T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KAFEİK ASİT FENETİL ESTER YÜKLÜ POLİMERİK NANOPARTİKÜLLERİN İNSAN GLİOBLASTOMA HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ANTİ-PROLİFERATİF VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Aysu SALBAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Dr. Öğretim Üyesi Ayşegül ERDEMİR ÜSTÜNDAĞ

Şubat, 2022

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KAFEİK ASİT FENETİL ESTER YÜKLÜ POLİMERİK NANOPARTİKÜLLERİN İNSAN GLİOBLASTOMA HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ANTİ-PROLİFERATİF VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Aysu SALBAŞ tarafından hazırlanan tez çalışması 23.02.2022 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.

Dr. Öğr. Üyesi Ayşegül ERDEMİR ÜSTÜNDAĞ
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Dr. Öğr. Üyesi Ayşegül ERDEMİR ÜSTÜNDAĞ, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi ……...

Doç. Dr. Banu MANSUROĞLU, Üye ……...
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Esin AKTAŞ ÇETİN, Üye ……...
İstanbul Üniversitesi

Danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Ayşegül ERDEMİR ÜSTÜNDAĞ sorumluluğunda tarafımca hazırlanan "Kafeik Asit Fenetil Ester Yüklü Polimerik Nanopartiküllerin İnsan Glioblastoma Hücreleri Üzerindeki Anti-Proliferatif ve Apoptotik Etkilerinin İncelenmesi" başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Aysu SALBAŞ

İmza

Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü'nün FYL-2020-4104 numaralı projesi ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) 2210-C Öncelikli Alanlar Yüksek Lisans Burs Programı ile desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Kapısını çaldığım ilk gün beni geri çevirmeyip ilgi ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, sadece akademik olarak değil yaşama dair her konuda değerli bilgi ve tecrübelerini paylaşan saygıdeğer danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Ayşegül ERDEMİR ÜSTÜNDAĞ'a,

Zaman, mekan dinlemeden yardımıma koşan, öğrendiklerimin karşılığını asla ödeyemeyeceğim, yüksek lisansımın kazandırdığı en güzel arkadaşlık için Arş. Gör. Fatma Şayan POYRAZ'a, bilgi ve tecrübelerini sabırla aktaran, her konuda samimiyetle yardımcı olan laboratuvar arkadaşlarım Gülşah AKBAŞ ve İrem METEOĞLU'na,

Lisansımı tamamladıktan sonra bile kol kanat geren Ege Üniversitesi Biyomühendislik bölümü hocalarıma; fikirleri ve duruşuyla hayatımda önemli yere sahip sayın Prof. Dr. Kemal Sami KORKMAZ'a, her zaman yol gösteren ve yardımcı olan, kullandığım hücre hatlarını temin ettiğim sayın Doç. Dr. Ayşe NALBANTSOY'a ve Doç. Dr. Aylin Şendemir ÜRKMEZ'e,

Bana olan inançlarını bir gün olsun yitirmeyip bütün yolları benimle beraber yürüyen aileme; bağlılık, dirayet ve tertiplilik kavramlarını hayatıma kazandıran anneme, hayat görüşümün yapıtaşı olan, yaratıcılığımı borçlu olduğum babama, şüphe duyduğum ve içinden çıkılamaz her durumda kendini yanımda hissettiren ablama, bize yazılan senaryoda önümüze sürüklenen tüm sıkıntılara rağmen tüm yüklerimi benimle beraber omuzlayan, hayatı daha keyifli ve çekilebilir bir yer kılan yol arkadaşım Ömer Faruk BAYSAN'a, hayatımın her evresinde yanımda olarak varlığı konusunda müteşekkir olduğum en eski dostum Ecem Elgiz YILDIZHAN'a, kendimi bildim bileli hayatımda olmasından büyük keyif aldığım, tez sürecinde bütün kahrımı çekip bana kol kanat geren Duygu Sunay SALBAŞ'a, hayatta karşıma çıkan yeni basamaklara adım atmam için beni hep cesaretlendiren Seçil CAN'a, sadece arkadaşlığıyla değil tezim için yaptığı yardımlarla da hayatımda büyük yeri olan Büşra YÖNDEMOĞLU'na, ufkumu genişleten ve tüm yazılımsal konularda yardımları dokunan Fatih AKIN'a ve hayattımıza kattığı neşe için Toprak AKIN'a,

TÜBİTAK 2210-C Öncelikli Alanlar Yurt İçi Lisansüstü Burs Programı tarafından desteklenen tez çalışmamda tüm destekleri için TÜBİTAK'a,

Bugünkü ben olmamda aracılık eden sert rüzgârlara, yol ayrımlarına, sarsıldığım dalgalara ve yolumun kesiştiği her canlıya sonsuz teşekkürler.

Aysu SALBAŞ

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ ix

KISALTMA LİSTESİ x

ŞEKİL LİSTESİ xi

TABLO LİSTESİ xiii

ÖZET xiv

ABSTRACT xvi

1 GİRİŞ 1

1.1 Literatür Özeti ... 1
1.2 Tezin Amacı ... 3
1.3 Hipotez ... 4

2 GENEL BİLGİLER 5

2.1 Kanser ... 5
2.2 Glioblastoma Multiforme ... 9
2.3 Glioblastoma'nın Moleküler Mekanizmaları ... 13
2.1.1 Birincil ve İkincil Glioblastoma ... 14
2.4 Glioblastoma'nın Tedavi Stratejileri ... 18
2.5 Anti-Kanser Ajanlar Olarak Polifenoller ... 23
2.1.2 Kafeik Asit Fenetil Ester (CAPE) ... 23
2.6 Glioblastoma Tedavisinde Nanoterapötik Yaklaşımlar ... 25
2.1.3 İlaç Taşıyıcı Sistemler Olarak Nanopartiküller ... 26
2.1.4 Polimerik Nanopartiküller ... 28
2.7 Glioblastoma Tedavisi İçin Nanotaşıyıcı Temelli İlaç Kombinasyon Terapileri ... 29

3 MATERYAL VE YÖNTEM 32

3.1 Materyal ... 32
3.1.1 Kullanılan Cihazlar ... 32
3.1.2 Kullanılan Sarf Malzemeler ... 32

3.1.3 Kullanılan Kimyasallar, Enzimler, Kitler 33
3.1.4 Stok Solüsyonlar ve Tamponlar 35
3.2 Yöntem 39
3.2.1 Tekli Emülsiyon Çözücü Uçurma Metodu (w/o) ile CAPE-Temozolomid Yüklü PLGA Nanopartiküllerinin Sentezi 39
3.2.2 CAPE-Temozolomid Yüklü Nanopartiküllerin Reaksiyon Verimi, Enkapsülasyon Etkinliği ve Etken Madde Yüklenme Veriminin Hesaplanması 42
3.2.3 CAPE-Temozolomid Yüklü Nanopartiküllerin Karakterizasyonu .. 43
3.2.4 CAPE-Temozolomid Yüklü Nanopartiküllerin *İn Vitro* Salımı 44
3.2.5 Hücre Kültürü Çalışmaları 44
3.2.6 CAPE-Temozolomid Yüklü Nanopartiküllerin *İn Vitro* Biyolojik Etkinliğinin Araştırılması 47

4 BULGULAR VE TARTIŞMA **60**

4.1 CAPE ve Temozolomid Moleküllerine Ait UV-Vis Spektrumları ve Kalibrasyon Eğrileri 60
4.1.1 CAPE Molekülüne Ait UV-Vis Spektrumu ve Kalibrasyon Grafiği . 60
4.1.2 Temozolomid Molekülüne Ait UV-Vis Spektrumu ve Kalibrasyon Grafiği 60
4.2 Farklı Parametreler ile CAPE-Temozolomid Yüklü PLGA Nanopartiküllerinin Sentezi 63
4.3 CAPE-TMZ Yüklü Nanopartiküllerin Reaksiyon Verimi, Enkapsülasyon Etkinliği ve Etken Madde Yüklenme Verimi 64
4.3.1 Reaksiyon Verimi (RV) 64
4.3.2 Enkapsülasyon Etkinliği (EE) 65
4.3.3 Etken Madde Yüklenme Verimi (DL) 66
4.4 CAPE-TMZ Yüklü Nanopartiküllerin Karakterizasyonu 68
4.4.1 Nanopartiküllerin Boyut Analizi ve Çoklu Dağılım İndeksleri (PDI) 68
4.4.2 Nanopartiküllerin Zeta Potansiyel Analizi 70
4.4.3 Nanopartiküllerin FT-IR Analizi 72
4.5 Nanopartiküllerin *İn Vitro* Salım Analizi 74

4.6 U87MG İnsan Glioblastoma Hücre Hattında CAPE-TMZ Yüklü Nanopartiküllerin *İn Vitro* Etkinlik Testleri 76
4.6.1 Serbest CAPE-Temozolomid ve CAPE-Temozolomid Yüklü Nanopartiküllerin U87MG ve CCD-1079Sk Hücre Hatları Üzerindeki Sitotoksik Aktivitesi 76
4.6.2 Serbest CAPE-Temozolomid ve CAPE-Temozolomid Yüklü Nanopartiküllerin U87MG Hücreleri Üzerinde Hücre Göçüne Etkisi.... 80
4.6.3 CAPE-Temozolomid Yüklü Nanopartiküllerin U87MG Hücrelerinde Koloni Oluşturma Potansiyeline Etkisi 83
4.6.4 CAPE-Temozolomid Yüklü Nanopartiküllerin U87MG Hücreleri Üzerinde Apoptoz İndüksiyonun Gen Düzeyinde Gösterimi..... 85
4.6.5 CAPE-Temozolomid Yüklü Nanopartiküllerin U87MG Hücreleri Üzerinde Apoptoz İndüksiyonunun Protein Düzeyinde Gösterimi 88
4.6.6 CAPE-Temozolomid Yüklü Nanopartiküllerin U87MG Hücreleri Üzerinde Apoptotik Etkisinin İmmünositokimyasal Olarak Belirlenmesi..... 90

5 SONUÇ VE ÖNERİLER **92**

KAYNAKÇA **95**

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR **106**

SİMGE LİSTESİ

A	Amper
dk	Dakika
rpm	Dakikada dönme hızı
°C	Derece santigrat
g	Gram
kDa	Kilodalton
L	Litre
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mV	Milivolt
M	Molar
ng	Nanogram
nm	Nanometre
sa	Saat
cm	Santimetre
W	Watt
%	Yüzde

KISALTMA LİSTESİ

ATR	Attenuated Total Reflectance
BCA	Bikinkoninik Asit Tahlili
BSA	Bovine Serum Albümin
CAPE	Kafeik Asit Fenetil Ester
CT	Serbest CAPE ve Temozolomid Molekülleri
CT-NP	CAPE ve Temozolomid Yüklü PLGA Nanopartikülleri
DCM	Diklorometan
DMEM	Dulbecco's Medified Eagle Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
FBS	Fetal Sığır Serumu
FT-IR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GBM	Glioblastoma Multiforme
HCl	Hidroklorik Asit
IC_{50}	Yarı Maksimum İnhibitör Konsantrasyon
KBB	Kan-Beyin Bariyeri
MRI	Manyetik Rezonans Görüntüleme
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
MTT	3-(4,5-Dimetiltriazol-2-İl)-2,5-Difeniltetrazolium Bromid
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
NP	Nanopartikül
OD	Optik Yoğunluk
PBS	Fosfat Tamponlu Salin Solüsyonu
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDI	Çoklu Dağılım İndeksi
PLGA	Polilaktik-ko-glikolik Asit
PVA	Polivinil Alkol
PVDF	Hidrofilik Poliviniliden Florür
RNA	Ribonükleik Asit
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat–Poliakrilamid Jel Elektroforez
TMZ	Temozolomid
TNF	Tümör Nekroz Faktörü
TUNEL	Terminal Deoksinükleotidil Transferaz dUTP Uç Etiketleme
UV	Ultra Violet

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Kanser hücrelerinin temel özellikleri 7
Şekil 2.2 GBM'nin DSÖ tarafından belirlenen ortak özellikleri ve tanısal belirteçleri 10
Şekil 2.3 Beyin, Meninksler ve Merkezi Sinir Sistemi Kanserlerinin Yaşa Standardize İnsidans Hızlarının Cinsiyete Göre 2013-2017 Yılları Arasındaki Dağılımı 11
Şekil 2.4 GBM onkogenezine sebep olan genomik değişiklikler 16
Şekil 2.5 Temozolomid'in kimyasal dönüşümü 19
Şekil 2.6 TMZ tedavisi için öngörücü bir işaret olarak MGMT promotör metilasyonu 20
Şekil 2.7 Kan-beyin bariyerinin şematik çizimi 21
Şekil 2.8 CAPE'nin kimyasal yapısı 23
Şekil 2.9 Kan-beyin bariyerinden geçiş stratejileri 27
Şekil 2.10 İlaç taşıma sistemlerinin sınıflandırılması 28
Şekil 2.11 Çözücü buharlaştırma yöntemi 29
Şekil 3. 1 Bovine serum albümin (BSA) standart eğrisi 55
Şekil 3. 2 Jeldeki proteinlerin PVDF membrana transferi 58
Şekil 4.1 CAPE molekülüne ait kalibrasyon eğrisi ve UV-Vis Spektrumu 61
Şekil 4.2 TMZ molekülüne ait kalibrasyon eğrisi ve UV-Vis Spektrumu 62
Şekil 4.3 CT-NP1'e ait boyut dağılım grafiği 68
Şekil 4.4 CT-NP2'ye ait boyut dağılım grafiği 69
Şekil 4.5 CT-NP3'e ait boyut dağılım grafiği 69
Şekil 4.6 CT-NP1'e ait zeta potansiyel grafiği 70
Şekil 4.7 CT-NP2'ye ait zeta potansiyel grafiği 71
Şekil 4.8 CT-NP3'e ait zeta potansiyel grafiği 71
Şekil 4.9 CAPE, TMZ, PLGA, CT-NP1, CT-NP2 ve CT-NP3'e ait FT-IR spektrumları .. 73
Şekil 4.10 CT-NP'nin temozolomid ve CAPE için *in vitro* salım grafiği 74
Şekil 4.11 U87MG hücre hattının mikroskop görüntüsü 76
Şekil 4.12 CT ve CT-NP'nin U87MG hücre canlılığına 24 saat süre ile etkisi .. 77
Şekil 4.13 CT ve CT-NP'nin U87MG hücre canlılığına 48 saat süre ile etkisi .. 78
Şekil 4.14 CT ve CT-NP'nin CCD-1079Sk hücre canlılığına 24 saat süre ile etkisi 79
Şekil 4.15 CT ve CT-NP'nin U87MG hücre göçüne etkisi 81

Şekil 4.16 CT ve CT-NP'nin U87MG hücrelerinde yarık mesafesinin zamana bağlı değişimi 82

Şekil 4.17 CT-NP'nin U87MG hücrelerinde koloni oluşumu üzerindeki etkisi ... 84

Şekil 4.18 Kaspaz-3 (Casp-3), kaspaz-9 (Casp-9), kaspaz-8 (Casp-8), Bax, Bcl-2 ve sitokrom-c (Cyt-c) genlerinin kontrole göre relatif ekspresyonları ... 87

Şekil 4.19 Kaspaz-3 (Casp-3), kaspaz-9 (Casp-9), kaspaz-8 (Casp-8), Bax, Bcl-2 ve sitokrom-c (Cyt-c) ekpresyonlarının Western Blot yöntemiyle protein düzeyinde gösterimi 89

Şekil 4.20 U87MG hücrelerinde apoptotik aktivitenin TUNEL yöntemi ile belirlenmesi..... 91

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1 Farklı parametreler kullanılarak üretilen nanopartiküller 39
Tablo 3.2 Hücre kültüründe kullanılan hücre hatlarının özellikleri 44
Tablo 3.3 cDNA sentezinde kullanılan bileşenler 50
Tablo 3.4 cDNA sentezi reaksiyon koşulları 51
Tablo 3.5 qRT-PCR analizinde kullanılan bileşenler 53
Tablo 3.6 qRT-PCR reaksiyon koşulları 53
Tablo 3.7 %12'lik ayırma jeli protokolü 55
Tablo 3.8 %4'lük yükleme jeli protokolü 56
Tablo 3.9 TUNEL deneyi için boyama solüsyonu 59
Tablo 4.1 Farklı parametreler kullanılarak üretilen nanopartiküller 64
Tablo 4.2 Etken madde olarak CAPE ve temozolomid kullanılarak üretilen nanopartiküllere ait RV, EE ve DL sonuçları 67
Tablo 4.3 Etken madde olarak CAPE ve TMZ kullanılarak üretilen nanopartiküllere ait fiziko-kimyasal karakterizasyon sonuçları 72
Tablo 4.4 CT ve CT-NP uygulanan U87MG hücrelerindeki yarık mesafelerinin zamana bağlı olarak değişimleri 82

ÖZET

Kafeik Asit Fenetil Ester Yüklü Polimerik Nanopartiküllerin İnsan Glioblastoma Hücreleri Üzerindeki Anti-Proliferatif ve Apoptotik Etkilerinin İncelenmesi

Aysu SALBAŞ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Dr. Öğretim Üyesi Ayşegül ERDEMİR ÜSTÜNDAĞ

Yetişkinlerde sık görülen primer beyin tümörü glioblastoma multiforme (GBM), hızlı gelişmesi, radyasyon ve kemoterapiye dirençli olmasıyla tahrip edici kanser türlerindendir. GBM tedavisinde standart hale gelen kemoterapötik ilaç temozolomid (TMZ), beyindeki transport sistemlerindeki engelleri aşamamakta ve farklı yan etkiler barındırmaktadır. Kafeik asit fenetil ester (CAPE), anti-mitojenik, anti-viral, anti-inflamatuar ve anti-kanser özelliklere sahip bir propolis biyoaktif bileşenidir. Ancak düşük çözünürlüğü ve hidrofobik doğası anti-kanser ajan olarak kullanımını sınırlamaktadır. Biyouyumlu polimerik nanopartiküller, etken maddelerin hücre içine alımının kolaylaştırılması ve sağlıklı hücrelere sitotoksik etki yaratmaması gibi özellikleri sayesinde ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanılmaktadır.

Bu tez çalışmasında amaç; glioblastoma tedavisinde daha etkin bir ilaç dağıtımı için CAPE-temozolomid yüklü PLGA nanopartiküler formülasyonların sentezlenmesi ve U87MG insan glioblastoma hücre hattı üzerinde anti-proliferatif

ve apoptotik etkilerinin araştırılmasıdır. Tekli emülsiyon (w/o) çözücü uçurma metoduyla sentezlenen CAPE-temozolomid yüklü nanopartiküllerin (CT-NP) boyut, zeta potansiyeli, çoklu dağılım indeksleri hesaplanarak karakterizasyonu yapılmış, etken madde yükleme verimi (DL) ve enkapsülasyon etkinliği (EE) belirlenmiştir. CT-NP'de EE, CAPE için %83,2, temozolomid için %40; DL, CAPE için %33,54, temozolomid için %6,45 olarak hesaplanmıştır.

CT-NP'nin U87MG hücreleri üzerindeki sitotoksik aktivitesi MTT (metiltiazol difenil tetrazolyum) yöntemi ile belirlenmiştir. Serbest CAPE-temozolomid molekülleri (CT) ve CT-NP'lerin U87MG hücrelerinde inkübasyonu sonucunda IC_{50} değeri 11,69 μg/ml (CT-NP 24.saat), 55,7 μg/ml ve 18,21 μg/ml (48 saat) olarak hesaplanmıştır. CT ve CT-NP'nin U87MG hücreleri üzerindeki hücre göçüne etkisi analiz edilmiş ve kanser hücrelerinin migrasyonunu önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir. Ayrıca, CT-NP'nin U87MG hücrelerinde koloni oluşturma potansiyelini baskıladığı görülmüştür. CT-NP'nin U87MG hücreleri üzerindeki apoptotik aktivitesi mRNA ve protein düzeyinde incelendiğinde sitokrom-c, Bax, kaspaz-8, kaspaz-9 ekspresyonlarının arttığı ve apoptozun teşvik edildiği gösterilmiştir. Apoptotik hücrelerin TUNEL yöntemi ile işaretlenmesi sonucu CT-NP'nin U87MG hücreleri üzerinde apoptozu indüklediği doğrulanmıştır.

Sonuç olarak, bu tez çalışması ile CT-NP'nin U87MG hücrelerinde apoptozu teşvik ederek hücre bölünmesini durduğu ve glioblastoma tedavisi için potansiyel bir biyoteknolojik ilaç adayı olabileceği gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: CAPE, temozolomid, nanopartikül, anti-kanser, glioblastoma

ABSTRACT

Investigation of Anti-Proliferative and Apoptotic Effects of Caffeic Acid Phenethyl Ester Loaded Polymeric Nanoparticles on Human Glioblastoma Cells

Aysu SALBAŞ

Department of Molecular Biology and Genetics

Master of Science Thesis

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Ayşegül ERDEMİR ÜSTÜNDAĞ

Glioblastoma multiforme (GBM), primary brain tumor, is one of the aggressive types of cancer with its rapid development and resistance to radiation and chemotherapy. The chemotherapeutic drug temozolomide (TMZ), which has become the standard in GBM treatment, cannot overcome the obstacles in the transport systems of the brain and has different side effects. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) is a propolis bioactive component with anti-mitogenic, anti-inflammatory and anti-cancer activities. However, its low solubility and hydrophobic nature limit its use as an anti-cancer agent. Biocompatible polymeric nanoparticles are powerful tools as drug delivery systems, owing to their features such as facilitating the uptake of active substances into cells, not causing cytotoxic effects to healthy cells and increasing solubility.

The aim of this thesis study is to synthesize CAPE-temozolomide loaded PLGA nanoparticles for more efficient drug delivery for the treatment of glioblastoma and to investigate their anti-proliferative and apoptotic effects on the U87MG human glioblastoma cell line. CAPE-temozolomide loaded nanoparticles (CT-NP)

were synthesized by single emulsion (w/o) solvent evaporation method, their size, zeta potential, multidispersion indexes were calculated and characterized, active ingredient loading efficiency and encapsulation efficiency were determined. The encapsulation efficiency (EE) of CT-NP was calculated as 83.2% for CAPE, 40% for temozolomide, and the active ingredient loading efficiency (DL) for CAPE 33.54%, and 6.45% for temozolomide.

The cytotoxic activity of CT-NP on U87MG cells was determined by the MTT method. After incubation of CT and CT-NPs in U87MG cells, the IC_{50} value was calculated as 11.69 μg/ml (CT-NP, 24 hours), 55.7 μg/ml and 18.21 μg/ml (48 hours). The effect of CT and CT-NP on cell migration on U87MG cells was analyzed and it was found that they significantly reduced the migration of cancer cells. In addition, CT-NP was found to suppress the colony forming potential in U87MG cells. When the apoptotic activity of CT-NP on U87MG cells was examined at the mRNA and protein level, it was shown that cytochrome-c, Bax, caspase-8, caspase-9 expressions were increased and apoptosis was promoted. It was confirmed that CT-NP induced apoptosis on U87MG cells by labeling apoptotic cells with the TUNEL method.

In conclusion, with this thesis, it has been shown that CT-NP inhibits cell division by promoting apoptosis in U87MG cells and can be a potential biotechnological drug candidate for the treatment of glioblastoma.

Keywords: CAPE, temozolomide, nanoparticle, anti-cancer, glioblastoma

1
GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Merkezi sinir sistemi (MSS) tümörleri arasında yetişkinlerde en sık teşhis edilen glioblastoma multiforme (GBM), agresif primer beyin tümörüdür [1]. GBM'de, hızlı dejenerasyon, nüksetme potansiyelinin yüksekliği ve tedavi yetersizliği sebebiyle tam anlamıyla iyileşme olasılığı düşüktür [2]. Cerrahi, cerrahi sonrası radyoterapi ve kemoterapi uygulamaları standartlaşmış olsa da bu tedavi yöntemlerinin hasta sağ kalımı düşüktür [3]. GBM tedavisinde kullanılan ilaçların beyinde bulunan kan-beyin bariyerini fizyolojik olarak aşamaması sebebiyle etkili ilaç konsantrasyona ulaşılamaması tedaviyi kısıtlayan en büyük etkendir [4]. GBM tedavisinde maligniteye karşı anti-kanser özellik gösteren standart tedavi olarak kullanılan kemoterapötik ajanlardan temozolomid (TMZ), imidazotetrazin sınıfına ait alkilleyici bir ajandır [5].

TMZ, hücre döngüsünü durduran, tümör ilerlemesini geciktiren, mitotik yıkıma sebep olan, apoptoz ve otofajiyi indükleyen, hızlı emilen ve uygulama kolaylığı sayesinde biyoyararlanımı yüksek bir kemoterapötik ajandır [6], [7]. TMZ, standart tedavi olarak uygulanmasına rağmen glioblastomanın ilaca direnç göstermesi sebebiyle hastaların sağkalımı ortalama 22 aydır ve primer tümör sıklıkla yeniden ortaya çıkmaktadır [5], [8]. Buna ek olarak mide bulantısı, kusma, iştahsızlık, ishal, deri döküntüsü, saç dökülmesi, yorgunluk, baş dönmesi, bulanık görme, uykusuzluk ve baş ağrısı gibi yan etkileri bulunan TMZ'nin tedavide kullanımı sınırlanmaktadır [9]. TMZ'nin biyoaktif bileşiklerle birlikte uygulandığı çalışmalarda TMZ'nin insan beyin kanseri hücrelerinin duyarlılığını artırdığı, biyoaktif bileşiklerin kemoterapötiklere benzer etki gösterdiği ve TMZ'nin biyoaktif bileşiklerle kombinasyonunun glioblastoma tedavisinde TMZ'nin yalnız kullanımına göre daha etkili olabileceği gösterilmiştir. TMZ ve doğal anti-kanser ajanlarının kombinasyonunu, merkezi sinir sistemi tümör tedavileri açısından yenilikçi tedavi stratejisi olarak öngörülmektedir [5].

Mevcut tedavi yöntemlerindeki kısıtlamalara karşın etkili anti-kanser aktivite gösteren doğal bileşenler GBM tedavisinde potansiyel anti-tümör ajanları olarak görülmektedir [10].

Flavonoid benzeri doğal bir bileşik olan kafeik asit fenetil ester (CAPE), bal arısı propolisin en aktif bileşenidir [11]. Kemoterapötik ajanlarla ilişkilendirilmiş yan etkilerden yoksun olan CAPE'nin akut bağışıklık tepkilerinin bastırılması, anti-oksidan, anti-mitojenik, anti-proliferatif, anti-karsinojenik, anti-inflamatuar ve anti-alerjik etki gibi çeşitli *in vitro* biyolojik etkileri bildirilmiştir [10], [11]. CAPE, apoptoz yolaklarını indükleyerek kanserojen insidansın bastırılması ve transkripsiyon faktörü nükleer faktör-kappa B (NF-κB) inhibisyonu aktiviteleriyle kanser hücrelerinde etkili bir anti-kanser ajanıdır. Bunlara ek olarak CAPE'nin anjiyogenez, tümör istilası ve metastaza karşı inhibe edici etkisi bulunmaktadır. Diğer taraftan ise CAPE, plazma enzimleriyle hidrolize uğrayabilir. Bu sebeple kısa yarı ömre sahiptir. Suda zayıf çözünür karakteri, düşük biyoyararlanım ve düşük biyolojik performansı nedeniyle *in vivo* ve *in vitro* etkinliğini kısıtlıdır [11], [12].

Nanopartiküler sistemler, ilaç ve biyoaktif doğal ürünlerin dezavantajlarının üstesinden gelebilmek ve bu maddelerin suda çözünürlüğünü iyileştirmek, biyolojik aktivitesini ve biyoyaralanımını artırmakla birlikte günümüzde küçük partikül boyutları sayesinde bölgeye özgü ilaç dağıtımı ve tümör hedeflemesi için büyük avantaj sağlamak adına geliştirilen stratejilerdendir. Anti-kanser ajanlarının polimerik nanopartiküler sistemlere enkapsülasyonunun, etken maddelerin kontrollü salınımı, hücreye özgü hedeflendirilmesi, etki sürelerinin uzatılması ve toksik etkinin azaltılmasında avantaj sağladığı gösterilmiştir. Poli (laktik asit-ko-glikolik asit) (PLGA), yüksek biyobozunurluğu, biyouyumluluğu ve düşük toksisitesi nedeniyle anti-kanser ajanlarının kapsüllenmesi için yaygın olarak kullanılan, küçük partikül boyutu ve geniş yüzey alanına sahip bir polimerik nanopartiküldür. PLGA nanopartikülleri, kontrollü salım, hücreye özgü hedeflendirme, düşük konsantrasyonlarda etken madde kullanımı, küçük boyut ve toksik etkinin azaltılmasına büyük oranda avantaj sağlamaktadır [9], [12].

Günümüzde doğal kaynaklı etken maddelerin kemoterapötik ilaçlarla birlikte uygulanması, yeni kanser tedavi stratejilerinin ortaya koyulmasında önem kazanmıştır. Anti-kanser özellik barındıran doğal kaynaklı bileşenler ve kemoterapötik ajanların birlikte uygulandığı çalışmalarda, bu ilaç kombinasyonlarının yüksek anti-tümöral aktivite gösterdiği bildirilmiştir [13].

Standart kemoterapi ilacı olan temozolomid molekülünün hücrelerde yarattığı toksik etki, kanser hücreleri tarafından ilaca karşı oluşturulan direnç ve kanser hücrelerinde aşılamayan fizyolojik engelleri sebebiyle CAPE gibi doğal bileşenlerle desteklendirilip etkili tedavi stratejilerinin geliştirilmesi hususunda önemli bir yere sahiptir. Bu sebeplerle hem anti-kanser özellik barındırdan maddelerin birlikte uygulanmasıyla kanser tedavisinde yeni ilaç kombinasyonlarının geliştirilmesi hem de bu maddelerin nanopartiküler sistemlerle bütünleştirilmesiyle biyoteknolojik ilaç stratejilerine katkıda bulunacağı öngörülmektedir.

1.2 Tezin Amacı

Önerilen tez çalışmasının amacı, CAPE-temozolomid moleküllerinin Poli (laktik asit-ko-glikolik asit) (PLGA) nanopartiküler sisteme ko-enkapsüle edilerek insan glioblastoma U87MG hücre hattı üzerinde anti-kanser aktivitesinin hücresel ve moleküler düzeyde belirlenmesidir. Bu çalışma ila nanopartiküler sisteme enkapsüle edilen CAPE-TMZ kombinasyonu ve serbest formda CAPE-TMZ kombinasyonunun insan glioblastoma (U87MG) hücre hattı üzerindeki sitotoksik, anti-proliferatif ve apoptotik etkisinin karşılaştırmalı olarak araştırılması amaçlanmaktadır. Nanopartiküler sisteme CAPE-TMZ moleküllerinin yüklenmesiyle insan glioblastoma hücre hattında anti-proliferatif ve apoptotik etkinin araştırılması ve temel inhibisyon mekanizmalarının açığa kavuşturulması hedeflenmektedir. CAPE-TMZ yüklü PLGA nanopartiküllerinin serbest formlarına kıyasla U87MG hücre hattında daha yüksek anti-kanser aktivite göstermesi beklenmektedir.

1.3 Hipotez

Nano-biyoteknolojik ilaç sistemleri hem temozolomid hem de CAPE molekülünün anti-proliferatif ve apoptotik etkisinin artırılması ve her iki anti-kanser ajanının toksik etki, düşük biyoyararlanım ve düşük biyolojik performans gibi dezavantajlarının üstesinden gelmek için kullanılabilecek etkili araçlardır. Sentezlenmesi planlanan CAPE-temozolomid nanopartiküllerinin serbest CAPE-temozolomid formuna göre hücre içine ilaç alımı açısından daha verimli olacağı böylece hücreye özgü hedeflendirme açısından daha etkin anti-kanser aktivite göstermesi beklenmektedir. Kemoterapötik ajan TMZ'in toksik etkisi ve düşük aktivitesi sebebiyle, antikanser etkili doğal kaynaklı CAPE'nin ise suda düşük çözünürlüğe, düşük biyoyararlanım ve düşük biyolojik performansa sahip olması nedeniyle kullanımları kısıtlanmaktadır. TMZ ve CAPE'nin nanopartiküler sisteme kombinasyon halinde entegre edilmesi ile moleküllerin dezavantajlarının bertaraf edilmesi, biyoyararlanım, biyouyumluluk, hücre içine alım ve moleküler kararlılığın artırılmasıyla daha etkin anti-kanser kombinasyon ilaç tedavilerin geliştirilerek nano-biyoteknoloji alanına katkı sağlayacaktır. Nanopartiküler sisteme CAPE/temozolomid moleküllerinin kombinasyon halde yüklenmesiyle anti-proliferatif ve apoptotik etkinin araştırılması insan glioblastoma hücre hattında daha önce çalışılmamıştır. Özgün değere sahip bu tez çalışmasından elde edilecek sonuçların kombinasyon olarak uygulanan farklı etken maddelerin nanopartiküler sistemlere entegre edilmesi, enkapsüle edilen maddelerin biyoyararlanımının arttırılmasına, kontrollü salınımına ve suda az çözünme gibi dezavantajlarının önüne geçilmesini sağlayarak, farklı kanser türlerinin tedavilerinde yaygınlaşacak yeni stratejilerin doğmasına imkan sağlayacaktır. Bu çalışmada, gerçekleştirilecek olan nanopartiküler biyoteknolojik ilaç stratejisi kanser, nanoteknoloji ve nanotıp alanlarına katkı sağlayacak ve biyoteknolojik ilaçların geliştirilmesinde örnek teşkil edecektir.

2

GENEL BİLGİLER

2.1 Kanser

Kanser, genetik materyalin uzun zaman içerisinde çeşitli mutasyonlara uğraması sonucu yapısında hasara neden olan kalıtsal bir hastalıktır. Bu mutasyonlar, büyümeyi destekleyen genlerin etkinleştirilmesi, çoğalmayı baskılayan genlerin durdurulması, hücre ölümünün önlenmesi ve DNA tamir enzimlerinin baskılanması gibi hücresel mekanizmaları etki etmektedir. Genetik değişiklikler kanser hücresinin denetimsizce çoğalmasına, gereğinden fazla hücre birikimine ve sağlıklı dokulara yayılımına yol açmaktadır [14], [15].

Tümörler iyi huylu (benign) ve kötü huylu (malign) olarak 2 tipte incelenmektedir. Benign tümörler etraftaki dokuya ya da vücudun uzak bölümlerine yayılmazlar. Bu tümörler canlının yaşamında tehlike oluşturmadıkları için genellikle cerrahi müdahaleyle alınmaktadırlar. Öte yandan malign tümörler hem yakındaki dokulara hem de besin ihtiyaçlarını karşılamak için kan ve lenf damarları aracılığıyla vücudun diğer bölgelerine metastaz olarak adlandırılan yayılım gösterirler. Malign tümörlerin diğer dokulara yayılarak doku fonksiyonları üzerinde etkide bulunmaları hastalığın tedavi sürecini güçleştirmektedir [15], [16].

Onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve DNA tamir genleri olarak 3 gruba ayrılan genler, kanserleşme sürecinde büyük rol oynamaktadır. Hücre büyümesinde ve farklılaşmasında görev alan normal genler proto-onkogenler olarak adlandırılır ve bu genler mutasyonlar, artan gen ifadesi, gen kopyaları ve kromozomal yeniden düzenlemelerden dolayı etkinleşerek onkogen haline gelebilirler. RAS, Erk, MYC gibi genler onkogenler arasında en bilinenlere örnek gösterilebilirler. Hücrenin bölünmesini ve çoğalmasını denetleyen, hasar halinde DNA onarımını başlatan, onarım müdahalesinin başarısızlıkla sonuçlanması durumunda apoptozu başlatan gen gruplarına ise tümör baskılayıcı genler denir. Tümör baskılayıcı genlerden en bilineni ve en çok çalışılmış olanı TP53 genidir. Delesyonlar, nokta mutasyonları,

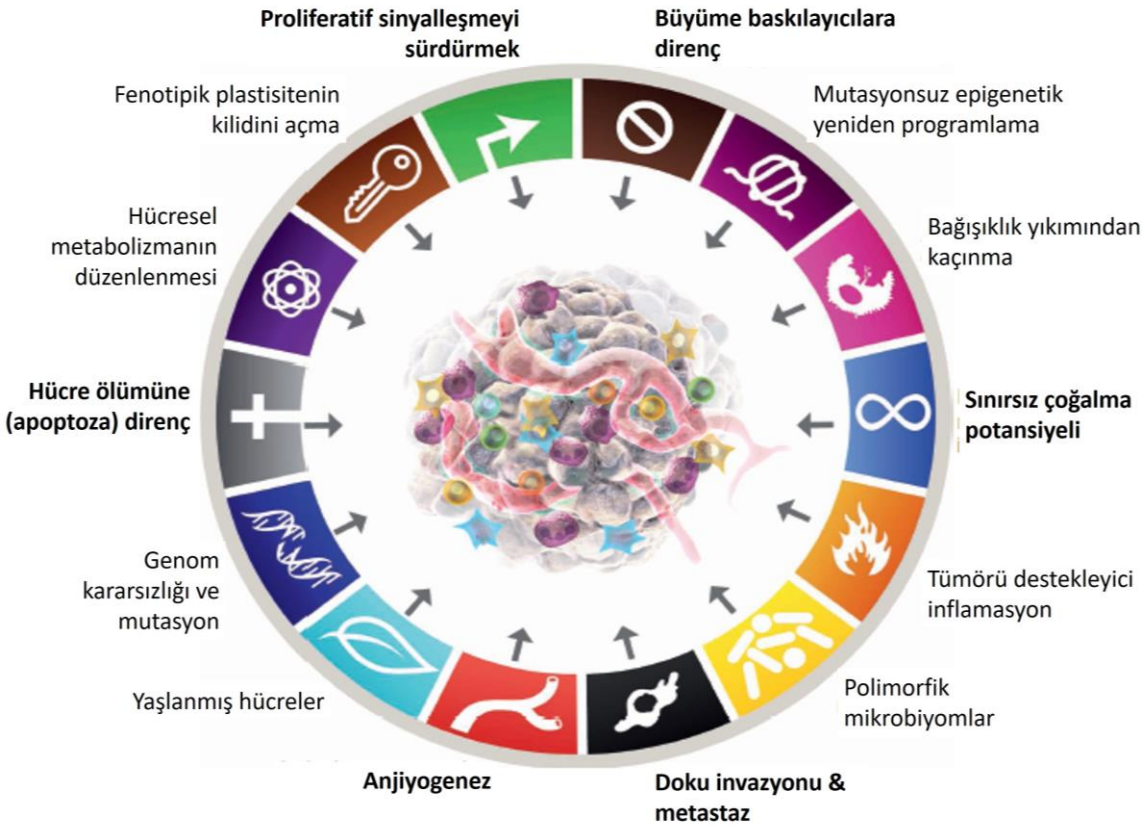
epigenetik baskılanmalar, kromozomların doğru ayrılamaması ve mitotik rekombinasyonlar tümör baskılayıcı genlerin fonksiyonlarını engelleyerek hücre döngüsündeki kontrol kaybına ve bunun sonucunda karsinogeneze sebebiyet verebilirler. DNA tamir genleri ise, hasara uğramış DNA'nın onarılması için ihtiyaç duyulan proteinleri o bölgeye getirerek genin fonksiyonunu tekrar kazanmasını sağlar. DNA onarımının başarıyla gerçekleşememe durumunda hücrenin apoptotik veya nekrotik yol aracılığıyla yok edilmesini sağlamak DNA tamir genlerinin diğer önemli görevidir. DNA tamir genlerinde gerçekleşen işlev kayıpları hücrenin kanserleşme sürecinde sıklıkla etkili olan bir problemdir. BRCA geninde fonksiyon kaybı nedeniyle meme kanseri oluşumunun tetiklenmesi DNA tamir genlerinin en bilinen örneğidir [17].

