

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**NANOİLAÇ OLARAK MODİFİYE EDİLMİŞ SERAMİDAZ
İNHİBİTÖRLERİNİN İN VİTRO KANSER
HÜCRELERİNDE TOKSİK ETKİLERİNİN VE
MEKANİZMASININ ARAŞTIRILMASI**

FERDANE DANIŞMAN KALİNDEMİRTAŞ

**DANIŞMAN
PROF. DR. HÜSNİYE BİRMAN**

**FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
FİZYOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2020

DOKTORA TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İstanbul Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Programında Doktora öğrencisi **Ferdane DANIŞMAN-KALINDEMİRTAŞ** tarafından Prof.Dr.Hüsnüye BİRMAN danışmanlığında hazırlanan “**Nanoilaç Olarak Modifiye Edilmiş Seramidaz İnhibitörlerinin İn Vitro Kanser Hücrelerinde Toksik Etkilerinin ve Mekanizmasının Araştırılması**” başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından, 07 /02/2020 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.


Jüri Başkanı

Prof. Dr. F.Aytül UYAR
İstanbul Üniversitesi,
İstanbul Tıp Fakültesi,
Fizyoloji .A.D


Jüri-Danışman

Prof. Dr. Hüsnüye BİRMAN
İstanbul Üniversitesi
İstanbul Tıp Fakültesi
Fizyoloji AD


Jüri

Prof. Dr. Nesrin Zeynep ERTAN
İstanbul Aydın Üniversitesi,
Tıp Fakültesi Fizyoloji AD


Jüri

Prof. Dr. Gülderen ŞAHİN
İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa-
Cerrahpaşa Tıp Fizyoloji AD

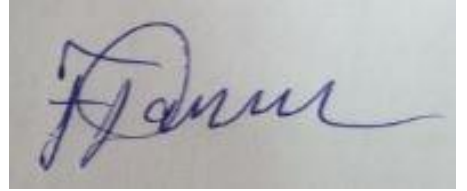

Jüri

Prof. Dr. Işıl ALBENİZ
İstanbul Üniversitesi
İstanbul Tıp Fakültesi
Biyofizik AD

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Ferdane DANIŞMAN KALINDEMİRTAŞ



İTHAF

Aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Lisanüstü eğitimim süresince değerli bilgilerinden faydalandığım, Anabilim Dalı'nda tezimi yapma olanakları sunan Anabilim Dalı başkanımız, değerli hocam Prof. Dr. Aytül UYAR'a ve eğitimim süresince emeği geçen diğer tüm değerli hocalarıma,

Akademik hayatıma başladığım günden bu yana desteğini yanımda hissettiğim, engin bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, hem beşeri hem ahlaki değerleri ile kendisini örnek aldığım, kendisiyle çalışmaktan her zaman mutluluk ve keyif duyduğum, her türlü kolaylığı göstererek tezimin tamamlanmasına en büyük desteği sağlayan, maddi manevi her türlü yardımı ve desteği benden esirgemeyen, beni her zaman ileriye taşıyan çok sevdiğim danışman hocam Sayın Prof. Dr. Hüsniye BİRMAN'a,

Bu çalışmanın hazırlanmasından tamamlanmasına kadar her zaman yanımda olan, tecrübesinden ve bilgisinden sonsuz istifade ettiğim, akademik hayatımda kazandığım tecrübelerin büyük kısmını kendisine borçlu olduğum, sabrına, çalışma azmine, hayran olduğum, beni cesaretlendiren, çalışmalarımın en büyük destekleyicilerinden biri olan çok sevdiğim diğer danışman hocam diyebileceğim Sayın Prof. Dr. Serap KURUCA'ya,

Avcılarda bana nanoteknolojinin bilmediğim kapılarını açan, çok derin bilgilerinden istifade etme şansı bulduğum, engin bilgisi, enerjisi ve çalışma azmi ve hoşgörüsü ile hayran olduğum, hiç unutmayacağım hocam Sayın Prof. Dr. Ayben KİLİSLİOĞLU'na ve nanoteknoloji konusunda bilgilerimin önemli bir kısmını borçlu olduğum, bilgisi ve çalışma azmine hayran olduğum, her zaman her türlü sorunda kendisine danışabildiğim Sayın Dr. Öğretim Üyesi Selcan KARAKUŞ'a, bana her türlü yardımı ve kolaylığı sağlayan sevgili arkadaşlarım Ezgi TAN ve Merve ILGAR'a,

Laboratuvarda çalışma ortamımızda bana her zaman yardımcı olan, desteklerini hep yanımda hissettiğim çok değerli arkadaşlarım, Güneş ÖZEN, Gökçe ERDEMİR ve aramıza yeni katılan Neslişah IŞIK'a

Gerek deney sürecimde, gerekse yazma aşamasında her türlü zorlukta yanımda olan, beni yüreklendiren, işlerimi kolaylaştıran canım eşim Celal KALINDEMİRTAŞ'a ve hayat kaynağım biricik kızım Zeynep KALINDEMİRTAŞ'a

İçten, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 29884



İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	iii
İTHAF.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	xiii
ÖZET	xvi
ABSTRACT.....	xvii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. KANSER.....	3
2.1.1. Kanser oluşum mekanizmaları.....	4
2.2. MEME KANSERİ	6
2.2.1. Üçlü Negatif Meme Kanseri (ÜNMK)	7
2.3. FLOROURASİL	8
2.4. KARMOFUR.....	9
2.5. ROSİN.....	9
2.6. POLİETİLEN GLİKOL (PEG).....	10
2.7. NANO İLAÇLAR.....	11
2.7.1. Nano ilaçların tarihçesi	11
2.7.2. Kanser Tedavisinde Nanoilaçların Geliştirilmesi	12
2.7.3. Nano ilaç taşıyıcı sistemler	13
2.7.3.1. Polimerik Nanopartiküller.....	15
2.7.3.2. Katı lipid nanopartiküller	16
2.7.3.3. Kitosan bazlı nanopartiküller	16
2.7.3.4. Folik asit ve PLGA konjugatları	17
2.7.3.5. Silika nanopartiküller	17
2.7.4. Tanı ve Tedavide Nano İlaçlar:.....	19
2.7.5. Hedefe Yönelik Nanoilaçlar:	20

2.8. SERAMİDLER VE SFİNGOLİPİTLER.....	21
2.9. ASİT SERAMİDAZLAR	21
2.9.1. N-Açıl Sifingosin Amido Hidrolaz 1 (ASAH1) ve Kanserdeki Rolü.....	23
2.9.2. Meme Kanseri Gelişiminin Kritik Basamaklarında Çok Yönlü Bir Faktör olan Seramid Metabolizma Dengesi.	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	29
3.1. GEREÇ	29
3.1.1. Kullanılan Çözeltiler	31
3.1.2. Kullanılan Bileşikler	32
3.1.2.1. Florourosil	32
3.1.2.2. Karmofur	33
3.2. YÖNTEM	34
3.2.1. Spektroskopik Yöntemler	34
3.2.2. Absorbans Ölçümü.....	34
3.2.3. Polimerik Nanopartiküllerin Hazırlanması:	35
3.3. Hücre Kültürü Çalışmaları	36
3.3.1. Hücrelerin Çoğaltılması	36
3.3.2. Hücre Kültürü ve hücre serilerinin stabilizasyonu:.....	37
3.3.3. Tripsin ile Hücrelerin Kaldırılması	37
3.3.4. Hücre Canlılığının Tripan Mavisi Boya ile Değerlendirilmesi.....	37
3.3.5. Sitotoksik Konsantrasyonlarının Belirlenmesi (IC50)	37
3.3.6. Hücre Lizatlarının Hazırlanması	38
3.3.7. BCA Protein Deney Kiti ile Protein Miktarı Tayini	38
3.4. Western Blot Yöntemi	40
3.5. İstatistik.....	41
4. BULGULAR.....	42
4.1. Polimerik Nanopartiküllerin Dinamik Işık Saçılımı ile Karakterizasyonu.....	42
4.2. Nanopartiküllerin Zeta Potansiyeli	44
4.3. Polimerik Nanopartiküllerin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi ile Karakterizasyonu	46
4.4. Polimerik Nanopartiküllerin FTIR (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi) Analizi Sonuçları	49
4.5. Stabilitate Sonuçları.....	49

4.6. Karmofur ve 5-FU Konsantrasyon-Absorbans Grafikleri	50
4.7. <i>İn vitro</i> İlaç Salım Çalışmaları	51
4.8. KÜMÜLATİF YÜZDE SALIM DOĞRULARI	55
4.9. HİGUCHİ KİNETİĞİ	58
4.10. SİTOTOKSİSİTE SONUÇLARI.....	59
4.11. WESTERN BLOT ANALİZLERİ	64
4.11.1. MCF-7 Hücre Serilerinde Western Blot Analizleri	65
4.11.2. MDA-MB-231 Hücre Serilerinde Western Blot Analizleri.....	68
4.11.3. HUVEC Hücre Serilerinde Western Blot Analizleri	70
5. TARTIŞMA	72
KAYNAKLAR	87
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	100
ÖZGEÇMİŞ	101

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2. 1: FDA tarafından onaylanmış klinik çalışmalarda veya piyasada kanser tedavisinde kullanılan nanoilaçlar	17
Tablo 3. 1: Kullanılan Kimyasallar.....	29
Tablo 3. 2: Kullanılan Alet ve Cihazlar	30
Tablo 4. 1: Hazırlanan boş polimerik nanopartiküllerin partikül boyutu ve zeta potansiyel değerleri.....	42
Tablo 4. 2: Meme kanseri (MDA-MB-231 ve MCF-7) ve endotel (HUVEC) hücrelerinde 5-FU, Karmofur ve Nano 5-FU, Nano Karmofur'un IC ₅₀ değerleri.....	59

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4. 1: İlaç yüklenmemiş polimerik boş nanopartiküllerin DLS analizi.....	43
Şekil 4. 2: Karmofur yüklenmiş polimerik nanopartiküllerin DLS analizi	43
Şekil 4. 3: 5-FU yüklenmiş polimerik nanopartiküllerin DLS analizi sonucu partikül boyutları	44
Şekil 4. 4: Polimerik boş nanopartiküllerin zeta potansiyeli	45
Şekil 4. 5: Karmofur yüklü polimerik nanopartiküllerin zeta potansiyeli	45
Şekil 4. 6: 5-FU yüklü polimerik nanopartiküllerin zeta potansiyeli	45
Şekil 4. 7: Polimerik boş nanopartiküllerin SEM görüntüleri.	46
Şekil 4. 8: Karmofur yüklü nanopartiküllerin SEM görüntüleri.	47
Şekil 4. 9: 5-FU yüklü nanopartiküllerin SEM görüntüleri.	48
Şekil 4. 10: Boş Nanopartiküller ile Karmofur ve 5-FU yüklenmiş nanopartiküllerin FTIR analizleri	49
Şekil 4. 11: Serbest Karmofur'a ait kalibrasyon doğrusu ve regresyon denklemi	50
Şekil 4. 12: Serbest 5-FU'ya ait kalibrasyon doğrusu ve regresyon denklemi.....	51
Şekil 4. 13: Karmofur yüklenmiş nanopartiküllerin pH:7,4 de zamana bağlı olarak salım miktarı gösterilmektedir.....	52
Şekil 4. 14: Karmofur yüklenmiş nanopartiküllerin pH:1,2 de zamana bağlı olarak salım miktarı gösterilmektedir.....	52
Şekil 4. 15: 5-FU yüklenmiş nanopartiküllerin pH:7,4 de zamana bağlı olarak salım miktarı gösterilmektedir.....	53
Şekil 4. 16: 5-FU yüklenmiş nanopartiküllerin pH:1,2 de zamana bağlı olarak salım miktarı gösterilmektedir.....	54
Şekil 4. 17: 5-FU yüklenmiş nanopartiküllerin pH:7,4 de zamana bağlı kümülatif yüzde salım oranı gösterilmektedir.	55
Şekil 4. 18: 5-FU yüklenmiş nanopartiküllerin pH:1,2 de zamana bağlı kümülatif yüzde salım oranı gösterilmektedir.	56
Şekil 4. 19: Karmofur yüklenmiş nanopartiküllerin pH:7,4 de zamana bağlı kümülatif yüzde salım oranı gösterilmektedir.....	57
Şekil 4. 20: Karmofur yüklenmiş nanopartiküllerin pH:1,2 de zamana bağlı kümülatif yüzde salım oranı gösterilmektedir.....	57
Şekil 4. 21: Higuchi ilaç salım kinetiği.....	58

Şekil 4. 22: MCF-7 hücre serilerinde serbest 5-FU ve nano 5-FU nun hücre canlılığı üzerindeki etkileri	59
Şekil 4. 23: MCF-7 hücre serilerinde serbest karmofur ve nano karmofurun hücre canlılığı üzerindeki etkileri.	60
Şekil 4. 24: MDA-MB-231 hücre serilerinde serbest 5-FU ve nano 5-FU nun hücre canlılığı üzerindeki etkileri	61
Şekil 4. 25: MDA-MB-231 hücre serilerinde serbest karmofur ve nano karmofurun hücre canlılığı üzerindeki etkileri	61
Şekil 4. 26: MDA-MB-231 hücrelerinin ışık mikroskopunda görünümü.	62
Şekil 4. 27: MCF-7 hücrelerinin ışık mikroskopunda görünümü.	63
Şekil 4. 28: Protein konsantrasyon absorbanans grafiği.	64
Şekil 4. 29: MCF-7 hücrelerinde görülen protein ekspresyonları	65
Şekil 4. 30: MCF-7 için Aktin ekspresyon seviyeleri.....	65
Şekil 4. 31: MCF7 için S1P ekspresyon seviyeleri.....	66
Şekil 4. 32: MCF7 için Bcl-2 ekspresyon seviyeleri	66
Şekil 4. 33: MCF-7 için ASAHI ekspresyon seviyeleri.....	67
Şekil 4. 34: MDA-MB-231 hücrelerinde görülen protein ekspresyonları	68
Şekil 4. 35: MDA-MB-231 için Aktin ekspresyon seviyeleri.	68
Şekil 4. 36: MDA-MB-231 için S1P ekspresyon seviyeleri.	69
Şekil 4. 37: MDA-MB-231 için ASAHI ekspresyon seviyeleri.	69
Şekil 4. 38: MDA-MB-231 için ASAHI ekspresyon seviyeleri.	70
Şekil 4. 39: HUVEC hücrelerinde görülen protein ekspresyonları	70

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

μ L: Mikrolitre

μ M: Mikromolar

5-FU: 5-Florourasil

ATCC : American Type Culture Collection

BSA: Sığır Serum Albumini (Bovine serum albumin)

CO₂ : Karbon dioksit

DLS: Dinamik Işık Saçılımı (Dynamic Light Scattering)

dk : Dakika

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: Dimetil sülfoksit

EDTA: Etilen diamin tetra asetik asit

IC₅₀: Hücrelerin %50'sini öldüren inhibisyon konsantrasyonu

M: Molarite

MCF-7: İnsan meme kanseri hücre hattı

MDA: İnsan meme kanseri hücre hattı

mg: Miligram

ml : Mililitre

MM : Metilen Mavisi

mM : Milimolar

MTT : 3-(4,5- dimetil-2-tiyazolil)-2,5-difeniltetrazoluum bromid sitotoksisite testi

nm : Nanometre

NP: Nanopartikül

°C : Santigrad derece

PBS : Fosfat tamponu (Phosphate Buffered Saline)

PI : Propidyum iyodit

PLGA: Poli (D, L-Laktik-ko-Glikolik Asit)

PEG: Poli-Etilen Glikol

RB : Rodamin B

rpm : Dakika devir /dönüş sayısı

SDS: Sodyum Dodesil Sülfat

SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat -Poliakrilamid Jel Elektroforez)

SEM : Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscope)

TBS: Tris tampon tuzu (Tris buffered saline)

TBST: Tris tampon tuzu Tween-20 (Tris buffered saline Tween-20)

TEM : Geçirimli Elektron Mikroskobu (Transmission Electron Microscope)

TEMED: Tetra metil etilen diamin

TGS: Tris/Glycine/SDS

TNF: Tümör Nekrozis Faktör

UV : Ultraviyole - Morötesi

µL : Mikrolitre

AC: Asit seramidaz

HUVEC: İnsan Kordon Veni Endotel Hücreleri (Human Umbilical Vein Endothelial Cells)

ASA1: N-Açıl Sifingosin Amido Hidrolaz 1

S1P: Sifingozin 1 fosfat

TRAIL: TNF ile ilgili apoptozu indükleyen ligand (Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand)

WHO: Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)

KLN: Katı lipid nanopartiküller



ÖZET

Danışman Kalındemirtaş, F. (2020). Nanoilaç olarak modifiye edilmiş seramidaz inhibitörlerinin in vitro kanser hücrelerinde toksik etkilerinin ve mekanizmasının araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Kanser sağlık alanında en fazla ilaç araştırmalarının yapıldığı ve yeni ilaçların klinik kullanımda hızla yer aldığı bir alandır. Son yıllarda nanopartikül bazlı ilaçların geliştirilmesi ile hem kanser hücrelerinde hedefe yönelik toksik etki sağlanması hem de sağlıklı hücrelerde daha düşük yan etkilerin meydana gelmesi istenmektedir. Bu amaçla hücre çoğalması ve farklılaşmasındaki sinyal iletilerinde çeşitli mekanizmaları ve molekülleri hedefleyen nanopartiküller geliştirilmektedir.

Seramidaz, seramidi sfingozin 1-fosfat ve yağ asitlerine dönüştüren bir enzimdir. Asit seramidaz aktivitesinin tümörlü hücrelerde normal hücrelerle kıyaslandığında artmış olduğu gösterilmiştir. Ayrıca seramidazların aşırı ekspresyonu tümör hücrelerini tümör nekrozis faktör ve radyasyona karşı dirençli hale getirmektedir. Bu nedenlerle seramidaz inhibitörleri antikanser ilaç geliştirilmesinde önemli hedeflerdir.

Bu çalışmada timidilat sentetaz üzerine etkilerinin yanında, seramidaz inhibitörleri de olan, florourasil (5-FU) ve karmofur nanotaşıyıcı sistemlere yüklenerek meme kanseri hücre serilerinde (MCF-7, MDA-MB-231) ve insan kordon veni endotel hücrelerinde (HUVECs) etkileri incelenmiştir. Bu amaçla biyouyumlu nanotaşıyıcı olan rosin esteri ve Poli-Etilen Glikol (PEG) kullanılmıştır. Nanopartiküllerin karakterizasyonu Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) ve Dinamik Işık Saçılımı (DLS) ile yapıldıktan sonra sitotoksik etkileri incelenmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre 10-100 µM konsantrasyon aralığında çalışılan nanopartiküllerin meme kanseri hücreleri üzerinde sitotoksik etkileri tespit edilmiştir. Nano 5-FU'nun ve nano karmofurun sitotoksik aktivitesinin MCF-7 hücre hattında MDA-MB-231 hücre hattına göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Ayrıca çalışmamızda, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde western blot ile yapılan protein analizinde, S1P, ASAH1 ve Bcl-2 proteinlerinin ekspresyonunda genel olarak kontrole göre azalma görülmektedir, özellikle S1P ve ASAH1 için nano karmofur'da daha yüksek oranda bir azalma söz konusudur. Çalışmamızdaki bu sonuçlara göre 5-FU ve karmofurun ASAH1 ve S1P üzerinden etki ederek hücre ölümünü gerçekleştirdiğini düşünmekteyiz. Ayrıca bu ilaçların nano taşıyıcılara yüklenmesi sonucu ASAH1 ve S1P enzimlerinin sitotoksik etkilerinin de artabileceği bulgularımızda görülmektedir. Çalışmamızda sağlıklı HUVEC hücrelerinde ASAH1 ve S1P enzim seviyelerinde önemli bir değişiklik görülmemesi, nano bileşiklerimizin kanser hücreleri üzerinde kullanılabilir olduğunu desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler : Florourosil, Karmofur, Nano ilaç, Sitotoksisite, Seramidaz

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 29884

ABSTRACT

Danışman Kalındemirtaş, F. (2020). Investigation of the toxic effects and mechanism of in vitro cancer cells of nano-drug-modified ceramidase inhibitors İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Physiology. PhD thesis. İstanbul.

Cancer is an area where the most drug researches are conducted in the field of health and new drugs are rapidly introduced into clinical use. In recent years, with the development of nanoparticle based drugs, it is aimed to provide targeted toxic effects on cancer cells and lower side effects in healthy cells. For this purpose, nanoparticles targeting various mechanisms and molecules in signaling cell proliferation and differentiation are being developed.

Ceramidase is an enzyme that converts ceramide into sphingosine 1-phosphate and fatty acids. Acid ceramidase activity has been shown to be increased in tumor cells compared to normal cells. In addition, overexpression of ceramidases renders tumor cells resistant to tumor necrosis factor and radiation. For these reasons, ceramidase inhibitors are important targets in the development of anticancer drugs.

In addition to its effects on thymidilate synthetase, fluorouracil and carmofur, which are also inhibitors of ceramidase were loaded into nanotransport systems and their effects on breast cancer cell lines MCF-7, MDA-MB-231 and HUVECs were investigated. For this purpose, Rosin ester, which is a biocompatible nanocarrier, and Poly-Ethylene-Glycol were used. Cytotoxic effects of nanoparticles were investigated by SEM and DLS.

The cytotoxic effects of our nanoparticles in the range of 10-100 concentration μM on breast cancer cells were determined. The cytotoxic activity of nano 5-FU and nano carmofur was found to be higher in the MCF-7 cell line than in the MDA-MB-231 cell line.

In our study S1P, ASAH1 enzyme levels and Bcl-2 protein expression decreased compared to control cells, especially for S1P and ASAH1. This result was lower for nano carmofur applied cells. Therefore, we think that 5-FU and carmofur effect cell death by acting on ASAH1 and S1P. ASAH1 and S1P enzymes activity may increase when loading of these drugs into the nano carriers.

There were no significant changes in ASAH1 and S1P enzyme levels in healthy HUVEC cells, these results suggest that our nano compounds can be used on cancer cells.

Key Words: Fluorourosil, Carmofur, Nano drug, Cytotoxicity, Ceramidase.

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 29884

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, günümüzde en önemli ölüm nedenleri arasındadır ve var olan tedavilerle birlikte yeni tedavi arayışları devam etmektedir. Cerrahi ve radyoterapi ile birlikte kemoterapi kanser tedavisinin temelini oluşturmaktadır. Kemoterapi, kanser hücresi çoğalmasını, hastalığın ilerlemesini ve metastazını baskılamak için sıklıkla kullanılan bir tedavidir. Kemoterapötik ilaçlar sadece çoğalan kanser hücrelerini öldürmekle kalmayıp, normal hücrelere de zarar verebilirler. Bu nedenle, yan etkilerin şiddetini azaltmak amacıyla, kemoterapinin etkinliğini koruyan veya geliştiren yeni antitümör ilaç tedavilerine ihtiyaç duyulmaktadır (Li ve ark 2017).

Aynı zamanda, günümüzde kanser tedavisinde kullanılan ilaçlara karşı direnç gelişmesi tedavinin başarısını düşürmekte ve kanserin nüks etmesine neden olmaktadır. Bu konuda yoğun bilimsel çalışmalar yürütülmekte, özellikle hücre kültürlerinde yeni antikanser ilaçlar ile daha başarılı tedaviler sağlanmasına çalışılmaktadır.

Seramidaz enzim çalışmaları, son yıllarda oldukça ilgi çekmektedir. Seramidazlar, seramidin sfingozine ve yağ asitlerine indirgenmesini katalize etmektedirler. Seramid miktarı sadece sfingolipid biyosentezi ve degradasyonu için önemli olmakla kalmayıp, apoptoz, hücre farklılaşması ve büyümesi gibi hücrenin geleceği ile ilgili sinyallerin oluşumunda da önemli bir rol oynamaktadır (Saied ve Arenz, 2016). Asit seramidaz inhibisyonu bazı kanser türlerini kemoterapi ve radyoterapiye duyarlı hale getirmektedir. Seramidin birikimi normal çoğalan hücrelere zarar vermezken, aşırı çoğalan tümör hücrelerinde birikerek apoptoza neden olabilmektedir. Ayrıca seramid, sfingozin üretmek amacıyla seramidaz enziminin aktivasyonu ile hidroliz edilebilir. Bu yüzden seramid ve sfingozin-1-fosfat arasındaki denge hücrenin kaderini belirler (Olivera ve Spiegel 2001, Spiegel 2002). Seramidazların aktivitesinin inhibe edilmesi seramid birikimine yol açacağı için seramidaz inhibitörleri antikanser ilaç gelişimi açısından önemli hedeflerdir (Bielawska ve ark. 1992, Selzner ve ark. 2001).

Kanser tedavisinde yeni bir yaklaşım olarak kullanılan asit seramidaz inhibitörleri ile artan çalışmalar doğrultusunda asit seramidazların kanser tedavisinde ve ilaç direncini azaltmada ve kombine kullanımla gösterdiği sinerjik etki sayesinde tedavide daha etkili seçenekler sunması gelecek için umut vaat etmektedir.

Asit seramidazların son literatürlerde kanser hücreleri üzerinde farklı yollarla sitotoksik etkileri ortaya çıkmaktadır ve bilinmeyen muhtemel mekanizmalarının aydınlatılması için çalışmalar devam etmektedir (Govindarajaha ve ark 2019).

Nano ilaçların geliştirilmesi ile insanlarda hem daha düşük yan etkilerin ortaya çıkması, hem de kanser hücrelerinde hedefe yönelik etkilerle yeni tedaviler amaçlanmaktadır. Nano ilaçlar hedefe yönelik ve tümörlere karşı spesifik olup tedaviye daha iyi cevap alınmasını sağlar. Seramidaz inhibitörleri ile özellikle de nanopartikül bazlı yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bu nedenle, çalışmamız nanoteknolojik olarak üretilmiş ilaç uygulanması özelliği ile önem arz etmektedir.

Yapmış olduğumuz tez çalışmasında asit seramidaz inhibitörleri olan 5-FU ve karmofuru kullanılarak MCF-7, MDA-MB-231 hücre serilerindeki sitotoksik etkileri ve bunun hangi mekanizma ile gerçekleştiğini tespit etmeyi amaçladık.

Bu amaçla, 5-FU ve karmofurun hem serbest hem de bizim hazırladığımız PEG kaplı nano formlarını kullandık. Ayrıca ASAH1, S1P ve bcl-2 protein miktarlarını tayin ederek sitotoksik mekanizmanın aydınlatılmasını amaçladık. Sonuçlarımızın literatüre önemli katkı sağlayacağını ve aynı zamanda nano bileşiklerimizin kanser hücreleri üzerinde kullanılabilme olasılığının tespit edilmesini sağlayacağını düşünmekteyiz.

2. GENEL BİLGİLER

Günümüzde kanser, tüm dünya için en çok sorun teşkil eden hastalıkların başında gelmektedir. Dünya Sağlık Örgütüne (WHO) bağlı kurumlar tarafından yapılan araştırmalarda, 2030 lu yıllarda kanserin bir numaralı ölüm nedeni olabileceği bildirilmektedir (Tuncer 2008). Cerrahi ve radyoterapi ile birlikte kemoterapi kanser tedavisinin temelini oluşturmaktadır. Kemoterapi, kanser hücresi çoğalmasını, hastalığın ilerlemesini ve metastazını baskılamak için sıklıkla kullanılan bir tedavi olmasının yanında, kemoterapötik ilaçlar sadece çoğalan kanser hücrelerini öldürmekle kalmayıp, aynı zamanda normal hücreler üzerinde de olumsuz etkilere neden olabilmektedir. Bu nedenle, olumsuz reaksiyonların ve yan etkilerin şiddetini azaltmanın yanında, kemoterapinin etkinliğini koruyan veya geliştiren yeni antitümör ilaç tedavilerine ihtiyaç duyulmaktadır (Li ve ark 2017).

2.1. KANSER

Kanser, vücudun belirli bir bölümündeki normal hücreler kontrolden çıkmaya başladığında gelişmektedir. Farklı kanser türleri vardır; kanser hücresi ölmek yerine büyümeye, bölünmeye ve yeniden bölünmeye ve yeni anormal hücreler oluşturmaya devam etmektedirler. Genellikle kanser hücreleri DNA'nın hasar görmesi sonucu normal hücrelerden gelişir. Bir kişinin DNA'sı, ortamdaki zararlı mutajenlere, kimyasallara maruz kaldığında hasar görür (Sudhakar 2009). Genellikle DNA hasar gördüğünde, vücut onarabilir ama ne yazık ki kanserleşen hücrelerdeki hasarlı DNA onarılamaz.

Yine de kanser patogenezinde rol oynayan birçok genin mutasyona uğradığı bilinmektedir. Bu gen mutasyonları anormal hücre çoğalmasına yol açmaktadır. Kanser tedavisinde, kanser hücrelerinin büyüme ve çoğalmasını yavaşlatmak, kanserin başka organ ve dokulara yayılmasını önleyerek, kanserin kontrol altında tutulması en önemli kriter olarak kabul edilmektedir. Teknolojik gelişmelerin yardımı ile erken tanı ve uygun tedavi için yararlı olabilecek bilgiler edinilmiş olmasına rağmen, kanser tedavisinde kullanılan ilaçların kanserli hastalar üzerindeki etkilerinin yanı sıra, yan etkileri de söz konusudur (Hassanpour ve ark 2017).

Kanser ilaçlarının getirdiği yan etkilerle birlikte, ilaca karşı direnç, kanser tedavilerinde büyük sorun teşkil etmekte ve bazı kemoterapi tedavilerinin başarısız olmasına sebep olarak gösterilmektedir (Nurgali ve ark 2018).

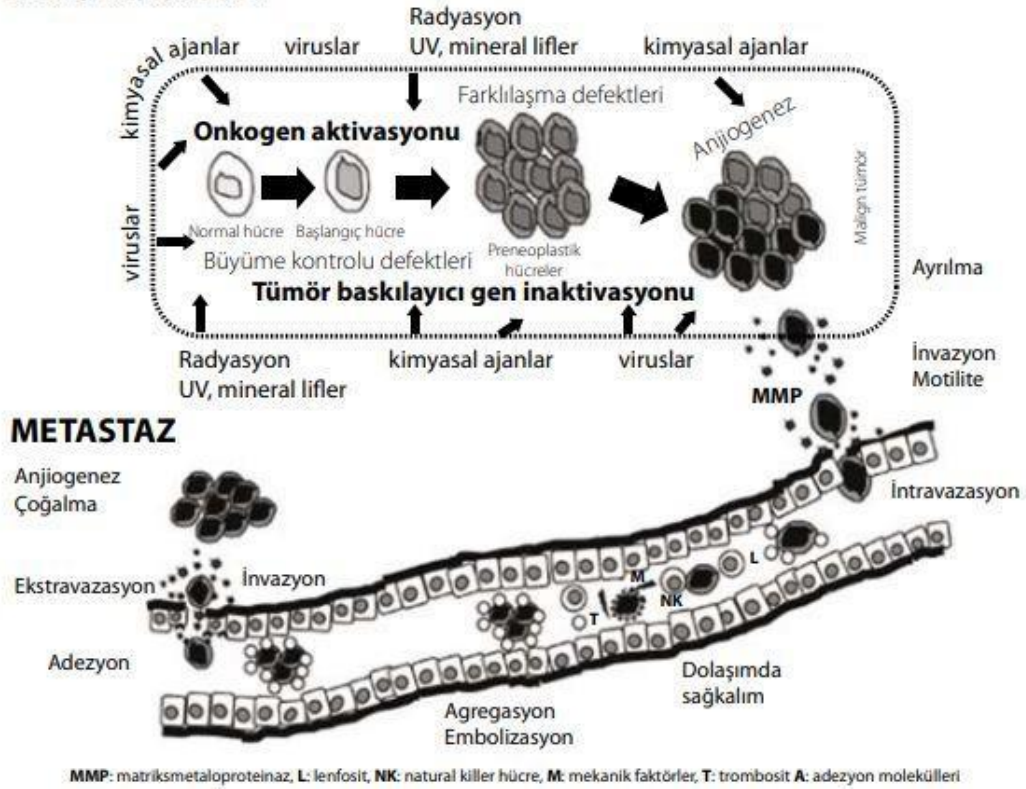
Bazı kemoterapi uygulamalarının amacı, kanserin yol açtığı etkileri gidermek, hastanın yaşam kalitesini arttırmak, ağrı ve benzeri belirtileri ortadan kaldırmak ya da hafifletmektir.

2.1.1. Kanser oluşum mekanizmaları

Kanser terimi, hücre döngüsünün denetimsiz olduğu, pro-apoptotik aktivitenin bozulduğu hücrelerin kontrolsüz çoğalmasıyla tanımlanan, hastalıklar için kullanılmaktadır (Todd, Wong 1999). Artan hücre proliferasyonu, kanser oluşumu sürecini tetikleyebilmektedir. DNA hasarının büyük çoğunluğu, hücresel enzimatik sistemler tarafından hücre bölünmesinden önce onarılmaktadır. Hücreler ne kadar hızlı bölünürse, genotoksik hasarın hücre bölünmesinden önce onarılamama olasılığı o kadar artmaktadır. Hücre bölünmesi gerçekleştiğinde, genomik değişim sabittir ve kalıtsaldır. Eğer böyle bir genomik değişiklik hücreye ve onun nesline seçici bir büyüme avantajı verirse, klonal genişleme ve ilerleyici neoplazi gelişmeye başlayacaktır (Haschek ve ark 2013).

Serbest radikaller, kanser oluşumunun en büyük nedenlerindendir. Organizmada oluşan en önemli serbest radikaller reaktif oksijen türleri (ROS)'dur ve kanser oluşumunun bir çok evresinde rol almaktadır (Williams 1992, Yokus ve ark 2008). Serbest radikaller en dış orbitallerinde eşleşmemiş elektrona sahiplerdir. Eşleşmemiş olan elektronlar yüksek enerjili olduklarından ROS'u oldukça reaktif hale getirebilmektedirler. Organizmadaki antioksidanlar ise, ROS'u ve bundan kaynaklanan hasarı önleyerek gerekli dengeyi sağlamaya çalışırlar. Bu denge bozulduğu zaman ROS ile hücre hasarı meydana gelmektedir (Yokuş ve Çakır 2012).

KARSİNOGENEZ



Şekil 2. 1: Kanser oluşumu

(İçli ve Akbulut 2005 den)

Yaşam süresince hücrelerimiz sürekli yenilenmektedir. Genlerin kontrolü altında ölen hücreler vücuttan atılırken yenileri oluşmaktadır (Kumar 1992). Bazen anormal bir şekilde kromozomlarda veya DNA da meydana gelen bir değişiklik sonucu hücreler kontrolsüz bir şekilde bölünmeye başlar. Normal olmayan bu hücreler komşu dokulara ve uzak organlara yayılabilmektedirler. Bu durumda kanser meydana gelmektedir. Kanser oluştuğunu söyleyebilmek için invazyon ve metastazın olması önemlidir (Lenhard ve ark 2001). Hücrelerde oluşan mutajenik etkilerin çok önemli bir kısmı hücre siklusu sırasında meydana gelmektedir. Hücre siklusu, S evresi (DNA sentezi), M evresi (Mitoz bölünme) ve bu ikisi arasındaki G1-G2 (duraklama evresi) olan bu dört evreden meydana gelir. Hücreler genellikle G0 evresinde bulunmakta olup istirahat evresindedirler, ancak bir uyarı geldiğinde bölünme evresine geçmektedirler. Hücre siklusunun kontrol noktalarında oluşan değişimler kanser oluşumuna neden

olabilmektedirler. DNA onarımı ve apoptozis tümör baskılanmasında kritik olaylardır. Siklin ve siklin bağımlı kinazlar, tümör baskılayıcı genler üzerinde büyüme ve çoğalmada hücre ölümünde önemli etkilere sahiptirler (Lawrence 2008).

