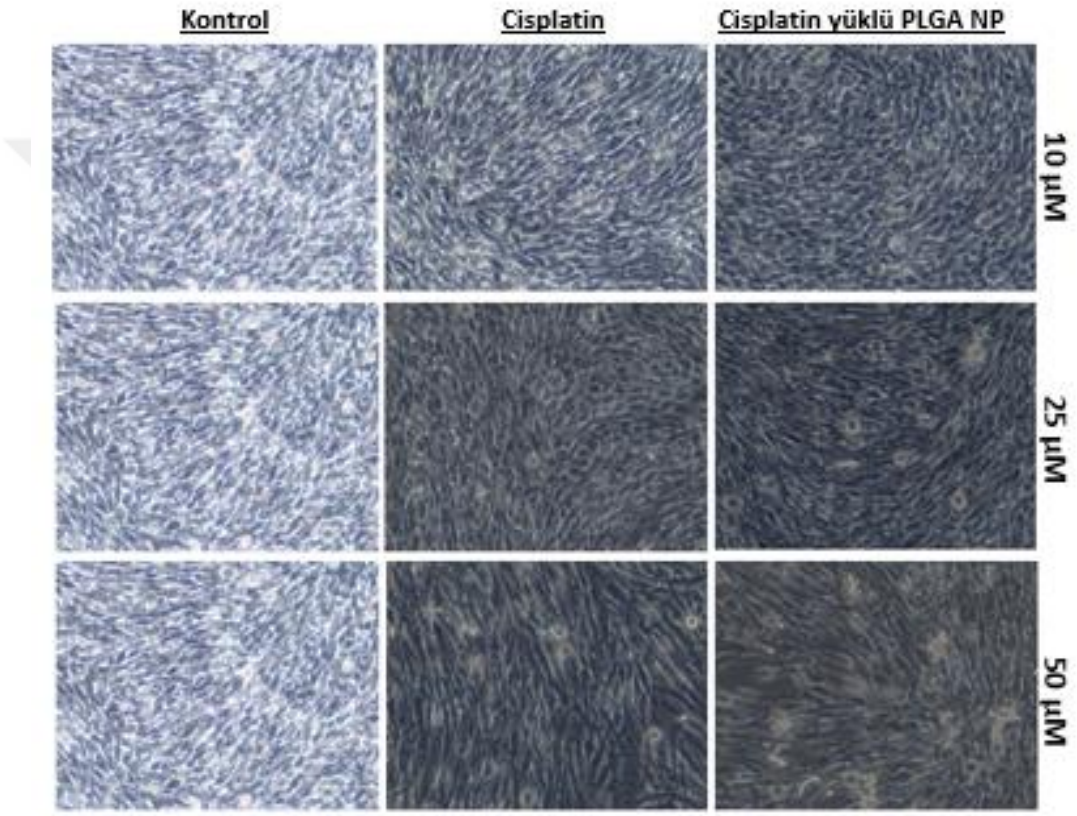
Şekil 4.10 Inverted mikroskopta C6 Glioma hücrelerinin morfolojik görüntüsü (24 saat, x10)



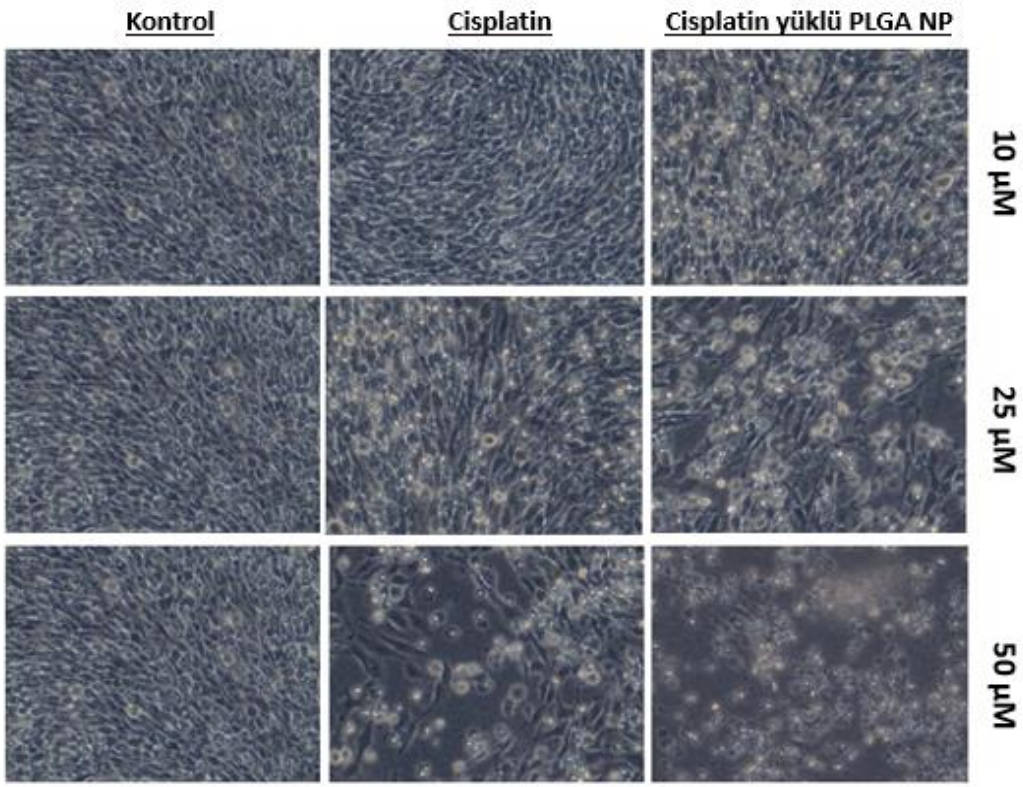
Şekil 4.11 Inverted mikroskopta C6 Glioma hücrelerinin morfolojik görüntüsü (24 saat, x40)

4.6 Farklı Konsantrasyonlardaki Cisplatin ve Cisplatin Yüklü PLGA NP'nin C6 Glioma Hücreleri Üzerindeki Etkisi

Cisplatinin ve Cisplatin yüklü PLGA NP'nin 1 μM, 5 μM, 10 μM, 25 μM, 50 μM, 75 μM, 100 μM, 125 μM, 150 μM konsantrasyonları ile muamele edilen C6 Glioma hücrelerindeki sitotoksisitesi MTT yöntemiyle 24 ve 48 saat süreyle belirlendi. Hücrelerin inkübasyon süreleri sonrasında morfolojileri inverted mikroskop ile değerlendirildi (Şekil 4.12- 4.13).

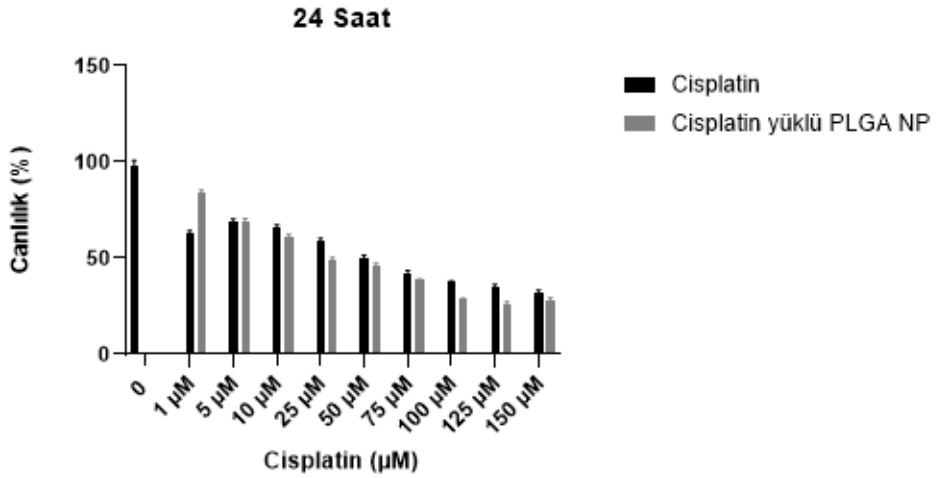


Şekil 4.12 Kontrol, Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP ile 24 saat muamele edilen C6 Glioma hücrelerinin morfolojik görüntüleri (x20)

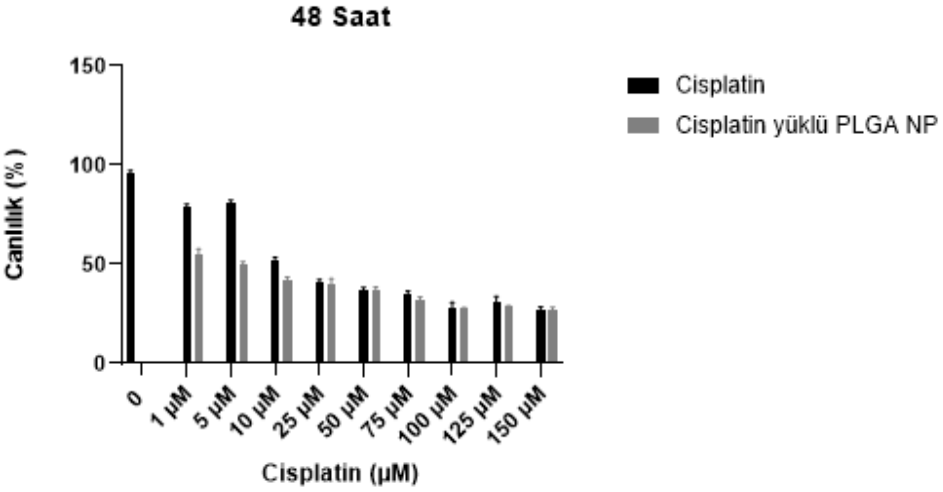


Şekil 4.13 Kontrol, Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP ile 48 saat muamele edilen C6 Glioma hücrelerinin morfolojik görüntüleri (x20)

Şekil 4.14'de C6 Glioma hücrelerine farklı konsantrasyonlarda (0-150 μM) uygulanan Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP'ye ait hücre canlılık oranları gösterildi. 24 saat C6 Glioma hücrelerine uygulanan Cisplatin'in IC_{50} değeri 53 μM olarak belirlendi. Cisplatin yüklü PLGA NP'ye ait IC_{50} değeri ise 24 μM olarak bulundu. 48 saat C6 Glioma hücrelerine uygulanan Cisplatin'in IC_{50} değeri 12,7 μM olarak belirlenirken, Cisplatin yüklü PLGA NP'ye ait IC_{50} değeri ise 4,3 μM olarak bulundu (Şekil 4.15). Elde edilen IC_{50} değerlerine göre; Cisplatin yüklü PLGA NP'nin 24 ve 48 saatlik uygulaması serbest formuna göre C6 Glioma hücrelerinde daha az konsantrasyonda daha yüksek etki gösterdi.



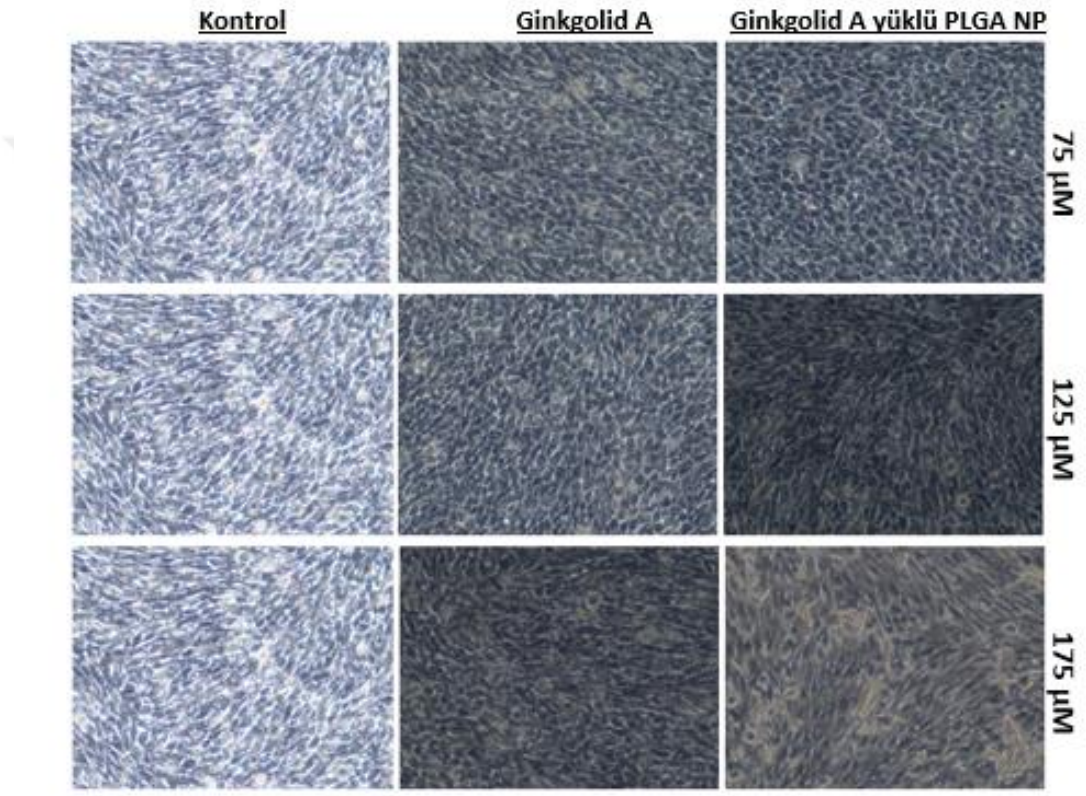
Şekil 4.14 Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP ile muamele edilen C6 Glioma hücrelerinin 24 saatlik canlılık (%) grafiği



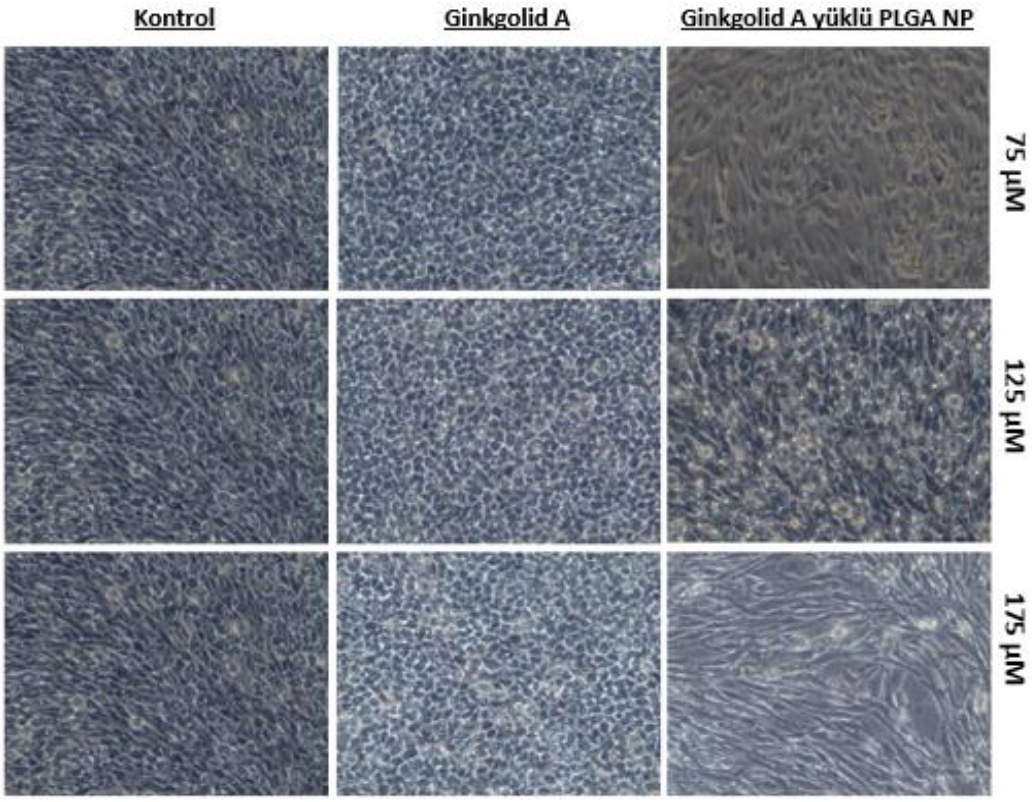
Şekil 4.15 Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP ile muamele edilen C6 Glioma hücrelerinin 48 saatlik canlılık (%) grafiği

4.7 Farklı Konsantrasyonlardaki Ginkgolid A ve Ginkgolid A Yüklü PLGA NP'nin C6 Glioma Hücreleri Üzerindeki Etkisi

Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP'nin 5 µM, 10 µM, 25 μM, 50 μM, 100 μM, 150 μM, 250 μM, 500 μM, 1000 μM konsantrasyonları ile muamele edilen C6 Glioma hücrelerindeki sitotoksisitesi MTT yöntemiyle 24 ve 48 saat süreyle belirlendi. Hücrelerin inkübasyon sonucunda morfolojileri inverted mikroskop ile değerlendirildi (Şekil 4.16- 4.17).

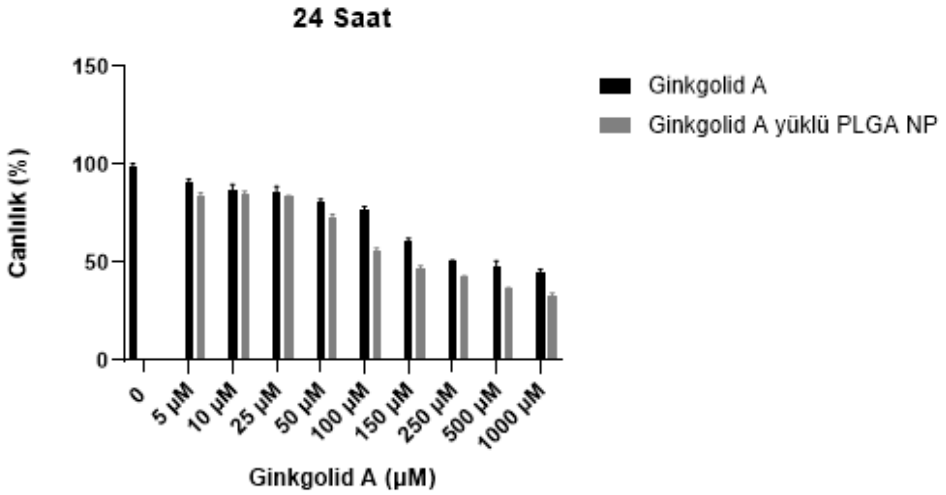


Şekil 4.16 Kontrol, Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP ile 24 saat muamele edilen C6 Glioma hücrelerinin morfolojik görüntüleri (x20)

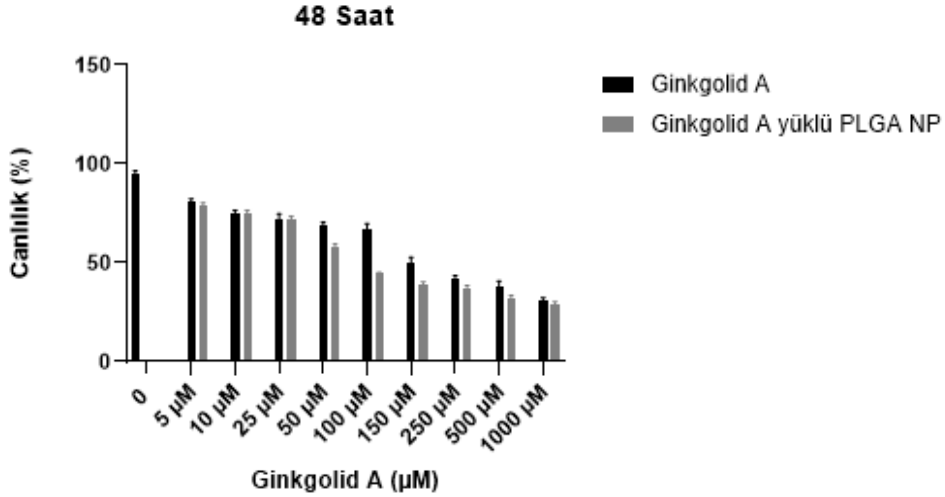


Şekil 4.17 Kontrol, Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA ile 48 saat muamele edilen C6 Glioma hücrelerinin morfolojik görüntüleri (x20)

Şekil 4.18'de C6 Glioma hücrelerine farklı konsantrasyonlarda (0-1000 μM) uygulanan Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP'ye ait hücre canlılık oranları gösterildi. 24 saat C6 Glioma hücrelerine uygulanan Ginkgolid A'nın IC_{50} değeri 175 μM olarak ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP'nin IC_{50} değeri ise 116 μM olarak belirlendi. 48 saat C6 Glioma hücrelerine uygulanan Ginkgolid A'nın IC_{50} değeri 136 μM olarak, Ginkgolid A yüklü PLGA NP'ye ait IC_{50} değeri ise 64 μM olarak bulundu (Şekil 4.19). Elde edilen IC_{50} değerlerine göre; Ginkgolid A yüklü PLGA NP'nin 24 ve 48 saatlik uygulanması serbest formuna göre C6 Glioma hücrelerinde daha az konsantrasyonda daha yüksek etki gösterdi.