Kanser, hücresel faaliyetlerde önem arz eden değişikliklere neden olan genetik veya zamanla edinilen bir dizi mutasyon sonucu gelişim göstermektedir. Kanser hücresi, normal hücrelerin sahip olduğu özellikleri kaybetmesi sonucu hücrelerin morfolojisine, hücre yüzeyindeki proteinlerin düzenine, çoğalmasına, yenilenmesine ve ölümüne etki edecek anormal özellikler kazanır [18].

Kanser hücrelerinin temelde farklı dokulardan köken aldığı; kemik ve kas gibi mezenşimal doku kökenli *sarkoma*lar, epitelyal doku kökenli *karsinom*lar ve kemik iliği, lösemi gibi hemapoetik ve lenfoid sistem kökenliler olmak üzere 3 tipi bulunmaktadır. Her ne kadar farklı doku veya kökene sahip olmalarına karşın kanser hücrelerinin bazı ortak özellikleri vardır [14].

Kanser hücreleri; kendi hücre bölünme sinyallerini sentezleme, büyüme baskılayıcı sinyallere karşı direnç gösterme, invazyon ve metastaz potansiyeline sahip olma, sınırsız bölünebilme, damar oluşturma (anjiyogenez) ve programlı hücre ölümünden (apoptoz) kaçınma olmak üzere 6 temel özellik gösterirler (Şekil 2.1).

Kanser hücrelerinin edinmiş olduğu bu ortak özellikler gösterdiği malign aksiyonların kaynağıdır. Son bulgular hücresel metabolizmanın düzenlenmesi, fenotipik plastisitenin kilidinin açılması, genom kararsızlığı ve mutasyon, yaşlanmış hücreler, polimorfik mikrobiyomlar, tümörü destekleyici inflamasyon, bağışıklık yıkımından kaçınma ve mutasyonsuz epigenetik yeniden programlama mekanizmalarının kanser hücrelerinde görüldüğünü ortaya çıkarmıştır [18], [21].



Şekil 2.1 Kanser hücrelerinin temel özellikleri [20]

Erken teşhis ve aile hikayesi, kanser gibi genetik temeli bulunan hastalıklarda büyük önem taşımaktadır. Kanserin erken teşhisinde yararlanılan yöntemlere röntgen, kan testleri, bilgisayarlı tomografi taramaları, manyetik rezonans görüntüleme (MRI), endoskopi ve genetik görüntüleme testleri örnek olarak verilebilir [22].

Kanser tedavisinde sıklıkla uygulanan kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi yöntemlerin yanı sıra, farklı yaklaşımlar olarak hormon terapisi ve biyolojik uygulamaların yapılması klasik yöntemleri destekleyici biçimde eş zamanlı veya ayrı ayrı kullanılabilmektedir.

Uygulanan her tedavi yönteminin kendi içinde farklı avantaj ve dezavantajlar barındırması, kanserin kişiye özgü bir hastalık olması ve tedavi uygulamalarının kişiden kişiye çeşitlilik gösterebilmesi nedeniyle tek ve eşsiz bir tedavi yönteminden söz etmek mümkün olmamaktadır. Radyoterapi, kanser hücrelerini iyonizan ışın uygulamasıyla öldürme temelline dayanan bir tedavi yöntemidir. Vücutta belirli bir bölgenin hedef alınması ya da tüm vücudun hedeflenmesiyle çeşitli radyoterapi tedavileri uygulanabilmektedir. Genellikle cerrahi operasyonlardan önce radyoterapi uygulamasıyla tümörlü dokunun küçültülmesi amaçlanır. Radyoterapi tedavisinin en önemli dezavantajı kanser hücrelerinin öldürülmesiyle birlikte sağlıklı hücrelerin de tahribata uğratılmasıdır. Bunun yanı sıra hastanın hayat standardını etkileyen kusma, saç kaybı, halsizlik, iştah kaybı gibi yan etkiler de sıklıkla görülebilmektedir. Kemoterapötik ajanlar kullanarak kanser hücrelerinin öldürülmesi hedeflenen Kemoterapi tedavisinde sitotoksik antineoplastik ajanlar başroldedir. Kemoterapi, radyoterapi tedavisine benzer şekilde cerrahi uygulama öncesi tümörü küçültmek amacıyla neoadjuvan tedavi olarak veya tek başına uygulanabilmektedir. Kemoterapi yönteminin hastalarda yaşa ve metabolizmaya bağlı olarak uygulanabilme sınırlılığı bulunmaktadır. Cerrahi yöntemler genellikle gelişmekte olan kanserlerin önlenmesinde, dokudan kesit alınmasıyla yapılan teşhislerde ve kanserli dokunun vücut dışına çıkarılmasında kullanılmaktadır. Cerrahi yöntemler hem radyoterapi ve/veya kemoterapi tedavileriyle bir arada hem de tek başına kullanılan yaygın bir yöntemdir. Cerrahi yöntemlerin tümörün pozisyonu ve boyutundan dolayı uygulama kısıtlılığı bulunabilmektedir [22].

2.2 Glioblastoma Multiforme

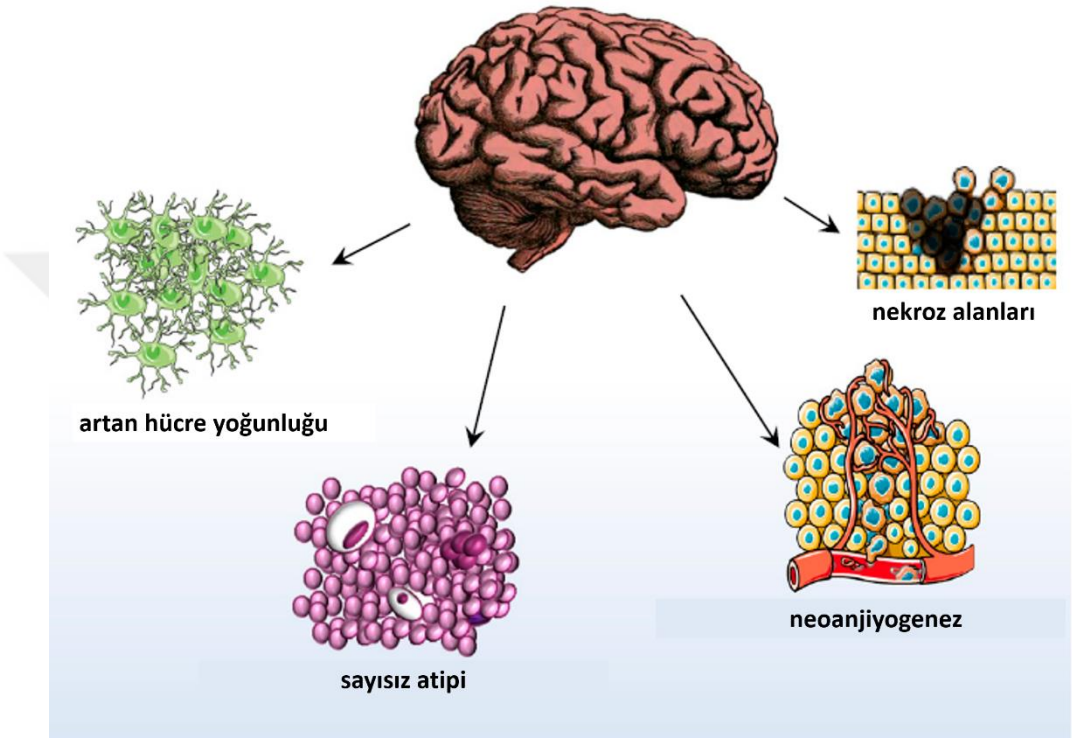
Glioma, adını beyindeki nöronlara destek işlevindeki glial hücrelerden alan, beyin veya omurgada başlayan bir tür neoplazm (doku büyümesi) dır. Gliomalar, merkezi sinir sisteminin (MSS) en sık görülen tümörleridir. Gliomalar hücre kökenine, derecesine ve konumuna göre sınıflandırılır [23], [24].

Morfolojik tanı, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından tanımlanan kriterlere dayanır. MSS tümörlerinin derecelendirilmesi morfolojilerinin, malignite derecelerinin (derece I-IV), proliferatif indeksin, tedaviye yanıtın ve hayatta kalma süresinin değerlendirilmesini içerir [25].

Derece I tümörler düşük dereceli ve iyi huylu (benign) olarak tanımlanmakta, yavaş büyüme özelliği ile beynin diğer bölgelerine yayılım göstermezler. Astrositom (LGA) olarak adlandırılan derece II tümörlerinin büyüme hızları yavaş olsa da zaman içerisinde beynin diğer bölgelerine yayılarak kötü huylu (malign) hale gelebilmektedir. Derece III ve IV tümörler yüksek dereceli ve kötü huylu olarak tanımlanırlar. Derece III anaplastik astrositom (AA) ve derece IV glioblastoma multiforme (GBM) olarak adlandırılır. Büyüme hızları ve beyin dokusundaki yayılma riskleri yüksek olan bu tümörler tedaviden sonra nüksetmeleri ile yaygınlaşmıştır [26].

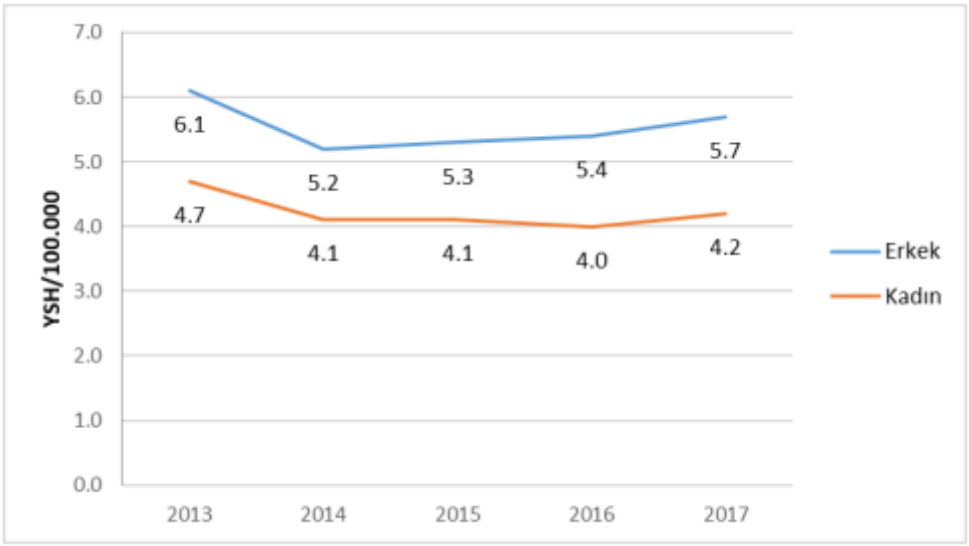
Derece IV gliomalar olarak sınıflandırılan Glioblastoma multiforme (GBM), yetişkinlerde en sık görülen birincil beyin tümörüdür. Glioblastoma, hızlı büyüyen doğası, çevreye doğru düzensiz, saldırgan büyümesi, radyoterapi ve kemoterapiye direnci ve teşhisten ölüme hızlı ilerlemesi nedeniyle en tahrip edici kanserlerden biridir. Bu sebeplerle cerrahi operasyon, radyasyon ve kemoterapi gibi optimal tedavilerin uygulanmasına rağmen sağkalım süresi yaklaşık 15 aydır. Düşük dereceli gliomalarla karşılaştırıldığında GBM'nin DSÖ tarafından belirlenen ortak özellikleri ve tanısal belirteçleri Şekil 2.2'de gösterilmiştir [23]. Dr. Rudolf Virchow tarafından makroskopik ve mikroskobik teknikler kullanılarak ilk olarak 1863 yılında glial hücre kökenli bir tümör olarak tanımlanan GBM, günümüzdeki beyin tümörleri sınıflandırmasına kaynak oluşturmuştur [27].

Manyetik rezonans görüntüleme, GBM için birincil tanı aracıdır. Kesin tanı, intraoperatif olarak çıkarılan tümörün veya parçalarının geleneksel histolojik, sitolojik ve histokimyasal yöntemler kullanılarak histopatolojik incelemesine dayanır [25].



Şekil 2.2 GBM'nin DSÖ tarafından belirlenen ortak özellikleri ve tanısal belirteçleri [28]

Dünyadaki istatistiklere bakıldığında GBM'nin en sık görülen malign primer beyin tümörü olduğu görülmektedir. Yaş gruplarına göre değişkenlik gösteren GBM insidansı yaş ile birlikte artış görülmekte ve bulgular ortalama tanı yaşının 64 olduğunu göstermektedir. TC Sağlık Bakanlığı 2017 istatistiklerine göre Türkiye'de MSS kanserlerinin insidansı erkeklerde yüz binde 5,7 kadınlarda ise 4,2'dir (Şekil 2.3) [29].



Şekil 2.3 Beyin, Meninksler ve Merkezi Sinir Sistemi Kanserlerinin Yaşa Standardize İnsidans Hızlarının Cinsiyete Göre 2013-2017 Yılları Arasındaki Dağılımı (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, Dünya Standart Nüfusu, 100.000 Kişide) [29]

GBM'lerin ortaya çıkışındaki nedenler tam olarak aydınlatılamamış olmasına rağmen tümör oluşumunda çevresel faktörler ve ailesel kalıtımı gibi farklı etkenlerin rol alabileceği düşünülmektedir [30]. GBM'nin ailesel kalıtımı vakaların %1'inde tanımlanmıştır [31]. Glioblastomaların gelişimdeki genetik arka plan, kendiliğinden ortaya çıkanlardan farklılık gösterir [32]. GBM, tüberöz skleroz, Turcot sendromu, multipl endokrin neoplazi tip IIA ve nörofibromatoz tip I (NF I) gibi genetik hastalıkların seyrinde ortaya çıkabilir. Bunlara ek olarak, beyin kontüzyonunun (yaralanma, eziklik) sonucunda elde edilmiş kafa travmaları, glioblastoma başlangıcında etki gösterebilmektedir [25].

Hücre döngüsündeki G1/S kontrol noktasının deregülasyonu ve hücrede meydana gelen genetik bozukluklar (kromozom 10q içinde genetik materyal kaybı, EGFR, FGFR2, IRS2 ve AKT3 genlerinin amplifikasyonu ve PTEN, TP16, TP53, PARK2, PTPRD ve NF1 genlerindeki mutasyonlar) GBM gelişiminde etkilidir [33].

Ayrıca GBM'nin kadınlarda postmenopozal dönemde ortaya çıkma riskinin yüksek olması, glioblastoma gelişiminde cinsiyet hormonlarının rolü üzerine bir hipotez oluşturulmuştur [34]. GBM insidansı boy ve VKİ (vücut kitle indeksi) ile de ilişkilidir, bu iki özelliğin yüksek değerleri glioblastoma insidansı riskini artırır [35].

Gliomaların oluşumu konusunda en iyi bilinen çevresel faktör iyonizan radyasyona maruz kalmaktır. DNA hasarı oluşturan iyonizan radyasyona maruz kalınan yaş ne kadar küçükse glioma riski o kadar yükselir [36]. Glial tümörlerin radyasyon sonucunda ortaya çıkma, zaman içinde malign tümör özelliği kazanma, radyoterapi ve alkilleyici ajan kemoterapilerine yanıt vermeleri, hastalarda görülen kemik iliği baskılanması ve tümörlerin nüks etmesi, DNA hasar tamirindeki bu bozukluklarla açıklanabilen çok temel bir özelliktir. Diğer çevresel faktörler GBM oluşumunda net olarak kanıtlanamamıştır [30]. Yapılan moleküler genetik çalışmaları DNA'da oluşan bu hasarın tamiri konusundaki eksikliklerin GBM gelişiminde önemli rolü olabileceğini göstermiştir. DNA hasar tamirindeki eksiklikler hem kalıtılmış hem de sonradan kazanılmış olabilmektedir.

Kanserin genetik bir hastalık olduğu uzun bir süredir bilinmektedir. Tümör oluşumunda etkili olan genetik bozuklukların iki kaynağı vardır; Ailesel olarak "kalıtılan" özellikler "germline" olarak adlandırılırken, sonradan "kazanılan" özellikler "somatik" olarak adlandırılır [30]. Kanserlerin kalıtılabileceği ilk olarak Broca [37] tarafından tarif edilmiştir.

Kalıtılan genetik bozukluğun GBM gelişimini ne kadar artıracağını etkilenen genin çalışma mekanizması ve genin kanser oluşumundaki gücü belirler. Tümör oluşumunu engelleyen genler tümör baskılayıcı gen olarak bilinirken kanserin oluşumunda aktif çalışan genler onkogen olarak adlandırılırlar. Bozukluğun bir onkogende ya da tümör baskılayıcı gende olmasına göre kalıtım dominant ya da resesif olarak gelişir [30].

2.3 Glioblastoma'nın Moleküler Mekanizmaları

GBM bulguları değerlendirildiğinde demografik özellikler, yerleşim, yaygınlık, boyut, histopatoloji, tedavi cevabı ve sağkalım bakımından büyük bir heterojenite görülmekle beraber, GBM hastalarının %70-80 oranında ortak moleküler özelliklere rastlanmaktadır. Hücre büyümesi, proliferasyon ve migrasyon gibi birçok hücresel fonksiyonu düzenleyen kromozomun 10q23 bölgesinde konumlanmış bir tümör baskılayıcı geni olan PTEN (Protein tirozin fosfotaz ve tensin homoloğu) genin kaybı, EGFR (Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü) amplifikasyonu ve TERT (telomeraz ters transkriptaz) promotör mutasyonları, GBM'lerin büyük çoğunluğunda görülen ortak özellikler arasındadır [30].

GBM orijinlerinin anlaşılması konusunda telomeraz enziminin ters transkriptaz (TERT) aktivasyonu önemli yol göstericilerdendir. Telomerler, memeli kromozomlarının protein ve özel tekrarlı DNA dizilerinden oluşan özelleşmiş uçlarıdır. Her hücre bölünmesinde telomer bölgeleri kısalarak belli sayıda bölünme sonrasında hücre çoğalmasının durduğu TP53 proteinin korumasındaki "senesens" durumu meydana gelerek hücrenin yeni denge durumunda krize girmesi önlenir. Bölünme yetisinin önemli olduğu hücrelerde (örneğin, kök hücreler) telomeraz enzimi ters transkriptaz aktivitesi ile kromozom uçlarını yeniden yapılandırır. Telomer bölgelerinin yenilenmesi hücreye sonsuz bölünme yeteneği kazandırır [30]. Malign tümörlerde telomeraz enziminin düzenleyici bölgesinde görülen spesifik mutasyonların enzim sentezini artırdığı ve benzer mutasyonların GBM'de sık görüldüğü yapılan çalışmalarda ortaya konulmuştur [38].

Bir tümör baskılayıcı gen olan PTEN (Protein tirozin fosfotaz ve tensin homoloğu), hücre içinde birçok sinyal yolağında etkili rol almakta bu nedenle mutasyonları birçok kanser türünde görülmektedir. Yapılan GBM çalışmalarında en sık görülen ve en erken açığa çıkan temel değişiklik PTEN tümör baskılayıcı genine ait iki kopyadan birinin kaybıdır. Diğer kopyanın sağlam olmasına rağmen kansere yatkınlık oluşturmaktadı [30]. Glial hücrelerin GBM karakteristiği kazanmasındaki temel mekanizmanın PTEN fonksiyon kaybı olduğu düşünülmektedir [39].

GBM'lerde en sık görülen genetik değişiklerden biri de EGFR (Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü) sinyalizasyonunun aşırı aktivasyonudur. Bu değişiklikler GBM'lerin yaklaşık %80'inde kendi başlarına ya da kombinasyonlar halinde görülebilmektedir. Bir tirozin kinaz reseptörü olan EGFR'nin GBM'de aşırı aktivasyonu birçok mekanizma ile gerçekleşse de en sık rastlanan mekanizma EGFR'nin normal koşullarda iki olan kopya sayısının artmasıdır. EGFR artışı gözlenmeyen GBM'lerde bunun yerine yine bir tirozin kinaz reseptörü olan PDGFRA geninin aşırı aktivasyonu gözlenmektedir. EGFR aşırı aktivasyonu, görülme sıklığı nedeniyle GBM tedavisinde önemli bir hedef olarak görülmesine rağmen EGFR'nin hedeflendiği klinik çalışmalarda yarar sağlanamamıştır [30].

PTEN, EGFR ve TERT mutasyonları haricinde görülen değişikliklerin bir kısmı GBM onkogenezinde rol almalarına karşın diğer kısmı ise tesadüfen ortaya çıkmış ve onkogenezde belirgin rol almayan genlerdir. EGFR, CDK4, PDGFRA, MDM2, MDM4, MET, CDK6, MYCN, CCND2, PIK3CA ve AKT3 genlerinde görülen kopya sayılarındaki artışlar, CDKN2A/B, PTEN, CDKN2C, RB1, PARK2, NF1 genlerinde yaşanan homozigot kopyalarının kaybı ve TP53, PTEN, NF1, EGFR, ERBB2, RB1, PIK3R1, PIK3CA genlerinde gerçekleşen mutasyonlar GBM'de rastlanan diğer değişikliklerdir. Reseptör tirozin kinaz (RTK) genlerinin amplifikasyonu ve mutasyonel aktivasyonu yoluyla büyüme faktörü sinyalizasyon düzensizliği, fosfatidilinositol-3-OH kinaz (PI3K) yolunun aktivasyonu ve p53 ve retinoblastoma tümör baskılayıcı yolakların etkisizleştirilmesi GBM'de tanımlanan genetik değişikliklere eklenmektedir [33].

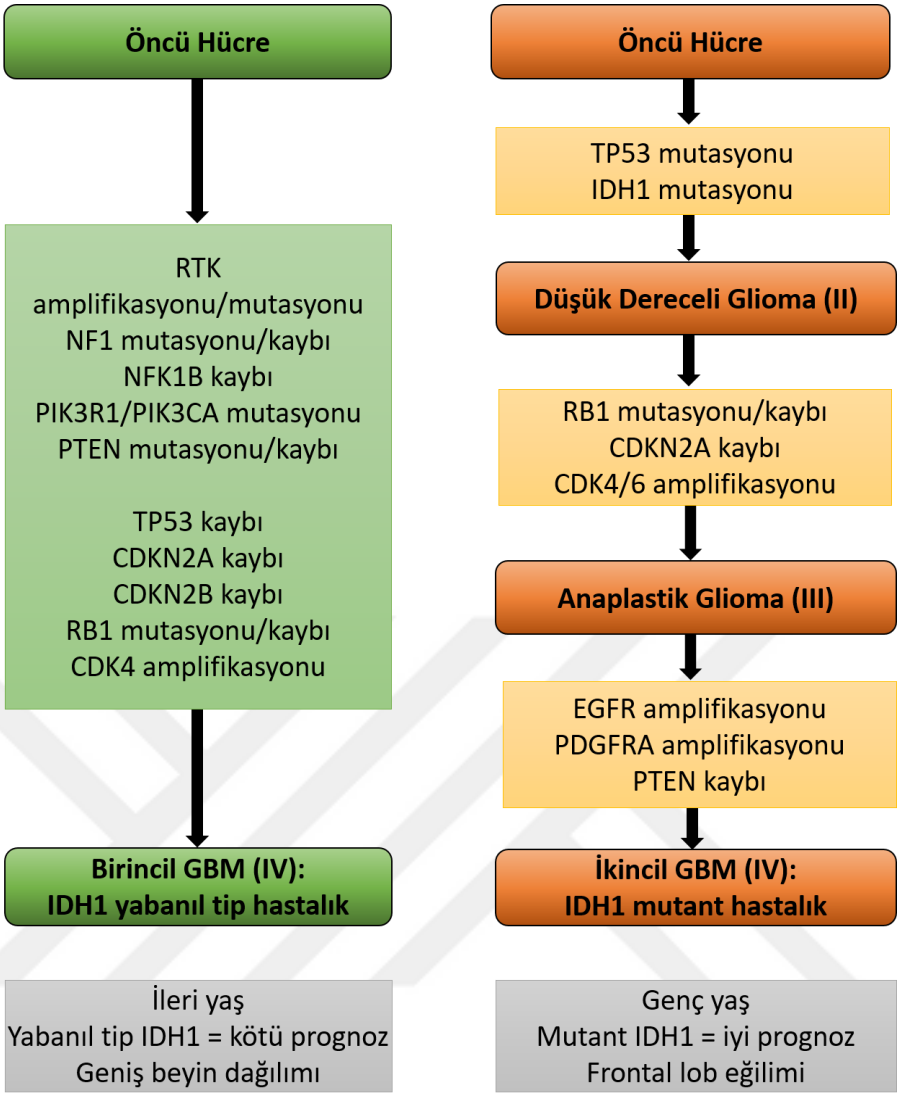
2.1.1 Birincil ve İkincil Glioblastoma

En yaygın yetişkin beyin tümörleri arasında olan GBM (DSÖ, derece IV astrositom), birincil (*de novo*) ve ikincil olarak sınıflandırılmaktadır. İkincil GBM'ler düşük dereceli (DSÖ, derece II veya III) gliomalardan türetilmiştir. Her iki GBM sınıfı da doğada yaygın görülmekte, fonksiyonel tümör davranışı, tedavi stratejisi ve klinik sonuçlarla birlikte dahil olan moleküler yollar farklılık göstermektedir [40].

EGFR geninin amplifikasyonu ve protein ürününün aktive edici mutasyonları, PTEN amplifikasyonu ve kromozom 10 kaybı birincil GBM'nin ayırt edici özellikleridir. Hem birincil hem de ikincil GBM'ler, kromozom 10q'da ortak heterozigotluk kaybına sahiptir. PTEN geninin kromozom 10 üzerinde yer almasına rağmen, bu gendeki mutasyonlar sadece birincil GBM'de gözlenir. Bu sebeple birincil ve ikincil GBM arasında paylaşılan özellikler olmasına rağmen gliomaların onkogenezinde farklı genetik olaylar sorumlu olmaktadır. GBM onkogenezinde en erken gerçekleşen genetik olaylardan biri IDH1 veya IDH2 geninin mutasyonudur. Telomeraz ters transkriptaz (TERT) geninin promotöründeki mutasyonlar, telomer uzunluğunun korunmasına ve hücre sağkalımında rol oynayan telomeraz aktivitesinin artmasına yol açar. TERT mutasyonu hem birincil hem de ikincil GBM'de tümör oluşumu sürecinde gerçekleşen erken olaylardandır [40].

Yapılan çalışmalarda analiz edilen 601 gen arasında belirgin şekilde somatik mutasyona uğramış genler ve mutasyon yüzdeleri şu şekildedir; TP53 (%42), PTEN (%33), nörofibromatoz-1 (NF1) (%21), EGFR (%18), RB1 (%11), PIK3R1 (%10) ve PIK3CA (%7). Bununla beraber, çoklu genomik analiz türlerinin bütünleştirilmesiyle daha önceden tanımlanmış değişikliklerin bilinen yolaklara yansıtılması sağlanmıştır. Bu yaklaşım sayesinde, p53, Rb ve reseptör tirozin kinaz (RTK)/Ras/fosfoinositid 3-kinaz (PI3K) yolağı düzensizliğinin GBM insidansını artırdığı ortaya çıkarıldı [41].

Birincil ve ikincil GBM'ler farklı öncü hücrelerden kaynaklanabilirler (Şekil 2.4). Birincil GBM, *de novo* (kendiliğinden) ortaya çıkmakta, p53 ve RB yolu işlev bozukluğunun yanı sıra RTK/Ras/PI3K sinyal düzensizliği de sergilemektedir, bu da baskın yabanıl tip IDH1 genotipi sebebiyle kötü prognoza sahip ileri yaş hastalarında ortaya çıkan tümörlere yol açmaktadır. Buna karşın ikincil GBM'dan önce, düşük dereceli glioma (II) veya doğrudan glioblastomaya ilerleyen anaplastik glioma lezyonları görülmektedir. İkincil GBM daha genç hastalarda ortaya çıkan ve daha iyi bir prognoz sağlayan ve sınırlı frontal lob eğilimi olan mutant bir IDH1 genotipinin kontrolündedir [41].



Şekil 2.4 GBM onkogenezine sebep olan genomik değişiklikler [41]

Genomik ve proteomik analizlerden elde edilen bilgilerle RTK'lerin (EGFR, PDGFRA ve MET dahil), PI3K yolunun, PTEN ve NF1 kaybı tarafından aktive edilen sinyal yollarının ve mutant IDH proteinlerinin glioblastoma patobiyolojisinde merkezi rollerde yer aldığını anlaşılmıştır. EGFR amplifikasyonu, birincil glioblastomların yaklaşık %50'sinde gözlenir ve kötü prognoz ile ilişkilidir. Ayrıca, EGFR ile amplifiye edilmiş hücrelerin %50'si, gen düzenlemesi olan EGFRvIII mutantını barındırır. EGFRvIII ekspresyonunun, tek başına yabanıl tip EGFR ekspresyonundan daha kötü bir prognoz sağladığı belirlenmiştir. EGFR/EGFRvIII durumuna benzer şekilde, hücre ve reseptör heterojenlikleri, PDGF/PDGFR'nin agresif glioma büyümesini desteklediği farklı bir mekanizma gibi görünmektedir. RTK, glioblastomaların %5'inde amplifiye

edilmiştir, 62 glioblastoma örneğinden 18'inde (%29) aşırı eksprese edildiği ve daha kısa medyan sağkalıma sahip olduğu bulunmuştur ve nadiren mutasyona uğramıştır. Ayrıca, c-MET'in, artan EGFR/EGFRvIII seviyelerine sahip glioblastoma hücrelerinde birlikte aktive olduğu bulunmuştur. SRC ve SFK (Src kinaz ailesi), glioblastoma hasta numunelerinde ve hücre dizilerinde sıklıkla aktive edilir ve glioblastomada yaygın olarak eksprese edilir. SFK, glioblastomada yaygın olarak aşırı eksprese edilen büyüme faktörü reseptörlerinden gelen sinyallere aracılık ederek SFK aktivasyonu için potansiyel bir açıklama sağlar [41].

GBM'ler de dahil olmak üzere pek çok kanser türünde kinazların aktivasyonunda etkili PI3K sinyal yolu düzensizdir. Yukarıda bahsedilen RTK amplifikasyonu/mutasyonu ve PTEN kaybı gibi önemli genomik değişikliklerin tümü bu yolu aktive eder. PI3K, hayatta kalma, çoğalma, göç ve istila dahil olmak üzere GBM ile ilgili süreçleri yürütmekle görevlidir. Son çalışmalar iyi tanımlanmış işlevlerine katkıda bulunmuş ve GBM'de PI3K işlevinin altında yatan yeni mekanizmalar ortaya çıkarılmıştır. Spesifik olarak CD95, PI3K ve SFK ile etkileşim yoluyla istilayı teşvik eder, GSK3b (glikojen sentaz kinaz 3 beta) aktivasyonunu tetikler ve matris metalloproteinaz (MMP) ekspresyonunun indüklenmesini sağlar. Bunlara ek olarak PTEN kaybına bağlı AKT aktivasyonu, GBM'de RTK inhibitör duyarsızlığına katkıda bulunmaktadır. PTEN, PI3K sinyalini doğrudan antagonize eder ve kanserde en sık değişikliğe uğrayan genlerden biridir. GBM'lerin yaklaşık %50'sinde genomik kayıp, mutasyon veya epigenetik inaktivasyona uğrar, bu da yüksek seviyelerde PI3K aktivitesi ve aşağı akış sinyali ile sonuçlanır (Koul 2008). PI3K yolu, gliomalarda itici bir güç olduğundan, kritik negatif düzenleyicisi PTEN'in ifadesindeki veya işlevindeki küçük değişikliklerin bile tümör hücresi davranışı üzerinde derin etkileri vardır [41], [42].

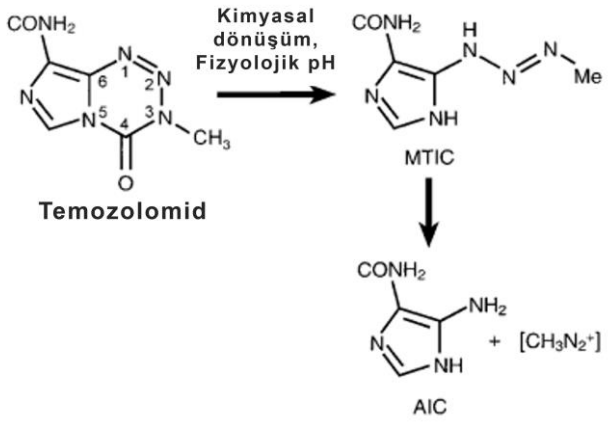
GBM'de gözlenen bir diğer genetik değişiklik ise NF1 (Nörofibromatoz tip 1) geninin inaktivasyonudur. NF1 geni, Ras ve mTOR sinyalleşmesini negatif olarak düzenleyen güçlü bir tümör baskılayıcıdır. NF1 mutasyonu, mTOR'un Ras aracılı hiperaktivasyonuna bağlı olarak artan hücre proliferasyonu ve göçü ile sonuçlandığı ortaya çıkarılmıştır [41].

2.4 Glioblastoma'nın Tedavi Stratejileri

Glioblastoma dahil olmak üzere malign gliomalar için tedavi seçimini hastanın yaşı, kitlenin (tümör) hacmi, lokalizasyonu ve hastanın yaşam kalitesi gibi çeşitli faktörler etkilemektedir. Tedavi alternatifleri arasında kemoterapi, total veya subtotal rezeksiyon ve radyoterapi yer alır [23], [30]. Glioblastoma multiforme yüksek proliferatif aktivite ile karakterizedir. GBM'nin invaziv doğası nedeniyle cerrahi rezeksiyon tümör hücrelerini nadiren ortadan kaldırmakta ve nüksü önlemek adına cerrahi rezeksiyon sonrası tedavi gerekmektedir. Kan-beyin bariyeri tedaviyi zorlaştırmakta, hipoksi alanlarında bulunan tümör hücrelerinin radyoterapiye olan direnci sebebiyle tedaviler etkili olamamaktadır. Güncel GBM tedavisinin temelini ise mümkün olduğu ölçüde cerrahi rezeksiyon, ardından kemoterapi ve radyoterapi oluşturmaktadır [25], [28]. GBM'de kemoterapinin bel kemiğini alkilleyici ajanlar (temozolomid, prokarbazin, karmustin, lomustin, fotemustin, nimustin) oluşturur. Temozolomid ve prokarbazin DNA bazlarına metil grupları bağlayarak etki gösterir. Buna karşılık daha toksik olan lomustin ve karmustin gibi ajanlar metilasyona ek olarak DNA sarmalları arasında çapraz bağlar oluştururlar. Bu kemoterapötik ajanların etkinliklerine rağmen kemik iliği baskılanması gibi belirgin yan etkileri nedeniyle genel kullanıma girmelerini kısıtlamıştır [30]. Diğer kemoterapotiklerle karşılaştırıldığında yüksek sağkalım süresi ile temozolomid (TMZ) ve radyoterapi uygulaması GBM tedavisinde standart hale gelmiştir [25].

1970'lerde keşfedilen TMZ, yeni teşhis edilen beyin tümörlerinin tedavisinde 2005 yılında FDA (Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi) tarafından onaylanan bir DNA alkilleyici ajandır [28]. İmidazotetrazin serisinin bir alkilleyici ajanı olan TMZ'nin moleküler ağırlığı 194,15 g/mol olup hızlı emilme ve uygulama kolaylığı sayesinde hastalarda neredeyse % 100 absorbe edilerek iyi bir biyoyararlanıma sahiptir. Yapılan çalışmalarda TMZ'nin hücre döngüsünü durdurduğu, tümör ilerlemesini geciktirdiği, mitotik yıkıma sebep olduğu, apoptozu ve otofajiyi indüklediği kanıtlanmıştır [6], [7]. Glioblastomların primer tedavisinde bugüne kadar alkilleyici ajanlardan başka klinik çalışmalarda etkinliği kanıtlanmış başka bir kemoterapötik, hedefli ilaç, biyolojik ajan (immünoterapötik, gen tedavisi, onkolitik virüs) ya da kombinasyon olmamıştır [30].

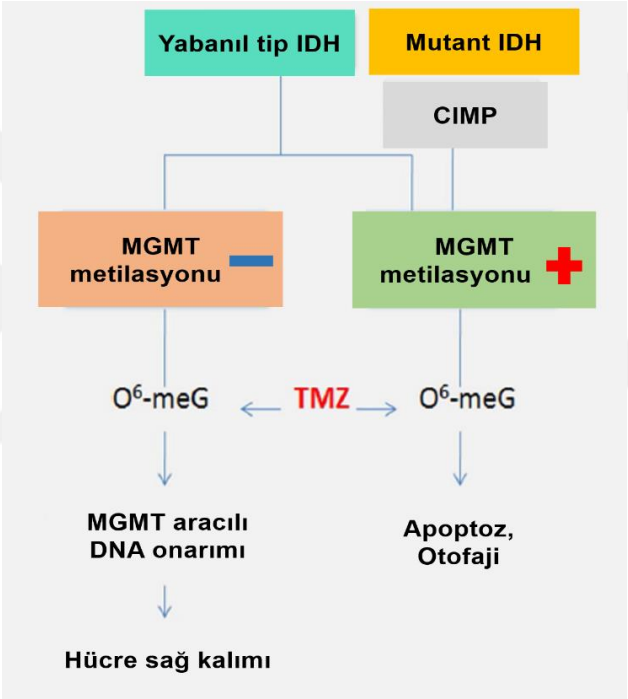
GBM tedavisini yönlendiren moleküler belirteçlerden biri olarak kabul edilen MGMT (O(6)-Metilguanine-DNA MetilTransferaz) metilasyonunun alkilleyici ajanlara verilen yanıtın öngörülmesi konusunda bu etkinin direkt olarak MGMT'nin DNA-hasar tamiri etkisine bağlı olduğu hipotezi oluşturulmuştur. Alkilleyici ajanlar, DNA'da çift sarmal kırıkları ve sarmallar arası çapraz bağlanma yaratarak etki mekanizması oluştururlar. Alkilleyici ajanların yarattığı hasar büyük ölçüde MGMT tarafından onarılır. MGMT, DNA'daki hasarların tamirinde görev alan bir enzim olup miktarı epigenetik olarak düzenlenmektedir. MGMT enziminin promoter bölgesinin metillenmesi, alkilleyici ajanların gösterdiği en etkin mekanizmadır. GBM tedavisindeki ilk çalışmalar karmustin'in promoter metilasyonu yolu ile MGMT geninin susturulmasında etkili olmuş ve hastaların sağkalımının arttığı gösterilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarda rutin tedavi kapsamına giren TMZ ile de aynı etki ve sonuçlar elde edilmiştir [30].



Şekil 2.5 Temozolomid'in kimyasal dönüşümü [43]

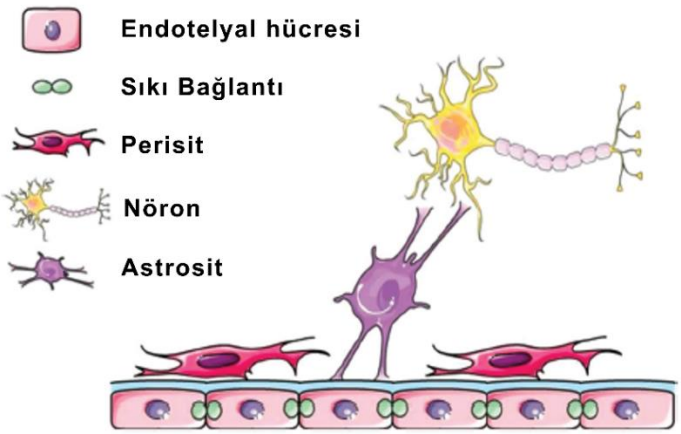
DNA'nın metilasyonu, TMZ'nin kötü huylu hücrelere sitotoksisitesinden sorumlu ana mekanizma gibi görünmektedir. TMZ'nin kendiliğinden reaktif metilleme ajanı MTIC (5-(3-metiltriazen-1-il)imidazol-4-karboksamid) ve AIC (5-aminoimidazol-4-karboksamid)'e dönüşümü, temozolomidin yüksek elektropozitif C4 pozisyonundaki suyun etkisiyle başlatılır (Şekil 2.5) [43].

