

**T.C.**  
**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KOLON KANSER HÜCRE HATTINDA KUERSETİN VE KAFEİK  
ASİT FENETİL ESTER YÜKLÜ NANOPARTİKÜLLERİN  
PROLİFERASYON VE APOPTOZ ÜZERİNE ETKİLERİNİN  
İNCELENMESİ**

**Reyhan Dilsu ÇOLPAN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı**

**Danışman**

**Dr. Öğretim Üyesi Ayşegül ERDEMİR ÜSTÜNDAĞ**

**Ocak, 2020**

**T.C.**  
**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KOLON KANSER HÜCRE HATTINDA KUERSETİN VE KAFEİK ASİT  
FENETİL ESTER YÜKLÜ NANOPARTİKÜLLERİN PROLİFERASYON  
VE APOPTOZ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Reyhan Dilsu ÇOLPAN tarafından hazırlanan tez çalışması 22.01.2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

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

**Jüri Üyeleri**

Dr. Öğr. Üyesi Ayşegül ERDEMİR ÜSTÜNDAĞ, Danışman

Yıldız Teknik Üniversitesi

\_\_\_\_\_

Doç. Dr. Banu MANSUROĞLU, Üye

Yıldız Teknik Üniversitesi

\_\_\_\_\_

Dr. Öğr. Üyesi Melike ERSÖZ, Üye

Demiroğlu Bilim Üniversitesi

\_\_\_\_\_

Danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Ayşegül ERDEMİR ÜSTÜNDAĞ sorumluluğunda tarafımda hazırlanan “Kolon Kanseri Hücre Hattında Kuersetin ve Kafeik Asit Fenetil Ester Yüklü Nanopartiküllerin Proliferasyon ve Apoptoz Üzerine Etkilerinin İncelenmesi” başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Reyhan Dilsu ÇOLPAN

İmza

Bu alışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü'nün FYL-2019-3609 numaralı projesi ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) 2210-C Öncelikli Alanlar Yüksek Lisans Burs Programı ile desteklenmiştir.

*Aileme*

## TEŞEKKÜR

---

Yüksek lisans eğitimim boyunca danışmanlığımı üstlenen, bilgi ve deneyimi ile her zaman örnek alacağım, sevgi ve hoşgörüsü ile her konuda daima yanımda olan sayın Dr. Öğr. Üyesi Ayşegül ERDEMİR ÜSTÜNDAĞ'a,

Bu tezin her aşamasında bilgi, destek ve yardımlarını esirgemeyen araştırmacı ruhu ve fikirleriyle ufku açan sayın Doç. Dr. Serap DERMAN'a,

Tez çalışmam süresince tüm laboratuvar olanaklarını sunarak yardımını esirgemeyen, lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca kendisinden aldığım dersler sayesinde bilgi ve tecrübesinden yararlandığım sayın Doç. Dr. Banu MANSUROĞLU'na,

Kullandığım hücre hattını temin ettiğim, hücre kültüründe yaşanan tüm aksiliklere rağmen tekrar tekrar hücre temini sağlayarak desteğini esirgemeyen, sayın Arş. Gör. Dr. Levent ELMAS'a

Her daim yanımda olan, maddi manevi tüm imkanlarını sunan canım Ailem'e,

Deneyler süresince gece-gündüz, haftaiçi-haftasonu fark etmeden gelip çalıştığım, çıkan her türlü sorunla birlikte mücadele ettiğim hücre kültürü ekibi arkadaşlarım Fatma Şayan POYRAZ ve Gülşah AKBAŞ'a, hücre kültürü ekibine sonradan dahil olup her daim yanımda olan Cansel KAYA ve İrem METEOĞLU'na, -1'deki ortamı güzelleştiren tüm yan laboratuvardaki arkadaşlarım Kübra TRABZONLU, Sinem KURT, Tuğba ATABEY, Sefanur ERDÖL, Emrah BERTAN, İlkgül AKYAMAN'a, her konuda birbirimize yardımcı olduğumuz Merkez Lab. ekibinden Fatma Ceren KIRMIZITAŞ ve Sevgi VARLI'ya, kendimi bildim bileli desteğiyle her zaman yanımda olan en yakın arkadaşım Yasemin ÇOMAK'a teşekkür ederim.

Bu tez çalışması TÜBİTAK 2210-C Öncelikli Alanlar Yurt İçi Lisansüstü Burs Programı tarafından desteklenmiştir. Tüm desteklerinden dolayı TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım.

# İÇİNDEKİLER

<b>SİMGE LİSTESİ</b>	<b>ix</b>
<b>KISALTMA LİSTESİ</b>	<b>x</b>
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b>	<b>xi</b>
<b>TABLO LİSTESİ</b>	<b>xiii</b>
<b>ÖZET</b>	<b>xv</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>xvii</b>
<b>1 Giriş</b>	<b>1</b>
1.1 Literatür Özeti.....	1
1.2 Tezin Amacı.....	3
1.3 Hipotez .....	3
<b>2 Genel Bilgiler</b>	<b>4</b>
2.1 Kolon Kanseri .....	4
2.2 Kolon Kanserinin Moleküler Mekanizmaları.....	6
2.2.1 Otonom Büyüme Sinyali .....	7
2.2.2 Anti-Büyüme Sinyallerine Duyarsızlık .....	8
2.2.3 Replikatif Ölümsüzlük .....	8
2.2.4 Anjiyogenezi İndükleme .....	9
2.2.5 İnvazyon ve Metastazı İndükleme .....	9
2.2.6 Apoptoza Direnç .....	10
2.3 Kolon Kanseri için Tedavi Stratejileri.....	13
2.3.1 Güncel Tedaviler.....	13
2.3.2 Alternatif Tedaviler.....	13
2.4 Flavonoidler .....	16
2.4.1 Kuersetin.....	17
2.4.2 CAPE .....	19
2.5 Nanoteknoloji ve Kanser .....	22
2.5.1 İlaç Taşıyıcı Sistemler Olarak Nanopartiküller.....	24
2.5.2 Polimerik Nanopartiküller .....	27
<b>3 Materyal ve Yöntem</b>	<b>31</b>
3.1 Materyal .....	31
3.1.1 Kullanılan Cihazlar .....	31

3.1.2 Kullanılan Sarf Malzemeler .....	31
3.1.3 Kullanılan Kimyasallar, Enzimler, Kitler.....	32
3.1.4 Stok Solüsyonlar ve Tamponlar .....	34
3.2 Yöntem.....	39
3.2.1 CAPE Molekülünün UV Standart Eğrisi .....	39
3.2.2 Kuersetin Molekülünün UV Standart Eğrisi .....	39
3.2.3 Tekli Emülsiyon Çözücü Uçurma Metodu (o/w) ile Kuersetin, CAPE ve Kuersetin-CAPE Yüklü PLGA Nanopartiküllerinin Sentezi.....	39
3.2.4 Kuersetin, CAPE ve Kuersetin-CAPE Yüklü Nanopartiküllerin Reaksiyon Verimi, Enkapsülasyon Etkinliği ve Etken Madde Yüklenme Veriminin Hesaplanması .....	40
3.2.5 Kuersetin, CAPE ve Kuersetin-CAPE Yüklü Nanopartiküllerin Karakterizasyonu .....	41
3.2.6 Kuersetin, CAPE ve Kuersetin-CAPE Yüklü Nanopartiküllerin <i>In Vitro</i> Salımı .....	42
3.2.7 HT-29 İnsan Kolon Kanseri Hücre Kültürü Çalışmaları .....	42
3.2.8 Kuersetin-CAPE Yüklü Nanopartiküllerin <i>In Vitro</i> Biyolojik Etkinliğinin Araştırılması .....	45
<b>4 Sonuçlar ve Tartışma</b> .....	<b>58</b>
4.1 Kuersetin ve CAPE Moleküllerine Ait UV-Vis Spektrumları ve Kalibrasyon Eğrileri.....	58
4.1.1 Kuersetin Molekülüne Ait UV-Vis Spektrumu ve Kalibrasyon Grafiği .....	58
4.1.2 CAPE Molekülüne Ait UV-Vis Spektrumu ve Kalibrasyon Grafiği.....	59
4.2 Farklı Parametreler ile Kuersetin, CAPE ve Kuersetin-CAPE Yüklü PLGA Nanopartiküllerinin Sentezi.....	60
4.3 Kuersetin, CAPE ve Kuersetin-CAPE Yüklü Nanopartiküllerin Reaksiyon Verimi, Enkapsülasyon Etkinliği ve Etken Madde Yüklenme Verimi.....	61
4.3.1 Reaksiyon Verimi (RV) .....	61
4.3.2 Enkapsülasyon Etkinliği (EE).....	65
4.3.3 Etken Madde Yüklenme Verimi (DL).....	66
4.4 Kuersetin, CAPE ve Kuersetin-CAPE Yüklü Nanopartiküllerin Karakterizasyonu .....	67
4.4.1 Nanopartiküllerin Boyut Analizi ve Çoklu Dağılım İndeksleri (PDI) .....	67
4.4.2 Nanopartiküllerin Zeta Potansiyel Analizi.....	69
4.4.3 Nanopartiküllerin Morfolojik İncelemesi.....	71
4.4.4 Nanopartiküllerin FT-IR Analizi .....	72



4.5 Nanopartiküllerin <i>In Vitro</i> Salım Analizi .....	75
4.6 HT-29 Kolon Kanser Hücre Hattında Q-C ve QC-NP'lerin <i>In Vitro</i> Etkinlik Testleri .....	76
4.6.1 Q-C ve QC-NP'lerin HT-29 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Aktivitesi ....	77
4.6.2 Q-C ve QC-NP'lerin Hücre Göçü Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi .....	81
4.6.3 Q-C ve QC-NP'lerin HT-29 Hücreleri Üzerindeki Anti-Proliferatif Etkisi	85
4.6.4 Q-C ve QC-NP ile Apoptoz İndüksiyonunun Gen Düzeyinde Gösterimi.....	87
4.6.5 Q-C ve QC-NP ile Apoptoz İndüksiyonunun Protein Düzeyinde Gösterimi .....	90
<b>5 Sonuç ve Öneriler</b>	<b>94</b>
<b>Kaynakça</b>	<b>98</b>
<b>Tezden Üretilmiş Yayınlar</b>	<b>112</b>

## SİMGE LİSTESİ

---

rpm	Dakikada dönme hızı
°C	Derece Santigrat
g	Gram
L	Litre
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mV	Milivolt
M	Molar
nm	Nanometre

## KISALTMA LİSTESİ

---

5-FU	5-fluorouracil
ATCC	American Type Culture Collection
ATR	Attenuated Total Reflectance
BCA	Bikinkoninik asit
CAPE	Kafeik asit fenetil ester
DCM	Diklorometan
DL	Etken Madde Yüklenme Verimi
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EE	Enkapsülasyon Etkinliği
EMA	European Medicine Agency
EMT	Epitelyal Mezenkimal Geçiş
EtOH	Etil alkol
FBS	Fetal Bovine Serum
FDA	Food and Drug Administration
FT-IR	Fourier Transform Infrared
HCl	Hidroklorik asit
IC <sub>50</sub>	Yarı maksimum inhibitör konsantrasyon
MPP	Matris metaloproteinazlar
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
NP	Nanopartikül
OD	Optik Yoğunluk
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCNA	Prolifere Hücre Çekirdek Antijeni
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDI	Çoklu Dağılım İndeksi
PGA	Poliglikolik asit
PLA	Polilaktik asit
PLGA	Polilaktik-ko-glikolik asit
PVA	Polivinil alkol
Q-C	Serbest kuersetin-CAPE
QC-NP	Kuersetin-CAPE Nanopartikül
RNA	Ribonükleik asit
RV	Reaksiyon Verimi
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopu
UV	Ultra Violet

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	Kolon kanseri prognozu ile ilişkilendirilmiş genetik değişiklikler .....	4
Şekil 2.2	Kanser hücrelerinin altı temel özelliği .....	6
Şekil 2.3	Hücre döngüsü evreleri .....	7
Şekil 2.4	Apoptotik süreçte yer alan Bcl-2 protein ailesi üyeleri.....	11
Şekil 2.5	Apoptozun içsel ve dışsal yoldan indüklenmesi .....	12
Şekil 2.6	Kuersetinin kimyasal yapısı.....	18
Şekil 2.7	Kafeik asit fenetil esterinin kimyasal yapısı .....	20
Şekil 2.8	Kanser hücrelerinde CAPE'nin apoptotik yolak üzerine etkisi.....	21
Şekil 2.9	Kuersetin ve CAPE moleküllerinin anti-kanser ajan olarak kullanımını sınırlayan özellikler .....	22
Şekil 2.10	İlaç taşıma sistemi olarak kullanılan nano-yapılı sistemler.....	24
Şekil 2.11	Kan damarlarının çok olduğu bir tümör bölgesine nanopartikül aracılı kemoterapik vermenin şematik gösterimi .....	26
Şekil 2.12	Polimerik nanopartiküllerin sınıflandırılması.....	27
Şekil 2.13	L-PLA (a), D-PLA(b), PGA(c), PLGA(d)'nin kimyasal yapıları.....	29
Şekil 2.14	PLGA'nın hidrolizi.....	30
Şekil 3.1	BSA standart eğrisi.....	54
Şekil 3.2	Jeldeki proteinlerin membrana transferi için yerleşimi .....	57
Şekil 4.1	Kuersetin molekülüne ait kalibrasyon eğrisi .....	58
Şekil 4.2	Kuersetin molekülüne ait UV-Vis Spektrumu .....	59
Şekil 4.3	CAPE molekülüne ait kalibrasyon eğrisi.....	59
Şekil 4.4	CAPE molekülüne ait UV-Vis Spektrumu .....	60
Şekil 4.5	NP-20'ye ait boyut dağılım analizi.....	68
Şekil 4.6	NP-4'e ait boyut dağılım analizi.....	68
Şekil 4.7	NP-6'ya ait boyut dağılım analizi .....	69
Şekil 4.8	NP-12'ye ait boyut dağılım analizi.....	69
Şekil 4.9	NP-20'ye ait zeta potansiyel grafiği .....	70
Şekil 4.10	NP-4'e ait zeta potansiyel grafiği.....	70
Şekil 4.11	NP-6'ya ait zeta potansiyel grafiği .....	70
Şekil 4.12	NP-12'ye ait zeta potansiyel grafiği .....	71
Şekil 4.13	NP-12'nin 40.000x büyütme oranı ile çekilmiş SEM görüntüsü .....	71
Şekil 4.14	PLGA'ya ait (NP-18) FT-IR spektrumu .....	73
Şekil 4.15	NP-4'e ait FT-IR spektrumu .....	74
Şekil 4.16	NP-6'ya ait FT-IR spektrumu.....	74
Şekil 4.17	NP-12'ye ait FT-IR spektrumu.....	75
Şekil 4.18	QC-NP'nin kuersetin (a) ve CAPE (b) için salımı .....	76
Şekil 4.19	HT-29 hücrelerinin 4X (a) ve 10X (b) objektif büyütme altındaki invert mikroskop görüntüleri.....	77
Şekil 4.20	Q-C ve QC-NP'nin HT-29 hücre canlılığına 24 saat süre ile etkisi.....	79
Şekil 4.21	Q-C ve QC-NP'nin HT-29 hücre canlılığına 48 saat süre ile etkisi.....	79
Şekil 4.22	Q-C ve QC-NP'nin HT-29 hücre canlılığına 72 saat süre ile etkisi.....	80
Şekil 4.23	Q-C ve QC-NP'nin HT-29 hücre göçü üzerine etkisi. ....	84
Şekil 4.24	Farklı dozlarda Q-C ve QC-NP uygulanmış HT-29 hücrelerine ait proliferasyon grafiği.....	86

<b>Şekil 4.25</b> Q-C ve QC-NP uygulanan HT-29 hücrelerine ait anti-proliferatif etkinin gösterimi.....	87
<b>Şekil 4. 26</b> Kaspaz-3 (Casp-3), kaspaz-9 (Casp-9), sitokrom-c (Cyt-c), Bcl-2, Bax, Apaf-1 ve kaspaz-8 (Casp-8) genlerinin kontrole göre relatif ekspresyonları.....	89
<b>Şekil 4.27</b> Q-C ve QC-NP uygulanmış örneklere ait kaspaz-9, kaspaz-3 ve $\beta$ -actin'in Western Blot ile analizi .....	91

## TABLO LİSTESİ

---

<b>Tablo 2.1</b> Farklı flavonoid gruplarının ana kaynakları ve anti-kanser özellikleri.....	17
<b>Tablo 2.2</b> Nanopartiküllerin biyoloji ve tıptaki uygulama alanları .....	25
<b>Tablo 2.3</b> Nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan doğal ve sentetik polimerler, blok kolipomerler ve stabilizörler .....	28
<b>Tablo 3.1</b> HT-29 hücre hattının özellikleri .....	42
<b>Tablo 3.2</b> cDNA sentezinde kullanılan bileşenler.....	49
<b>Tablo 3.3</b> cDNA sentezi reaksiyon koşulları .....	50
<b>Tablo 3.4</b> Real-Time PCR analizinde kullanılan bileşenler .....	51
<b>Tablo 3.5</b> Real-Time PCR reaksiyon koşulları.....	52
<b>Tablo 3.6</b> Real-Time PCR ile ekspresyonu belirlenecek genlere ait primer dizileri, ürün uzunluğu ve Tm değerleri.....	52
<b>Tablo 3.7</b> Protein standartlarının hazırlanması.....	54
<b>Tablo 4.1</b> Etken madde olarak kuersetin ve CAPE kullanılarak üretilen nanopartiküllere ait RV, EE, DL, Z-ave, PDI ve mV sonuçları .....	62
<b>Tablo 4.2</b> Farklı parametreler kullanılarak üretilen nanopartiküller .....	63
<b>Tablo 4.3</b> Kuersetin, CAPE ve kuersetin-CAPE yüklü nanopartiküllere ait parametreler .....	65
<b>Tablo 4.4</b> Örneklerden izole edilen RNA miktarları.....	88

## **Kolon Kanseri Hücre Hattında Kuersetin ve Kafeik Asit Fenetil Ester Yüklü Nanopartiküllerin Proliferasyon ve Apoptoz Üzerine Etkilerinin İncelenmesi**

Reyhan Dilsu ÇOLPAN

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Dr. Öğretim Üyesi Ayşegül ERDEMİR ÜSTÜNDAĞ

Kolon kanseri, ülkemizde görülen kanser türleri arasında üçüncü sırada yer almakta ve görülme sıklığı giderek artmaktadır. Günümüzde kemoterapi ve radyoterapi gibi kanser tedavisinde kullanılan yöntemler kısıtlı etkinliğe sahip olup birçok yan etkiyi barındırmaktadır. Bu nedenle, kanser tedavilerini desteklemek için yeni yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır. Son yıllarda, bitkisel kökenli bileşikler birçok anti-kanser özellik sergilediklerinden dolayı anti-kanser ajan olarak kullanımları önem kazanmıştır.

İki doğal kaynaklı bileşik, kuersetin ve kafeik asit fenetil ester (CAPE) molekülleri, immün yanıtın baskılanması, antioksidan, anti-inflamatuvar ve anti-karsinojenik özellikler başta olmak üzere geniş spektrumlu biyolojik aktiviteye sahiptirler. Sahip oldukları bu avantajlı özelliklerinin yanı sıra suda düşük çözünürlük, düşük stabilite ve düşük biyoyararlanım gibi dezavantajlı özelliklerinden dolayı biyolojik sistemlerde kullanımları kısıtlanmaktadır. Günümüzde nanopartiküler sistemler,

kuersetin ve CAPE gibi moleküllerin de sahip olduğu birçok dezavantajlı özelliğın bertaraf edilmesi amacıyla ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanılmaktadır.

Bu tez çalışmasının amacı; kuersetin-CAPE içeren PLGA nanopartikül sistemlerin sentezlenmesi ve HT-29 insan kolon kanser hücre hattı üzerinde anti-kanser aktivitesinin hücresele ve moleküler düzeyde belirlenmesidir. Kuersetin-CAPE yüklü nanopartiküller (QC-NP) tekli emülsiyon (w/o) çözücü uçurma yöntemi kullanılarak sentezlenmiştir. Nanopartiküllerin partikül boyutu, zeta potansiyeli, çoklu dağılım indeksi, ilaç yükleme kapasitesi ve enkapsülasyon verimi belirlenmiştir. QC-NP'nin enkapsülasyon verimi kuersetin için %74.28, CAPE için %65.24 olarak hesaplanmıştır.

Optimizasyonu ve karakterizasyonu gerçekleştirilen QC-NP'nin serbest kuersetin-CAPE (Q-C) ile karşılaştırmalı olarak insan kolon kanser hücre hattı HT-29 üzerindeki sitotoksik aktivitesi MTT yöntemiyle belirlenmiştir. HT-29 hücrelerinin Q-C ve QC-NP ile inkübasyonu sonucunda IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 53.42 µg/ml ve 11.28 µg/ml (24 saat), 15.54 µg/ml ve 8.29 µg/ml (48 saat), 47.57 µg/ml ve 22.96 µg/ml (72 saat) olarak tespit edilmiştir. Bunlara ek olarak, Q-C ve QC-NP'nin HT-29 insan kolon kanser hücre hattı üzerindeki hücre göçü ve proliferasyonu üzerindeki etkisi incelenmiş; kanser hücrelerinin göç ve proliferasyonunu önemli ölçüde azalttığı gözlemlenmiştir. Aynı zamanda, hücreler üzerine Q-C ve QC-NP uygulanması ile apoptotik yolda yer alan genlerin ekspresyon değişiklikleri mRNA ve protein düzeyinde gösterilmiştir. QC-NP'ler serbest moleküllere kıyasla HT-29 hücrelerinin kaspaz-3 ve cleaved kaspaz-9 ekspresyonunu arttırmıştır. Sonuç olarak, kuersetin-CAPE yüklü nanopartiküllerin HT-29 insan kolon karsinoma hücre hattında serbest moleküllere kıyasla sitotoksik aktiviteyi arttırdığı, proliferasyonu azalttığı ve apoptozu indüklediği tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** CAPE, kuersetin, nanopartikül, anti-kanser, kolon kanseri



# **Investigation of the effects of Quercetin and Caffeic Acid Phenethyl Ester Loaded Nanoparticles on Proliferation and Apoptosis in Colon Cancer Cell Line**

Reyhan Dilsu ÇOLPAN

Department of Molecular Biology and Genetics

Master of Science Thesis

Advisor: Assist. Prof. Dr Ayşegül ERDEMİR ÜSTÜNDAĞ

Colon cancer is in third place among the types of cancer seen in our country and its incidence is gradually increasing. Nowadays, methods used in cancer treatment such as chemotherapy and radiotherapy have limited efficacy and have many side effects. Therefore, new approaches are needed to support cancer therapies. Recently, plant derived compounds have gained an attraction as anti-cancer agents since they exhibit many anti-cancer properties.

Two natural derived compounds, quercetin and caffeic acid phenethyl ester (CAPE) molecules, have broad spectrum of biological activity, especially in the suppression of immune response, antioxidant, anti-inflammatory and anti-carcinogenic properties. Besides their advantageous properties, their use in biological systems is limited due to their disadvantageous properties such as low solubility in water, low stability and low bioavailability. Nowadays, nanoparticle systems are being used as drug delivery systems to eliminate many

disadvantageous properties which molecules such as quercetin and CAPE also have.

The aim of this study is synthesis of quercetin-CAPE loaded nanoparticles and determination of their anti-cancer activity at cellular and molecular level on HT-29 human colon cancer cell line. Quercetin-CAPE loaded nanoparticles (QC-NPs) were synthesized by single emulsion (w/o) solvent evaporation method. Particle size, zeta potential, polydispersity index, drug loading capacity and encapsulation efficiency of nanoparticles were determined. Particle size of QC-NP was determined as 348.6 nm. The encapsulation efficiency of the QC-NP was calculated 74.28% for quercetin and 65.24% for CAPE.

Cytotoxic activity of optimized and characterized QC-NPs on HT-29 cell line was determined by MTT method in comparison with the free quercetin-CAPE (Q-C). Incubation of HT-29 cells with Q-C and QC-NPs resulted in IC<sub>50</sub> values 53.42 µg/mL and 11.28 µg/mL (24 h), 15.54 µg/mL and 8.295 µg/mL (48 h), and 47.57 µg/mL and 22.96 µg/mL (72 h), respectively. Additionally, effect of Q-C and QC-NP on cell migration and proliferation of HT-29 human colon cancer cell line was examined and it was observed that migration and proliferation of cancer cells was significantly reduced. Also, expression changes of genes in the apoptotic pathway were demonstrated at mRNA and protein level after treatment of cells with Q-C and QC-NP. QC-NPs increased the expression of caspase-3 and cleaved caspase-9 of HT-29 cells compared to free molecules. As a result, it was determined that quercetin-CAPE loaded nanoparticles increased cytotoxic activity, reduced proliferation and induced apoptosis in the HT-29 human colon carcinoma cell line in comparison with free molecules.

**Keywords:** CAPE, quercetin, nanoparticle, anti-cancer, colon cancer

### 1.1 Literatür Özeti

Kolon kanseri, kolon ve rektum dokusu gibi epitelyal dokulardan köken alan ve adenomların karsinomlara dönüşüm süreci ile ortaya çıkan bir kanser türüdür[1], [2]. Dünyada en sık görülen tümörlerden birisi olan kolon kanseri hem erkek hem de kadınlar için kanser ölümlerinin en önde gelenleri arasında yer almaktadır [3]. Ülkemizde görülen kanser türleri arasında üçüncü en sık görülen kanser türü olup dünya genelinde kanserden ölüm vakalarında dördüncü sırada yer almaktadır [4].

Kolon kanseri tedavisi, tümörün hangi evrede olduğuna bağlı olarak değişmekle beraber genel olarak kemoterapi ve radyoterapi yöntemlerini içermektedir[5]. Bu yöntemlerin temel amacı kanserli hücreleri öldürmektir. Ancak kemoterapötik ilaçların çoğunda vücuttaki kanserli olmayan normal bölünen hücreler etkilenerek düşük bağışık yanıt, saç dökülmesi, yorgunluk, bulantı ve hormon dengesizliği gibi istenmeyen yan etkiler ortaya çıkmaktadır[6]. Kısıtlı etkinliğe sahip olan bu yöntemlerin neden olduğu birçok yan etki sebebiyle kanser terapilerini destekleyecek yeni yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda meyve ve sebze tüketiminin kanser riskini azalttığına yönelik sonuçlarının bildirilmesi, bitkisel kökenli doğal bileşiklerin kanser tedavisinde kullanımına olan ilgi ve araştırmaları arttırmıştır.

Flavonoidler, bitkiler tarafından üretilen ve insan sağlığı üzerinde yararlı etkilere sahip olan düşük moleküler ağırlıklı polifenolik bileşiklerdir [7]. Kuersetin; elma, soğan, brokoli, bögürtlen, ahududu, fındık ve kırmızı şarapta sıklıkla bulunan ve flavonoller grubunda yer alan bir flavonoid olup [8] antioksidan, anti-kanser, anti-anjiyogenez gibi geniş biyolojik aktivitelere sahiptir [9]. Kuersetinin hücre döngüsü regülasyonu, apoptozu indükleme, tirozin kinaz aktivitesinin inhibisyonunu sağlama fonksiyonları ise anti-kanser ajan olma potansiyelini güçlendirir niteliktedir [5]. Bir başka doğal kaynaklı molekül, kafeik asit fenetil

ester (CAPE) ise propolisin aktif bileşenlerinden biridir ve bitkilerde yaygın bir şekilde bulunur. CAPE molekülü immün yanıtın baskılanması, antioksidan, antimitojenik, antikarsinojenik, anti-inflamatuvar, antiviral ve antibakteriyel özellikler başta olmak üzere farklı biyolojik ve farmakolojik aktivitelere sahiptir [10], [11]. CAPE aktivitesini, çeşitli kanser türlerinde anjiyogenez, tümör invazyonu, metastaz, proliferasyon, apoptoz süreçlerine etki ederek gerçekleştirmektedir. CAPE'nin kanser hücre hatları üzerine etki ederken, sağlıklı hücreler üzerine zarar göstermeyip yan etkilere neden olmaması anti-kanser ajan olarak kullanılma potansiyelini destekler niteliktedir [12]. Tedavide kullanılan kemoterapi ve radyoterapinin yan etkileri göz önüne alındığında CAPE'nin sahip olduğu bu özellik oldukça önemlidir [13].

Kuersetin ve CAPE moleküllerinin sahip oldukları sayısız avantajların yanı sıra biyolojik sistemlerde kullanımlarını kısıtlayan suda düşük çözünürlük, yarılanma ömrünün kısa olması, fizyolojik ortamda kararsızlık ve düşük biyoyararlanım gibi birçok dezavantajlı özellikleri de bulunmaktadır [14], [15]. Bu moleküllerin tedavide kullanılmasını artırmak amacıyla nanopartiküler sistemler sahip oldukları eşsiz fiziksel ve kimyasal özellikler ile oldukça güçlü araçlardır. Bu sistemler; tümörlerin spesifik olarak hedeflenmesine, etken maddelerin daha düşük dozlarda kullanılmasına, sağlıklı hücreler üzerine olan toksik etkilerinin en aza indirgenmesine olanak sağlamaktadır [16], [17]. Özellikle polilaktit-poliglikolit kopolimerleri (PLGA) gibi biyoyumlu ve biyobozunur özellikteki polimerik nanopartiküler sistemler hem ilaç taşıyıcı olarak hem de kombinasyon terapilerinde ilaç etkilerinin artırılması amacıyla sıklıkla tercih edilmektedir [18].

Son yıllarda yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar, polifenolik anti-kanser ajanlarının kombinatif olarak kullanımının tümör büyümesini tek bir ajandan daha etkili bir şekilde inhibe ettiğini tespit etmiştir. Bu tez çalışmasında kuersetin ve CAPE moleküllerinin biyolojik etkinliği ve anti-kanser aktivitesinin artırılması amacıyla PLGA nanopartiküler sistemlere ko-enkapsülasyonu gerçekleştirilmiş ve moleküllerin serbest formunun kombinasyonu ile karşılaştırmalı olarak insan kolon kanser hücre hattı HT-29 üzerindeki sitotoksik, anti-proliferatif ve apoptotik aktiviteleri incelenmiştir.

## **1.2 Tezin Amacı**

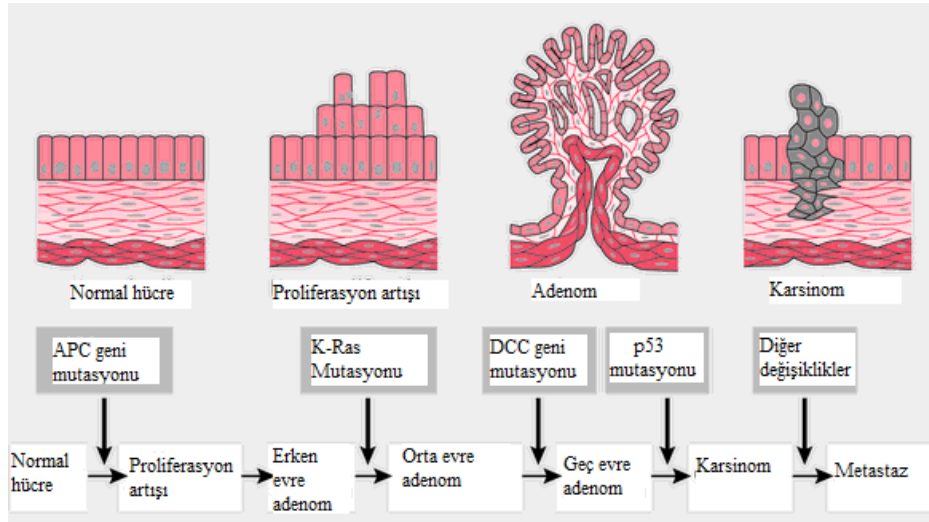
Yapılan tez çalışmasının temel amacı; kuersetin-CAPE içeren PLGA nanopartiküler sistemlerin HT-29 insan kolon kanser hücre hattı üzerinde anti-kanser aktivitesinin hücresel ve moleküler düzeyde belirlenmesidir. Anti-kanser özelliğe sahip olduğu bilinen kuersetin ve CAPE moleküllerinin kombine olarak nanopartiküler sisteme yüklenmiş formu ile serbest kuersetin-CAPE kombinasyonunun insan kolon kanser hücre hattı üzerindeki sitotoksik, antiproliferatif, apoptotik etkisi karşılaştırmalı olarak araştırılması amaçlanmaktadır.

## **1.3 Hipotez**

Bu çalışmada kuersetin ve CAPE moleküllerinin kombine olarak nanopartiküler sisteme yüklenmesi ile moleküllerin sahip oldukları suda düşük çözünürlük, düşük stabilite, düşük biyoyararlanım gibi dezavantajlı özelliklerinin bertaraf edilerek daha yüksek biyoyumluluğa ve avantajlara sahip kontrollü salım sistemlerinin oluşturulması ve böylece anti-kanser etkinin arttırılması hedeflenmektedir. Bu çalışma ile, sentetik kanser ilaçlarına göre avantajlara sahip sekonder metabolitlerin yüklü olduğu nanopartiküler sistemler ile biyoteknoloji alanına faydalı bir model oluşturulacağı ve sadece kolon kanseri değil aynı zamanda diğer kanser türlerine karşı da ilaç taşıma sistemlerinin geliştirilmesine ışık tutarak ilaç ve biyomalzeme alanlarına önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir.

## 2.1 Kolon Kanseri

Kolorektal kanser, kolon ve rektum dokusundan gelişen bir kanser türü olup epitelyal tabakadan köken almaktadır [1]. Sporadik kolon kanserlerinin büyük çoğunluğu iyi huylu olan adenomlardan gelişmekte ve zamanla adenomların karsinomlara dönüştüğü görülmektedir [2]. Adenom sayısı ve büyüklüğü ile kolorektal kanserin gelişmesi arasında doğru orantı olduğu bildirilmiştir. Adenomların karsinoma dönüşüm süreci yavaş ilerleyen bir süreç olup ortalama on yıl olduğu düşünülmektedir [19]. Bu süreçte; başlangıçta iyi huylu olan lezyonlarda birçok moleküler değişiklik gerçekleşmektedir. Proto-onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerde biriken mutasyonlar sonucu hastalık ilerlemektedir [20]. Şekil 2.1'de kolorektal kanser ilerlemesi ile ilişkilendirilmiş genetik değişiklikler yer almaktadır.



**Şekil 2.1** Kolon kanseri prognozu ile ilişkilendirilmiş genetik değişiklikler [21]

Kolon kanserinin kalıtsal ve kalıtsal olmayan iki çeşidi bulunmaktadır. Kalıtsal olanlar; ailevi kolon polipozisi (FAP) ve polipozisle birlikte olmayan hereditör kolon kanseri (HNPCC)'dir. FAP'lı hastalarda 5. kromozomdaki APC geni mutasyona uğramıştır ve buna ek olarak binlerce polip oluşumu

gözlemlenmektedir. Kolon kanserinin iki türü de (FAP ve HNPCC) otozomal dominant geçiş göstermektedir. Ancak çoğunluk kalıtsal olmayıp çevresel faktörlere bağlı olarak somatik mutasyonlardan kaynaklanmaktadır [22]. Sporadik kolorektal tümörlerin %70'inde APC geninin inaktivasyonu görülmektedir. Geri kalan diğer tümörlerde WNT sinyal yolağında yer alan  $\beta$ -catenin ve Axin moleküllerinde aktive edici mutasyonlar görülmektedir. Bu mutasyonlar; erken pre-malign lezyonlarda görülen tek genetik değişikliklerdir. Yapılan çalışmalarla WNT sinyal yolağının kolorektal kanserin başlama sürecinde önemli bir yere sahip olduğu bulunmuştur [20]. Bunlar dışında; K-Ras mutasyonu, SMAD'ların inaktivasyonu, p53 mutasyonları kolon kanserinin çeşitli evreleri ile ilişkilendirilmiş durumdadır (Şekil 2.1).

Erken dönem kolorektal kanser sıklıkla belirti göstermez. Bu nedenle erken teşhis için tarama yaptırmak önemli bir yere sahiptir. Bir tümör büyüdükçe kanamayı arttırmakta ve bağırsağın çalışmasını engelleyebilmektedir. Bazı durumlarda kansere bağlı olarak gerçekleşen kan kaybı anemiye sebep olmakta, zayıflık, aşırı yorgunluk, nefes darlığı gibi çeşitli semptomlara neden olmaktadır [23].

Dünyada en sık görülen tümörlerden birisi olan kolon kanseri hem erkek hem de kadınlar için kanser ölümlerinin en önde gelenleri arasında yer almaktadır [3]. Ülkemizde görülen kanser türleri arasında üçüncü en sık görülen kanser türü olup dünya genelinde kanserden ölüm vakalarında dördüncü sırada yer almaktadır [4]. Kolon kanseri, gelişmiş ülkelerde yeme ve yaşam tarzına bağlı olarak daha fazla görülmektedir [24]. Örneğin; Avrupa ülkeleri ve İngiltere gibi ekonomik olarak gelişmiş ülkelerde Afrika ve Asya ülkelerine kıyasla kolon kanseri insidansının daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Gelişmiş ülkelerde yılda 737.000 vaka görülürken, az gelişmiş ülkelerde yılda 624.000 vaka görülmektedir [25]. 2019 yılında kolon kanseri görülen total 101.420 kişi olduğu tahmin edilirken, bunlardan 51.020'sinin ölümle sonuçlandığı tahmin edilmektedir [6]. Kolon kanseri insidasında son on yıl boyunca artış görülmekte ve önümüzdeki yıllarda da artmaya devam etmesi beklenmektedir [26].

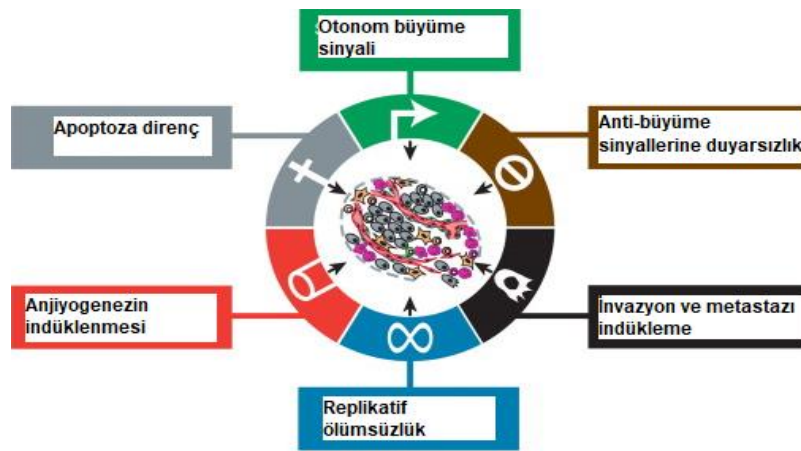
Multifaktöriyel bir hastalık olmakla birlikte; genetik, hormonal değişiklikler, çevresel faktörler, alkol ve tütün kullanımı, yaş, fiziksel aktivite eksikliği, düzensiz

beslenme alışkanlıkları, meyve ve sebzelerin az tüketimi kolon kanseri gelişmesine neden olabilecek risk faktörleri arasında sayılabilir [24], [27]. Kolorektal kanser görülme sıklığı yaşla birlikte artmaktadır ve kırk yaşından önce teşhis edildiğinde nedeni genellikle genetik sendromlar olmaktadır [28]. Yapılan epidemiyolojik çalışmalar, fiziksel aktivite, beslenme alışkanlıkları ve yaşam tarzının kolorektal kanserin önlenmesinde önemli etkilere sahip olduğunu göstermektedir. Yapılan çalışmalarla yüksek yağ ve düşük fiber içeren diyetle beslenen toplumlarda kolon kanserinin daha sık görüldüğü tespit edilmiştir [24].

## 2.2 Kolon Kanserinin Moleküler Mekanizmaları

Kanser, kontrolsüz büyüme ve genetiği değişmiş hücrelerin bölünmesi ile karakterize bir hastalıktır. Kolorektal kanser, büyümeyi kontrol eden mekanizmalarda meydana gelen mutasyonların birikimi sonucunda oluşmaktadır. Genomik kararsızlık, adenomlardan karsinomların oluşum sürecinde önemli bir yere sahiptir. 1990'da Fearon ve Vogelstein'in yapmış olduğu kolorektal tümörögenез modeli hastalığın moleküler mekanizmasının aydınlatılmasına katkı sağlayarak model oluşturmuştur [2].

Hastalığın ortaya çıkışı hücrelerin otonom büyüme sinyali üretme, anti-büyüme sinyallerine duyarsızlık, invazyon ve metastazı indükleme, anjiyogenezi indükleme ve apoptozdan kaçma özelliklerine dayanmaktadır [29]. Kanserinin altı temel özelliği (Şekil 2.2) temel alınarak kolon kanserinin moleküler mekanizmaları anlatılacaktır.



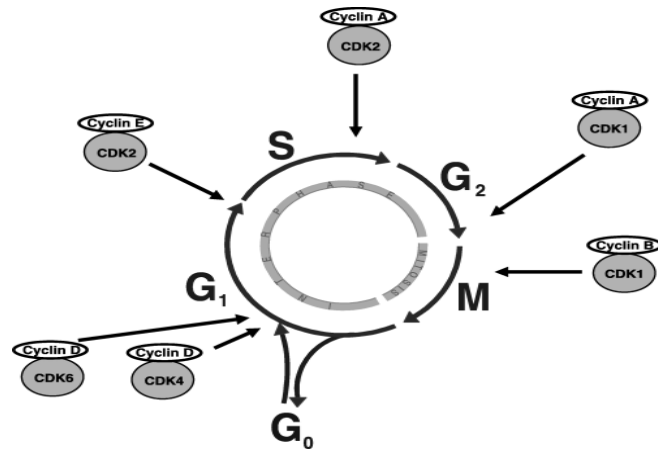
Şekil 2.2 Kanser hücrelerinin altı temel özelliği [30]



### 2.2.1 Otonom Büyüme Sinyali

Anormal hücre proliferasyonu kolon karsinogenezinde önemli bir yere sahiptir. Çoğalan hücreler karsinojenik uyarılara daha duyarlıdır. Normal kolonda DNA sentezi ve hücre bölünmesi kriptlerin alt ve orta kısımlarında gerçekleşmektedir. Proliferasyon sürecinde meydana gelen mutasyonlar kolonda karsinogenez sürecini başlatmaktadır [2].