2.2. MEME KANSERİ

Meme kanseri, kadınlar arasında en sık görülen malign tümördür ve bir çok ülkede kanser ölümlerinin de başlıca nedenidir. Kadınlarda meme kanseri riski, yaşam boyunca yaklaşık %7-10 civarındadır. Yani yaklaşık her 10-14 kadından biri yaşamı boyunca meme kanserine yakalanabilmektedir. Tüm meme kanserlerine baktığımızda ise, erkeklerde görülen meme kanseri oranı %1 civarındadır (Fisher 1994).

Meme kanseri, meme bezlerinde belirgin malignitelerin ortaya çıkmasıdır. Meme kanserine yol açan nedenler tam olarak bilinmemekle birlikte kadın cinsiyet, yaş, ırk, aile hikayesi, hiç doğum yapmamak, ilk doğum yaşının 35'in üzerinde olması, kişinin önceden meme kanseri hikayesi olması, menstruasyon süresi gibi nedenler meme kanserine yatkınlığı arttırmaktadır. Ayrıca atipik duktal/lobuler hiperplazi, lobuler karsinoma in situ veya non invaziv meme lezyonu hikayesi ve genetik nedenler (BRCA1 ve BRCA2 genleri, Li-Fraumeni sendromu v.b) meme kanserine yatkınlığı arttırmaktadır (Henderson 1993). Bunlar gibi birçok faktör meme kanseri riski ile ilişkili olduğu halde, aile hikayesi ve memede atipik hücre çoğalması dışında, tek bir dominant faktör yoktur. Hastaların önemli bir grubunda yukarıda sayılan risk faktörlerinden hiç birinin saptanamadığı da bildirilmektedir (Heywang-Köbrunner ve ark. 2001).

Meme kanseri, kadınlarda en sık teşhis edilen kanserdir. Meme ve yumurtalık kanserine duyarlılık sağlayan iki ana gen BRCA1 geni ve BRCA2 genidir. Bu genlerdeki mutasyonlar hem kalıtsal meme kanseri hem de kalıtsal yumurtalık kanseri ile ilişkilidir. Meme ve yumurtalık kanserlerinin bir özelliği, kanserin genellikle daha genç bir yaşta ortaya çıkmasıdır. Genetik tarama testleri, kansere yakalanma eğilimi gösteren ailelerin bilgilendirilmesini ve kanser insidansının ve morbiditesinin azaltılabilmesini hedeflemektedir (Juvet and Norderhaug 2008).

Son on yılda moleküler biyoloji, sistem biyolojisi ve genom alanındaki önemli gelişmeler ile birlikte meme kanseri hakkındaki bilgiler hücresel, moleküler ve genomik

anlamda aydınlatılmaya devam etmektedir. Araştırmalar ışığında elde edilen bilgilerle, kanser gelişimi ile ilgili mekanizmalar anlaşıldıkça daha umut verici tedaviler düzenlenebileceği düşünülmektedir. Risk faktörlerinin daha iyi bilinmesi, spesifik meme kanseri sınıflandırmaları ve alt tiplerinin iyi yapılması, meme kanserinde meme kök hücrelerinin olası rollerinin araştırılmasıyla mümkündür. Meme kanserinin temel biyolojik yönleri ve metastazının altında yatan mekanizmaların kapsamlı bir şekilde araştırılması gereklidir (Feng ve Spezia 2018).

Meme kanserlerinin bazılarında hormon reseptörü (HR) pozitif ve hormon tedavilerine cevap alınabilmektedir. Endokrin tedavi, semptomatik visseral hastalığı bulunmayan ileri evre östrojen reseptör (ER) pozitif, insan epidermal büyüme faktör reseptörü 2 (HER2) negatif meme kanseri olan hastalar için tercih edilebilir. Terapötik seçenekler, klinik sunuma göre değişir ve tamoksifen, aromataz inhibitörleri veya fulvestrant gibi tek ajan tedavileri ve kombinasyon terapileri seçeneklerini içerir (Flaum and Gradishar 2018).

Fakat bütün bu seçeneklere rağmen kullanılan ilaçların ciddi yan etkileri olması ve bir süre sonra meme kanser hücreleri tarafından direnç geliştirilerek etkisiz kalmaları, kullanımı sınırlamakta ve tam kür sağlanamamaktadır. Bu nedenle yeni ilaç arayışları gündemdedir ve özellikle seçici etkiye sahip, kullanılan dozlarda normal hücrelere zarar vermeyen ilaçların geliştirilmesi son derece önemlidir.

2.2.1. Üçlü Negatif Meme Kanseri (ÜNMK)

Meme kanseri vakalarının yaklaşık %15'i östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve insan epidermal büyüme faktör reseptörü 2 (HER2) ekspresyonu tespit edilmeyen üçlü (er-/pr-/her2-) negatif meme kanseri (ÜNMK) grubuna aittir. ER, PR, HER2 protein ekspresyonu olmayan meme kanserleri üçlü negatif meme kanserleri grubuna girmektedir. Bu hasta grubunun olumsuz prognozunun yanı sıra, etkili hedefe yönelik tedavinin eksikliği ÜNMK'yi yoğun araştırma konusu yapmaktadır. ÜNMK 'nin daha çok genç hastaları etkilediği bilinmekle beraber, düşük sosyoekonomik durum, hormonal faktörler ve obezite ile daha sıkı ilişkili olabileceği görülmektedir (Rubovszky ve ark 2010).

Genetik olarak ÜNMK 'li hastaların büyük kısmı, özellikle BRCA1'de bir meme kanseri geni mutasyonu barındırır (Gonzalez-Angulo ve ark 2011). Patolojik olarak, ÜNMK genellikle yüksek derecelidir ve nekroz gösteren yaygın olarak sızan duktal karsinomdur (Livasy ve ark 2006). ÜNMK hastaları, doğal olarak agresif bir klinik davranış ve hedef etkili tedavilerin eksikliği nedeniyle diğer meme kanseri alt tipleri ile karşılaştırıldığında genellikle daha kötü prognoza sahiptir (Malorni ve ark 2012, Bianchini ve ark 2016). ÜNMK 'nin doğru teşhisi, hormonal tedaviden ve HER2 hedefli ilaçlardan faydalanacak hastalarda hayati önem taşımaktadır, ER ve / veya HER2 negatifliği hastalığın yanlış teşhisini önlemek için çok önemlidir (Feng ve ark 2018, Bianchini ve ark 2016).

ÜNMK için tercih edilen tedavi sistemik kemoterapidir. Önemli birkaç çalışmada, ÜNMK hastalarının yaklaşık %10'unun iyi bir prognoza sahip olmasına rağmen, tek başına üçlü negatifliğin, bağımsız prognostik faktör olduğuna dair kanıt bulunmaktadır. Son dönemlerde, hedefe yönelik kemoterapötik ajanlar üzerinde yapılan çalışmalar son derece önemli duruma gelmiştir (Rubovszky ve ark 2010).

2.3. FLOROURASİL

Flourouracil (5-FU) meme, kolorektal kanser, sindirim ve solunum sisteminden kaynaklanan malignitelerin tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir antikanser ilaçtır (Aronson 2011). 5-FU çeşitli yollarla etki göstermekle birlikte esas olarak bir timidilat sentaz inhibitörü olan bir pirimidindir. DNA replikasyonu için gerekli bir nükleotid olan timidin sentezini bloke eder ve 5-FU'nun asit seramidaz inhibitörü olduğu bilinmektedir (Longley ve ark. 2003, Dimentiev ve ark 2018). 5-FU, herhangi bir aşamadaki meme kanserini tedavi etmek için diğer kemoterapi ilaçlarıyla kombinasyon halinde kullanılabilir. Doksorubisin+paklitaksel ikilisine 5-FU eklenmesinin meme kanseri hücre kültürlerinde kaspaz bağımlı apoptozisi arttırdığı bulunmuştur (Zoli ve ark. 2005). Ayrıca meme kanserinin agresif formu olan inflamatuvar meme kanserinin tedavisinde de kullanılır (Cristofanilli ve ark. 2003). Nair ve arkadaşları, meme kanseri hücre serisi olan MCF-7 hücrelerinde 5-FU bağlanmış poli D, L-laktik-ko-glikolik asit (PLGA) nanopartiküllerinin antitümör etkinliğini değerlendirmişlerdir. İn vitro ilaç salım çalışmaları, 5-FU'nun nanopartiküllerden uzun süreli ve sürekli salınımını göstermiştir.

PLGA kombinasyonlu nanoparçacıkların, tümör hücrelerine karşı doz ve zamana bağlı bir şekilde serbest ilaçtan daha iyi sitotoksikite gösterdikleri bildirilmiştir (Nair ve ark 2011).

2.4. KARMOFUR

Antineoplastik bir ilaç olan karmofur, güçlü bir asit seramidaz inhibitörüdür ve bu özellik, anti-proliferatif etkileri için esastır. Karmofur, fluorourasil'in bir pirimidin benzeri ve türevi olduğundan tıpkı onun gibi antikanser kemoterapötik ve anti-metastatik aktiviteler sergilemektedir. Karmofurun kimyasal yapısındaki değişiklikler ile kanser hücre çoğalmasını önlemek için standart antitümöral ilaçlarla sinerjik olarak hareket eden yeni asit seramidaz inhibitörleri sentez edilebilir (Realini ve ark 2013).

Karmofurun antikanser özellikleri, bu ajanın, timidilat sentetazı bloke ederek bir pirimidin analogu olan 5-FU oluşturma kabiliyetine bağlanmıştır. Bununla birlikte, karmofur kaynaklı timidilat sentetaz aktivitesi inhibisyonu ve hücre proliferasyonu arasındaki pozitif korelasyonun olmaması, daha karmaşık bir etki mekanizması olduğunu düşündürmektedir. 5-FU'e direnç geliştirmiş olan insan kanser hücreleri için karmofurun toksik olduğu bildirilmektedir. Klinikte kolorektal kanserleri tedavi etmek için şu anda kullanılan antineoplastik bir ilaç olan karmofur, hücre içi asit seramidazın çok güçlü ilk inhibitörü olarak tanımlanmaktadır (Realini ve ark. 2013).

İyi çalışılmış bir ASAH1 inhibitörü olan karmofurun servikal kanserlere karşı antiproliferasyon ve antimetastatik özellikleri olduğu ve Wnt / katenin sinyal yolağında rol oynadığı bildirilmektedir (Liu ark 2017, Realini ve ark 2013).

2.5. ROSİN

Rosin berrak ya da yarı saydam bir katıdır. Çam ağacının reçinelerinde doğal olarak meydana gelir. Ağacın taze sıvı reçinesinin ısıtılmasıyla elde edilir. Çam oleoresin, ağaçlarından salgılanan yağların ve uçucu olmayanların bir karışımı olan

rosin doğal bir bileşiktir. Uçucu reçine bileşenleri damıtılır ve rosin elde edilir (Zinkel ve ark 1989).

Rosin esteri gibi doğal polimerler birçok avantajları nedeniyle daha caziptir, çünkü bunlar biyolojik olarak çözünebilir, ucuz ve hazır bulunur. Ayrıca, doğal polimerlerin en önemli yararı, kimyasal modifikasyonlar yapabilmeleridir. Rosin esteri bir biyopolimer olarak, reçine ve türevleri, mikrokapsülleme maddeleri, film oluşturma maddesi ve farmasötik tabletlerin formülasyonunda bağlayıcı madde olarak kullanılabilir (Kumar ve Gupta 2013).

Son yıllarda, çok sayıda doğal zamlar farmasötik olarak ilaç tasarımında ve geliştirilmesinde polimer olarak araştırılmaktadır. Sürekli ve kontrollü ilaç dağıtım sistemleri hazırlamak için, doğal polimerler bir araştırma konusu olmaya devam etmektedir.

Rosinin nanoilaç tasarlanmasında kullanımını sağlayan en önemli özellik, oda sıcaklığında rosinin fragil bir malzeme olarak bulunması, ısıtıldığında erimesidir. İlaç taşıma sistemlerinde, genel olarak rosinin mükemmel film oluşturma özelliği ön plana çıkmaktadır (Kumar ve Gupta, 2013, Singh ve ark 2011).

2.6. POLİETİLEN GLİKOL (PEG)

Nanopartiküllerin yüzeyinin polietilen glikol (PEG) ile kaplanması, hedef hücreler ve dokularda ilaç etkinliğini artırmak için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Nanopartiküller üzerindeki PEG kaplamalar, yüzeyi agregasyondan, opsonizasyondan ve fagositozdan korur, sistemik dolaşım süresini uzatır (Suk ve ark 2016).

PEG kaplı ilaç nanotaşıyıcıya yüklenerek, sistemik dolaşım süresi artırılabilir ve sitotoksik aktiviteyi önemli ölçüde etkilemeden proteinlerin immünojenliği azaltılabilir (V. Weissig 2014).

PEG in, ilaç kullanım alanında uzun bir güvenlik geçmişi bulunmaktadır. Ayrıca FDA tarafından genel olarak güvenli görülen bir sınıflamaya dahil olduğu için en yaygın kullanılan polimerdir. İlaç taşıyıcı sistemin PEG ile kaplanması ilk defa Davis ve

Abuchowski tarafından 1977'de tanımlanmıştır. Araştırmacılar PEG'in sığır serum albümini ve karaciğer katalaz proteinlerine kovalent bağlanmasını başarmışlardır (Abuchowski, 1977).

2.7. NANO İLAÇLAR

Nanopartiküller nanometre boyutunda (1-1000 nm), özelleştirilmiş yüzeyi, geliştirilmiş çözünürlüğü ve çok işlevliliği ile yeni biyomedikal uygulamalarda kullanılmaktadır. Nanopartiküller, üretilen bileşiklerden belirgin şekilde farklı ya da daha etkili özellikler gösterebilmektedir. Nanoparçacıklar ile bileşiklere kazandırılan yeni özellikler sayesinde hücreler üzerinde etkili olma yeteneği artabilmektedir. Hızla büyüyen bu çalışma alanı disiplinler arası araştırma gerektirmekte ve kanser gibi ölümcül hastalıkları teşhis ve tedavi edebilen çok işlevli nano cihazların tasarlanması ve geliştirilmesi için fırsatlar sunabilmektedir (Singh ve Lillard 2009).

2.7.1. Nano ilaçların tarihçesi

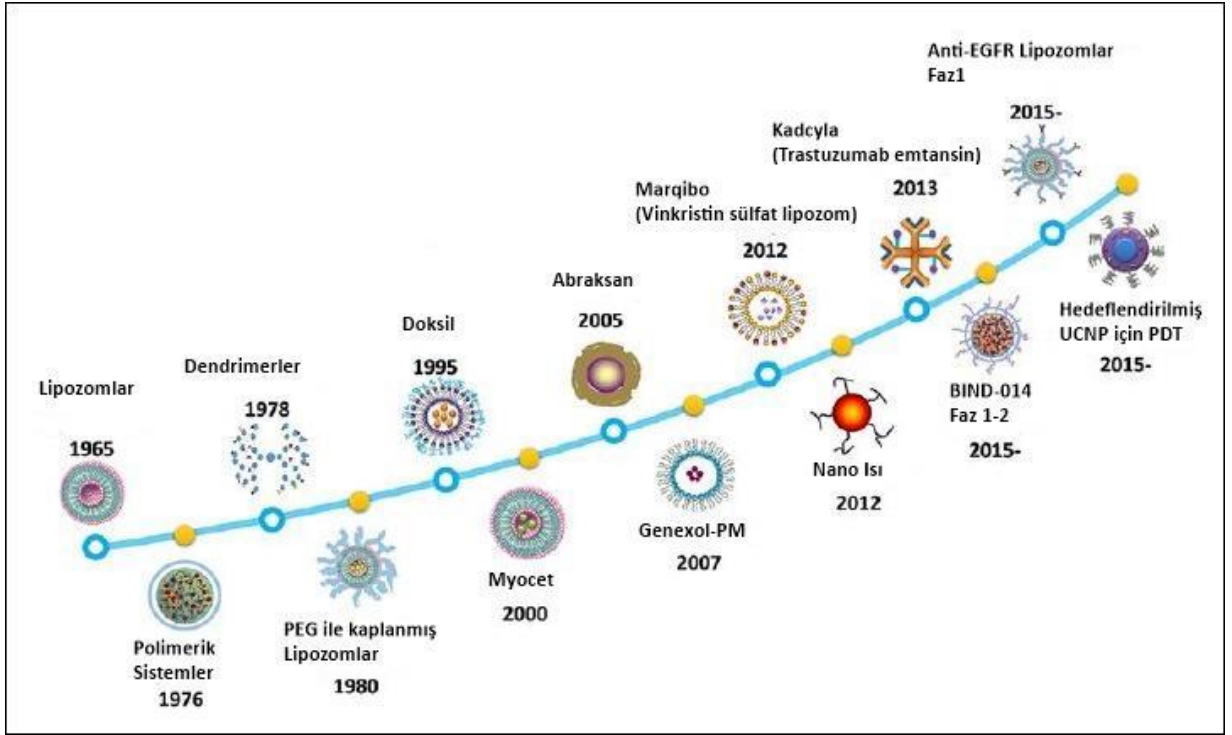
Yeni tedavi arayışları ile beraber, ilaç yapımında nanoteknolojinin kullanılmaya başlanması 1960'lı yıllara dayanmaktadır. İlk zamanlar yağ kesecikleri ilaç taşımak için kullanılmıştır. Daha sonra ilaçlar lipozom adı verilen keseciklere yerleştirilmiş ve dışarıdaki sıvı ortamdan etkilenmesi önlenmiştir. İçindeki etken maddeyi kontrollü, yani yavaş bir şekilde dışarı veren ilaçlar da 1970 li yıllarda çalışılmıştır. Sonra, polimer kaplı nano parçacıklar, nano algılayıcılar geliştirilmiştir. Bu nano parçacıklar vücuttaki moleküler değişiklikleri algılayarak, hastalıkların teşhisinde, bazı ölçümlerin yapılmasında kullanılmasının yanı sıra, ilacı vücutta istenilen bölgeye taşımak için de kullanılmaktadır.

Polimer kaplı nano parçacıklar ilacın kontrollü bir şekilde salınmasını mümkün kılmaktadır. Ortamın sıcaklığı, asit-baz dengesi veya şeker gibi belirli bir molekülün varlığı, ilacın nano parçacıktan salınımına yol açabilir. Kontrollü salım sayesinde ilacı uzun sürede, düşük dozda vermek mümkün olabilmektedir.

Diğer bir ilaç taşıyıcı nanosistem de lipozom denilen yağ kesecikleridir. 1995 yılında bir AIDS hastasında doksorubisin adlı ilaç kanser tedavisinde lipozom içine yerleştirilerek kullanılmıştır. Ayrıca; daunorubisin, ağrı tedavisinde kullanılan morfin, ciddi mantar enfeksiyonlarında kullanılan amfoterisin lipozomların içine yerleştirilerek vücuda verilmiştir (Farokhzad ve Langer 2006, Ferrari 2005, Lensen ve ark 2008).

2.7.2. Kanser Tedavisinde Nanoilaçların Geliştirilmesi

Çeşitli biyolojik özelliklere sahip olacak şekilde uyarlanabilen ve çeşitli ortamlarda kullanılabilen nanopartiküller, kemoterapide daha güvenli ve etkili bir yol sunabilmektedir (Lavan ve ark 2003, Shi ve ark 2011, Langer 1990). Son on yılda, kanser tedavisinde ilaç taşıyıcılar olarak nano malzemeler konusunda yaklaşık 12.000 çalışma bildirilmesine rağmen, teknolojik gelişmeler ve klinik uygulamalar arasında bir boşluk olduğu dikkat çekmektedir, yani bunların büyük çoğunluğu klinik kullanıma sokulamamıştır. Son 50 yılda birçok nano ilaç geliştirilmiştir (Şekil 2.2). 1965 yılında Bangham ve ark. lipozomları keşfetmiştir (Bangham ve ark 1965). Doksorubisinin (Doxil) bir lipozomal formülasyonu, 1995'te ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından AIDS'le ilişkili Kaposi sarkomunun tedavisi için onaylanmıştır (James ve ark 1994). 2005'te albumin bazlı bir nanopartikül, protein bağlı paklitaksel (Abraxane) meme kanseri, küçük hücreli dışı akciğer kanseri ve pankreas kanseri tedavisinde klinik kullanım için FDA tarafından onaylanmıştır (Green ve ark 2006). Daha yakın zamanda, 2013 yılında, insan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2'ye hedeflenen, adotrastuzumab emtansinin bu reseptör tarafından pozitif olan meme kanseri hastalarda kullanımı onaylanmıştır (Kamaly ve ark 2012, Li ve ark 2017).

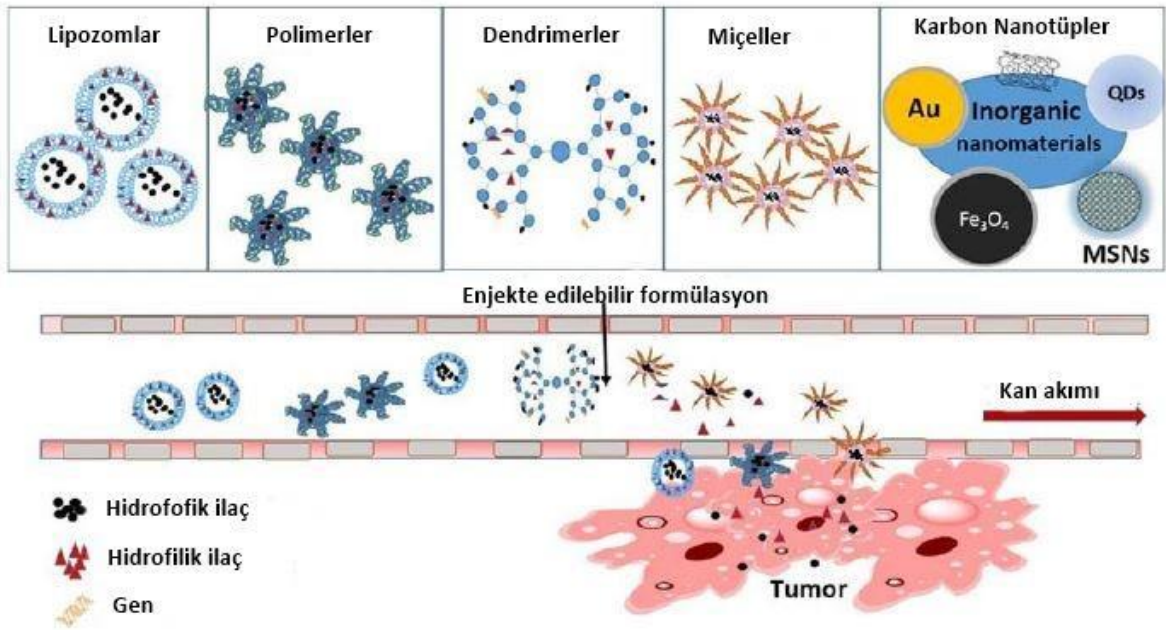


Şekil 2. 2: Nanoilaçların Gelişiminin Zaman Çizelgesi

(Li ve ark 2017 den).

2.7.3. Nano ilaç taşıyıcı sistemler

Son dönemlerde kansere karşı kemoterapinin daha etkili ve faydalı olması yönünde çalışmalar devam ederken, nanotıp bu konuda oldukça cazip bir alan olarak karşımıza çıkmaktadır ve bununla ilgili çalışmalar her geçen gün artmaktadır.



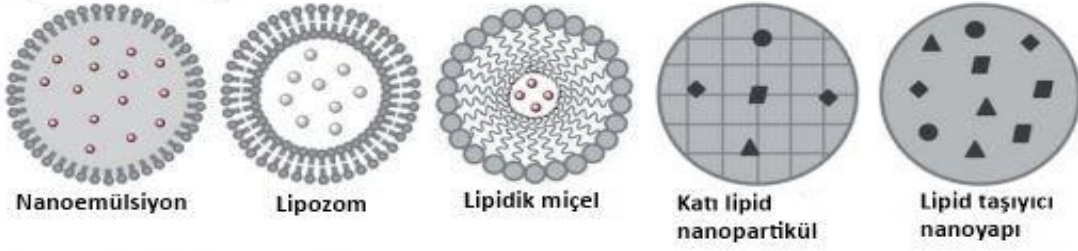
Şekil 2. 3: Nanoilaç Taşıyıcı Sistem Çeşitleri

(Li ve ark 2017'den).

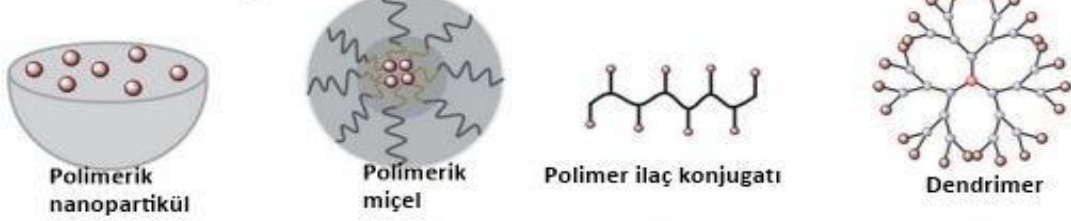
Kanser tedavisi için ilaç taşıyıcı olarak kullanılan nanomalzemeler. Farklı biyolojik özellikleri ile nanomalzemeler, geçirgenliği ve tutma etkisini artırır, biyoyararlanımı artırır, kemoterapi ilaçlarının toksisitesini azaltabilir, hidrofobik veya hidrofilik kemoterapi ilaçlarını kan dolaşımına salıverebilir ve kanser hücrelerine karşı sitotoksik etkiler sağlayabilir. Karbon nanotüpler; QD'ler, kuantum noktaları; MSN'ler, metal nanoparçacıklar (Li ve ark 2017).

Kemoterapi esnasında, sağlıklı dokuyu korumanın yanında tümör hedeflemesine dayanarak, ilaç taşıyıcı sistemler aracılığı ile hastalara önemli faydalar sağlanması beklenmektedir. Bunlarla birlikte, azalmış sistemik toksisiteye rağmen, klinik kullanım için onaylanmış çoğu nano-ilaç, önceden tahmin edilenden daha az etkili olmuştur. Deney sonuçları ile klinik sonuçlar arasındaki boşluk, güçlü klinik öncesi modelleri kullanarak kapsamlı ilaç taraması yapmanın gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Lipid Bazlı Nanopartiküller



Polimer Bazlı Nanopartiküller



İnorganik Nanopartiküller



Şekil 2. 4: İlaç hedeflemede kullanılan çeşitli nanotaşıyıcılar:

(Akhter ve ark 2018 den).

2.7.3.1. Polimerik Nanopartiküller

Polimerik nanopartiküller, doğal veya sentetik polimerlerle hazırlanmakta, boyutları 10-1000 nm arasında olabilmektedir. Etkin madde nanopartikül içinde çözündürülür, içinde hapsedilebilir ya da yüzeye adsorbe edilebilir. Nanokapsül veya nanoküre şeklinde olabilirler. Nanopartiküller veziküler sistemlerdir, ilaç bir boşluğa doldurulur ve bir polimer membran ile kaplanır. Polilaktik asit (PLA), Poliglikolik asit (PGA) ve Poli (d,l-laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) gibi biyoyumumlu aynı zamanda biyobozunur polimerlerden üretilen nanotaşıyıcı sistemler en yaygın kullanılan sistemlerdir (Derman ve ark 2013, Rao ve ark 2011, Cohen-Sela ve ark 2009).

PLGA, biyobozunabilirlik ve biyouyumluluk gibi önemli özellikleri nedeniyle polimerik nanopartiküllerin üretilmesi için en çok kullanılan polimerlerden biridir.

2.7.3.2. Katı lipid nanopartiküller

Katı lipid nanopartiküller (KLN) alternatif bir kolloidal taşıyıcı sistem olarak artan bir öneme sahiptir. Bu ilaç taşıma sistemi, ucuz ve kolay uygulanabilir olup, sulu ortamda yüksek yayılım göstermektedir. Özellikle hidrofobik ilaçlar için salım süresini uzatması açısından avantajlara sahiptir. Patel ve ark. tarafından sıcaklık modülasyonlu katılaşma yöntemiyle, 5-FU yüklü KLN'lerin antikanser aktivitesi Caco-2 hücre serileri ile araştırılmış ve hücre canlılığında konsantrasyona bağlı bir azalma bildirilmiştir. Bu çalışmadan, 5-FU yüklü bir KLN uygulama sisteminin saf 5-FU 'den daha üstün bir anti-kanser aktivite gösterebileceği sonucuna varılmıştır (Patel ve ark 2014).

2.7.3.3. Kitosan bazlı nanopartiküller

Kitosan nanopartiküller, biyouyumluluk, hidrofiliklik, biyolojik olarak bozunabilirlik, toksik olmama, yüksek biyoyararlanım, modifikasyon kolaylığı, sulu çözünürlük gibi potansiyel özelliklere sahiplerdir. Kitosan, kitinin deasetilasyonu ile elde edilen doğrusal bir polisakkarittir (Calixto ve ark 2019). Kitosan yüklü 5-FU nanopartikülleri kullanarak kolorektal kanserde sağlıklı hücrelerin korunduğu bildirilmiştir (Tummala ve ark 2015).

2.7.3.4. Folik asit ve PLGA konjugatları

Folik asit, birçok çalışmada özellikle ileri evrede metastatik kanserlerin tedavisi için bir hedefleyici ajan olarak kullanılmaktadır. Folik asit kullanımı nanopartiküllerin sitotoksitesine ve hedeflemeye önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır (Quin ve ark 2013). Folik asit taşıyan ilaç taşıma sistemi ile yapılan bir çalışmada saf 5-FU ile folik asit yüklenmiş taşıyıcı sistem karşılaştırılmış ve folik asit yüklü taşıyıcının oldukça anlamlı bir şekilde daha etkili olduğu bildirilmiştir (Wang ve ark 2015).

2.7.3.5. Silika nanopartiküller

Kolon kanserlerinde 5-FU yüklü silika nanopartiküller 5-FU'nun kemoterapötik etkinliğini geliştirmek için hiyalüronik asit ile konjuge edilmiş ve kolon kanseri hücrelerini hedeflemek üzere hazırlanmıştır. Genel olarak, hiyalüronik asitin, silika nanopartiküllere konjugasyonunun CD44 aracılı endositoz yoluyla hücrelerde 5-FU birikimine yol açabileceği ve önemli anti-kanser etkinin oluşabileceği gösterilmiştir (Chandran ve ark 2017).

Tablo 2. 1: FDA tarafından onaylanmış klinik çalışmalarda veya piyasada kanser tedavisinde kullanılan nanoilaçlar

İlaç tipi	İlaç	Ürün adı/Firma	Endikasyon	FAZ
	Doksorubisin	Myocet™/ Teva UK	Metastatik meme kanseri	Onaylandı
		Doxil™/ Janssen	Kaposi sarkomu Over kanseri Multiple myeloma	Onaylandı
		ThermoDox™/ Celsion	Primer hepatoselüler	Faz III

Lipozomlar	Vinkristin		karsinom	
		Marqibo™/ Spectrum Pharmaceuticals	Akut lenfoblastik lösemi	Onaylandı
	Daunorubisin	DaunoXome™/ Galen	HIV ilişkili Kaposi sarkomu	Onaylandı
	Sitarabin	Depocyt™/ Pacira Pharmaceuticals	Lenfomatöz menenjit	Onaylandı
	Irinotekan	Onivyde™/ Merrimack Pharmaceuticals	Metastatik pankreatik kanser Over kanseri	Onaylandı
	Asparaginaz	Oncaspar™ (PEG)/ Baxalta	Akut lenfoblastik lösemi	Onaylandı
Polimerik konjugatlar	Paklitaksel	Opaxio™ (Polyglycerol adipate)/ CTI Biopharma	Over kanseri	Faz III Devam ediyor.
Polimerik miçeller	Paklitaksel	Genexol-PM™/ Samyang Biopharmaceuticals	Meme kanseri Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri Over kanseri	Onaylandı
	DACH-platin	NC-6004 Nanoplatin™/ NanoCarrier™	Pankreatik kanser Baş ve çene kanseri Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri Mesane kanseri	Faz III
Diğerleri	Irinotekan	Alchemia	Akciğer kanseri	Faz III
	Paklitaksel	Abraxane™/ Celgene	İleri meme kanseri İleri küçük hücreli olmayan akciğer kanseri İleri pankreas kanseri	Onaylandı

(Hare ve ark 2017'den).

2.7.4. Tanı ve Tedavide Nano İlaçlar:

Hedefe yönelik ilaç taşıma sistemlerinde ilerlemeler sayesinde, çok yönlü moleküler görüntüleme yöntemlerinde, uyarana duyarlı bileşenler ve kanser terapisinde potansiyel teranostik ajanların gelişimi gibi olaylarda önemli gelişmeler ortaya çıkmıştır. İlk zamanlarda, PEG ile konjugasyon gibi nanoparçacık modifikasyonları, nanopartiküllerin kan dolaşımındaki süresini arttırmak ve böbrek klirens oranlarını azaltmak için kullanılmıştır. Hedefe yönelik ilaç uygulama sistemlerinin geliştirilmesi ile anti-kanser ilaçların ve kanser gen terapilerinin terapötik etkinliğinin, hedefe yönelik olmayan uygulamalara kıyasla önemli ölçüde etkili ve faydalı olduğu gösterilmektedir. Yine de, tüm bunların yanı sıra, çok işlevli nanopartiküller sayısız avantaj sunsa da, karmaşık doğası tekrarlanabilirlik ve toksisite endişeleri ile ilgili zorluklar ortaya çıkmaktadır (Babu ve ark 2014).

Nanoteknoloji kemoterapi kliniklerinde yaygın olarak uygulanmaktadır. Bununla birlikte, kansere karşı kemoterapinin terapötik potansiyeli, nonspesifik ilaç dağılımı, çoklu ilaç direnci (multidrug resistance, MDR) ve kanserin heterojenliğinden dolayı ciddi ölçüde tatmin edici değildir. Bu nedenle, nanoteknolojinin aracılık ettiği kemoterapiye dayalı kombinasyon tedavisine eğilim olmaktadır. Tümör için doğru ön tanı ve gerçek zamanlı takip açısından, tedavi süreciyle tanıyı birleştiren nano-terapötik araştırmalar, kanser tedavisinde umut verici bir alan olmaktadır (Zhao ve ark 2018).