GBM'de uygulanan TMZ tedavisi MGMT promotör metilasyonu ile sonuçlanabilmektedir. TMZ, O6-metilguanin (O6-meG) gibi DNA lezyonlarına neden olur. MGMT, O6-alkilguanini çıkararak guanini normale döndürür ve böylece tümör hücresinin hayatta kalmasını teşvik eder. Prromotör bölgesinin hipermetilasyonu, genin silinmesi veya ekspresyonunun baskılanması ile MGMT işlevi bozulabilir. Glioblastomlarda, IDH1/2 mutasyonları, bu durumun bir parçası olarak MGMT metilasyonunu içerebilen CpG adası hipermetilasyonu fenotipine (CIMP) neden olur. MGMT aracılı DNA onarım işlevinin kaybı, DNA zinciri kopmalarına, apoptoza, otofajiye ve tümör hücresi ölümüne yol açabilir (Şekil 2.6) [44].



Şekil 2.6 TMZ tedavisi için öngörücü bir işaret olarak MGMT promotör metilasyonu [44]

Glioblastoma multiforme (GBM) tedavisi, beyin cerrahisindeki en zorlu problemlerden olmakla beraber etkili bir tedavi yöntemi hala bulunamamıştır. GBM'nin patogenezi hakkındaki yeterli bilginin bulunmaması, tümörün agresif lokal yayılımı, çevredeki sağlıklı beyin dokularına zarar vermeden tümörün çıkarılamaması ve kemoterapinin kan-beyin bariyeri (KBB) nedeniyle beyin tümörlerine erişimin kısıtlı olması GBM tedavisinde karşılaşılan zorluklardır [45].



Şekil 2.7 Kan-beyin bariyerinin şematik çizimi [46]

Kan-beyin bariyeri (KBB), besinlerin taşınması, homeostaz ve vücut ile beyin arasındaki iletişimden sorumlu olan, yabancı maddelerin beyne ulaşmasını engelleyen, dinamik, esnek bir arayüzdür. Merkezi sinir sistemindeki damarlar da vücudun geri kalanındaki kan damarları gibi damar içindeki kan ile doğrudan temas halinde olan ince bir endotelyal hücre tabakası ile kaplıdır. Ancak MSS kan damarları, endotel hücrelerinin sıkı bağlantılar oluşturan özel protein yapıları tarafından birbirine sıkıştırılmış zarları ile yan yana sıkıca paketlenmeleri bakımından farklılık gösterir. Bunlar, kandan MSS'ne maddelerin akışını kısıtlayarak, sadece su, bazı gazlar ve hücre zarlarından (lipidde çözünen moleküller olarak adlandırılan) yardımsız geçebilen bileşikler gibi küçük moleküllerin beyne serbestçe geçmesine izin verir. Zarlar ayrıca potansiyel olarak zararlı bileşikleri ve ilaçları beyinden dışarı atan akış pompaları içerir. Zarlardaki diğer kanallar, taşıyıcılar ve reseptörler, temel besin maddelerinin ve moleküllerin beyne girmesine yardımcı olur. MSS kan damarları ayrıca vücudun başka yerlerinde bulunan kan damarlarından çok daha fazla destekleyici hücre (perisit) ile çevrilidir. Ayrıca astrosit adı verilen sinir hücreleri ile çevrilidirler. Perisitler ve astrositler ekstra bir bariyer sağlar ve KBB'nin seçiciliğinde rol oynayan genlerin ekspresyonunu etkiler (Şekil 2.7) [28].

Kan-beyin bariyerinin, GBM tedavisinde etkili ilaç keşfinde yarattığı zorluklardan en önemlisi MSS geçirgenliği sebebiyle etkili ilaç konsantrasyonu ve bunun sürdürülebilmesidir. İlaç, diğer dokulara yayılmadan tümör bölgesine ulaşmalı ve terapötik konsantrasyonlara ulaşmalıdır.

MSS ilaçları uygun lipofilikliğe ve boyuta sahip olarak KBB'ni geçebilmelidir. Beyin, yabancı maddeleri tanımak ve çıkarmak için akış pompalarını kullanır ve özellikle ABC taşıyıcıları, büyük miktarda lipofilik molekül, ksenobiyotik, toksik metabolit ve ilaç akışını önler. MSS tümörleri KBB'nin yapısal bütünlüğünü tehlikeye atarak tümör çekirdeğinde sızıntı yapmasına neden olur. Bu, küçük moleküllerin tümör bölgesinde daha geçirgen olabileceğini düşündürse de, çoğalan hücreleri tümörün kenarında çevreleyen KBB bozulmadan kalır. Bu nedenle, KBB fizyolojisi ve bileşik geçirgenliği, MSS ilaç keşif süreci için kritik hususlardır [28].

GBM tedavisi geliştirilirken karşılaşılan en büyük zorluk, hedef bölgede terapötik konsantrasyonlara ulaşılmasında yaşanmaktadır. KBB'nin varlığı GBM tedavisindeki en büyük zorluklardandır. Bu nedenle, GBM ilaç tasarımında hedef seçimi, geçirgenlik ve ilaç farmakokinetiği önemli hususlardır [28].

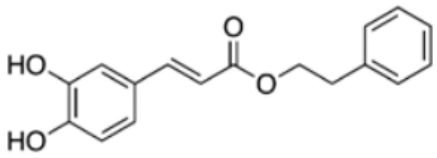
TMZ, standart tedavi olarak uygulanmasına rağmen glioblastomanın ilaca direnç göstermesi sebebiyle hastaların sağkalımı ortalama 22 aydır ve primer tümör sıklıkla yeniden ortaya çıkmaktadır [5], [8]. Buna ek olarak mide bulantısı, kusma, iştahsızlık, ishal, deri döküntüsü, saç dökülmesi, yorgunluk, baş dönmesi, bulanık görme, uykusuzluk ve baş ağrısı gibi yan etkileri bulunan TMZ'nin tedavide kullanımı sınırlanmaktadır. TMZ tedavisinde hem toksik etkiyi azaltmak hem de aktiviteyi artırmak amacıyla yeni stratejilere ihtiyaç duyulmaktadır [9]. TMZ'nin biyoaktif bileşiklerle birlikte uygulandığı çalışmalarda TMZ'nin insan beyin kanseri hücrelerinin duyarlılığını artırdığı, biyoaktif bileşiklerin kemoterapötiklere benzer etki gösterdiği ve TMZ'nin biyoaktif bileşiklerle kombinasyonunun glioblastoma tedavisinde yalnız TMZ'nin kullanımına göre daha etkili olabileceği gösterilmiştir. TMZ-doğal anti-kanser ajanlarının kombinasyonunun merkezi sinir sistemi tümör tedavileri açısından yenilikçi tedavi stratejisi olarak öngörülmektedir [5]. Mevcut tedavi yöntemlerindeki kısıtlamalara karşın etkili anti-kanser aktivite gösteren doğal ekstraktlar GBM tedavisinde potansiyel anti-tümör ajanlar olarak görülmektedir [10].

2.5 Anti-Kanser Ajanlar Olarak Polifenoller

Yapılan çalışmalarda antioksidan, antiproliferatif, anti-anjiyojenik, antikanser, immünomodülatör ve hipoglisemik özellikleri belirtilen polifenoller, yeni ilaç keşfi çalışmalarında ilgi çekici konuma gelmiştir [47]. Doğal veya sentetik polifenolik bileşiklerin çeşitli kanserlerde gösterdikleri terapötik özelliklerin araştırılmasıyla, bal arısı propolisi veya bitkilerin polifenol bakımından zengin özütlerinin kanser hücrelerini kemoterapiye daha duyarlı hale getirmede ilaç olarak uygulanması yeni bir yaklaşım haline gelmiştir. Bal arısı propolisinde bulunan birincil fenolik bileşikler olan kafeik asit, kafeik asit fenetil ester (CAPE) ve ferulik asit, başta glioma olmak üzere farklı kanser türlerinde antikanser özellikler sergilemektedir [48].

2.1.2 Kafeik Asit Fenetil Ester (CAPE)

Flavonoid benzeri doğal bir bileşik olan kafeik asit fenetil ester (CAPE), bal arısı propolisin en aktif polifenolik bileşenidir [11]. -20^{0}C saklama sıcaklığında ticari ürün olarak kullanılan ve etanol, dimetil sülfoksit (DMSO) ve etil asetat (50 mg ml^{-1}) içerisinde çözünebilen beyaz bir tozdur. Ampirik formülü $C_{17}H_{16}O_4$'tür (Şekil 2.8) ve 284.31 g.mol^{-1} moleküler ağırlığa sahiptir [49].



Şekil 2.8 CAPE'nin kimyasal yapısı [49]

CAPE'nin akut immün yanıtların baskılanması, antioksidan, antimitojenik, antikarsinojenik, antiinflamatuar ve antialerjik etki gibi çeşitli *in vitro* biyolojik etkileri bildirilmiştir. Doğal antioksidan olarak sınıflandırılan CAPE, kanser, diyabet ve kardiyovasküler, Alzheimer ve Parkinson gibi hastalıklarda *in vivo* oksidatif hasarları önleme potansiyeli barındırmaktadır [11], [12], [50]. Ayrıca CAPE'nin diyabetin neden olduğu oksidatif stresi ve nöroinflamatuar belirteçler olan tümör nekroz faktörü (TNF)-a ve interferon (IFN)-g ekspresyonunu baskıladığı, hayvan modellerinde sinir hücrelerinde gerçekleşen apoptozu ve

astrosit proliferasyonunu inhibe ettiği bilinmektedir. Hücrelerde çoklu moleküler mekanizmalarda aktivite gösteren bir biyoaktif bileşik olan CAPE, beyin malignitelerinde kontrolsüz hücre proliferasyonunu sinir hücrelerinin farklılaşmasını indükleyerek nörofarklılaşmayı indükleme aktivitesi göstermektedir [51]. Tümör istilası ve metastatik yollarda etki gösteren CAPE'nin tümör metastazında önemli sistemlerden biri olan matriks metalloproteinazlarda ve MMP-2 mRNA inhibisyon etkisi bulunmaktadır [52]. Karsinogenezdeki antioksidan aktivitesi araştırıldığında CAPE'nin DNA zinciri hasarı, protein degredasyonu ve membrana lipid peroksidasyon mekanizmalarını engellediği görülmüştür [53]. CAPE, apoptoz yolaklarını indükleyerek kanserojen insidansın bastırılması ve transkripsiyon faktörü nükleer faktör-kappa B (NF-κB) inhibisyonu aktiviteleriyle kanser hücrelerinde etkili bir anti-kanser ajanıdır. Bunlara ek olarak CAPE'nin anjiyogenez, tümör istilası ve metastaza karşı inhibe edici etkisi bulunmaktadır [11], [12]. CAPE, kanser hücrelerinde proapoptotik Bax ve Bak proteinlerinin aktivitesini indükleyerek, apoptoz inhibitörü olan Bcl-2 ekspresyonunu azaltarak, sitokrom c'yi serbest bırakırak, apoptozun içsel yolaklarının aktivasyonunda görev almaktadır. Ayrıca CAPE'nin apoptozu p53 ve p21 proteinleri ile p38 MAPK, JNK, ERK kinazlarının aktivasyonu aracılığıyla indüklediği bilinmektedir [54]. Yapılan çalışmalarda CAPE'nin NF-kB'yi inhibe ettiği, TRAIL ve Fas reseptörünün uyarılmasıyla kanser hücrelerinde apoptozun dışsal yolağını indüklediği bildirilmiştir [55]. CAPE'nin pro-apoptotik etkisi insan lösemi hücre hattın (HL-60), insan yumurtalık karsinomu (SK-OV-3), insan akciğer karsinomu (NCI-H358), insan hepatoselüler karsinom (HepG2), C6 glioma, insan servikal kanseri (ME180) ve insan pankreas kanseri (PANC-1) gibi çeşitli kanser türlerinde kaspaz-3 veya kaspaz-7'nin artan aktivitesi ile kanıtlanmıştır [54].

Polifenollerin düşük emilim, yetersiz midede kalma süresi, düşük geçirgenlik, gıda işleme ve saklama sırasında istikrarsızlık ve çevresel streslere (örneğin nötr pH ve oksijen) karşı savunmasızlık gibi ortak özelliklerini barındıran CAPE'nin başlıca ana dezavantajlarından biri suda düşük çözünürlüktür [47].

CAPE, plazma enzimleriyle hidrolize uğrayabilir. Bu sebeple kısa yarı ömre sahiptir. Suda zayıf çözünür karakteri, düşük biyoyararlanım ve düşük biyolojik performansı nedeniyle *in vivo* ve *in vitro* etkinliğini kısıtlıdır [12].

CAPE gibi çözünürlüğü düşük moleküllerin kanser tedavi uygulamalarında kanser hücrelerince absorbe edilip etkinliklerinin artırılması için çözücü takviyesi gerekmektedir. Ancak bu yöntemle hem moleküllerin etkisi azalmakta hem de toksik etkiye sebep olmaktadır. Bu kısıtlamaların aşılabilmesi için geliştirilen tekniklerden biri polifenolik moleküllerin farklı taşıyıcılara dahil edildiği kapsülleme sistemleridir. Bu taşıyıcı sistemler çevresel streslere karşı yüksek koruma, hedeflenen salım ve yüksek biyoyararlanım gibi birçok avantaj sağlamaktadır. Nanotaşıyıcılar CAPE'nin en büyük dezavantajı olan hidrofobik özelliğinin üstesinden gelmenin etkili bir yoludur. CAPE'nin misel yapılar ile kopolimer içinde kapsüllenmesinin CAPE'nin kontrollü salınımına ve kolon kanseri hücrelerinde antitümör aktivitesinde etkili olduğu gösterilmiştir [47].

Kapsülleme işlemi, CAPE gibi hassas biyoaktif polifenolik bileşikler için çevreyle arasında bir koruma bölgesi oluşturarak bu bileşikleri zorlu şartlar altında muhafaza eder. Ayrıca enkapsülasyon sayesinde çeşitli ortamlarda salınımları kontrol edilebilen CAPE'nin biyoerişilebilirliği ve biyoyararlanımının artırılması sağlanır. Bunlara ek olarak CAPE'nin ilaç olarak kullanımını kısıtlayan tat, koku gibi duyusal dezavantajları da maskelenebilmektedir [47].

2.6 Glioblastoma Tedavisinde Nanoterapötik Yaklaşımlar

Nanobiyoteknoloji, ilaçların sitotoksik etkisini azaltmak veya ilaç direncinin üstesinden gelmek için antikanser ilaçların keşfinde ve yeni formülasyonlarının hazırlanmasında son yıllarda büyük ilgi görmektedir [45]. Kemoterapide ilaçlar, kanser hücrelerinin DNA'larına zarar vermek ve hızlı büyümelerini önlemek için vücuttaki hücrelere nüfuz eder ve kanser hücreleri için normal hücrelere göre daha toksiktir. Tümöre terapötik maddenin seçici olarak verilmesi için nanotaşıyıcı bazlı ilaç dağıtım sistemleri geliştirilmiştir.

Nanotaşıyıcılar kullanılarak hedefe yönelik tedavi, geleneksel kemoterapiye göre avantajlı olarak nitelendirilmektedir. GBM'de bulunan ancak normal beyinde olmayan reseptörleri hedeflemek için farklı nanotaşıyıcılar kullanılır, böylece sistemik olarak uygulanan ilaç tümöre verilir ve normal beyin dokusu korunur [45].

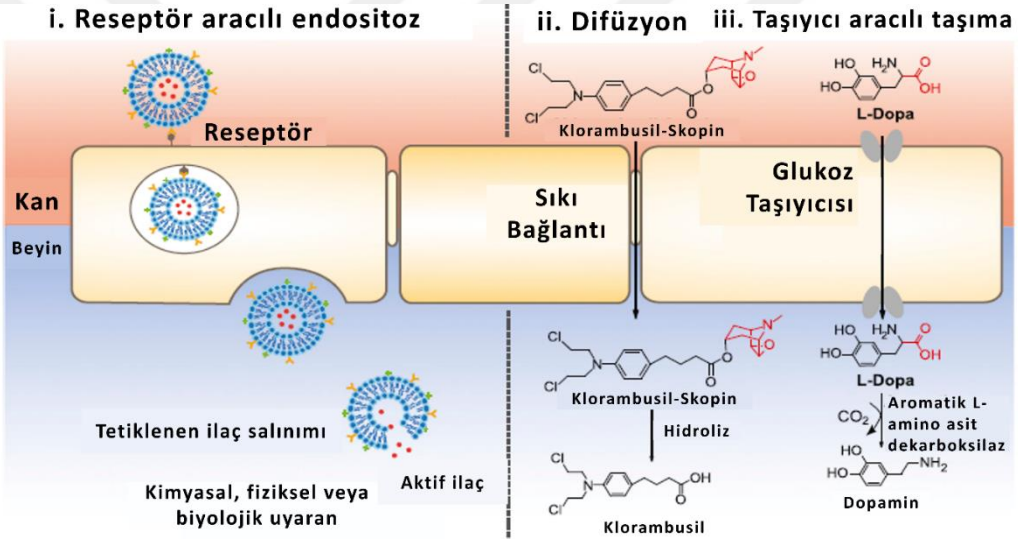
2.1.3 İlaç Taşıyıcı Sistemler Olarak Nanopartiküller

Nanopartikül tabanlı ilaç dağıtım sistemleri, tümör hücrelerinde lokalizasyonu için bunların tümöre özgü antikorlar, peptitler, şekerler, hormonlar ve antikarsinojenik ilaçlarla kaplanmasıyla karakterize edilebilir. Nanopartiküller aracılığıyla kemoterapötik ajanlar, nano ölçekli yüzey reseptörleri eklenerek insan vücudunda belirli alanlara hedeflenebildiğinden geleneksel ilaç sistemlerine göre yenilikçi bir yaklaşım sunmaktadır. Yüzey reseptörleri sayesinde hedef dokuyu tanıyıp bağlanan nanopartiküller kontrollü salınımla ilaç moleküllerini serbest bırakır ve sağlıklı hücreleri ilacın sitotoksisitesinden korumuş olur. Ayrıca nanopartiküle kapsüle edilen ilaçlar degredasyondan korunduğu gibi boyutlarının da son derece küçük olması sebebiyle kılcal damarlardan geçebilmekte ve kanser hücreleri tarafından alınarak hedef bölgede etkili ilaç birikimi sağlanmış olur. Bu sebeple nanopartiküller, gelişmiş hedef özgüllüğü olan kontrollü ilaç dağıtım sistemleri olarak, geleneksel kanser tedavisindeki sınırlamaların üstesinden gelebilme potansiyeli barındırmaktadır [56].

GBM'de standart tedavi olan temozolomidin, zayıf ilaç dağıtımı, çözünürlüğünün düşük olması, hücre içinde hidroliz ile kolayca inaktif hale gelmesi, KBB'yi geçememesi ve hedef dışı DNA hasarı yaratması sebepleriyle kullanımı kısıtlanmaktadır. Bu dezavantajlarının üstesinden gelebilmek adına nanopartiküler sisteme aktarılan temozolomidin GBM tedavisinde umut vereceği düşünülmektedir [28].

Genel olarak nanopartiküller (NP), lipozomlar, dendrimerler, miseller ve ferritin gibi organik ve polimerik; altın NP'ler, kuantum noktaları, demir oksit ve lantanit iyonları gibi inorganik olarak sınıflandırılabilmektedir. Organik NP'ler, imalat için kimya ve yapı açısından daha fazla esneklik sağlarken, inorganik NP'ler, belirli optik veya manyetik özellikler barındırdıkları için ilgi çekici fiziksel özelliklere sahiptir. NP'ler için KBB geçirgenliğini etkileyen boyut, yük ve şekil gibi önemli

faktörler bulundurmaktadır. NP boyutu, hücrelerde pasif hedeflemeyi ve biyolojik dağılımı etkileyen temel bir özelliktir. NP'ler 5-100 nm boyutunda, ilaç tutma kapasitesi ve gelişmiş ilaç geçirgenliği sebebiyle sağlıklı beyin hücrelerinde düşük birikim ile beyin tümörlerinde seçici geçirgenliğe sahiptir. KBB boyunca taşınmasını etkileyen önemli bir faktör olan NP'lerin yüzey yükü ise toksisite ve dağılım profillerini etkilemekte ve beyin iletiminde -15 ile -60 mV aralığında zeta potansiyele sahip olmaktadır [28]. Beyin tümörlerine ilaç uygulamalarında KBB'nin yarattığı zorluğun üstesinden gelinebilmesi adına taşıyıcı aracılı taşımanın kullanılması tercih edilmektedir. Beyin kılcal endotelinin spesifik mekanizmalarının anlaşılması ve ilaçların beyin dokusuna penetrasyonunu arttırmak için çeşitli stratejiler geliştirilmektedir [45].

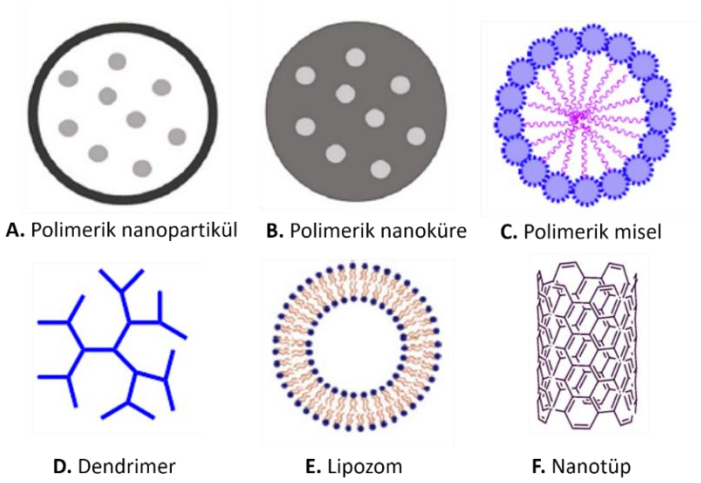


Şekil 2.9 Kan-beyin bariyerinden geçiş stratejileri [28]

Reseptör aracılı endositozda, uygulanan ilaç endositozu tetiklemek için KBB'deki bir reseptöre bağlanan bir liganda konjuge edilir. Küçük lipofilik bileşikler pasif difüzyonla alınabilir. Taşıyıcı aracılı taşımada ise ilaç dağıtımı glukoz taşıyıcıları ve protein aileleri tarafından yürütülür (Şekil 2.9) [28]. Nanopartiküllere kapsüle edilen ilaç kompleklerinin KBB üzerinden GBM'ye hedeflenmesi 3 aşamadan oluşmaktadır: nanopartikül-ilaç kompleksi KBB'deki reseptörü hedef alır ve reseptörü hedefleyen ajanı geride bırakarak KBB'yi geçer; kompleks daha sonra tümör hücresi yüzeyindeki reseptöre hedeflenir ve hedefleme ajanını yüzeyde bırakır; nanopartikül tetiklenerek aktif ilaç salınımı yaparak tümör hücresine nüfuz eder [45].

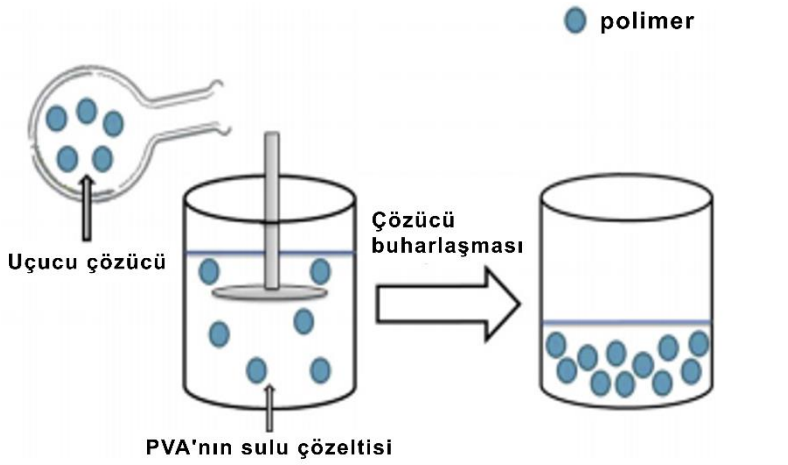
2.1.4 Polimerik Nanopartiküller

Nanopartiküler ilaç dağıtım sistemleri, ilacın varlığı, miktarı ve süresiyle ilgilenirler. Antiinflamatuar ilaçlar gibi birçok ilacın yarı ömrü kısadır ve hedeflenen bölgeye giderken çevre dokulara ve organlara yan etkilere sebep olurlar. Nanopartiküller kontrollü bir dağıtım sistemi ile hem ilacın etkinliğini korur hem de sağlıklı hücreleri ilacın yan etkilerinden korurlar. Hedef bölgeye taşınacak olan ilaç, nanomateryal bir taşıyıcıya kapsüllenerek nanopartiküler sistemdeki yerini alır. Polimerler, biyouyumluluk ve biyomimetik özellikler dahil olmak üzere ayırt edici özellikleri nedeniyle biyosensörler, kataliz ve ilaç verme gibi biyomalzemelerde büyük kullanıma sahiptir. Polimerler, terapötik maddeyi doğrudan hedefe yönlendirme, ilaç stabilitesini ve etkinliğini koruma yeteneklerinden dolayı nanopartiküler ilaç dağıtım sistemleri içerisinde yerini almaktadır (Şekil 2.10). Polimerik nanomateryaller, potansiyel olarak tehlikeli ilaçları, KBB'yi geçme problemiyle savaşmaları gereken iltihap bölgeleri veya merkezi sinir sistemi gibi vücudun hassas bölgelerine ulaştırmada kullanılabilmektedir [57].



Şekil 2.10 İlaç taşıma sistemlerinin sınıflandırılması [58], [59]

Küçük boyut, biyobozunurluk, suda çözünürlük, toksik olmama, uzun raf ömrü ve depolama sırasında stabilite gibi etkili özellikleri sebebiyle polimerik nanopartiküller, ilaçların, proteinlerin, DNA'nın ve genlerin hedeflenen bölgelere iletilmesinde kullanılmaktadır. polimerik nanopartiküllerin, anti-kanser terapi, aşı ve gen terapisi, KBB'yi geçme, tanı ve tıbbi uygulamalarda kullanımları bulunmaktadır [57].



Şekil 2.11 Çözücü buharlaştırma yöntemi [57]

Polimerik nanopartiküllerin sentezlenmesinde kullanılan çözücü buharlaştırma yönteminde polimer ve ilaç uçucu bir çözücü (örneğin polivinil alkol, PVA) içinde karıştırılarak emülsiyon oluşturulduktan sonra buharlaştırılarak çözücü emülsiyonu bir süspansiyona dönüştürülür. Daha sonra katı nanopartiküller ultrasantrifüj ile toplanır, saflaştırma işlemi için yıkanır ve nanopartiküller liyoflize edilir. Poli laktik-ko-glikolik asit (PLGA) polimeri kullanılarak sentezlenen nanopartiküller için bu yöntem uygulanır (Şekil 2.11) [57].

2.7 Glioblastoma Tedavisi İçin Nanotaşıyıcı Temelli İlaç Kombinasyon Terapileri

GBM tedavisinde yer alan kemoterapinin kısıtlamaları arasında KBB, karmaşık tümör heterojenitesi, glioma kök hücreleri, DNA hasar onarım ve ilaç direnç mekanizmaları gelmektedir. Kemoterapötik ilaçların beyin tümörleri üzerinde etkili olamamasının en büyük nedeni çoklu ilaç direncidir. İlaç direnci mekanizmalarında en sık karşılaşılan ATP bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcı aracılı ekzositoz olmuştur. İlaç direnç mekanizmalarında rol oynayan taşıyıcılar inhibe edildiğinde uygulanan tedavide önemli ölçüde fayda sağlanmıştır [60].

Kemoterapötik ajanların etkinliği doza bağlı olarak toksisiteleri açısından sınırlanmaktadır. KBB'nin beyin dokusunu yabancı maddelere karşı koruması sebebiyle beyinde terapötik ilaç seviyelerine ulaşmak adına yüksek doz uygulaması yapılmaktadır. Antikanser ilaçlarında doz artışı metodu önemli bir toksisiteye sebep olmaktadır. GBM tedavisinde uygulanan birçok kemoterapötik

ilaç beyinde verimli ilaç birikimine ulaşmak için gereken dozlarda beklenmeyen toksisite göstermiştir. GBM tedavisindeki kemoterapötik ajanlardan temozolomid lenfopeni, trombositopeni ve nötropeni; bevacizumab ise sıklıkla hipertansiyon, lökopeni, merkezi olmayan sinir sistemi kanaması ve tromboembolizm etkisine neden olmaktadır [61], [62]. GBM tedavisinde yaşanan tüm zorluklar sebebiyle ilaçların nanopartiküler sistem içerisine enkapsüle edilmesinin yanı sıra sinerjik etken maddelerle kombinasyon halinde çalışılarak ilaç etkinliğinin artırılması ve toksisitenin düşürülmesi hedeflenmektedir.

İlaç kombinasyonları çalışmalarında, etkinliği artırmak, toksisiteyi azaltmak ve beyin hücrelerinin ilaçlara gösterdiği direncin üstesinden gelebilmek için her bir bileşiğin güçlü ve zayıf yönlerinden yararlanılmaktadır [63].

Kemoterapötik ilaçların kimyasal modifikasyonu veya akış taşıyıcı inhibitörler gibi yaklaşımlarla potansiyel antikanser ilaçlarının araştırılmış ve bu konuda terapötik moleküllerin polar uçlarına lidip gruplar eklenerek daha lipofilik bir forma dönüştürülmüştür. Lipofilik bileşiklerin KBB'de geçirgenliğinin arttığı görülmüştür [64]. Buna karşın, ilaç molekülünün kan dolaşımıyla spesifik olmayan alım riskini de artırmaktadır. Bu nedenle GBM tedavisinde KBB geçirgenliğinin artırılmasında farklı yaklaşımların araştırılması gerekmektedir.

Lipid nanokapsüllerden oluşan bir hidrojele birlikte yüklenen paklitaksel (PTX) ve TMZ, U87MG tümör rezeksiyonunun lokal tedavisinde tek bir ilaç uygulamasından daha etkili bir şekilde tümör büyümesini baskılamıştır [65]. KBB nedeniyle ilaç moleküllerinin terapötik etki gösterebilmek için beyne ulaşamadıkları bu sebeple ilaç moleküllerini kapsülleyen nanopartiküller aracılığıyla beyne spesifik olarak taşınmasının sağlanabileceği düşünülmektedir [66]. Hidrofilik ve hidrofobik özellikteki ilaçların kapsüle edilmesi, kontrollü ilaç salınımı ve ilacın dolaşımdaki yarı ömrünün uzatılması nanopartiküler formülasyon ile sağlanabilmektedir. Serbest formda yarı ömrü 1,8 saat olan TMZ'nin, kitosan bazlı nanopartiküle kapsüllendiğinde yarı ömrünün 13,4 saate yükseldiği görülmüştür [67]. Aspirin ile TMZ etken maddelerinin PLGA nanopartikülüne birlikte kapsüllendiği bir çalışmada, ksenograft fare modelinde

sadece TMZ yüklenen partiküllere kıyasla tümör baskılanmasını artırdığı bulunmuştur [68].

Nanopartikülere yüklenen ilaç kombinasyonları tasarımındaki amaç, moleküllerin çözünürlük, stabilite ve toksisite gibi kısıtlamalarının üstesinden gelerek birden fazla ajanın hedef bölgeye taşınması ve etkili olmasıdır. Nanoformülasyonların tasarımında kombinasyon etkisi tanımlanmalı, moleküler ağırlık ve yüklerin sinerjik oranları dikkate alınmalıdır. Bu nedenle, nanoformülasyonların serbest ilaç formları ve farklı nanopartiküllere kapsüllenmiş ilaçlar ila karşılaştırmalı olarak incelenmesi sonuçların daha kapsamlı olması açısından önemlidir [63].

GBM tedavisinde yetersiz olan tek ilaç tedavilerinin yerini kombinasyon ilaç uygulamalarının alacağı düşünülmektedir. GBM'nin heterojenliği ve direnç gösterme ihtimali göz önüne alındığında, sinerjistik ve farklı moleküler mekanizmaları hedefleyen ilaç kombinasyonlarının çalışılması gerekmektedir. Moleküler yolakları hakkında giderek daha fazla bilgi edinilen GBM'nin tedavisinde kombinasyon ilaç tedavileri ve nanopartiküler sistem uygulamalarının yeni biyoteknolojik ilaç stratejileri geliştirileceği öngörülmektedir.

3

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Kullanılan Cihazlar

- Hassas terazi- Shimadzu
- Ultrasonik Su Banyosu- Bandelin Sonorex
- Sonikatör- Bandelin Sonoplus
- Manyetik Karıştırıcı-Variomag Mono
- Çalkalayıcı-Biosan Environmental Shaker ES20
- Santrifüj Cihazı-Beckman Coulter Allegra X-30 R
- Mini Santrifüj Cihazı-Hermle Z 206 A
- Vorteks-Velp Scientifica
- Çoklu Manyetik Karıştırıcı-IKA
- pH Metre-Hanna
- UV-Vis Spektrofotometre- Shimadzu UV-1800
- Zeta Sizer-Malvern ZEN 3600 Nano ZS
- Liyafilizatör-Telstar Cryodos
- FT-IR-Thermo Scientific Nicolet iS10
- CO_2 İnkübatör-Biosan ES20
- Otoklav-Hirayama
- Floresan Mikroskop-Zeiss AxioVert A01
- Biyogüvenlik Kabini-Hedlab XPROII
- Elisa Reader-BioTek PowerWave XS2
- qRT-PCR Cihazı-AriaMx Real-Time PCR System
- Nanodrop-Thermo Scientific NanoDrop One Microvolume UV-Vis Spectrophotometers
- SDS-PAGE Elektroforez Sistemi- BIO-RAD MiniPROTEAN® 3 CelI
- Western Transfer Sistemi-Trans-Blot Turbo Transfer System

3.1.2 Kullanılan Sarf Malzemeler

- Hücre üreme flaskları (T25, T75)-NEST
- Thoma Lamı- ISOLAB
- Beher-Isolab
- İnce uçlu pens
- Pipet ucu 1000 µl-ISOLAB L.005.01.003.500
- Pipet ucu 200 µl-ISOLAB L-002-R.0
- Parafilm-Bemis PM-996
- Serolojik pipetler (1,2,5,10 ml)-NEST

- 96 kuyulu mikroplaka- ISOLAB I.122.11.096 / CELLSTAR 655160
- 96 kuyulu PCR mikroplaka-Agilent
- 24 kuyulu plaka-SPL Life Sciences 13485
- 96 well soğuk bloklu PCR cooler-Eppendorf
- Hücre kryo (dondurma) tüpler-NEST 607001
- 15 ml'lik steril falkon tüpler-ISOLAB S.078.02.002.050
- 50 ml'lik steril falkon tüpler -ISOLAB S.078.02.008.050
- Steril tek kullanımlık pipetler (1, 2, 5,10 ve 25 ml'lik)-SPL Life Science
- Steril plastik pipet ucu 1000 µl- ISOLAB I.005.01.003.500
- Steril plastik pipet ucu 200 µl- ISOLAB I.005.01.002.901
- Steril plastik pipet ucu 10 µl- ISOLAB I.005.01.001.901
- 0,2 µl PCR tüpü-Axygen 15216383
- 2 ml mikrosantrifüj tüpü- NEST 620011
- Steril şırınga- Set Medikal
- 0,22 µm steril filtre- SE2M034199
- Nitroselüloz Transfer Membran- Thermo Scientific 88018
- PVDF Membran-BIO-RAD 1620177
- Filtre kağıdı -BIO-RAD 1703965
- Trans Blot Turbo Transfer Pack-BIO-RAD 1704158

3.1.3 Kullanılan Kimyasallar, Enzimler, Kitler

Nanopartikül sentezi için;

- Temozolomid (TMZ, Sigma-Aldrich T2577)
- Kafeik Asit Fenetil Ester (CAPE, Sigma-Aldrich C8221)
- Poli laktik-ko-glikolik asit (PLGA, Sigma-Aldrich 719870)
- Diklorometan (DCM, Merck 106050)
- Dimetil formamide (DMF, Sigma-Aldrich ReagentPlus® D158550)
- Etil Alkol (Merck 64-17-5)
- Polivinil Alkol (PVA, Sigma-Aldrich 363138)

PBS tamponunun hazırlanması için;

- Sodyum klorür (NaCl, Sigma-Aldrich 13423)
- Monosodyum fosfat (NaH_2PO_4, Sigma-Aldrich 04270)
- Disodyum fosfat dihidrat ($Na_2HPO_4.2H_2O$, Sigma-Aldirch 04272)
- Sodyum hidroksit (NaOH, Sigma-Aldrich 71690)
- Hidroklorik asit (HCl, Sigma-Aldrich 30721)

Hücre kültürü çalışmaları için;

- Dulbecco's Medified Eagle Medium (Sigma 6046)
- F12 Nutrient Mixture (Ham-Gibco 21765-029)
- DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12, Thermo Scientific 11320033)
- Penisilin-Streptomisin (Sigma P4333)
- L-glutamin 200 mM (Gibco 1881732)
- Fetal Sığır Serumu (Gibco 08G5259K)
- Tripsin-EDTA (Multicell 325043156)
- Tripan Mavisi (Sigma T8154)
- Thiazoyl Blue Tetrazolium Bromide %98 (MTT, Sigma M5655)
- Dimetil Sülfoksit (DMSO, ChemCruz sc358801/Carlo Erba 508001)

Total RNA izolasyonu için;

- Direct-zol RNA MiniPrep kiti (Zymo Research R2050)
- cDNA Sentez Kiti (SensiFAST)
- qRT-PCR primerleri Sentegen A.Ş'den temin edildi.
- SYBR Lo-Rox Kit (SensiFAST BIO-94020)

Western blot analizi için;

- Proteaz-fosfataz inhibitör kokteyl 100X (Sigma PPC1010)
- RIPA 10x (Abcam ab156034)
- BCA Protein Assay Kiti (SMARTTM 21071)
- Tris baz (Sigma 1001765977)
- HCl (Sigma-Aldrich 30721)
- SDS (Sigma 101536917)
- Amonyum Persülfat (Sigma 06429KH)
- TEMED (Sigma Life Science 102051196)
- Akrilamid/Bis solüsyonu (Biorad-1610158)
- Metanol (Sigma-Aldrich STBG2513V)
- Glacial Asetik Asit (TEKKİM-251011531)
- Gliserol (Riedel de Haen 15524)
- β-merkaptoetanol (MERCK 8.05740.0250)
- Glisin (Sigma G8898-500G)
- Bromfenol mavisi (Sigma-Aldrich 114391)
- Coomassie brilliant blue (AppliChem A1092)
- Tween 20 (AppliChem A1389)
- Yağsız süt tozu (Bioshop SKI400.500)
- 0.2 µm Immün-Blot Protein Blotlama PVDF Membranı (Bio-Rad Cat No:1620177)
- Beta-actin primer antikor (Rabbit-Cell Signaling Technology 4967S)
- Anti-caspase-3 antikor (Abcam ab13847)
- Cleaved caspase-9 primer antikor (Rabbit Abcam ab2324)
- Sitokrom-c primer antikor (Mouse-İnvitrogen 338500)
- Bax (B-9) primer antikor (Santa Cruz Biotech. Sc-7480)

- Bcl-2 (C-2) primer antikor (Santa Cruz Biotech. Sc-7382)
- Goat anti-mouse IgG H&L HRP (Abcam ab205719)
- Goat anti-rabbit IgG (H+L) sekonder antikor (Abcam ab205718)
- Sodyum azid-(Carlo Erba Reagents 478482)
- DAB substrat (Thermo Scientific- 34001)
- H_2O_2 (Sigma-Aldrich 18304)

TUNEL yöntemi için;

- Paraformaldehit (PFA, Sigma-Aldrich 158127 powder)
- TUNEL Assay Kit - FITC (Abcam ab66108)
- Kapatma solüsyonu (Large Volume Vision Mount, Thermo Scientific TA-060-UG)

3.1.4 Stok Solüsyonlar ve Tamponlar

3.1.4.1 Nanopartikül Sentezi için CAPE ve Temozolomid Çözeltilerinin Hazırlanması

1 mg CAPE tartılıp ve 10 ml etil alkol içerisinde çözdürülerek CAPE için 0.1 mg/ml; 2.5 mg temozolomid tartılıp ve 10 ml distile su içerisinde çözdürülerek temozolomid için 0.25 mg/ml ana stok çözeltileri ayrı ayrı hazırlandı. Ana stok çözeltilerinin belirli konsantrasyon aralığında seyreltilmesiyle bir seri CAPE ve temozolomid çözeltisi hazırlandı.