Şekil 4.18 Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP ile muamele edilen C6 Glioma hücrelerinin 24 saatlik canlılık (%) grafiği

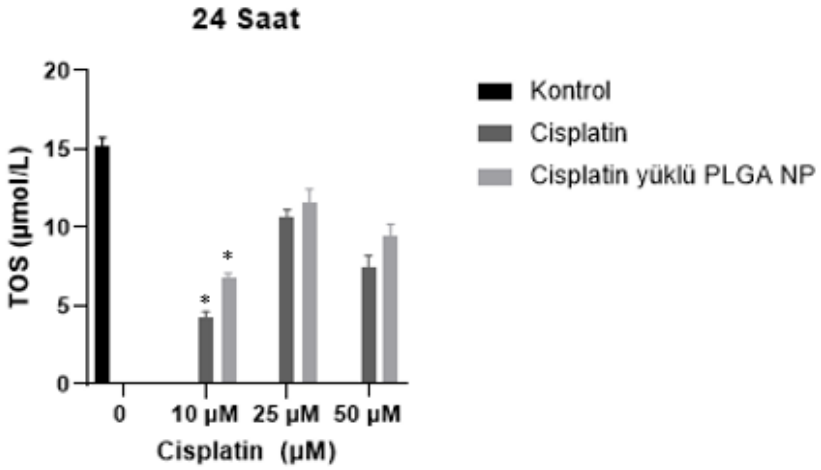


Şekil 4.19 Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP ile muamele edilen C6 Glioma hücrelerinin 48 saatlik canlılık (%) grafiği

4.8 Total Oksidan Seviye (TOS) Ölçüm Sonuçları

4.8.1 Cisplatin ve Cisplatin Yüklü PLGA NP ile Muamele Edilen C6 Glioma Hücrelerinde TOS Ölçümü

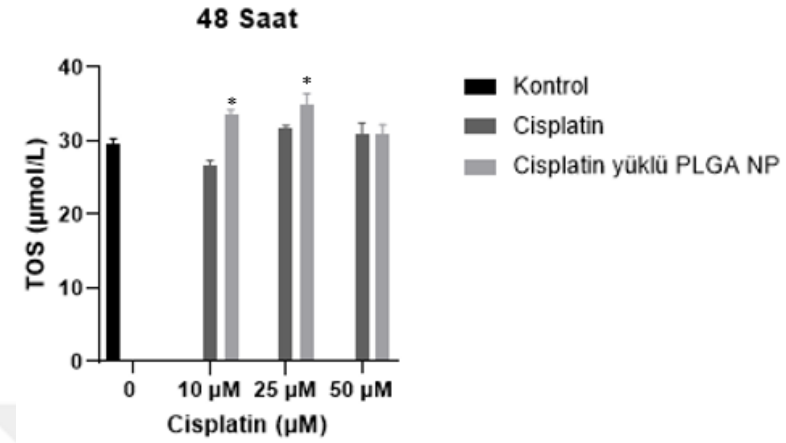
C6 Glioma hücre lizatlarında TOS değerleri 24. saatte kontrol hücrelerinde 15.6 μmol/L, 10 μM, 25 μM ve 50 μM konsantrasyonlarında Cisplatin uygulanan hücrelerde sırasıyla; 4.53 μmol/L, 10.29 μmol/L, 7.03 μmol/L, 10 μM, 25 μM ve 50 μM konsantrasyonlarında Cisplatin yüklü PLGA NP uygulanan hücrelerde sırasıyla; 6.56 μmol/L, 12.20 μmol/L, 9.01 μmol/L olarak bulundu (Şekil 4.20). 24. saatte 10 μM Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP ile muamele edilen C6 Glioma hücrelerinin TOS değerlerinde kontrol hücrelerine göre anlamlı bir azalma olduğu belirlendi ($p<0.05$).



Şekil 4.20 Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP ile muamele edilen C6 Glioma hücrelerinde TOS değerleri (24 saat)

TOS değeri 48. saatte kontrol hücelerinde 30.05 μmol/L, 10 μM, 25 μM ve 50 μM konsantrasyonlarında Cisplatin uygulanan hücrelerde sırasıyla; 27.12 μmol/L, 31.52 μmol/L, 32 μmol/L, 10 μM, 25 μM ve 50 μM konsantrasyonlarında Cisplatin yüklü PLGA NP uygulanan hücrelerde sırasıyla; 33 μmol/L, 36 μmol/L, 31.84 μmol/L olarak bulundu (Şekil 4.21).

48. saatte 10 μM ve 25 μM Cisplatin yüklü PLGA NP ile muamele edilen C6 Glioma hücrelerinin TOS değerlerinde kontrol hücrelerine göre anlamlı bir artış olduğu belirlendi ($p<0.05$).

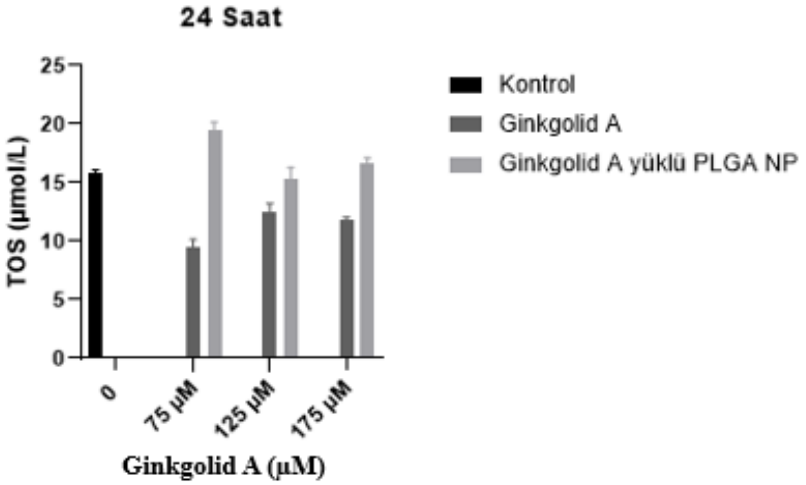


,

Şekil 4.21 Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP ile muamele edilen C6 Glioma hücrelerinde TOS değerleri (48 saat)

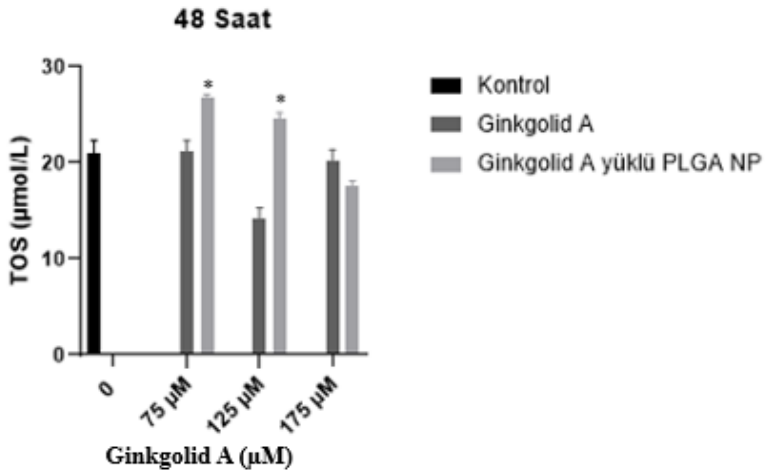
4.8.2 Ginkgolid A ve Ginkgolid A Yüklü PLGA NP ile Muamele Edilen C6 Glioma Hücrelerinde TOS Ölçümü

TOS değeri 24. saatte kontrol hücrelerinde 15.52 μmol/L, 75 μM, 125 μM ve 175 μM konsantrasyonlarında Ginkgolid A uygulanan hücrelerde sırasıyla; 9.10 μmol/L, 11.86 μmol/L, 11.64 μmol/L, 75 μM, 125 μM ve 175 μM konsantrasyonlarında Ginkgolid A yüklü PLGA NP uygulanan hücrelerde sırasıyla; 19.10 μmol/L, 14.55 μmol/L 16.34 μmol/L olarak bulundu (Şekil 4.22). 24. saatte Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP'nin uygulanan tüm konsantrasyonlarında C6 Glioma hücrelerinin TOS değerlerinde kontrol hücrelerine göre anlamlı bir farklılık saptanmadı.



Şekil 4.22 Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP uygulanan C6 Glioma hücrelerindeki TOS değerleri (24 saat)

TOS değeri 48. saatte kontrol hücrelerinde 21.94 μmol/L, 75 μM, 125 μM ve 175 μM konsantrasyonlarında Ginkgolid A uygulanan hücrelerde sırasıyla; 20.37 μmol/L, 13.45 μmol/L, 19.30 μmol/L, 75 μM, 125 μM ve 175 μM konsantrasyonlarında Ginkgolid A yüklü PLGA NP uygulanan hücrelerde sırasıyla; 26.47 μmol/L, 24.02 μmol/L, 17.35 μmol/L olarak bulundu (Şekil 4.23). 48. saatte 75 μM ve 125 μM Ginkgolid A yüklü PLGA NP ile muamele edilen C6 Glioma hücrelerinin TOS değerlerinde kontrol hücrelerine göre anlamlı bir artış olduğu belirlendi ($p<0.05$).

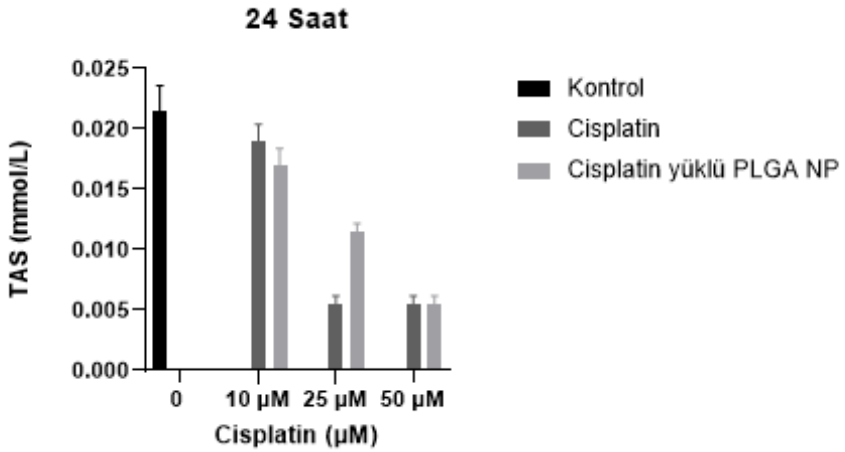


Şekil 4.23 Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP ile muame edilen C6 Glioma hücrelerindeki TOS değerleri (48 saat)

4.9 Total Antioksidan Seviye (TAS) Ölçüm Sonuçları

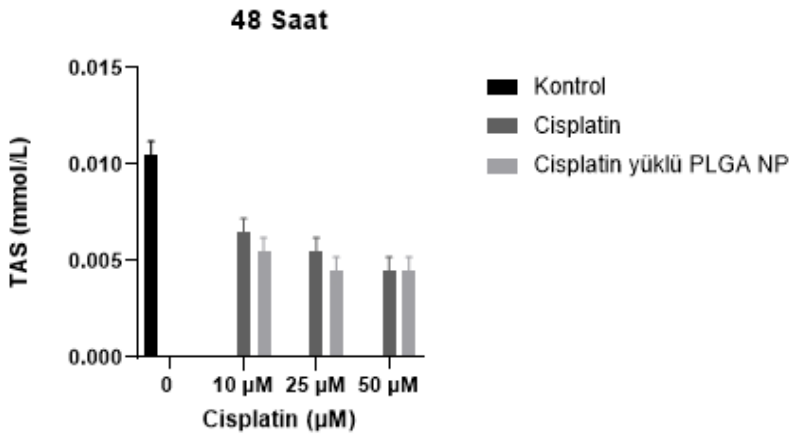
4.9.1 Cisplatin ve Cisplatin Yüklü PLGA NP ile Muamele Edilen C6 Glioma Hücrelerinde TAS Ölçümü

C6 Glioma hücre lizatlarında TAS değeri 24. saatte kontrol hücrelerinde 0.023 mmol/L, 10 μM, 25 μM ve 50 μM konsantrasyonlarında Cisplatin uygulanan hücrelerde sırasıyla; 0.018 mmol/L, 0.005 mmol/L, 0.005 mmol/L, 10 μM, 25 μM ve 50 μM konsantrasyonlarında Cisplatin yüklü PLGA NP uygulanan hücrelerde sırasıyla; 0.016 mmol/L, 0.011 μmol/L, 0.005 μmol/L olarak bulundu. 24. saatte Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP'nin uygulanan tüm konsantrasyonlarında C6 Glioma hücrelerinin TAS değerlerinde kontrol hücrelerine göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı (Şekil 4.24).



Şekil 4.24 Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP ile muamele edilen C6 Glioma hücrelerindeki TAS değerleri (24 saat)

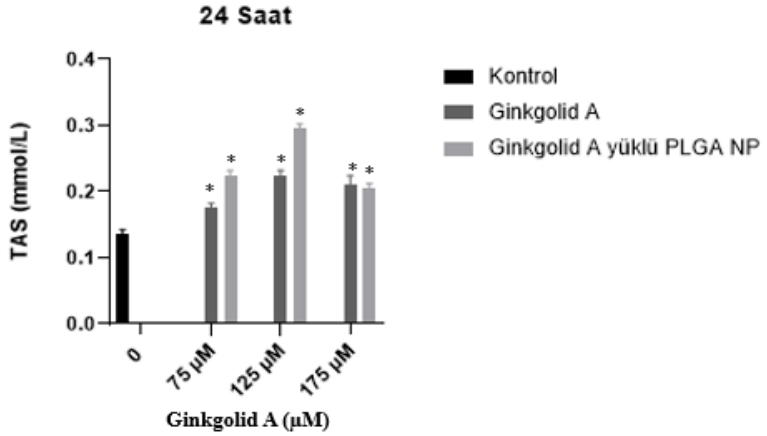
TAS değeri 48. saatte kontrol hücrelerinde 0.011 mmol/L, 10 μM, 25 μM ve 50 μM konsantrasyonlarında Cisplatin uygulanan hücrelerde sırasıyla; 0.006 mmol/L, 0.005 mmol/L, 0.004 mmol/L, 10 μM, 25 μM ve 50 μM konsantrasyonlarında Cisplatin yüklü PLGA NP uygulanan hücrelerde sırasıyla; 0.005 mmol/L, 0.004 μmol/L, 0.004 mmol/L olarak bulundu. 48. saatte Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP'nin uygulanan tüm konsantrasyonlarında C6 Glioma hücrelerinin TAS değerlerinde kontrol hücrelerine göre anlamlı bir farklılık saptanmadı (Şekil 4.25).



Şekil 4.25 Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP ile muamele edilen C6 Glioma hücrelerindeki TAS değerleri (48 saat)

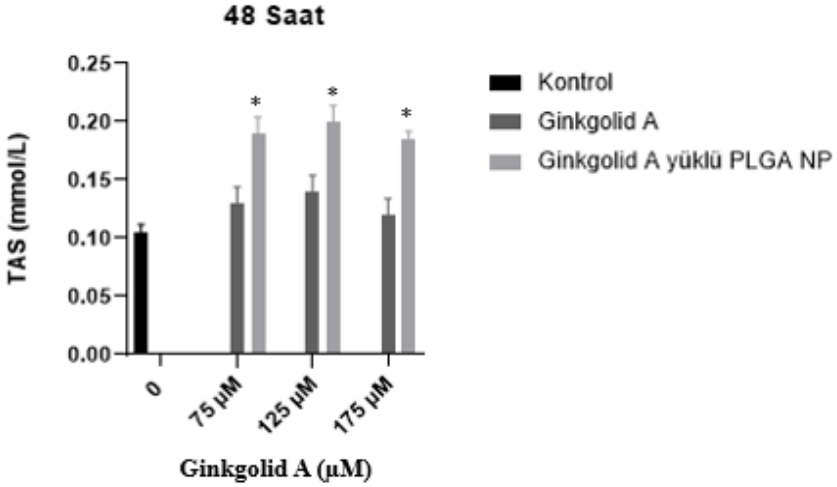
4.9.2 Ginkgolid A ve Ginkgolid A Yüklü PLGA NP ile Muamele Edilen C6 Glioma Hücrelerinde TAS Ölçümü

TAS değerleri 24. saatte kontrol hücrelerinde 0.14 mmol/L, 75 μM, 125 μM ve 175 μM konsantrasyonlarında Ginkgolid A uygulanan hücrelerde sırasıyla; 0.17 mmol/L, 0.22 mmol/L, 0.20 mmol/L, 75 μM, 125 μM ve 175 μM konsantrasyonlarında Ginkgolid A yüklü PLGA NP uygulanan hücrelerde sırasıyla; 0.23 mmol/L, 0.29 mmol/L, 0.21 mmol/L olarak bulundu (Şekil 4.26). 24. saatte Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP'nin uygulanan tüm konsantrasyonlarında C6 Glioma hücrelerinin TAS değerlerinde kontrol hücrelerine göre anlamlı bir artış olduğu belirlendi ($p<0.05$).