Hücre döngüsü, mitozla sonuçlanan ve hücrelerin büyümesi için çok sayıda proteinin görev aldığı karmaşık bir programdır. G<sub>1</sub>, S ve G<sub>2</sub> fazlarından oluşmaktadır. Hücre döngüsü regülatörleri olarak siklin proteinleri ile kompleks yapan siklin bağımlı kinazlar (CDK) görev yaparlar. Bu proteinler hücre döngüsünün aşamaları boyunca hücrenin ilerleyişini düzenler ve p53, p16, p21 ve birçok protein tarafından düzenlenirler. G<sub>1</sub> ve G<sub>1</sub>/S fazı CDK4-siklin D kompleksi, S fazı CDK2-siklin A kompleksi, G<sub>2</sub>/M fazı CDK1-siklin A ve B kompleksleri (Şekil 2.3) ile regüle edilir [31].



Şekil 2.3 Hücre döngüsü evreleri [31]

Normal hücrelerin hücre döngüsü ile bölünmeleri için büyüme faktörleri, ekstrasellüler matriks elemanları, hücre-hücre etkileşim molekülleri tarafından uyarılmaları gerekmektedir. Onkogenler, otokrin simülasyon ile kendi büyüme faktörlerini salgırlar veya aşağı-düzenleyici rolde görev alan yolaklardaki bileşikleri değiştirirler. Böylelikle normal hücrelerden farklı olarak büyüme faktörlerine bağımlılıktan kurtulurlar [16].

pRb ve P53 gibi tümör baskılayıcı genlerin baskılanması, normalde hücre döngüsü ilerlemesini engelleyen proteinlerin işlevsizliği ile sonuçlanır. Birçok kanser türünde hücre döngüsündeki düzensizlik, hücre döngüsünün farklı seviyelerinde yer alan proteinlerin mutasyonu ile meydana gelmektedir. Kanserde; siklin bağımlı kinazlarda (CDK), siklin bağımlı kinaz inhibitörlerinde (CKI), CDK substratları ve kontrol noktası proteinlerini kodlayan genlerde mutasyonlar gözlenmiştir. Siklin bağımlı kinazların baskılanmasında E2F'in sürekli anlatımı ve tümör supressör bir gen olan Rb'nin inaktivasyonu önemli işleve sahiptir [17].

### **2.2.2 Anti-Büyüme Sinyallerine Duyarsızlık**

Anti-büyüme sinyallerinden kaçma özelliği kanser hücrelerinin önemli bir özelliğidir. Çoğalmaya devam etmek amacıyla kanser hücrelerinin anti-büyüme sinyallerine karşı duyarsız olması gerekir [32]. Bu amaca yönelik olarak, kanser hücreleri hücre döngüsü regülatör yollarını kullanarak anti-proliferatif sinyallerden kaçarlar. Kolon kanser sürecinde sinyalleşme yolağında yer alan bazı yollar; Sonic Hedgehog (SHH), Wnt- $\beta$  catenin, TGF- $\beta$ /SMAD, EGFR, Notch olarak sayılabilir [33]. Bu yollardaki mutasyonlar hücre büyümesini yönlendirerek büyümeyi önleyen genlerin baskılanmasına sebep olur. Birçok anti-proliferatif sinyal Rb proteini tarafından gerçekleştirilir. Bir tümör baskılayıcı olan Rb'nin bozulması hücrelerin sürekli çoğalmasına ve anti-büyüme faktörlerine duyarsız hale gelmesine neden olur [34].

### **2.2.3 Replikatif Ölümsüzlük**

Normal hücrelerde çoğalmayı sınırlandıran intristik bir mekanizma vardır. Bu mekanizma telomerler aracılığıyla sağlanır. Kromozomların uçlarında bulunan telomerler normal hücrelerde her hücre döngüsü sırasında kısalır, bu kısalma kromozomun bütünlüğü ve kararlılığı açısından önemlidir. Kolorektal karsinogenezde ise kanser hücreleri telomer uzunluklarını korumaktadır. Telomer aktivitesinin bozulması sınırsız replikasyona neden olmaktadır [30].

Telomeraz, telomerik DNA dizilerini sentezleyen RNA'ya bağımlı DNA polimerazdır. Telomeraz kanser tedavisi için hedef olarak görülebilir [35]. Kanser hücrelerinde yüksek telomeraz aktivitesi gözlemlenmektedir. Kolon kanseri

hücrelerinde telomeraz aktivitesinin inhibisyonu hücre döngüsü tutuklama ve apoptoz süreci ile ilişkilidir [36].

#### **2.2.4 Anjiyogenezi İndükleme**

Anjiyogenez, anjiyogenik faktörler tarafından düzenlenen yeni kan damarlarının oluştuğu karmaşık bir süreçtir. Bu süreç; kontrolsüz hücre büyümesi ve tümör metastaz sürecinde önemli bir yere sahiptir. Anjiyogenez tümörü besleyerek tümör boyutunun artmasını ve yeni zararlı mutasyonların çıkma olasılığının artmasına neden olmaktadır [34].

Anjiogenez süreci ile kanser hücreleri yakın ya da uzak dokulara yayılabilmektedir. Anjiyogenik faktörlerin salınması ile birlikte kanser hücresi bazal membranı proteazlar yardımı ile parçalar. Karbondioksit artışı, hipoksi, nitrik oksit artışı gibi bazı uyarılar anjiyogenez özelliği taşıyan VEGF (Damar endoteli büyüme faktörü), FGF (Fibroblast büyüme faktörü), PDGF (Platelet türevli büyüme faktörü), TGF-beta (Transforme edici büyüme faktörü) gibi bazı moleküllerin oluşumuna yol açarlar. Bunların çoğu komşu küçük damarlara difüze olarak endotel hücreleri üzerindeki reseptörlerine bağlanır ve sonuçta yeni damar oluşumu ile sonuçlanacak olaylar dizisini aktive ederler [37].

Değişik kanser türleri anjiyogenezi indüklemeye farklı yolları kullanabilmektedir. VEGF'in anjiyogenez, metastaz ve insan kolon kanserinin proliferasyonundaki rolünü belirlemeye yönelik birçok çalışma yapılmıştır. Kolon kanseri hücrelerinin anjiyogenezi genellikle WNT yolağı ve VEGF aracılığıyla indüklediği ve VEGF sinyal yolunun 5 glikoprotein ailesi (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D ve plasental büyüme faktörü (PlGF)) içerdiği bulunmuştur [38], [39].

#### **2.2.5 İnvazyon ve Metastazi İndükleme**

Normal hücreler vücuttaki yerlerini değiştirmezler, göç etmezler. Birçok kanser türünde primer tümörler çevredeki yakın dokulara (invazyon) ve uzak dokulara (metastaz) yayılım göstermektedir [30].

Kolorektal karsinomlarda invazyon, tümör hücrelerinin epitelyal-mezenkimal geçişi (EMT) ile karakterizedir. Benzer şekilde metastazda da EMT'ye benzer

şekilde epitel fenotipine doğru bir farklılaşma söz konusudur. Bu kötü huylu ilerleme sürecinde genetik değişikliklere ek olarak tümör ortamının da önemli olduğunu göstermektedir. Kolorektal kanserlerde, APC tümör baskılayıcı genindeki mutasyonlar sebebiyle WNT yolağındaki ana onkoprotein  $\beta$ -cateninidir. Tümör hücrelerinin epitelyal-mezenkimal geçişi transkripsiyonel aktivatör  $\beta$ -catenininin nükleer birikmesi ile ilişkilidir. Nükleer  $\beta$ -catenin embriyonik süreçte EMT ve kök hücre oluşum sürecinde yer almaktadır. Birikim sonucunda sahip olduğu bu iki özelliği tümör hücrelerine de aktarabilmekte ve buna bağlı olarak tümör prognozuna katkıda bulunmaktadır [40].

Metastaz, kanser morbidite ve mortalitesinin başlıca nedenidir ve kanser ölümlerinin yaklaşık %90'ını oluşturur. Metastaz süreci, kanser hücrelerinin primer tümörden çevre dokulara ve uzak organlara yayılmasını içeren birçok işlem gerektiren karmaşık bir işlemdir. Uzak bir bölgedeki tümörü yeniden oluşturmak için; çevreleyen dokuları istila etme, dolaşımında göç etme ve hayatta kalma, istila ettiği organda koloni oluşturma ve büyüme yeteneklerine sahip olması gerekmektedir. Bu açıdan bakıldığında kanser hücreleri tarafından kök hücre benzeri fenotip kazanılması ve metastatik süreci etkileyen mutasyonlar metastaz için önemlidir [41].

Kolorektal kanserde metastaz süreci bir seri adımdan oluşmaktadır. Bu süreç; ekstrasüller matriksin lizisi ile başlar. Daha sonra kanser hücreleri tarafından üretilen enzimler ile hücre dışı matriksin değiştirilerek kanser hücrelerinin birincil tümör bölgesinden ayrılmasını sağlar. Matris metaloproteinazlar (MPP) ile kanser hücrelerinin göç etmesinin sağlanmakta ve bu süreçte çeşitli MPP'ler görev almaktadır. Kolorektal kanserde MPP-1,-2,-3,-7,-9 ve -13'ün overekspresyonu görülmektedir [40], [41].

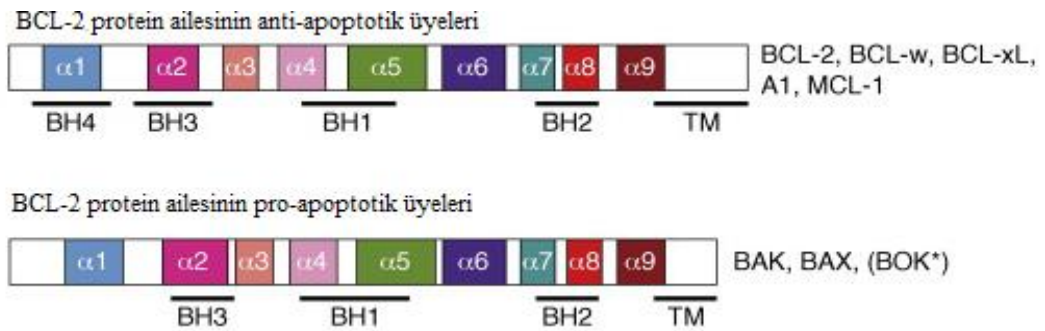
### **2.2.6 Apoptoza Direnç**

Apoptoz, hücrelerin kendi kendilerini yok ettikleri, genlerle düzenlenen programlı hücre ölümüdür. İstenmeyen, yıpranmış, potansiyel olarak zararlı hücrelerin yok edilmesini sağlayan bir mekanizmadır [42]. Çok hücreli organizmalarda, mitoz yoluyla üretilen yeni hücreler ile hasar görmüş ya da gerekli olmayıp kaldırılan

hücreler arasında homeostatik bir denge görülmektedir. Apoptoz veya programlanmış hücre ölümü, tüm çok hücreli organizmaların gelişiminde ve homeostazında önemli bir rol oynar [43].

Apoptoz süreci, içsel yolak ve dışsal yolak olmak üzere 2 yoldan başlatılabilir. İçsel yolak mitokondri aracılığıyla aktive olurken, dışsal yolak ölüm reseptörleri gibi dıştan gelen sinyallerle aktive olmaktadır. Ancak; iki yolun birbiriyle bağlantılı olduğu, bir yoldaki moleküllerin diğerini etkileyebileceğine dair çalışmalar bulunmaktadır [44]. Apoptozu uyarıcı hücre içi sinyaller arasında büyüme faktörleri, onkogenler ve tümör süpresör genler sayılabilir. Hücre dışı sinyaller ise büyüme faktörlerinin yetersizliği, ölüm reseptörlerinin aktivasyonu (FAS ve TNF) ve dış etkenler (kimyasallar, UV, radyasyon, kemoterapötik ilaçlar)'dir. Hücre içi sinyaller içsel yolu uyarırken, hücre dışı sinyaller dışsal yolu uyarır [45].

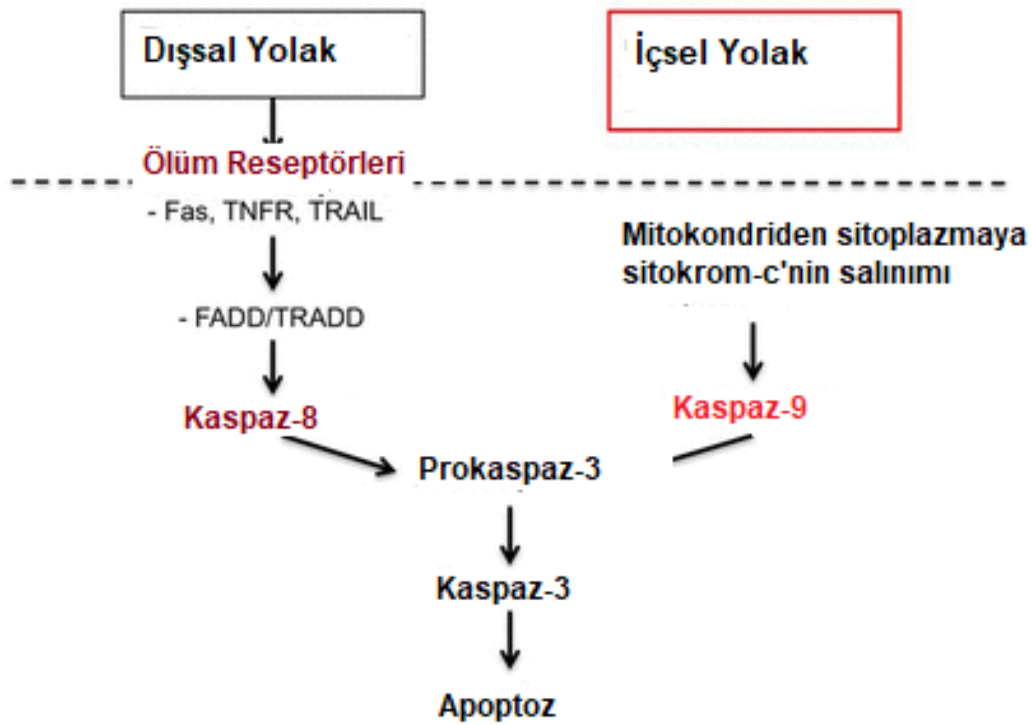
Apoptotik süreçte Bcl-2 protein ailesi ve kaspazlar görev almaktadır. Bcl-2 protein ailesi pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyelerden oluşmaktadır (Şekil 2.4). Bax, Bok ve Bak pro-apoptotik proteinler iken, Bcl-2, Bcl-W, Bcl-xL, Bcl-B ise anti-apoptotik proteinleri temsil etmektedir [46]. Kaspazların ise insanlarda 12 çeşidi bulunup bunlardan 7'sinin apoptotik süreçte yer aldığı bilinmektedir. Bunlar; kaspaz-2, -3, -6, -7, -8, -9 ve -10 olarak sıralanabilir. Öncül formlarında inaktif zimojenler olarak sentezlenen kaspazlar apoptoz sürecinde aktif formlarına dönüşmektedirler [47].



**Şekil 2.4** Apoptotik süreçte yer alan Bcl-2 protein ailesi üyeleri [48]

Apoptoz hücre içinden ya da dışından gelen sinyallerle başlar, kaspazların aktivasyonu ile devam eder. İçsel yolda kaspaz-3, kaspaz-9 aktivasyonu görülürken, dışsal yolda kaspaz-3 ve kaspaz-8 aktivasyonu görülür. Aktifleşen kaspazlar ile hedef proteinlerin yıkılması sonucu hücrede biyokimyasal ve yapısal

değişiklikler gözlemlenir, apoptotik cisimcikler oluşur. Bu süreçte Bcl-2 protein ailesi üyelerinden pro-apoptotik proteinler olan Bax ve Bak ekspresyonu artarken, anti-apoptotik proteinler olan Bcl-2, Bcl-xL ekspresyonları azalmaktadır. Mitokondri de apoptozun içsel yolağındaki süreçte görev almakta ve sitokrom-c'nin mitokondriden sitoplazmaya salınmasını uyararak apoptozu başlatmaktadır [45]. İçsel ve dışsal yoldan apoptozun indüklenme süreci Şekil 2.5'te detaylı olarak şematize edilmiştir.



**Şekil 2.5** Apoptozun içsel ve dışsal yoldan indüklenmesi [49]

Apoptoz, kanser için önemli bir bariyerdir. Bu nedenle kolon kanseri de dahil birçok kanser türünde apoptotik yolların baskılanması ve direnç mekanizması görülmektedir [34]. Bu mekanizma apoptotik yolaktaki bileşenleri ya da regülatörlerini değiştirerek gerçekleştirmektedir [16]. Apoptozu inhibe etmenin etkili yolları, B-hücreli Lenfoma 2 (Bcl-2) protein ailesi ve iki ana proapoptotik gen olan Bax ve Bak'ın baskılanmasıdır [50]. DNA hasarı olduğu zaman hücreler apoptoz ile yok edilir. Fakat kanser hücreleri apoptotik sinyallerden kaçınır.

Apoptoza karşı direnç olarak kanser hücrelerinde p53 kaybı ve anti-apoptotik bir protein olan Bcl-2'nin aktivasyonu örnek verilebilir [34].

## **2.3 Kolon Kanseri için Tedavi Stratejileri**

### **2.3.1 Güncel Tedaviler**

Günümüzde kolon kanseri tedavisinde, tümörün hangi evrede olduğuna bağlı olarak değişmekle beraber genel olarak kemoterapi ve radyoterapi uygulanmaktadır [10]. 1. evre kolon kanserine kemoterapi uygulaması yapılmadan cerrahi müdahale önerilirken, 2. evreden itibaren kemoterapi tedavisi önerilmektedir [11]. Birçok ilaç Amerika Birleşik Devletleri'nde kolorektal kanser tedavisinde kullanılmak üzere FDA tarafından onaylanmıştır. Bunlar arasında; kapesitabin, fluorourasil (5-FU), irinotekan, oksaliplatin, trifluridin/tipiracil sayılabilir [51]. Kemoterapide genellikle oksaliplatin ve fluorourasil kullanılmaktadır. Kolorektal kanserde gözlemlenen Ras mutasyonu söz konusu olduğunda ise kemoterapiye ek olarak bevacizumab, setuksimab monoklonal antikoları da tedavi sürecine dahil olmaktadır [12]. Kemoterapi ve radyoterapinin temel amacı kanserli hücreleri öldürmektir. Fakat kemoterapik ilaçlar kanserli hücrelerin yanında sağlıklı hücreler üzerine de etki ederek saç dökülmesi, yorgunluk, kusma, bulantı, ağız yaraları, hormon dengesizliği gibi yan etkilere neden olmaktadır [13]. Kullanılan yöntemlerin toksik etkileri göz önüne alındığında, tedavide uygulanan kemoterapi ve radyoterapinin yan etkilerini azaltacak ve tedaviye destek olacak yeni bileşenlere ihtiyaç duyulmaktadır.

### **2.3.2 Alternatif Tedaviler**

Kolon kanseri tedavisinde kullanılan güncel tedaviler ve yan etkileri göz önüne alındığında alternatif tedavilere ihtiyaç duyulduğu görülmektedir. Terapötik ve anti-kanser etkilerin arttırılması amacıyla alternatif stratejiler araştırılmıştır.

#### **2.3.2.1 Hedeflenmiş terapi**

Hedefe yönelik kanser tedavileri (moleküler olarak hedeflenen tedaviler), spesifik molekülleri hedef alarak kanser hücrelerinin büyüme, proliferasyon ve yayılmasını

engelleyen ajanlar olarak tanımlanabilir. Bu tip tedavi, sağlıklı hücelere verilen zararı sınırlandırırken kanser hücrelerinin büyüme ve yayılmasını engeller [51].

Hedeflenmiş tedaviler, standart kemoterapiden birçok özelliği ile farklılık göstermektedir. Hedeflenmiş tedavilerin aksine, geleneksel kemoterapide genellikle hızla çoğalan kanserli ve sağlıklı hücreler hedef alınır. Buna ek olarak, hedefe yönelik tedaviler sıklıkla sitotoksik etki göstermekte, kanser hücrelerinin çoğalmasını durdurmaktadır. Standart kemoterapi ise sitotoksik etki göstermekte, kanser hücrelerini öldürmektedir.

Günümüzde, hücrenin hayatta kalma yollarıyla ilişkilendirilen birçok hedef belirlenmiştir. Hedeflenen terapötik ilaçlar arasında hormon tedavileri, transdüksiyon inhibitör sinyalleri, gen ekspresyon modülatörleri, apoptoz indükleyicileri, anjiyogenez inhibitörleri, immünoterapiler sayılabilir. Hedefli tedaviler günümüzde kolorektal, pankreas, küçük hücreli akciğer, meme, prostat kanserinde tümörlerin tedavisinde kullanılmaktadır.

Kolorektal kanserli hastalar için 5-FU bazlı tedavi yıllarca tek uygulanabilir tedavi seçeneğini temsil etmiştir. Son yıllarda, tedavi sürecinde uygulanabilecek yeni ajanlar eklenmiştir [52]. Bu ajanlar arasında anjiyogenik faktörleri hedef alan bevacizumab ve regorafenib, epidermal büyüme faktörü reseptörünü (EGFR) hedef alan cetuximab ve panitumumab monoklonal antikorlar yer almaktadır [53].

Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) birçok kanser türünde overeksprese olan ve proliferasyon, tümör büyümesi, anjiyogenez ve metastazda rol alan bir tirozin kinaz reseptörüdür. Cetuximab kolorektal kanser ve skuamöz hücre kanserlerinin tedavisinde, panitumumab metastatik kolon kanseri tedavisinde kullanılan monoklonal antikorlardır [54]. Yapılan araştırmalar sonucunda EGFR'ı bloke eden ilaçların kolorektal kanser de dahil olmak üzere epitelyal kanserlerin büyümesini durdurmak veya yavaşlatmak için etkili olabileceğini ve etkisini MAPK, PI3K, AKT sinyal yollarını inhibe ederek gerçekleştirdiği bulunmuştur [55].

### **2.3.2.2 Kombine İlaç Tedavileri**

Kolorektal kanseri tedavisinde kullanılan monoterapinin ya da kemoterapi tedavisine ek olarak verilen monoklonal antikorların (hedeflenmiş terapi)



sağkalımı arttırdığı bilinmektedir. Bu süreçte kullanılan ilaçların kombinasyon çalışmaları ile etkinliklerinin iyileştirilmesi ve geliştirilmesi kanser tedavisinde son derece önem arz etmektedir. Farklı moleküler mekanizmalarla çalışan ilaçların kombinasyon çalışmaları ilaç direnci olasılığını azaltırken, toksisiteyi en aza indirerek tümör hücrelerinin öldürülmesini arttırmaktadır [56].

Son yıllarda, düşük dozda kemopreventif ve terapötik ajanların farklı kombinasyonları ile sinerjistik etkiler elde edilebileceği, yüksek doz etkisiyle ilişkili yan etkilerin minimize edilebileceğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Uzun süre tek başına tedavide kullanılan 5-FU ile oksaliplatin, cisplatin, irinotecan, resveratrol gibi çeşitli ilaçlar ve flavonoidlerle çeşitli kanser türleri üzerinde yapılmış kombinasyon çalışmaları literatürde oldukça geniş bir araştırma alanını kapsamaktadır [57], [58]. Falkson ve arkadaşları metastatik kolon kanseri hastaları üzerinde 5-FU, metilCCNU ve vinkristin üçlü kombinasyon çalışması yaparak tek başına 5-FU tedavisi ile uygulamasını karşılaştırmalı olarak incelemiş, çalışmalarında üçlü kombinasyon tedavinin hastalar üzerinde daha etkili olduğu bulunmuştur [59]. Xiao ve arkadaşları kolon kanser hücreleri üzerine (HT-29 ve HT-116) atorvastatin ve celecoxib kombinasyonunun sinerjistik olarak hücre döngüsünü durdurduğunu ve apoptozu indüklediğini bulmuştur [60]. Lin ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada ise çeşitli kanser türlerinde yüksek seviyede eksprese olan siklooksijenaz-2 (COX-2) proteini inhibitörü ve kemoterapik ajan olarak kullanılan oksaliplatinin kombinasyonunun kolon kanser hücre hattında hücre büyümesi ve sağkalımı üzerindeki etkisi araştırılarak kanser hücrelerinin büyümesini engellediği bulunmuştur [61].

Flavonoidlerin kombinasyon olarak ilaçlarla, çeşitli inhibitörlerle ve anti-kanser ajanlarla kullanımı yeni kombinasyon tedavilerin geliştirilmesi açısından önemli bir yere sahiptir. Son yıllarda kanser tedavisinde kullanılmak üzere flavonoidlerin kombinasyon çalışmaları giderek artmaktadır. Patel ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada flavonoid bir molekül olan kurkiminin 5-FU ve oksaliplatin ile kombinasyonu sonucu ilaçların sahip olduğu hücre büyümesi inhibisyonunu kolon kanseri hücreleri üzerinde arttırdığı bulunmuştur [62]. Kurkumin, 5-FU ve oksaliplatinin kombinasyonu ile gastrik kanser hücrelerinde yapılan başka bir

çalışmada ise benzer etki göstererek hücre büyümesini inhibe ettiği bulunmuştur [63].

## 2.4 Flavonoidler

Flavonoidler, bitkiler tarafından üretilen ve insan sağlığı üzerinde yararlı etkilere sahip olan düşük moleküler ağırlıklı polifenolik bileşiklerdir [7]. Bitkilerin kök, tohum, çiçek, yaprak, dal ve gövde gibi tüm kısımlarında ve çay, kahve, şarap gibi bitkisel ürünlerde yüksek miktarlarda bulunan sekonder metabolitlerdir [9].

Flavonoid bileşikleri, benzo- $\gamma$ -piron (C6-C3-C6) türevlerinden meydana gelmekte ve heterojen gruplar içermektedir [64]. Doğada 5000'den fazla flavonoid olup moleküler yapılarına göre altı sınıfa ayrılmışlardır. Bunlar; flavon, flavonon, flavanol, izoflavon, antosiyanidin ve kateşindir [65]. Flavonlar grubunda; apigenin ve luteolin, flavononlar grubunda; naringenin ve hesperetin, flavonoller grubunda; kaemferol, mirisetin, kuersetin, izoflavonlar grubunda; daidzein ve genistein, antosiyanidinler grubunda; siyanidin, pelargonidin, delfinidin, peonidin, kateşinler grubunda; epikateşin, kateşin yer almaktadır [9].

Polifenolik bileşikler olan flavonoidler geniş spektrumlu biyolojik aktivite göstermektedir. Bu aktiviteler arasında; antialerjik, antiinflamatuvar, antioksidan, antimutajenik, antikarsinojenik, enzimatik aktivitelerin düzenlenmesi sayılabilir. Sahip oldukları özellikler ile kanser tedavisinde kullanılan kemoterapi gibi yöntemlerin yan etkilerini azaltarak destekleyici tedavide kullanılacak aday ajanlar oldukları düşünülmektedir [42]. Yapılan çalışmalarla çeşitli flavonoidlerin farklı kanser türlerinde anti-kanser etkiye sahip olduğu gösterilmiş ve Tablo 2.1'de toplu olarak verilmiştir [9]. Bunlara ek olarak, Kundz ve arkadaşları kolon kanseri hücre hattında (HT-29 ve Caco-2) 30'dan fazla flavonoid ile karşılaştırmalı olarak çalışarak flavonoidlerin hücre proliferasyonu ve sitotoksisite üzerine etkilerini incelemişlerdir [66].

Epidemiyolojik çalışmalar, meyve ve sebze tüketimi ile alınan flavonoidlerin kanserin önlenmesi ve kemoterapi sürecinde önemli etkilere sahip olduğunu göstermektedir. Flavonoidler karsinogenez sürecinde çeşitli basamaklara çeşitli mekanizmalar ile etki etmektedir. Bunlar; anti-proliferasyon, hücre döngüsü

durdurma, apoptozu indükleme ve farklılaşma, anjiyogenezin inhibisyonu, antioksidan aktivite göstermesi ve çoklu ilaç direncinin inhibisyonudur [42]. Örneğin; yapılan *in vivo* çalışmalarda luteolinin akciğer, karaciğer, kolon, prostat kanser hücre hatlarında; tümör hücrelerinin inhibisyonu, hücre döngüsü durdurma ve apoptozu içsel ve dışsal yollardan indükleyerek kanser hücrelerinin gelişimini engellediği bulunmuştur [67].

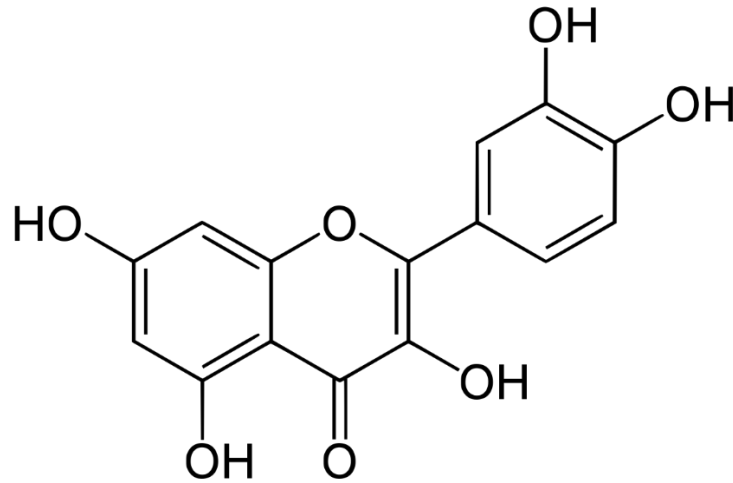
**Tablo 2.1** Farklı flavonoid gruplarının ana kaynakları ve anti-kanser özellikleri [9]

Flavonoid Grubu	Alt grup	Ana kaynakları	Anti-kanser özellikleri
Flavanollar	Kateşin, gallokateşin, epikateşin, epigallokateşin	Çikolata, yeşil ve siyah çay, kiraz, çilek, kakao, elma	İnsan oral, rektal ve prostat kanseri
Flavonlar	Apigenin, krisin, luteolin Flavonollar: kaemferol, mirisetin, kuersetin Flavononlar: hesperitin, naringin Flavononlar: taksifolin	Maydanoz, kereviz, kırmızı biber, brokoli, biber Brüksel lahanası, elma, soğan, pırasa, fasulye, kiraz Portakal, üzüm ve limon suyu Böğürtlen, kırmızı soğan, Sibirya karaçam ağacı	Akciğer kanseri, lösemi, mide, kolon, tiroid, oral ve gırtlak kanseri, meme kanseri
Antosiyanidin	Siyanidin, delfinidin, malvidin, petunidin, peonidin, pelargonidin	Patlıcan, böğürtlen, yaban mersini	Kolorektal kanser

#### 2.4.1 Kuersetin

Kuersetin (3,3',4',5,7-pentahidroksiflavon) (Şekil 2.6) meyve ve sebzelerde en bol bulunan flavonoidlerden biridir [68]. Flavonoller grubunun temsilcisi olan kuersetin beslenmenin ayrılmaz bir parçası olup bir insanın günlük diyetinde ortalama 25 mg tükettiği tahmin edilmektedir [69]. Elma, soğan, brokoli ve böğürtlen, ahududu, fındık ve kırmızı şarapta sıklıkla bulunmaktadır [8].

Antioksidan, anti-kanser, anti-anjiyogenik gibi sahip olduğu özellikler ile potansiyel anti-kanser bir ajan olduğu düşünölmektedir [70]. Kuersetinin hücre döngüsü regölasyonu, apoptozu indökleme, tirozin kinaz aktivitesinin inhibisyonunu sağlama fonksiyonları anti-kanser ajan olma potansiyelini güçlendirir niteliktedir [5]. Kuersetinin anti-kanser aktivitesi, glikolizin inhibisyonu, hücre döngüsü inhibitörleri olarak görev yapan p21<sup>WAF1</sup> ve p27<sup>KIP1</sup> up-regölasyonu, onkogenlerin inhibisyonunu içermektedir [71]. Psahoulia ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada kuersetinin onkojenik Ras proteinlerinin degradasyonuna aracılık ettiği bulunmuştur. Bu nedenle; Ras'ın aracılık ettiği kanser çeşitlerinde kuersetinin tümör önleyici rol alacağı düşünölmektedir [72].



**Şekil 2.6** Kuersetinin kimyasal yapısı [73]

Kuersetinin beyin, kolon ve diğer dokulardaki tümörlerin büyümesini azaltan ve malign hücrelerin yayılmasını engelleyen bir apoptoz indöktörü olarak görev aldığı bilinmektedir. Hücre döngüsünü farklı kanser çeşitlerinde farklı evrelerde durdurduğu rapor edilmiştir. Örneğin; lösemi hücrelerinde hücre döngüsünü G0/G1'de durdururken [74] , kolon kanserinde S fazında durdurduğu gösterilmiştir [75]. Meme kanseri hücre hatları üzerinde yapılan çalışmalarda ise kuersetinin hücre döngüsünü S fazında durdurduğu ve apoptozun mitokondriyal yolunu aktive ederek tümör regresyonuna neden olduğu bulunmuştur [68]. Priyadarsini ve arkadaşlarının kuersetin ile Hela hücreleri üzerinde yapmış olduğu çalışmada ise kuersetinin servikal kanseri üzerindeki etkisinin moleküler mekanizmasının aydınlatılması amacıyla apoptotik yolda yer alan Bcl-2 protein

ailesinin ekspresyonlarına bakılmış ve apoptozu içsel yoldan p53 indüksiyonu ve NFkB inhibisyonu aracılığıyla indüklediği bulunmuştur [76]. Kuersetin molekülü kanserin yanı sıra metabolik ve inflamatuvar hastalıkların tedavisinde de önemli bir yere sahiptir. [70].

Kuersetin molekülü sinerjistik olarak çalışmaya uygun bir molekül olduğundan kombinasyon çalışmalarında sıklıkla karşımıza çıkmaktadır. Literatürde kuersetinin bir çok doğal flavonoid ile kombinasyon çalışmaları bulunmakta olup bunlar arasında; resveratrol [77], elajik asit [78], luteolin [79], kaempferol [80] ve kemoterapide sıklıkla kullanılan bir ilaç olan cisplatin [81] yer almaktadır.

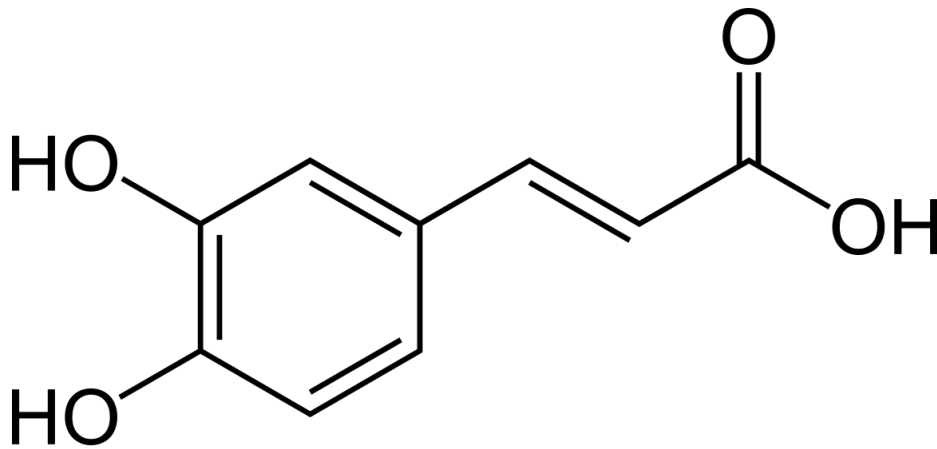
Son yıllarda geliştirilen ilaç molekülleri arasında molekülün sahip olduğu çözünürlük ve biyoyararlanım özellikleri önem teşkil etmektedir. Kuersetin sahip olduğu avantajlı özelliklerin yanında suda düşük çözünürlük, fizyolojik ortamda kararsızlık, düşük biyoyararlanım gibi dezavantajlı özelliklere sahiptir. Bu özellikler bileşiğin oral yoldan verilmesini ve tedavide kullanılmasını kısıtlamaktadır [14]. Molekülün sahip olduğu dezavantajlı özelliklerin bertaraf edilerek çözünürlüğünün ve biyoyararlanımının değişik teknikler kullanılarak arttırılması gerekmektedir.

#### **2.4.2 CAPE**

Kafeik asit fenetil ester (CAPE), bal arasından elde edilen propolisin önemli aktif bileşenlerinden biridir. Molekül formülü  $C_{17}H_{16}O_4$ ; molekül ağırlığı 284,31 g/mol olan CAPE flavonoid benzeri bir molekül olup çok geniş spektrumlu biyolojik ve farmakolojik etkilere sahiptir [82]. İmmün yanıtın baskılanması, antioksidan, antimitojenik, antikarsinojenik, anti-inflamatuvar, antiviral, antibakteriyel, antialerjik etkiyi içeren birçok avantajlı özelliğe sahiptir [10], [11]. Aynı zamanda birçok biyolojik aktivitede terapötik bileşik olarak önemli bir yere sahip olduğu bulunmuştur [82]. Kafeik asit türevlerinden biri olan CAPE molekülü iltihaplanma, kanser, enfeksiyon ve nörodejenerasyon gibi çeşitli patolojilere karşı umut verici terapötik potansiyele sahiptir. Terapötik özelliği yapısında bulundurduğu kateşin halkası ve iki hidroksil grubundan (Şekil 2.7) kaynaklanmaktadır [12]. Aynı zamanda yapısında bulundurduğu aromatik ve alifatik karbon grupları sayesinde

de hücre zarından kolayca geçebilmektedir [83]. Silva ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada CAPE'nin sıçanlarda kan-beyin bariyerini etkili şekilde geçebildiğini göstermiştir [84].

Potansiyel bir anti-kanser ajan olarak CAPE'nin aktivitesini, çeşitli kanser türlerinde anjiyogenez, tümör invazyonu, metastaz, proliferasyon, apoptoz süreçlerine etki ederek gerçekleştirdiği bulunmuştur [12]. CAPE'nin antiproliferatif etkisi, apoptoz indükleyici etkisi, invazyon ve metastazı inhibe edici etkisi kolon kanseri de dahil olmak üzere birçok kanser hücre hattında gösterilmiştir.

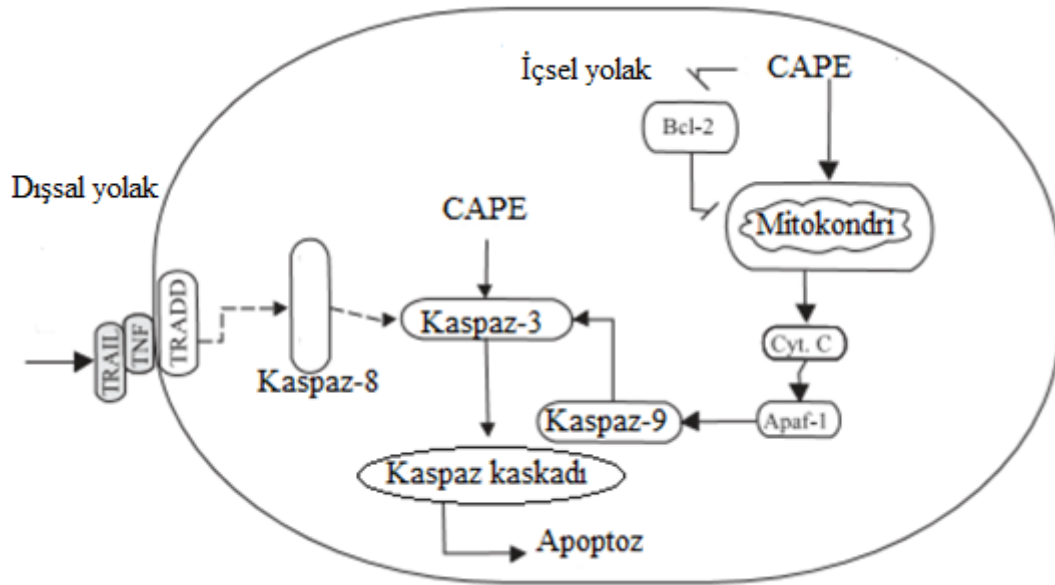


**Şekil 2.7** Kafeik asit fenetil esterinin kimyasal yapısı [85]

CAPE'nin proapoptotik etkisinin araştırılması için HL-60, insan meme kanseri MCF-7, insan yumurtalık sarkinomu SK-OV-3, insan akciğer sendromu NCI-H358, C6 Glioma, insan servikal kanseri ME180, insan pankreas kanseri PANC-1 hücreleri ile yapılan çalışmalarda apoptotik yolda yer alan kaspaz-3 veya kaspaz-7 aktivitesinin arttığı gözlemlenmiştir [86], [87]. Buna ek olarak, Orsalic ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada Mca hücreleri üzerine 15 saatlik süre ile CAPE uygulanması sonucunda apoptozun önemli bir şekilde arttığı gözlemlenmiştir [88]. Kolon kanseri hücreleri olan HCT116 üzerine artan dozlarda CAPE uygulanması ile yapılan başka bir çalışmada da benzer şekilde proliferasyon, hücre döngüsü ve apoptoz üzerine etkileri araştırılarak proliferasyonu inhibe ettiği, hücre döngüsünü G0/G1 fazında durdurduğu ve apoptozu indüklediği bulunmuştur [89]. Xiang ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada ise CAPE'nin

kolon kanseri hücreleri üzerinde  $\beta$ -catenin'in down regülasyonunu sağlayarak apoptoz ve hücre döngüsü üzerine etki ettiği gösterilmiştir [90]. Yapılan çalışmalar göz önüne alındığında CAPE'nin tümör hücreleri üzerindeki etkisini sitotoksik olarak değil, apoptozu indükleyerek gerçekleştirdiğini göstermektedir (Şekil 2.8).