Tümör hücreleri, normal hücrelerde bulunmayan yüzey işaretleyicilerini aşırı ifade etmektedirler. Bu durum da kanser hücrelerinin ligand-yönelimli hedeflenmesi için hedef dışı hücrelerden ayrılması konusunda yardımcı olur. Ancak tümör heterojenliği, belirli bir hedef işaretleyici için net modelin oluşturulmasını engellemektedir. Sonuç olarak, tedavi sırasında kanser hücrelerinin bir alt grubu hedeflenmemiş olarak kalmaktadır, bu da daha sonra ilaç direnci ve kanser nüksetmesini arttırmaktadır. Kanser tedavisinde kanser hücrelerini hedefleme için ortaya çıkan sorunlarla birlikte, yeni hedeflerin oluşturulması yönünde etkili hedefe yönelik tedavi için uygun antijenik belirteçlerin arayışı sürmektedir. Ayrıca, daha etkili ligandla yönlendirilmiş kanser hücrelerini izlemek ve hedeflenmesini kolaylaştırmak için, farklı yaklaşımların terapötik ve tanısal potansiyeli, temel mekanizmaları ve özellikle farklı

nanotaşıyıcı sistemler için kurulan metodlarının geliştirilmesi önem arz etmektedir (Seidi ve ark 2018).

Etkili meme kanseri kemoterapilerindeki başlıca zorluklar arasında, tümöre ulaşan yetersiz ilaç konsantrasyonları, hızlı eliminasyonları, sistemik toksisite gibi olumsuz etkiler mevcuttur.

Nanoteknoloji, meme kanseri tedavisinde mevcut kemoterapötik engelleri aşmak ve geleneksel kemoterapi ve çoklu ilaç direnci sorunlarının çözülmesi ile ilgili potansiyele sahiptir. Önceki çalışmaların ışığında, nanopartiküller ile farklı antikanser ilaçların konjugasyonu, daha az yan etki, reçetelenen ilacın düşük dozları ve tümör hücresi tarafından ilaç direncinin üstesinden gelebilmek için meme kanseri tedavisinde oldukça umut verici bir ajan olacaktır. Nanoteknolojinin uygulanması, hastaları aylar süren etkili olmayan ilaçlardan ve zayıflatıcı yan etkilerden kurtarabilir ve bu da tedavinin potansiyel olarak daha etkili bir şekilde uygulanmasına olanak sağlayabilir. Ne yazık ki, meme kanseri hücrelerini seçici olarak hedef alan sadece birkaç klinik olarak onaylanmış nanotaşıyıcı ilaç vardır (Bassiouni ve Faddah 2012).

2.7.5. Hedefe Yönelik Nanoilaçlar:

Günümüzde uygulanan tedavi yöntemleri ile, hasta dokular iyileştirilirken sağlıklı dokularda zararlı etkiler oluşabilmektedir. Hedefe yönelik tedavi yöntemleri sayesinde, hastalarda oluşabilecek zararlı etkilerin azaltılabilmesi ve tedavinin ekisinin artırılabilmesi mümkündür.

Hedefe yönelik tedavide çeşitli yöntemler kullanılabilir.

1. Hastalığa spesifik bir antikor ilaç kullanılabilir,
2. Hastalığa özel olan hedefleme ajanı (antikor gibi), ilaç molekülüne bağlanabilir.
3. İlaç molekülü, nanotaşıyıcının içinde hedefe gönderilebilir. Bu yöntemde kanserli bölgede bulunan aktif damar yapısından dolayı pasif bir şekilde ya da kanserli bölgenin biyobelirteci ile antikor gibi hedefleme ajanı arasındaki özel yapılardan dolayı hedeflendirilmiş nanoilaçlar kullanılabilir (Önyüksel ve ark 2017).

2.8. SERAMİDLER VE SFİNGOLİPİTLER

Bütün hücrelerde hücresel yapıyı korumak, enerji üretmek ve sinyal iletimini sağlayabilmek için lipitlere ihtiyaç vardır.

Sfingolipidler, fosfolipitler ve kolesterol ökaryotik hücre membranının esas bileşenleridir. İlk kez 1884’de adlandırılan sfingolipitler büyük bir lipit grubunu temsil etmektedirler. Sfingolipitler membran akışkanlığı ve yapısının korunmasında rol alırlar, normal doku ve hücre homeostazında önemli yapıtaşdırlar. Seramid, sfingolipit metabolizmasının merkezi olup tüm diğer sfingolipitlerin oluşumu için bir öncüdür. Apoptoz, hücre büyümesi ve farklılaşması, yaşlanma, diyabet, insülin direnci, inflamasyon, nörodejeneratif hastalıklar veya ateroskleroz gibi durumlarda canlı hücresel fonksiyonların düzenlenmesini sağlayan bir sinyal molekülüdür (Futerman ve Hannun 2004).

Seramid, sfingolipid biyosentezinin ve degradasyonunun merkezi olmakla birlikte aynı zamanda sfingolipid sinyalinde anahtar bir moleküldür. Ayrıca apoptozu ve/veya farklılaşmayı teşvik etmektedir (Saied ve Arenz 2016). Seramid, genellikle biyomembranlarda düşük konsantrasyonlarda bulunan nispeten basit sfingolipittir (Şekil 2.5).

Seramid, monosit farklılaşması, apoptoz, sinir sistemi rejenerasyonu ve Ca^{2+} taşınımı dahil olmak üzere çeşitli fonksiyonlar sergileyen bir sfingolipittir. Aynı zamanda birçok sfingolipidin öncüsü olarak görev yapar, hidrofobik etkileşimler yoluyla plazma zarının dış yapraklarına tutturur (Bernardo ve ark. 1995, Ferlinz ve ark. 2001, Strelow ve ark. 2000).

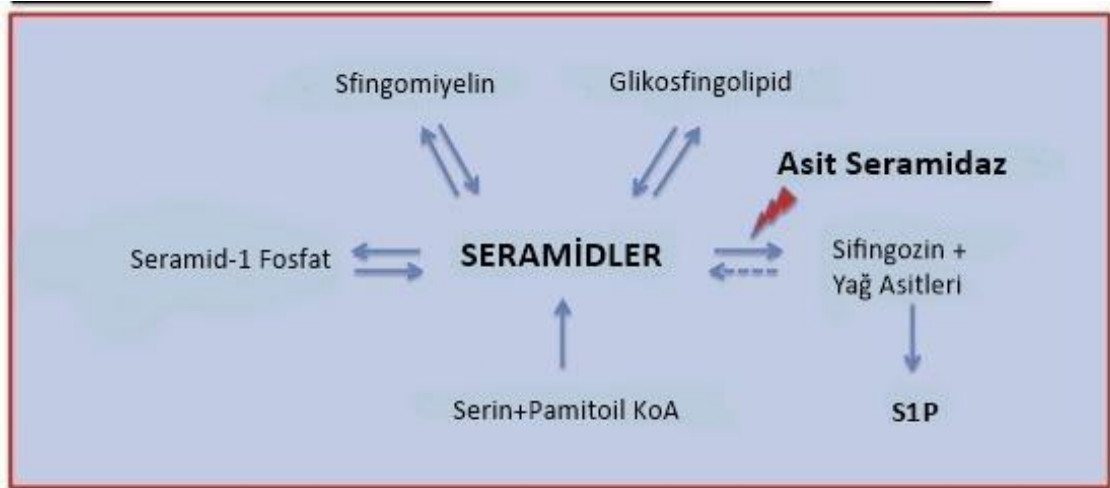
2.9. ASİT SERAMİDAZLAR

Seramidazlarla ilgili çalışmalar son yıllarda artarak devam etmektedir. Seramidazlar, seramidin sfingozin ve yağ asitlerine parçalanmasını katalize etmektedirler.

Asit seramidaz, lizozomal bir enzimdir. 55kDa öncü proteini olarak sentezlenir, bu daha sonra olgun α -alt ünite (13kDa) ve β -alt ünite (40kDa) halinde işlenir. Asit seramidaz

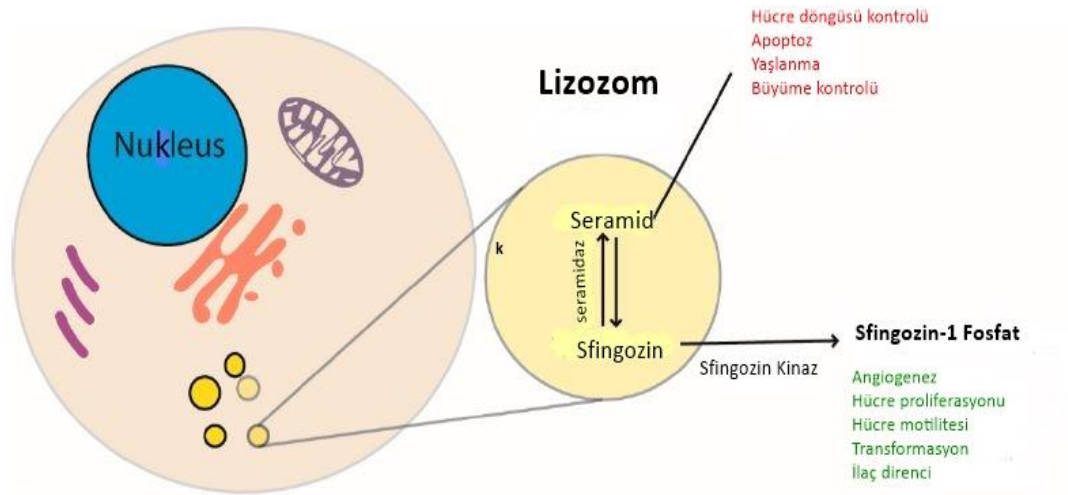
seramidin hidrolizini serbest yağ asidi ve sfingosine katalize eder. Sfingozin ve bunun fosforlanmış formu, sfingozin-1-fosfatın (S1P), fosfokinaz C aktivitesini inhibe ettiği ve hücre çoğalmasında ve farklılaşmasında ikinci bir haberci olarak hareket ettiği gösterilmiştir. Asit seramidaz, Farber hastalığı olarak bilinen bir lizozomal depo bozukluğunun nedenidir. Bu hastalık dokularda seramid birikimi ile karakterizedir, eklemlerde ve ekstremitelerde şişlik ve ağrı, akciğer yetmezliği ve erken yaşta ölüme neden olur. Bu nedenle, seramid hidrolizinde asit seramidaz gereklidir ve farber hastalığının nedenidir (Bernardo ve ark. 1995, Ferlinz ve ark. 2001, Strelow ve ark. 2000).

Asit seramidaz inhibisyonunun, belirli kanser türlerini kemoterapi ve radyoterapiye karşı duyarlılaştırdığı bildirilmektedir. Prostat kanseri ile ilgili yeni çalışmalar, N-Açıl Sfingozin Amido Hidrolaz 1 (ASAH1)'in düzenlenmesinin, sfingolipid metabolizma yolunu değiştirerek radyasyona direnç sağladığını göstermektedir (Mahdy ve ark. 2009, Cheng ve ark. 2013). Bu durum, asit seramidaz inhibitörlerinin, kemoterapötik ilaçlar ile sinerjistik olarak etki edebilen maddeler olduğunu düşündürmektedir. Bu sebeple, seramidaz aktivitelerin doğru bir şekilde ölçülmesi ve yeni inhibitörlerin geliştirilmesi önemlidir. Potansiyel klinik etkilerin yanı sıra, seramidaz inhibisyonu ve tahlilinde son gelişmeler, seramid biyolojisinin mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına yardımcı olabileceğini düşündürmektedir (Saied ve Arenz 2016).



Şekil 2. 5: Seramidler

(Schuchman 2016 dan).



Şekil 2. 6: Seramid ve S1P arasındaki denge

(Lai ve ark 2019'dan).

Seramid ve S1P, zıt hücresel yolları düzenler ve uyarır. Seramid, pro-apoptotik bir etkiye sahiptir ve hücre replikasyonunu bloke eder, S1P hücreleri çoğalmaya teşvik eder. AC seramidleri ve sfingozin seviyelerini dengeler. Sfingozin daha sonra sfingozin kinaz ile S1P'ye dönüştürüldüğünden, AC hücre ömrünün düzenlenmesinde doğrudan bir role sahiptir (Lai ve ark 2019).

2.9.1. N-Açıl Sifingosin Amido Hidrolaz 1 (ASAH1) ve Kanserdeki Rolü

Seramidin sfingozin ve serbest yağ asidine dönüşümünden sonra, sfingozin kinaz 1 (SPHK1) veya 2 (SPHK2) fosforile sfingozin, tümör promotörü, sfingozin-1-fosfat (S1P) oluşturur (Şekil 2.7) (Ogretmen ve Hannun 2004). Başlangıçta sıçan beyin homojenatlarında keşfedilen ve ayrıca 1995 yılında insan idrarından karakterize edilen ve saflaştırılan ASAH1, glikozilasyonun derecesine bağlı olarak 53-55 kDa'lık bir moleküler ağırlığa sahiptir.



Şekil 2. 7: Seramid metabolizmasını ve ASAHI1'i inhibe etmenin etkilerinin açıklanması.

(Nguyen ve ark 2018'den)

Sfingolipid metabolizması bir hücrenin kaderini belirlemede önemlidir. Çeşitli sfingolipid metabolitleri arasında seramid, hücre içi sinyal iletiminde anahtar molekül olarak rol oynar. Seramid genellikle sfingomiyelin, sfingosin, seramid-1-fosfat ve glukozilseramid gibi çeşitli metabolitlere dönüştürülür. Seramid hücrede birikirse apoptozu tetikler. Öte yandan, metabolit sfingosini, G protein ile birleştirilmiş reseptör sinyalleme yoluyla anjiyogenezi teşvik eden sfingosin-1-fosfata (S1P) dönüştürülür. Bu nedenle, seramiddeki denge ve hücrelerdeki S1P seviyeleri hücre ölümünün yanı sıra anjiyogeneze önemli bir rol oynar. AC, çok hedefli antikanser ilaçların geliştirilmesinde ümit verici bir hedef proteindir, çünkü inhibisyonu, Akt ve ERK 1/2 yolu aracılığıyla anjiyogenezi aynı anda inhibe edebilir ve seramid kaynaklı apoptoz yoluyla kanser hücrelerinin çoğalmasını sınırlayabilir. Bazı AC inhibitörleri bildirilmiş olmasına rağmen, klinik kullanım için etkili oldukları kanıtlanmamıştır. AC yapısının aydınlatılmasındaki son gelişmeler, insan hastalıklarının tedavisi için daha iyi inhibitörlerin geliştirilmesini kolaylaştıracaktır (Cho ve Kwon 2019).

Yüksek seramid seviyelerinin, kaspaz-9 ve kaspaz-3'ün aktivasyonuna yol açan sitokrom C'nin salıverilmesi ile radyoterapi ve kemoterapi uygulanan hücrelerde apoptozu indüklediği bildirilmektedir. (Ogretmen ve Hannun 2004, Pettus ve ark. 2002, Bieberich 2008, Nguyen ve ark 2018).

Yağ asitleri 14 ila 26 karbon arasında değişen yan zincirleri taşıyan seramidler, 6 enzimden oluşan bir aile olan seramid sentetazların (CerS) etkisi ile üretilir (White-Gilbertson ve ark 2009, Mullen ve ark 2012). Her spesifik seramid türü, farklı hücrel yanıtı ortaya çıkarabilir (Grösch ve ark 2012). Apoptosis CerS6 ile ilişkilendirilmiştir, çünkü CerS6 ekspresyonunun inaktivasyonunun hem C16-seramid seviyesini hem de hücrelerin ölüm reseptörü ligandı TNF ile ilgili apoptozu indükleyen ligand (TRAIL) 'e hücrel duyarlılığını azalttığı görülmüştür. Tersine, aşırı bir CerS6 ekspresyonu TRAIL'e duyarlılığı arttırmaktadır (White-Gilbertson ve ark 2009). Genomik bir çalışmada, ASAH1'in melanom vakalarında kanser tespiti ve tanımlanması için yararlı bir biyobelirteç olduğu bulunmuştur (Musumarra ve ark 2003). Son zamanlarda, Lai ve ark. ASAH1'in inhibisyonunun, kanser başlatıcı hücre oluşumunu ve invazif melanomanın kendi kendini yenilemesini inhibe ettiğini bildirmişlerdir (Lai ve ark 2017). ASAH1 aktivitesi de akut miyeloid lösemide deregüle edilmiştir. Sonuç olarak, ASAH1 akut miyeloid lösemide yeni bir ilaç hedefi olarak düşünülmektedir (Tan ve ark 2017). Ayrıca, ASAH1 inhibe edildiğinde, hücreler kemoterapiye ve radyasyona daha duyarlı hale gelmektedir ve ASAH1 inhibitörünün, tümör hücrelerini hassaslaştırdığı bildirilmektedir. Araştırmacılar, prostat kanserinde, ASAH1'in aşırı ekspresyonunun kemoterapiye daha dirençli, daha büyük tümör oluşumlarına yol açtığını bildirmektedirler.

ASAH1, insan prostat tümörlerinin %67'sinde ve kafa ve boyun kanserlerinin %70'inde normal kontrollerle karşılaştırıldığında aşırı eksprese edilmektedir (Norris ve ark 2006). Yeni ilaç geliştirmeye yönelik bir çalışmada, ASAH1'in inaktivasyonu araştırılmış ve ASAH1 inhibitörü B13 adı verilen bir maddeye maruz kalındığında ASAH1 aktivitesinin inhibe edilmesi sonucu, sitotoksik etki görülmüş, hücre içi seramid birikimi nedeniyle SW403 insan adenokarsinoma hücrelerinde önemli miktarda apoptozu neden olmuştur (Selzner ve ark 2001). Benzer şekilde, ceranib-2 de bir asit seramidaz inhibitörüdür. Ceranib-2'nin MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde, stresle aktive protein kinaz / c-Jun N-terminal kinaz, p38 mitojenle aktifleştirilmiş protein kinaz ile apoptoz yolunu aktive ettiği ve Akt (antiapoptotik) yolunu inhibe ederek apoptozu indüklediği bildirilmektedir (Vethakanraj ve ark 2018). Asit seramidaz inhibitörü olan Ceranib-2'nin küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerini hedeflerken karboplatin ile sinerjik bir etkiye sahip olduğu da bildirilmiştir (Yildiz-Ozer ve ark 2018). İyi araştırılmış bir ASAH1 inhibitörü olan karmofurun servikal kanserlere

karşı antiproliferasyon ve antimetastatik özellikleri olduğu ve Wnt / katenin sinyal yolağında rol oynadığı görülmektedir (Liu ve ark 2017, Realini ve ark 2013). Klinik açıdan daha önemlisi erken meme kanseri hastalarında, ameliyat sonrası karmofurun destekleyici (adjuvan) kullanımının yararlı bulunmasıdır (Morimoto ve Koh 2003). Diğer taraftan, hepatoma hücrelerinde ASAH1'in aktive edilmesi, Hara ve ark.'nın belirttiği gibi, daha yüksek seviyelerde hücre içi S1P, daha düşük seramid seviyeleri ve kontrollerle karşılaştırıldığında daha yüksek hücre sağkalımı ile sonuçlanmıştır (Şekil 2.7) (Hara ve ark 2004). Ayrıca, trofoblastların ASAH1 inhibitörü ile tedavi edilmesi epidermal büyüme faktörünün antiapoptotik etkisini ortadan kaldırarak seramid kaynaklı apoptoza yol açmıştır. Hücre büyümesi ve invazyonunu tetikleyen ASAH1, hücrelerin tümör-nekroz-faktör-kaynaklı apoptozise daha dirençli olmasını ve daha hızlı göç etmesini sağlar (Saad ve ark. 2007).

Seramid ayrıca, doğrudan ya da sinyal metabolitlerinin kaynağı olarak görev yaparak farklılaşma, çoğalma ve programlanmış hücre ölümü gibi çeşitli işlemleri düzenleyebilen bir sinyalleşme molekülü olarak da işlev görmektedir. Seramidazlar ile parçalandığında, seramid yağ asidi ve sfingosin oluşturarak, hücre büyümesinin, hayatta kalmanın, göçün ve iltihaplanmanın güçlü bir düzenleyicisi olan sfingosin-1-fosfat (S1P) oluşturacak şekilde fosforile edilebilir. Dolayısıyla, seramidazlar hem sfingolipid hem de hücresel homeostazın merkezi düzenleyicileridir (Malinina ve Brown 2015)

2.9.2. Meme Kanseri Gelişiminin Kritik Basamaklarında Çok Yönlü Bir Faktör olan Seramid Metabolizma Dengesi.

Seramidler, metabolik enerji yollarında ve sinyal kaskadlarında anahtar lipidlerdir ve hücrelerdeki kritik fizyolojik fonksiyonları modüle ederler. Seramidlerin sentezi, endoplazmik retikulumda (ER) gerçekleşir. Bununla birlikte, inflamasyonda seramid birikimi, obezitenin kronik düşük dereceli bir inflamasyon ile ilişkilendirilmesi durumu, insülin sinyalleşmesi gibi yolların deregülasyonunu kolaylaştırır ve mitokondriyal membran üzerinde yapısal yeniden düzenlemelere yol açar, geçirgenliğini ve iyonların akışını değiştirir.

Sfingolipidlerin rol oynadığı geniş biyolojik süreçler göz önüne alındığında, bunlar meme kanseri gibi enerji metabolizmalarında anormallikler sergileyen hastalıklar ile ilişkilendirilmiştir. Bu anlamda sfingolipidler, kanser progresyonunda büyüme, proliferasyon, sağkalım, yaşlanma ve apoptoz gibi çeşitli olayları module edebilir. Sfingolipidler çeşitli hücresel süreçlerde önemli işlevler yerine getirmektedirler ve hücrenin bulunduğu ortamın durumuna bağlı olarak metabolik ve potansiyel olarak meme kanserinin gelişimini inhibe edebilir veya teşvik edebilirler (García-González ve ark 2018).

Çeşitli araştırmalar asit seramidaz inhibitörlerinin kanser kemoterapisi için potansiyel anti-proliferatif ve sitostatik ilaçlar olduğunu göstermiştir. Asit seramidaz inhibitörleri araştırmalarında, farklı ilaçlarla kombine kullanım da son dönemlerde ilgi çekmektedir. (Bedia ve ark 2007).

Asit seramidazın ekspresyonu, birçok kanserde anormal derecede yüksektir ve bu durum kemoteröpatik direncin de bir işaretidir. Kolorektal kanser tedavisinde de kullanılan karmofurun güçlü bir asit seramidaz inhibitörü olduğu bilinmektedir.

Bununla birlikte, karmofur kaynaklı timidilat sentetaz aktivitesi inhibisyonu ve hücre proliferasyonu arasındaki pozitif korelasyonun olmaması, daha karmaşık bir etki mekanizması olduğunu düşündürmektedir. Bu fikir, karmofur'un 5-FU'e direnç geliştirmiş olan insan kanser hücreleri için toksik olduğunu gösteren veriler için ek destek bulmaktadır. Bir çalışmada, AC aşırı ekspresyonunun HEK 293 hücrelerinde proliferasyonu hızlandırdığını ve prostat kanseri hücre proliferasyonunu azaltmak için fenretinid [N- (4-hidroksifenil) retinamid] ile sinerji içinde hareket ettiğini göstermektedir. Sonuç olarak, klinikte kolorektal kanserleri tedavi etmek için şu anda kullanılan antineoplastik bir ilaç olan karmofur, hücre içi AC'nin güçlü bir inhibitörü olarak tanımlanmaktadır. Ayrıca karmofurun AC üzerindeki etkilerinin sitotoksik aktivite için temel olduğu ve bu molekülün kimyasal iskeletindeki modifikasyonlar ile standart antitümoral ilaçların terapötik etkinliğinin artırılabilceği ve bu anlamda yeni AC inhibitörleri oluşturulabileceği gösterilmektedir (Realini ve ark. 2013).

Glioblastoma multiforme (GBM), merkezi sinir sisteminin en sık görülen primer, intrakraniyal malignitesidir. Cerrahi müdahale ve tamamlayıcı tedavi temozolomid ile

eşzamanlı radyasyon içeren standart tedavi protokolü, hala iyi bir prognoz vermemektedir. Sonuçta, tüm GBM'ler standart tedaviye direnç geliştirerek nüks olur. (Doan ve ark. 2017) de yaptığı bir çalışmada, GBM'lerin ASAH1 ve S1P düzenlenmesi yoluyla radyasyona direnç kazandığını göstermektedir. Ayrıca, ASAH1 ve S1P'nin ya monoklonal antikörlerle, küçük moleküllu ilaçlarla (yani, carmofur) veya her ikisinin bir kombinasyonu ile inhibisyonu, GBM hücre büyümesinin baskılanmasına neden olmuştur. Sonuç olarak, ASAH1 ve S1P'nin, özellikle ASAH1'i aşırı ifade ettiğinden yeni GBM'lerin ve tekrarlayan GBM'lerin tedavisi için mükemmel hedefler olabileceği ileri sürülmektedir (Doan ve ark. 2017).

Günümüzde kanser tedavisinde kullanılan ilaçlara karşı direnç gelişmesi tedavinin başarısını düşürmekte ve kanserin nüks etmesine neden olmaktadır. Bu konuda yoğun bilimsel çalışmalar yürütülmekte ve hücre kültürlerinde kullanılacak antikanser ilaçlarla daha başarılı tedaviler sağlanmasına çalışılmaktadır.

Asit seramidaz inhibitörleri ile ilgili çalışmalar giderek artmaktadır. Artan literatürler doğrultusunda asit seramidazların kanser tedavisinde ve ilaç direncini azaltmada ve kombine kullanımla gösterdiği sinerjik etki sayesinde tedavide daha etkili seçenekler sunması gelecekte umut vaad etmektedir.

Asit seramidazların son literatürlerde kanser hücreleri üzerinde farklı yollarla sitotoksik etkilerinin ortaya çıkması ve muhtemel bilinmeyen mekanizmalarının aydınlanması için çalışmalar devam etmektedir.

Bu amaçla yapmış olduğumuz tez çalışmasında asit seramidaz inhibitörleri olan 5-FU ve karmofur kullanılarak MCF-7, MDA-MB-231 hücre serilerindeki sitotoksik etkilerini ve bunu hangi mekanizma ile gerçekleştirdiğini tespit etmeyi amaçladık. 5-FU ve karmofurun hem serbest hem de bizim hazırladığımız PEG kaplı nano formlarını kullandık. Ayrıca ASAH1, S1P enzim düzeyleri ve bcl-2 protein ekspresyonu western blot ile tayin edilerek sitotoksik mekanizmanın aydınlatılmasını amaçladık.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

Tablo 3. 1: Kullanılan Kimyasallar

Malzeme adı	Özellik/kod
Etil asetat	Emboy Kimya, Türkiye
Buffer (PBS)	Merk Millipore, Almanya
Poli Etilen Glikol (PEG)	Sigma Aldrich, Almanya
Rosin Ester	Pina Kimya, Türkiye
Laemli Tampon	Bio-rad, ABD
Tris/Glisin/SDS Tampon	Bio-rad, ABD
Tampon solüsyon (TBS)	sc-362186
Ponceau S	Sigma P7170-1L
Metanol	Merck Millipore, Almanya
Western Görüntüleme Solüsyonu	170-5060
Akrilamid	161-0154
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco 10270-106
Penicillin-Streptomycin	K952-100 MI
Dulbacco's Modified Eagle Medium (DMEM) Toz	Sigma-Aldrich
Metil Tiyazol Tetrazolyum (MTT)	Sigma-Aldrich
Fosfat buffer salin (PBS)	Santa Cruz
Trypsin	Difco Laboratories
EDTA (Ethilen diamin tetra asetik asit)	sc-29092 (500gr)
Tripan mavisi	Merck
Triton X-100	Sigma
Tween-20	Santa Cruz
Tetra metil etilen diamin (TEMED)	Thermo scientific 17919
Dimetil sulfoksid (DMSO)	Merck
Sodyum dodesil sulfat (SDS)	Multicell (500G) Wisent Inc.
Amonyum persulfat (APS)	Thermo scientific

Hidroklorik asit (HCL)	Sigma
bisinkoninik asit (BCA) protein testi	Smart TM
Yağsız süt tozu	Santa Cruz
2-Mercaptoethanol	Merck
Fenil metil sulfonil florid (PMSF)	Sigma 78830-5G
Bromofenol mavisi	AppliChem A2331

Tablo 3. 2: Kullanılan Alet ve Cihazlar

Adı	Özellik
UV Spektrofotometre	Shimadzu UV-1601, Almanya
Ultrasonikatör	Bandelin sonopuls, Almanya
Hassas Terazı	DENVER, U.S.A
PH metre	HANNA, Türkiye
Diyaliz Membran	Sigma-Aldrich (10mmx6mm)
Manyetik Isıtıcı:	VELP, İtalya
İmmun-blot PVDF membrane	10'lu paket
Filtre kağıdı	100'lü paket
Laminar akımlı kabin	-
Buzdolabı	Bosh
CO2 inkübatörü	Nuaire-Nu 5500
Santrifüj	Rotina
Mikropipet	Eppendorf
Azot tankı	Taylor-Wharton
Western Blot Sistemi	Bio-rad, USA
Mini-Çalkalayıcı	BioSan PSU-2T
HEPA filtreli CO ₂ İnkübatörü	Nuaire-Nu 5500E
Santrifüj	Hettich Rotina 46R
Vorteks	Nuve mix
PH-metre	Hanna Instrument
Işık mikroskobu	Olympus

İnvert mikroskop	Olympus
Mini-protean western blot seti	Biorad
ECL görüntüleme kamerası	Wealtec KETA
ELISA mikropate okuyucu	RAYTO RT-2100C
Dinamik Işık Saçılımı (DLS)	Malvern

3.1.1. Kullanılan Çözeltiler

DMEM Hazırlanışı

Toz formda olan DMEM besiyeri distile suda çözündükten sonra, tampon sistemi için 3,7 g/L Sodyum bikarbonat eklendi. Çözeltinin homojen bir şekilde karışması sağlandıktan sonra 0,22 µm vakumlu steril filtre sisteminden süzüldü. Sonra 100 U/ml penisilin ve 10 µg/ml streptomisin ilave edildi. Deneyde kullanım sırasında %10 FBS eklendi.

MTT (Metil Tiyazol Tetrazolyum) Hazırlanışı

MTT cam beher içerisinde 5 mg/ml olacak şekilde hassas terazide tartıldıktan sonra fosfat tamponunda (PBS) çözüldü.

pH:7,4 ve pH:1,2 Tampon Solüsyonların Hazırlanışı:

pH:7,4: Merck Millipore'den temin edilen PBS'den mezüre 2,5 ml alındı ve üzerine distile su ilave edilerek 50 ml'ye tamamlandı.

pH metre ile ölçüm yapıldı: pH:7,4 olarak ölçüldü.

pH:1,2: 3 gr NaCl tartıldı ve 1450 gram distile suda çözündü.

pH metre ile ölçülerek pH: 1.2 olana kadar HCl çözeltisi damlatıldı.

-1.5 Molar Tris-HCl, pH 8.8 Tampon Çözeltisinin Hazırlanışı:

27 g Tris,

2 ml 1 N HCl (8.3 ml HCl 100 ml ye distile su ile tamamlandı)

Toplam hacim pH 8.8'e ayarlandıktan sonra 150 ml'ye distile su ile tamamlandı.

0.5 M Tris-HCl, pH6.8 Tamponu Çözeltisinin Hazırlanışı:

12.1 g Tris,

7.47 ml HCl

Toplam hacim pH 6.8'e ayarlandıktan sonra 100 ml'ye distile su ile tamamlandı.

TBST hazırlanışı

Hazır olan TBS tamponundan 100 ml alınarak distile su ile 1000 ml ye tamamlandı.

İçine 1ml TWEEN-20 ilave edildi.

% 5 lik Süt Tozu Çözeltisi

5 gr süt tozu 100 ml TBST içinde çözeltisi çözüldü ve bloklama çözeltisi hazırlandı.

Transfer Tamponu Çözeltisinin Hazırlanışı

50 ml TGS çözeltisi

100 ml methanol

350 ml distile su ile 500 ml ye tamamlandı.

% 10'luk SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) Çözeltisinin Hazırlanışı:

0.1 g SDS 1ml'ye distile su ile tamamlandı.

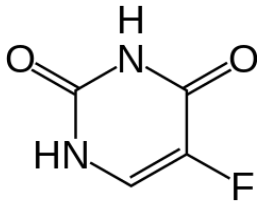
% 10'luk APS (Amonyum Persülfat) Çözeltisinin Hazırlanışı:

0.1 g APS 1ml'ye distile su ile tamamlandı.

3.1.2. Kullanılan Bileşikler

3.1.2.1. Florourosil

Molekül Formülü:



Saflık : HPLC $\geq$ % 99.

Saklama koşulları: +20 °C 'de.

Kimyasal Okunuşu: 5-floro-1H-pirimidin-2,4-dion

Kapalı Formülü: C₄H₃FN₂O₂

Molekül ağırlığı: 130,1 g/mol

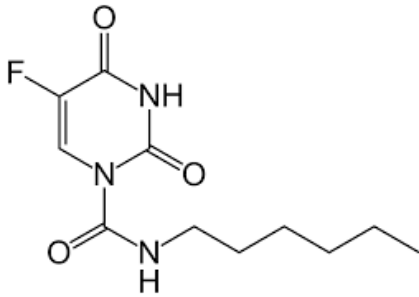
Görünüşü: Beyaz, beyaza yakın, kokusuz kristalize tozdur.

Erime sıcaklığı: 190-200 °C.

(<https://www.drugfuture.com/chemdata/fluorouracil.html>).

3.1.2.2. Karmofur

Molekül Formülü:



Safılık : HPLC $\geq$ % 98.

Saklama koşulları: +4 °C 'de.

Kimyasal Okunuşu: 5-Floro-*N*-heksil-3,4-dihidro-2,4-dioxo-1(2*H*)-pyrimidinecarboxamide

Kapalı Formül: C₁₁H₁₆FN₃O₃

Moleküler Ağırlığı: 257.26

Görünüşü: Beyaz, beyaza yakın, kokusuz kristalize tozdur.

Çözünürlüğü: Pratik olarak kloroform, eter ve benzende çözünmez. Metanolde, DMSO'da çözünür. (<https://www.drugfuture.com/chemdata/carmofur.html>)

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Spektroskopik Yöntemler

Karmofur ve 5-FU'un molekül Dalga Boyu Tespiti:

İlaç konsantrasyonları 50 mM olacak şekilde serbest karmofur ve serbest 5-FU ilaçları DMSO kullanılarak çözüldü. İlaç dalga boyu tespiti için 5 farklı konsantrasyon hazırlandı.

1. 50 mM olan ilaç konsantrasyonundan 30 µl alındı. DMSO ile 10 ml ye tamamlandı, ilk konsantrasyon hazırlandı.
2. Hazırlanan ilk konsantrasyondan 5 ml alındı, üzerine 5 ml DMSO ilave edilerek ½ oranında seyreltilmiş oldu ve 2. konsantrasyon hazırlandı.
3. Hazırlanan 2. konsantrasyondan 5 ml alındı, üzerine 5 ml DMSO ilave edilerek ½ oranında seyreltilmiş oldu ve 3. konsantrasyon hazırlandı.
4. Hazırlanan 3. konsantrasyondan 5 ml alındı, üzerine 5 ml DMSO ilave edilerek ½ oranında seyreltilmiş oldu ve 4. konsantrasyon hazırlandı.
5. Hazırlanan 4. konsantrasyondan 5 ml alındı, üzerine 5 ml DMSO ilave edilerek ½ oranında seyreltilmiş oldu ve 5. konsantrasyon hazırlandı.