UV-Vis Spektrofotometresindeki ölçümler sonucunda CAPE molekülünün maksimum absorbans dalga boyu 323 nm, temozolomid molekülünün maksimum absorbans dalga boyu ise 330 nm olarak belirlendi. Seri konsantrasyonlarda hazırlanan CAPE ve temozolomid çözeltilerinin sırasıyla 323 nm ve 330 nm dalga boyunda UV absorbans değerleri okunarak CAPE ve temozolomid moleküllerinin standart kalibrasyon eğrileri çizildi [69], [70].

3.1.4.2 Nanopartikül Sentezi için Polivinilalkol (PVA) Çözeltisinin Hazırlanması

%3'lük PVA çözeltisinin elde edilebilmesi için 3 gram PVA tartıldı ve üzerine 100 ml distile su eklenerek manyetik karıştırıcıda 65-75°C'de homojen çözelti elde edilene kadar karıştırıldı. Elde edilen %3'lük PVA çözeltisi filtre kağıdı ile süzüldü.

%1'lük PVA çözeltisinin elde edilebilmesi için 1 gram PVA tartıldı ve üzerine 100 ml distile su eklenerek manyetik karıştırıcıda 65-75°C'de homojen çözelti elde edilene kadar karıştırıldı. Elde edilen %1'lük PVA çözeltisi filtre kağıdı ile süzüldü.

%0,1'lik PVA çözeltisinin elde edilebilmesi için 0,1 gram PVA tartıldı ve üzerine 100 ml distile su eklenerek manyetik karıştırıcıda 65-75°C'de homojen çözelti elde edilene kadar karıştırıldı. Elde edilen %0,1'lik PVA çözeltisi filtre kağıdı ile süzüldü.

3.1.4.3 Fosfat Tamponlu Salin Solüsyonunun (PBS) Hazırlanması

0,2922 gram NaCl, 0,5999 gram NaH_2PO_4 ve 0,889 gram $Na_2HPO_4.2H_2O$ tartıldı, 500 ml distile su içerisinde çözdürüldü ve manyetik karıştırıcıda homojen çözelti elde edilene kadar karıştırıldı. Çözeltinin pH'ı NaOH ve HCl kullanılarak 7.4'e ayarlandı. Hazırlanan PBS hücre kültürü çalışmalarında otoklavlanarak kullanıldı.

3.1.4.4 Hücre Kültüründe Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Besiyeri hazırlanması için ticari olarak satın alınan DMEM ve F12 1:1 oranda karıştırılarak hazırlanan DMEM/F12 içerisine 0.2 mM L-glutamin, 100 µg/ml streptomisin ve 100 µg /ml penisilin eklendi. Hazırlanan besiyerine %10 FBS (Fetal Sığır Serumu) eklenerek %10'luk DMEM/F12 tamamlanmış besiyeri hazırlandı. Hazırlanan besiyeri, U87MG insan glioblastoma ve CCD-1079Sk insan fibroblast hücrelerinde kullanıldı. Hazırlanan tamamlanmış besiyeri +4°C'de saklandı.

Dondurma Solüsyonunun Hazırlanması için %95 FBS (Fetal Sığır Serumu) ve %5 DMSO içeren dondurma solüsyonu hazırlanarak U87MG insan glioblastoma ve CCD-1079Sk insan fibroblast hücrelerinin dondurulmasında kullanıldı. Hazırlanan hücre dondurma solüsyonu -20°C'de saklandı.

3.1.4.5 MTT Solüsyonunun Hazırlanması

6 mg MTT molekülü (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) tartılarak 10 ml PBS içerisinde çözdürüldü ve filtreden geçirilerek hazırlanan 0.6 mg/ml'lik solüsyon hücre canlılığı testi olan MTT testinde kullanıldı. MTT solüsyonu ışığa duyarlı olması nedeniyle taze hazırlandı ve +4ºC'de karanlıkta muhafaza edildi.

3.1.4.6 Protein Lizatlarının Hazırlanmasında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Lizat hazırlanmasında RIPA+proteaz fosfotaz inhibitörü içeren lizis tamponu kullanıldı. 5X RIPA çözeltisi 1X'e seyreltildi. 1 ml RIPA içerisine 10 µl proteaz fosfotaz inhibitör eklendi.

3.1.4.7 Protein Miktar Tayininde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

BCA Protein Assay Kiti içerisinde yer alan "Working Solution" kit protokolüne uygun olarak A ve B solüsyonundan sırasıyla 50:1 oranında karıştırılarak hazırlandı.

3.1.4.8 SDS-PAGE'de Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Akrilamid/Bis çözeltisinin hazırlanmasında, 87,60 g akrilamid ve 2,40 g N-N-bis-metilen-akrilamid tartılarak 300 ml distile su içerisinde çözdürüldü ve filtrelenerek +4ºC'de karanlıkta saklandı.

Tris-HCl (pH 8.8) çözeltisinin hazırlanmasında, 13,615 g Tris baz tartılarak 40 ml distile su içerisinde çözdürüldü. pH'ı 8.8'e ayarlandı ve çözelti distile su ile 75 ml'ye tamamlandı.

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

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

APS çözeltisinin hazırlanmasında, 0,10 g amonyum persülfat tartılarak 1 ml distile su içerisinde çözdürüldü. Günlük taze olarak hazırlanır.

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

Boya uzaklaştırma çözeltisinin hazırlanmasında, 50 ml %5'lik metanol ve 70 ml %7'lik glacial asetik asit karışımı hazırlandı ve çözeltinin hacmi distile su ile 1 L'ye tamamlandı.

2X SDS-PAGE örnek tamponunun hazırlanmasında, 0,02 g bromfenol mavisi ve 0,4 g SDS tartılarak, 2,5 ml 0,5 M Tris-HCl (pH 6.8), 2 ml gliserol ve 0,4 ml β-merkaptoetanol içeren karışım içerisinde çözdürüldü. Çözeltinin toplam hacmi distile su ile 10 ml'ye tamamlandı. 1 ml'lik mikrosantrifüj tüplere bölünerek -20°C'de saklandı.

5X Tank tamponunun hazırlanmasında, 15 g tris baz, 72 g glisin ve 5 g SDS tartılarak 1 L distile su içerisinde çözdürüldü.

3.1.4.9 Western Blot Analizinde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

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

PBS (Phosphate Buffered Saline) tamponunun hazırlanmasında, 0,5844 g NaCl, 1,1988 g NaH_2PO_4 ve 1,7799 g $Na_2HPO_4.2H_2O$ tartılarak 1 L distile su içerisinde çözdürüldü. Çözeltinin pH'ı 7.4'e ayarlandı.

PBS-Tween 20 çözeltisinin hazırlanmasında, 1000 ml PBS ve 2 ml Tween 20 karıştırıldı.

%5'lik süt tozunun hazırlanmasında, 5 g yağsız süt tozu tartılarak 100 ml PBS-Tween 20 çözeltisi içerisinde çözdürüldü.

3.1.4.10 TUNEL Yönteminde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Paraformaldehit (PFA) çözeltisinin hazırlanmasında, 1 g PFA tartılarak 80 ml PBS içerisinde 60ºC'de ısıtılarak çözdürüldü. Berrak renk gözlenene kadar NaOH eklenip karıştırıldı. Çözelti PBS ile 100 ml'ye tamamlandı. Tüm işlemler çeker ocakta yapıldı.

3.2 Yöntem

3.2.1 Tekli Emülsiyon Çözücü Uçurma Metodu (w/o) ile CAPE-Temozolomid Yüklü PLGA Nanopartiküllerinin Sentezi

Nanopartiküler sistemlerde PLGA kullanılmasındaki en etkili parametre molekülün hidrofobik ya da hidrofilik özelliğidir. CAPE'nin hidrofobik, temozolomid'in ise hidrofilik özellik göstermesi sebebiyle çalışmada tekli emülsiyon (w/o) çözücü uçurma yöntemi kullanılarak nanopartiküler sistemler hazırlanmıştır. Farklı parametrelerde sentezlenen CAPE-temozolomid yüklü nanopartiküller (CT-NP) Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1 Farklı parametreler kullanılarak üretilen nanopartiküller

NP	**Bileşenler (mg)**			**PVA Miktarı**		**Çözücü (ml)**		**Sonikasyon**
	CAPE	TMZ	PLGA	İç Faz (ml-%)	Dış Faz (ml-%)	Etil Alkol	DCM	
CT-NP1	1	1	50	4 ml %3	35 ml %0,1	0,5	1	2 dk %80
CT-NP2	5	1	100	4 ml %3	35 ml %0,1	0,5	1	2 dk %80
CT-NP3	5	2	20	5 ml %1	35 ml %0,1	0,5	1	2 dk %40

- **CT-NP1 Sentezi;**

1 mg CAPE 500 μl etil alkol çözeltisi içerisinde, 1 mg temozolomid 500 μl distile su çözeltisi içerisinde, 50 mg PLGA ise 1 ml diklorometan (DCM) çözeltisi içerisinde iyice çözdürüldü. PLGA-DCM çözeltisi içerisine eklenen CAPE-etil alkol ve temozolomid-distile su çözeltileri iyice karıştırılmak üzere vortekslendi. Hazırlanan karışım organik fazın oluşturulması amacıyla peristaltik pompa yardımı ile 5 akış hızında (5 ml/dk) 4 ml %3 polivinilalkol (PVA) çözeltisi içerisine pompalandı ve karışım buz banyosunda 2 dk %80 enerji altında prob sonikatör kullanılarak sonike edildi. Sonike edildikten sonra oluşan karışım peristaltik pompa yardımı ile 2 akış hızında (2 ml/dk) manyetik karıştırıcı üzerindeki 35 ml %0,1 PVA çözeltisi içerisine pompalandı. Elde edilen karışım organik çözücülerin buharlaşması ve etken maddeler ile PLGA'nın iyice karışması amacıyla 700 rpm'de 4 saat manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. 4 saatin sonunda karışımdan 50 μl alınarak üzerine 1450 μl distile su eklendi ve eppendorfa alınarak daha sonra yapılacak olan boyut ve zeta analizleri için ayrıldı. 4 saatin sonunda elde edilen karışımdan katı nanopartiküllerin çöktürülmesi amacıyla 9000 rpm'de 45 dk santrifüj edildi ve üst faz toplandı. Daha sonra, nanopartiküllerin yüzeylerinde bulunan kalıntıları uzaklaştırmak amacıyla 35 ml distile su eklenerek 9000 rpm'de 30 dakika 3 kez santrifüj edilerek yıkama işlemi yapıldı. Her aşamada elde edilen üst fazlar enkapsülasyon veriminin indirekt olarak tayini için toplandı. Elde edilen katı nanopartiküller üzerine 5 ml distile su eklenerek çözdürüldü ve önce -80 °C'de bir süre dondurulduktan sonra liyofilizatörde kurutuldu.

- **CT-NP2 Sentezi;**

5 mg CAPE 500 μl etil alkol çözeltisi içerisinde, 1 mg temozolomid 500 μl distile su çözeltisi içerisinde, 100 mg PLGA ise 1 ml diklorometan (DCM) çözeltisi içerisinde iyice çözdürüldü. PLGA-DCM çözeltisi içerisine eklenen CAPE-etil alkol ve temozolomid-distile su çözeltileri iyice karıştırılmak üzere vortekslendi. Hazırlanan karışım organik fazın oluşturulması amacıyla peristaltik pompa yardımı ile 5 akış hızında (5 ml/dk) 4 ml %3 polivinilalkol (PVA) çözeltisi içerisine pompalandı ve karışım buz banyosunda 2 dk %80 enerji altında prob sonikatör

kullanılarak sonike edildi. Sonike edildikten sonra oluşan karışım peristaltik pompa yardımı ile 2 akış hızında (2 ml/dk) manyetik karıştırıcı üzerindeki 35 ml %0,1 PVA çözeltisi içerisine pompalandı. Elde edilen karışım organik çözücülerin buharlaşması ve etken maddeler ile PLGA'nın iyice karışması amacıyla 700 rpm'de 4 saat manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. 4 saatin sonunda karışımdan 50 μl alınarak üzerine 1450 μl distile su eklendi ve eppendorfa alınarak daha sonra yapılacak olan boyut ve zeta analizleri için ayrıldı. 4 saatin sonunda elde edilen karışımdan katı nanopartiküllerin çöktürülmesi amacıyla 9000 rpm'de 45 dk santrifüj edildi ve üst faz toplandı. Daha sonra, nanopartiküllerin yüzeylerinde bulunan kalıntıları uzaklaştırmak amacıyla 35 ml distile su eklenerek 9000 rpm'de 30 dakika 3 kez santrifüj edilerek yıkama işlemi yapıldı. Her aşamada elde edilen üst fazlar enkapsülasyon veriminin indirekt olarak tayini için toplandı. Elde edilen katı nanopartiküller üzerine 5 ml distile su eklenerek çözdürüldü ve önce -80 °C'de bir süre dondurulduktan sonra liyofilizatörde kurutuldu.

- **CT-NP3 Sentezi;**

5 mg CAPE 500 μl etil alkol çözeltisi içerisinde, 1 mg temozolomid 500 μl distile su çözeltisi içerisinde, 20 mg PLGA ise 1 ml diklorometan (DCM) çözeltisi içerisinde iyice çözdürüldü. PLGA-DCM çözeltisi içerisine eklenen CAPE-etil alkol ve temozolomid-distile su çözeltileri iyice karıştırılmak üzere vortekslendi. 5 ml %1 polivinilalkol (PVA) çözeltisi içerisine, ayrı bir eppendorfta 500 μl distile su çözeltisi içerisinde çözdürülen 1 mg temozolomid eklendi. Hazırlanan PLGA-CAPE-temozolomid karışımı organik fazın oluşturulması amacıyla peristaltik pompa yardımı ile 4 akış hızında (4 ml/dk) 5 ml %1 PVA-TMZ çözeltisi içerisine pompalandı ve karışım buz banyosunda 2 dk %40 enerji altında prob sonikatör kullanılarak sonike edildi. Sonike edildikten sonra oluşan karışım peristaltik pompa yardımı ile 2 akış hızında (2 ml/dk) manyetik karıştırıcı üzerindeki 35 ml %0,1 PVA çözeltisi içerisine pompalandı. Elde edilen karışım organik çözücülerin buharlaşması ve etken maddeler ile PLGA'nın iyice karışması amacıyla 700 rpm'de 4 saat manyetik karıştırıcıda karıştırıldı [71]. 4 saatin sonunda karışımdan 50 μl alınarak üzerine 1450 μl distile su eklendi ve eppendorfa alınarak daha sonra yapılacak olan boyut ve zeta analizleri için ayrıldı. 4 saatin sonunda elde edilen

karışımdan katı nanopartiküllerin çöktürülmesi amacıyla 9000 rpm'de 45 dk santrifüj edildi ve üst faz toplandı. Daha sonra, nanopartiküllerin yüzeylerinde bulunan kalıntıları uzaklaştırmak amacıyla 35 ml distile su eklenerek 9000 rpm'de 30 dakika 3 kez santrifüj edilerek yıkama işlemi yapıldı. Her aşamada elde edilen üst fazlar enkapsülasyon veriminin indirekt olarak tayini için toplandı. Elde edilen katı nanopartiküller üzerine 5 ml distile su eklenerek çözdürüldü ve önce -80 °C'de bir süre dondurulduktan sonra liyofilizatörde kurutuldu.

3.2.2 CAPE-Temozolomid Yüklü Nanopartiküllerin Reaksiyon Verimi, Enkapsülasyon Etkinliği ve Etken Madde Yüklenme Veriminin Hesaplanması

Üretilen nanopartiküllerin ilk santrifüj ve üç yıkama sonrasında elde edilen üst fazları kullanılarak reaksiyon verimi (RV), enkapsülasyon etkinliği (EE) ve etken yükleme verimi (DL) indirekt yöntem ile hesaplandı. Konsantrasyonu bilinen CAPE-TMZ yüklü nanopartikül çözeltilerinin UV spektroskopi cihazı kullanılarak standart kalibrasyon eğrisi çizildi. Moleküllerin tayini için absorbans ölçümü CAPE molekülü için 323 nm'de, temozolomid molekülü için 330 nm'de yapıldı.

3.2.2.1 Reaksiyon Verimi (RV)

Üretilen nanopartiküllerin reaksiyon veriminin hesaplanması için elde edilen katı nanopartikül miktarı kullanılarak her bir nanopartikül için aşağıdaki eşitlik (3.1) kullanılarak reaksiyon verimi hesaplandı:

$$RV\ (\%) = \frac{\text{Üretilen nanopartikül miktarı}}{\text{Başlangıç polimer miktarı} + CAPE + TMZ}\ X\ 100 \qquad (3.1)$$

3.2.2.2 Etken Madde Yükleme Verimi (DL)

Etken madde yüklenme veriminin hesaplanmasında santrifüj ve üç yıkama sonucunda elde edilen üst fazlar kullanılarak hesaplanan nanopartikül içerisine yüklenen etken madde miktarı ve elde edilen katı nanopartikül miktarı kullanılmıştır. Etken madde yüklenme verimi eşitlik (3.2) kullanılarak hesaplandı:

$$DL\ (\%) = \frac{\text{Nanopartikül içine yüklenen } CAPE + TMZ \text{ miktarı } (mg)}{\text{Elde edilen nanopartikül miktarı } (mg)}\ X\ 100 \qquad (3.2)$$

3.2.2.3 Enkapsülasyon Etkinliği (EE)

Sentezlenen nanopartiküllerin enkapsülasyon veriminin hesaplanmasında santrifüj sonrası toplanan üst fazlar ve CAPE ve temozolomid için ayrı ayrı çizilen kalibrasyon eğrileri kullanıldı. Üst fazların UV spektrum değerlerinden yüklenmemiş etken madde miktarları hesaplandı. Nanopartikül içerisine yüklenen kısım ise, başlangıçtaki toplam madde miktarından yüklenmemiş madde miktarı çıkarılarak indirekt olarak hesaplanmıştır. Aşağıda verilen eşitlik (3.3) kullanılarak enkapsülasyon verimi hesaplandı:

$$EE\ (\%) = \frac{Nanopartikül\ içine\ yüklenen\ CAPE + TMZ\ miktarı\ (mg)}{Kullanılan\ CAPE + TMZ\ miktarı\ (mg)} X\ 100 \qquad (3.3)$$

3.2.3 CAPE-Temozolomid Yüklü Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Sentezlenen tüm nanopartiküllerin Zeta sizer ile boyut, dağılım ve zeta potansiyel analizleri yapılmıştır. Bunlara ek olarak, optimize nanopartiküllerin Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) analizleri yapılmıştır.

3.2.3.1 Boyut ve Zeta Potansiyel Analizi

Sentezlenen nanopartiküllerin boyut ve zeta potansiyel ölçümleri Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK) cihazı ile gerçekleştirildi. Zetasizer Nano ZS cihazında boyut analizleri dinamik ışık saçılması yöntemiyle, zeta potansiyel ölçümleri ise kapiler küvetlerde faz analiz ışık saçılması metoduyla yapıldı. Tüm analizler 3 tekrarlı olarak 25 °C'de ±0.1 °C hassasiyet ile gerçekleştirildi.

3.2.3.2 FT-IR Analizi

Serbest CAPE molekülü, serbest temozolomid molekülü, PLGA polimeri ve CAPE-temozolomid yüklü nanopartiküle ait fonksiyonel grupların tayini FT-IR analizi ile gerçekleştirildi. Boyut ve zeta potansiyel analizleri sonucunda kullanıma uygun olarak seçilen nanopartiküller doğrudan ATR (Attenuated Total Reflectance) ataçmanı kullanılarak 3 tekrarlı olarak analiz edildi.

3.2.4 CAPE-Temozolomid Yüklü Nanopartiküllerin *İn Vitro* Salımı

Kullanıma uygun olarak seçilen nanopartiküllerden 3 mg tartılarak 3 ml PBS içinde çözdürüldü ve 37ºC 'de yatay çalkalayıcıya 140 rpm'de çalkalanmaya bırakıldı. Örnekler belirli aralıklarla 9000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst fazlar UV spektrumda ölçüm için ayrılarak pellet üzerine taze PBS eklendi. Bu işlem 15 gün boyunca tekrarlandı. Üst fazlardan yapılan UV ölçüm değerleri kullanılarak etken maddelerin *in vitro* salım hesaplamaları yapıldı.

3.2.5 Hücre Kültürü Çalışmaları

Üretilen nanopartiküllerin *in vitro* etkinliğinin test edilmesi amacıyla hücre kültürü çalışmalarında U87MG (ATCC® HTB-14™) insan glioblastoma hattı ve sağlıklı CCD-1079Sk (ATCC® CRL-2097™) insan fibroblast hücre hattı kullanıldı. Bu tez çalışmasında kullanılan U87MG hücre hattı epitel morfolojisine sahip, kültürde adherent (yüzeye yapışan) büyüme özelliğine sahip hücrelerdir. CCD-1079Sk insan fibroblast hücreleri fibroblastik morfolojide ve kültür ortamında adherent büyüme özelliğine sahip sağlıklı kontrol hücre hattı olarak kullanılmaktadır.

U87MG insan glioblastoma hücre hattı ve CCD-1079Sk insan fibroblast hücre hattı 37ºC'de %5 CO_2 içeren ortamda ve %10 FBS içeren tamamlanmış besiyeri içerisinde büyütüldü [128], [129]. Kullanılan hücre hatlarına ait tüm özellikler Tablo 3.2'de yer almaktadır.

Tablo 3.2 Hücre kültüründe kullanılan hücre hatlarının özellikleri [128], [129]

Özellik	**U-87 MG (ATCC® HTB-14™)**	**CCD-1079Sk (ATCC® CRL-2097™)**
Organizma	*Homo sapiens*, İnsan	*Homo sapiens*, İnsan
Doku	Beyin	Deri
Hastalık	Glioblastoma	Normal
Yaş	Bilinmiyor	Yeni doğan
Cinsiyet	Erkek	Erkek
Morfoloji	Epitelyal	Fibroblast
Büyüme özelliği	Adherent	Adherent

3.2.5.1 Hücre Hatlarının Canlandırılması

Hücre hatlarının canlandırılmasında izlenen adımlar hücre kültüründe kullanılan U87MG hücreleri ve CCD-1079Sk hücreleri için de aynıdır. Sıvı azot tankında (-196ºC) dondurulmuş halde kriyotüplerde bulunan hücreler 37ºC'deki steril distile su içerisinde çözdürüldü. Bu aşamada hücrelerin DMSO'dan zarar görmemesi için hızlı gerçekleştirilmesine dikkat edildi. Çözünen hücreler tamamlanmış besiyeri içeren falkon tüp içerisine alınarak 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonucunda süpernatant atıldı ve pellet üzerine tamamlanmış besiyeri eklenerek hafifçe pipetaj yapıldı. Pipetaj ile hücrelerin homojen olarak dağılması sağlandı ve sayımı yapılan hücrelerin yoğunluğuna bağlı olarak T25 ya da T75 flasklara aktarıldı. Flasklara ekilen hücreler, 37ºC'deki %5 CO_2 içeren inkübatöre inkübasyona bırakıldı. Ekimden sonra hücrelerin flask yüzeyine tutunması mikroskop ile kontrol edilerek tutunan ve büyüyen hücrelerin besiyeri değiştirildi. %80-90 yoğunluğa ulaşan hücrelerin pasajlama işlemi gerçekleştirildi.

3.2.5.2 Hücre Hatlarının Pasajlanması

Hücre hatlarının pasajlanmasında izlenen adımlar hücre kültüründe kullanılan U87MG hücreleri ve CCD-1079Sk hücreleri için de aynıdır. Flasklara ekilen hücreler her gün kontrol edilerek besiyerleri değiştirildi. Hücrelerin %80-90 konfluent olduğu aşamada pasajı yapıldı. Pasaj işleminde öncelikle hücreler üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve hücre yüzeyi PBS ile yıkanarak hücre artıklarının ve besiyerinin iyice uzaklaştırılması sağlandı. Flask yüzeyine yapışık halde bulunan hücreler 1x Tripsin-EDTA kullanılarak kaldırıldı ve enzimin etki etmesi amacıyla hücreler 37ºC'lik inkübatörde 3 dakika bekletildi. Hücrelerin flask yüzeyinden ayrılıp ayrılmadığının anlaşılması için mikroskopta kontrol edildi. Yüzeyden ayrılmış halde bulunan hücrelerin üzerindeki tripsinin etkisini inaktive etmek amacıyla üzerine eklenen tripsin miktarının en az iki katı kadar tamamlanmış besiyeri eklenerek yıkama yapıldı ve 15 ml'lik falkon tüpe aktarıldı. 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek hücrelerin çöktürülmesi sağlandı. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılırken, pellet üzerine tamamlanmış besiyeri eklenerek pipetaj yapıldı. Homojen şekilde dağıtılarak çözünmesi sağlanan hücreler sayılarak yeni flasklara aktarıldı.

Hücrelerin çoğalması için flasklar 37ºC'de %5'lik CO2 içeren inkübatöre bırakıldı. Hücreler %80-%90 yoğunluğa ulaştığında rahatça çoğalabilmeleri amacıyla pasajlama işlemi tekrar edildi.

3.2.5.3 Tripan Mavisi ile Hücrelerin Canlılık Kontrolü

Canlı ve ölü hücre sayısının belirlenmesi amacıyla tripan mavisi kullanıldı. Pasaj işleminde santrifüj sonrası elde edilen hücre pelleti besiyeri ile çözüldükten sonra içerisinden 10 µl hücre süspansiyonu alındı ve 10 µl tripan mavisi ile bir mikrosantrifüj tüpü içerisinde karıştırıldı. Elde edilen 20 µl hücre-boya karışımının 10 µl'si alınarak Thoma lamına aktarıldı. Işık mikroskobu altında hücre sayımı yapıldı. Thoma lamında bulunan 16 küçük karenin 4 farklı bölgesindeki canlı hücreler sayılarak ortalaması alındı. Mikroskopta canlı hücreler renksiz ve parlak olarak gözlemlenirken cansız hücreler mavi olarak gözlemlendi. Canlı hücre sayısı eşitlik (3.4) kullanılarak hesaplandı.

$$Canlı\ hücre\ sayısı = Sayılan\ hücre\ sayısının\ ort\ \times DF\ \times Toplam\ hacim\ \times 10^4 \quad (3.4)$$

Eşitlik (3.4)'de yer alan sayılan hücre sayısının ortalaması ifadesi; Thoma lamında sayılan 4 farklı bölgedeki karelerde bulunan hücrelerin ortalamasını temsil etmektedir. DF ifadesi ise; dilüsyon faktörünü temsil etmektedir. Toplam hacim ise; hücre pelletinin ne kadar ml besiyerinde çözüldüğünü temsil etmektedir.

3.2.5.4 Hücre Hatlarının Dondurulması

Hücre hatlarının dondurulmasında izlenen adımlar hücre kültüründe kullanılan U87MG hücreleri ve CCD-1079Sk hücreleri için de aynıdır. Hücrelerin dondurulmasında %95 FBS ve %5 DMSO kullanıldı. Tripsin eklenerek kaldırılan hücrelerin santrifüj edilmesi ile elde edilen hücre pelleti 106/ml hücre olacak şekilde sayıldı ve %95 FBS ve %5 DMSO içeren dondurma solüsyonu içerisinde çözdürülerek kriyotüplere koyuldu. Ardından kriyotüpler +4ºC'de 30 dakika, -20ºC'de 1 saat ve -80ºC'de gece boyu inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün -196ºC sıvı azot tankına geçirilerek kademeli soğutma işlemi gerçekleştirildi. Kademeli soğutma işlemi ile hücrelerin oda sıcaklığında sitotoksik etki eden DMSO'dan en az düzeyde zarar görerek depolanması amaçlanmıştır.

3.2.6 CAPE-Temozolomid Yüklü Nanopartiküllerin *İn Vitro* Biyolojik Etkinliğinin Araştırılması

3.2.6.1 MTT Testi

MTT molekülü (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide); canlı hücrelerdeki mitokondriyal membranında lokalize olan mitokondriyal süksinat dehidrogenaz enzimine bağlanarak formazan kristalleri oluşturmaktadır. MTT testi, formazan kristallerinin çözdürülmesi ile elde edilen absorbans derecesi ile canlı hücre miktarı arasında doğru orantı bulunmasına dayanarak optik yoğunluğunun ölçülmesi ile gerçekleştirilmektedir [72].

U87MG insan glioblastoma hücre hattı ve CCD-1079Sk insan fibroblast hücre hattına uygulanan serbest CAPE-temozolomid (CT) ve CAPE-temozolomid nanopartikülerinin (CT-NP) sitotoksik etkisi MTT yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

Kullanılacak hücre hattı 96 kuyulu mikroplakalara kuyu başına 10.000 hücre olacak şekilde ekilerek 37ºC'de %5 CO_2 içeren inkübatörde kültüre olması için 24 saat inkübasyona bırakıldı. Belirlenen dozlarda serbest CAPE-temozolomid ve CAPE-temozolomid nanopartikülleri hücreler üzerine uygulamaları yapıldı ve 24 ve 48 saatlik inkübasyona bırakıldı. Hücreler üzerindeki sitopatolojik incelemeler mikroskopta incelendi. Belirlenen 24 ve 48 saatlik süreler sonunda her bir kuyu üzerine 50 µl MTT solüsyonu eklenerek 3 saat inkübe edildi. 3 saat sonunda MTT solüsyonları uzaklaştırılıp her bir kuyu üzerine 100 µl DMSO eklenerek hücreler üzerinde oluşan formazan kristalleri çözdürüldü. ELISA okuyucu ile 570 nm dalga boyunda hücrelerin absorbans değerleri okundu ve % hücre canlılıkları eşitlik (3.5) ve IC_{50} değerleri belirlendi.

$$\%Canlılık = \frac{OD_{570e}}{OD_{570b}} \times 100 \qquad (3.5)$$

OD_{570e}: 570 nm'de deney gruplarının verdiği absorbans değeridir.

OD_{570b}: 570 nm'de kontrol grubunun verdiği absorbans değeridir.

3.2.6.2 Yara İyileşmesi Testi

İnsan glioblastoma U87MG hücreleri, 24 kuyucuklu mikroplaka içerisine her kuyuda 10^5 hücre olacak şekilde ekilerek 24 sa inkübasyona bırakıldı. Mikroplaka içerisindeki hücreler %70-80 yoğunluğa ulaştığında hücrelerin üzerindeki besiyeri değiştirilmeden 200 µl'lik pipet ucu yardımıyla her bir kuyunun ortasında düşey bir çizgi çizilerek hücreler arasında boşluk oluşturuldu. Her bir kuyu mikroskopta kontrol edildikten sonra yüzen hücreleri uzaklaştırmak için besiyerleri değiştirildi. Mikroplaka üzerine ayrı ayrı uygulanacak olan serbest CAPE-temozolomid ve CAPE-temozolomid NP dozları IC_{50} değerlerine göre hesaplanarak hücrelere eklendi. 0, 6, 12 ve 24. saatlerde mikroskop görüntüleri alınarak çizikler arasındaki mesafe ImageJ programı kullanılarak 3 tekrarlı olarak ölçüldü.

3.2.6.3 Koloni Formasyon Deneyi

İnsan glioblastoma U87MG hücreleri, IC_{50} değerine göre hesaplanan CAPE-temozolomid yüklü nanopartikül (CT-NP) dozuyla T25 flaskta muamele edilen CT-NP grubu ve kontrol grubu 48 sa süreyle inkübe edildi. 48 sa sonunda her bir grup tripsin ile muamele edilerek kaldırıldı ve hücre sayımı yapılarak 6 kuyucuklu mikroplakalara her bir kuyu içerisinde 100 hücre olacak şekilde kontrol ve CT-NP grubu ayrı ayrı 3 tekrarlı olacak şekilde ekildi. Mikroplaka 10 gün süreyle 37°C'deki %5'lik CO_2 içeren inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyon süresi boyunca her 3 günde bir kuyulardaki besiyerleri değiştirildi. İnkübasyon süresinin bittiği 10. günde oluşan hücreleri görünür hale getimek getirmek amacıyla boyama işlemi yapıldı. Bu amaçla kuyulardaki besiyerleri uzaklaştırılıp her bir kuyu PBS ile yıkandı. Fiksasyon işlemi için hücreler -20°C'deki etanol ile muamele edilerek 10 dk bekletildi. Etanol uzaklaştırıldıktan sonra hücreler kristal viole boyasıyla 15 dk muamele edilerek görünür hale getirildi. Fazla boyanın uzaklaştırılması amacıyla kuyucuklar 2-3 kere distile su ile yıkandı. Boyanan kontrol ve CT-NP gruplarına ait koloniler sayılarak karşılaştırmalı analiz yapıldı.

3.2.6.4 Total RNA İzolasyonu

T25 flasklara ekilen U87MG hücrelerinin üzerine serbest CAPE- temozolomid (CT) ve CAPE-temozolomid yüklü nanopartiküller (CT-NP) belirlenen IC_{50} konsantrasyon aralığında (5, 10 ve 20 μg/ml) uygulandı ve 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda RNA izolasyonu, "Zymo Research Direct-zol RNA MiniPrep" kullanılarak kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi.

Öncelikle hücreler üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler soğuk PBS ile yıkandı. T25 flasklar üzerine 2,5 ml Trizol solüsyonu eklendi ve 2 dakika bekletildi. Bu aşamada hücre kazıyıcı yardımı ile hücreler flask tabanından kazınarak 15 ml'lik falkonlara aktarıldı. 2 dakika inkübasyonun ardından üzerine 950 μl kloroform eklenerek karıştırıldı ve karışım 2 ml'lik mikrosantrifüj tüplere geçirilerek 2 dakika bekletildi. Tüpler 15000 rpm'de +4°C'de 15 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüpler sarsılmadan süpernatantlar alınarak steril mikrosantrifüj tüplere geçirildi ve süpernatant miktarları pipetle ölçülerek üzerine 1:1 oranda etanol eklenip pipetaj yapıldı. Etanolde çözülen örnekler spin kolona aktarıldı ve 14000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonucunda toplama tüpündeki sıvı uzaklaştırıldı ve tüm bu işlemler örneklerin tamamı spin kolona aktarılıncaya kadar tekrar edildi. Her bir spin kolon üzerine 400 μl RNA Wash Buffer eklendi ve 14000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda toplama tüpündeki sıvı uzaklaştırıldı. Her bir örnek için steril mikrosantrifüj tüpünde 5 μl DNAz I ve 75 μl DNA Digestion Buffer karışımı hazırlanarak her bir spin kolon üzerine hazırlanan 80 μl'lik karışım eklendi ve 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. 15 dakika inkübasyon sonunda 400 μl Direct-zol RNA PreWash spin kolonlar üzerine eklendi ve 14000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpündeki atık uzaklaştırıldıktan sonra 400 μl Direct-zol RNA PreWash eklenerek santrifüj işlemi tekrar edildi ve toplama tüpündeki sıvı uzaklaştırıldı. 700 μl RNA Wash Buffer spin kolon üzerine eklenerek 2 dakika 14000 rpm'de santrifüj edildi. Toplama tüpündeki sıvı uzaklaştırıldı.

Toplama tüpü atılarak spin kolonlar yeni steril RNAz içermeyen tüplere geçirildi ve spin kolonun tam ortasına gelecek şekilde 22 µl DNaz RNaz içermeyen su eklendi ve 14000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonucunda RNA'lar RNAz içermeyen tüpler içerisinde kullanıma hazır hale getirildi.

3.2.6.5 İzole Edilen RNA Örneklerinin Miktar ve Saflık Tayini

Nanodrop UV-Vis Spektrofotomere (Thermo Scientific) ile izole edilen RNA'ların saflık dereceleri ve miktarları tespit edilmiştir. RNA konsantrasyonlarının belirlenebilmesi amacıyla RNA örneklerinin 1'er µl'si cihaza pipetlenerek ölçüm yapıldı ve ng/µl cinsinden konsantrasyonları belirlendi. İzole edilen RNA örneklerinin saf olarak kabul edilmesi için 260 nm ve 280 nm dalga boylarında alınan absorbans değerlerinin oranının 1.7 ile 2.0 arasında olması gerekmektedir [130]. RNA miktarı hesaplanmasında 260 nm'deki bir optik yoğunluk (OD) değeri 40 µg/ml RNA miktarı tek iplikli RNA'ya eşdeğer olarak kabul edilmiştir. Bu hesaplamada kullanılan formül eşitlik (3.6)'de verilmiştir.

$$\text{RNA Miktarı} = \text{OD ünitesi} \times \text{sulandırma faktörü} \times 40\ \mu\text{g/ml} \tag{3.6}$$

3.2.6.6 cDNA Sentezi

Total RNA'lardan cDNA sentezi SensiFAST cDNA sentez kiti protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. cDNA sentezi sırasında kullanılan bileşenler ve hacimleri Tablo 3.3'de verilmiştir.

Tablo 3.3 cDNA sentezinde kullanılan bileşenler

Kullanılan Bileşenler	**Hacim**
Total RNA (1 µg'a kadar)	15 µl
5x TransAmp Buffer	4 µl
Reverse Transkriptaz	1 µl
Toplam Hacim	**20 µl**

İzole edilen RNA'ların 15 µl'si 0,2 ml'lik polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tüpleri içerisine koyuldu. Ardından her bir örnek üzerine 4 µl 5x TransAmp Buffer eklendi. En son olarak Reverse Transkriptaz enziminden 1'er µl her bir tüp içerisine eklenerek iyice karıştırılması sağlandı. Total RNA'dan cDNA sentez reaksiyonu için PCR cihazı Tablo 3.4'te belirtilen programa ayarlandı. PCR reaksiyonu sonucunda elde edilen cDNA örnekleri, Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) analizinde kullanılana kadar -20ºC'ye kaldırılarak saklandı.

Tablo 3.4 cDNA sentezi reaksiyon koşulları

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

3.2.6.7 Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

CAPE-temozolomid yüklü nanopartikülerin (CT-NP) insan glioblastoma hücre hattı üzerine belirlenen IC_{50} konsantrasyon değerleri aralığında uygulanması sonucu oluşan apoptotik ve anti-proliferatif etkilerinin incelenmesi amacıyla apoptotik yolakta yer alan genlerin ekspresyon analizi Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) cihazı kullanılarak yapılmıştır.

qRT-PCR analizinde kullanılan primerler Sentegen firması tarafından sentezlenmiştir. Üretici firmanın talimatlarına göre uygun miktarlarda DNaz RNaz içermeyen su ile çözdürülen ana stok primerlerden qRT-PCR analizinde kullanılmadan önce 10 µM olacak şekilde ara stoklar oluşturuldu.

CAPE-temozolomid yüklü nanopartiküllerin hücre hattına uygulanması sonucunda Bax (F:CCCGAGAGGTCTTTTTCCGAG, R:CCAGCCCATGATGGTTCTGAT), Bcl-2 (F:GGTGGGGTCATGTGTGTGG, R:CGGTTCAGGTACTCAGTCATCC), Kaspaz-3 (F:AGAGGGGATCGTTGTAGAAGTC, R:ACAGTCCAGTTCTGTACCACG), Kaspaz-9 (F:CTCAGACCAGAGATTCGCAAAC,R:GCATTTCCCCTCAAACTCTCAA), sitokrom-c (F:CTTTGGGCGGAAGACAGGTC, R:TTATTGGCGGCTGTGTAAGAG), Kaspaz-8 (F:GTTGTGTGGGGTAATGACAATCT, R:TCAAAGGTCGTGGTCAAAGCC), B-aktin (F:CATGTACGTTGCTATCCAGGC, R:CTCCTTAATGTCACGCACGAT) genlerinin ekspresyonu test edilmiştir.