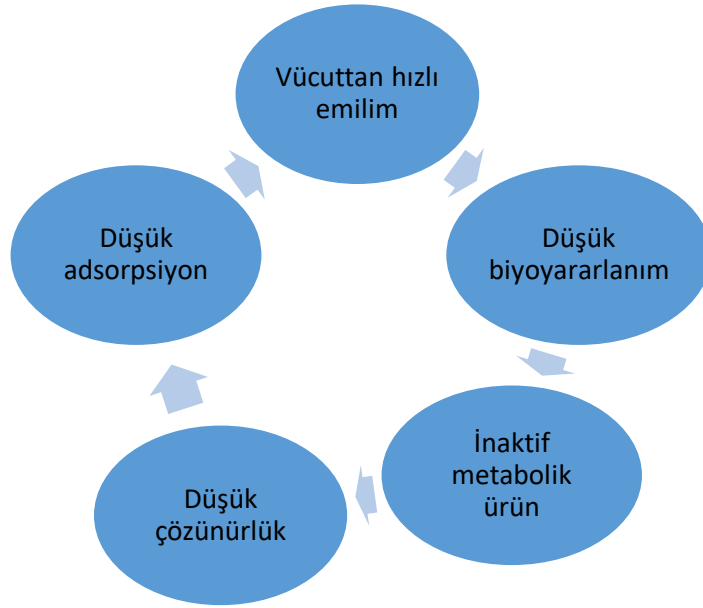
CAPE'nin birçok flavonoid molekülünün sahip olduğu gibi bazı dezavantajlı özellikleri bulunmaktadır. Yapısında bulundurduğu ester bağı,  $\alpha$ - $\beta$  doymamış karbonil ve katekol gruplarından dolayı biyolojik sistemde kararsız bir yapı göstermekte ve kolaylıkla parçalanmaktadır. Aynı zamanda tedavide kullanımını zorlaştıran suda düşük çözünürlük, yarılanma ömrünün kısa olması ve düşük biyoyararlanım gibi dezavantajlı özellikleri de mevcuttur [15]. Molekülün tedavide kullanılabilirliğini sağlamak amacıyla nanoteknoloji de dahil olmak üzere çeşitli yöntemler kullanılarak yarılanma ömrünün ve biyoyararlanımın artırılması, suda çözünürlüğünün iyileştirilmesi gerekmektedir.



**Şekil 2.8** Kanser hücrelerinde CAPE'nin apoptotik yolak üzerine etkisi [91]

Flavonoidler grubunda yer alan kuersetin ve CAPE moleküllerinin sahip oldukları sınırlamalar (düşük biyoyararlanım, düşük çözünürlük, düşük adsorpsiyon vb.) toplu olarak Şekil 2.9 'da gösterilmiştir. Bu sınırlamaları aşmak için kanser tedavisinde çeşitli yöntemler kullanılmakta olup yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biri lipozomlar, kitosan ve diğer ilaç taşıyıcı sistemler aracılığıyla moleküllerin polimere yüklenmesidir. Bu sistemler, suda düşük çözünürlük,

vücutta emilim, dolaşım süresi, hedef özgüllüğünün arttırılması amacıyla kullanılmakta ve bu amaca yönelik olarak biyobozunur malzemeler sıklıkla tercih edilmektedir [14].



**Şekil 2.9** Kueretin ve CAPE moleküllerinin anti-kanser ajan olarak kullanımını sınırlayan özellikler

## 2.5 Nanoteknoloji ve Kanser

Nanoteknoloji, nanometre boyutlu nesnelere ilişkin mühendislik, biyoloji, fizik ve kimyadan türetilmiş çok çeşitli alanları kapsayan multidisipliner bir alandır [92]. Son yıllarda nanoteknolojik gelişmelerde hızlı bir artış yaşanmış olup lipozomlar, polimerik miseller, polimer-ilaç konjugatları dahil olmak üzere birçok nano bazlı sistem, son 30 yılda klinik olarak onaylanmış çeşitli terapötik ürünler için temel oluşturmuştur [93].

Kanser nanoteknolojisi, moleküler görüntüleme, moleküler tanı ve hedefe yönelik tedavi için geniş uygulamaları olan bir araştırma alanıdır. Temel mantık, yarı iletken kuantum noktaları ve demir oksit nanokristalleri gibi nanometre boyutundaki partiküllerin, moleküllerde bulunmayan optik, manyetik veya yapısal özelliklere sahip olmasıdır. Bu nanopartiküller, monoklonal antikolar, peptitler veya küçük moleküller gibi tümör hedefleme ligandları ile bağlandığında tümör biyobelirteçlerinin hedeflenmesi için kullanılabilir. 5-100 nm arasındaki boyut



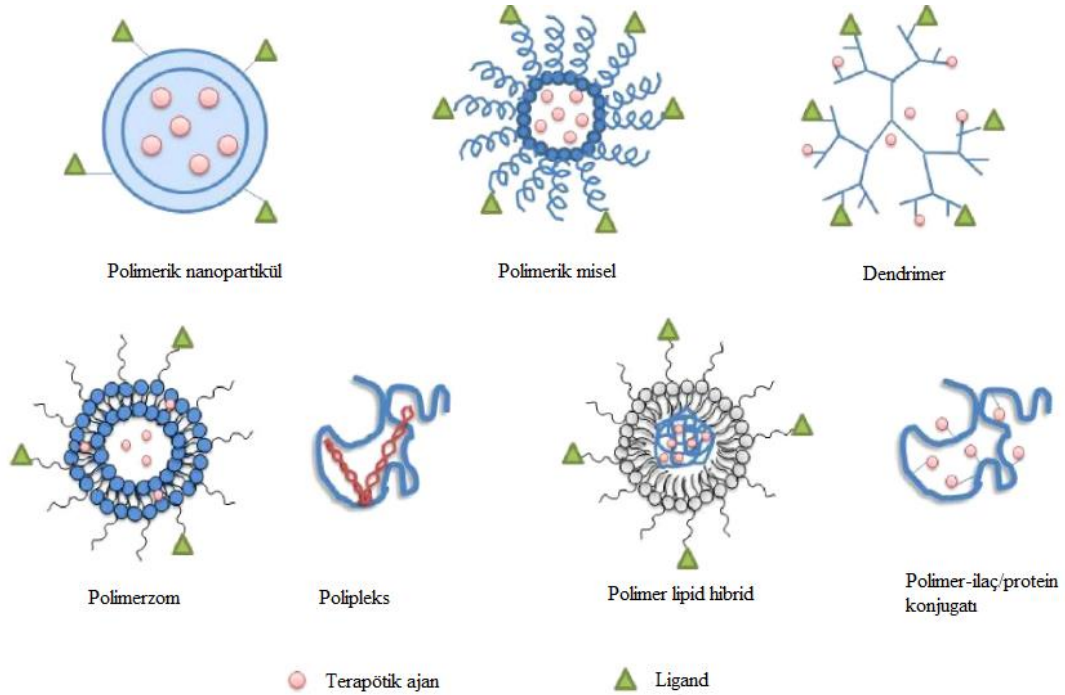
aralığındaki nanopartiküller çoklu tanısal ve terapötik ajanlara konjuge etmek için geniş yüzey alanlarına ve fonksiyonel gruplara sahiptir [94].

Kanserde ilaç taşıyıcı sistemler olarak (Şekil 2.10) lipozomlar, polimerik miseller, polimer-ilaç konjugatları (polimerik nanopartiküller), dendrimerler, viral nanopartiküller, nanotüpler kullanılmaktadır [95]. Lipozomlar, lipid bazlı hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı sistemlerdir. Küresel şekilde olan ve içi sıvı maddeyle dolu ve dışı bir çift lipid tabaka ile çevrili kolloidal yapılardır. Ampifilik, biyouyumlu ve terapötik özelliğe sahip olan lipozomlar ile yapılan birçok çalışma mevcuttur [96]. Hidrofilik ve hidrofobik ilaçları içine dahil etme yeteneği ile kanser kemoteröpatiklerini uygun nanokariyer sistemler haline getirmektedir [97]. Wong ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada lipozomların PEG'lenmesi ile elde edilen formülasyon içerisinde kuersetin ve vinkristin molekülleri 1:2 oranında yüklenerek meme kanseri hücreleri üzerinde lipozomlar ile antikanser etkinin arttırıldığı bulunmuştur [98]. Maturama ve arkadaşlarının polimerik miseller ile yapmış olduğu çalışmada sahip oldukları anti-kanser etki çeşitli klinik çalışmalarda gösterilmiştir [99]. Polimer-ilaç konjugatları olan polimerik nanopartiküller, lipozomlar ile karşılaştırıldığında daha dar bir boyut dağılımı, yüksek stabilite, lipofilik ilaçlar için yüksek yükleme kapasitesi, kontrollü ilaç salımı sağladığı için daha avantajlıdır [60].

Dendrimerler, düzenli dizilim gösteren ve tekrarlanan birimlerden oluşan sentetik polimerlerden oluşan makromoleküller olup kontrollü yıkım, yüksek ligand yoğunluğu, yüksek yapısal ve kimyasal homojenite göstermektedirler [96]. Viral nanopartiküller, farklı virüs çeşitleri kullanılarak doku hedefleme ve ilaç dağıtımını içeren uygulamalar amacıyla geliştirilmiştir [100]. Karbon nanotüpler, benzen halkalarından oluşan karbon silindirlerdir. Karbon nanotüpler tüm solventlerde tamamen çözünmediği için bazı toksisite ve sağlık sorunlarına sebep olmaktadır [101].

Nanoteknoloji, ilaç taşınım sistemleri için yükselen bir alan olup geleneksel sistemlerle kıyaslandığında birçok avantajlı özelliğe sahiptir [39]. Nanoteknoloji içerisinde geliştirilen birçok nano-yapılı sistem bulunmakta olup bunlar arasında; polimerik nanopartiküller, miseller, dendrimerler, lipozomlar, viral

nanopartiküller ve karbon nanotüplerine ek olarak grafin oksit, yağ nanoemülsiyonları, demiroksit nanopartikülleri, silika nanopartiküller, manyetik nanopartiküller sayılabilir. Bu çalışmada ilaç taşıyıcı sistemler olarak çeşitli araştırmalarda kontrollü salım sağlaması ve nano boyut gibi avantajlı özellikleri gösterilen nanopartiküller kullanılacaktır. Bu nedenle ilaç taşıyıcı sistemler olarak nanopartiküllerin tercih edilmesi ve nanopartikül çeşitleri arasından bu çalışmada tercih edilen polimerik nanopartiküller hakkında detaylı bilgi verilmiştir.



**Şekil 2.10** İlaç taşıma sistemi olarak kullanılan nano-yapılı sistemler [102]

### 2.5.1 İlaç Taşıyıcı Sistemler Olarak Nanopartiküller

Nanopartiküller, hem nanoküreleri hem de nanokapsülleri içeren katı kolloidal partiküller olarak tanımlanabilir [103]. Temel karakteristik özellikleri boyutlarından kaynaklanmaktadır. Boyutları 5-10 nm ile 1000 nm arasında değişmekte olup genellikle elde edilen aralık 100-500 nm arasında olmaktadır [104].

Geçtiğimiz on yıl boyunca, küçük ve büyük moleküller için taşıyıcı olarak partiküler sistemlerin kullanımı önemli bir araştırma konusu olmuştur. Nanopartiküller gibi partiküler sistemler, çeşitli ilaç moleküllerinin farmakokinetik ve farmokodinamik özelliklerini değiştirmek ve geliştirmek için fiziksel bir yaklaşım olarak

kullanılmıştır [105]. Nanobiyoteknolojik araştırmalarda sıklıkla karşımıza çıkan ilaç taşıma sistemleri geliştirilmesinde temel hedefler; daha spesifik ilaç sistemlerinin geliştirilmesi, toksisite azaltılırken terapötik özelliğın sürdürülmesi, biyouyumluluk ve güvenliğın artırılmasıdır [106]. Yapılan alışmalar ile nanopartiküler sistemlerin kontrollü salım mekanizması gerçekleştirdiğı, daha yüksek hücre içi alıma izin verdiğı, maddelerin stabilitelerini arttırdığı, biyouyumluluğı ve biyolojik olarak paralanabilirliğı arttırdığı gözlemlenmiştir [103].

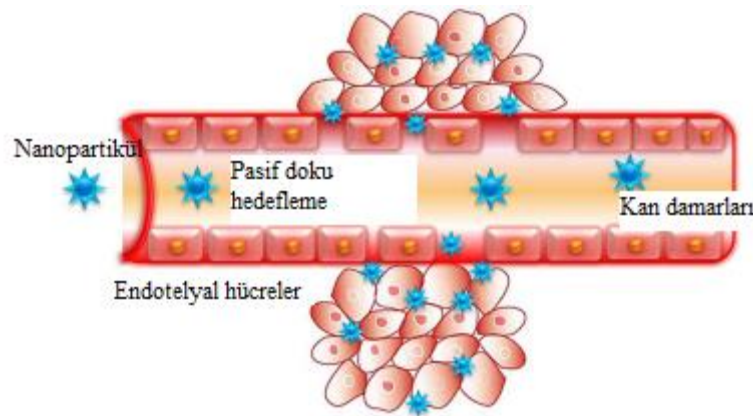
Nanopartiküller eşsiz fiziksel özellikler (partikül agregasyonu, fotoemiyon, elektriksel ve ısı iletkenliğı) ve kimyasal özellikler (katalitik aktivite) sergilerler. Bu nedenle; araştırmacılar tarafından çeşitli alanlarda büyük ilgi görmekte-dirler [107]. Bu alanlar arasında; nanoteknoloji, tıp, biyomalzeme, biyoteknoloji sayılabilir. Biyouyumlu materyallerin üretimi ve çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanımı, ilaç ve antijenler için taşıyıcı sistemler olarak kullanılması, kombinasyon tedavilerde ilaç etkilerinin artırılması amacıyla nanopartiküler sistemler geniş uygulama alanlarına sahiptir [108]. Tablo 2.2'de bazı nanopartikül teknolojileri ve uygulama alanları gösterilmiştir.

**Tablo 2.2** Nanopartiküllerin biyoloji ve tıptaki uygulama alanları [109]

<b>Ana Uygulama Alanı</b>	<b>Teknoloji</b>
İlaç taşını-mı	Anti-tümör özelliğ-e sahip ilacın kan-beyin bariyeri boyunca taşınmasını sağlayan polimerik nanopartikül üretimi
Lüminesans biyobelirteçleri	Biyokonjuge yarı iletken kuantum noktaları üretimi
Farmakoloji	Antimikrobiyal nano-emülsiyonlar
MRI koruyucu	Nanomanyetik, karbon kompozit malzemeler

Elbaz ve arkadaşları propolisin nanopartiküler sistemlere yüklenmesi ile insan kolon ve akciğer kanseri üzerindeki sitotoksik etkisinin azaldığını, sahip olduğu terapötik etkinin ise arttığını bildirmişlerdir [110]. Win ve arkadaşlarının yapmış *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda kemoterapötik ajan olarak kullanılan paklitakselin nanopartiküler sisteme yüklenmesi ile tümör hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin arttırıldığı gözlemlenmiştir [111]. Yapılan başka bir çalışmada ise kahverengi alg kullanılarak sentezlenen altın nanopartiküllerin insan kolon kanseri hücreleri (HT-29 ve Caco-2) üzerindeki aktivitesi incelediğinde; apoptozu içsel ve dışsal yoldan uyardığı bulunmuştur [112].

Neoplastik patolojilerin tedavisinde ilaç dağıtımına aracılık eden nanopartiküller, pasif hedefleme ya da aktif hedefleme stratejileri geliştirilebilir. Pasif hedeflemede; tümör dokusunun vaskülarizasyonu ile interstisyel boşlukta pasif difüzyon aracılığıyla moleküllerin geçişine izin verilmekte ve ilaç serbest bırakılmaktadır [113]. Artmış geçirgenlik ve alıkonma etkisi pasif hedefleme mekanizmaları olup nanopartiküller bu mekanizma ile kanserli hücreler üzerinde birikme gösterirken sağlıklı hücreler üzerinde birikme göstermezler (Şekil 2.11) [114]. Pasif hedeflemede diğer önemli bir faktör ise; tümör hücresinin normal hücrelerden farklı olarak tümörü çevreleyen eşsiz bir mikro ortama sahip olmasıdır [96]. Aktif hedeflemede ise; nanopartiküllerin yüzeyleri kanser hücreleri tarafından aşırı eksprese edilen reseptörlere spesifik ligand,protein ve peptitlerle kaplanarak kanserli hücreler üzerine aktif olarak hedeflendirilmesi sağlanmaktadır [113], [114].

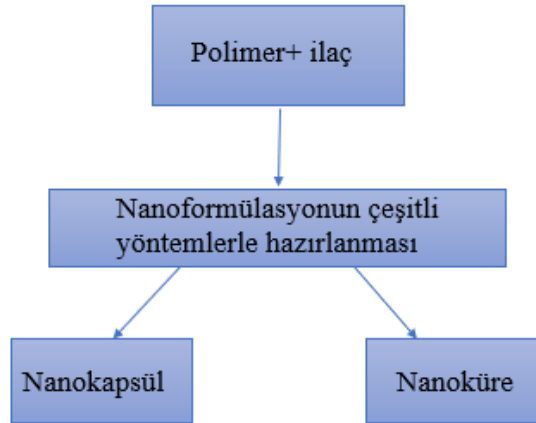


**Şekil 2.11** Kan damarlarının çok olduğu bir tümör bölgesine nanopartikül aracılı kemoterapik vermenin şematik gösterimi [93]

## 2.5.2 Polimerik Nanopartiküller

Polimerik nanopartiküller, biyouyumlu ve biyobozunur polimerler ya da kopolimerler kullanılarak elde edilen nanopartiküler sistemlerdir. Hem polimerizasyon yöntemleriyle hem de önceden oluşturulmuş polimerler kullanılarak yapılabilirler. Nanopartiküllerin genel olarak sahip olduğu avantajlı özelliklerin yanı sıra polimerik nanopartiküller fizyolojik ortamda kolayca parçalanabilmeleri ve ürünlerin sitotoksik olmayışı, etken madde yükleme kapasitelerinin yüksek olması, etken maddenin salım ve biyoyararlanımını arttırması, kolaylıkla sterilize edilebilmeleri, daha yüksek stabilite sağlamaları gibi birçok avantajlı özelliklere sahiptir [115]. Biyomalzeme araştırmalarındaki ilerlemeler, biyouyumlu ve biyobozunur özelliklere sahip polimerik nanopartiküllerin geliştirilmesi ile sağlanmıştır [93].

Polimerik nanopartiküller, yaklaşık kırk yıl önce kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik ajanların ve aşılarda taşınması amacıyla geliştirilen sistemler olup bu sistemler ile etken maddeler yüzeye adsorbe edilebilir, hapsedilebilir ya da partikül içinde çözündürülebilir. Hazırlama yöntemine göre nanoküre ya da nanokapsül olarak adlandırılmaktadırlar [63]. Nanokapsüller (Şekil 2.12), bir ilacın polimerik bir zarla çevrili bir iç sıvı çekirdeğinden oluşan bir oyukta kapatılarak oluşturulmakta olup veziküler sistemlere benzetilmektedir [61]. Nanoküreler ise matriks sistemlere benzetilmekte olup ilaç uniform olarak disperse edilerek oluşturulmaktadır [115].



Şekil 2.12 Polimerik nanopartiküllerin sınıflandırılması

Polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında doğal ya da sentetik polimerler kullanılmaktadır ve bu süreçte polimer seçimi önemli bir yere sahiptir. En yaygın olarak kullanılan sentetik polimerler, polilaktik asit (PLA), poliglikolik asit (PGA), polilaktit-poliglikolit kopolimerleri (PLGA), polikaprolaktonlar ve poliakrilatlardır. Laktit-glikolit kopolimeri, kapsamlı şekilde araştırılmış polimerler arasındadır. Kullanılan doğal polimerler arasında ise alijanat, albumin, kitosan geniş çapta araştırılmıştır. Doğal polimerler genellikle sentezi ve işlenmesi bakımından sentetik polimerlere göre daha sınırlıdır. Bu dezavantaj sebebiyle kontrollü salım sistemlerinde sentetik polimer kullanımı ön plandadır [116]. Tablo 2.3'te nanopartikül hazırlanmasında kullanılan doğal ve sentetik primerler toplu olarak verilmiştir. Bu tez çalışmasında nanopartiküler sistemlerin hazırlanmasında polimer olarak PLGA kopolimeri tercih edildiğinden, bu polimere ait ayrıntılı bilgi verilmiştir.

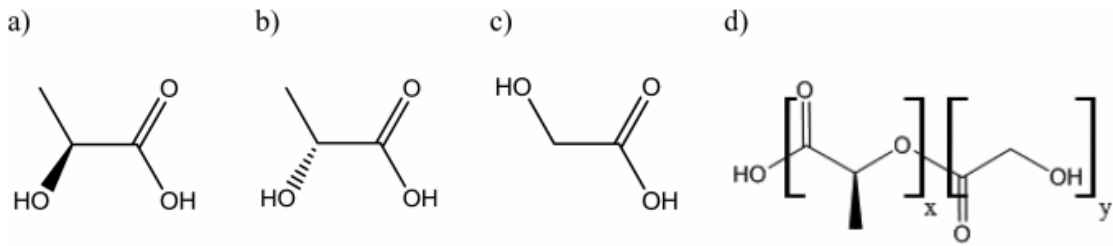
**Tablo 2.3** Nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan doğal ve sentetik polimerler, blok kolipomerler ve stabilizörler [105]

<b>Polimer Çeşitleri</b>	<b>Polimer Adları</b>
Doğal Polimerler	Kitosan, Alijanat, Albumin, Jelatin
Sentetik Polimerler	PLA, PGA, PLGA, poliakrilat, poliprolakton
Blok Kopolimerler	Poli(laktik)-poli (etilen glikol) (PLA-PEG), PGA-PEG, PLGA-PEG
Kolloidal Stabilizörler	Polivinilalkol (PVA), Tween 20, Tween 80, Dekstran

PLGA ilaç taşınmasında yaygın olarak kullanılan, güvenilirliği yüksek, taşıyıcı ajan olarak diğer nanotaşıyıcılarla karşılaştırıldığında daha yüksek kararlılığa ve ilaç yükleme kapasitesine sahip FDA (Food and Drug Administration) ve EMA (European Medicine Agency) onaylı bir polimerdir [18]. Bunlara ek olarak; PLGA polimeri ilacın toksisitesini azaltan, biyoyararlanımını ve etki süresini arttıran, uzun süreli salım yapılmasını sağlayan ilaç taşıma sistemidir. İlaç taşıma

sistemlerinde kullanılan biyobozunur polimerlerin "altın standardı" olarak kabul edilen PLGA, en uzun klinik deneyimlere sahip olması sebebiyle sıklıkla tercih edilmektedir [117].

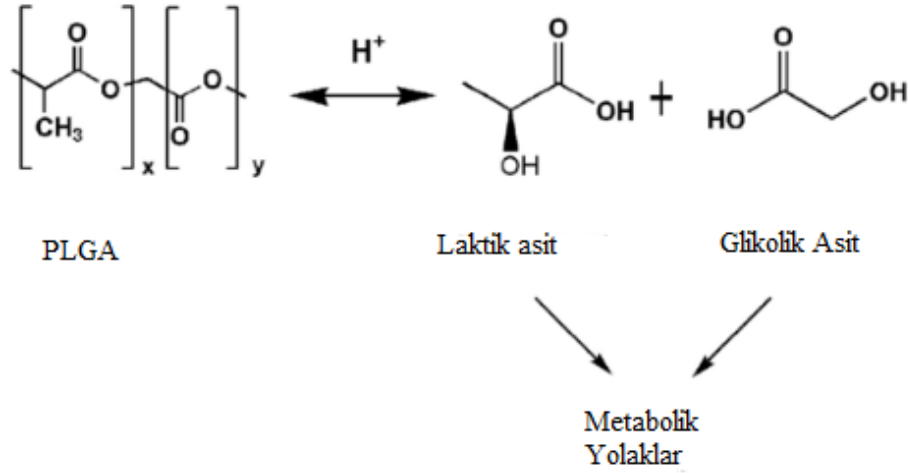
PLGA, poli-laktik asit (PLA) ve poli-glikolik asit (PGA) kopolimeridir. Poli-laktik asit, tipik olarak asimetrik bir  $\alpha$ -karbon içermekte ve stereokimyasal olarak genelde D ya da L formunda bulunmaktadır (Şekil 2.13). PLA'nın enantiyomerik formları poli-D-laktik asit (PDLA) ve poli-L-laktik asittir (PLLA). PLGA genel olarak D ve L-laktik asit formlarının eşit oranda olduğu poli-D,L-laktik-ko-glikolik asit için bir kısaltma olarak kullanılmaktadır [117].



**Şekil 2.13** L-PLA (a), D-PLA(b), PGA(c), PLGA (d)'nin kimyasal yapıları (x; Laktik asit üniteleri sayısını, y; glikolik asit ünitelerinin sayısını göstermektedir.) [116]

PLGA, poliester omurgasının hidrolitik olarak bölünmesiyle parçalanmaktadır. Şekil 2.14'te gösterilen PLGA polimerinin hidrolizi reaksiyonu incelendiğinde poliesterin hidrolizinin bir asit ile katalizlendiği görülmektedir. Çünkü karboksilik asit zinciri uçları PLGA polimerlerinin hidrolitik bölünmesinin bir ürünüdür [116]. Ester bağlarının yıkılması sonucunda yapısındaki laktik asit ve glikolik aside hidrolize olan PLGA molekülü krebs döngüsü aracılığıyla vücuttan  $\text{CO}_2$  ve  $\text{H}_2\text{O}$  halinde atılmaktadır [117]. Younis ve arkadaşları terapötik etkiye sahip olduğu bilinen Igaratimod molekülünü PLGA polimeri içerisine enkapsüle ederek glioma hücreleri üzerindeki sitotoksikite, göç ve apoptotik etkilerini incelemiş ve nanopartikül içerisine enkapsüle edilmesi ile molekülün etkisinin kontrollü salım mekanizması ile arttırıldığı gözlemlenmiştir [118]. Zhang ve arkadaşları ise apatinib molekülünün sahip olduğu suda düşük çözünürlük ve düşük stabilite problemlerinin üstesinden gelmek amacıyla apatinib yüklü PLGA nanopartikülleri sentezlemiş ve sentezlenen apatinib-PLGA nanopartiküllerin tümör hücrelerini ve anjiyogenezi inhibe ettiğini bildirmişlerdir [119]. Literatürde bunlara ek olarak;

flavonoidler grubunda yer alan kurkumin [120], kuersetin [121], rutin [122], kateşin [123] moleküllerinin PLGA içerisine ko-enkapsülasyonu çalışmaları bulunmakta ve *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla üretilen formülasyonların etkisi desteklenmektedir.



**Şekil 2.14** PLGA'nın hidrolizi [124]

Son yıllarda blok kopolimer kavramı, biyolojik olarak parçalanabilmesi, toksik olmaması ve immünojenik olmamasından dolayı kontrollü ve hedefli ilaç taşıma sistemlerinin geliştirilmesini önemli ölçüde etkilemiştir [125]. Literatürde blok kopolimerler olan PLA-PEG, PGA-PEG, PLGA-PEG ile çalışmalar bulunmaktadır ve bu çalışmalarda kemoterapik ajanların, flavonoidlerin PLGA-PEG'lenmesi ile farmokinetik ve dağılım özellikleri araştırılmıştır [126].



### 3.1 Materyal

#### 3.1.1 Kullanılan Cihazlar

- Hassas terazi- Shimadzu
- Ultrasonik Su Banyosu- Bandelin Sonorex
- Sonikatör- Bandelin Sonoplus
- Manyetik Karıştırıcı-Variomag Mono
- Çalkalayıcı-Biosan Environmental Shaker ES20
- Santrifüj Cihazı-Beckman Coulter Allegra X-30 R
- Mini Santrifüj Cihazı-Hermle Z 206 A
- Vorteks-Velp Scientifica
- Çoklu Manyetik Karıştırıcı-IKA
- pH Metre-Hanna
- UV-Vis Spektrofotometre- Shimadzu UV-1800
- Zeta Sizer-Malvern ZEN 3600 Nano ZS
- Liyafilizatör-Telstar Cryodos
- FT-IR-Thermo Scientific Nicolet iS10
- CO<sub>2</sub> İnkübatör-Biosan ES20
- Otoklav-Hirayama
- Invert Mikroskop-Olympus
- Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)- ZEISS EVO LS10
- Biyogüvenlik Kabini-Hedlab XPROII
- Elisa Reader-BioTek PowerWave XS2
- Real Time PCR Cihazı-AriaMx Real-Time PCR System
- Nanodrop-Thermo Scientific NanoDrop One Microvolume UV-Vis Spectrophotometers
- SDS-PAGE Elektroforez Sistemi- BIO-RAD MiniPROTEAN® 3 Cell
- Western Transfer Sistemi-Trans-Blot Turbo Transfer System

#### 3.1.2 Kullanılan Sarf Malzemeler

- Hücre üreme flaskları (T25, T75)-NEST
- Thoma Lamı- ISOLAB
- Pipet ucu 1000 µl-ISOLAB L.005.01.003.500
- Pipet ucu 200 µl-ISOLAB L-002-R.0
- Parafilm-Bemis PM-996

- 96 kuyulu mikroparka- Sunul Tissue Culture Plate
- 96 kuyulu PCR mikroparka-Agilent
- 24 kuyulu plaka-ISOLAB 13485
- 96 well soğuk bloklu PCRcooler-Eppendorf
- Hücre kryo (dondurma) tüpler-NEST 607001
- 15 ml'lik steril falkon tüpler-NEST 601002
- 50 ml'lik steril falkon tüpler -ISOLAB S.078.02.008.050
- Steril tek kullanımlık pipetler (1 ml, 2 ml, 5 ml,10 ml ve 25 ml'lik)-SPL Life Science
- 0,2 mikrolitrelik PCR tüpü-Axygen 15216383
- Steril Őıringa- Set Medikal
- 0,22 µm steril filtre- SE2M034199
- Nitroselüloz Transfer Membran- Thermo Scientific 88018
- PVDF Membran-BIO-RAD 1620177
- Filtre kağıdı -BIO-RAD 1703965
- Trans Blot Turbo Transfer Pack-BIO-RAD 1704158

### 3.1.3 Kullanılan Kimyasallar, Enzimler, Kitler

Nanopartikül sentezi için; etken madde olarak kuersetin (Sigma Aldrich Q4951) ve CAPE (Sigma C8221), polimer olarak ise Poli laktik-ko-glikolik asit (PLGA) (Sigma 719870) kullanıldı. Diklorometan (Merck), Etil Alkol (Merck), Polivinil Alkol (Sigma Aldrich 363138) nanopartikül üretim sürecinde kullanılan diğer kimyasallardır.

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılacak PBS tamponunun hazırlanmasında sodyum klorür (NaCl-Sigma Aldrich 13423), monosodyum fosfat (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Sigma Aldrich 04270), disodyum fosfat dihidrat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O-Sigma Aldrich 04272) kullanıldı. Çözeltilerin pH'ının ayarlanmasında sodyum hidroksit (NaOH, Sigma Aldrich 71690), hidroklorik asit (HCl-Sigma Aldrich 30721) kullanıldı.

Hücre kültürü çalışmalarında hücrelerin büyütülmesi ve pasajlanmasında Dulbecco's Medified Eagle Medium (Sigma 6046), F12 Nutrient Mixture (Ham-Gibco 21765-029), Penisilin-Streptomisin (Sigma P4333), L-glutamin 200 mM (Gibco 1881732), Fetal Sığır Serumu (Gibco 08G5259K), Tripsin-EDTA (Multicell 325043156) kullanıldı. Hücre sayısının belirlenmesinde ise Tripan Mavisini (Sigma T8154) boyası kullanıldı.

Hücre canlılığı testi için Thiazoyl Blue Tetrazolium Bromide %98 (MTT-Sigma M5655), Dimetil Sülfoksit (DMSO-ChemCruz sc358801/Carlo Erba 508001) kullanıldı.

Prolifere Hücre Çekirdek Antijeni (PCNA) ile proliferasyonun belirlenmesinde PCNA antikoru (Thermo Scientific, MS106P), hematoksilen (Bio-optica,05-06002), İnvitrogen Histostain Plus Kiti (Cat. No: 85-9043), AEC Peroxidase Substrate Kiti (Vector Laboratories, SK4200), kapatma medyumunu (Thermo Fisher Scientific, Lab Vision PermaFluor Aqueous Mounting Medium) reaktifleri kullanıldı.

Hücrelerden total RNA izolasyonu Direct-zol RNA MiniPrep kiti (Zymo Research R2050) ile yapıldı. cDNA eldesi cDNA Sentez Kiti (SensiFAST) kullanılarak gerçekleştirildi. Real-Time PCR primerleri Sentegen A.Ş' den temin edildi. Real Time PCR SYBR Lo-Rox Kit (SensiFAST BIO-94020) kullanılarak AriaMx Real-Time PCR cihazı ile gerçekleştirildi.

Western Blot analizinde kullanılan protein lizatlarının hazırlanmasında Proteaz-fosfataz inhibitör kokteyl 100X (Sigma PPC1010) içeren RIPA 10x (Abcam ab156034) kullanıldı. Elde edilen lizatların protein miktarı BCA Protein Assay Kiti (SMART™ 21071) kullanılarak tayin edildi. SDS-PAGE analizinde kullanılan çözeltilerin hazırlanmasında Tris baz (Sigma 1001765977), HCl (Sigma Aldrich 30721), SDS (Sigma 101536917), Amonyum Persülfat (Sigma 06429KH), TEMED (Sigma Life Science 102051196), Akrilamid/Bis solüsyonu (Biorad- 1610158), Metanol (Sigma Aldrich STBG2513V), Glacial Asetik Asit (TEKKİM-251011531), Gliserol (Riedel de Haen 15524),  $\beta$ -merkaptoetanol (MERCK 8.05740.0250), Glisin (Sigma G8898-500G), Bromfenol mavisi (Sigma Aldrich 114391), Coomassie brilliant blue (AppliChem A1092) kullanıldı. Western Blot analizinde kullanılan çözeltilerin hazırlanmasında ise; Tween 20 (AppliChem A1389), yağsız süt tozu (BioshopSKI400.500) kimyasalları kullanıldı. Blotlama için 0.2  $\mu$ m nitroselüloz Trans-blot Turbo Transfer Pack (Cat No:1704158) ve 0.45  $\mu$ m nitroselüloz membran (Thermo Scientific, Lot:SI23993310) kullanıldı. Primer antikor olarak Beta-actin primer antikor (Rabbit-Cell Signaling Technology 4967S), Anti-caspase-3 antikor (Abcam ab13847), Cleaved caspase-9 primer antikor (Rabbit-Abcam ab2324), Sitokrom-c primer antikor (Mouse-İnvitrogen 338500) kullanıldı.

Sekonder antikor olarak ise; Goat anti-mouse IgG H&L HRP (Abcam ab205719) ve Goat anti-rabbit IgG (H+L) sekonder antikor (Abcam ab205718) kullanıldı. Primer ve sekonder antikorlar içerisinde Sodyum azid-(Carlo Erba Reagents 478482) eklenerek saklandı. Bağlanan antikorların gösterilmesi DAB (Thermo Scientific-34001) ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma- Aldrich 18304) kullanılarak kolorimetrik yöntemle gerçekleştirildi.

### **3.1.4 Stok Solüsyonlar ve Tamponlar**

#### **3.1.4.1 Farklı Konsantrasyonlardaki CAPE Çözeltilerinin Hazırlanması**

10 ml etil alkol içerisinde 1 mg CAPE çözülürerek 0.1 mg/ml'lik CAPE çözeltisi elde edildi. 0.1mg/ml'lik ana stok CAPE çözeltisi seyreltilerek 0.09; 0.08; 0.07; 0.06; 0.05; 0.04; 0.03; 0.02; 0.01; 0.009; 0.008; 0.007 0.006; 0.005; 0.004; 0.003; 0.002; 0.001 mg/ml konsantrasyonlarda bir seri CAPE çözeltisi hazırlandı.

UV-Vis Spektrofotometresindeki ölçümler sonucunda CAPE molekülünün maksimum absorbans dalga boyu 323 nm olarak belirlendi. Kalibrasyon eğrisinin çizilmesi amacıyla konsantrasyonları 0.1 mg/ml- 0.001 mg/ml arasında olan 20 tane CAPE çözeltisinin tek dalga boyunda UV absorbans değerleri okundu. Okunan değerler kullanılarak CAPE molekülünün standart kalibrasyon eğrisi çizildi.

#### **3.1.4.2 Farklı Konsantrasyonlardaki Kuersetin Çözeltilerinin Hazırlanması**

10 ml etil alkol içerisinde 2.5 mg kuersetin çözülürerek 0.25 mg/ml'lik ana stok kuersetin çözeltisi elde edildi. 0.25 mg/ml'lik ana stok kuersetin çözeltisi seyreltilerek 0.2-0.005 mg/ml konsantrasyonları arasında bir seri kuersetin çözeltisi hazırlandı.

Hazırlanan kuersetin-etil alkol çözeltilerinin UV-Vis Spektrofotometresindeki ölçümler sonucunda kuersetinin maksimum absorbans dalga boyu 372 nm olarak belirlendi. Konsantrasyonları bilinen kuersetin-etil alkol çözeltilerinden tek dalga boyunda UV absorbans değerleri okunarak kalibrasyon eğrisi çizildi.

#### **3.1.4.3 Polivinilalkol (PVA) Çözeltisinin Hazırlanması**

4 gram polivinilalkol tartıldı ve üzerine 100 ml distile su eklenerek manyetik karıştırıcıda 65-75° C'de homojen çözelti elde edilene kadar karıştırılarak %4'lük

polivinilalkol çözeltisi elde edildi. Elde edilen %4'lük PVA çözeltisi filtre kağıdı ile süzüldü.

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

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

#### **3.1.4.4 0,01 mol/L'lik PBS Hazırlanması (pH=7.4)**

0,2922 gram NaCl, 0,5999 gram NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve 0,889 gram Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O tartılarak üzerine 500 ml distile su eklendi ve manyetik karıştırıcıda homojen çözelti elde edilene kadar karıştırıldı. Çözeltinin pH'ı NaOH ve HCl kullanılarak 7.4'e ayarlandı. Hücre kültürü çalışmalarında hazırlanan PBS otoklavlanarak kullanıldı.

#### **3.1.4.5 %10'lük DMEM/F12 Tamamlanmış Besiyeri Hazırlanması**

Ticari olarak satın alınan DMEM ve F12 1:1 oranda karıştırılarak hazırlanan DMEM/F12 içerisine 0.2 mM L-glutamin, 100 µg/mL streptomisin ve 100 U/mL penisilin eklendi. Hazırlanan besiyerine %10 FBS (Fetal Sığır Serum) eklenerek %10'lük DMEM/F12 tamamlanmış besiyeri hazırlandı ve HT-29 insan kolon kanseri hücre kültürü çalışmalarında kullanıldı. Hazırlanan tamamlanmış besiyeri +4°C'de saklandı.

#### **3.1.4.6 Hücre Dondurma Solüsyonunun Hazırlanması**

%95 FBS (Fetal Sığır Serum) ve %5 DMSO içeren dondurma solüsyonu hazırlanarak HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinin dondurulmasında kullanıldı. Hazırlanan hücre dondurma solüsyonu -20°C'de saklandı.

#### **3.1.4.7 MTT Solüsyonunun Hazırlanması**

Hücre canlılığı testi olan MTT testinde kullanılmak üzere 6 mg MTT molekülü tartıldı. Tartılan MTT molekülünün 10 ml PBS içerisinde çözünmesi sağlandı ve filtreden geçirilerek 0.6 mg/ml'lik solüsyon hazırlandı. Taze hazırlanan 0.6

mg/ml'lik MTT solüsyonu ışığa duyarlı olması sebebiyle kullanılabildiği kadar +4°C'de karanlıkta bekletildi.

#### **3.1.4.8 Protein Lizatlarının Hazırlanmasında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması**

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

#### **3.1.4.9 Protein Miktar Tayininde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması**

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

#### **3.1.4.10 SDS-PAGE'de Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması**

##### **Akrilamid/Bis**

Akrilamid 87,60 gram

N-N-bis-metilen-akrilamid 2,40 gram

Distile su 300 ml

Filtrelenip +4°C'de karanlıkta saklanır.

##### **Tris-HCl (pH=8.8)**

Tris baz 27,23 gram

Distile su 80 ml

Çözeltinin pH'ı HCl kullanılarak 8.8'e ayarlanır ve çözelti distile su ile 150 ml'ye tamamlanır.

##### **Tris-HCl (pH=6.8)**

Tris baz 6 gram

Distile su 60 ml

Çözeltinin pH'ı HCl ile 6.87'ye ayarlanır. Ardından çözelti distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

### **%10 SDS**

SDS 10 gram

Distile su 90 ml

Çözeltinin çözünmesi sağlandıktan sonra distile su ile hacmi 100 ml'ye tamamlanır.

### **APS**

Amonyum persülfat 0,10 gram

Distile su 1 ml

Günlük taze olarak hazırlanır.