Bu çözeltilerin 190nm-400nm aralığında UV spektrumu alındı ve maksimum absorbans (λ_{max}) gösterdiği dalga boyu belirlendi.

Karmofur için dalga boyu 267 nm, 5-FU için dalga boyu 290 nm olarak tespit edildi.

3.2.2. Absorbans Ölçümü

Karmofur Nano

Dalga Boyu:267 nm

Nanotaşıyıcıya yüklenmiş ilaçların salımını tespit etmek için diyaliz membran, ortam olarak da pH:7,4 ve pH:1,2 tampon solüsyonlar kullanıldı.

100 µM olan nano taşıyıcıya yüklenmiş karmofur konsantrasyonundan 2 ml diyaliz membrana alındı. Diyaliz membran boyutu yaklaşık 16 cm, ortam sıcaklığı yaklaşık 37 ± 2 °C. Diyaliz membranın her iki ucu ip ile bağlanarak kapatıldı.

Diyaliz membran içindeki nanotaşıyıcıya yüklenmiş karmofur pH:7,4 ve pH:1,2 olan 50 ml tampon solüsyon içine ayrı ayrı bırakılarak salım takip edildi.

267 nm dalga boyunda UV spektrofotometrede farklı zamanlarda absorbands ölçümü yapıldı.

Fluorourosil Nano

1 mM olan nano taşıyıcıya yüklenmiş 5-FU konsantrasyonundan 2 ml diyaliz membrana alındı. Diyaliz membran boyutu yaklaşık 16 cm, ortam sıcaklığı yaklaşık 37 ± 2 °C. Diyaliz membranın her iki ucu ip ile bağlanarak kapatıldı.

Diyaliz membran içindeki nanotaşıyıcıya yüklenmiş 5-FU pH:7,4 ve pH:1,2 olan 50 ml tampon solüsyon içine ayrı ayrı bırakılarak salım takip edildi.

290 nm dalga boyunda UV spektrofotometrede farklı zamanlarda absorbands ölçümü yapıldı.

pH:7,4 ve pH:1,2 tampon solüsyonların hazırlanması:

pH:7,4: Merck Millipore'den temin edilen PBS'den mezüre 2,5 ml alındı ve üzerine distile su ilave edilerek 50 ml'ye tamamlandı.

pH metre ile ölçüm yapıldı: pH:7,4 olarak ölçüldü.

pH:1,2: 3 gr NaCl tartıldı ve 1450 gram distile suda çözündü.

pH metre ile ölçülerek pH: 1.2 olana kadar HCl çözeltisi damlatıldı.

3.2.3. Polimerik Nanopartiküllerin Hazırlanması:

Nanopartiküller ilaçsız boş polimerik nanopartiküller ve ayrı ayrı karmofur ve 5-FU yüklenmiş polimerik nanopartiküller olarak hazırlandı.

Nanopartiküller iki farklı fazda hazırlandı.

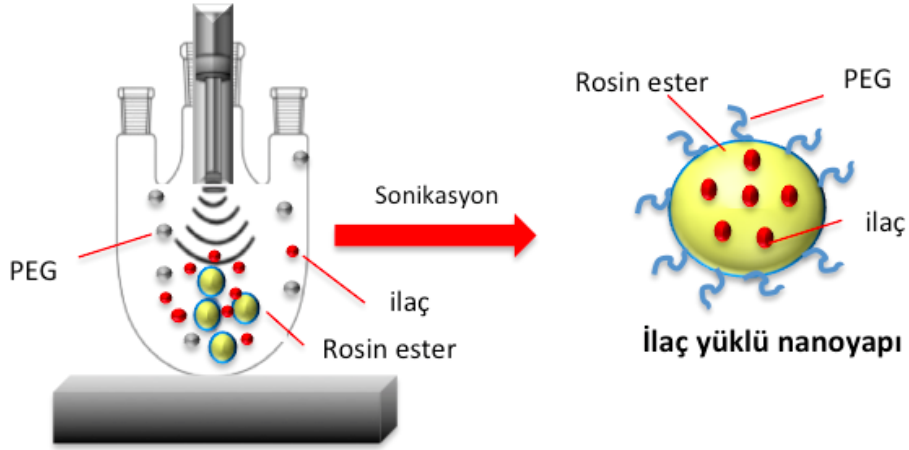
Nanotaşıyıcıya karmofur ve 5-FU yüklenmiş polimerik nanopartiküller hazırlanmadan önce, ilaçlar DMSO içinde çözündü. (0,64 gr karmofur ve 0,0032 gr 5-FU ayrı ayrı 0,25 ml DMSO içinde çözündü.)

Dağılan Faz: 0,025 gr Rosin, 0,25 ml DMSO, 3,5 ml etil asetat kullanıldı.

Sürekli Faz: 0,25 gr PEG400, 14,9 ml distile su, 1,85 ml etil asetat kullanıldı.

Karışımlara toplamda 20 dakika sonikasyon uygulandı. Öncelikle sürekli faza 3 dakika sonikasyon yapıldı ve sürekli fazdan 3,75 ml alınarak ayrıldı. Sonra dağılan faz sonikasyon sırasında damla damla eklendi. Kalan 17,5 ml sürekli faz da bu karışıma yavaşça eklendi ve sonikasyon 20 dakikaya tamamlandı (%30 AM).

Çözelti 50-60 °C' de çeker ocak içinde 2 saat tutularak etil asetatın uçması sağlandı. Son çözelti 20 ml olarak ölçüldü ve bulanık gözlemlendi. Bu işlemler ilaçlı ve ilaçsız numuneler için ayrı ayrı gerçekleşti (pH: 4.4, Sıcaklık: 25 °C, Viskozite: 1,9 cP).



Şekil 3. 1: Rosin ester ve PEG ile hazırladığımız nanopartiküllerin temsili görünümü

Deney sonucunda, homojenik polimerik nanopartikül elde edilmiştir.

Nanotaşıyıcıya baktığımızda, yapıda çekirdek kısmında hidrofobik ilacımız bulunmaktadır. Kabuk kısmında hidrofilik özellik gösteren PEG bulunmaktadır (Şekil 3.1). Rosin ester amfifilik özellik gösterip ilacın biyoyumumluluğunu ve hücre membranı ile etkileşimini arttırmak hedeflenmiştir.

3.3. Hücre Kültürü Çalışmaları

Bu çalışmada kullanılan MCF-7, MDA-MB231 (insan meme kanseri hücreleri) meme kanseri ve HUVEC (İnsan Kordon Veni Endotel Hücreleri) sağlıklı endotel hücre serileri ATCC'den temin edilmiştir.

3.3.1. Hücrelerin Çoğaltılması

Sıvı azotta saklanmakta olan hücreler 37 °C su banyosuna alındı. Çalışılacak olan hücrelere %10 FBS içeren medyum ilavesi yapılarak, santrifüj edildi ve hücre yoğunluğuna göre 75 veya 25 cm²'lik flasklara alınarak, 37 °C, %5 CO₂ ortamında inkübasyona bırakıldı.

3.3.2. Hücre Kültürü ve hücre serilerinin stabilizasyonu:

MCF-7 ve MDA-MB-231 ve HUVEC hücreleri 37 °C'de, %95 O₂, %5 CO₂ li etüv atmosferinde inkübe edildi. Kültür ortamı için, 100,000 U/L penisilin ve 100.000 g/L streptomisin ilave edilerek hazırlanan, % 10 fetal sığır serumu (FBS) içeren DMEM (Dulbecco'nun Modifiye Eagle Medyumu) kullanılarak kültüre edildi. En az haftada 2 kez hücrelerin medyumunu tazelendi. Hücreler % 70-90 konfluent olduklarında pasajları yapıldı.

3.3.3. Tripsin ile Hücrelerin Kaldırılması

Konfluent olan hücreler tripsin ile 2 dakika bekletildikten sonra flasktan kalkması sağlandı ve üzerlerine %10 FBS'li medyum ilave edilerek santrifüje alındı. Santrifüj sonrası hücreler falkonun dibine çöktü, içinde tripsin içeren %10 FBS'li medium dökülerek yeni medium ilave edildi.

3.3.4. Hücre Canlılığının Tripan Mavisi Boya ile Değerlendirilmesi

Hücreler bire bir oranda tripan mavisi boyası ile boyanarak hücrelerin canlılığı değerlendirildi ve hücre sayımı yapıldı. Tripan mavisi boyası ile (1 hacim boya + 1 hacim hücre) boyanır. Mikroskopta Neubauer lamında sayılan hücreler şöyle değerlendirilir: Mavi renkte boyanan, yani boyayı alan hücreler ölü hücreler, boya almayan hücreler canlı hücrelerdir.

Hücre canlılığı hesaplanması:

Toplam hücre= Sayılan hücre x Dilüsyon faktörü x Toplam hacim x 10.000 (lam faktörü).

3.3.5. Sitotoksik Konsantrasyonlarının Belirlenmesi (IC50)

Mitokondriyal Aktiviteye Dayalı MTT Testi

MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiyazolil)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) testi in vitro olarak metabolizmanın canlılığına dayanan sitotoksiteyi ölçmek için kullanılır. Kantitatif, kolorimetrik bir yöntemdir. MTT testi doğal ya da sentetik bileşiklerin sitotoksitesini anlamada (ilk basamak tarama testi) yaygın kullanılan hassas, güvenilir ve ucuz bir testtir (Mosmann, 1983).

Hücreler %70-90 konfluent olduğunda tripsin uygulanarak falkın zemininden kaldırıldı ve tripan mavisi boyası ile boyandı, hücre sayımı yapılarak hücrelerin canlılık

oranı belirlendi. Hücre sayısı mililitrede 10^5 olacak şekilde 90 μ l olarak, hücreler 96'lık platelere ekildi. Sonra farklı konsantrasyonlarda 20-100 μ M aralığında maddeler ilave edilir. 72 saatlik inkübasyona bırakıldı ve sonra hücrelere MTT testi uygulandı. 0,5 mg/ml olacak şekilde PBS de hazırlanan MTT çözeltisi, 72 saatlik inkübasyon sonrası hücreler üzerine eklendi. Etüvde 37 °C'de, karanlıkta, 4 saat inkübasyondan sonra, 96 lık pleyttteki her kuyucuğa 100 μ l DMSO ilave edilerek çözöldü. Hücrelerin ELİSA cihazında 540 nm'de okutuldu. Tüm deneyler en az üç kere tekrar edildi.

Aşağıdaki formüllere göre canlı hücre sayısı (VI) veya sitotoksik indeks (SI) hesaplandı:

$$VI (\text{Canlı hücre sayısı}) = (\text{Deney Absorbans} \div \text{Kontrol absorbans}) \times 100$$

$$\text{Sitotoksik indeks (SI)} = 1 - [(\text{Deney Absorbans} \div \text{Kontrol absorbans}) \times 100]$$

Hücre büyümesini % 50 inhibe eden konsantrasyon (IC_{50}) sitotoksik doz-yanıt eğrisinden hesaplandı.

3.3.6. Hücre Lizatlarının Hazırlanması

Hücreler flasklara, hücre sayısı ml'de 10^5 olacak şekilde ekildi. Üzerlerine IC_{50} değerlerindeki 5-FU, Karmofur, Nano 5-FU, Nano Karmofur konsantrasyonları ilave edilerek, 72 saat, 37 °C de, %5 CO_2 li etüvde inkübe edildi. 72 saat sonunda, tripsin ile hücreler kaldırıldı ve PBS ile yıkandı. Sonra, medyum ve PBS hücrelerden uzaklaştırıldı. Kalan pelet üzerine 100 ya da 200 μ l hücre lizatı (1:1000 PMSF olacak şekilde) eklendi. Buzda 1 saat süresince bekletildi, bu arada 10-15 dakikada bir vortekslendi. Sonra 14000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi ve üstte kalan süpernatant toplanarak western analizlerinde kullanıldı.

3.3.7. BCA Protein Deney Kiti ile Protein Miktarı Tayini

BCA protein deneyi, bir örnekteki toplam proteinin nicelleştirilmesi için kullanılır. Bu yöntemin prensibi, proteinlerin bir alkalın çözeltisi (biüret reaksiyonu) içerisinde $Cu + 2$ 'yi $Cu + 1$ 'e düşürebilmesi ve bicinkoninik asit (BCA) ile mor bir renk oluşumuna neden olabilmesidir. Bakırın azaltılmasına esas olarak, protein moleküllerinde bulunan sistein veya sistin, tirozin ve triptofan dahil dört amino asit

kalıntısı neden olur. Bununla birlikte, bradford analizine kıyasla, evrensel peptit omurgası da renk oluşumuna katkıda bulunduğundan BCA testi daha objektiftir (He F 2011).

Önce BSA standartları hazırlandı.

Kit içinde 1ml BSA stok solüsyonu 2 mg/ml (distile su) olacak şekilde hazır alındı ve 20-2000 µg /ml olacak şekilde 8 farklı konsantrasyona dilüe edildi.

Kit içindeki BCA çalışma reaktifi hazırlandı. Örnekler için gereken toplam çalışma reaktifi hacmi hesaplanarak, 50 oranında BCA Reaktif A, 1 oranında BCA Reaktif B (50: 1, Reaktif A: B) ile karıştırarak hazırlandı (karışım berrak ve yeşil bir çözelti gibi göründü).

Protein örnekleri 96 kuyucuklu plakalara her kuyucukta 25 µL olacak şekilde, ve üzerine 200 µL olacak şekilde çalışma reaktifi eklendi. 37 °C de 30 dk bekletildikten sonra, 10 dk oda sıcaklığında bekletildi ve 560 nm de absorbans ölçümü alındı.

Öncelikle BSA ile hazırlanan standartlar için standart grafik eğrisi çizildi. Elde edilen regresyon denklemine göre, örneklerdeki protein miktarı hesaplandı.

Protein miktarı µg/ml olarak belirlendi.

Kullanılacak protein miktarı 30 µg/ml şeklinde ayarlandı.

Örneklerden elde edilen proteinler, moleküler büyüklüklerine göre SDS jelde (SDS-PAGE) yürütüldü. Bu çalışmada %10'luk ayrıştırma jeli; %4'lük sıkıştırma jeli olacak şekilde SDS jeli hazırlandı.

%10'luk ayrıştırma jeli (4 jel için)

9,5 ml dH₂O

6 ml 1,5 M Tris pH:8,8

8 ml %30 Akrilamid/

240 µl %10'luk SDS

240 µl %10'luk APS

24 µl TEMED

%4'lük sıkıştırma jeli (4 jel için)

8,9 ml dH₂O

3,75 ml 0,5 M Tris pH:6,8

2 ml %30 Akrilamid/bisakrilamid

150 µl %10'luk SDS

150 µl %10'luk APS

15 µl TEMED

3.4. Western Blot Yöntemi

Western blot, antijen-antikor bağlanmasının spesifitesini kullanarak potansiyel olarak önemli bir ortam arasından tek bir proteini seçer. Western blot, proteinlerin eşit yüklenmesi, proteinlerin molekül ağırlığına göre jel elektrofozinde ayrılması, uygun bir membrana elektroforetik transferi ve antikorların primer ve sekonderlerle muamelesi sonucu araştırılması prensiplerine dayanır (Gavini, K. ve Parameshwaran, K. 2019).

Protein miktar tayininden sonra çalışılan proteinlerin molekül büyüklüğüne göre ayırıştırma jeli % 10 olacak şekilde hazırlandı. Ayırıştırma jeli için belirtilen bileşikler 50 ml lik falkon tüpte karıştırıldı. En son APS ve TEMED eklendi ve hemen jel hazırlama düzeneğine konuldu. Hava almaması ve jelin yüzeyinin düzgün olması için üzerine isopropanol konuldu.

Ayırıştırma jeli polimerleşince, üstündeki isopropanol uzaklaştırıldı ve aynı ayırıştırma jeline olduğu sırayla sıkıştırma jeli hazırlandı ve jel düzeneğine eklendi. Sonra hemen taraklar yerleştirildi.

Jeller polimerleştikten sonra elektroforez sistemine yerleştirildi ve taraklar çıkarıldı. Daha önceden 30 µg/ml olacak şekilde %5 merkaptotanol içeren Laemli solüsyonu ilave edilerek 95 °C de denatüre edilen protein örnekleri jeldeki kuyucuklara 20 µl olarak yerleştirildi. Markır ise en baştaki kuyucuğa 10 µl olacak şekilde yerleştirildi.

Markır görüntüsü takip edilerek 1,5-2 saat kadar 100 voltta yürütme işlemi gerçekleştirildi. Böylece proteinler jel üzerinde yürütülmüş oldu.

Yürütme işleminden sonra sandviç yöntemi ile transfer işlemi uygulandı. Jeldeki proteinler ıslak transfer uygulanarak PVDF membrane aktarıldı. Bu aşamada, iki adet filtre kağıdı arasına PVDF membran, bu membranın üzerine de jel yerleştirilerek

sandviç hazırlandı ve transfer düzeneğine yerleştirildi. Bu esnada membran ve jelin kuru kalmaması dikkat edildi. Sisteme transfer tampon çözeltisi ilave edildi ve 70 voltta 2 saat transfer uygulandı.

Transfer işlemi bittikten sonra membran, bloklama çözeltisi olan %5 lik yağsız süt tozunda 1 saat oda sıcaklığında çalkalanarak bekletildi. Bu esnada membranda bulunan proteinlerin, açık amino asit residülerinin kapanması sağlandı.

Bloklama bitince yıkama solüsyonu ile 5 dk aralarla üçer defa yıkama yapıldı. Uygun bir şekilde hazırlanan primer antikorlar ile +4 °C de çalkalayıcıda gece boyunca bekletildi. Ertesi gün yine yıkama solüsyonu ile 3 er kez yıkama yapıldı. Uygun sekonder antikorlar, uygun şekilde süt tozunda hazırlanarak ilave edildi. Sekonderler çalkalayıcıda oda sıcaklığında bir saat bekletildi. Yıkama solüsyonu ile tekrar üçer kez yıkama yapıldıktan ECL substratı uygulanarak görüntü alındı.

3.5. İstatistik

Gruplar arası sitotoksosite anlamlılığı kontrole göre student-t testi ile karşılaştırılarak p değerleri hesaplanmıştır.

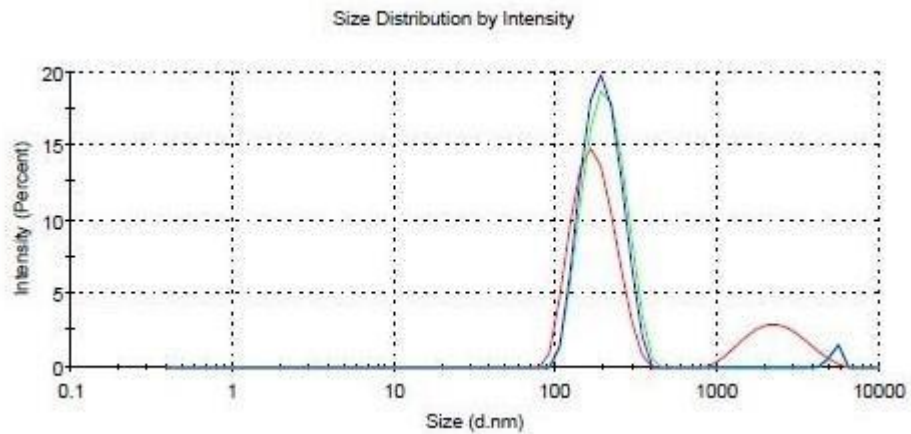
4. BULGULAR

Polimerik nanopartiküllerin partikül boyutu ve zeta potansiyeli DLS (Dinamik Işık Saçılımı) analizi ile değerlendirilmiştir. Hazırlanan ilaç yüklenmemiş PEG 400 ve Rosin Esteri içeren polimerik boş nanopartikül boyutları ile karmofur ve 5-FU yüklenmiş nanopartiküllerin boyutları ve zeta potansiyelleri Tablo 4.1’de gösterilmiştir.

Tablo 4. 1: Hazırlanan boş polimerik nanopartiküllerin partikül boyutu ve zeta potansiyel değerleri.

Polimerik Nanopartiküller	Partikül Boyutu (nm)	Partikül dağılım oranı	Zeta Potansiyel (mV)	Polarite
Boş nanopartikül	197,9	% 98,7	0,7	Negatif
Karmofur yüklenmiş nanopartikül	198,5	%97,1	0,7	Negatif
5-FU yüklenmiş nanopartikül	304,9	%98,4	0,7	Negatif

4.1. Polimerik Nanopartiküllerin Dinamik Işık Saçılımı ile Karakterizasyonu

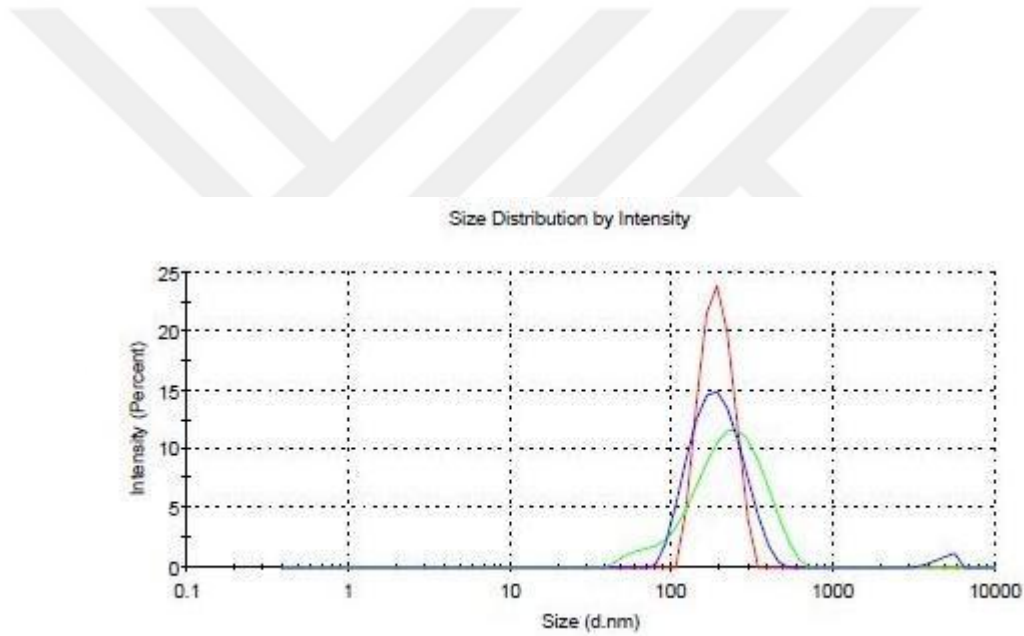


Results

	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 203.3	Peak 1: 197.9	97.8	52.49
Pdl: 0.228	Peak 2: 5312	2.2	389.0
Intercept: 0.956	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

Şekil 4. 1: İlaç yüklenmemiş polimerik boş nanopartiküllerin DLS analizi

İlaç yüklenmemiş polimerik boş nanopartiküllerin boyutlarının, DLS analizi sonucunda ortalama 197.9 nm olduğu aşağıdaki şekilde gösterilmektedir. Ayrıca nanopartiküllerin % 97.8 oranında bu boyutlarda dağılım gösterdiği görülmektedir (Şekil 4.1).

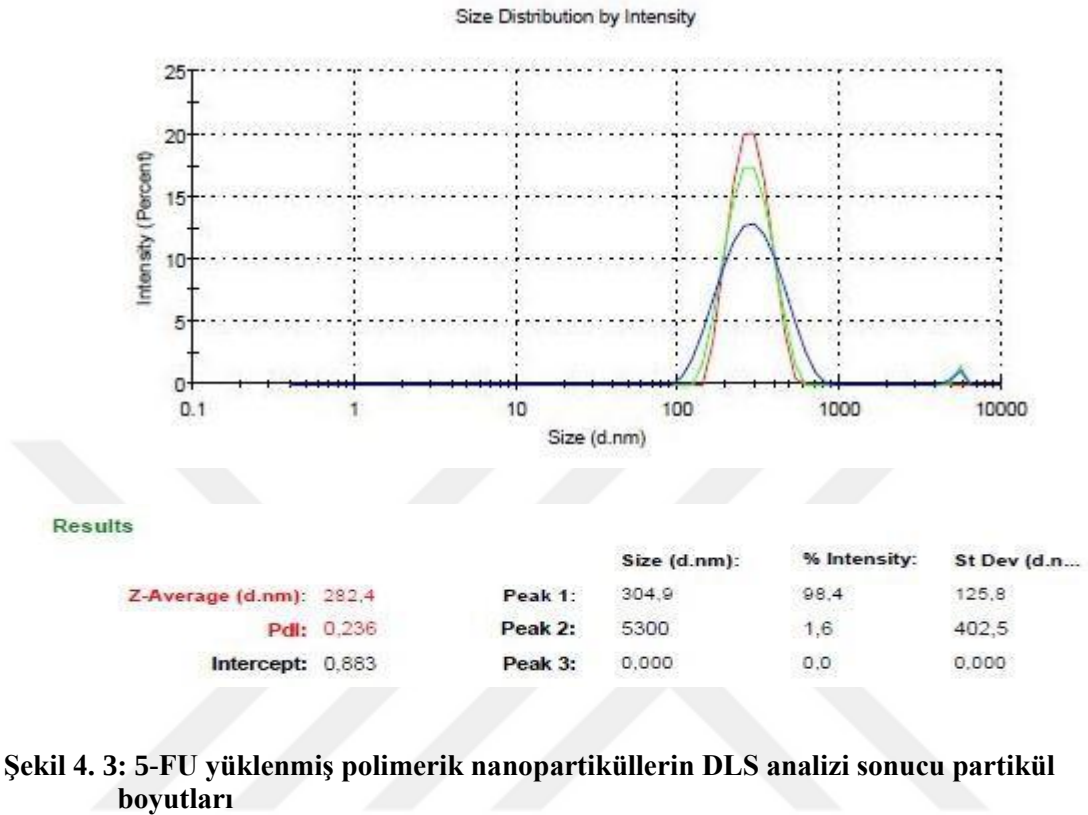


Results

	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 186.9	Peak 1: 198.5	97.1	70.93
Pdl: 0.203	Peak 2: 4881	2.9	681.0
Intercept: 0.949	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

Şekil 4. 2: Karmofur yüklenmiş polimerik nanopartiküllerin DLS analizi

Karmofur yüklenmiş nanopartiküllerin boyutları, DLS analizi sonucunda 198.5 nm olarak aşağıdaki şekilde gösterilmektedir. Ayrıca nanopartiküllerin % 97.1 oranında bu boyutlarda dağılım gösterdiği görülmektedir (Şekil 4.2).



Şekil 4. 3: 5-FU yüklenmiş polimerik nanopartiküllerin DLS analizi sonucu partikül boyutları

5-FU yüklenmiş nanopartiküllerin boyutları, DLS analizi sonucunda 304.9 nm olarak aşağıdaki şekilde gösterilmektedir. Ayrıca nanopartiküllerin % 98.4 oranında bu boyutlarda dağılım gösterdiği görülmektedir (Şekil 4.3).

4.2. Nanopartiküllerin Zeta Potansiyeli

İlaç yüklenmeyen polimerik boş nanopartiküllerin, 5-FU ve karmofur yüklü polimerik nanopartiküllerin şekil 4.4, şekil 4.5, şekil 4.6'da zeta potansiyellerinin 0,7 mV, polaritesinin negatif olduğu görülmektedir.

Measured Data	
Zeta Potential	0.7 mv
Polarity	Negative
Mobility@25C	0.06u/s/V/cm
Conductivity	25 uS/cm
Field Strength (Req/Act)	10 / 9.9 kV/m
SOP	
Zeta Run Time	100 sec

Şekil 4. 4: Polimerik boş nanopartiküllerin zeta potansiyeli

Measured Data	
Zeta Potential	0.7 mv
Polarity	Negative
Mobility@25C	0.06u/s/V/cm
Conductivity	24 uS/cm
Field Strength (Req/Act)	10 / 9.9 kV/m
SOP	
Zeta Run Time	100 sec

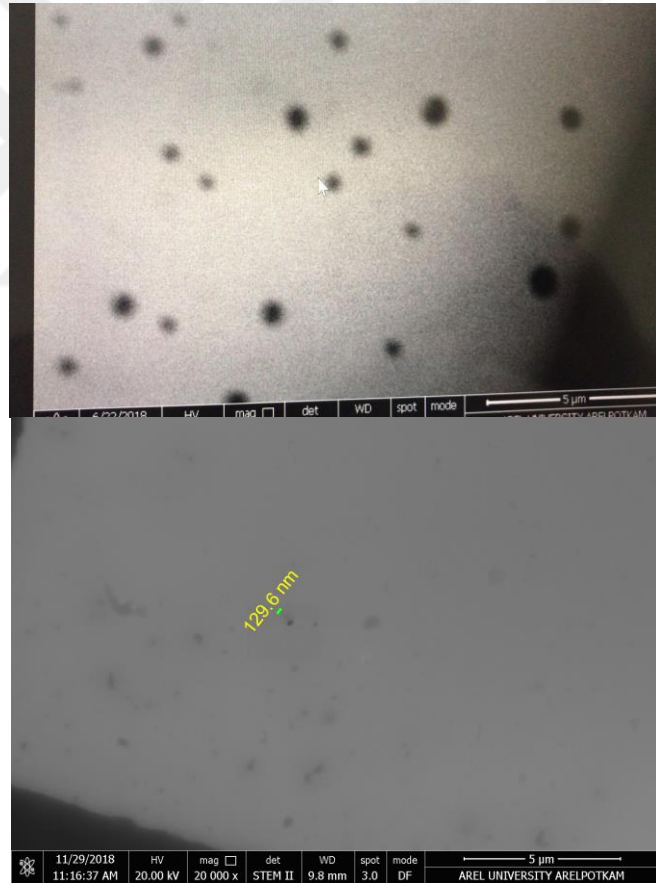
Şekil 4. 5: Karmofur yüklü polimerik nanopartiküllerin zeta potansiyeli

Measured Data	
Zeta Potential	0.7 mv
Polarity	Negative
Mobility@25C	0.06u/s/V/cm
Conductivity	20 uS/cm
Field Strength (Req/Act)	10 / 10.0 kV/m
SOP	
Zeta Run Time	100 sec

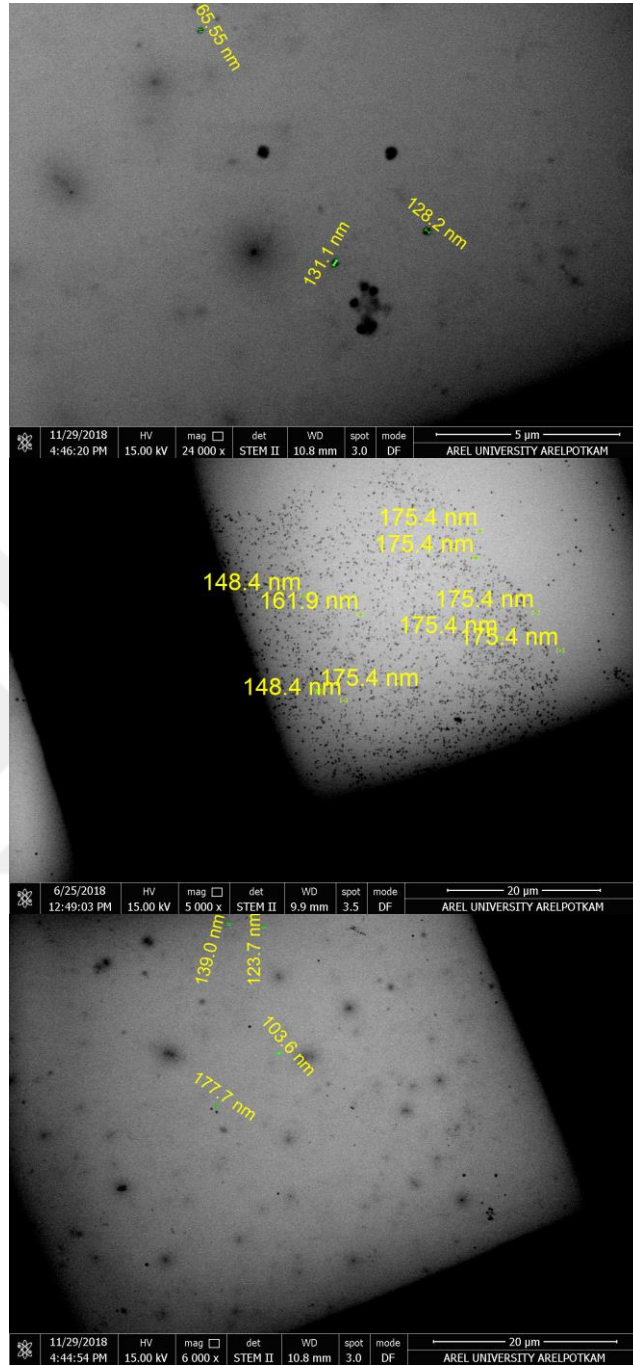
Şekil 4. 6: 5-FU yüklü polimerik nanopartiküllerin zeta potansiyeli

4.3. Polimerik Nanopartiküllerin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi ile Karakterizasyonu

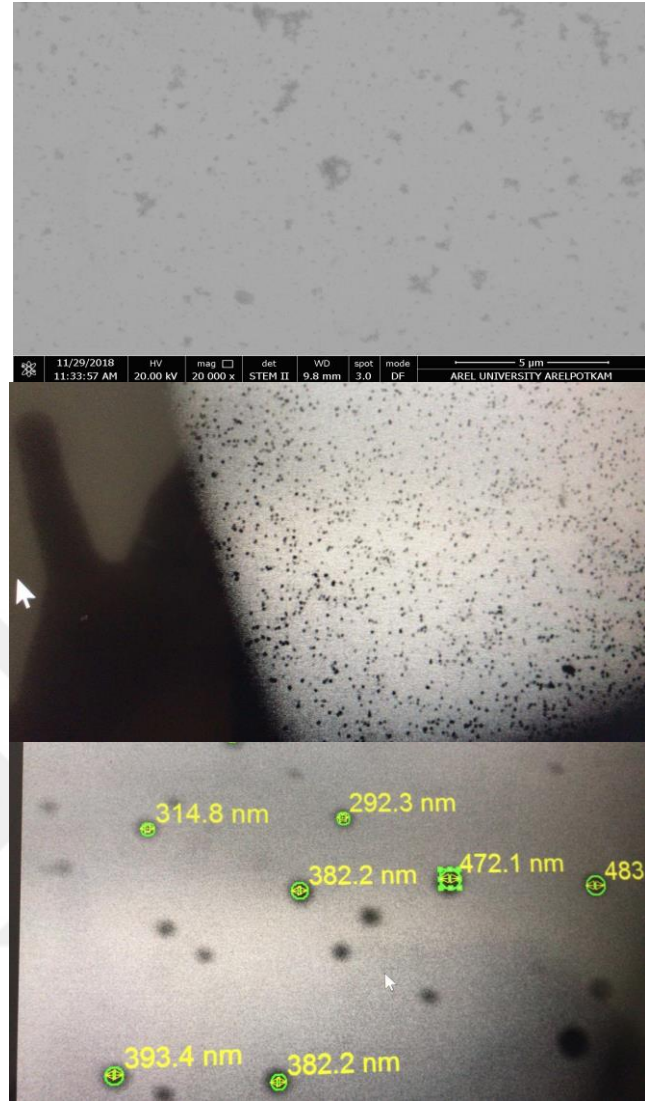
Polimerik nanopartiküllerin partikül büyüklüklerinin dağılımının homojen olup olmadığını izleyebilmek için partikül boyutu ve partiküllerin dağılımı SEM analizi ile incelenmiştir. Nanopartiküllerin homojen bir şekilde film içerisinde dağıldığı görülmektedir. Hazırlanan boş nanopartiküllerin, 5-FU yüklü ve karmofur yüklü nanopartiküllerin boyutları ve dağılımı aşağıda şekil 4.7, şekil 4.8, şekil 4.9 da gösterilmektedir.