Şekil 4.26 Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP uygulanan C6 Glioma hücrelerindeki TAS değerleri (24 saat)

TAS değerleri 48. saatte kontrol hücrelerinde 0.10 mmol/L, 75 μM, 125 μM ve 175 μM konsantrasyonlarında Ginkgolid A uygulanan hücrelerde sırasıyla; 0.14 mmol/L, 0.15 mmol/L, 0.13 mmol/L, 75 μM, 125 μM ve 175 μM konsantrasyonlarında Ginkgolid A yüklü PLGA NP uygulanan hücrelerde sırasıyla; 0.18 mmol/L, 0.19 μmol/L, 0.18 mmol/L olarak bulundu (Şekil 4.27). 48. saatte Ginkgolid A yüklü PLGA NP'nin uygulanan tüm konsantrasyonlarında C6 Glioma hücrelerinin TAS değerlerinde kontrol hücrelerine göre anlamlı bir artış olduğu belirlendi ($p<0.05$).



Şekil 4.27 Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP uygulanan C6 Glioma hücrelerindeki TAS değerleri (48 saat)

4.10 Protein Miktar Tayini

4.10.1 Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP için Protein Tayini

C6 Glioma hücrelerindeki protein tayini için SMART ™ BCA Protein Assay Kiti kullanılmıştır. Protein miktarı 24. saatte kontrol hücrelerinde 3.26 mg, 10 μM, 25 μM ve 50 μM konsantrasyonlarında Cisplatin uygulanan hücrelerde sırasıyla; 3.89 mg, 4.06 mg, 3.88 mg, 10 μM, 25 μM ve 50 μM konsantrasyonlarında Cisplatin yüklü PLGA NP uygulanan hücrelerde sırasıyla; 2.95 mg, 3.89 mg, 2.92 mg bulundu. Protein miktarı 48. saatte kontrol hücrelerinde 2.92 mg, 10 μM, 25 μM ve 50 μM konsantrasyonlarında Cisplatin uygulanan hücrelerde sırasıyla; 3.10 mg, 2.60 mg, 2.70 mg, 10 μM, 25 μM ve 50 μM konsantrasyonlarında Cisplatin yüklü PLGA NP uygulanan hücrelerde sırasıyla; 2.37 mg, 2.57 mg, 2.09 mg olarak bulundu.

4.10.2 Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP için Protein Tayini

C6 Glioma hücre hattında SMART ™ BCA Protein Assay Kiti ile protein miktar tayini analizi gerçekleştirildi. Protein miktarı 24. saatte kontrol hücrelerinde 3.10 mg, 75 μM, 125 μM ve 175 μM konsantrasyonlarında Ginkgolid A uygulanan hücrelerde sırasıyla; 2.65 mg, 3.27 mg, 3.05 mg; 75 μM, 125 μM ve 175 μM konsantrasyonlarında Ginkgolid A yüklü PLGA NP uygulanan hücrelerde sırasıyla; 3.91 mg, 3.42 mg, 3.81 mg protein olarak bulundu. Protein miktarı 48. saatte kontrol hücrelerinde 2.83 mg, 75 μM, 125 μM ve 175 μM konsantrasyonlarında Ginkgolid A uygulanan hücrelerde sırasıyla; 2.03 mg, 3.73 mg, 2.53 mg, 75 μM, 125 μM ve 175 μM konsantrasyonlarında Ginkgolid A yüklü PLGA NP uygulanan hücrelerde sırasıyla; 3.13 mg, 2.45 mg, 2.76 mg olarak bulundu.

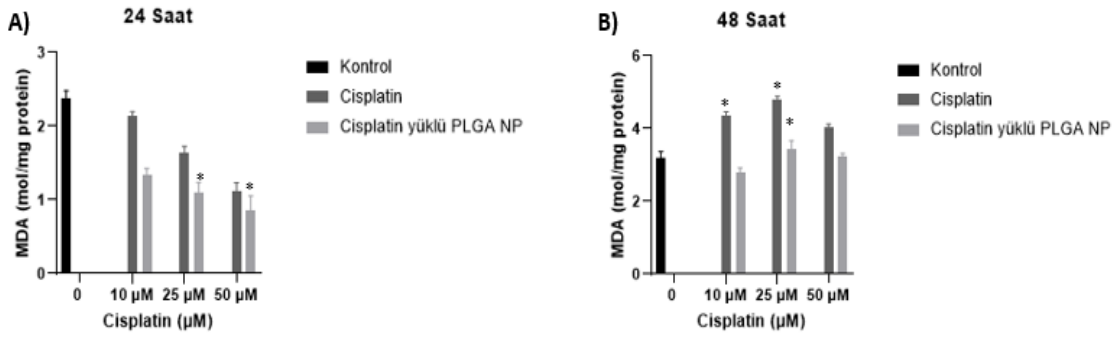
4.11 MDA Aktivite Tayini

4.11.1 Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP ile Muamele Edilen C6 Glioma Hücrelerinde MDA Düzeyi

MDA seviyeleri, 10 μM, 25 μM ve 50 μM konsantrasyonlarda Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP ile 24 ve 48 saat muamele edilen C6 Glioma hücrelerinden elde edilen hücre lizatlarında ölçülerek hesaplandı.

MDA seviyesi 24. saatte kontrol hücrelerinde 2.45 MDA/mg ,10 μM, 25 μM, 50 μM konsantrasyonlarında Cisplatin uygulanan hücrelerde sırasıyla, 2.18 MDA/mg, 1.57 MDA/mg, 1.05 MDA/mg; 10 μM, 25 μM, 50 μM konsantrasyonlarında Cisplatin yüklü PLGA NP uygulanan hücrelerde sırasıyla, 1.26 MDA/mg, 1.01 MDA/mg, 0.72 MDA/mg protein olarak bulundu (Şekil 4.28-A). 24. saatte 25 μM ve 50 μM Cisplatin yüklü PLGA NP ile muamele edilen C6 Glioma hücrelerinin MDA seviyelerinde kontrol hücrelerine göre anlamlı bir azalma olduğu belirlendi ($p<0.05$).

MDA seviyesi 48. saatte kontrol hücrelerinde 3.33 MDA/mg, 10 μM, 25 μM ve 50 μM konsantrasyonlarında Cisplatin uygulanan hücrelerde sırasıyla 4.44 MDA/mg, 4.86 MDA/mg, 4.43 MDA/mg, 10 μM, 25 μM ve 50 μM konsantrasyonlarında Cisplatin yüklü PLGA NP uygulanan hücrelerde sırasıyla 2.89 MDA/mg, 3.26 MDA/mg, 3.18 MDA/mg protein olarak bulundu (Şekil 4.28-B). 48. saatte 10 μM ve 25 μM Cisplatin ve 25 μM Cisplatin yüklü PLGA NP ile muamele edilen C6 Glioma hücrelerinin MDA seviyelerinde kontrol hücrelerine göre anlamlı bir artış olduğu belirlendi ($p<0.05$).



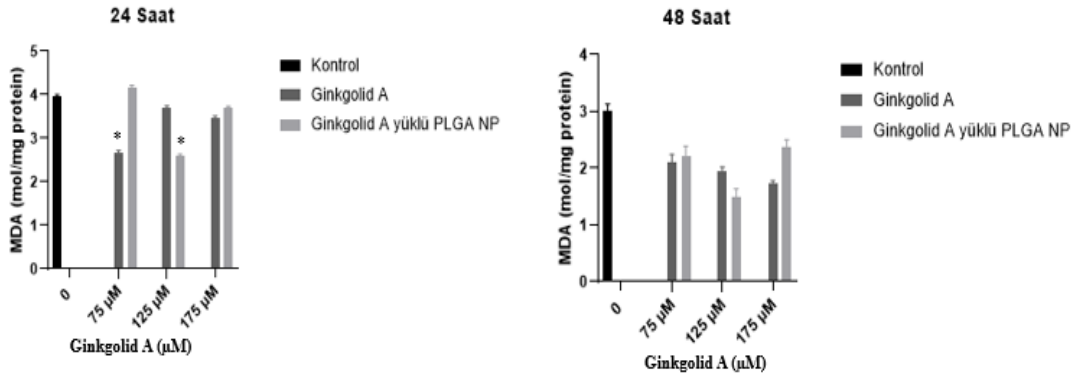
Şekil 4.28 Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP uygulanan C6 Glioma hücrelerindeki MDA seviyeleri (A) 24 saat (B) 48 saat

4.11.2 Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP ile Muamele Edilen C6 Glioma Hücrelerinde MDA Düzeyi

MDA seviyeleri, 75 μM, 125 μM ve 175 μM konsantrasyonlarda Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP ile 24 ve 48 saat muamele edilen C6 Glioma hücrelerinden elde edilen hücre lizatlarında ölçülerek hesaplandı.

MDA seviyesi 24. saatte kontrol hücrelerinde 3.96 MDA/mg, 75 μM, 125 μM ve 175 μM konsantrasyonlarında Ginkgolid A uygulanan hücrelerde sırasıyla; 2.61 MDA/mg, 3.67 MDA/mg, 3.45 MDA/mg, 75 μM, 125 μM ve 175 μM konsantrasyonlarında Ginkgolid A yüklü PLGA NP uygulanan hücrelerde sırasıyla 4.1 MDA/mg, 2.58 MDA/mg, 3.73 MDA/mg protein olarak bulundu (Şekil 4.29-A). 24. saatte 75 μM Ginkgolid A ve 125 μM Ginkgolid A yüklü PLGA NP ile muamele edilen C6 Glioma hücrelerinin MDA seviyelerinde kontrol hücrelerine göre anlamlı bir azalma olduğu belirlendi ($p<0.05$).

MDA seviyesi 48. saatte kontrol hücrelerinde 2.94 MDA/mg, 75 μM, 125 μM ve 175 μM konsantrasyonlarında Ginkgolid A uygulanan hücrelerde sırasıyla; 2.00 MDA/mg, 4.04 MDA/mg, 1.49 MDA/mg, 75 μM, 125 μM ve 175 μM konsantrasyonlarında Ginkgolid A yüklü PLGA NP uygulanan hücrelerde sırasıyla; 2.34 MDA/mg, 1.41 MDA/mg, 2.47 MDA/mg protein olarak bulundu (Şekil 4.29-B). 48. saatte Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP'nin uygulanan tüm konsantrasyonlarında C6 Glioma hücrelerinin MDA seviyelerinde kontrol hücrelerine göre anlamlı bir farklılık saptanmadı.



Şekil 4.29 Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP uygulanan C6 Glioma hücrelerindeki MDA seviyeleri (A) 24 saat (B) 48 saat

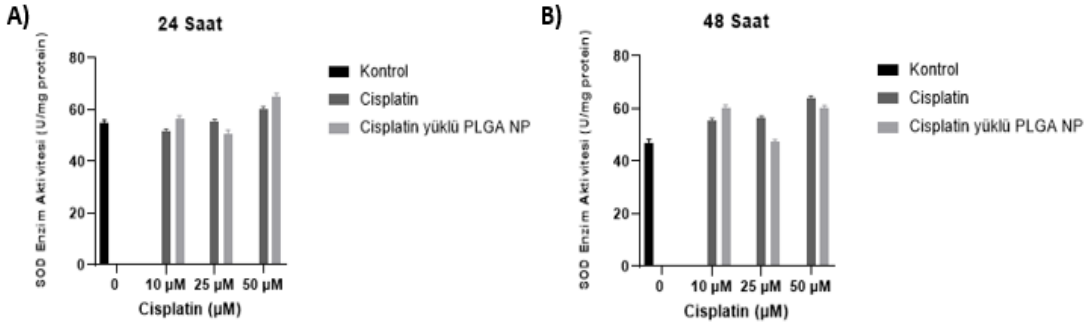
4.12 SOD Aktivite Tayini

4.12.1 Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP ile Muamele Edilen C6 Glioma Hücrelerinde SOD Düzeyi

SOD seviyeleri, 10 μM, 25 μM ve 50 μM konsantrasyonlarda Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP ile 24 ve 48 saat muamele edilen C6 Glioma hücrelerinden lizatlar elde edilerek hesaplandı.

SOD seviyeleri, 24. saatte kontrol hücrelerinde 55.69 U/mg, 10 μM, 25 μM ve 50 μM konsantrasyonlarında Cisplatin uygulanan hücrelerde sırasıyla; 52.36 U/mg, 54.46 U/mg, 59.44 U/mg; 10 μM, 25 μM ve 50 μM konsantrasyonlarında Cisplatin yüklü PLGA NP uygulanan hücrelerde sırasıyla; 57.40 U/mg, 51.83 U/mg, 65.95 U/mg olarak bulundu (Şekil 4.30-A). 24. saatte Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP'nin uygulanan tüm konsantrasyonlarında C6 Glioma hücrelerinin SOD seviyelerinde kontrol hücrelerine göre anlamlı bir farklılık saptanmadı.

SOD seviyeleri 48. saatte kontrol hücrelerinde 46.14 U/mg, 10 μM, 25 μM ve 50 μM konsantrasyonlarında Cisplatin uygulanan hücrelerde sırasıyla; 54.44 U/mg, 56.01 U/mg 64.59 U/mg, 10 μM, 25 μM ve 50 μM konsantrasyonlarında Cisplatin yüklü PLGA NP uygulanan hücrelerde sırasıyla; 59.09 U/mg, 48.5 U/mg, 61.04 U/mg olarak bulundu (Şekil 4.30-B). 24. saatte Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP'nin uygulanan tüm konsantrasyonlarında C6 Glioma hücrelerinin SOD seviyelerinde kontrol hücrelerine göre anlamlı bir farklılık saptanmadı.



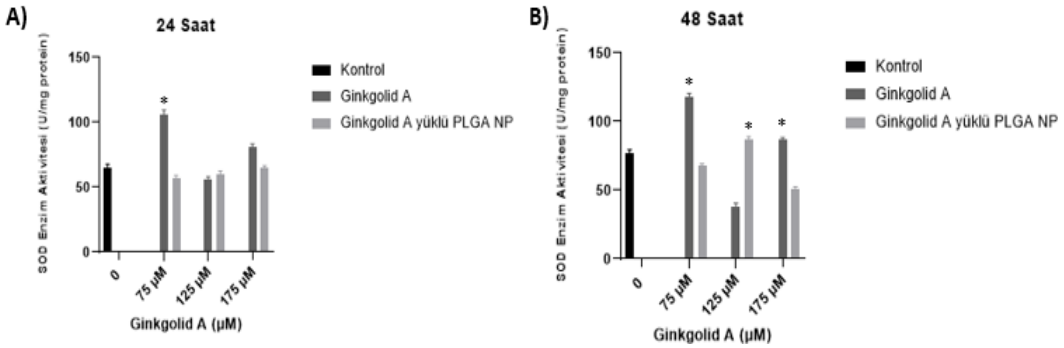
Şekil 4.30 Cisplatin, Cisplatin yüklü PLGA NP uygulanan C6 Glioma hücrelerindeki SOD seviyeleri (A) 24 saat (B) 48 saat

4.12.2 Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP ile Muamele Edilen C6 Glioma Hücrelerinde SOD Düzeyi

SOD seviyeleri, 75 μM, 125 μM ve 175 μM konsantrasyonlarda Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP ile 24 ve 48 saat muamele edilen C6 Glioma hücrelerinden elde edilen hücre lizatlarında ölçülerek hesaplandı.

SOD seviyeleri 24. saatte kontrol hücrelerinde 66.96 U/mg, 75 μM, 125 μM ve 175 μM konsantrasyonlarında Ginkgolid A uygulanan hücrelerde sırasıyla; 108.47, 57,32 U/mg, 82.54 U/mg, 75 μM, 125 μM ve 175 μM konsantrasyonlarında Ginkgolid A yüklü PLGA NP uygulanan hücrelerde sırasıyla 58.32 U/mg, 58.48, 63.02 U/mg olarak bulundu (Şekil 4.31-A). 24. saatte 75 μM Ginkgolid A ile muamele edilen C6 Glioma hücrelerinin MDA seviyesinde kontrol hücrelerine göre anlamlı bir artış olduğu belirlendi ($p<0.05$).

SOD seviyeleri 48. saatte kontrol hücrelerinde 78.94 U/mg, 75 μM, 125 μM ve 175 μM konsantrasyonlarında Ginkgolid A uygulanan hücrelerde sırasıyla; 116.56 U/mg, 36.96 U/mg, 85.80 U/mg, 75 μM, 125 μM ve 175 μM konsantrasyonlarında Ginkgolid A yüklü PLGA NP uygulanan hücrelerde sırasıyla; 66.98 U/mg, 88.33 U/mg, 49.34 U/mg olarak bulundu (Şekil 4.31-B). 48. saatte 75 μM ve 175 μM Ginkgolid A ve 125 μM Ginkgolid A yüklü PLGA NP ile muamele edilen C6 Glioma hücrelerinin SOD seviyelerinde kontrol hücrelerine göre anlamlı bir artış olduğu belirlendi ($p<0.05$).



Şekil 4.31 Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP uygulanan C6 Glioma hücrelerindeki SOD seviyeleri (A) 24 saat (B) 48 saat

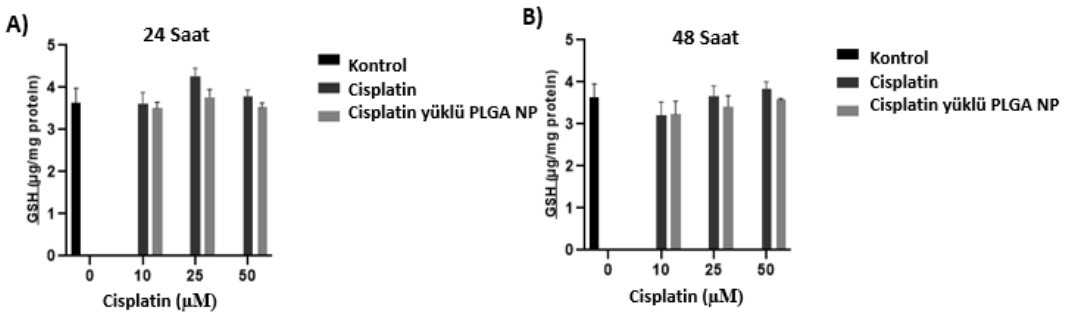
4.13 GSH Aktivite Tayini

4.13.1 Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP ile Muamele Edilen C6 Glioma Hücrelerinde GSH Düzeyi

GSH seviyeleri, 10 μM, 25 μM ve 50 μM konsantrasyonlarda Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP ile 24 ve 48 saat muamele edilen C6 Glioma hücrelerinden lizatlar elde edilerek hesaplandı.

GSH seviyeleri 24. saatte kontrol hücrelerinde 3.88 µg/mg, 10 μM, 25 μM ve 50 μM konsantrasyonlarında Cisplatin uygulanan hücrelerde sırasıyla; 3.80 µg/mg, 4.11 µg/mg, 3.89 µg/mg, 10 μM, 25 μM ve 50 μM konsantrasyonlarında Cisplatin yüklü PLGA NP uygulanan hücrelerde sırasıyla; 3.61 µg/mg, 3.64 µg/mg, 3.45 µg/mg olarak bulundu (Şekil 4.32-A). 24. saatte Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP ile muamele edilen C6 Glioma hücrelerinin GSH seviyelerinde kontrol hücrelerine göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı.