48.sa IC_{50} dozunda CT-NP ile muamele edilmiş U87MG hücreleri ve kontrol U87MG hücre grubunda ticari kit kullanılarak RNA izolasyonu gerçekleştirildi ve elde edilen RNA'lar reverse transkriptaz enzimi ile cDNA sentez kiti (SensiFAST) protokolüne uygun olarak cDNA'ya çevrildi. cDNA'lar 1:4 oranında seyreltilerek qRT-PCR analizinde kullanıldı. Analizde; uygun oranda (1:4) seyreltilen cDNA'lar, forward ve reverse primerler, SYBR green boyası ve dH_2O kullanıldı. Her bir bileşen için stok ve reaksiyon konsantrasyonu, kuyu başına kullanılan miktarı Tablo 3.5'te yer almaktadır. Bu miktarlar baz alınarak 96 kuyulu qRT-PCR mikroplakasında çalışılacak örnek sayısına göre master mix hazırlanarak kullanılmıştır. 96 kuyulu PCR mikroplakası içerisine ekspresyonu test edilecek her bir gen için ayrı hazırlanan master mix'ten 18'er µl eklendi. Her bir kuyucuk üzerine 2 µl cDNA eklenerek 40 döngü qRT-PCR analizi yapıldı. qRT-PCR cihazı ön denatürasyon amacıyla 95ºC'de 2 dakika, denatürasyon için 95ºC'de 5 saniye, primerlerin bağlanması için optimum sıcaklık olarak seçilen 63ºC'de 10 saniye, bağlanan primerlerin uzaması için 72ºC'de 15 saniyeye ayarlanmıştır. Analizde kullanılan reaksiyon koşulları Tablo 3.6'da toplu olarak gösterilmiştir.

Tablo 3.5 qRT-PCR analizinde kullanılan bileşenler

Bileşen Adı	**Her bir reaksiyon için**
SensiFAST SYBR Lo-Rox	10 µl
Forward Primer	0,8 µl
Reverse Primer	0,8 µl
cDNA	2 µl
dH_2O	6,4 µl

Hedef genlerin ekspresyonları anlatımı şartlara göre değişmeyen referans gen grubunda yer alan B-aktin gen ekspresyonu ile karşılaştırılarak $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu ile tayin edilmiştir [73].

Tablo 3.6 qRT-PCR reaksiyon koşulları

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

3.2.6.8 Protein Lizatlarının Hazırlanması

T25 flasklar içerisine ekilen hücreler flaskı kaplayana kadar 37°C'de %5 CO_2'li etüvde inkübe edildi. Hücreler çoğaldıktan sonra üzerlerine belirlenen 48.sa IC_{50} dozunda CT-NP uygulanarak 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler PBS ile yıkandı. Hücreler üzerine 1,5 ml tripsin/EDTA eklenerek 3 dakika inkübatörde bekletildi. Tripsinizasyondan sonra hücreler üzerine tamamlanmış besiyeri eklenerek tripsinin aktivitesinin inhibisyonu sağlandı. Hücreler falkon tüpe aktarılarak 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı. Pellet üzerine 500 µl soğuk PBS eklendi, pipetaj yapıldı ve hücreler mikrosantrifüj tüpüne transfer edildi. Örnekler 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve üst faz atıldı. Pellet üzerine 10

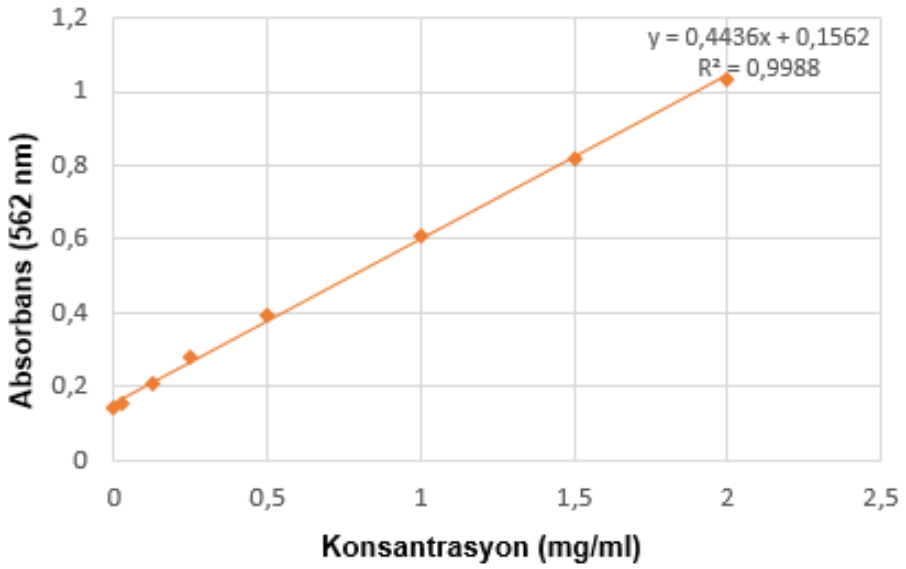
µl proteaz fosfotaz inhibitörü içeren 1 ml 1x RIPA çözeltisinden yaklaşık 500 µl eklendi. 20 dakika buz üzerinde inkübe edildi ve 5 dakikada bir örnekler vortekslendi. Örnekler 15000 rpm +4ºC'de 20 dakika santrifüjlendi. Süpernatantlar temiz mikrosantrifüj tüplere geçirildi, pellet atıldı. Elde edilen protein lizatları kullanılıncaya kadar -80ºC'de saklandı.

3.2.6.9 Protein Miktar Tayini

Protein miktar tayini Smart BCA Protein Assay kiti protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. Hücreler proteaz fosfotaz inhibitörü eklenen RIPA ile liziz edildikten sonra elde edilen protein lizatlarının konsantrasyonu bicinchoninic asit yöntemi (BCA) ile belirlendi.

Protein standart eğrisi çizebilmek amacıyla 2 mg/ml, 1.5 mg/ml, 1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.125 mg/ml, 0.025 mg/ml, 0 mg/ml bovine serum albümin (BSA) içeren seri dilüsyonlar hazırlandı ve standart eğri çizildi.

2 mg/ml-0 mg/ml hazırlanan BSA standartlarından ve 1:10 oranında dilue edilen örneklerden 3 tekrarlı 96 kuyulu mikroplakada belirlenen kuyulara 10'ar µl koyuldu. Kit protokolüne göre hazırlanan Working Solution her bir kuyu üzerine 200 µl olacak şekilde eklendi. Mikroplaka 37ºC'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. ELISA okuyucu kullanılarak 562 nm'deki absorbansları ölçüldü (Şekil 3.1). BSA standartlarının 562 nm'deki absorbans değerleri kullanılarak standart eğri çizildi. Standart eğriye göre her bir örneğin protein konsantrasyonları belirlendi. Lizatlar, proteaz fosfotaz inhibitör içeren RIPA ve 2X SDS-PAGE buffer eklenerek 1 mg/ml protein içerecek şekilde stoklanarak SDS-PAGE için hazır hale getirildi ve -20ºC'ye kaldırıldı.



Şekil 3.1 Bovine serum albümin (BSA) standart eğrisi

3.2.6.10 Örneklerin Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezinde Yürütülmesi

SDS-PAGE için BIO-RAD MiniPROTEAN® 3 CelI jel elektroforez sistemi kullanıldı. %12'lik ayırma jeli ve %4'lük yükleme jeli hazırlandı. Jeller, Tablo 3.7 ve Tablo 3.8'de verilen protokollere göre hazırlandı.

Tablo 3.7 %12'lik ayırma jeli protokolü

Kullanılan Bileşenler	**Miktar**
Distile su	3,35 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8.8)	2,5 ml
%10 SDS	100 µl
%30 Akrilamid/Bis	4 ml
%10 APS	75 µl
TEMED	15 µl

Hazırlanan ayırma jeli belirlenen noktaya kadar döküldükten sonra üzeri distile su ile kaplanarak polimerleşmesi beklendi. Jelin polimerleşmesi beklenirken %4'lük yükleme jeli hazırlandı.

Tablo 3.8 %4'lük yükleme jeli protokolü

Kullanılan Bileşenler	**Miktar**
Distile su	3,05 ml
0,5 M Tris-HCl (pH 6.8)	1,25 ml
%10 SDS	50 µl
%30 Akrilamid/Bis	0,65 ml
%10 APS	30 µl
TEMED	6 µl

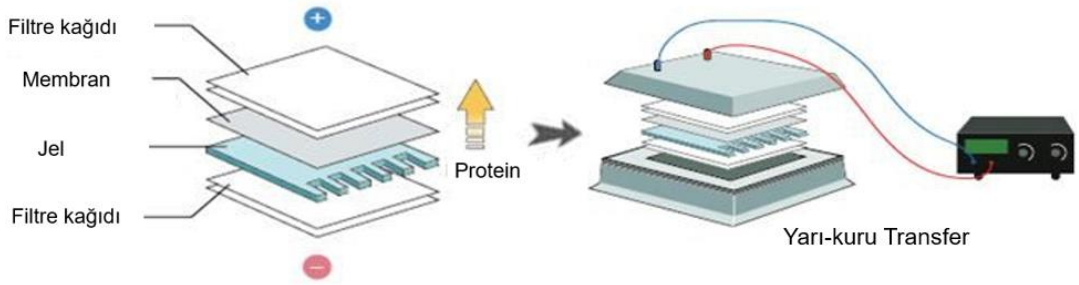
Ayırma jelinin üzerine düzleşmesi için eklenen distile su uzaklaştırıldı ve hazırlanan yükleme jeli baloncuk oluşmaması için dikkat edilerek ayırma jelinin üzerine döküldü. Jel üzerine uygun taraklar yerleştirilerek polimerleşmesi beklendi.

Yürütme tankı 1X tank tamponu ile dolduruldu ve polimerleşmesi tamamlanan jel tankın içerisine yerleştirildi. Jel üzerine yerleştirilen taraklar yavaşça çıkarıldı. SDS-PAGE için -20ºC'de stoklanmış örnekler 95ºC'de 5 dakika ısıtıldı. Örnekler tarakların oluşturduğu kuyucuklara 20'şer µl olarak eklendi. Protein boyutunun belirlenebilmesi için marker olarak 3 µl PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Cat.No. 26619) kullanıldı. Tüm örneklerin kuyucuklara yüklenmesinin ardından elektrotlar güç kaynağına bağlandı. Örnekler önce 80 V'da 30 dk ardından 100 V'da bir saat yürütüldü.

3.2.6.11 Western Blot Analizi

48 saat süreyle CAPE-temozolomid yüklü nanopartikülleri (CT-NP) uygulanan örneklerdeki B-aktin (42 kDa), sitokrom-c (12 kDa), kaspaz-3 (35 kDa), cleaved kaspaz-9 (37 kDa), Bax (23 kDa) ve Bcl-2 (26 kDa) proteinlerinin ekspresyonunu protein düzeyinde göstermek amacıyla kontrol grubuyla karşılaştırmalı olarak Western Blot analizi yapıldı.

SDS-PAGE sonrası jeldeki proteinlerin PVDF membrana transferi için Trans-Blot Turbo Transfer sistemi kullanıldı. Jel proteinlerinin PVDF membrana transferi Şekil 3.2'de şematize edilen şekilde gerçekleştirildi.



Şekil 3.2 Jeldeki proteinlerin PVDF membrana transferi [131]

Akımın geçtiği yöne doğru filtre kağıtları arasına sırasıyla jel ve membran yerleştirildi ve yerleştirildikten sonra hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. Bio-Rad Trans-Blot Turbo Transfer sistemi kullanılarak 25 V'da 1.3 A'de 10 dakikada proteinlerin membrana aktarımı başarılı olarak gerçekleştirildi. Membrana aktarımın başarılı olup olmadığını anlamak amacıyla jel coomasie boya çözeltisi ile boyanarak jelde protein varlığı olmadığı belirlendi. Membran %5' lik bloklama çözeltisinde (5 gr süt tozu/100 ml PBS-Tween 20) oda sıcaklığında 1 saat çalkalayıcıda bloklandı. B-aktin (1:1000), sitokrom-c (1:1000), kaspaz-3 (1:250), cleaved kaspaz-9 (1:500), Bax (1:200) ve Bcl-2 (1:200) primer antikorları %5'lik süt tozu ile seyreltilerek kullanıma hazır hale getirildi. Hazırlanan primer antikorlar, membranların üzerini kaplayacak şekilde muamele edilerek +4ºC'de çalkalayıcıda gece boyu inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından membranlar üzerindeki antikorlar toplandı. Falkon içine toplanan antikorlar üzerine %1'lik sodyum azid çözeltisi eklenerek kaldırıldı. Membranlar, PBS-Tween 20 ile 3x5 dakika yıkandı. Yıkamalar sonrası membranlar, B-aktin, kaspaz-3, cleaved kaspaz-9 için anti-rabbit sekonder antikor (1:10000) ile sitokrom-c, Bax ve Bcl-2 için anti-mouse sekonder antikor (1:10000) ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Sekonder antikorlar ile inkübasyon sonrası membranlar PBS-Tween 20 ile 3 kere 5'er dakika yıkandı. Deteksiyon aşamasına geçilmeden önce membranlar PBS ile yıkandı. Kolorimetrik deteksiyon için; 60 mg DAB (3, 3',

-diaminobenzidin tetrahidroklorid) 100 ml PBS ve 100 µl H_2O_2 içeren çözelti hazırlandı. Membran, hazırlanan deteksiyon çözeltisi içerisine bir pens yardımı ile batırılarak renk oluşumu gözlemlenene kadar beklendi. Bantların belirginleşmesi sonucunda reaksiyonu durdurmak amacıyla distile su kullanılmıştır.

3.2.6.12 Coomasie Boyaması

Proteinlerin jelden membrana aktarımının tam olarak gerçekleşip gerçekleşmediğinin anlaşılması amacıyla Coomasie boyaması yapıldı. Örnekler SDS-PAGE'de yürütülüp membrana aktarımın kontrolü sağlandıktan sonra jel dikkatlice çıkarılarak protein boyama çözeltisine (%0.1 Coomassie brilliant blue, %40 metanol ve %10 asetik asit) koyuldu. Gece boyu inkübasyon sonrası boyanan jel, ertesi gün boya uzaklaştırma çözeltisine (%5 metanol, %7 asetik asit) alınarak 2 saat çalkalayıcıda bekletilerek boyanın uzaklaştırılması sağlandı.

3.2.6.13 Terminal Deoksinükleotidil Transferaz-Aracılı dUTP Nick Uç İşaretleme (TUNEL) yöntemi

T75 flasklar içerisine ekilen hücreler flaskı kaplayana kadar 37°C'de %5 CO_2'li ortamda inkübe edildi. Hücreler çoğaldıktan sonra üzerlerine belirlenen 48.sa IC_{50} dozunda CT-NP ile muamele edildi ve kontrol grubuyla karşılaştırmalı olarak incelenmesi için 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda flasklardaki hücreler 3 ml tripsin ile kaldırılarak 15'lik falkon tüplere alındı ve 300g'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra üst fazlar atıldı ve pellet üzerine 0,5 ml PBS eklenerek yıkama yapıldı. Hücrelere %1 paraformaldehit (PFA) (w/v PBS içinde) eklenerek 1-5 dk fikse edildi. Fikse edilen hücreler 300g'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonunda üst faz atılarak pelletin üzerine 5 ml PBS eklenerek yıkandı ve 300g'de 5 dk santrifüj edildi. Bu yıkama ve santrifüj işlemi tekrar edildi. Santrifüj sonrası pellet 0,5 ml PBS ile çözdürüldü ve üzerine 5 ml %70'lik soğuk etanol eklenerek 30 dk -20°C'de bekletildi. Daha sonra tüpe 1 ml yıkama tamponu eklenerek 300g'de 5 dk santrifüj edildi ve bu işlem tekrar edildi. Boyama işlemleri karanlık ortamda gerçekleştirildi. Her bir örnek tüpüne Tablo 3.9'a göre hazırlanan boyama solüsyonundan eklenerek 37°C'de 1 saat karanlıkta inkübe edildi. 1 saat süresince örnekler 15 dk'da bir vortekslendi.

İnkübasyon sonunda örneklerin üzerine 1 ml Rinse Buffer eklendi ve 300g'de 5 dk santrifüj edildikten sonra oluşan üst faz atıldı (bu işlem tekrarlandı). Örneklerin üzerine 0,5 ml Propidium Iodide/RNase A solüsyonu eklenerek pellet süspanse edildi. Örnekler daha sonra oda sıcaklığındaki karanlık ortamda 30 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda her bir örnekten 100 µl polilisin slayta alındı ve üzerlerine kapatma solüsyonu damlatılarak lamelle kapatıldı. Görüntüleme için örnekler floresan mikroskobunda FITC (530 nm) ve Tex-Red (630 nm) filtreleriyle incelendi.

Tablo 3.9 TUNEL deneyi için boyama solüsyonu

DNA etiketleme solüsyonu	**Her bir örnek için**
Reaksiyon Tamponu (+4^{0}C)	10 µl
TdT Enzimi (-20^{0}C)	0.75 µl
FITC-dUTP	8 µl
ddH_2O	32.25 µl
Toplam Hacim	**51 µl**

3.2.6.14 İstatiksel Analizler

Ardışık 3 kez tekrarlanan deneylere ait ölçüm sonuçları alınarak ortalama ve ± SD değerleri hesaplandı. Biyolojik etki açısından artan konsantrasyonları ile pozitif ve negatif kontroller arasında anlamlı bir farklılığın olup olmadığı Graphpad Prism 8.0 istatistik yazılımı kullanılarak değerlendirildi ve $p<0.05$ değerleri anlamlı kabul edildi.

4

BULGULAR VE TARTIŞMA

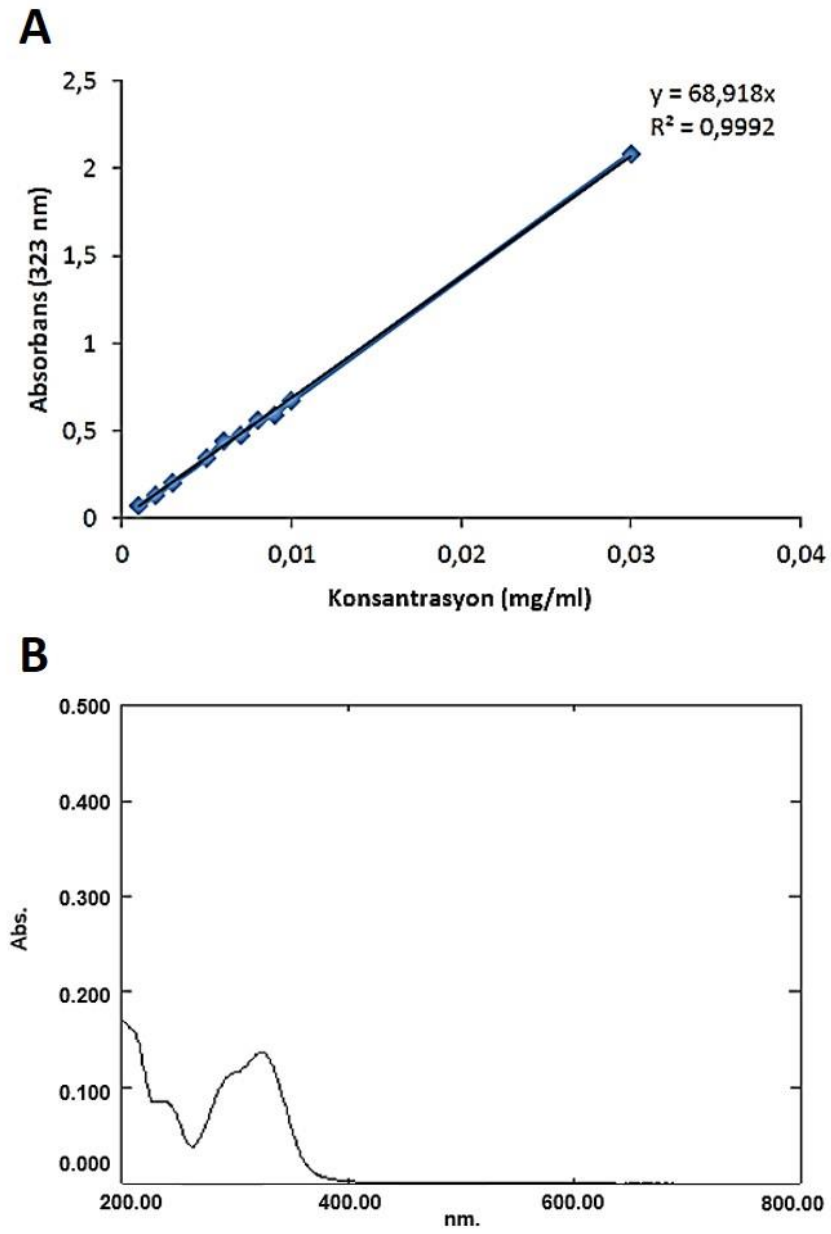
4.1 CAPE ve Temozolomid Moleküllerine Ait UV-Vis Spektrumları ve Kalibrasyon Eğrileri

4.1.1 CAPE Molekülüne Ait UV-Vis Spektrumu ve Kalibrasyon Grafiği

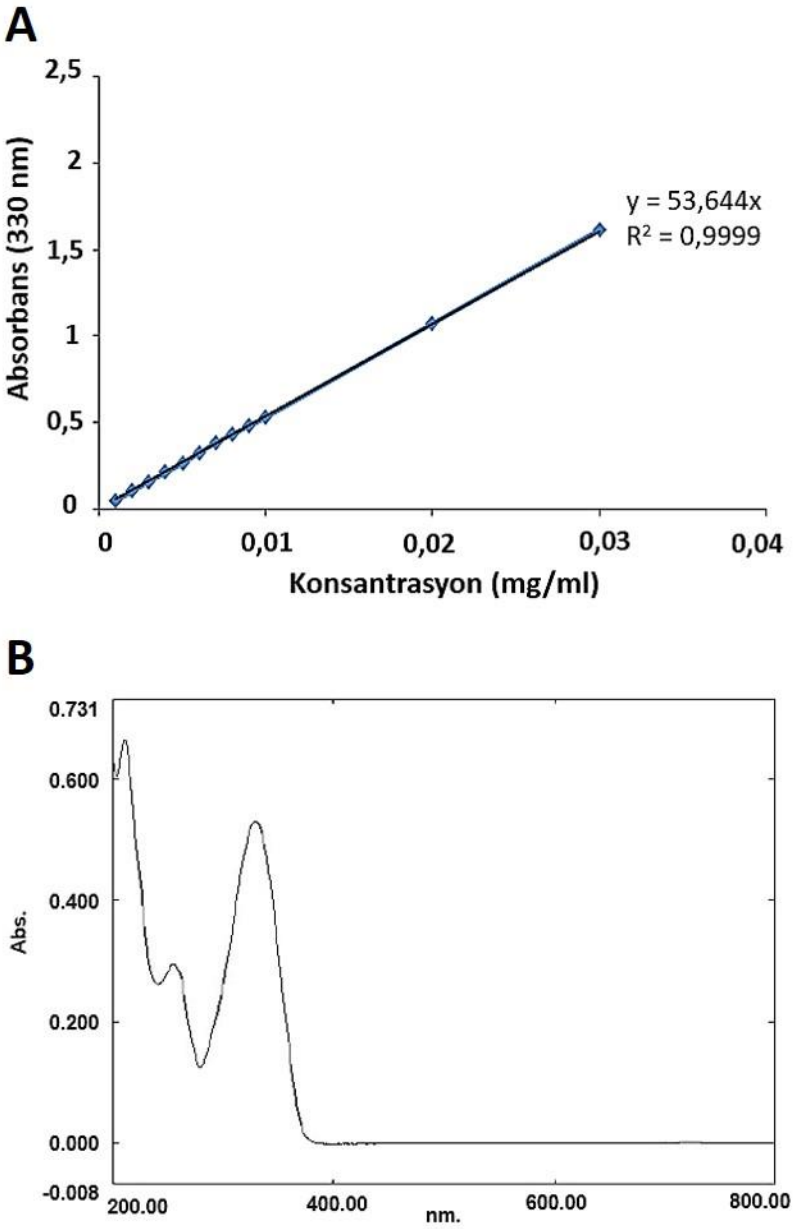
10 ml etil alkol içerisinde 1 mg CAPE çözeltisi çözdürülerek 0.1 mg/ml'lik ana stok CAPE çözeltisi elde edildi. Hazırlanan 0.1 mg/ml'lik ana stok CAPE çözeltisi seyreltilerek 0.1 mg/ml- 0.001 mg/ml konsantrasyonları arasında CAPE çözeltileri hazırlandı. UV spektrofotometrede CAPE molekülünün absorbans piki verdiği dalga boyu 323 nm olarak tespit edildi. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan CAPE çözeltilerinin UV-Vis spektroskopisinde spektrumu alınarak UV absorbans değerlerinden kalibrasyon eğrisi çizildi. Seri CAPE çözeltilerinin etanole karşı hazırlanan kalibrasyon eğrisi ve UV-Vis spektrumu Şekil 4.1'de yer almaktadır [69].

4.1.2 Temozolomid Molekülüne Ait UV-Vis Spektrumu ve Kalibrasyon Grafiği

10 ml distile su içerisinde 1 mg temozolomid (TMZ) çözeltisi çözdürülerek 0.1 mg/ml'lik ana stok temozolomid çözeltisi elde edildi. Hazırlanan 0.1 mg/ml'lik ana stok temozolomid çözeltisi seyreltilerek 0.01 mg/ml ile 0.009 mg/ml konsantrasyonları arasında temozolomid çözeltileri hazırlandı. UV spektrofotometrede temozolomid molekülünün absorbans piki verdiği dalga boyu 330 nm olarak tespit edildi. Farklı konsantrasyonlardaki temozolomid çözeltilerinin UV-Vis spektroskopisinde spektrumu alınarak UV absorbans değerlerinden kalibrasyon eğrisi çizildi. Seri temozolomid çözeltilerinin distile suya karşı hazırlanan kalibrasyon eğrisi ve UV-Vis spektrumu Şekil 4.2'de yer almaktadır [70].



Şekil 4.1 A. CAPE molekülüne ait kalibrasyon eğrisi; **B.** CAPE molekülüne ait UV-Vis Spektrumu [69]



Şekil 4.2 A. TMZ molekülüne ait kalibrasyon eğrisi; **B.** TMZ molekülüne ait UV-Vis Spektrumu [70]

4.2 Farklı Parametreler ile CAPE-Temozolomid Yüklü PLGA Nanopartiküllerinin Sentezi

Etken maddenin barındırdığı hidrofilik ya da hidrofobik karakter, Poli (laktik asit-ko-glikolik asit) (PLGA) nanopartiküllerinin hazırlanmasında uygulanacak metodun seçimi için en önemli değişkendir. Yapılan çalışmada CAPE ve temozolomid molekülleri PLGA polimeri içerisine enkapsüle edilerek nanopartiküler formülasyon elde edilmiştir. Kullanılan etken maddelerden CAPE'nin hidrofobik, temozolomidin ise hidrofilik özellik göstermesi sebebiyle PLGA nanopartikülleri tekli emülsiyon (w/o) çözücü uçurma yöntemi uygulanarak hazırlanmıştır.

Farklı sentez parametreleri kullanılarak CAPE ve temozolomid etken maddeleri 3 farklı şekilde (CT-NP1, CT-NP2 ve CT-NP3) PLGA polimerine enkapsüle edilmiştir. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılmak üzere optimize koşullara sahip nanopartikül seçilerek çalışılmıştır.

İlk nanopartikül CT-NP1'in sentezinde CAPE ve temozolomid etken maddeleri 1'er mg, PLGA ise 50 mg olarak belirlenmiş ve sentezlenen nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinliği ve etken madde yükleme kapasitesinin beklenenden farklı olarak bulunması sebebiyle etken madde miktarları artırılarak ve sentez parametreleri farklı nanopartiküller sentezlenmiştir. CAPE ve PLGA miktarı artırılarak gerçekleştirilen CT-NP2 sentezinde CAPE için reaksiyon verimi, enkapsülasyon etkinliği ve etken madde yükleme kapasitesinde artış gözlense de temozolomidin PLGA polimeri içerisine başarılı enkapsülasyonu gözlenememiştir. Yapılan son sentezde temozolomid miktarı artırılıp PLGA miktarı azaltılmış ve nanopartikül stabilizasyonunu sağlamak amacıyla iç faz için %1'lük 5 ml PVA, dış faz için ise % 0.1'lik 35 ml PVA kullanılmıştır. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılmak üzere istenen sonuçların elde edildiği sentezlenen CT-NP3 seçilmiştir. Nanopartiküllere ait tüm sentez parametreleri Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1 Farklı parametreler kullanılarak üretilen nanopartiküller

NP	Bileşenler			PVA Miktarı		Sonikasyon
	CAPE (mg)	TMZ (mg)	PLGA (mg)	İç Faz (ml, %)	Dış Faz (ml, %)	
CT-NP1	1 mg	1 mg	50 mg	4 ml, %3	35 ml, %0,1	2 dk %80
CT-NP2	5 mg	1 mg	100 mg	4 ml, %3	35 ml, %0,1	2 dk %80
CT-NP3	5 mg	2 mg	20 mg	5 ml, %1	35 ml, %0,1	2 dk %40

4.3 CAPE-TMZ Yüklü Nanopartiküllerin Reaksiyon Verimi, Enkapsülasyon Etkinliği ve Etken Madde Yüklenme Verimi

Sentezlenen nanopartiküllerin hesaplanarak elde edilen; reaksiyon verimi, enkapsülasyon etkinliği ve etken madde yükleme verimi değerleri Tablo 4.2'de verilmiştir.

4.3.1 Reaksiyon Verimi (RV)

Etken maddelerin 1:1 oranında 50 mg PLGA içerisine enkapsüle edildiği nanopartikülün (CT-NP1) reaksiyon verimi %28,23 olarak bulunmuştur. CAPE miktarı artırılarak gerçekleştirilen sentezlerde reaksiyon veriminin arttığı gözlenmiştir. 5 mg CAPE, 1 mg temozolomid ve 100 mg PLGA kullanılarak gerçekleştirilen nanopartikül (CT-NP2) sentezinde reaksiyon verimi %40,79 olarak bulunmuştur. Temozolomid miktarının da artırılıp PLGA miktarının azaltıldığı sentezden elde edilen nanopartikülün (CT-NP3) reaksiyon verimi %45,92 olarak bulunmuştur (Tablo 4.2). Sentez parametrelerinden artan PLGA miktarının reaksiyon verimine yaptığı olumlu etki yapılan çalışmalarda elde edilen verilerle desteklenmektedir [74], [75]. Elde edilen sonuçlara bakılarak değişen PLGA miktarlarının reaksiyon verimi üzerine etkisini değerlendirmek için farklı miktarlarda PLGA ile deneme yapmak gerekmektedir. Ancak Tablo 4.2'de sonuçlara bakılarak CAPE-temozolomid yüklü nanopartiküllerin reaksiyon verimi için yalnızca PLGA artışının yeterli olmadığı, etken madde miktarlarının artırılarak

verimde daha etkili bir artış sağlanacağı görülmektedir. CAPE ve temozolomid miktarlarında yapılan artışla beraber organik fazdaki etken madde konsantrasyonu artmış, PLGA polimeriyle daha fazla etkileşime giren etken maddelerin kapsüle olma verimleri artmıştır.

4.3.2 Enkapsülasyon Etkinliği (EE)

Nanopartiküllere enkapsüle edilen etken madde miktarı, santifüj işlemleri sonrası toplanan üst fazların; enkapsülasyon etkinliği ve etken madde yükleme verimi hesaplamalarında kullanılmasıyla elde edilmiştir. Üst fazlar toplanarak UV absorbans değerleri 323 nm ve 330 nm'de okunarak elde edilen değerler kalibrasyon eğrisi yardımıyla enkapsüle olan etken madde miktarları CAPE ve temozolomid için ayrı ayrı hesaplanmıştır (Tablo 4.2).

1'er mg CAPE ve temozolomidin 1:1 oranında kullanılmasıyla gerçekleştirilen CT-NP1 sentezinde enkapsülasyon etkinliğinin hesaplanmasıyla elde edilen sonuçlar CAPE ve temozolomid etken maddelerinin nanopartiküle enkapsüle olmadığını göstermiştir. Düşük molekül ağırlığı (194,15 g/mol) ve küçük boyutları sebebiyle temozolomid molekülünün kapsüllenmesinde yaşanan zorluklar nanotaşıyıcı sistem uygulamalarında yaygınlaşmış bir problemdir. Nanopartikül sentezi sırasında temozolomidin hidrofilik yapısı sebebiyle organik fazdan sulu fazla difüzyonunun hızlı gerçekleşmesi enkapsülasyon etkinliğindeki zayıflığı açıklamaktadır [71]. CAPE gibi hidrofobik yapılı etken maddelerin, kullanılan polimer ile etkileşimlerinin zayıf olduğu bilinmekte ve bu problemin üstesinden gelebilmek adına etken madde miktarında yapılan artışların enkapsülasyon etkinliğinde başarılı sonuç verdiği görülmektedir [47].

CT-NP2 sentezinde CAPE için hesaplanan enkapsülasyon etkinliği %57,2'dir. CAPE molekülü için artan enkapsülasyon etkinliğinin, PLGA polimerine enkapsüle edilen etken madde miktarlarında yapılan artışların sebebi olduğu çalışmalarda görülmektedir [75].

Temozolomid için hesaplanan enkapsülasyon etkinliği ise temozolomidin nanopartiküle enkapsüle olmadığını göstermiştir. Suda yüksek çözünürlüğe sahip temozolomidin bilinen bir diğer özelliği enkapsülasyon etkinliğinin düşük olmasıdır. PLGA miktarında gerçekleştirilen artış, temozolomid etken maddesinin

enkapsülasyonunda artırıcı etkide bulunmamıştır. Bunun nedeninin, temozolomidin DCM'de düşük çözünürlük göstermesi ve bu sebeple PLGA polimeriyle karışamaması olduğu düşünülmektedir [76].

CT-NP3 sentezinden elde edilen enkapsülasyon etkinliği CAPE için %83,2; temozolomid için ise %40 olarak bulundu. Sonuç olarak başlangıç etken madde miktarlarını artırarak CAPE ve temozolomidin enkapsülasyon etkinliğinde pozitif etki yaratılmıştır. CAPE'de görülen artan enkapsülasyon etkinliği, hidrofobik maddelerin PLGA polimerine enkapsülasyonundaki en önemli parametrelerden biri olan polimer/etken madde oranı ile açıklanabilmaktedir [77]. Temozolomidin PLGA polimerine enkapsülasyonunun artırılması adına PVA çözeltisi içerisine eklenen temozolomid, organik fazdan PVA içeren sulu faza istenmeyen ilaç difüzyonunu önlemiş bunun sonucunda da verimli bir enkapsülasyon etkinliği sağlanmıştır. Temozolomid ile doyurulan sulu fazın nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinliğine yaptığı pozitif etki yapılan çalışmalarla paralellik göstermektedir [71], [76].

4.3.3 Etken Madde Yüklenme Verimi (DL)

Nanopartikülün etken madde yükleme verimi polimerik maddelere enkapsüle edilen etken maddelerin terapötik etkinliğinde ve nanotaşıyıcı sistemlerin ilaç dağıtımında en önemli parametredir [78].

Nanopartikül tasarımında polimer bileşimi, moleküler ağırlık ve polimer/etken madde oranı parametrelerinin yanı sıra optimize edilmesi gereken en önemli parametrelerden biri de etken madde yükleme verimidir [77].

Elde edilen katı nanopartikül miktarı ve etken maddelerin enkapsülasyon miktarları ile hesaplanan etken madde yükleme verimi her iki etken madde için ayrı ayrı hesaplanmıştır (Tablo 4.2).

1'er mg CAPE ve temozolomidin 1:1 oranında kullanılmasıyla gerçekleştirilen CT-NP1 sentezinde CAPE ve temozolomid için etken madde yüklenmesi açısından uygun parametrelere sahip olmadığı, etken maddelerin enkapsüle edilememesiyle belirlenmiştir. Düşük etken madde miktarlarının PLGA polimerine etken madde yüklemesindeki verim düşüklüğüne sebep olduğu düşünülmektedir.

CAPE miktarının 5 mg'a çıkarılarak gerçekleştirilen CT-NP2 sentezinde CAPE için etken madde yükleme verimi %6,94 olarak bulunmuştur. Temozolomidin enkapsüle edilememesi sebebiyle bu sentez koşullarında temozolomid için verimle etken madde yüklenmesi gerçekleştirilememiştir. Hidrofilik yapıda olan temzolomid'in enkapsülasyon sırasında organik fazdan sulu faza difüzyonunun hızlı olması sebebiyle etken madde yüklenmesinde verim alınamamıştır [71].

20 mg PLGA, 5 mg CAPE ve 2 mg temozolomid kullanılan CT-NP3 sentezinde etken madde yükleme verimi ayrı ayrı hesaplanarak CAPE için %33,54; temozolomid için ise %6,45 olarak bulundu. Etken madde yükleme veriminin düşük olması sebebiyle temozolomidin, PLGA polimerine enkapsülasyonunda zorluklar yaşanmaktadır [79]. Temozolomidin en önemli dezavantajı olan zayıf etken madde yükleme veriminin üstesinden gelebilmek adına doymuş sulu faz tekniği kullanılarak nanopartikül sentezlenmiştir. Bu sentezde en yüksek etken madde yükleme verimi elde edilmiş ve Ananta ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile paralel sonuçlar alınmıştır [71]. Nanopartikül sentezinde yapılan polimer ve etken madde miktarında değişikliklerin optimizasyonunda yaptığı etki henüz kesin olarak belirlenememiştir [77]. Hidrofobik özellikteki CAPE'nin etken madde yükleme verimi yapılan çalışmalarla paralellik göstermektedir [80]. CT-NP3 sentezinde görülen etken madde yükleme verimindeki artışın PLGA polimerine, farklı özelliklere sahip (temozolomid, hidrofilik ve CAPE, hidrofobik) etken maddelerin birlikte enkapsüle edilmesiyle sağlanmış olabileceği düşünülmektedir [81].