Şekil 4. 7: Polimerik boş nanopartiküllerin SEM görüntüleri.

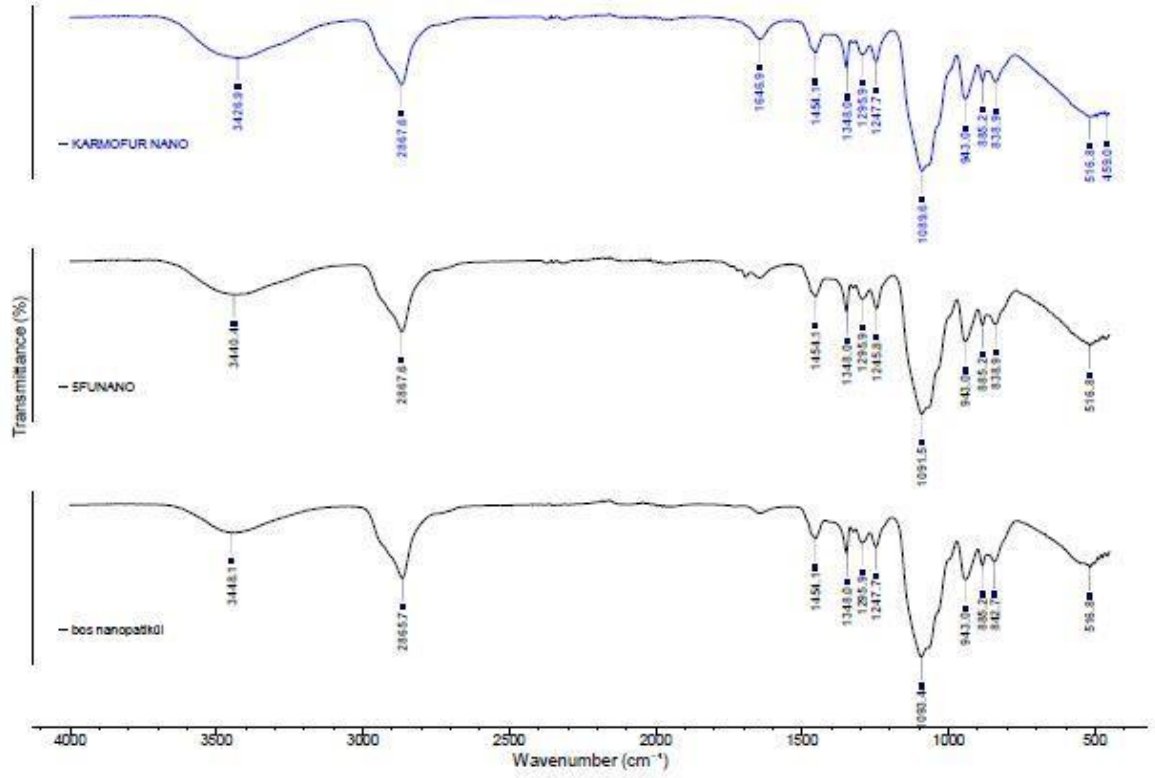


Şekil 4. 8. Karmofur yüklü nanopartiküllerin SEM görüntüleri.



Şekil 4. 9: 5-FU yüklü nanopartiküllerin SEM görüntüleri.

4.4. Polimerik Nanopartiküllerin FTIR (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi) Analizi Sonuçları



Şekil 4. 10: Boş Nanopartiküller ile Karmofur ve 5-FU yüklenmiş nanopartiküllerin FTIR analizleri

Moleküllerdeki bağların özelliklerini yansıtan FTIR analizleri şekil 4.10'da görülmektedir.

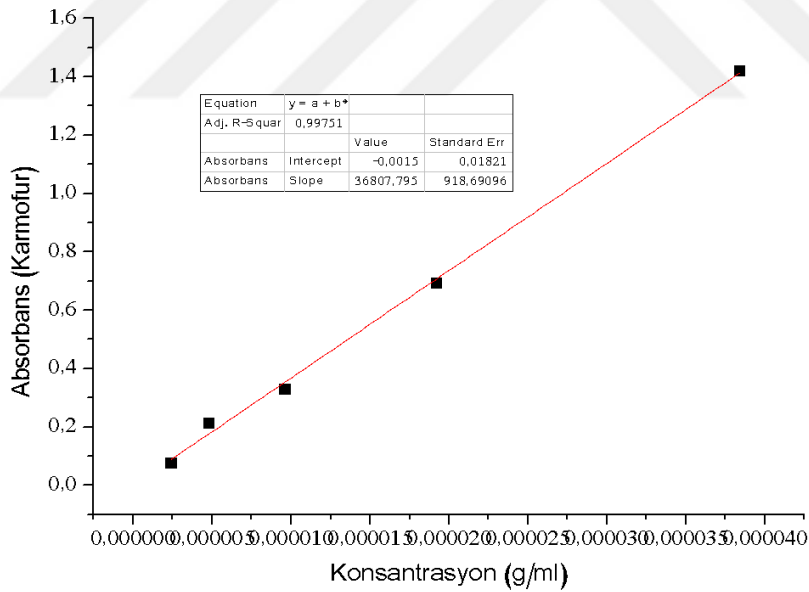
4.5. Stabilite Sonuçları

Stabilite testleri nanotaşıyıcıya yüklenmiş 5-FU ve karmofur nanopartikülleri için yürütülmüştür. Yapılan incelemelerde 5-FU ve karmofur polimerik nanopartiküllerinin her ikisi de 6 ay +4 °C'de bekletilmiş ve çökme, bulanıklık gibi herhangi bir gözle görülür değişiklik gözlenmemiştir. Ayrıca 6 ay sonunda tekrar alınan DLS ölçümlerinde önceki ölçümlere benzer partikül boyutları tespit edilmiş, partikül dağılımının ise % 90'ın üzerinde 6 ay öncekilere benzer boyutlarda olduğu görülmüştür. 25 °C'de 3 ay stabil bir şekilde bekletildiğinde ise, yine dibe çökme ya da bulanıklık gibi gözle görülür bir değişiklik gözlenmemiştir.

4.6. Karmofur ve 5-FU Konsantrasyon-Absorbans Grafikleri

Karmofur ve 5-FU'ya ait kalibrasyon doğrusu Şekil 4.11 ve Şekil 4.12 de görülmektedir. Bu ilaçların her biri için 5 farklı konsantrasyon hazırlandı ve UV (UltraViolet) cihazı ile analiz edildi. Elde edilen çözeltilerin konsantrasyonlarına karşı grafik halinde kalibrasyon doğrusuna ait lineer regresyon denklemi hesaplandı. Karmofur ve 5-FU'nun UV ile miktar tayini sonucu lineer regresyon verileri aşağıdaki şekilde yer almaktadır. 190 - 400 nm dalga boyu aralığında bu konsantrasyonların UV spektrumu alındı ve maksimum absorbans (λ_{max}) gösterdiği dalga boyu belirlendi. Karmofur için dalga boyu 267 nm, 5-FU için dalga boyu 290 nm olarak tespit edildi. Regresyon analizi sonucunda elde edilen veriler salım çalışmalarında kullanılmıştır.

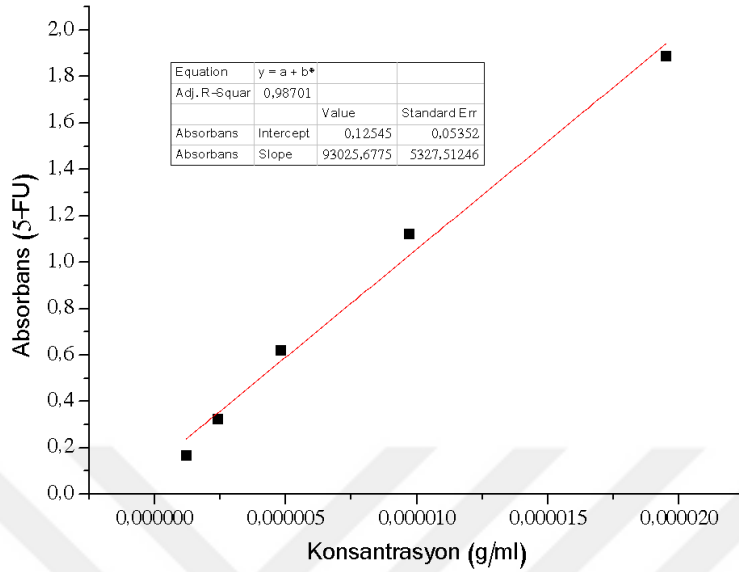
Karmofur Konsantrasyon-Absorbans Grafiği



Şekil 4. 11: Serbest Karmofur'a ait kalibrasyon doğrusu ve regresyon denklemi

Karmofur molekülünün UV ile analizi sonucunda 240 nm dalga boyunda olduğu tespit edilmiştir.

Fluorourosil Konsantrasyon-Absorbans Grafiği



Şekil 4. 12: Serbest 5-FU'ya ait kalibrasyon doğrusu ve regresyon denklemi

5-FU molekülünün UV ile analizi sonucunda 267 nm dalga boyunda olduğu tespit edilmiştir.

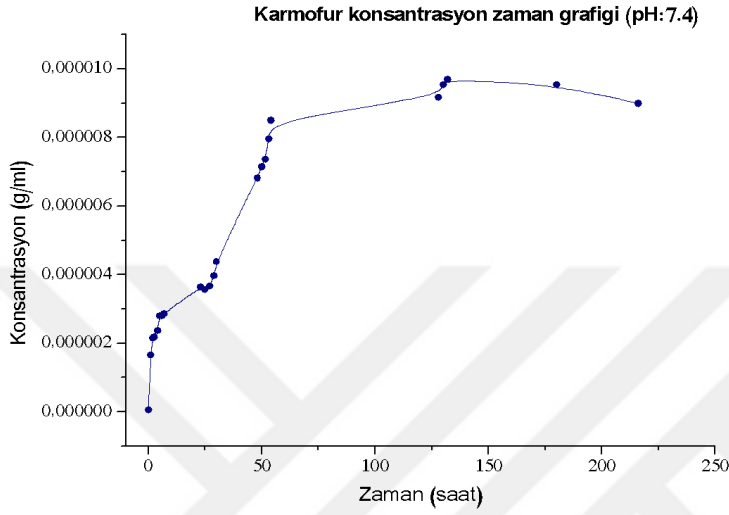
Karmofurun ve 5-FU'nun her ikisinin de lineer bir grafiğe sahip olduğu şekil 4.11 ve 4.12 de görülmektedir.

4.7. *İn vitro* İlaç Salım Çalışmaları

İn vitro salım çalışmaları diyaliz membran kullanılarak, 37 °C'de gerçekleştirildi. pH 7,4 ve pH 1,2 lik 2 farklı tampon çözelti içinde salım sonuçları değerlendirildi. Zamana bağlı olarak yüzde kümülatif salım miktarları ve bağıl standart sapmalar sonucunda, salım miktarları şekil 4.13, şekil 4.14, şekil 4.15, şekil 4.16, şekil 4.17'da verilmiştir. Karmofur yüklenmiş nanopartiküllerin pH:7,4 de, yüzde 48 oranında, 5-FU yüklenmiş nanopartiküllerin kümülatif olarak yaklaşık yüzde 8 oranında salım yaptığı gösterilmiştir. pH 1,2 deki salımın ise her iki bileşik için de pH 7,4'e oranla oldukça düşük olduğu görülmektedir.

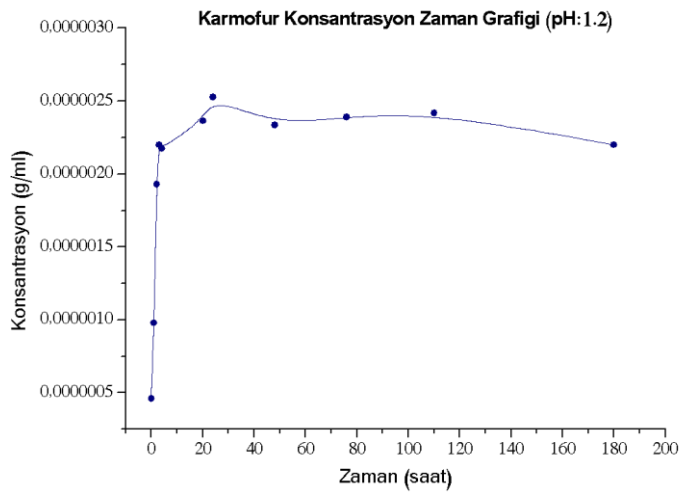
Salım sonuçlarına göre karmofur yüklenmiş nanopartiküllerin, 5-FU yüklenmiş nanopartiküllerden daha iyi salım gerçekleştirdiği gösterilmiştir (Şekil 4.13)

Karmofur Yüklenmiş Nanopartiküllerin Zamana Bağlı Salım Miktarları



Şekil 4. 13: Karmofur yüklenmiş nanopartiküllerin pH:7,4 de zamana bağlı olarak salım miktarı gösterilmektedir.

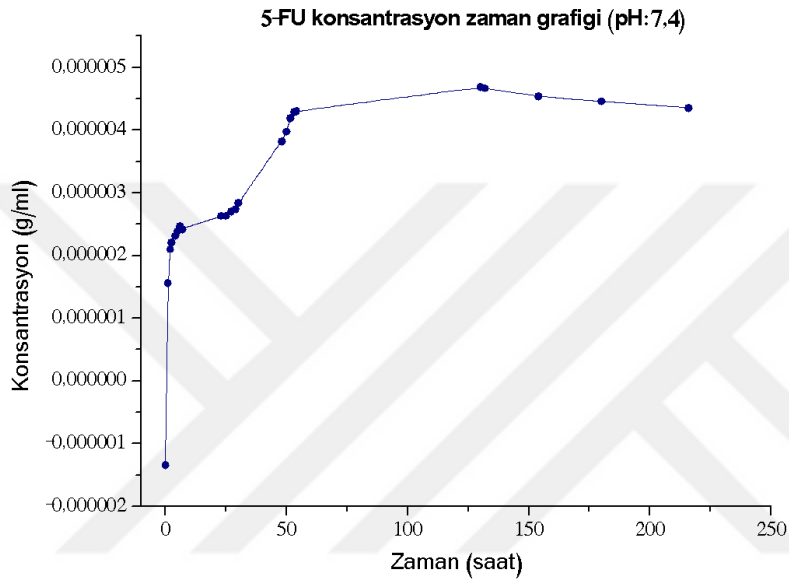
Nano Karmofur bileşiğinin *in vitro* salımının ilk 50 saat içinde önemli oranda gerçekleştiği gözlenmektedir.



Şekil 4. 14: Karmofur yüklenmiş nanopartiküllerin pH:1,2 de zamana bağlı olarak salım miktarı gösterilmektedir.

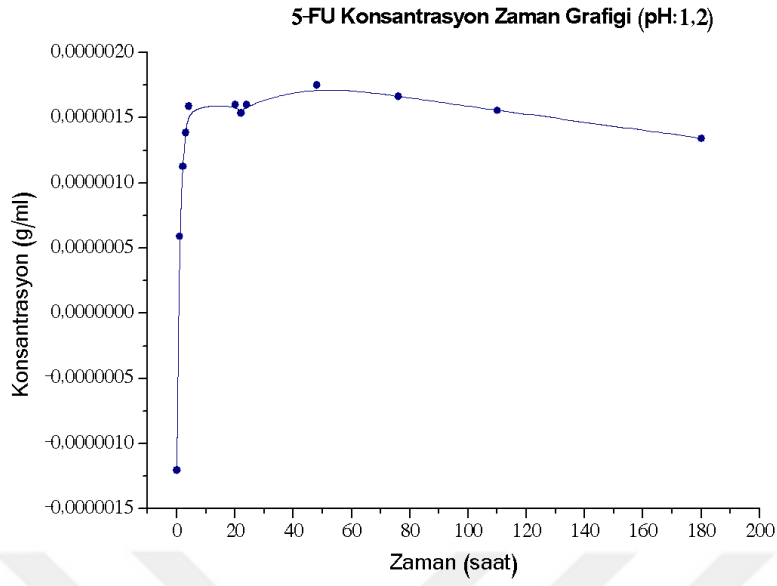
pH 1,2 de ilk saat içinde salım gözlenirken, devam eden süreçte salımın gerçekleşmediği görülmektedir.

Fluorourosil Yüklendi Nanopartiküllerin Zamana Bağlı Salım Miktarları



Şekil 4. 15: 5-FU yüklendi nanopartiküllerin pH:7,4 de zamana bağli olarak salım miktarı gösterilmektedir.

Yukarıdaki şekilde 5-FU yüklendi nanopartiküller için *in vitro* salımının ilk 1-2 saat içinde önemli oranda gerçekleştiği, ilk 50 saat içinde ise neredeyse tamamlandığı gözlenmektedir.

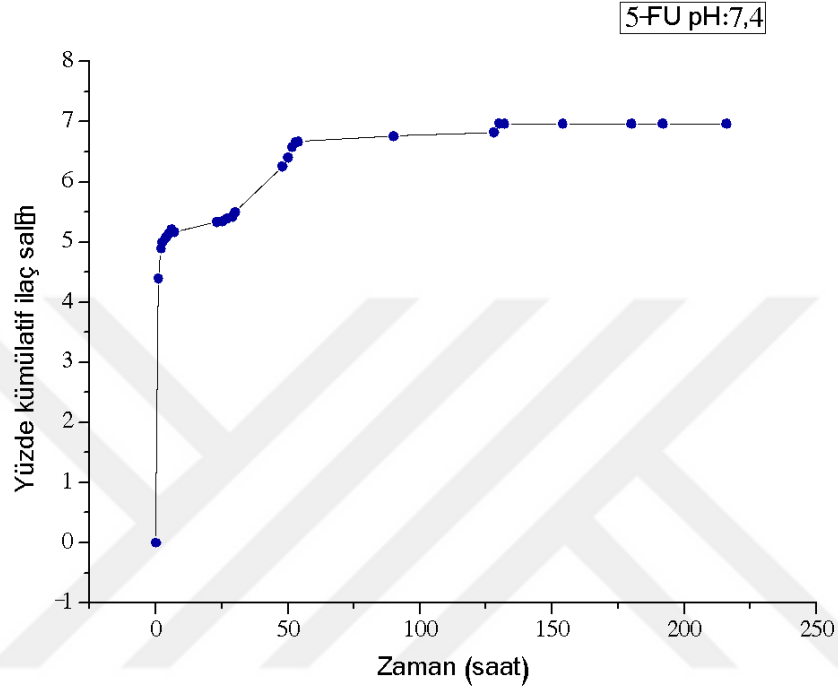


Şekil 4. 16: 5-FU yüklenmiş nanopartiküllerin pH:1,2 de zamana bağlı olarak salım miktarı gösterilmektedir.

pH 1,2 de ilk saat içinde salım gözlenirken, devam eden süreçte salımın gerçekleşmediği görülmektedir.

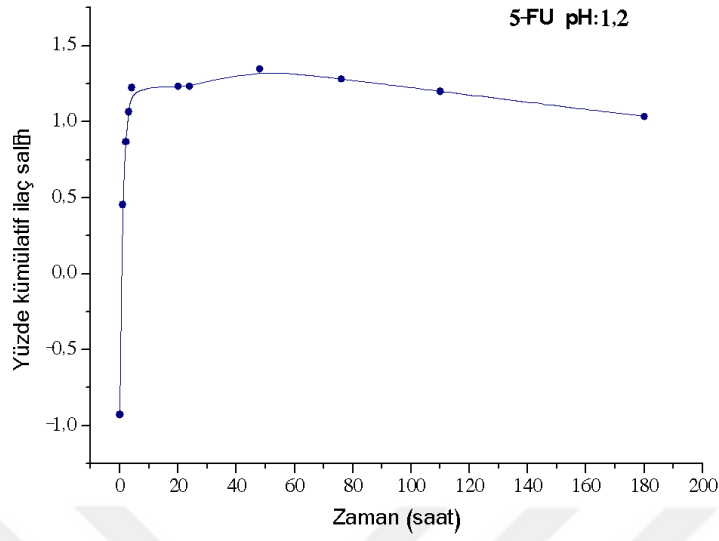
4.8. KÜMÜLATİF YÜZDE SALIM DOĞRULARI

Fluorourosil Yüklenmiş Nanopartiküllerin Zamana Karşılık Kümülatif Yüzde Salım Grafikleri



Şekil 4. 17: 5-FU yüklenmiş nanopartiküllerin pH:7,4 de zamana bağlı kümülatif yüzde salım oranı gösterilmektedir.

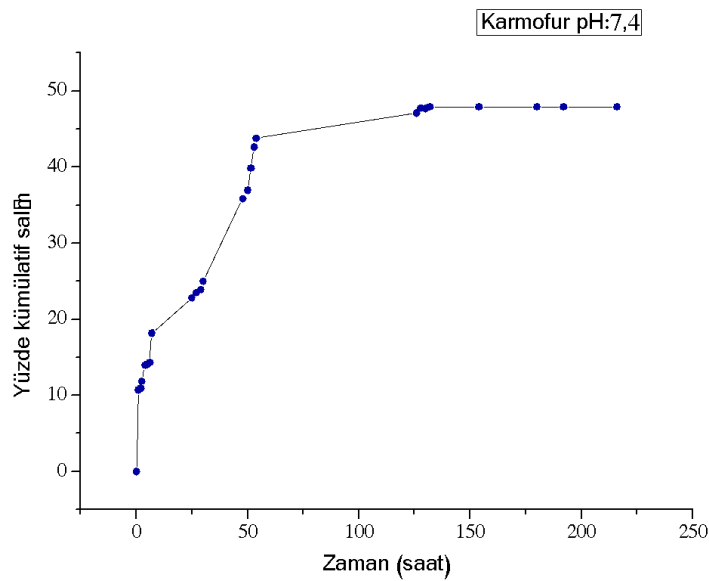
5-FU yüklenmiş nanopartiküller için 50-60 saaten sonra salımın tamamlandığı görülmektedir.



Şekil 4. 18: 5-FU yüklenmiş nanopartiküllerin pH:1,2 de zamana bağlı kümülatif yüzde salım oranı gösterilmektedir.

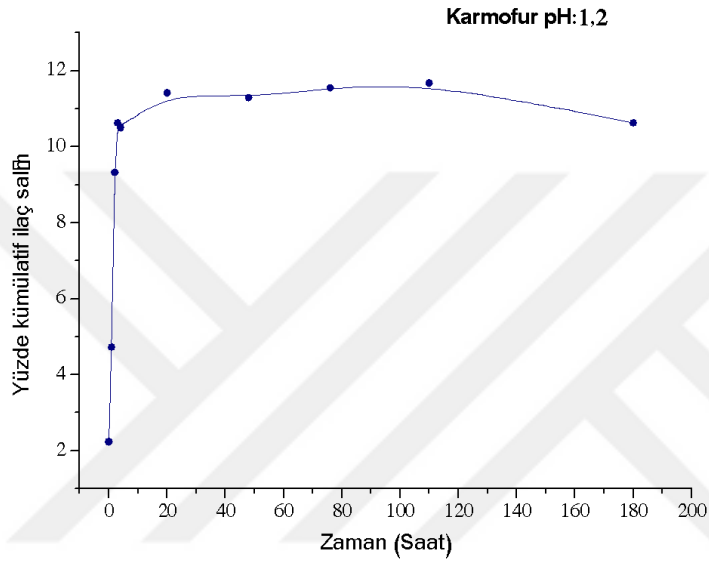
pH:1,2'de salımın pH:7,4'e göre çok az miktarda olduğu ve ilk saatten sonra nanopartiküllerin hiç salınmadığı görülmektedir.

Karmofur Yüklenmiş Nanopartiküllerin Zamana Karşılık Kümülatif Yüzde Salım Grafikleri



Şekil 4. 19: Karmofur yüklenmiş nanopartiküllerin pH:7,4 de zamana bağlı kümülatif yüzde salım oranı gösterilmektedir.

Karmofur yüklenmiş nanopartiküller için 50-60 saaten sonra salımın tamamlandığı görülmektedir.

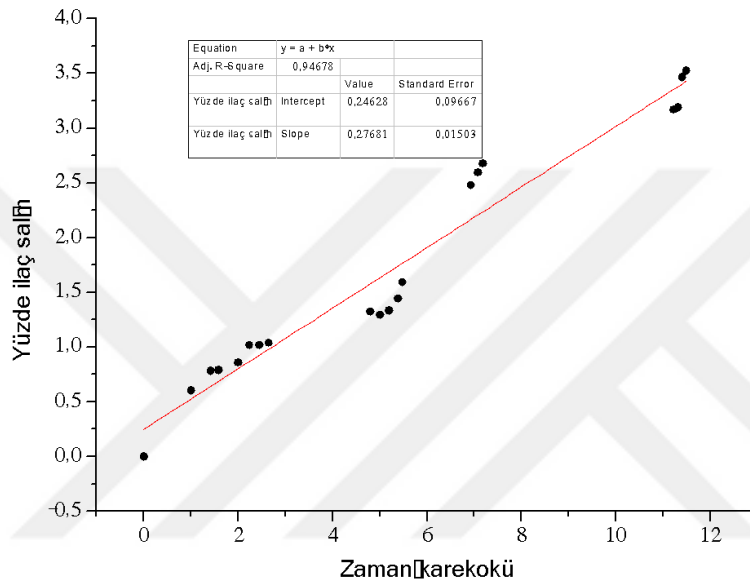


Şekil 4. 20: Karmofur yüklenmiş nanopartiküllerin pH:1,2 de zamana bağlı kümülatif yüzde salım oranı gösterilmektedir.

pH:1,2'de salımın pH:7,4'e göre çok az miktarda olduğu ve ilk saatten sonra nanopartiküllerin hiç salınmadığı görülmektedir.

4.9. HIGUCHİ KİNETİĞİ

Higuchi modeli, ilacın çözünmeyen bir matristen zamana bağlı olarak serbest bırakılmasını açıklar, difüzyon kontrollü bir şekilde gerçekleşir. Bizim ilaç salım kinetiğimizin, farklı kinetik modeller arasında Higuchi modeline uygunluk gösterdiği şekil 3.20 de görülmektedir.



Şekil 4. 21: Higuchi ilaç salım kinetiği.

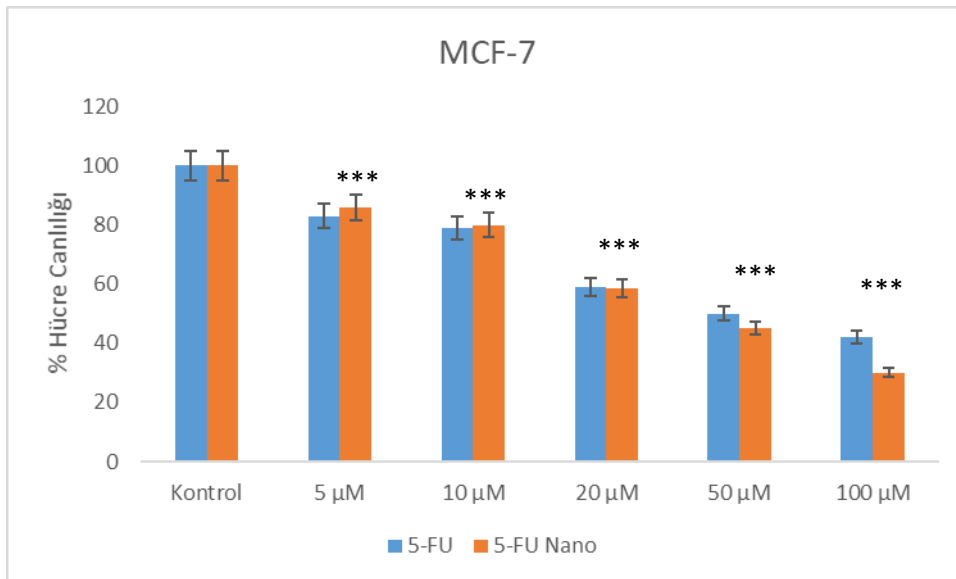
4.10. SİTOTOKSİSİTE SONUÇLARI

MDA-MB-231 ve MCF-7 ve HUVEC hücreleri için 5-FU, Karmofur ve Nano 5-FU, Nano Karmofur bileşiklerinin IC₅₀ değerleri aşağıdaki tabloda gösterilmektedir.

Tablo 4. 2: Meme kanseri (MDA-MB-231 ve MCF-7) ve endotel (HUVEC) hücrelerinde 5-FU, Karmofur ve Nano 5-FU, Nano Karmofur'un IC₅₀ değerleri

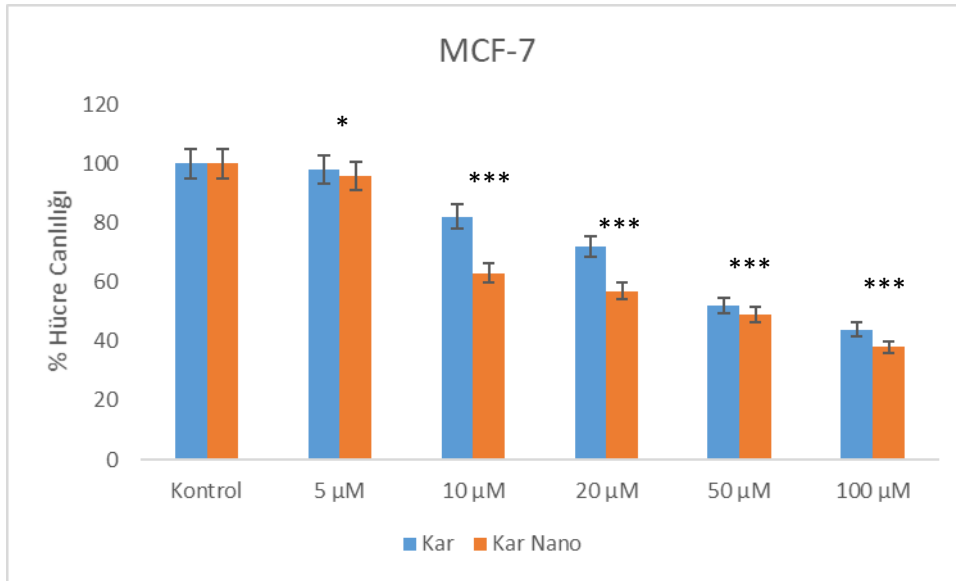
	MCF 7	MDA MB 231	HUVEC
Serbest 5-FU	50 μ M	80 μ M	90 μ M
Nano-5FU	45 μ M	110 μ M	>100 μ M
Serbest Karmofur	52 μ M	90 μ M	>100 μ M
Nano-Karmofur	50 μ M	115 μ M	>100 μ M
Boş Nanopartikül	Etkisiz	Etkisiz	Etkisiz

MCF-7 Hücrelerinde Sitotoksosite Sonuçları



Şekil 4. 22: MCF-7 hücre serilerinde serbest 5-FU ve nano 5-FU nun hücre canlılığı üzerindeki etkileri

(*** P<0.001)



Şekil 4. 23: MCF-7 hücre serilerinde serbest karmofur ve nano karmofurun hücre canlılığı üzerindeki etkileri.

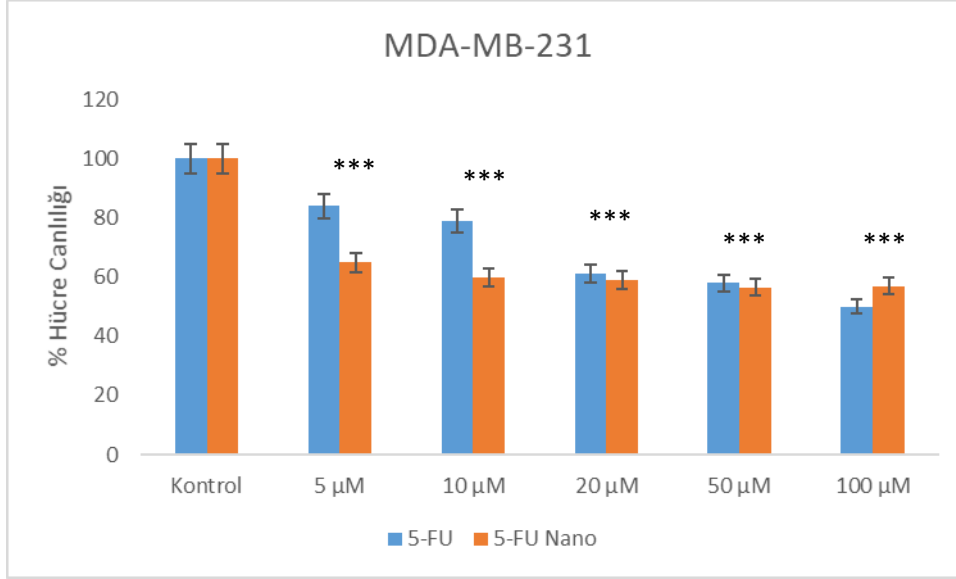
(Kar: Karmofur)

(* $P < 0,05$), (*** $P < 0,001$)

IC_{50} oranları, MCF-7 hücre serisinde 5-FU için serbest ilaçta $IC_{50} = 50 \mu M$ iken, nano 5-FU için $45 \mu M$ olarak tespit edildi.