GSH seviyeleri 48. saatte kontrol hücrelerinde ve 10 μM, 25 μM ve 50 μM konsantrasyonlarında Cisplatin uygulanan hücrelerde sırasıyla; 3.86 µg/mg, 3.43 µg/mg, 3.84 µg/mg, 3.95 µg/mg, 10 μM, 25 μM ve 50 μM konsantrasyonlarında Cisplatin yüklü PLGA NP uygulanan hücrelerde sırasıyla; 3.45 µg/mg, 3.22 µg/mg, 3,55 µg/mg olarak bulundu (Şekil 4.32-B). 48. saatte Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP'nin uygulanan tüm konsantrasyonlarında C6 Glioma hücrelerinin GSH seviyelerinde kontrol hücrelerine göre anlamlı bir farklılık saptanmadı.



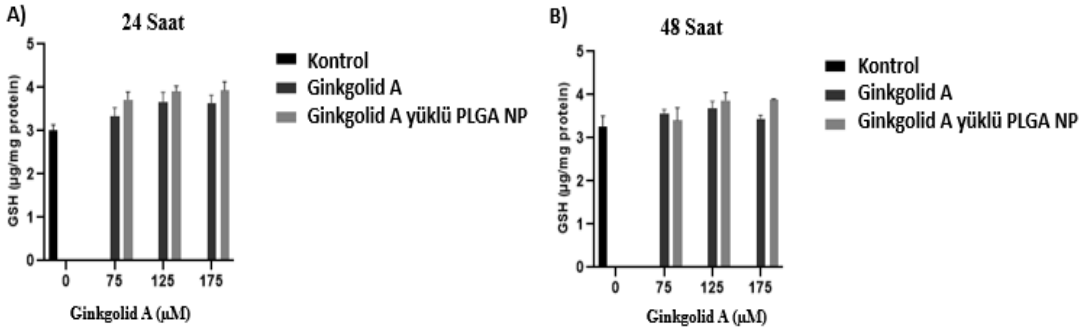
Şekil 4.32 Cisplatin, Cisplatin yüklü PLGA NP uygulanan C6 Glioma hücrelerindeki GSH seviyeleri (A) 24 saat (B) 48 saat

4.13.2 Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP ile Muamele Edilen C6 Glioma Hücrelerinde GSH Düzeyi

GSH seviyeleri, 75 μM, 125 μM ve 175 μM konsantrasyonlarda Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP ile 24 ve 48 saat muamele edilen C6 Glioma hücrelerinden elde edilen hücre lizatlarından ölçülerek hesaplandı.

GSH seviyeleri 24. saatte kontrol hücrelerinde 2.91 µg/mg, 75 μM, 125 μM ve 175 μM konsantrasyonlarında Ginkgolid A uygulanan hücrelerde sırasıyla; 3.47 µg/mg, 3.82 µg/mg, 3.76 µg/mg, 75 μM, 125 μM ve 175 μM konsantrasyonlarında Ginkgolid A yüklü PLGA NP uygulanan hücrelerde sırasıyla; 3.84 µg/mg, 3.82 µg/mg, 4.07 µg/mg olarak bulundu (Şekil 4.33-A). 24. saatte Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP'nin uygulanan tüm konsantrasyonlarında C6 Glioma hücrelerinin GSH seviyelerinde kontrol hücrelerine göre anlamlı bir farklılık saptanmadı.

GSH seviyelerinde 48. saatte kontrol hücrelerinde 3,43 µg/mg, 75 μM, 125 μM ve 175 μM konsantrasyonlarında Ginkgolid A uygulanan hücrelerde sırasıyla; 3.67 µg/mg, 3.57 µg/mg, 3.37 µg/mg, 75 μM, 125 μM ve 175 μM konsantrasyonlarında Ginkgolid A yüklü PLGA NP uygulanan hücrelerde sırasıyla; 3.61 µg/mg, 3.74 µg/mg, 3.88 µg/mg olarak bulundu (Şekil 4.33-B). 48. saatte Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP'nin uygulanan tüm konsantrasyonlarında C6 Glioma hücrelerinin GSH seviyelerinde kontrol hücrelerine göre anlamlı bir farklılık saptanmadı.

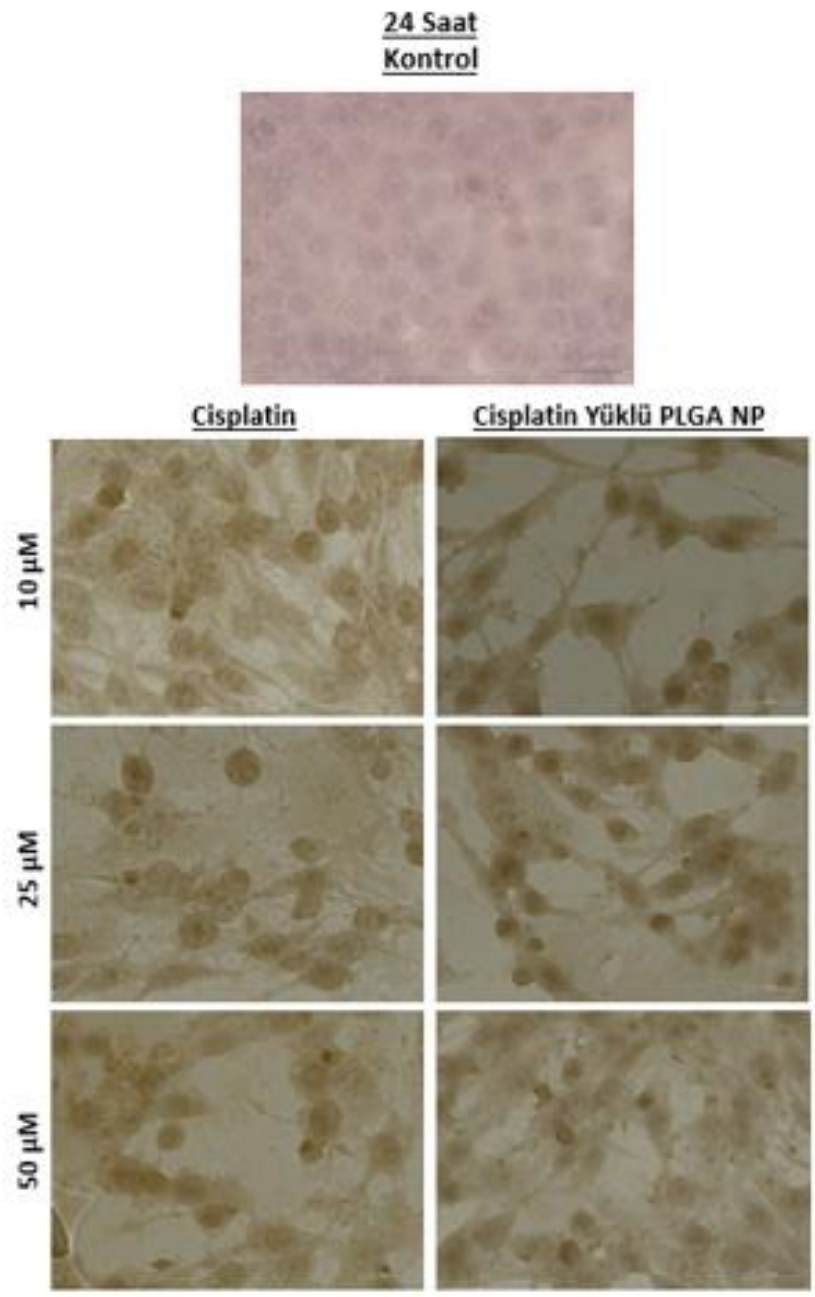


Şekil 4.33 Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP uygulanan C6 Glioma hücrelerindeki GSH seviyeleri (A) 24 saat (B) 48 saat

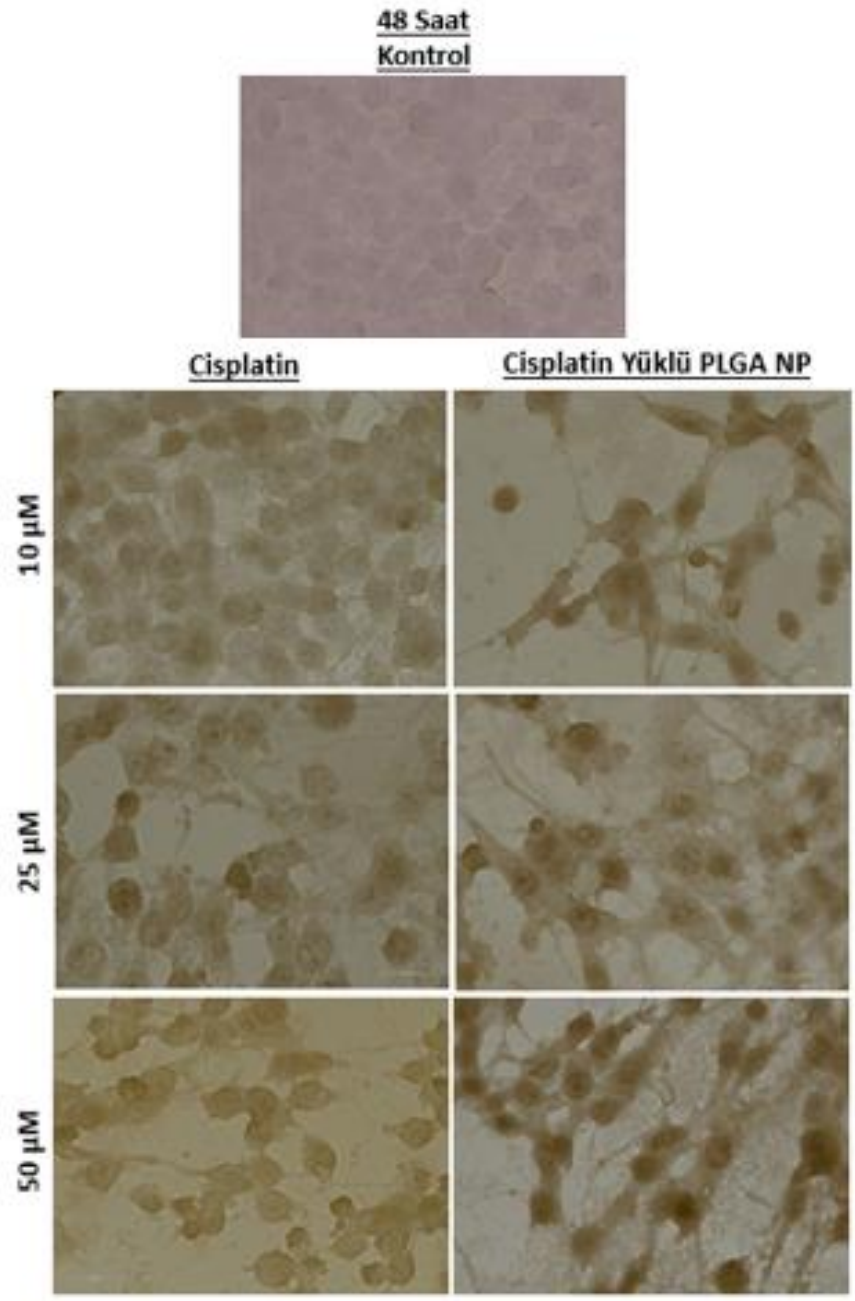
4.14 TUNEL Yöntemi ile Apoptoz Tayini

4.14.1 Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP'nin C6 Glioma Hücrelerinde Apoptoz Etkisi

10 μM, 25 μM ve 50 μM konsantrasyonlarında Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP ile 24 ve 48 saat muamele edilen C6 Glioma hücrelerinde apoptotik etki TUNEL yöntemiyle gösterildi. Apoptoza giden hücreler bu yöntem ile kahverengi olarak pozitif işaretlendi (Şekil 4.34- 4.35).



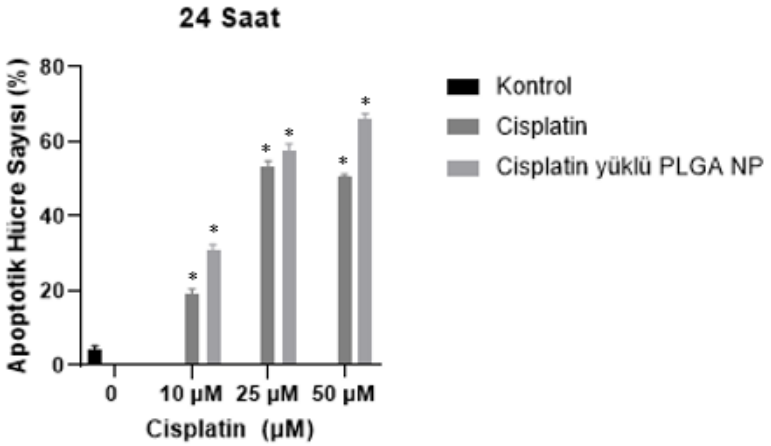
Şekil 4.34 Kontrol, Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP ile 24 saat muamele edilen C6 Glioma hücrelerinin TUNEL pozitif işaretlenmesinin ışık mikroskobu görüntüsü (100x)



Şekil 4.35 Kontrol, Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP ile 48 saat muamele edilen C6 Glioma hücrelerinin TUNEL pozitif işaretlenmesinin ışık mikroskobu görüntüsü (100x)

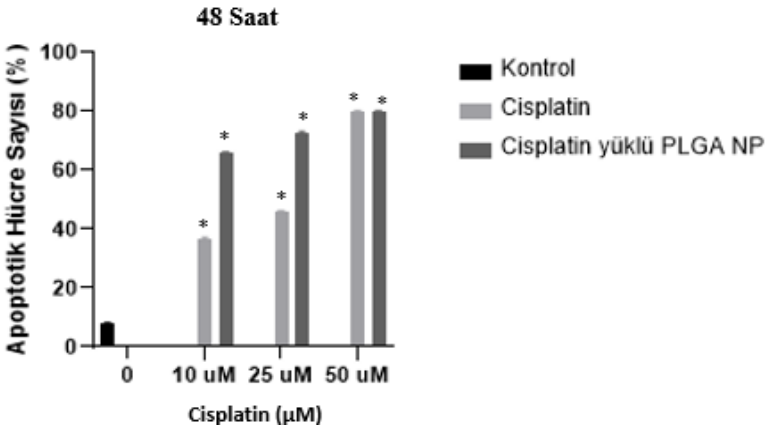
TUNEL yöntemi ile pozitif işaretlenmiş hücre sayısı 24. saatte kontrol hücrelerinde %5,04, 10 μM, 25 μM ve 50 μM konsantrasyonlarında Cisplatin uygulanan hücrelerde sırasıyla; %18.83, %54.36, %53.48, 10 μM, 25 μM ve 50 μM konsantrasyonlarında Cisplatin yüklü PLGA NP uygulanan hücrelerde sırasıyla; %36.02, %58.81 ve %67.05 olarak bulundu (Şekil 4.36).

24. saatte Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP'nin uygulanan tüm konsantrasyonlarında C6 Glioma hücrelerinin apoptotik hücre sayısında kontrol hücrelerine göre anlamlı bir artış olduğu belirlendi ($p<0.05$).



Şekil 4.36 Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP uygulanan C6 Glioma hücrelerinde apoptotik hücre sayısı (24 saat)

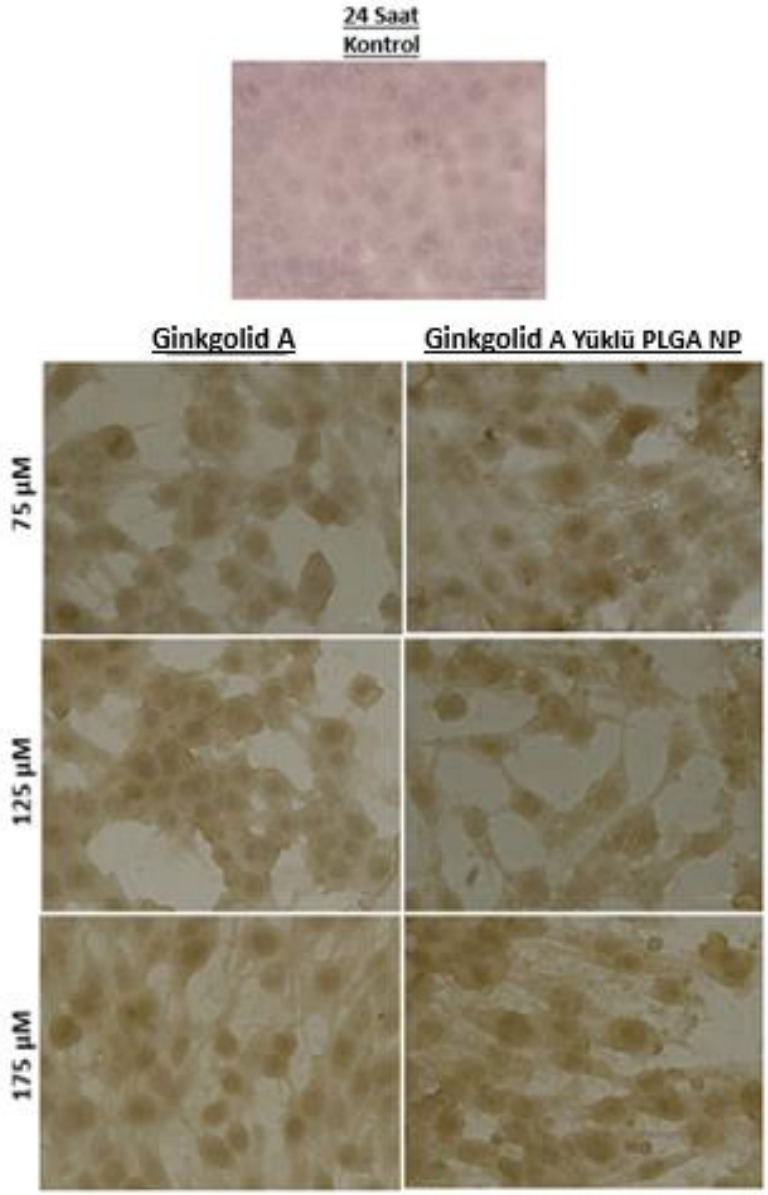
TUNEL yöntemi ile pozitif işaretlenmiş hücre sayısı 48. saatte kontrol hücrelerinde %8.13, 10 μM, 25 μM ve 50 μM konsantrasyonlarında Cisplatin uygulanan hücrelerde sırasıyla; %36.05, %45.42, %60.17, 10 μM, 25 μM ve 50 μM konsantrasyonlarında Cisplatin yüklü PLGA NP uygulanan hücrelerde sırasıyla; %65.26, %72.71, %79.46 olarak bulundu (Şekil 4.37). 48. saatte Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP'nin uygulanan tüm konsantrasyonlarında C6 Glioma hücrelerinin apoptotik hücre sayısında kontrol hücrelerine göre anlamlı bir artış olduğu belirlendi ($p<0.05$).