### **Protein Boyama Çözeltisi**

Coomassie brilliant blue 0,1 gram

Metanol 40 ml

Glacial asetik asit 10 ml

Çözelti distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

### **Boya Uzaklaştırma Çözeltisi**

%5 Metanol 50 ml

%7 Glacial asetik asit 70 ml

Çözelti distile su ile 1 L'ye tamamlanır.

### **2X SDS-PAGE Örnek Tamponu**

0,5 M Tris-HCl pH=6.8 2,5 ml

Gliserol 2 ml

$\beta$ -merkaptoetanol 0,4 ml

Bromfenol mavisi 0,02 gram

SDS 0,4 gram

Çözeltinin toplam hacmi distile su ile 10 ml'ye tamamlanır. 1 ml'lik mikrosantrifüj tüplere alikotlanarak -20'de saklanır.

### **5X Tank Tamponu**

Tris baz 15 gram

Glisin 72 gram

SDS 5 gram

Çözelti 1 L distile su içerisinde çözülür.

### **3.1.4.11 Western Blot Analizinde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması**

#### **Towbin Tamponu**

Glisin 14,4 gram

Tris baz 3,03 gram

Distile su 500 ml

Metanol 200 ml

Çözelti distile su ile 1 L'ye tamamlanır.

#### **PBS (Phosphate Buffered Saline)**

NaCl 0,5844 gram

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,1988 gram

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 1,7799 gram

1 L distile su ile çözülerek çözeltinin pH'ı 7.4'e ayarlandı.

#### **PBS-Tween 20**

PBS 1000 ml

Tween 20 2 ml

#### **%5'lik Süt Tozu**

Yağsız süt tozu 5 g

PBS Tween 20 100 ml



## **3.2 Yöntem**

### **3.2.1 CAPE Molekülünün UV Standart Eğrisi**

10 ml etil alkol içerisinde 1 mg CAPE çözdürülerek 0.1 mg/ml'lik CAPE çözeltisi elde edildi. Bu çözelti seyreltilerek 0.1 mg/ml- 0.001 mg/ml konsantrasyonları arasında çözeltiler hazırlandı. Farklı konsantrasyonlardaki çözeltilerin UV-Vis spektroskopisinde spektrumu alınarak UV şiddetlerinden kalibrasyon eğrisi çıkartıldı.

### **3.2.2 Kuersetin Molekülünün UV Standart Eğrisi**

1 mg kuersetin tartılarak 10 ml etil alkol içinde çözdürüldü ve 0.1 mg/ml'lik kuersetin çözeltisi hazırlandı. Ana stok kuersetin çözeltisinin seyreltilmesi ile 0.1 mg/ml- 0.001 mg/ml konsantrasyonları arasında elde edilen çözeltilerin UV-Vis spektroskopisinde spektrumu alınarak UV şiddetlerinden kalibrasyon eğrisi çıkartıldı.

### **3.2.3 Tekli Emülsiyon Çözücü Uçurma Metodu (o/w) ile Kuersetin, CAPE ve Kuersetin-CAPE Yüklü PLGA Nanopartiküllerinin Sentezi**

Belirlenen miktarlardaki kuersetin, CAPE etken maddeleri ve 100 mg PLGA polimeri tartılarak farklı miktarlarda etil alkol ve DCM çözeltisi ile çözdürüldü. Kuersetin ve CAPE etken maddelerinin çözünmesi için etil alkol kullanılırken, PLGA polimerinin çözünmesi için DCM çözeltisi kullanıldı. Daha sonra, etil alkol ile iyice çözünmesi sağlanan kuersetin ve CAPE molekülleri ile DCM içerisinde çözünen PLGA polimeri birbirine karıştırıldı. Hazırlanan karışım, organik fazın oluşturulması amacıyla Tablo 4.2'de belirtilen farklı hacim veya farklı konsantrasyonlarda polivinilalkol çözeltisi üzerine steril şırınga ve sonikatör cihazı yardımıyla eklendi ve karışım buz banyosunda Tablo 4.2'de belirtilen sürelerde %80 enerji altında prob sonikatör kullanılarak sonike edildi. Sonike edildikten sonra oluşan karışım, 35 ml %0.1 PVA çözeltisi üzerine manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılarak steril şırınga ile eklendi. İşlem sonucunda elde edilen organik çözücü buharlaştırmak amacıyla 24 saat manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Süre sonunda elde edilen nanopartikül çözeltisinden katı

nanopartiküllerin çöktürülmesi amacıyla 9000 rpm'de 40 dakika santrifüj edildi ve üst faz toplandı. Ardından nanopartiküllerin yüzeylerinde bulunan kalıntıları uzaklaştırmak amacıyla 35 ml distile su eklenerek 9000 rpm'de 30 dakika 3 kez santrifüj edilerek yıkama işlemi yapıldı. İşlem sonunda toplam 4 santrifüj ve 3 defa distile su ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Her aşamada elde edilen üst fazlar toplanmıştır. Elde edilen katı nanopartiküller 5 ml distile su ile çözdürülerek -20 °C'ye konuldu ve liyofilizatörde kurutuldu.

### **3.2.4 Kuersetin, CAPE ve Kuersetin-CAPE Yüklü Nanopartiküllerin Reaksiyon Verimi, Enkapsülasyon Etkinliği ve Etken Madde Yüklenme Veriminin Hesaplanması**

Üretilen nanopartiküllerin karakterizasyonun yapılması amacıyla reaksiyon verimi, enkapsülasyon etkinliği/verimi, etken madde yüklenme verimi hesaplandı.

#### **3.2.4.1 Reaksiyon Veriminin (RV) Hesaplanması**

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

$$RV (\%) = \frac{\text{Üretilen nanopartikül miktarı}}{\text{Başlangıç PLGA miktarı} + \text{etken madde miktarı}} \times 100 \quad (3.1)$$

#### **3.2.4.2 Enkapsülasyon Etkinliğinin (EE) Hesaplanması**

Sentezlenen nanopartiküllerin enkapsülasyon veriminin hesaplanmasında santrifüj sonrası toplanan üst fazlar ve kuersetin, CAPE için ayrı ayrı çizilen kalibrasyon eğrileri kullanıldı. Üst fazların UV spektrum değerlerinden yüklenmemiş etken madde miktarları hesaplandı. Nanopartikül içerisine yüklenen kısım ise, başlangıçtaki toplam madde miktarından yüklenmemiş madde miktarı çıkarılarak indirekt olarak hesaplanmıştır. Aşağıda verilen eşitlik (3.2) kullanılarak enkapsülasyon verimi hesaplandı.

$$EE (\%) = \frac{\text{Nanopartikül içerisine yüklenen etken madde miktarı (mg)}}{\text{Kullanılan etken madde (kuersetin,CAPE)miktarı (mg)}} \times 100 \quad (3.2)$$

### 3.4.2.3 Etken Madde Yükleme Veriminin (DL) Hesaplanması

Etken madde yükleme veriminin hesaplanmasında santrifüj ve üç yıkama sonucunda elde edilen üst fazlar kullanılarak hesaplanan nanopartikül içerisine yüklenen etken madde miktarı ve elde edilen katı nanopartikül miktarı kullanılmıştır. Etken madde yükleme verimi eşitlik (3.3) kullanılarak hesaplandı.

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

### 3.2.5 Kuersetin, CAPE ve Kuersetin-CAPE Yüklü Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Sentezlenen tüm nanopartiküllerin Zeta sizer ile boyut, dağılım ve zeta potansiyel analizleri yapılmıştır. Bunlara ek olarak, optimize nanopartiküllerin SEM ve FT-IR analizleri yapılmıştır.

#### 3.2.5.1 Boyut ve Zeta Potansiyel Analizi

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

#### 3.2.5.2 SEM Analizi

Üretilen nanopartiküllerin morfolojik incelemeleri SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) cihazı ile gerçekleştirildi. SEM analizi ile nanopartiküllere ait yüzey morfolojisi ve şekilleri belirlendi. Yüksek vakum altında altın tabaka ile kaplanan nanopartiküller SEM cihazında analiz edildi.

#### 3.2.5.3 FT-IR Analizi

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

### 3.2.6 Kuersetin, CAPE ve Kuersetin-CAPE Yüklü Nanopartiküllerin *In Vitro* Salımı

Kullanıma uygun olarak seçilen nanopartiküllerden 10 mg tartılarak 2 ml PBS içinde çözdürüldü ve 37°C 'de yatay çalkalayıcıya 140 rpm'de çalkalanmaya bırakıldı. Örnekler belirli aralıklarla 9000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst fazlar UV spektrumunda ölçüm için ayrılarak pellet üzerine taze PBS eklendi. Bu işlem 30 gün boyunca tekrarlandı. Üst fazlardan yapılan UV ölçüm değerleri kullanılarak etken maddelerin *in vitro* salım hesaplamaları yapıldı.

### 3.2.7 HT-29 İnsan Kolon Kanseri Hücre Kültürü Çalışmaları

Üretilen nanopartiküllerin *in vitro* etkinliğinin test edilmesi amacıyla hücre kültürü çalışmalarında HT-29 insan kolon kanseri hücre hattı kullanıldı. Bu tez çalışmasında kullanılan HT-29 hücre hattının morfolojisi epitel olup, kültürde adherent (yüzeye yapışan) büyüme özelliğine sahip hücrelerdir. 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda ve %10 FBS içeren tamamlanmış besiyeri içerisinde büyütülmesi önerilmektedir [127]. Kullanılan hücre hattına ait tüm özellikler Tablo 3.1'de yer almaktadır.

**Tablo 3.1** HT-29 hücre hattının özellikleri [127]

HT-29 (ATCC® HTB38™)	
<b>Organizma</b>	Homo sapiens, İnsan
<b>Doku</b>	Kolon
<b>Hastalık</b>	Kolorektal Adenokarsinom
<b>Yaş</b>	44
<b>Cinsiyet</b>	Kadın
<b>Morfoloji</b>	Epitelyal
<b>Büyüme özelliği</b>	Adherent

### **3.2.7.1 HT-29 İnsan Kolon Kanseri Hücre Hattının Canlandırılması**

Sıvı azot tankında (-196°C) dondurulmuş halde kriyotüplerde bulunan HT-29 hücreleri 37°C'deki steril distile su içerisinde çözdürüldü. Bu aşamada hücrelerin DMSO'dan zarar görmemesi için hızlı gerçekleştirilmesine dikkat edildi. Çözünen hücreler tamamlanmış besiyeri içeren falkon tüp içerisine alınarak 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonucunda süpernatant atıldı ve pellet üzerine tamamlanmış besiyeri eklenerek hafifçe pipetaj yapıldı. Pipetaj ile hücrelerin homojen olarak dağılması sağlandı ve sayımı yapılan hücrelerin yoğunluğuna bağlı olarak T25 ya da T75 flasklara aktarıldı. Flasklara ekilen hücreler, 37°C'deki %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatöre inkübasyona bırakıldı. Ekimden sonra hücrelerin flask yüzeyine tutunması mikroskop ile kontrol edilerek tutunan ve büyüyen hücrelerin besiyeri değiştirildi. % 80-90 yoğunluğa ulaşan hücrelerin pasajlama işlemi gerçekleştirildi.

### **3.2.7.2 HT-29 İnsan Kolon Kanseri Hücre Hattının Pasajlanması**

Flasklara ekilen hücreler her gün kontrol edilerek besiyerleri değiştirildi. Hücrelerin %80-%90 konfluent olduğu aşamada pasajı yapıldı. Pasaj işleminde öncelikle hücreler üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve hücre yüzeyi PBS ile yıkanarak hücre artıklarının ve besiyerinin iyice uzaklaştırılması sağlandı. Flask yüzeyine yapışık halde bulunan hücreler 1x Tripsin-EDTA kullanılarak kaldırıldı ve enzimin etki etmesi amacıyla hücreler 37°C'lik inkübatörde 3 dakika bekletildi. Hücrelerin flask yüzeyinden ayrılıp ayrılmadığının anlaşılması için mikroskopta kontrol edildi. Yüzeyden ayrılmış halde bulunan hücrelerin üzerindeki tripsinin etkisini inaktive etmek amacıyla üzerine eklenen tripsin miktarının en az iki katı kadar tamamlanmış besiyeri eklenerek yıkama yapıldı ve 15 ml'lik falkon tüpe aktarıldı. 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek hücrelerin çöktürülmesi sağlandı. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılırken, pellet üzerine tamamlanmış besiyeri eklenerek pipetaj yapıldı. Homojen şekilde dağıtılarak çözünmesi sağlanan hücreler sayılarak yeni flasklara aktarıldı. Hücrelerin çoğalması için flasklar 37°C'de %5'lik CO<sub>2</sub> içeren inkübatöre bırakıldı. Hücreler %80-%90 yoğunluğa ulaştığında rahatça çoğalabilmeleri amacıyla pasajlama işlemi tekrar edildi.

### **3.2.7.3 Tripan Mavisi ile HT-29 İnsan Kolon Kanseri Hücrelerinin Canlılık Kontrolü**

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

$$\text{Canlı hücre sayısı} = \text{Sayılan hücre sayısının ortalaması} \times \text{DF} \times \text{Toplam Hacim} \times 10^4 \quad (3.4)$$

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

### **3.2.7.4 HT-29 İnsan Kolon Kanseri Hücre Hattının Dondurulması**

HT-29 insan kolon kanseri hücre hattının bir kısmı deneylerde kullanılmak üzere pasajlanarak çoğaltılırken bir kısmı başka çalışmalarda kullanılmak üzere donduruldu.

HT-29 hücre hattının dondurulmasında %95 FBS ve %5 DMSO kullanıldı. Tripsin eklenerek kaldırılan hücrelerin santrifüj edilmesi ile elde edilen hücre pelleti 10<sup>6</sup>/ml hücre olacak şekilde sayıldı ve %95 FBS ve %5 DMSO içeren dondurma solüsyonu içerisinde çözdürülerek kriyotüplere koyuldu. Ardından kriyotüpler +4°C'de 30 dakika, -20°C'de 1 saat ve -80°C'de gece boyu inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün -196°C sıvı azot tankına geçirilerek kademeli soğutma işlemi gerçekleştirildi. Kademeli soğutma işlemi ile hücrelerin oda sıcaklığında sitotoksik etki eden DMSO'dan en az düzeyde zarar görerek depolanması amaçlanmıştır.

### 3.2.8 Kuersetin-CAPE Yüklü Nanopartiküllerin *In Vitro* Biyolojik Etkinliğinin Araştırılması

#### 3.2.8.1 MTT Testi

MTT molekülü; canlı hücrelerdeki mitokondriyal membranında lokalize olan mitokondriyal süksinat dehidrogenaz enzimine bağlanarak formazan kristalleri oluşturmaktadır. MTT testi, formazan kristallerinin çözdürülmesi ile elde edilen absorbans derecesi ile canlı hücre miktarı arasında doğru orantı bulunmasına dayanarak optik yoğunluğunun ölçülmesi ile gerçekleştirilmektedir [128]. İnsan kolon kanseri hücre hattına (HT-29) uygulanan serbest kuersetin-CAPE ve kuersetin-CAPE nanopartiküler formülasyonunun sitotoksik etkisi MTT yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

Kullanılacak hücre hattı 96 kuyulu mikrolakalara kuyu başına 10.000 hücre olacak şekilde ekilerek 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde kültüre olması için 24 saat inkübasyona bırakıldı. Belirlenen dozlarda serbest kuersetin-CAPE ve kuersetin-CAPE nanopartiküler formülasyonun hücreler üzerine uygulamaları yapıldı ve 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyona bırakıldı. Hücreler üzerindeki sitopatolojik incelemeler mikroskopta incelendi. Belirlenen 24, 48 ve 72 saatlik süreler sonunda her bir kuyu üzerine 50 µl MTT solüsyonu eklenerek 3 saat inkübe edildi. 3 saat sonunda MTT solüsyonları uzaklaştırılıp her bir kuyu üzerine 100 µl DMSO eklenerek hücreler üzerinde oluşan formazan kristalleri çözdürüldü. ELISA okuyucu ile 570 nm dalga boyunda hücrelerin absorbans değerleri okundu ve % hücre canlılıkları eşitlik (3.5) ve IC<sub>50</sub> değerleri belirlendi.

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

OD<sub>570e</sub>: 570 nm'de deney gruplarının verdiği absorbans değeridir.

OD<sub>570b</sub>: 570 nm'de kontrol grubunun verdiği absorbans değeridir.

#### 3.2.8.2 Yara İyileşmesi Testi

HT-29 hücreleri 24 kuyucuklu mikrolakalar içerisine her kuyuda 7x10<sup>5</sup> hücre olacak şekilde ekildi. 24 saat inkübasyon sonucunda hücreler %70-%80 yoğunluğa

ulaştığında hücreler üzerindeki besiyeri değiştirilmeden 200 µl'lik sarı pipet ucu yardımıyla her bir kuyunun orta kısmına yukarıdan aşağıya doğru bir çizgi çekilerek hücreler arasında boşluk oluşturuldu. Kuyular mikroskopta kontrol edilerek yüzen hücrelerin uzaklaştırılması amacıyla besiyeri ile yıkama yapıldı ve besiyeri değiştirildi. 48 saatlik IC<sub>50</sub> değerlerine göre hesaplanan dozlarda serbest kuersetin-CAPE ve nanopartiküler formülasyon hücreler üzerine uygulandı. 0, 16, 24, 48 ve 72. saatlerde görüntüler alındı. Çizikler arasındaki mesafe "ImageJ" programı kullanılarak 3 tekrarlı olarak ölçüldü.

### **3.2.8.3 Prolifere Hücre Çekirdek Antijeni (PCNA) ile Proliferasyonun Belirlenmesi**

24 kuyucuklu mikropalakalar içerisine %90 etanol ile sterilize edilen yuvarlak lameller steril pens yardımıyla yerleştirildi. HT-29 hücreleri lameller üzerine 50 µl'sinde  $5 \times 10^4$  hücre olacak şekilde ekildi ve 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda 30 dakika bekletildi. 30 dakika sonunda hücreler üzerine 450 µl tamamlanmış besiyeri eklendi ve hücrelerin tutunması amacıyla 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda hücreler üzerine serbest kuersetin-CAPE ve nanopartiküler formülasyon için belirlenen IC<sub>50</sub> konsantrasyon aralığında (5, 10 ve 20 µg/ml'lik) uygulama yapıldı ve 48 saat inkübasyona bırakıldı. 48 saatlik inkübasyon süresinin sonunda 24 kuyucuklu mikropalakalar içerisindeki tamamlanmış besiyeri uzaklaştırıldı ve her bir kuyucuğa 500 µl PBS koyularak 5 dakika bekletildi. Süre sonunda PBS uzaklaştırılıp -20°C'de soğutulan metanolden 400 µl eklenip 5 dakika bekletildi. Süre sonunda kuyucuklar üzerindeki metanol uzaklaştırılıp lamellerin iyice kurumaması için bekletildi ve fiksasyon işlemi tamamlandı.

24 kuyucuklu boş bir mikropalaka alınarak içine 500 µl PBS eklendi ve yeni mikropalaka düzeni oluşturuldu. Mikroskopta incelenerek lameller üzerine 500 µl PBS koyuldu ve steril pens yardımıyla lameller hazırlanan mikropalakalar içerisine yerleştirildi. Kuyucuklar üzerinde bulunan PBS uzaklaştırılıp İnvitrogen Histostain Plus Kiti içerisinde bulunan A solüsyonundan 6 damla eklenerek karıştırıcı üzerinde 20 dakika bekletildi. Süre sonunda solüsyon uzaklaştırılarak her bir kuyucuk üzerine 240 µl pCNA antikoru (1:300) eklendi. Mikropalaka +4°C'de



karıştırıcı üzerinde 1 gece inkübasyona bırakıldı. Gece boyu inkübasyon sonucunda kuyucuklardaki antikorlar toplandı. Kuyucuklar 3x5 dakika olacak şekilde 500 µl PBS ile yıkandı. İnvitrogen Histostain Plus Kiti içerisinde yer alan B solüsyonundan (sekonder antikor) kuyulara 6 damla eklenerek mikrolaka 20 dakika karıştırıcı üzerinde bırakıldı. Daha sonra 3x5 dakika olacak şekilde 500 µl PBS ile yıkandı. Yıkamalar sonrasında kuyulara İnvitrogen Histostain Plus Kiti içerisindeki C solüsyonundan (Streptavidin-peroxidase (HRP)) 6 damla damlatıldı ve 20 dakika karıştırıcı üzerinde etki etmesi sağlandı. Hücreler 3x5 dakika olacak şekilde 500 µl PBS ile yıkandı.

AEC Peroxidase Substrate Kiti (Vector Laboratories, SK4200) protokolüne göre 1 ml kromojen hazırlamak için 14,4 µl buffer stock, 18 µl AEC, 16 µl hidrojen peroksit 1 ml distile su içine eklenerek vortekslendi. Hazırlanan kromojen karışımından her bir kuyucuk üzerine 300 µl eklendi ve 20 dakika beklendi. Bekleme süresi boyunca mikroskopta hücreler kontrol edildi ve kromojen yardımıyla pCNA antikoruna ile işaretlenen hücrelerin gösterilmesi sağlandı. Ardından kromojen uzaklaştırılarak hücreler distile su ile 5 dakika boyunca yıkandı. İşaretlenmeyen hücrelerin gösterilmesi için hücreler hematoksilen ile 10 saniye muamele edildi ve reaksiyon çeşme suyu ile durduruldu. Kuyular distile su ile 5 dakika yıkandıktan sonra lamalar üzerine 1 damla kapatma medyumu damlatıldı. Steril pens yardımıyla 24 kuyucuklu mikrolakalar içerisinden çıkarılan lameller ters olarak lamalar üzerine yerleştirildi ve kuruması için karanlık bir yere kaldırıldı. Kuruduktan sonra immersiyon objektifi kullanılarak 100x büyütmede rastgele seçilen 10 farklı alandaki işaretlenen ve işaretlenmeyen hücreler sayılarak proliferasyon yüzdesi eşitlik (3.6) kullanılarak hesaplandı.

$$\%Proliferasyon = \frac{\text{İşaretlenmiş hücre sayısı}}{\text{Toplam hücre sayısı}} \times 100 \quad (3.6)$$

#### **3.2.8.4 Total RNA İzolasyonu**

T25 flasklara ekilen hücreler üzerine serbest kuersetin-CAPE ve kuersetin-CAPE nanopartikülleri belirlenen IC<sub>50</sub> konsantrasyon aralığında (5, 10 ve 20 µg/ml) uygulandı ve 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda RNA

izolasyonu, "Zymo Research Direct-zol RNA MiniPrep " kullanılarak kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi.

Öncelikle hücreler üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler soğuk PBS ile yıkandı. T25 flasklar üzerine 2,5 ml Trizol solüsyonu eklendi ve 2 dakika bekletildi. Bu aşamada hücre kazıyıcı yardımı ile hücreler flask tabanından kazınarak 15 ml'lik falkonlara aktarıldı. 2 dakika inkübasyonun ardından üzerine 950 µl kloroform eklenerek karıştırıldı ve karışım 2 ml'lik mikrosantrifüj tüplere geçirilerek 2 dakika bekletildi. Tüpler 15000 rpm'de +4°C'de 15 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüpler sarsılmadan süpernatantlar alınarak steril mikrosantrifüj tüplere geçirildi ve süpernatant miktarları pipetle ölçülerek üzerine 1:1 oranda etanol eklenip pipetaj yapıldı. Etanolde çözülen örnekler spin kolona aktarıldı ve 14000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonucunda toplama tüpündeki sıvı uzaklaştırıldı ve tüm bu işlemler örneklerin tamamı spin kolona aktarılincaya kadar tekrar edildi. Her bir spin kolon üzerine 400 µl RNA Wash Buffer eklendi ve 14000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda toplama tüpündeki sıvı uzaklaştırıldı. Her bir örnek için steril mikrosantrifüj tüpünde 5 µl DNaz I ve 75 µl DNA Digestion Buffer karışımı hazırlanarak her bir spin kolon üzerine hazırlanan 80 µl'lik karışım eklendi ve 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. 15 dakika inkübasyon sonunda 400 µl Direct-zol RNA PreWash spin kolonlar üzerine eklendi ve 14000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpündeki atık uzaklaştırıldıktan sonra 400 µl Direct-zol RNA PreWash eklenerek santrifüj işlemi tekrar edildi ve toplama tüpündeki sıvı uzaklaştırıldı. 700 µl RNA Wash Buffer spin kolon üzerine eklenerek 2 dakika 14000 rpm'de santrifüj edildi. Toplama tüpündeki sıvı uzaklaştırıldı. Toplama tüpü atılarak spin kolonlar yeni steril RNAz içermeyen tüplere geçirildi ve spin kolonun tam ortasına gelecek şekilde 22 µl DNaz RNaz içermeyen su eklendi ve 14000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonucunda RNA'lar RNAz içermeyen tüpler içerisinde kullanıma hazır hale getirildi.

### **3.2.8.5 İzole Edilen RNA Örneklerinin Miktar ve Safılık Tayini**

Nanodrop UV-Vis Spektrofotomere (Thermo Scientific) ile izole edilen RNA'ların safılık dereceleri ve miktarları tespit edilmiştir. RNA konsantrasyonlarının

belirlenebilmesi amacıyla RNA örneklerinin 1'er µl'si cihaza pipetlenerek ölçüm yapıldı ve ng/ µl cinsinden konsantrasyonları belirlendi.

İzole edilen RNA örneklerinin saf olarak kabul edilmesi için 260 nm ve 280 nm dalga boylarında alınan absorbans değerlerinin oranının 1.7 ile 2.0 arasında olması gerekmektedir [129]. RNA miktarı hesaplanmasında 260 nm'deki bir optik dansite (OD) değeri 40 µg/ml RNA miktarı tek iplikli RNA'ya eşdeğer olarak kabul edilmiştir. Bu hesaplamada kullanılan formül eşitlik (3.7)'de verilmiştir.

$$\text{RNA Miktarı} = \text{OD ünitesi} \times \text{sulandırma faktörü} \times 40 \text{ µg/ml} \quad (3.7)$$

### 3.2.8.6 cDNA Sentezi

Total RNA'lardan cDNA sentezi SensiFAST cDNA sentez kiti protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. cDNA sentezi sırasında kullanılan bileşenler ve hacimleri Tablo 3.2'de verilmiştir.

**Tablo 3.2** cDNA sentezinde kullanılan bileşenler

<b>Kullanılan Bileşenler</b>	<b>Hacim</b>
Total RNA (1 µg'a kadar)	n µl
5x TransAmp Buffer	4 µl
Reverse Transkriptaz	1 µl
DNaz-RNaz içermeyen su	20 µl' ye kadar
Toplam Hacim	20 µl

İzole edilen RNA'ların 15 µl'si 0,2 ml'lik PCR tüpleri içerisine koyuldu. Ardından her bir örnek üzerine 4 µl 5x TransAmp Buffer eklendi. En son olarak Reverse Transkriptaz enziminden 1'er µl her bir tüp içerisine eklenerek iyice karıştırılması sağlandı. Total RNA'dan cDNA sentez reaksiyonu için polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) cihazı Tablo 3.3'te belirtilen programa ayarlandı. PCR reaksiyonu sonucunda

elde edilen cDNA örnekleri, Real-Time PCR analizinde kullanılana kadar -20 °C'ye kaldırılarak saklandı.

**Tablo 3.3** cDNA sentezi reaksiyon koşulları

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

### 3.2.8.7 Real-Time PCR Analizi

Serbest kuersetin-CAPE ve kuersetin-CAPE nanopartiküler formülasyonun insan kolon kanser hücre hattı üzerine belirlenen IC<sub>50</sub> konsantrasyon değerleri aralığında uygulanması sonucu oluşan apoptotik ve anti-proliferatif etkilerinin incelenmesi amacıyla apoptotik yolda yer alan genlerin ekspresyon analizi Real-Time PCR cihazı kullanılarak yapılmıştır.

Real-Time PCR analizinde kullanılan primerler Sentegen firması tarafından sentezlenmiştir. Üretici firmanın talimatlarına göre uygun miktarlarda DNaz RNaz içermeyen su ile çözdürülen ana stok primerlerden Real-Time PCR analizinde kullanılmadan önce 10 µM olacak şekilde ara stoklar oluşturuldu. Kuersetin-CAPE ve nanopartiküllerin uygulanması sonrası ekspresyonu test edilecek olan Bax, Bcl-2, Kaspaz-3, Kaspaz-9, sitokrom-c, Apaf-1, Kaspaz-8, B-actin genlerinin dizileri, ürün uzunluğu ve Tm değerleri Tablo 3.6'da gösterilmiştir.

Hücreler üzerine farklı dozlarda (5, 10 ve 20 µg/ml) serbest ve nanopartiküler formülasyonun uygulanması sonrası ticari kit kullanılarak RNA izolasyonu gerçekleştirildi ve elde edilen RNA'lar reverse transkriptaz enzimi ile cDNA sentez kiti (SensiFAST) protokolüne uygun olarak cDNA'ya çevrildi. cDNA'lar 1:4 oranında seyreltilerek Real-Time PCR analizinde kullanıldı. Analizde; uygun

oranda (1:4) seyreltilen cDNA'lar, forward ve reverse primerler, SYBR green boyası ve dH<sub>2</sub>O kullanıldı. Her bir bileşen için stok ve reaksiyon konsantrasyonu, kuyu başına kullanılan miktarı Tablo 3.4 'de yer almaktadır. Bu miktarlar baz alınarak 96 kuyulu Real-Time PCR mikropalakasında çalışılacak örnek sayısına göre master mix hazırlanarak kullanılmıştır.

96 kuyulu PCR mikropalakası içerisine ekspresyonu test edilecek her bir gen için ayrı hazırlanan master mix'ten 18'er µl eklendi. Her bir kuyucuk üzerine 2 µl cDNA eklenerek 40 döngü Real-Time PCR analizi yapıldı. Real-Time PCR cihazı ön denatürasyon amacıyla 95°C'de 2 dakika, denatürasyon için 95°C'de 5 saniye, primerlerin bağlanması için optimum sıcaklık olarak seçilen 63°C'de 10 saniye, bağlanan primerlerin uzaması için 72°C'de 15 saniyeye ayarlanmıştır. Analizde kullanılan reaksiyon koşulları Tablo 3.5'te toplu olarak gösterilmiştir.

**Tablo 3.4** Real-Time PCR analizinde kullanılan bileşenler

<b>Bileşen Adı</b>	<b>Stok Konsantrasyonu</b>	<b>Reaksiyon Konsantrasyonu</b>	<b>Bir Reaksiyon için Kullanılan Miktar</b>
SensiFAST SYBR Lo- Rox	2x	2x	10 µl
Forward Primer	100 nmol	10 µM	0,8 µl
Reverse Primer	100 nmol	10 µM	0,8 µl
cDNA	-	-	2 µl
dH <sub>2</sub> O	-	-	6,4 µl

Hedef genlerin ekspresyonları anlatımı şartlara göre değişmeyen referans gen grubunda yer alan B-actin gen ekspresyonu ile karşılaştırılarak  $2^{-\Delta\Delta CT}$  metodu ile tayin edilmiştir [130].

**Tablo 3.5** Real-Time PCR reaksiyon koşulları

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

**Tablo 3.6** Real-Time PCR ile ekspresyonu belirlenecek genlere ait primer dizileri, ürün uzunluğu ve Tm değerleri

Gen Adı	Primer Dizisi	Ürün Uzunluğu	Tm
B-actin NM_001101	F: CATGTACGTTGCTATCCAGGC R: CTCCTTAATGTCACGCACGAT	250	60.8 60.2
Sitokrom-c NM_018947	F: CTTTGGGCGGAAGACAGGTC R: TTATTGGCGGCTGTGTAAGAG	54	62.8 60.1
Kaspaz-3 NM_004346	F: AGAGGGGATCGTTGTAGAAGTC R: ACAGTCCAGTTCTGTACCACG	81	60.6 61.4
Kaspaz-9 NM_032996	F: CTCAGACCAGAGATTCGCAAAC R: GCATTTCCCCTCAAACCTCTCAA	116	60.9 60.5
Kaspaz-8 NM_033356	F: GTTGTGTGGGGTAATGACAATCT R: TCAAAGGTCGTGGTCAAAGCC	222	60.5 62.8
Apaf-1 NM_181868	F: AAGGTGGAGTACCACAGAGG R: TCCATGTATGGTGACCCATCC	116	60.2 61.0
Bax NM_138763	F: CCCGAGAGGTCTTTTTCCGAG R: CCAGCCCATGATGGTTCTGAT	155	62.1 61.9
Bcl-2 NM_000657	F: GGTGGGGTCATGTGTGTGG R: CGGTTTCAGGTACTIONACTCATCC	89	62.6 61.8

### **3.2.8.8 Protein Lizatlarının Hazırlanması**

T25 flasklar içerisine ekilen hücreler flaskı kaplayana kadar 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübe edildi. Hücreler çoğaldıktan sonra üzerlerine belirlenen IC<sub>50</sub> dozlarında serbest kuersetin-CAPE ve nanopartiküller (5, 10 ve 20 µg/ml) uygulandı ve 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler PBS ile yıkandı. Hücreler üzerine 1,5 ml tripsin/EDTA eklenerek 3 dakika inkübatörde bekletildi. Tripsinizasyondan sonra hücreler üzerine tamamlanmış besiyeri eklenerek tripsinin aktivitesinin inhibisyonu sağlandı. Hücreler falkon tüpe aktarılarak 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı. Pellet üzerine 500 µl soğuk PBS eklendi, pipetaj yapıldı ve hücreler mikrosantrifüj tüpüne transfer edildi. Örnekler 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve üst faz atıldı. Pellet üzerine 10 µl proteaz fosfotaz inhibitörü içeren 1 ml 1x RIPA çözeltisinden yaklaşık 500 µl eklendi. 20 dakika buz üzerinde inkübe edildi ve 5 dakikada bir örnekler vortekslendi. Örnekler 15000 rpm +4°C'de 20 dakika santrifüjlendi. Süpernatantlar temiz mikrosantrifüj tüplere geçirildi, pellet atıldı. Elde edilen protein lizatları kullanılıncaya kadar -80°C'de saklandı.

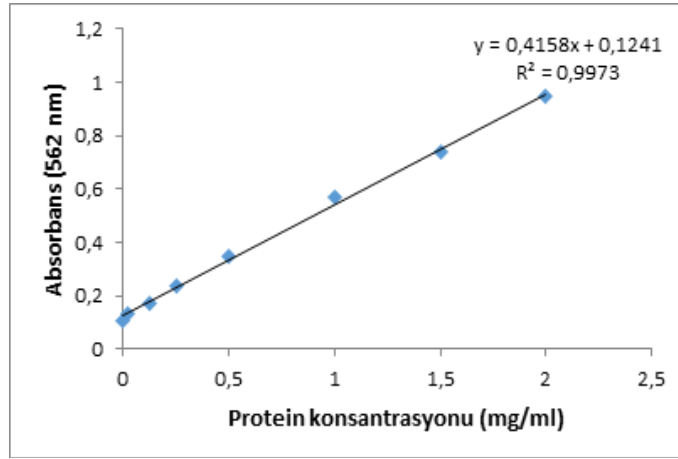
### **3.2.8.9 Protein Miktar Tayini**

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

Protein standart eğrisi çizebilmek amacıyla 2 mg/ml, 1.5 mg/ml, 1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.125 mg/ml, 0.025 mg/ml, 0 mg/ml bovine serum albümin (BSA) içeren seri dilüsyonlar hazırlandı. Protein miktar tayini için kit protokolüne uygun olarak hazırlanan BSA standartlarının miktarları Tablo 3.7'de gösterilmiş olup BSA standart eğrisi ise Şekil 3.1'de gösterilmiştir.

2mg/ml-0 mg/ml hazırlanan BSA standartlarından ve 1:10 oranında dilue edilen örneklerden 3 tekrarlı 96 kuyulu mikropalakada belirlenen kuyulara 10'ar µl koyuldu. Kit protokolüne göre hazırlanan Working Solution her bir kuyu üzerine

200 µl olacak şekilde eklendi. Mikroplaka 37°C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. ELISA okuyucu kullanılarak 562 nm'deki absorbansları ölçüldü. BSA standartlarının 562 nm'deki absorbans değerleri kullanılarak standart eğri çizildi. Standart eğriye göre her bir örneğin protein konsantrasyonları belirlendi. Lizatlar, proteaz fosfotaz inhibitör içeren RIPA ve 2X SDS-PAGE buffer eklenerek 1 mg/ml protein içerecek şekilde stoklanarak SDS-PAGE için hazır hale getirildi ve -20°C'ye kaldırıldı.



**Şekil 3. 1** BSA standart eğrisi

**Tablo 3.7** Protein standartlarının hazırlanması [131]

Tüp Numarası	Konsantrasyon	BSA	Distile su
1	2 mg/ml	300 µl stok	0 µl
2	1.5 mg/ml	375 µl stok	125 µl
3	1 mg/ml	325 µl stok	325 µl
4	0.5 mg/ml	325 µl tüp 3	325 µl
5	0.25 mg/ml	325 µl tüp 4	325 µl
6	0.125 mg/ml	325 µl tüp 5	325 µl
7	0.025 mg/ml	100 µl tüp 6	400 µl
8	0 mg/ml	0 µl	400 µl



### 3.2.8.10 Örneklerin Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezinde Yürütülmesi

SDS-PAGE için BIO-RAD MiniPROTEAN® 3 Cell jel elektrofrez sistemi kullanıldı. %12'lik ayırma jeli ve %4'lük yükleme jeli hazırlandı. Jeller aşağıda verilen protokollere göre hazırlandı.

#### %12'lik Ayırma Jeli:

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

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

#### %4'lük Yükleme Jeli:

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

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

Yürütme tankı 1X tank tamponu ile dolduruldu ve polimerleşmesi tamamlanan jel tankın içerisine yerleştirildi. Jel üzerine yerleştirilen taraklar yavaşça çıkarıldı. SDS-PAGE için -20°C'de stoklanmış örnekler 95°C'de 5 dakika ısıtıldı. Örnekler tarakların oluşturduğu kuyucuklara 20'şer µl olarak eklendi. Protein boyutunun belirlenebilmesi için marker olarak 3 µl PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Cat.No. 26619) kullanıldı. Tüm örneklerin kuyucuklara yüklenmesinin

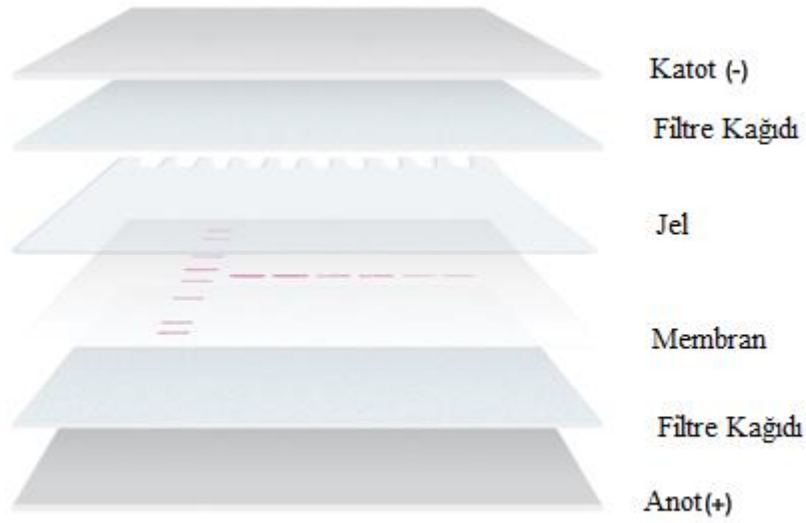
ardından elektrotlar güç kaynağına bağlandı. Örnekler 80 V'da yarım saat ardından 100 V'da bir saat yürütüldü.

### **3.2.8.11 Western Blot Analizi**

Serbest molekül ve nanopartikül formülasyonu uygulanan örneklerdeki B-actin (42 kDa), sitokrom-c (12 kDa), kaspaz-3 (35 kDa) ve cleaved kaspaz-9 (37 kDa) proteinlerinin ekspresyonunu protein düzeyinde göstermek amacıyla Western Blot analizi yapıldı. SDS-PAGE sonrası jeldeki proteinlerin nitroselüloz membrana transferi için Trans-Blot Turbo Transfer sistemi kullanıldı. Jel proteinlerinin nitroselüloz membrana transferi Şekil 3.2'de şematize edilen şekilde gerçekleştirildi.

Akımın geçtiği yöne doğru filtre kağıtları arasına sırasıyla jel ve membran yerleştirildi ve yerleştirildikten sonra hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. Bio-Rad Trans-Blot Turbo Transfer sistemi kullanılarak 25 V'da 1.3 A'de 7 dakikada proteinlerin membrana aktarımı başarılı olarak gerçekleştirildi. Membrana aktarımın başarılı olup olmadığını anlamak amacıyla jel coomasie boya çözeltisi ile boyanarak jelde protein varlığı olmadığı belirlendi. Membran %5' lik bloklama çözeltisinde (5 gr süt tozu/100 ml PBS-Tween 20) oda sıcaklığında 1 saat çalkalayıcıda bloklandı. B-actin (1:1000), sitokrom-c (1:1000), kaspaz-3 (1:250) ve cleaved kaspaz-9 (1:500) primer antikoları %5'lik süt tozu ile seyreltilerek kullanıma hazır hale getirildi. Hazırlanan primer antikolar, membranların üzerini kaplayacak şekilde muamele edilerek +4°C'de çalkalayıcıda gece boyu inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından membranlar üzerindeki antikolar toplandı. Falkon içine toplanan antikolar üzerine %1'lik sodyum azid çözeltisi eklenerek kaldırıldı. Membranlar, PBS-Tween 20 ile 3x5 dakika yıkandı. Yıkamalar sonrası membranlar, B-actin, kaspaz-3, cleaved kaspaz-9 için anti-rabbit sekonder antikor (1:10000) ile sitokrom-c için anti-mouse sekonder antikor (1:10000) ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Sekonder antikolar ile inkübasyon sonrası membranlar PBS-Tween 20 ile 3 kere 5'er dakika yıkandı. Deteksiyon aşamasına geçilmeden önce membranlar PBS ile yıkandı. Kolorimetrik deteksiyon için; 60 mg DAB (3, 3', -diaminobenzidintetrahidroklorid) 100 ml PBS ve 100 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeren çözelti hazırlandı. Membran, hazırlanan deteksiyon çözeltisi içerisine bir pens yardımı ile

batırılarak renk oluşumu gözlemlenene kadar beklendi. Bantların belirginleşmesi sonucunda reaksiyonu durdurmak amacıyla distile su kullanılmıştır [132].