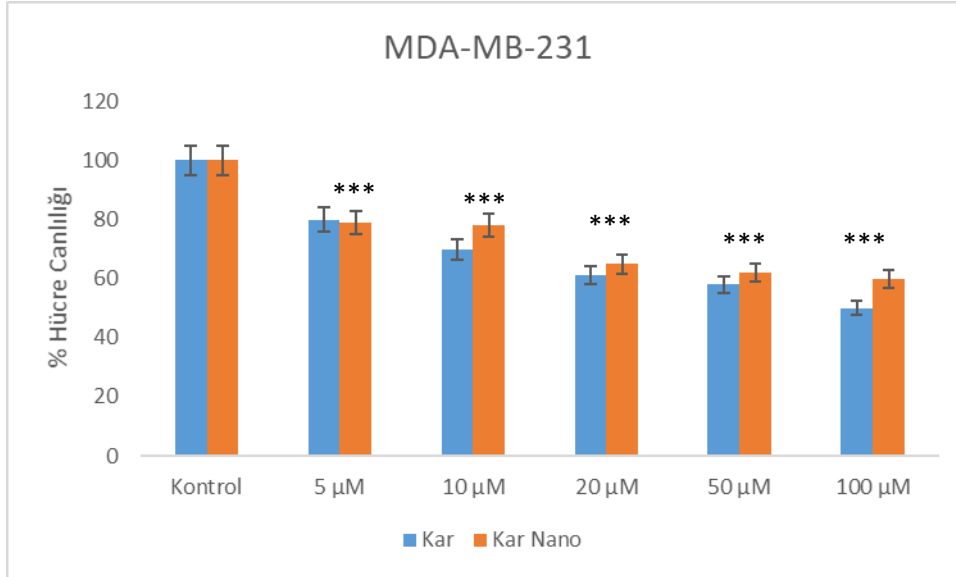
Karmofur için ise MCF-7 hücre serisinde serbest ilaçta $IC_{50} = 52 \mu M$ iken, nano karmofur için $IC_{50} = 50 \mu M$ olarak tespit edildi. Nano karmofurun salım oranı 5-FU' ya göre yüksek fakat sitotoksik etkinliği az bulundu.

MDA-MB-231 Hücrelerinde Sitotoksosite Sonuçları



Şekil 4. 24: MDA-MB-231 hücre serilerinde serbest 5-FU ve nano 5-FU nun hücre canlılığı üzerindeki etkileri

(*** P<0.001)



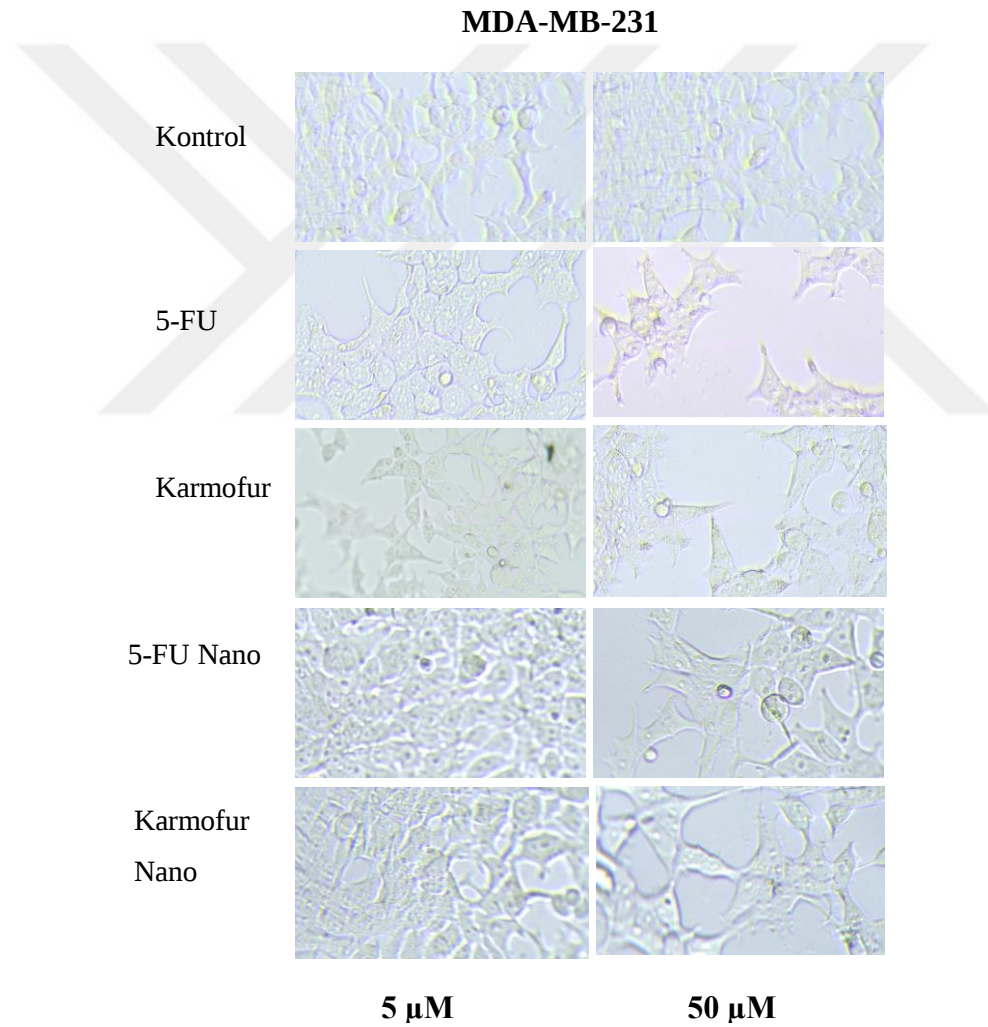
Şekil 4. 25: MDA-MB-231 hücre serilerinde serbest karmofur ve nano karmofurun hücre canlılığı üzerindeki etkileri

(*** P<0.001)

MDA-MB-231 hücre serisindeki bulgularımızı değerlendirdiğimizde, 5-FU için serbest ilaçta IC_{50} değeri, 80 μM iken, nano 5-FU için 110 μM olarak tespit edildi.

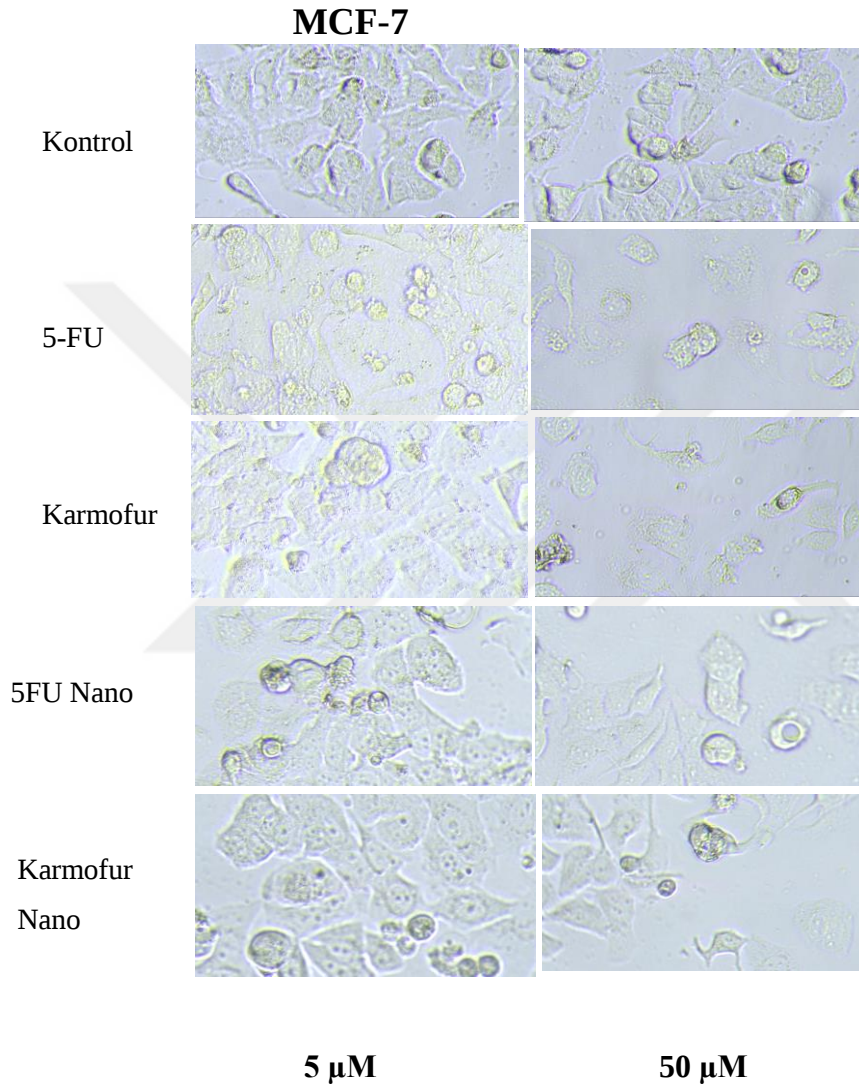
Karmofur için ise bu hücre serisinde serbest ilaçta $IC_{50} = 90 \mu M$ iken, nano karmofur için $IC_{50} = 100 \mu M$ olarak tespit edildi. Karmofurun salım oranı 5FU' ya göre yüksek fakat MDA-MB-231 hücreleri için de sitotoksik etkinliği daha az bulundu.

Çalışmamızda hücreler arasında, MCF-7 hücre serisinde sitotoksik aktivite daha yüksek ve çalıştığımız bileşikler arasında da 5-FU 'nun nano formu daha etkili bulunmuştur. MDA-MB-231 hücre serisinde ise sitotoksik aktivite daha düşüktür.



Şekil 4. 26: MDA-MB-231 hücrelerinin ışık mikroskopunda görünümü.

MDA-MB-231 hücreleri yüzeye yayılmış ve birbirine bağlantılı bir durumda görülmektedir. 5FU, Karmofur ve bunların nano formları uygulandığında ise hücrelerin bazılarında, hacimlerinde ve sitoplazmik uzantılarındaki artışın aksine, bazılarında küçülme ve yuvarlak hücre şekli görülmektedir; hücreler arasında bağlantıların ve hücre sayısının azaldığı dikkati çekmektedir. Büyütme: X200

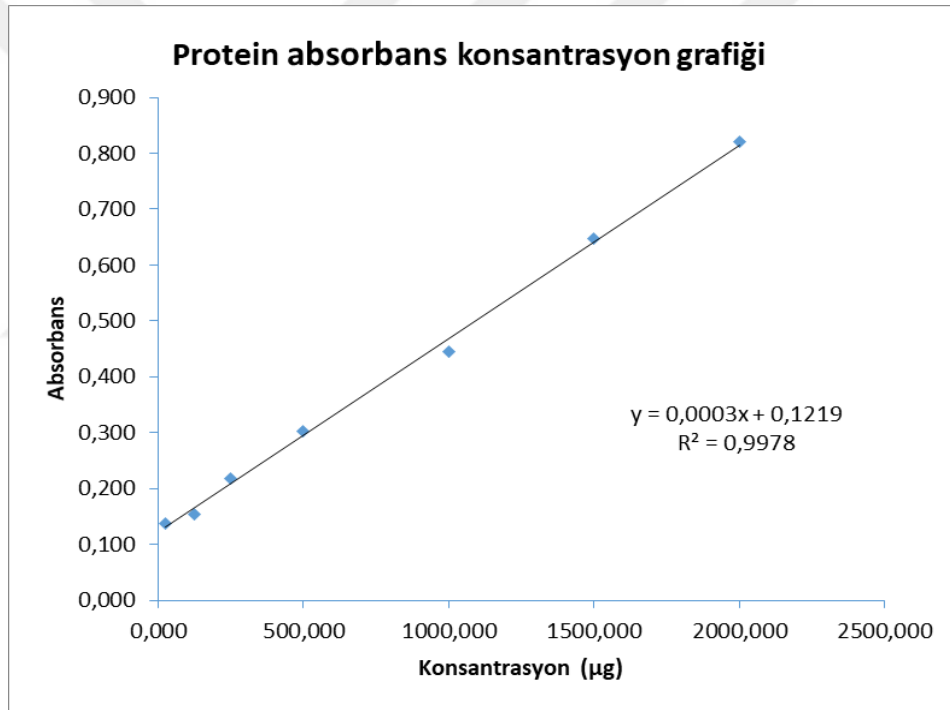


Şekil 4. 27: MCF-7 hücrelerinin ışık mikroskopunda görünümü.

MCF-7 hücreleri yüzeye yayılmış ve birbirine bağlantılı durumda gözlenmektedir. 5-FU, karmofur ve bunların nano formları uygulandığında ise MCF-7 hücrelerinin bazılarında, hacimlerinde ve sitoplazmik uzantılarındaki artışın aksine, bazılarında küçülme ve yuvarlak hücre şekli, vakuollerin arttığı, yapıştığı zeminden kalktığı görülmektedir; hücreler arasında bağlantıların ve hücre sayısının azaldığı dikkati çekmektedir. Büyütme: X200

4.11. WESTERN BLOT ANALİZLERİ

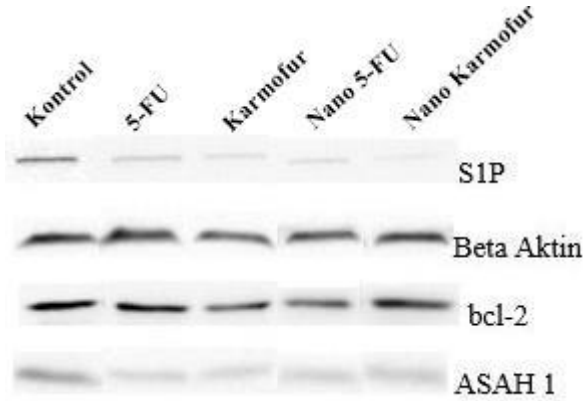
Western blot çalışmasında, MCF-7, MDA-MB-231 ve HUVEC hücreleri için ayrı ayrı aktin miktarları tespit edilerek kontrol olarak kullanıldı. Ayrıca, hücrelerde bulunan ASAH1, S1P ve Bcl-2 enzim protein miktarları ilaçla muamele edilmeden ve 5-FU, Karmofur, nano 5-FU, nano karmofur ile ayrı ayrı IC₅₀ değerinde hücreler ile inkübasyondan sonra tespit edildi. Değerlendirilen proteinlerin miktarı, her birinin aktin miktarlarına oranlanarak hesaplandı. Hesaplamalarda ImageJ® programı kullanılmıştır.



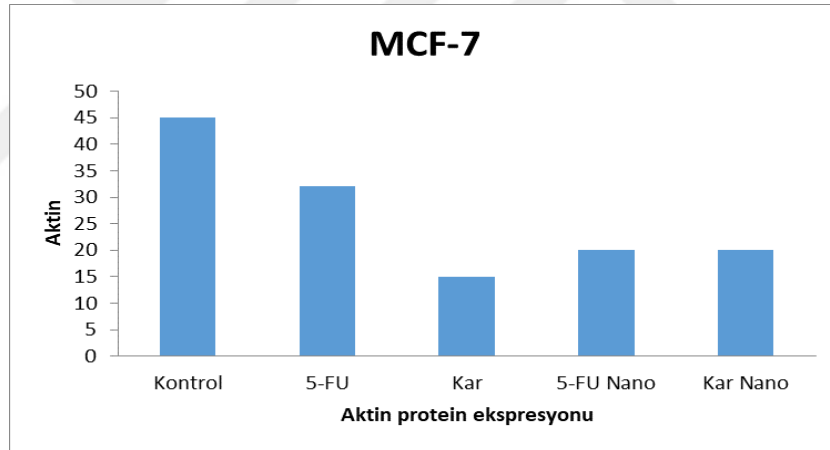
Şekil 4. 28: Protein konsantrasyon absorbans grafiği.

(Protein miktarı hesaplamalarında kullanıldı.)

4.11.1. MCF-7 Hücre Serilerinde Western Blot Analizleri

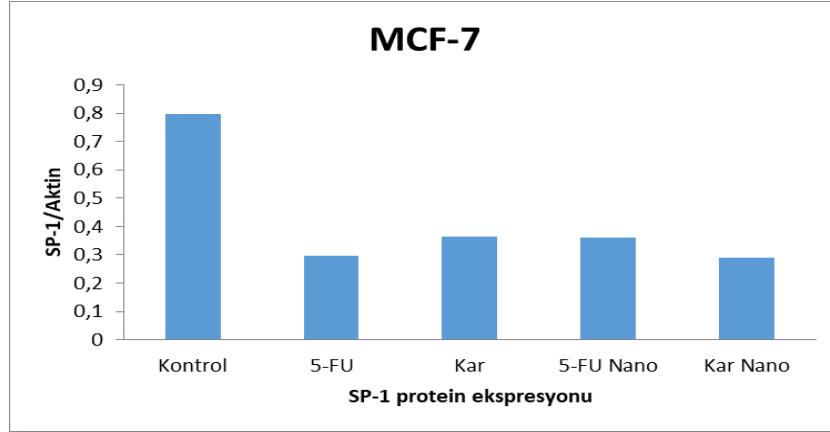


Şekil 4. 29: MCF-7 hücrelerinde görülen protein ekspresyonları



Şekil 4. 30: MCF-7 için Aktin ekspresyon seviyeleri.

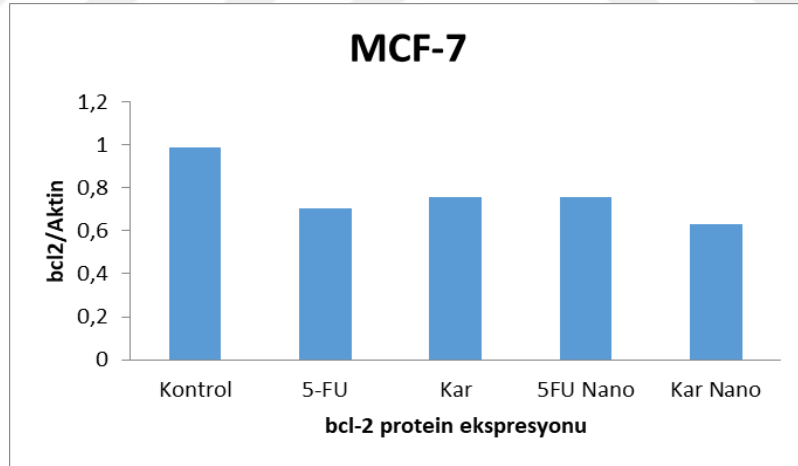
İmageJ® programı ile hesaplanmıştır.



Şekil 4. 31: MCF7 için S1P ekspresyon seviyeleri

*İmageJ® programı ile hesaplanmıştır.

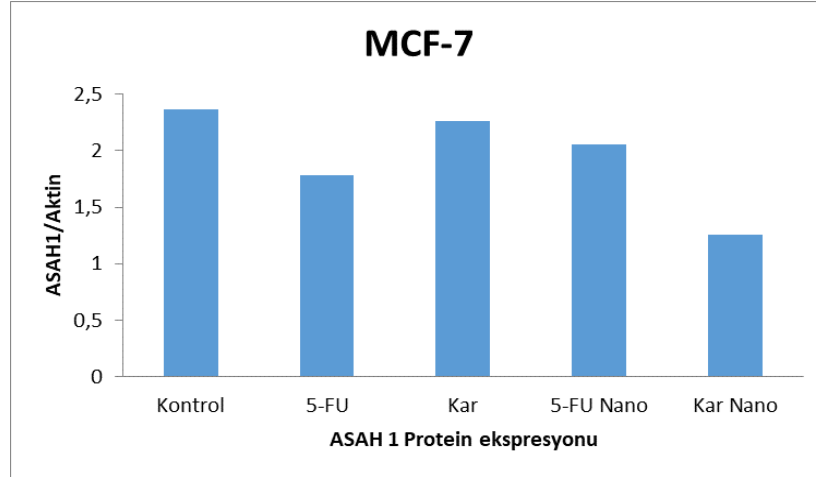
MCF-7 hücrelerinde S1P miktarında kontrole göre belirgin bir azalma görülmektedir, özellikle 5-FU ve Nano Karmofur'da daha fazla bir azalma söz konusu olmaktadır.



Şekil 4. 32: MCF7 için Bcl-2 ekspresyon seviyeleri

*İmageJ® programı ile hesaplanmıştır.

MCF-7 hücrelerinde Bcl-2 miktarında kontrole göre bir azalma görülmektedir, özellikle Nano Karmofur'da daha belirgin bir azalma söz konusu olmaktadır.

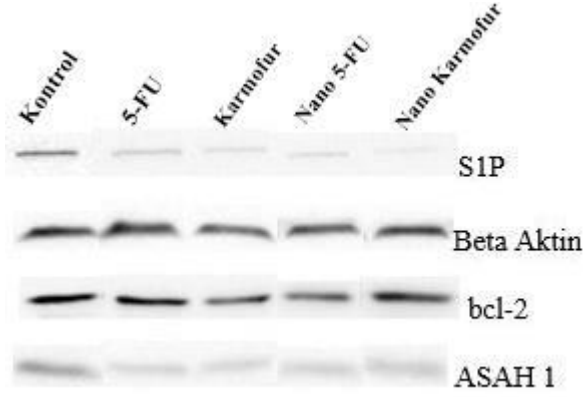


Şekil 4. 33: MCF-7 için ASAHI ekspresyon seviyeleri

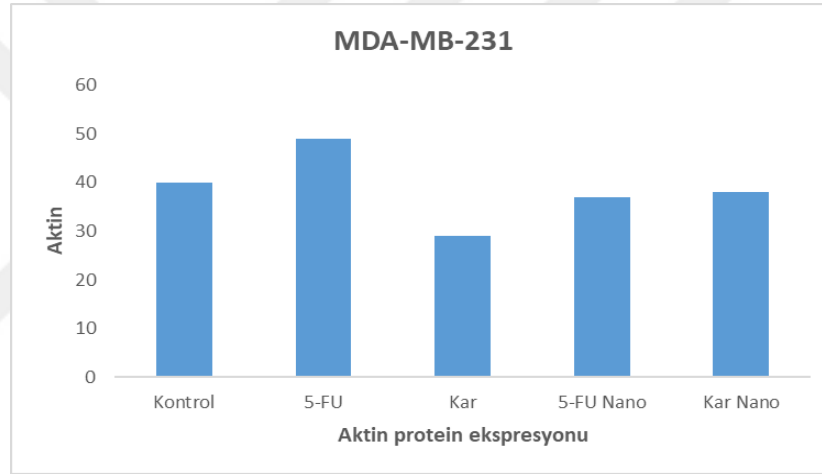
İmageJ® programı ile hesaplanmıştır.

MCF-7 hücrelerinde genel olarak ASAHI miktarında kontrole göre bir azalma gözlenmektedir, özellikle serbest karmofurda ASAHI miktarı çok değişmezken, Nano Karmofur'da belirgin bir azalma olması dikkat çekmektedir.

4.11.2. MDA-MB-231 Hücre Serilerinde Western Blot Analizleri

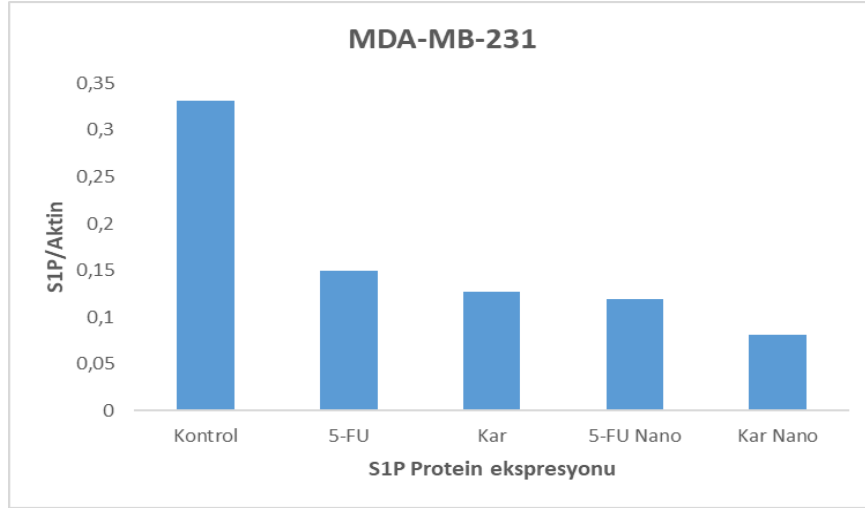


Şekil 4. 34: MDA-MB-231 hücrelerinde görülen protein ekspresyonları



Şekil 4. 35: MDA-MB-231 için Aktin ekspresyon seviyeleri.

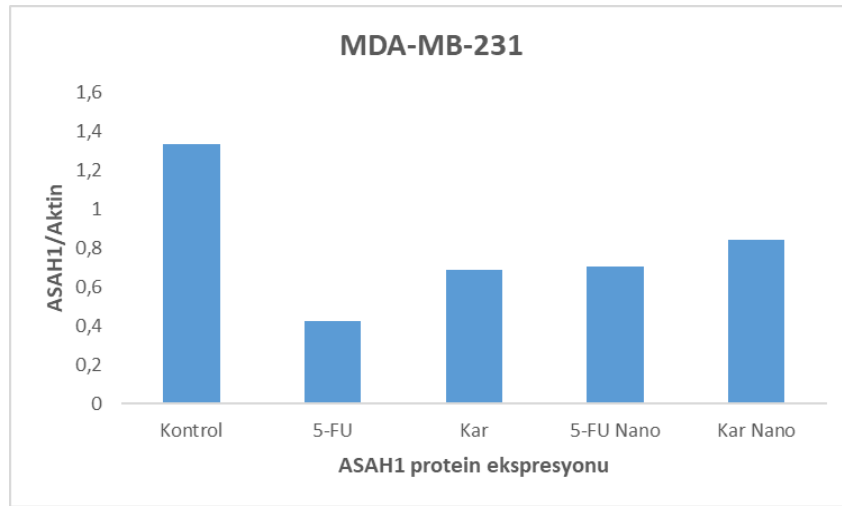
İmageJ® programı ile hesaplanmıştır.



Şekil 4. 36: MDA-MB-231 için S1P ekspresyon seviyeleri.

İmageJ® programı ile hesaplanmıştır.

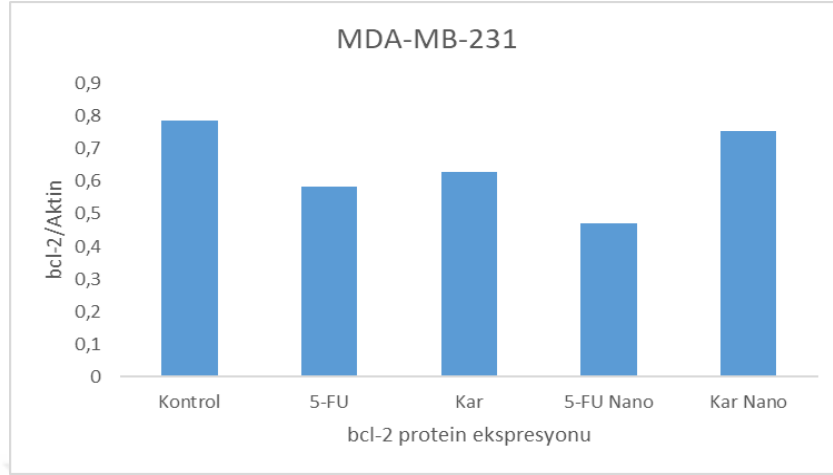
MDA-MB-231 hücrelerinde S1P miktarında kontrole göre önemli oranda azalma görülmektedir, özellikle Nano Karmofur'da daha belirgin bir azalma söz konusu olmaktadır.



Şekil 4. 37: MDA-MB-231 için ASAHI ekspresyon seviyeleri.

İmageJ® programı ile hesaplanmıştır.

MDA-MB-231 hücrelerinde ASAHI miktarında kontrole göre azalma görülmektedir, özellikle serbest 5-FU da daha belirgin bir azalma söz konusu olmaktadır.

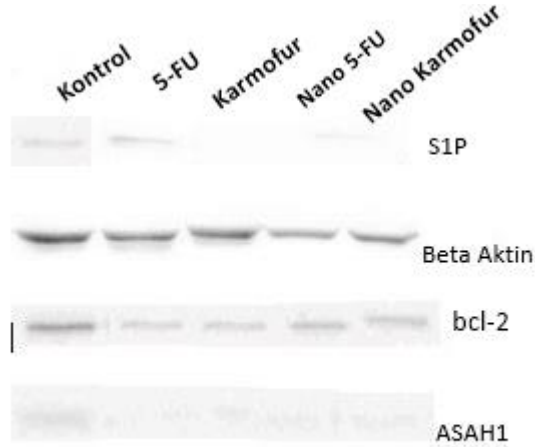


Şekil 4. 38: MDA-MB-231 için ASAHI ekspresyon seviyeleri.

ImageJ® programı ile hesaplanmıştır.

MDA-MB-231 hücrelerinde Bcl-2 miktarında kontrole göre bir azalma görülmektedir.

4.11.3. HUVEC Hücre Serilerinde Western Blot Analizleri



Şekil 4. 39: HUVEC hücrelerinde görülen protein ekspresyonları

HUVEC hücrelerinde ASAH1 miktarında kontrole göre azalma görülmektedir. Ancak ASAH1 miktarının HUVEC kontrolde de diğer hücelere (MDA-MB-231, MCF-7) kıyasla oldukça düşük miktarda olduğu dikkat çekmektedir.

HUVEC hücrelerinde ASAH1 miktarında kontrole göre azalma görülmektedir. Ancak şekil 4.39'daki S1P miktarlarına bakıldığında MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerine göre S1P miktarlarının oldukça düşük olduğu görülmektedir.



5. TARTIŞMA

Son yıllarda kanser tüm dünyada en yaygın olan ve bir çok sorunu beraberinde getiren hastalıkların başında gelmektedir (Li ve ark 2017). Kemoterapi, kanser hücresi çoğalmasını, hastalığın ilerlemesini ve metastazı baskılamak için sıklıkla kullanılan tedavilerdendir. Bununla birlikte, kemoterapötik ilaçlar, bazı durumlarda sadece çoğalan kanser hücrelerini öldürmekle kalmayıp, aynı zamanda normal hücrelerde de toksik etkilere neden olabilmektedir. Bu nedenle, yan etkileri azaltacak, kemoterapinin etkinliğini artıran ve geliştiren yeni antitümör ilaç arayışları devam etmektedir.

Nanoteknolojik gelişmeler sayesinde hedefe yönelik tedaviler konusunda bir çok yenilikler geliştirilmektedir. İlaçların hedefe yönlendirilmesiyle birlikte kanser hücrelerinde ilaç konsantrasyonları artırılabilirken, sağlıklı hücrelerdeki toksisite azaltılmaya çalışılmaktadır (Oylar ve Tekin, 2011).

Yaptığımız çalışmada meme kanseri tedavisinde kullanılan kemoteropatik ilaçlardan biri olan 5-FU ve onun türevi olan karmofuru kullandık. Yeni sentezlenen 5-FU ve karmofur yüklü polimerik nanopartiküllerin, serbest 5-FU ve serbest karmofurun sitotoksik ve antiproliferatif etkilerini, ASAHI, S1P ve Bcl-2 protein ekspresyonları üzerindeki etkilerini, MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerinde araştırdık. Serbest 5-FU, karmofur ve bu ilaçların 10-100 μ M konsantrasyon aralığında polimerik nanotaşıyıcıya yüklenmesiyle hazırlanan partiküllerin, hücreler üzerinde sitotoksik etkileri olduğunu tespit ettik. Serbest 5-FU, serbest karmofur ve bunların nano formülasyonlarının 72 saat sonunda sitotoksik etkisi, özellikle MCF-7 hücreleri üzerinde oldukça anlamlı bulunmuştur (Tablo 4.2).

Ayrıca nanotaşıyıcıya yüklenmiş olan polimerik nanopartiküllerimiz, 5-FU ve karmofurun salım oranına baktığımızda özellikle 5-FU (yaklaşık % 7 salım) için oldukça düşük oranlarda salınmasına rağmen sitotoksik etkisi oldukça anlamlıdır. Polimerik nanotaşıyıcıya yüklediğimiz, karmofurun daha yüksek (yaklaşık % 47) salım oranı olduğu görülmektedir. Nano-karmofurun salımı daha yüksek oranda olmasına rağmen, sitotoksik aktivitesinin nano-5-FU'ya göre daha az olduğu bulundu. Bunlar da göz önüne alındığında nanotaşıyıcıya yüklediğimiz nano-ilaçların göz ardı edilemeyecek şekilde etkili olduğunu söyleyebiliriz.

Ayrıca nanoformülasyonda kullandığımız PEG ve rosin esterinin biyolojik olarak uyumlu olduğu bilinmektedir. Hedef hücreler ve dokularda ilaç etkinliğini artırmak ve immun sistem tarafından tanınarak fagosite edilmesini önlemek için nanopartiküllerin yüzeyinin PEG ile kaplanması yaygın olarak kullanılan bir yaklaşımdır (Kumar ve Gupta 2013, Suk ve ark 2016).

Uzun yıllar yürütülen çalışmalar sonucunda, 5-FU'nun etkisi daha iyi anlaşılmaya başlanmış ve birçok kanserde kullanımı sayesinde antikanser aktivitesini artıran yeni stratejilerin geliştirilmesine öncü olmuştur. 5-FU genellikle i.v. (intravenöz) yolla kullanıldığında (Kim ve ark 2001), antikanser etkilerini, timidilat sentetazın inhibe edilmesi ve metabolitlerinin RNA ve DNA'ya bağlanması yoluyla yapar. Bunlara rağmen, ilaç direnci, 5-FU'nun klinik kullanımı için önemli bir sınırlayıcı olmaya devam etmektedir (Longley ve ark 2003).

Karmofur, 1-heksilkarbomoil-5-florourasil olarak da bilinen, intraselüler timidilat sentazı inhibe eden ve 5-FU'e benzer (çok küçük moleküler farklılığı olan) bir bileşik olarak, oral yoldan alınan bir ilaçtır. Çin, Japonya ve Finlandiya'daki kolorektal kanser hastaları için destekleyici kemoterapi olarak karmofur kullanımının sağkalımı uzattığı bildirilmektedir (Koyama ve ark 1981, Davis 1982).

Nanoteknoloji sayesinde tümörlerin erken teşhis edilebilmesi de mümkün olabilmektedir. Aynı zamanda nanoyapıların tek bir tümör hücresine bile girebilme potansiyeline sahip olmaları sayesinde, klasik görüntüleme tekniklerine göre daha hassas tanı yapılabilmektedir. Örneğin meme kanseri tümörlerinin teşhisinde mamografi ile bir milyon hücre gerekirken, nanoyapılar kullanılarak yüzden az tümör hücresi ile kanseri tespit etmek mümkün olabilmektedir (Singh, 2005).

Kanser oluşumu ve gelişimi ile ilgili olarak çok sayıda biyolojik mekanizma bulunmaktadır. Enzim reaksiyonları sonucu aktiflenen lipid yapılar, kanserin tanı, teşhis ve tedavisinde oldukça önemli rol alırlar. Lipit metabolizmasındaki yollarda pek çok enzim yer almaktadır. Bu çalışmada, bu enzimlerden biri olan asit seramidaz enziminin çalışmasını baskılayarak MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini araştırdık.

Çalışmamız sonucunda, IC_{50} oranları, MCF-7 hücre serisinde serbest 5-FU için $IC_{50}= 50 \mu M$ (mikromolar) iken, nano 5-FU için $45 \mu M$ olarak tespit edildi. Serbest karmofur için ise MCF-7 hücre serisinde $IC_{50} =52 \mu M$ iken, nano karmofur için $IC_{50} =50 \mu M$ olarak tespit edildi. Nano karmofurun salım oranı 5-FU' ya göre yüksek fakat sitotoksik etkinliği daha az bulundu. Salım sonuçlarını değerlendirdiğimizde, nanotaşıyıcıya yüklenen $3,2 \mu g$ 5-FU'nun sadece %7 sinin yaklaşık 3 günde salındığını düşündüğümüzde serbest ilaca göre çok daha düşük miktarlarda ilaç etkinliğinin sağlandığı görülmektedir. Karmofur için ise nanotaşıyıcıya yüklenen $64 \mu g$ ilacın %47 sinin yaklaşık 3 günde salındığını düşündüğümüzde serbest karmofura göre düşük miktarlarda ilaç etkinliğinin sağlandığı görülmektedir (3 gün sonrasında salım devam etmemektedir).