Tablo 4.2 Etken madde olarak CAPE ve temozolomid kullanılarak üretilen nanopartiküllere ait RV, EE ve DL sonuçları

NP	Katı NP miktarı (mg)	Reaksiyon Verimi (RV - %)	Enkapsülasyon Etkinliği (EE - %)		Etken Madde Yüklenme Verimi (DL - %)	
			CAPE	TMZ	CAPE	TMZ
CT-NP1	14,4	28,23	-	-	-	-
CT-NP2	41,2	40,79	57,2	-	6,94	-
CT-NP3	12,4	45,92	83,2	40	33,54	6,45

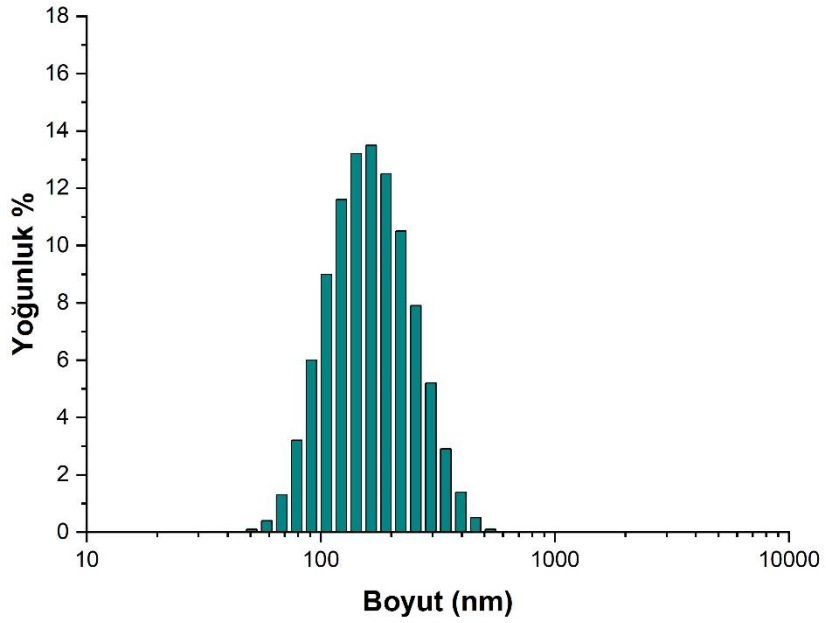
4.4 CAPE-TMZ Yüklü Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

4.4.1 Nanopartiküllerin Boyut Analizi ve Çoklu Dağılım İndeksleri (PDI)

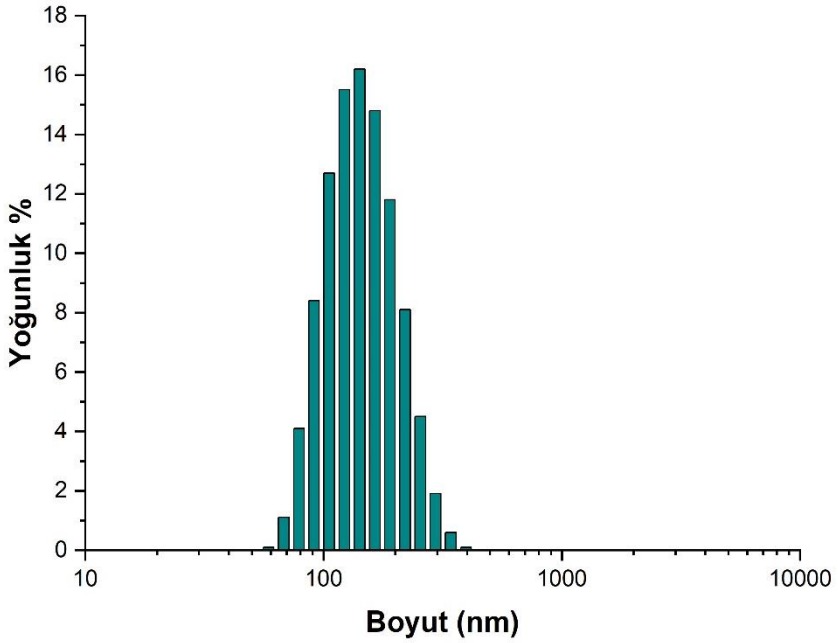
Farklı parametrelerle sentezlenen nanopartiküller CT-NP1, CT-NP2 ve CT-NP3'ün fiziko-kimyasal özelliklerinin belirlenmesi kapsamında boyut analizi ve çoklu dağılım indeksleri (PDI) Zetasizer Nano Z cihazı kullanılarak 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

1 mg CAPE kullanılarak sentezlenen CT-NP1'in boyutu 154,4 nm olarak bulunmuştur. Sentezinde 5 mg CAPE kullanılan CT-NP2'nin boyutuna bakıldığında 136,3 nm olarak bulunurken etken maddeler artırılarak sentezlenen CT-NP3'ün boyut ölçümünden 168,3 nm sonucu elde edilmiştir.

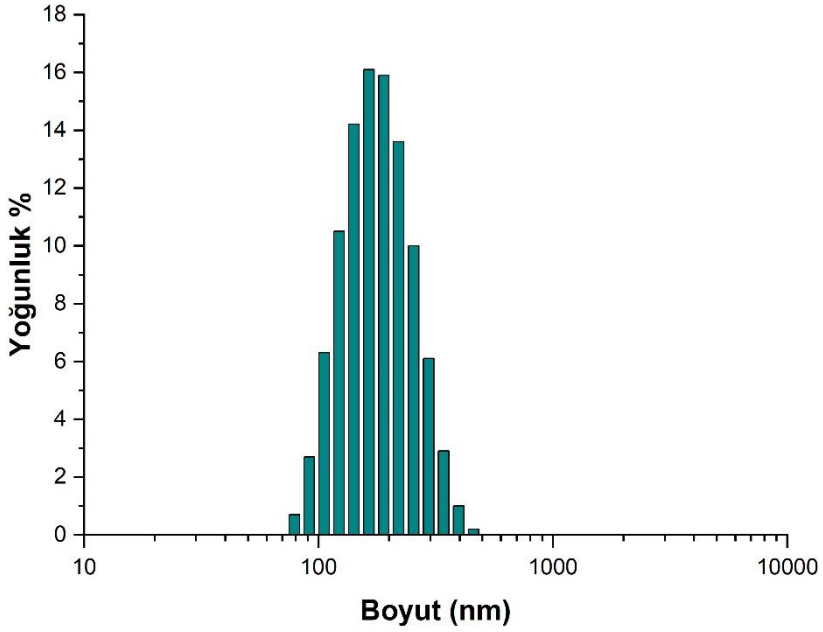
Farklı parametrelerle sentezlenen CT-NP1, CT-NP2 ve CT-NP3 nanopartiküllerinin çoklu dağılım indekslerine (PDI) bakıldığında sırasıyla; 0,190, 0,121 ve 0,103 değerleri elde edilmiştir. Elde edilen düşük PDI değerlerine ve Şekil 4.3, Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'te verilen boyut dağılım grafiklerine bakıldığında nanopartikül boyut dağılımlarının dar ve homojen yapıda olduğu görülmektedir.



Şekil 4.3 CT-NP1'e ait boyut dağılım grafiği



Şekil 4.4 CT-NP2'ye ait boyut dağılım grafiği

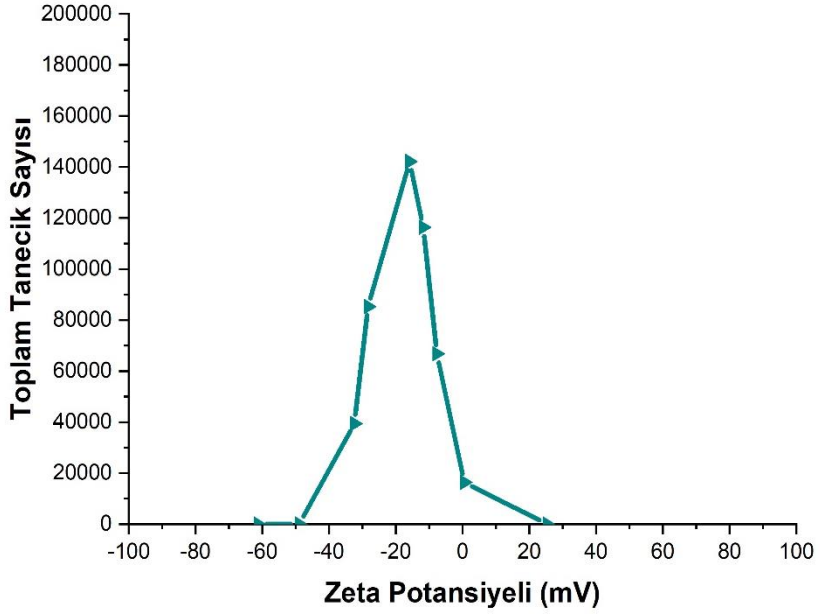


Şekil 4.5 CT-NP3'e ait boyut dağılım grafiği

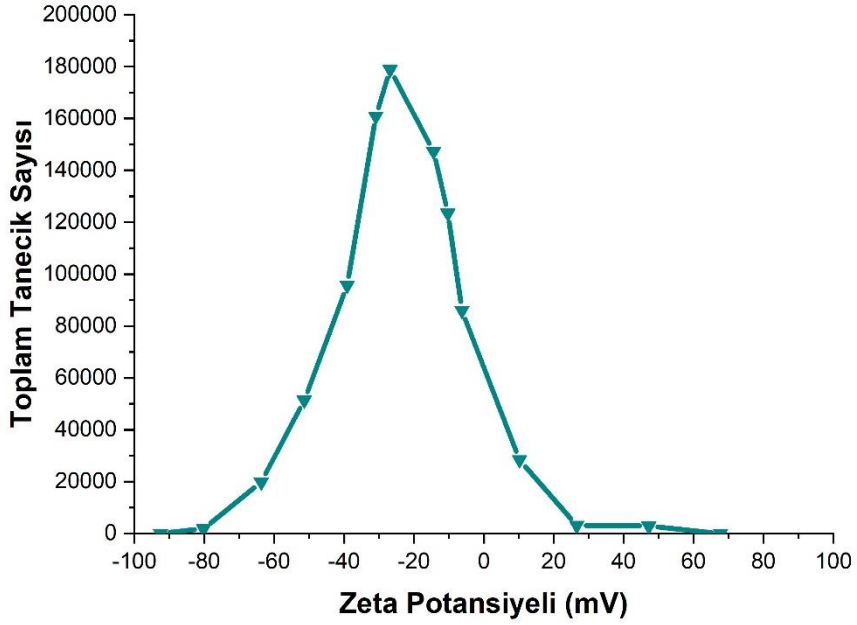
Glioblastoma tedavisi kapsamında geliştirilen nanopartiküler ilaç sistemlerinin beyne nüfuz etmeleri ve ilaçların hedeflenen bölgelere iletilmesinde nanopartiküllerin boyutu önem teşkil etmektedir [82]. Nanopartiküler ilaç sistemleri aracılığıyla etkili bir glioblastoma tedavisi gerçekleştirebilmek adına nanopartiküllerin kan-beyin bariyerini (KBB) aşabilmeleri gerekmektedir. Bu sebeple sentezlenen nanopartikül boyutlarının 200 nm'den küçük olması gerekmektedir [45], [83]. Nanopartikül sentezinde kullanılan etken maddelerin miktarlarındaki artışın, polimerlere enkapsüle edilen madde miktarının sabit olması sebebiyle daha büyük nanopartikül boyutlarına sebep olacağı düşünülmektedir [84].

4.4.2 Nanopartiküllerin Zeta Potansiyel Analizi

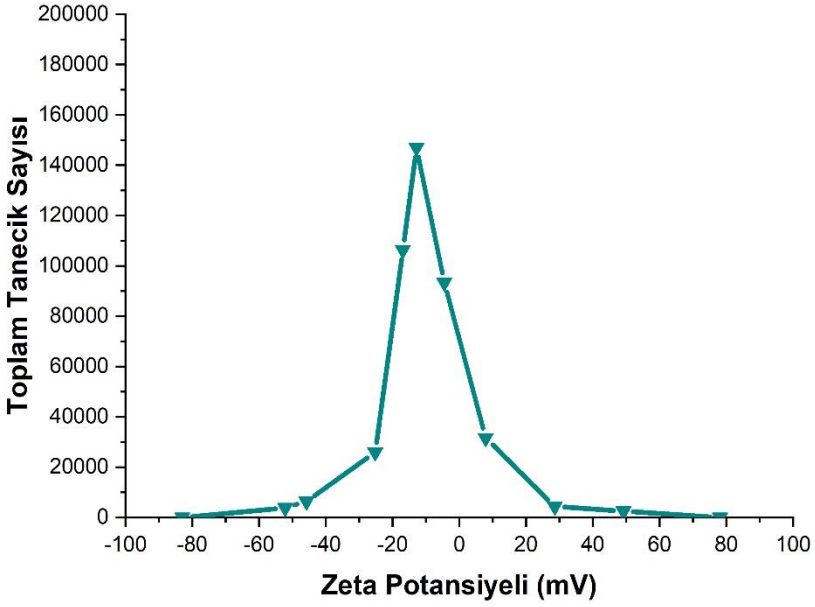
Sentezlenen nanopartikülerin karakterizasyon analizinde zeta potansiyelleri kapiler küvetler içerisinde Zetasizer Nano Z cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Nanopartiküllerin zeta potansiyel grafikleri Şekil 4.6, Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'de verilmiş olup nanopartiküllere ait zeta potansiyel değerleri Tablo 4.3'te yer almaktadır. CT-NP1, CT-NP2 ve CT-NP3'ün zeta potansiyel analizinde elde edilen değerler sırasıyla -18,5 mV, -25,2 mV ve -15,5 mV olarak ölçülmüştür.



Şekil 4.6 CT-NP1'e ait zeta potansiyel grafiği



Şekil 4.7 CT-NP2'ye ait zeta potansiyel grafiği



Şekil 4.8 CT-NP3'e ait zeta potansiyel grafiği

Nanopartiküler ilaç taşıma sistemleri tasarımında önemli özelliklerden biri de yüzey yüküdür. Nanopartiküllerin yüzey yükleri hem kan-beyin bariyeri geçişi hem de beyin dokusunda toksik etkiye sebep olma konusunda önem taşımaktadır. Yapılan çalışmalarda düşük konsantrasyonlarda anyonik özellikteki nanopartiküllerin kan-beyin bariyeri bütünlüğünde toksik etki yaratmadığı görülmüştür [83], [85]. Sentezlenen nanopartiküllerin yüzey yükleri yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında elde edilen sonuçlar paralellik göstermektedir [86].

Tablo 4.3 Etken madde olarak CAPE ve TMZ kullanılarak üretilen nanopartiküllere ait fiziko-kimyasal karakterizasyon sonuçları

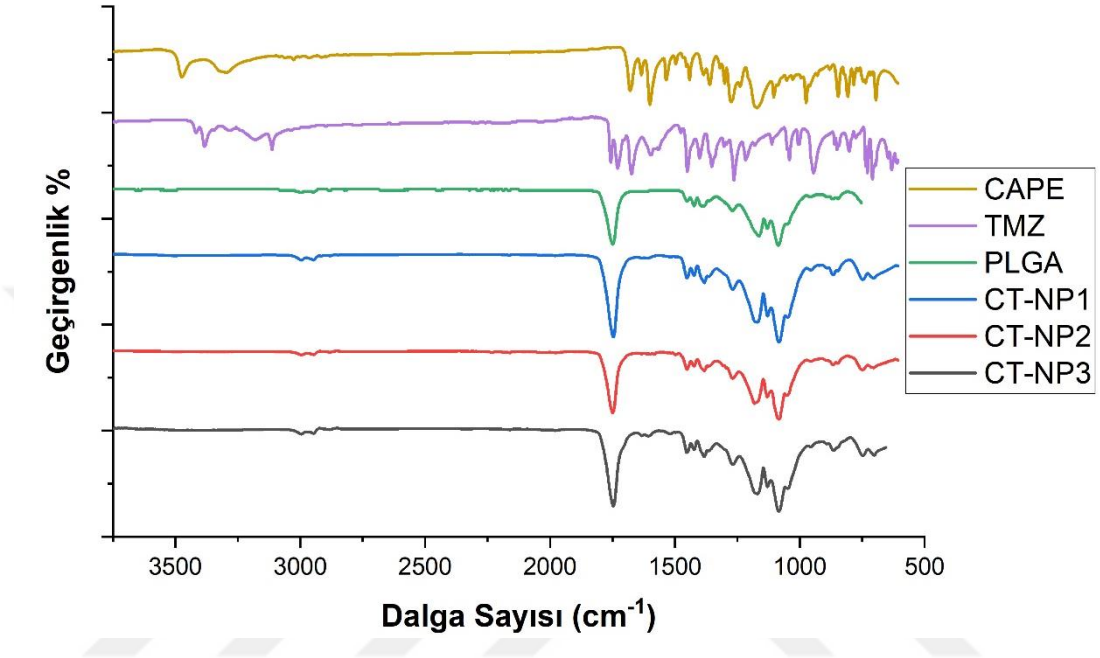
NP	Boyut Z-Ave (nm)	Çoklu Dağılım İndeksi (PDI)	Zeta Potansiyel (mV)
CT-NP1	154,4	0,190	-18,5
CT-NP 2	136,3	0,121	-25,2
CT-NP 3	168,3	0,103	-15,5

4.4.3 Nanopartiküllerin FT-IR Analizi

Nanopartiküllerin karakterizasyon analizlerinden olan Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) analizi ile sentezlenen nanopartiküllerin yüzeyinde bulunan fonksiyonel grupların tayin edilmesi ve bu sayede etken maddelerin nanopartikül içerisine enkapsülasyonu veya yüzeye adsorpsiyonu tespit edilmiştir. Etken maddelerin başarılı şekilde enkapsüle olması halinde FT-IR spektrumlarının PLGA polimeri karakteristiğinde olması beklenmektedir. Kullanılan etken maddeler CAPE, temozolomid; polimer PLGA ve sentezlenen nanopartiküllere ait FT-IR spektrumları Şekil 4.9'da gösterilmiştir.

CAPE molekülünün FTIR spektrumunda O-H grubu 3480 cm^{-1} ve 3327 cm^{-1} bölgelerinde, C-C grubu 1601 cm^{-1} bölgesinde ve C-O grubu ise 1685 cm^{-1} ve 1182 cm^{-1} bölgelerinde karakteristik olarak pik vermektedir [87].

Polar yapıları sebebiyle C=O grubu 1700–1750 cm^{-1} bölgesinde güçlü ve yoğun bant yapıları vermektedir. Temozolomid molekünün FTIR spektrumunda C=O grubu yoğunlukla 1758 cm^{-1} bölgesinde gözlenmektedir. NH_2 grubu aromatik aminlerde 3300–3500 cm^{-1} bölgesindedir. Temozolomid molekülünde NH_2 grubu 3420 cm^{-1} ve 3385 cm^{-1} bölgelerinde pik vermektedir [88].



Şekil 4.9 CAPE, TMZ, PLGA, CT-NP1, CT-NP2 ve CT-NP3'e ait FT-IR spektrumları

PLGA polimerinin FTIR spektrumunda 2993 cm^{-1} ve 2989 cm^{-1} bölgelerinde bulunan pikler C-H gruplarına aittir. C=O grubundaki ester bağına ait atanan pik 1751 cm^{-1}'de görülmektedir. PLGA polimerinin karakteristik tepe noktalarını veren C-O grubu 1165 cm^{-1} ve 1087 cm^{-1} bölgelerinde pik vermektedirler [89].

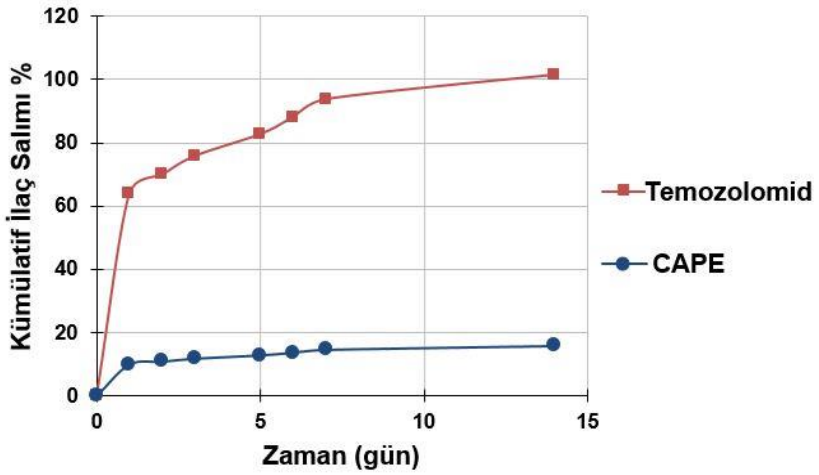
Sentezlenen CT-NP1, CT-NP2 ve CT-NP3 spektrumlarına bakıldığında PLGA spektrumuyla özdeş olduğu görülmekte bu da CAPE ve temozolomid etken maddelerinin başarılı şekilde enkapsüle edildiğini kanıtlamaktadır.

Farklı parametrelerle sentezlenen CT-NP1, CT-NP2 ve CT-NP3 nanopartiküllerinin karakterizasyon sonuçları değerlendirilmiştir. Bu sonuçlara göre hücre kültürü çalışmalarında kullanılmak üzere CT-NP3 nanopartikülü seçilmiştir. Tez kapsamında yapılacak *in vitro* çalışmalarda kullanılacak CT-NP3 nanopartikül, ilerleyen bölümlerde CT-NP olarak adlandırılacaktır.

4.5 Nanopartiküllerin *İn Vitro* Salım Analizi

Sentezlenen nanopartikül PBS (pH: 7.4) süspanse edilerek 37°C'de yatay bir şekilde çalkalanarak *in vitro* salım deneyi 15 gün boyunca takip edilmiştir. Belirli sürelerde yapılan UV-spektrofotometre ölçümlerine göre CAPE-temozolomid yüklü nanopartikülü (CT-NP) için salım grafiği çizilmiştir. CT-NP'nin 15 gün boyunca gösterdiği salım davranışı Şekil 4.10'da gösterilmiştir.

Etken maddelerin aktivitelerinin artırılması ve dezavantajlarının bertaraf edilmesi adına nanopartiküler sistemlere enkapsülasyonunun en büyük özelliği etken maddelerin kontrollü salımının sağlanabilmesidir [56]. Nanopartikül ilaç sistemlerinde kapsüllerin salım ortamına alındıktan sonra, stabil salım hızı profiline erişmeden önce fazla miktarda ilaç salınımı gerçekleşmektedir. "Burst (patlama) etkisi" olarak adlandırılan bu mekanizma yüksek ilk ilaç salımına neden olurken nanopartiküler ilaç formülasyonunun kullanım süresini kısıtlamaktadır [90]. Nanopartiküler ilaç sistemlerinin başlangıç burst (patlama) etkisi salımı ve stabil hızda salım olarak iki farklı salım profili gösterdikleri bilinmektedir [91]. Yapılan çalışmalarda tedavilerde kullanılan ilaçların burst (patlama) etkisi sonrasında salım hızı profilinin stabil duruma geldiği görülmüştür [92].



Şekil 4.10 CT-NP'nin temozolomid ve CAPE için *in vitro* salım grafiği

CT-NP'nin salım grafiğine bakıldığında temozolomid molekülünün %63,95'inin, CAPE molekülünün ise %9,9'unun salınmasıyla her iki molekül için de burst (patlama) etkisinin ilk 24 saatte gerçekleştiği görülmektedir.

Temozolomid için salım grafiği artan bir eğimle 3. günde %75,86, 5. günde %82,8 ve 7. günde %93,81'e ulaştıktan sonra stabil salım hızı profili göstermiştir. Buna rağmen CAPE molekülün salım grafiğinde benzer ivmeli artış görülmemiş ve 7. günde salım hızı stabil profil izlemiştir. Bu durum yapılan çalışmalarda hidrofobik ilaçların yüksek ilaç içeriklerinde nanopartiküllerin çekirdeğinde birikim gösterdiği ve bu sebeple daha yavaş salındığı şeklinde açıklanmaktadır [11].

Grafiğe bakıldığında CAPE'nin salım hızının yavaş olmasında, ilaç ve polimer arasındaki hidrofobik etkileşim sebebiyle CAPE'nin nanopartiküllerin merkezine yerleşmesinin neden olduğu söylenebilmektedir. Nanopartikülerin polimer kabuğu içinde ilaç çekirdeği yapısı ile ilaç taşıyıcı sistemlerin dolaşımda ömrünün uzatılması, hidrofobik ilaçların hedef kanser hücrelerine ulaşması ve sağlıklı hücrelere sistotoksik etkisinin azaltılması potansiyeli oluşturulmaktadır [93].

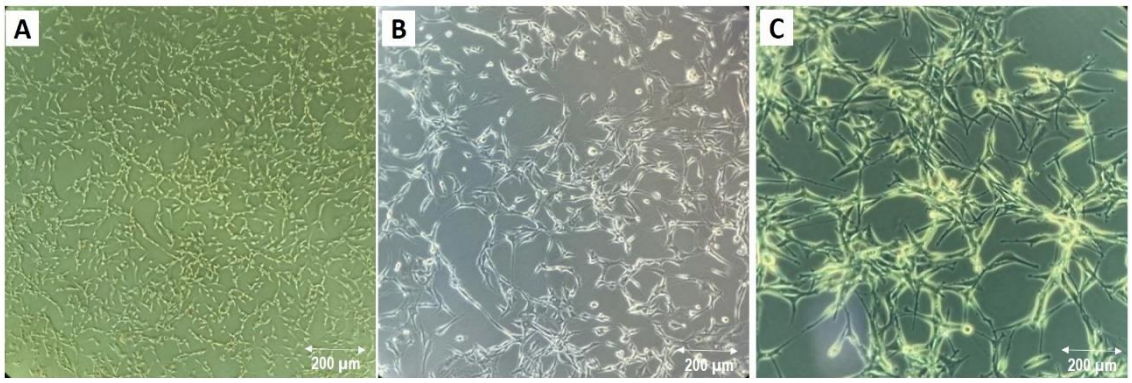
İlaç salınımı büyük ölçüde nanopartikül sentezinde kullanılan polimerin bozunmasına da bağlıdır. Etken madde yükleme verimi, etken madde ve polimerlerin moleküler ağırlıkları ve polimer maddenin monomer oranı ilaç salım hızını ve modelini etkileyen başlıca faktörlerdir [94].

Temozolomid molekülünün hızlı salımındaki etken molekülün serbest formunun yarı ömrünün 1.8 saat olmasıyla açıklanabilir. Nanopartiküle enkapsüle edilen temozolomidin çözünme profiline bakıldığında yarı ömrünün uzadığı söylenebilmektedir. Sentezlenen nanopartiküller ile sürdürülebilir ve kontrollü bir ilaç salımı, kan-beyin bariyerinin aşılması, kanser hücrelerine etki gösterebilecek aktif (MTIC)'ye dönüşmesi ve ayrıca temozolomid tedavisinde doz tekrarlarına gerek duyulmayarak sitotoksik etkinin azaltılması sağlanabilmektedir [95], [96].

İn vitro salım çalışmalarından alınan sonuçlar referans alınarak, sentezlenen nanopartikülün U87MG insan glioblastoma hücre hattı üzerinde *in vitro* biyolojik etkinlik çalışmaları yapılmıştır.

4.6 U87MG İnsan Glioblastoma Hücre Hattında CAPE-TMZ Yüklü Nanopartiküllerin *İn Vitro* Etkinlik Testleri

Üretilen CAPE-temozolomid yüklü nanopartiküller (CT-NP) *in vitro* hücre kültürü çalışmalarında insan glioblastoma hücre hattı U87MG kullanılmıştır. İnsan glioblastoma hücre hattı %10 FBS içeren DMEM besiyerinde 37°C'de %5 CO_2'li ortamda büyütülmüş ve Şekil 4.11'deki morfolojik görüntüleri elde edilmiştir.

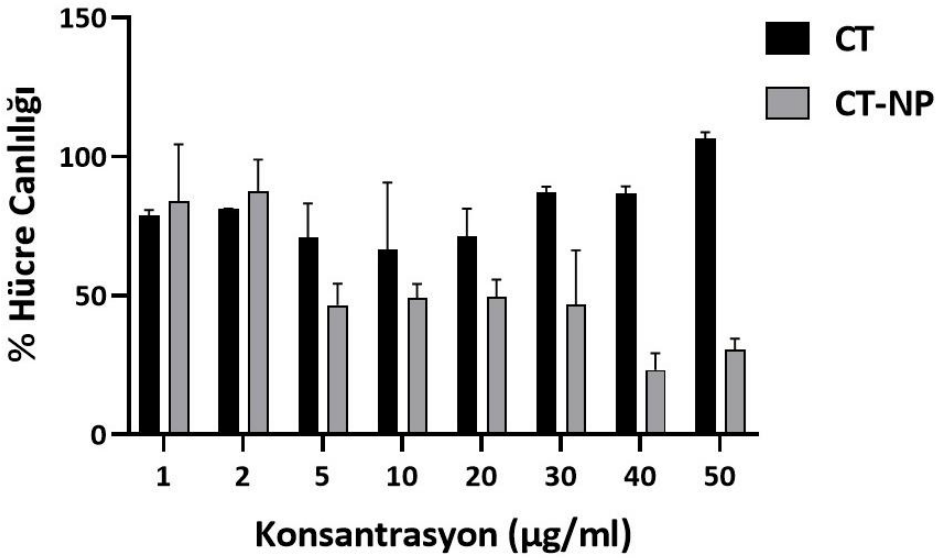


Şekil 4.11 U87MG hücre hattının mikroskop görüntüsü, **A.** 5X; **B.** 10X; **C.** 20X

4.6.1 Serbest CAPE-Temozolomid ve CAPE-Temozolomid Yüklü Nanopartiküllerin U87MG ve CCD-1079Sk Hücre Hatları Üzerindeki Sitotoksik Aktivitesi

Serbest CAPE-temozolomid (CT) ve CAPE-temozolomid yüklü nanopartiküllerin (CT-NP) U87MG ve CCD-1079Sk hücreleri üzerindeki sistotoksik aktivite MTT yöntemiyle belirlenmiştir. MTT (metiltiazol difenil tetrazolyum), hücre proliferasyon testlerinde metabolik aktivitenin ölçümünde kullanılan bir tetrazolyum tuzudur. Pozitif yüklü bir bileşik olan MTT, canlı hücrelerde membrana yapısını aşarak hücre içine alındığında dehidrojenaz enzimin aktivitesiyle formazan kristallerine dönüştürülerek renk değişimi gerçekleşir. Bu renk değişiminin absorbans olarak ELISA okuyucu veya spektrofotometrik yöntemle ölçülmesiyle canlı/ölü hücre sayısı belirlenir [97], [98].

Ayrı ayrı 96 kuyulu mikroplakalara ekilen U87MG ve CCD-1079Sk hücreleri üzerine 1 µg/ml, 2 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml, 40 µg/ml ve 50 µg/ml konsantrasyonlarında CT ve CT-NP uygulandı.

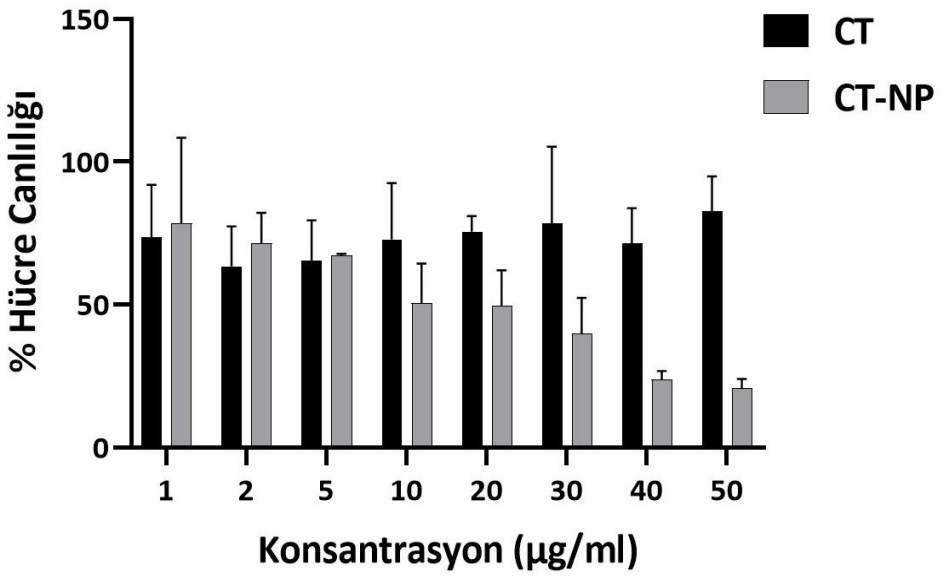


Şekil 4.12 CT ve CT-NP'nin U87MG hücre canlılığına 24 saat süre ile etkisi

24 ve 48 saat süreyle inkübe edilen U87MG hücrelerinin konsantrasyon ve zamana bağlı % canlılık değişimleri Şekil 4.12 ve Şekil 4.13'te gösterilmiştir. CCD-1079Sk hücreleri 24 saat süreyle inkübe edildi ve % canlılık değişimi Şekil 4.14'te verilmiştir.

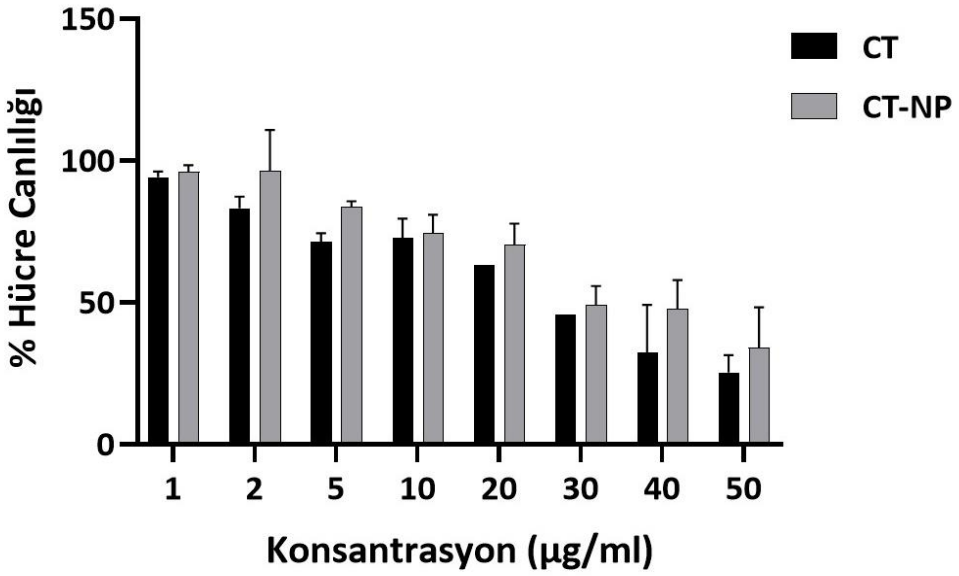
U87MG hücrelerinin 24 saat süreyle CT-NP ile muamele edilmesi sonucu IC_{50} değeri 11,69 µg/ml olarak bulunmuştu. 48 saat süreyle CT ve CT-NP ile muamele edilen U87MG hücrelerinin IC_{50} değerleri sırasıyla 55,7 µg/ml ve 18,21 µg/ml olarak hesaplanmıştır.

Temozolomidin insan glioblastoma hücre hatları üzerinde yapılan sitotoksik aktivitesinin yapıldığı çalışmalarda U87MG, GBM8401 ve GBM-SKH hücrelerinde IC_{50} değerleri sırasıyla 397,2, 391,4 ve 492,0 µM olarak bulunmuş ve belirlenen temozolomid dozunun ancak uzun süre uygulama sonucunda apoptozun indüklendiği görülmüştür [6]. C6 glioma hücre hattında yapılan temozolomid canlılık testinde serbest temozolomid ile zamandan bağımsız yapılan MTT testinde IC_{50} değeri 150 µg/mL olarak bulunurken, nanopartiküler sisteme enkapsüle edilen temozolomidin 72 ve 96 saat sonra IC_{50} değerleri 200 µg/mL ve 150 µg/mL olarak bulunmuştur [95].



Şekil 4.13 CT ve CT-NP'nin U87MG hücre canlılığına 48 saat süre ile etkisi

Temozolomid molekülünün serbest ve nanopartiküle enkapsüle edilmiş formları C6 glioma [76] ve U87MG insan glioblastoma [71] hücre hattında karşılaştırıldığında, kontrollü salım özelliği sayesinde temozolomid nanopartiküllerinin serbest formdan daha yüksek sitotoksik aktivitede olduğu bulunmuştur. Serbest temozolomidin düşük sitotoksik aktivitesi yarı ömrünün kısa olmasıyla açıklanmaktadır. Temozolomidin kanser hücrelerinde terapötik etki gösterebilmesi adına yüksek doz ve uzun süreli uygulama veya doz tekrarları gerekmektedir. Bu nedenle temozolomidin kısıtlanan kullanımına fayda sağlayacak antikanser etkili maddelerle kombinasyon stratejileri ortaya konmuştur. U87MG hücre hattı üzerinde paklitaksel ve temozolomidin kombinasyon uygulaması sonucunda sadece temozolomid uygulamasından daha yüksek sitotoksik aktivite göstermiştir. Paklitaksel ve temozolomidin sinerjistik etkilere sahip olduğu ve U87MG hücreleri üzerinde antikanser etki görülmüştür [65]. Flavonoid sınıfına ait doğal kaynaklı bileşik propolisin antikanser aktivitesinin ortaya çıkarılmasıyla beraber temozolomid ile kombinasyon çalışması yapılmıştır. Bulgular sonucunda temozolomid molekülün 10 µM-50 µM konsantrasyon aralığında önemli bir sitotoksik aktivite görülmezken, propolis-temozolomid kombinasyonunun tek başına temozolomidin 20 µM dozundan daha yüksek sitotoksik aktivitede olduğunu görülmüştür [5].



Şekil 4.14 CT ve CT-NP'nin CCD-1079Sk hücre canlılığına 24 saat süre ile etkisi

Farklı hücre hatlarında sitotoksik aktivitesi incelenen CAPE'nin, HepG2 hepatoselüler karsinom hücrelerinde 20 µg/mL konsantrasyonda hücre canlılığını ancak %72'ye düşürdüğü [99], CT26 fare kolorektal karsinom hücrelerinde nanopartikül enkapsülasyonuyla uygulanmış ve 10 µg/ml - 20 µg/ml aralığında IC_{50} değeri vermiştir [11]. Düşük antikanser aktivite göstermesi sebebiyle CAPE de diğer antikanser ajanlarla kombinasyon çalışmaları yapılarak potansiyeli artırılmaya çalışılmmıştır. Bu amaçla C6 glioma hücre hattında kombinasyon uygulaması yapılan 60 µM CAPE ve nM Dasatinib konsantrasyonlarında hücre proliferasyonunda %50 düşüş yaşanmıştır [10].

U87MG hücre hattına 24 saat süreyle CT uygulaması sonucu IC_{50} değeri elde edilememiştir. Bunun sebebi literatür sonuçlarına uygun şekilde, serbest formda uygulanan CAPE-temozolomid konsantrasyonlarının hücre canlılığını %50'ye düşürebilecek sitotoksik aktivite gösterememesidir. Yukarıdaki çalışmalarda serbest CAPE-temozolomid formunun IC_{50} değerine ancak yüksek dozlarda ulaşılabildiğine değinilmiştir. Sentezlenen CT-NP, U87MG hücrelerinde düşük dozlarda sitotoksik aktivite göstermesi sebebitle terapötik aktivitesinin yüksek olduğu düşünülmektedir.

CCD-1079Sk hücrelerinin 24 saat süreyle CT ve CT-NP ile muamele edilmesi sonucu IC_{50} değerleri sırasıyla 11,62 μg/ml ve 17,4 μg/ml olarak hesaplanmıştır. Şekil 4.14'te 24 saat süreyle CT uygulamasının CCD-1079Sk hücrelerine sitotoksik aktivitede bulunduğu görülmektedir. CT-NP uygulaması CT'den daha az sitotoksik aktiviteye sahiptir. Bu bulgular serbest formdaki CAPE-temozolomid etken maddelerinin sağlıklı hücrelere gösterdiği sitotoksik aktivite ile kullanımın kısıtlandığını, bu sebeple tedavi olarak kullanılması adına bu yöntemin geliştirilmesi gerektiği sonucunu vermektedir. Nanopartiküler sisteme enkapsüle edilen CAPE-temozolomidin sağlıklı hücrelere serbest formlarına oranla daha az sitotoksik etki göstermesi, sentezlenen CT-NP'lerin glioblastoma tedavisinde kullanım potansiyeli taşıdığını göstermektedir.