**Şekil 3. 2** Jeldeki proteinlerin membrana transferi için yerleşimi [133]

#### **3.1.8.12 Coomasie Boyaması**

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

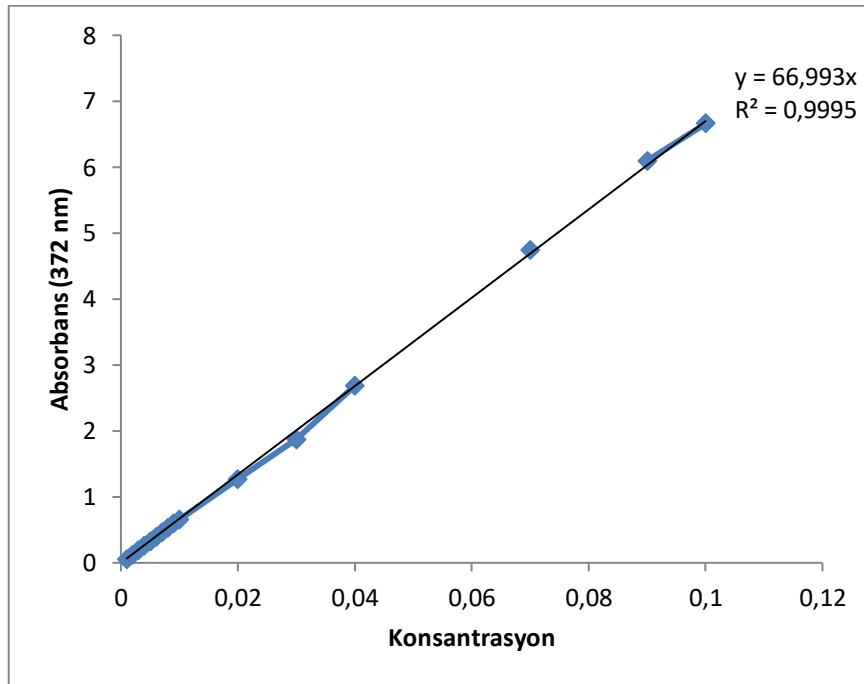
#### **3.2.8.13 İstatiksel Analizler**

Ardışık 3 kez tekrarlanan deneylere ait ölçüm sonuçları alınarak ortalama ve  $\pm$  SD değerleri hesaplandı. Biyolojik etki açısından artan konsantrasyonları ile pozitif ve negatif kontroller arasında anlamlı bir farklılığın olup olmadığı Graphpad Prism 6.0 istatistik yazılımı kullanılarak değerlendirildi ve  $p < 0.05$  değerleri anlamlı kabul edildi.

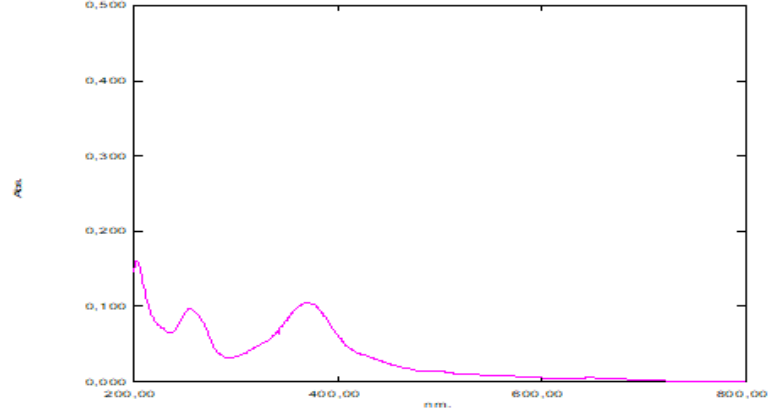
## 4.1 Kuersetin ve CAPE Moleküllerine Ait UV-Vis Spektrumları ve Kalibrasyon Eğrileri

### 4.1.1 Kuersetin Molekülüne Ait UV-Vis Spektrumu ve Kalibrasyon Grafiği

10 ml etil alkol içerisinde 1 mg kuersetin çözeltisi çözdürülerek 0.1 mg/ml'lik ana stok kuersetin çözeltisi hazırlandı. Ana stok kuersetin çözeltisi kullanılarak 0.1 mg/ml- 0.001 mg/ml konsantrasyonları arasında hazırlanan çözeltiler ile UV spektrofotometrede kuersetin molekülünün pik verdiği dalga boyunun 372 nm olduğu tespit edildi. Hazırlanan kuersetin çözeltilerinden ölçülen UV absorbans değerleri kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizildi. Kuersetinin etanole karşı hazırlanan 0,1 mg/ml-0.001 mg/ml'lik bir seri çözeltilere ait kalibrasyon eğrisi Şekil 4.1'de gösterilmiştir. Kuersetin çözeltisine ait 372 nm dalga boyunda verdiği pikin gösterildiği UV-Vis spektrumu ise Şekil 4.2'de yer almaktadır.



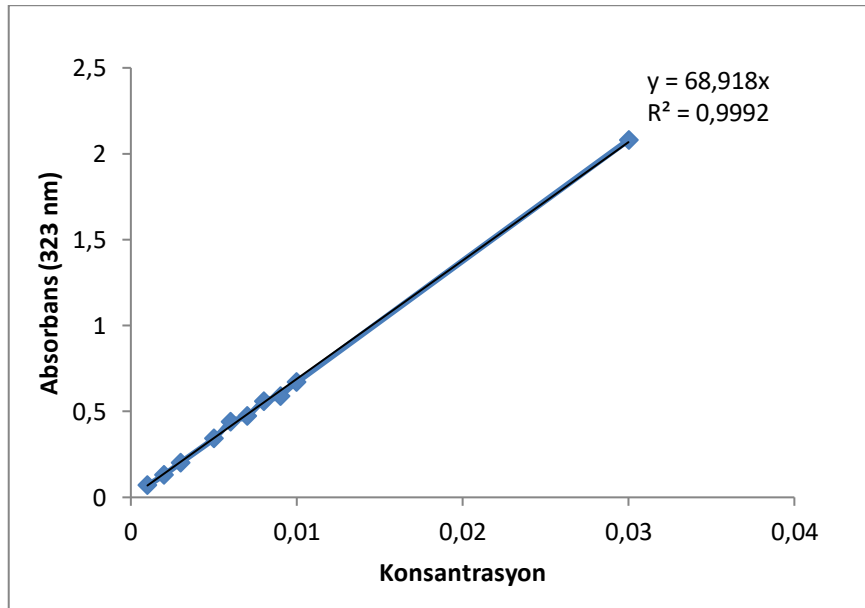
Şekil 4.1 Kuersetin molekülüne ait kalibrasyon eğrisi



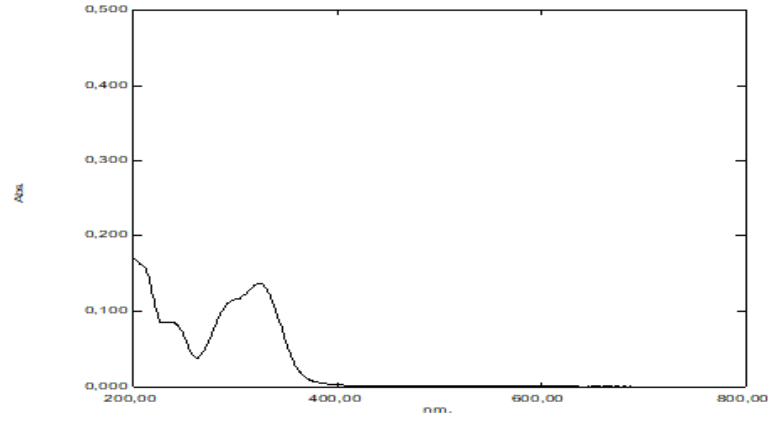
**Şekil 4.2** Kuersetin molekülüne ait UV-Vis Spektrumu

#### 4.1.2 CAPE Molekülüne Ait UV-Vis Spektrumu ve Kalibrasyon Grafiği

10 ml etil alkol içerisinde 1 mg CAPE çözeltisi çözdürülerek 0.1 mg/ml'lik ana stok CAPE çözeltisi elde edildi. Hazırlanan 0.1 mg/ml'lik ana stok CAPE çözeltisi seyreltilerek 0.1 mg/ml- 0.001 mg/ml konsantrasyonları arasında CAPE çözeltileri hazırlandı. UV spektrofotometrede CAPE molekülünün absorbans piki verdiği dalga boyu 323 nm olarak tespit edildi. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan CAPE çözeltilerinin UV-Vis spektroskopisinde spektrumu alınarak UV absorbans değerlerinden kalibrasyon eğrisi çizildi. Şekil 4.3'de bir seri CAPE çözeltilerinin etanole karşı hazırlanan kalibrasyon eğrisi, Şekil 4.4'te ise UV-Vis spektrumu yer almaktadır.



**Şekil 4.3** CAPE molekülüne ait kalibrasyon eğrisi



**Şekil 4.4** CAPE molekülüne ait UV-Vis Spektrumu

## **4.2 Farklı Parametreler ile Kuersetin, CAPE ve Kuersetin-CAPE Yüklü PLGA Nanopartiküllerinin Sentezi**

Kuersetin ve CAPE moleküllerinin sahip olduğu hidrofobik özelliklerden dolayı bu tez çalışmasında tekli emülsiyon (w/o) çözücü uçurma yöntemi kullanılarak PLGA nanopartiküler sistemler hazırlanmıştır. Farklı parametreler kullanılarak serbest kuersetin, serbest CAPE ve kuersetin-CAPE yüklü toplam 19 farklı nanopartikül sentezi yapılmıştır. Buna ek olarak, etken madde içermeyen PLGA nanopartikülü de üretilmiştir. Sentezlenen nanopartiküllerden optimize koşullara sahip partikül seçilerek hücre kültürü çalışmalarında kullanılmak üzere dört sentez daha yapılmıştır.

İlk olarak, 25 mg etken madde kullanılarak CAPE, kuersetin ve kuersetin-CAPE yüklü PLGA nanopartikülleri sentezlenmiştir. Fakat kuersetin-CAPE yüklü nanopartiküllerin boyut ve zeta analizlerinin, enkapsülasyon etkinliği ve ilaç yükleme kapasitesinin beklenenden farklı olarak bulunmasından dolayı etken madde miktarı azaltılarak ve sentez parametreleri değiştirilerek nanopartiküller üretilmiştir. Tablo 4.2 incelendiğinde; kuersetin ve CAPE miktarının nanopartikül içerisine enkapsüle edilebileceği optimize değer bulunabilmesi amacıyla etken madde miktarı 25 mg'dan sırasıyla 20, 15, 10 ve 5 mg'a kadar azaltılmıştır. Etken madde miktarları literatürde belirtilen 1:1, 1:2 ve 1:3 oranlarında karıştırılarak farklı kombinasyonlar denenmiş, 1:1 ve 1:2 oranlarda karıştırılarak elde edilen kombinasyonlar başarılı şekilde enkapsüle edilememiştir. Sentez parametrelerinden biri olan PVA miktarında ise iç fazın konsantrasyonu ve miktarı

değiştirilerek boyut üzerine etkisi incelenmiştir. Buna ek olarak, dış faz miktarı ve konsantrasyonu ise değiştirilmemiştir. Etken maddelerin çözücüsü olarak kullanılan etil alkol ve DCM miktarları değiştirilerek moleküllerin daha iyi şekilde çözünmesini sağlayacak olan uygun konsantrasyon tespit edilmiştir. Sonikasyon süresinin enkapsülasyon üzerine etkisi değerlendirilmesi amacıyla 1,5 ve 2'şer dakika sonike edilmiştir. İleriki çalışmalarda kullanılmak üzere boyutu düşük olan, 5 mg kuersetin ve 15 mg CAPE'nin (1:3) başarılı şekilde enkapsüle edildiği nanopartikül formülasyonu seçilmiştir. Daha fazla miktarda kuersetin ve CAPE molekülü içeren nanopartiküller sentezlendiğinde boyutlarının hücre kültürü çalışmaları için uygunluk göstermediği görülmektedir. Sentezlenen nanopartiküllerin reaksiyon verimi, enkapsülasyon etkinliği, etken madde yüklenme verimi, boyut, zeta potansiyel ve çoklu dağılım indeksleri hesaplanarak Tablo 4.1'de toplu olarak verilmiştir.

### **4.3 Kuersetin, CAPE ve Kuersetin-CAPE Yüklü Nanopartiküllerin Reaksiyon Verimi, Enkapsülasyon Etkinliği ve Etken Madde Yüklenme Verimi**

#### **4.3.1 Reaksiyon Verimi (RV)**

Tablo 4.1 incelendiğinde; boyut ve zeta potansiyel analizleri sonucunda hücre kültürü çalışmaları için ideal özelliklere sahip olduğu belirlenen 5 mg kuersetin ve 100 mg PLGA kullanılarak üretilen nanopartikülün (NP-20) reaksiyon verimi %76.85 olarak bulunmuştur. 15 mg kuersetin ve 100 mg PLGA kullanılarak yapılan nanopartikül üretiminin reaksiyon verimi ise %54.76 olarak hesaplanmıştır. 15 mg CAPE kullanılarak üretilen nanopartikülün (NP-6) reaksiyon verimi ise %26.30 olarak hesaplanmıştır. Hücre kültürü çalışmalarında başlıca kullanılacak formülasyon olan 5 mg kuersetin ve 15 mg CAPE yüklü PLGA nanopartikülünün (NP-12) reaksiyon verimi ise kuersetin molekülü için %70.09, CAPE molekülü içinse %64 olarak bulunmuştur.

**Tablo 4.1** Etken madde olarak kuersetin ve CAPE kullanılarak üretilen nanopartiküllere ait RV, EE, DL, Z-ave, PDI ve mV sonuçları (Q: Kuersetin, C: CAPE)

NP	Kati NP Miktarı (mg)	Reaksiyon Verimi (%)		Enkapsülasyon Etkinliği (%)		Etken Madde Yükleme Verimi (%)		Boyut Z-Ave (nm)	Çoklu Dağılım İndeksi (PDI)	Zeta Potansiyel (mV)
		Q	C	Q	C	Q	C			
NP-1	123	98,4	-	94,4	-	19,18	-	1282	0,719	-10,8
NP-2	124,2	99,36	99,36	94,06	81,24	18,93	96,86	705,2	0,552	-12,5
NP-3	27,4	-	21,92	-	74%	-	68,13	137,5	0,124	-25,5
NP-4	62,98	-	54,76	-	87,3	-	20,79	371,4	0,33	-13,5
NP-5	85,87	71,55	-	92,5	-	21,54	-	611,2	0,378	-11,8
NP-6	30,25	-	26,3	-	71	-	35,2	195,3	0,095	-23,9
NP-7	98,02	85,23	85,23	91,93	76,07	14,95	11,64	967,4	0,45	-8,88
NP-8	81,18	70,59	70,59	86,26	74,7	15,93	13,8	761,3	0,851	-11,2
NP-9	71,6	68,19	62,26	57,6	73,08	4,02	15,3	482,7	0,382	-3,63
NP-10	74,3	67,54	64,6	86,3	75,26	11,61	15,19	553,8	0,393	-7,78
NP-11	49,9	45,36	43,39	83,2	78,39	16,67	23,54	874,8	0,541	-4,03
NP-12	73,6	70,09	64	74,28	65,24	5,04	13,28	384,6	0,34	-6,87
NP-13	66,7	60,63	58	83	67,58	12,44	15,18	953,8	0,701	-4,43
NP-14	64,5	61,42	56,08	57,4	51,03	4,44	11,8	515,8	0,261	-5,67
NP-15	96,9	92,28	84,2	84,37	81,6	4,34	12,63	1246	0,415	-7,74
NP-16	74,5	70,95	-	82,38	-	5,52	-	460	0,354	-11,6
NP-17	18,8	-	16,26	41,86	-	-	33,58	154,3	0,165	-17,7
NP-18	9,6	-	-	-	-	-	-	167,9	0,199	-22,4
NP-19	93,4	88,95	-	82,4	-	4,41	-	939,2	0,706	-6,91
NP-20	80,7	76,85	-	63,18	-	3,91	-	353	0,077	-6,97



**Tablo 4.2** Farklı parametreler kullanılarak üretilen nanopartiküller

NP	Bileşenler			PVA Miktarı		Çözücü		Sonikasyon
	Kuersetin (mg)	CAPE (mg)	PLGA (mg)	İç Faz (ml-%)	Dış faz (ml-%)	Etil alkol (ml)	DCM (ml)	
NP-1	25	-	100	4 ml (%3 PVA)	35 ml (%0.1 PVA)	0,5 ml	1,5 ml	1,5 dk %80 güç
NP-2	25	25	100	4 ml (%3 PVA)	35 ml (%0.1 PVA)	0,5 ml	1,5 ml	1,5 dk %80 güç
NP-3	-	25	100	4 ml (%3 PVA)	35 ml (%0.1 PVA)	0,75 ml	1,25 ml	1,5 dk %80 güç
NP-4	15	-	100	5 ml (%3 PVA)	35 ml (%0.1 PVA)	1,25 ml	2 ml	2 dk %80 güç
NP-5	20	-	100	5 ml (%3 PVA)	35 ml (%0.1 PVA)	1,25 ml	2 ml	2 dk %80 güç
NP-6	-	15	100	4 ml (%3 PVA)	35 ml (%0.1 PVA)	0,75 ml	1,25 ml	1,5 dk %80 güç
NP-7	15	15	100	4 ml (%3 PVA)	35 ml (%0.1 PVA)	0,75 ml	1,25 ml	1,5 dk %80 güç
NP-8	15	15	100	5 ml (%3 PVA)	35 ml (%0.1 PVA)	1 ml	2 ml	2 dk %80 güç
NP-9	5	15	100	5 ml (%3 PVA)	35 ml (%0.1 PVA)	1 ml	2 ml	2 dk %80 güç
NP-10	10	15	100	5 ml (%3 PVA)	35 ml (%0.1 PVA)	1 ml	2 ml	2 dk %80 güç
NP-11	10	15	100	5 ml (%3 PVA)	35 ml (%0.1 PVA)	1,5 ml	2 ml	2 dk %80 güç
<b>NP-12</b>	5	15	100	4 ml (%3 PVA)	35 ml (%0.1 PVA)	0,5 ml	1,5 ml	1,5 dk %80 güç
NP-13	10	15	100	5 ml (%4 PVA)	35 ml (%0.1 PVA)	0,5 ml	1,5 ml	1,5 dk %80 güç
NP-14	5	15	100	5 ml (%3 PVA)	35 ml (%0.1 PVA)	0,5 ml	1,5 ml	1,5 dk %80 güç
NP-15	5	15	100	4 ml (%3 PVA)	35 ml (%0.1 PVA)	0,25 ml	1,75 ml	1,5 dk %80 güç
NP-16	5	-	100	5 ml (%3 PVA)	35 ml (%0.1 PVA)	1,25 ml	2 ml	1,5 dk %80 güç

**Tablo 4.3** Farklı parametreler kullanılarak üretilen nanopartiküller (devamı)

NP-17	-	15	100	4 ml (%3 PVA)	35 ml (%0.1 PVA)	0,5 ml	1,5 ml	1,5 dk %80 güç
NP-18	-	-	100	4 ml (%3 PVA)	35 ml (%0.1 PVA)	0,5 ml	1,5 ml	1,5 dk %80 güç
NP-19	5	-	100	5 ml (%3 PVA)	35 ml (%0.1 PVA)	1 ml	2 ml	2 dk %80 güç
NP-20	5	-	100	5 ml (%3 PVA)	35 ml (%0.1 PVA)	1 ml	2 ml	2 dk %80 güç

Kuersetin ve CAPE molekülleri ile yapılan kombinasyon sentezlerde PLGA miktarı sabit tutularak etken madde miktarının arttırılması reaksiyon verimini olumlu yönde etkilemiştir. NP-13 ve NP-14 formülasyonu karşılaştırılarak incelendiğinde değiştirilen tek etken etken madde miktarıdır. Etken madde miktarının daha fazla olduğu NP-13 formülasyonunda reaksiyon veriminin daha yüksek olduğu gözlemlenmektedir. Etken madde miktarının reaksiyon verimi üzerindeki etkisine dair elde edilen veriler, Derman ve arkadaşlarının CAPE yüklü PLGA nanopartiküller üzerinde yapmış olduğu başlangıçtaki CAPE ve PLGA miktarının reaksiyon verimini olumlu yönde etki ettiği sonuçları ile benzerlik göstermektedir [134].

Kuersetin ve CAPE içeren nanopartiküllerin üretimi için her iki molekülün de yüksek reaksiyon verimi ile nanopartikül içine enkapsüle edilmesi NP-12 formülasyonunda mümkün olmuştur. Etken madde miktarının aynı olduğu NP-12, NP-14 ve NP-15 karşılaştırıldığında reaksiyon verimlerinin ortalama %70 olarak hesaplanmış olup boyut analizleri dikkate alındığında optimize nanopartikül olarak NP-12 seçilerek hücre kültürü çalışmalarında kullanılmıştır. İleriki çalışmalarda kullanılmak üzere seçilen NP-12 nanopartikülü QC-NP, nanopartikül formülasyonu içindeki madde miktarına karşılık gelen kuersetin ve CAPE kombinasyonu ise Q-C şeklinde kısaltılarak kullanılmıştır.

### 4.3.2 Enkapsülasyon Etkinliği (EE)

Nanopartiküllerin çöktürme ve yıkama sürecinde elde edilen üst fazlar enkapsülasyon etkinliği ve etken madde yüklenme verimi hesaplanmasında kullanıldı. Üst fazların UV absorbans değerleri 323 nm’de ve 372 nm’de okunmuş ve elde edilen absorpsiyon değerlerinden kalibrasyon eğrisi yardımı ile enkapsüle olmamış CAPE ve kuersetin moleküllerinin miktarı hesaplanmıştır (Tablo 4.3).

5 mg kuersetin kullanılarak üretilen nanopartikülde (NP-20) 3.159 mg kuersetin enkapsüle edildi. NP-20’nin enkapsülasyon etkinliği %63.18 olarak hesaplandı. 15 mg kuersetin kullanılarak üretilen nanopartikülde (NP-4) 13.096 mg kuersetin enkapsüle edilerek enkapsülasyon verimi %87.30 olarak hesaplandı. 15 mg CAPE kullanılarak sentezlenen NP-6’nın ise 10.65 mg’ı enkapsüle edilerek enkapsülasyon etkinliği %71 olarak hesaplandı.

**Tablo 4.4** Kuersetin, CAPE ve kuersetin-CAPE yüklü nanopartiküllere ait parametreler

Kullanılan Etken Madde Miktarı (mg)	Elde edilen Üst faz miktarı (ml)	Enkapsüle Olmuş Etken Madde Miktarı (mg)		Enkapsüle Olmamış Etken Madde Miktarı (mg)	
5 mg kuersetin	135 ml	3,159 mg		1,840 mg	
15 mg kuersetin	136 ml	13,096 mg		1,904 mg	
15 mg CAPE	138 ml	10,65 mg		4,35 mg	
5 mg kuersetin- 15 mg CAPE	136 ml	CAPE	Kuersetin	CAPE	Kuersetin
		9,78 mg	3,71 mg	5,21 mg	1,28 mg

Kuersetin ve CAPE’nin kombinasyon nanoformülasyonunda enkapsülasyon etkinlikleri kuersetin ve CAPE molekülleri için ayrı ayrı hesaplandı. 5 mg kuersetin için 3.71 mg kuersetin enkapsüle edildi. Kuersetin için enkapsülasyon etkinliği; %74.28 olarak hesaplandı. 15 mg CAPE’nin 9.78 mg’ı enkapsüle edildi ve CAPE için enkapsülasyon etkinliği ise; %65.24 olarak hesaplandı. Sonuçlar incelendiğinde NP-4, NP-6, NP-12 ve NP-20 nanoformülasyonlarının enkapsülasyon etkinliğinin %60 ve üzerinde olduğu görülmektedir. Bu tez çalışmasında üretilen ve hücre

kültürü çalışmalarında kullanılacak iki etken maddenin yüklü olduğu formülasyon olan NP-12'nin enkapsülasyon etkinlikleri, literatürde hesperidin ve diazepam yüklü PLGA nanopartiküller sentezleyen Sharma ve arkadaşlarının enkapsülasyon etkinliklerine benzerlik göstermektedir [135].

Enkapsülasyon etkinliği, nanopartikül içerisine başarıyla yüklenen ilacın yüzdesi olarak tanımlanmaktadır. Etken maddelerin ilaç taşıyıcı sistemler içerisine başarılı şekilde enkapsüle edilerek hazırlanan nanopartiküllerin hastalıkların önlenmesinde ve tedavisindeki etkinliğini arttırabileceği düşünülmektedir [136]. Bu nedenle enkapsülasyon etkinliği yüksek nanopartiküllerin üretilmesi amacıyla bu parametreye etki eden faktörlerin aydınlatılması önem taşımaktadır. Tekli emülsiyon çözücü uçurma yöntemiyle nanopartikül sentezinde enkapsülasyon etkinliği; ilaç: polimer oranı, PVA konsantrasyonu ve hacmi başta olmak üzere çeşitli faktörlerden etkilenmektedir [137]. Sentezlenen nanopartiküller içerisinde etken madde miktarı: polimer oranının arttırılmasının enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisi incelendiğinde; olumlu etki gösterdiği gözlemlenmiştir. Örneğin; NP-8 ve NP-9 formülasyonları incelendiğinde etken madde miktarı daha fazla olan NP-8 formülasyonunun enkapsülasyon etkinliğinin daha yüksek olduğu görülmektedir. Etken madde miktarı: polimer oranının enkapsülasyon etkinliği üzerine olumlu etkisi, Lemoine ve arkadaşlarının polimerik nanopartiküller üzerine etki eden çeşitli parametrelerin araştırılması amacıyla yapmış olduğu çalışma ile benzerlik göstermektedir [138]. PVA hacminin arttırılmasının enkapsülasyon etkinliği üzerindeki etkisine bakıldığında ise PVA hacminin arttırılması ile enkapsülasyon etkinliğinin düştüğü gözlemlenmektedir. Song ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada vinkristin ve kuersetin yüklü nanopartikül sentezlenmesinde çeşitli işlem parametrelerinin etkisi araştırılmış ve PVA hacminin arttırılması ile benzer sonuçlar elde edilmiştir [139].

#### **4.3.3 Etken Madde Yüklenme Verimi (DL)**

Nanopartikülün etken madde yüklenme verimi, nanopartikül formülasyonunun belirleyici özelliklerinden biridir. Bununla birlikte etken madde yüklenme veriminin terapötik etkinlik ve farmakokinetik üzerindeki etkisi tam olarak değerlendirilmemiştir [140]. Sentezlenen tüm nanopartiküllere ait etken madde

yüklenme verimleri Tablo 4.1'de gösterilmiştir. 5 mg kuersetin kullanılarak üretilen nanopartikülün (NP-20) etken madde yüklenme verimi (DL) %3.91 olarak, 15 mg kuersetin kullanılarak üretilen nanopartikülün (NP-4) etken madde yüklenme verimi ise %20.79 olarak hesaplanmıştır. 15 mg CAPE içeren NP-6 formülasyonunun etken madde yüklenme verimi ise %35.2 olarak hesaplanmıştır. 5 mg kuersetin ve 15 mg CAPE içeren NP-12'nin etken madde yüklenme verimi (DL) ise kuersetin ve CAPE molekülleri için ayrı ayrı hesaplanmış olup sırasıyla %5.04 ve %13.28 olarak bulunmuştur. Literatürde Ling ve arkadaşları sentezlediği paklitaksel yüklü PLGA nanopartiküllerin etken madde yüklenme verimini tek bir molekül enkapsüle etmesine karşın %4.84 olarak bulmuştur [141]. Bu tez çalışmasında tek ve çift etken madde kullanılarak elde edilen nanopartiküler formülasyonların daha yüksek etken madde yüklenme verimine sahip olduğu görülmektedir.

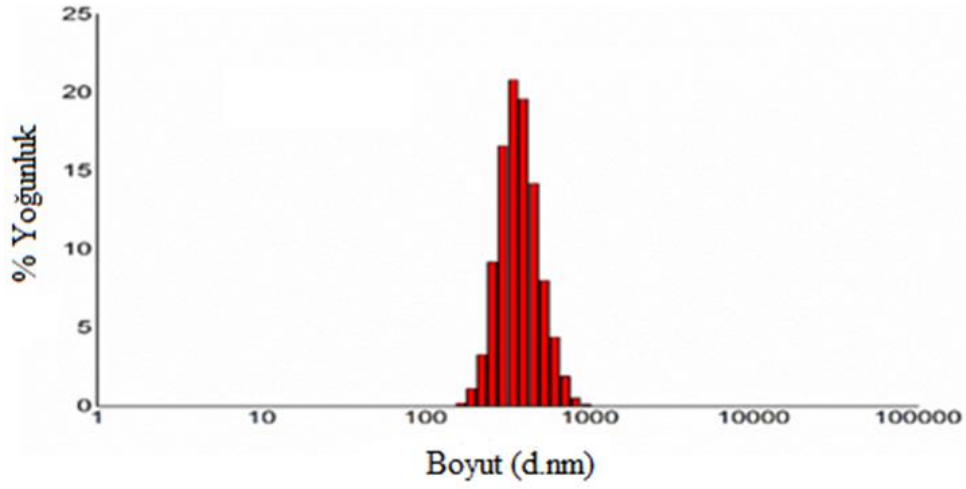
#### **4.4 Kuersetin, CAPE ve Kuersetin-CAPE Yüklü Nanopartiküllerin Karakterizasyonu**

##### **4.4.1 Nanopartiküllerin Boyut Analizi ve Çoklu Dağılım İndeksleri (PDI)**

Üretilen nanopartiküllerin boyut analizleri Zeta-sizer cihazı ile 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Boyut analizi ve çoklu dağılım indeksleri (PDI) Tablo 4.1'de gösterilmiştir. Tablo 4.1 incelendiğinde; 5 mg kuersetin yüklü nanopartikülün (NP-20) boyutu 353 nm olarak, çoklu dağılım indeksi (PDI) ise 0.077 olarak bulunmuştur. 15 mg kuersetin içeren nanopartikülün (NP-4) boyutuna bakıldığında 371.4 nm, çoklu dağılım indeksinin ise 0.330 olarak ölçülmüştür. 15 mg CAPE yüklü nanopartikül formülasyonu olan NP-6'nın boyut ölçümü sonuçlarına bakıldığında ise boyutunun 195.3 nm olup çoklu dağılım indeksinin 0.095 olduğu görülmektedir.

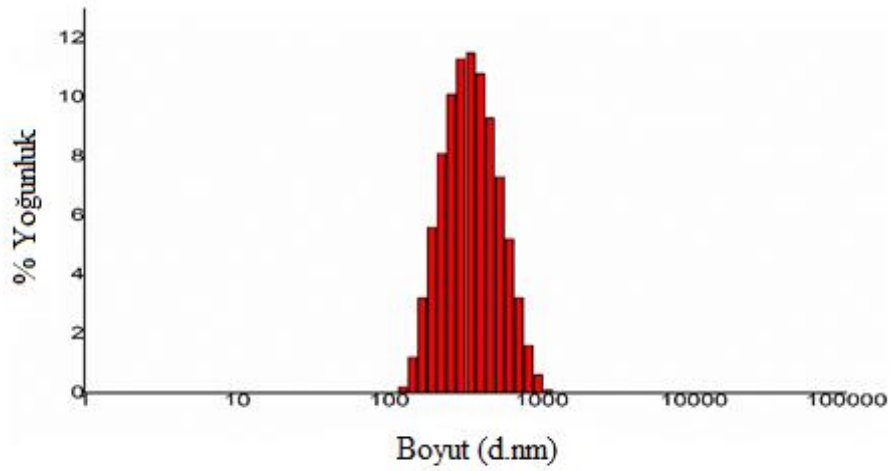
Yapılan boyut ve zeta potansiyel ölçümleri sonucunda hücre kültürü çalışmalarında kullanılmak üzere optimize kuersetin-CAPE yüklü PLGA (NP-12) nanopartiküllerin boyutu ortalama 384.6 nm, zeta potansiyel değeri -6,87 mV, çoklu dağılım indeksi (PDI) 0.340 olarak bulunmuştur. Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'de nanopartiküllere ait boyut dağılım analizleri gösterilmiştir. NP-4,

NP-6, NP-20 ve NP-12 formülasyonlarına ait boyut dağılımlarına bakıldığında; tüm nanopartiküllerin benzer skalada boyut dağılımı gösterdiği görülmektedir.

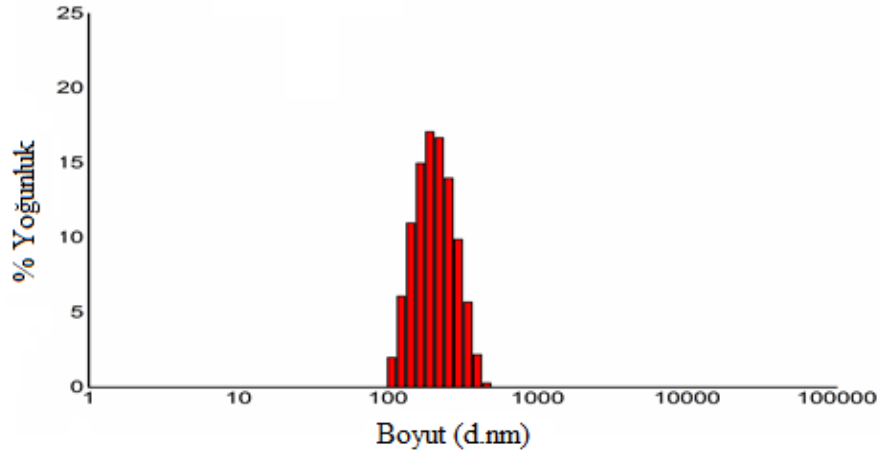


**Şekil 4.5** NP-20'ye ait boyut dağılım analizi

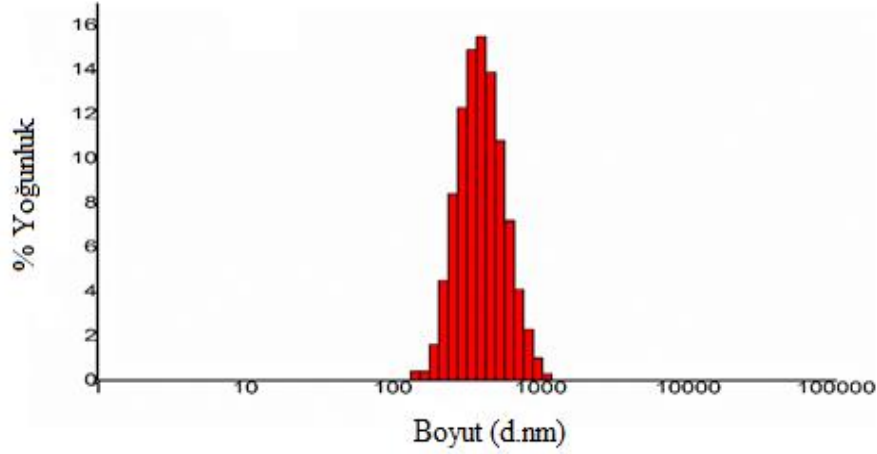
NP-4, NP-6, NP-12 ve NP-20 nanopartiküllerinin PDI değerlerinin ise 0.077 ile 0.340 arasında olduğu görülmektedir. PDI değerlerinin küçük olması, sentezlenen nanopartiküllere ait boyut dağılımının dar ve homojen olması anlamına gelmektedir.



**Şekil 4.6** NP-4'e ait boyut dağılım analizi



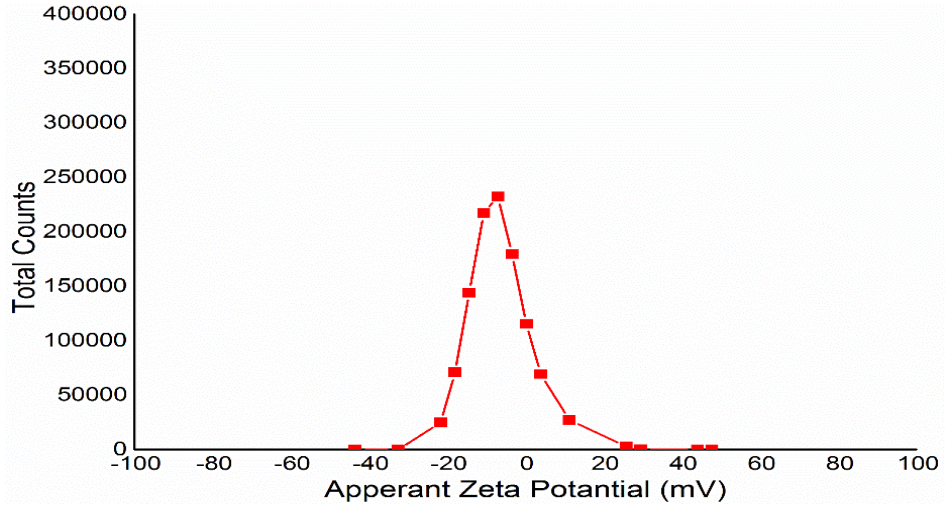
**Şekil 4.7** NP-6'ya ait boyut dağılım analizi



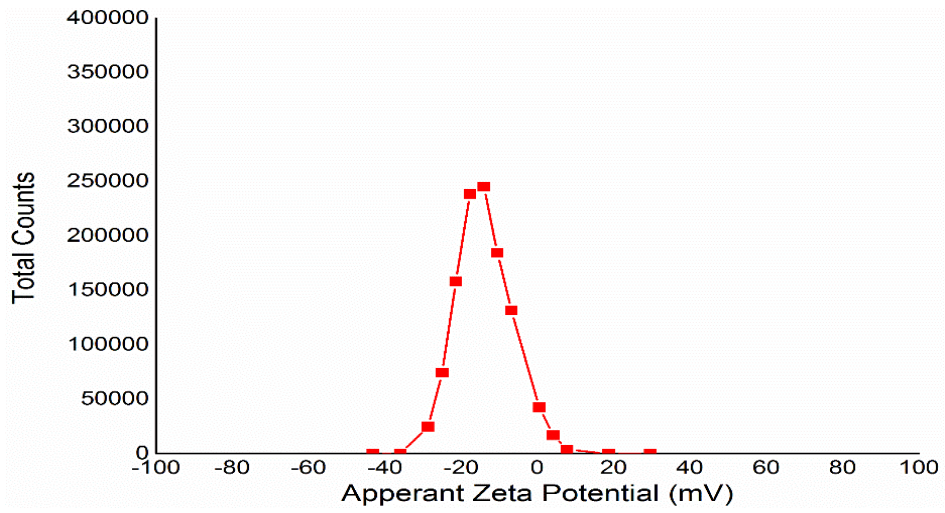
**Şekil 4.8** NP-12'ye ait boyut dağılım analizi

#### 4.4.2 Nanopartiküllerin Zeta Potansiyel Analizi

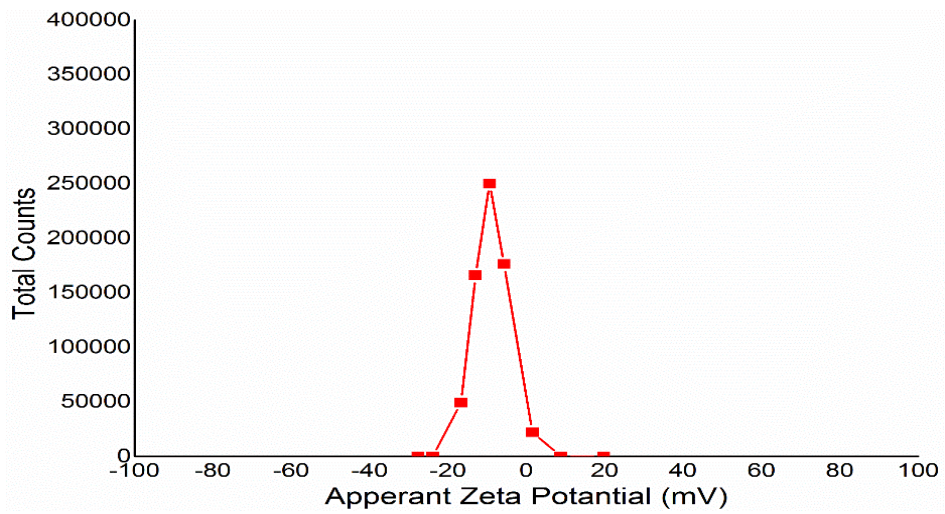
Zeta potansiyel ölçümleri kapiler kuvetler kullanılarak Zeta-sizer cihazında gerçekleştirildi. NP-20, NP-4, NP-6 ve NP-12 nanopartiküllerine ait zeta potansiyel değerleri Tablo 4.1'de gösterilmiş olup Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12'de nanopartiküllere ait zeta potansiyel analiz grafikleri verilmiştir. Ölçülen zeta potansiyel değerleri arasında değerler değişkenlik göstermekle beraber en yüksek -3.63 mV, en düşük -25.5 mV olarak ölçülmüştür. Ölçülen değerler ile nanopartiküllere ait yüzey özellikleri hakkında bilgi edinilmiştir.