MDA-MB-231 hücre serisindeki bulgularımızı değerlendirdiğimizde, 5-FU için serbest ilaçta IC_{50} değeri, $80 \mu M$ iken, nano 5-FU için $110 \mu M$ olarak tespit edildi.

Karmofur için ise bu hücre serisinde serbest ilaçta IC_{50} değeri, $90 \mu M$ iken, nano karmofur için $IC_{50} =115 \mu M$ olarak tespit edildi. Karmofurun salım oranı 5-FU' ya göre yüksek fakat MDA-MB-231 hücreleri için de sitotoksik etkinliği daha az bulundu. IC_{50} değerleri birbirine yaklaşık olmasına rağmen 5-FU'nun salım oranının çok düşük bir miktarda olduğu göz önüne alındığında (kümülatif % 7), bulgular nano 5-FU nun çok daha etkili olduğunu yansıtmaktadır.

Böylece kullandığımız seramidaz inhibitörlerinin, özellikle de nanotaşıyıcıya yüklenmiş formlarının MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri üzerinde sitotoksik etkisinin (Tablo 4.1) anlamlı olduğu görülmektedir. Ayrıca kontrol amaçlı kullandığımız sağlıklı hücre hattı olan HUVEC (İnsan Kordon Veni Endotel Hücreleri) hücrelerinde sitotoksik etkinin daha az bulunması, (IC_{50} değeri yüksek) kullandığımız bileşiklerin spesifik olarak kanser hücre serileri üzerinde etkili olduğunu göstermektedir (Tablo 4.1). IC_{50} değeri ile sitotoksik etki negatif korelasyon göstermektedir.

Özetleyecek olursak, çalıştığımız meme kanseri hücreleri arasında, MCF-7 hücre serisinde sitotoksik aktivite daha yüksek bulunmuştur. MDA-MB-231 hücre serisinde ise sitotoksik aktivite daha düşüktür, çalıştığımız bileşikler arasında ise 5-

FU'nun nano formu, nano karmofura göre daha etkili bulunmuştur. Görüldüğü gibi çalışmamızda kanser hücre tipine göre sitotosik aktivite bulguları da değişiklik göstermektedir. Literatürlerde de hücre tipinin sitotoksik aktivite için etkili bir faktör olduğu bulgusu, kanser tedavisi için üzerinde durulan önemli bir bilgidir (Feng ve ark, 2018).

Yaptığımız çalışmada 10-100 μ M konsantrasyonlar 72 saat olarak uygulanmış olup, hücre kültür serileri için yeterli bir süre ve kullandığımız ilaçların da etkisini izleyebileceğimiz zaman aralığıdır. İlaç salım oranlarının ilk 1-3 saatte daha yüksek, sonraki zaman diliminde kademeli olarak azalarak, belli bir sabit değerde salınmasının devam etmesi nanoyapının etkin ve sağlıklı bir şekilde çalıştığını göstermektedir.

Başka bir çalışmada, in vitro salım çalışmaları sonucu nanopartiküllerden 5-FU'nun uzun süreli ve sürekli salımı gösterilmiştir. Poli (D, L-Laktik-ko-Glikolik Asit) (PLGA) kombinasyonlu nanopartiküller, serbest ilaca göre tümör hücre serilerine karşı doza ve zamana bağlı bir şekilde daha iyi sitotoksikite sergilemiştir (Bassiouni ve Faddah 2012). Bu sonuç bizim çalışmamızla benzer bir bulgudur. Çalışmamızda da nano 5-FU'nun düşük orandaki salımına rağmen serbest 5-FU'dan daha etkin sitotoksikite göstermesi dikkat çekmektedir.

Başka bir çalışmada hücrelerin, 5-FU yüklü nanopartiküllerin yüksek konsantrasyonlarının değil, tedaviye uygun, daha düşük konsantrasyonlarına uzun süre maruz kalmasının hücre ölümünde daha etkin olduğu gösterilmiştir (Nair ve ark 2011). PLGA ve 5-FU kombinasyonu ile MCF-7 meme kanseri ve U87MG glioma hücrelerine çalışılmış, PLGA 50-50 nanopartiküllerinin, PLGA 90-10 nanopartiküllerinden ve serbest 5-FU'dan daha iyi antitümör etkinliğine sahip olduğu gösterilmektedir (Nair ve ark 2011). Bu çalışmada da nano 5-FU düşük orandaki salımına rağmen serbest 5-FU'dan daha etkin sitotoksikite göstermiştir. Biz de çalışmamızda ilaçların etkisini görmemiz açısından 72 saat süre ile inkübasyonun yeterli olduğunu düşündük.

Patel ve ark. tarafından sıcaklık modülasyonlu katılaşma yöntemiyle serbest 5-FU ve 5-FU yüklü katı lipid nanopartiküllerin (KLN) antikanser aktivitesi Caco-2 hücre serisinde araştırılmış ve hücre canlılığında konsantrasyona bağlı bir azalma olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmadan, 5-FU yüklü bir KLN uygulanmasının saf 5-FU'den daha üstün bir anti-kanser aktivite üretebileceği sonucuna varılmıştır (Patel ve ark 2014). Bizim çalışmamızda da PEG uygulanması sonucunda, nano 5-FU, serbest 5-

FU'ya göre MCF-7 hücrelerde daha yüksek sitotoksik aktivite göstermiştir. Fakat MDA-MB-231 hücrelerinde tespit edilen sitotoksikite MCF-7 ye göre daha az olup hücre tipine göre değişiklik göstermektedir.

Çalışmamızda, HUVEC hücre serisinde yapılan hücre kültürü sonuçlarında ilaç yüklediğimiz nanotaşıyıcıların hücre canlılığını olumsuz etkilemediğini ve serbest ilaca göre sağlıklı hücrelerde sitotoksik etkisinin az olduğunu tespit ettik. Bu da 5-FU ve karmofur yüklenmiş nano taşıyıcımızın sağlıklı hücrelere zarar vermezken kanser hücrelerinde önemli düzeyde sitotoksik olduğunu göstermektedir. Kanser hücrelerine duyarlılık (spesifite) göstermesi açısından bu bulgu son derece önemlidir.

Çalışmamızda, nanopartikül sentezi sırasında PEG ve rosin ester kullandık. Doğal bir polimer olan PEG ve rosin biyouyumlu olması sebebiyle, ortamda toksik bir etki oluşturması beklenmemektedir, bu sebeple ilaç yüklenmemiş olan nanopartiküller meme kanseri ve sağlıklı hücre grubunda toksik bir etki göstermemiştir.

Hedef dokulara yeterli miktarda sistemik olarak uygulanan ilaçların terapötik konsantrasyonlarını vermek için, bunların mümkün olduğunca kan dolaşımında bulunması gerektiğinden, dolaşım süresini arttırmak için çeşitli yaklaşımların faydalı olduğu düşünülmektedir. Bu tür bir yaklaşım terapötik maddenin yüzeyini, kandaki protein ve hücre yapıları ile etkileşime girmeyen ve biyouyumlu ve biyobozunur özellikler kazandıran zararlı etkisi olmayan bir polimer ile kaplamaktır. PEG, ilaç kullanım alanında insanlar için uzun güvenlik geçmişi bulunmaktadır. Ayrıca FDA tarafından genel olarak güvenli olarak görülen bir sınıflamaya dahil olduğu için en yaygın kullanılan polimerdir. İlaç dağıtımı için PEG ile kaplamanın ilk raporları göz önüne alındığında, Abuchowski ve arkadaşları 1977'de PEG'in sığır serum albümini ve karaciğer katalaz proteinlerine kovalent bağlanmasını tanımlamaktadır (Abuchowski ve ark. 1977). PEG kaplı ilaç nanotaşıyıcıya yüklenerek sistemik dolaşım süresi artırılabilir ve aktiviteyi önemli ölçüde etkilemeden proteinlerin immünojenliği azaltılabilir (V.Weissig 2014).

Nanopartiküllerin yüzeyinin PEG ile kaplanması, hedef hücreler ve dokularda ilaç etkinliğini artırmak için yaygın olarak kullanılan bir yaklaşımdır. Nanopartiküller üzerindeki PEG kaplamalar, yüzeyi agregasyondan, opsonizasyondan ve fagositozdan korur, sistemik dolaşım süresini uzatır (Suk ve ark 2016).

Bizim hazırladığımız nanotaşıyıcıya baktığımızda, yapıda çekirdek kısmında hidrofobik ilacımız bulunmaktadır. Kabuk kısmında hidrofilik özellik gösteren PEG bulunmaktadır (Şekil 3.1). Rosin ester kullanmaktaki amaç ise, amfifilik (hem hidrofilik ve hidrofobik) özellik gösterdiğinden, ilacın biyouyumluluğunu ve hücre membranı ile etkileşimini arttırması nedeniyledir. İlaç ile rosin ester arasında kimyasal bir etkileşim olabilir. 5-FU yüklü PEG kaplı rosin ester esaslı polimerik nanotaneciğin bu etkileşiminden dolayı % salım oranı düşük olmuştur diyebiliriz. Nanoyapılarda, biyolojik olarak parçalanması zor olan ilacın yapı içinde homojen olarak dağılması ve boyut küçüklüğü de kontrollü salım mekanizmasını etkilemektedir.

Kontrollü ve sürdürülebilir salım, nanopartiküllerin en önemli özelliklerindendir. Çalışmamızda 5-FU ve karmofur yüklü polimerik nanopartiküllerinin kontrollü salım süreci de gözlenmiştir. Bulgularımız arasında bizim ilaç salım kinetiğimizin, farklı kinetik modeller arasından yüksek korelasyon değerine ($R^2 = 0,92$) sahip Higuchi modeline uygunluk gösterdiği görülmektedir. Bu da nanopartiküllerimizin kontrollü ve sürdürülebilir bir salım gösterdiğini desteklemektedir. Bu modele göre ilaç salım mekanizması; polimer matris içerisindeki başlangıç ilaç miktarının çözünürlüğünden yüksek olduğu ve nanotaneciklerin sistemin kalınlığından küçük olduğu şeklinde açıklanabilir (Paul 2011).

İlaç salım profiline bakıldığında, 5-FU yüklü yapıda ilk 1 saat içerisinde ilk aşamada gerçekleşen ani salım miktarının ilerleyen aşamalarda azaldığı gözlemlenmiştir. 250 saat takipte ilaç miktarının % 7 oranında salımı gerçekleşmiştir. Rosin ester esaslı bu yapıda ve % kümülatif ilaç salım miktarının düşük olduğu görülmektedir. Karmofur yüklü yapıda ilk 4 saat içerisinde ilk aşamada gerçekleşen ani salım miktarının ilerleyen aşamalarda azaldığı gözlemlenmiştir. 40 saat sonra bağımsız olarak ilaç miktarının % 25-47 oranında salımı gerçekleşmiştir. Rosin ester esaslı bu yapıda % kümülatif ilaç salım miktarının yüksek ve ilacın salım hızının kontrol edilebildiği görülmektedir. 3 gün sonrasında ilacın artık salınmadığı görülmektedir (Şekil 4.17, Şekil 4.19).

Aydın ve Pulat bir çalışmada, daha iyi hedefleme etkinliği ve ilacın tümör hücrelerine lokalizasyonu için 5-FU yüklü kitosan nanopartiküllerini geliştirmişlerdir. İn vitro salım çalışmaları, 48 saatlik bir inkübasyon periyodundan sonra çeşitli pH ortamına bağlı olarak % 29-60 salım miktarına sahip kitosan nanopartiküllerinden 5-FU

kontrollü ve sürekli bir salım göstermiştir. Sonuç olarak, 5-FU kaplanmış kitosan nanopartiküllerinin kanser tedavisi için pH'a duyarlı bir ilaç olabileceği öne sürülmüştür (Aydın ve Pulat 2012). Bizim çalışmamızda salım pH değerlerine baktığımızda pH:7,4 de salımın gerçekleşmesi, pH 1.2 de ilacın salınmaması mide asiditesinde ilacın zarar görmesinin engellenebilmesi bakımından önemli bir bulgu olup ilacın oral yolla da kullanılabilmesine imkan verebileceğini düşündürmektedir. Ancak bu bulgunun detaylı araştırmalarla incelenmesi gereklidir.

Bir çalışmada, nanopartiküle bağlı ilaçların hücreden dışarı atılma olasılığının serbest ilaçlardan daha az olduğu düşünülerek, nanopartiküllerin ilaç direnci ile ilişkisi araştırılmıştır. Nanopartiküller kullanılarak paklitaksel ve kemosensitizatörler (hücreleri kemoterapiye duyarlı hale getiren ajanlar) birlikte verilerek ilaç direnci düşürülmeye çalışılmıştır (Markman ve ark 2013).

Bhadra ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, dendritik yapıda yeni nanopartiküller sentezlenmiştir. G4 PAMAM dendrimerleri MPEG-5000'le kaplanmıştır. PAMAM dendrimerleri ve PEG kaplanmış dendrimerler kıyaslanmıştır. PEG kaplanmış dendrimerler içerisine 5-FU'yu 12 kat fazla hapsedebilmiştir. Aynı zamanda PEG kaplanan dendrimerlerin etkin maddeyi daha yavaş saldırdığı ve daha az toksik oldukları görülmüştür (Bhadra ve ark 2003).

Tümör tedavisindeki ilaç uygulamaları için tümörün mikroçevresi göz önde tutulması gereken bir durumdur. Nanotedavi, katı tümörlere özgü olan vasküler, doku ve hücresel özelliklere odaklanarak kanseri hedeflemede daha etkili bir yaklaşım sağlayabilir. Nano parçacıklar kullanılarak hedefe yönelik tedavi yöntemleri, kanserli hücrelerin dirençli klonal popülasyonlarının olasılığını azaltabilir. Yapılan çalışmalar sonucunda, nanopartiküllerin oksijen, pH, besin değerleri gibi fizikokimyasal özelliklerinin, ilaç transportunda anahtar rol oynadığı düşünülmektedir (Millard ve ark 2017). Nanotedavi ile solid tümörlere özgü olan vasküler doku ve hücresel özelliklere odaklanarak kanseri hedeflemede daha etkili bir yaklaşım sağlanabilir.

Mevcut tedavileri sınırlayan sorunlardan biri de, ilaçların daha derin doku katmanlarına ulaşamamasıdır (Kibria ve ark 2016). Bu sebeple geliştirilebilecek yöntemler sayesinde; düşük pH, gelişmiş glikoliz gibi kanserli hücrelerde gözlenen bazı ayırt edici özellikler, tümörlerin tespitinde veya ilaçların tümör bölgelerine iletilmesinde kullanılabilir. pH, malign hücreleri ayırt etmek için bir işaretleyici olarak kullanılabilir,

tümör hücrelerinin yüzeyindeki pH, sağlıklı hücrede ve tümör dokusunda hücre dışı pH'dan daha düşüktür (Adochite ve ark 2016).

Karmofurun intraselüler olarak, asit seramidaz aktivitesinin inhibitörü olduğu, in vivo kolorektal kanser tedavisinde de bildirilmiştir ve karmofurun asit seramidaz inhibisyonu aracılığı ile anti-proliferatif olduğu vurgulanmaktadır. Ayrıca karmofurun kimyasal yapısında yapılacak değişikliklerle, kanser hücresi çoğalmasını önlemek için standart kemoteröpatik ilaçlarla sinerjistik olarak etkileşen yeni asit seramidaz inhibitörleri sentez edilebileceği fikri ileri sürülmektedir (Realini ve ark 2013).

Çömlekçi'nin karmofur ile yapmış olduğu çalışmada, A549 akciğer kanseri hücre hattı için 24 saat sonunda IC_{50} değeri 23 μM olarak tespit edilmiştir (Çömlekçi 2017). Bizim çalışmamızda karmofurun IC_{50} değerleri, MCF-7 için 52 μM , MDA-MB-231 hücreleri için 98 μM olarak bulunmuştur. Çalıştığımız hücreler farklı olduğu için farklı sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca MDA-MB-231 hücreleri üçlü reseptör negatif olarak bilinen dirençli hücrelerdir. Bu nedenle MCF-7 den daha yüksek dozlarda IC_{50} 'ye sahip olması beklenen bir durumdur.

Üçlü reseptör negatif meme kanserleri (ÜNMK'ler), östrojen reseptörü, progesteron reseptörü ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 bulunmayan tümörler olarak tanımlanmaktadır. Klinik olarak, ÜNMK hastaları, 5-FU'yu da içeren sitotoksik ilaçlarla tedavi edilir. Bununla birlikte, ÜNMK'ler bir dizi tedaviden sonra bu tür ilaçlara direnç geliştirir. Takahashi ve ark. nın yapmış olduğu bir çalışmada dirençli ÜNMK hücreleri oluşturmuş ve dirençli hücrelerde 5-FU'nun IC_{50} değerinin dirençli olmayan hücrelerden 5.5 kat daha fazla olduğu gözlenmiştir (Takahashi ve ark 2013). Böyle bir durumda ilacın yan etkileri de artmaktadır. İlaç taşıma sistemlerine yüklenmiş ilaçların, dirençli kanser hücre hatlarına da faydalı olabileceği düşünülmektedir.

Son dönemlerde ilaç direncini yenebilmek amacıyla nano ilaçlarla yapılan çalışmalar artış göstermektedir. Nanoparçacıklar kullanılarak gerçekleştirilen hedefe yönelik tedavi yöntemleri sayesinde, kanserli hücrelerin dirençli popülasyonlarının azaltılabilme olasılığının mümkün olduğu ileri sürülmektedir (Takahashi ve ark 2013).

Melanoma hücrelerinde genetik plastisite ve tümörü yeniden oluşturan kanser kök hücrelerinin varlığı ve ilaçların etkin şekilde elimine edilmesi nedeniyle farmakolojik ve radyolojik tedavilere karşı direnç oluşturulduğu ileri sürülmüştür (Lai

ve ark 2019). Bizim çalışmamızda da MDA-MB-231 hücrelerinin dirençli hücreler olduğu bilinmektedir.

Surapaneni ve ark. yapmış olduğu bir çalışmada, ilginç bir şekilde, altın nanopartiküller ile tedavi sonucunda MDA-MB-231 hücrelerinin, timidilat sentetaz enziminin ekspresyonunu azaltarak, 5-FU'ya duyarlı hale getirdiği ileri sürülmektedir (Surapaneni ve ark 2018). Başka bir çalışmada ise meme ve kolon kanser hücrelerinde selenyum nanopartikülleri ile 5-FU'nun kemoduyarlılığının arttırıldığı bildirilmiştir. Bu sonucun selenyum ve 5-FU nano-formulasyonlarının glukoz blokajı aracılığıyla, kanser hücre biyoenerjisini inhibe etmesiyle ilgili olabileceği düşünülmektedir (Abd-Rabou ve ark 2019). Bizim çalışmamızda sentezlediğimiz nanopartiküller ile de meme kanseri hücre hatlarında ilaçlara karşı duyarlılığın, sitotoksitenin arttığı görülmektedir.

Yapılan çalışmalardan birinde kolorektal kanseri tedavi etmek amacıyla kullanılan karmofur, sıçan rekombinant asid seramidazının oldukça güçlü bir inhibitörü olarak tespit edilirken, IC_{50} konsantrasyonu $29 \pm 5 \mu M$ olarak belirtilmiştir (Realini ve ark 2013). Çeşitli hücre serileriyle yapılan çalışmalar, sitotoksite açısından çalışmamızla uyum göstermektedir.

Gao ve ark. tarafından SW620 hücrelerinde 5-FU'nun IC_{50} değeri 48 saat sonunda $13 \mu g/ml$ olarak bulunmuştur (Gao ve ark 2014). Sitotoksite sonuçları bizim bulgularımızla benzerlik göstermekle birlikte, çalışmamız 72 saatlik daha uzun zaman dilimine ait bulguları göstermektedir.

Alyafee ve ark. yapmış olduğu bir çalışmada, yeni anastrozol yüklü PLA-PEG-PLA nanopartikülleri sentezlenmiş ve MCF-7 hücre hattında apoptotik etkisi hem serbest anastrozol, hem de anastrozol yüklü NP'lerle karşılaştırılmıştır. Sentezlenmiş anastrozol yüklü NP'nin, serbest anastrozole benzer bir terapötik etki gösterdiği gözlenmiştir (Alyafee ve ark. 2018). Bizim çalışmamızda hem karmofur, hem de 5-FU yüklü NP'lerin MCF-7 kanser hücre hattında serbest ilaçlardan daha iyi antiproliferatif etki gösterdiği gözlenmiştir (Tablo 4.2).

Jain A ve ark yapmış olduğu bir çalışmada, 5-FU'yu kitosan ile kaplayarak kolon spesifik ilaç taşıma sistemi geliştirmeye çalışmışlardır. 5-FU taşıyan ligand bağlı kitosan nanopartikülleri sentezleyerek, oral uygulama yoluyla mide asidinden etkilenmeden kolon spesifik ilaç taşıma sistemini geliştirerek, ilacın midede ve ince bağırsakta salınmadan kolona ulaşmasını sağlamışlardır (Jain ve ark 2016). Bizim

çalışmamızda da nano 5-FU ve nano karmofurun asit ortamında (pH:1,2) neredeyse hiç salınma uğramadığı, pH:7,4'de salım gerçekleştirdiğini tespit ettik. Sonuçlarımız, ilaçlarımızın midenin fizyolojik ortamında salımından korunacağını destekler niteliktedir. Bu sonuç ağızdan ilaç kullanımı için umut verici olabilir.

Tümör heterojenliği belirli bir hedefi işaretlemek için önemli bir unsurdur. Hedefin sayısında ve kalitesinde değişiklikler oluşturmaktadır. Bu yüzden de tedavi süresince kanser hücrelerinin bir alt grubu hedeflenmemiş olarak kalmaktadır, bu da daha sonra ilaç direnci ve kanser nüksetmesini arttırmaktadır (Zhao 2018).

Sfingolipid metabolizmasında ikinci haberci olarak görev yapan seramid ve sfingozin 1 fosfat (S1P) 'ın hücre döngüsü ve apoptoz üzerindeki karşılıklı etkileşimleri bilinmektedir. Seramid ve metabolitlerin hücre apoptozunda ve proliferasyonunda rolleri vardır. Asit seramidaz, sfingolipid metabolizmasının düzenlenmesinde anahtar bir enzimdir. Asit seramidaz, apoptotik bir molekül olan seramid ve mitojenik özelliklere sahip olan S1P arasındaki dengeyi kontrol etmede düzenleyici bir moleküldür ve hücrenin kaderini belirler. Asit seramidaz, bu iki metabolitin hücre içi konsantrasyonunun, S1P'yi oluşturmak için hızlı bir şekilde fosforlanmış olan sfingozine hidrolize edilmesiyle çok önemli bir rol oynar. Bu enzimin regülasyonunun bozulması, kronik hastalıkların yanı sıra bir takım malignitelerde de bildirilmiştir. Ayrıca, bu enzimin kalıtsal eksikliği, ciddi ve ölümcül bir lizozomal depo bozukluğu olan Farber hastalığı ile ilişkilidir (Alayoubi ve ark 2013, Lukci ve Sewer 2011).

Seramid molekülü hücre ölümünü tetiklerken, S1P'ın ise hücre sağkalımını artırdığı, apoptozdan kaçışa neden olduğu ve ilaç direncinin oluşmasına neden olduğu gözlenmiştir. Bu sebeple bu iki molekülün kanserli hücrelerin çoğalması üzerindeki etkilerinin araştırılması gündeme gelmiştir (Pettus ve ark. 2002). Yapılan çalışmalarda kanserleşen hücrelerdeki seramidaz enzimi aktivasyonunun artışı; seramid düzeyini azaltırken, S1P düzeyini arttırdığı belirlenmiştir (Obeid ve ark., 1993)(Şekil 2.5). Biz de çalışmamızda seramidaz inhibitörleri ile muamele sonrası bu enzim miktarları arasındaki dengenin nasıl değiştiğini göstermeyi amaçladık.

Seramid biyosentezinde görev alan enzimlerin artışı ile seramidin metabolize edilmesindeki azalma sonucu seramidin birikimi sağlanarak hücrelerin apoptoza girmeleri kanser tedavisinde yeni bir tedavi yöntemi olarak düşünülebilir.

Seramidaz, seramidi sfingozin 1-fosfat ve yağ asitlerine dönüştüren bir enzimdir. Bu enzim inhibe edildiğinde, tümör bölgesinde yaşanan seramid birikiminden dolayı hücre ölümü gerçekleşmektedir. Seramidazların aktivitesinin inhibe edilmesi seramid birikimine yol açacağı için seramidaz inhibitörleri antikanser ilaç gelişimi için önemli hedeflerdir.

Bizim bulgularımızda ilaç uygulanmayan MCF-7 kanser hücrelerinde S1P düzeyi yüksek iken ilaç ile muamele ettiğimiz tüm gruplarda S1P seviyelerinin anlamlı bir şekilde düştüğünü görmekteyiz.

Seramid, sfingolipid biyosentezinin ve degradasyonunun merkezi olmakla kalmayıp aynı zamanda, sfingolipid sinyalinde anahtar bir moleküldür, apoptozu ve/veya farklılaşmayı teşvik eder (Saied ve Arenz 2016).

Bizim bulgularımızda kanser hücrelerinde asit seramidaz ve S1P miktarı fazla iken ilaç ile inkübasyon sonrası MCF-7 ve MDA-MB-321 hücrelerinde ASAH1 ve SP1 seviyelerinin azaldığı gösterilmiştir. Bulgularımıza benzer bir şekilde, Realini ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada, karmofurun SW403 ve LNCaP kanser hücre hatlarında, asit seramidazı azalttığı ve sağlam hücrelerde ise seramid seviyelerini arttırdığı bildirilmektedir. Ayrıca karmofur ile yapılan in vivo çalışmalarda, bazı organ ve dokularda seramidin biriktiği, asit seramidaz aktivitesinin ise azaldığı bildirilmiştir (Realini ve ark. 2013).

Yapılan bir çalışmada bitkisel östrojen bileşiği olan genisteinin östrojene bağımlı meme kanser hücreleri olan MCF-7’de ASAH1 ekspresyonunu indükleyerek kanser hücre büyümesine neden olduğu gösterilmiştir. Sonuçta östrojen bileşiği genisteinin Siklin B2’yi ve hücre proliferasyonunu ASAH1 e bağımlı bir şekilde stimüle ettiği gösterilmiştir. Bu veriler ASAH1’in meme kanseri hücre büyümesinde rolünü destekleyen bir mekanizmayı tanımlamıştır (Lucki ve Sewer 2011). Literatürlerden de görüldüğü gibi östrojen pozitif hücreler tedaviye daha iyi cevap vermektedir. Bizim bulgularımızda da bu hücre grubunda daha olumlu sonuçlar alındığı görülmektedir.

Hsu ve ark. yapmış olduğu bir çalışmada, SP1’in akciğer tümörü gelişiminde, hücre çoğalması ve metastazında oldukça yüksek bulunduğu belirtilmiştir (Hsu ve ark 2012). Biz de yapmış olduğumuz çalışmada benzer şekilde, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında seramidaz enzim inhibitörleri kullanılmayan kontrol grubunda SP1 seviyelerinin daha yüksek olduğunu gösterdik (Şekil 4.31, Şekil 4.36).

Seramidazların aktivitesinin inhibe edilmesi seramid birikimine yol açacağı için seramidaz inhibitörleri antikanser ilaç gelişimi için önemli hedeflerdir. Seramidazlar, meme, prostat, kolon, boyun gibi bir çok kanser türünde aşırı derecede ekspresyon göstermektedir. Seramidaz aktivitesinin tümörlü hücrelerde normal hücrelerle kıyaslandığında artmış olduğu gösterilmiştir. Ayrıca seramidazların aşırı ekspresyonu tümör hücrelerini tümör nekrozis faktör (TNF) ve radyasyona karşı dirençli hale getirmiştir. Tüm bu bulgular seramidazların yeni antikanser ilaçların gelişimi için önemli hedefler olduğunu desteklemektedir.

Seramidaz aktivitelerin doğru bir şekilde ölçülmesi ve yeni inhibitörlerin geliştirilmesi önemlidir. Potansiyel klinik etkilerin yanı sıra, seramidaz inhibisyonu ve mekanizması konusunda yeni çalışmalar seramid biyolojisinin mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına yardımcı olabileceğini düşündürmektedir (Saied ve Arenz 2016).

Doan ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, Glioblastoma multiforme (GBM)'lerin asit seramidaz (ASAH1) ve sfingosin-1-fosfatın (S1P) düzenlenmesi yoluyla radyasyona direnç kazandığı gösterilmektedir. Ayrıca, ASAH1 ve S1P'nin ya monoklonal antikörlerle ve küçük moleküllü ilaçlarla (yani, karmofur) veya her ikisinin bir kombinasyonu ile inhibisyonu, GBM hücre büyümesinin baskılanmasına neden olmuştur. Bu sonuçlar, ASAH1 ve S1P'nin, özellikle ASAH1'i aşırı ifade ettiğinden yeni GBM'lerin ve tekrarlayan GBM'lerin tedavisi için mükemmel hedefler olabileceğini, ileri sürmektedir. Bizim kullandığımız meme kanseri (MCF-7 ve MDA-MB-231) hücrelerinin de ASAH1'i normalden fazla ifade ettiği bilinmektedir (Doan ve ark 2017). Kullandığımız MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre tiplerinde de ASAH1 mekanizmasının takibinin literatür için önemli katkı sağlayacağını düşünmekteyiz. Bununla birlikte çalışmamız meme kanseri hücrelerindeki sitotoksik aktivitede ASAH 1 mekanizmasının etkilerini görmek açısından da önemlidir. Bu nedenle kullandığımız hücreler tedavi etkinliği ön görmek açısından uygundur.

Bizim çalışmamızda, asit seramidaz inhibitörleri uygulanan MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde S1P miktarında kontrole göre belirgin bir azalma görülmektedir, özellikle nano Karmofur'da daha fazla bir azalma söz konusudur. Ayrıca, MCF-7 hücrelerinde genel olarak ASAH1 miktarında kontrole göre bir azalma gözlenmekte; özellikle serbest karmofurda ASAH1 miktarı çok değişmezken, nano karmofur'da belirgin bir azalma olması dikkat çekmektedir. Bu bulgular nano karmofurun ASAH1

ve S1P enzimleri üzerine serbest karmofurdan daha etkili olduğunu göstermektedir. Bu yüzden, çalışmamızda 5-FU ve karmofurun ASAH1 ve S1P üzerinden etki ederek hücre ölümünü gerçekleştirdiğini söyleyebiliriz. Ayrıca bu ilaçların nano taşıyıcılara yüklenmesi sonucu ASAH1 ve S1P enzimleri üzerindeki etkisinin artabileceği de bulgularımızda görülmektedir. Aynı zamanda sağlıklı hücreler olan HUVEC üzerinde yaptığımız çalışmada, ASAH1 ve S1P seviyelerinde önemli bir değişiklik olmadığı da bulgularımız arasındadır. Bu da bileşiklerimizin kanser hücreleri üzerinde kullanılabilecek ilaç olarak, tedavi potansiyelinin olduğunu göstermektedir.

Sfingolipitler, çoğalma, apoptoz, farklılaşma, anjiyogenez, stres ve tümör büyümesi, neoanjiyogenez ve kemoterapiye cevap gibi kanserin çeşitli yönleriyle bağlantılı enflamatuvar tepkiler dahil olmak üzere çeşitli hücresel işlemlerin önemli düzenleyicileridir. Sfingolipid metabolizmasının merkezi molekülü olan seramid, genel olarak antiproliferatif ve proapoptotik fonksiyonlara aracılık ederken, sfingosin-1-fosfat ve diğer türevlerin karşıt etkileri vardır.

Seramid oluşumunu kontrol eden çeşitli enzimler vardır; asit veya nötr sfingomiyelinazlar ve seramid molekülü, kanser hücrelerinin kemoterapötik ilaçlar tarafından öldürülmesinde bariyer oluşturmaz. Aksine, glukosilseramid sentaz, seramidaz ve sfingosin kinaz ise kanser hücresi kemoterapisinde direnç sağlayan diğer enzimlerdir. Kanser hücrelerinde direnç gelişimini önlemek için hedef olarak enzimlerin inhibe edilmesinin önemli olduğu bildirilmektedir (Dimanche-Boitrel ve Rebillard 2013). Bizim çalışmamızda da seramidaz enzimi inhibe edilerek kanser hücrelerinde direnç gelişimi engellenmeye çalışılmıştır.

Yildiz-Özer ve ark. yapmış olduğu bir çalışmada, asit seramidaz inhibitörü olan Ceranib-2 nin H460 hücrelerinde hem asit seramidaz aktivitesini inhibe ettiği, hem de Bcl-2 ekspresyonunu azalttığı bildirilmiştir (Yildiz-Özer ve ark 2018). Bizim bulgularımızda da kullandığımız asit seramidaz inhibitörleri ile MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin inkübasyonu sonucu, Bcl-2 miktarında kontrole göre bir azalma görülmektedir, özellikle nano karmofur'da daha belirgin bir azalma söz konusu olmaktadır. Bu bulgular bize hücre ölümünün mitokondriyal apoptoz yolağı ile gerçekleşmiş olabileceğini düşündürmektedir. Aynı zamanda asit seramidaz ve S1P arasındaki dengenin bozulmasının, hücrenin apoptoza gitmesinde önemli bir rol

oynadığını bilmekteyiz. Bu bilgiler, nano karmofurun Bcl-2 ye bağı olarak mitokondrial apoptozis yolağı üzerinden etkili olduğunu göstermektedir.

Sonuçlarımızda ASAH1 protein ekspresyonu, Bcl-2 ye göre daha belirgin bir azalma göstermektedir. ASAH1 in azalmasına bağı olarak, hücre ölümünün ASAH1 ve S1P arasındaki denge ile apoptoza gidişi arasında kolaylaştırıcı bir faktör olduğunu düşünmekteyiz. Diğer yandan Bcl-2 nin azalması ise kanser hücre ölümünün mitokondriyal apoptozis yolağını kullanmış olabileceğini düşündürmektedir. Nitekim Bcl-2 azalmasında mitokondriyal apoptozis yolağını bildiren çalışmalar bulunmaktadır (Spierings ve ark 2004).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda onkojenik yolakların inhibisyonunda, özellikle HER2, EGFR, MAPK, PI3K / Akt, STAT3 ve HIF gibi farklı, anti-apoptoz proteinlerinin (Bcl-2, Bcl-xL ve survivinin) inhibe edilmesiyle apoptozun arttırılması, ve Wnt / β -catenin ve Hedgehog gibi düzensiz yolakların hedeflenmesi üzerinde durulmaktadır (Nair 2019, Takahaski ve ark. 2013).