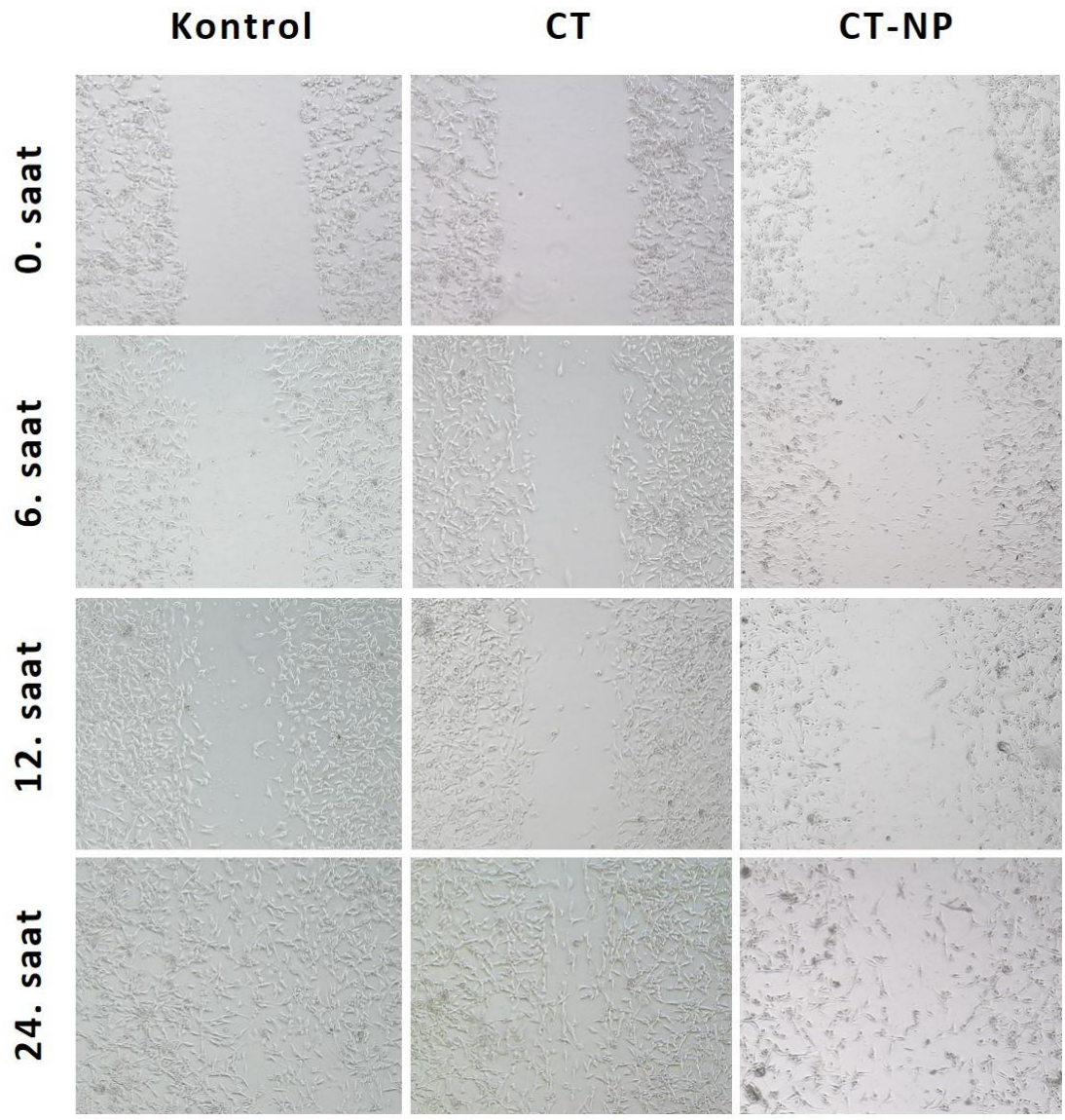
CT ve CT-NP'nin U87MG hücreleri üzerindeki IC_{50} değerleri, sitotoksik aktiviteleri ve kontrollü salım özellikleri göz önüne alındığında devam eden hücre çalışmalarında 24 ve 48 saat olmak üzere farklı inkübasyon süreleri kullanılmıştır.

4.6.2 Serbest CAPE-Temozolomid ve CAPE-Temozolomid Yüklü Nanopartiküllerin U87MG Hücreleri Üzerinde Hücre Göçüne Etkisi

CAPE-temozolomid yüklü nanopartiküllerin (CT-NP) U87MG hücreleri üzerindeki hücre göçüne etkisi serbest CAPE-temozolomid (CT) ile karşılaştırmalı olarak yara iyileşmesi testi ile incelenmiştir. Kontrol grubu ve IC_{50} değerlerine göre belirlenen CT ve CT-NP dozları ile inkübe edilen U87MG hücreleri 24 saat süreyle izlendi. Kontrol, CT ve CT-NP gruplarından 0, 6, 12 ve 24. saatlerde alınan mikroskop görüntüleri Şekil 4.15'te verilmiştir.

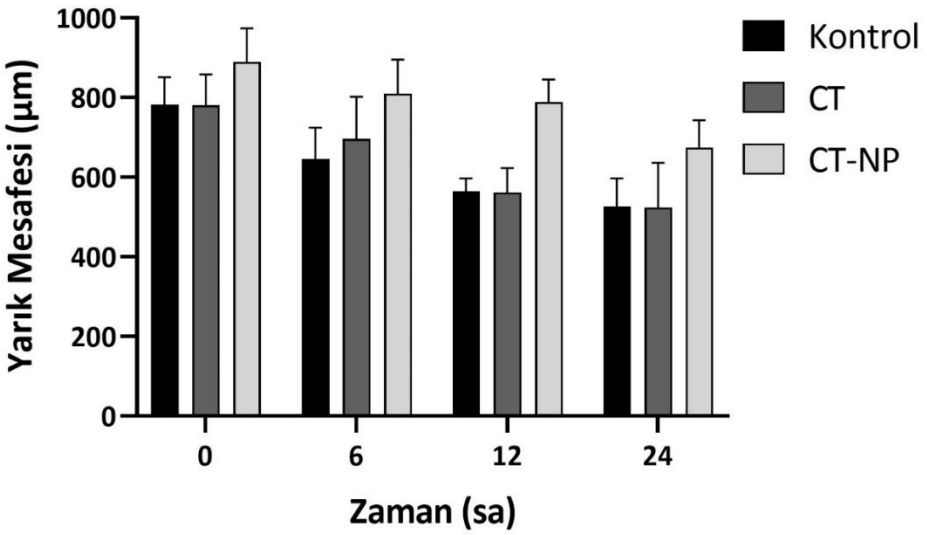
U87MG hücrelerindeki yarık mesafelerinin zamana bağlı olarak değişimleri verilen Tablo 4.4'e bakıldığında, tüm grupların arasındaki mesafenin zamana bağlı olarak azaldığı μm cinsinden görülmektedir. Bu değerlere göre 6. saatte ölçülen yarık mesafelerinde; kontrol grubunda %17,47, CT uygulaması yapılan grupta %10,78 ve CT-NP ile inkübe edilen grupta %8,97 daralma olduğu hesaplanmıştır. Şekil 4.16'da verilen grafikte 24. saatin sonunda yarık mesafeleri incelendiğinde kontrol grubu %78 kapanırken, CT uygulanan hücreler %71,7 kapanmıştır. CT-

NP uygulaması yapılan gruba bakıldığında %44,45'lik kapanma yüzdesiyle yarık mesafesindeki daralmanın en az olduğu görülmektedir.



Şekil 4.15 CT ve CT-NP'nin U87MG hücre göçüne etkisi

Kanser hücrelerinin metastaz kabiliyeti geliştirilen tedaviyi kısıtlayan büyük etmenlerden biridir. GBM hücreleri hücre göçü yoluyla kemoterapi ve radyoterapi tedavilerine direnç göstererek nüksetmektedir. Tümör hücreleri damar sistemiyle hücre göçünü kolaylaştırırak besin ve oksijen tedarikini kontrol ederek GBM'nin ilerlemesine katkıda bulunur. Hücre göçünü sınırlamak kanser hücrelerinin yayılımını önlemek açısından önem taşımaktadır [100], [101].



Şekil 4.16 CT ve CT-NP'nin U87MG hücrelerinde yarık mesafesinin zamana bağlı değişimi

Yapılan çalışmalarda standart tedavi kapsamında uygulanan temozolomide karşı glioblastoma hücrelerinin kazandığı direnç mekanizması sebebiyle, temozolomid uygulamasının hücre göçü ve istilasında etki göstermediği sonuçları elde edilmiştir [102]. Son geliştirilen ilaç stratejileri kanser tedavilerinde kombinasyon uygulamalarının antikanser ajanların tek başına kullanılmasından daha etkili olabileceğini düşündürmektedir. Yapılan çalışmada temozolomidin kombine tedavisinde glioblastoma hücre göçünü, proliferasyonunu ve istilasını baskıladığı görülmüştür [103].

Tablo 4.4 CT ve CT-NP uygulanan U87MG hücrelerindeki yarık mesafelerinin zamana bağlı olarak değişimleri

Zaman	Kontrol (µm)	CT (µm)	CT-NP (µm)
0. saat	782,42	780,26	889,27
6.saat	645,70	696,13	809,49
12.saat	564,86	561,24	788,62
24.saat	526,27	523,66	674,39

Tümör hücrelerinin büyük bir kısmı temozolomidin kanser hücrelerinde etki mekanizması olan metilasyona karşı duyarsızdır. Bitkisel kaynaklı ginseng'in içeriğindeki aktif bir bileşenin temozolomid ile kombinasyon tedavisinde bu duyarsızlığa bertaraf ettiği, anti-kanser ve anti-anjiyojenik aktivite gösterdiği bulunmuştur [104].

U87MG hücre hattı üzerinde çalışılan temozolomid ve yeşil çayın kombine tedavisinde, direnç mekanizmasının engellenmesinde temozolomid ile hücre canlılığı ve göçünde sinerjistik etkisi gösterilmiştir [105].

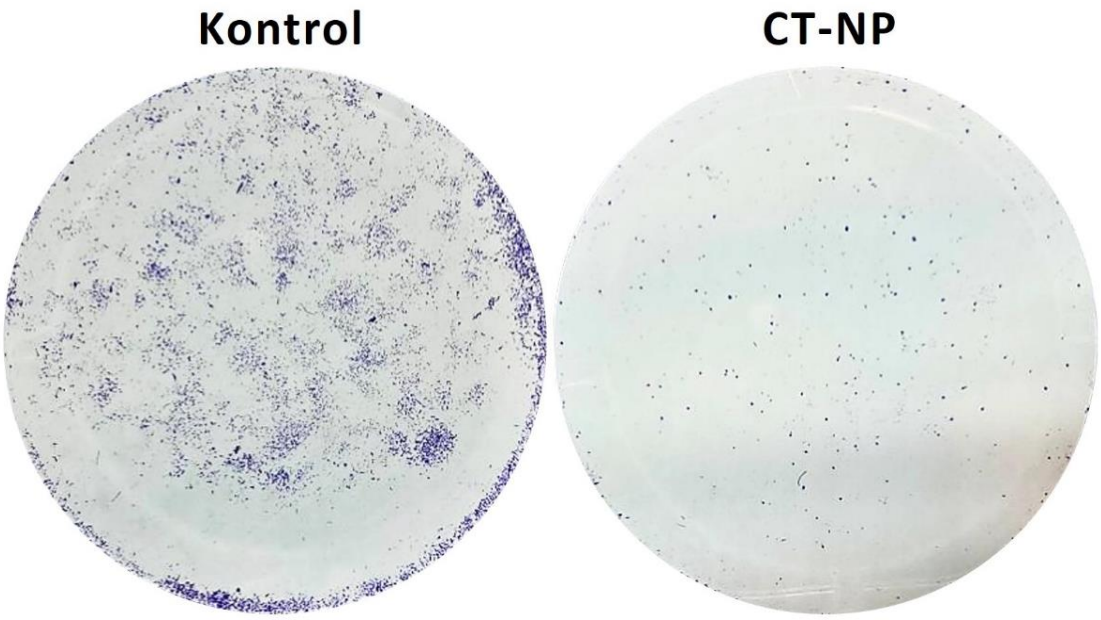
Glioblastoma hücre hatlarında çalışılan doğal bitki ürünleri flavonoid, terpenoid ve polifenollerin hücre göçü ve proliferasyonu yavaşlattığı ve hücre ölümünü teşvik ettiği, anjiyojenik faktörlerin (VEGF ve TGF-b1) ekspresyonunun azaltılması, PI3K/AKT/mTOR aracılı sinyal yollarının bozulması ve proliferasyonda görevli PCNA ve siklin D1 genlerinin ekspresyonlarının baskılanması aktiviteleriyle kanıtlanmıştır [106].

U87MG hücre hattı üzerinde CT ve CT-NP uygulamasından elde edilen veriler yapılan çalışmalarla paralellik göstermektedir. CAPE ve temozolomid etken maddelerinin kombinasyon halinde nanopartiküler sisteme enkapsüle edilmesiyle CAPE ve temozolomid moleküllerinin U87MG hücrelerindeki antikanser aktivitesinin artırılarak hücre göçünü baskılaması sağlanmıştır.

4.6.3 CAPE-Temozolomid Yüklü Nanopartiküllerin U87MG Hücrelerinde Koloni Oluşturma Potansiyeline Etkisi

CAPE-temozolomid yüklü nanopartiküllerin (CT-NP) U87MG hücreleri üzerinde koloni oluşturma potansiyeli koloni formasyon deneyi ile analiz edildi. Kontrol grubuyla karşılaştırmalı olarak IC_{50} değerlerine göre belirlenen CT-NP dozuyla inkübe edilen U87MG hücreleri 10. gün sonunda Şekil 4.17'de görüldüğü şekilde koloni sayımı amacıyla boyandı ve karşılaştırmalı analizi yapıldı. Kolonilerin sayımı ve değerlendirilmesinde ImageJ programı kullanıldı.

ImageJ programı kullanılarak yapılan sayım ve hesaplamalarda U87MG hücrelerine CT-NP uygulamasının kontrol grubuna kıyasla koloni oluşturma potansiyelini %74,8 azalttığı hesaplanmıştır.



Şekil 4.17 CT-NP'nin U87MG hücrelerinde koloni oluşumu üzerindeki etkisi

Uygulanan tedavi sonrası kromozom hasarı, apoptoz gibi mekanizmalarla hücre üreme ve canlılığının baskılanmasına karşın yeni nesil oluşturma kapasitesini koruyan hücrelerin belirlenmesinde klonojenik analiz yöntemi kullanılmaktadır. Radyasyon ve kemoterapi direnci, ilaç uygulamalarındaki kısıtlamalar sebebiyle tedavi etkinliklerinin değiştirilmesi gerekmektedir.

Bu bakımdan sağlıklı doku bütünlüğünün bozulması ve kanser nüksünün önlenebilmesinde kanser hücrelerinin sürekli çoğalma yeteneğinin üstesinden gelinebilmesi için kanser hücrelerinin koloni oluşturma potansiyelinin ortadan kaldırılması gerekmektedir [107].

Temozolomid tedavisi uygulanan U87MG hücrelerinde G2-M kontrol noktasında bölünme inhibe edilerek koloni oluşumunda %30 oranında azalma görülmüştür [7]. Temozolomid ve paklitaksel kombinasyonunun U87MG hücrelerinde MGMT ekspresyonunu baskılayarak sinerjik aktiviteleriyle koloni oluşumunda düşüş yaşandığı yapılan çalışmada ortaya konmuştur [65].

Doğal kaynaklı maddelerin antikanser aktivitelerinin incelendiği çalışmalarda; flavonoid ekstraktlarının U251 hücrelerinde büyüme inhibisyonu ile klonojenik sağkalımı azalttığı [108], propolisin ise hücre dışı sinyallerin fosforilasyonunu indükleyerek hücre büyümesini ve koloni oluşumunu önemli ölçüde azalttığı görülmüştür [109].

Elde edilen sonuçlar CT-NP'nin U87MG hücrelerinde literatür örnekleriyle paralel olarak büyümeyi baskıladığı ve koloni oluşturma potansiyelini azaltarak kanserli hücrelerinin yayılımını engellediğini göstermektedir.

4.6.4 CAPE-Temozolomid Yüklü Nanopartiküllerin U87MG Hücreleri Üzerinde Apoptoz İndüksiyonun Gen Düzeyinde Gösterimi

CAPE-temozolomid yüklü nanopartiküllerin (CT-NP) apoptotik ve anti-proliferatif etkilerinin incelenmesi amacıyla belirlenen IC_{50} dozunda U87MG hücreleri üzerine 48 saat süreyle uygulanması sonucunda kontrol grubuyla karşılaştırmalı olarak Bax, Bcl-2, kaspaz-3, kaspaz-9, sitokrom-c, kaspaz-8 ve B-aktin genlerinin ekspresyonu qRT-PCR ile analiz edilmiştir. Hedef genlerin ekspresyonları anlatımı şartlara göre değişmeyen referans gen grubunda yer alan B-aktin gen ekspresyonu ile karşılaştırılarak $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu ile tayin edilmiştir [73].

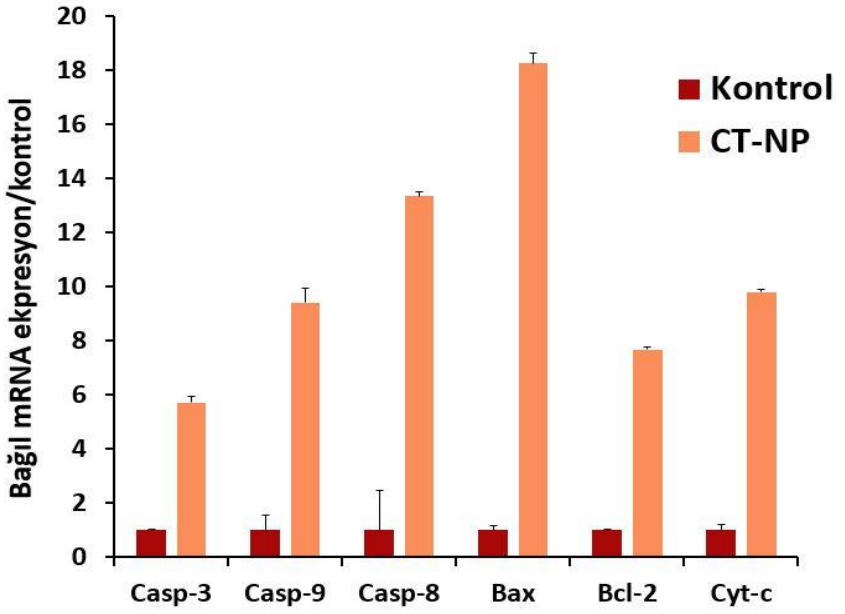
Kanser tedavi hedefleri arasında yer alan apoptozun, reseptör aracılı (dışsal) ve mitokondriyal aracılı (içsel) yolak mekanizmaların aydınlatılması, apoptoza direncin üstesinden gelinmesi ve yeni antikanser ajanlarının geliştirilmesinde büyük önem taşımaktadır. Kemoterapötik kanser ajanlarının mitokondriyal membran yapısının bozulması, sitokrom-c salınımı ve kaspaz aktivasyonunda etkili olması apoptozun indüksiyon mekanizmalarındaki potansiyelini açığa çıkarmaktadır [110].

Hücre ölümünü baskılayan anti-apoptotik Bcl-2 proteini, apoptozu indükleyen pro-apoptotik Bax proteini ve apoptoz yolaklarında görevli kaspazlar Programlı hücre ölümü apoptozun düzenlenmesinde aktif rol oynamaktadır. Bcl-2, mitokondriyal membran yapısını koruyarak apoptozun anahtar uygulayıcısı kaspaz-3 aktivasyonunu baskılayarak apoptoz inhibisyonuna yol açar. Bax ise hücre içinde artan ölüm sinyaliyle sitoplazmadan mitokondri membranına translokalize olarak apoptozu indükler [111], [112]. İlk önce prokaspazlar olarak sentezlenen kaspaz proteinlerinin aktif kaspaz formu için belirli kısımlarının kesilip atılması gerekir. Bu adımda uyarılan kaspaz-9, prokaspaz-3'ün belirli kısımlarını keserek aktif hale gelmesinde görev alır. Aktif kaspaz-3 sitozolde bulunan ICAD'ı (Kaspazla aktive olan deoksiribonükleaz inhibitörü) inaktif hale getirerek CAD'ın (kaspazla aktive olan deoksiribonükleaz) serbest kalmasını

sağlar. Serbest haliyle nükleusa giren CAD, DNA hasarı yaratarak hücreyi apoptoza teşvik eder. Mitokondri membranlarında yer alan sitokrom-c'nin sitozole salınması apoptozu başlatan bir mekanizmadır. Bcl-2 anti-apoptotik özelliğiyle sitokrom-c'nin sitozole salınmasını engellerken, Bax pro-apoptotik özelliği sayesinde sitokrom-c'nin sitozole geçişini sağlar [113]. Apoptozun reseptör aracılı dışsal yolağında transmembran TNF reseptör genleri hücre içi sinyal mekanizmasında aktivite gösterirler. FADD'ın prokaspaz-8 ile birleşerek öldürücü sinyal kompleksi oluşturması sonucunda kaspaz-8'in aktive olarak apoptozun aktivasyonu gerçekleşir [114]. Apoptozun mitokondriyal (içsel) yolağını başlatan uyaranların mitokondriyal geçiş porunu açmasıyla sitokrom-c'nin prokaspaz-9 ile birleşerek apoptozom kompleksi oluşumuna ve kaspas-9'un aktivasyonuna neden olurlar. Mitokondriyal membran geçirgenliğinden Bcl-2 ve Bax proteinleri sorumludur [115]. U87MG hücre hattında apoptotik aktivitenin belirlenmesi amacıyla kullanılan dopamin maddesinin Bcl-2/Bax oranını artırmasıyla içsel apoptoz yolağını sitokrom-c salımını ve kaspaz aktivasyon mekanizmalarıyla indüklediği gösterilmiştir [116]. Temzolomid tedavisinde hücresel apoptozun indüklenmesinde apoptozun mitokondriyal içsel yolunda yer alan pro-apoptotik Bax ve anti-apoptotik Bcl-2 ekspresyonunu değiştirdiği daha önceden sunulmuştur [117], [118]. CT-NP uygulanan U87MG hücrelerinde yapılan qRT-PCR analiz sonuçlarından elde edilen Şekil 4.18'de görülen ekspresyonlar incelendiğinde, pro-apoptotik Bax ekspresyonunda kontrol grubuna göre 18 kat atış yaşandığı görülmektedir. Bax/Bcl-2 oranında görülen artış CT-NP uygulamasının U87MG hücreleri üzerinde apoptozun indüklendiğini göstermektedir.

Doğal kaynaklı bitki ekstraktlarının mitokondriyal membran potansiyelini azaltılması ve Bcl-2/Bax oranını artırılması aktiviteleriyle apoptozun içsel yolağını indüklediği [119], fenolik bileşik propolisin kaspaz-8, kaspaz-9 ve kaspaz-3'ün aktivasyonu ve NF-kB yoluyla apoptozun her iki yolağını da aktifleştirdiği [55], bir diğer fenolik bileşik öjenolün sitokrom-c'nin sitozole salınması ve kaspaz-3 ve kaspas-9'u aktifleştirmesiyle içsel apoptozun indüklendiği gösterilmiştir [120]. Kontrol grubuna oranla kaspaz-3, kaspaz-9 ve sitokrom-c ekpresyonlarında görülen artış CT-NP uygulamasının apoptozun içsel yolağında gösterdiği aktivite olduğu düşünülmektedir. Kontrol grubuna oranla CT-NP'de görülen yüksek

kaspaz-8 artışı apoptozun dışsal yolağının aktive edildiğine işaret etmektedir. Kaspaz-8'de görülen artışın literatür sonuçlarına paralel olarak doğal kaynaklı CAPE'nin U87MG hücrelerinde apoptozun dışsal yolağını indükleme mekanizması olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.18 Kaspaz-3 (Casp-3), kaspaz-9 (Casp-9), kaspaz-8 (Casp-8), Bax, Bcl-2 ve sitokrom-c (Cyt-c) genlerinin kontrole göre relatif ekspresyonları

U87MG hücre hattı üzerinde uygulanan temozolomidin mitokondriyal yolla apoptozu indüklediği, apoptozun baskılanmasında görevli Bcl-2 geninin ekspresyonlarını baskıladığı, Bax/Bcl-2 oranını artırdığı ve tümörü regüle ettiği görülmüştür. Temozolomid uygulamasıyla tümör baskılayıcı gen olan p53 ekspresyonunun artırılarak, mitokondiyal membran potansiyelini bozarak sitokrom-c'nin sitozole salınmasını ve kaspaz-3 ve kaspaz-9'un aktivasyonunu sağladığı kanıtlanmıştır. Temozolomidin timokinon ile kombinasyon uygulaması sonucunda temozolomidin tek başına sergilediği pro-apoptotik aktivitelerin arttığı, apoptozun indüklenmesinde birlikte kullanımının sağlayacağı terapötik etkinlik açığa çıkarılmıştır [121]. Literatür kaynaklarında CAPE ve temozolomid moleküllerinin ayrı ayrı uygulanan tedavi sonuçlarına göre nanopartiküle sisteme enkapsüle edilen CAPE ve temozolomid moleküllerinin U87MG hücrelerinde apoptoz indüksiyonunda sinerjik etki göstererek terapötik etkilerinin artırıldığı düşünülmektedir.

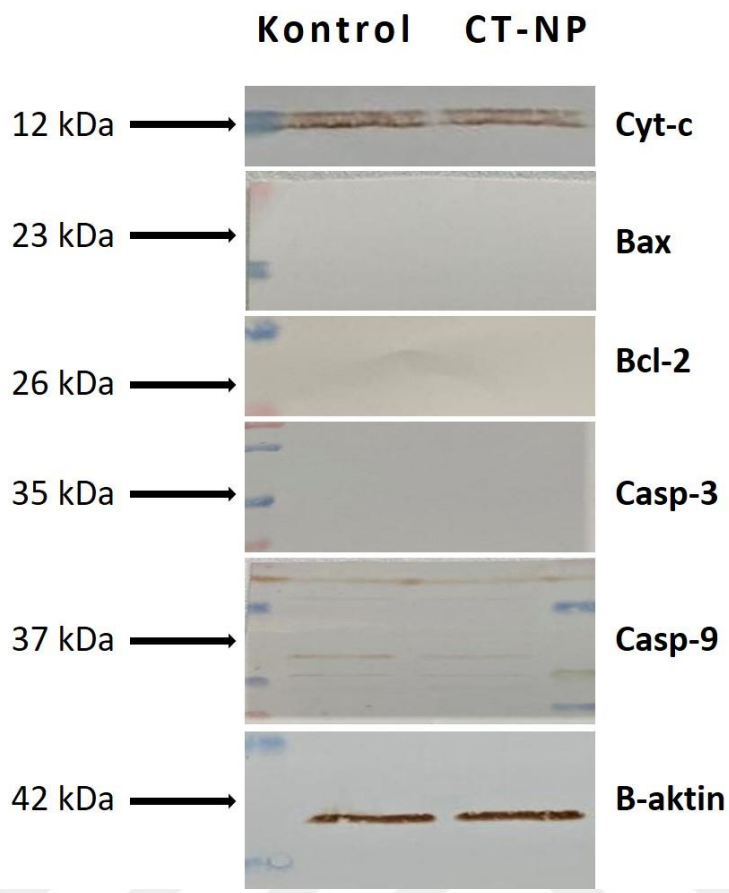
4.6.5 CAPE-Temozolomid Yüklü Nanopartiküllerin U87MG Hücreleri Üzerinde Apoptoz İndüksiyonunun Protein Düzeyinde Gösterimi

CAPE-temozolomid yüklü nanopartikülerin (CT-NP) U87MG hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi, içsel ve dışsal apoptoz yolaklarında etkili olan sitokrom-c, kaspaz-3, cleaved kaspaz-9, Bax ve Bcl-2 proteinlerinin ekspresyonun kontrol grubuyla karşılaştırmalı olarak Western Blot analizi ile belirlenmiştir. Referans gen grubunda olan B-aktin düzenleyici bir proteindir ve yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. Western Blot analizinde gerçekleştirilen proteinlerin membrana aktarımı sonrasında gerçekleştirilen kolorimetrik deteksiyondan elde edilen membran görüntüleri Şekil 4.19'da gösterilmiştir.

Elde edilen bulguların qRT-PCR analiz sonuçları ile eş değerde bulunmama sebebinin kolorimetrik deteksiyon yönteminin düşük hassasiyetinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Yaygın olarak kullanılmasına rağmen kolorimetrik deteksiyon yönteminin dezavantajları bilinmektedir [122].

Apoptoz mekanizmalarında mitokondriyal membran bozulmasını, sitokrom-c salınımını, kaspaz aktivasyonunu ve sonuç olarak hücre ölümünü düzenleyen Bcl-2 ailesi proteinleri içsel yolakta rol oynarken, ölüm reseptörlerinin aktivasyonu ve ardından kaspaz 8'in aktivasyonu ise dışsal yolakta yer almaktadır. Kaspaz-3 aktivasyonu her iki yolakta da görülen ortak bir mekanizmadır [123]. Bcl-2'nin sitokrom-c salınımını ve kaspaz aktivasyonunu engelleme aktivitesi gösterdiği, Bax ile zıt işlevlere sahip olduğu bu sayede de Bax'ın mitokonriden sitozole sitokrom-c salınımını teşvik ederek kaspaz-3'ün aktivasyonunu indüklediği yapılan çalışmalarda açığa çıkarılmıştır [124], [125].

Antikanser aktivitesi bulunan doğal kaynaklı bitki ekstraktlarının apoptotik aktiviteleri araştırıldığında sitokrom-c salınımın indüklendiği ve kaspaz-9 aktivasyonunun teşvik edildiği görülmüştür [119]. CT-NP uygulaması sonucu Şekil 4.19'da verilen membranlarda sitokrom-c ve kaspaz-9'un ekspresyonları görülmektedir. CT-NP'nin sitokrom-c ve kaspaz-9 aktivasyonunun apoptoz indüksiyonunda doğal kaynaklı bileşik CAPE'nin etkisiyle olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.19 Kaspaz-3 (Casp-3), kaspaz-9 (Casp-9), kaspaz-8 (Casp-8), Bax, Bcl-2 ve sitokrom-c (Cyt-c) ekpresyonlarının Western Blot yöntemiyle protein düzeyinde gösterimi

Glioblastoma hücreleri üzerinde yapılan kombinasyon resveratrol ve paklitaksel tedavisinin kaspaz-3 üzerinde etkisinin bulunmadığı ancak kaspaz-9 aktivasyonu ile apoptozu indüklediği gösterilmiştir [126]. Yapılan kombinasyon çalışmalarından elde edilen verilerle literatür karşılaştırması yapıldığında U87MG hücrelerinde CT-NP uygulamasının kaspaz-3 aktivasyonunda etki göstermeden kaspaz-9'un indüklenmesinin glioblastoma hücrelerinin kazandığı direnç mekanizmalarından kaynaklandığı düşünülmektedir. CAPE ve temozolomid kombinasyonunun U87MG insan glioblastoma hücre hattındaki apoptotik mekanizmaların aydınlatılması için ileri düzeyde *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar yapılması gerekmektedir.

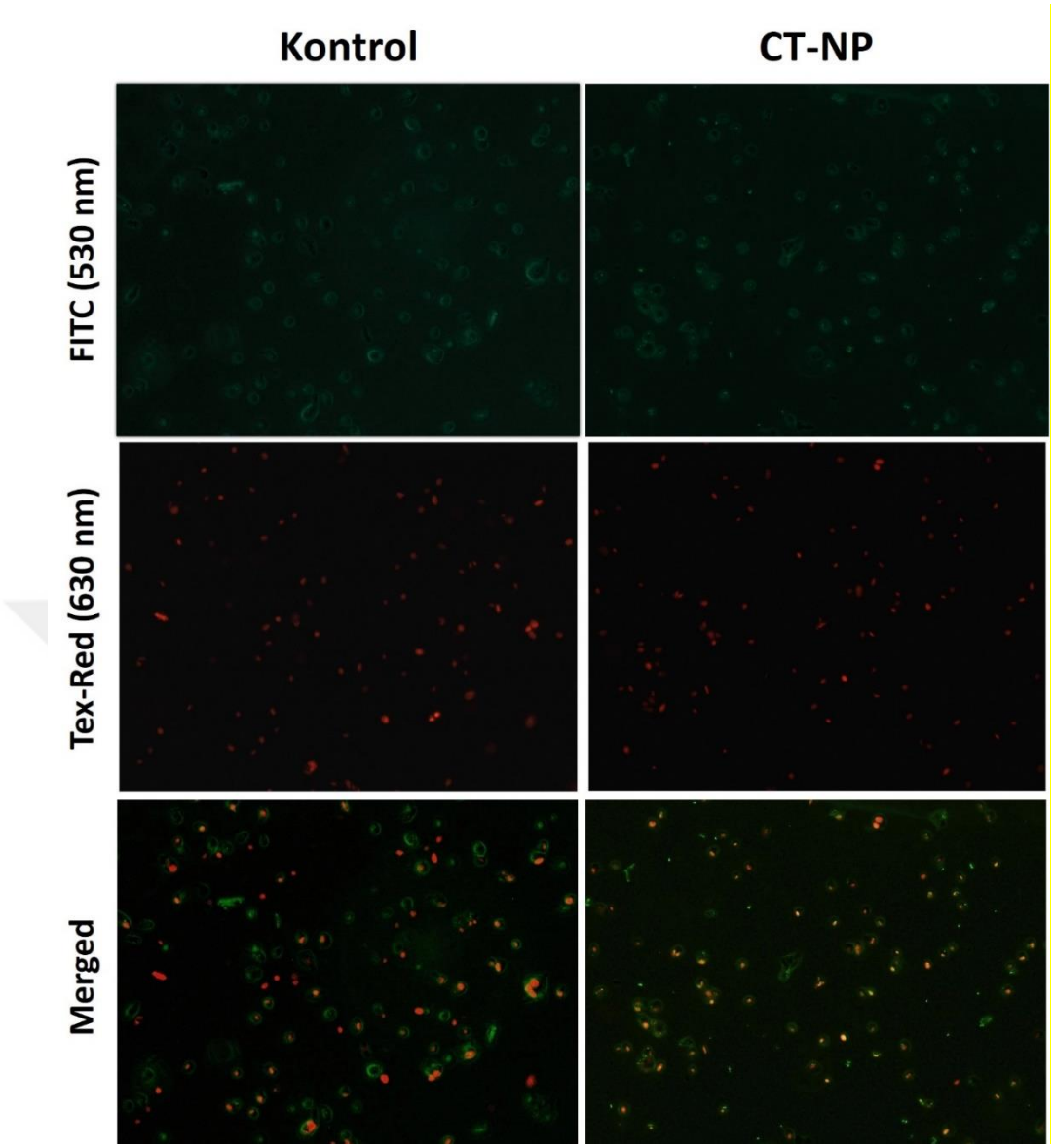
4.6.6 CAPE-Temozolomid Yüklü Nanopartiküllerin U87MG Hücreleri Üzerinde Apoptotik Etkisinin İmmünositokimyasal Olarak Belirlenmesi

Terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) dUTP Nick-End Etiketleme (TUNEL) testi, apoptoz sonucu meydana gelen DNA kırıkları 3' –OH uçlarına terminal deoksinükleotidil transferaz enzimi tarafından yesil floresan isaretli dUTP ile etiketlenerek apoptotik hücreleri saptamak için kullanılır. CAPE-temozolomid yüklü nanopartiküllerinin (CT-NP) U87MG hücreleri üzerindeki apoptotik aktivite kontrol grubuyla karşılaştırmalı olan TUNEL yöntemi ile analiz edildi.

Kontrol ve CT-NP gruplarının TUNEL işaretlemesi sonrası floresan mikroskobunda FITC (530 nm) ve Tex-Red (630 nm) filtreleriyle incelenmesi sonucunda Şekil 4.20'de verilen görüntüler elde edilmiştir.

Şekil 4.20'de görülen PI (propidyum iyodür) boyamasıyla kırmızı görünen hücreler toplam hücre sayısını, yeşil hücreler ise TUNEL pozitif hücrelerini işaret etmektedir. Apoptotik hücrelerin sayısı ve % değerlerlerinin hesaplanmasında ImageJ programı kullanıldı. 48 saat inkübasyonun sonunda kontrol grubu hücrelerinin %66'sı TUNEL pozitif boyama gösterirken, CT-NP uygulanan hücrelerin %97'si TUNEL pozitif olarak bulundu. Yapılan hesaplamada U87MG hücreleri üzerinde CT-NP uygulamasının apoptotik aktiviteyi %31 oranında artırdığı bulunmuştur.

İnsan glioblastoma LN229 hücre hattında temozolomid uygulamasıyla yapılan çalışmalarda apoptotik aktivitenin belirlenmesinde temozolomidin kombinasyon tedavisinin serbest formuna oranla apoptozu daha fazla indüklediği gösterilmiştir [127].



Şekil 4.20 U87MG hücrelerinde apoptotik aktivitenin TUNEL yöntemi ile belirlenmesi. Floresan mikroskobu, 20X. TUNEL boyaması yeşil floresan, PI boyaması kırmızı floresan

CT-NP'nin U87MG hücreleri üzerindeki apoptotik aktivitesinin belirlenmesi amacıyla yapılan TUNEL analizi sonuçlarının önceki *in vitro* biyolojik etkinlik çalışma sonuçlarıyla uyumlu olduğu görülmüştür.

5
SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında anti-kanser aktivitesi bilinen doğal kaynaklı CAPE ve glioblastoma tedavisinde standart hale gelmiş kemoterapötik ajan temozolomid yüklü polimerik nanopartiküllerin U87MG insan glioblastoma hücre hattı üzerindeki anti-kanser aktivitesi incelenmiştir. CAPE ve temozolomid etken maddelerinin PLGA polimerine enkapsüle edilmesiyle, nanopartiküler sistemlerin etken maddelerin kontrollü salımının ve spesifik ilaç dağıtımının sağlanması, hücre içi alımın kolaylaştırılması, yarı ömürlerinin uzatılması ve düşük çözünürlüğünün üstesinden gelinerek biyoyararlanım ve biyouyumluluk özelliklerinin artırılmasıyla insan glioblastoma hücrelerinde terapötik etkinliği artırdığı tespit edilmiştir.

Yapılan tez çalışması ile CAPE ve temozolomid moleküllerinin nanaopartiküler sistem formülasyonu ile serbest CAPE-temozolomid kombinasyonu insan glioblastoma hücre hattı üzerindeki anti-proliferatif ve apoptotik aktivitesi ilk kez karşılaştırmalı olarak çalışılmıştır. Bu sebeple çalışma özgün değere sahiptir.

CAPE ve temozolomid etken maddeleri tekli emülsiyon çözücü uçurma yöntemiyle nanopartiküler formülasyona enkapsüle edilmiştir. Sentezlenen CAPE-temozolomid yüklü nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinliği (EE), etken madde yüklenme verimi (DL), reaksiyon verimi (RV) hesaplanmış, boyut (Z-Ave), çoklu dağılım indeksi (PDI) ve zeta potansiyel (mV) ölçümleri ile karakterizasyon çalışmalarına ek olarak FT-IR analizleri yapılmıştır. Nanopartiküller etken madde ve polimer miktarının değiştirilmesiyle farklı parametrelerde sentezlenmiş, oluşturulan nanopartiküller arasından minimum boyut, maksimum enkapsülasyon etkinliği ve etken madde yükleme verimine sahip formülasyon seçilerek hücre kültürü çalışmalarında kullanılmıştır. Seçilen CAPE-temozolomid yüklü nanopartikül formülasyonun (CT-NP3) enkapsülasyon etkinliği (EE) CAPE için %83,2, temozolomid için %40, etken madde yüklenme verimi (DL) CAPE için

%33,54, temozolomid için %6,45, reaksiyon verimi (RV) %45,92 olarak hesaplanmıştır. Boyutu 168,3 nm, zeta potansiyeli -15,5 mV, çoklu dağılım indeksi 0,103 olarak ölçülen nanopartikülün 15 günlük süreyle yapılan *in vitro* salım analizlerinden CAPE'nin %15,72'sini, temozolomidin ise %98,5'ini saldığı hesaplanarak *in vitro* hücre kültürü çalışmalarına yapılmıştır.