**Şekil 4.9** NP-20'ye ait zeta potansiyel grafiği

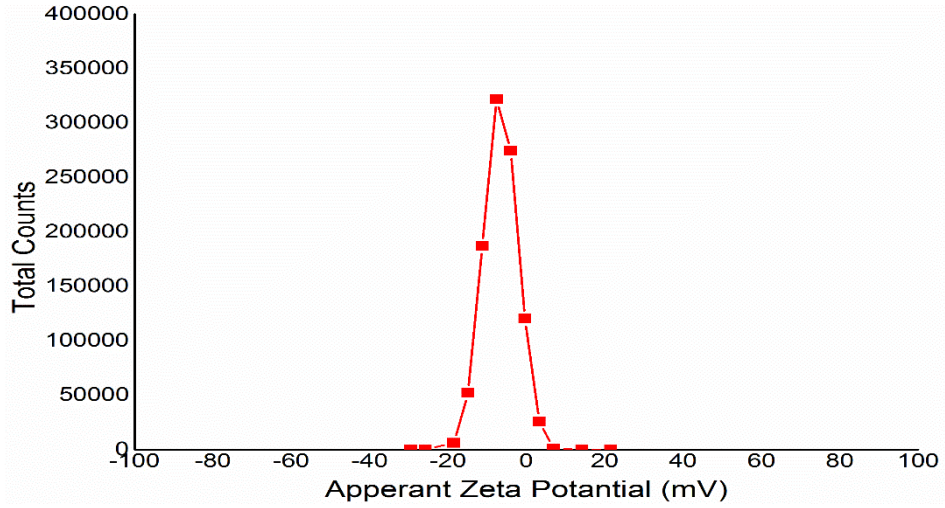


**Şekil 4.10** NP-4'e ait zeta potansiyel grafiği



**Şekil 4.11** NP-6'ya ait zeta potansiyel grafiği

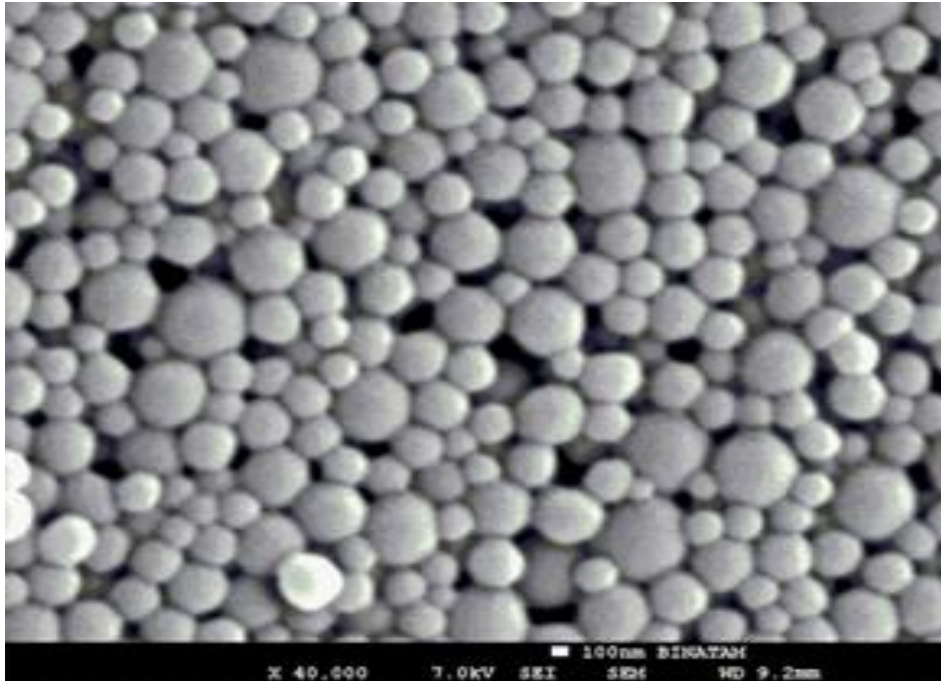




**Şekil 4.12** NP-12'ye ait zeta potansiyel grafiği

#### 4.4.3 Nanopartiküllerin Morfolojik İncelemesi

Üretilen kuersetin-CAPE yüklü nanopartiküllerin morfolojik incelemeleri SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. İletkenliği sağlamak amacıyla nanopartiküllerin üzeri altınla kaplanarak vakum altında analiz edildi. Kuersetin-CAPE yüklü PLGA nanopartiküle (NP-12) ait 40.000x büyütme oranı ile SEM görüntüleri alınmış olup Şekil 4.13'te gösterilmektedir.



**Şekil 4.13** NP-12'nin 40.000x büyütme oranı ile çekilmiş SEM görüntüsü

SEM görüntüleri incelendiğinde kuersetin-CAPE yüklü nanopartiküllerin (NP-12) homojen olarak dağıldığı ve partikül boyutlarının ortalama 300-400 nm civarında olduğu görülmektedir.

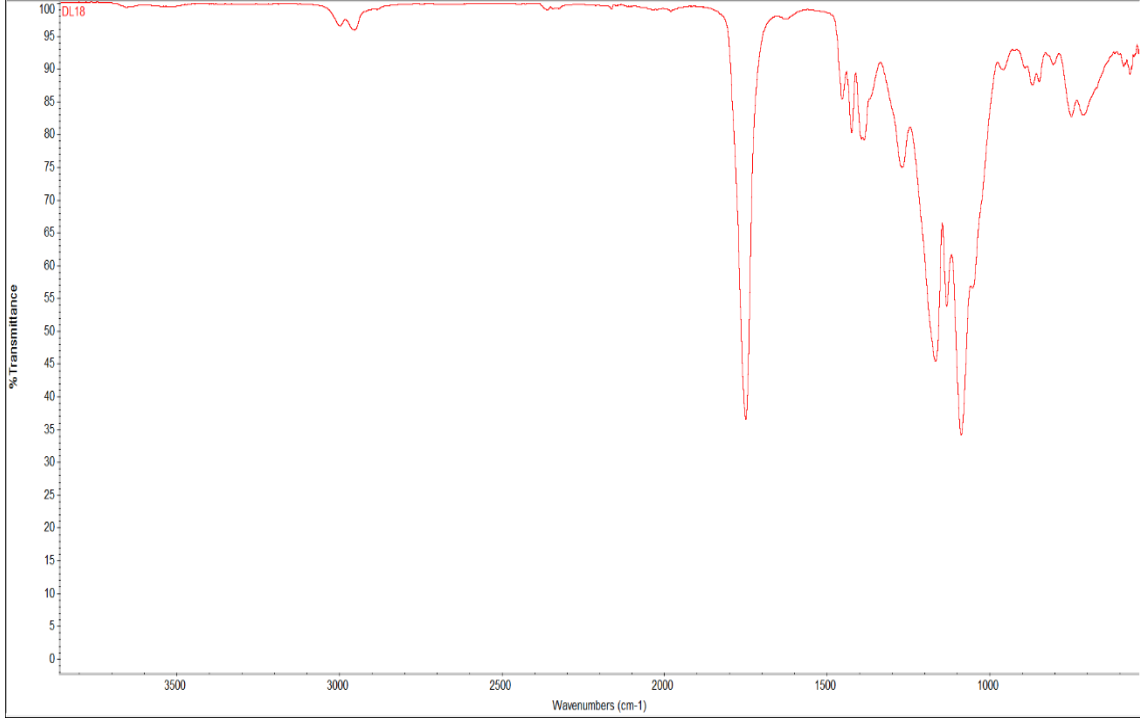
Nanopartikülün boyutu, partikülün kan dolaşımında kolayca hareket ederek tümör dokusuna ulaşabilmesi için önemli bir yere sahiptir. Küçük boyuttaki nanopartiküller birikerek, tümörün kan damarlarından kolayca geçebilirler. Büyük boyuttaki nanopartiküller ise damarlardan kolayca geçemez ve hedef tümörlü dokuya ulaşamaz. Bu nedenle; nanopartikül büyüklüğünün optimizasyonu ile tümör dokusuna spesifik alımın artırılması hedeflenmektedir [142]. Bu tez çalışmasında *in vitro* çalışmalarda kullanılacak olan nanopartikülün SEM analizi ile Zeta-Sizer cihazında ölçülen boyut değerlerinin uyumlu ve 300-400 nm civarında olduğu bulunmuştur. Literatürde Sun ve arkadaşlarının yaptığı kuersetin yüklü PLGA nanopartiküllerin boyutunun da benzer şekilde 300 nm civarında olduğu ve *in vitro* çalışmalarda yüksek anti-bakteriyel aktivite gösterdiği yer almaktadır [143]. Benzer şekilde, Singh ve arkadaşlarının yaptığı insulin ve kuersetin yüklü nanopartiküllerin boyutları da 300-400 nm arasında bulunmuş ve *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar ile etkili formülasyona sahip olduğu gösterilmiştir [144].

#### 4.4.4 Nanopartiküllerin FT-IR Analizi

Etken maddelerin nanopartikül içine enkapsülasyonu ya da yüzeye adsorpsiyonunun tespit edilmesi amacıyla Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) analizi yapılmıştır. Üretilen nanopartiküllerin enkapsülasyonunun başarılı olması durumunda FT-IR spektrumlarının polimer karakteristiğinde olması beklenmektedir. Liyofilize halde bulunan nanopartiküllerin (NP-4, NP-6, NP-12, NP-20) PLGA karakteristiğinde olup olmadığının belirlenmesi amacıyla FT-IR spektrumları çekilmiş olup spektrumlar Şekil 4.14-Şekil 4.17'de yer almaktadır.

Kuersetin molekülü sahip olduğu karbonil grupları sebebiyle (C=O) 1655  $\text{cm}^{-1}$ 'de, C=C grupları sebebiyle 1512  $\text{cm}^{-1}$ 'de, C-O grupları nedeni ile 1286  $\text{cm}^{-1}$ 'de pik vermektedir. PLGA polimeri spesifik olarak 1750  $\text{cm}^{-1}$ 'de pik vermekte, C=O ve C-O gruplarına karşılık 1250-1100  $\text{cm}^{-1}$  arasında pik görülmektedir. FT-IR

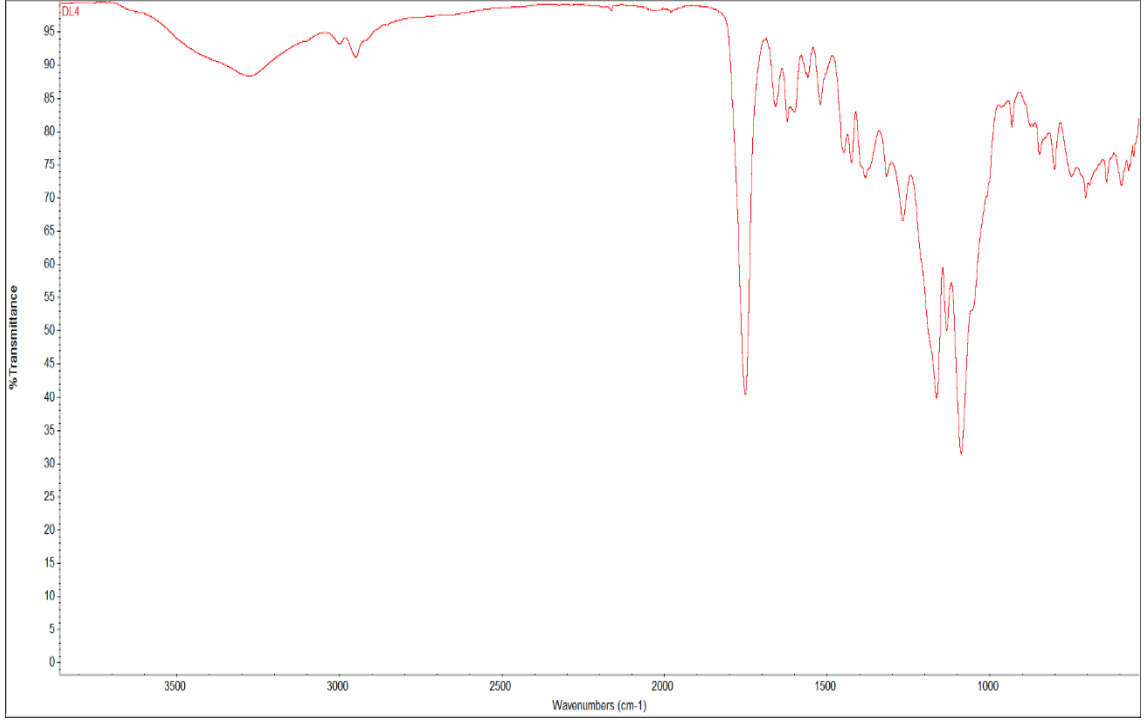
spektrumları incelendiğinde; Şekil 4.15 'te yer alan kuersetin yüklü nanopartiküllerin (NP-4) analizinde PLGA karakteristiğinde pikler görülmekle beraber zayıf şiddette de olsa kuersetine ait pik de görülmektedir. Elde edilen FT-IR spektrumu sonucuna NP-4 nanopartiküllerinde yüzeyde düşük miktarda kuersetin molekülünün adsorbe olduğu söylenebilir.



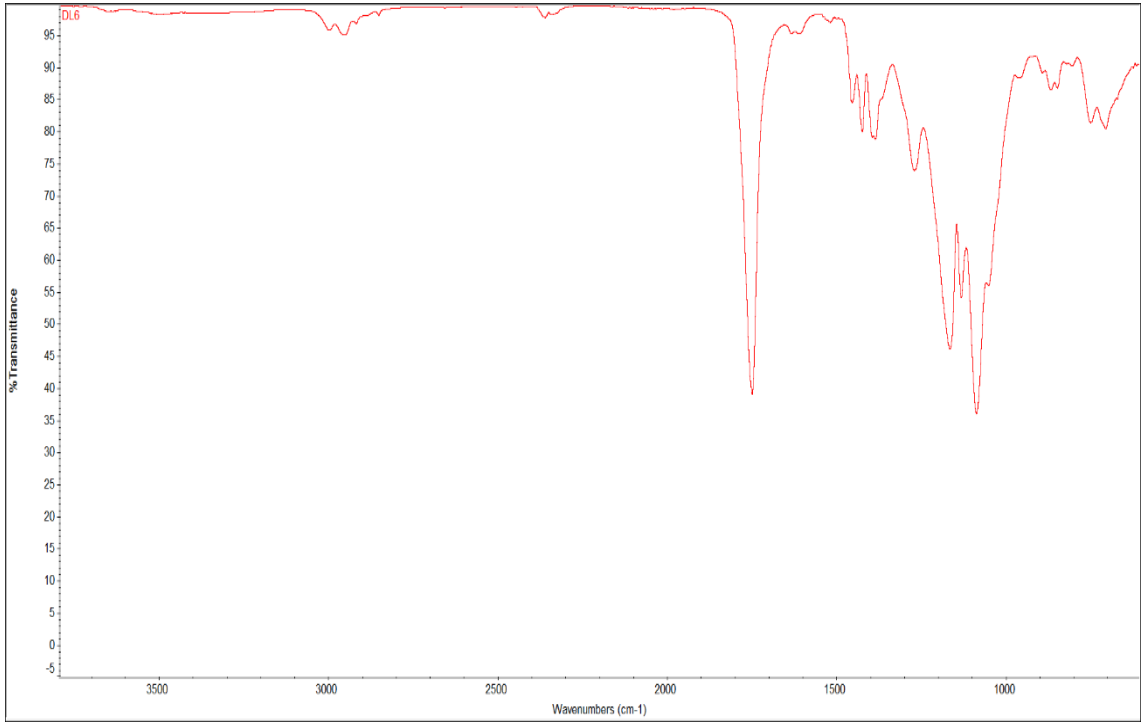
**Şekil 4.14** PLGA'ya ait (NP-18) FT-IR spektrumu

CAPE molekülü  $3471\text{ cm}^{-1}$ ,  $3320\text{ cm}^{-1}$  ve  $1600\text{ cm}^{-1}$ 'de pik vermektedir. Şekil 4.16'da yer alan CAPE nanopartiküllerinin spektrumu, boş PLGA nanopartiküllerine ait spektrumla karşılaştırıldığında (Şekil 4.14) yüzeye çok az miktarda CAPE molekülünün adsorbe olduğu görülmektedir.

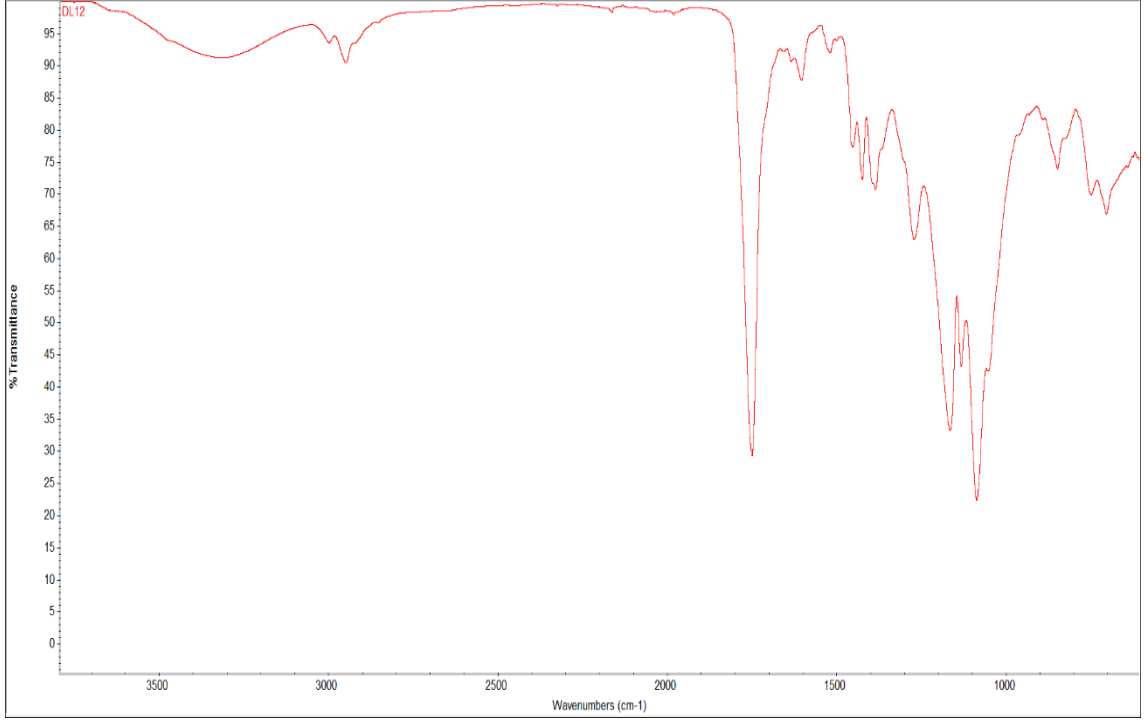
Kuersetin-CAPE yüklü nanopartiküler formülasyonun (NP-12) spektrumu (Şekil 4.17), PLGA spektrum grafiği (Şekil 4.14) ile karşılaştırmalı olarak incelendiğinde çok az miktarda kuersetine ait bant görülmekte, CAPE molekülüne ait bant görülmemektedir. PLGA'nın belirli piklerinin ise değişmediği görülmektedir.



**Şekil 4.15** NP-4'e ait FT-IR spektrumu



**Şekil 4.16** NP-6'ya ait FT-IR spektrumu



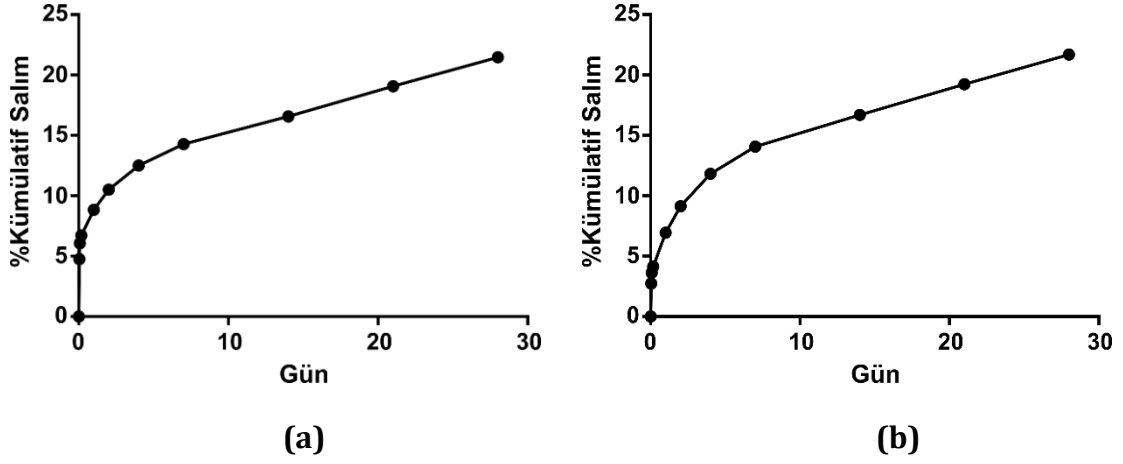
**Şekil 4.17** NP-12'ye ait FT-IR spektrumu

Sonuç olarak, NP-12 formülasyonunda CAPE molekülünün yüzeye adsorbe olmadan kuersetin molekülünün ise düşük oranda yüzeye adsorbe olarak nanopartikül içerisine başarı ile yüklendiği görülmektedir.

#### **4.5 Nanopartiküllerin *In Vitro* Salım Analizi**

Nanopartiküllerin PBS (pH=7.4) ile süspanse edilerek 37°C'de yatay çalkalayıcıda çalkalanarak gerçekleştirilen *in vitro* salım deneyleri 30 gün süre boyunca takip edilmiştir. UV-spektrofotometrede belirli sürelerde yapılan ölçümlere göre kuersetin-CAPE yüklü nanopartikül formülasyonu (QC-NP) için salım grafikleri çizilmiştir. Güne bağlı olarak % etken maddenin salım miktarları sırasıyla kuersetin ve CAPE için Şekil 4.18 'de gösterilmiştir.

Salım grafiklerinin incelenmesi sonucunda; 30 günlük süre sonunda kuersetin-CAPE yüklü nanopartikül (QC-NP) CAPE için %21.7, kuersetin için %21.46'a salım yaptığı gözlemlenmiştir. Nanopartiküllerle yapılan salım çalışma sonuçları hücre kültürü çalışmaları için referans alınarak partiküllerin *in vitro* biyolojik etkinliğinin araştırılmasına başlanmıştır.



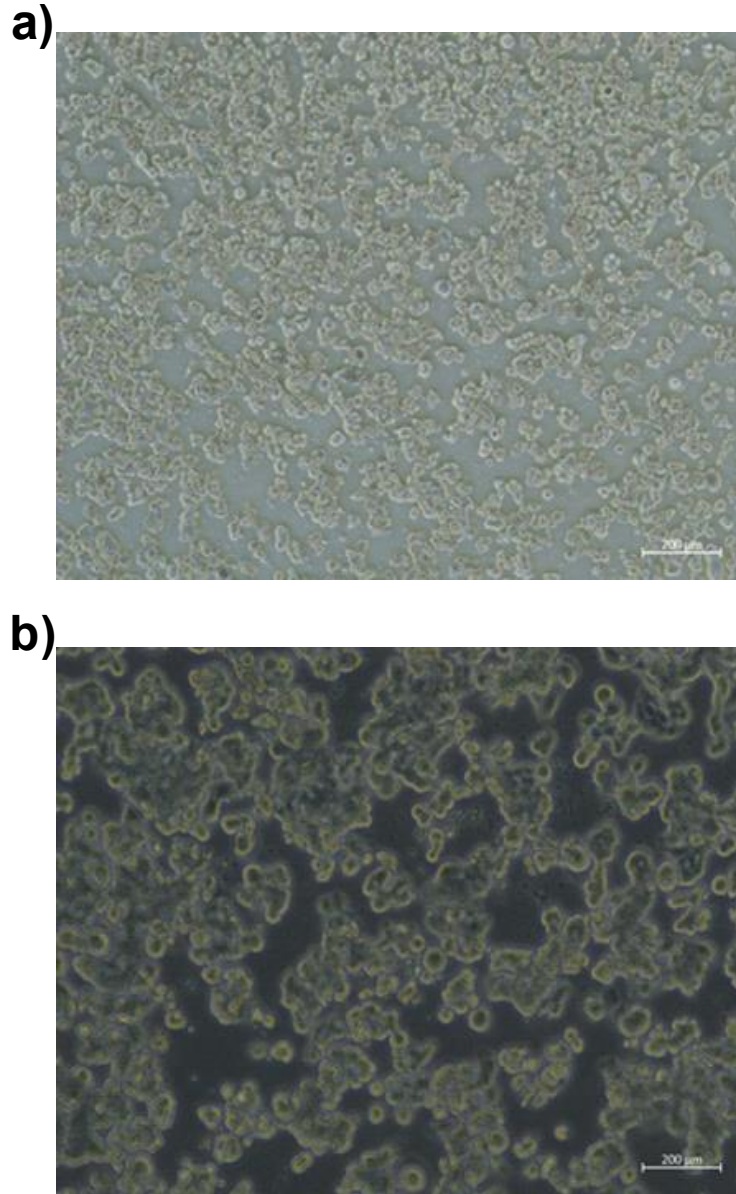
**Şekil 4.18** QC-NP'nin kueretin (a) ve CAPE (b) için salımı

Nanopartikülün salım davranışı, formülasyonun geliştirilmesinin yanı sıra doğrudan ilaç stabilitesi ve terapötik sonuçlarla ilgili olan polimer nanopartiküllerin uygulaması için önemli bir faktördür [145]. *In vitro* salım grafikleri incelendiğinde ortalama ilk 3 saatte salımın büyük çoğunluğunun yapıldığı görülmekte ve bu literatürde "Burst effect" olarak bilinen etki mekanizması ile açıklanmaktadır.

Hızlı başlangıç salımı olarak bilinen bu etki genel olarak polimer nanoparçacıkların içerisine yerleştirilmiş ilaçtan ziyade polimer nanopartiküllerin yüzeyine adsorbe edilen ya da zayıf şekilde bağlanan ilacın fraksiyonuna bağlıdır [146]. Bu etkiden sonra daha yavaş ve kontrollü salım gerçekleştiği görülmektedir. Elde edilen *in vitro* salım grafiklerinin benzerleri literatürde Babos ve arkadaşları tarafından çift ajan yüklü PLGA nanopartiküllerinde de gösterilmiştir [147].

#### **4.6 HT-29 Kolon Kanser Hücre Hattında Q-C ve QC-NP'lerin *In Vitro* Etkinlik Testleri**

Üretilen kueretin-CAPE yüklü nanopartiküllerin *in vitro* etkinlikleri için hücre kültürü çalışmalarında insan kolon adenokarsinom hücre hattı HT-29 kullanılmıştır. HT-29 hücre hattı %10 FBS içeren DMEM besiyerinde 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda büyütülerek Şekil 4.19'daki morfolojik görüntüleri elde edilmiştir.



**Şekil 4.19** HT-29 hücrelerinin 4X (a) ve 10X (b) objektif büyütme altındaki invert mikroskop görüntüleri

#### **4.6.1 Q-C ve QC-NP'lerin HT-29 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Aktivitesi**

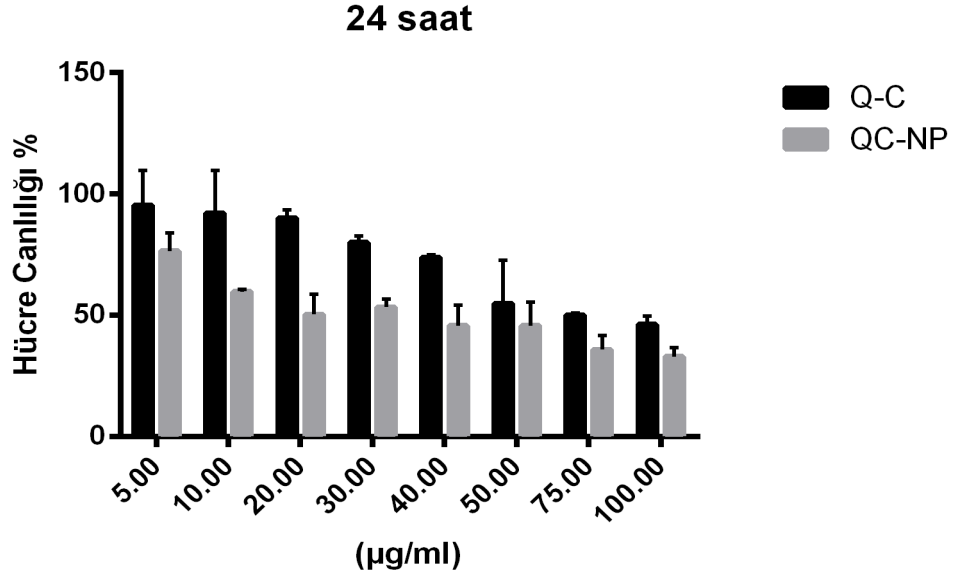
Q-C ve QC-NP'nin HT-29 insan kolon kanser hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi MTT yöntemi ile belirlenmiştir. Bu yöntemde; MTT molekülü canlı hücrelerdeki mitokondriyal süksinat dehidrogenaz enzimine bağlanarak formazan kristalleri oluşturmakta ve bu kristallerin çözdürülmesi ile elde edilen absorbans derecesinden canlı ve ölü hücreler spektrofotometrik olarak belirlenmektedir [128].

Sitotoksosite çalışmasında QC-NP için *in vitro* salım çalışmasından elde edilen veriler doğrultusunda serbest moleküller için kullanılacak konsantrasyonlar belirlendi. 24, 48 ve 72 saat süre ile Q-C ve QC-NP uygulanan hücrelerin IC<sub>50</sub> değerleri hesaplandı. Konsantrasyon ve zamana bağlı olarak hücrelerin % canlılık değişimleri Şekil 4.20, Şekil 4.21 ve Şekil 4.22'de gösterilmiştir.

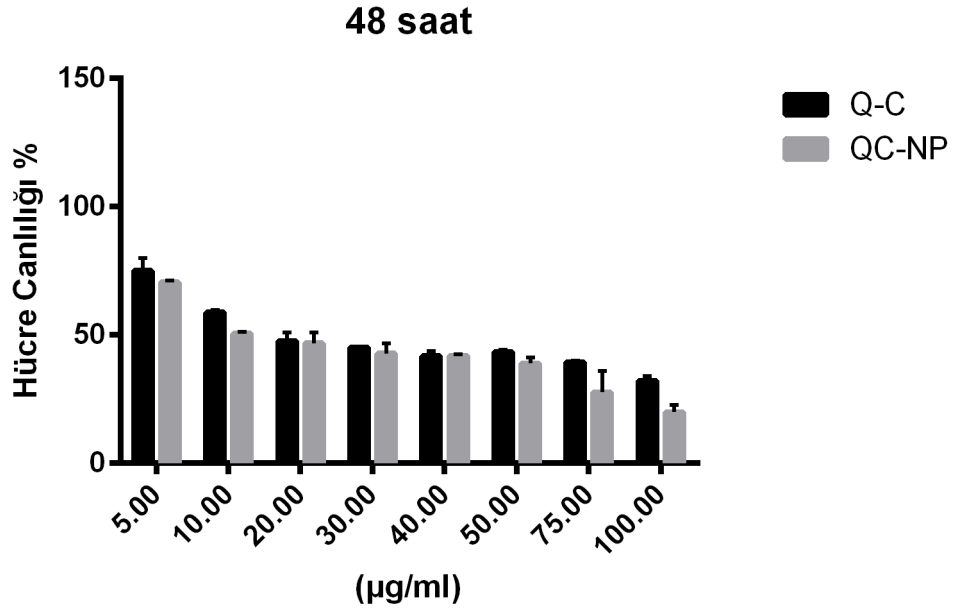
HT-29 hücrelerinin Q-C ve QC-NP ile 24 saat inkübasyonu sonrası IC<sub>50</sub> değerleri 53.42 ve 11.28 µg/ml, 48 saat inkübasyonu sonrası IC<sub>50</sub> değerleri 15.54 ve 8.29 µg/ml, 72 saat inkübasyonu sonrası IC<sub>50</sub> değerleri 47.57 ve 22.96 µg/ml olarak hesaplanmıştır.

Kanser tedavisinde geleneksel olarak kullanılan kemoterapi gibi yöntemlerin yan etkilerini azaltıcı, daha az toksik etkiye sahip yeni tedavi yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Flavonoidlerin sahip oldukları anti-kanser, antioksidan, antianjiyogenik özellikleri sayesinde kanser tedavisinde destekleyici ajan olarak kullanılabilirler düşünülmektedir [42]. Bu çalışmada kullanılan kuersetin ve CAPE moleküllerinin kolon, pankreas, meme, prostat kanser hücre hatları dahil olmak üzere birçok kanser türünde anti-kanser ve anti-proliferatif aktiviteleri gösterilmiştir [69], [90]. Son zamanlarda doğal kaynaklı ajanların sahip olduğu anti-kanser etkinin artırılması amacıyla çeşitli kombinasyon çalışmaları yapılmaktadır. Farklı etken maddeler farklı hücresel yollara etki edebildiğinden kombinasyon çalışmaları daha yüksek anti-tümoral aktivite ile sonuçlanabilmektedir. Ancak, kuersetin ve CAPE gibi doğal kaynaklı birçok molekül suda düşük çözünürlük gibi dezavantajlı özellikler sergilemektedir. Bu moleküllerin sahip olduğu dezavantajlı özelliklerin bertaraf edilmesi amacıyla nanopartiküler sistemler kullanılmaktadır.

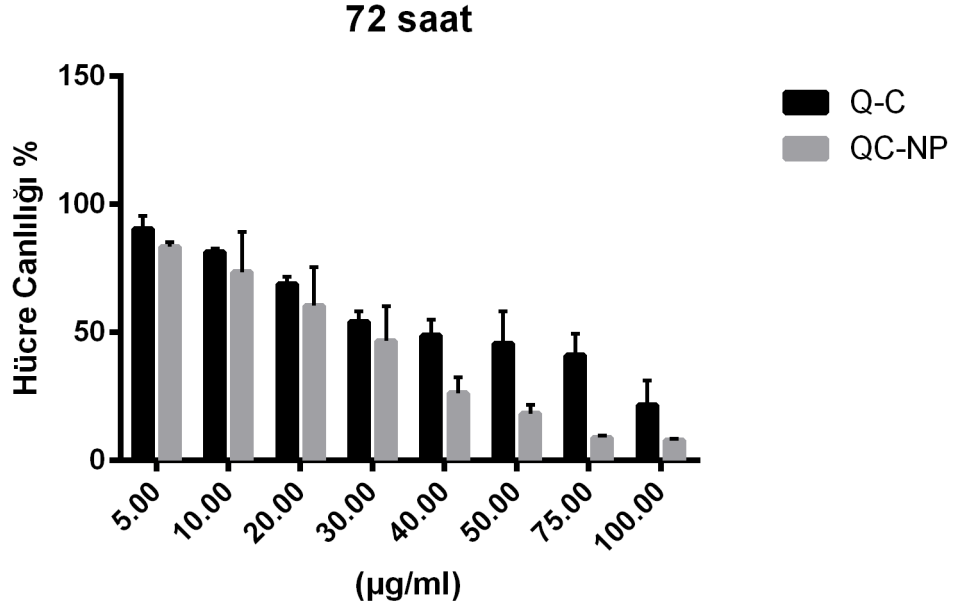




Şekil 4.20 Q-C ve QC-NP'nin HT-29 hücre canlılığına 24 saat süre ile etkisi



Şekil 4.21 Q-C ve QC-NP'nin HT-29 hücre canlılığına 48 saat süre ile etkisi



**Şekil 4.22** Q-C ve QC-NP'nin HT-29 hücre canlılığına 72 saat süre ile etkisi

Yang ve arkadaşlarının kuersetinin kolon kanser hücre hattı HT-29 üzerine inhibisyonunu inceledikleri bir çalışmada, hücrelerin kuersetin ile 48 saat inkübasyonu sonrası  $IC_{50}$  değeri  $81.65 \mu M$  bulunmuştur [8]. Kuersetinin kolon kanseri hücreleri üzerindeki anti-proliferatif etkisinin araştırıldığı başka bir çalışmada ise iki farklı hücre hattı, HT-29 ve HCT15 kullanılmış ve HT-29 hücrelerinin kuersetine daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Aynı çalışmada hücrelerin kuersetin ile 24 saat süre inkübasyonu sonrası  $IC_{50}$  değerleri HT-29 hücreleri için  $42.5 \mu M$ , HCT15 hücreleri için ise  $77.4 \mu M$  olarak bulunmuştur [148]. Bunlara ek olarak, kuersetinin meme kanseri hücresi MCF-7 üzerindeki  $IC_{50}$  değeri  $31.04 \mu g/ml$ , servikal kanser hücresi olan Hela hücreleri üzerindeki  $IC_{50}$  değeri  $5.78 \mu g/ml$  olarak bulunmuştur [149].

CAPE molekülünün çeşitli kolon kanseri hücre hatlarında  $IC_{50}$  değerleri değişiklik göstermekte olup, Wang ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada HCT116 hücre hattı üzerine 24 ve 48 saat uygulanması sonucu  $IC_{50}$  değerleri sırasıyla  $22.45 \mu M$  ve  $12.07 \mu M$  olarak bulunmuştur [89]. Kolon kanser hücre hattı olan CT-26 üzerine farklı dozlarda CAPE uygulanması ile yapılan bir çalışmada ise  $IC_{50}$  değeri  $35 \mu M$  olarak tespit edilmiştir [150].

Biyobozunur polimerik nanopartikül sistemlerinin en önemli özelliklerinden biri kontrollü salım özellikleri sayesinde moleküllerin biyolojik sistemlere uygulanması sonrası hızlı degradasyonunu önlemesidir. Bir diğer önemli özelliği ise biyobozunur yapıları sayesinde suda düşük çözünürlüğe sahip moleküllerin çözünürlüğünü arttırabilmesidir.

Elde edilen sonuçlar incelendiğinde PLGA nanopartiküler sisteme koenkapsüle edilen kuersetin ve CAPE'nin, HT-29 hücrelerini serbest molekül karışımına göre daha düşük dozlarda inhibe ettiği görülmektedir. Nanopartiküler formülasyonun kolon kanseri hücre hattı üzerinde daha düşük konsantrasyonlarda uygulanmasının daha yüksek sitotoksik aktivite gösterdiği ve bu nedenle serbest moleküllere kıyasla daha gelişmiş biyoyumluluk özelliğine sahip olduğu söylenebilir. Üretilen polimerik nanopartiküller ile kolon kanser hücreleri üzerinde sağlanan sitotoksik etki, benzer şekilde Pimple ve arkadaşlarının kuersetin dihidrat ve etoposid moleküllerinin sinerjistik olarak PLGA içerisine enkapsülasyonu sonucu elde edilen nanopartiküller ile akciğer kanseri hücre hattı A-549 üzerinde yapmış olduğu çalışmada da gösterilmiştir [5].

Q-C ve QC-NP'nin 48 saat için IC<sub>50</sub> değerleri ve nanopartiküler sistemlerin kontrollü salım yaparak hücreler üzerine daha uzun süreyle etki etme özellikleri göz önüne bulundurulduğunda bu aşamadan sonraki hücre çalışmalarında 48 saat inkübasyon süresi uygulanmıştır.

#### **4.6.2 Q-C ve QC-NP'lerin Hücre Göçü Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi**

Kuersetin-CAPE ve kuersetin-CAPE nanopartiküllerinin HT-29 hücre hattı üzerinde hücre göçüne etkisi yara iyileşmesi testi ile analiz edildi. Q-C ve QC-NP HT-29 hücre hattına üzerine uygulandıktan sonra hücreler 0, 16, 24, 48 ve 72. saatlerde mikroskopik olarak incelendi. Belirlenen saatlerde görüntülenen hücrelerdeki yarıklar arasındaki mesafe Image-J programı ile analiz edildi. Şekil 4.23'te Q-C ve QC-NP uygulanan HT-29 hücrelerine ait yara iyileşmesi testi görüntüleri, Tablo 4.3 'te ise analiz sonuçları verilmiştir.

Tablo 4.3 incelendiğinde, kontrol hücreleri arasındaki yarıkların zamanla arttıkça azaldığı gözlemlenmektedir. Q-C uygulanan hücrelerde ise zamanla

mesafenin yine daraldığı gözlemlenmekte fakat kontrole kıyasla daha az daralma olduğu gözlemlenmektedir. Kontrol hücrelerinde 72. saat sonunda yarıklar arasındaki mesafe %59 kapanırken, Q-C uygulanan hücrelerde ise yarıklar arasındaki mesafenin %27'si kapanmıştır. QC-NP uygulanan hücrelerde yarıklar arasındaki mesafenin ise 72. saat sonunda %4'ünün kapandığı tespit edilmiştir.