Seramiddeki denge ve hücrelerdeki S1P seviyeleri hücre ölümünün yanı sıra anjiyogeneizde önemli bir rol oynar. Asit seramidaz (AC), çok hedefli antikanser ilaçların geliştirilmesinde ümit verici bir proteindir, çünkü inhibisyonu, Akt ve ERK 1/2 yolu yoluyla anjiyogenezi aynı anda inhibe edebilir ve bu şekilde seramid kaynaklı apoptoz yoluyla kanser büyümesini sınırlayabilir (Cho ve Kwon 2019). Diğer bazı AC inhibitörler bildirilmiş olmasına rağmen, tedavide etkili oldukları kanıtlanmamıştır. AC yapısının aydınlatılmasındaki son gelişmeler, insanda hastalıklarının tedavisi için daha iyi inhibitörlerin geliştirilmesini kolaylaştıracaktır (Cho ve Kwon 2019).

Karmofurun antikanser özellikleri, bu ajanın, timidilat sentazı bloke ederek tümör hücrelerinde DNA sentezini inhibe eden bir pirimidin analogu olan 5-FU oluşturma kabiliyetine bağlanmıştır. Bununla birlikte, karmofur kaynaklı timidilat sentetaz aktivitesi inhibisyonu ve hücre proliferasyonu arasındaki pozitif korelasyonun olmaması, daha karmaşık bir etki mekanizması olduğunu düşündürmektedir. Bu fikir, karmofur'un 5-FU'e direnç geliştirmiş olan insan kanser hücreleri için toksik olduğunu gösteren veriler için ek destek bulmaktadır. Bir çalışmada, AC aşırı ekspresyonunun HEK 293 hücrelerinde proliferasyonu hızlandırdığını ve prostat kanseri hücre proliferasyonunu azaltmak için fenretinid [N- (4-hidroksifenil) retinamid] ile sinerji içinde hareket ettiğini göstermektedir. Sonuç olarak, klinikte kolorektal kanserleri

tedavi etmek için řu anda kullanılan antineoplastik bir ilaç olan karmofur, hücre içi asit seramidazın yüksek güçlü bir inhibitörü olarak tanımlamaktadır. Bu molekülün kimyasal iskeletindeki modifikasyonlar ile standart antitümoral ilaçların terapötik etkinliğini artıracılabilecek asit seramidaz inhibitörleri oluşturulabileceği düşünülmektedir (Realini ve ark. 2013).

Karmofur, katalitik sisteini hedef alan elektrofilik bir karbonil reaktif grup içeren bir antineoplastik ilaçtır. Bu yeni yapısal veri, AC inhibisyonunun temelini açıklar, proteinin enzimatik özelliklerine dair öngörü sağlar (Dementiev 2018).

Gelecekte kanser tedavisinde bir alternatif olarak, sentezlenen ASAH1 e karşı immünoterapi veya tümör aşısı kullanmak, gelecekteki çalışmalarda göz önünde bulundurularak faydalı sonuçlar elde edilebilir (Nguyen ve ark 2018).

Çalışmamızda nanotaşıyıcıya yüklenmiş 5-FU'nun çok az miktarda salındığı (% 7) fakat kanser hücreleri üzerinde oldukça etkili olduğu görülmektedir. Burada 5-FU'nun salımı arttırılabilinirse, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri üzerinde az miktarda ilaçla oldukça etkili bir sonucun ortaya çıkması beklenmektedir. Bu da gelecekte ilacın zararlı yan etkilerden korunma ve daha etkili tedavi seçeneği sunma açısından oldukça umut vadedici bir durumdur. Sonraki alışmalarımızda 5-FU yüklenen nanotaşıyıcıya metal nanopartiküller ya da duyarlı moleküller eklenerek, ısı ya da ultraviyole ile kullanımı sayesinde ilacın salımını arttırmayı planlamaktayız.

KAYNAKLAR

Abd-Rabou, A. A., Shalby, A. B., ve Ahmed, H. H. (2019). Selenium nanoparticles induce the chemo-sensitivity of fluorouracil nanoparticles in breast and colon cancer cells. *Biological trace element research*, 187(1), 80-91.

Abuchowski, A., McCoy, J. R., Palczuk, N. C., van Es, T., ve Davis, F. F. (1977). Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase. *Journal of Biological Chemistry*, 252(11), 3582-3586.

Adochite, R. C., Moshnikova, A., Golijanin, J., Andreev, O. A., Katenka, N. V. ve Reshetnyak, Y. K. (2016). Comparative study of tumor targeting and biodistribution of pH (Low) Insertion Peptides (pHLIP® peptides) conjugated with different fluorescent dyes. *Molecular Imaging and Biology*, 18(5), 686-696.

Akhter, M. H., Rizwanullah, M., Ahmad, J., Ahsan, M. J., Mujtaba, M. A. ve Amin, S. (2018). Nanocarriers in advanced drug targeting: setting novel paradigm in cancer therapeutics. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 46(5), 873-884.

Alayoubi, A. M., Wang, J. C., Au, B. C., Carpentier, S., Garcia, V., Dworski, S., ve ark. (2013). Systemic ceramide accumulation leads to severe and varied pathological consequences. *EMBO molecular medicine*, 5(6), 827-842.

Alyafee, Y. A., Alaamery, M., Bawazeer, S., Almutairi, M. S., Alghamdi, B., Alomran, N., ve ark. (2018). Preparation of anastrozole loaded PEG-PLA nanoparticles: evaluation of apoptotic response of breast cancer cell lines. *International journal of nanomedicine*, 13, 199.

Aronson, J. K. (2011). A worldwide yearly survey of new data in adverse drug reactions. Vol. 33. 669-690.

Aydin, R., ve Pulat, M. (2012). 5-Fluorouracil encapsulated chitosan nanoparticles for pH-stimulated drug delivery: evaluation of controlled release kinetics. *Journal of Nanomaterials*, 2012, 42.

Babu, A., Templeton, A. K., Munshi, A. ve Ramesh, R. (2014). Nanodrug delivery systems: a promising technology for detection, diagnosis, and treatment of cancer. *Aaps Pharmscitech*, 15(3), 709-721.

Bangham, A. D., Standish, M. M. ve Watkins, J. C. (1965). Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of molecular biology*, 13(1), 238-IN27.

Bassiouni, Y., ve Faddah, L. (2012). Nanocarrier-based drugs: the future promise for treatment of breast cancer. *J. Appl. Pharm. Sci*, 2(5), 225-232.

Bedia, C., Casas, J., Garcia, V., Levade, T. ve Fabriàs, G. (2007). Synthesis of a novel ceramide analogue and its use in a high-throughput fluorogenic assay for ceramidases. *Chembiochem*, 8(6), 642-648.

Bernardo, K., Hurwitz, R., Zenk, T., Desnick, R. J., Ferlinz, K., Schuchman, E. H. ve Sandhoff, K. (1995). Purification, characterization, and biosynthesis of human acid ceramidase. *Journal of Biological Chemistry*, 270(19), 11098-11102.

Bhadra, D., Bhadra, S., Jain, S., ve Jain, N. K. (2003). A PEGylated dendritic nanoparticulate carrier of fluorouracil. *International journal of pharmaceutics*, 257(1-2), 111-124.

Bianchini, G., Balko, J. M., Mayer, I. A., Sanders, M. E. ve Gianni, L. (2016). Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nature reviews Clinical oncology*, 13(11), 674.

Bieberich, E. (2008). Ceramide signaling in cancer and stem cells. *Future lipidology*, 3(3), 273-300.

Bielawska, A., Linardic, C. M., ve Hannun, Y. A. (1992). Ceramide-mediated biology. Determination of structural and stereospecific requirements through the use of N-acyl-phenylaminoalcohol analogs. *Journal of Biological Chemistry*, 267(26), 18493-18497.

Calixto, G. M. F., de Annunzio, S. R., Victorelli, F. D., Frade, M. L., Ferreira, P. S., Chorilli, M., & Fontana, C. R. (2019). Chitosan-Based Drug Delivery Systems for Optimization of Photodynamic Therapy: A Review. *AAPS PharmSciTech*, 20(7), 253.

Chandran, S. P., Natarajan, S. B., Chandraseharan, S. ve Shahimi, M. S. B. M. (2017). Nano drug delivery strategy of 5-fluorouracil for the treatment of colorectal cancer. *Journal of Cancer Research and Practice*, 4(2), 45-48.

Cheng, J. C., Bai, A., Beckham, T. H., Marrison, S. T., Yount, C. L., Young, K. ve Armeson, K. E. (2013). Radiation-induced acid ceramidase confers prostate cancer resistance and tumor relapse. *The Journal of clinical investigation*, 123(10), 4344-4358.

Cho, S. M. ve Kwon, H. J. (2019). Acid ceramidase, an emerging target for anti-cancer and anti-angiogenesis. *Archives of pharmacal research*, 42(3), 232-243.

Cohen-Sela, E., Chorny, M., Koroukhov, N., Danenberg, H. D. ve Golomb, G. (2009). A new double emulsion solvent diffusion technique for encapsulating hydrophilic molecules in PLGA nanoparticles. *Journal of controlled release*, 133(2), 90-95.

Cristofanilli, M., Buzdar, A. U. ve Hortobagyi, G. N. (2003). Update on the management of inflammatory breast cancer. *The oncologist*, 8(2), 141-148.

Çömlekçi, E. (2017). Yeni sentez edilen nano-karmofur bileşiğinin insan akciğer kanseri üzerindeki etkilerinin incelenmesi (*Yüksek lisans tezi*, Anadolu Üniversitesi).

Davis, H. L. (1982). Chemotherapy of large bowel cancer. *Cancer*, 50, 2638-2646.

Dementiev, A., Joachimiak, A., Nguyen, H., Gorelik, A., Illes, K., Shabani, S. ve ark (2018). Molecular mechanism of inhibition of acid ceramidase by carmofur. *Journal of medicinal chemistry*, 62(2), 987-992

Derman, S., Kızılbey, K. ve Akdeste, Z. M. (2013). Polymeric nanoparticles. *Sigma*, 31, 107-120.

Dimanche-Boitrel, M. T. ve Rebillard, A. (2013). Sphingolipids and response to chemotherapy. In *Sphingolipids in Disease* (pp. 73-91). Springer, Vienna.

Doan, N. B., Nguyen, H. S., Al-Gizawiy, M. M., Mueller, W. M., Sabbadini, R. A., Rand, S. D., ve ark., S. P. (2017). Acid ceramidase confers radioresistance to glioblastoma cells. *Oncology reports*, 38(4), 1932-1940.

Farokhzad, O. C. ve Langer, R. (2006). Nanomedicine: developing smarter therapeutic and diagnostic modalities. *Advanced drug delivery reviews*, 58(14), 1456-1459.

Feng, Y., Spezia, M., Huang, S., Yuan, C., Zeng, Z., Zhang, L. Ve Liu, B. (2018). Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes & diseases*, 5(2), 77-106.

Ferlinz, K., Kopal, G., Bernardo, K., Linke, T., Bär, J., Breiden, B. ve Sandhoff, K. (2001). Human acid ceramidase processing, glycosylation, and lysosomal targeting. *Journal of Biological Chemistry*, 276(38), 35352-35360.

Ferrari, M. (2005). Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nature reviews cancer*, 5(3), 161.

Fisher, B. (1994). Malignancies of the breast. *Practical Oncology. First edition. Cameron RB (editor). Norwalk, Appleton & Lange*, 417-434.

Flaum, L. E., ve Gradishar, W. J. (2018). Advances in endocrine therapy for postmenopausal metastatic breast Cancer. In *Optimizing Breast Cancer Management* (pp. 141-154). Springer, Cham.

Futerman, A. H. ve Hannun, Y. A. (2004). The complex life of simple sphingolipids. *EMBO reports*, 5(8), 777-782.

Gao, L., Shen, L., Yu, M., Ni, J., Dong, X., Zhou, Y. ve Wu, S. (2014). Colon cancer cells treated with 5-fluorouracil exhibit changes in poly(lactosamine)-type N-glycans. *Molecular medicine reports*, 9(5), 1697-1702.

García-González, V., Díaz-Villanueva, J., Galindo-Hernández, O., Martínez-Navarro, I., Hurtado-Ureta, G. ve Pérez-Arias, A. (2018). Ceramide metabolism balance, a multifaceted factor in critical steps of breast cancer development. *International journal of molecular sciences*, 19(9), 2527.

Gavini, K., & Parameshwaran, K. (2019). Western Blot (Protein Immunoblot). In *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing.

Gonzalez-Angulo, A. M., Timms, K. M., Liu, S., Chen, H., Litton, J. K., Potter, J., ve ark. (2011). Incidence and outcome of BRCA mutations in unselected patients

with triple receptor-negative breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 17(5), 1082-1089.

Govindarajah, N., Clifford, R., Bowden, D., Sutton, P. A., Parsons, J. L., ve Vimalachandran, D. (2019). Sphingolipids and acid ceramidase as therapeutic targets in cancer therapy. *Critical reviews in oncology/hematology*.

Green, M. R., Manikhas, G. M., Orlov, S., Afanasyev, B., Makhson, A. M., Bhar, P. ve Hawkins, M. J. (2006). Abraxane®, a novel Cremophor®-free, albumin-bound particle form of paclitaxel for the treatment of advanced non-small-cell lung cancer. *Annals of Oncology*, 17(8), 1263-1268.

Grösch, S., Schiffmann, S. ve Geisslinger, G. (2012). Chain length-specific properties of ceramides. *Progress in lipid research*, 51(1), 50-62.

Hara, S., Nakashima, S., Kiyono, T., Sawada, M., Yoshimura, S., Iwama, T. ve Sakai, N. (2004). p53-independent ceramide formation in human glioma cells during γ -radiation-induced apoptosis. *Cell death and differentiation*, 11(8), 853.

Hare, J. I., Lammers, T., Ashford, M. B., Puri, S., Storm, G. ve Barry, S. T. (2017). Challenges and strategies in anti-cancer nanomedicine development: an industry perspective. *Advanced drug delivery reviews*, 108, 25-38.

Haschek, W. M., Rousseaux, C. G., Wallig, M. A., Bolon, B. ve Ochoa, R. (Eds.). (2013). *Haschek and Rousseaux's handbook of toxicologic pathology*. Academic Press.

Hassanpour, S. H. ve Dehghani, M. (2017). Review of cancer from perspective of molecular. *Journal of Cancer Research and Practice*, 4(4), 127-129.

He, F. (2011). BCA (bicinchoninic acid) protein assay. *Bio Protocol Biol*, 101, e44.

Henderson, I. C. (1993). Risk factors for breast cancer development. *Cancer*, 71(S6), 2127-2140.

Heywang-Köbrunner S.H, Dershaw D.D, Schreer I. Diagnostic Breast Imaging. Mammography, Sonography, Magnetic Resonance Imaging, and Interventional Procedures. Second edition, 2001;252-310.

Hsu, T. I., Wang, M. C., Chen, S. Y., Yeh, Y. M., Su, W. C., Chang, W. C., ve Hung, J. J. (2012). Sp1 expression regulates lung tumor progression. *Oncogene*, 31(35), 3973.

İçli, F., ve Akbulut H. Onkolojiye Giriş. "İn. için G, Biberoğlu K, Süleymanlar G ve ark.; eds." *İç Hastalıkları. Güneş Kitapevi* (2005): 2007-2014.

Jain, A., ve Jain, S. K. (2016). Optimization of chitosan nanoparticles for colon tumors using experimental design methodology. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 44(8), 1917-1926.

James, N. D., Coker, R. J., Tomlinson, D., Harris, J. R. W., Gompels, M., Pinching, A. J. ve Stewart, J. S. W. (1994). Liposomal doxorubicin (Doxil): an effective new treatment for Kaposi's sarcoma in AIDS. *Clinical oncology*, 6(5), 294-296.

Juvet, L. K., ve Norderhaug, I. N. (2008). Genetic Tests for Breast and Ovarian Cancer.

Kamaly, N., Xiao, Z., Valencia, P. M., Radovic-Moreno, A. F. ve Farokhzad, O. C. (2012). Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation. *Chemical Society Reviews*, 41(7), 2971-3010.

Kibria, G., Hatakeyama, H., Sato, Y., ve Harashima, H. (2016). Anti-tumor effect via passive anti-angiogenesis of PEGylated liposomes encapsulating doxorubicin in drug resistant tumors. *International journal of pharmaceutics*, 509(1-2), 178-187.

Kim, N. K., Min, J. S., Park, J. K., Yun, S. H., Sung, J. S., Jung, H. C. ve Roh, J. K. (2001). Intravenous 5-fluorouracil versus oral doxifluridine as preoperative concurrent chemoradiation for locally advanced rectal cancer: prospective randomized trials. *Japanese journal of clinical oncology*, 31(1), 25-29.

Koyama, Y. (1981). 1-Hexylcarbamoyl-5-fluorouracil (HCFU)—A masked 5-fluorinated pyrimidine. *Cancer treatment reviews*, 8(2), 147-156.

Kumar V, Cotran RS, Robbins SL, eds Basic Pathology. 5th W.B. Saunders Company 1992. Ringer DP, Schnipper LE. Principles of Cancer Biology. İn: Lenhard RE, Osteen RT, Gansler T; eds. Clinical Oncology Atlanta: American Cancer Society; 2001:21-35.

Kumar, S., ve Gupta, S. K. (2013). Rosin: a naturally derived excipient in drug delivery systems. *Polim. Med*, 43(1), 45-48.

Lai, M., La Rocca, V., Amato, R., Freer, G. ve Pistello, M. (2019). Sphingolipid/Ceramide Pathways and Autophagy in the Onset and Progression of Melanoma: Novel Therapeutic Targets and Opportunities. *International journal of molecular sciences*, 20(14), 3436.

Lai, M., Realini, N., La Ferla, M., Passalacqua, I., Matteoli, G., Ganesan, A. ve Piomelli, D. (2017). Complete Acid Ceramidase ablation prevents cancer-initiating cell formation in melanoma cells. *Scientific reports*, 7(1), 7411.

Langer, R. (1990). New methods of drug delivery. *Science*, 249(4976), 1527-1533.

Lavan, D. A., McGuire, T. ve Langer, R. (2003). Small-scale systems for in vivo drug delivery. *Nature biotechnology*, 21(10), 1184.

Lawrence TS, Rosenberg SA;eds. Cancer. 8 th Ed. Philadelphia:Lippicott-Williams&Wilkins;2008:79- 92.

Lenhard, R. E., Osteen, R. T., ve Gansler, G. (2001). General approach to cancer patients. *Clinical oncology*, 149-158.

Lensen, D., Vriezema, D. M. ve van Hest, J. C. (2008). Polymeric microcapsules for synthetic applications. *Macromolecular bioscience*, 8(11), 991-1005.

Li, Z., Tan, S., Li, S., Shen, Q. ve Wang, K. (2017). Cancer drug delivery in the nano era: An overview and perspectives. *Oncology reports*, 38(2), 611-624.

Liu, P., Ma, S., Liu, H., Han, H. ve Wang, S. (2017). HCFU inhibits cervical cancer cells growth and metastasis by inactivating Wnt/ β -catenin pathway. *Journal of cellular biochemistry*.

Livasy, C. A., Karaca, G., Nanda, R., Tretiakova, M. S., Olopade, O. I., Moore, D. T. ve Perou, C. M. (2006). Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Modern pathology*, 19(2), 264.

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

Lucki, N. C., ve Sewer, M. B. (2011). Genistein stimulates MCF-7 breast cancer cell growth by inducing acid ceramidase (ASAH1) gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, 286(22), 19399-19409.

Mahdy, A. E., Cheng, J. C., Li, J., Elojeimy, S., Meacham, W. D., Turner, L. S. ve Beckham, T. H. (2009). Acid ceramidase upregulation in prostate cancer cells confers resistance to radiation: AC inhibition, a potential radiosensitizer. *Molecular Therapy*, 17(3), 430-438.

Malinina, L. ve Brown, R. E. (2015). Catalytic mechanism of eukaryotic neutral ceramidase. *Structure*, 23(8), 1371-1372.

Malorni, L., Shetty, P. B., De Angelis, C., Hilsenbeck, S., Rimawi, M. F., Elledge, R., ve ark. (2012). Clinical and biologic features of triple-negative breast cancers in a large cohort of patients with long-term follow-up. *Breast cancer research and treatment*, 136(3), 795-804.

Markman, J. L., Rekechenetskiy, A., Holler, E., ve Ljubimova, J. Y. (2013). Nanomedicine therapeutic approaches to overcome cancer drug resistance. *Advanced drug delivery reviews*, 65(13-14), 1866-1879.

Millard, M., Yakavets, I., Zorin, V., Kulmukhamedova, A., Marchal, S. ve Bezdetnaya, L. (2017). Drug delivery to solid tumors: the predictive value of the multicellular tumor spheroid model for nanomedicine screening. *International journal of nanomedicine*, 12, 7993.

Morimoto, K. ve Koh, M. (2003). Postoperative adjuvant use of carmofur for early breast cancer. *Osaka city medical journal*, 49(2), 77-84.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63.

Mullen, T. D., Hannun, Y. A. ve Obeid, L. M. (2012). Ceramide synthases at the centre of sphingolipid metabolism and biology. *Biochemical Journal*, 441(3), 789-802.

Musumarra, G., Barresi, V., Condorelli, D. F. ve Scirè, S. (2003). A bioinformatic approach to the identification of candidate genes for the development of new cancer diagnostics. *Biological chemistry*, 384(2), 321-327.

Nair, L., Jagadeeshan, S., Nair, S. A. ve Kumar, G. V. (2011). Biological evaluation of 5-fluorouracil nanoparticles for cancer chemotherapy and its dependence on the carrier, PLGA. *International journal of nanomedicine*, 6, 1685.

Nair, P. R. (2019). Delivering combination chemotherapies and targeting oncogenic pathways via polymeric drug delivery systems. *Polymers*, 11(4), 630.

Nguyen, H., Awad, A., Shabani, S. ve Doan, N. (2018). Molecular targeting of acid ceramidase in glioblastoma: a review of its role, potential treatment, and challenges. *Pharmaceutics*, 10(2), 45.

Norris, J. S., Bielawska, A., Day, T., El-Zawahri, A., ElOjeimy, S., Hannun, Y. ve Dong, J. Y. (2006). Combined therapeutic use of AdGFPFasL and small molecule inhibitors of ceramide metabolism in prostate and head and neck cancers: a status report. *Cancer gene therapy*, 13(12), 1045.

Nurgali, K., Jagoe, R. T. Ve Abalo, R. (2018). Adverse effects of cancer chemotherapy: Anything new to improve tolerance and reduce sequelae?. *Frontiers in pharmacology*, 9, 245.

Obeid, L. M., Linardic, C. M., Karolak, L. A. ve Hannun, Y. A. (1993). Programmed cell death induced by ceramide. *Science*, 259(5102), 1769-1771.

Ogretmen, B. ve Hannun, Y. A. (2004). Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. *Nature Reviews Cancer*, 4(8), 604.

Olivera, A., ve Spiegel, S. (2001). Sphingosine kinase: a mediator of vital cellular functions. *Prostaglandins & other lipid mediators*, 64(1-4), 123-134.

Oylar, Ö., Tekin, İ., (2011). Kanserin Teşhis Ve Tedavisinde Nanoteknolojinin Önemi, Uludağ Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi, Cilt 16, Sayı 1.

Önyüksel, H., Bahadori, F. ve Çelik, B. (2017). Hedeflendirilmiş Nanoilaçlar. *Türkiye Klinikleri Pharmacology-Special Topics*, 5(2), 90-101.

Patel, M. N., Lakkadwala, S., Majrad, M. S., Injeti, E. R., Gollmer, S. M., Shah, Z. A., ve ark. (2014). Characterization and evaluation of 5-fluorouracil-loaded solid lipid nanoparticles prepared via a temperature-modulated solidification technique. *AAPS PharmSciTech*, 15(6), 1498-1508.

Paul, D. R. (2011). Elaborations on the Higuchi model for drug delivery. *International journal of pharmaceutics*, 418(1), 13-17.

Pettus, B. J., Chalfant, C. E. ve Hannun, Y. A. (2002). Ceramide in apoptosis: an overview and current perspectives. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1585(2-3), 114-125.

Quin, X. C., Guo, Z. Y., Liu, Z. M., Zhang, W., Wan, M. M., ve Yang, B. W. (2013). Folic acid-conjugated graphene oxide for cancer targeted chemo-photothermal therapy. *Journal of photochemistry and photobiology B: Biology*, 120, 156-162.

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

Realini, N., Solorzano, C., Pagliuca, C., Pizzirani, D., Armirotti, A., Luciani, R. ve Piomelli, D. (2013). Discovery of highly potent acid ceramidase inhibitors with in vitro tumor chemosensitizing activity. *Scientific reports*, 3, 1035.

Rubovszky, G., Udvarhelyi, N., Horváth, Z., Láng, I. ve Kásler, M. (2010). Triple-negative breast carcinoma--review of current literature. *Magyar onkologia*, 54(4), 325-335.

Saad, A. F., Meacham, W. D., Bai, A., Anelli, V., Anelli, V., Mahdy, A. E. ve Keane, T. E. (2007). The functional effects of acid ceramidase over-expression in prostate cancer progression and resistance to chemotherapy. *Cancer biology & therapy*, 6(9), 1451-1456.

Saied, E. M. ve Arenz, C. (2016). Inhibitors of ceramidases. *Chemistry and physics of lipids*, 197, 60-68.

Schuchman, E. H. (2016). Acid ceramidase and the treatment of ceramide diseases: The expanding role of enzyme replacement therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1862(9), 1459-1471.

Seidi, K., Neubauer, H. A., Moriggl, R., Jahanban-Esfahlan, R. ve Javaheri, T. (2018). Tumor target amplification: implications for nano drug delivery systems. *Journal of controlled release*, 275, 142-161.

Selzner, M., Bielawska, A., Morse, M. A., Rüdiger, H. A., Sindram, D., Hannun, Y. A., ve Clavien, P. A. (2001). Induction of apoptotic cell death and prevention of

tumor growth by ceramide analogues in metastatic human colon cancer. *Cancer research*, 61(3), 1233-1240.

Shi, J., Xiao, Z., Kamaly, N. ve Farokhzad, O. C. (2011). Self-assembled targeted nanoparticles: evolution of technologies and bench to bedside translation. *Accounts of chemical research*, 44(10), 1123-1134.

Singh, A., Sharma, P. K. ve Malviya, R. (2011). Release behavior of drugs from various natural gums and polymers. *Polimery w medycynie*, 41(4), 73-80.

Singh, K. K. (2005). Nanotechnology in cancer detection and treatment. 583.

Singh, R., ve Lillard Jr, J. W. (2009). Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Experimental and molecular pathology*, 86(3), 215-223.

Spiegel, S. ve Milstien, S. (2002). Sphingosine 1-phosphate, a key cell signaling molecule. *Journal of Biological Chemistry*, 277(29), 25851-25854.

Spierings, D. C., de Vries, E. G., Vellenga, E., van den Heuvel, F. A., Koornstra, J. J., Wesseling, J. ve de Jong, S. (2004). Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 52(6), 821-831.

Strelow, A., Bernardo, K., Adam-Klages, S., Linke, T., Sandhoff, K., Krönke, M. ve Adam, D. (2000). Overexpression of acid ceramidase protects from tumor necrosis factor-induced cell death. *Journal of Experimental Medicine*, 192(5), 601-612.

Sudhakar, A. (2009). History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *Journal of cancer science and therapy*, 1(2), 1-4.

Suk, J. S., Xu, Q., Kim, N., Hanes, J. ve Ensign, L. M. (2016). PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 99, 28-51.

Surapaneni, S. K., Bashir, S. ve Tikoo, K. (2018). Gold nanoparticles-induced cytotoxicity in triple negative breast cancer involves different epigenetic alterations depending upon the surface charge. *Scientific reports*, 8(1), 1-12.

Taha, T. A., Mullen, T. D. ve Obeid, L. M. (2006). A house divided: ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate in programmed cell death. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1758(12), 2027-2036.

Takahashi, K., Tanaka, M., Inagaki, A., Wanibuchi, H., Izumi, Y., Miura, K. ve Iwao, H. (2013). Establishment of a 5-fluorouracil-resistant triple-negative breast cancer cell line. *International journal of oncology*, 43(6), 1985-1991.

Tan, S. F., Pearson, J. M., Feith, D. J. ve Loughran Jr, T. P. (2017). The emergence of acid ceramidase as a therapeutic target for acute myeloid leukemia. *Expert opinion on therapeutic targets*, 21(6), 583-590.

Todd R, Wong DT. (1999). Oncogenes. *Anticancer Res.* Nov-Dec;19(6A):4729-46.

Tummala, S., Kumar, M. S., ve Prakash, A. (2015). Formulation and characterization of 5-Fluorouracil enteric coated nanoparticles for sustained and localized release in treating colorectal cancer. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 23(3), 308-314.

Tuncer, M. (2008) Globalleşen Kanser Ve Türkiye, www.nukte.org

V. Weissig, T.K. Pettinger, N. Murdock, Nanopharmaceuticals (part 1): products on the market, *International journal of nanomedicine*, 9 (2014) 4357-4373.

Vethakanraj, H. S., Sesurajan, B. P., Padmanaban, V. P., Jayaprakasam, M., Murali, S. ve Sekar, A. K. (2018). Anticancer effect of acid ceramidase inhibitor ceranib-2 in human breast cancer cell lines MCF-7, MDA MB-231 by the activation of SAPK/JNK, p38 MAPK apoptotic pathways, inhibition of the Akt pathway, downregulation of ER α . *Anti-cancer drugs*, 29(1), 50-60.

Wang, Y., Li, P., Chen, L., Gao, W., Zeng, F. ve Kong, L. X. (2015). Targeted delivery of 5-fluorouracil to HT-29 cells using high efficient folic acid-conjugated nanoparticles. *Drug delivery*, 22(2), 191-198.

White-Gilbertson, S., Mullen, T., Senkal, C., Lu, P., Ogretmen, B., Obeid, L. ve Voelkel-Johnson, C. (2009). Ceramide synthase 6 modulates TRAIL sensitivity and nuclear translocation of active caspase-3 in colon cancer cells. *Oncogene*, 28(8), 1132.

Williams, GM., (1992). DNA reactive and epigenetic carcinogens. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 44: 457– 64.

Yildiz-Ozer, M., Oztopcu-Vatan, P. ve Kus, G. (2018). The investigation of ceranib-2 on apoptosis and drug interaction with carboplatin in human non small cell lung cancer cells in vitro. *Cytotechnology*, 70(1), 387-396.

Yokus, B., Akdag, M.Z., Dasdag, S., Cakir, D.U. ve Kizil, M., (2008). Extremely Low Frequency Electromagnetic Fields Cause Oxidative DNA Damage in Rats. *International Journal of Radiation Biology*, 8 (10), 789-795.

Yokuş, B., Çakır, DÜ., (2012). İn vivo Oksidatif DNA Hasarı Biyomarkeri; 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*.5: 535- 43.

Zhao, C. Y., Cheng, R., Yang, Z. ve Tian, Z. M. (2018). Nanotechnology for cancer therapy based on chemotherapy. *Molecules*, 23(4), 826.

Zinkel, D. F. ve Russell, J. (1989). Naval Stores. Production, Chemistry, Utilization. Pulp Chemicals Association. Inc. New York, NY. 1059p.

Zoli, W., Ulivi, P., Tesei, A., Fabbri, F., Rosetti, M., Maltoni, R. ve ark. (2005). Addition of 5-fluorouracil to doxorubicin-paclitaxel sequence increases caspase-dependent apoptosis in breast cancer cell lines. *Breast Cancer Research*, 7(5), R681.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

NANOİLAÇ OLARAK MODİFİYE EDİLMİŞ SERAMİDAZ
İNİHİTÖRLERİNİN İN VİTRO KANSER HÜCRELERİNDE
TOKSİK ETKİLERİNİN VE MEKANİZMASININ ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

% 6	% 2	% 1	% 5
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

SİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	% 2
2	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
3	polen.itu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
4	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	<% 1
5	Submitted to Dumlupinar University Öğrenci Ödevi	<% 1
6	acikerisim.pau.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
7	Submitted to Hacettepe University Öğrenci Ödevi	<% 1
8	Submitted to Anadolu University Öğrenci Ödevi	<% 1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Ferdane	Soyadı	Danışman Kalındemirtaş
Email	ferdanis@hotmail.com	Uyruğu	TC

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İstanbul Üniversitesi	-
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi	2015
Lisans	Mustafa Kemal Üniversitesi	2006

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Ar. Gör.	İstanbul Üniversitesi	2014-2020
2.	Ar. Gör.	Erzincan Üniversitesi	2014-2014

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	Orta			78,75

Yayınları

Kalındemirtaş, F. D., Birman, H., Candöken, E., Gazioğlu, S. B., Melikoğlu, G., & Kuruca, S. (2019). Cytotoxic Effects of Some Flavonoids and Imatinib on the K562 Chronic Myeloid Leukemia Cell Line: Data Analysis Using the Combination Index Method. Balkan medical journal, 36(2), 96.

HAKEMLİ KONGRE/SEMPOZYUM BİLDİRİ KİTAPLARINDA YER ALAN YAYINLAR

Danışman F., Birman H., Çandöken E., Kuruca D.S., Melikoğlu G., Purisa S., "Investigation of Apoptotic Effects of some Flavonoids on Human Chronic Myeloid Leukemia Cell Lines ", 41. ulusal fizyoloji kongresi, ÇANAKKALE, TÜRKİYE, ACTA PHYSIOLOGICA, ss.34-34, 2015

Altiner P., Albeniz G., Türker Şener L., Danışman F., Birman H., Albeniz I., "İnvestigation of DNADamage using the Comet Assay", ACTA PHYSIOLOGICA, vol.215, pp.34-35, 2015

Birman H., Daniřman F., Candöken E., Kuruca D.S., Melikoğlu G., "Cytotoxic effect of flavonoids combined with imatinib on human chronic myeloid leukemia cell lines", ACTA PHYSIOLOGICA, vol.215, pp.124-124, 2015

Türker şener L., Albeniz G., Çelikok Y., Daniřman F., Ahbab M.A., Albeniz I., "Effects of endocrine disrupting compounds on fetal development during pregnancy", ACTA PSYCHOLOGICA, vol.709, pp.50-50, 2016

Daniřman Kalindemirtaş F., Birman H., Albeniz I., "İnsan lösemi hücreleri K562 ve HL60 hücre serilerinde bazı flavonoid bileşiklerin sitotoksik etkilerinin karşılaştırılması", 42. Ulusal Fizyoloji Kongresi, DÜZCE, TÜRKİYE, ACTA PSYCHOLOGICA, ss.61-62, 2016

Daniřman Kalindemirtaş F., Kuruca D.S., Kaya B., Yanardaę R., Ertik O., Ülküseven B., "Cytotoxic effect of vanadium complexes that has elastase enzyme inhibitor activity on breast cancer cells.", 1st International Symposium on Graduate Research in Science Focus on Entrepreneurship and Innovation (ISGRS 2018), İSTANBUL, TÜRKİYE, 4-6 Ekim 2018, pp.159-159

Daniřman F., Birman H., Tan E., Ilgar M., Karakuş S., Kilislioğlu A., Kuruca S. "Preparation of Drug Loaded Polymeric Nanoparticles As Ceramidase Inhibitor", 2. Uluslararası İVEKbio kongresi, 2018 İSTANBUL, TÜRKİYE.