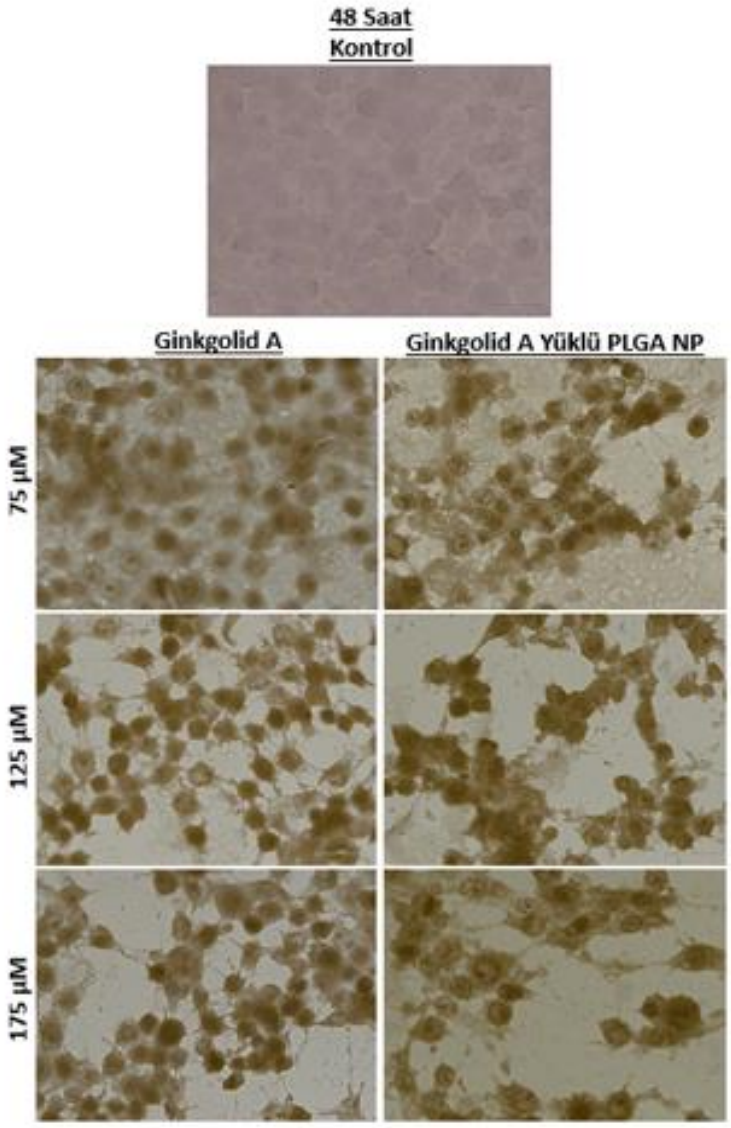
Şekil 4.37 Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP uygulanan C6 Glioma hücrelerinde apoptotik hücre sayısı (48 saat)

4.14.2 Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP'nin C6 Glioma Hücrelerinde Apoptoz Etkisi

75 μM,125 μM ve 175 μM konsantrasyonlarında Gingkolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP ile 24 ve 48 saat muamele edilen C6 Glioma hücrelerinde apoptotik etki TUNEL yöntemiyle gösterildi. Apoptoza giden hücreler bu yöntem ile kahverengi olarak pozitif işaretlendi (Şekil 4.38- 4.39).

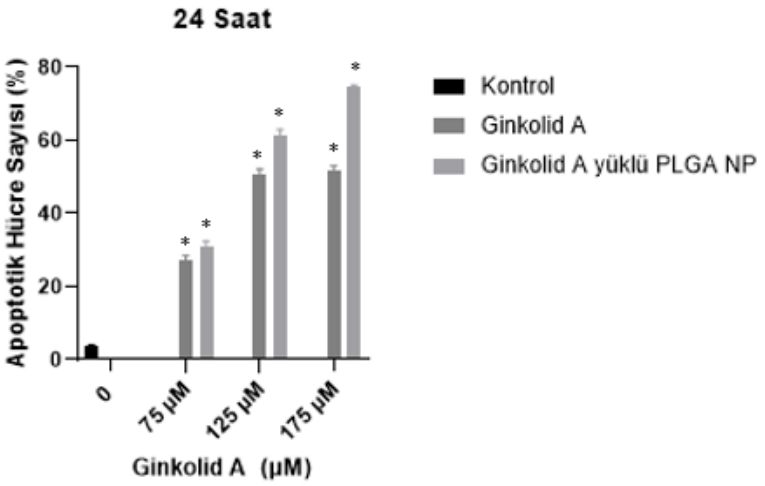


Şekil 4.38 Kontrol, Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP ile 24 saat muamele edilen C6 Glioma hücrelerinin TUNEL pozitif işaretlenmesinin ışık mikroskobu görüntüsü (100x)



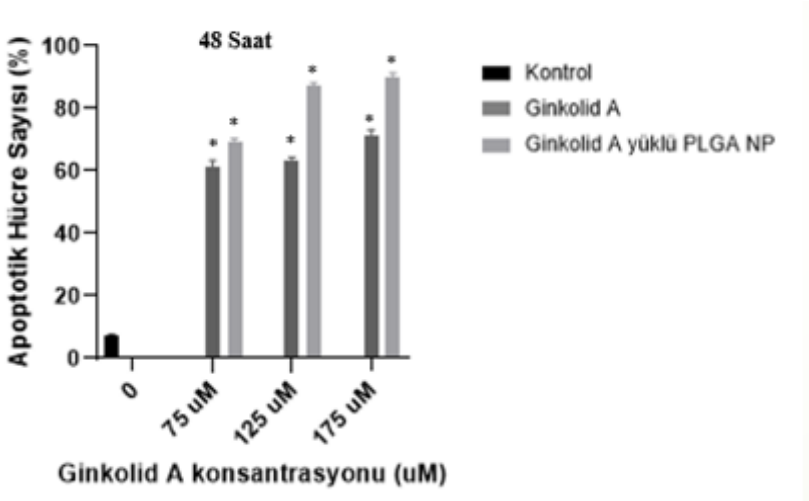
Şekil 4.39 Kontrol, Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP ile 48 saat muamele edilen C6 Glioma hücrelerinin TUNEL pozitif işaretlenmesinin ışık mikroskobu görüntüsü (100x)

TUNEL yöntemi ile pozitif işaretlenmiş hücre sayısı 24. saatte kontrol hücrelerinde %3,72, 75 μM, 125 μM ve 175 μM konsantrasyonlarında Ginkgolid A uygulanan hücrelerde sırasıyla; %24.12, %51.80 ve %52.70, 75 μM, 125 μM ve 175 μM konsantrasyonlarında Ginkgolid A yüklü PLGA NP uygulanan hücrelerde sırasıyla; %25.78, %62.46 ve %74.22 olarak bulundu (Şekil 4.40). 24. saatte Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP'nin uygulanan tüm konsantrasyonlarında C6 Glioma hücrelerinin apoptotik hücre sayısında kontrol hücrelerine göre anlamlı bir artış olduğu belirlendi ($p<0.05$).



Şekil 4.40 Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP uygulanan C6 Glioma hücrelerinde apoptotik hücre sayısı (24 saat)

TUNEL yöntemi ile pozitif işaretlenmiş hücre sayısı 48. saatte kontrol hücrelerinde %7.30, 75 μM, 125 μM ve 175 μM konsantrasyonlarında Ginkgolid A uygulanan hücrelerde sırasıyla; %62.76, %62.38, %72.68, 75 μM, 125 μM ve 175 μM konsantrasyonlarında Ginkgolid A yüklü PLGA NP uygulanan hücrelerde sırasıyla; %68.06, %86.91, %89.08 olarak bulundu (Şekil 4.41). 48. saatte Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP'nin uygulanan tüm konsantrasyonlarında C6 Glioma hücrelerinin apoptotik hücre sayısında kontrol hücrelerine göre anlamlı bir artış olduğu belirlendi ($p<0.05$).



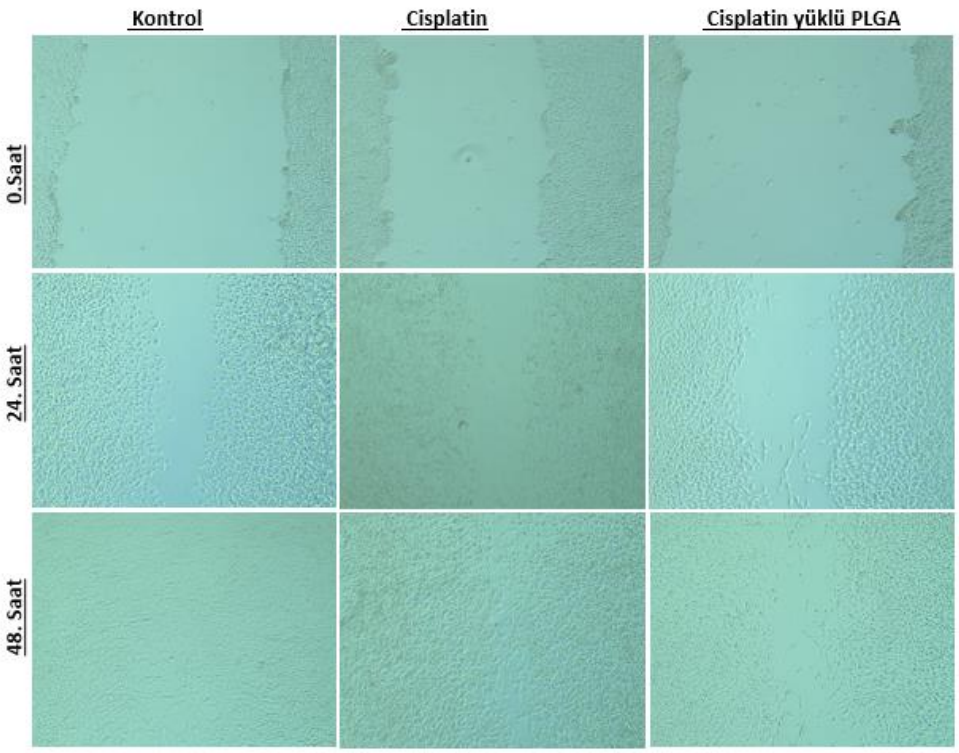
Şekil 4.41 Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP uygulanan C6 Glioma hücrelerinde apoptotik hücre sayısı (48 saat)

4.15 Yara İyileşmesi Analizi

4.15.1 Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP'nin C6 Glioma Hücrelerinde Hücre Göçüne Etkisi

Etken maddelerin hücre göçüne etkisinin incelenmesi için Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP ile muamele edilen C6 Glioma hücrelerinde yara iyileşme analizi gerçekleştirildi. Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP ile muamele edilen C6 Glioma hücrelerinde mikropipet ucu yardımıyla oluşturulan yarıkların 0. saatte, 24. saatte ve 48. saatte mikroskobik görüntüleri alındı.

Image-J program yardımıyla, 0. saatte, 24. saatte ve 48. saatte gözlemlenen hücrelerin yarıkları arasındaki mesafe analiz edildi. Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP'nin C6 Glioma hücre göçüne etkisi Şekil 4.42'de ve analiz sonuçları Tablo 4.2 'de gösterildi. Kontrol hücrelerindeki yarık mesafesi saatlere bağlı olarak hızlı bir şekilde kapanma göstermiştir. Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP ile muamele edilen C6 Glioma hücrelerinde zamana bağlı olarak mesafenin daraldığı fakat kontrol hücrelerine göre bu kapanmanın daha az olduğu belirlendi.



Şekil 4.42 Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP'nin C6 Glioma hücre göçünde etkisi

Kontrol hücrelerinde 48. saatte yarıklar arasındaki mesafe %93 kapanırken, Cisplatin ile muamele edilen hücrelerde yarıklar arasındaki mesafe %90, Cisplatin yüklü PLGA NP ile muamele edilen hücrelerde yarıklar arasındaki mesafenin ise 48. saatte %82 kapandığı tespit edildi.

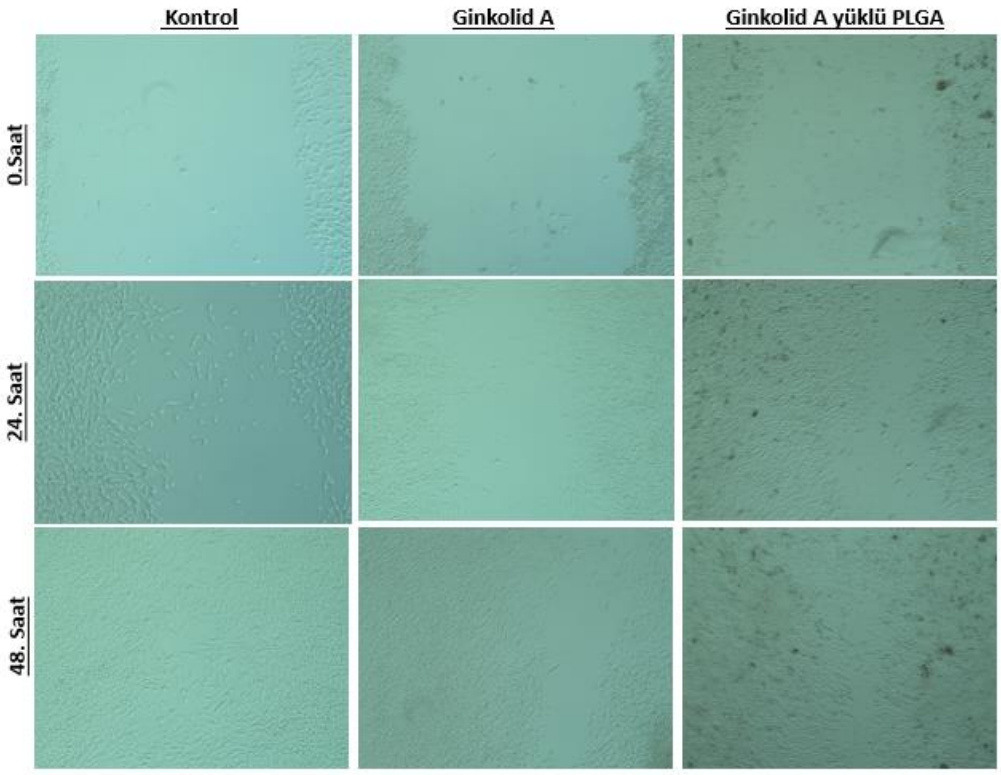
Tablo 4.2 Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP ile muamele edilen C6 Glioma hücrelerinde oluşturulan yarıkların mesafe değerleri

	Kontrol (µm)	Cisplatin (µm)	Cisplatin yüklü PLGA NP (µm)
0. Saat	1359,003	990,018	1482,003
24. Saat	375,02	408,011	630
48. Saat	96,047	110	312

4.15.2 Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP'nin C6 Glioma Hücrelerinde Hücre Göçüne Etkisi

Etken maddelerin hücre göçüne etkisinin incelenmesi için Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP ile muamele edilen C6 Glioma hücrelerinde yara iyileşme analizi gerçekleştirildi. Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP ile muamele edilen C6 Glioma hücrelerinde mikropipet ucu yardımıyla oluşturulan yarıkların 0. saatte, 24. saatte ve 48. saatte mikroskobik görüntüleri alındı.

Image-J program yardımıyla 0. Saat, 24. saat ve 48. saat gözlemlenen hücrelerin yarıkları arasındaki mesafe analiz edildi. Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP'nin C6 Glioma hücre göçüne etkisi Şekil 4.43'te ve analiz sonuçları Tablo 4.3'te gösterildi. Kontrol hücrelerindeki yarık mesafesi saatlere bağlı olarak hızlı bir şekilde kapanma göstermiştir. Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP ile muamele edilen C6 Glioma hücrelerinde zamana bağlı olarak mesafenin daraldığı fakat kontrol hücrelerine göre bu kapanmanın daha az olduğu belirlendi.



Şekil 4.43 Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP'nin C6 Glioma hücre göçünde etkisi

Kontrol hücrelerinde 48. saat sonunda yarıklar arasındaki mesafe %81 kapanırken, Ginkgolid A ile muamele edilen hücrelerde yarıklar arasındaki mesafe %78, Ginkgolid A PLGA NP ile muamele edilen hücrelerde yarıklar arasındaki mesafenin ise %79 kapandığı tespit edildi.

Tablo 4.3 Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP ile muamele edilen C6 Glioma hücrelerinde oluşturulan yarıkların mesafe değerleri

	Kontrol (µm)	Ginkgolid A (µm)	Ginkgolid A yüklü PLGA NP (µm)
0. Saat	1521,107	1278,014	1344,03
24. Saat	819,017	657,007	603,007
48. Saat	339	360,001	350

Glioblastoma beyin tümörü metastatik özelliğe sahiptir. Etkin bir tedavi yöntemi tam olarak bulunmamaktadır ve hastalarda yaşam süresi yaklaşık 15 ay olarak belirlenmiştir [3]. Oksidatif stres, beyin ve kanser metabolizması dahil olmak üzere birçok dejeneratif hastalığı etkilemektedir. İnsan metabolizmasında, antioksidanların varlığı ile bazı oksidatif hasarlar önlenebilmektedir. Bu antioksidan savunma sisteminin her bir bileşeni, organizmayı korumak için sinerjik olarak birleşebilir [191], [192].

Zayıf çözünür ve toksik ilaçların polimerik NP içinde kapsüllenmesi, terapötik ve farmakodinamik performanslarını arttırdığı gibi yan etkilerini de azaltmaktadır. Vücutta 200 nm'den büyük partiküller dalak tarafından etkin bir şekilde temizlenirken, 5 nm'den küçük partiküller böbrekler tarafından vücuttan hızla temizlenir. Bu nedenle, nanotıpta en yaygın olarak 10-200 nm aralığındaki NP'ler tercih edilmektedir [16].

KBB üzerinde NP ile yapılan çalışmaların sonuçlarında bu bariyeri geçebilen partikül boyutlarının 150-300 nm arasında olduğu kaydedilmiştir [184], [189]. Reseptör aracılı endositozun yaklaşık olarak 200 nm boyutunda nanopartiküllerin alımı için yaygın bir yol olduğu bildirilmiştir [193]. Rossina ve arkadaşları (2019) SKOV-3 hücrelerinde, Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP'nin sitotoksisitesini inceledikleri bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Sentezledikleri Cisplatin yüklü PLGA NP'nin boyutunu 192.89 ± 16.73 nm olarak göstermişlerdir [190]. Cheng ve arkadaşları (2011), sentezledikleri Cisplatin yüklü PLGA-mPEG NP'nin boyutunu ise 192 ± 12 nm olarak kaydetmişlerdir [184]. Çalışmamızda sentezlediğimiz Cisplatin yüklü PLGA NP'nin boyutu 196,5 ± 1,773 nm olarak belirlenmiş ve literatür ile uyumlu bulunmuştur.