**Tablo 4.3** Q-C ve QC-NP uygulanan hücrelerde zamana bağlı olarak yarıklar arasındaki mesafe değerleri

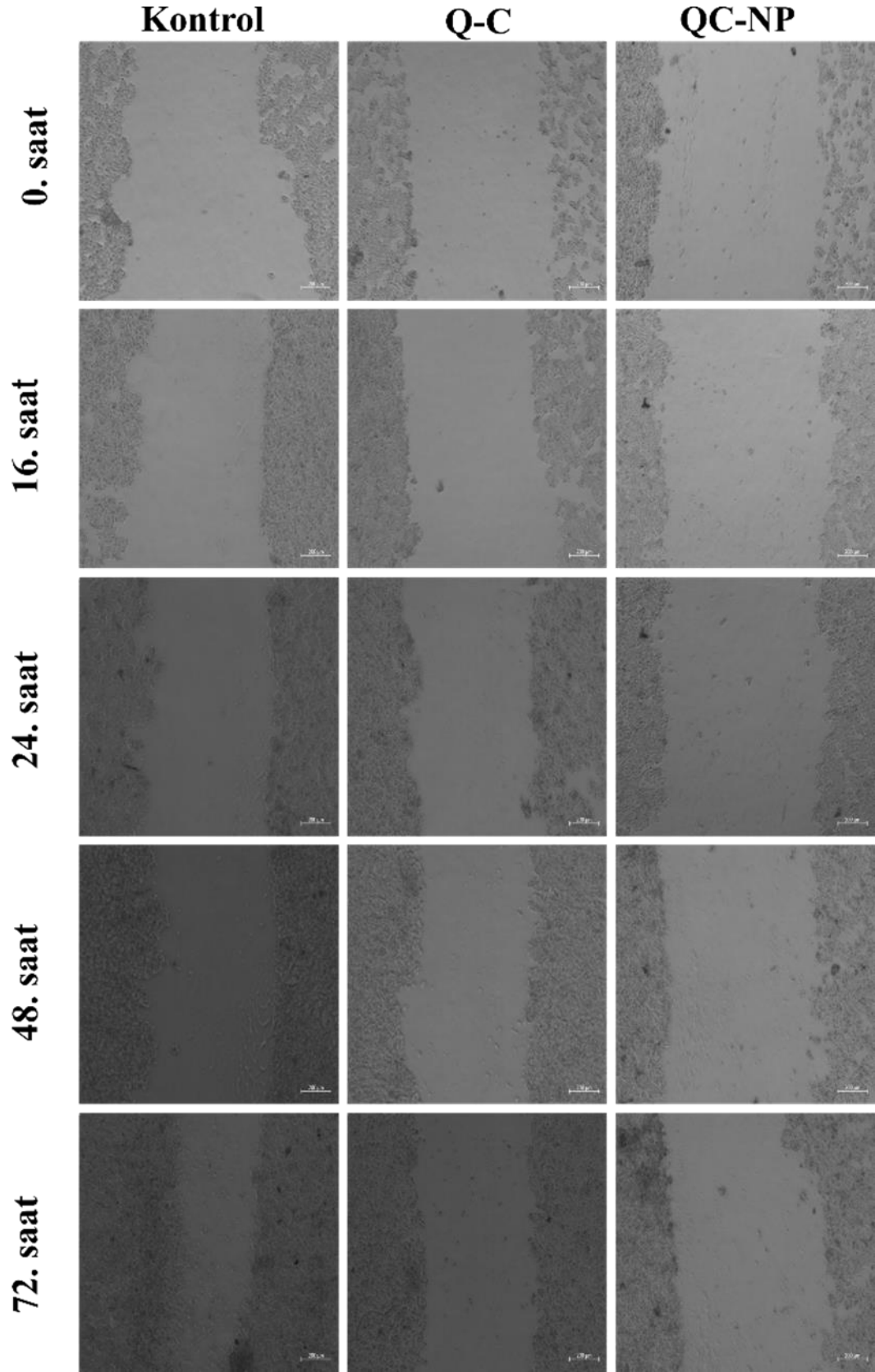
Zaman	Kontrol ( $\mu\text{m}$ )	Q-C ( $\mu\text{m}$ )	QC-NP ( $\mu\text{m}$ )
0.saat	1095,865	954,168	1081,262
16.saat	823,816	890,307	1082,666
24.saat	806,306	732,856	1056,996
48.saat	708,338	704,174	1037,502
72.saat	440,974	693,058	1034,734

Hücre göçü, kimyasal ve mekanik sinyallere yanıt olarak tek bir hücrenin veya bir hücre grubunun yönlendirilmiş hareketidir. Bu, embriyonik gelişim sırasında başlayan ve ölüme kadar devam eden ve zaman zaman hastalıkta patojenik durumlara katkıda bulunabilen, yaşam boyunca meydana gelen temel hücresel bir süreçtir [151]. Hücre göçünün patolojik durumlara katkı sağladığına örnek olarak, hücre göçü ve kanser hücrelerinin istilasını içeren çok aşamalı bir süreç olan metastaz süreci verilebilir. Normal hücrelerin hücre göçü sıkı bir şekilde düzenlenirken, tümör hücreleri hücre göçünü teşvik eden değiştirilmiş bir mikroçevreye maruz kalmakta ve invaziv hücre göçü reseptör tirozin kinazlar tarafından uyarılmaktadır. Buna bağlı olarak, tümör hücreleri çevre ve uzak dokulara hızlıca göç edebilmektedir. Literatürde kuersetin ve CAPE moleküllerinin de dahil olduğu birçok flavonoid molekülün kanser hücrelerinin göçünü engelleyici özellikleri gösterilmiştir. Örneğin, kuersetinin osteosarkom hücre hatları üzerindeki etkisini inceleyen Lan ve arkadaşları hücre göçünü doza ve zamana bağlı olarak inhibe ettiğini bildirmişlerdir [152]. CAPE molekülü uygulanan kolon

kanser hücre hattı HCT116 üzerinde yapılan yara iyileşmesi testinde, CAPE'nin hücreler arasındaki mesafeyi zamana bağlı olarak azaltmadığı, dolayısıyla yarıklar arasındaki mesafenin kapanmadığı gözlemlenmiştir. Böylece, CAPE molekülünün kanser hücreleri üzerinde hücre göçünü engellediği gösterilmiştir [153]. Bonuccelli ve arkadaşları MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerine CAPE uygulanmasının yara kapanmasını kontrole göre %70 oranında azalttığını göstermiştir [154].

İlaç potansiyeli bulunan bileşenlerin kanser hücrelerinde hücre göçünü engelleyici etkisinin artırılması amacıyla yeni sistemlerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Bu ihtiyaç; nanoteknoloji temelli tedavilerin gelişmesine olanak sağlamıştır. Özellikle polimerik nanopartiküllerin bu konuda avantaj sağlayacağına yönelik birçok çalışma bulunmaktadır [155].

Bu çalışmada kuersetin-CAPE nanopartiküllerinin, serbest kuersetin-CAPE kombinasyonuna kıyasla HT-29 insan kolon kanser hücre hattında hücre göçünün engellenmesinde daha etkili olduğu bulunmuştur. Kuersetin yüklü nanopartiküller kullanılarak yapılan bir çalışmada, üretilen nanopartiküller MDA-MB-231 hücreleri üzerine uygulanmış ve 2.5 µg/ml konsanstrasyonda hücre göçünü inhibe ettiği gösterilmiştir [156]. Benzer şekilde, meme kanser hücreleri MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri üzerinde CAPE-γCD kompleksi ve CAPE'nin hücre göçüne etkisi araştırılmış ve elde edilen bulgular her iki molekülün de iki hücre hattında hücre göçünü önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir [15]. CT-29 fare kolon adenokarsinomu hücreleri kullanılarak Lee ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, CAPE yüklü nanopartiküllerin anti-invazif ve anti-migratif özellik gösterdiği bildirmiştir [10]. Elde edilen bulgular literatür ile uyum göstermekte olup, nanopartiküler sisteme enkapsülasyon ile kuersetin ve CAPE moleküllerinin HT-29 kolon kanserinde hücre göçü inhibisyon özellikleri arttırılmıştır.



Şekil 4.23 Q-C ve QC-NP'nin HT-29 hücre göçü üzerine etkisi

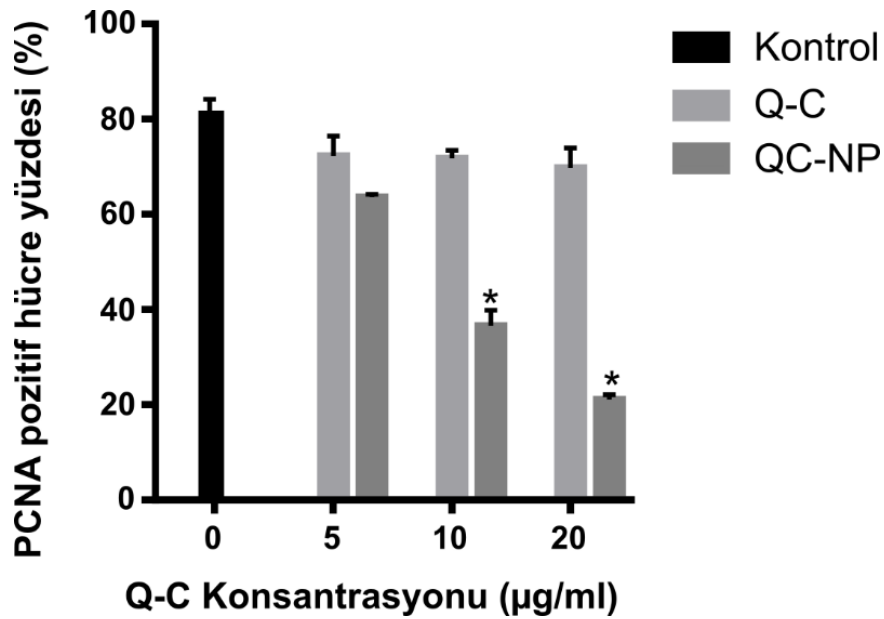
#### 4.6.3 Q-C ve QC-NP'lerin HT-29 Hücreleri Üzerindeki Anti-Proliferatif Etkisi

Q-C ve QC-NP'lerin HT-29 kolon kanseri hücrelerinin proliferasyonuna etkisi immunositokimyasal PCNA işaretleme yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. 48 saat için belirlenen IC<sub>50</sub> dozlarında Q-C ve QC-NP uygulanan HT-29 hücrelerinde PCNA ile işaretlenen ve işaretlenmeyen hücreler sayılarak proliferasyon yüzdesi belirlenmiştir. Kontrol grubu hücreleri için proliferasyon yüzdesi %80.76 olarak tespit edilmiştir. Q-C uygulanan HT-29 hücreleri için hücre proliferasyon yüzdeleri 5 µg/ml için %70.47, 10 µg/ml için %72.57 ve 20 µg/ml için ise %72.11 olarak belirlenmiştir. QC-NP uygulanan HT-29 hücreleri için hücre proliferasyon yüzdeleri ise 5 µg/ml için %63.98, 10 µg/ml için %39.39 ve 20 µg/ml için ise %21.27 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.24).

Proliferasyon artışı, erken evre adenomların oluşmasına öncülük ederek kolon kanseri oluşum sürecinde önemli bir yere sahiptir [21]. Çeşitli çalışmalarda polifenolik bileşiklerin kanser hücreleri üzerinde anti-proliferatif etki gösterdiği bulunmuştur [9]. Delgado ve arkadaşları kuersetin molekülünün anti-proliferatif etkilerini meme kanseri (MCF-7), kolon kanseri (Caco-2), pankreas kanseri (BxPC-3) hücre hatlarında göstermiştir [157]. Bunlara ek olarak, kuersetinin insan glioma hücre hattı U138MG hücre hattı üzerindeki [158], insan hepatom kanser hücreleri (HepG2 ve Huh-7) üzerindeki anti-proliferatif etkisi [159] çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. CAPE molekülünün sahip olduğu anti-proliferatif etki kolon, servikal kanser dahil olmak üzere birçok hücre hattında gösterilmiştir [89].

Proliferasyon, kanser gelişimi ve ilerlemesinin önemli bir parçasıdır. Prolifere hücre çekirdek antijeni (PCNA), tüm ökaryotik türlerde bulunan evrimsel olarak iyi korunmuş bir protein olup DNA replikasyonu ve hücre döngüsü düzenlenmesinde görev yapmaktadır. Bu nedenle, hücre proliferasyonunun tespiti için kullanılan bir belirteç olup, PCNA'nın aşırı ekspresyonu tümör proliferasyonu hakkında bilgi vermektedir [160]. Bu çalışmada, moleküllerin sahip olduğu anti-proliferatif etkinin artırılması amacıyla polimerik nanopartiküler sistemler kullanılmıştır. PCNA immüno-sitokimyasal analizleri incelendiğinde; HT-29 kolon kanser hücre hattı üzerine 48 saat süre ile uygulanan Q-C ve QC-NP formülasyonları karşılaştırıldığında nanopartiküler formülasyonun serbest moleküle kıyasla tüm

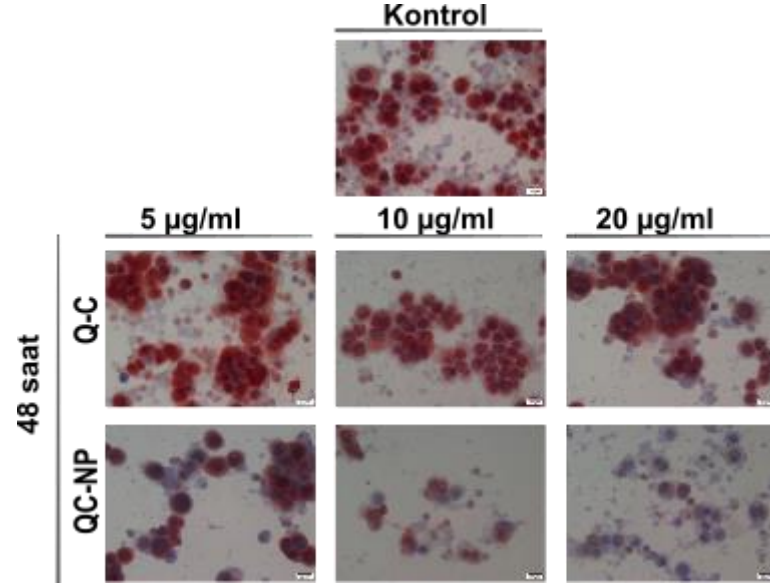
konsantrasyonlarda proliferasyonu azalttığı görülmektedir (Şekil 4.24, Şekil 4.25). PCNA pozitif hücre sayısı hem QC-NP (10 µg/ml) hem de QC-NP (20 µg/ml) formülasyonlarında yaklaşık %40 ve %50 azalmaktadır. HT-29 hücrelerine 48 saat süre ile 10 ve 20 µg/ml QC-NP uygulaması PCNA pozitif hücrelerde anlamlı bir azalmaya yol açmıştır ( $p<0.05$ ) (Şekil 4.24). Sonuçlar incelendiğinde, QC-NP'lerin sahip oldukları düşük boyut özelliği sayesinde kolayca hücre zarından geçerek kanser hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği ve Q-C'lere kıyasla daha yüksek anti-proliferatif etki gösterdiği görülmektedir. Benzer şekilde Ersoz ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada hesperetin flavonu, PLGA nanopartiküler sisteme yüklendiğinde C6 glioma kanser hücrelerinde anti-proliferatif aktivitenin arttığı gösterilmiştir [160].



**Şekil 4.24** Farklı dozlarda Q-C ve QC-NP uygulanmış HT-29 hücrelerine ait proliferasyon grafiği

\* kontrole göre istatistiksel olarak anlamlılığı temsil etmektedir. ( $p<0.05$ )





**Şekil 4.25** Q-C ve QC-NP uygulanan HT-29 hücrelerine ait anti-proliferatif etkinin gösterimi

#### 4.6.4 Q-C ve QC-NP ile Apoptoz İndüksiyonun Gen Düzeyinde Gösterimi

HT-29 hücrelerine Q-C ve QC-NP uygulaması sonrası; apoptozun içsel yolağında yer alan sitokrom-c, Apaf-1, kaspaz-3, kaspaz-9 ve dışsal yolaktaki kaspaz-8 genlerinin, pro-apoptotik Bax ve anti-apoptotik Bcl-2 ekspresyon seviyeleri, kontrol grubu ve B-actin gen ekspresyonuyla karşılaştırılarak tespit edilmiştir. Real-Time PCR yöntemi; geniş dinamik aralığına sahip, hassas, amplifikasyondan sonra işlem gerektirmemesi gibi sahip olduğu avantajlı özellikleri ile gen ekspresyonunun belirlenmesinde en yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biridir [161]. 48 saat için belirlenen IC<sub>50</sub> dozlarında Q-C ve QC-NP uygulanan HT-29 hücrelerinden ticari kit kullanılarak total RNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen RNA miktarları Nanodrop cihazı ile ölçülerek Tablo 4.4'teki sonuçlar elde edilmiştir.

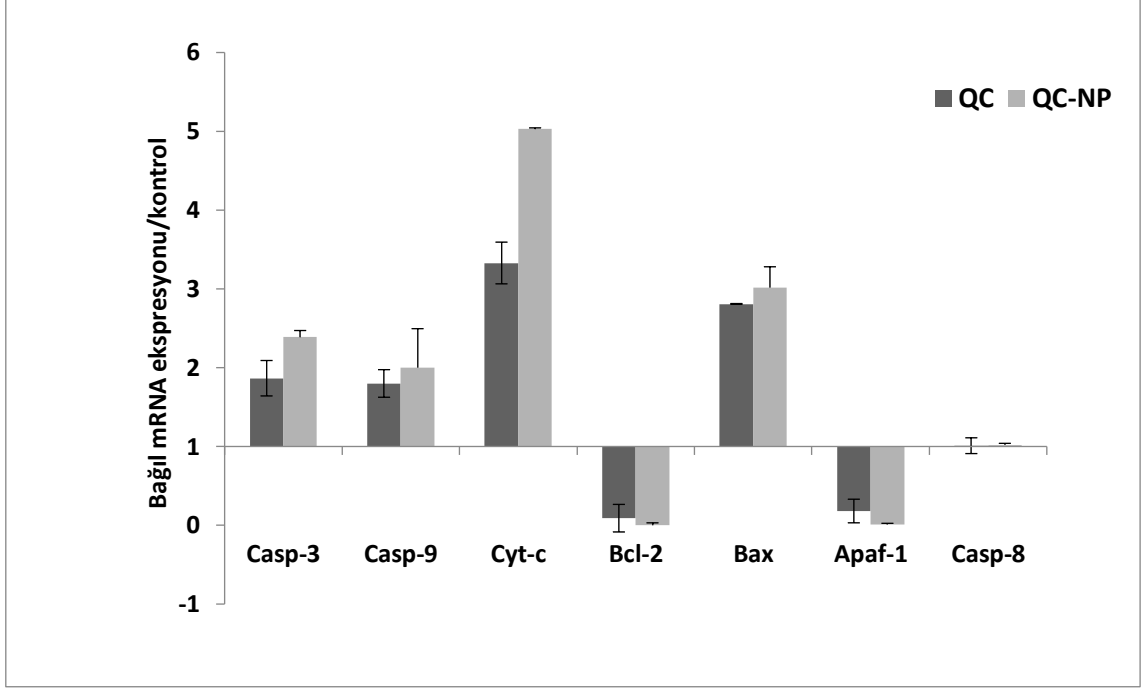
Spektrofotometrik olarak ölçülen RNA'ların maksimum emilimi 260 nm'de proteinlerin ise 280 nm dalga boyunda olmaktadır. A<sub>260</sub>/ A<sub>280</sub> oranı nükleik asitlerin saflığı hakkında bilgi vermektedir. Tablo 4.4'te gösterilen Nanodrop cihazından alınan sonuçlara göre; uygulama yapılan hücrelerden elde edilen RNA'ların saflığı 2.04 ile 2.07 arasında değişmektedir.

**Tablo 4.5** Örneklerden izole edilen RNA miktarları

Örnek Adı	A <sub>260</sub> / A <sub>230</sub>	A <sub>260</sub> / A <sub>280</sub>	ng/ $\mu$ l
Kontrol	2.22	2.07	1631.3
Q-C	2.16	2.03	1328.1
QC-NP	2.15	2.04	1598.4

İzole edilen RNA'lar, reverse transkriptaz enzimi kullanılarak cDNA'ya çevrilmiştir. 1:4 oranında seyreltilen cDNA'lar, her bir gen için ayrı olan forward ve reverse primerler ve SYBR green boyası kullanılarak Real-Time PCR yapılmıştır. Hedef gen ekspresyonları anlatımı şartlara göre değişmeyen gen grubunda yer alan B-actin gen ekspresyonu ile karşılaştırılmalı olarak  $2^{-\Delta\Delta t}$  metoduna göre analiz edilmiştir [130]. Kaspaz-3, kaspaz-9, sitokrom-c, Bcl-2, Bax, Apaf-1 ve kaspaz-8 genlerinin kontrole göre bağıl mRNA ekspresyonları Şekil 4.26'da verilmiştir.

Hücre içi sinyallerle apoptotik uyarı alınmasından sonra pro-apoptotik üyelerden Bid, anti-apoptotik protein olan Bcl-2'yi inaktifleştirerek, Bax ve Bak proteinlerini aktifleştirir [162]. HT-29 hücreleri üzerine Q-C ve QC-NP uygulanması sonucunda Bcl-2 ekspresyonunun Q-C ve QC-NP için sırasıyla 0.0899 ve 0.0005 kat azaldığı tespit edilmiştir. Bax ekspresyonunun ise Q-C ve QC-NP için sırasıyla 2.8 ve 3 kat arttığı gözlemlenerek Bcl-2 ve Bax arasındaki ters ilişki gösterilmiştir. Q-C ve QC-NP uygulamasının pro-apoptotik ve anti-apoptotik genler üzerindeki etkisi karşılaştırılmalı olarak incelendiğinde QC-NP'nin apoptozun içsel yolağındaki genlerin mRNA seviyesini arttırdığı gözlemlenmektedir.



**Şekil 4. 26** Kaspaz-3 (Casp-3), kaspaz-9 (Casp-9), sitokrom-c (Cyt-c), Bcl-2, Bax, Apaf-1 ve kaspaz-8 (Casp-8) genlerinin kontrole göre relatif ekspresyonları

Aktifleşen Bax ve Bak proteinleri mitokondriyal membranda por oluşumunu indükleyerek sitokrom-c salınımını uyarır. Sitokrom-c, Apaf-1 ile kompleks halinde apoptozomu oluşturur ve kaspaz kaskadının uyarılmasını sağlar [162]. HT-29 hücreleri üzerine Q-C ve QC-NP uygulanması sonucunda sitokrom-c ekspresyonunun sırasıyla 3 ve 5 kat arttığı gözlemlenirken, Apaf-1 ekspresyonunu Q-C'de 0.1808 kat QC-NP'de ise 0.009 kat azaldığı gözlemlenmektedir. QC-NP uygulaması sonrası sitokrom-c mRNA düzeyindeki artış apoptozun içsel yolağının aktivasyonunu göstermektedir. Apaf-1 ekspresyonundaki azalmanın ise proteinin sitokrom-c ile kompleks halinde iken hızlıca degrade olmasından dolayı sitoplazmadaki miktarının azalmasından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.

Kaspaz kaskadındaki uyarı içsel yolakta kaspaz-9, dışsal yolakta ise kaspaz-8 uyarılması ile başlar. Hücreler üzerine Q-C ve QC-NP uygulaması ile kaspaz-9 ekspresyonunun Q-C ve QC-NP için sırasıyla 1.8 ve 2 kat arttığı, dışsal yolakta yer alan kaspaz-8 ekspresyonunun ise değişmediği bulunmuştur. Bu sonuç, Q-C ve QC-NP uygulaması sonucunda HT-29 hücrelerinde apoptozun içsel yolağının aktive olurken dışsal yolağının aktive olmadığını göstermektedir. Kaspaz kaskadındaki kaspaz-9'un uyarılması sonucunda ise içsel ve dışsal yolakta ortak olarak bulunan

kaspaz-3 aktifleşir. HT-29 hücrelerine Q-C ve QC-NP uygulanması sonrası, kaspaz-3 ekspresyonunda Q-C için 1.8 kat, QC-NP için 2.3 kat artış gözlemlenmiştir.

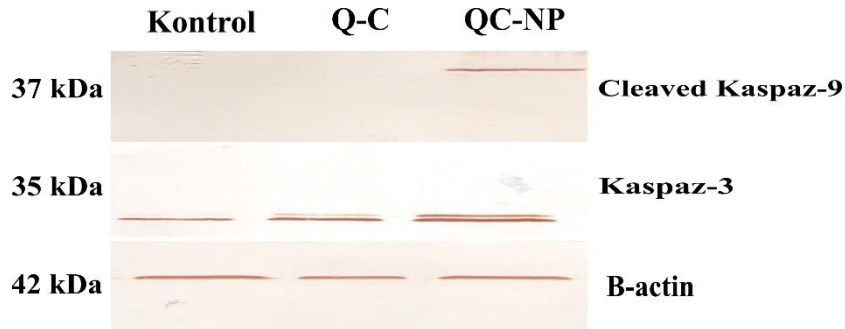
Q-C ve QC-NP'nin HT-29 hücrelerinde apoptozu indüksiyonunun mRNA seviyesinde incelenmesi sonucu, QC-NP'nin kaspaz-9 ve kaspaz-3 ekspresyonunu serbest moleküle göre daha fazla arttırarak apoptozun içsel yolağının indüklenmesinde daha etkili olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Elde edilen sonuçlara benzer şekilde Das ve arkadaşları apigenin yüklü PLGA nanopartiküllerin apoptoz üzerindeki etkisini *in vitro* olarak araştırması sonucunda sitokrom-c, kaspaz-3, cleaved kaspaz-9, Bax ekspresyonlarının artarken Bcl-2 ekspresyonunun azaldığını Real-Time PCR ile göstermişlerdir [163]. Baharara ve arkadaşları ise gümüş nanopartiküllerin MCF-7 hücreleri üzerindeki apoptoz indüksiyonunun gen düzeyindeki değişikliklerinin gösterimini Real-Time PCR ile yaparak kaspaz-3, kaspaz-9, Bax, Bcl-2 ve kaspaz-8 ekspresyonlarını benzer şekilde tespit etmişlerdir [164].

#### **4.6.5 Q-C ve QC-NP ile Apoptoz İndüksiyonunun Protein Düzeyinde Gösterimi**

Q-C ve QC-NP uygulamasının HT-29 hücrelerindeki apoptotik etkisinin protein düzeyinde gösterimi Western Blot yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. QC-NP uygulaması sonrası, HT-29 hücrelerinde apoptozun içsel yolağında yer alan kaspaz-3 (35 kDa) ve cleaved-kaspaz-9 (37 kDa) ekspresyonunun protein düzeyinde gösterimi Western Blot analizi ile doğrulanmıştır. Anlatımı şartlara göre değişmeyen referans gen grubunda olan B-actin geni ise yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır (Şekil 4.27).

Apoptoz, kaspazların aktivasyonu dahil birçok biyokimyasal süreci içeren morfolojik değişiklikler ile karakterizedir. Bu süreç; iki farklı yolla içsel ya da dışsal yol ile kontrol edilir. Sitokrom-c ve kaspaz-9 mitokondriyal yolakta yer alırken, kaspaz-3 iki yolakta da yer aldığından apoptozun kilit bir aracısı olarak bilinmektedir [165]. Bu tez çalışmasında Q-C ve QC-NP uygulamasının HT-29 hücrelerinin apoptozuna olan etkisi; sitokrom-c, kaspaz-3 ve cleaved kaspaz-9 proteinlerinin ekspresyonlarının incelenmesiyle gerçekleştirilmiştir.

Sitokrom-c, 12.3 kDa'luk nükleer DNA kodlu bir protein olup mitokondriden sitoplazmaya salınımı, apoptozun içsel yolağının başlangıcı olarak düşünülmektedir [166]. Yapılan çalışmada HT-29 hücreleri üzerine Q-C ve QC-NP 48 saat süre ile uygulanmış ve apoptozun içsel yolağında yer alan sitokrom-c, kaspaz-3 ve cleaved kaspaz-9 proteinlerinin ekspresyonları incelenmiştir. QC-NP uygulaması sonrası HT-29 hücrelerinde sitokrom-c'nin mRNA düzeyinde kontrole kıyasla 5 kat arttığı tespit edildiğinden Western Blot analizi sonucunda sitokrom-c proteininin yüksek düzeyde ekspresyon göstermesi beklenmekteydi. Ancak elde edilen sonuçlara göre hem Q-C uygulaması hem de QC-NP uygulaması sonrası hücrelerde sitokrom-c proteininin ekspresyonu tespit edilememiştir. Bu durumun sitokrom-c'nin mitokondriyal dış membranını geçirgenleştirilmesinden hemen sonra sitozolde hızlıca azalmasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Ripple ve arkadaşları yapmış olduğu çalışmada sitozoldeki sitokrom-c'nin miktarının azaldığı durumlarda bile kaspaz-9 ve kaspaz-3'ü aktive edebileceğini göstermişlerdir [167].



**Şekil 4.27** Q-C ve QC-NP uygulanmış örneklere ait kaspaz-9, kaspaz-3 ve  $\beta$ -actin'in Western Blot ile analizi

Sıklıkla çalışılan başlatıcı kaspazlar arasında yer alan kaspaz-9, kemoterapi, stress ajanları ve radyasyon gibi çeşitli uyaranlara karşı apoptozun içsel yolağında yer alan önemli bir proteindir [168]. Kaspaz-9 aktivitesi için ayrılma gerekmemekle birlikte, yapılan çalışmalar apoptoz sırasında kaspaz-9'da ayrılma olduğunu göstermiştir. Kaspaz-9 ayrılmasının, proteinin enzimatik aktivitesini düzenlemenin yanı sıra apoptoz sırasında diğer olaylar için önemli olabileceği düşünülmektedir. Çeşitli teoriler mevcut olmakla birlikte, bazı araştırmalar cleaved kaspaz-9'un XIAP gibi diğer apoptoz araçları ile etkileşime girebileceğini öne sürmektedir [169].

Apoptoz sürecinde önemli bir yere sahip olmasından dolayı bu tez çalışmasında cleaved kaspaz-9 ekspresyonu araştırılmıştır. Q-C ve QC-NP uygulanan örneklerin kaspaz-9 ekspresyonu incelendiğinde; QC-NP uygulanan örneklerde ekspresyon gözlemlenirken, kontrol ve Q-C örneklerinde ekspresyon gözlemlenmemiştir. Bu durum; üretilen nanopartiküler formülasyonun serbest moleküle kıyasla hücreleri apoptoza yönlendirmede daha etkin olduğunu ve apoptozun içsel yolağını aktive ettiğini düşündürmektedir.

HT-29 hücreleri Q-C ve QC-NP formülasyonları ile muamele edildiğinde 48 saat sonucunda tüm örneklerde kaspaz-3 aktivasyonu gözlemlenmektedir (Şekil 4.28). Kaspaz-3 ekspresyonunun Western Blot analizi sonucunda, kontrolde daha az yoğunlukta, Q-C'de yoğun ve QC-NP'de ise daha yoğun ekspresyon gösterdiği tespit edilmiştir. Tüm örnekler Q-C ve QC-NP ile 48 saat süre ile inkübe edildiğinden, kontrol grubundaki bazı hücrelerin bu uzun inkübasyon süresinde apoptoza yönelmesinden kaynaklı olarak düşük düzeyde kaspaz-3 ekspresyonu gösterdiği düşünülmektedir. QC-NP ile Q-C kıyaslandığında ise QC-NP'de kaspaz-3'ün daha yüksek düzeyde ekspresyon gösterdiği görülmektedir. Bu sonuçlar; üretilen nanopartiküler formülasyonun serbest moleküle kıyasla daha etkili olduğu ve hücreleri apoptoza yönlendirerek kaspaz-3 aktivasyonunu sağladığını göstermektedir. Priyadarsini ve arkadaşları [76] kuersetinin servikal kanser hücrelerinde benzer şekilde kaspaz-3 aktivasyonunu sağladığını, Ren ve arkadaşları [170] kuersetin yüklü nanopartiküller ile karaciğer kanser hücrelerinde kaspaz-3, kaspaz-9 ve sitokrom-c aktivasyonu sağlanarak apoptozu içsel yoldan uyandırdığını Western Blot analizi ile göstermişlerdir. CAPE'nin apoptotik etkisi *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla gösterilmiş olup, Tang ve arkadaşları kolon kanser hücre hattında CAPE'nin doza bağlı olarak kaspaz-3, sitokrom-c, Bax genlerinin ekspresyonlarında artışa sebep olduğunu protein düzeyinde göstermişlerdir [171]. Çalışmamızda QC-NP formülasyonunun göstermiş olduğu apoptotik etki, Paul ve arkadaşlarının chelidonine yüklü PLGA nanopartiküllerinin HepG2 hücreleri üzerindeki apoptotik etki p53, Bax, Apaf-1, kaspaz-3 ve kaspaz-9 genlerinin Western Blot ile analizi yapılmış olup benzer şekilde kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktivasyonunun olduğu bulunmuştur [172]. Sonuç

olarak, üretilen nanopartiküllerin HT-29 hücre hattında apoptozun indüklenmesini içsel yolağı uyararak gerçekleştirdiğı düşünölmektedir.

Bu tez çalışmasında anti-kanser özelliği bilinen kuersetin ve CAPE moleküllerinin sahip olduğu dezavantajlı özelliklerin nanopartiküler sistemlere yüklenmesi ile bertaraf edilerek suda çözünürlüğünün, biyouyumluluğunun artırılması ve elde edilen kuersetin-CAPE PLGA nanopartiküllerinin insan kolon kanser hücre hattında anti-kanser aktivitesinin hücresel ve moleküler düzeyde belirlenmesi amaçlanmıştır.

Tez kapsamında; kuersetin ve CAPE moleküllerinin nanopartiküler formülasyonu ile serbest kuersetin-CAPE kombinasyonunun insan kolon kanser hücre hattı üzerindeki sitotoksik, anti-proliferatif ve apoptotik etkisi literatürde ilk defa karşılaştırılmalı olarak araştırılmıştır. Bu nedenle çalışma özgün bir değer taşımaktadır.

Tekli emülsiyon çözücü uçurma yöntemi kullanılarak kuersetin, CAPE ve kuersetin-CAPE yüklü nanopartiküler sistemler hazırlanmıştır. Hazırlanan nanopartiküler sistemlerin enkapsülasyon etkinliği (EE), etken madde yüklenme verimi (DL), reaksiyon verimi (RV) hesaplanarak karakterizasyonu kapsamında boyut (Z-Ave), çoklu dağılım indeksi (PDI) ve zeta potansiyel (mV) ölçümleri yapılarak SEM ve FT-IR analizleri yapılmıştır.

Kullanılan etken madde, PVA ve organik solvent miktarları değiştirilerek farklı nanopartiküller sentezlenmiş olup, sentezlenen nanopartiküllerin minimum boyut, maksimum enkapsülasyon etkinliği ve ilaç yükleme kapasitesine sahip formülasyon hücre kültürü çalışmalarında kullanılmak üzere optimize olarak seçilmiştir. Kuersetin-CAPE yüklü optimize nanopartikül formülasyonunun (NP-12) enkapsülasyon etkinliği (EE) kuersetin için %74.28, CAPE için %65.24, etken madde yüklenme verimi (DL) kuersetin için %5.04, CAPE için %13.28, reaksiyon verimi (RV) kuersetin için %70.09, CAPE için %64 olarak hesaplanmıştır. Boyutu 384.6 nm, zeta potansiyeli -6.87 mV, çoklu dağılım indeksi 0.340 olarak ölçülmüştür. İn vitro salım analizleri yapıldığında 30 günlük süre sonunda



kuersetinin %21.46'sını, CAPE'nin ise %21.7'sini saldığı bulunarak *in vitro* hücre kültürü çalışmalarına başlanmıştır.

Üretilen kuersetin-CAPE yüklü PLGA nanopartiküllerin serbest kuersetin-CAPE ile karşılaştırmalı olarak insan kolon kanseri hücre hattı HT-29 üzerindeki sitotoksik etkisi MTT yöntemi ile araştırılmıştır. *In vitro* salım değerleri göz önüne alınarak serbest moleküle denk gelen nanopartiküler formülasyon miktarı hesaplanarak belirlenen konsantrasyon aralığında HT-29 hücreleri üzerine uygulama yapıldı. Serbest kuersetin-CAPE için konsantrasyon aralığı 10-2000 µg/ml seçilirken, nanopartiküler formülasyon için konsantrasyon aralığı 0.5-100 µg/ml seçilmiştir. MTT sonucunda; HT-29 hücrelerinin serbest ve nanopartiküler formülasyon ile 24 saat inkübasyonu sonrası IC<sub>50</sub> değerleri 53.42 ve 11.28 µg/ml olarak, 48 saat inkübasyonu sonrası IC<sub>50</sub> değerleri 15.54 ve 8.295 µg/ml olarak, 72 saat inkübasyonu sonrası IC<sub>50</sub> değerleri 47.57 ve 22.96 µg/ml olarak bulunmuştur. Sonuçlar analiz edildiğinde, 48 saat inkübasyon ile serbest ve nanopartiküler formülasyonun hücreler üzerinde daha etkili olduğu sonucuna varılarak ileriki çalışmalarda 48 saat inkübasyon tercih edilmiştir.

Elde edilen IC<sub>50</sub> değerleri göz önüne alınarak etkin dozu kapsayacak şekilde belirlenen dozlarda (5,10 ve 20 µg/ml) HT-29 hücreleri üzerine serbest ve nanopartiküler formülasyon uygulanarak 0, 16, 24, 48 ve 72. saatlerdeki yara iyileşmesi analizi yapıldı. Analiz sonuçlarına göre; kontrol hücrelerinde 0. saatte 1095.865 µm olan ortalama mesafe 72. saat sonunda 440.974 µm'ye düşerken, Q-C uygulanan hücrelerde 0. saatte 954.168 µm iken 72. saat sonunda 693.058 µm'ye düştüğü gözlemlenmektedir. QC-NP uygulanan hücrelere bakıldığı zaman ise 0. saatte ortalama 1081.262 µm olan mesafenin 72. saatte ortalama 1034.734 µm olduğu tespit edilmiştir. Böylece, üretilen nanopartiküler formülasyonun kanser hücrelerinin göçünü önemli derecede azalttığı gösterilmiştir.

Proliferasyon analizi yapılması amacıyla HT-29 hücreleri üzerine 5,10 ve 20 µg/ml Q-C ve QC-NP uygulanarak 48 saat süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda; kontrol grubu için proliferasyon yüzdesi %80,76 iken, 5 µg/ml Q-C uygulanan hücrede %70.47, 10 µg/ml Q-C uygulananda %72.57, 20 µg/ml Q-C uygulananda ise %72.11 olarak bulunmuştur. QC-NP uygulanan hücrelerde ise

proliferasyon yüzdesi, 5 µg/ml uygulananda %63.98, 10 µg/ml uygulananda %39.39, 20 µg/ml uygulananda %21.27 olarak hesaplanmıştır. Üretilen nanopartiküler formülasyonun serbest moleküllere kıyasla hücre proliferasyonunu önemli derecede inhibe ettiği gösterilmiştir.

48 saatlik IC<sub>50</sub> değerlerine göre belirlenen dozlarda Q-C ve QC-NP uygulaması yapılan hücrelerin apoptozun içsel yolağında yer alan sitokrom-c, Apaf-1, kaspaz-3, kaspaz-8, kaspaz-9 genlerinin, pro-apoptotik Bax ve anti-apoptotik Bcl-2 genlerinin ekspresyonları B-actin gen ekspresyonuyla karşılaştırmalı olarak Real-Time PCR yöntemi ile analiz edilmiştir. Analiz sonucunda; sitokrom-c miktarının arttığı, Apaf-1'in azaldığı, kaspaz-3 ve kaspaz-9 ekspresyonlarının artarken kaspaz-8 ekspresyonunun değişmediği bulunmuştur. Bcl-2 ve Bax genlerinin ekspresyonları ise ters ilişkili olarak bulunmuştur. Buna bağlı olarak, nanopartiküler formülasyon uygulaması ile HT-29 hücrelerinde apoptozun içsel yolağının aktive olduğu düşünülmektedir.

Apoptotik süreçte kilit rol oynayan sitokrom-c, kaspaz-3 ve cleaved-kaspaz-9 proteinlerinin ekspresyonu Western Blot yöntemi ile gösterilmiştir. Sitokrom-c hızlıca degrade olduğundan ekspresyon gözlemlenmezken, nanopartiküler formülasyon uygulanması ile kaspaz-3 ve cleaved-kaspaz-9 aktivasyonunun sağlandığı ve böylece apoptozun içsel yolağının aktive olduğu düşünülmektedir.

Üretilen nanopartiküler formülasyon ile moleküllerin sahip olduğu suda düşük çözünürlük, düşük biyoyararlanım özelliklerinin iyileştirilmesi sağlanarak hücre kültürü çalışmalarında anti-kanser, anti-proliferasyon ve apoptoz süreçlerinde olumlu sonuçlar alınmıştır. Bu nedenle; üretilen nanopartiküler sistemin ilaç taşıyıcı sistemler için referans olabileceği düşünülmekte, deneylerin *in vitro* çalışmalara ek *in vivo* olarak gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

Bu çalışmada apoptoz sürecindeki kilit genlerin ekspresyonuna bakılmıştır. Apoptoz indüklenmesinde görev alan diğer genlerin ekspresyonlarının incelenerek daha detaylı moleküler mekanizmalarının aydınlatılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Apoptoz sürecinin yanı sıra kanser hücrelerinin altı özelliği baz alınarak hücre döngüsü üzerine etkisinin, invazyon, metastaz ve anjiyogenez süreçlerinin detaylı olarak araştırılması gerekmektedir. Bunlara ek olarak; üretilen nanopartiküler

formülasyonun kanser tedavisine ek olarak destekleyici ajan olarak kullanılabilmesi amacıyla klinik çalışmaların yapılmasına ihtiyaç bulunmaktadır.