İnsan glioblastoma U87MG hücre hattı ve insan fibroblast CCD-1079Sk hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkinin araştırılması için sentezlenen CAPE-temozolomid yüklü nanopartiküller ile serbest formda CAPE-temozolomid karşılaştırmalı olarak MTT yöntemi kullanılmıştır. *İn vitro* salım oranları dikkate alınarak serbest etken maddeye karşılık gelen nanopartikül miktarı hesaplanarak hücre hatları üzerine 1-50 µg/ml konsantrasyon aralığında uygulanmıştır. U87MG hücrelerinde yapılan MTT sonucunda nanopartikülün 24 saat süreyle inkübasyonunda IC_{50} değeri 11,69 µg/ml olarak, serbest ve nanopartikül formülasyonlarının 48 saat süreyle inkübasyonunda IC_{50} değerleri sırasıyla 55,7 µg/ml ve 18,21 µg/ml olarak hesaplanmıştır. CCD-1079Sk hücrelerinde yapılan MTT sonucunda serbest ve nanopartikül formülasyonlarının 24 saat süreyle inkübasyonunda IC_{50} değerleri sırasıyla 11,62 µg/ml ve 17,4 µg/ml olarak hesaplanmıştır. U87MG hücreleri üzerindeki IC_{50} değerleri analiz edildiğinde devam eden hücre çalışmalarında 24 ve 48 saat olmak üzere farklı inkübasyon sürelerinin kullanılmasına karar verilmiştir.

U87MG hücrelerine uygulanan serbest ve nanopartikül formülasyonlarının hücre göçüne etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre kontrol hücrelerinde 0. saatte 782,42 µm olan ortalama mesafenin 24. saat sonunda 526,27 µm'ye düştüğü, CT uygulanan hücrelerde 0. saatte 780,26 µm olan ortalama mesafenin 24. saat sonunda 523,66 µm'ye düştüğü, CT-NP uygulanan hücrelerde ise 0. saatte 889,27 µm olan ortalama mesafenin 24. saat sonunda 674,39 µm'ye düştüğü gözlenmiştir. Buna göre sentezlenen nanopartiküler formülasyonun insan glioblastoma hücrelerinin göçünü baskıladığı görülmüştür. CAPE-temozolomid yüklü nanopartiküllerin U87MG hücreleri üzerinde koloni oluşturma potansiyeli koloni formasyon deneyi ile analiz edilmiştir. Sentezlenen nanopartiküllerin

U87MG hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla koloni oluşturma potansiyelini %74,8 azalttığı hesaplanmıştır.

U87MG hücreleri üzerine uygulanan CAPE-temozolomid yüklü nanopartiküllerin apoptotik ve anti-proliferatif etkilerinin gen düzeyinde araştırılması amacıyla kontrol grubuyla karşılaştırmalı olarak Bax, Bcl-2, kaspaz-3, kaspaz-9, sitokrom-c, kaspaz-8 ve B-aktin genlerinin ekspresyonu qRT-PCR cihazı kullanılarak analiz edilmiştir. CT-NP'nin Bax, sitokrom-c ve kaspaz-8 ekspresyonlarını diğer genlere göre daha fazla artırmasıyla apoptozu aktive ettiği gösterilmiştir.

CAPE-temozolomid yüklü nanopartiküllerin U87MG hücreleri üzerindeki apoptotik etksinin protein düzeyinde araştırılması amacıyla kontrol grubuyla karşılaştırmalı olarak sitokrom-c, kaspaz-3, cleaved kaspaz-9, Bax ve Bcl-2 proteinlerinin ekspresyonun Western Blot yöntemiyle analiz edilmiştir. CT-NP'nin sitokrom-c ve kaspaz-9 aktivasyonuyla apoptozu teşvik ettiği gösterilmiştir. U87MG hücreleri üzerine uygulanan CAPE-temozolomid yüklü nanopartiküllerin apoptotik etkisinin kontrol grubuyla kıyaslanarak immünositokimyasal olarak araştırılmasında TUNEL yöntemi kullanılmıştır. CT-NP uygulamasının kontrol grubuna kıyasla U87MG hücreleri üzerindeki apoptotik aktiviteyi %31 oranında artırdığı gösterilmiştir.

Standart kemoterapi ilacı olan temozolomid molekülünün hücrelerde yarattığı toksik etki, kanser hücreleri tarafından ilaca karşı oluşturulan direnç ve kanser hücrelerinde aşılamayan fizyolojik engellerinin doğal kaynaklı bileşen CAPE ile desteklendirilerek oluşturulan nanopartiküler formülasyonun insan glioblastoma U87MG hücre hattı üzerinde yapılan çalışmalarda anti-proliferasyon ve apoptotik süreçlerde olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Sentezlenen nanopartiküler ilaç kombinasyonun hem anti-kanser özellik barındırdan maddelerin birlikte uygulanmasıyla kanser tedavisinde yeni ilaç kombinasyonlarının geliştirilmesi hem de bu maddelerin nanopartiküler sistemlerle bütünleştirilmesiyle biyoteknolojik ilaç stratejilerine katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Oluşturulan nanopartiküler ilaç kombinasyonun geliştirilmesi için yapılan *in vitro* çalışmalara ek olarak *in vivo* çalışmaların yapılması gerekmektedir.

KAYNAKÇA

[1] A. Salazar-Ramiro *et al.*, "Role of redox status in development of glioblastoma," *Front. Immunol.*, vol. 7, pp. 1–15, Apr. 2016, doi: 10.3389/fimmu.2016.00156.

[2] C. J. Blunt, "The dismal disease: temozolomide and the interaction of evidence," *SSRN Electron. J.*, pp. 1–14, 2019, doi: 10.2139/ssrn.3444926.

[3] K. S. Borges, M. S. Brassesco, C. A. Scrideli, A. E. E. Soares, and L. G. Tone, "Antiproliferative effects of Tubi-bee propolis in glioblastoma cell lines," *Genet. Mol. Biol.*, vol. 34, no. 2, pp. 310–314, 2011, doi: 10.1590/S1415-47572011000200024.

[4] J. Murphy, D. Spencer, Y. Cheng, and M. S. Lesniak, "Gold nanoparticles for the treatment of malignant gliomas," in *The World Scientific Encyclopedia of Nanomedicine and Bioengineering I*, 2016, pp. 151–176.

[5] R. Markiewicz-Żukowska, M. H. Borawska, A. Fiedorowicz, S. K. Naliwajko, D. Sawicka, and H. Car, "Propolis changes the anticancer activity of temozolomide in U87MG human glioblastoma cell line," *BMC Complement. Altern. Med.*, vol. 13, no. 1, p. 50, Dec. 2013, doi: 10.1186/1472-6882-13-50.

[6] C.-J. Lin *et al.*, "Resveratrol enhances the therapeutic effect of temozolomide against malignant glioma *in vitro* and *in vivo* by inhibiting autophagy," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 52, pp. 377–391, Jan. 2012, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.10.487.

[7] Y. Hirose, M. S. Berger, and R. O. Pieper, "p53 effects both the duration of G2/M arrest and the fate of temozolomide-treated human glioblastoma cells," *Cancer Res.*, vol. 61, no. 5, pp. 1957–1963, 2001.

[8] P. Caporaso *et al.*, "Novel role of triazenes in haematological malignancies: pilot study of temozolomide, lomeguatrib and IL-2 in the chemo-immunotherapy of acute leukaemia," *DNA Repair (Amst).*, vol. 6, no. 8, pp. 1179–1186, Aug. 2007, doi: 10.1016/j.dnarep.2007.03.016.

[9] H. Xu, F. Jia, P. Singh, S. Ruan, H. Zhang, and X. Li, "Synergistic anti-glioma effect of a coloaded nano-drug delivery system," *Int. J. Nanomedicine*, vol. Volume 201, pp. 29–40, Dec. 2016, doi: 10.2147/IJN.S116367.

[10] H. M. Balkhi, T. Gul, and E. Haq, "Anti-neoplastic and calcium modulatory action of caffeic acid phenethyl ester and dasatinib in C6 glial cells: a therapeutic perspective," *CNS Neurol. Disord. - Drug Targets*, vol. 15, no. 1, pp. 54–63, Jan. 2016, doi: 10.2174/1871527315666151110125435.

[11] H.-Y. Lee *et al.*, "Preparation of caffeic acid phenethyl ester-incorporated nanoparticles and their biological activity," *J. Pharm. Sci.*, vol. 104, no. 1, pp. 144–154, Jan. 2015, doi: 10.1002/jps.24278.

[12] S. Derman, “Caffeic Acid Phenethyl Ester Loaded PLGA Nanoparticles: Effect of Various Process Parameters on Reaction Yield, Encapsulation Efficiency, and Particle Size,” *J. Nanomater.*, vol. 2015, pp. 1–12, 2015, doi: 10.1155/2015/341848.

[13] F. Dilnawaz and S. K. Sahoo, “Enhanced accumulation of curcumin and temozolomide loaded magnetic nanoparticles executes profound cytotoxic effect in glioblastoma spheroid model,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 85, no. 3, pp. 452–462, Nov. 2013, doi: 10.1016/j.ejpb.2013.07.013.

[14] G. Karp, *Cell and Molecular Biology: Concepts and experiments*, 7th ed. Wiley, 2013.

[15] E. Yılmaz and V. Altunok, “Kanser ve p53 geni,” *Adana Vet. Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü Derg.*, vol. 1, pp. 19–23, 2011, [Online]. Available: http://www.adanavet.gov.tr/tr/e-dergi.php.

[16] G. M. Cooper, *The Cell: A Molecular Approach*, 8th ed. Oxford University Press, 2019.

[17] C. B. Blackadar, “Historical review of the causes of cancer,” *World J. Clin. Oncol.*, vol. 7, no. 1, pp. 54–86, 2016, doi: 10.5306/wjco.v7.i1.54.

[18] P. T. Rieger, “The biology of cancer genetics,” *Semin. Oncol. Nurs.*, vol. 20, no. 3, pp. 145–154, Aug. 2004, doi: 10.1053/j.soncn.2004.04.001.

[19] D. Hanahan and R. A. Weinberg, “The hallmarks of cancer,” *Cell*, vol. 100, no. 1, pp. 57–70, Jan. 2000, doi: 10.1016/S0092-8674(00)81683-9.

[20] D. Hanahan, “Hallmarks of cancer: new dimensions,” *Cancer Discov.*, vol. 12, no. 1, pp. 31–46, Jan. 2022, doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059.

[21] K. J. Harrington, “Biology of cancer,” *Medicine (Baltimore).*, vol. 39, no. 12, pp. 689–692, Dec. 2011, doi: 10.1016/j.mpmed.2011.09.015.

[22] O. Baykara, “Current modalities in treatment of cancer,” *Balıkesır Heal. Sci. J.*, vol. 5, no. 3, pp. 154–165, 2016, doi: 10.5505/bsbd.2016.93823.

[23] Hayat M.A., *Tumors of the Central Nervous System, Volume 1*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2011.

[24] A. D’Ambrosio, “Glioma vs. Glioblastoma: Understanding Treatment Differences,” *Neurosurgeons of New Jersey*, 2019. https://www.neurosurgeonsofnewjersey.com/blog/glioma-vs-glioblastoma/.

[25] K. Urbańska, J. Sokołowska, M. Szmidt, and P. Sysa, “Glioblastoma multiforme – an overview,” *Contemp. Oncol.*, vol. 5, no. 5, pp. 307–312, 2014, doi: 10.5114/wo.2014.40559.

[26] A. Arslantas *et al.*, “Genomic alterations in low-grade, anaplastic astrocytomas and glioblastomas,” *Pathol. Oncol. Res.*, vol. 13, no. 1, pp. 39–46, Mar. 2007, doi: 10.1007/BF02893439.

[27] S. Agnihotri *et al.*, “Glioblastoma, a Brief Review of History, Molecular

Genetics, Animal Models and Novel Therapeutic Strategies," *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz).*, vol. 61, pp. 25–41, Feb. 2013, doi: 10.1007/s00005-012-0203-0.

[28] 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, Jul. 2018, doi: 10.1124/pr.117.014944.

[29] M. Türkyılmaz *et al.*, "TÜRKİYE KANSER İSTATİSTİKLERİ 2017," Ankara, 2021. [Online]. Available: https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanser-db/istatistik/Turkiye_Kanser_Istatistikleri_2017.pdf.

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

[31] J. A. Schwartzbaum, J. L. Fisher, K. D. Aldape, and M. Wrensch, "Epidemiology and molecular pathology of glioma," *Nat. Clin. Pract. Neurol.*, vol. 2, no. 9, pp. 494–503, Sep. 2006, doi: 10.1038/ncpneuro0289.

[32] L. B. Daniels, M. Shaya, M. L. Nordberg, C. D. Shorter, M. Fowler, and A. Nanda, "Glioblastoma multiforme in two non-nuclear family members.," *J. Louisiana State Med. Soc.*, vol. 159, no. 4, pp. 215–222, 2007, [Online]. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17987960.

[33] R. McLendon *et al.*, "Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways," *Nature*, vol. 455, no. 7216, pp. 1061–1068, Oct. 2008, doi: 10.1038/nature07385.

[34] G. C. Kabat, A. M. Etgen, and T. E. Rohan, "Do steroid hormones play a role in the etiology of glioma?," *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 19, no. 10, pp. 2421–2427, Oct. 2010, doi: 10.1158/1055-9965.EPI-10-0658.

[35] 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, doi: 10.1038/sj.bjc.6604445.

[36] E. Ülgen *et al.*, "Whole exome sequencing–based analysis to identify DNA damage repair deficiency as a major contributor to gliomagenesis in adult diffuse gliomas," *J. Neurosurg.*, vol. 132, no. 5, pp. 1435–1446, May 2020, doi: 10.3171/2019.1.JNS182938.

[37] P. Broca, *Traité des tumeurs*. Paris : P. Asselin, 1866.

[38] 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, Jul. 2013, doi: 10.1093/neuonc/nou206.18.

[39] S. Duan *et al.*, "PTEN deficiency reprogrammes human neural stem cells towards a glioblastoma stem cell-like phenotype," *Nat. Commun.*, vol. 6, pp.

1–14, Dec. 2015, doi: 10.1038/ncomms10068.

[40] A. Mansouri, J. Karamchandani, and S. Das, “Molecular Genetics of Secondary Glioblastoma,” in *Glioblastoma*, S. De Vleeschouwer, Ed. Codon Publications, 2017, pp. 27–42.

[41] G. P. Dunn *et al.*, “Emerging insights into the molecular and cellular basis of glioblastoma,” *Genes Dev.*, vol. 26, no. 8, pp. 756–784, Apr. 2012, doi: 10.1101/gad.187922.112.

[42] D. Koul, “PTEN signaling pathways in glioblastoma,” *Cancer Biol. Ther.*, vol. 7, no. 9, pp. 1321–1325, Sep. 2008, doi: 10.4161/cbt.7.9.6954.

[43] H. S. Friedman, T. Kerby, and H. Calvert, “Temozolomide and treatment of malignant glioma,” *Clin. cancer Res. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 6, no. 7, pp. 2585–2597, Jul. 2000, [Online]. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10914698.

[44] K. Aldape, G. Zadeh, S. Mansouri, G. Reifenberger, and A. von Deimling, “Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers,” *Acta Neuropathol.*, vol. 129, pp. 829–848, Jun. 2015, doi: 10.1007/s00401-015-1432-1.

[45] 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.

[46] W. Debinski, W. Priebe, and S. B. Tatter, “Chapter 17 Maximizing Local Access to Therapeutic Deliveries in Glioblastoma. Part I: Targeted Cytotoxic Therapy,” in *Glioblastoma*, S. De Vleeschouwer, Ed. Codon Publications, 2017, pp. 341–358.

[47] S. Rahaiee, E. Assadpour, A. Faridi Esfanjani, A. S. Silva, and S. M. Jafari, “Application of nano/microencapsulated phenolic compounds against cancer,” *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 279, p. 102153, May 2020, doi: 10.1016/j.cis.2020.102153.

[48] P. Morin *et al.*, “Substituted caffeic and ferulic acid phenethyl esters: synthesis, leukotrienes biosynthesis inhibition, and cytotoxic activity,” *Molecules*, vol. 22, no. 7, p. 1124, Jul. 2017, doi: 10.3390/molecules22071124.

[49] S. Akyol, Z. Ginis, F. Armutcu, G. Ozturk, M. R. Yigitoglu, and O. Akyol, “The potential usage of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) against chemotherapy-induced and radiotherapy-induced toxicity,” *Cell Biochem. Funct.*, vol. 30, no. 5, pp. 438–443, Jul. 2012, doi: 10.1002/cbf.2817.

[50] S. Son and B. A. Lewis, “Free radical scavenging and antioxidative activity of caffeic acid amide and ester analogues: structure−activity relationship,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 50, no. 3, pp. 468–472, Jan. 2002, doi: 10.1021/jf010830b.

[51] A. Konar *et al.*, “Identification of Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) as a

Potent Neurodifferentiating Natural Compound That Improves Cognitive and Physiological Functions in Animal Models of Neurodegenerative Diseases," *Front. Aging Neurosci.*, vol. 12, no. 5, pp. 356–362, Nov. 2020, doi: 10.3389/fnagi.2020.561925.

[52] H. J. Hwang *et al.*, "Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester on cancer cell metastasis mediated by the down-regulation of matrix metalloproteinase expression in human HT1080 fibrosarcoma cells," *J. Nutr. Biochem.*, vol. 17, no. 5, pp. 356–362, May 2006, doi: 10.1016/j.jnutbio.2005.08.009.

[53] T. Wang, L. Chen, W. Wu, Y. Long, and R. Wang, "Potential cytoprotection: antioxidant defence by caffeic acid phenethyl ester against free radical-induced damage of lipids, DNA, and proteins," *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, vol. 86, no. 5, pp. 279–287, May 2008, doi: 10.1139/Y08-029.

[54] D. Sawicka, H. Car, M. H. Borawska, and J. Nikliński, "The anticancer activity of propolis," *Folia Histochem. Cytobiol.*, vol. 50, no. 1, pp. 25–37, Apr. 2012, doi: 10.5603/FHC.2012.0004.

[55] E. Szliszka, Z. Czuba, M. Domino, B. Mazur, G. Zydowicz, and W. Krol, "Ethanolic extract of propolis (EEP) enhances the apoptosis-inducing potential of TRAIL in cancer cells," *Molecules*, vol. 14, pp. 738–754, Feb. 2009, doi: 10.3390/molecules14020738.

[56] K. Subramani and W. Ahmed, "Nanoparticulate drug-delivery systems for oral cancer treatment," in *Emerging Nanotechnologies in Dentistry*, Elsevier, 2018, pp. 355–370.

[57] H. K. S. Yadav, A. A. Almokdad, S. I. M. Shaluf, and M. S. Debe, "Polymer-Based Nanomaterials for Drug-Delivery Carriers," in *Nanocarriers for Drug Delivery*, Elsevier, 2019, pp. 531–556.

[58] K. Vinothini and M. Rajan, "Mechanism for the nano-based drug delivery system," in *Characterization and Biology of Nanomaterials for Drug Delivery*, Elsevier, 2019, pp. 219–263.

[59] M. J. Ramalho, M. A. N. Coelho, and M. C. Pereira, "Nanocarriers for the delivery of temozolomide in the treatment of glioblastoma," in *Design and Development of New Nanocarriers*, Elsevier, 2018, pp. 687–722.

[60] Y. Li, H. Yuan, K. Yang, W. Xu, W. Tang, and X. Li, "The structure and functions of P-Glycoprotein," *Curr. Med. Chem.*, vol. 17, no. 8, pp. 786–800, Mar. 2010, doi: 10.2174/092986710790514507.

[61] J. R. Perry *et al.*, "Short-course radiation plus temozolomide in elderly patients with glioblastoma," *N. Engl. J. Med.*, vol. 376, no. 11, pp. 1027–1037, Mar. 2017, doi: 10.1056/NEJMoa1611977.

[62] R. J. Diaz, S. Ali, M. G. Qadir, M. I. De La Fuente, M. E. Ivan, and R. J. Komotar, "The role of bevacizumab in the treatment of glioblastoma," *J. Neurooncol.*, vol. 133, pp. 455–467, Jul. 2017, doi: 10.1007/s11060-017-2477-x.

[63] M. Zhao, D. van Straten, M. L. D. Broekman, V. Préat, and R. M. Schiffelers, "Nanocarrier-based drug combination therapy for glioblastoma," *Theranostics*, vol. 10, no. 3, pp. 1355–1372, 2020, doi: 10.7150/thno.38147.

[64] C.-T. Lu, Y.-Z. Zhao, H. L. Wong, J. Cai, L. Peng, and X.-Q. Tian, "Current approaches to enhance CNS delivery of drugs across the brain barriers," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 9, no. 1, pp. 2241–2257, May 2014, doi: 10.2147/IJN.S61288.

[65] M. Zhao *et al.*, "Codelivery of paclitaxel and temozolomide through a photopolymerizable hydrogel prevents glioblastoma recurrence after surgical resection," *J. Control. Release*, vol. 309, pp. 72–81, Sep. 2019, doi: 10.1016/j.jconrel.2019.07.015.

[66] R. Karim, C. Palazzo, B. Evrard, and G. Piel, "Nanocarriers for the treatment of glioblastoma multiforme: current state-of-the-art," *J. Control. Release*, vol. 227, pp. 23–37, Apr. 2016, doi: 10.1016/j.jconrel.2016.02.026.

[67] C. Fang *et al.*, "Temozolomide nanoparticles for targeted glioblastoma therapy," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 7, no. 12, pp. 6674–6682, Apr. 2015, doi: 10.1021/am5092165.

[68] Z. Shi *et al.*, "Aspirin-/TMZ-coloaded microspheres exert synergistic antiglioma efficacy via inhibition of β-catenin transactivation," *CNS Neurosci. Ther.*, vol. 19, pp. 98–108, Feb. 2013, doi: 10.1111/cns.12041.

[69] R. D. Çolpan, "Kolon kanser hücre hattında kuersetin ve kafeik asit fenetil ester yüklü nanopartiküllerin proliferasyon ve apoptoz üzerine etkilerinin incelenmesi," Yayımlanmış yüksek lisans tezi. Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı, İstanbul., 2020.

[70] İ. Meteoğlu, "Temozolomid ve genistein yüklü polimerik nanopartiküllerin anti-proliferatif ve apoptotik etkilerinin insan glioblastoma hücrelerinde karşılaştırmalı analizi," Yayımlanmış yüksek lisans tezi. Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı, İstanbul., 2021.

[71] J. S. Ananta, R. Paulmurugan, and T. F. Massoud, "Temozolomide-loaded PLGA nanoparticles to treat glioblastoma cells: a biophysical and cell culture evaluation," *Neurol. Res.*, vol. 38, no. 1, pp. 51–59, Jan. 2016, doi: 10.1080/01616412.2015.1133025.

[72] D. Gerlier and N. Thomasset, "Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation," *J. Immunol. Methods*, vol. 94, no. 1–2, pp. 57–63, Nov. 1986, doi: 10.1016/0022-1759(86)90215-2.

[73] K. J. Livak and T. D. Schmittgen, "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2-\Delta\Delta CT$ method," *Methods*, vol. 25, no. 4, pp. 402–408, Dec. 2001, doi: 10.1006/meth.2001.1262.

[74] A. S. Hussein, N. Abdullah, and A. Fakru'l-razi, "Optimizing the process

parameters for encapsulation of linamarin into PLGA nanoparticles using double emulsion solvent evaporation technique," *Adv. Polym. Technol.*, vol. 32, no. S1, pp. E486–E504, Mar. 2013, doi: 10.1002/adv.21295.

[75] K. Kızılbey, "Optimization of rutin-loaded PLGA nanoparticles synthesized by single-emulsion solvent evaporation method," *ACS Omega*, vol. 4, no. 1, pp. 555–562, Jan. 2019, doi: 10.1021/acsomega.8b02767.

[76] Y. Ling, K. Wei, F. Zou, and S. Zhong, "Temozolomide loaded PLGA-based superparamagnetic nanoparticles for magnetic resonance imaging and treatment of malignant glioma," *Int. J. Pharm.*, vol. 430, no. 1–2, pp. 266–275, Jul. 2012, doi: 10.1016/j.ijpharm.2012.03.047.

[77] J. Panyam, D. Williams, A. Dash, D. Leslie-Pelecky, and V. Labhasetwar, "Solid-state solubility influences encapsulation and release of hydrophobic drugs from PLGA/PLA nanoparticles," *J. Pharm. Sci.*, vol. 93, no. 7, pp. 1804–1814, Jul. 2004, doi: 10.1002/jps.20094.

[78] J. Panyam and V. Labhasetwar, "Sustained cytoplasmic delivery of drugs with intracellular receptors using biodegradable nanoparticles," *Mol. Pharm.*, vol. 1, no. 1, pp. 77–84, Jan. 2004, doi: 10.1021/mp034002c.

[79] S. Ni, X. Fan, J. Wang, H. Qi, and X. Li, "Biodegradable implants efficiently deliver combination of paclitaxel and temozolomide to glioma C6 cancer cells *in vitro*," *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 42, no. 1, pp. 214–221, Jan. 2014, doi: 10.1007/s10439-013-0903-6.

[80] J. Z. Wang *et al.*, "A novel nanoparticle loaded with methyl caffeate and caffeic acid phenethyl ester against Ralstonia solanacearum —a plant pathogenic bacteria," *RSC Adv.*, vol. 10, no. 7, pp. 3978–3990, 2020, doi: 10.1039/C9RA09441E.

[81] X. Song *et al.*, "Dual agents loaded PLGA nanoparticles: Systematic study of particle size and drug entrapment efficiency," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 69, no. 2, pp. 445–453, Jun. 2008, doi: 10.1016/j.ejpb.2008.01.013.

[82] T. I. Janjua *et al.*, "Frontiers in the treatment of glioblastoma: past, present and emerging," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 171, pp. 108–138, Apr. 2021, doi: 10.1016/j.addr.2021.01.012.

[83] F. Pourgholi, M. Hajivalili, J.-N. Farhad, H. S. Kafil, and M. Yousefi, "Nanoparticles: Novel vehicles in treatment of Glioblastoma," *Biomed. Pharmacother.*, vol. 77, pp. 98–107, Feb. 2016, doi: 10.1016/j.biopha.2015.12.014.

[84] S. Mao, J. Xu, C. Cai, O. Germershaus, A. Schaper, and T. Kissel, "Effect of WOW process parameters on morphology and burst release of FITC-dextran loaded PLGA microspheres," *Int. J. Pharm.*, vol. 334, no. 1–2, pp. 137–148, Apr. 2007, doi: 10.1016/j.ijpharm.2006.10.036.

[85] E. Fröhlich, "The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 7, pp. 5577–5591, Nov. 2012, doi: 10.2147/IJN.S36111.

[86] M. J. Ramalho, J. A. Loureiro, M. A. N. Coelho, and M. C. Pereira, “Factorial design as a tool for the optimization of PLGA nanoparticles for the co-delivery of temozolomide and O6-benzylguanine,” *Pharmaceutics*, vol. 11, no. 8, p. 401, Aug. 2019, doi: 10.3390/pharmaceutics11080401.

[87] E. M. P. J. Garrido, A. S. Cerqueira, D. Chavarria, T. Silva, F. Borges, and J. M. P. J. Garrido, “Microencapsulation of caffeic acid phenethyl ester and caffeic acid phenethyl amide by inclusion in hydroxypropyl-β-cyclodextrin,” *Food Chem.*, vol. 254, no. February, pp. 260–265, Jul. 2018, doi: 10.1016/j.foodchem.2018.02.007.

[88] S. A. Bhat and S. Ahmad, “Quantum chemical calculations and analysis of FTIR, FT–Raman and UV–Vis spectra of temozolomide molecule,” *J. Mol. Struct.*, vol. 1099, pp. 453–462, Nov. 2015, doi: 10.1016/j.molstruc.2015.07.002.

[89] H. Wang *et al.*, “Enhanced anti-tumor efficacy by co-delivery of doxorubicin and paclitaxel with amphiphilic methoxy PEG-PLGA copolymer nanoparticles,” *Biomaterials*, vol. 32, no. 32, pp. 8281–8290, Nov. 2011, doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.07.032.

[90] X. Huang and C. S. Brazel, “On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems,” *J. Control. Release*, vol. 73, no. 2–3, pp. 121–136, Jun. 2001, doi: 10.1016/S0168-3659(01)00248-6.

[91] E. . Kikkinides, G. C. Charalambopoulou, A. . Stubos, N. . Kanellopoulos, C. . Varelas, and C. . Steiner, “A two-phase model for controlled drug release from biphasic polymer hydrogels,” *J. Control. Release*, vol. 51, no. 2–3, pp. 313–325, Feb. 1998, doi: 10.1016/S0168-3659(97)00182-X.

[92] M. E. Cam *et al.*, “Evaluation of burst release and sustained release of pioglitazone-loaded fibrous mats on diabetic wound healing: an *in vitro* and *in vivo* comparison study,” *J. R. Soc. Interface*, vol. 17, no. 162, p. 20190712, Jan. 2020, doi: 10.1098/rsif.2019.0712.

[93] M. Yokoyama, T. Okano, Y. Sakurai, H. Ekimoto, C. Shibazaki, and K. Kataoka, “Toxicity and antitumor activity against solid tumors of micelle-forming polymeric anticancer drug and its extremely long circulation in blood.,” *Cancer Res.*, vol. 51, no. 12, pp. 3229–3236, Jun. 1991, [Online]. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2039998.

[94] C. Fonseca, S. Simões, and R. Gaspar, “Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and *in vitro* anti-tumoral activity,” *J. Control. Release*, vol. 83, no. 2, pp. 273–286, Oct. 2002, doi: 10.1016/S0168-3659(02)00212-2.

[95] D. S. Jain *et al.*, “Unraveling the cytotoxic potential of Temozolomide loaded into PLGA nanoparticles,” *DARU J. Pharm. Sci.*, vol. 22, no. 1, p. 18, Dec. 2014, doi: 10.1186/2008-2231-22-18.

[96] O. Sayiner, S. Arisoy, T. Comoglu, F. G. Ozbay, and G. Esendagli,

"Development and *in vitro* evaluation of temozolomide-loaded PLGA nanoparticles in a thermoreversible hydrogel system for local administration in glioblastoma multiforme," *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 57, p. 101627, Jun. 2020, doi: 10.1016/j.jddst.2020.101627.

[97] G. Terzioğlu, A. Ü. Keskin, and G. Y. Demirel, "Measurement methods of cell proliferation and a comparison of various commercial proliferation kits," *Turkish J. Immunol.*, vol. 1, no. 3, pp. 74–89, Jan. 2013, doi: 10.5606/tji.2013.267.

[98] O. Tokur and A. Aksoy, "*In vitro* sitotoksisite testleri," *Harran Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Derg.*, vol. 6, no. 1, pp. 112–118, 2017.

[99] T. Chung *et al.*, "Novel and therapeutic effect of caffeic acid and caffeic acid phenyl ester on hepatocarcinoma cells: complete regression of hepatoma growth and metastasis by dual mechanism," *FASEB J.*, vol. 18, no. 14, pp. 1670–1681, Nov. 2004, doi: 10.1096/fj.04-2126com.

[100] D. Ghosh, S. Nandi, and S. Bhattacharjee, "Combination therapy to checkmate glioblastoma: clinical challenges and advances," *Clin. Transl. Med.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–12, Dec. 2018, doi: 10.1186/s40169-018-0211-8.

[101] D. R. Welch and D. R. Hurst, "Defining the hallmarks of metastasis," *Cancer Res.*, vol. 79, no. 12, pp. 3011–3027, Jun. 2019, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-19-0458.

[102] A. A. Stepanenko *et al.*, "Temozolomide promotes genomic and phenotypic changes in glioblastoma cells," *Cancer Cell Int.*, vol. 16, pp. 1–16, Dec. 2016, doi: 10.1186/s12935-016-0311-8.

[103] M. Park, C. Song, H. Yoon, and K.-H. Choi, "Double blockade of glioma cell proliferation and migration by temozolomide conjugated with NPPB, a chloride channel blocker," *ACS Chem. Neurosci.*, vol. 7, no. 3, pp. 275–285, Mar. 2016, doi: 10.1021/acschemneuro.5b00178.

[104] C. Sun *et al.*, "Additive antiangiogenesis effect of ginsenoside Rg3 with low-dose metronomic temozolomide on rat glioma cells both in vivo and in vitro," *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, vol. 35, pp. 1–12, Dec. 2016, doi: 10.1186/s13046-015-0274-y.

[105] Y. Zhang *et al.*, "EGCG inhibits properties of glioma stem-like cells and synergizes with temozolomide through downregulation of P-glycoprotein inhibition," *J. Neurooncol.*, vol. 121, no. 1, pp. 41–52, Jan. 2015, doi: 10.1007/s11060-014-1604-1.

[106] A. J. Yool and S. Ramesh, "Molecular targets for combined therapeutic strategies to limit glioblastoma cell migration and invasion," *Front. Pharmacol.*, vol. 11, no. 358, pp. 1–26, Mar. 2020, doi: 10.3389/fphar.2020.00358.

[107] N. A. P. Franken, H. M. Rodermond, J. Stap, J. Haveman, and C. van Bree, "Clonogenic assay of cells in vitro," *Nat. Protoc.*, vol. 1, no. 5, pp. 2315–2319, Dec. 2006, doi: 10.1038/nprot.2006.339.

[108] A. I. Elkady, R. A. E. H. Hussein, and O. A. Abu-Zinadah, “Effects of crude extracts from medicinal herbs rhazya stricta and zingiber officinale on growth and proliferation of human brain cancer cell line in vitro,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2014, pp. 1–16, 2014, doi: 10.1155/2014/260210.

[109] S. Patel, “Emerging adjuvant therapy for cancer: propolis and its constituents,” *J. Diet. Suppl.*, vol. 13, no. 3, pp. 245–268, May 2016, doi: 10.3109/19390211.2015.1008614.

[110] R. Eröz, A. Karataş, O. A. Alkoç, D. Baltacı, M. Oktay, and S. Çolakoğlu, “Apoptozis hakkında bilinenler,” *Duzce Med. J.*, vol. 14, no. 2, pp. 87–101, 2012.

[111] İ. Tunç, S. Zergeroğlu, B. H. Daylan, T. Aydoğdu, and L. Mollamahmutoğlu, “Serviks kanserlerinde Bcl-2 ve Bax protein expresyonları ve prognostik faktörlerle korelasyonu,” *Türk Jinekolojik Onkol. Derg.*, vol. 7, no. 4, pp. 140–148, 2004.

[112] C. A. Ağca, M. Kırıcı, A. Can, and Y. Yumak, “5-Florouracïl ve resveratrol kombïnasyonunun insan akciğer kanserï A549 hücre hattında apoptozïs üzerïn etkïsï,” *Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Derg.*, vol. 21, no. 3, pp. 359–368, 2019, doi: 10.24938/kutfd.465470.

[113] S. Kumar, “ICE-like proteases in apoptosis,” *Trends Biochem. Sci.*, vol. 20, no. 5, pp. 198–202, May 1995, doi: 10.1016/S0968-0004(00)89007-6.

[114] F. C. Kischkel *et al.*, “Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor.,” *EMBO J.*, vol. 14, no. 22, pp. 5579–5588, Nov. 1995, [Online]. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8521815.

[115] M. M. Hill, C. Adrain, P. J. Duriez, E. M. Creagh, and S. J. Martin, “Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes,” *EMBO J.*, vol. 23, no. 10, pp. 2134–2145, May 2004, doi: 10.1038/sj.emboj.7600210.

[116] Y.-L. Lan *et al.*, “Anti-cancer effects of dopamine in human glioma: involvement of mitochondrial apoptotic and anti-inflammatory pathways,” *Oncotarget*, vol. 8, no. 51, pp. 88488–88500, Oct. 2017, doi: 10.18632/oncotarget.19691.

[117] J. Ma, M. Murphy, P. J. O’Dwyer, E. Berman, K. Reed, and J. M. Gallo, “Biochemical changes associated with a multidrug-resistant phenotype of a human glioma cell line with temozolomide-acquired resistance,” *Biochem. Pharmacol.*, vol. 63, no. 7, pp. 1219–1228, Apr. 2002, doi: 10.1016/S0006-2952(02)00876-6.

[118] A. Das, N. L. Banik, S. J. Patel, and S. K. Ray, “Dexamethasone protected human glioblastoma U87MG cells from temozolomide induced apoptosis by maintaining Bax:Bcl-2 ratio and preventing proteolytic activities.,” *Mol. Cancer*, vol. 3, no. 36, pp. 1–10, Dec. 2004, doi: 10.1186/1476-4598-3-36.

[119] W. Thuncharoen, M. Chulasiri, S. Nilwarangkoon, Y. Nakamura, and R.

Watanapokasin, “Apoptotic induction of skin cancer cell death by plant extracts.,” *J. Med. Assoc. Thail.*, vol. 96, no. 1, pp. 60–64, Jan. 2013, [Online]. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23724457.

[120] W.-Z. Liang *et al.*, “The involvement of mitochondrial apoptotic pathway in eugenol-induced cell death in human glioblastoma cells,” *Toxicol. Lett.*, vol. 232, no. 1, pp. 122–132, Jan. 2015, doi: 10.1016/j.toxlet.2014.10.023.

[121] M. Khazaei and M. Pazhouhi, “Temozolomide-mediated apoptotic death is improved by thymoquinone in U87MG cell line,” *Cancer Invest.*, vol. 35, no. 4, pp. 225–236, Apr. 2017, doi: 10.1080/07357907.2017.1289383.

[122] L. Wang, X. Xu, X. Niu, and J. Pan, “Colorimetric detection and membrane removal of arsenate by a multifunctional L-arginine modified FeOOH,” *Sep. Purif. Technol.*, vol. 258, no. 2, pp. 1–12, Mar. 2021, doi: 10.1016/j.seppur.2020.118021.

[123] I. M. Ghobrial, T. E. Witzig, and A. A. Adjei, “Targeting apoptosis pathways in cancer therapy,” *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 55, no. 3, pp. 178–194, May 2005, doi: 10.3322/canjclin.55.3.178.

[124] R. M. Kluck, E. Bossy-Wetzel, D. R. Green, and D. D. Newmeyer, “The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis,” *Science (80-.).*, vol. 275, no. 5303, pp. 1132–1136, Feb. 1997, doi: 10.1126/science.275.5303.1132.

[125] K. M. Ryan, A. C. Phillips, and K. H. Vousden, “Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein,” *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 13, no. 3, pp. 332–337, Jun. 2001, doi: 10.1016/S0955-0674(00)00216-7.

[126] Y. Öztürk, C. Günaydın, F. Yalçın, M. Nazıroğlu, and N. Braidy, “Resveratrol enhances apoptotic and oxidant effects of paclitaxel through TRPM2 channel activation in DBTRG glioblastoma cells,” *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2019, pp. 1–13, Mar. 2019, doi: 10.1155/2019/4619865.

[127] S. E. Pustchi, N. G. Avci, Y. M. Akay, and M. Akay, “Astrocytes decreased the sensitivity of glioblastoma cells to temozolomide and Bay 11-7082,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, pp. 1–18, Sep. 2020, doi: 10.3390/ijms21197154.

[128] U-87 MG (ATCC® HTB-14™), https://www.atcc.org/products/htb-14 (Erişim zamanı; 31.12.2021).

[129] CCD-1079Sk (ATCC® CRL-2097™), https://www.atcc.org/products/crl-2097 (Erişim zamanı; 18.01.2022).

[130] ThermoFisher Scientific Technotes RNA Isolation, https://www.thermofisher.com/tr/en/home/references/ambion-tech-support/rna-isolation/tech-notes/quantitating-rna.html (Erişim zamanı; 01.12.2021).

[131] Vikipedi, Western Blot, https://tr.wikipedia.org/wiki/Western_blot (Erişim zamanı; 01.12.2021).

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

A. Salbaş ve A. Erdemir, “Glioblastoma tedavisinde kullanılmak üzere kafeik asit fenetil ester ve temozolomid yüklü polimerik nanopartiküllerin sentezi”, 2. Sağlık Bilimlerinde Multidisipliner Çalışmalar Kongresi, Ankara, Şubat 2021.

Projeler

A. Salbaş ve A. Erdemir, “Kafeik asit fenetil ester yüklü polimerik nanopartiküllerin insan glioblastoma hücreleri üzerindeki anti-proliferatif ve apoptotik etkilerinin incelenmesi”, YTÜ BAP Y. Lisans, FYL-2020-4104.