Çalışmamızda Cisplatinin C6 Glioma hücrelerinde 24. ve 48. saat IC_{50} değerleri sırasıyla; 53 μM ve 12.7 μM olarak kaydedilirken, Cisplatin yüklü PLGA NP'nin C6 Glioma hücrelerinde IC_{50} değeri 24. saatte 24 μM, 48. saatte 4.3 μM olarak belirlenmiştir. Mirmalek ve arkadaşları (2016), Cisplatinin IC_{50} değerini MCF-7 hücrelerinde yaptıkları araştırmada 24. saatte 20 µg/ml olarak kaydetmişlerdir [194]. Biyoyararlanımını arttırmak için Cisplatin yüklü PLGA NP sentezlenen bir çalışmada (2021), Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP'nin MCF-7 kanser hücre

hatlarında sitotoksisitesi incelenmiştir. MCF-7 hücre hattında Cisplatin yüklü PLGA NP'nin 24. Saatte IC_{50} değeri 23 ± 2:80 µg/mL iken, serbest Cisplatinde IC_{50} değeri 38 ± 3:78 µg/mL olarak kaydedilmiştir [195]. Cisplatin yüklü PLGA NP için IC_{50} değeri, serbest Cisplatin'e göre daha düşük konsantrasyonda kaydedilmiştir. Çalışmamızda Cisplatin ve sentezlediğimiz Cisplatin yüklü PLGA NP için IC_{50} değerleri literatür ile benzer sonuç vermiştir.

Çalışmamızda Cisplatin yüklü PLGA NP ile muamele edilen C6 Glioma hücrelerinin TOS değerlerinde kontrol hücrelerine göre 48. saatte artış gözlemlenirken, MDA seviyelerindeki artış serbest Cisplatin formunda daha yüksek bulunmuştur. Verma ve arkadaşları (2016), Cisplatin ile gerçekleştirdikleri nefrotoksisite çalışmasında böbrek dokusunda TOS değerlerinde artış olduğunu göstermiş ve hücrelerin apoptoza ilerlediğini raporlamışlardır [196]. Alkahtani ve arkadaşları (2021), MCF-7 hücrelerine uyguladıkları Cisplatin yüklü PLGA NP çalışmasında, Cisplatin yüklü PLGA NP'nin MCF-7 hücre hattında ROS'u arttırdığını doğrulamışlardır [195]. Yapılan bu çalışmada 48. saatte elde ettiğimiz sonuçlarımız Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP uygulanan C6 Glioma hücrelerinde oksidatif stresi arttırarak hücreleri apoptoza yönlendirmiş ve bu sonuçlarımız literatürdeki çalışmalarla desteklenmiştir.

Cisplatin bir kemoterapi ilacıdır ve antioksidatif bir etkisi mevcut değildir. Hücrelerde oksidatif stresi arttırarak apopotozu indüklemektedir. Verma ve arkadaşları (2016), Cisplatin'in antioksidan seviyesini tayin ettikleri çalışmalarında, TAS ve GSH seviyesinde azalma belirlemişlerdir [196]. Çalışmamızda serbest Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP uygulanan hücrelerin TAS durumlarında kontrol hücrelerine göre anlamlı olmayan azalma saptanmıştır.

Morovati ve arkadaşları (2019), Cisplatin'in apoptoz üzerine etkisini flow sitometri yöntemi ile Annexin V boyaması yaparak göstermişlerdir. 24 saat boyunca MDA-MB-231 hücrelerine uygulanan Cisplatin'in hücrelerdeki apoptotik yüzdesi %4.26 olarak belirlenirken, Cisplatin yüklü demir oksit NP ile muamele edilen hücrelerde apooptotik yüzdesini %38.69 olarak kaydetmişlerdir [197]. Çalışmamızda kullanılan TUNEL metodu ile Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP

ile muamele edilen C6 Glioma hücrelerinde kontrol hücrelerine göre apototik hücre sayısında anlamlı artış gözlemlenmiş ve literatürle uyumlu bulunmuştur.

Montiel ve arkadaşları (2009), HUVEC (endotel hücreler) hücrelerinde Cisplatin'in hücre göçüne olan etkisini incelemişlerdir. Hücrelerde yara oluşturulmuş ve Cisplatin'in entodel hücrelerinin hareketini yavaşlattığı kaydedilmiştir [198].

Elde edilen sonuçlara göre Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP'nin C6 Glioma hücrelerini oksidatif stresi indükleyerek apoptoza yönlendirdiği ve elde edilen sonuçların literatür ile uyumlu olduğu belirlendi.

Ginkgo biloba özü (EGb 761) gibi doğal maddeler oksidatif strese ve yaşlanmaya karşı korumada etkili bir bileşiktir. EGb 761 geniş bir farmakolojik etki yelpazesinde kullanılmaktadır; EGb 761'in antiiskemik, antiödem, antihipoksik ve radikal süpürücü olabileceği gösterilmiştir. Beyinde faydalı klinik etkileşimleri olduğu kaydedilmiştir [199], [200]. EGb 761, *Ginkgo biloba* ağacının kurutulmuş yapraklarından elde edilir. Bu ekstrakt, %24 flavonoid glikozitler (ginkgoflavonlar, glikozitler), ginkgolid (A, B, C) ve bilobalid gibi %6 terpen laktonlar, bazı organik asitler ve diğer bileşenleri içeren karmaşık bir karışımdır [135].

Chao ve arkadaşları (2004), *Gingko biloba* özütü olan EGb 761 ile yaptıkları çalışmada HepG2 ve Hep3B hücre hattında 24. saatte IC_{50} değerini 750 mg/L ve 1000 mg/L olarak bildirmişlerdir [201]. Çalışmamızda *Gingko biloba* bileşenleri arasında yer alan Ginkgolid A'nın C6 Glioma hücrelerinde IC_{50} değeri 24. ve 48. saatte sırasıyla; 175 μM ve 136 μM olarak belirlendi. Ma ve arkadaşları (2014), Ginkgolid A'nın hCMEC/D3 hücre hattında 24. saatte IC_{50} değerini 200 μM olarak kaydetmişlerdir. Literatür sonuçları bulgularımızla uyumludur [202].

Liu ve arkadaşları (2019), Ginkgolid B yüklü nanokristal sentezleyerek Parkinson hastalığına karşı koruyucu etkisini araştırmışlardır. MPP+ ile muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinde canlılık %41 oranında azalırken, Ginkgolid B yüklü nanokristallerin MPP+' ın oluşturduğu nörotoksisiteye karşı koruma sağladığını ileri sürmüşlerdir. Ginkgolid B'nin nanokristal formunun, serbeste oranla plazma ve beyinde daha yüksek Ginkgolid B geçirgenliği sağladığını göstermişlerdir [14].

Zhao ve arkadaşları (2020), Ginkgolid B yüklü PEG-PCL NP ile muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinde serbest Ginkgolid B'ye göre NP'nin yüksek terapötik etkinlik ve düşük konsantrasyonlarda yüksek aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir [203].

Liu ve ark. 2019 yılında gerçekleştirdikleri çalışmada iskemi hasarında Ginkgolidlerin ve bilobalidin beyin hücrelerine karşı antioksidan etkilerini incelemişlerdir. SH-SY5Y hücreleri oksidatif strese maruz bırakılmış, ardından ginkgolidler ile muamele edilerek SOD seviyeleri incelenmiştir. Ginkgolid A, Ginkgolid B, Ginkgolid K ve Bilobalidler arasında en yüksek SOD seviyesi Ginkgolid B'de kaydedilmiştir. Çalışmalarında Ginkgolid B'nin, iskemik hasarda anti-oksidatif etki için ginkgo terpenoid laktonların en etkili aktif bileşeni olabileceğini savunmuşlardır [14]. Gill ve arkadaşları (2017), Gingkolid B'nin, SH-SY5Y hücrelerinde SOD ve GSH seviyelerini arttırmasıyla oksidatif DNA ve RNA baz hasarlarını azaltarak genom bütünlüğünü koruyup Aβ1-42 kaynaklı oksidatif stres hasarına karşı koyabileceği sonucuna varmışlardır [204]. Çalışmamızda Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP ile muamele edilen C6 Glioma hücrelerinde TAS ve SOD seviyelerinde anlamlı bir artış belirlenmiş Ginkgolid A'nın antioksidan etkisinin literatür ile uyumlu olduğu saptanmıştır.

Lou ve arkadaşları (2020), Cisplatin ve *Ginkgo biloba* yapraklarından elde edilen Ginkgetinin A549 akciğer kanseri hücrelerinde sinerjetik etkisini incelemişlerdir. 5 μM Cisplatinin apoptoz oranını %15 oranında arttırdığını, 5 μM Ginkgetinin ise %30 oranında apoptozu indüklediğini bulmuşlardır. Cisplatin ve ginkgetin kombinasyonu ile muamele edilen A549 hücrelerinde apoptoz oranının %50'nin üzerine çıktığı raporlanmıştır [205].

Feodorova ve arkadaşları (2020), HCT116 (kolon kanseri), A2058 (melanom) ve kanserli olmayan fibroblast McCoy-Plovdiv hücrelerinde *Ginkgo biloba* ekstraktının sitotoksisitesini incelemişlerdir. Ekstraktın HCT116 ve A2058 hücrelerinde proliferasyonu ve canlılığı önemli ölçüde azalttığını, McCoy-Plovdiv hücrelerinde ise böyle bir etkinin olmadığını bildirmişlerdir. *Ginkgo biloba*'nın uygulanan en yüksek konsantrasyonunda bile 72 saatlik uygulamadan sonra McCoy-Plovdiv hücreleri üzerinde bir sitotoksik etki oluşturmamıştır. Fakat sağlıklı hücre hattında *Ginkgo biloba* ekstraktının yüksek konsantrasyonları ile

muamele edilen hücrelerde, kontrol hücrelerine göre daha yüksek ölü hücre saptanmıştır [206].

Çalışmamızda TUNEL metodu ile saptanan Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP ile muamele edilen C6 Glioma hücrelerindeki apoptotik hücre sayısındaki artış literatür ile eşdeğerdir.

Tez çalışmamızda; kemoterapi ilacı olan Cisplatin ve antioksidan özelliği bulunan Ginkgolid A moleküllerinin, PLGA NP sistemlere aktarılmasıyla C6 Glioma hücreleri üzerindeki biyolojik aktivitelerinin araştırılması amaçlanmıştır. Cisplatin ve Ginkgolid A' nın serbest ve ayrı ayrı yüklenmiş PLGA NP formları ile muamele edilen C6 Glioma hücrelerindeki sitotoksisiteleri, oksidatif stres, antioksidan seviyeleri ve apoptotik etkileri literatür için özgün bir çalışma olarak kaydedilmiştir.

Buna göre;

- Cisplatin yüklü PLGA NP ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP'nin C6 Glioma hücrelerindeki IC_{50} değerleri, serbest Cisplatin ve serbest Ginkgolid A ile muamele edilen C6 Glioma hücrelerindeki IC_{50} değerlerine göre 24. ve 48. saatte daha düşük dozda olduğu belirlenmiştir. Cisplatin yüklü PLGA NP ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP'nin, serbest formlarına göre daha düşük dozda daha yüksek bir etkinlik gösterdiği çalışma sonucu olarak kaydedilmiştir.
- Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP ile muamele edilen C6 Glioma hücrelerinde TOS ve MDA seviyeleri 48. saatte artmıştır. Antioksidan analizlerinde ise istatistiksel farklılık belirlenmemiştir. Cisplatin, kemoterapi ilacı olduğundan etkili bir antioksidan özelliği bulunmamaktadır. Oksidatif stresi arttırarak hücreleri apoptoza indükleyebilir.
- Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP ile muamele edilen C6 Glioma hücrelerinin TAS seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış kaydedilmiştir. GSH seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık belirlenmezken, Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP ile muamele edilen C6 Glioma hücrelerinde kontrol hücrelerine göre SOD seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlenmiştir.

- Cisplatin, Cisplatin yüklü PLGA NP, Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP'nin uygulanan tüm konsantrasyonlarında C6 Glioma hücrelerinde apoptozu indüklediği belirlenmiştir.
- Cisplatin, Cisplatin yüklü PLGA NP, Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP yara oluşturulan C6 Glioma hücrelerinde hücre göçünü kontrol hücrelerine göre yavaşlattığı kaydedilmiştir.

Tüm bu sonuçlara göre; Cisplatin ve Cisplatin yüklü PLGA NP hücrelerde oksidatif stresi arttırarak apoptozu indükleyebilir. Ginkgolid A ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP C6 Glioma hücrelerinde antioksidan aktivitesi ile serbest radikallerin ortadan kaldırılmasında etkilidir.

Cisplatin yüklü PLGA NP ve Ginkgolid A yüklü PLGA NP Glioblastoma tedavisine yönelik olarak geliştirilen etkin tedavi yaklaşımlarında düşünülebilir.

Bu tez çalışmasından elde edilen bulgular sadece beyin tümörlerinde değil, diğer kanser türleri içinde yeni tedavi yöntemlerine katkıda bulunabilir. Ortaya çıkan bu araştırma sonuçları *in vivo* deneylerle desteklenmelidir.

KAYNAKÇA

[1] LR. Nussbaum, RR McInnes, FH Willard. Genetik ve Kanser. Thompson&Thompson Genetics in Medicine. Istanbul, Güney Kitabevi, 2005.

[2] D. Hanahan and R.A. Weinberg, R.A. “The hallmarks of cancer,” Cell 100, 57–70, 2000.

[3] R.L. Siegel, K.D. Miller,A. Jemal, “Cancer statistic,” CA Cancer J. Clin.70, 7-30,2020.

[4] A.F. Tamimi, M. Juweid, “Epidemiology and Outcome of Glioblastoma Incidence of Glioblastoma. In Glioblastoma; De Vleeschouwer,” S., Ed.; Codon Publications: Brisbane, Australia, p. 1, 2017.

[5] JL. Turi, I. Jaspers LA, MC. Madden, LE. Brighton, JD. Carter, E. Nozik-Grayck, CA. Piantadosi, AJ. Ghio, “Oxidative stress activates anion exchange protein 2 and AP-1 in airway epithelial cells,” Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 283(4): L791–L798, 2020.

[6] B. Halliwell, J. Gutteridge, “Free radicals in biology and medicine,” 4th edn. Oxford University, New York, 2007.

[7] C. Panis, AC. Herrera, VJ Victorino, FC. Campos, LF. Freitas, T. De Rossi, AN. Colado Simão, AL. Cecchini, R. Cecchini, “Oxidative stress and hematological profiles of advanced breast cancer patients subjected to paclitaxel or doxorubicin chemotherapy,” Breast Cancer Res Treat 133(1):89–97, 2012.

[8] T. Belwal, L. Giri, A. Bahukhandi, M. Tariq, P. Kewlani, I. D. Bhatt, et "Ginkgo biloba, in Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements,” Elsevier, 2019, pp. 241-250.

[9] B. Singh, RA Sharma, “Plant terpenes: defense responses, phylogenetic analysis, regulation and clinical applications,” Biotech. 2015 Apr;5(2):129-151.

[10] Y. Shi, "Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis," Molecular cell, 9: 459-470, 2002.

[11] W. Ren, Z. Qiao, H. Wang, L. Zhu, ve L. Zhang, "Flavonoids: promising anticancer agents," Medicinal research reviews, 23: 519-534, 2003.

[12] B. Stordal, M. Davey, “Understanding Cisplatin Resistance Using Cellular Models,” Iubmb Life,59: 696–699, 2007

[13] T. Uehara, J. Yamate, M. Torii, T. Maruyama, “Comparative Nephrotoxicity of Cisplatin and Nedaplatin: Mechanisms Characteristics,”Journal of Toxicologic Pathology,24:87–94, 2011.

[14] Q. Liu, Z. Jin, Xu. Zhiliang, H. Yang, L. Li, G. Li, F. Li, Gu. Shaoli, S. Zong, J. Zhou, L. Cao, WX. Zhenzhong Wang, “Antioxidant efects of ginkgolides and bilobalide against cerebral ischemia injury by activating the Akt/Nrf2 pathway in vitro and in vivo,” Natl Libr Med 24:441–452, 2019.

[15] M. Ferrari, M, "Cancer nanotechnology: opportunities and challenges," Nature reviews cancer, 5: 161, 2005

[16] L. Ribovski, N.M. Hamelmann, J.M.J. Paulusse, “Polymeric Nanoparticles Properties and Brain Delivery,” Pharmaceutics 13, 2045, 2021.

[17] D. Demir, Dosetaksel İçeren NP Formülasyonu ve in Vitro Değerlendirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2013

[18] D. Hanahan, R.A. Weinberg, “Hallmarks of Cancer: The Next Generation,”Cell 144, 646-674, 2011

[19] D. Hanahan, “Hallmarks of Cancer: New Dimensions,” Cancer Discov. Jan;12(1):31-46, 2022.

[20] M. Schulz, K. Hoffmann, C. Weikert, U. Nöthlings, M.B. Schulze, H. Boeing, “Identification of a dietary pattern characterized by high-fat food choices associated with increased risk of breast cancer: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study,” Br J Nutr. ,100(5): 942–946, 2018.

[21] E. Weiderpass, “Lifestyle and cancer risk,” J Prev Med Public Health. Nov; 43(6): 459–71, 2010.

[22] K. Watanabe, O. Tachibana, K. Sato, Y. Yonekawa, P. Kleihues, and H. Ohgaki, "Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are

mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas," Brain pathology, vol. 6, pp. 217- 223, 1996.

[23] P.H. Rang, M.M. Dale, M.J. Ritter, P. Moore, “Cancer Chemotherapy. Pharmacology,” London, Elsevier Churchill Livingstone, 2003.

[24] L.A. Algier, Z. Hanoğlu, G. Özden, F. Kara, “The use of complementary and alternative (non-conventional) medicine in cancer patients in Turkey,” Eur J Oncol Nurs., 9:138- 146,2005

[25] A. Molassiotis, P. Fernandez-Ortega, D. Pud, G. Ozden, “Use of complementary and alternative medicine in cancer patients: a European survey,” Ann Oncol., 16:655-663,2005.

[26] B. Niggeman, C. Gruber, “Side effects of complementary and alternative medicine,” Allergy, 58:707-716, 2003.

[27] S.Y. Tzeng, J.J. Green, “Therapeutic nanomedicine for brain cancer,” Ther Deliv, 4 (6), 687-704, 2013.

[28] A. Behin, K. Hoang-Xuan, A.F. Carpentier, J.Y Delattre, “Primary brain tumours in adults,” Lancet, 361 (9354), 323-331, 2003.

[29] E.M. Bohan, “Editor Cognitive changes associated with central nervous system malignancies and treatment,” Seminars in oncology nursing, 2013.

[30] J. Huse, E. Holland, “Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma,” *Nat Rev Cancer* 10, 319–331, 2010.

[31] P. O. de Souza, S. E. Bianchi, F. Figueiró, L. Heimfarth, K. S. Moresco, R. M. Gonçalves, et al., "Anticancer activity of flavonoids isolated from Achyrocline satureioides in gliomas cell lines," Toxicology in Vitro, vol. 51, pp. 23-33, 2018.

[32] J. Cahill, G. LoBiondo-Wood, N. Bergstrom, T. Armstrong, “Brain tumor symptoms as antecedents to uncertainty: an integrative review,” Journal of Nursing Scholarship, 44(2):145-55, 2012.

[33] S. Bastola, M.S. Pavlyukov, D. Yamashita, S. Ghosh, H. Cho, N. Kagaya, Z. Zhang, M. Minata, Y. Lee, H. Sadahiro, “Glioma-initiating cells at tumor edge gain signals from tumor core cells to promote their malignancy,” Nat. Commun. 11, 4660, 2020.