- [1] Jemal, A. Siegel, R. Ward, E. Hao, Y. Xu, J. Murray, T. ve Thun, M.J., (2008). "Cancer statistics, 2008", CA: a cancer journal for clinicians, 58: 71-96.
- [2] Fearon, E.R. ve Vogelstein, B., (1990). "A genetic model for colorectal tumorigenesis", cell, 61: 759-767.
- [3] Arber, N. ve Levin, B., (2005). Chemoprevention of colorectal cancer: ready for routine use?, ed. Tumor Prevention and Genetics III. Springer, 213-230.
- [4] Vukobrat-Bijedic, Z. Husic-Selimovic, A. Sofic, A. Bijedic, N. Gogov, B. Djuran, A. Redzepovic, A. Saray, A. ve Bjelogrljic, I., (2012). "The application of current diagnostic protocols of patients with colon cancer in preparation for therapy", Acta Informatica Medica, 20: 238.
- [5] Pimple, S. Manjappa, A.S. Ukawala, M. ve Murthy, R., (2012). "PLGA nanoparticles loaded with etoposide and quercetin dihydrate individually: in vitro cell line study to ensure advantage of combination therapy", Cancer nanotechnology, 3: 25.
- [6] Siegel, R.L. Miller, K.D. ve Jemal, A., (2019). "Cancer statistics, 2019", CA: a cancer journal for clinicians, 69: 7-34.
- [7] Sghaier, M.B. Skandrani, I. Nasr, N. Franca, M.-G.D. Chekir-Ghedira, L. ve Ghedira, K., (2011). "Flavonoids and sesquiterpenes from *Teucrium ramosissimum* promote antiproliferation of human cancer cells and enhance antioxidant activity: A structure-activity relationship study", Environmental toxicology and pharmacology, 32: 336-348.
- [8] Yang, L. Liu, Y. Wang, M. Qian, Y. Dong, X. Gu, H. Wang, H. Guo, S. ve Hisamitsu, T., (2016). "Quercetin-induced apoptosis of HT-29 colon cancer cells via inhibition of the Akt-CSN6-Myc signaling axis", Molecular medicine reports, 14: 4559-4566.
- [9] Batra, P. ve Sharma, A.K., (2013). "Anti-cancer potential of flavonoids: recent trends and future perspectives", 3 Biotech, 3: 439-459.
- [10] Lee, H.-Y. Jeong, Y.-I. Kim, E.J. Lee, K.D. Choi, S.-H. Kim, Y.J. Kim, D.H. ve Choi, K.-C., (2015). "Preparation of caffeic acid phenethyl ester-incorporated nanoparticles and their biological activity", Journal of pharmaceutical sciences, 104: 144-154.
- [11] He, Y.-J. Liu, B.-H. Xiang, D.-B. Qiao, Z.-Y. Fu, T. ve He, Y.-H., (2006). "Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on the growth of SW480 colorectal tumor cells involves  $\beta$ -catenin associated signaling pathway down-regulation", World journal of gastroenterology: WJG, 12: 4981.
- [12] Murtaza, G. Sajjad, A. Mehmood, Z. Shah, S.H. ve Siddiqi, A.R., (2015). "Possible molecular targets for therapeutic applications of caffeic acid

phenethyl ester in inflammation and cancer", journal of food and drug analysis, 23: 11-18.

- [13] Akyol, S. Ginis, Z. Armutcu, F. Ozturk, G. Yigitoglu, M.R. ve Akyol, O., (2012). "The potential usage of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) against chemotherapy-induced and radiotherapy-induced toxicity", Cell biochemistry and function, 30: 438-443.
- [14] Nam, J.-S. Sharma, A.R. Nguyen, L.T. Chakraborty, C. Sharma, G. ve Lee, S.-S., (2016). "Application of bioactive quercetin in oncotherapy: from nutrition to nanomedicine", Molecules, 21: 108.
- [15] Wadhwa, R. Nigam, N. Bhargava, P. Dhanjal, J.K. Goyal, S. Grover, A. Sundar, D. Ishida, Y. Terao, K. ve Kaul, S.C., (2016). "Molecular characterization and enhancement of anticancer activity of caffeic acid phenethyl ester by  $\gamma$  cyclodextrin", Journal of Cancer, 7: 1755.
- [16] Vazquez, E. Ferrer-Miralles, N. Mangues, R. Corchero, J.L. Schwartz, J. ve Villaverde, A., (2009). "Modular protein engineering in emerging cancer therapies", Current pharmaceutical design, 15: 893-916.
- [17] Oylar, Ö. ve Tekin, İ., (2011). "Kanserin teşhis ve tedavisinde nanoteknolojinin önemi", Uludağ Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi, 16: 147-154.
- [18] Demir, D., (2013). "Doksetel İçeren Nanopartiküllerin Formülasyonu ve in Vitro Değerlendirilmesi", Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [19] Winawer, S. Fletcher, R. Miller, L. Godlee, F. Stolar, M. Mulrow, C. Wooli, S. Glick, S. Ganiars, T. ve Bond, J., (1997). "Erratum: Colorectal cancer screening: Clinical guidelines and rationale (Gastroenterology (1997) 112 (594-642))", Gastroenterology, 112: 1060.
- [20] Sancho, E. Batlle, E. ve Clevers, H., (2004). "Signaling pathways in intestinal development and cancer", Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 20: 695-723.
- [21] "Colon Cancer-Carcinogenesis", Available at: <https://medical-dictionary.thefreedictionary.com/carcinogenesis>, 15.11.2019.
- [22] Aran, V. Victorino, A.P. Thuler, L.C. ve Ferreira, C.G., (2016). "Colorectal cancer: epidemiology, disease mechanisms and interventions to reduce onset and mortality", Clinical colorectal cancer, 15: 195-203.
- [23] Cross, A.J. Wooldrage, K. Robbins, E.C. Pack, K. Brown, J.P. Hamilton, W. Thompson, M.R. Flashman, K.G. Halligan, S. ve Thomas-Gibson, S., (2019). "Whole-colon investigation vs. flexible sigmoidoscopy for suspected colorectal cancer based on presenting symptoms and signs: a multicentre cohort study", British journal of cancer, 120: 154.
- [24] Shafiee, G. Saidijam, M. Tavilani, H. Ghasemkhani, N. ve Khodadadi, I., (2016). "Genistein induces apoptosis and inhibits proliferation of HT29 colon cancer cells", International journal of molecular and cellular medicine, 5: 178.

- [25] Tariq, K. ve Ghias, K., (2016). "Colorectal cancer carcinogenesis: a review of mechanisms", *Cancer biology & medicine*, 13: 120.
- [26] Arnold, M. Sierra, M.S. Laversanne, M. Soerjomataram, I. Jemal, A. ve Bray, F., (2017). "Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality", *Gut*, 66: 683-691.
- [27] Fang, J.-Y. Li, Z.-H. Li, Q. Huang, W.-S. Kang, L. ve Wang, J.-P., (2012). "Resveratrol affects protein kinase C activity and promotes apoptosis in human colon carcinoma cells", *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13: 6017-6022.
- [28] Giovannucci, E., (2002). "Modifiable risk factors for colon cancer", *Gastroenterology Clinics of North America*, 31: 925-943.
- [29] El-Refaei, M.F. ve Mady, E.A., (2013). "Regulation of Apoptosis, Invasion and Angiogenesis of Tumor Cells by Caffeic Acid Phenethyl Ester", *Carcinogenesis*: 297.
- [30] Hanahan, D. ve Weinberg, R.A., (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation", *cell*, 144: 646-674.
- [31] Vermeulen, K. Van Bockstaele, D.R. ve Berneman, Z.N., (2003). "The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer", *Cell proliferation*, 36: 131-149.
- [32] Amin, A.R. Karpowicz, P.A. Carey, T.E. Arbiser, J. Nahta, R. Chen, Z.G. Dong, J.-T. Kucuk, O. Khan, G.N. ve Huang, G.S., (2015). "Evasion of anti-growth signaling: a key step in tumorigenesis and potential target for treatment and prophylaxis by natural compounds": Elsevier.
- [33] Tiwari, A. Saraf, S. Verma, A. Panda, P.K. ve Jain, S.K., (2018). "Novel targeting approaches and signaling pathways of colorectal cancer: An insight", *World journal of gastroenterology*, 24: 4428.
- [34] Hanahan, D. ve Weinberg, R.A., (2000). "The hallmarks of cancer", *cell*, 100: 57-70.
- [35] Yaswen, P. MacKenzie, K.L. Keith, W.N. Hentosh, P. Rodier, F. Zhu, J. Firestone, G.L. Matheu, A. Carnero, A. ve Bilslund, A., (2015). "Therapeutic targeting of replicative immortality": Elsevier.
- [36] Shin, P.-K. Zoh, Y. Choi, J. Kim, M.-S. Kim, Y. ve Choi, S.-W., (2019). "Walnut phenolic extracts reduce telomere length and telomerase activity in a colon cancer stem cell model", *Nutrition research and practice*, 13: 58-63.
- [37] AKTAŞ, S.H. ve AKBULUT, H., (2014). "Kolorektal kanserde anjiyogenez ve anti-anjiyogenik tedaviler", *Turkish Journal of Oncology/Türk Onkoloji Dergisi*, 29.
- [38] Zhang, X. Gaspard, J.P. ve Chung, D.C., (2001). "VEGF is regulated by the WNT pathway in colon cancer", *Gastroenterology*, 120: A4.
- [39] Sun, W., (2012). "Angiogenesis in metastatic colorectal cancer and the benefits of targeted therapy", *Journal of hematology & oncology*, 5: 63.

- [40] Brabletz, T. Hlubek, F. Spaderna, S. Schmalhofer, O. Hiendlmeyer, E. Jung, A. ve Kirchner, T., (2005). "Invasion and metastasis in colorectal cancer: epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, stem cells and  $\beta$ -catenin", *Cells tissues organs*, 179: 56-65.
- [41] Adwan, H. El Harouni, D. Habashy, D. Banna, N. Georges, R. ve Berger, M., (2018). *Early Metastasis in Colorectal Cancer Poses an Option for New Diagnostic and Treatment Strategies*, ed. Cancer Metastasis. IntechOpen.
- [42] Ren, W. Qiao, Z. Wang, H. Zhu, L. ve Zhang, L., (2003). "Flavonoids: promising anticancer agents", *Medicinal research reviews*, 23: 519-534.
- [43] Shi, Y., (2002). "Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis", *Molecular cell*, 9: 459-470.
- [44] Elmore, S., (2007). "Apoptosis: a review of programmed cell death", *Toxicologic pathology*, 35: 495-516.
- [45] Coşkun, G., (2011). "Özgür H", *Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 20: 145-158.
- [46] Adams, J.M. ve Cory, S., (2007). "The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy", *Oncogene*, 26: 1324.
- [47] Youle, R.J., (2007). "Cellular demolition and the rules of engagement", *Science*, 315: 776-777.
- [48] Chipuk, J.E. ve Green, D.R., (2008). "How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization?", *Trends in cell biology*, 18: 157-164.
- [49] Cheng, N. Jiao, S. Gumaste, A. Bai, L. ve Belluscio, L., (2016). "APP Overexpression Causes A $\beta$ -Independent Neuronal Death through Intrinsic Apoptosis Pathway", *eNeuro*, 3.
- [50] Kang, M.H. ve Reynolds, C.P., (2009). "Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy", *Clinical cancer research*, 15: 1126-1132.
- [51] "Colorectal Cancer: Types of Treatment ", Available at: <https://www.cancer.net/cancer-types/colorectal-cancer/types-treatment>, 04.09.2019.
- [52] Hegde, S.R. Sun, W. ve Lynch, J.P., (2008). "Systemic and targeted therapy for advanced colon cancer", *Expert review of gastroenterology & hepatology*, 2: 135-149.
- [53] "NCI", Available at: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/targeted-therapies>, 01.10.2019.
- [54] Şakalar, Ç. İzgi, K. ve Canatan, H., (2013). "Kanser immün terapi ve monoklonal antikörler", *FÜ Sağ. Bil. Tıp Derg.* 2013, 27 (2): 105, 111.
- [55] Xu, H. Yu, Y. Marciniak, D. Rishi, A.K. Sarkar, F.H. Kucuk, O. ve Majumdar, A.P., (2005). "Epidermal growth factor receptor (EGFR)-related protein

inhibits multiple members of the EGFR family in colon and breast cancer cells", *Molecular cancer therapeutics*, 4: 435-442.

- [56] Al-Lazikani, B. Banerji, U. ve Workman, P., (2012). "Combinatorial drug therapy for cancer in the post-genomic era", *Nature biotechnology*, 30: 679.
- [57] Wu, S.-L. Sun, Z.-J. Yu, L. Meng, K.-W. Qin, X.-L. ve Pan, C.-E., (2004). "Effect of resveratrol and in combination with 5-FU on murine liver cancer", *World journal of gastroenterology: WJG*, 10: 3048.
- [58] Cavanna, L. Artioli, F. Codignola, C. Lazzaro, A. Rizzi, A. Gamboni, A. Rota, L. Rodino, C. Boni, F. ve Iop, A., (2006). "Oxaliplatin in combination with 5-fluorouracil (5-FU) and leucovorin (LV) in patients with metastatic gastric cancer (MGC)", *American journal of clinical oncology*, 29: 371-375.
- [59] Falkson, G. ve Falkson, H., (1976). "Fluorouracil, methyl-CCNU and vincristine in cancer of the colon", *Cancer*, 38: 1468-1470.
- [60] Xiao, H. Zhang, Q. Lin, Y. Reddy, B.S. ve Yang, C.S., (2008). "Combination of atorvastatin and celecoxib synergistically induces cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells", *International journal of cancer*, 122: 2115-2124.
- [61] Lin, J. Hsiao, P.-W. Chiu, T.H. ve Chao, J.-I., (2005). "Combination of cyclooxygenase-2 inhibitors and oxaliplatin increases the growth inhibition and death in human colon cancer cells", *Biochemical pharmacology*, 70: 658-667.
- [62] Patel, B.B. Sengupta, R. Qazi, S. Vachhani, H. Yu, Y. Rishi, A.K. ve Majumdar, A.P., (2008). "Curcumin enhances the effects of 5-fluorouracil and oxaliplatin in mediating growth inhibition of colon cancer cells by modulating EGFR and IGF-1R", *International journal of cancer*, 122: 267-273.
- [63] Zhou, X. Wang, W. Li, P. Zheng, Z. Tu, Y. Zhang, Y. ve You, T., (2016). "Curcumin enhances the effects of 5-fluorouracil and oxaliplatin in inducing gastric cancer cell apoptosis both in vitro and in vivo", *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*, 23: 29-34.
- [64] Gibellini, L. Pinti, M. Nasi, M. Montagna, J.P. De Biasi, S. Roat, E. Bertonecelli, L. Cooper, E.L. ve Cossarizza, A., (2011). "Quercetin and cancer chemoprevention", *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2011.
- [65] Ravishankar, D. Rajora, A.K. Greco, F. ve Osborn, H.M., (2013). "Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy", *The international journal of biochemistry & cell biology*, 45: 2821-2831.
- [66] Kuntz, S. Wenzel, U. ve Daniel, H., (1999). "Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines", *European journal of nutrition*, 38: 133-142.
- [67] Chiu, F.L. ve Lin, J.K., (2008). "Downregulation of androgen receptor expression by luteolin causes inhibition of cell proliferation and induction



of apoptosis in human prostate cancer cells and xenografts", *The Prostate*, 68: 61-71.

- [68] Srivastava, S. Somasagara, R.R. Hegde, M. Nishana, M. Tadi, S.K. Srivastava, M. Choudhary, B. ve Raghavan, S.C., (2016). "Quercetin, a natural flavonoid interacts with DNA, arrests cell cycle and causes tumor regression by activating mitochondrial pathway of apoptosis", *Scientific reports*, 6: 24049.
- [69] Shan, B.-E. Wang, M.-X. ve Li, R.-q., (2009). "Quercetin inhibit human SW480 colon cancer growth in association with inhibition of cyclin D1 and survivin expression through Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway", *Cancer investigation*, 27: 604-612.
- [70] Calgarotto, A.K. Maso, V. Junior, G.C.F. Nowill, A.E. Latuf Filho, P. Vassallo, J. ve Saad, S.T.O., (2018). "Antitumor activities of Quercetin and Green Tea in xenografts of human leukemia HL60 cells", *Scientific reports*, 8: 3459.
- [71] Kim, H.-S. Wannatung, T. Lee, S. Yang, W.K. Chung, S.H. Lim, J.-S. Choe, W. Kang, I. Kim, S.-S. ve Ha, J., (2012). "Quercetin enhances hypoxia-mediated apoptosis via direct inhibition of AMPK activity in HCT116 colon cancer", *Apoptosis*, 17: 938-949.
- [72] Psahoulia, F.H. Moutzi, S. Roberts, M.L. Sasazuki, T. Shirasawa, S. ve Pintzas, A., (2006). "Quercetin mediates preferential degradation of oncogenic Ras and causes autophagy in Ha-RAS-transformed human colon cells", *Carcinogenesis*, 28: 1021-1031.
- [73] "Kuersetinin kimyasal yapısı", Available at: <http://kolonkanseri.blogspot.com/2014/05/kolon-kanserinde-quercetin.html>, 23.05.2019.
- [74] Yuan, Z. Long, C. Junming, T. Qihuan, L. Youshun, Z. ve Chan, Z., (2012). "Quercetin-induced apoptosis of HL-60 cells by reducing PI3K/Akt", *Molecular biology reports*, 39: 7785-7793.
- [75] Richter, M. Ebermann, R. ve Marian, B., (1999). "Quercetin-induced apoptosis in colorectal tumor cells: possible role of EGF receptor signaling", *Nutrition and cancer*, 34: 88-99.
- [76] Priyadarsini, R.V. Murugan, R.S. Maitreyi, S. Ramalingam, K. Karunagaran, D. ve Nagini, S., (2010). "The flavonoid quercetin induces cell cycle arrest and mitochondria-mediated apoptosis in human cervical cancer (HeLa) cells through p53 induction and NF- $\kappa$ B inhibition", *European journal of pharmacology*, 649: 84-91.
- [77] Mertens-Talcott, S.U. ve Percival, S.S., (2005). "Ellagic acid and quercetin interact synergistically with resveratrol in the induction of apoptosis and cause transient cell cycle arrest in human leukemia cells", *Cancer letters*, 218: 141-151.
- [78] Mertens-Talcott, S.U. Talcott, S.T. ve Percival, S.S., (2003). "Low Concentrations of Quercetin and Ellagic Acid Synergistically Influence

Proliferation, Cytotoxicity and Apoptosis in MOLT-4 Human Leukemia Cells-", *The Journal of nutrition*, 133: 2669-2674.

- [79] Ravishankar, D. Watson, K.A. Boateng, S.Y. Green, R.J. Greco, F. ve Osborn, H.M., (2015). "Exploring quercetin and luteolin derivatives as antiangiogenic agents", *European journal of medicinal chemistry*, 97: 259-274.
- [80] ACKLAND, M.L. VAN DE WAARSENBURG, S. ve Jones, R., (2005). "Synergistic antiproliferative action of the flavonols quercetin and kaempferol in cultured human cancer cell lines", *In vivo*, 19: 69-76.
- [81] Zhao, J.-l. Zhao, J. ve Jiao, H.-j., (2014). "Synergistic growth-suppressive effects of quercetin and cisplatin on HepG2 human hepatocellular carcinoma cells", *Applied biochemistry and biotechnology*, 172: 784-791.
- [82] Arasoglu, T. Derman, S. ve Mansuroglu, B., (2015). "Comparative evaluation of antibacterial activity of caffeic acid phenethyl ester and PLGA nanoparticle formulation by different methods", *Nanotechnology*, 27: 025103.
- [83] Zheng, Z.S. Xue, G.Z. Grunberger, D. ve Prystowsky, J.H., (1995). "Caffeic acid phenethyl ester inhibits proliferation of human keratinocytes and interferes with the EGF regulation of ornithine decarboxylase", *Oncology research*, 7: 445-452.
- [84] Silva, R.B. Santos, N. Martins, N. Ferreira, D. Barbosa Jr, F. Souza, V.O. Kinoshita, A. Baffa, O. Del-Bel, E. ve Santos, A.C.d., (2013). "Caffeic acid phenethyl ester protects against the dopaminergic neuronal loss induced by 6-hydroxydopamine in rats", *Neuroscience*, 233: 86-94.
- [85] "Kafeik asit fenetil esterin kimyasal yapısı", Available at: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c8221?lang=en&region=TR>, 04.08.2019.
- [86] Chen, Y.-J. Shiao, M.-S. Hsu, M.-L. Tsai, T.-H. ve Wang, S.-Y., (2001). "Effect of caffeic acid phenethyl ester, an antioxidant from propolis, on inducing apoptosis in human leukemic HL-60 cells", *Journal of agricultural and food chemistry*, 49: 5615-5619.
- [87] Watabe, M. Hishikawa, K. Takayanagi, A. Shimizu, N. ve Nakaki, T., (2004). "Caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis by inhibition of NFκB and activation of Fas in human breast cancer MCF-7 cells", *Journal of Biological Chemistry*, 279: 6017-6026.
- [88] Oršolić, N. Knežević, A.H. Šver, L. Terzić, S. ve Bašić, I., (2004). "Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds", *Journal of ethnopharmacology*, 94: 307-315.
- [89] Wang, D. Xiang, D.-B. He, Y.-J. Li, Z.-P. Wu, X.-H. Mou, J.-H. Xiao, H.-L. ve Zhang, Q.-H., (2005). "Effect of caffeic acid phenethyl ester on proliferation and apoptosis of colorectal cancer cells in vitro", *World journal of gastroenterology: WJG*, 11: 4008.

- [90] Xiang, D. Wang, D. He, Y. Xie, J. Zhong, Z. Li, Z. ve Xie, J., (2006). "Caffeic acid phenethyl ester induces growth arrest and apoptosis of colon cancer cells via the  $\beta$ -catenin/T-cell factor signaling", *Anti-cancer drugs*, 17: 753-762.
- [91] Sawicka, D. Car, H. Borawska, M.H. ve Nikliński, J., (2012). "The anticancer activity of propolis", *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 50: 25-37.
- [92] Ferrari, M., (2005). "Cancer nanotechnology: opportunities and challenges", *Nature reviews cancer*, 5: 161.
- [93] Choi, J.Y. Thapa, R.K. Yong, C.S. ve Kim, J.O., (2016). "Nanoparticle-based combination drug delivery systems for synergistic cancer treatment", *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 46: 325-339.
- [94] Nie, S. Xing, Y. Kim, G.J. ve Simons, J.W., (2007). "Nanotechnology applications in cancer", *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 9: 257-288.
- [95] Pandey, H. Rani, R. ve Agarwal, V., (2016). "Liposome and their applications in cancer therapy", *Brazilian archives of biology and technology*, 59.
- [96] Cho, K. Wang, X. Nie, S. ve Shin, D.M., (2008). "Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer", *Clinical cancer research*, 14: 1310-1316.
- [97] Torchilin, V.P., (2005). "Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers", *Nature reviews Drug discovery*, 4: 145.
- [98] Wong, M.-Y. ve Chiu, G.N., (2010). "Simultaneous liposomal delivery of quercetin and vincristine for enhanced estrogen-receptor-negative breast cancer treatment", *Anti-cancer drugs*, 21: 401-410.
- [99] Matsumura, Y. ve Kataoka, K., (2009). "Preclinical and clinical studies of anticancer agent-incorporating polymer micelles", *Cancer science*, 100: 572-579.
- [100] Manchester, M. ve Singh, P., (2006). "Virus-based nanoparticles (VNPs): platform technologies for diagnostic imaging", *Advanced drug delivery reviews*, 58: 1505-1522.
- [101] Bianco, A. Kostarelos, K. ve Prato, M., (2005). "Applications of carbon nanotubes in drug delivery", *Current opinion in chemical biology*, 9: 674-679.
- [102] Prabhu, R.H. Patravale, V.B. ve Joshi, M.D., (2015). "Polymeric nanoparticles for targeted treatment in oncology: current insights", *International journal of nanomedicine*, 10: 1001.
- [103] Mora-Huertas, C.E. Fessi, H. ve Elaissari, A., (2010). "Polymer-based nanocapsules for drug delivery", *International journal of pharmaceutics*, 385: 113-142.
- [104] Quintanar-Guerrero, D. Allémann, E. Fessi, H. ve Doelker, E., (1998). "Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable

nanoparticles from preformed polymers", Drug development and industrial pharmacy, 24: 1113-1128.

- [105] Mohanraj, V. ve Chen, Y., (2006). "Nanoparticles-a review", Tropical journal of pharmaceutical research, 5: 561-573.
- [106] De Jong, W.H. ve Borm, P.J., (2008). "Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards", International journal of nanomedicine, 3: 133.
- [107] Liu, W.-T., (2006). "Nanoparticles and their biological and environmental applications", Journal of bioscience and bioengineering, 102: 1-7.
- [108] Kreuter, J., (2004). "Influence of the surface properties on nanoparticle-mediated transport of drugs to the brain", Journal of nanoscience and nanotechnology, 4: 484-488.
- [109] Salata, O.V., (2004). "Applications of nanoparticles in biology and medicine", Journal of nanobiotechnology, 2: 3.
- [110] Elbaz, N.M. Khalil, I.A. Abd-Rabou, A.A. ve El-Sherbiny, I.M., (2016). "Chitosan-based nano-in-microparticle carriers for enhanced oral delivery and anticancer activity of propolis", International journal of biological macromolecules, 92: 254-269.
- [111] Win, K.Y. ve Feng, S.-S., (2006). "In vitro and in vivo studies on vitamin E TPGS-emulsified poly (D, L-lactic-co-glycolic acid) nanoparticles for paclitaxel formulation", Biomaterials, 27: 2285-2291.
- [112] González-Ballesteros, N. Prado-López, S. Rodríguez-González, J. Lastra, M. ve Rodríguez-Argüelles, M., (2017). "Green synthesis of gold nanoparticles using brown algae *Cystoseira baccata*: Its activity in colon cancer cells", Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 153: 190-198.
- [113] Calzoni, E. Cesaretti, A. Polchi, A. Di Michele, A. Tancini, B. ve Emiliani, C., (2019). "Biocompatible polymer nanoparticles for drug delivery applications in cancer and neurodegenerative disorder therapies", Journal of functional biomaterials, 10: 4.
- [114] Dağlıoğlu, C., "İlaç Taşıma Sistemleri olarak Nanopartiküller kullanılarak Pasif ve Aktif Tümör Hedeflemelerinin Karşılaştırmalı İncelenmesi", Akademik Platform Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi, 6: 1-7.
- [115] DERMAN, S. KIZILBEY, K. ve AKDESTE, Z.M., (2013). "Polymeric nanoparticles", Sigma, 31: 107-120.
- [116] Hines, D.J. ve Kaplan, D.L., (2013). "Poly (lactic-co-glycolic) acid-controlled-release systems: experimental and modeling insights", Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems, 30.
- [117] Makadia, H.K. ve Siegel, S.J., (2011). "Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier", Polymers, 3: 1377-1397.
- [118] Younis, M. Faming, W. Hongyan, Z. Mengmeng, T. Hang, S. ve Liudi, Y., (2019). "Iguratimod encapsulated PLGA-NPs improves therapeutic outcome in glioma, glioma stem-like cells and temozolomide resistant glioma cells", Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine: 102101.

- [119] Zhang, J. Liu, P. Zhang, Z. Han, J. Yang, X. Wang, A. ve Zhang, X., (2019). "Apatinib-loaded nanoparticles inhibit tumor growth and angiogenesis in a model of melanoma", *Biochemical and Biophysical Research Communications*.
- [120] Akl, M.A. Kartal-Hodzic, A. Suutari, T. Oksanen, T. Montagner, I.M. Rosato, A. Ismael, H.R. Afouna, M.I. Caliceti, P. ve Yliperttula, M., (2019). "Real-Time Label-Free Targeting Assessment and in Vitro Characterization of Curcumin-Loaded Poly-lactic-co-glycolic Acid Nanoparticles for Oral Colon Targeting", *ACS omega*.
- [121] ARASOĞLU, T. Derman, S. MANSUROĞLU, B. UZUNOĞLU, D. KOÇYİĞİT, B.S. GÜMÜŞ, B. Acar, T. ve Tuncer, B., (2017). "Preparation, characterization, and enhanced antimicrobial activity: quercetin-loaded PLGA nanoparticles against foodborne pathogens", *Turkish Journal of Biology*, 41: 127-140.
- [122] Kızılbey, K., (2019). "Optimization of Rutin-Loaded PLGA Nanoparticles Synthesized by Single-Emulsion Solvent Evaporation Method", *ACS Omega*, 4: 555-562.
- [123] Pool, H. Quintanar, D. de Dios Figueroa, J. Mano, C.M. Bechara, J.E.H. Godínez, L.A. ve Mendoza, S., (2012). "Antioxidant effects of quercetin and catechin encapsulated into PLGA nanoparticles", *Journal of Nanomaterials*, 2012: 86.
- [124] Li, L.-Y. Cui, L.-Y. Zeng, R.-C. Li, S.-Q. Chen, X.-B. Zheng, Y. ve Kannan, M.B., (2018). "Advances in functionalized polymer coatings on biodegradable magnesium alloys—a review", *Acta biomaterialia*, 79: 23-36.
- [125] Kapoor, D.N. Bhatia, A. Kaur, R. Sharma, R. Kaur, G. ve Dhawan, S., (2015). "PLGA: a unique polymer for drug delivery", *Therapeutic delivery*, 6: 41-58.
- [126] Rafiei, P. ve Haddadi, A., (2017). "Docetaxel-loaded PLGA and PLGA-PEG nanoparticles for intravenous application: pharmacokinetics and biodistribution profile", *International journal of nanomedicine*, 12: 935.
- [127] "HT-29", Available at: [https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-38.aspx?geo\\_country=tr](https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-38.aspx?geo_country=tr), 05.05.2019.
- [128] Gerlier, D. ve Thomasset, N., (1986). "Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation", *Journal of immunological methods*, 94: 57-63.
- [129] "RNA Isolation", Available at: <https://www.thermofisher.com/tr/en/home/references/ambion-tech-support/rna-isolation/tech-notes/quantitating-rna.html>, 25.01.2020.
- [130] Livak, K.J. ve Schmittgen, T.D., (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method", *methods*, 25: 402-408.

- [131] "Smart BCA Protein Assay Kit", Available at: [https://intronbio.com:6001/intronbioen/product/product\\_view.php?PRD\\_T\\_ID=39#none](https://intronbio.com:6001/intronbioen/product/product_view.php?PRD_T_ID=39#none). Accessed.
- [132] Mahmood, T. ve Yang, P.-C., (2012). "Western blot: technique, theory, and trouble shooting", North American journal of medical sciences, 4: 429.
- [133] "biorad", Available at: <https://www.bio-rad.com/en-ug/applications-technologies/protein-blotting-methods?ID=LUSPPSESH>, 15.11.2019.
- [134] Derman, S., (2015). "Caffeic acid phenethyl ester loaded PLGA nanoparticles: effect of various process parameters on reaction yield, encapsulation efficiency, and particle size", Journal of Nanomaterials, 16: 318.
- [135] Sharma, D. Philip, G. Gabrani, R. Ali, J. ve Dang, S., (2015). "Dual agents loaded polymeric nanoparticle: Effect of process variables", International journal of pharmaceutical investigation, 5: 155.
- [136] Amini, Y. Amel Jamehdar, S. Sadri, K. Zare, S. Musavi, D. ve Tafaghodi, M., (2017). "Different methods to determine the encapsulation efficiency of protein in PLGA nanoparticles", Bio-medical materials and engineering, 28: 613-620.
- [137] G Nava-Arzaluz, M. Piñón-Segundo, E. Ganem-Rondero, A. ve Lechuga-Ballesteros, D., (2012). "Single emulsion-solvent evaporation technique and modifications for the preparation of pharmaceutical polymeric nanoparticles", Recent patents on drug delivery & formulation, 6: 209-223.
- [138] Lemoine, D. ve Pr eat, V., (1998). "Polymeric nanoparticles as delivery system for influenza virus glycoproteins", Journal of Controlled Release, 54: 15-27.
- [139] Song, X. Zhao, Y. Hou, S. Xu, F. Zhao, R. He, J. Cai, Z. Li, Y. ve Chen, Q., (2008). "Dual agents loaded PLGA nanoparticles: systematic study of particle size and drug entrapment efficiency", European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics, 69: 445-453.
- [140] Chu, K.S. Schorzman, A.N. Finniss, M.C. Bowerman, C.J. Peng, L. Luft, J.C. Madden, A.J. Wang, A.Z. Zamboni, W.C. ve DeSimone, J.M., (2013). "Nanoparticle drug loading as a design parameter to improve docetaxel pharmacokinetics and efficacy", Biomaterials, 34: 8424-8429.
- [141] Ling, Y. ve Huang, Y., (2008). "Preparation and release efficiency of poly (lactic-co-glycolic) acid nanoparticles for drug loaded paclitaxel": Springer.
- [142] Tran, S. DeGiovanni, P.-J. Piel, B. ve Rai, P., (2017). "Cancer nanomedicine: a review of recent success in drug delivery", Clinical and translational medicine, 6: 44.
- [143] Sun, D. Li, N. Zhang, W. Yang, E. Mou, Z. Zhao, Z. Liu, H. ve Wang, W., (2016). "Quercetin-loaded PLGA nanoparticles: a highly effective antibacterial agent in vitro and anti-infection application in vivo", Journal of Nanoparticle Research, 18: 3.

- [144] Singh, S. Kushwah, V. Agrawal, A.K. ve Jain, S., (2018). "Insulin-and quercetin-loaded liquid crystalline nanoparticles: implications on oral bioavailability, antidiabetic and antioxidant efficacy", *Nanomedicine*, 13: 521-537.
- [145] Lu, X.-Y. Wu, D.-C. Li, Z.-J. ve Chen, G.-Q., (2011). *Polymer nanoparticles*, ed. Progress in molecular biology and translational science. Elsevier, 299-323.
- [146] Villaverde, A., (2011). *Nanoparticles in translational science and medicine*: Academic Press.
- [147] Babos, G. Biró, E. Meiczinger, M. ve Feczko, T., (2018). "Dual drug delivery of sorafenib and doxorubicin from PLGA and PEG-PLGA polymeric nanoparticles", *Polymers*, 10: 895.
- [148] Raja, S.B. Rajendiran, V. Kasinathan, N.K. Amrithalakshmi, P. Venkatabalasubramanian, S. Murali, M.R. Devaraj, H. ve Devaraj, S.N., (2017). "Differential cytotoxic activity of Quercetin on colonic cancer cells depends on ROS generation through COX-2 expression", *Food and chemical toxicology*, 106: 92-106.
- [149] Le Son, H. ve Anh, N.P., (2013). "Phytochemical composition, in vitro antioxidant and anticancer activities of quercetin from methanol extract of *Asparagus Cochinchinensis* (Lour.) Merr. Tuber", *Journal of Medicinal Plants Research*, 7: 3360-3366.
- [150] Liao, H.-F. Chen, Y.-Y. Liu, J.-J. Hsu, M.-L. Shieh, H.-J. Liao, H.-J. Shieh, C.-J. Shiao, M.-S. ve Chen, Y.-J., (2003). "Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on angiogenesis, tumor invasion, and metastasis", *Journal of agricultural and food chemistry*, 51: 7907-7912.
- [151] "Hücre Göçü", Available at: <https://www.mechanobio.info/development/what-is-cell-migration/>, 24.11.2019.
- [152] Lan, H. Hong, W. Fan, P. Qian, D. Zhu, J. ve Bai, B., (2017). "Quercetin inhibits cell migration and invasion in human osteosarcoma cells", *Cellular Physiology and Biochemistry*, 43: 553-567.
- [153] Budisan, L. Gulei, D. Jurj, A. Braicu, C. Zanoaga, O. Cojocneanu, R. Pop, L. Raduly, L. Barbat, A. ve Moldovan, A., (2019). "Inhibitory Effect of CAPE and Kaempferol in Colon Cancer Cell Lines—Possible Implications in New Therapeutic Strategies", *International journal of molecular sciences*, 20: 1199.
- [154] Bonuccelli, G. De Francesco, E.M. de Boer, R. Tanowitz, H.B. ve Lisanti, M.P., (2017). "NADH autofluorescence, a new metabolic biomarker for cancer stem cells: Identification of Vitamin C and CAPE as natural products targeting "stemness"", *Oncotarget*, 8: 20667.
- [155] Chereddy, K.K. Coco, R. Memvanga, P.B. Ucar, B. des Rieux, A. Vandermeulen, G. ve Pr at, V., (2013). "Combined effect of PLGA and

- curcumin on wound healing activity", *Journal of controlled release*, 171: 208-215.
- [156] Sarkar, A. Ghosh, S. Chowdhury, S. Pandey, B. ve Sil, P.C., (2016). "Targeted delivery of quercetin loaded mesoporous silica nanoparticles to the breast cancer cells", *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1860: 2065-2075.
- [157] Delgado, L. Fernandes, I. González-Manzano, S. de Freitas, V. Mateus, N. ve Santos-Buelga, C., (2014). "Anti-proliferative effects of quercetin and catechin metabolites", *Food & function*, 5: 797-803.
- [158] Braganhol, E. Zamin, L.L. Canedo, A.D. Horn, F. Tamajusuku, A.S. Wink, M.R. Salbego, C. ve Battastini, A.M., (2006). "Antiproliferative effect of quercetin in the human U138MG glioma cell line", *Anti-cancer drugs*, 17: 663-671.
- [159] Igbe, I. Shen, X.-F. Jiao, W. Qiang, Z. Deng, T. Li, S. Liu, W.-L. Liu, H.-W. Zhang, G.-L. ve Wang, F., (2017). "Dietary quercetin potentiates the antiproliferative effect of interferon- $\alpha$  in hepatocellular carcinoma cells through activation of JAK/STAT pathway signaling by inhibition of SHP2 phosphatase", *Oncotarget*, 8: 113734.
- [160] Ersoz, M. Erdemir, A. Duranoglu, D. Uzunoglu, D. Arasoglu, T. Derman, S. ve Mansuroglu, B., (2019). "Comparative evaluation of hesperetin loaded nanoparticles for anticancer activity against C6 glioma cancer cells", *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 47: 319-329.
- [161] Wong, M.L. ve Medrano, J.F., (2005). "Real-time PCR for mRNA quantitation", *Biotechniques*, 39: 75-85.
- [162] Jan, R., (2019). "Understanding apoptosis and apoptotic pathways targeted cancer therapeutics", *Advanced pharmaceutical bulletin*, 9: 205.
- [163] Das, S. Das, J. Samadder, A. Paul, A. ve Khuda-Bukhsh, A.R., (2013). "Efficacy of PLGA-loaded apigenin nanoparticles in Benzo [a] pyrene and ultraviolet-B induced skin cancer of mice: Mitochondria mediated apoptotic signalling cascades", *Food and chemical toxicology*, 62: 670-680.
- [164] Baharara, J. Namvar, F. Ramezani, T. Mousavi, M. ve Mohamad, R., (2015). "Silver nanoparticles biosynthesized using *Achillea biebersteinii* flower extract: apoptosis induction in MCF-7 cells via caspase activation and regulation of Bax and Bcl-2 gene expression", *Molecules*, 20: 2693-2706.
- [165] Goldar, S. Khaniani, M.S. Derakhshan, S.M. ve Baradaran, B., (2015). "Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment", *Asian Pac J Cancer Prev*, 16: 2129-2144.
- [166] Cai, J. Yang, J. ve Jones, D., (1998). "Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1366: 139-149.



- [167] Ripple, M.O. Abajian, M. ve Springett, R., (2010). "Cytochrome c is rapidly reduced in the cytosol after mitochondrial outer membrane permeabilization", *Apoptosis*, 15: 563-573.
- [168] Li, P. Zhou, L. Zhao, T. Liu, X. Zhang, P. Liu, Y. Zheng, X. ve Li, Q., (2017). "Caspase-9: structure, mechanisms and clinical application", *Oncotarget*, 8: 23996.
- [169] Twiddy, D. ve Cain, K., (2007). "Caspase-9 cleavage, do you need it?", *Biochemical journal*, 405: e1.
- [170] Ren, K.-W. Li, Y.-H. Wu, G. Ren, J.-Z. Lu, H.-B. Li, Z.-M. ve Han, X.-W., (2017). "Quercetin nanoparticles display antitumor activity via proliferation inhibition and apoptosis induction in liver cancer cells", *International journal of oncology*, 50: 1299-1311.
- [171] Tang, H. Yao, X. Yao, C. Zhao, X. Zuo, H. ve Li, Z., (2017). "Anti-colon cancer effect of caffeic acid p-nitro-phenethyl ester in vitro and in vivo and detection of its metabolites", *Scientific reports*, 7: 7599.
- [172] Paul, A. Das, S. Das, J. Samadder, A. ve Khuda-Bukhsh, A.R., (2013). "Cytotoxicity and apoptotic signalling cascade induced by chelidonine-loaded PLGA nanoparticles in HepG2 cells in vitro and bioavailability of nano-chelidonine in mice in vivo", *Toxicology letters*, 222: 10-22.

## Tezden Üretilmiş Yayınlar

---

**İletişim Bilgisi:** dilsu.colpan@gmail.com

### **Konferans Bildirileri**

1. Çolpan R.D., Erdemir A., "Kolon Kanseri Tedavisinde Kullanılmak Üzere Kuersetin-CAPE Yüklü Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu", 5.Biyomalzeme Günleri, İSTANBUL, TÜRKİYE, 22-23 Ekim 2018, ss.2-2.

2. Çolpan R.D., Erdemir A., "Kuersetin-CAPE Yüklü PLGA Nanopartiküllerin Kolon Kanser Hücre Hattında Sitotoksik Özelliklerinin Belirlenmesi", 31.Ulusal Kimya Kongresi, İSTANBUL, TÜRKİYE, 10-13 Eylül 2019, ss.404.

### **Projeler**

1. Çolpan R.D., Erdemir, A., "Kolon Kanser Hücre Hattında Nanopartiküler Sistemlerin Antikanser Aktivitesinin İncelenmesi", YTÜ BAP Y. Lisans, FYL-2019-3609.