[34] H. Ohgaki, P. Kleihues, “Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma,” Am J Pathol, 170(5):1445-53,2007.

[35] J. Behnan, G. Finocchiaro, G. Hanna, “The landscape of the mesenchymal signature in brain tumours,” Brain, 142, 847–866, 2019.

[36] J.G. King, K. Khalili, “Inhibition of human brain tumor cell growth by the anti-inflammatory drug, flurbiprofen,” Oncogene, 20 (47), 6864-6870, 2001.

[37] W. Yu, L. Zhang, Q. Wei, A. Shao, “O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase (MGMT): Challenges and New Opportunities in Glioma Chemotherapy,” Front. Oncol., 9, 1547, 2020.

[38] K. Özduman, M. Hacıhanefioğlu, and M. N. Pamir, “Glioblastom,” Türk Nöroşirürji Derg., vol. 29, no. 3, pp. 305–334, 2019.

[39] P. J. Killela et al., “TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal,” Neuro. Oncol., vol. 16, no. suppl 3, pp. 6021–6026, 2013.

[40] Y. Wang, Y.A. Suh, M.Y. Fuller, J.G. Jackson, S. Xiong, T. Terzian, A. Quintás-Cardama, J.A. Bankson, A.K. ElNaggar, G. Lozano, “Restoring expression of wild type p53 suppresses tumor growth but does not cause tumor regression in mice with a p53 missense mutation,” J. Clin. Invest, 121,893–904, 2011.

[41] R. McLendon, “Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways,” Nature, vol. 455, no. 7216, pp. 1061–1068, 2008.

[42] M. Ashcroft, K.H. Vousden, “Regulation of p53 stability,” Oncogene, 18:7637-7643, 1999.

[43] D.L. Kasper, A.S. Fauci, S.L. Hauser, D.L. Longo, J.L. Jameson, J. Loscalzo. Harrison's Principles of Internal Medicine, 2015.

[44] V. S. Benson, K. Pirie, J. Green, D. Casabonne, and V. Beral, “Lifestyle factors and primary glioma and meningioma tumours in the million-women study cohort,” Br. J. Cancer, vol. 99, no. 1, pp. 185–190, 2008.

[45] A. Shergalis, A. Bankhead, U. Luesakul, N. Muangsin, and N. Neamati, “Current Challenges and Opportunities in Treating Glioblastoma,” Pharmacol. Rev., vol. 70, no. 3, pp. 412–445, 2018.

[46] K. Jain, “Potential of Nanobiotechnology in the Management of Glioblastoma Multiforme,” in Glioblastoma, S. K. Ray, Ed. New York, NY: Springer New York, 2010, pp. 399–419.

[47] K. Urbańska, J. Sokołowska, M. Szmidt, and P. Sysa, “Glioblastoma multiforme – an overview,” Contemp. Oncol., vol. 5, no. 5, pp. 307–312, 2014.

[48] B. Halliwell, “Free radicals, Antioxidants and Human Disease: Curiosity, Cause or Consequence?,” The Lanset., 344:721-724, 1994.

[49] V. Lobo, A. Patil, A. Phatak, N. Chandra, “Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health,” Pharmacogn Rev., 4(8): 118–126, 2010.

[50] Y. Dündar, R. Aslan, “Hekimlikte Oksidatif Stres Ve Antioksidanlar,” Afyon Kocatepe Üniversitesi Yayınları, 29, 2000.

[51] K. Bagchi, S. Puri, “Free radicals and antioxidants in health and disease,” East Mediterranean Health Jr., 4:350–60, 1998.

[52] M. Ebadi, “Antioxidants and free radicals in health and disease: An introduction to reactive oxygen species, oxidative injury, neuronal cell death and therapy in neurodegenerative diseases,” Arizona: Prominent Press, 2001.

[53] A.J Lea, “Dietary factors associated with death rates from certain neoplasms in man,” Lancet, 2:332–3, 1966.

[54] Z. Ďuračková, “Some current insights into oxidative stress,” *Physiological Research*, vol. 59, no. 4, pp. 459–469, 2010.

[55] S. Kumar and A. K. Pandey, “Free radicals: health implications and their mitigation by herbals,” *British Journal of Medicine and Medical Research*, vol. 7, no. 6, pp. 438–457, 2015.

[56] H. Bartsch, J. Nair, “Chronic inflammation and oxidative stress in the genesis and perpetuation of cancer: role of lipid peroxidation, DNA damage, and repair,” Langenbecks Arch Surg., 391:499–510, 2006.

[57] M.A. Trush, T.W. Kensler, “An overview of the relationship between oxidative stress and chemical carcinogenesis,” Free Radic Biol Med, 10:201–209, 1991.

[58] T.J. Slaga, A.J. Klein-Szanto, L.L. Triplett, L.P. Yotti, K.E. Trosko, “Skin tumor-promoting activity of benzoyl peroxide, a widely used free radical-generating compound,” Science, 213:1023– 1025, 1981.

[59] R. Guillen-Sans, M. Guzman-Chozas, 1The thiobarbituric acid (TBA) reaction in foods: a review,” Critical reviews in food science and nutrition, 38(4): 315-350, 1998.

[60] B. Halliwell, S. Chirico, "Lipid Peroxidation: its mechanism, measurement and significance," The American Journal of Clinical Nutrition, 57(1):715 - 25, 1993.

[61] E.N. Frankel, W.E. Neff, “Formation of malonaldehyde from lipid oxidation products,” Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism, 754(3): 264-270, 1983.

[62] H. Sies, “Antioxidant functions of vitamin E, and C, b-carotene, and other carotenoids,” Annals of the New York Academy of Science, 669, 1992.

[63] J. Harms, M. Ringdal, "Interaction of lipid peroxidation products with DNA,” Mutation Research, 195, 137±149, 1988.

[64] Secim D. Antioksidanlar ve Zeytinyağı. Zeytin Bilimi 1 (1) 2011; 43-47.

[65] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, T.D.M. Cronin, M. Manzur, J. Telser, “Free Radicals and Antioxidants In Normal Physiological Functions,” The international journal of biochemistry & cell biology, 39(1), 44–84, 2007.

[66] O. Özcan, H. Erdal, G. Çakırca, Z. Yönden, “Oksitadif Stres Ve Hücre İçi Lipit, Protein ve DNA Yapıları Üzerine Etkileri,” JCEI, 6 (3): 331-336, 2015.

[67] G. Taner, “Serbest Radikallere Karşı Antioksidan Savunma” Bilim Teknik, Ağustos 113:453, 2005.

[68] J.E. Browm, Nutrition Now, (2nd Edition), West/Wadswort, Belmont, 1999.

[69] K. Maiese, S. Daniela Morhan, Z. Zhong Chong, “Oxidative Stress Biology and Cell Injury During Type 1 And Type 2 Diabetes Mellitus,” Curr Neurovasc Res, 4: 63-71, 2007.

[70] C. Kasnak, R. Palamutoğlu, “Doğal Antioksidanların Sınıflandırıması Ve İnsan Sağlığına Etkileri,” Türk Tarım- Gıda Bilim Ve Teknoloji Dergisi, 3(5): 226-234, 2015.

[71] G. Demircan, Aspirinin Vasküler Endotel Hücre Kültüründe Oksidatif ve Nitrozatif Stres Üzerine Etkilerinin Araştırılması. Ondokuz Mayıs Üniversitesi- Biyoloji Aanabilim Dalı. Doktora Tezi. 2011.

[72] I.S. Young, J.V. Woodside, “Antioxidants In Health and Disease,” J clin Pathol., 54 (3): 176-186, 2011.

[73] İ. Akkuş, Serbest Radşkaller Ve Fizyopatolojik Etkileri, Mimoza Yayınları, 38, Kuzucular Ofset, 1995.

[74] Y.J. Moon, X. Wang, M.E. Morris, “Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism”, Toxicology İn Vitro 20(2): 187–210, 2006.

[75] W. Ren, Z. Qiao, H. Wang, L. Zhu, L. Zhang, “Flavonoids: promising anticancer agents,” Medicinal Research Reviews, 23 (4): 519-534, 2003.

[76] J. Limon-Pacheco, M.E. Gonsebatt, “The Role of Antioxidants and Antioxidanttrelated Enzymes In Proactive Responses To Enviromentally Induced Oxidative Stress,” Mutat Res., 674(1-2): 137-147, 2009.

[77] S. Yanbeyi, Aspirin ve Antioksidant Buthylated Hydroxyanisole’ün Tavşanlarda Eritrosit Total Katalaz, Süperoksit Dismutaz Ve Glutatyon Peroksidaz Aktiviteleri 166 Üzerine Etkileri. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi, 1999.

[78] N.H.P. Cnubben. I.M.C.M. Reietjens, H. Wortelboer, J. Van-Zanden, P.J. Van Bladeren, “The Interplay of Glutathione Related Processes In Antioxidant Defense,” Environ Toxicol Pharmacol, 10(4): 141 – 152, 2001.

[79] Frei B., Stocker R., England L., Ames BN. 1990 Ascorbate: The Most Effective Antioxidant in Human Blood Plasma. Advenced Experimentel Medicine and Biology. 264: 155-163.

[80] GC Mills, “Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocytenzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown,” J Biol Chem, Nov;229(1):189-97, 1957.

[81] İ. Yılmaz, “Karotenoidler,” İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 17 (3) 223-231, 2010.

[82] L. Ernster L, G. Dallner, “Biochemical, Physiological and Medical Aspects of Ubiquinone Function,” Biochemical Et Biophysica Acta (Bba), 1271(1):195-204, 1999.

[83] N. Pellegrini, C. Miglio, D. Del Rio, “Effect Of Domestic Cooking Methods on The Total Antioxidant Capacity Of Vegetables,” Int J Food Sci Nutr, 60 :12-22, 2009.

[84] I.W. Morton I.W, R.A.A.İ Caccetta, I.B. Puddet, K.D. Croft, K.D, “Chemistry And Biological Effects of Dietary Phenolic Caompounds: Relevance to Disease,” Clinical And Experimental Pharmacology and Physiology, 27,152-159, 2000.

[85] A.V. Rao, L.G. Rao, “Carotenoids and Human Health,” Pharmacol Res, 55: 207-216, 2007.

[86] H. Gerster, “Anticarcinogenic Effect of Common Carotenoids,” Internat. J. Nutr. Res., (63), 93-121, 1993.

[87] B. Dimitrios, “Sources of Natural Phenolic Antioxidants,” Trends In Food Science & Technology, 17: 505-512, 2006.

[88] C. Barak, S.B. Yaşar, “Polifenollerin Antioksidan Özelliği ve Zeytinyağında Toplam Polifenol Tayini,” I.Ulusal Zeytin Öğrenci Kongresi, 2018, 214-218.

[89] M.S. Fernandez-Panchon, D. Villano, A.M. Troncoso, M.C. Garcia-Parrilla, “Antioxidant Activity of Phenolic Compounds: From In Vitro Results To In ViVO Evidence,” Critical Reviewa in Food Science and Nutrition, 48: 649-671, 2008.

[90] A. Scalbert, I.T. Johnston, M. Saltmarsh, “Polyphenols: Antioxidants and Beyond,” Ameican Journal of Clinical Nutrition, 81: 215-217, 2005.

[91] D. Krishnaiah, R. Sarbatly, R. Nithyanandam, “A review of the antioxidant potential of medicinal plant species,” Food Bioprod Process., 89: 217–33, 2011.

[92] J. Grassmann, E.F. Elstner, “Essential oils/properties and uses. Encyclopaedia of Food Science,” Food Technology and Nutrition, 2177-2184, 2003.

[93] F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck, M. Idaomar, “Biological effects of essential oils- A review,” Food and Chemical Toxicology, 46(2): 446- 475, 2008.

[94] T. Beric, P. Nikolic, J. Stanojevic, V. Vukovic-Gacic, J. Knezevic-Vukcevic, “Protective effect of Basil (*Ocimum basilicum* L.) against oxidative DNA damage and mutagenesis,” Food and Chemical Toxicology, 46(2): 724-732, 2008.

[95] E. Breitmeier, Terpenes: Flavours, Fragrances, pharmaca, pheromones. Wiley-VCH, 1-3, 2006.

[96] F.A. Oliveira, L.N. Andrade, E.B. de Sousa, D.P de Sousa, “AnalgesicLike Activity of Essential Oil Components: Updated,” Moleküller, 19, 5717-5747, 2014.

[97] B.Z. Altunkaynak, E. Özbek, “Programmed Cell Death: What is the Apoptosis ?,” Tıp Araştırmaları Dergisi, 6(2): 93 -104, 2008.

[98] V. Kumar, A.K Abbas, N. Fausto, “Cellular adaptations, cell injury, and cell death,” 7th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005. p.3-46.

[99] A. Burlacu, “Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins,” Journal of Cellular and Molecular Medicine, 7(3): 249-257, 2003.

[100] J.M. Adams, S. Cory, "The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy," Oncogene, 1324, 2007.

[101] V. Jesenberger, S. Jentsch, “Deadly encounter: ubiquitin meets apoptosis,” Nature Reviews Molecular Cell Biology, 112-121,2002.

[102] R.J. Youle, "Cellular demolition and the rules of engagement," Science, 315: 776-777, 2007.

[103] E. Vazquez, N. Ferrer-Miralles, R. Mangues, J.L. Corchero, J. Schwartz, A. Villaverde, "Modular protein engineering in emerging cancer therapies", Current pharmaceutical design, 15: 893-916, 2009.

[104] G. Coşkun, H. Özgür, “Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması,” Arşiv Kaynak Tarama Dergisi, 20: 145-158, 2011.

[105] M.H. Kang, C.P. Reynolds, "Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy," Clinical cancer research, 15: 1126-1132, 2009.

[106] A. Saraste, K. Pulkki, "Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis," Cardiovasc Res, 45(3): 528-537, 2000.

[107] U. Ziegler, P. Groscurth, "Morphological features of cell death," News Physiol Sci, 19:124-128, 2004.

[108] P.R. Galle, "Apoptosis in liver disease", Journal of Hepatology, 27(2): 405-412, 1997.

[109] V. Kumar, A. Abbas, N. Fausto, J. Aster, "Robins and Cotran 71 Pathologic Basis of Disease" 8th Edition, Saunders Elsevier, Philadelphia, 2010.

[110] N. Gültekin, K. Karaoğlu, E. Küçükateş, "Hücrede Apoptoz ve Sağkalım Mekanizmalarının Keşfedilmesi ve Yeni Potansiyel Tedavi Stratejeleri," *Türk Kardiyoloji Derneği 36*(2): 120-130, 2008.

[111] G.B. Kauffman, R. Pentimalli, S. Doldi, M.D. Hall, "Michele Peyrone (1813-1883), Discoverer of Cisplatin" Platinum Metals Review, 54(4), 250–256, 2010.

[112] A. Werner, Z. Anorg, "Beitrag zur Konstitution anorganischer Verbindungen," Chem. 3, 267, 1893.

[113] B. Rosenberg B, L. Van Camp, T. Krigas, "Inhibition of cell division in Escherichia coli by electrolysis products from a platinum electrode," Nature, 205(4972): 698-699, 1965.

[114] M.G. Awad, R.A. Ali, D.D. Abd El-Monem, "Graviola leaves extract enhances the anticancer effect of cisplatin on various cancer cell lines," *Mol. Cell. Toxicol,* 16, 385–399, 2020.

[115] S. Dilruba, G.V. Kalayda, "Platinum-based drugs: past, present and future," Cancer Chemother Pharmacol, 77: 1103–1124, 2016.

[116] D. Wang, S.J. Lippard, "Cellular processing of platinum anticancer drugs," Nature Reviews Drug Discovery,4(4): 307-320, 2005.

[117] S. Dasari, P.B. Tchounwou, "Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action," European J Pharmacol, 740: 364–378, 2014.

[118] A.W. Prestayko, S.T. Crooke, S.K. Carter, "Cisplatin, current status and new developments," University of Alabama in Birmingham Comprehensive Cancer Center. Bristol Laboratories. Academic Press, 1980.

[119] X. Lin, T. Okuda, A. Holzer, S.B. Howell SB, “The copper transporter CTR1 regulates cisplatin uptake in Saccharomyces cerevisiae,” Molecular Pharmacology, 62(5): 1154-1159, 2002.

[120] A.K. Holzer, G.H. Manorek, S.B. Howell, “Contribution of the major copper influx transporter CTR1 to the cellular accumulation of cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin,” Molecular Pharmacology, 70(4): 1390-1394, 2006.

[121] A. Kart, Y. Cigremis, M. Karaman, H. Ozen, “Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) ameliorates cisplatin-induced hepatotoxicity in rabbit,” Experimental and Toxicologic Pathology, 62(1): 45-52, 2010.

[122] K. Cayir, A. Karadeniz, A. Yildirim, Y. Kalkan, A. Karakoc, M. Keles, S. Tekin, “Protective effect of L-carnitine against cisplatin-induced liver and kidney oxidant injury in rats,” Open Medicine, 4(2): 184-191, 2009.

[123] I. Hassan, S. Chibber, I. Naseem, “Vitamin B2: a promising adjuvant in cisplatin based chemoradiotherapy by cellular redox management,” Food and Chemical Toxicology, 59: 715-723, 2013.

[124] A.M Florea, D. Büsselberg, “Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects,” Cancers, 3(1): 1351-1371, 2011.

[125] S. Manohar, N. Leung. “Cisplatin nephrotoxicity: a review of the literature,” Journal of Nephrology,31(1): 15-25, 2017.

[126] J.C.F. Quintanilha, M.V. Sousa, M.B. Visacri, L.S. Amaral, R.M.M. Santos, T. Zambrano, “Involvement of cytochrome P450 in cisplatin treatment: implications for toxicity,” Cancer Chemother Pharmacol, 80:223–233, 2017.

[127] S.Y. Saad, T.A. Najjar, M. Alashari, “Role of non-selective adenosine receptor blockade and phosphodiesterase inhibition in cisplatin-induced nephrogonadal toxicity in rats,” Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology 31(12): 862-867, 2004.

[128] J.A. Yáñez, X.W. Teng, K.A. Roupe, M.W. Fariss, N.M. DavieS, “Chemotherapy induced gastrointestinal toxicity in rats: involvement of

mitochondrial DNA, gastrointestinal permeability and cyclooxygenase 2," Journal of Pharmaceutical Sciences, 6(3): 308-314, 2003.

[129] R. Khan, Q.A. Khan, W. Qamar, A. Lateef, M. Tahir, M.U. Rehman, K. Ali, S. Sultana, "Chrysin protects against cisplatin-induced colon. toxicity via amelioration of oxidative stress and apoptosis: probable role of p38MAPK and p53," Toxicology and Applied Pharmacology, 258(3): 315-329, 2012.

[130] A. Canta, E. Pozzi, V. Carozzi, "Mitochondrial dysfunction in chemotherapyinduced peripheral neuropathy (CIPN)," Toxics,3(2): 198-223, 2015.

[131] A. Scuteri, A. Galimberti, D. Maggioni, M. Ravasi, S. Pasini, G. Nicolini, M. Bossi, M. Miloso, G. Cavaletti, G. Tredici, "Role of MAPKs in platinum-induced neuronalnapoptosis.," Neurotoxicology, 30(2): 312-319, 2009.

[132] N. Pabla, Z. Dong, "Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies.," Kidney International, 73(9): 994-1007, 2008.

[133] C.P. Bearcroft, P. Domizio, F.H. Mourad, E.A. Andre, M.J.G. Farthing, "Cisplatin impairs fluid and electrolyte absorption in rat small intestine: a role for 5- hydroxytryptamine," Gut, 44(2): 174-179,1999.

[134] S. Logani, M.C. Chen, T. Tran, T. Le, R.B. Raffa, "Actions of Ginkgo Biloba related to potential utility for the treatment of conditions involving cerebral hypoxia," Minireview Life Sciences,67: 1389- 1396, 2000.

[135] M. Coşkun, "14. bitkisel ilaç hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler," 29-31 Mayıs 2002.

[136] T. Yoshikawa, Y. Naito, M. Kondo, "Ginkgo biloba leaf extract: review of biological actions and clinical applications, Antioxidants & redox signaling," Vol. 1, No. 4, 1999.

[137] L.L.B. Ponto, S.K. Schultz, "Ginkgo biloba extract: review of CNS effects," Annals of Clinical Psychiatry: Official Journal of The American Academy Of Clinical Psychiatrists, Vol. 15, No. 2, 2003.

[138] P. Pietta, P. Simonetti, C. Gardana, P. Mauri P, "Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) of Ginkgo biloba flavonol and Camellia sinensis catechin metabolites," Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 23: 223-226, 2000.

[139] Ö. Aybastier, “Farklı Formlardaki Ginkgo biloba’nın Antioksidan Özelliklerinin Belirlenmesi,” Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi Sayı 18, S. 206-212, Mart-Nisan 2020.

[140] T.A. Van Beek, “Ginkgolides and bilobalide: their physical, chromatographic and spectroscopic properties,” Bioorg Med Chem., 1;13(17):5001-12, 2005.

[141] C. Baltasi, “The Benefits of Ginkgo Biloba,” Journal of the Amerıcan Dıetetıc Assocıatıon, 107: 432-433, 2007.

[142] F. Pohl, P.K.T Lin, “The Potential Use of Plant Natural Products and Plant Extracts with Antioxidant Properties for the Prevention/Treatment of Neurodegenerative Diseases: In Vitro, In Vivo and Clinical Trials,” Molecules, 23: 3283, 2018.

[143] A. Walkowiak, L. Ledziński, M. Zapadka, B. Kupcewicz, “ Detection of adulterants in dietary supplements with Ginkgo biloba extract by attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate methods PLS-DA and PCA,” Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 208: 222–228, 2019.

[144] M. Vasseur, T. Jean, F.V. DeFeudis, K. Drieu, “ Effects of repeated treatments with an extract of Ginkgo biloba (EGb 761), bilobalide and ginkgolide B on the electrical activity of pancreatic beta cells of normal or alloxan-diabetic mice: an ex vivo study with intracellular microelectrodes,” Gen Pharmacol 25(1): 31-46, 1994.

[145] D.J. Brown, “Phytotherapy-Herbal medicine meets clinical science,” NARD Journal 118: 41-52, 1996.

[146] F.V. DeFeudis, “Ginkgo Biloba Extract (EGb 761) and CNS Functions: Basic Studies and Clinical Applications,” Current Drug Targets, 1: 25-58, 2000.

[147] S.F. Omidkhoda, B.M Razavi, H. Hosseinzadeh, “Protective effects of *Ginkgo biloba* L. against natural toxins, chemical toxicities, and radiation: A comprehensive review,” Phytotherapy Research, 33: 2821–2840, 2019.

[148] Funikawa, “5. ScL Papers Ins. Phys,” Chem. Res. (Jcpan), 19, 2, 1932.

[149] F. DeFeudis, “Ginkgo biloba extract (EGb 761) From chemistry to the clinic,” Wiesbaden: Ullstein Medical, 1998.

[150] C. Sarkar, C. Quispe, S. Jamaddar S, “Therapeutic promises of ginkgolide A: a literature-based review,” Biomed Pharmacother, 132:110908, 2020.

[151] V.S. Kotakadi, Y. Jin, A.B. Hofseth, L. Ying, X. Cui, S. Volate, “Ginkgo biloba extract EGb 761 has anti-inflammatory properties and ameliorates colitis in mice by driving effector T cell apoptosis,” Carcinogenesis, 29 (9), 1799-1806, 2008.

[152] A.J. Thompson, S.C.R. Lummis, “Calcium modulation of 5-HT3 receptor binding and function,” Neuropharmacology 56:285–291, 2009.

[153] M. Sbit, L. Dupont, O. Dideberg, P. Braquet, “Structure of ginkgolide A monohydrate and ginkgolide C Ethanol.1·5 hydrate, isolated from Ginko biloba L,” C Crystal Struct. Commun. 43, 2377–2381, 1987

[154] D.S. Wishart, Y.D. Feunang, A.C. Guo, E.J. Lo, A. Marcu, J.R. Grant, T. Sajed, D. Johnson, C. Li, Z. Sayeeda, N. Assempour, I. Iynkkaran, Y. Liu, A. Maciejewski, N. Gale, A. Wilson, L. Chin, R. Cummings, D. Le, A. Pon, C. Knox, M. Wilson, “DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018,” Nucleic Acids Res. 46, D1074–D1082, 2018.

[155] H.W. Zhao, X.Y. Li, “Ginkgolide A, B, and huperzine A inhibit nitric oxide production from rat C6 and human BT325 glioma cells,” Bao, 20, 941–943, 2000.

[156] V.L. Dawson, T.M. Dawson, “Nitric oxide in neuronal degeneration,” Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 211, 33–40, 1996.

[157] W. Zhou, H. Chai, A. Courson, P.H. Lin, A.B. Lumsden, Q. Yao, C. Chen, “Ginkgolide A attenuates homocysteine-induced endothelial dysfunction in porcine coronary arteries,” J. Vasc. Surg. 44,853–862, 2006.

[158] Y. Chen, C. Wang, M. Hu, J. Pan, J. Chen, P. Duan, T. Zhai, J. Ding, C. Xu, “Effects of ginkgolide A on okadaic acid-induced tau hyperphosphorylation and the PI3K-Akt signaling pathway in N2a cells,” Planta Med. 78, 1337–1341, 2012.

[159] R.H. Prabhu, V.B. Patravale, M.D. Joshi, "Polymeric nanoparticles for targeted treatment in oncology: current insights", International journal of nanomedicine, 10: 1001, 2015.

[160] S. Raj, “Nanotechnology in cosmetics: Opportunities and challenges,” Journal of pharmacy & bioallied sciences,4(3): p. 186, 2012.

[161] J.H. Park, “Polymeric nanomedicine for cancer therapy,” Progress in Polymer Science,33(1): p. 113-137, 2008.

[162] J.B. Christoforidis, S. Chang, A. Jiang, J. Wang, C.M. Cebulla, “Intravitreal devices for the treatment of vitreous inflammation,” Mediat. Inflamm, 2012.

[163] M. Elsabahy, K.L. Wooley, “Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications,” Chem Soc Rev., 7;41(7):2545-61, 2012.

[164] C. Amgoth, C. Phan, M. Banavoth, S. Rompivalasa, G. Tang, “Polymer Properties: Functionalization and Surface Modified Nanoparticles,” In Role of Novel Drug Delivery Vehicles in Nanobiomedicine; IntechOpen: London, UK, 2019.

[165] D. Quintanar-Guerrero, E. Allémann, H. Fessi, E. Doelker, "Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable 106 nanoparticles from preformed polymers", Drug development and industrial pharmacy, 24: 1113-1128, 1998.

[166] D.J. Hines, D.L. Kaplan, "Poly (lactic-co-glycolic) acid− controlled-release systems: experimental and modeling insights", Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems, 30, 2013.

[167] J.W. Hickey, J.L. Santos, J-M. Williford, H-Q. Mao, “Control of polymeric nanoparticle size to improve therapeutic delivery,” J. Control. Release, 219, 536–547, 2015.

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

[169] H. Vardhan, P. Mittal, S.K.R. Adena, B. Mishra, “Long-circulating polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate nanoparticles for tumor targeted docetaxel delivery: formulation, optimization and in vitro characterization,” European Journal of Pharmaceutical Sciences, 99, 85-94, 2017.

[170] A. Champa Jayasuriya, J. Darr, “Controlled release of cisplatin and cancer cell apoptosis with cisplatin encapsulated poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles,” Journal of Biomedical Science and Engineering Vol.6 No.5, 2013.

[171] H. Zhang, S. Gao, “Temozolomide/PLGA microparticles and antitumor activity against Glioma C6 cancer cells in vitro,” International Journal of Pharmaceutics 329, 122–128, 2007.

[172] S.H. Hsu, C.J Chang, C.M. Tang, “ In Vitro And In Vivo Effects of Ginkgo Biloba Extract Egb 761 On Seeded Schwann Cells Within Poly (Dl-Lactic Acid-Co-Glycolic Acid) Conduits for Peripheral Nerve Regeneration,” Journal Of Biomaterials Applications Volume 19, 2004.

[173] Y. Sun, L.W. Oberley, Y. Li, "A simple method for clinical assay of superoxide dismutase,"Clin Chem, 34(3): 497-50, 1988.

[174] P.W. Riddles, R.L. Blakeley, B. Zerner, "Ellman's reagent: 5,5'- dithiobis (2-nitrobenzoic acid) a reexamination," Anal. Biochem., 94(1): 75- 81, 1979.

[175] M. Vairetti, A. Ferrigno, R. Bertone, P. Richelmi, F. Berte, L. Freitas, "Apoptosis vs. necrosis: glutathione-mediated cell death during rewarming of rat hepatocytes," Biochimica et Biophysica Acta, 1740(3): 367- 374, 2005.

[176] B. Ansari, P.J. Coates, B.D. Greenstein, P.A. Hall, "In situ endlabeling detects DNA strand breaks in apoptosis and other physiological and pathological states", J. Pathol, 170:1–8, 1993.

[177] M.M. Kockx, J. Muhring, M.W. Knaapen, G.R. Meyer,"RNA synthesis and splicing interferes with DNA in situ end labeling techniques used to detect apoptosis", Am J Pathol, 152(4): 885-8, 1998.

[178] T.J. Ho, S.J Jiang, C.C Wu, J.G. Lin, “ The *In Vitro* and *In Vivo* Wound Healing Properties of the Chinese Herbal Medicine Jinchuang Ointment,” Evid Based Complement Alternat Med. 2016.

[179] M. Parhizkar, P.J.T. Reardon, J.C. Knowles, R.J. Browning, E. Stride, R.B. Pedley, A.H Harker, M. Edirisinghe, “Electrohydrodynamic Encapsulation of Cisplatin in Poly (lactic-co-glycolic acid) Nanoparticles for Controlled

Drug Delivery, Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine," 2016.

[180] T. Caldas Dos Santos, N. Rescignano, L. Boff, F.H. Reginatto, C.M.O Simões, A.M. de Campos, C. Mijangos, "In vitro antiherpes effect of C-glycosyl flavonoid enriched fraction of Cecropia glaziovii encapsulated in PLGA nanoparticles," Mater Sci Eng C Mater Biol Appl., 1; 75:1214-1220, 2017.

[181] T.S.J. Kashi, S. Eskandarion, M. Esfandyari-Manesh, S.M.A. Marashi, N. Samadi, S.M. Fatemi, F. Atyabi, S. Eshraghi, R. Dinarvand, "Improved drug loading and antibacterial activity of minocycline-loaded PLGA nanoparticles prepared by solid/oil/water ion pairing method," International journal of nanomedicine, 7, 221, 2012.

[182] S. Umar, M. Zahra, M. Akhter, A. Waseem, "Novel Surfactant Stabilized Plga Cisplatin Nanoparticles for Drug Delivery Applications," Turkish Journal Of Chemistry: Vol. 45: No. 6, Article 10, 2021.

[183] L. Han, Y. Fu, A.J. Cole, J. Liu, J. Wang. "Co-encapsulation and sustained release of four components in ginkgo terpenes from injectable PELGE nanoparticles," Fitoterapia 83,721–731, 2012.

[184] L. Cheng, C. Jin, W. Lv, Q Ding, X Han, "Developing a Highly Stable PLGA-mPEG Nanoparticle Loaded with Cisplatin for Chemotherapy of Ovarian Cancer," PLoS ONE 6(9), 2011.

[185] G. Mattheolabakis, E. Taoufik, S. Haralambous, M.L. Roberts, K. Avgoustakis, "In vivo investigation of tolerance and antitumor activity of cisplatin-loaded PLGA-mPEG nanoparticles," Eur J Pharm Biopharm, 71(2):190-5, 2009.

[186] D. Cun, D.K. Jensen, M.J. Maltesen, M. Bunker, P. Whiteside, D. Scurr, C. Foged, H.M. Nielsen, "High loading efficiency and sustained release of siRNA encapsulated in PLGA nanoparticles: quality by design optimization and characterization," European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 77, 26-35, 2011.

[187] A. Budhian, S.J. Siegel, K.I. Winey, "Production of haloperidol loaded PLGA nanoparticles for extended controlled drug release of haloperidol," Journal of microencapsulation, 22, 773-785, 2005.

[188] Y. Tong, Y. Chen, J. Pan, L. Huang, R. Wang, “Effect Of Dextran Gel on Preparation of Nano-Liposomes Loaded with Ginkgolide,” Bulletin of the Korean Chemical Society, 31(9), 2542–2546, 2010.

[189] S.C. Pillai, A. Borah, M.N.T. Le, H. Kawano, K. Hasegawa, D.S. Kumar, “Co-Delivery of Curcumin and Bioperine via PLGA Nanoparticles to Prevent Atherosclerotic Foam Cell Formation,” Pharmaceutics, 13, 1420, 2021.

[190] D.R. Rossina, R. Dante, K. Ruiz-Saray , E. Paola, M. Oceguera-Basurto, J. Juárez, A. Zepeda-Moreno, A. Del Toro-Arreola, A. Daneri-Navarro, “Cisplatin-loaded PLGA nanoparticles for HER2 targeted ovarian cancer therapy,” Colloids Surf B Biointerfaces, 1;178:199-207, 2019.

[191] JJ. Zimmerman, “Oxyradical pathophysiology,” Adv. Pediat., 42: 243-302, 1995.

[192] Ames, B.N., Shigenaga, M.K. and Hagen, T.M.: Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. Proc. Natl. Acad. Sci., 90: 7915- 7922, 1993.

[193] H. Hillaireau, P. Couvreur, “Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery,” Cell. Mol. Life Sci. 66, 2873–2896, 2009.

[194] S.A. Mirmalek, E. Jangholi, M. Jafari, S. Yadollah-Damavandi, Javidi MA, Y. Parsa, T. Parsa, S.A. Salimi-Tabatabaee, H. Ghasemzadeh Kolagar, S. Khazaei Jalil, R. Alizadeh-Navaei, “Comparison of in Vitro Cytotoxicity and Apoptogenic Activity of Magnesium Chloride and Cisplatin as Conventional Chemotherapeutic Agents in the MCF-7 Cell Line,” Asian Pac J Cancer Prev., 17(S3):131-4, 2016.

[195] S. Alkahtani, S. Alarifi, G. Albasher, M. Al-Zharani, H. Nada, H. Aljarba, M. Alhoshani, S. Norah, "Poly Lactic-Co-Glycolic Acid- Loaded Nanoformulation of Cisplatin as a Therapeutic Approach for Breast Cancers,” Oxidative Medicine and Cellular Longevity, vol. 2021.

[196] P.K. Verma, R. Raina, M. Sultana M, Singh, P. Kumar, “Total antioxidant and oxidant status of plasma and renal tissue of cisplatin-induced nephrotoxic rats: protection by floral extracts of Calendula officinalis Linn,” Ren Fail., 38(1):142-50., 2016.

[197] A. Morovati, S. Ahmadian, H. Jafary, “Cytotoxic effects and apoptosis induction of cisplatin-loaded iron oxide nanoparticles modified with chitosan in human breast cancer cells,” Mol Biol Rep., 46(5):5033-5039, 2019.

[198] M. Montiel, L. Urso, E.P. de la Blanca, S. Marsigliante, E. Jiménez, “Cisplatin reduces endothelial cell migration via regulation of type 2-matrix metalloproteinase activity,” Cell Physiol Biochem, 23(4-6):441-8, 2009.

[199] D.A. Barber, S.R. Harris, “Oxygen free radicals and antioxidants: a review,” Amer. Pharm., NS34: 26-35, 1994.

[200] F.V. DeFeudis, “Ginkgo biioba extract (EGb 761): Pharmacological activities and clinical applications,” Paris, Elsevier, 1991.

[201] J.C. Chao, C.C. Chu, “Effects of Ginkgo biloba extract on cell proliferation and cytotoxicity in human hepatocellular carcinoma cells,” World J Gastroenterol, 10(1):37-41, 2004.

[202] S. Ma, X. Liu, Q. Xu, X. Zhang, “Transport of ginkgolides with different lipophilicities based on an hCMEC/D3 cell monolayer as a blood-brain barrier cell model,” Life Sci., 2;114(2):93-101, 2014.

[203] Y. Zhao, S. Xiong, P. Liu, W. Liu, Q. Wang, Y. Liu, H. Tan, X. Chen, X. Shi, Q. Wang, T. Chen, “Polymeric Nanoparticles-Based Brain Delivery with Improved Therapeutic Efficacy of Ginkgolide B in Parkinson’s Disease,” *Int J Nanomedicine*, 15:10453-10467, 2020.

[204] I. Gill, S. Kaur, N. Kaur, M. Dhiman, A.K. Mantha, “Phytochemical Ginkgolide B Attenuates Amyloid-β1-42 Induced Oxidative Damage and Altered Cellular Responses in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells,” J Alzheimers Dis., 60(s1):S25-S40, 2017

[205] J.S. Lou, L.P. Zhao, Z.H. Huang, X.Y. Chen, J.T. Xu, W.C. Tai, K.W.K. Tsim, Y.T. Chen, T. Xie, “Ginkgetin derived from Ginkgo biloba leaves enhances the therapeutic effect of cisplatin via ferroptosis-mediated disruption of the Nrf2/HO-1 axis in EGFR wild-type non-small-cell lung cancer,” Phytomedicine, Jan;80:153370, 2021.

[206] Y. Feodorova, T. Tomova, D. Minchev, V. Turiyski, M. Draganov, M. Argirova, “Cytotoxic effect of *Ginkgo biloba* kernel extract on HCT116 and A2058 cancer cell lines,” Heliyon, 19, 2020.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. **Guzelsoy U., Ersoz M., Mansuroglu B.** "Investigation of The Effect of Cisplatin and Cisplatin-Loaded PLGA on C6 Glioma Cells" Anadolu 9th International Conference on Applied Sciences. DİYARBAKIR, TÜRKİYE, 11-12 Haziran 2022. Sayfa 51.